

Die Affinitätskonstanten einiger Eiweißspaltungsprodukte.

Von

Aristides Kanitz.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)
(Der Redaktion zugegangen am 21. März 1906.)

Abgesehen davon, daß Affinitätskonstanten-Bestimmungen von Eiweißspaltungsprodukten die nicht sonderlich zahlreichen Zahlendaten der Eiweißchemie vermehren, sind sie auch vom Standpunkte der allgemeinen Chemie, sowie der Biologie nicht zwecklos.

Einerseits gehören die in Rede stehenden Stoffe nicht nur zu jener merkwürdigen Stoffgruppe, welche, weil sich ihre Repräsentanten Säuren gegenüber als Basen, Basen gegenüber als Säuren betätigen können, also sowohl Wasserstoff- wie auch Hydroxylionen abzuspalten vermögen, als amphotere bezeichnet wird; sondern sie bieten eben in bezug ihrer amphoteren Eigenschaft eine Mannigfaltigkeit der Verhältnisse dar, welche es mit sich bringt, daß an ihnen ausgeführte Affinitätskonstanten-Bestimmungen zugleich eine mehr oder weniger wesentliche Erweiterung der Kenntnisse über amphotere Elektrolyte in sich schließen.

Andererseits würde die Kenntnis der Affinitätskonstanten einer stufenweise komplizierter werdenden Reihenfolge von Eiweißspaltungsprodukten einwandsfreiere Schlüsse über die amphoteren Eigenschaften des nativen Eiweißes zulassen, als wie Untersuchungen an letzterem selbst ergeben können. Einigermaßen zuverlässige Anhaltspunkte über diese Eigenschaft des Eiweißes wären aber für die Entscheidung mancher in die Biologie einschlagenden Frage, um nur die mannigfaltigen Erscheinungen der Eiweißausfällung oder die verwickelten Verhältnisse bei der mikroskopischen Färbung zu erwähnen, von eminenter Wichtigkeit.

Bereits die erste ausgedehntere, über amphotere Elektrolyte erschienene Arbeit enthält — indem sie die Untersuchung der amphoteren Eigenschaft der Aminosäuren zu ihrem Gegenstand hat — die Affinitätskonstanten einiger der wichtigsten

Eiweißspaltungsprodukte: nämlich des Glykokolls, Alanins, Leucins und der Asparaginsäure.¹⁾ Die vorliegende Mitteilung sucht den Verhältnissen beim Lysin, Arginin und Histidin näher zu kommen. Die «Hexonbasen» sind zunächst wegen ihrer Wichtigkeit als ständig wiederkehrende Spaltungsprodukte des Eiweißes gewählt worden, sodann aber auch deswegen, weil neben dem Vorhandensein einer Karboxylgruppe in ihnen, welche auf die Möglichkeit einer Salzbildung mit Basen hinweist, von allen dreien, sowohl mit einem, als wie mit zwei Äquivalenten Säure gebildete Salze bekannt sind; die Bearbeitung der Hexonbasen somit eine natürliche Fortführung der früheren Arbeiten über amphotere Elektrolyte bildet, in welchen fast ausschließlich²⁾ nur Stoffe behandelt werden, die nur je ein Äquivalent Säure und Base zu neutralisieren vermögen.

Eine einigermaßen befriedigende Lösung der gestellten Aufgabe ist nur für das Histidin erreicht worden, während beim Lysin und Arginin bis jetzt nur über die zweite Basedissoziationskonstante etwas Zahlenmäßiges ausgesagt werden konnte, bezüglich der übrigen Konstanten dagegen nur — allerdings ziemlich eindeutige — Schätzungen möglich waren. Die beschränkte Menge der vorhandenen Präparate, welche ich der großen Liebenswürdigkeit des Herrn Professor Siegfried verdanke, brachte es mit sich, daß die Bestimmungen nur bei einer Temperatur — $25^{\circ}(\pm 0,05^{\circ})$ — ausgeführt werden konnten.³⁾

Da das Histidin am ausgedehntesten untersucht worden ist, erscheint es am zweckmäßigsten, an diesem zu erläutern,

¹⁾ Über amphotere Elektrolyte und innere Salze, von K. Winkelblech, Zeitschr. f. physikal. Chem., Bd. XXXVI, S. 546—595, 1901.

²⁾ Auf die von Winkelblech (l. c.) gemessene Asparaginsäure wird noch eingegangen werden.

³⁾ Die Ausführung einer Bestimmungsreihe bei 40° war schon wegen der im Warmblüterorganismus gegebenen Verhältnisse beabsichtigt. Nach der soeben erschienenen Untersuchung von Harald Lundén (Zeitschrift f. physikal. Chem., Bd. LIV, S. 532, 1906), der bei den von ihm untersuchten amphoterer Stoffen ein ähnlich erhebliches Ansteigen der Dissoziationskonstante mit der Temperatur beobachtete, wie es für die des Wassers bekannt ist, ist eine Weiterführung dieser Untersuchung in der beabsichtigt gewesenen Richtung auch von allgemein chemischem Interesse.

in welcher Art und Weise von den für die Bestimmung der Affinitätskonstanten von amphoteren Elektrolyten anwendbaren Methoden Gebrauch gemacht worden ist. Lysin und Arginin können nachher kurz abgehandelt werden!

I.

Aus der Leitfähigkeit eines amphoteren Elektrolyten läßt sich, wie von James Walker¹⁾ begründet, von den von ihm erwähnten Ausnahmefällen abgesehen, keine der Affinitätskonstanten bestimmen. Wegen des gleichzeitigen Vorhandenseins der basischen und sauren Eigenschaft können jedoch die amphoteren Elektrolyte nur schwache Säuren und Basen sein, und demzufolge kann man, wenn man den Hydrolysegrad (x) ihrer mit starken Säuren und Basen gebildeten Salze (z. B. der Natriumsalze und der Chloride) bei bekannter Verdünnung (v) bestimmt hat, das Größenverhältnis ihrer Dissoziationskonstanten (k_x) zum bekannten Ionenprodukt des Wassers (k_w) durch dieselbe Formel berechnen:

$$\frac{(1-x)v}{x^2} = \frac{k_x}{k_w} \quad (1)$$

durch die der Zusammenhang dieser Größen bei dem Salze einer gewöhnlichen schwachen Säure bzw. Base gegeben wird.

Formel (1) ergibt sich aus der zuerst von Sv. Arrhenius,²⁾ sodann von W. Nernst³⁾ für die Hydrolyse binärer Elektrolyte entwickelten Gleichgewichtsgleichung unter der für verdünntere Lösungen annähernd zutreffenden Annahme, daß der Dissoziationsgrad des die Hydrolyse erleidenden Salzes und der durch die Hydrolyse entstandenen starken Säure oder Base praktisch identisch ist.

Auch wir werden mit ihrer Hilfe aus dem Hydrolysegrad des Histidinnatriums und des Histidinhydrochlorids die Säure- und die erste Basedissoziationskonstante des Histidins berechnen.

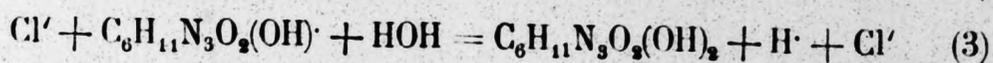
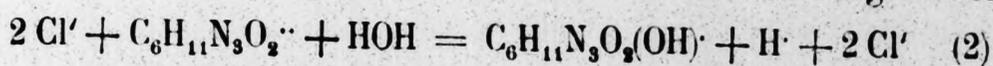
Durch dieselbe Formel (1), welche nur für binäre Elek-

¹⁾ Theorie der amphoteren Elektrolyte, von James Walker, Zeitschrift für physikal. Chem., Bd. XLIX, S. 82, 1904.

²⁾ Svante Arrhenius, Über die Gleichgewichtsverhältnisse zwischen Elektrolyten, Zeitschr. f. physikal. Chem., Bd. V, S. 1—22, 1890.

³⁾ Theoretische Chemie.

trolyte abgeleitet und bis jetzt nur auf einwertige Salze angewendet worden ist, können wir auch die zweite Basedissoziationskonstante des Histidins aus der Hydrolyse seines Dichlorids annähernd berechnen, indem wir für v die Literzahl, worin ein Mol des Histidindichlorids gelöst ist, für x den davon in Histidinhydrochlorid und Salzsäure zerfallenen Molbruchteil einsetzen. Um die Richtigkeit dieser Rechnungsweise einzusehen, brauchen wir nur das Schema der Hydrolyse des Histidindichlorids (2) und des Histidinhydrochlorids (3) — beide in Ionenform — aufzuschreiben und miteinander zu vergleichen:



Das Cl' -ion bleibt in beiden Vorgängen unverändert. In Schema (2) entsteht aus je einem zweiwertigen $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$ -kation je ein einwertiges $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2(\text{OH})$ -kation und ein Wasserstoffion. In Schema (3) entsteht aus dem einwertigen $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2(\text{OH})$ -kation ein Wasserstoffion und ein Mol undissoziiertes Histidin.¹⁾ Die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf Schema (2) wie auf Schema (3) muß demzufolge zu ein und derselben Formel (1) führen. Weil der in Schema (3) dargestellte Vorgang an und für sich nur in viel geringerem Betrage als der in Schema (2) dargestellte stattfinden kann, so wird das mit dem $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2(\text{OH})$ -ion in Schema (2) gleichzeitig entstandene Wasserstoffion die Weiter-Hydrolyse des $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2(\text{OH})$ -ions nach Schema (3) praktisch vollkommen verhindern.

Da vollkommene Ionisation nur in sehr verdünnten Lösungen erreicht ist, so wäre, um die zweite Basedissoziationskonstante exakt zu bekommen, erforderlich, den Unterschied in den Dissoziationsgraden des Histidindichlorids, Histidinhydrochlorids und der Salzsäure zu berücksichtigen und Formel (1) entsprechend zu ergänzen. Wir werden diese Korrektur nicht anbringen und deswegen können die aus den konzentrierteren

¹⁾ Richtiger gesagt Histidinhydrat; ob und wie weit dasselbe ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2(\text{OH})_2$) nachher in das Histidin ($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$) übergeht (wie NH_4OH in NH_3), bleibt natürlich unentschieden.

Lösungen erhaltenen Dissoziationskonstanten bis zu 20% fehlerhaft sein.

Die für Histidinchlorid gemachten Überlegungen treffen natürlich auch für andere zweiwertige Basen wie auch Säuren zu und die zweite Dissoziationskonstante ist somit aus der Hydrolyse der betreffenden normalen Salze mit annähernder Genauigkeit durch Formel (1) allgemein berechenbar.

Die Bestimmung des Hydrolysegrades (x) selbst geschieht durch Bestimmung der Menge eines der Hydrolyseprodukte — zumeist der freien Säure oder Base — in der hydrolysierten Salzlösung von bekannter Konzentration. Sie läuft somit auf die indirekte oder direkte Bestimmung der Wasserstoff- bzw. Hydroxylionkonzentration der Salzlösung hinaus. Die indirekte Bestimmungsweise ist: die Messung der elektrischen Leitfähigkeit der hydrolysierten Salzlösung. Die Leitfähigkeit einer solchen Salzlösung, welche wegen der im Vergleich zu anderen Ionen erheblich größeren Wanderungsgeschwindigkeit des Wasserstoff- bzw. Hydroxylions ungewöhnlich groß ist, wird mit der Leitfähigkeit derselben Salzlösung, für den Fall, daß das Salz überhaupt nicht oder vollständig hydrolysiert wäre, verglichen. Die direkte Bestimmungsweise ist: das Vergleichen der Reaktionsgeschwindigkeit der Esterkatalyse oder der Zuckerinversion,¹⁾ bzw. der Esterverseifung in Gegenwart einer bekannten Menge des hydrolysierten Salzes mit der entsprechenden Reaktionsgeschwindigkeit bei bekannter Säure bzw. Base- d. h. Wasserstoff- bzw. Hydroxylionkonzentration. Die erwähnte Arbeit von Walker (l. c.) führt aus, warum die zuletzt erwähnten dynamischen Bestimmungsmethoden für den Hydrolysegrad der Salze amphoterer Stoffe richtigere Werte ergeben.

¹⁾ Die Grenzen ihrer Anwendbarkeit sind ungefähr dieselben wie die der Esterkatalyse. Für die Bestimmung der Wasserstoffionkonzentration von Salzen amphoterer Elektrolyte wurde die Methode bis jetzt wenig verwendet; doch ist sie eben zu diesem Zweck der Esterkatalyse vorzuziehen. Ich habe sie nur deshalb nicht verwendet, weil mir nicht ganz geeignete Apparate zu Gebote standen. Daß viele der fraglichen Salze selbst die Polarisationsenebene drehen, bildet für die Anwendung der Methode kein Hindernis, weil die von den Salzen herrührende Drehung während des Reaktionsverlaufes konstant bleiben wird.

Bei mehrwertigen Salzen können, wegen der Unmöglichkeit, die Leitfähigkeit des nichthydrolysierten Salzes experimentell zu bestimmen, naturgemäß nur die dynamischen Methoden exaktere Ergebnisse liefern. Bei einwertigen Salzen scheinen mir beide Methoden Vorzüge und Nachteile zu haben.

Gegenüber ihrer methodischen Fehlerhaftigkeit bietet die Bestimmung des Hydrolysegrades durch Leitfähigkeitsmessung den Vorteil, daß man x bei sehr verschiedenen Verdünnungen (v bis ca. 500—1000) bestimmen kann. Gegenüber ihrer theoretischen Richtigkeit ist die Bestimmung des Hydrolysegrades mit dynamischen Methoden in der Ausführung mit gewissen Nachteilen verknüpft. Zunächst ist die Notwendigkeit der Verwendung eines Indikators zu erwähnen. Da bei der Esterkatalyse die gebildete Essigsäure titriert werden muß, so ist dazu Phenolphthalein der Indikator $\kappa\alpha\tau'$ $\acute{\epsilon}\xi\omicron\chi\eta\nu$. Der Farbumschlag mit demselben erfolgt jedoch in Gegenwart der Hexonbasen und vieler Aminosäuren nicht ganz mit der wünschenswerten Schärfe. Sodann kann man wegen des verhältnismäßig langsamen Verlaufs der Esterkatalyse bei 25° den Hydrolysegrad nur in konzentrierteren (v bis ca. 40) Salzlösungen und von erheblicher hydrolysierten Salzen bestimmen. — Die Esterverseifung verläuft sehr viel schneller als die Esterkatalyse, würde also die Bestimmung von x auch in verdünnter Salzlösung zulassen; dem steht nun aber der Umstand gegenüber, daß es sich jetzt um die Bestimmung der Titerabnahme des an der Reaktion teilnehmenden, als schwache Base aufzufassenden, hydrolysierten Natriumsalzes handelt, und der Farbumschlag der auf Basen empfindlichen Indikatoren (z. B. Methylorange, vgl. darüber Lunge, Ztschr. f. angew. Chem. Bd. XVII, Heft 7, 8, 9) nur in konzentrierter Lösung mit der erforderlichen Schärfe erfolgt.¹⁾ Durch die Notwendigkeit, konzentriertere Lösungen

¹⁾ Winkelblech (l. c.) und mitunter auch Lundén (l. c.) haben bei den Katalysen- wie Saponifikationsversuchen ein und denselben Indikator, nämlich p-Nitrophenol verwendet; da dessen Dissoziationskonstante (2.3×10^{-7}) rund in der Mitte zwischen der des Methyloranges (4.6×10^{-4}) und der des Phenolphthaleins (8×10^{-10}) liegt (vgl. Salm, Zeitschrift für Elektrochem., Bd. XII, S. 100), ist derselbe auf Hydroxylionen weniger empfindlich als Methylorange, auf Wasserstoffionen weniger empfindlich als

verwenden zu müssen, wird die für die Anwendbarkeit von Formel (1) für die Berechnung der Dissoziationskonstanten gemachte Voraussetzung, daß der Dissoziationsgrad des Salzes und der entstandenen freien Säure bzw. Base nur unerheblich voneinander verschieden ist; nicht so vollkommen erfüllt als wie beim Arbeiten mit verdünnten Lösungen!

Demzufolge wurde bei den in dieser Arbeit untersuchten Stoffen, soweit es möglich war, der Hydrolysegrad nach beiden Methoden bestimmt.

Die Esterkatalyse wurde mit Methylacetat ausgeführt, indem 2 ccm davon mit 25 ccm der zu untersuchenden Salzlösung von bekannter Konzentration vermischt, zeitweise 2 ccm dem Reaktionsgemisch entnommen und mit ca. $n/10$ Barytwasser oder kohlenstofffreier Natronlauge und Phenolphthalein als Indikator titriert wurden. Der durch Verwendung einer konzentrierteren Lauge erzielte Vorteil des schärferen Indikatorumschlages überwiegt bei weitem den der größeren Genauigkeit in der Ablesung bei Verwendung verdünnterer Titrierlösungen. Aus den Titrationen wurde die Geschwindigkeitskonstante nach der für monomolekulare Reaktionen geltenden Formel mit dekadischen Logarithmen berechnet. Die Geschwindigkeitskonstante bei bekannter Säure- d. h. Wasserstoffionkonzentration wurde durch Wiederholung der Bestimmung unter ganz gleichen Bedingungen mit Salzsäure von bekannter Konzentration erhalten. Unter ganz gleichen Bedingungen deshalb, weil — ob zwar die fragliche Reaktion eins der Schulbeispiele für monomolekulare Reaktionen bildet — die Reaktionsgeschwindigkeit trotzdem von der Anfangskonzentration des Esters nicht ganz unerheblich abhängt. Bei der Berechnung des Hydrolysegrades aus den beiden erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurde für die «Neutral-

Phenolphthalein. Aber auch bei Verwendung dieses, wie ich mich ausdrücken möchte, Kompromißindikators scheint die Anwesenheit der amphoterer Stoffe den Indikatorumschlag zu beeinflussen, denn während Winkelblech (l. c. S. 578, 579) zur Titration einer gewissen Menge Salzsäure 7,27 ccm $n/33,3$ -Lauge gebraucht hat, hat er zur Titration der mit der Salzsäure äquivalenten Menge des Hydrochlorids des Glykokolls 6,76 ccm, des Alanins 7,51 ccm, des Asparagins 7,42 ccm von derselben Lauge benötigt.

salzwirkung» keine Korrektur angebracht aus Gründen, die auf S. 544 und 545 der Arbeit von Lundén (l. c.) dargelegt sind.

Die Bestimmung der Hydroxylionkonzentration durch Ester-verseifung hat zu keinen brauchbaren Ergebnissen geführt.

Aus der elektrischen Leitfähigkeit erhält man bei einwertigen Salzen den Hydrolysegrad (x) durch die Formel:¹⁾

$$x_v = \frac{M_v - \mu_v}{\mu_{\text{HCl}} - \mu_v} \quad (4)$$

NaOH

worin M_v die gemessene Mol-Leitfähigkeit des hydrolysierten Salzes bei der Verdünnung v , μ_{HCl} die Mol-Leitfähigkeit der Salzsäure bzw. der Natronlauge bei derselben Verdünnung v , μ_v endlich die Mol-Leitfähigkeit des hydrolysierten Salzes bei der Verdünnung v für den Fall bedeutet, daß dasselbe gar nicht hydrolysiert wäre.

Für zweiwertige Salze tritt an Stelle von Formel (4) nach dem auf S. 479 Gesagten die Formel:

$$x_v = \frac{M_v - \mu_v}{(\mu_{\text{HCl}} + \mu_1) - \mu_v} \quad (5)$$

NaOH

worin bis auf μ_1 die Buchstaben dieselbe Bedeutung haben wie in Formel (4) und μ_1 die Mol-Leitfähigkeit des nicht hydrolysierten einwertigen Salzes bedeutet, welches bei der Hydrolyse des zweiwertigen Salzes entsteht. (Im Falle des Histidindichlorids z. B. ist es die Leitfähigkeit des nichthydrolysierten Histidinhydrochlorids.)

Die experimentelle Ermittlung von μ_v durch Zurückdrängung der Hydrolyse gelang beim Histidinnatrium und Histidinhydrochlorid nur bei $v = 32$. Bei größerer Verdünnung machte sich die Eigenleitfähigkeit des Histidins sehr erheblich geltend. Es mußten demzufolge die zu den größeren Verdünnungen zugehörigen μ_v -Werte aus der bei $v = 32$ ermittelten nach Ostwald²⁾ geschätzt werden. Die μ_v -Werte für das Histidindichlorid wurden gleich der Mol-Leitfähigkeit des von Bredig³⁾ ge-

¹⁾ Über die Affinitätsgrößen der Basen, von G. Bredig, Zeitschrift für physikal. Chem., Bd. XIII, S. 321, 1894.

²⁾ Vgl. G. Bredig, Beiträge zur Stöchiometrie der Ionenbeweglichkeit, Zeitschrift f. physikal. Chemie, Bd. XIII, S. 198, 1894.

³⁾ Ibid. S. 233.

messenen Tetramethyldiamindichlorids gesetzt. Letzteres ist als Salz einer mittelstarken Base ($k = 5,1 \times 10^{-4}$) gar nicht hydrolysiert und hat eine mit dem Histidindichlorid gleiche Atomzahl.

Die in den mitgeteilten Tabellen unter M_v angegebenen Leitfähigkeitswerte sind das Mittel von zwei mit einzeln bereiteten Lösungen erhaltenen Bestimmungsreihen, welche teilweise bis zu 1% von einander differierten. Die Ursache der größeren Leitfähigkeitsdifferenzen ist in den unvermeidlichen Konzentrationsunterschieden der nur in kleinen Mengen herstellbar gewesenen Lösungen zu suchen. Weil jedoch, wegen der Unmöglichkeit, die Leitfähigkeit des nichthydrolysierten Salzes experimentell zu bestimmen, dieselbe (μ_v) sicherlich auf 1% ungenau ist, reicht die erzielte Genauigkeit der Leitfähigkeitsmessungen vollständig aus. Ein Blick auf Formel (4) zeigt, daß bei kleiner Hydrolyse schon ein Unterschied von wenigen Zehntelprozenten in der Leitfähigkeit einen erheblichen Einfluß auf x , somit auch auf k_x/k_w ausübt. Deswegen sind die in den Tabellen mitgeteilten Zahlenwerte absichtlich nur bis zur ersten Dezimale gegeben.

Alle Leitfähigkeitswerte sind auf reziproke Siemens-Einheiten bezogen, weil die benutzten Leitfähigkeitswerte von Bredig noch darin gegeben sind. Sie fallen übrigens in den Ergebnissen ganz aus. Die Leitfähigkeitsbestimmungen selbst wurden mit Telephon und Wechselstrom ausgeführt. Es wäre anachronistisch, sie ausführlicher beschreiben zu wollen.

In den Tabellen bedeutet:

v die Literzahl, welche ein Mol des am Kopfe der Tabelle angegebenen Salzes gelöst enthält;

M_v die gemessene Mol-Leitfähigkeit desselben (die spez. Leitfähigkeit des Wassers 1,6 bis 2×10^{-6} ist nicht abgezogen);

μ_v die Mol-Leitfähigkeit desselben für den Fall, daß es nicht hydrolysiert wäre;

μ_{HCl} bzw. μ_{NaOH} die Mol-Leitfähigkeit der Salzsäure bzw. Natronlauge;

100 x das Hundertfache des hydrolysierten Molbruchteils (bei einwertigen Salzen = der prozentischen Hydrolyse);

k_b bzw. k_{bb} bzw. k_s die erste bzw. zweite Basedissoziationskonstante bzw. die Säuredissoziationskonstante des zu dem fraglichen Salze gehörenden amphoteren Stoffes;

k_w das Ionenprodukt des Wassers ¹⁾ bei 25°: $1,11 \times 10^{-14}$;

θ Minuten;

cc verbrauchte cc-Lauge;

C die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante nach der Formel

$$C = \frac{1}{\theta} \log \frac{cc \infty}{cc \infty - cc \theta}$$

berechnet.

II.

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Histidins standen mir zwei Präparate: das Histidinhydrochlorid aus Kasein und die freie «Base» aus Blut hergestellt zur Verfügung. 0,2500 g des ersteren gaben 0,1765 g Silberchlorid, enthielten somit 17,46% Cl, während für $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl + H_2O$, 17,39% Cl berechnet sind. Die Reinheit der vollkommen aschenfreien Base geht auch aus ihrer Leitfähigkeit μ_1 hervor, welche mit der Leitfähigkeit μ_2 einer von Professor Siegfried aus dem oben erwähnten Histidinhydrochlorid hergestellten Basenprobe, wie aus Tabelle I ersichtlich, ziemlich übereinstimmt.

Tabelle I.
Mol-Leitfähigkeit des Histidins.

v	μ_1	μ_2	
8	3,4	—	—
32	3,4	3,7	4,3
64	3,8	4,1	4,1
128	4,3	4,2	4,2
256	5,6	5,2	5,3
512	7,6	6,6	6,2
1024	9,2	9,3	8,4

Die Leitfähigkeit des Wassers $1,6 \times 10^{-6}$ ist abgezogen!

Eine Dissoziationskonstante kann aus den Zahlen natürlich nicht berechnet werden. Im Gegensatz zu der wie bekannt ²⁾ ganz außerordentlich kleinen Leitfähigkeit mancher Aminosäuren ist jedoch die Leitfähigkeit an und für sich nicht unbedeutend.

¹⁾ Vgl. Lundén (l. c.), S. 559.

²⁾ Walker (l. c.).

Die von Walter Neumann¹⁾ gemessenen Leitfähigkeiten der ebenfalls amphoteren Peptone ist allerdings noch größer.

Die folgenden Tabellen II—IV enthalten die mit den Histidinsalzen ausgeführten Leitfähigkeitsmessungen und sind nach dem im ersten Teil dieser Arbeit Vorausgeschickten ohne weiteres verständlich.

Tabelle II.
Leitfähigkeitsmessungen am Histidinhydrochlorid.

v	M _v	μ _v	μ _{HCl}	100 x	k _b /k _w
32	88,9	87	374	0,66	7,2 × 10 ⁵
64	94,0	90	378	1,4	5,3
128	98,3	93	384	1,8	4,0
256	102,0	95	389	2,4	5,5
512	105,6	97	394	2,9	5,9
1024	109,7	98	399	3,9	6,9
					5,1 × 10 ⁵

Eine aus Histidin und berechneter Salzsäure hergestellte Lösung ergab innerhalb Fehlergrenzen übereinstimmende Leitfähigkeitswerte.

Tabelle III.
Leitfähigkeitsmessungen am Histidinnatrium.

v	M _v	μ _v	μ _{NaOH} ²⁾	100 x	k _s /k _w
32	66,3	65	210	0,90	2,7 × 10 ⁵
64	70,6	68	213	1,8	1,9
128	74,3	71	213	2,3	2,1
256	78,0	73	213	3,6	1,9
512	82,0	75	213	5,1	1,9
1024	87,0	76	213	8,0	1,5
					2,0 × 10 ⁵

¹⁾ Walter Neumann, Über Peptone, Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 216, 1905.

²⁾ Die Leitfähigkeit der Natronlauge nimmt bei größerer Verdünnung bekanntlich wegen der Kohlensäureaufnahme ab. In der Tabelle

Die Lösung war aus Histidin und berechneter, aus Natrium hergestellter, kohlenstofffreier Natronlauge ¹⁾ hergestellt.

Tabelle IV.

Leitfähigkeitsmessungen am Histidindichlorid.

v	Mv	μ_v ²⁾	$\mu_{\text{HCl}} + \mu_1$ ³⁾	100 x	k_{bb}/k_w	X	K/k_w ⁴⁾
64	380,4	217,6	468	67,2	47	30,4	$1,0 \times 10^3$
128	418,4	229,0	477	76,5	52	35,0	1,6
256	443,4	238,8	484	81,2	69	38,0	2,9
512	458,0	248,2	491	86,4	103	38,9	5,5
1024	469,8	254,0	497	88,9	113	40,0	10,0

Die Lösung war aus Histidinhydrochlorid und berechneter Salzsäure hergestellt. Eine andere Lösung, aus Histidin und Salzsäure dargestellt, gab innerhalb Versuchsfehlern mit den in der Tabelle mitgeteilten übereinstimmende Leitfähigkeitswerte.

ist die höchste beobachtete Mol-Leitfähigkeit an Stelle dieser Werte beibehalten worden. Das Histidinnatrium ist, wie ersichtlich, nur wenig hydrolysiert, deswegen kann sich bei demselben die Kohlensäure praktisch in gar keiner Leitfähigkeitsabnahme geltend machen.

¹⁾ Welche ich von Herrn Professor Siegfried gütigst bekommen hatte.

²⁾ Die entsprechende Mol-Leitfähigkeit des Tetramethyldiamindichlorids (vgl. S. 484).

³⁾ Die μ_v -Werte des Histidinhydrochlorids aus Tabelle II (vgl. S. 483).

⁴⁾ Diese «Konstante» erhält man, wenn man in Formel (1) für x ein Hundertstel der in der Tabelle IV unter X verzeichneten prozentischen Hydrolyse des Histidinchlorids (wenn man dessen zerfallenen Molbruchteil als in 1 Mol Histidin und 2 Mol Salzsäure zerfallen ansieht) einsetzt; ihr durch Multiplikation mit k_w gebildetes Produkt könnte man als das Doppelte einer aus der ersten und der zweiten Basedissoziationskonstante des Histidins sich ergebenden mittleren Dissoziationskonstante ansehen, welche zu einer einsäurigen Base gehörte, die das Halbe des Molargewichts des Histidins zum Molargewicht hätte. Diese Rechnungsweise ist durch das Massenwirkungsgesetz nicht begründbar.

Ich habe die Berechnung deswegen ausgeführt, weil H. Ley (Zeitschrift f. physikal. Chem., Bd. XXX, S. 222, 1899) auf diese Weise eine Hydrolysekonstante (das ist das Riziproke: k_w/K der hier benutzen Konstante) für das Aluminiumchlorid (AlCl_3) und das Berylliumchlorid (BeCl_2) aus den von ihm bestimmten Hydrolysegraden der erwähnten

In Tabelle IV zeigt k_{bb}/k_w einen deutlichen Gang und steigt von 50 bis 110. Da die Geschwindigkeitskonstante der Salze berechnet hatte. Obzwar Ley die Verhältnisse bei der Hydrolyse der genannten Salze für sehr verwickelt hält, sollen nach ihm immerhin die erwähnten Hydrolysekonstanten eine ungefähre Schätzung der Stärke der beiden zugehörigen Metallhydroxyde ermöglichen.

Die bis jetzt bekannten zweiten Dissoziationskonstanten der mehrbasischen Säuren sind zwar alle erheblich, mitunter sehr erheblich kleiner als die ersten (vgl. z. B. die Tabelle S. 260 bei W. A. Smith; Über die stufenweise Dissoziation zweibasischer organischer Säuren, Zeitschrift f. physikal. Chem., Bd. XXV, 1898), eine zahlenmäßige Gesetzmäßigkeit jedoch für das Größenverhältnis der verschiedenen Dissoziationskonstanten zueinander ist nicht vorhanden. Ich wüßte keinen Grund, etwas anderes für das Verhältnis der verschiedenen Dissoziationskonstanten der mehrsaurigen Basen zueinander zu erwarten. Danach kann meines Erachtens die Messung der Hydrolyse der normalen Salze mehrsauriger Basen nur ebensoviel über die Stärke der betreffenden mehrsaurigen Basen aussagen, wie die Messung der Hydrolyse der normalen Salze der mehrbasischen Säuren über die Stärke der betreffenden mehrbasischen Säuren aussagt. Daß aber aus dem Hydrolysegrad eines mit einer starken Base gebildeten normalen Salzes einer mehrbasischen Säure nicht der geringste Schluß über die Größe der ersten — und für die «Stärke» in allererster Linie in Betracht kommenden — Dissoziationskonstante der betreffenden mehrbasischen Säure gezogen werden kann, läßt sich durch die Verhältnisse in Trinatriumphosphatlösungen treffend illustrieren. Nach John Shields (Zeitschr. f. physikal. Chem., Bd. XII, S. 167, 1893) ist Trinatriumphosphat in $m/50$ -Lösung mindestens zu 98% in Dinatriumphosphat und Natronlauge hydrolysiert, X ist somit rund 33 bei $v = 50$. Aus diesen Werten würde nach dem Massenwirkungsgesetz nur folgen, daß die dritte Dissoziationskonstante der Phosphorsäure etwa dem Ionenprodukt des Wassers gleich ist; die von Ley benutzte Rechnungsweise würde für $K/k_w = 333$ und daraus für die Dissoziationskonstante $ca. 3,7 \times 10^{-12}$ ergeben. Eine Größe, die gar nicht vermuten läßt, daß die erste — und für seine «Stärke» maßgebende — Dissoziationskonstante der Phosphorsäure $ca. 6 \times 10^{-3}$, also rund 2 Milliarden mal größer ist.

Ich habe diese scheinbare Abschweifung ins Gebiet der anorganischen Chemie deshalb gemacht, weil eben jetzt W. B. Hardy (Colloidal solution. The Globulins. Journ. of Physiology, Bd. XXXIII, S. 251, 1906) aus der durch Esterverseifung und durch Zuckerinversion bestimmten OH- bzw. H-Ionkonzentration von Säureglobulin- und Baseglobulinlösungen Schlüsse über die Base- und Säurestärke des Globulins gezogen hat. — Es ist selbstverständlich, daß ich durch diese Bemerkung zu den mit anderen Methoden gewonnenen Anschauungen Hardy's keinerlei Stellung genommen habe.

Methylacetatkatalyse in $m/10$ Histidindichloridlösung nach Tabelle VI sich zu $1,01 \times 10^{-4}$ ergibt, während sie in $m/10$ Salzsäure nach Tabelle V $3,165 \times 10^{-4}$ beträgt, so erhält man daraus bei $v = 10$ für $100x$ des Histidindichlorids 31,8 und für $k_{bb}/k_w = 68$. Eine Zahl, welche in der Größenordnung mit den in Tabelle IV erhaltenen Werten übereinstimmt.

Tabelle V.

Methylacetatkatalyse in Gegenwart von Salzsäure.
 $v = 10$.

ϑ	cc	C	ϑ	cc	C
0	2,00	—	0	1,95	—
336	5,30	$3,11 \times 10^{-4}$	280	4,80	$3,16 \times 10^{-4}$
1385	11,73	3,12	415	5,99	3,17
1765	13,20	3,18	1495	12,28	3,21
2888	15,62	3,21	1751	13,13	3,19
∞	17,45	—	2972	15,68	3,20
		$3,15 \times 10^{-4}$	∞	17,40	—
					$3,18 \times 10^{-4}$

Tabelle VI.

Methylacetatkatalyse in Gegenwart von Histidindichlorid.
 $v = 10$.

ϑ	cc	C	ϑ	cc	C
0	4,05	—	0	4,10	—
230	4,87	$0,99 \times 10^{-4}$	1348	8,40	$1,00 \times 10^{-4}$
394	5,45	1,01	2516	11,22	1,01
1670	9,21	1,01	2914	11,98	1,01
2946	12,05	1,02	4194	14,25	1,03
5780	15,88	1,00	5474	15,90	1,05
11524	18,80	1,03	9803	18,45	0,99
13002	19,30	1,00	∞	20,15	—
∞	20,10	—			
		$1,01 \times 10^{-4}$			$1,01 \times 10^{-4}$

$$100x = 31,8$$

$$k_{bb}/k_w = 68$$

Das Histidinhydrochlorid ist, wie die folgende Tabelle VII zeigt, schon zu wenig hydrolysiert (vgl. S. 481), um mit der Methylacetatkatalyse brauchbare Werte zu ergeben. Die entstandene Essigsäure beschleunigt im späteren Verlauf die Reaktion sehr erheblich. Rechnet man aus dem Mittelwert der ersten drei Geschwindigkeitskonstanten ($1,84 \times 10^{-6}$) die prozentische Hydrolyse aus, so erhält man $100x = 0,58$, woraus sich k_b/k_w in roher Übereinstimmung mit dem aus Tabelle II erhaltenen Wert ($5,1 \times 10^5$) zu 3×10^5 ergibt.

Tabelle VII.

Methylacetatkatalyse in Gegenwart von Histidinhydrochlorid.
 $v = 10$.

ϑ	cc	C
0	2,03	—
2858	2,23	$1,91 \times 10^{-6}$
15 845	3,00	1,71
27 729	3,86	1,94
75 249	7,80	2,57
106 929	10,20	2,89
134 289	11,56	4,12
∞	18,08	—

Durch Multiplikation mit $k_w = 1,11 \times 10^{-14}$ erhält man aus den Konstanten k_{bb}/k_w , k_b/k_w und k_s/k_w der Tabellen II, III und VI folgende Werte für die

Dissoziationskonstanten des Histidins bei 25° :

Erste Basedissoziationskonstante	$5,7 \times 10^{-9}$
Zweite „	$5,0 \times 10^{-13}$
Säuredissoziationskonstante	$2,2 \times 10^{-9}$

Vergleicht man diese mit den bis jetzt für amphotere Elektrolyte gefundenen Dissoziationskonstanten, welche ich nach

der Zusammenstellung von Lundén¹⁾ (l. c.) als Fußnote heretze, so ist die zugleich erhebliche Größe der entgegengesetzten ersten Base und der Säuredissoziationskonstante bemerkenswert. Wohl sind Stoffe bekannt, bei denen eine der Dissoziationskonstanten (bis jetzt die Säuredissoziationskonstante) viel größer ist als beim Histidin, aber dann ist die entgegengesetzte Dissoziationskonstante um so kleiner. Histidin ist der Stoff, bei welchem bis jetzt die Base- und Säureeigenschaft gleichzeitig am meisten entwickelt gefunden worden ist.

III.

Vom Lysin war mir nur das Dichlorid, vom Arginin das Dinitrat zugänglich. Letzteres ergab eine befriedigende Elementaranalyse und zersetzte sich bei 148—150°. Nach Gulewitsch²⁾ soll der Schmelzpunkt von Arginindinitrat 145° sein. 0,1671 g Lysindichlorid gaben 0,2164 g Silberchlorid = 32,93% HCl, während für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl$ 33,28% HCl berechnet sind. Die Substanz zersetzte sich bei 198—202° in Übereinstimmung mit einer Mitteilung von Lawrow,³⁾ nach der die Substanz keinen scharfen Schmelzpunkt zeigt, bei 194—195° sich zu

¹⁾ Die bis jetzt bekannten amphoteren Elektrolyte, für welche die Base- (k_b) sowie die Säuredissoziationskonstante (k_s) bekannt ist. Temperatur 25°.

	k_s	k_b
Dimethylpyron	$0,80 \times 10^{-14}$	2×10^{-14}
Acetoxim	$6,0 \times 10^{-13}$	$6,5 \times 10^{-13}$
Sarkosin	$1,2 \times 10^{-10}$	$1,7 \times 10^{-12}$
Leucin	$1,8 \times 10^{-10}$	$2,3 \times 10^{-12}$
Glykokoll	$1,8 \times 10^{-10}$	$2,7 \times 10^{-12}$
α -Alanin	$1,9 \times 10^{-10}$	$5,1 \times 10^{-12}$
β -i-Asparagin	$1,35 \times 10^{-9}$	$1,53 \times 10^{-12}$
Kakodylsäure	$6,4 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-13}$
o-Aminobenzoesäure	$1,06 \times 10^{-5}$	$1,37 \times 10^{-12}$
p-	$1,21 \times 10^{-5}$	$2,33 \times 10^{-12}$
m-	$1,63 \times 10^{-5}$	$1,22 \times 10^{-11}$
Asparaginsäure	15×10^{-5}	$1,2 \times 10^{-12}$

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 190.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 395.

verändern beginnt und bei 200—202° Gasbläschen sichtbar werden. Nach Henderson¹⁾ dagegen sollen alle vollkommen reinen Lysindichloridpräparate bei 192—193° schmelzen. Letzteres ist merkwürdig, weil nach der Theorie durch Verunreinigungen der Schmelzpunkt erniedrigt und nicht erhöht wird.

Um über die erste Basedissoziationskonstante des Arginins und Lysins Anhaltspunkte zu gewinnen, wurde das Arginin-dinitrat und das Lysindichlorid mit Natronlauge im molaren Verhältnis vermischt, die Leitfähigkeit des Gemisches gemessen und von den erhaltenen Werten die Leitfähigkeit von 1 Mol Natriumchlorid bzw. Natriumnitrat abgezogen. Die Differenz der so erhaltenen Leitfähigkeiten des Lysinhydrochlorids und des Argininmononitrats bei $v = 32$ und $v = 1024$ ist ca. 10. Was besagen würde, daß die zuletzt genannten Salze nicht meßbar hydrolysiert sind. Dieses Ergebnis wird dadurch bestätigt, daß in Gegenwart von $m/10$ -Lösungen der erwähnten Salzgemische das Methylacetat selbst nach Monaten nicht nennenswert gespalten ist. Die erste Basedissoziationskonstante des Arginins und Lysins ist also mindestens 1×10^{-7} , und wäre somit aus der Leitfähigkeit der freien «Basen» mit einiger Genauigkeit bestimmbar, wenn dieselben kohlenstofffrei herstellbar wären.

Zur Orientierung über die Säurestärke des Arginins und Lysins wurde die Leitfähigkeit von Gemischen, welche Arginin-dinitrat bzw. Lysindichlorid und Natronlauge im Verhältnis von zwei Äquivalenten der ersteren zu drei Äquivalenten des letzteren enthielten, gemessen und von den erhaltenen Leitfähigkeitswerten die Leitfähigkeit von zwei Äquivalenten Natriumchlorid bzw. Natriumnitrat abgezogen. Die Leitfähigkeit des Argininnatriums ergab sich so bei $v = 32$ annähernd gleich der Leitfähigkeit der Natronlauge²⁾ und zeigte für weitere Verdünnungen die für die letztere charakteristische Leitfähigkeitsabnahme. Das Arginin besitzt demzufolge keine Säureeigenschaft. Die Leitfähigkeit des Lysinatriums ergab, daß dasselbe selbst bei

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 321.

²⁾ Ganz kann die Leitfähigkeit der freien Natronlauge nicht erreicht werden, weil durch die gleichzeitige Anwesenheit von Natriumnitrat bzw. Natriumchlorid und Natronlauge die Dissoziation herabgedrückt wird.

$v = 1024$ nicht über 50% hydrolysiert ist. Die Säuredissoziationskonstante des Lysins beträgt somit ca. $1-2 \times 10^{-11}$.

Aus der Methylacetatkatalyse in Gegenwart von Lysindichlorid ergibt sich (wie Tabelle VIII zeigt) k_{bb}/k_w zu 150. Dieser Wert wird auch durch die in Tabelle IX mitgeteilten Leitfähigkeitsmessungen am Lysindichlorid bestätigt.

Tabelle VIII.

Methylacetatkatalyse in Gegenwart von Lysindichlorid.

$v = 20$			$v = 10$		
θ	cc	C	θ	cc	C
0	1,03	—	0	2,00	—
2 527	4,79	$4,79 \times 10^{-5}$	2534	7,08	$7,02 \times 10^{-5}$
3 955	6,50	4,80	2838	7,70	7,05
5 397	8,10	4,84	3960	9,33	7,05
6 838	9,36	4,93	4281	9,76	7,08
9 614	11,25	4,89	5571	11,22	7,08
11 457	12,29	4,95	7153	12,69	7,15
14 355	13,46	4,94	∞	17,45	—
17 194	14,25	4,89			
∞	16,48	—			$7,07 \times 10^{-5}$
		$4,88 \times 10^{-5}$			
	$100x = 30,8$			$100x = 22,4$	
	$k_{bb}/k_w = 146$			$k_{bb}/k_w = 153$	

Tabelle IX.

Leitfähigkeitsmessungen am Lysindichlorid.

v	M_v	M_{Bg}	μ_v	$\mu_{HCl} + \mu_1$	$100x$	k_{bb}/k_w
64	331,0	330	210,0	468	46,9	154
128	377,4	374	221,4	477	61,0	134
256	417,6	416	231,4	484	73,6	125
512	446,6	445	239,8	491	82,1	136
1024	464,0	464	246,2	497	85,9	214

Für μ_v ist aus Bredig's Messung (l. c. S. 232) die Mol-Leitfähigkeit des Pentamethyldiamindichlorids eingesetzt. Für μ_1 ist aus Tabelle II die Leitfähigkeit des nichthydrolysierten Histidinhydrochlorids gesetzt; die Leitfähigkeit des Lysinhydrochlorids wird wahrscheinlich 1–2% kleiner sein. Unter MB_g ist die von Bredig (l. c. S. 316) mitgeteilte Leitfähigkeit des Lysindichlorids gegeben. Die Übereinstimmung unserer Messungen ist (vgl. S. 484) eine befriedigende.

Bei Arginindinitrat ergibt die Methylacetatkatalyse nach Tabelle X bei $v = 10,75$ für $k_{bb}/k_w : 204$. Durch Leitfähigkeitsmessungen, welche wegen der großen Unsicherheit von μ_v und μ_1 nur grobe Annäherungen liefern können und deren ausführliche Wiedergabe deshalb unterbleiben soll, wird die Größenordnung von k_{bb}/k_w bestätigt.

Tabelle X.

Methylacetatkatalyse in Gegenwart von Arginindinitrat.

$v = 10,75$			$v = 10,75$		
ϑ	cc	C	ϑ	cc	C
0	1,88	—	0	1,88	—
1456	4,75	$6,13 \times 10^{-5}$	1326	4,50	6,09
2943	7,09	6,07	2826	6,95	6,11
4371	9,05	6,20	4257	8,89	6,24
7237	11,77	6,14	5717	10,55	6,25
8653	12,85	6,02	7127	11,82	6,28
10146	13,65	6,14	9930	13,74	6,30
∞	17,33	—	∞	17,33	—
		$6,12 \times 10^{-5}$			$6,22 \times 10^{-5}$

$$100x = 19,5$$

$$k_{bb}/k_w = 204$$

Wenn wir das, was über die Dissoziationskonstanten des Arginins und Lysins ermittelt werden konnte, rekapitulieren, so gelangen wir zu folgender Übersicht:

	des Arginins	des Lysins
Erste Basedissoziationskonstante	$< 1,0 \times 10^{-7}$	$< 1,0 \times 10^{-7}$
Zweite	$2,2 \times 10^{-12}$	$1,1 \times 10^{-12}$
Säuredissoziationskonstante	$> 1,11 \times 10^{-14}$	ca. $1-2 \times 10^{-12}$

Ein Vergleich der Dissoziationskonstanten des Lysins mit denen des Leucins (S. 491) zeigt, daß durch Eintritt der zweiten Aminogruppe die Basedissoziationskonstante des Leucins ca. 5×10^4 mal sich vergrößert hat, während die Säuredissoziationskonstante nur 10 mal kleiner geworden ist.

Das Guanidin ist eine äußerst starke Base¹⁾ und deswegen ist es erklärlich, daß durch dessen Eintritt die Aminovaleriansäure (deren Säuredissoziationskonstante ungefähr gleich der des Leucins sein wird) die Säureeigenschaft völlig eingebüßt hat, also das Arginin keine Säure ist.

Die zweite Basedissoziationskonstante ist sowohl beim Arginin wie beim Lysin und Histidin (S. 490) sehr viel kleiner als die erste. Das ist auch bei der Asparaginsäure der Fall, deren zweite Säuredissoziationskonstante aus der von Winkelblech (l. c.) gemessenen Mol-Leitfähigkeit des Asparaginsäure-natriums sich nach der in dieser Arbeit gebrauchten Rechnungsweise zu $1,8 \times 10^{-10}$ ergibt.

Leipzig, März 1906.

¹⁾ Bredig (l. c.), S. 317.

²⁾ Berechnung der zweiten Säuredissoziationskonstante der Asparaginsäure aus der Mol-Leitfähigkeit des Asparaginsäurenatriums:

v	M _v	μ _v	μ _{NaOH} + μ ₁	100 x	k _{bb} /k _w
32	152,5	148	276	3,5	$2,5 \times 10^4$
64	165,4	156	282	7,5	1,05
128	176,6	168	285	8,9	1,5
256	187,1	174	286	11,7	1,65
512	198,7	182	288	15,8	1,1
1024	206,3	186	289	19,8	2,1
					$1,65 \times 10^4$

Für μ₁ ist Winkelblech's Messung (l. c.) der Leitfähigkeit des Asparaginsäurenatriums eingesetzt. μ_v ist das Doppelte der von Winkelblech geschätzten Äquivalent-Leitfähigkeit des nichthydrolysierten Asparaginsäurenatriums.