Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Onderzoekingen over serumzuivering

https://hdl.handle.net/1874/292355

A. geu. 1925, 1928.

ONDERZOEKINGEN OVER SERUMZUIVERING

A. N. VERVEEN

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

ONDERZOEKINGEN OVER SERUMZUIVERING

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT
3969 4215

Diss Utrecht 1928

ONDERZOEKINGEN OVER SERUMZUIVERING

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS **DR. B. J. H. OVINK**, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP **DINSDAG 20 MAART 1928**, 'S NAMIDDAGS 4 UUR, DOOR

ARIE NICOLAAS VERVEEN

OFFICIER VAN GEZONDHEID 2DE KLASSE
BIJ HET NEDERLANDSCH-INDISCHE LEGER,
GEBOREN TE PURMEREND



1928
DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS, UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

Opgedragen aan mijn Moeder

Hooggeleerde ALDERSHOFF, Hooggeachte Promotor, het is mij een behoefte dit proefschrift te beginnen met een woord van hartelijken dank aan U, daar Gij het mij mogelijk maaktet om voor mijn vertrek naar Indië mijn studiën te voltooien. Dankbaar ben ik U voor het onderwerp, dat Gij mij ter bestudeering verschaftet. De vriendelijke omgang, dien Gij mij betoondet, zal in blijvende herinnering door mij bewaard worden.

Aan Zijne Excellentie den MINISTER VAN KOLONIËN ben ik grooten dank verschuldigd voor het verkrijgen van het benoodigde uitstel van vertrek naar Indië.

Gaarne maak ik van deze gelegenheid gebruik om aan U Hoogleeraren, Oud-Hoogleeraren, Lectoren en Privaatdocenten der Medische en Philosophische Faculteit te Utrecht, mijn oprechten dank te betuigen voor het onderwijs dat tot mijn vorming bijdroeg. In het bijzonder gedenk ik hierbij mijn leermeesters WINKLER en KOUWER, wier lessen ik nog het voorrecht heb gehad vele jaren te mogen volgen.

U, Hooggeleerde RINGER, ben ik bijzonderen dank schuldig. Zeer erkentelijk ben ik U voor de gastvrijheid, die ik in Uw laboratorium genoot. Zonder Uwe medewerking ware een belangrijk gedeelte van dit proefschrift achterwege gebleven. De mogelijkheid om electro-dialytische proeven te verrichten werd mij door U verschaft, en met groote welwillendheid verleendet Gij mij alle hulp, die ik noodig had.

U, Zeergeleerde PONDMAN, onderdirecteur van het R.S.I., dank ik voor de groote belangstelling, die Gij voor mijn werkzaamheden toondet en voor Uw hulp, waarop ik nooit tevergeefs een beroep deed. Uw collegiale omgang droeg er niet weinig toe bij, dat ik zulke aangename herinneringen behoud aan den tijd, dien ik in het R.S.I. doorbracht.

Voor de hulp, die Dr. FRANSSEN mij verleende ben ik hem zeer erkentelijk.

Geachte Mejuffrouw DE LIND VAN WIJNGAARDEN, Gij leerdet mij de techniek der serumzuivering in het R.S.I. nauwkeurig kennen; Uw ervaring kwam mijn onderzoek zeer ten nutte. Moge ik U ook aan deze plaats voor Uw hulpvaardigheid danken.

Tenslotte een woord van dank aan U, geachte vriend HAANTJES, voor de zorgen aan de uitvoering der teekeningen besteed.

INLEIDING

In ons land wordt sinds 1926 door het Rijks Serologisch Instituut „gezuiverd serum" verkrijgbaar gesteld. Dit gezuiverde serum is niet anders dan een oplossing van die eiwitfractie van het serum, die in tegenstelling met de andere serumeiwitten, sterk antitoxinehoudend is. Het oorspronkelijke serum wordt dus door een antitoxinerijke eiwitoplossing vervangen. Ten onrechte wordt dit eindproduct van de serumzuivering dan ook als serum, zij het „gezuiverd serum" aangeduid. Beter ware te spreken b.v. inplaats van „gezuiverd diphtherie-serum" van een geconcentreerde oplossing van diphtherieantitoxine of van pseudo-globulinum antidiphthericum, daar blijken zal, dat de pseudoglobuline de eiwitfractie is, waaraan het antitoxine voornamelijk gebonden is. *)

Niet alle sera komen voor zuivering in aanmerking. Vooral met diphtherie-serum en tetanus-serum worden practisch de beste resultaten verkregen, dus met de antitoxische sera. Bij de antibacterieele sera wordt minder succes gezien. Dit berust hierop, dat bij de antitoxische sera de specifieke antistof, het antitoxine, die over de prophylactische en therapeutische werking van het serum beslist, met de pseudoglobuline kan worden geïsoleerd. Bij de antibacterieele sera is het nog niet zeker uitgemaakt of de antistoffen ook in die mate aan de pseudoglobuline gebonden zijn. Althans de resultaten met de uit antibacterieele sera bereide pseudoglobulineoplossing wettigen het vermoeden dat ook binding aan andere eiwitten in sterkere mate aanwezig is.

*) Over de vraag of een onderscheiding van de globuline in euglobuline en pseudoglobuline recht van bestaan heeft, zie hoofdstuk IV.

Deelde *Seng* (1) *) reeds in 1899 mee, dat het antitoxine in de „in water oplosbare globuline" aanwezig is, *E. P. Pick* bevestigde (2) dat het de pseudoglobulinefractie is, waaraan het antitoxine is gebonden. Hij scheidde de serumeiwitten met ammoniumsulfaat en kon in de pseudo-globuline het antitoxine aantoonen. Sindsdien zijn deze onderzoekingen steeds bevestigd. *Ruppel* b.v. (3) vermeldt, dat bij diphtherie- en tetanus-serum de albuminefractie in het geheel geen antitoxine bevat, terwijl aan de euglobuline hoogstens 12—15 % van het antitoxine is gebonden.

Hoe men zich de binding van het antitoxine aan de eiwitten moet voorstellen en of andere stoffen hierbij een rol spelen, is nog niet bekend; ook tast men in het duister omtrent de natuur van het antitoxine. Sommigen zijn van meening, dat antitoxinen bepaalde substanties zijn, die door de eiwitmoleculen worden gebonden, anderen stellen zich voor, dat het antitoxine in wezen gelijk is aan pseudo-globuline, maar dat er bepaalde actieve eindgroepen in het eiwitmolecuul aanwezig zijn, waardoor de specifieke eigenschap ontstaat om toxine te neutraliseeren.

Stoffen, waarvan sommigen veronderstellen, dat ze invloed kunnen hebben, zijn de lipoiden. Zijn er chemisch tusschen de euglobuline en pseudoglobuline (zie hoofdst. IV) geen verschillen aantoonbaar, wel schijnt een deel der globuline, overeenkomend met de euglobuline, rijker te zijn aan lipoide stoffen. *Frankenthal* (4) o. a. onderzocht het verband tusschen serumlipoiden en eiwitten en bevestigde het onderzoek van *Miss Chick* (5), dat lipoiden voornamelijk in de globuline-fractie aanwezig zijn, en wel 't meeste in de euglobuline-fractie. Voor ons was ook zijn methode van onderzoek van belang: hij vergeleek onderling de uitkomsten, die hij verkreeg door met ammoniumsulfaat uit te zouten en electrodialytisch de globuline te verwijderen, om na te gaan of de gevonden hoeveelheid lipoiden met uitzouten gevolg was van

*) Cijfers verwijzen naar de literatuurlijst.

het neerslaan van het eiwit, waarbij mogelijkerwijs de lipoiden konden zijn meegesleept. Electro-dialytisch nu vond hij dezelfde hoeveelheid lipoiden aan de eiwitfracties als met uitzouten.

Op de vraag van welken aard het bindingsproces is van toxine door antitoxine, is nog geen afdoend antwoord te geven. Afgezien van het specifieke der reactie, waarover bijna niets bekend is, zijn de opvattingen verschillend. Volgens *Ehrlich* is het een zuiver chemische reactie, die in wezen overeenkomt met de neutralisatie van een zuur door een base.

Hiertegenover vat *Bordet* de reactie zuiver physisch-chemisch, als een adsorptie-proces op. Ertusschen staat de meening van *Arrhenius* en *Madsen*, die aannemen, dat er weliswaar een chemische reactie plaats vindt, maar dat zich een verschuifbaar evenwicht instelt.

Meer eenheid heerscht thans wel omtrent de opvatting, dat de gunstige werking der antitoxische sera in wezen berust op de binding van toxine door antitoxine; het antitoxine is zoowel prophylactisch als therapeutisch het alléén werkzaam bestanddeel van het serum. Werd dit in Duitschland het allereerst bewezen, in Frankrijk wordt nog aan de mogelijkheid van anti-bacterieele werking vastgehouden.

Von Behring (6) sloot aanvankelijk een antibacterieele werking niet uit, in vitro was ze weliswaar niet aantoonbaar, maar proeven van *Ransom* wezen op het bestaan ervan. *Ransom* ontdekte namelijk, dat avirulente diphtherie-bacillen, in de buikholte van een cavia gebracht, gephagocyteerd werden, en virulente niet. Voegde hij evenwel een kleine hoeveelheid antitoxine bij de bacillensuspensie dan werden ook de virulente bacillen door de phagocyten vernietigd.

In Frankrijk ontkende *Cruveilhier* (7) alle verband tusschen de werking van diphtherie-serum en het gehalte aan antitoxine. Volgens hem was titratie in het geheel geen maatstaf voor de werking van het serum. In proeven op caviae meende hij te kunnen vaststellen, dat zoowel prophylactisch als therapeutisch met sera van 200 A E in verreweg

de meeste gevallen betere resultaten werden verkregen dan met sera van 500 A E.

Kolle en *Schlossberger* (8) daarentegen toonden aan, dat door paarden alleen met levende virulente diphtherie-bacillen in te spuiten er een serum werd verkregen, dat bij konijnen en caviae een werking vertoonde, die volkomen parallel verliep met het gehalte aan antitoxine.

Sato (9) kon eveneens door proeven op konijnen aantoonen, dat een gunstige werking van diptherie-serum alleen afhankelijk was van de hoeveelheid antitoxine die werd ingespoten. Bovendien bleek hem het groote belang van zoo spoedig mogelijk na de injectie antiserum toe te dienen. Was kort na de injectie een geringe dosis antitoxine (200—250 A E) nog in staat genezing te brengen, na 8—12 uur waren hiertoe hoeveelheden van 1200—3600 A E noodig.

Franssen (10) komt in zijn proeven tot volkomen dezelfde resultaten.

Ook bij den mensch worden met serum-behandeling des te betere resultaten verkregen naarmate vroeger met de serumtherapie wordt begonnen. Zoo spoedig mogelijk moet het vereischte aantal A E worden toegediend. Niet onverschillig is het evenwel hoe groot de hoeveelheid vreemd eiwit is, die de benoodigde hoeveelheid antitoxine draagt. Een tijdlang meenden sommige onderzoekers, o. a. *Spronck*, en waarschijnlijk niet geheel ten onrechte, dat de aspecifieke prikkel door de vreemde eiwitten teweeggebracht, mede van gunstigen invloed was op het verloop van het ziekteproces, waardoor zelfs gemeend werd, dat het de voorkeur verdiende om sera met lagen titer in te spuiten *(Hamburger)* (11). Al mag dan ook de aspecifieke prikkel in die gevallen, waarin het serum therapeutisch wordt toegepast, nuttig zijn, daartegenover staat de veel grootere kans op serumziekte. Voor prophylactische doeleinden is de aspecifieke prikkel van geen waarde, zoodat dan het gebruik van *gezuiverd serum* aan te raden is, te meer daar *Franssen* (10) door proeven bij den mensch aantoonde, dat na prophylactische inspuiting met gezuiverd serum lange-

ren tijd antitoxine in het bloed aantoonbaar bleef dan dat met natuurlijk antitoxisch serum het geval was. De serumziekte is dan ook de reden waarom ernaar gestreefd wordt, het benoodigde antitoxine toe te dienen te zamen met zoo weinig mogelijk eiwit. De schadelijke bijwerkingen, die zoo dikwijls optreden bij serum inspuiten, zouden geheel verdwijnen, wanneer het mocht gelukken het antitoxine geheel van de pseudo-globuline, het heterologe eiwit, te scheiden. Aangezien het verkrijgen van antitoxine, gebonden aan homoloog eiwit, dat is van menschenserum, practisch onmogelijk is, moet getracht worden om de hoeveelheid antitoxine aan het heterologe eiwit zoo groot mogelijk te maken, opdat slechts weinig vreemd eiwit behoeft te worden ingebracht. Dit doel nu kan langs verschillende wegen worden bereikt. Verkeerd zou wezen om eenvoudig het serum te concentreeren, waardoor per cc. een hooger aantal A E te verkrijgen zou zijn, omdat dan ook de schadelijke bestanddeelen in de zelfde hoeveelheid aanwezig blijven en in dezelfde mate worden geconcentreerd. Beter is te trachten paardeserum met zoo hoog mogelijken titer te verkrijgen. Paarden, die niet in staat blijken om serum te produceeren met een hoogeren titer dan 300 A E per cc., worden dan ook voor dit doel uitgeschakeld.

De methode der serumzuivering nu stelt ons in staat, het aantal A E per c.c. aanmerkelijk op te voeren. Gebruik makend van het verschijnsel, dat de pseudo-globuline fractie voornamelijk het antitoxine-rijke eiwit is, wordt op verschillende manieren dit eiwit uit het serum afgezonderd, en wordt, aangezien de pseudoglobulinefractie 50—60 % van alle serumeiwitten uitmaakt, tenslotte een antitoxinerijke eiwitoplossing verkregen, die in verhouding tot het oorspronkelijke serum, eiwitarm genoemd mag worden.

Ten onrechte zou men kunnen meenen, dat het proces der antitoxine-concentratie of der serumzuivering, een geschikte methode is om sera met lagen titer toch nog bruikbaar te maken door het aantal A E op te voeren. Immers de oorspronke-

lijk geringe bezetting van de pseudoglobuline met antitoxine is een gebrek, dat ook door isoleeren der pseudo-globuline niet wordt opgeheven. Ook kan men geen antitoxine van het eene pseudoglobuline-deeltje op het andere overdragen, maar al kon dat, dan zou het nog niet helpen, want men zou toch, althans langs den weg der uitzouting, de antitoxine-rijke pseudoglobuline-deeltjes niet van de antitoxine-arme kunnen scheiden. Wel gelukt het b.v. uit een serum met een titer, die de helft van den vereischten bedraagt, een pseudoglobuline-oplossing te verkrijgen, die per cc. den juisten titer heeft, maar er is dan geen sprake van eiwitarme antitoxine-oplossing, en de beoogde voordeelen zullen derhalve uitblijven.

De wijze, waarop een geconcentreerde antitoxine-oplossing wordt verkregen, is in verschillende landen uiteenloopend. Hoofdzakelijk wordt langs twee wegen het doel bereikt. De eerste methode, waarbij neutrale zouten worden gebruikt om in bepaalde concentratie toegevoegd, neerslagen van de verschillende eiwitfracties te geven, wordt genoemd de *serumzuivering door uitzouten*. Deze methode wordt in het groot in Amerika toegepast, eveneens is ze gebruikelijk in Engeland en in ons land. Op geheel andere wijze wordt *electroosmotisch* het doel bereikt. Hierbij wordt de electrische stroom benut om uit een eiwit-oplossing de electrolyten te verwijderen, waardoor een neerslag der euglobuline optreedt. Deze methode der electroosmose, volgens gepatenteerde Duitsche voorschriften toegepast, begint tegenwoordig meer en meer veld te winnen. Zoo hebben het R. S. I. te Utrecht en het Instituut Pasteur te Bandoeng zich vrijheid van de toepassing dezer methode verzekerd. Zooals in hoofdstuk V zal worden toegelicht, wordt er eigenlijk ten onrechte van electroosmose gesproken, maar verdient het de voorkeur om van *electrodialyse* te spreken.

Volgens opgave van *Dieudonné* en *Weichardt* (12) wordt in Amerika op groote schaal de concentratiemethode van *Gibson* toegepast, waarbij met ammoniumsulfaat de eiwitfracties worden gescheiden. Allereerst wordt met $(NH_4)_2\ SO_4$

de globuline neergeslagen, die het antitoxine bevat. Het neerslag wordt in een verzadigde keukenzoutoplossing gebracht, waarin de euglobuline onopgelost blijft, terwijl de pseudoglobuline oplost. Na filtratie worden uit de verkregen oplossing van pseudoglobuline door dialyse de zouten verwijderd en zoo zou uit een serum met 400 A E per cc. een globulineoplossing te verkrijgen zijn met 2000 A E per cc.

Wadsworth (13) deelt daarentegen uitvoerig mede, hoe in Amerika in het groot alleen door uitzouten met ammoniumsulfaat de gewenschte concentratie der antitoxinen wordt bereikt. Eerst wordt $(NH_4)_2\ SO_4$ toegevoegd tot een concentratie van 30 % verzadiging, waarbij verwarmd wordt tot een temperatuur van hoogstens 60° C. Na filtratie wordt in het filtraat de concentratie van het $(NH_4)_2\ SO_4$ opgevoerd tot 48 % verzadiging, wat thans bij kamertemperatuur plaats vindt. Uit het neerslag wordt eerst door druk een deel van het zout verwijderd, waarna dialyse gedurende 9 dagen vrijwel alle $(NH_4)_2\ SO_4$ doet verdwijnen. Bij een lage temperatuur wordt de antitoxine-oplossing gedurende 2 maanden bewaard, waarna het neerslag dat opgetreden is tengevolge van de toegevoegde antiseptica wordt verwijderd.

Mac Conkey volgde in Engeland een gewijzigde methode van zuivering. Hij gebruikte namelijk Na_2SO_4 exsiccatus, dat het voordeel had gemakkelijker dialyseerbaar te zijn dan $(NH_4)_2SO_4$ en bovendien veel minder giftig was. Het nadeel is echter, dat men bij een temperatuur van 37° C. werken moet. Dit nadeel werd door zijn opvolger *Petri* zóó sterk gevoeld, dat deze weer tot de Amerikaansche methode met ammoniumsulfaat terugkeerde.

Door *Dr. Pondman* werd indertijd de Engelsche methode, waarbij dus van watervrij natriumsulfaat gebruik gemaakt wordt, bestudeerd en in het Rijks Serologisch Instituut ingevoerd. De steeds meer in ons land toepassing vindende gezuiverde sera, worden langs dezen weg verkregen.

De serumzuivering door uitzouten, zooals ze in het R. S. I. wordt toegepast, voert dan ook tot zeer bevredigende resul-

taten. Zonder dat er sprake is van een belangrijk antitoxine-verlies wordt uit het oorspronkelijke paardeserum met hoogen titer een eindproduct verkregen, dat de voordeelen heeft van zeer eiwitarm te zijn in verhouding tot den hoogen titer.

De methode door uitzouten wordt in Duitschland weinig verricht. (12) Algemeen wordt daar natuurlijk paardeserum gebruikt met hoogen titer (wettelijk minimum 350 A E per cc.). In de laatste jaren echter laat de Electro-osmose Gesellschaft te Berlijn door „Bram" te Oelzschau bij Leipzig electroosmotisch gezuiverde antitoxine-oplossing in den handel brengen. welk praeparaat door de staatscontrôle wordt toegelaten.

Ruppel is de grondlegger van de toepassing der electrodialyse bij de serumzuivering. In patentgeschriften is de methode beschreven, over de techniek is daarentegen in de wetenschappelijke vaktijdschriften weinig gepubliceerd.

Het doel kan worden bereikt met verschillende electrodialysatoren. Er wordt gesproken van een 3-cellen apparaat, waarin het toestel door 2 dialyseermembranen in 3 ruimten is gescheiden, waarvan de middelste het serum bevat en de buitenste ruimten de electroden; bovendien stroomt door de buitenste cellen steeds water met het doel om de stoffen, die bij een aangebracht potentiaal verschil door de membranen passeeren, af te voeren.

Tengevolge van de verwijdering der electrolyten uit de middenruimte, treedt hierin een uitvlokking der euglobuline op. De albumine kan daarna worden verwijderd door een 4-cellen apparaat te gebruiken. Het schijnt intusschen, dat de scheiding tusschen de pseudoglobuline en de albumine practisch op deze wijze niet wordt verricht, maar dat de albumine reeds vóórdat de euglobuline wordt neergeslagen door uitzouten uit het serum wordt verwijderd.

Tenslotte verkrijgt men een zuivere pseudo-globuline-oplossing volgens de mededeelingen van *Ruppel* (3). Alle stoffen met kleinere moleculen dan de eiwitten, die door de membranen worden tegengehouden, worden volgens *Ruppel* verwijderd. *Ruppel* schrijft, dat het eindproduct dan ook ge-

heel vrij is van electrolyten, aminozuren, albumosen en peptonen, „kurz von allen chemischen Individuen, deren Molecülgrösze kleiner ist als die der genuinen Proteine."

In de volgende hoofdstukken wordt nu de serumzuivering zooals deze in het R. S. I. wordt verricht, besproken, terwijl daarna enkele proeven over electro-dialyse worden medegedeeld, verricht met een electrodialysator, die, dank zij de welwillende medewerking van *Professor Ringer*, mij in staat stelde een denkbeeld te vormen over electro-dialytische serumzuivering.

HOOFDSTUK I

OVER DE VOORDEELEN VAN HET GEBRUIK VAN GEZUIVERD SERUM

De nadeelen, die dikwijls verbonden zijn aan het toedienen van natuurlijke sera, kunnen bij gebruik van gezuiverde sera aanmerkelijk worden verminderd. Algemeen heerscht hieromtrent thans geen twijfel meer. Aanvankelijk werd gemeend, dat alle bezwaren zouden uitblijven; dit bleek niet het geval te zijn. De voordeelen van gezuiverde sera wegen niettemin ruimschoots op tegen het veel zorg en tijd eischende zuiveringsproces. In Amerika worden bijna uitsluitend gezuiverde sera toegediend; daar bestaat blijkbaar geen twijfel meer omtrent de voordeelen.

Het belangrijkste resultaat, dat verkregen wordt is de vermindering van het aantal gevallen waarin serumziekte optreedt, en de lichtere graad waarin de verschijnselen zich vertoonen.

Als „serumziekte" werden indertijd door *v. Pirquet* en *Shick*, de verschijnselen samengevat, die na het inspuiten van soortvreemd serum bij den mensch kunnen optreden.

Het percentage der gevallen waarin serumziekte wordt waargenomen, geven verschillende onderzoekers zeer wisselend op. Spreken *Otto* en *Hetsch* (14) van ± 10 %, evenzoo *Gierthmüllen* (15); in ons land deelt *Herderschee* (25) mee in 75—81 % der gevallen serumziekte te hebben geconstateerd. Dit groote verschil berust hierop, dat in het laatste geval ook de lichte verschijnselen worden meegerekend.

De serumziekte treedt gewoonlijk op 8—10 dagen na de eerste seruminspuiting. De symptomen varieeren tusschen lichte verschijnselen (exantheem) en zwaardere (urticaria, gewrichtspijn, gewrichtszwellingen, oedemen, klierzwellingen, koorts). Met de serumziekte is tegelijk een tijdperk van overgevoeligheid ingetreden, dat weken blijft bestaan. Bijzondere voorzorgen moeten dan ook genomen worden, wanneer de serumtoediening herhaald wordt later dan 10 dagen na de eerste inspuiting. De dosis serum moet dan niet ineens, maar in kleine porties worden ingebracht (*Besredka*). Zoo wordt de kans op collaps en mors acuta, welk laatste verschijnsel gelukkig slechts zelden bij den mensch is opgetreden (sporadische gevallen beschreven door *Gaffky, Heubner* en *Herderschee*), tot een minimum beperkt. Als regel verraadt zich bij herhaalde inspuiting de toestand van overgevoeligheid door een spoediger en sterker optreden der verschijnselen van serumziekte, soms reeds op den 4den dag.

Dat ernstige anaphylactische verschijnselen bij den mensch zelden worden aangetroffen, berust ten deele hierop, dat de 2de inspuiting meestal kort na de eerste wordt gegeven.

Herderschee (25) toont aan, dat de hoeveelheid ingespoten serum niet onverschillig is, want na één inspuiting van 20 c.c. serum, werd 67 % serumziek; van hen, die den volgenden dag nogeens werden ingespoten 79 %; werd de inspuiting nog vaker herhaald, dan in 88 % der gevallen serumziekte.

Over de *aetiologie* der serumziekte is nog veel onbekend. Dat er een incubatietijd is, pleit voor de opvatting, dat het lichaam antistoffen heeft gevormd en door binding van deze antistoffen aan het heterologe eiwit de serumziekte uitbreekt.

Bij een herhaalde inspuiting ontstaan tengevolge van den allergischen toestand, waarin het organisme verkeert, de antistoffen sneller, en treden de verschijnselen zooveel spoediger en heftiger op. Deze voorstelling verklaart de verschijnselen echter niet; van een inzicht in het vraagstuk zijn we nog ver verwijderd.

Voor de meening, dat de vreemde eiwitten van groote be-

teekenis zijn bij het veroorzaken der serumziekte, pleiten de dierproeven, die aantoonen, dat heterologe eiwitten krachtige antigenen zijn. Naar het lichaamsgewicht berekend, wordt bij caviae b.v. veel grootere hoeveelheden ingespoten dan bij den mensch. Volgens *Dieudonné* en *Weichardt* (12), komt een inspuiting van 2 c.c. vreemd eiwit bij een cavia van 300 gram overeen met 500 c.c. bij een mensch van gemiddeld 75 K.G. gewicht. 't Behoeft dus niet te verwonderen, dat de verschijnselen bij de dieren zooveel heftiger zijn. Gemakkelijk gelukt het door een herhaald inspuiten het dier te dooden.

Uit onderzoekingen van *Dale* en *Hartley* (16); *Doerr* en *Berger* (17); *Ruppel, Ornstein, Carl* en *Lasch* (3) is nu gebleken, dat de verschillende serumeiwitten, de euglobuline, de pseudo-globuline en de albumine als antigenen niet dezefde waarde hebben. De krachtigste antigene werking vertoont euglobuline, daarna volgt pseudo-globuline, terwijl albumine de minste antigeenwerking heeft. Worden, volgens *Ruppel*, caviae ingespoten met zuivere isotonische albumine-oplossing, dan geeft herhaalde albumine-inspuiting slechts nu en dan anaphylactische verschijnselen, terwijl pseudo-globuline en euglobuline bij die vooraf met albumine ingespoten dieren typische anaphylaxie veroorzaken.

Worden de dieren vooraf met pseudoglobuline ingespoten, dan blijken ze anaphylactisch te zijn tegenover pseudo-globuline en euglobuline, maar niet tegenover albumine.

Met euglobuline-inspuiting worden de dieren anaphylactisch ten opzichte van eu- en pseudoglobuline, maar albumine brengt weer geen verschijnselen teweeg.

Deze proeven zijn van onmiskenbaar belang om een indruk te verkrijgen omtrent de betere resultaten, die met gezuiverd serum verwacht mogen worden.

Boencke en *Mouriz* (18) verrichtten dierproeven met gezuiverd en ongezuiverd serum en toonden aan, dat de anaphylactische verschijnselen bij gebruik van gezuiverd serum met hetzelfde eiwit-gehalte als het ongezuiverde, weliswaar blijven bestaan, maar toch in veel minder sterke mate op-

treden. Op grond van de antigeeneigenschappen der pseudo-globuline, mag van gezuiverd serum derhalve niet verwacht worden, dat alle allergische verschijnselen zullen uitblijven, maar zal, aangezien het sterkst werkend antigeen verwijderd is, wel een aanmerkelijke vermindering der anaphylactische verschijnselen verwacht mogen worden. Dit nu komt geheel met de klinische ervaringen overeen.

In het Wilhelmina-Gasthuis te Amsterdam verkreeg Dr. *Herderschee* de volgende resultaten (19): Van 200 patienten, die met 20—60 % natuurlijk diphtherieserum werden behandeld, trad in 81 % der gevallen serumziekte op. Allen kregen serumexantheem, meestal urticaria. Temperatuursverhooging trad 28 maal op, terwijl 9 maal gewrichtspijn, 1 maal erythema iridis en 1 maal na intraveneuze injectie een shock werd gezien.

In *156* gevallen, die met *door uitzouten gezuiverd serum* werden behandeld, daalde het aantal gevallen van serumziekte tot *53 %*, de verschijnselen waren hier veel minder sterk uitgesproken, slechts eenmaal werden gewrichtspijnen waargenomen.

Bij *159* met *electro-osmotisch gezuiverd serum* behandelde patienten waren de resultaten nog iets gunstiger, het percentage serumziekte daalde tot *43 %*, ook werd het ergste symptoom gewrichtspijnen in slechts één geval waargenomen. De zeer hevige urticaria, die bij het gebruik van natuurlijk serum veelvuldig voorkomt, werd in het geheel niet meer gezien.

Uit deze gegevens blijkt dus zeer duidelijk, dat het gebruik van geconcentreerde antitoxineoplossingen inplaats van natuurlijke sera, groote voordeelen heeft, waartoe bovendien gerekend mogen worden de *mogelijkheid van snellere resorptie* en *het kunnen volstaan met het inbrengen van kleinere hoeveelheden vloeistof*.

Het visceuze serum toch zal veel minder snel geresorbeerd kunnen worden dan de veel minder visceuze pseudo-globulineoplossing.

Bevindt zich de therapeutische dosis A. E. (3000—6000) in 10 c.c. serum, het gezuiverd praeparaat bevat in slechts 5 c.c. 3000—10.000 A. E.

Op de vraag, hoe het komt, dat met Electro-osmotisch gezuiverd serum, blijkens de gegevens, betere resultaten worden bereikt dan met het door uitzouten gezuiverd serum, wordt in hoofdstuk VIII nog nader teruggekomen.

HOOFDSTUK II

DE SERUMZUIVERING DOOR UITZOUTEN IN HET RIJKS SEROLOGISCH INSTITUUT

Het bloed der voor serumproductie gebezigde paarden wordt bij het aderlaten steriel opgevangen in flesschen, die ongeveer 1.5 L. kunnen bevatten. Na 2 dagen, wanneer de scheiding tusschen de cruor sanguinis en het serum, mede door doelmatige druk op de bloedkoek, is tot stand gekomen, wordt het serum afgeheveld in steriele flesschen van 10 L. inhoud. Aan de sera, die niet gezuiverd worden, voegt men 0.5 % superol toe; de sera, die voor zuivering bestemd zijn, worden zonder bederfwerend middel op een koele plaats en in het donker bewaard, totdat met de zuivering kan worden begonnen. Dit geschiedt zoo spoedig mogelijk; hoogstens duurt het eenige weken voordat een begin wordt gemaakt. De wijze van bloedaftappen geschiedt op een dusdanige steriele manier, dat bederf van het serum nooit optreedt.

Gewoonlijk wordt wekelijks een hoeveelheid serum van ± 6.50—7.50 L. gezuiverd en overeenkomstig hiermee is alles in het R.S.I. ingericht.

Alleen sera met hoogen titer worden voor zuivering gebruikt (zie blz. 13): meestal paardeserum, nu en dan ook schapenserum.

Behalve van diphtherie- en tetanusserum vindt sinds begin 1927 ook het zuiveren van roodvonkserum plaats, wat geschiedt in navolging van Amerikaansche onderzoekers.

Een afzonderlijke kamer in het R.S.I. is geheel voor de

serumzuivering ingericht. Een koel vertrek verdient aanbeveling, dus een kamer die op het noorden is gelegen, waar bovendien alle licht buitengesloten kan worden.

Aan een beschrijving der methode ga een kort overzicht vooraf.

Om de op blz. 15 genoemde redenen wordt geen ammoniumsulfaat, maar watervrij natriumsulfaat gebruikt voor de scheiding der serumglobuline en -albumine. Het zout voegt men tot een zoodanige concentratie toe, dat de globuline praecipiteert, terwijl de albuminerie in oplossing blijft. Voor het bereiken van deze zoutconcentratie is het noodig het serum vooraf te verwarmen tot 37° C. Door filtratie (1ste maal) verkrijgt men het neerslag der globuline, dat daarop weer in water van 37° C. wordt opgelost, waarna nogmaals natriumsulfaat tot de vereischte concentratie wordt toegevoegd om zooveel mogelijk de albumine te verwijderen.

Het neerslag wordt weer afgefiltreerd (2de maal) en opnieuw opgelost in water tot het dubbele van het oorspronkelijke volume serum. Dit geschiedt bij kamertemperatuur. Door nu keukenzout toe te voegen tot ongeveer de verzadigingsgrens is bereikt, ontstaat een troebeling tengevolge van het neerslaan der euglobuline. Door filtratie (3de maal) wordt dit neerslag verwijderd. Bij de verkregen heldere zoutoplossing wordt onder schudden ijsazijn gedaan tot een volume-percentage van 3 %, waardoor al het aanwezige eiwit, de pseudoglobuline, neerslaat. Opnieuw wordt gefiltreerd (4de maal). Het thans verkregen neerslag, waarin nog een groote hoeveelheid keukenzout, resten Na_2SO_4 en veel vloeistof aanwezig is, wordt door langzamerhand toenemende druk van deze bestanddeelen grootendeels bevrijd. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een *pers*, waarin het eiwit zoolang blijft, totdat het flink ingedroogd is. Dan lost men het in water op en verwijdert door dialyse het nog teveel aan zout.

Uit dit overzicht blijkt, dat tijdens het proces vier maal wordt gefiltreerd. Deze filtratie wordt altijd 's middags be-

gonnen en duurt tot den volgenden morgen; alle vloeistof is dan doorgeloopen. Daar de filtratie's telkens op de eerste vier dagen der zuivering plaats vinden, wordt steeds in het begin der week, bij voorkeur 's maandags met de zuivering begonnen. De bijzonderheden van elke phase der behandeling worden opgeteekend, zoodat men aan het einde een overzicht over het verloop van het proces heeft bij ieder bewerkt serum.

Begonnen wordt met nauwkeurig de hoeveelheid serum, die gezuiverd moet worden, te bepalen. Hiertoe wordt het geschonken in maatglazen van 1 liter inhoud, waarbij tevens met behulp van een areometer het soortelijk gewicht wordt vastgesteld. Vanuit de maatglazen schenkt men het in een Keulsche pot, die in een waterbad is geplaatst, dat op ongeveer 39° C. wordt verwarmd. Nu en dan wordt met een lepel geroerd, en deelt zich langzamerhand de temperatuur van het omringende water aan het serum mede.

Enkele kubieke centimeters serum worden gebruikt om de waterstofionenconcentratie te bepalen en het percentage eiwit, dat in het serum aanwezig is.

Het bepalen der Ph geschiedt langs colorimetrischen weg met nitrophenol als indicator. Gewoonlijk loopen de gevonden waarden zeer weinig uiteen; als regel is de Ph = 7.5—7.7.

Het begin soortelijk gewicht varieerde bij 34 bepalingen van 1.022 tot 1.030.

Het eiwitgehalte is aan tamelijk sterke wisselingen onderhevig; zoo bleek de laagste gevonden waarde 5.70 % (colipaard XVI, serumzuivering no. 92), de hoogste 8.76 % (diphtheriepaard XII, serumzuivering no. 100), te bedragen.

Heeft het serum een temperatuur van 37° C. bereikt, wat ongeveer na 1½ uur het geval is, dan wordt zooveel natriumsulfaat toegevoegd tot het s.g. tot 1.175 is gestegen. Volgens de Engelsche opgave komt dit s.g. overeen met een natriumsulfaatconcentratie van ± 18.5 %.

De practijk leerde in het R.S.I., dat de hoeveelheid natriumsulfaat ongeveer 20 % van de oorspronkelijke hoeveelheid

serum bedraagt, dus zal b.v. door aan 7.40 L. serum 1.470 K.G. zout toe te voegen het s.g. van 1.175 worden bereikt. Als regel wordt er eerst iets minder dan 20 % bijgedaan, in dit geval dus 10 gram minder.

Het afgewogen natriumsulfaat wordt bij het serum gevoegd terwijl voortdurend wordt geroerd. Het serum wordt sterk troebel door het neerslaan der globuline en terwijl van tijd tot tijd de vloeistof nogeens in beweging wordt gebracht en de temperatuur gecontroleerd, wordt na ongeveer 3 uur het soortelijk gewicht bepaald. Is dit juist 1.175, dan behoeft geen zout meer te worden toegevoegd. Bestaat er een klein verschil, is b.v. het s.g. 5 streepjes te laag, dan is op een hoeveelheid van ± 7 L. 30 gram zout voldoende om het vereischte s.g. te doen verkrijgen.

Ondertusschen is alles reeds voor de filtratie in gereedheid gebracht. Daar dit eveneens bij 37° C. moet geschieden, aangezien bij lagere temperatuur het zout uitkristalliseert, is in de serumkamer een groote stoof (1.3 M. × 0.6 M. × 0.8 M.) aanwezig, waarin de temperatuur steeds op 37° C. wordt gehouden. Hierin bevinden zich een 14-tal trechters. Nadat nu het zout aan het serum is toegevoegd, brengt men filters in deze trechters. Gefiltreerd wordt door doeken (z.g.n. „muslim"), niet door papier, wat het voordeel heeft, dat steeds opnieuw, na uitwasschen de filters gebruikt kunnen worden. De doeken worden vooraf in leidingwater vochtig gemaakt, om de filtratie vlotter te doen verloopen en worden dadelijk in de stoof gebracht, opdat ze warm zijn wanneer het serum straks wordt opgeschonken.

Heeft het serum na 3 uur het vereischte s.g. bereikt, dan wordt het op de filters gebracht, waarbij getracht wordt zoo snel mogelijk te werken, opdat de temperatuur in de stoof niet te veel daalt. Is alle serum op de doeken geschonken, dan wordt tot den volgenden morgen gewacht.

Op den 2den dag der zuivering is bijna alle vloeistof doorgeloopen en bevindt zich op de doeken een groot geel-wit neerslag van serumglobuline. Het, gewoonlijk in alle flesschen

heldere filtraat, dat de albumine benevens een groote hoeveelheid natriumsulfaat bevat, kan worden weggedaan. Enkele kubieke centimeters worden gebruikt om daarin de hoeveelheid eiwit, de albumine, te bepalen.

Om de nog achtergebleven resten van albumine te verwijderen wordt het neerslaan der globuline herhaald.

In het R.S.I. geschiedt dit als volgt: In de Keulsche pot wordt warm water gebracht tot een volume, dat 0.5 L. kleiner is dan het oorspronkelijke volume van het serum en weer wordt tot een temperatuur van 37° C. verwarmd. Het neerslag schept men nu met een lepel van de doeken en lost dit op in het warme water. Er ontstaat een opalesceerende vloeistof, waaraan thans weer natriumsulfaat wordt toegevoegd tot een s.g. van 1.175. De hoeveelheid natriumsulfaat die hiervoor noodig is bedraagt als regel 30 tot 60 gram meer dan de eerste maal.

Na ongeveer 3 uur wordt het s.g. bepaald en wanneer het tot 1.175 is gestegen, wordt opnieuw precies als de eerste maal gefiltreerd.

Den derden dag wordt het neerslag op de doeken beschouwd als alleen te bestaan uit serumglobuline. Evenals den vorigen dag wordt in enkele c.c. van het filtraat de hoeveelheid eiwit bepaald, waarna de rest weer verwijderd kan worden.

In een groote Keulsche pot van ± 20 L. wordt nu 2 maal zooveel leidingwater gebracht als het oorspronkelijke volumen van het serum bedroeg. Het globuline-neerslag lost hierin gemakkelijk op en thans is het doel uit de globuline de euglobuline te verwijderen, zoodat de pseudoglobuline, die het meeste antitoxine (80—90 %) bevat, alleen wordt overgehouden. Men bereikt dit door natriumchloride toe te voegen; immers slaat een deel der globuline, de euglobuline voornamelijk, bij verzadiging met NaCl neer. Dit gebeurt reeds bij kamertemperatuur, zoodat verwarming bij het verdere deel der zuivering niet meer noodig is.

De concentratie van het natriumchloride wordt weer uit-

gedrukt in het soortelijk gewicht, dat namelijk moet worden opgevoerd tot 1.205. 't Bleek, dat de benoodigde hoeveelheid zout ongeveer benaderd wordt door erbij te doen 38.5 %, berekend naar het dubbele volume water: b.v. bedroeg de hoeveelheid serum oorspronkelijk 7.40 L., dan werd het 2de neerslag met natrium-sulfaat dus opgelost in 14.80 L. leidingwater, en was de hoeveelheid natrium-chloride, die toegevoegd moest worden tot een s.g. van 1.205: $\frac{38.5}{100} \times 14.80 = 5.698$ K.G.

Weer wordt ongeveer 3 uur gewacht en van tijd tot tijd geroerd. Het door het natriumchloride opgetreden neerslag wordt daarna door filtreeren verwijderd, bovendien wordt behalve de euglobuline alle verontreiniging tegengehouden, die eventueel in het zout aanwezig was en wordt een geheel helder filtraat verkregen, dat van de eiwitten alleen nog de pseudoglobuline bevat, maar sterk zouthoudend is door natriumsulfaat en natriumchloride.

Van deze heldere vloeistof wordt het eiwitgehalte in enkele c.c. bepaald en tevens nauwkeurig het volume gemeten. Zoo is men in staat om uit te rekenen hoeveel eiwit uit het serum door uitzouten is verwijderd.

De pseudoglobuline bevindt zich evenwel thans in een groot volume vloeistof, het percentage eiwit wisselt ongeveer tusschen 1.25 en 1.75, zoodat het noodig is, niet alleen de zouten grootendeels te verwijderen, maar ook een veel geconcentreerder oplossing te verkrijgen.

Dit wordt bereikt door onder schudden ijsazijn tot 3 $^0/_{00}$ aan de zouthoudende eiwitoplossing toe te voegen. De pseudoglobuline slaat hierdoor volledig neer. Opnieuw wordt gefiltreerd (4de maal) en het filtraat op eiwit onderzocht. Hoogstens bevat dit sporen eiwit.

Het neerslag der pseudoglobuline blijft op de filters achter als een dik, wit, kaasachtig neerslag. Nadat de vloeistof zooveel mogelijk is doorgeloopen, worden de filters opengeslagen

en twee aan twee zoo op elkaar gelegd, dat zich tusschen 2 filters een laag neerslag bevindt.

De grootste hoeveelheid vocht wordt nu verwijderd door telkens twee filters in een dubbelgevouwen doek te leggen, en deze alle op elkaar te plaatsen. Door het eigen gewicht trekt zoo reeds een belangrijk gedeelte der vloeistof en der zouten in de doeken, die van tijd tot tijd door versche worden vervangen.

Na ± 24 uur worden de filters in de pers gebracht, een houten pers, waarmee aanvankelijk weinig druk wordt uitgeoefend. Telkens wanneer de doeken vochtig zijn, worden ze vervangen door andere, totdat ze geen vocht meer opnemen.

Langzamerhand wordt krachtiger druk uitgeoefend, totdat na ongeveer 8 dagen de pseudoglobuline sterk is ingedroogd. De kaasachtige witte massa is veranderd in een grijs-gele, brokkelige substantie, terwijl vooral aan de randen min of meer doorschijnende schilfers te zien zijn. Wanneer dit laatste verschijnsel begint op te treden, wordt het eiwithoudende neerslag van de filters verwijderd en afgewogen in hoeveelheden van ongeveer 500 gram, die elk voor zich opgelost worden in gedestilleerd water, tot het volume in liters het dubbele bedraagt van het gewicht aan eiwit (in K.G.), dus wordt 500 gram eiwit in 1 liter gedestilleerd water opgelost. Hieraan wordt toegevoegd 5½ % soda (poeder), welk percentage berekend is naar de gewichtshoeveelheid eiwit, en *niet* naar het volumen water, waarin het eiwit is opgelost.

Het oplossen geeft nog al eens moeilijkheden, daar kleine stukjes eiwit vaak onopgelost blijven en het niet gelukt deze in oplossing te brengen.

Door dialyse wordt tenslotte het teveel aanwezige zout verwijderd. Aangezien natriumsulfaat niet giftig is en sneller dialyseert, kan met dialyse gedurende korteren tijd dan bij uitzouten met ammoniumsulfaat het geval is, worden volstaan.

De ervaring leert, dat na een dialyse gedurende twee maal

24 uur ongeveer de goede NaCl-concentratie wordt bereikt. Gebruikt worden dialyseerzakken van perkamentpapier. Het perkamentpapier wordt, na eerst gecontroleerd te zijn op de aanwezigheid van kleine gaatjes (tegen het licht houden is practisch voldoende om eventueel gaatjes op te sporen), vooraf in water goed vochtig gemaakt, waarna de dialyseerzakken worden gevouwen.

Gedialyseerd wordt in langzaam stroomend leidingwater in een groote dialyseerbak (1 × 0.5 × 0.25 M.) en nauwkeurig wordt alle licht gedurende de dialyse buitengesloten.

Het volume der vloeistof neemt gedurende de dialyse gemiddeld met ± 30 % toe, zorg wordt gedragen het waterniveau steeds zoo te wijzigen, dat de vloeistof in de zakken voor ongeveer $^1/_3$ gedeelte in het stroomende water zijn ondergedompeld.

De vloeistof wordt na 2 × 24 uur overgebracht in een steriele flesch van 5 liter en vervolgens zooveel van een verdunde natronloogoplossing toegevoegd tot een Ph van ± 7.6 is bereikt. De vloeistof, die aanvankelijk troebel was, wordt hierdoor ten deele helder. Als conserveeringsmiddel wordt er daarna onder krachtig schudden 8 $^0/_{00}$ van een mengsel van gelijke hoeveelheden trikresol en aether bij gedaan.

De zoo verkregen licht troebele pseudoglobulineoplossing wordt nu gedurende 2 maanden in de ijskast bewaard. In dien tijd vormt zich een dik bezinksel op den bodem der flesch. Nu wordt de bovenstaande heldere vloeistof afgeheveld, en door een E.K.-filter gefiltreerd.

Hierna is de steriele geconcentreerde pseudoglobulineoplossing verkregen, die een hoog Antitoxine gehalte bezit en die vervolgens in ampullen wordt overgebracht.

Uit een hoeveelheid serum van b.v. 7.50 L. kan zoo door deze methode van serumzuivering een hoeveelheid antitoxine oplossing worden verkregen van ± 2.75 L., waarvan het eiwitgehalte b.v. 10 % is en die een sterkte kan hebben van 900—2000 A.E., al naar den titer van het oorspronkelijke serum.

HOOFDSTUK III

ONDERZOEKINGEN NAAR AANLEIDING VAN DE SERUMZUIVERING DOOR UITZOUTEN

De serumzuivering zooals deze in het R. S. I. wordt verricht, geeft gelijk wij reeds vermeldden, bevredigende resultaten. Het doel om een eiwitarme oplossing te verkrijgen met een hoog antitoxinegehalte wordt bereikt, zonder dat het eiwitgehalte een maximum grens van 10—12 pCt. overschrijdt. (In Duitschland mag het eiwitgehalte wettelijk niet hooger zijn dan 12 pCt.) Zoo kan uit diphtherieserum met hoogen titer een pseudoglobulineoplossing worden bereid, die per cc. zelfs 2000 A. E. bevat. Bedraagt b.v. de titer van het serum, dat gezuiverd wordt 900 A. E. en is het pseudoglobulinegehalte 4 pCt., dan kan een pseudoglobulineoplossing worden verkregen, die bij een eiwitgehalte van 12 pCt. 2000 A. E. per cc. bevat, *waarbij rekening is gehouden met antitoxineverlies bij de zuivering.*

De bereiding van antitoxineoplossingen uit sera door uitzouten gaf aanleiding tot eenige vragen, waarvan de beantwoording veel werk en tijd vereischte. Het scheen mij van belang deze vraagpunten nader onder de oogen te zien, vandaar dat ik aan het verzoek daartoe gaarne voldeed. Het was mijn streven om althans op eenige vragen een antwoord te geven. Mocht ik in het een en ander geslaagd zijn, veel en misschien het voornaamste moest ik laten rusten.

Het belangrijkste, waarmee ik mij slechts op kleine schaal bezig hield, was het onderzoek naar de verdeeling van het

antitoxine over de verschillende eiwitfracties van het paardeserum. Voor de serumzuivering was het van het grootste belang om uit te maken, of door het zuiveren niet een belangrijk percentage van het oorspronkelijk aanwezige antitoxine wordt verwijderd en of op grond daarvan een wijziging der zoutconcentraties aanbeveling verdiende. Het zou immers mogelijk kunnen zijn, dat met de albumine- of euglobulinefractie, of met beide, een te groot gedeelte van het antitoxine werd weggedaan.

Volgens opgave van *Ruppel* c.s. (3) vindt bij den langs electro-dialytischen weg verrichte zuivering een verlies van ten hoogste 20 pCt. plaats, terwijl in het R. S. I. niet precies bekend is hoe groot het verlies is en of bij verschillende sera de verliezen sterk uiteenloopen. Omgekeerd kan gevraagd worden of het niet mogelijk is, dat bij het uitzouten nog eiwitten achterblijven, die voor de immuniseering geen beteekenis hebben.

Deze belangrijkste vragen worden in dit proefschrift echter slechts zeer onbevredigend beantwoord. De oorzaak hiervan ligt in het groote aantal dierproeven, dat zulk een onderzoek zou eischen. Immers geven alleen dierproeven betrouwbare uitkomsten, wanneer de sterkte van het serum moet worden bepaald; en aangezien voornamelijk diphtherieserum gezuiverd wordt zou een zeer groot materiaal aan caviae, alle van een gewicht van ongeveer 250 gram, noodig geweest zijn. Deze waren niet tot mijn beschikking.

Behalve de genoemde vragen bleven er echter nog verschillende over, die een onderzoek wettigden.

Zooals reeds werd medegedeeld, wordt in het R. S. I. in navolging van de Engelsche methode, watervrij natriumsulfaat gebruikt om de scheiding tusschen de globuline en de albumine tot stand te brengen.

Al dadelijk valt als een verschil met de Engelsche methode op, dat het natriumsulfaat in het R. S. I. aan *serum* wordt toegevoegd, terwijl in Engeland en eveneens in Amerika *bloedplasma* wordt gebezigd.

In Engeland wordt het bloed opgevangen in flesschen van 2 liter, waarin vooraf 20 cc. van een 10 pCt. kaliumoxalaat-oplossing is gebracht, en na goed schudden blijven de flesschen een nacht bij kamertemperatuur staan, waarna het plasma wordt afgeheveld. Evenals in het R. S. I. het serum tot 37° C. wordt verwarmd, brengt men daar het plasma op diezelfde temperatuur en voegt vervolgens natriumsulfaat toe tot een s.g. van 1.175. *Mac Conkey* deelde mede, dat met dit s.g. een zoutconcentratie overeenkomt van ongeveer 18.5 gram natriumsulfaat per 100 cc.

Onderzocht werd nu of zonder meer bij *serum* tot een zelfde s.g. van 1.175, natriumsulfaat kan worden toegevoegd evenals dit bij *plasma* geschiedt; en of de bereikte zoutconcentratie 18.5 pCt. bedraagt.

Tot dit doel werd een hoeveelheid bloedplasma en bloedserum van één aderlating afkomstig (tetanusserum paard XVII), met elkaar vergeleken. Voor het verkrijgen van het serum werd het bloed op de gebruikelijke manier (zie blz. 23) behandeld, voor het plasma werd het bloed opgevangen in een litersflesch, waarin 10 cc. van een 10 pCt. kaliumoxalaat oplossing was gedaan en na 10 minuten krachtig schudden de flesch weggezet. Na 2 dagen werden serum en plasma afgeheveld.

Een groot verschil in het s.g. van plasma en serum mocht niet verwacht worden. Immers verschillen in samenstelling bestaan in hoofdzaak slechts in de aanwezigheid van fibrinogeen in het plasma, waarvan in het serum slechts sporen aantoonbaar zijn. (20). Bij kamertemperatuur (16° C.) werd van beide het s.g. bepaald:

Van het plasma bedroeg dit 1.025.

Van het serum bedroeg dit 1.026.

Een uitgesproken verschil in het s.g. was dus niet aanwezig. De kleur van het plasma was roodachtig, van het serum geel. Het plasma scheen mij minder visceus te zijn dan het serum; dit werd echter niet nader onderzocht.

Om na te gaan of de invloed van het toevoegen van na-

triumsulfaat op het s.g. van plasma en serum dezelfde was, werden twee maatglazen van 500 cc. grootendeels respectievelijk met plasma en serum gevuld en geplaatst in een waterbad van 37—38° C. Nadat de temperatuur van plasma en serum gestegen was tot 37° C. werd in beide maatglazen 92.5 gram watervrij natriumsulfaat gebracht en met plasma resp. serum aangevuld tot 500 cc., zoodat in beide de zoutconcentratie gelijk was, namelijk 18.5 pCt.

Een sterke uitvlokking der globuline trad op. In beide maatglazen werd door roeren voor goede vermenging zorg gedragen en van tijd tot tijd het s.g. bepaald. Telkens vóór het vaststellen van het s.g. werd de temperatuur gecontroleerd en de vloeistof geroerd met een glazen staaf. De areometer werd vooraf verwarmd in warm water en na afgedroogd te zijn, in de vloeistof gebracht.

Een overzicht geeft tabel 1.

TABEL 1

	Temp. in graden C.	Soortelijk Gew. Plasma	Soortelijk Gew. Serum
Vóór het toevoegen van Na_2SO_4	16	1.025	1.026
1/4 uur na „ „ „ „	37	1.160	1.061
1/2 „ „ „ „ „ „	37	1.162	1.167
3/4 „ „ „ „ „ „	37	1.165	1.168
1 „ „ „ „ „ „	37	1.165	1.168
2 „ „ „ „ „ „	37	1.166	1.170
2½ „ „ „ „ „ „	37	1.167	1.171
3 „ „ „ „ „ „	37	1.167	1.171

Allereerst valt op, dat het een groot verschil oplevert, of men het s.g. korten tijd na het toevoegen van natriumsulfaat bepaalt, dan wel of langeren tijd gewacht wordt. Duidelijk blijkt, dat eerst na 2½ uur in beide gevallen de juiste waarde wordt gevonden.

Verder toont deze tabel aan, dat het kleine verschil in s.g. dat aanvankelijk bestond, 15 minuten na het toevoegen van

natriumsulfaat nog aanwezig is. Na langeren tijd wordt dit verschil evenwel grooter, totdat bij den bereikten eindtoestand het s.g. van het serum duidelijk hooger is dan van het plasma. Dit zou erop kunnen wijzen, dat, om een bepaald s.g. te bereiken, er aan plasma iets meer natriumsulfaat dient toegevoegd te worden dan aan serum en zou dus de bereikte zoutconcentratie in Engeland met plasma iets hooger zijn dan in het R. S. I. met serum. Intusschen is het verschil niet groot.

Ook laat de tabel duidelijk zien, dat bij een natriumsulfaat concentratie van 18.5 pCt. noch bij het plasma noch bij het serum een s.g. van 1.175 wordt bereikt.

De Engelsche opgave, dat het bereikte s.g. van 1.175 overeenkomt met een natriumsulfaatconcentratie van ongeveer 18.5 pCt. is dus niet geheel juist; de concentratie is hooger.

Terecht rijst de vraag, of de areometermethode een geschikte methode is om het s.g. van colloidale vloeistoffen te bepalen. In ieder geval moet steeds minstens 2½ uur gewacht worden, voordat het s.g. wordt afgelezen. Alleen dan worden waarden gevonden, die betrouwbaar zijn en onderling zeer goed te vergelijken.

Blijkt uit de tabel, dat een natriumsulfaatconcentratie van 18.5 pCt. het serum een s.g. van 1.171 doet verkrijgen, zoo vragen we thans hoeveel natriumsulfaat in het R. S. I. wordt toegevoegd om een s.g. van 1.175 te doen bereiken.

In tabel 2 wordt aangegeven de hoeveelheden serum, die in de verschillende gevallen van serumzuivering werden behandeld, het begin s.g. en het aantal grammen natriumsulfaat, dat noodig was om het vereischte s.g. van 1.175 te bereiken. Bovendien bevat de laatste kolom cijfers, die aangeven hoe groot het percentage natriumsulfaat was, wanneer dit berekend werd naar het *beginvolume*.

Uiteraard geeft dit getal het werkelijke percentage niet weer, dit laatste is tengevolge der volumetoename na het

toevoegen van natriumsulfaat, kleiner dan de hier vermelde cijfers.

TABEL 2

No. der Serum-zuivering	Liters Serum	Begin S.G.	K.G. Na_2SO_4	% Na_2SO_4 berekend naar het beginvolume
107	3.88	1.025	0.780	20.10
108	6.96	1.025	1.410	20.26
109	6.72	1.028	1.340	19.94
111	6.52	1.024	1.330	20.40
112	6.48	1.028	1.310	20.21
113	6.60	1.028	1.320	20.—
114	6.56	1.026	1.300	19.82
115	6.32	1.029	1.260	19.93
116	7.40	1.030	1.470	19.86
117	7.78	1.028	1.545	19.86
118	5.42	1.026	1.100	20.29
119	6.30	1.026	1.252	19.87

Uit deze cijfers blijkt, dat het percentage natriumsulfaat berekend naar het *beginvolume*, ongeveer 20 pCt. bedraagt, nu eens is wat meer natriumsulfaat noodig, dan weer iets minder. In het R. S. I. wordt steeds 3 uur gewacht voordat het s.g. wordt afgelezen en wordt steeds nauwkeurig tot dit s.g. natriumsulfaat toegevoegd, zoodat de cijfers geheel betrouwbaar zijn.

Hierop afgaande trachtten we allereerst na te gaan hoe het komt, dat het gevonden percentage wisselingen vertoont, die blijkens de tabel varieeren tusschen 19.82 en 20.40 pCt.

De verschillende invloeden, die hierbij een rol kunnen spelen zijn:

1. De temperatuur.
2. Het volume van het serum dat gezuiverd wordt.
3. Invloeden in het serum gelegen, o.a. het begin soortelijk gewicht van het serum.
4. Invloeden in het zout gelegen.

Aangezien steeds bij een temperatuur van 37° C. wordt gewerkt, kan de temperatuurinvloed worden uitgesloten.

Eveneens behoeft geen rekening gehouden te worden met mogelijke veranderingen van het natriumsulfaat: eerstens is dit zout zeer zuiver aanwezig en in de tweede plaats is het watervrij. Door de verpakking en door het te bewaren op een droge plaats is slechts geringe invloed van vocht op het zout mogelijk.

Daar de gevolgde methode steeds dezelfde was, namelijk bepaling van het s.g. met den areometer, altijd 3 uur na toevoeging van natriumsulfaat bij een temperatuur van 37° C., blijven derhalve twee mogelijkheden over:

1. De invloed van het beginvolume, dat steeds verschillend is.
2. De mogelijke invloed van eigenschappen van het serum, waarvan we de rol die het s.g. speelt kunnen volgen.

Onwaarschijnlijk is, dat het getal, dat aangeeft het percentage toegevoegd natriumsulfaat uitgedrukt in het begin volume, beïnvloed wordt door de hoeveelheid serum, die wordt gezuiverd. Aan 10 liter serum zal 2 maal zooveel watervrij natriumsulfaat moeten toegevoegd worden als aan 5 liter serum; in het eerste geval zal de volumetoename 2 maal zoo groot zijn als in het tweede geval, wanneer in beide gevallen dezelfde zoutconcentratie wordt bereikt.

Ook blijkt uit tabel 2, dat het beginvolume er niet toe doet, want bij 3.88 liter (No. 107) werd 20.10 pCt. van het beginvolume toegevoegd en bij ongeveer het dubbele, 7.78 liter (No. 117) 19.86 pCt., dus geen verschil overeenkomstig het volumeverschil.

Rangschikken we volgens het s.g., dan blijkt onmiskenbaar de invloed, die het begin s.g. van het serum heeft op de getallen die het percentage natriumsulfaat aangeven, berekend naar het oorspronkelijke volume (zie tabel 3).

TABEL 3

No. der Serum-zuivering	Liters Serum	Begin S.G.	% Na_2SO_4 berekend naar het begin-volume
95	8.28	1.022	20.60
92	8.05	1.023	20.74
11	6.52	1.024	20.40
97	8.66	1.024	20.20
107	3.88	1.025	20.10
108	6.96	1.025	20.26
118	5.42	1.026	20.29
102	8.30	1.027	20.24
103	8.66	1.027	20.20
112	6.48	1.028	20.21
117	7.78	1.028	19.86
109	6.72	1.028	19.94
113	6.60	1.028	20.—
115	6.32	1.029	19.93
116	7.40	1.030	19.86

Naarmate het s.g. van het oorspronkelijke serum lager is moet meer natriumsulfaat worden toegevoegd en omgekeerd. Bij een s.g. van 1.030 werd als minimum 19.86 pCt. natriumsulfaat toegevoegd. De aanwezige onregelmatigheden moeten waarschijnlijk aan kleine onnauwkeurigheden bij het toevoegen van het natriumsulfaat worden toegeschreven. Wanneer b.v. het s.g. van 1.175 na 3 uur niet precies bereikt is, kunnen gemakkelijk verschillen optreden, omdat de dan nog toe te voegen hoeveelheid natriumsulfaat moeilijk te bepalen is.

De mogelijkheid om uit de verslagen der serumzuivering den invloed van het s.g. te kunnen aantoonen, wijst op de nauwkeurigheid waarmee de serumzuivering wordt verricht.

Het soortelijk gewicht van het serum is dus van invloed op de zoutconcentratie, die wordt bereikt door natriumsulfaat toe te voegen tot een s.g. van 1.175. Ook de *werkelijke zoutconcentratie* zal hierdoor wisselen en wel zal bij serum

met een laag begin s.g. een hoogere zoutconcentratie worden verkregen dan bij serum met een hoog begin s.g. Volgens de getallen, die het percentage natriumsulfaat aangeven berekend naar het beginvolume, bedraagt deze wisseling ten hoogste ongeveer 1 pCt.

Waar derhalve blijkt, dat de methode, om met het s.g. als maatstaf de zoutconcentratie te bepalen, tot varieerende concentratie's aanleiding geeft, zou men geneigd zijn deze methode prijs te geven en een betere te zoeken. Echter is deze niet gemakkelijk te vinden. De hoeveelheid natriumsulfaat te berekenen naar het beginvolume zou eenvoudiger en nauwkeuriger wezen, mits we steeds zeker zijn, dat het zout werkelijk watervrij is. Uiteraard is zekerheid hieromtrent moeilijk te verkrijgen.

Een mogelijkheid zou wezen om bij het te bereiken s.g. een correctie aan te brengen; b.v. zou men bij het gemiddelde begin s.g. natriumsulfaat kunnen toevoegen tot een s.g. van 1.175 en bij lager of hooger begin s.g. tot een soortelijk gewicht lager respect. hooger dan 1.175; b.v. als volgt:

bij een begin s.g. van 1.022 tot een s.g. van 1.172.
bij een begin s.g. van 1.026 tot een s.g. van 1.175.
bij een begin s.g. van 1.029 tot een s.g. van 1.179.

Ongetwijfeld werd dan een meer constante werkelijke concentratie verkregen.

Met deze correctie geeft het s.g. een ten naaste bij constant werkelijk percentage natriumsulfaat.

Thans zullen we de vraag beantwoorden tusschen welke waarden het werkelijke percentage varieert. Aangezien tabel 1 aantoonde, dat een concentratie van 18.5 pCt. wordt overschreden, ligt de werkelijke concentratie dus tusschen 18.5 en 19.86—20.74 pCt.

Uit tabel 1, waar sprake is van serum met een begin s.g. van 1.026 volgt, dat een werkelijke natriumsulfaatconcentratie van 18.5 pCt. reeds een s.g. van 1.175 kan doen bereiken, wanneer het begin s.g. van het serum 1.030 bedraagt.

terwijl bij een begin s.g. van 1.022 vermoedelijk bij een concentratie van 18.5 pCt. het s.g. zou gestegen zijn tot 1.167. In ieder geval daalt de zoutconcentratie nooit beneden een werkelijk percentage van 18.5 wanneer tot een s.g. van 1.175 natriumsulfaat wordt toegevoegd.

De werkelijke zoutconcentratie kan op eenvoudige wijze worden bepaald door het volume te meten, nadat het natriumsulfaat is toegevoegd. De sterke schuimvorming, die hierbij optreedt, maakt het moeilijk de volumetoename nauwkeurig te meten: groote fouten zijn hierbij niet te vermijden.

Enkele voorbeelden mogen volgen:

Serumzuivering. No. 116. Diphtherieserum paard IV.

De hoeveelheid serum bedraagt 7.40 liter.
Het begin s.g. is 1.030.
Toegevoegd wordt 1470 gram natriumsulfaat, d.i. 19.86 pCt. van het beginvolume.
Het volume wordt ongeveer 7.85 liter. Het werkelijke percentage bedroeg dus ongeveer 18.7 pCt.

Serumzuivering. No. 118. Tetanusserum paard XVII.

De hoeveelheid serum bedraagt 5.42 liter.
Begin s.g. 1.026.
Toegevoegd wordt 1100 gram natriumsulfaat d.i. 20.29 pCt.
Het volume wordt ongeveer 5.70, het werkelijke percentage bedroeg 19.3 pCt.

In verschillende gevallen werd zoo het werkelijke percentage bepaald, maar dikwijls waren de uitkomsten onbetrouwbaar door de moeilijkheid om nauwkeurig het volume te meten. Hoewel evenmin absoluut betrouwbaar, geven bovenstaande voorbeelden een indruk van de wisselingen die het werkelijke percentage ondergaat. Uit deze voorbeelden blijkt weer het lagere werkelijke percentage bij een hoog begin s.g.

van 1.030, en een hoogere waarde bij een s.g., dat ongeveer als gemiddelde mag gelden, n.l. 1.026.

Langs anderen weg werd eveneens het werkelijke percentage in één geval vastgesteld.

Aan diphtherieserum van paard XII (serumzuivering No. 114) werden stijgende hoeveelheden natriumsulfaat toegevoegd en nagegaan bij welke concentratie het s.g. van 1.175 werd bereikt. Nadat het serum, waarvan 6.56 liter aanwezig was, op 37° C. was verwarmd, werd in een maatglas van 1 liter 130 gram natriumsulfaat afgewogen, en vervolgens tot 1 liter met serum bijgevuld en het maatglas in een waterbad van 38° C. geplaatst. Door goed te roeren werd de vloeistof diffuus troebel en na 15 minuten werd het s.g. bepaald, terwijl de temperatuur van het serum 37° C. bedroeg. Vervolgens werd in een tweede maatglas 150 gram natriumsulfaat afgewogen en op gelijke wijze het s.g. na ¼ uur bepaald. Zoo ook werd met 170, 190, 200 en 220 gram de proef herhaald, en telkens na ¼ uur het s.g. afgelezen. Bovendien bleven de maatglazen, waarin 130 gram, 190 gram en 200 gram natriumsulfaat was gebracht, gedurende 3 uur bij 37° C. staan en werd toen het s.g. bepaald.

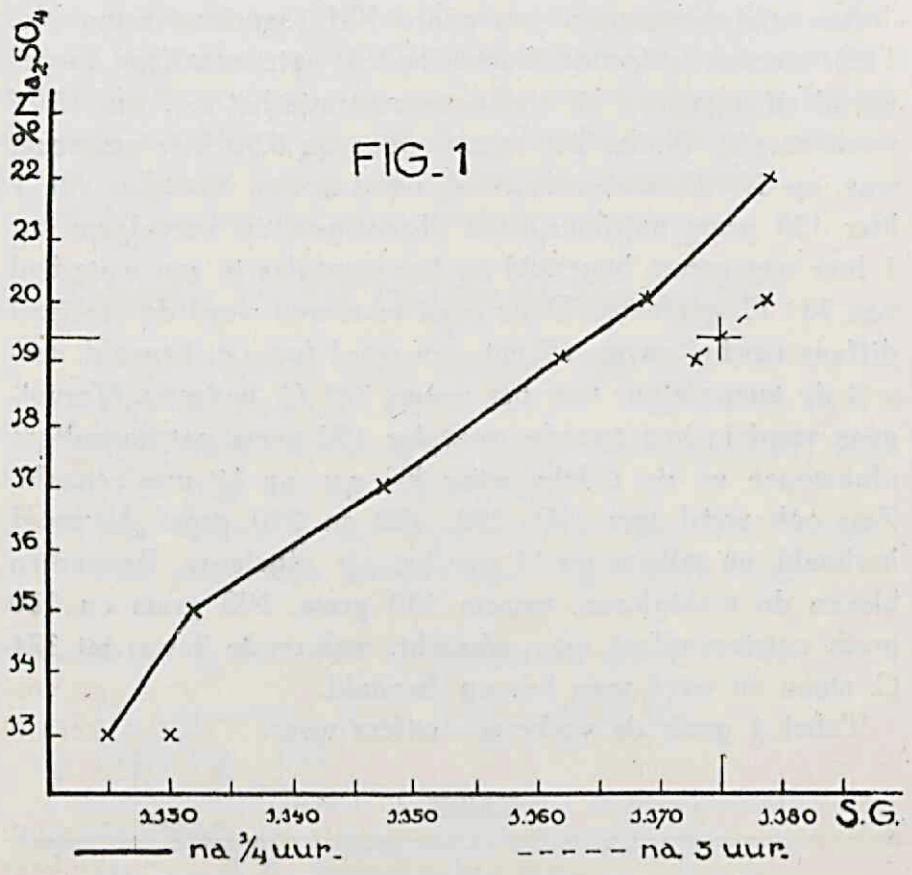
Tabel 4 geeft de verkregen cijfers weer:

TABEL 4

Begin S.G.	% natrium-sulfaat	„S.G." na 15 min.	S.G. na 3 uur
1.026	13	1.125	1.130
1.026	15	1.132	—
1.026	17	1.147	—
1.026	19	1.162	1.173
1.026	20	1.169	1.179
1.026	22	1.179	—

Serumzuivering No. 114. Diphtherieserum Paard XII.

Duidelijk blijkt dus, dat eerst na drie uur de areometer het s.g. aangeeft. Het s.g. is hier bereikt bij een zoutconcentratie gelegen tusschen 19 en 20 pCt. natriumsulfaat.



Om in dit geval nauwkeurig de concentratie te bepalen, waarbij een s.g. van 1.175 na drie uur wordt bereikt, werd een grafische voorstelling gemaakt.

In figuur 1 werd op de abscis het s.g. afgezet en op de ordinaat het percentage natriumsulfaat, dat werd toegevoegd. Met behulp van de getallen van tabel 4 is een lijn te construeeren, die het verband aangeeft tusschen het percentage natriumsulfaat en het schijnbare s.g. na ¼ uur en het werkelijke na 3 uur. Van de beide lijnen, die dit verband na 15 minuten

en na 3 uur aantoonen is de eerste geheel te construeeren, van de laatste waren slechts drie punten bekend, maar de belangrijkste. Want duidelijk is te zien, dat met een s.g. van 1.175 een percentage natriumsulfaat overeenkomt, dat gelegen is bij 19.3—19.4 pCt.

Vatten we thans het besprokene als volgt samen:

1. Wat het begin soortelijk gewicht betreft is er tusschen plasma en serum weinig verschil aantoonbaar.
2. Voor het bereiken van een s.g. van 1.175 moet aan plasma meer natriumsulfaat worden toegevoegd dan aan serum.
3. Tengevolge hiervan geeft het bepalen van het s.g. aanleiding tot het verkrijgen van lagere concentratie's natriumsulfaat bij serum dan bij plasma, wanneer tot een soortelijk gewicht van 1.175 natriumsulfaat wordt toegevoegd.
4. Bij gebruik van watervrij natriumsulfaat, zooals in het R. S. I. geschiedt, is duidelijk aangetoond, dat het wisselende begin s.g. van het serum de oorzaak is van wisselingen in de bereikte zoutconcentratie's, wanneer tot een s.g. van 1.175 natriumsulfaat wordt toegevoegd.
5. Het percentage natriumsulfaat berekend naar het beginvolume varieert tusschen 19.86 en 20.74 pCt., blijkens tabel 3, dus ongeveer 0.9 pCt. verschil naarmate het begin s.g. 1.022 of 1.030 bedraagt.
6. Het werkelijke percentage varieert dus eveneens. Geconstateerd werd een waarde van 18.7 pCt. bij een begin s.g. van 1.030 en van 19.3 pCt. bij een begin s.g. van 1.026. Na raming varieert het werkelijke percentage dus eveneens ongeveer 0.9 pCt. al naar een hoog of laag begin s.g.
7. Een meer constant werkelijk percentage natriumsulfaat

kan verkregen worden door de hoeveelheid watervrij natriumsulfaat te berekenen naar het oorspronkelijke volume van het serum.

8. Het meten van het s.g. na 2½—3 uur is om twee redenen van belang:

a. Dit s.g. zal weliswaar wisselingen vertoonen, zal hooger of lager zijn dan 1.175 naarmate het begin s.g. hooger of lager is dan een gemiddeld begin s.g., maar deze wisselingen zullen vooraf vast te stellen zijn en daardoor zal het bereikte s.g. een *contrôle wezen voor eventueele vochtigheid van het natriumsulfaat.*

b. Wordt de toevoeging van het natriumsulfaat en is het s.g. hierbij de *maatstaf voor de hoeveelheid natriumsulfaat, die de tweede maal toegevoegd moet worden.*

Zooals reeds werd medegedeeld wordt de praecipitatie met natriumsulfaat tweemaal verricht om achtergebleven resten albumine te verwijderen. Dat deze herhaling noodig is blijkt reeds hieruit, dat meestal niet alle vloeistof de eerste maal is doorgeloopen, maar dikwijls nog kleine hoeveelheden op de filters zijn achtergebleven. Door de herhaling der praecipitatie en filtratie wordt alle albumine verwijderd.

Dit geschiedt nu in het R. S. I. eenigszins anders dan volgens de Engelsche methode. In Engeland lost met het neerslag op in een kleine hoeveelheid water bij 33—37° C. en voegt daarna nog zooveel water toe tot in het geheel het oorspronkelijke volume weer wordt bereikt. Daarna komt er natriumsulfaat bij weer tot een s.g. van 1.175.

In het R. S. I. wordt het neerslag opgelost in een volume water, dat 0.5 liter kleiner is dan het oorspronkelijke volume van het serum. Doordat het volume van het neerslag echter veel grooter is dan 0.5 liter wordt het volume der oplossing aanmerkelijk grooter dan het oorspronkelijk bedroeg. Bijvoorbeeld:

Serumzuivering. No. 117. Diphtherieserum. Paard XII.

Aanwezige hoeveelheid serum bedraagt 7.78 liter.
Hierbij komt 1545 gram natriumsulfaat.
Na filtratie wordt het neerslag opgelost in 7.28 liter.
Het volume wordt hierdoor 9.90 liter.

Hieruit blijkt dus, dat het volume 2.12 liter grooter is geworden dan het oorspronkelijk was. Het gevolg is, dat hierdoor een zooveel grooter hoeveelheid natriumsulfaat noodig is om weer een s.g. van 1.175 te bereiken. Door dus hierin de Engelsche methode te volgen wordt een aanmerkelijke besparing van natriumsulfaat verkregen en is het bovendien van practisch voordeel, dat minder vloeistof gefiltreerd behoeft te worden.

Thans zullen wij nagaan bij welke concentratie men moet aannemen, dat de globuline neerslaat en de albumine in oplossing blijft.

Mac Conkey geeft als grenzen van het neerslaan van het euglobuline op: 10—11 pCt. natriumsulfaat, terwijl de pseudoglobuline zou neerslaan bij verder zout toevoegen van nog 7.5—8.5 pCt. Een nauwkeurige grens vermeldde hij dus niet: uit zijn opgaven zou af te leiden zijn, dat er een grenszône is, gelegen bij 17.5—19.5 pCt. natriumsulfaat. Blijkbaar paste hij om deze reden het bepalen van het s.g. toe, waardoor hij een zoutconcentratie bereikte, die weliswaar niet constant is, maar wisselt tusschen ongeveer 18.5—19.5 pCt. Zijn opgave van ongeveer 18.5 gram per 100 cc. moet beschouwd worden als een lage concentratie die in sommige gevallen met een hoog begin s.g. wordt bereikt.

In dit verband zijn voor ons van beteekenis de onderzoekingen van *Paul Howe* (21), die vond, dat met stijgende concentratie van natriumsulfaat een curve te construeeren is, die een langzame toename van het eiwitneerslag aantoont. Deze lijn heeft volgens *Howe* eenige „critical zônes" gelegen bij 13.5—14.5 pCt., bij 17.4 pCt. en bij 21—22 pCt.

Bij 13.5 pCt. zou de euglobuline neerslaan, bij ongeveer 21.5 pCt. de geheele globulinefractie. De zône die bij 17.4 pCt. wordt gevonden, zou pleiten voor de opvatting, dat de pseudoglobuline weer in 2 groepen is onder te verdeelen.

Bij 13.5—14.5 pCt. natriumsulfaat zou dezelfde hoeveelheid eiwit worden neergeslagen als bij doorleiden van CO_2 of verzadiging met natriumchloride, terwijl bij 21.5 pCt. evenveel wordt neergeslagen als met magnesiumsulfaat bij totale verzadiging en met ammoniumsulfaat bij halve verzadiging.

Pinkus (22) wees reeds in 1901 op de voordeelen, die aan het gebruik van natriumsulfaat waren verbonden boven ammoniumsulfaat: o.a. noemde hij de geringe giftigheid van het zout, de mogelijkheid om in de filtraten volgens de Kjeldahlmethode stikstof te bepalen en het gemakkelijk kunnen verkrijgen van oplossingen, die weinig zout bevatten, omdat bij afkoelen het zout kristalliseert.

Porges en Spiro (23) scheidden evenals *Pinkus* de eiwitten van elkaar met natriumsulfaat maar allen werkten bij een temperatuur van 30° C., waardoor andere grenswaarden werden gevonden dan bij 37° C.

Porges en Spiro besloten op grond van hun onderzoekingen met natriumsulfaat tot het bestaan van 3 globulinen: de euglobuline en 2 pseudoglobulinen.

Homer (24) paste het eerst natriumsulfaat toe om antitoxine te concentreeren. Gevonden werd, dat antitoxinen met natriumsulfaat te concentreeren zijn, zonder dat denaturatie tengevolge van de verwarming optreedt.

Evenmin treedt denaturatie op wanneer ammoniumsulfaat gecombineerd met verwarmen wordt gebruikt. *Miss Homer* gaf aan het natriumsulfaat de voorkeur, omdat dit zich gemakkelijker liet verwijderen. Verder stelde zij vast, dat met stijgende hoeveelheden ammoniumsulfaat en natriumsulfaat dezelfde curves verkregen werden, maar „critical points" kon zij er niet in aantoonen. Zij geeft aan, dat de pseudoglobuline wordt neergeslagen bij een concentratie van 11.5 —

18.5 pCt. watervrij natriumsulfaat, en bij 32.5 pCt. ook de albumine.

Volgens *Paul Howe* worden de „critical zônes" niet gezien wanneer met sterke concentratie's wordt gewerkt. Wordt daarentegen het serum verdund, dan zou het gevolg zijn dat de grenzen, die elkaar bedekken worden verschoven, waardoor de afzonderlijke grenzen der eiwitfractie's zichtbaar worden.

Door een proef werd nagegaan, of dergelijke „critical zônes" ook konden worden aangetoond. Begonnen werd met het bereiden van een 40 pCt. natriumsulfaatoplossing.

In een maatglas van 1000 cc. werd 400 gram watervrij natriumsulfaat gebracht en warm water toegevoegd tot een volume van 1000 cc. Door goed te roeren loste spoedig een groot deel van het zout op. Deze natriumsulfaat-oplossing stond gedurende 3 × 24 uur in de stoof bij 37° C., van tijd tot tijd werd geroerd en werd het door verdamping ietwat verminderde volume op een liter gebracht. Na drie dagen werden in de stoof 23 glazen kolfjes van 50 cc. inhoud geplaatst. In elk kolfje werd met een geijkt pipet 10 cc. paardeserum gebracht en in elk kolfje het volume op 40 cc. gebracht door toe te voegen aqua destillata en stijgende hoeveelheden van de 40 pCt. natriumsulfaat-oplossing.

In het eerste kolfje kwam 10 cc. serum + 16.5 cc. aqua destillata + 13.5 cc. der 40 pCt. natriumsulfaatoplossing, zoodat de zoutconcentratie daarin 13.5 pCt. bedroeg.

In het tweede kolfje: 10 cc. serum + 16 c. aq. destillata + 14 cc. natriumsulfaatoplossing, dus daarin bedroeg de zoutconcentratie 14 pCt., etc.

In kolfje no. 23: 10 cc. serum + 5.5 aq. dest. + 24.5 cc. natriumsulfaatoplossing, dus een concentratie van 24.5 pCt.

In de kolfjes was een gaandeweg sterker worden der troebeling duidelijk waarneembaar. De kolfjes werden alle goed geschud en bleven gedurende 4 uur in de stoof bij 37° C. staan. Van tijd tot tijd werden alle kolfjes opnieuw geschud. Na 4 uur werd de inhoud der kolfjes gefiltreerd:

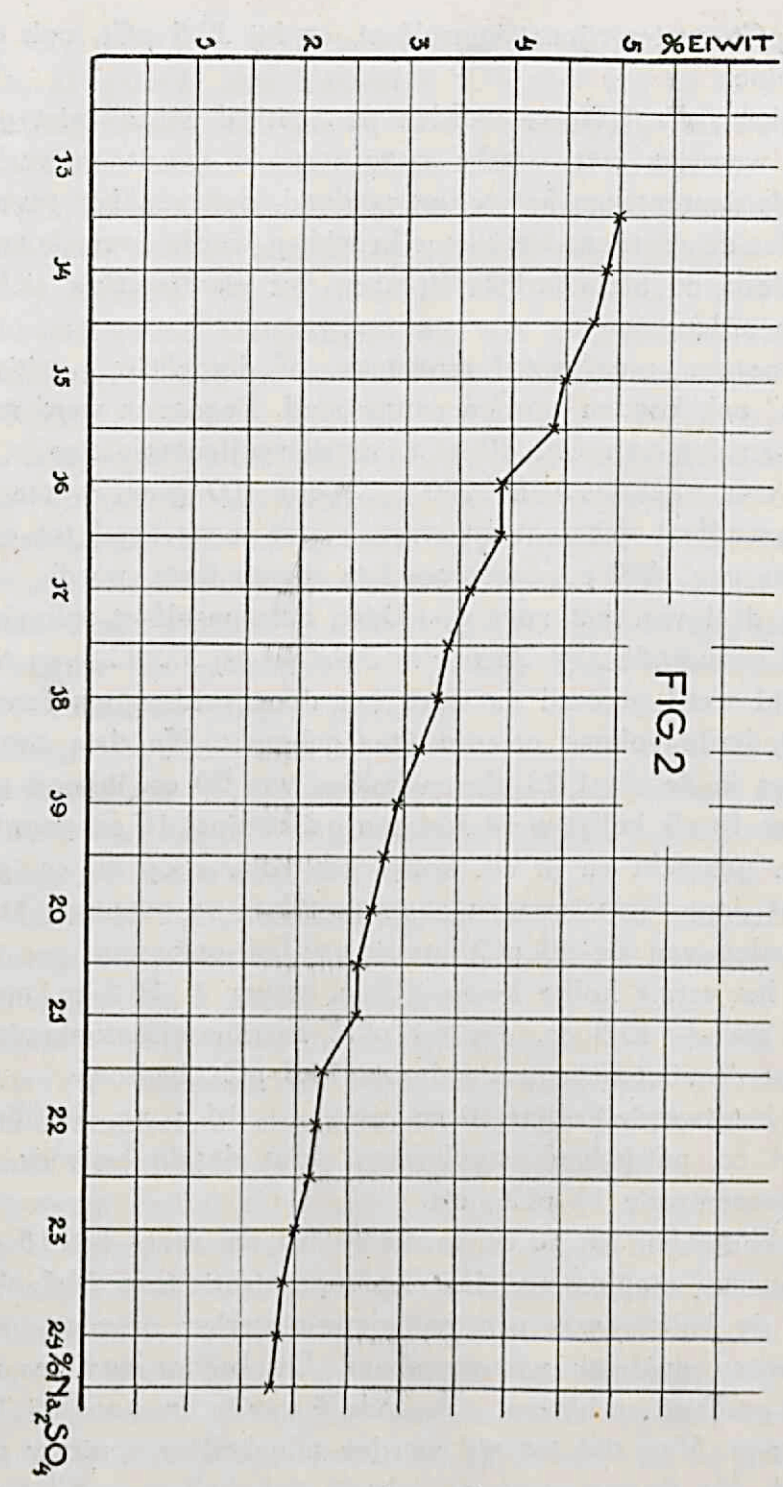


FIG. 2

23 heldere filtraten werden verkregen. Deze filtratie geschiedde eveneens bij 37° C. Van elk filtraat werd met een geijkt pipet 10 cc. in kolfjes van 50 cc. gebracht. Aan elk dezer filtraten werd vervolgens 5 cc. aq. dest. toegevoegd en 0.5 cc. 0.1 normaal azijnzuur en de kolfjes gedurende minstens 1 uur op een kokend waterbad geplaatst. In alle kolfjes vlokte het eiwit uit.

Den volgenden dag werden de neerslagen op gewogen filters gebracht en zóó dikwijls met warm water overgoten, tot de laatste sporen SO_4 uit het filtraat verdwenen waren. Bij toevoeging van enkele druppels bariumchloride 10 pCt. trad geen troebeling meer op. In geen der gevallen ging eiwit verloren, wat gecontroleerd werd door het toevoegen van salpeterzuur.

Nadat de filters in de bijbehoorende weegfleschjes waren gedroogd bij 105° C., werd de gewichtstoename vastgesteld en berekend hoe groot het percentage door het natriumsulfaat niet neergeslagen eiwit in elk der gevallen bedroeg.

In figuur 2 is de curve afgebeeld, die het resultaat van deze proef was. Op de abscis is de concentratie natriumsulfaat aangegeven, op de ordinaat het percentage eiwit, dat na toevoegen van het natriumsulfaat in oplossing bleef. De lijn toont aan hoe langzamerhand bij stijgende natriumsulfaatconcentratie de hoeveelheid eiwit, die in oplossing blijft kleiner wordt, dus de hoeveelheid die neerslaat grooter wordt. Bij een concentratie van 13.5 pCt. natriumsulfaat bleef nog slechts 5.02 pCt. eiwit in oplossing, bij 24.5 pCt. natriumsulfaat 1.84 pCt. eiwit in oplossing. De curve daalt geleidelijk, echter zijn er twee punten waar de lijn horizontaal verloopt. Dit was het geval bij een natriumsulfaatconcentratie van 16—16.5 pCt. en bij 20.5—21 pCt.

Bij 15.5 % natriumsulfaat was er 4.26 % eiwit in het filtraat.
„ 17 % „ „ „ 3.90 % „ „ „ „
„ 16.5 % „ „ „ 3.89 % „ „ „ „
„ 17 % „ „ „ 3.61 % „ „ „ „

Bij 19.5 % natriumsulfaat was er 2.80 % eiwit in het filtraat.
„ 20 % „ „ „ 2.72 % „ „ „ „
„ 20.5 % „ „ „ 2.58 % „ „ „ „
„ 21 % „ „ „ 2.57 % „ „ „ „
„ 21.5 % „ „ „ 2.34 % „ „ „ „

Wij vonden op deze wijze dus een „critical zône" in de pseudoglobuline en één in de buurt van de scheidingsgrens der globuline-albuminefractie's.

De mogelijke aanwezigheid van een dergelijke zône bij 13.5—14.5 %, dus op de grens van een eu- en pseudoglobulinefractie werd niet nagegaan.

De hier gevonden zônes bij 16—16.5 % en bij 20.5—21 % komen niet geheel overeen met de opgaven van *Paul Howe*, die ze vond bij 17.4 % en 21—22 %.

Dat de gevonden zônes gevolg zouden zijn van eventueele fouten in de techniek kan ik niet aannemen. De mogelijkheid hiertoe blijft open omdat deze lijn geconstrueerd werd op enkelvoudige bepalingen. Ook werd de proef niet herhaald. Deze proef werd echter pas verricht aan het einde van mijn onderzoekingen over de eiwitsamenstelling van paardeserum (zie hoofdstuk IV), zoodat de noodige routine voor een dergelijke proef aanwezig was. De verschillen zijn te groot om ze aan de proeffout toe te schrijven.

Zelfs al mochten dergelijke „critical zônes" met zekerheid worden aangetoond, dan nog zou het geenszins vaststaan, dat zulke zônes de grensconcentratie zouden aangeven, waarbij de ééne eiwitfractie wel en de andere niet wordt neergeslagen.

In elk geval wordt door uitzouten nooit een eiwitfractie geheel zuiver geïsoleerd, altijd worden nog wel gedeelten van de aangrenzende eiwitfractie mee neergeslagen.

Mocht volgens sommigen de aanwezigheid van „critical zônes" bij omstreeks 21 % natriumsulfaat er al op wijzen, dat bij deze concentratie alle globuline wordt gepraecipiteerd, terwijl de albumine in oplossing blijft, over het algemeen is de meening, dat reeds bij een concentratie van 18.5 % natriumsulfaat de globuline wordt neergeslagen.

Miss Homer b.v. geeft aan, dat de euglobuline neerslaat met ammoniumsulfaat bij minstens 34 % verzadiging en met natriumsulfaat bij minstens 11.5 % natriumsulfaatconcentratie bij 37° C., terwijl de pseudoglobuline neerslaat met ammoniumsulfaat tusschen 34 en 36 % verzadiging en met natriumsulfaat tusschen 12 en 18.5 % bij 37° C.

Voor ons van belang is haar mededeeling, dat met 12 tot 18.5% natriumsulfaat verreweg de grootste hoeveelheid antitoxine wordt neergeslagen.

Ook *Ruppel* (3) deelt mede, dat de albumine geheel geen antitoxine bevat, terwijl de euglobuline slechts 10—15 % van het antitoxine draagt en *Wadsworth* (13) vermeldt dat de hoeveelheid eiwit, die door een 30—33 % verzadiging met ammoniumsulfaat wordt neergeslagen slechts 20 % van het antitoxine bevat en dat de hoeveelheid antitoxine per cc. bovendien zeer gering is. Het eiwit, dat tusschen 33 tot 48 % verzadiging met ammoniumsulfaat neerslaat bevat relatief meer antitoxine.

Stellen we thans de vraag of in het R. S. I. met het natriumsulfaat alle pseudoglobuline wordt neergeslagen en alle albumine wordt verwijderd.

Om deze vraag te beantwoorden werd getracht te bepalen hoeveel eiwit met het natriumsulfaat wordt verwijderd, om dit vervolgens te vergelijken met het percentage albumine, dat in het serum aanwezig is. De hoeveelheid albumine nu werd in het te zuiveren serum bepaald volgens de methode der gefractioneerde praecipitatie met ammoniumsulfaat, waarbij de euglobuline wordt neergeslagen bij $^1/_3$ verzadiging en de pseudoglobuline bij $^1/_2$ verzadiging met ammoniumsulfaat. In het volgende hoofdstuk wordt de techniek hiervan nader besproken. Op deze wijze werden onderzocht:

A. *Serumzuivering No. 117; diphtherieserum Paard XII begin s.g. 1.028.*
B. *Serumzuivering No. 118; tetanusserum Paard XVII, begin s.g. 1.026.*

C. *Serumzuivering No. 119; tetanusserum Paard XVII, begin s.g. 1.026.*

A. Serumzuivering No. 117. Diphtherieserum Paard XII. S.G. 1.028.

De eiwitsamenstelling van het serum was de volgende:

Totaal eiwit	8.73 %
Albumine	2.87 %
Totaal globuline	5.86 %
Euglobuline	1.48 %
Pseudoglobuline	4.06 %

In het R. S. I. wordt bij elke serumzuivering *in de beide albuminehoudende filtraten* de hoeveelheid eiwit bepaald. Mogen de verkregen cijfers eenige beteekenis hebben bij onderling vergelijk der verschillende zuiveringen, absolute waarde hebben die cijfers niet. Dit blijkt dadelijk wanneer wij letten op al de invloeden, die storend op de juiste uitkomsten werken. Allereerst wordt geen rekening gehouden met de volumetoename, die optreedt nadat het natriumsulfaat is toegevoegd, waardoor de hoeveelheid vloeistof, die gefiltreerd wordt, grooter is dan het volume van het serum waarin het totale eiwit werd bepaald. Dan worden de filters vooraf vochtig gemaakt met leidingwater; het bleek mij dat elke filter ongeveer 50 cc. water opneemt wat op 13 doeken berekend meer dan een halve liter water is. (Gewoonlijk worden bij de eerste filtratie 13 filters gebruikt). Tenslotte zal de temperatuur van 37° C. ook van invloed wezen. Ook bij de herhaling der filtratie spelen al deze factoren opnieuw een rol.

De eiwitgetallen der filtraten hebben niettemin *vergelijkende beteekenis.*

Bleek bij uitzouten met ammoniumsulfaat tot halve verzadiging een albuminegehalte van 2.87 % (zie boven) gevonden te worden, bij de methode met natriumsulfaat werd in het eerste filtraat alleen reeds 2.89 % eiwit aangetoond

en in het tweede filtraat 0.38 % te zamen dus 3.27 %. Was dit juist, dan werd veel te veel eiwit met de filtraten verwijderd, was derhalve te weinig eiwit neergeslagen en de natriumsulfaatconcentratie dus te laag geweest.

Als volgt werd nu het juiste percentage berekend. Nadat voor de tweede maal met natriumsulfaat een neerslag was verkregen, werd dit opgelost in een hoeveelheid water en vervolgens het volume gemeten, waarin dan de hoeveelheid eiwit werd bepaald. Bij dit onderzoek werd het neerslag opgelost in 5 liter water en hierna het volume gemeten hetwelk 7.80 liter bleek te zijn, waarna in deze 7.80 liter de hoeveelheid eiwit werd bepaald. En nu bleek, dat door deze behandeling met natriumsulfaat totaal niet 3.27 % eiwit, maar slechts 2.64 % eiwit was verwijderd, bleef derhalve nog een kleine hoeveelheid der albuminefractie op de filters achter.

B. Serumzuivering No. 118, Tetanusserum Paard XVII S.G. 1.026.
De hoeveelheid toegevoegd natriumsulfaat bedroeg de eerste maal 20.29 % van het begin-volume.
De eiwitfractie's hierin bedroegen:

Totaal eiwit	7.61 %
Albumine	2.94 %
Totaal globuline	4.67 %
Euglobuline	0.53 %
Pseudoglobuline	4.14 %

Schijnbaar bedroeg het albuminegehalte in het eerste filtraat 2.95 % en in het tweede 0.31 %, dus te zamen 3.26 %. werd daarentegen de hoeveelheid eiwit in de oplossingen bepaald, en thans voor beide filtratie's afzonderlijk, zoo bleek dat de eerste maal 2.83 % en de tweede maal 0.61 % eiwit met de filtraten was verwijderd, samen 3.44 %. Bij deze zuivering is dus in tegenstelling met No. 117, te veel eiwit verwijderd, is blijkbaar door het natriumsulfaat te weinig eiwit neergeslagen, dus de zoutconcentratie niet groot genoeg ge-

weest. Het blijkt verder, dat reeds bij de eerste toevoeging van natriumsulfaat ten naaste bij alle albumine werd verwijderd. Op bladzijde 36 zagen wij, dat de concentratie, waarin het natriumsulfaat de eerste maal werd toegevoegd 19.3 % bedroeg. In dit geval ging derhalve bij deze concentratie alle albumine reeds direct door de filters, en toont dit geval aan, dat het aanbeveling verdient:

òf slechts eenmaal te filtreeren bij deze natriumsulfaatconcentratie,

òf tweemaal te filtreeren, maar dan de eerste maal met een hoogere natriumsulfaatconcentratie.

C. Serumzuivering No. 119, Tetanus Paard XVII S.G. 1.026.

Hoeveelheid toegevoegd natriumsulfaat bedroeg de eerste maal 19.87 % van het begin-volume.

De eiwitfractie's waren:

Totaal eiwit	7.73 %
Albumine	2.83 %
Totaal globuline	4.90 %
Euglobuline	0.98 %
Pseudoglobuline	3.92 %

Schijnbaar (d.i. door het eiwitgehalte van de filtraten te bepalen) werd hier de eerste maal verwijderd 2.72 % eiwit en de tweede maal 0.54 % samen 3.26 %.

In werkelijkheid was het daarentegen:

De eerste maal: 3.26 %.

De tweede maal: 0.84 %, samen 4.10 %, waaruit volgt, dat reeds de eerste natriumconcentratie te laag was, waardoor te veel eiwit werd verwijderd. Bij de herhaling ging nog eens een belangrijke hoeveelheid te loor.

Vergelijken we nader No. 118 en No. 119, dan valt al dadelijk op het verschil in de natriumsulfaatconcentratie in de beide gevallen. Bedroeg deze in het eerste geval 20.29 % van het beginvolume, in het tweede geval was het 19.87 % van

het beginvolume. Dit verklaart hoe het komt, dat bij No. 119 zooveel eiwit meer verloren ging dan bij No. 118. Dat in deze twee gevallen, waarbij een gelijk begin s.g. aanwezig was, zulk een groot verschil in natriumsulfaatconcentratie werd bereikt, moest worden toegeschreven aan een technische fout, die dan ook werd gevonden. Hier werd n.l. eerst aan 5.8 liter serum 1160 gram natriumsulfaat toegevoegd, dus 20 % van het beginvolume. Later werd hierbij gedaan 0.5 liter serum, dat een werkelijke natriumsulfaatconcentratie had van 18.5 % en werd blijkbaar de afname van het s.g. tengevolge hiervan over het hoofd gezien.

Werd bij serumzuivering No. 118 en No. 119 dus aangetoond, dat meer albumine werd verwijderd tijdens het serumzuiveren dan overeen kwam met de hoeveelheid eiwit, die door ½ verzadiging met ammoniumsulfaat in oplossing blijft, de vraag is, of het in de bedoeling ligt om die hoeveelheid albumine te verwijderen, die bij 50 % verzadiging met ammoniumsulfaat nog in oplossing blijft. We kunnen opmerken, dat o.a. *Miss Homer* aangetoond heeft dat het antitoxine neerslaat bij 18.5 % verzadiging met natriumsulfaat bij 37° C., wat overeenkomt met 46 % (volumeprocenten) van een verzadigde ammoniumsulfaatoplossing.

Zijn dus de verschillen niet sterk uitgesproken dan behoeft nog niet dadelijk een groot antitoxineverlies gevreesd te worden; zijn de verschillen daarentegen groot, dan zal wel degelijk een belangrijk gedeelte der antitoxine verloren zijn gegaan. In No. 118 b.v. was het verschil in de hoeveelheid albumine, die met ammoniumsulfaat tot ½ verzadiging nog in oplossing bleef 2.94 %, bij de zuivering bedroeg het verlies 3.44 %, dus ging 0.50 % meer verloren.

In No. 119 daarentegen bedroeg dit nadeelig verschil: 4.10 %—2.83 % is 1.27 %.

Ben ik geneigd te meenen, dat in het eerste geval reeds teveel eiwit werd verwijderd, in het tweede geval is geen twijfel mogelijk. Exacte gegevens ontbreken mij echter. Beter ware geweest bij de bepaling der fractie's de albumin te ver-

wijderen door 46 % verzadiging met ammoniumsulfaat. Zoo alleen werden absolute waarden verkregen, die geheel met elkaar te vergelijken waren geweest. Tenslotte kunnen dierproeven alleen uitmaken of er antitoxine verloren gaat en hoeveel dit bedraagt.

Bleek duidelijk, dat het begin s.g. een rol speelt op de natriumsulfaatconcentratie, wanneer dit zout de eerste maal tot een bepaald s.g. wordt toegevoegd, deze invloed kon ik bij de herhaling van het toevoegen van natriumsulfaat niet meer aantoonen, omdat noch het s.g. der globulineoplossing nadat de eerste maal natriumsulfaat was toegevoegd noch het volume bepaald werd. Ook kon tusschen de totaal verwijderde hoeveelheid albumine en het begin s.g. geen overeenkomst worden aangetoond.

Gaan we thans na welke rol het *natriumchloride* bij het zuiveringsproces speelt.

Het eiwitneerslag, dat na de tweede behandeling met natriumsulfaat gerekend wordt geen albumine meer te bevatten, wordt opgelost in koud water en het volume tot het dubbele van het oorspronkelijke gebracht. In het R. S. I. wordt ook hierop niet bijzonder gelet. Het volume wordt door het neerslag aanmerkelijk grooter dan tweemaal het beginvolume. Bijvoorbeeld:

Serumzuivering No. 118. Tetanusserum Paard XVII.

Hoeveelheid serum is 5.42 L.

Het neerslag wordt opgelost in 10.84 L. water en het volume is hierna 12.30 liter, dus een volumetoename van ongeveer 1.5 L. is het gevolg.

Serumzuivering No. 17. Diphtherieserum. Paard XII.

Beginvolume 7.78 L.

Neerslag opgelost in 15.56 L. water, waarna het volume bedraagt 18.36 L., dus een volumevergrooting van 2.8 L.

Door deze volumevergrooting is de hoeveelheid keukenzout die gebruikt wordt om het s.g. van 1.205 te bereiken onnoodig groot, bovendien is het nadeel weer, dat het filtreeren des te meer filters en tijd kost.

Komt nu het s.g. van 1.205 overeen met de verzadiging door natriumchloride? Uit een proef die gedaan werd bleek, dat de grens der verzadiging nog niet werd bereikt.

In maatglazen van 1 L. werd tot dit doel 500 cc. der verdunde globulineoplossing gebracht waaraan stijgende hoeveelheden natriumchloride werden toegevoegd. Volgens de berekening in het R. S. I. moest aan 500 cc. der oplossing ongeveer 38.5 % natriumchloride toegevoegd worden, d.i. 192.5 gram NaCl om het s.g. van 1.205 te bereiken.

TABEL 5

No. Maatglas	Het 2de neerslag met Na_2So_4 opgelost in 2 maal het oorspr. volume v. h. serum	Gram NaCl.	S.G.	Troebel	NaCl. op den bodem
1	500 cc.	180	1.198	+	—
2	500 „	190	1.204	+	—
3	500 „	200	1.210	+	—
4	500 „	210	1.217	+	+
5	500 „	220	1.217	+	+

Het schema dezer proef (zie tabel 5) laat duidelijk zien, dat het juiste S.G. bereikt werd met ongeveer 190 gram natriumchloride. Hoewel de oplossing troebel werd door het uitzouten der euglobuline, loste alle natriumchloride op. Eerst bij toevoegen van 210 gram natriumchloride bleef een gedeelte van het natriumchloride onopgelost, het s.g. bleef tegelijk constant, namelijk 1.217.

In tegenstelling met het toevoegen van natriumsulfaat aan het serum werd bij deze verdunde globulineoplossing na toe-

voegen van keukenzout het s.g. reeds spoedig goed aangewezen.

Gemiddeld werd een toename van 2 streepjes geconstateerd b.v. van een S.G. van 1.204 tot 1.206 na twee uur.

Is nu het toevoegen van natriumchloride tot een s.g. van 1.205 voldoende waarborg, dat de euglobuline wordt neergeslagen?

Ook dit zal weer achtereenvolgens bij de serumzuivering No. 117, 118 en 119 worden nagegaan.

A. Serumzuivering No. 117 Diphtherieserum Paard XII.
De eiwitsamenstelling van het serum bedroeg:

Totaal eiwit	8.73 %
Albumine	2.87 %
Globuline	5.86 %
Euglobuline	1.48 %
Pseudoglobuline	4.38 %

We zagen reeds, dat door het natriumsulfaat 2.64 % eiwit werd verwijderd, ten naaste bij dus de hoeveelheid albumine die met ammoniumsulfaat in het serum werd gevonden.

Nadat nu door het toevoegen van NaCl ook de euglobuline was neergeslagen werd een filtraat verkregen, dat 20.2 liter bedroeg en waarvan het eiwitgehalte 1.70 % was. Op het beginvolume van 7.78 liter berekend is derhalve $\frac{20.2}{7.78} \times$ 1.70 % = 4.40 % eiwit overgebleven, dus verwijderd werd 8.73 %—4.40 % = 4.23 % eiwit. En aangezien als albumine 2.64 % eiwit verloren ging, werd door het natriumchloride dus 4.23 %—2.64 % = 1.59 % eiwit als euglobuline neergeslagen.

Volgens bovenstaande opgave werd voor euglobuline een hoeveelheid van 1.48 % gevonden. Het natriumchloride verwijderde dus vrijwel de juiste hoeveelheid eiwit.

B. Serumzuivering No. 118 Tetanusserum Paard XVII.
Hier was de eiwitsamenstelling, zooals ze met ammoniumsulfaat bij ½ en 1/3 verzadiging werd gevonden:

Totaal eiwit	7.61 %
Albumine	2.94 %
Globuline	4.67 %
Euglobuline	0.53 %
Pseudoglobuline	4.14 %

Hier was na de verwijdering van albumine en euglobuline in de eiwit-zoutoplossing van 13.5 liter: 1.50 % eiwit aanwezig, op het oorspronkelijke volume van het serum berekend is dit 3.73 %.

Verwijderd werd dus 7.61 %—3.73 % = 3.88 %, waarvan 3.44 % als albumine zooals op blz. 52 werd aangetoond. Het natriumchloride sloeg derhalve 3.88 %—3.44 % = 0.44 % eiwit neer. Ook hier komt deze hoeveelheid ten naaste bij met het aanwezige gehalte aan euglobuline overeen. Het verschil van 0.09 % valt binnen de gemaakte proeffout.

C. Serumzuivering No. 119 Tetanusserum Paard XVII.
Ook hier werd de juiste hoeveelheid euglobuline verwijderd.
De samenstelling van het serum was:

Totaal eiwit	7.73 %
Albumine	2.83 %
Globuline	4.90 %
Eugolbuline	0.98 %
Pseudoglobuline	3.92 %

Nadat de euglobuline met NaCl was neergeslagen werd een filtraat van 15.8 liter verkregen, dat 1.04 % eiwit bevatte. Berekend naar het oorspronkelijke volume van

6.30 liter was dus nog overgebleven $\frac{15.8}{6.3} \times 1.04\ \% = 2.61$

eiwit, dus totaal 5.12 % eiwit verwijderd. Daar zooals we

vroeger berekenden 4.10 % als albumine werd weggedaan, werd derhalve als euglobuline 5.12 %—4.10 % = 1.02 % neergeslagen door het natriumchloride, een waarde die dus zeer goed overeenkomt met de vooraf in het serum bepaalde.

Deze drie voorbeelden toonen ons aan, dat de hoeveelheid eiwit die met het natriumchloride als euglobuline werd neergeslagen steeds nauwkeurig overeenkwam met het percentage dat door 1/3 verzadiging met ammoniumsulfaat als euglobuline neerslaat. Bedroeg in deze drie gevallen het euglobuline percentage 1.48 %, 0.53 % en 0.98 %, door het keukenzout werd respectievelijk 1.59 %, 0.44 % en 1.02 % als euglobuline neergeslagen.

In tegenstelling met de hoeveelheden eiwit die als albumine worden verwijderd, waarbij dikwijls teveel eiwit wordt weggedaan, waarborgt dus het neerslaan van NaCl een praecipitaat van de euglobulinefractie, zonder dat hierbij fouten worden gemaakt.

In tabel 6 is getracht een overzicht te geven:

1. van de hoeveelheden eiwit, die totaal tijdens de serumzuivering worden verwijderd.
2. van het percentage dat er door toevoeging van watervrij natriumsulfaat uitgaat.
3. van de hoeveelheden euglobuline die worden neergeslagen.

In 6 gevallen werd van het serum, dat gezuiverd werd de juiste samenstelling wat het percentage der verschillende eiwitfracties betreft, vastgesteld. Zooals reeds is medegedeeld werd steeds in het serum van 2 aderlatingen afkomstig elk afzonderlijk de verschillende fractie's bepaald en bleken deze zoo uiteen te loopen (zie volgend hoofdstuk), dat niet zonder meer de gevonden waarden op het te zuiveren serum, dat steeds een mengsel is van minstens 2 aderlatingen afkomstig konden worden overgebracht. Daarom werd in verschillende gevallen ook nog eens de samenstelling van het te zuiveren serum op dezelfde wijze bepaald.

Zoo kon worden berekend hoeveel eiwit totaal moest worden verwijderd, d.i. de som van albumine + euglobuline (zie kolom M).

In deze kolom worden eenige cijfers met een vraagteeken aangeduid, d.w.z. deze waarden werden berekend uit de eiwitfractie's, die bij de 2 aderlatingen werden gevonden. Absoluut juist zijn deze getallen dus niet.

Duidelijk blijkt, dat doorgaans meer eiwit werd verwijderd dan aan albumine en euglobuline aanwezig was. Zooals we reeds mededeelden is wel wat meer toegestaan, omdat inplaats van met 46 % verzadiging met ammoniumsulfaat 50 % verzadiging steeds werd toegepast maar te groote verschillen wijzen zeker op een teveel dat verwijderd werd.

Ook uit het percentage eiwit, dat overbleef is in verband met het percentage pseudoglobuline, dat oorspronkelijk aanwezig was, ongeveer vooruit te voorspellen of met de serumzuivering fouten zijn gemaakt.

Uit kolom L waarin de procenten pseudoglobuline zijn aangegeven (waarin tusschen haakjes is vermeld hoe groot de hoeveelheid pseudoglobuline berekend naar 100 totaal eiwit is) blijkt, dat het percentage aanwezige pseudoglobuline wisselt tusschen ongeveer 50 %—60 % (nauwkeuriger: 50 en 62.5 %) van het totaal eiwit.

Blijft derhalve minder dan 40 % van het totaal eiwit over in het eindproduct, dan is zeker teveel als albumine resp. euglobuline verwijderd. Daar het ons niet gelukte om aan te toonen, dat ooit teveel als euglobuline werd neergeslagen, zal de fout waarschijnlijk als regel gelegen zijn in het verwijderen van het eiwit met natriumsulfaat, doordat dit zout in te geringe concentratie werd toegevoegd.

Vergelijken we nu de cijfers tusschen haakjes in kolom L met die in kolom N en letten wij voor sommige gevallen alleen op de cijfers tusschen haakjes in kolom N, dan kunnen wij op grond hiervan omtrent deze 10 gevallen van serumzuivering tot het volgende besluiten:

TABEL 6

Volgnummer der Serumzuivering	Nummer van het Paard	Diphtherie- of Tetanusserum	Hoeveelheid Serum in Liters	Gehalte aan A.E. per c.c.	Totaal eiwit %	Albumine %	Globuline (totaal) %	Euglobuline %	Pseudoglobuline %	Albumine + Euglobuline %	% eiwit, dat als pseudoglobuline aanwezig blijft	% eiwit, dat als albumine en euglobuline verwijderd is	Het percentage eiwit, dat met Na_2SO_4 verwijderd werd			Door NaCl. verwijderd % eiwit	Opmerkingen met betrekking tot het bereikte resultaat bij de Serumzuivering
													de eerste maal	de tweede maal	totaal		
109	IV	D	6.72	> 400	7.73 (100)	—	—	—	—	—	4.42 (57.3)	3.31 (42.7)	(2.85)	(0.48)	(3.33)	—	Zeer waarschijnlijk goed.
110	XII	D	7.50	—	8.32 (100)	3.08	5.24	0.92	4.32 (51.9)	4.—	3.68 (44.2)	4.64 (55.8)	(3.23)	(0.57)	(3.80)	—	Vermoedelijk iets te veel eiwit verwijderd.
111	XV	T	6.52	—	6.53 (100)	—	—	—	—	3.30?	3.07 (47.—)	3.46 (53.—)	(2.83)	(0.49)	(3.32)	—	Vermoedelijk goed.
112	V	D	6.48	> 300	7.15 (100)	—	—	—	—	3.47?	3.85 (53.8)	3.30 (46.2)	(2.43)	(0.35)	(2.78)	—	Vermoedelijk iets te veel eiwit verwijderd.
113	IV	D	6.60	500	8.68 (100)	2.85	5.83	0.90	4.93 (56.9)	3.75	4.40 (50.7)	4.28 (49.3)	(3.12)	(0.31)	(3.43)	—	Vermoedelijk iets te veel eiwit verwijderd.
114	XII	D	6.56	400	7.43 (100)	—	—	—	—	3.58?	2.71 (36.4)	4.72 (63.6)	(2.79)	(0.17)	(2.96)	—	Zeker te veel eiwit verwijderd.
116	IV	D	7.40	—	8.92 (100)	2.61	6.31	0.82	5.58 (62.5)	3.43	4.33 (48.5)	4.59 (51.5)	(2.27)	(0.26)	(2.53)	—	Zeker te veel eiwit verwijderd.
117	XII	D	7.78	—	8.73 (100)	2.87	5.86	1.48	4.38 (50.—)	4.35	4.40 (50.4)	4.33 (49.6)	(2.89)	(0.38)	2.64 (3.27)	1.59	Zeker goed.
118	XVII	T	5.42	3 AE	7.61 (100)	2.94	4.67	0.53	4.14 (54.4)	3.47	3.73 (49.—)	3.88 (51)	2.83 (2.95)	0.61 (0.31)	3.44 (3.26)	0.44	Iets te veel als albumine verwijderd.
119	XVII	T	6.30	—	7.73 (100)	2.83	4.90	0.98	3.92 (50.7)	3,81	2.61 (33.7)	5.12 (66.3)	3.26 (2.72)	0.84 (0.54)	4.10 (3.26)	1.02	Zeker te veel eiwit als albumine verwijderd.
A	B	C	E	F	G	H	I	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	W

Opmerking: 1. de cijfers tusschen haakjes in de kolommen L, N en O geven de hoeveelheid eiwit aan, wanneer het totaal eiwit 100 bedraagt;
2. de cijfers tusschen haakjes in de kolommen Q en R daarentegen geven aan het schijnbare percentage albumine, dat in de filtraten bij de Serumzuivering wordt gevonden; terwijl de cijfers niet tusschen haakjes het werkelijke percentage aangeven.

Het percentage eiwit, dat met Na_2SO_4 verwijderd werd			Door NaCl. verwijderd % eiwit	Opmerkingen met betrekking tot het bereikte resultaat bij de Serumzuivering
de eerste maal	de tweede maal	totaal		
(2.85)	(0.48)	(3.33)	—	Zeer waarschijnlijk goed.
(3.23)	(0.57)	(3.80)	—	Vermoedelijk iets te veel eiwit verwijderd.
(2.83)	(0.49)	(3.32)	—	Vermoedelijk goed.
(2.43)	(0.35)	(2.78)	—	Vermoedelijk iets te veel eiwit verwijderd.
(3.12)	(0.31)	(3.43)	—	Vermoedelijk iets te veel eiwit verwijderd.
(2.79)	(0.17)	(2.96)	—	Zeker te veel eiwit verwijderd.
(2.27)	(0.26)	(2.53)	—	Zeker te veel eiwit verwijderd.
(2.89)	(0.38)	2.64 (3.27)	1.59	Zeker goed.
2.83 (2.95)	0.61 (0.31)	3.44 (3.26)	0.44	Iets te veel als albumine verwijderd.
3.26 (2.72)	0.84 (0.54)	4.10 (3.26)	1.02	Zeker te veel eiwit als albumine verwijderd.
P	Q	R	S	W

t aan, wanneer het totaal eiwit 100 bedraagt;
schijnbare percentage albumine, dat in de filtraten bij de Serumzuivering wordt geven.

Bij serumzuivering No. 114 en 119 bleef van 100 gram eiwit resp. slechts 36.4 en 33.7 gram eiwit over, zeker is dat hier dus een groot verlies aan pseudoglobuline plaats vond.

Ook voor serumzuivering No. 116 is ongetwijfeld verlies te boeken, want op 100 gram eiwit was 62.5 gram pseudoglobuline aanwezig en 48.5 gram bleef over. Op zichzelf weliswaar een belangrijke hoeveelheid, maar bij een serum met een dergelijk hoog pseudoglobuline-gehalte moet teveel verwijderd zijn. Hiervoor pleit, dat serumzuivering No. 109 ook diphtherieserum van ditzelfde paard betrof en toen was weliswaar het eiwitgehalte lager, maar werd een grootere hoeveelheid pseudoglobuline in het eindproduct verkregen. Tabel 2 toont aan, dat bij No. 109 de toegevoegde hoeveelheid natriumsulfaat grooter was dan bij No. 116, wat dus mee in de richting wijst, dat het natriumsulfaat hierin weer een rol heeft gespeeld. Het begin s.g. was hieraan waarschijnlijk schuld, want dit was bij No. 109: 1.028, bij No. 116 daarentegen 1.030, zoodat, toen door zout toevoegen een s.g. van 1.175 werd bereikt er bij No. 109 een grootere natriumsulfaatconcentratie bestond dan bij No. 116. Ook No. 113 betrof serum van hetzelfde paard IV. Ook hier waar het begin s.g. 1.028 bedroeg, werd tot een hoogere concentratie natriumsulfaat toegevoegd en was het resultaat blijkens de cijfers gunstiger dan bij No. 116.

Te meer was dit een verlies, omdat het hier serum met een hoogen titer betreft zooals in kolom F is te zien.

In deze drie gevallen werd dus zeker te veel eiwit verwijderd.

In één geval (No. 117) toonden wij reeds vroeger aan, dat de cijfers prachtig overeenstemmen, hier werd zoowel de juiste hoeveelheid albumine als het juiste percentage euglobuline verwijderd.

Hoewel dit niet afzonderlijk werd nagegaan volgt uit de cijfers, dat bij No. 109 (uit kolom N blijkt, dat 57.3 gram eiwit van de 100 gram zijn overgebleven) zeker geen verlies optrad.

Nemen wij aan, dat de juiste hoeveelheid euglobuline werd neergeslagen, dan is deze serumzuivering *zeker goed* geweest.

Rekenen wij de getallen, waarin de serumzuivering „vermoedelijk goed" werd verricht of waarbij „vermoedelijk iets te veel werd verwijderd" (zie kolom W) nog tot de gevallen waarbij het verlies wel is waar niet bekend is, maar toch in geen geval belangrijk geweest kan zijn, nog tot de groep waarbij geen verlies optrad, dan kunnen wij dus als volgt resumeeren:

In 10 gevallen van serumzuivering was:

in 3 gevallen een groot verlies aan pseudoglobuline aantoonbaar (No. 114, 116 en 119);

in 1 geval een klein verlies aanwezig (No. 118);

in 1 geval kon worden aangetoond, dat de zuivering geheel goed geschiedde (No. 117);

in 5 gevallen was het verlies, zoo het aanwezig was in ieder geval niet groot (No. 109, 110, 111, 112 en 113, waarbij van twee veronderstellingen wordt uitgegaan:

a. dat met natriumchloride de juiste hoeveelheid euglobuline werd neergeslagen;
b. dat het antitoxine reeds mee werd neergeslagen bij 46 % verzadiging met ammoniumsulfaat. Daar het albumine-percentage bepaald werd door halve verzadiging met ammoniumsulfaat mag dus iets meer albumine verwijderd worden dan met de albumine waarde (zie kolom H) overeenkomt.

Mocht ik er in geslaagd zijn in enkele gevallen aangetoond te hebben, dat een groot verlies aan antitoxine optrad, aan den anderen kant is toch ook duidelijk gebleken, dat de *serumzuivering door uitzouten*, zooals ze in het R.S.I. te Utrecht wordt verricht, *zeer bevredigende resultaten geven kan*.

HOOFDSTUK IV

ONDERZOEKINGEN OVER DE EIWITSAMENSTELLING VAN PAARDESERUM

In de vorige hoofdstukken was telkens sprake van de hoeveelheid eiwit, die in een oplossing aanwezig was. In dit hoofdstuk zal de wijze waarop het eiwitgehalte werd bepaald nader worden besproken.

Bij de serumzuivering worden herhaaldelijk eiwitbepalingen verricht. In het R.S.I. wordt allereerst nagegaan hoeveel eiwit er totaal in het te zuiveren serum aanwezig is, vervolgens wordt in het eerste en tweede filtraat waarmee de albumine verwijderd wordt het percentage eiwit bepaald en geschiedt dit opnieuw in de zouthoudende pseudoglobulineoplossing, nadat de euglobuline is verwijderd. Daar in dit laatste geval tevens het volume der oplossing wordt gemeten, is door eenvoudige berekening naar het oorspronkelijke volume van het serum, vast te stellen hoe groot het percentage eiwit is en hoeveel er dus als albumine en euglobuline is verdwenen. Nadat met ijsazijn de pseudoglobuline is neergeslagen en vervolgens afgefiltreerd, wordt ook dit filtraat op eiwit onderzocht om eventueele verliezen te controleeren.

Als regel zijn in dit laatste filtraat hoogstens sporen eiwit aantoonbaar. Tenslotte wordt de laatste eiwitbepaling verricht, nadat de antitoxineoplossing 2 maanden bij lage temperatuur is bewaard gebleven. Wanneer het eiwitgehalte dan hooger is dan 9—10 % wordt de oplossing met steriele physiologische NaCl-oplossing verdund tot een maximum eiwit-

gehalte van 9—10 %. Van dit eindproduct wordt dan het aantal A.E. per c.c. bepaald.

Uit dit alles blijkt dus, dat in het R.S.I. voor de praktijk der serumzuivering de afzonderlijke eiwitfractie's niet worden nagegaan. Zooals in hoofdstuk III bleek, geschiedde dit wel door mij en kon ik op grond van de verkregen uitkomsten in sommige gevallen aantoonen, dat niet alleen teveel eiwit verloren ging, maar was het mij ook mogelijk aan te geven waar het verlies gelegen was.

Behalve de eiwitbepalingen, die ik verrichtte in rechtstreeks verband met de serumzuivering, werd bovendien gedurende 3 maanden de wisseling in de eiwitsamenstelling van het paardeserum nagegaan en wel bij verschillende paarden. Echter werden deze bepalingen meestal niet verricht in het serum, dat voor zuivering in het R.S.I. kwam, daar deze hoeveelheden afkomstig waren van verschillende aderlatingen, maar werd het serum, afkomstig van *elke aderlating*, onderzocht. Als regel werden de paarden eens per maand gelaten en geschiedde zulk een aderlating in twee tempo's met een tusschentijd van twee tot driemaal 24 uur.

Dank zij de hulp van *Dr. Franssen*, die het aderlaten verrichtte, kreeg ik gedurende 3 maanden hoeveelheden serum van verschillende paarden en telkens van 2 aderlatingen, waarin dan behalve het totaal eiwit ook de afzonderlijke fractie's werden bepaald.

Aan een beschrijving van de gevolgde techniek wil ik vooraf doen gaan een poging om een antwoord te geven op een aantal vragen, die verband houden met de eiwitfractie's in het paardeserum.

Zooals bekend is, worden in het serum verschillende eiwitfractie's onderscheiden. Voortdurend was in de voorafgaande bladzijden sprake van serumalbumine en serumglobuline niet alleen, maar ook van euglobuline en pseudoglobuline.

Niemand twijfelt er aan, dat er een scherp onderscheid bestaat tusschen de albumine en de globuline.

Daarentegen is steeds groote wetenschappelijke strijd gevoerd over de vraag of er slechts één globuline bestaat, dan wel of „eu"globuline van „pseudo"globuline moet worden onderscheiden, of er behalve de in zuiver water onoplosbare „eu"globuline dus ook nog een in water oplosbaar „pseudo"-globuline aanwezig is.

Over dit vraagstuk bestaat een zeer uitgebreide literatuur en daar de meeningen nog steeds verdeeld zijn is het zeer moeilijk een overzicht te geven. Daar mijn electrodialytische proeven mij echter telkens in aanraking met dit vraagstuk brachten, mocht ik het niet stilzwijgend voorbij gaan.

Zeer beknopt en onvolledig tracht ik daarom niettemin iets omtrent de volgende vragen mee te deelen:

1. Op grond van welke eigenschappen wordt een onderscheid gemaakt tusschen serumalbumine en serumglobuline?
2. Bestaat de mogelijkheid, dat albumine onder bepaalde omstandigheden in globuline overgaat, of zijn de beide groepen in wezen zóó verschillend, dat zulk een overgang niet is aan te nemen?
3. Wanneer moet worden aangenomen, dat er een serumalbumine en een serumglobuline bestaat, zijn deze fractie's dan elk als eenheden op te vatten, dan wel kunnen in elke groep weer ondergroepen worden onderscheiden; kan met name gesproken worden van een „eu"globuline en van een „pseudo"globuline?

Zonder twijfel wordt terecht een scherp onderscheid gemaakt tusschen serumalbumine en serumglobuline, daar afdoende aangetoond is, dat het hier twee geheel verschillende eiwitten betreft.

Oorspronkelijk werd het verschil in *oplosbaarheid* in water als maatstaf voor de verdeeling in de albumine en globuline beschouwd. Verdunt men serum sterk met water (b.v. tot $^1/_{10}$) dan wordt de oorspronkelijke heldere vloeistof troebel door het onoplosbaar worden der euglobuline, die neerslaat doordat het electrolytgehalte kleiner is geworden. Blijkt hieruit de invloed, die neutrale zouten in kleine concentratie's

hebben, in *sterkere zoutconcentratie's* komen eveneens verschillen te voorschijn en hiervan werd gebruik gemaakt om een andere verdeeling der serumeiwitten in albumine, pseudoglobuline en euglobuline tot stand te brengen. Verschillende neutrale zouten zijn practisch toegepast om de verschillende eiwitfractie's vast te stellen. Bij de serumzuivering kwamen wij reeds het natriumsulfaat en het natriumchloride tegen, maar ook magnesiumsulfaat en ammoniumsulfaat zijn veelvuldig voor fractiescheiding toegepast.

Verder verschillen de albumine en globuline in hun *coagulatie-temperatuur* en bleek het, dat onderscheid bestaat wat betreft *de chemische samenstelling;* b.v. in het eene eiwit zijn bepaalde aminozuren aangetoond, die in het andere ontbreken.

Naarmate de wetenschap voortschreed werden de verschillen, die aangetoond konden worden eveneens veelvuldiger. Men vond verschillen in het *iso-electrisch punt,* andere waarden voor het *goudgetal* en behalve de genoemde physische en physisch-chemische verschillen ook *serologisch* onderscheid, want de albumine bleek geen antitoxine te binden in tegenstelling met de globuline en zooals we eveneens reeds eerder bespraken werken albumine en globuline als antigeen geheel specifiek.

Het ligt geenszins in de bedoeling alle verschillen, die verder nog bestaan op te sommen, noch is het mijn plan al de genoemde verschillen toe te lichten.

Alleen iets uitvoeriger wil ik wezen omtrent die eigenschappen, waarmee ik door deze studie in aanraking kwam.

Oorspronkelijk berustte dus het onderscheid, dat men maakte tusschen serumalbumine en -globuline op de onoplosbaarheid van globuline en de oplosbaarheid van albumine in water.

Olof Hammarsten (26) heeft steeds aan dit oorspronkelijk verschil als basis van onderscheid vastgehouden.

Hammarsten gebruikte het magnesiumsulfaat om de in water onoplosbare globulinefractie neer te slaan; werd uit het aldus verkregen neerslag door dialyse het zout verwijderd,

dan ontstond er een neerslag van globuline maar de oplossing, die overbleef, bevatte toch nog eiwit.

Hammarsten nu was van meening, dat bij het dialyseeren een gedeelte der globuline in oplossing bleef, omdat het niet mogelijk was de laatste sporen electrolyt te verwijderen. In dien tijd was nog geen methode bekend, waardoor dit kon geschieden, want ook na langdurige dialyse met gedistilleerd water bleven nog resten electrolyt achter.

Reeds door *Hofmeister* was aangeraden gebruik te maken van het ammoniumsulfaat om de eiwitten van elkaar te scheiden. Door zijn leerlingen *Pohl* en *Kauder* (27) werd bij 46 % verzadiging van dit zout alle globuline neergeslagen. Volgens hen begint de serumalbumine pas neer te slaan bij een concentratie van 64 %.

Hoewel het weliswaar reeds lang bekend was, dat bij dialyse van de met neutrale zouten neergeslagen globuline in de oplossing eiwit achterbleef, maakte *Marcus* (28) voor het eerst een onderscheid in de groep der globulinen door te gaan spreken van „in water oplosbare" en „in water onoplosbare" globuline, waarmee dus de basis van de verdeeling der serumeiwitten, werd aangetast.

Spiro (29) en *Pick* (2) gingen nog een stap verder. *Pick* slaagde er in door ammoniumsulfaat tot een bepaalde graad van verzadiging toe te voegen de globuline in twee groepen te verdeelen.

Spiro nu nam aan, dat het ééne gedeelte der globuline, dat zoo verkregen werd, identiek was met het in water onoplosbare globuline en het andere met het in water oplosbare globuline en voerde de benaming „euglobuline en pseudoglobubuline" in.

Porges en *Spiro* (23) meenden zelfs drie groepen in de globuline te kunnen onderscheiden en vonden grenzen door met ammoniumsulfaat uit te zouten bij 30 %, 37 % en 44 % verzadiging.

Sindsdien is de benaming van euglobuline en pseudoglobuline in de literatuur gehandhaafd en was de verdeeling der

serumeiwitten in albumine en globuline niet meer gebaseerd op de oplosbaarheid van albumine en de onoplosbaarheid van globuline in water, maar op het gedrag tegenover bepaalde concentratie's van neutrale zouten. Op grond van deze onderzoekingen van leerlingen van *Hofmeister* werd als euglobuline beschouwd het eiwit dat bij $^1/_3$ verzadiging met ammoniumsulfaat neersloeg en als pseudoglobuline het eiwit, dat bij $^1/_2$ verzadiging met ammoniumsulfaat werd verkregen.

Deze indeeling was jarenlang de gebruikelijke, totdat *Pauli* (29) in 1922 erin slaagde langs electrodialytischen weg alle electrolyten uit een eiwitoplossing te verwijderen, waardoor men in het serum een neerslag verkrijgt, dat uit de geheele globulinefractie bestaat, terwijl de albumine in oplossing blijft. Hierdoor is men dus weer teruggekeerd tot de oorspronkelijke verdeeling der serumeiwittten, die gegrond was op de oplosbaarheid van albumine en de onoplosbaarheid van globuline in water. Uit de onderzoekingen van *Pauli* is gebleken, dat ten onrechte dan ook van pseudoglobuline wordt gesproken, want bij afwezigheid van electrolyten is het evenals de euglobuline onoplosbaar. De meening van *Olof Hammarsten* werd door deze nieuwe onderzoekingen geheel bevestigd: verwijdert men de laatste sporen electrolyt, dan slaat alle globuline, ook de pseudoglobuline neer.

Een voordeel van deze nieuwe methode om de eiwitten electrodialytisch van elkaar te scheiden is voornamelijk deze, dat hierdoor een scherpe scheiding tusschen de eiwitfractie's mogelijk geworden is.

Dit was steeds het nadeel van het uitzouten, dat hier nooit van een scherpe scheiding gesproken kon worden. Dit gold evenmin voor ammoniumsulfaat als voor magnesiumsulfaat, keukenzout en natriumsulfaat.

Over eigen ervaringen met de electrodialyse als methode om de eiwitfractie's van elkaar te scheiden, zie het volgende hoofdstuk.

Bleek uit de meeningsverschillen, die voortkwamen uit het

onderscheiden der eiwitfractie's naar hun oplosbaarheid bij af- respectievelijk aanwezigheid van zouten, al voldoende de moeilijkheden om op grond hiervan tot een uitgesproken verschil tusschen de eiwitten te besluiten, andere methoden toonden des te zekerder verschillen aan. Het *chemische onderscheid* neemt hierin zeker wel de eerste plaats in.

In 1903 toonde *Abderhalden* (30) reeds aan, dat albumine uit paardeserum in tegenstelling met globuline geen glycine bevatte, bij hydrolyse geen glycocoll afsplitste, maar daarentegen rijk was aan zwavel (1—2.2 %). Dit laatste werd bevestigd door *Hartley* (31), die het cystinegehalte van albumine veel hooger vond dan van globuline.

Bijzonder interessant zijn de onderzoekingen van *Obermayer* en *Willheim* (32), die de z.g. *aminoindex* van globuline en albumine bepaalden, d.i. het getal dat aangeeft op hoeveel stikstofatomen één eindstandige aminogroep voorkomt. Voor globuline nu vonden ze een waarde van ongeveer 21.5, voor albumine daarentegen gemiddeld slechts 12, waaruit dus blijkt, dat het aantal eindstandige aminogroepen bij beide eiwitten sterk verschilt.

Ook is het *goudgetal* volgens *Zsigmondy* (33) van de beide eiwitten zeer specifiek. *Reitstötter (34)* onderzocht dit bij verschillende sera en antisera en vond, dat euglobuline de sterkste beschermende werking had, pseudoglobuline minder sterk en albumine de minste beschermende werking.

Michaëlis (35) verkreeg verschillen, wanneer hij het *isoelectrische punt* van globuline en albumine bepaalde.

Tenslotte interesseeren ons nog de verschillen tusschen albumine en globuline voor zoover deze op *serologisch gebied* zijn gelegen.

Gebleken is, dat albumine en globuline als antigeen specifiek anaphylactisch werken. *Dale en Hartley* (16) en *Doerr* en *Berger* (17) toonden aan, dat caviae, die ingespoten werden met één eiwitfractie, in het bijzonder gevoelig waren ten opzichte van deze zelfde eiwitfractie, maar al waren ze soms

gevoelig tegenover andere fractie's, dan was dit nooit in zoo sterke mate het geval.

Ruppel c.s. en *Stern* (36) vonden, dat albumine de minste antigene werking had, waar tegenover euglobuline stond als het krachtigst werkzame.

De verschillende waarde der eiwitfractie's als antitoxinedragende stoffen werd reeds in 1902 door *Pick* (2) aangetoond en sindsdien door velen bevestigd (*Homer, Ruppel, Ornstein, Carl* en *Lasch, Adolf*).

Steeds weer werd bevestigd wat Pick reeds vond, dat het antitoxine alleen aan de globuline is gebonden, terwijl de albuminefractie in het geheel geen antitoxine bevat.

De conclusie, waartoe wij uit dit overzicht mogen besluiten is dus deze, dat wij terecht tusschen een albumine- en globulinefractie in het serum onderscheid maken. Een scherpe scheiding mogen wij echter niet verwachten, wanneer met een methode als door uitzouten wordt neergeslagen.

Voor de gevolgde wijze van serumzuivering in het R.S.I is dit dus van belang. Wij mogen niet verwachten, dat alle albumine en alle euglobuline met een dergelijke methodiek verwijderd worden.

Te zeer mag bovendien hiernaar niet gestreefd worden, omdat het gevaar zou zijn, dat belangrijke hoeveelheden antitoxine mee verwijderd zouden worden.

In tegenstelling hiermee belooft een electrodialytische serumzuivering op grond van het bovenstaande een scherpere scheiding der albumine en globuline. De practijk zou evenwel moeten bewijzen of in het R.S.I. een dergelijke methode de voorkeur zou verdienen boven die door uitzouten, daar reeds in het vorige hoofdstuk voldoende is gebleken, dat de verkregen resultaten zeer bevredigend genoemd mogen worden.

Bespreken wij vervolgens de tweede vraag, of de mogelijkheid bestaat, dat albumine onder omstandigheden in globuline

overgaat en omgekeerd. Wij zagen hoe albumine en globuline in tal van eigenschappen een onderscheid vertoonden, hetwelk niet alleen betrof de al of niet oplosbaarheid; eigenschappen, die onder tal van invloeden wisselingen vertoonen, maar dat ook verschillen in chemische samenstelling aanwezig waren, die het al direct onwaarschijnlijk maken, dat een overgang van albumine in globuline mogelijk is; althans niet door invloeden, die de werkelijke samenstelling van het eiwitmolecuul niet kunnen veranderen.

Merkwaardig is het, dat telkens pogingen worden aangewend om te bewijzen, dat albumine in globuline kan overgaan; maar tot heden is het niet gelukt om behalve de veranderingen in de oplosbaarheid ook chemische veranderingen aan te toonen.

In 1903 nam *Joachim* (37) waar, dat in het serum van een paard, dat met diphtherieserum werd geïmmuniseerd, de globuline toenam en de albumine afnam. Hij vermoedde, dat de albumine in globuline was overgegaan.

Moll (38) beweerde in 1904, dat het ook in vitro gemakkelijk gelukte albumine in globuline te veranderen. Door serumalbumine zwak alcalisch te maken en deze oplossing gedurende 1 uur bij 60° C. te verwarmen slaat bij halve verzadiging met ammoniumsulfaat het eiwit grootendeels neer. Hij bepaalde van dit kunstmatige globuline het zwavelgehalte en vond, dat dit sterk was verminderd en ongeveer gelijk was aan het lage zwavelgehalte van het echte globuline.

Ruppel c.s. (3) nam eveneens aan, dat albumine in euglobuline kan overgaan. Hij schrijft: „Diese Umwandlung findet statt beim Lagern einer salzhaltigen Albuminlösung, sie wird beschleunigt durch Erwärmen auf Körpertemperatur und Erhöhung der Alkalescenz ($^1/_{10}$ norm.) Eine fast quantitatieve Uberführung des Albumins in Euglobulin aber kann dadurch erreicht worden, dasz mann mit Kochsalz oder Ammonsulfaat (2—3 %) versetzte Albuminlösungen der Einwirkung des elektrischen Stromes aussetzt".

Verder deelt *Ruppel* mee, dat deze overgang van albumine

in euglobuline ook in het levende organisme optreedt, o.a. in het bloedserum van dieren, die met bacterieele toxinen worden ingespoten.

Uit albumine zou de euglobuline niet dadelijk ontstaan, maar eerst zou zich pseudoglobuline vormen en hieruit vervolgens euglobuline. Merkwaardig is het volgens *Ruppel*, dat absoluut albuminevrije pseudoglobulineoplossingen helder blijven, er geen neerslag van euglobuline ontstaat, terwijl in mengsels van albumine en pseudoglobuline beide eiwitten langzamerhand in euglobuline veranderen.

Ruppel bleek dus van meening te zijn, dat albumine in globuline veranderen kan en wel is het volgens hem een irreversibel proces.

Door tal van onderzoekers echter is afdoende bewezen, dat de overgang van albumine in globuline nog nooit met zekerheid is aangetoond.

Pauli (29) zag in de zuivere albumineoplossingen nooit veranderingen optreden, de eigenschappen der albumine veranderen ook na lang bewaren in het geheel niet.

De veranderingen op grond waarvan door *Moll* en *Ruppel* tot een overgang in globuline werd besloten, betroffen alle weer de physische en physisch-chemische eigenschappen der oplosbaarheid en der uitvlokking door zouten toe te voegen.

Ingrijpende veranderingen traden niet op. Dit werd voor het *„kunstmatige globuline van Moll"* aangetoond in 1912 door *Obermayer* en *Willheim*, die er de aminoindex van bepaalden en deze dezelfde vonden als die van het oorspronkelijke albumine, dus 12 (van het globuline 21).

Bijwaters en *Tasker* (39) konden aantoonen, dat de afname van de hoeveelheid zwavel gevolg was van de verwarming op 60° C; verhitten op nog hoogere temperatuur deed het zwavelgehalte nog meer verminderen. Chemische veranderingen, die geleid hebben tot een overgang van albumine in globuline, zijn dus niet aangetoond.

Uit het glycocoll- en fosforvrije albumine, dat zeer arm aan koolhydraten is, maar daarentegen veel zwavel bevat en ver-

der in de verhoudingen der aminozuren sterk met globuline verschilt, is een overgang in globuline onder invloed van weinig ingrijpende factoren, minstens zeer onwaarschijnlijk.

Chemici als *Abderhalden* en *Hammarsten* hebben van een dergelijke overgang dan ook nooit iets willen weten.

Ook van *serologisch standpunt* uit is dit vraagstuk bestudeerd. Reeds werden de onderzoekingen van *Dale* en *Hartley, Doerr* en *Berger* genoemd, die aantoonden, dat caviae met één eiwitfractie gesensibiliseerd, specifiek anaphylactisch reageerden tegenover deze fractie en niet anaphylactisch te gronde gingen door andere fractie's in te spuiten. Werden de caviae met albumine gesensibiliseerd, dan trad een anaphylactische shock alleen op door albumine in te spuiten en niet door globuline. *Ruppel* (3) echter vond deze specificiteit wel, wanneer met globuline (pseudo- en eu-) werd gesensibiliseerd, daarentegen niet wanneer het dier vooraf met albumine werd ingespoten. In dit laatste geval trad met eu- of pseudoglobuline wel typische anaphylactische shock op.

Fanconi (40) nu onderzocht de kunstmatige globuline volgens *Moll* en *Ruppel* uit albumineoplossingen van paardeserum bereid. Deze onderzoeker stelde vast, dat de eigenschappen der albumineoplossing in zooverre waren veranderd, dat bij een lagere graad van verzadiging een neerslag met ammoniumsulfaat reeds optrad; wat dit betreft gedroeg het eiwit zich dus als globuline.

Echter noch het kunstmatige globuline volgens *Moll*, noch dat volgens *Ruppel* vertoonde de antigene eigenschappen van het natuurlijke globuline. Bij een met globuline gesensibiliseerde cavia veroorzaakte het geen shock, terwijl het wel sensibiliseerde tegenover de albumine.

Resumeerend blijkt dus, dat een overgang van albumine in globuline en omgekeerd noch in vivo noch in vitro ooit is aangetoond.

Thans is nog de derde vraag als de belangrijkste overgebleven: Zijn de albumine- en globulinefractie's op zichzelf

beschouwd eenheden, d.w.z. bestaan ze uit eenzelfde soort eiwitdeeltjes of is een eiwitfractie weer opgebouwd uit eiwitdeeltjes die onderling zóó verschillen, dat terecht gesproken kan worden met name voor de globuline van een „eu"globuline en een „pseudo"globuline?

Beginnen wij met deze vraag te beantwoorden voor zoover het *de albumine*fractie betreft. De verdeeling naar het verschillend gedrag ten opzichte van zouten in verschillende concentratie's toegevoegd, speelt hierbij weer een belangrijke rol.

Zoo kon *Oppenheimer* (41) de albuminefractie weer in twee fractie's verdeelen, waarvan de eene bij $66^2/_3$ % verzadiging met ammoniumsulfaat en de tweede bij totale verzadiging neersloeg.

Halliburton (42) meende reeds in 1884 in de albuminefractie twee of drie eiwitten te kunnen onderscheiden, die een verschillende coagulatietemperatuur zouden hebben, echter door *Hougardy* (43) werd dit onderzocht en tegengesproken.

Obermayer en *Willheim* (32) vonden voor de aminoindex van albumine en evenzoo van globuline getallen, die steeds iets verschilden, wat zij meenden te kunnen verklaren door aan te nemen, dat de fractie's waren samengesteld uit een mengsel van een groot aantal kleinere fractie's. Zij bepaalden daarom de aminoindex bij de volgende percentage's verzadiging met ammoniumsulfaat: 25 %, 30 %, 37 % en 44 % (volgens de verdeeling van *Porges* en *Spiro* (23); bij 50 %; bij 66 % (een grens volgens *Oppenheimer*) en bij 100 %. De uitkomsten bewezen het bestaan van ondergroepen echter niet.

Tenslotte onderzochten *Doerr* en *Berger* (17) de verschillende eiwitfractie's *serologisch*. Zij meenden in de albuminefractie twee fractie's te kunnen onderscheiden, waarvan de grenzen gelegen zouden zijn bij 56—66 % en 66—99 % verzadiging met ammoniumsulfaat. Op grond hiervan onderscheiden zij een albumine C en een albumine D.

Uit dit overzicht blijkt derhalve, dat met zekerheid in de albuminefractie geen duidelijk begrensde afzonderlijke groepen te onderscheiden zijn. In hoever de proeven van *Doerr* en

Berger niettemin in deze richting wijzen zou door verdere onderzoekingen moeten worden nagegaan.

Wat de groep der globuline betreft, komt het vraagstuk neer op het al of niet bestaan van een „pseudo"globulinefractie. Reeds werd meegedeeld, dat *Pauli* de onoplosbaarheid van globuline in water bij afwezigheid van electrolyten aantoonde. *Hammarsten* wees er, voordat *Pauli* slaagde de oplossing electrolyt-vrij te maken, reeds op, dat de eigenschappen der oplosbaarheid dikwijls door allerlei factoren kunnen wisselen. Zoo zou volgens *Hammarsten* „in water onoplosbaar globuline" eenvoudig door aan de lucht bloot te stellen somtijds kunnen overgaan in „in water oplosbare globuline" en zou een eiwit, dat onoplosbaar is in neutrale zoutoplossing, zooals caseïne, door verontreiniging met serumbestanddeelen oplosbaar kunnen worden (44).

Mörner (45) deelt mee, dat toevoeging van zeep aan serumglobuline de neerslaggrenzen kan veranderen.

Deze gegevens moeten wel tot voorzichtigheid manen, om niet zonder meer te besluiten tot het bestaan van verschillende ondergroepen in de globulinefractie.

Wat de *chemische samenstelling* aangaat konden tusschen eu- en pseudoglobuline eigenlijk nooit verschillen worden aangetoond. *Chick* en *Hartley* (46) b.v. vonden geen onderscheid wat betreft het gehalte aan cystine en aminozuren.

Obermayer en *Willheim* (32) gingen de aminoindex na; voor euglobuline was deze ongeveer 21.5, voor pseudoglobuline eveneens ongeveer 21.5, wat er dus op wijst, dat er chemisch tusschen de beide globulinen geen groot verschil kan bestaan.

Miss Chick (5) e.a. beschouwen de euglobuline als een verbinding van pseudoglobuline met een lipoid en daaruit willen zij verklaren, dat er *serologisch* wel een verschillend gedrag der beide eiwitten aantoonbaar is. In verband hiermee is het onderzoek van *Frankenthal* (4) van beteekenis. Deze onderzoeker vond, dat de meeste lipoide bestanddeelen in de

globulinefractie aanwezig zijn. Van de globuline bevatte de euglobuline 52 % der lipoiden, de pseudoglobuline 28 %, de albumine 20 %. Meer dan de helft der lipoiden is dus aan de euglobuline gebonden en aangezien de euglobulinefractie slechts een klein gedeelte van de totale hoeveelheid eiwit bedraagt, is dit eiwit dus relatief zeer rijk aan lipoiden.

Als antigeen vertoonen euglobuline en pseudoglobuline volgens onderzoekingen van *Dale* en *Hartley* (16), *Doerr* en *Berger* (17) specifieke werking bij caviae, die vooraf gesensibiliseerd waren. Volgens *Ruppel* (3) bestaat er geen uitgesproken specifieke werking; wel werken eu- en pseudoglobuline als antigeen krachtiger dan albumine.

Als antitoxinedragende eiwitten kan tusschen eu- en pseudoglobuline al evenmin een wezenlijk onderscheid gemaakt worden. Over de beide eiwitfractie's is het antitoxine verdeeld. Volgens *Ruppel* gaat door het verwijderen der euglobuline 15—20 % van het antitoxine verloren, wat in verhouding tot de grootte der eiwitfractie's wijst op ongeveer gelijke verdeeling van het antitoxine over de euglobuline en pseudoglobuline. Intusschen vond *Mona Adolf* (48) de euglobulinefractie slechts weinig antitoxinehoudend.

Gaf het onderzoek van *Pauli* (29), waardoor aangetoond werd, dat bij afwezigheid van electrolyten alle globuline neerslaat, den doorslag aan de opvatting, dat ten onrechte gesproken wordt van euglobuline en pseudoglobuline, om practische reden is het volgens *Hammarsten* (49) gerechtvaardigd om deze nomenclatuur te blijven gebruiken. Immers slaat een gedeelte der globuline gemakkelijker neer en zijn er dus practisch verschillen, die een afzonderlijke benaming wenschelijk maken.

Ook vanuit een serologisch standpunt is een afzonderlijke benaming der beide globulinefractie's onmisbaar en werd dan ook steeds in dit proefschrift van euglobuline en pseudoglobuline gesproken.

Intusschen is de vraag, of de globulinefractie uit een meng-

sel van globulinen is samengesteld, of dat er één globuline bestaat, waarvan de oplosbaarheid en de grenzen, waarbij neerslagen met zouten optreden, afhankelijk zijn van aanwezige andere stoffen (lipoiden?), nog onopgelost (*Hammarsten* 49).

In colloid-chemische richting zal vermoedelijk naar de oplossing van dit vraagstuk gezocht moeten worden.

Na dit overzicht volgt thans een beschrijving van de gevolgde methode voor de bepaling der afzonderlijke eiwitfractie's in het paardeserum.

Reymann (47) geeft een uitvoerige beschrijving dezer techniek, die ook door mij werd gevolgd. De aldus verkregen uitkomsten zijn hierdoor volkomen vergelijkbaar met de resultaten van *Reymann*. Bij de gevolgde methodiek werd gebruik gemaakt van de *denaturatie en coagulatie van eiwitten, wanneer deze in waterige oplossing worden verhit.*

Het *totaal eiwitgehalte van het serum* werd als volgt bepaald: met een geijkt pipet van 10 cc., waarmee alle onderzoekingen over de eiwitsamenstelling werden verricht, werd 2 cc. serum afgemeten en in een glazen kolfje van 50 cc. inhoud gebracht. Na toevoegen van de dubbele hoeveelheid aqua destillata en 1 cc. 0,1 normaal azijnzuur, werd het kolfje op een kokend waterbad geplaatst gedurende een uur. Daardoor ontstaat er een volledige uitvlokking van het eiwit, wat steeds door afwezigheid van eiwit in het filtraat werd vastgesteld. Van tijd tot tijd werd het kolfje geschud en zoo noodig enkele cc. aqua destillata toegevoegd om te voorkomen, dat het praecipitaat te sterk indroogde.

Om de bepaling zoo zuiver mogelijk te verrichten, werden steeds 2 bepalingen gelijktijdig gedaan.

De kolfjes werden vervolgens, na afgedekt te zijn, bewaard tot den volgenden morgen. Dan werd het vlokkig neerslag afgefiltreerd. Dit geschiedde door vooraf in weegfleschjes gedroogde en gewogen papieren filters. Het drogen der fil-

ters gebeurde in een stoof, die op 105—110° C. werd verwarmd. De weegfleschjes met de filters erin werden gedurende 2 uur verwarmd, daarna werden ze in een exsiccator geplaatst, totdat ze afgekoeld waren. Vervolgens werden ze gewogen op een gevoelige balans tot in 0,1 milligrammen nauwkeurig. Daarna werd de verhitting en het wegen herhaald, totdat geen gewichtsafname meer optrad. Steeds werd hetzelfde filtreerpapier gebruikt. (Schleicher & Schüll No. 602 Hart).

Nadat de inhoud der kolfjes op deze filters was gebracht, werden de laatste sporen eiwit uit de kolfjes verwijderd met behulp van een gebogen glazen staafje, aan welks einde een gummi buisje was bevestigd. Voorzichtig werd eenige malen gedestilleerd water op de filters gespoten om alle electrolyt te verwijderen. De filtraten werden steeds op eiwit gecontroleerd.

Was op deze wijze alle eiwit op het filter gebracht, dan werd dit opnieuw in het weegfleschje gedaan en werd gedurende 3—4 uur bij 105—110° C. verwarmd en het weegfleschje opnieuw gewogen. Ook dit werd herhaald, totdat geen afname in gewicht meer optrad. Uit de gevonden gewichtstoename werd daarna het percentage eiwit van het serum berekend.

Behalve het *totale eiwit* werden in het serum nog de *euglobuline-*, de *pseudoglobuline-* en de *albuminefractie* bepaald.

Het *bepalen der albuminefractie* geschiedde eveneens in duplo in glazen kolfjes van 50 cc. Met de standaardpipet werd hiertoe 6 cc. serum in het kolfje gebracht. Toegevoegd werd 6 cc. aqua destillata en vervolgens 12 cc. van een koudverzadigde oplossing van ammoniumsulfaat. Niet alleen werden deze hoeveelheden steeds met dezelfde pipet gemeten, ook werden gelijke hoeveelheden altijd tusschen dezelfde deelstrepen afgemeten.

Zoo werd dus ½ verzadiging met ammoniumsulfaat verkregen, waardoor de globuline neersloeg. De kolfjes werden geschud en bleven een uur bij kamertemperatuur staan, waarna het neerslag werd afgefiltreerd. Van het heldere filtraat, dat

dus de albumine bevatte, werd nu 12 cc. in een kolfje van 50 cc. gebracht en aan dit filtraat 6 cc. aqua destillata toegevoegd. Vervolgens werd gedurende een uur op een kokend waterbad verhit, waardoor alle eiwit uitvlokte. Mocht in sommige gevallen minder goede uitvlokking opgetreden zijn, dan werd nog een kleine hoeveelheid 0.1 n. azijnzuur (druppelsgewijs) toegevoegd en meestal werd dan een goed resultaat bereikt. De kolfjes stonden dan weer tot den volgenden morgen, waarna de neerslagen op gewogen filters werden gebracht. Deze filtratie vereischte veel tijd en zorg, omdat het langen tijd duurde, voordat ook de laatste sporen ammoniumsulfaat uit het filtraat verdwenen waren. Ontstond met een 10 % oplossing van bariumchloride geen troebeling meer in het filtraat, dan werden de filters weer in de bijbehoorende fleschjes gebracht, gedroogd en gewogen en daarna het percentage albumine berekend. Aangezien 6 cc. serum verdund was tot 24 cc., en in 12 cc. filtraat de hoeveelheid eiwit werd bepaald, gaf de gewichtstoename dus de hoeveelheid albumine aan in 3 cc. serum.

De *euglobulinefractie* werd eveneens in 6 cc. serum bepaald door ammoniumsulfaat toe te voegen tot $^1/_3$ verzadiging. In een kolfje van 50 cc. werd weer 6 cc. serum gebracht, 12 cc. aqua destillata hierbij gedaan en vervolgens 9 cc. van een verzadigde oplossing van ammoniumsulfaat. Na 1 uur werd het neerslag der euglobuline afgefiltreerd en 18 cc. van het filtraat, waaraan 1 cc. 0.1 n. azijnzuur werd toegevoegd, op het waterbad verhit. Overigens werd op dezelfde manier te werk gegaan als boven beschreven voor het bepalen der albuminefractie. De gewichtstoename der filters, die tenslotte gevonden werd, berustte hier dus op het gecoaguleerd zijn van de pseudoglobuline en de albumine in het filtraat. Daar van 6 cc. serum was uitgegaan en het volume 27 cc. werd, waarvan in 18 cc. het eiwit werd bepaald, was de gewichtstoename dus de hoeveelheid pseudoglobuline en albumine, die in 4 cc. serum aanwezig was.

Uit deze 3 bepalingen waren nu eenvoudig de andere eiwitfracties te berekenen. Behalve het totale eiwit werd dus op deze wijze gevonden: de albuminefractie, de totale hoeveelheid globuline en de afzonderlijke fracties der eu- en pseudoglobuline.

Niet alleen bij de onderzoekingen naar aanleiding van de serumzuivering door uitzouten werd van deze techniek gebruik gemaakt, ook werd gedurende 3 maanden geregeld het serum onderzocht van de paarden, die diphtherie-, roodvonk- en tetanusserum leverden en zooals op bldz. 67 werd meegedeeld, werd de wisseling in de samenstelling van het serum nagegaan, die na een aderlating optrad. De gelegenheid ontbrak mij om de wisselingen in de eiwitsamenstelling na te gaan, die in het serum optreden in den aanvang van de immuniseering der dieren.

Niettemin werden 49 maal de afzonderlijke eiwitfractie's in het serum van verschillende paarden (No. III, IV, V, VI, VII, IX, XII, XV, XVII, XVIII), van een schaap en een geit bepaald en zullen eenige der gevonden uitkomsten worden meegedeeld.

Om te onderzoeken, of een voldoende nauwkeurigheid bij de eiwitbepalingen werd bereikt, werd na twee maanden nagegaan hoe groot de gemiddelde fout was, die gemaakt werd.

Aangezien ook *Reymann* hierover mededeelingen verstrekt, kon ik mijn uitkomsten met de zijne vergelijken en bleek het mij, dat ten naaste bij met overeenkomstige nauwkeurigheid werd gewerkt.

In éénzelfde serum werden dezelfde bepalingen, 12 in aantal, verricht op de boven beschreven manier.

De verkregen uitkomsten zijn medegedeeld in tabel 7.

Reymann berekent de gemiddelde fout der afzonderlijke eu- en pseudoglobulinefractie's uit de formule $\sqrt{a^2 + b^2}$, waarin a en b de gemiddelde fouten zijn der percentage's eiwit, die met elkaar verminderd, de gezochte fractie opleveren: b.v.

de totale globuline wordt gevonden door het totaal eiwit te verminderen met de albuminefractie; de gemiddelde fout der globulinefractie is volgens *Reymann* dus de wortel uit de som van de quadraten der gemiddelde fouten van het totaal eiwit en van de albuminefractie, en bedraagt derhalve: $\sqrt{0.023^2 + 0.075^2} = 0.078$;

voor de euglobulinefractie (= % totaal eiwit — % som van pseudoglobuline en albumine, zie tabel 7 kolom 3): $\sqrt{0.023^2 + 0.068^2} = 0.072$, en voor de pseudoglobulinefractie (= % totaal globuline — % euglobuline): $\sqrt{0.078^2 + 0.072^2} = 0.065$.

TABEL 7

Totaal eiwit %	Albumine %	Pseudoglobine + Albumine %
7.065	3.07	6.19
7.060	3.04	6.19
7.055	3.01	6.26
7.035	2.98	6.28
7.035	2.96	6.29
6.990	2.95	6.32
6.985	2.93	6.35
6.985	2.92	6.37
6.980	2.87	6.38
6.960	2.80	6.38
6.950	2.80	6.41
6.945	2.77	6.45
Gemiddelde waarde 7.00	2.93	6.32
„ fout ± 0.023	± 0.075	± 0.068

De bedoeling van deze berekeningen was alleen om na te gaan, of mijn uitkomsten met die van *Reymann* vergelijkbaar waren. *Reymann* vond de volgende gemiddelde fouten:

voor het % totaal eiwit : ± 0.028
„ „ „ albumine : ± 0.055
„ „ „ totaal globuline: ± 0.062
„ „ „ euglobuline : ± 0.092
„ „ „ pseudoglobuline: ± 0.068

waaruit dus blijkt, dat de verschillen met de door mij gevonden waarden niet groot zijn. De door mij verkregen uitkomsten bij de bepalingen der afzonderlijke eiwitfractie's in het paardeserum zijn dan ook volkomen met de door *Reymann* gevondene te vergelijken.

Een teleurstelling was het, dat ik geen gelegenheid had om de veranderingen na te gaan, die in de eiwitsamenstelling van het serum optreden nadat met de immuniseering was begonnen.

Alle onderzoekers namen na het inspuiten van toxinen waar, dat het totale eiwitgehalte toenam en eveneens de globulinefractie, terwijl de albuminefractie kleiner werd. Meeningsverschil heerscht nu nog over de vraag, of de toename van de hoeveelheid globuline parallel loopt aan de beschuttende werking, die het serum uitoefent, dus verband houdt met het gehalte aan antitoxine. De globulinetoename is in elk geval geen specifieke eigenschap van het inbrengen van toxine, want allerlei vreemde stoffen (soortvreemd eiwit, gelatine en allerlei bacterieele antigenen) geven dit verschijnsel, zooals o.a. door *Moll* (47), *Hurwitz en Meyer* (50), *Doerr en Berger* (51), *Reymann* (47) werd aangetoond. *Wells* (52) was van meening, dat de globulinetoename verband hield met pathologische processen, want in konijnenproeven gelukte het hem niet, door de dieren teveel te laten eten, de verhouding tusschen de globuline- en de albuminefractie te wijzigen, hoewel de totale hoeveelheid eiwit toenam; terwijl daarentegen in een geval waarin bij een konijn een absces ontstond, het globulinegehalte aanmerkelijk steeg.

Sommige onderzoekers, zooals *Wells, Hurwitz en Meyer*, zien in de globulinetoename dan ook niet anders dan een pathologisch proces, terwijl anderen hetzij een verband, hetzij een

parallelisme aannemen tusschen de globulinevermeerdering en de toename van het gehalte aan antitoxine.

De laatsten wijzen steeds weer op de globulinetoename na immuniseeren met diphtherietoxine en op de aanwezigheid van het antitoxine alleen in de globulinefractie, speciaal in de pseudoglobulinefractie, wat reeds in 1899 door *Seng* (1) werd aangetoond.

Zoo nam *Atkinson* (53) een parallelisme aan tusschen antitoxine- en globulinetoename, welke opvatting eveneens door *Ledingham* (54) werd gedeeld.

Banzhaf en Gibson (47) spraken op grond van onderzoekingen bij 11 met diphtherietoxine geïmmuniseerde paarden dit parallelisme tegen. Slechts in enkele gevallen konden zij het aantoonen.

Reymann (47) onderzocht opnieuw dit vraagstuk en verrichtte een onderzoek bij 24 paarden, die alle met diphtherietoxine werden geïmmuniseerd. Na een zeer uitvoerig onderzoek komt hij tot de volgende conclusie: „dasz der Parallelismus zwischen Diphtherieantitoxin und Globulinsteigerung, von *Atkinson* und *Ledingham* angenommen, aber von *Banzhaff* und *Gibson* als eine offene Frage hingestellt. . . . gar kein konstantes Phänomen ist und nur in Einzelfällen andeutungsweise nachgewiesen werden konnte."

Wat de verschillen betreft, die in het serum aanwezig waren bij de eerste en tweede aderlating met een tusschentijd van één tot tweemaal 24 uur, werden uitkomsten gevonden, die medegedeeld zijn in de tabellen 8 tot 14. In deze tabellen geven de cijfers het percentage eiwit aan, terwijl de tusschen haakjes geplaatste cijfers de hoeveelheden aangeven, berekend naar 100 gram eiwit.

TABEL 8

Eiwitsamenstelling Serum Paard IV (diphtherie) November 1927

	1ste aderlating	2de aderlating
Totaal eiwit	8.75 (100)	8.05 (100)
Albumine	2.93 (33.49)	2.80 (34.78)
Totaal globuline	5.82 (66.51)	5.25 (65.22)
Euglobuline	0.54 (6.17)	0.23 (2.86)
Pseudoglobuline.	5.28 (60.34)	5.02 (62.36)

TABEL 9

Eiwitsamenstelling Serum Paard VII (normaal serum) December 1927

	1ste aderlating	2de aderlating
Totaal eiwit	7.77 (100)	6.83 (100)
Albumine	3.60 (46.34)	3.27 (47.88)
Totaal globuline	4.17 (53.66)	3.56 (52.12)
Euglobuline	1.29 (16.60)	0.74 (10.83)
Pseudoglobuline	2.88 (37.06)	2.82 (41.29)

TABEL 10

Eiwitsamenstelling Serum Paard IX (roodvonk) December 1927

	1ste aderlating	2de aderlating
Totaal eiwit	8.67 (100)	8.17 (100)
Albumine	2.61 (30.10)	2.73 (33.41)
Totaal globuline	6.06 (69.90)	5.44 (66.59)
Euglobuline	0.93 (10.73)	0.97 (11.88)
Pseudoglobuline	5.13 (59.17)	4.47 (54.71)

TABEL 11

Eiwitsamenstelling Serum Paard XII (diphtherie) November 1927

	1ste aderlating	2de aderlating
Totaal eiwit	7.98 (100)	7.42 (100)
Albumine	3.27 (40.98)	3.07 (41.38)
Totaal globuline	4.71 (59 02)	4.35 (58.62)
Euglobuline	0.31 (3.88)	0.10 (1.34)
Pseudoglobuline	4.40 (55.16)	4.25 (57.28)

TABEL 12

Eiwitsamenstelling Serum Paard XVII (tetanus) December 1927

	1ste aderlating	2de aderlating
Totaal eiwit	7.64 (100)	7.14 (100)
Albumine	3.01 (39.39)	2.87 (40.20)
Totaal globuline	4.63 (60.61)	4.27 (59.80)
Euglobuline	0.74 (9.70)	0.82 (11.48)
Pseudoglobuline.	3.89 (50.91)	3.45 (48.32)

TABEL 13

Eiwitsamenstelling Serum Paard XVII (tetanus) Januari 1928

	1ste aderlating	2de aderlating
Totaal eiwit	7.81 (100)	7.85 (100)
Albumine	2.28 (29.19)	2.83 (36.05)
Totaal globuline	5.53 (70.81)	5.02 (63.95)
E globuline	0.98 (12.54)	0.88 (11.22)
Pseudoglobuline.	4.55 (58.27)	4.14 (52.73)

TABEL 14

Eiwitsamenstelling Serum Paard XVIII (roodvonk) November 1927

	1ste aderlating	2de aderlating
Totaal eiwit	8.77 (100)	8.43 (100)
Albumine	2.59 (29.53)	2.57 (30.48)
Totaal globuline	6.18 (70.47)	5.86 (69.52)
Euglobuline	0.65 (7.41)	0.76 (9.02)
Pseudoglobuline.	5.53 (63.06)	5.10 (60.50)

Beschouwen wij deze 7 voorbeelden, dan blijkt, dat bij de tweede aderlating een duidelijke afname van de totale hoeveelheid eiwit is opgetreden. Alleen in tabel 13 is een kleine toename aanwezig, die binnen de grenzen der proeffout is gelegen.

De hoeveelheid totale globuline is in alle gevallen duidelijk afgenomen en wel in veel sterker mate dan de hoeveelheid albumine, die in sommige gevallen de tweede maal zelfs meer bedroeg dan de eerste keer (tabel 10 en 13), terwijl in andere gevallen de verschillen slechts zeer klein waren.

Binnen de globulinefractie vertoont de pseudoglobuline de tweede maal steeds duidelijk kleinere waarden, terwijl de euglobulinefractie over het algemeen minder sterk afneemt.

De verschuivingen in de eiwitfractie's worden duidelijker zichtbaar wanneer de cijfers, die tusschen haakjes geplaatst zijn, met elkaar worden vergeleken.

Tabel 15 geeft de cijfers van de verschuivingen in de eiwitfractie's aan, waarbij de totale hoeveelheid eiwit 100 bedraagt.

Uit deze tabel blijkt zeer duidelijk, dat bij de tweede aderlating de hoeveelheid albumine relatief is toegenomen en de hoeveelheid totaal globuline steeds is afgenomen.

Binnen de globulinefractie is evenwel geen constante wisseling aantoonbaar, nu eens is de hoeveelheid euglobuline dan weer de hoeveelheid pseudoglobuline relatief toegenomen.

TABEL 15

No. der tabel	Albumine	Totaal globuline	Euglobuline	Pseudo-globuline
8	+ 1.29	— 1.29	— 3.31	+ 2.02
9	+ 1.54	— 1.54	— 5.77	+ 4.23
10	+ 3.31	— 3.31	+ 1.15	— 4.46
11	+ 0.40	— 0.40	— 2.54	+ 2.12
12	+ 0.81	— 0.81	+ 1.78	— 2.59
13	+ 6.86	— 6.86	— 1.32	— 5.54
14	+ 0.95	— 0.95	+ 1.61	— 2.66

Reymann (47), die tot ongeveer dezelfde resultaten komt (hij vindt de euglobulinefractie relatief steeds afgenomen) schrijft op grond van bepalingen van het antitoxinegehalte, dat hij bij de eerste en tweede aderlating verrichtte: „Aus einer Vergleichung der Antitoxinabnahme nach Aderlasz mit der Abnahme der verschiedenen Globulinfraktionen geht hervor, dasz auch in dieser Beziehung kein Parallelismus unter ihnen besteht."

De relatieve toename van de hoeveelheid albumine, die steeds na aderlaten optreedt, moet worden toegeschreven aan een groote toevoer van lymphe, die relatief meer albumine bevat dan globuline. *(Reymann.)*.

HOOFSTUK V

INLEIDING TOT DE ELECTRODIALITYSCHE PROEVEN

Handelden de vorige hoofdstukken over de serumzuivering door uitzouten, zooals deze o.a. in het R.S.I. te Utrecht wordt verricht, in de volgende bladzijden zal nog een korte beschrijving gegeven worden van de wijze, waarop langs electrodialytischen weg zuivere pseudoglobulineoplossingen werden verkregen. Reeds werd op bladzijde 14 meegedeeld, dat in Duitschland deze methode de electrosmotische wordt genoemd en volgde op bladzijde 16 een korte beschrijving van de daarbij gebruikte electrodialysatoren.

In 1911 richtte *Botho Schwerin* te Berlijn de Electroosmose-Gesellschaft op, waar met zuiver industrieele doeleinden o.a. de electrodialyse werd bestudeerd en deze methode toegepast o.m. voor het verkrijgen van zuivere pseudoglobulineoplossingen uit antitoxische en antibacterieele sera; van electrodialyse werd echter nooit gesproken, steeds was sprake van electroosmose. Dit is de oorzaak, dat in Duitschland en Oostenrijk steeds deze naam wordt gebruikt. (Zie *Dhéré* (55).)

Verwarring is hierdoor mogelijk, omdat onder electroosmose of electro-endosmose in de physische chemie verstaan wordt de vloeistofverplaatsing door een poreusen wand bij een aangebracht potentiaalverschil (56), terwijl het bij de electrodialyse gaat om de verwijdering van electrolyten uit een oplossing, waarbij van den electrischen stroom gebruikt gemaakt wordt.

Wij zullen dan ook steeds van electrodialyse spreken. Deze naam werd voor het eerst in 1905 gebruikt door *Tribot* en

Chrètien (55). Door *Dhéré* (55) werd aanvankelijk zoowel van electrische dialyse als van electrodialyse gesproken; de laatste naam verdient om zijn kortheid de voorkeur.

In Duitschland vond de naam ingang door onderzoekingen in het laboratorium van *Pauli* (1916), tengevolge waarvan *Pauli* (29) in Duitschland geldt als degene, die aan de methode den naam van electrodialyse gaf.

Met verschillende doeleinden werd van de electrodialyse gebruik gemaakt, o.a. tot het zuiveren van gelatine, albumine en globuline, van proteiden, van enzymen en tot het isoleeren van antistoffen.

De resultaten zijn zeer bevredigend. Zoo schrijft b.v. *Prof. W. E. Ringer* (57): „Mittels der gewöhlichen Dialyse konnten wir das Euglobulin nicht genügend von Electrolyten befreien.... Wir haben deshalb die electrische Dialyse verwendet und konnten dabei die Leitfähigkeit des Pferdeblutserums (etwa einen halben Liter) in einigen Stunden auf beinahe diejenige des destillierten Wassers erniedrigen."

In de literatuur over electrodialyse staan duidelijk twee richtingen tegenover elkaar. Aan den eenen kant wordt getracht op wetenschappelijke vragen een antwoord te geven: *Mona Adolf* (48), *Locke en Hirsch* (58), *Pauli* (29), *Freundlich en Loeb* (59). Anderen, en hierin gaat de Electroosmose Gesellschaft vooraan *(Ruppel, Ornstein, Carl* en *Lasch)*, streefden naar practische toepassing van de electrodialyse o.a. bij de serumzuivering. Hiervan was het gevolg, dat *Ruppel* c.s. een methode vonden, waarbij langs electrodialytischen weg het serum gezuiverd kon worden, zonder dat het tot op heden gelukt is een verklaring te geven van de verschijnselen, die zich daarbij voordoen.

De wijze, waarop de electrodialyse door *Dhéré, Pauli, Mona Adolf*, e.a. werd toegepast, verschilt sterk van de methode van *Ruppel* c.s. Niet alleen worden andere toestellen gebruikt, ook de keuze der membranen is anders, verder wordt met andere potentiaalverschillen gewerkt en is de tijd, gedurende welken de vloeistof in den electrodialysator blijft, zeer verschillend.

Dhéré (55) schrijft, dat reeds in 1910 voor het eerst in het Physiologisch Instituut te Freiburg (Zwitserland) eiwitten geheel van electrolyten werden gezuiverd. In 1910 deelden *Dhéré* en *Gorgolewski* (55) mede, dat door electrodialyse in serum een neerslag optreedt, dat uit pseudoglobuline bestaat. Door *Pauli* c.s. (29) werden deze onderzoekingen verder uitgebreid. Zij toonden aan, dat bij totale verwijdering van de electrolyten alle globuline neerslaat, zoodat hiermee bewezen was, dat ten onrechte van pseudoglobuline wordt gesproken.

Pauli nu werkte, in tegenstelling met *Ruppel*, met lage stroomsterkte en liet gedurende 48 uur de eiwitoplossing in den electrodialysator. Hij gebruikte als membranen perkamentpapier of collodium. Door een bepaalde techniek slaagde hij er in, alle globuline neer te slaan, dus zoowel de eu- als de pseudoglobuline, zonder dat er in de vloeistoffen sterke reactieveranderingen optraden.

Mona Adolf (48) verkreeg door electrodialyse van diphtherieserum, dat 50 maal werd verdund, eveneens een volledig neerslag der globuline, dus zoowel der eu- als der pseudoglobuline en kon in dit neerslag, nadat het weer was opgelost, de antistoffen aantoonen, terwijl de albumineoplossing in het geheel geen antitoxinen bevatte. Ook kon zij aantoonen, dat het eiwit, dat het eerste neerslaat, de euglobuline, slechts weinig antitoxine draagt.

Werd door deze onderzoekers dus wetenschappelijk aangetoond, dat bij afwezigheid van electrolyten de globulinefractie geheel neerslaat, bij de electrodialyse volgens *Ruppel* wordt alleen een gedeelte der globuline, volgens hem de euglobuline, neergeslagen en blijft de pseudoglobuline in oplossing.

Ruppel beoogde bij de electrodialytische serumzuivering een snelle verwijdering der electrolyten, maar ondervond het nadeel, dat met een groote stroomsterkte bij het gebruik van 2 membranen van perkamentpapier sterke reactieveranderingen optraden.

Op grond van onderzoekingen van *Hittorf* (60), *Bethe* en *Toropoff* (61), die in een electrolytoplossing één membraan

plaatsten en den invloed van den electrischen stroom bestudeerden op de veranderingen in reactie en concentratie aan beide zijden van de membraan, plaatste *Ruppel* aan den anodekant een positieve membraan, d.i. een membraan, die voornamelijk doorlaatbaar is voor anionen en aan den kathodekant een negatieve membraan, d.i. een membraan, die voornamelijk doorlaatbaar is voor kationen. Als positieve membraan, die voor het practische doel, goede resultaten gaf, gebruikte hij een chroomgelatinemembraan (zie volgend hoofdstuk), als negatieve membraan perkamentpapier.

Overigens deelde *Ruppel* weinig mede over de methodiek, die gevolgd werd. De theoretische beschouwingen, die hij over de electrodialyse gaf, werden door *Pauli* o.a. heftig aangevallen en bestreden.

Freundlich en *Loeb* (59) trachtten het eerst de processen, die zich bij de electrodialyse volgens *Ruppel*, afspelen, nader te verklaren, door de verschijnselen te bestudeeren, wanneer geen serum, maar electrolytoplossingen in den electrodialysator werden gedaan.

Ook Ettisch en *Beck* (62) streefden hierna, maar nog slechts zeer onvoldoende is men er in geslaagd de processen te verklaren.

HOOFDSTUK VI

PROEVEN OVER DEN INVLOED VAN VERSCHILLENDE MEMBRAANCOMBINATIES BIJ DE ELECTRODIALYSE

De in dit hoofdstuk beschreven proeven werden alle verricht met een electrodialysator, dien ik in het laboratorium van *Professor Ringer* tot mijn beschikking had.

Van dezen, uit eboniet vervaardigden electrodialysator is op plaat 1 en 2 een afbeelding gegeven.

Plaat 1 geeft dit toestel weer „voor het gebruik gereed", voorzien van slangen, die het koelwater toevoeren (in 't midden der figuur), van de slangen waardoor het leidingwater resp. het gedestilleerde water in de anode- en kathoderuimte wordt toegevoerd (links) en afgevoerd (rechts beneden). Verder is de roerinrichting ten deele zichtbaar.

Het toestel bestaat uit 3 deelen: de *middenruimte*, waarin de te dialyseeren vloeistof wordt gebracht en waarin de roerinrichting de vloeistof gedurende de proef steeds in beweging houdt en de *anode-* en *kathoderuimte*, waarin de electroden en de glazen koelbuizen zijn aangebracht en waardoor tijdens de proef leidingwater of gedestilleerd water stroomt.

De 3 cellen zijn door 2 membranen van elkaar gescheiden; nadat de membranen zijn aangebracht wordt het toestel in elkaar geplaatst en worden met behulp van 4 schroeven de cellen stevig tegen elkaar gedrukt. Bovendien is tusschen de cellen een gummiband gelegd, zoodat vloeistofverlies niet kan optreden.

Het toestel is geplaatst op een ijzeren statief.

Plaat 2 laat het inwendige zien.

De voorste cel is verwijderd en de voorste membraan opzij geslagen, waardoor de roerinrichting in de middenruimte zichtbaar is. Hierachter is de tweede membraan te zien.

In de voorste cel is de electrode benevens de koelbuis duidelijk te onderscheiden.

In den bodem van de middenruimte is een opening, die met een stop gesloten kan worden en waardoor na afloop der proef de vloeistof uit de middenruimte kan worden verwijderd.

De binnenafmetingen van den electrodialysator zijn 19.25 c.M. × 11.75 c.M. × 9.25 c.M., zoodat de totale inhoud ± 2 Liter bedraagt. De afmetingen van de middencel zijn 2.4 c.M. × 11.75 c.M. × 19.25 c.M., doordat de membranen echter nooit strak gespannen zijn, kan een hoeveelheid van ± 0.50 à 0.55 L. gelijktijdig worden gedialyseerd.

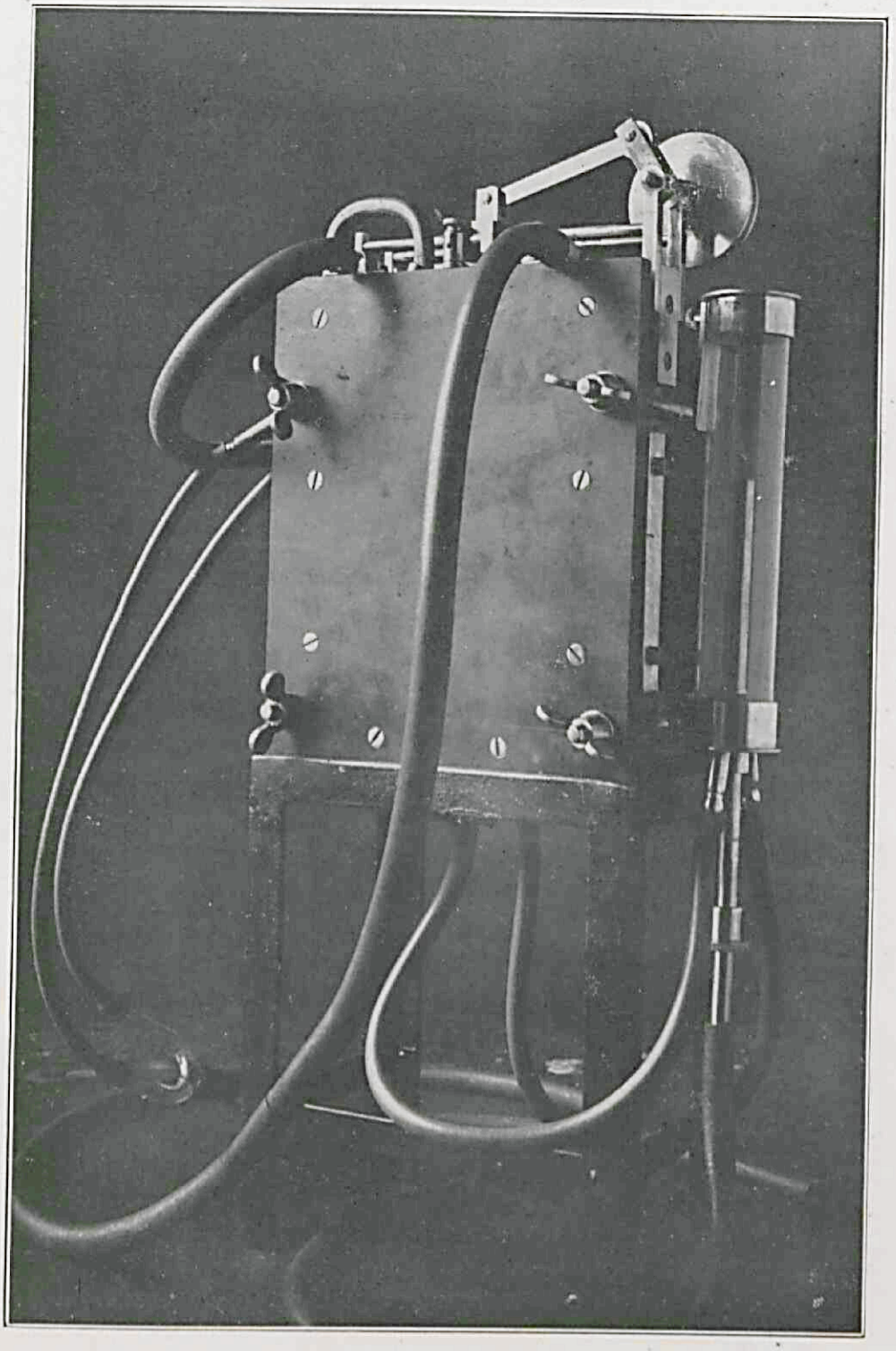
Als electroden werden gebruikt: een platina electrode aan den anodekant en een messing electrode aan den kathodekant. Het netwerk der electroden was 18 c.M. × 10.5 c.M., dat zich beiderzijds op 1 c.M. afstand van de membraanoppervlakte bevond.

De opstelling der proeven was steeds de volgende: de electrische stroom van 220 Volt werd behalve door den electrodialysator geleid door een ampèremeter en een weerstandsbank. Steeg de stroomsterkte tijdens een proef hooger dan 1.5 ampère, dan werd zooveel weerstand ingeschakeld, tot de grens van 1.5 ampère niet meer werd overschreden.

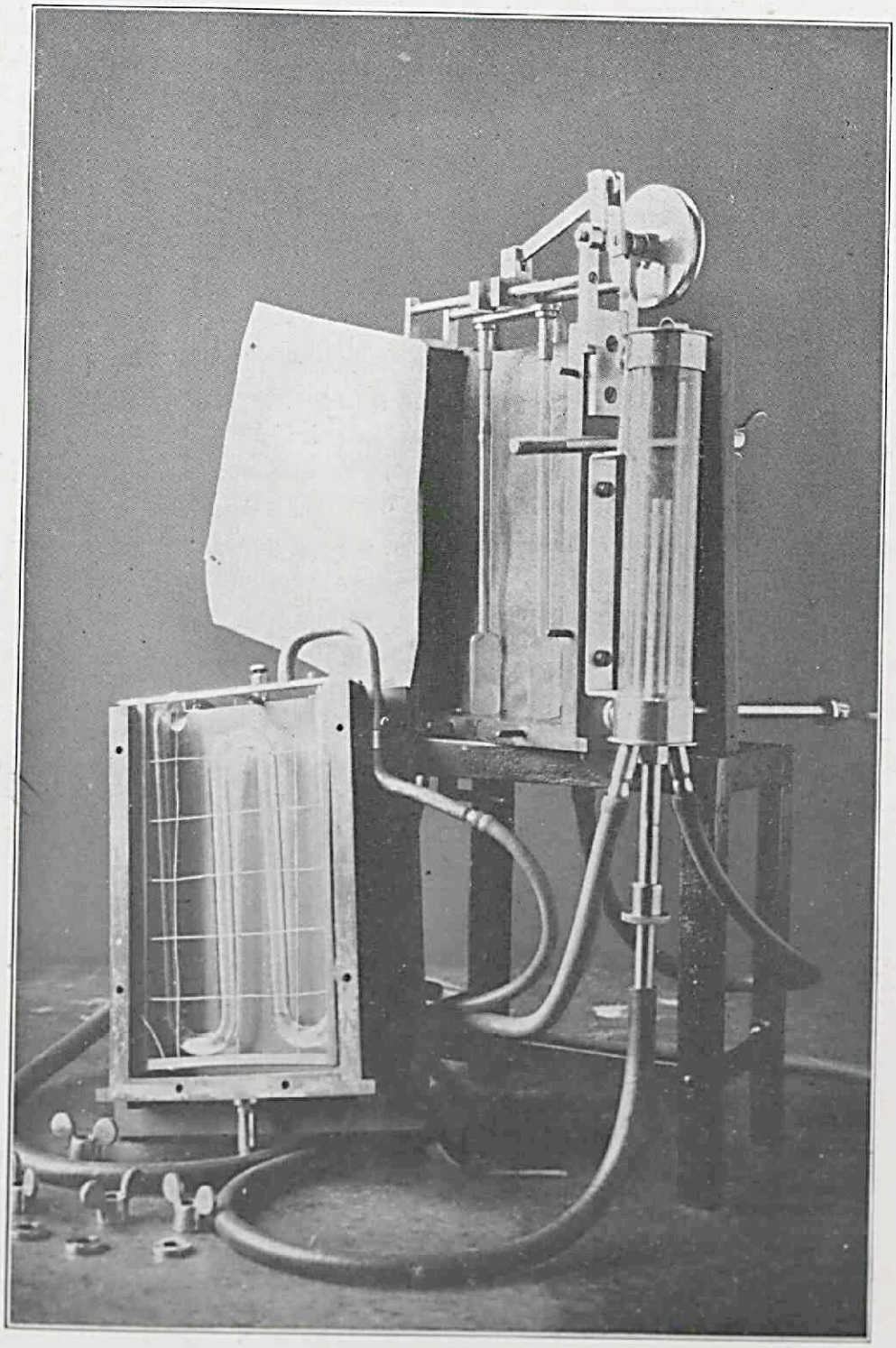
Door proeven met *10 × verdund paardeserum* werd nu nagegaan, welke invloed verschillende membraancombinatie's hebben:

1. op de reactie van het verdunde serum;
2. op het uitvlokken van eiwit.

De volgende membraancombinatie's werden achtereenvolgens bestudeerd:



Plaat 1



Plaat 2

A. aan den anodekant: perkamentpapier (— membraan).
aan den kathodekant: perkamentpapier (— membraan).
B. aan den anodekant: varkensblaas (+ membraan).
aan den kathodekant: varkensblaas (+ membraan).
C. aan den anodekant: chroomgelatinemembraan vlg. *Ruppel.*
aan den kathodekant: chroomgelatinemembraan vlg. *Ruppel* (beide + membranen).
D. aan den anodekant: varkensblaas (+ membraan).
aan den kathodekant: perkamentpapier (— membraan).
E. aan den anodekant: perkamentpapier (— membraan).
aan den kathodekant: varkensblaas (+ membraan).
F. aan den anodekant: chroomgelatinemembraan vlg. *Ruppel* (+ membraan).
aan den kathodekant: perkamentpapier (— membraan).
G. aan den anodekant: perkamentpapier (— membraan).
aan den kathodekant: chroomgelatinemembraan vlg. *Ruppel* (+ membraan).

Als positieve membranen werden dus de varkensblaas en de chroomgelatinemembraan volgens *Ruppel* gebruikt, als negatieve membraan het perkamentpapier.

De chroomgelatinemembraan werd gemaakt volgens de opgave van *Stern* (63): 10 gram gelatine, 3 gram ammoniumbichromaat en 5 gram glycerine werden achtereenvolgens in 100 cc. verwarmd gedestilleerd water opgelost.

Deze warme oplossing werd met een penseel op een vooraf uitgespannen doek gestreken en dit eenige malen herhaald. Daarna werd deze doek aan het licht blootgesteld gedurende 14 dagen, waarna de membraan vóór het gebruik eenige dagen in gedestilleerd water werd gelegd.

Aan de proeven met 10 × verdund paardeserum ging de volgende proef vooraf. In den electrodialysator werden 2 membranen van perkamentpapier geplaatst en het toestel geheel met leidingwater gevuld, dus zoowel de middencel als de

zijruimten. Werd nu de stroom door het toestel geleid, zoo wees de ampèremeter de eerste oogenblikken 0.74 ampère aan. Direct begon de stroomsterkte geleidelijk te dalen tot na 20 minuten een minimum van 0.19 ampère werd bereikt. Hoewel voortdurend leidingwater door de anode- en kathoderuimte stroomde, daalde de stroomsterkte niet verder. Dit geschiedde pas, toen in plaats van leidingwater stroomend gedestilleerd water in de zijruimten werd gebracht. De stroomsterkte daalde nu tot 0.02 ampère.

Deze proef leerde dus, dat bij doorstrooming met leidingwater een gedeelte der electrolyten in de middencel door den electrischen stroom verwijderd kan worden, maar dat er een oogenblik komt, waarop gedestilleerd water het leidingwater moet vervangen. Bij alle volgende proeven werd eerst doorstroomd met leidingwater en daalde de stroomsterkte niet verder, dan eerst werd het leidingwater vervangen door gedestilleerd water. Onnoodig te zeggen, dat voor de electrodialyse groote hoeveelheden gedestilleerd water noodig waren. In sommige gevallen bedroeg de verbruikte hoeveelheid tijdens één proef ± 10 Liter.

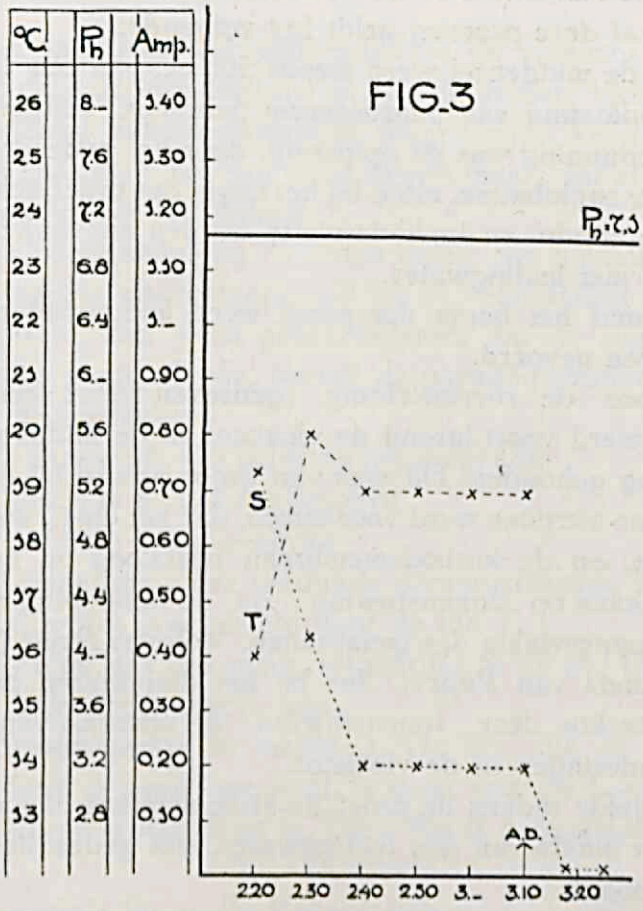
Werd de electrodialysator geheel met aqua destillata gevuld, dan bleek nog steeds een geringe stroomsterkte van ± 0.02 ampère aanwezig te zijn. Vandaar dan ook, dat het nooit gelukte de stroomsterkte beneden deze grens te doen dalen.

In *figuur 3* is het verloop der beschreven proef graphisch voorgesteld. Op de abseis is de tijd aangegeven, waarbij de afstand tusschen 2 streepjes 10 minuten is. Op de ordinaat zijn aangegeven: de temperatuur van de vloeistof in de middenruimte (° C.), de reactie (ph.) der vloeistof (die hier van geen belang was) en de stroomsterkte (ampère's).

De lijnen S en T geven het verloop der stroomsterkte en der temperatuur aan.

A.D. wijst het oogenblik aan, waarop het leidingwater door

Aqua Destillata wordt vervangen. De lijn der stroomsterkte, S, laat vanaf dit oogenblik een snelle daling zien.



Anodekant: perkamentpapier.
Kathodekant; „
De electrodialysator gevuld met leidingwater, later met Aqua Destillata.

De temperatuurlijn vertoont een stijging, die na 10 minuten maximaal werd, daarna trad een daling in en bleef de temperatuur op een constante hoogte. De proef wijst dus ook op de noodzakelijkheid om tijdens de proef te koelen, daar anders belangrijke temperatuursverhoogingen, vooral bij aanwezigheid van veel electrolyten, kunnen optreden.

De thans volgende figuren 4—10 zijn elk één voorbeeld van de op blz. 97 genoemde membraancombinatie's, met in de middenruimte van den E.D. 10 × verdund paardeserum.

Voor *al deze proeven* geldt het volgende:

1. In de middencel werd steeds 500 cc. van een *10 × verdunde oplossing* van paardeserum gebracht. Tengevolge van deze verdunning was de oplossing, door het gedeeltelijk neerslaan der euglobuline, altijd bij het begin der proef licht troebel.

2. De anode- en kathoderuimte werden aanvankelijk doorstroomd met leidingwater.

3. Vanaf het begin der proef werd leidingwater door de koelbuizen gevoerd.

4. Door de roerinrichting (gedreven door een kleinen motor) werd voortdurend de vloeistof in de middenruimte in beweging gehouden. Dit was van groot belang bij deze proeven, want hierdoor werd voorkomen, dat het eiwit, wanneer dit uitvlokte, op de kathodemembraan neersloeg en bestond er minder kans op „Ionenstuwing", d.i. de ophooping van ionen aan de oppervlakte der membranen. Volgens *Pauli* (29) is bij de methode van *Ruppel*, dus bij het dialyseeren met groote stroomsterkte, deze „Ionenstuwing" de oorzaak van de reactieveranderingen in de vloeistof.

5. Daalde tijdens de proef de stroomsterkte niet meer, dan werd, in plaats van met leidingwater, met gedestilleerd water doorstroomd.

6. Door den weerstand te regelen werd nauwkeurig zorg gedragen, dat de stroomsterkte nooit boven 1.5 ampère steeg.

7. Als regel om de 10 minuten werd: a) de temperatuur gecontroleerd, b) de reactie met lakmoespapier nagegaan, c) met een pipet 5 cc. uit de middenruimte genomen en in een reageerbuisje gebracht, en werd na afloop der proef van elk dezer hoeveelheden langs colorimetrischen weg de ph bepaald. Bovendien gaf de reeks buisjes na afloop een overzicht over het geheele proces. Een nadeel van den door mij gebruikten electrodialysator was, dat, in tegenstelling met den glazen electrodialysator van *Pauli*, niet gezien kon worden wanneer de

vloeistof troebel werd. Intusschen werd dit bezwaar overwonnen, door om de 10 minuten 5 cc. in een reageerbuisje te brengen.

8. Was na afloop der electrodialyse de vloeistof troebel, dan werd deze gecentrifugeerd en aan de heldere vloeistof tot $^1/_3$ verzadiging ammoniumsulfaat toegevoegd. Trad nu een duidelijke troebeling op, dan werd aangenomen, dat alle euglobuline nog niet was verwijderd.

9. Was de vloeistof bij $^1/_3$ verzadiging met ammoniumsulfaat niet troebel, daarentegen wel bij $^1/_2$ verzadiging met ammoniumsulfaat, dan werd geconcludeerd, dat de euglobuline volledig was neergeslagen, terwijl de pseudoglobuline nog in oplossing was gebleven.

Voor de figuren 4—10 geldt nu het volgende:

Op de abscis is de tijd aangegeven.

Op de ordinaat is aangegeven:

1. de *Temperatuur* der verdunde serumoplossing, waarvan het verloop wordt voorgesteld door de lijn *T*.

2. de *Reactie* der oplossing, uitgedrukt in de ph. De lijn *R* geeft het verloop der reactie aan.

3. de *Stroomsterkte* in ampère's. De lijn, die de stroomsterkte tijdens de proef aangeeft, is maat voor de hoeveelheid electrolyt, die nog aanwezig is. Deze lijn is aangeduid met de letter *S*.

De horizontale lijn in de figuren (Ph = 7.1) stelt voor de zône, waarin de reactie neutraal is. Bevindt de lijn die de ph aangeeft zich hier beneden, dan is de reactie der vloeistof dus zuur, en komt ze er boven, dan is de reactie alcalisch.

Bovendien is nog op de abscis aangegeven de graad van troebeling in het verdunde serum. Hiervoor geldt het volgende:

—	beteekent:	helder.
+	,,	: licht troebel = de troebeling die bij het begin der proef aanwezig is.
++	,,	: sterker troebel.
+++	,,	: vlokken zijn in de vloeistof aanwezig.

++++ beteekent: sterke vlokvorming, na korten tijd zetten deze zich in de reageerbuis op den bodem af.

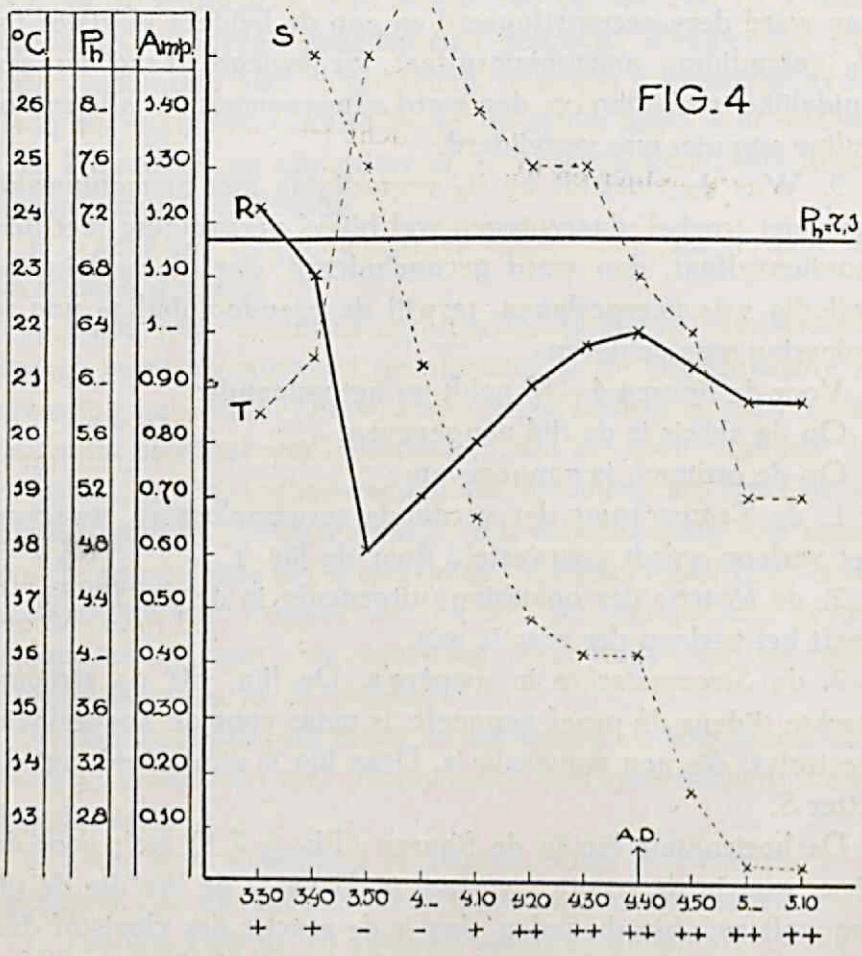


FIG. 4

Anodekant: perkamentpapier (—)
Kathodekant: „ (—)

A.D. beteekent in de figuren: aqua destillata. Op de abscis is de tijd aangegeven, waarop de proef met aqua destillata werd vervolgd.

A. In *figuur 4* is een overzicht gegeven van een proef met 2 membranen van perkamentpapier.

Het electrolytgehalte nam geleidelijk af (zie lijn S.), totdat

een stroomsterkte van 0.42 ampère werd bereikt. Met aqua destillata (A.D.) daalde de stroomsterkte vervolgens tot 0.04 ampère. In het begin der proef werd gedurende 10 minuten weerstand ingeschakeld, omdat de stroomsterkte grooter was dan 1.5 ampère.

De temperatuur (T) steeg in deze proef te hoog, omdat niet voldoende werd gekoeld.

Was de vloeistof aanvankelijk licht troebel, na 20 minuten was ze geheel helder en bleek de reactie sterk zuur te zijn geworden (ph = 4.8). Deze zure reactie was dan ook de oorzaak van het helder worden der oplossing.

De eindtoestand in deze proef was een duidelijk zure reactie en een onvoldoende uitvlokking van de globuline. De stroomsterkte daalde bovendien niet tot het minimum van 0.02 ampère.

Denaturatie van het eiwit kon niet worden aangetoond.

Na centrifugeeren trad bij $^1/_3$ verz. met ammoniumsulfaat een sterk neerslag op.

B. De volgende proef werd gedaan met aan den anode- en aan den kathodekant een varkensblaas als membraan. Voor het gebruik werd de blaas 3 dagen in gedestilleerd water, dat tweemaal daags werd ververscht, bewaard.

Figuur 5 geeft een overzicht.

Een uitgesproken verschil bestaat met de vorige proef.

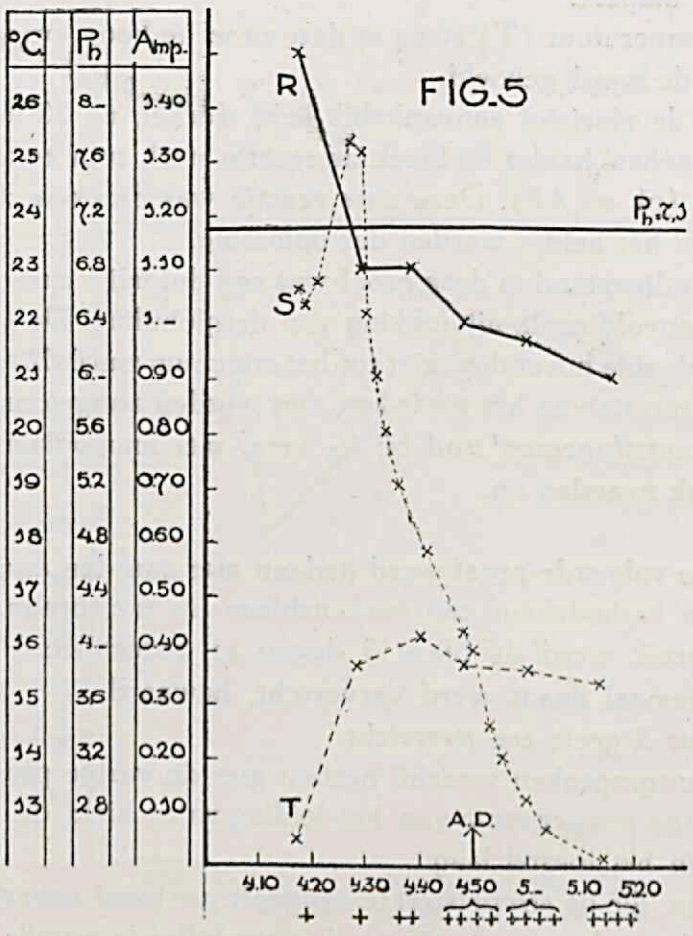
De lage temperatuur van het leidingwater hield de temperatuur in het toestel laag.

De lijn, die de stroomsterkte aangeeft, vertoont aanvankelijk een, zij het ook geringe stijging. In verschillende gevallen werd deze stijging in het begin waargenomen. Steeds maakte ze na korten tijd plaats voor een daling. Vermoedelijk is de oorzaak hierin gelegen, dat tijdelijk meer ionen worden vrijgemaakt dan afgevoerd door den electrischen stroom.

Mocht hier, bij gebruik van 2 positieve membranen, in tegenstelling met de vorige proef, een alcalische reactie verwacht worden, de reactie werd zuur en wel werd het iso-electrische punt der globuline (ph = ± 6.5) bij het einde der proef, te

samen met een minimale stroomsterkte, bereikt. Het gevolg was een sterke uitvlokking der globuline.

Na centrifugeeren bleek in de heldere vloeistof alleen pseudoglobuline en geen euglobuline meer aanwezig te zijn.

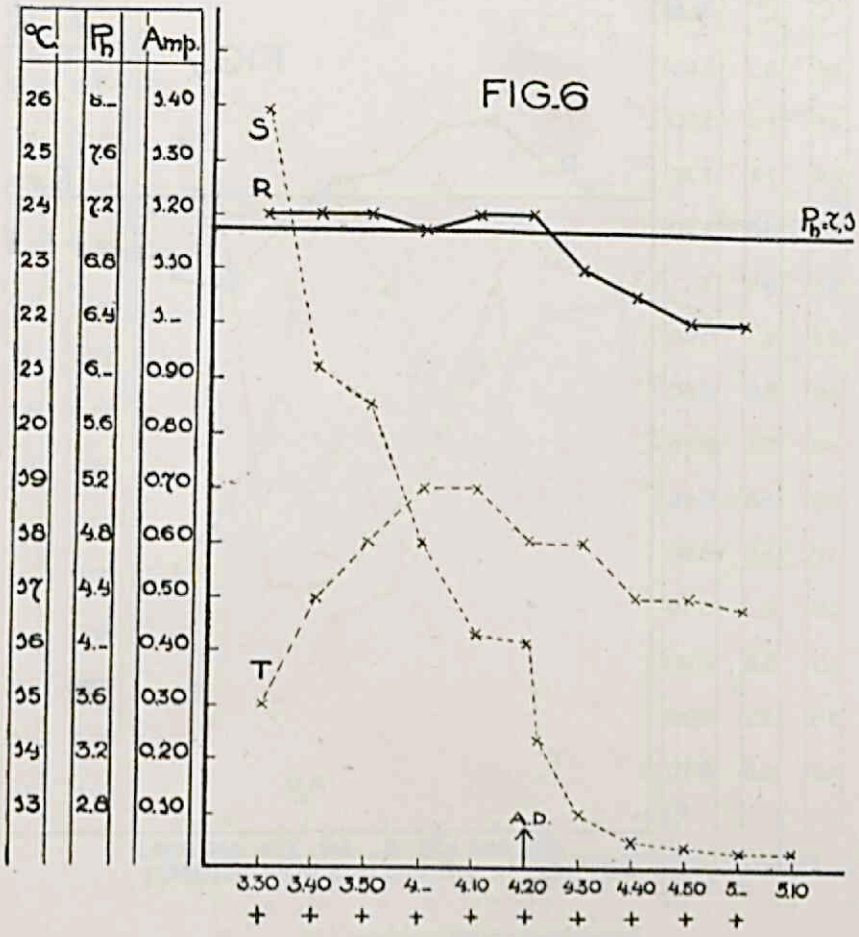


Anodekant: varkensblaas (+).
Kathodekant: „ (+).

Als bijzonderheden werden bij deze proef waargenomen: een sterke vloeistofafname in de middencel, en een sterke zwelling van de kathodemembraan. Van de 500 cc. vloeistof was na afloop 197 cc. minder aanwezig, waarbij de cc. die tijdens de proef uit den electrodialysator werden genomen, in rekening zijn gebracht.

De membraan aan den anodekant vertoonde geen bijzonderheden.

Uit deze proef bleek dus o.a., hoe weinig zeker men vooraf het verloop kan voorspellen. Bovendien is de varkensblaas een

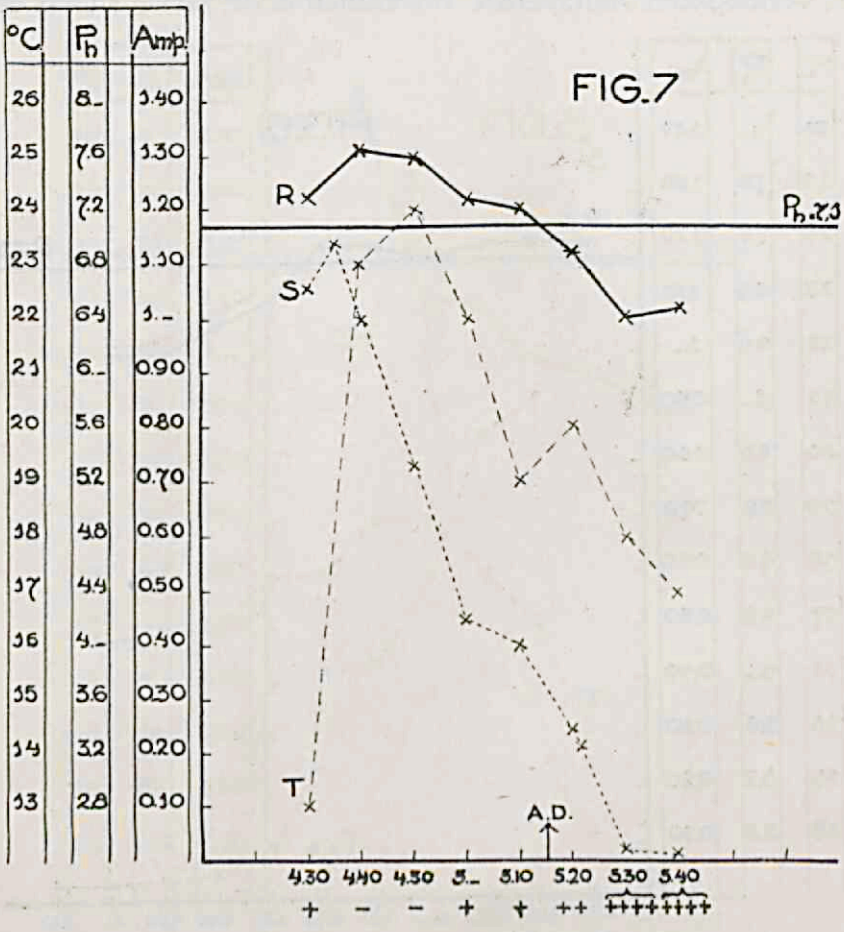


Anodekant: chroomgelatinebraam (+).
Kathodekant: „ (+).

membraan, die weinig betrouwbaar is, omdat ze wisselingen in doorlaatbaarheid vertoont. Om deze reden vindt ze electrodialytisch dan ook geen practische toepassing.

C. De proef, waarvan *figuur 6* een voorstelling geeft, werd genomen met 2 chroomgelatinemembranen. In de reactie der verdunde serumoplossing trad weinig verandering op.

De reactie der vloeistof was aan het einde der proef zwak zuur, het iso-electrische punt werd volgens de colorimetrische bepaling bereikt. De stroomsterkte daalde niet tot het minimum



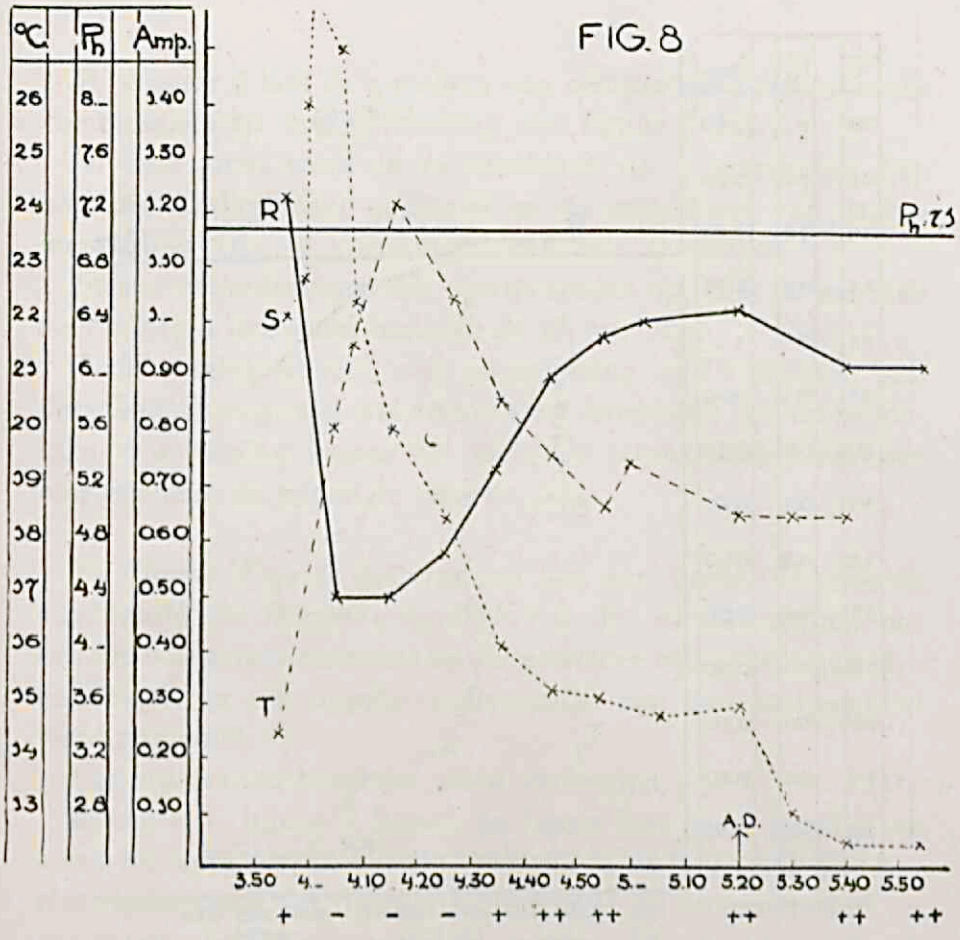
Anodekant: varkensblaas (+).
Kathodekant: perkamentpapier (—).

van gedestilleerd water, lagere waarde dan 0.03—0.04 ampère werd niet bereikt. Een uitvlokking van de globuline trad niet op, geen veranderingen waren, wat de lichte troebeling aangaat, tijdens de proef waarneembaar.

D. In *figuur 7* is een proef weergegeven, waarbij aan den anodekant een varkensblaas, dus een + membraan, en aan den

kathodekant een membraan van perkamentpapier, een — membraan, was geplaatst.

De uitkomst kwam met de verwachtingen overeen. Bij deze

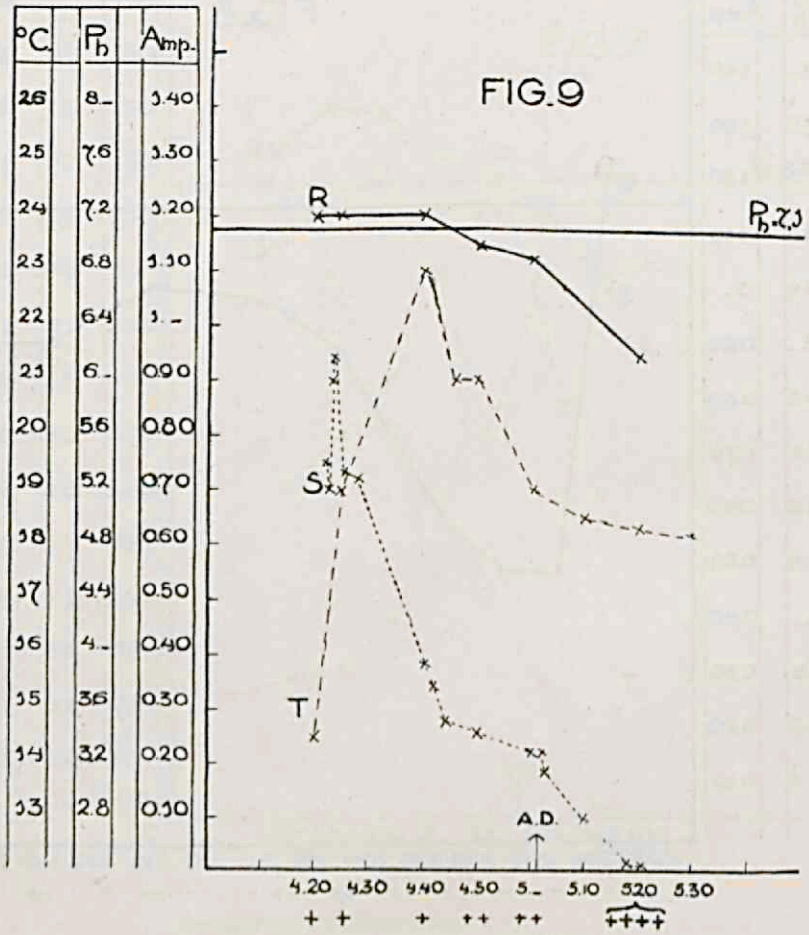


Anodekant: perkamentpapier (—).
Kathodekant: varkensblaas (+).

goede plaatsing van de membranen in den zin van *Ruppel* (3), een + membraan aan den anodekant en een — membraan aan den kathodekant, werd een uitstekend resultaat verkregen.

Opvallend is, dat de 3 lijnen der *R*eactie, der *S*troomsterkte en der *T*emperatuur parallel verloopen. De lijnen dalen geleidelijk en na 1 uur werd de euglobuline bijna geheel neerge-

slagen, want na centrifugeeren trad er bij $^1/_3$ verzadiging met ammoniumsulfaat in de heldere vloeistof slechts een lichte troebeling op.



Anode: chroomgelatinemembraan volgens Ruppel (+).
Kathode: perkamentpapier (—).

Merkwaardig was in deze proef, dat aanvankelijk de vloeistof gedurende korten tijd geheel helder was, vermoedelijk tengevolge van de tijdelijke licht alcalische reactie. Daarna werd de reactie neutraal en vervolgens zuur en werd het isoelectrische punt der globuline bereikt, terwijl bovendien de

stroomsterkte tot een minimum was gedaald. Dientengevolge vlokte de globuline en met name de euglobulinefractie uit.

Merkwaardig was het in deze proef, hoe plotseling de uitvlokking veel sterker werd. Ook in figuur 5 was dit trouwens aanwezig.

E. *Figuur 8* laat de gevolgen van een verkeerde membraancombinatie zien, in tegenstelling met figuur 7 dus.

In deze proef werd de varkensblaas, de + membraan dus, aan den kathodekant geplaatst en de membraan van perkamentpapier (de — membraan) aan den anodekant.

Sterke veranderingen der reactie traden op, 10 à 20 minuten na het begin der proef bedroeg de ph = 4.4.

Aanvankelijk troebel, was de oplossing na 10 minuten helder. Gaandeweg trad weliswaar weer troebeling op; tot duidelijke vlokvorming kwam het niet. De stroomsterkte bereikte hier evenmin de minimale waarde.

F. *Figuur 9* geeft het verloop van een proef, waarbij de combinatie van *Ruppel* gebruikt werd, dat wil dus zeggen, dat een chroomgelatinemembraan als positieve membraan aan den anodekant en een negatieve membraan aan den kathodekant werd geplaatst.

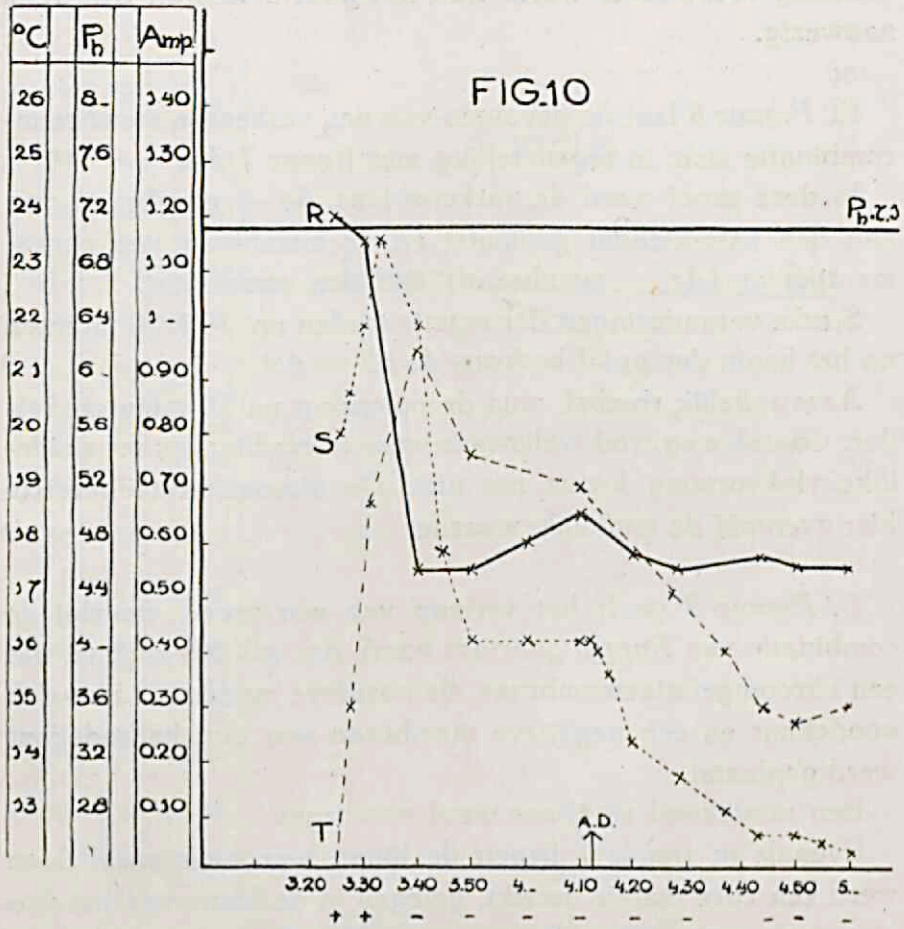
Een uitstekend resultaat werd verkregen.

Evenals in figuur 7 liepen de lijnen hier weer parallel en werd een zure reactie bereikt, gelegen in de buurt van het isoelectrische punt der globuline en daalde de stroomsterkte tot een minimale waarde van 0.02 ampère. Plotseling werd ook hier weer de vlokvorming duidelijk sterker.

Na afloop der proef bleek, dat alle euglobuline was neergeslagen, bij ½ verzadiging met ammoniumsulfaat intusschen bleek nog een groot gedeelte van het eiwit, de pseudoglobuline dus blijkbaar, neer te slaan.

Deze combinatie volgens *Ruppel* heeft het voordeel boven de combinatie perkamentpapier—varkensblaas, dat de uitkomsten meer betrouwbaar zijn.

G. Bij verkeerde plaatsing dezer membranen trad weer de sterke reactiewisseling in de vloeistof op. *Figuur 10* toont, dat de reactie in zoo'n geval snel daalde tot ph = 4.4, terwijl deze



Anodekant: perkamentpapier (—).
Kathodekant: chroomgelatinemembraan (+).

zure reactie tijdens de proef onveranderd bleef bestaan. Een uitvlokking trad in het geheel niet meer op. Ook daalde de stroomsterkte niet minimaal.

Uit deze 7 proeven blijkt dus het volgende. In 3 gevallen werd een sterkere zure reactie waargenomen (zie figuur 4, 8 en 10), d.w.z. in die gevallen, waar 2 membranen van perka-

mentpapier werden gebruikt, bij de plaatsing van een positieve membraan aan den kathodekant en van een negatieve membraan aan den anodekant, en bij eveneens een verkeerde plaatsing der membranen door de chroomgelatinemembraan aan den kathodekant en de membraan van perkamentpapier aan den anodekant aan te brengen.

Een alcalische reactie werd slechts korten tijd in figuur 7 gezien, zonder dat dit echter van eenigen schadelijken invloed op de eiwitoplossing was.

Het doel, om de euglobuline neer te slaan, werd bereikt in de proeven, waarvan de figuren 5, 7 en 9 een verslag geven.

In deze proeven werd een eindtoestand bereikt, waarbij de stroomsterkte tot een minimum daalde en de reactie het isoelectrische punt der globuline bereikte. Als gevolg hiervan vlokte derhalve de globuline uit, en wel op grond van de troebeling, die bij ½ verzadiging met ammoniumsulfaat nog optrad, gelukte het mij slechts de euglobuline neer te slaan.

Behalve figuur 5, waar 2 dierlijke membranen werden gebruikt, bevestigen figuur 7 en figuur 9 volkomen de bewering van *Ruppel*, dat het plaatsen van een positieve membraan (een varkensblaas om een chroomgelatinemembraan) aan den anodekant en van een negatieve membraan (perkamentpapier) aan den kathodekant, goede resultaten geeft, wanneer men de globuline en voornamelijk de euglobuline wil neerslaan, terwijl een verkeerde plaatsing der membranen tot sterke reactieveranderingen in de oplossing bij het doorleiden van een electrischen stroom, kan aanleiding geven.

Op grond van de goede uitkomsten, die ook bij herhaalde proeven met de membraancombinatie volgens *Ruppel* werden verkregen, werd dan ook in de proeven die verricht werden met het doel zuivere pseudoglobulineoplossingen te verkrijgen, van deze membranencombinaties gebruik gemaakt.

HOOFDSTUK VII

PROEVEN OVER HET VERKRIJGEN VAN EEN ZUIVERE PSEUDOGLOBULINE-OPLOSSING LANGS ELECTRO-DIALYTISCHEN WEG

Getracht werd, om na de ervaring bij de verschillende membraancombinatie's opgedaan, een zuivere pseudoglobuline-oplossing te bereiden. De scheiding van de globuline- en de albuminefractie werd door uitzouten met ammoniumsulfaat verricht.

Een reeks proeven werd genomen, waarvan er eenige zullen worden medegedeeld.

A. Aan 900 cc. normaal paardeserum werd een gelijke hoeveelheid van een verzadigde ammoniumsulfaatoplossing toegevoegd. De globuline slaat hierdoor neer. Met een glazen staaf werd geroerd en na 2 uur gefiltreerd door filtreerpapier. Den volgenden morgen werd halfverzadigde ammoniumsulfaatoplossing op de filters gebracht, om de nog in het neerslag aanwezige albumine te verwijderen. Op den derden dag werd het neerslag van de filters verwijderd en opgelost in een hoeveelheid leidingwater, waarmee het volume werd aangevuld tot 800 cc. Deze vloeistof was licht troebel.

Gedurende 18 uur werd deze oplossing gedialyseerd in een zak van perkamentpapier in stroomend leidingwater. Na deze dialyse bleek het volume te zijn toegenomen tot 1050 cc. en de vloeistof geheel helder te zijn geworden.

De oplossing reageerde neutraal tegenover lakmoes.

De reactie op ammoniumsulfaat met bariumchloride 10 % was sterk positief. Van de heldere oplossing werd nu 450 cc. in den electrodialysator gebracht.

Bij alle hier volgende proeven werd steeds de membraancombinatie volgens *Ruppel* gebruikt, dus een membraan van perkamentpapier aan den kathodekant en een chroomgelatinemembraan aan den anodekant.

Eveneens was het aangebrachte potentiaalverschil steeds 220 Volt. Het verloop van de proef was als volgt:

Direct, nadat de stroom werd ingeschakeld, wees de ampèremeter een stroomsterkte van 1,14 ampère aan, maar daarna steeg ze snel, zoodat weerstand moest worden ingeschakeld om te voorkomen, dat de stroomsterkte meer dan 1.5 ampère bedroeg.

Deze electrodialyse duurde vier uur, eerst na dezen tijd waren alle electrolyten uit de vloeistof verwijderd en was de stroomsterkte gedaald tot 0.03 ampère. 2 Uur duurde het voordat alle weerstand kon worden uitgeschakeld.

Wat de reactie aangaat, deze vertoonde na 1 uur neiging zóó sterk zuur te worden, dat enkele druppels van een 10 % natronloog-oplossing moesten worden bijgedruppeld; dit geschiedde 9 maal. 1½ Uur na het begin der proef was het niet meer noodig en bleef de reactie zwak zuur.

Door steeds te koelen (temperatuur van het leidingwater was 11° C.) steeg de temperatuur van de globulineoplossing niet boven 19° C.

Het laatste spoor ammoniumsulfaat was afwezig na 2½ uur electrodialyse.

Na 2 uur, dus nadat geen weerstand meer was ingeschakeld en geen natronloog meer toegevoegd behoefde te worden, was de oplossing troebel en kon geen denaturatie van het eiwit worden aangetoond. Met een druppel van een verzadigde keukenzout-oplossing verdween de troebeling dadelijk; eveneens na toevoegen van een spoortje verdunde loog, waarna bij voorzichtige neutralisatie met een kleine hoeveelheid van een sterk verdunde zoutzuuroplossing, de vloeistof weer troebel werd.

Na 3 uur 10 minuten was de stroomsterkte gedaald tot 0.24 ampère en werden de anode- en de kathoderuimte met

aqua destillata doorstroomd. De stroomsterkte daalde hierdoor tot 0.035 ampère.

De proef werd hier beëindigd.

De vloeistof was troebel. Het bleek, dat tijdens de electrodialyse geen volumeafname was opgetreden. Een gedeelte der troebele vloeistof werd gecentrifugeerd en de verkregen heldere vloeistof tot 1/3 verzadigd met ammoniumsulfaat. Een geringe troebeling trad nog op, wat dus bewijst, dat niet alle euglobuline was uitgevlokt, maar dat nog een geringe hoeveelheid was overgebleven.

In deze proef werd dus reeds na 18 uur dialyse de globulineoplossing in den electrodialysator gebracht. Bijzondere contrôle was noodig om te voorkomen, dat de stroomsterkte niet te groot en de reactie niet te sterk zuur werd, en de temperatuur van de vloeistof niet te hoog steeg.

Deze bezwaren werden voorkomen door wat langer te dialyseeren. Op deze wijze werden uitstekende resultaten bereikt.

Verscheidene proeven werden genomen, waarbij 7 maal 24 uur werd gedialyseerd in stroomend leidingwater, voordat de oplossing in den electrodialysator werd gebracht. Na deze zooveel langere dialyse bleek nog slechts een klein gedeelte van het ammoniumsulfaat te zijn achtergebleven. De vloeistof was na deze dialyse licht troebel door het reeds gedeeltelijk neerslaan der euglobuline, en reageerde zwak zuur ten opzichte van lakmoes.

In alle proeven, die op deze wijze werden verricht, bleek het volgende:

De stroomsterkte werd nooit hooger dan 0.88 ampère, zoodat geen weerstand ingeschakeld behoefde te worden.

Binnen twee uur was de stroomsterkte gedaald tot de minimale waarde.

De temperatuur van de globulineoplossing steeg nooit boven 16° C.

De reactie der oplossing bleef steeds dezelfde, namelijk zwak zuur tegenover lakmoes.

De laatste sporen ammoniumsulfaat waren na ongeveer 20 minuten verdwenen.

Gewoonlijk werd de lichte troebeling, die bij het begin der electrodialyse aanwezig was, na ongeveer 30 minuten duidelijker en begonnen zich vlokken te vormen. Nadat de stroomsterkte tot een minimum van ongeveer 0.02—0.03 ampère (de geleidbaarheid van gedestilleerd water) was gedaald, werd de troebele vloeistof uit den electrodialysator verwijderd en gecentrifugeerd.

Bij $^1/_3$ verzadiging met ammoniumsulfaat werd in alle gevallen nog een geringe troebeling waargenomen.

C. Tenslotte werd nog 940 cc. *tetanusserum* aan deze bewerking onderworpen. De behandeling week in niets van die onder B. af. Ook de resultaten waren dezelfde. 7 Maal 24 uur werd gedialyseerd, waarna het volume was toegenomen tot 1065 cc.

Daar de electrodialysator 500—550 cc. kon bevatten, werd de oplossing in twee keer behandeld.

In beide gevallen daalde de stroomsterkte tot 0.03 ampère en trad fijne vlokvorming op.

De vloeistof werd gecentrifugeerd en de heldere vloeistof bleek bij $^1/_3$ verzadiging met ammoniumsulfaat slechts lichte troebeling te vertoonen.

Uit de 940 cc. antitetanusserum werd op deze manier 980 cc. pseudoglobulineoplossing verkregen. Dit volume werd tot op ± 400 cc. teruggebracht (door de oplossing in glazen schalen bij 37° C. te plaatsen), tengevolge waarvan een lichte troebeling optrad.

Na centrifugeeren werd in de heldere vloeistof het percentage eiwit bepaald, dit bedroeg 8.50 %.

Als bederfwerend middel werd tenslotte nog 8 $^0/_{00}$ van een mengsel van gelijke deelen tricresol en aether toegevoegd, wat nog een geringe uitvlokking in de oplossing teweegbracht.

Deze oplossing werd sindsdien bij lage temperatuur bewaard.

HOOFDSTUK VIII

VOORDEELEN VAN ELECTRO-DIALYTISCHE SERUMZUIVERING

Hoewel mij alle ervaring ontbreekt over de practische toepassing der electrodialytische zuivering van serum, bestemd voor therapeutische doeleinden, zooals ze in Duitschland door *„Bram"* te Oelzschau wordt verricht, bleek mij niettemin bij mijn electrodialytische proeven over het bereiden van zuivere pseudoglobulineoplossingen, dat de electrodialyse een methode van zuivering is, die *veel zorg vereischt*. Nauwlettend moeten de processen in de oplossing worden gevolgd en dat in het bijzonder, wanneer men in korten tijd het zuiveringsproces wil beëindigen.

Het bleek immers in hoofdstuk VII, dat naarmate het electrolytgehalte der oplossing grooter is, de kans vermeerdert, dat tengevolge van de sterke reactieveranderingen de eiwitten denatureeren. In mijn proeven kon ik deze reactiewisselingen voorkomen door langeren tijd vooraf in stroomend leidingwater te dialyseeren, waarbij het voorkeur verdient, dat de temperatuur van het water laag is. Zoo deelt *Wadsworth* (13) mede, dat bij de serumzuivering met ammoniumsulfaat, in Amerika, gedurende 9 dagen gedialyseerd wordt in stroomend leidingwater van 5° C.

Wellicht is het mogelijk zonder voorafgaande dialyse dadelijk electrodialytisch de electrolyten te verwijderen door urenlang *bij zeer lage stroomsterkte* te dialyseeren. *(Pauli)*.

Echter de ervaringen hierover ontbreken mij.

In elk geval voert de serumzuivering langs electrodialyti-

schen weg sneller tot het doel dan die door uitzouten, en met name voor Indië is het mijns inziens van groot voordeel, dat in korten tijd het eindproduct kan worden verkregen.

Bij welke methode het antitoxineverlies grooter is, werd niet onderzocht.

Ruppel deelt mee, dat bij electrodialytische zuivering 15—20 % van het antitoxine verloren gaat. Nauwkeurig werd het verlies in het R.S.I. nooit bepaald. Vermoedelijk zal bij de serumzuivering door uitzouten het verlies grooter zijn, omdat met de herhaalde filtratie's en eveneens bij het indrogen ongetwijfeld aanmerkelijke verliezen optreden.

Een voordeel van het electrodialytisch verkregen eindproduct is, dat het helder blijft en geen achteruitgang in het antitoxinegehalte vertoont. Dit in tegenstelling met het door uitzouten gezuiverde serum. Zooals wij reeds eerder meedeelden is immers het eindproduct van het begin af aan niet geheel helder, en zet zich in de 2 maanden, dat het in de ijskast bewaard wordt, een dikke laag bezinksel op den bodem der flesch af, een neerslag, dat bij onderzoek uit euglobuline bleek te bestaan.

Reeds werd op blz. 21 medegedeeld, dat volgens de statistiek van *Herderschee* (19) bij gebruik van natuurlijk diphtherieserum in 81 % der gevallen serumziekte optreedt, bij door uitzouten gezuiverd serum in 53 % en bij electrodialytisch gezuiverd serum in 43 % der gevallen; en waren blijkbaar bij het gebruik van electrodialytisch gezuiverd serum de uitkomsten iets gunstiger dan bij het gebruik van door uitzouten gezuiverd serum.

Worden deze onderzoekingen in de toekomst bevestigd, dan rijst de vraag, waaraan dit moet worden toegeschreven.

Zonder een bevredigend antwoord te kunnen geven, lijkt het mij zeer waarschijnlijk, dat langs electrodialytischen weg een zuiverder pseudoglobulineoplossing wordt verkregen dan door uitzouten. Door den electrischen stroom worden tal van producten afgevoerd, die nog in het door uitzouten gezuiverde serum achterblijven.

Volgens *Ruppel* worden, behalve de electrolyten, ook de koolhydraten, de aminozuren, peptonen en albumosen verwijderd. Intusschen werd bij het door uitzouten gezuiverde eindproduct geen nader onderzoek in deze richting ingesteld en is dus met zekerheid hieromtrent geen oordeel uit te spreken.

Behalve de mogelijkheid, dat bij electrodialytische zuivering stoffen worden afgevoerd, die bij de serumziekte een rol kunnen spelen, is een tweede mogelijkheid, dat het electrodialytisch gezuiverde serum in het genoemde voorbeeld bereid was uit sera met hoogeren titer, waardoor het eindproduct eiwitarmer was dan het door uitzouten verkregene.

Verwacht mag immers worden (zie hoofdstuk II), dat minder serumziekte optreedt naarmate de benoodigde hoeveelheid antitoxine in verbinding met een kleinere hoeveelheid pseudoglobuline voorkomt.

Intusschen zijn hiermede slechts mogelijkheden genoemd en is een verklaring geenszins gegeven.

SLOTSOM

Allereerst werd de serumzuivering door uitzouten, zooals deze in het R.S.I. te Utrecht wordt verricht, nader bestudeerd.

Op grond van mijn onderzoekingen kon ik aantoonen, dat deze methode zeer bevredigende resultaten oplevert en dat de verliezen, die tijdens het proces optreden, in de meeste gevallen niet groot zijn.

In enkele gevallen van serumzuivering kon echter aangetoond worden, dat wel een aanmerkelijk verlies geleden was.

De oorzaken hiervan werden opgespoord en de richting aangegeven, waarin waarschijnlijk verbetering kan worden bereikt.

In het Physiologisch-Chemisch-Laboratorium van *Professor Ringer* verrichtte ik electrodialytische proeven. Allereerst werden verschillende membraancombinatie's bestudeerd. De combinatie volgens *Ruppel* bleek bij de beste resultaten te geven. Hiervan werd dan ook gebruik gemaakt om langs electrodialytischen weg zuivere pseudoglobulineoplossingen te bereiden.

Hiermede werden zeer bevredigende resultaten verkregen.

Ook werd een proef gedaan met tetanusserum: uit 940 cc. tetanusserum werd ongeveer 400 cc. pseudoglobulineoplossing verkregen, waarin het eiwitgehalte 8.50 % bedroeg.

6 Weken na de bereiding was deze oplossing nog volkomen helder; alleen was tengevolge van het toegevoegde tricresolaether een gering bezinksel op den bodem der flesch aanwezig.

Tenslotte werd gedurende 3 maanden de eiwitsamenstelling van paardeserum onderzocht en werden de gevolgen van een aderlating op de wijzigingen in de eiwitsamenstelling van het serum bestudeerd.

LITERATUUR

1. Zschr. f. Hyg. u. Inf. krankh. 1899, 31, blz. 513.
2. Beitr. z. Chem. Phys. u. Path. 1897, bd. 1.
3. Zschr. f. Hyg. u. Inf. krankh. 1922, bd. 97, blz. 188.
4. Zschr. f. Immf. u. Exp. Ther. 1925, bd. 42, blz. 501.
5. *Wells.* Chem. Anschauungen über Immunitätsvorgänge, 1927, blz. 67.
6. Zschr. f. Hyg. u. Inf. krankh. 1892, bd. 12, blz. 1 en 10.
7. Annales de l'Institut Pasteur 1905, blz. 249.
8. Med. Klinik 1919, blz. 1, 83, 553, 579.
9. Zschr. f. Immf. u. Exp. Ther. 1922, bd. 34, blz. 365.
10. *Franssen.* Dissertatie Utrecht 1927.
11. Wiener Klin. Wochenschr. 1916, no. 2, blz. 37.
12. *Dieudonné* und *Weichardt.* Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie, 1925, blz. 153.
13. *Wadsworth* Standard Methods 1927, blz. 384.
14. *Otto* und *Hetsch.* Arb. a. d. Staatsinstitut f. Exp. Ther. 1927, Hf. 19, blz. 33.
15. Münch. Med. Woch. 1926, blz. 1899.
16. Bioch. Journal 1916, 10, blz. 408.
17. Zschr. f. Hyg, u. Inf. krankh. 1922, bd. 96, blz. 191 en 258.
18. *Otto* und *Hetsch.* Arb. a. d. Staatsinstitut f. Exp. Ther. 1927, blz. 34.
19. *Franssen.* Dissertatie Utrecht 1927, blz. 9.
20. *Hammarsten.* Lehrbuch Physiol. Chemie 1926, blz. 199.
21. Journal of Biol. Chem. 1921, bd. 49, blz. 93.
22. Journal Physiol. 1901, bd. 27, blz. 57.
23. Beitr. Chem. Phys. u. Path. 1903, bd. 3, blz. 277.
24. Bioch. Journal 1919, bd. 13, blz. 278.
25. Ned. Tijdschrift v. Geneesk. 1927, 2, blz. 2603.
26. *Hammarsten.* Lehrbuch Physiol. Chemie 1926, blz. 205.
27. Archiv. f. Exp. Path. u. Ther. 1886, bd. 20, blz. 426.
28. Zschr. f. Physiol. Chemie 1899, bd. 28, blz. 559.
29. Bioch. Zschr. 1924, 152, blz. 355 en 360; 1924, 153, blz. 253; 1925, 159, blz. 482; Klinische Wochenschrift 1924, bd. 1, blz. 1.
30. Zschr. f. Physiolog. Chemie 1903, bd. 37, blz. 495; 1905, bd. 44, blz. 17.

31. Biochem. Journal 1914, bd. 8, blz. 541.
32. Biochem. Zeitschr. 1912, bd. 38, blz. 331; 1913, bd. 50, blz. 369.
33. Zschr. f. Analyt. Chemie 1901, bd. 40, blz. 697.
34. Zschr. f. Immf. u. Exp. Ther. 1920, bd. 30, blz. 468.
35. Biochem. Zschr. 1910, bd. 27, blz. 38; bd. 28, blz. 193.
36. Arch. f. Hyg. 1922, bd. 91, blz. 165.
37. Arch. f. d. ges. Physiol. 1903, bd. 93, blz. 558.
38. Bioch. Zschr. 1913, bd. 48, blz. 247.
39. Journal of Physiol. 1913/14, bd. 47, blz. 149.
40. Bioch. Zschr. 1923, bd. 139, blz. 321.
41. *Hammarsten,* Lehrbuch Physiol. Chemie 1926, blz. 208.
42. ——— Lehrb. Physiol. Chemie 1926, blz. 208.
43. ——— „ „ „ 1926, „ 207.
44. ——— „ „ „ 1926, „ 206.
45. Zschr. f. Physiol. Chemie 1901/02, bd. 34, blz. 207.
46. Bioch. Journal 1914, bd. 8, blz. 541.
47. *Reymann,* Zschr. f. Immf. u. Exp. Ther. 1924, bd. 39, blz. 15.
48. Klin. Wochenschr. 1924, blz. 1214.
49. *Hammarsten,* Lehrbuch Physiol. Chemie 1926, blz. 206.
50. Journal of Exper. Med. 1916, bd. 24.
51. Zschr. f. Hyg. u. Inf. kr. h. 1920, bd. 93, blz. 146.
52. Journal of Biol. Chem. 1913, bd. 15, blz. 37.
53. „ „ Exp. Med. 1900, vol. 5, blz. 67.
54. „ „ Hygiene, vol 7, blz. 65.
55. Koll. Chem. Beihefte 1927, bd. 41, blz. 315 en 243.
56. *Kruyt,* Inleiding tot de Physische Chemie, derde druk, blz. 106.
57. Zschr. f. Physiol. Chemie 1925, bd. 144, blz. 88.
58. Journal of Inf. Dis. 1924, 35, blz. 519.
59. Bioch. Zschr. 1924, bd. 150, blz. 522.
60. Zschr. f. Physik. Chemie 1901, 39, blz. 9 en 613.
61. Zschr. f. Physik. Chemie 1914, 88, blz. 686.
62. Bioch. Zeitschr. 1926, bd. 171, blz. 443, blz. 454; bd. 172, blz. 1.
63. Bioch. Zeitschr. 1923, bd. 144, blz. 115.

h. 9774.

INHOUD

Inleiding 9

HOOFDSTUK I

Over de voordeelen van het gebruik van gezuiverd serum 18

HOOFDSTUK II

De serumzuivering door Uitzouten in het Rijks Serologisch Instituut 23

HOOFDSTUK III

Onderzoekingen naar aanleiding van de serumzuivering door Uitzouten 31

HOOFDSTUK IV

Onderzoekingen over de eiwitsamenstelling van paardeserum 66

HOOFDSTUK V

Inleiding tot de electrodialytische proeven 91

HOOFDSTUK VI

Proeven over den invloed van verschillende membraancombinaties bij de electrodialyse 95

HOOFDSTUK VII

Proeven over het verkrijgen van een zuivere pseudoglobulineoplossing langs electrodialytischen weg . . 112

HOOFDSTUK VIII

Voordeelen van electrodialytische serumzuivering . . . 116

Slotsom 119
Literatuur 120

STELLINGEN

I

De toename van de hoeveelheid pseudoglobuline in het paardeserum, die optreedt, wanneer de dieren met diphtherietoxine worden geimmuniseerd, verloopt niet parallel aan den titer van het serum.

II

Serumziekte kan zelfs bij gebruik van gezuiverde sera niet altijd worden voorkomen.

III

Bij de behandeling van pneumonie met antipneumococcenserum verdient het gebruik van monovalent, type-specifiek serum de voorkeur boven het polyvalente.

IV

Bestaat door vervoer kans op beschadiging van voor het leven gewichtige organen bij een ongevalspatient. dan geschiede dit uitsluitend onder medisch toezicht.

V

Ter tijdige onderkenning van dreigende eclampsie is regelmatige contrôle van lichaamsgewicht en bloeddruk belangrijker dan urineonderzoek.

VI

Voor de Röntgendiagnostiek van het rotsbeen hebben alleen stereoscopische photographieën waarde.

VII

Wanneer bij strabismus convergens door een tenotomie op het scheele oog een onvoldoende effect wordt bereikt, wachte men met het doen van een volgende operatie minstens een half jaar.

VIII

Voor arbeid in met miltvuur besmet milieu moeten bindende voorschriften voor reinheid van handen en nagels gegeven worden.