

Über die Balloelektrizität amphoterer Stoffe.

Von

C. Christiansen und Johanne Christiansen.

Mit 6 Abbildungen im Text.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie in Kopenhagen.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. Juni 1919.)

Die balloelektrische Untersuchung amphoterer Stoffe haben wir in der Erwartung vorgenommen, daß das eigentümliche Verhalten dieser Stoffe Säuren und Basen gegenüber sich durch charakteristische balloelektrische Kurven zeigen könnte. C. Christiansen¹⁾ hat gefunden, daß ein Elektrolyt in wäßriger Lösung mit einem nicht leitenden Stoffe, z. B. Alkohol, gemischt, einen sehr großen balloelektrischen Ausschlag gibt, während die Stoffe für sich allein unwirksam waren; ob eine solche Mischung positiv oder negativ balloelektrisch ist, hängt von dem Alkoholprozentage ab, so daß die Elektrizität bei etwa 45% Äthylalkohol (entsprechend 1 Mol. Alkohol + 4 Mol. Wasser) von positiven zu negativen Werten schwingt. Die Deutung dieser Kurven für verschiedene Alkohole und Fettsäuren hat zu sehr interessanten zahlenmäßigen Verhältnissen zwischen Alkohol- bzw. Fettsäure-Molekülen und Wasser-Molekülen geführt²⁾.

Es war daher — in Fortsetzung früherer Untersuchungen von amphoterer Stoffen mittels anderer Methoden — interessant zu untersuchen, welche neue Tatsachen die balloelektrische Methode entschleiern könnte, wenn man Elektrolyte (Säuren oder Salze) mit den nicht leitenden Stoffen: Eiweiß

¹⁾ C. Christiansen, *Annal. d. Physik* [4] Bd. 40, S. 107 (1913).

²⁾ Johanne Christiansen, *Zeitschr. f. physikalische Chemie* Bd. 92, S. 257 (1917).

oder Aminosäuren, zusammenmischte. Besonders interessierten uns im voraus die Punkte, wo das Eiweiß von Säure oder Alkali eben neutralisiert war.

Diese Punkte sind bekanntlich dadurch erkennbar, daß sie Viskositätsmaxima¹⁾ darstellen, und weiter dadurch, daß freie Salzsäure durch Günzburgs Reaktion²⁾ eben hier nachweisbar wird. Bei den einleitenden Versuchen wurden daher auf denselben Lösungen sowohl balloelektrische wie auch viskosimetrische und Günzburg-Bestimmungen vorgenommen.

Serumalbumin.

Die erste Untersuchungsreihe wurde mit einem einen Monat lang dialysierten Pferdeserum vorgenommen, und es zeigte sich gleich, daß der balloelektrische Ausschlag von der Wasserstoffionenkonzentration in hohem Grade abhängig war, aber in ganz anderer Weise, als wir im voraus erwartet hatten. Die folgende Tabelle I zeigt eine Zusammenstellung der balloelektrischen Werte mit Viskosität und Reaktion derselben Lösung. Vier Eiweißkonzentrationen wurden untersucht, nämlich 0,48, 0,8, 1,6 und 2,4% Serumalbumin. Die Viskosität wurde bei 20° im Wasserbad mit einem Viskosimeter vom Wasserwert 32,5 Sek. bestimmt und ist in der Tabelle in Sekunden angegeben. Sie wurde nur für die Konzentration 1,6% Eiweiß bestimmt. Die Reaktion wurde nur grob mittels Kongopapier (K) bestimmt.

Positive Kongoreaktion bedeutet, daß der Wasserstoffionenexponent $< 4,6$, negative, daß er $> 4,6$ ist³⁾. Ob freie Salzsäure zugegen war oder nicht, wurde mittels Günzburgs Reagens (G) bestimmt. Die Balloelektrizität wurde mittels der von C. Christiansen⁴⁾ früher angegebenen Methode bestimmt. Vor und nach jeder Versuchsreihe wurde, wie in früheren

¹⁾ W. Pauli und Handovski, Biochem. Zeitschr. Bd. 18. S. 340 (1909).

²⁾ Johanne Christiansen, Biochem. Zeitschr. Bd. 47, S. 226 (1912).

³⁾ Johanne Christiansen, Biochem. Zeitschr. Bd. 46, S. 37 (1912).

⁴⁾ C. Christiansen, Annal. d. Physik [4] Bd. 40, S. 107 (1913).

Abhandlungen angegeben, immer der Ausschlag einer Kontrolllösung bestimmt, weil bekanntlich die große Empfindlichkeit des Ballometers von vielen verschiedenen Faktoren, die nicht immer konstant gehalten werden können, den Vergleich verschiedener Versuchsreihen erschwert. Der Ausschlag dieser Kontrolllösung, die aus gleichen Teilen, 2 mol. Alkohol und $n/_{10}$ -KCl, bestand, wurde als Einheit (aus praktischen Gründen mit 50 multipliziert) angenommen, und die gefundenen Ausschläge anderer Lösungen im Verhältnis zu dieser Einheit reduziert.

In der ersten Kolonne der Tabelle ist für jede Albuminkonzentration die Salzsäurekonzentration der Lösung angegeben. Weiter ist für jede Albuminkonzentration die Balloelektrizität und die Reaktion auf Kongopapier oder mit Günzburgs Reagens aufgezeichnet. Für die Konzentration 0,8% Serumalbumin sind auch drei Bestimmungen mit Salzzusatz und für die Konzentration 1,6% Serumalbumin die Viskositätsbestimmungen aufgezeichnet.

Die Tabelle I und die zugehörige Fig. 1 zeigen, daß die Balloelektrizität, die anfänglich positiv ist, bei Zusatz von ganz geringen Mengen Salzsäure erst bis 0 abnimmt, dann negativ wird, ein Minimum erreicht, um darauf wieder allmählich bis zu positiven Werten zu steigen.

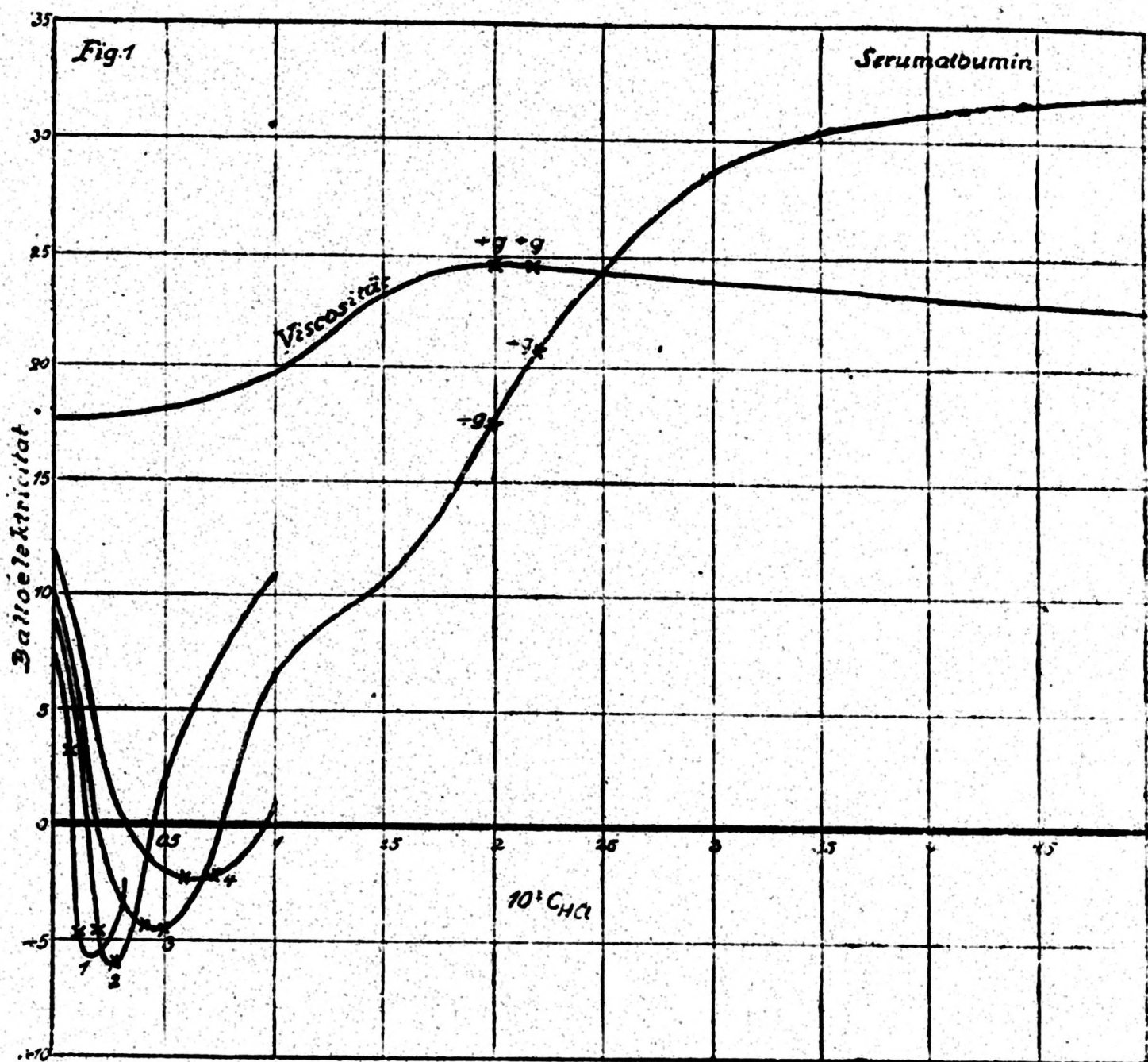
Die Viskosität zeigt eine gleichförmig steigende Kurve, die ein unscharfes Maximum bei dem Punkte erreicht, wo freie Salzsäure eben auftritt, d. h., wo eben alles Eiweiß mit Salzsäure gesättigt ist. Von diesem Punkte ab beginnt die Kurve langsam zu fallen.

Die Salzsäurekonzentration bei diesem Maximum ist 0,02 n; die Normalität des 1,6% Serumalbumins ist somit auch ungefähr 0,02 n, d. h. die Molekülgröße des Serumalbumins ist ein Multiplum von $16 : 0,02 = 800$.

Diesem Viskositätsmaximum entsprechend ist keine Diskontinuität der balloelektrischen Kurve (Kurve 3 der Figur) zu sehen; die großen und so charakteristischen Schwankungen der balloelektrischen Kurven liegen im ersten Anfang der Kurven bei ganz unbedeutendem Säurezusatz und haben somit

mit den Sättigungsgrenzen des Serumalbumins für Säure nichts zu tun.

Es war ein naheliegender Gedanke, daß der isoelektrische Punkt die Ursache dieser starken Richtungsänderung der Balloelektrizität war. Die Reaktion auf Kongopapier war ein ganz gutes Mittel, jene Vermutung zu prüfen. Der Umschlag dieses Indikators erfolgt nämlich bei $p_H = 4,6$, während der isoelek-



trische Punkt des Serumalbumins nach Michaëlis und Davidsohn¹⁾ ungefähr bei $p_H = 4,7$ liegt.

Wenn man die vier Kurven der Fig. 1, wo die Grenzen des Kongoumschlages durch Kreuze angegeben sind, unter diesem Gesichtspunkte betrachtet, sieht man, daß der Umschlag für die höchsten Eiweißkonzentrationen (1,6 und 2,4%,

¹⁾ Michaëlis und Davidsohn, Biochem. Zeitschr. Bd. 33, S. 456 (1911).

Tabelle I. Serumalbumin.

0,48% Serumalbumin			0,8% Serumalbumin			1,6% Serumalbumin			2,4% Serumalbumin		
$10^2 \cdot \text{CHCl}$	Ballo- elektr.	Reak- tion	$10^2 \cdot \text{CHCl}$	Ballo- elektr.	Reak- tion	$10^2 \cdot \text{CHCl}$	Ballo- elektr.	Reak- tion	$10^2 \cdot \text{CHCl}$	Ballo- elektr.	Reak- tion
0	8	—	0	8,7	—	0	10	35,4	0	11,2	—
0,05	4,2	—K	0,2	—4,5	—K	0,2	—0,2	—	0,4	—1,3	—
0,1	—4,9	+K	0,25	—6,2	+K	0,3	—3,3	—	0,5	—1,8	—
0,15	—6	—	0,3	—5,1	—	0,4	—4	—	0,6	—2,4	—K
0,2	—5,8	—	0,5	0,2	—	0,5	—4,5	—	0,7	—2,2	+K
0,3	—2,2	—	1	10,9	—	0,6	—3,3	—	0,8	—1,3	—
—	—	—	0	2,4	—	0,8	1,8	—	0,9	—0,6	—
—	—	—	0,25	5,8	—	1	6,7	39,5	1	+1,1	—
—	—	—	0,5	14,3	—	1,5	10,8	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	2	17,6	49,5	—	—	—G
—	—	—	—	—	—	2,2	20,9	—	—	—	+G
—	—	—	—	—	—	2,4	23,6	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	2,6	25	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	2,8	27	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	3	28,4	47,9	—	—	—
—	—	—	—	—	—	4	31	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	5	32	45	—	—	—

bzw. Kurve 3 und 4) in der Nähe des Minimums liegt, während er bei den beiden niedrigsten Konzentrationen (Kurve 1 und 2) links davon gelegen ist.

Der isoelektrische Punkt, der, wie schon erwähnt, bei etwas weniger saurer Reaktion als der Kongoumschlag liegt, kann daher nicht mit dem Minimum der Ballogramme zusammenfallen. Dagegen ist es mit den Versuchen vereinbar, daß er mit dem ersten Schnittpunkte der Kurven mit der Abscissenachse zusammenfällt, was auch theoretisch leichter zu begründen wäre; der isoelektrische Punkt ist ja dadurch gekennzeichnet, daß ebensoviele positive wie negative Eiweißionen vorhanden sind, und daß eine solche „Neutralität“ sich durch entsprechende balloelektrische Neutralität zeigen könnte, wäre ja ein sehr anziehender Gedanke.

Bei den späteren Versuchen mit Eieralbumin und Aminosäuren haben wir daher unsere Aufmerksamkeit besonders auf jenen Punkt gerichtet.

Eieralbumin.

Um mit ganz reinem Albumin arbeiten zu können, haben wir uns an Professor S. P. L. Sørensen gewendet, der uns freundlichst eine Portion seines reinen Eieralbumins überlassen hat. Der isoelektrische Punkt ist ja nämlich unter anderem dadurch eigentümlich, daß verschiedene Konzentrationen des Ampholyten — aber nur, wenn dieser ganz rein ist — ganz dieselbe Säurekonzentration fordern, um ihn zu erreichen. Dies stimmte nicht für Serumalbumin, was aus Fig. 1 ersichtlich ist. Die Abscisse bedeutete ja hier die Säurekonzentration, und man sieht, daß die ersten Schnittpunkte der vier Kurven mit der Abscissenachse — die ja nach unserer Theorie den isoelektrischen Punkt darstellen sollten — an ganz verschiedenen Stellen liegen.

Die Ursache könnte darin bestehen, daß Unreinheiten des dialysierten Serumalbumins je mehr Säure binden, je größer die Albuminkonzentration ist, und die Versuche mit S. P. L. Sørensens reinem Eiweiß waren daher für unsere Aufgabe von großer Bedeutung.

Wir erhielten von dem Carlsberg Laboratorium die Erläuterung, daß der Eiweißprozent der uns überlassenen Lösung 4,48% ($N\% \times 6,25$) betrug und daß als einzige Unreinheit $11,64 \cdot 10^{-3}$ Mol. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vorhanden wäre. Wir haben diese Lösung mit Wasser verdünnt und in den folgenden sechs Konzentrationen balloelektrisch untersucht: 0,0179%, 0,0715%, 0,143%, 0,359%, 0,718% und 1,79% Eiweiß. Dieselben sind auf den Fig. 2 und 3 als Nr. 1—6 markiert.

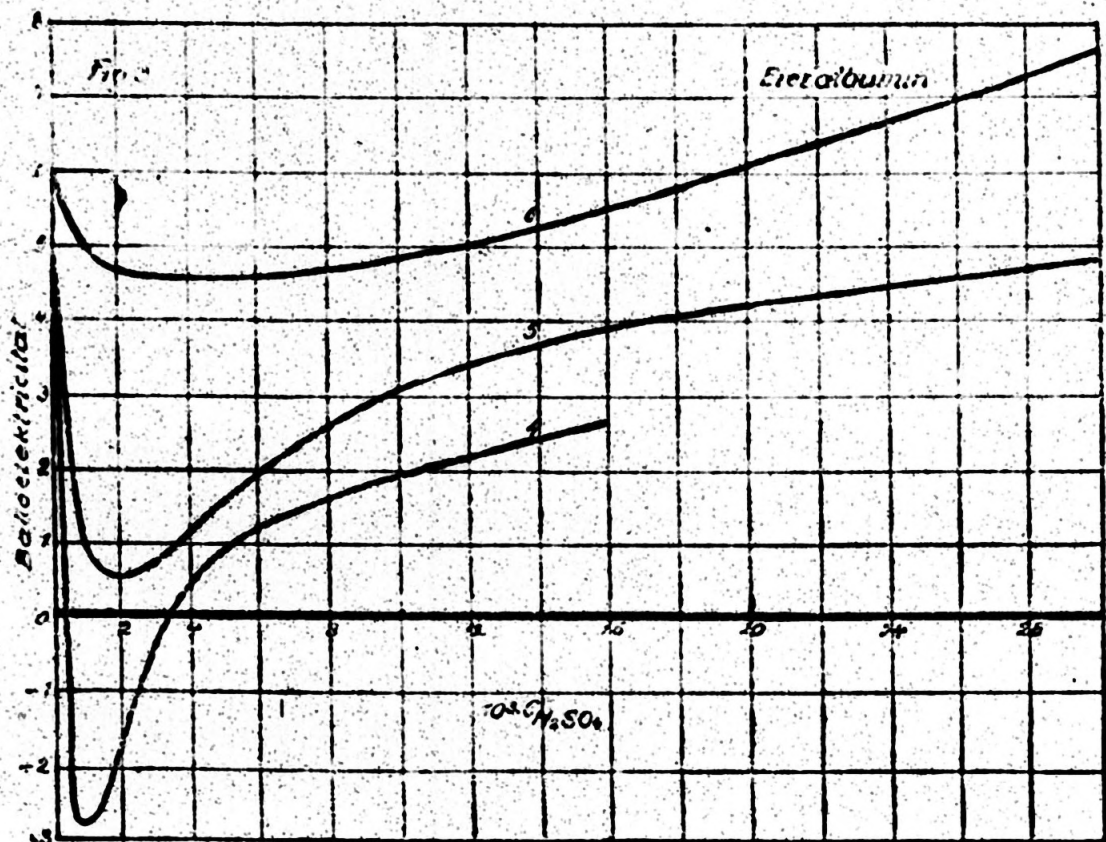
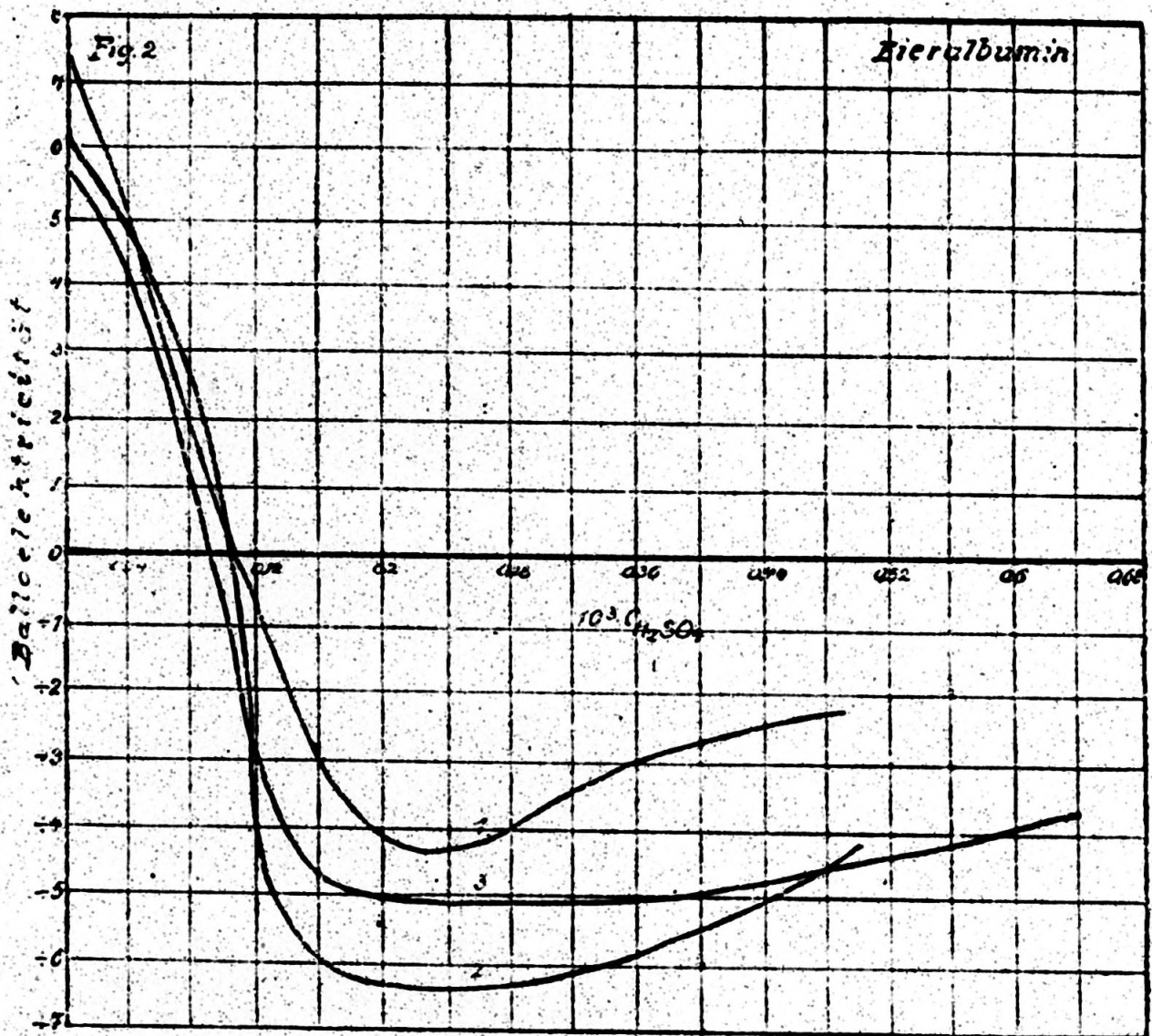
Als Säure wurde Schwefelsäure gewählt, weil diese Säure zu den Wasserstoffionenkonzentrations-Bestimmungen auf dem Carlsberg Laboratorium benutzt worden war.

Die Resultate sind in der Tabelle 2 und auf den Fig. 2—3 aufgezeichnet. Die Ordinate gibt die Balloelektrizität an, die Abscisse die Schwefelsäurekonzentration. Die Einheit der Abscisse ist in Fig. 3 50mal kleiner als in Fig. 2, um die Zeichnung der Kurven 4—6 in voller Ausdehnung zu erlauben.

Die Tabelle 2 und die Figuren 2—3 zeigen, daß alle sechs Kurven ein deutliches Minimum haben, aber dieses Minimum zeigt nur für die vier am wenigsten konzentrierten Lösungen balloelektrisch negative Werte. Die am niedrigsten gelegene Kurve ist Nr. 2 (0,0715% Eiweiß), die Kurven der höheren Eiweißkonzentrationen liegen entsprechend höher, aber auch Kurve Nr. 1, die der niedrigsten Eiweißkonzentration von allen (0,0179%) entspricht, liegt höher als sowohl Kurve Nr. 2 wie 3. Dies Verhalten ist bei balloelektrischen Versuchen nicht selten: Hohe Konzentrationen des betreffenden Stoffes geben flache Kurven, sehr verdünnte auch, indem sie sich dem Verhalten des reinen Wassers nähern; die am meisten charakteristischen Ballogramme geben die dazwischenliegenden Konzentrationen.

Die hier namentlich interessierende Frage war indessen, ob der erste Schnittpunkt mit der Nulllinie, der ja bei den vorläufigen Versuchen mit Serumalbumin als der vermutliche isoelektrische Punkt diskutiert worden ist, bei derselben Säurekonzentration für die verschiedenen Eiweißkonzentrationen lag. Die Kurven 1—3 (Fig. 2) zeigen nun in der Tat diese Eigentümlichkeit. Obgleich die Eiweißkonzentrationen 8fach vari-

ieren (von $0,0179$ bis $0,143$), liegen doch die erwähnten Schnittpunkte sehr nahe beisammen, nämlich bei $10,4 \cdot 10^{-5}$, $10,4 \cdot 10^{-5}$



und $9,2 \cdot 10^{-5} \text{ n H}_2\text{SO}_4$. Was die übrigen drei Kurven (Nr. 4 bis 6) betrifft, so liegt der Schnittpunkt der Kurve 4 zwischen 0 und $25 : 10^{-5}$, kann aber mangels an Bestimmungen

Tabelle II. S. P. L. Sørensens reines Eiweiß: 0,5113 nN = 4,48% Eiweiß (Faktor 6,25).

0,1—25 ccm		0,4—25 ccm		0,8—25 ccm		2—25 ccm		4—25 ccm		10—25 ccm	
0,0179% Eiweiß		0,0715% Eiweiß		0,143% Eiweiß		0,359% Eiweiß		0,718% Eiweiß		1,79% Eiweiß	
$10^3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_4$	Ball. PH	$10^3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_4$	Ball. PH	$10^3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_4$	Ball. PH	$10^3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_4$	Ball. PH	$10^3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_4$	Ball. PH	$10^3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_4$	Ball. PH
0	7,6	0	5,8	0	5,1	0	4,7	0	4,83	0	4,82
0,08	1,8	0,08	0,9	0,08	4,85	0,25	-1,8	0,5	4,55	0,5	4,7
0,16	-4,1	0,16	-4,7	0,16	4,7	0,5	-2,8	2	-	2	4,7
0,24	-4,3	0,24	-5,1	0,32	-	2	-1,4	4	-	4	-
0,32	-3,4	0,32	-4,6	0,48	-	4	0,6	8	-	8	-
0,48	-2,3	0,48	-3,8	0,64	-	16	2,6	16	-	16	-
-	-	-	-3,5	0,8	-	$10^3 \cdot \text{C}_2\text{NH}_2$	-	32	-	32	-
-	-	-	-	-	-	0,5	8,3	$10^3 \cdot \text{C}_2\text{NH}_3$	-	$10^3 \cdot \text{C}_2\text{NH}_3$	-
-	-	-	-	-	-	2	9,6	0,5	7	0,5	6,2
-	-	-	-	-	-	4	9,5	2	9,8	2	7,6
-	-	-	-	-	-	-	-	4	10,1	-	-

nicht näher angegeben werden, und Kurven 5 und 6 schneiden die Abscissenachse überhaupt nicht.

Das zweite charakteristische Kennzeichen des isoelektrischen Punktes besteht darin, daß er für verschiedene Eiweißkonzentrationen bei derselben Wasserstoffionenkonzentration liegt. Wir haben nicht selbst die Untersuchung der Wasserstoffionenkonzentrationen dieser Lösungen vorgenommen, es war aber möglich auf Grund der auf dem Carlsberg Laboratorium ausgeführten Messungen der Wasserstoffionenkonzentrationen entsprechender (aber salzreicherer) Lösungen, dieselbe einiger unserer Lösungen graphisch, wenn nicht genau, so doch ungefähr zu bestimmen. Die in dieser Weise mit Annäherung gefundenen Werte für p_H finden sich in der Tabelle 2.

Es ergibt sich daraus, daß der erste Schnittpunkt der Kurven mit der Abscissenachse für 0,0715 % Eiweiß in der Nähe von $p_H = 4,77$ liegt, für 0,143 % Eiweiß zwischen 4,7 und 4,85 und für 0,359 % Eiweiß zwischen 4,69 und 4,92.

S. P. L. Sørensen¹⁾ hat auf anderem Wege gefunden, daß der isoelektrische Punkt des reinen Eieralbumins bei $p_H = 4,803$ liegt, und auch die zweite Hauptbedingung, die der isoelektrische Punkt erfüllen muß, scheint demnach von dem ersten Schnittpunkt erfüllt zu sein.

Die Möglichkeit, daß der isoelektrische Punkt amphoterer Stoffe unter gewissen Bedingungen (starke Verdünnung und absolute Reinheit der Lösungen) balloelektrisch neutral wäre, — d. h. daß amphotere Stoffe bei der Säurekonzentration ihres isoelektrischen Punktes während des Spritzens ebensoviele positive wie negative Elektrizitätsträger erzeugen —, war, angesichts der noch unbekanntenen Theorie der Balloelektrizität, so interessant, daß wir es für zweckmäßig hielten, auch Aminosäuren nach diesem Gesichtspunkte zu untersuchen. Die Lage des isoelektrischen Punktes ist bei vielen Aminosäuren bekannt und es war daher zu erwarten, daß wir bei gleichzeitigen Wasserstoffionenkonzentrations- und Balloelektrizitäts-Bestimmungen interessante Resultate erlangen könnten.

¹⁾ Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet Bd. 12 (1915—17).

Es zeigte sich indessen, daß große und kaum ganz überwindliche technische Schwierigkeiten mit solchen Untersuchungen verbunden waren, weil Lösungen von Aminosäuren durch winzige Spuren von Unreinheiten balloelektrisch sehr veränderlich waren: Beispielsweise steigt der balloelektrische Ausschlag einer normalen Lösung von Glycin durch einfache Berührung mit reinem Filtrierpapier von 5,5 auf 12,5. Diese Lösungen verhielten sich also ganz wie C. Christiansen¹⁾ es früher beim Wasser — das ja auch als ein amphoterer Stoff aufgefaßt werden muß — nachgewiesen hat: Die Balloelektrizität von Leitfähigkeitswasser änderte sich (unter gleichen Versuchsbedingungen wie oben für Glycin) von 11,5 auf 20. Eine Lösung von $\frac{n}{10}$ NaCl hingegen gab — wie Salzlösungen überhaupt — sowohl vor wie nach Berührung mit Filtrierpapier ganz denselben balloelektrischen Ausschlag.

Weiter mußten wir die folgenden Fehlerquellen in Betracht ziehen: 1. die Kohlensäure der Luft, 2. die Glasalkalien, 3. das für die Darstellung der Lösungen anzuwendende Wasser.

Es spielte nämlich eine sehr große Rolle, ob die Lösungen mit gewöhnlichem destilliertem Wasser, mit kohlensäurefreiem destilliertem Wasser oder mit ganz reinem Leitfähigkeitswasser zubereitet worden waren, und außerdem zeigte es sich, daß sowohl Balloelektrizität wie Wasserstoffionenkonzentration der Lösungen sich beim Stehen in gewöhnlichen Reagensgläsern änderten, während solche von Jenaglas die Lösungen nicht beeinflußten.

Bevor wir über diese Fehlerquellen Klarheit hatten, mußten wir eine große Menge Versuche kassieren, und die hier veröffentlichten sind alle mit den nun zu erwähnenden Vorsichtsmaßregeln ausgeführt worden.

Bei der Lösung der reinen Stoffe wurde nie Filtrierpapier angewandt und das Wasser wurde zweimal destilliert, erstens mit Schwefelsäure und Kaliumpermanganat, danach mit Barytlauge und durch Silberröhre im Kühler. Es wurde dann aufgekocht und in dampfgereinigten Jenakolben mit zugehörigen

¹⁾ C. Christiansen, *Annal. der Physik* [4] Bd. 40, S. 111 (1913).
Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chemie. CVII.

Büretten aus Jenaglas kohlenstofffrei aufbewahrt. Die Leitfähigkeit dieses Wassers war $1 \cdot 10^{-6}$.

Alle Meßkolben, Pipetten usw., die bei der Darstellung und Aufbewahrung der Lösungen zur Verwendung kamen, waren aus Jenaglas.

Für die balloelektrischen Versuche konstruierte C. Christiansen ein besonderes kleines Ballometer, vollständig aus Jenaglas und Platin bestehend und so eingerichtet, daß dieselbe Lösung während der Untersuchung ständig im Apparat zirkulierte und nachher auf Wasserstoffionenkonzentration untersucht werden konnte. Bei den gewöhnlichen Ballometern geht nämlich die Lösung verloren; es war aber angesichts der erwähnten Fehlerquellen von der größten Bedeutung, daß beide Bestimmungen (auf Balloelektrizität und Wasserstoffionenkonzentration) an derselben Lösung ausgeführt werden konnten.

Fig. 4 zeigt den Apparat. Er war folgendermaßen eingerichtet: a ist das Spritzrohr, das in den größeren Behälter B — der die mit dem Quadrantenelektrometer verbundene Platinplatte p enthält — eingeschmolzen ist. S ist der Schornstein, durch den die abgespaltenen Elektrizitätsträger entweichen. Durch das Rohr b wird die zu untersuchende Lösung von dem durch a passierenden Luftstrom aufgesaugt und nach dem Spritzen gegen die Platinplatte tröpft sie wieder durch das Rohr c zurück.

Das Reagensglas R ist aus Jenaglas und enthält 10 ccm der zu untersuchenden Lösung. Kurze Zeit nach der balloelektrischen Untersuchung wurde die kolorimetrische Wasserstoffionenkonzentrations-Bestimmung ad modum S. P. L. Sörensen vorgenommen.

Eine elektrometrische Wasserstoffionenkonzentrations-Bestimmung war wegen der minimalen Leitfähigkeit der Lösungen unmöglich auszuführen, und es war auch nicht ratsam, Puffer oder Salze zuzusetzen, weil diese die Balloelektrizität der Lösungen stark beeinflussen.

Die Lösungen enthielten also — was wichtig zu erinnern ist — nur einen sehr verdünnten Ampholyten und ganz geringe Mengen von Säuren oder Basen. Es ist daher klar, daß

bei der Arbeit die peinlichste Sorgfalt erforderlich war und daß trotzdem Unregelmäßigkeiten in den Versuchsergebnissen kaum zu vermeiden waren.

Glycin wurde zuerst untersucht, wobei unsere Erwartungen insofern getäuscht wurden, als das Ballogramm von ganz anderem Charakter als das der Eiweißstoffe war. Es waren keine plötzlichen Schwingungen von positiver zu negativer Balloelektrizität nachzuweisen und steigender Säurezusatz gab nur eine allmähliche Herabsetzung der ursprünglichen positiven Balloelektrizität des neutralen Glycins, ungefähr wie

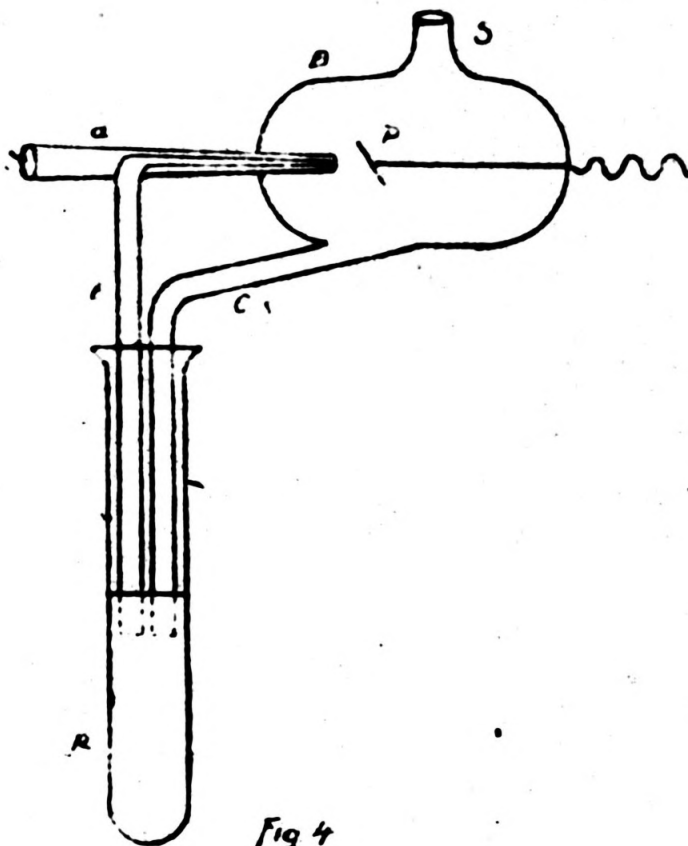


Fig 4

bei Säurezusatz zu Wasser. Die Versuche wurden mit den folgenden Glycinverdünnungen vorgenommen: $\frac{n}{1600}$, $\frac{n}{400}$, $\frac{n}{100}$, $\frac{n}{20}$ und $\frac{n}{2}$ und mit den folgenden Säuren: Salzsäure, Essigsäure, Phosphorsäure, Borsäure, aber es wurden keine Unregelmäßigkeiten wahrgenommen.

Alanin wurde in fünf verschiedenen Konzentrationen und mit vier verschiedenen Säuren untersucht, verhielt sich aber ganz wie Glycin.

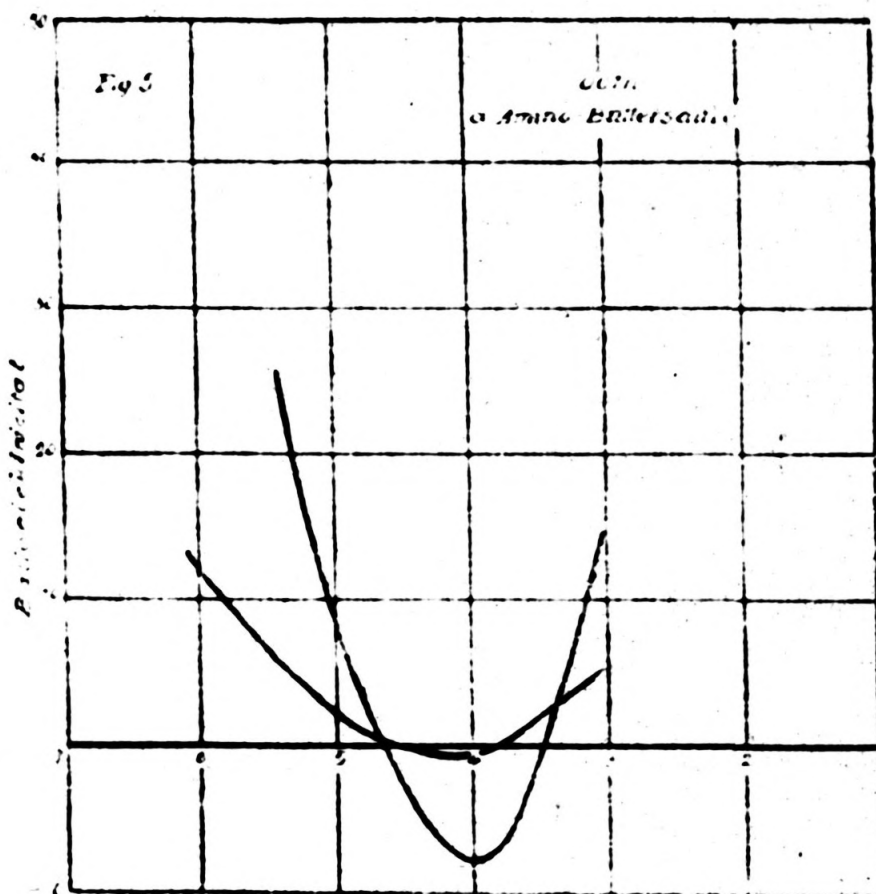
β -Alanin erzeugte allein viel weniger Balloelektrizität als Glycin und Alanin, und nach Zusatz von Säure oder Base wurde die entwickelte positive Balloelektrizitätsmenge noch kleiner.

α -Aminobuttersäure war das nächste Glied in der Reihe der neutralen Aminosäuren, und das Ballogramm dieses Stoffes ist, wie Fig. 5 zeigt, dem der Albuminstoffe sehr ähnlich. Die Figur zeigt zwei Kurven, eine ziemlich ebene, die die balloelektrischen Ausschläge von 0,01 n Aminobuttersäure mit Zusatz von Salzsäure wiedergibt, und eine steilere, die die Ausschläge von Lösungen zeigen, die außerdem 0,2 n Alkohol enthalten. Es wurde Alkohol zugesetzt, weil andere Untersuchungen von C. Christiansen¹⁾ gezeigt haben, daß entgegengesetzt geladene Komplexe (hier positive und negative Aminobuttersäure-Ionen) bei Zusatz von Alkohol eine erhöhte positive bzw. negative Balloelektrizität zeigen. Es wäre also zu erwarten, daß nach Alkoholzusatz erkannt werden konnte, ob die Lösung bei dem balloelektrischen Neutralpunkt zwei ähnliche, aber verschieden geladene Komplexe — was für den isoelektrischen Punkt charakteristisch ist — enthielt, oder ob die Neutralität durch zufällige Umstände bedingt wäre. Im ersten Falle lag die Vermutung nahe, daß die Wirkung des Alkohols auf die zwei Komplexe gleich groß und entgegengesetzt wäre, so daß die Alkoholkurve einen Neutralpunkt an derselben Stelle wie die alkoholfreie Kurve zeigte; im zweiten Falle müßte der Alkoholzusatz eine deutliche positive oder negative Wirkung auch im Neutralpunkte der alkoholfreien Lösungen hervorbringen. Beispiele zum letzten Fall: 1. Eine Lösung von $\frac{n}{32}$ NaCl in Wasser ist balloelektrisch neutral; Zusatz von Alkohol bewirkt einen großen positiven Ausschlag. 2. Das Ballogramm von 0,002 n Leucin mit Salzsäure (siehe Fig. 6) schneidet die Nulllinie zum zweiten Male bei $p_H = 3,3$. Zusatz von Alkohol zu dieser Lösung gibt einen großen negativen Ausschlag.

Wenden wir wieder unsere Aufmerksamkeit der α -Aminobuttersäure zu, dann sehen wir aus der Fig. 5, daß sowohl die alkoholfreie wie die alkoholhaltige Kurve von 0,01 n Aminobuttersäure die Nulllinie bei $p_H = 4,6$ schneiden. Die Tabelle 3 zeigt auch die Resultate für drei andere Konzen-

¹⁾ C. Christiansen, Annalen der Physik [4] Bd. 51, S. 530 (1916).

trationen. Für 0,015 n Aminobuttersäure schneidet die alkoholfreie Kurve die Nulllinie bei $p_H = 5$, die entsprechende alkoholhaltige Kurve bei $p_H = 4,9$. Für 0,005 n Aminobuttersäure schneidet die alkoholfreie Kurve die Nulllinie bei $p_H = 4,3$, die alkoholhaltige bei $p_H = 4,15$. Die 0,002 n Aminobuttersäure ist schon so stark verdünnt, daß sie sich sowohl mit wie ohne Alkohol ungefähr wie Wasser verhält, d. h. die Balloelektrizität sinkt langsam unter Zusatz von Säure und nähert sich erst bei hoher Acidität der Nulllinie.



Es ist interessant, diese 0,002 n Aminobuttersäure mit dem später erwähnten 0,002 n Leucin zu vergleichen. Leucin gibt auch in dieser großen Verdünnung ein schönes charakteristisches Ballogramm (Fig. 6) mit zwei Schnittpunkten der Kurve mit der Abscissenachse, während das Ballogramm der Aminobuttersäure bei derselben Verdünnung wie eben erwähnt demselben des reinen Wassers ganz ähnlich ist. Dieses verschiedene Verhalten deutet an, daß die Balloelektrizität jedes einzelnen Molekülkomplexes für Leucin viel größer als für Aminobuttersäure sein muß; bei der letzteren ist die Balloelektrizität so gering, daß die positive Balloelektrizität des reinen Wassers eine störende Rolle spielen kann und wahrscheinlich die Ursache dazu ist, daß der erste Schnittpunkt

der Kurven mit der Nulllinie für die verschiedenen Konzentrationen bei etwas verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen liegen ($p_H = 4,2$ bis $5,0$). Daß es sich trotzdem um den isoelektrischen Punkt handelt, ist aus dem Grunde wahrscheinlich, weil die Schnittpunkte der alkoholfreien und alkoholhaltigen Ballogramme mit der Nulllinie ganz oder nahezu zusammenfallen.

Auch Amino-iso-Buttersäure wurde (in den Konzentrationen $0,015$ und $0,01$ n) mit Salzsäurezusatz und mit und ohne Alkohol untersucht. Die Kurven waren denen der α -Aminobuttersäure sehr ähnlich. Die Schnittpunkte mit der Nulllinie lagen für $0,015$ n Amino-iso-Buttersäure bei $p_H = 4,8$ sowohl mit wie ohne Alkoholzusatz und für $0,01$ n bei $p_H = 5$ ohne, bei $p_H = 4,7$ mit Alkoholzusatz.

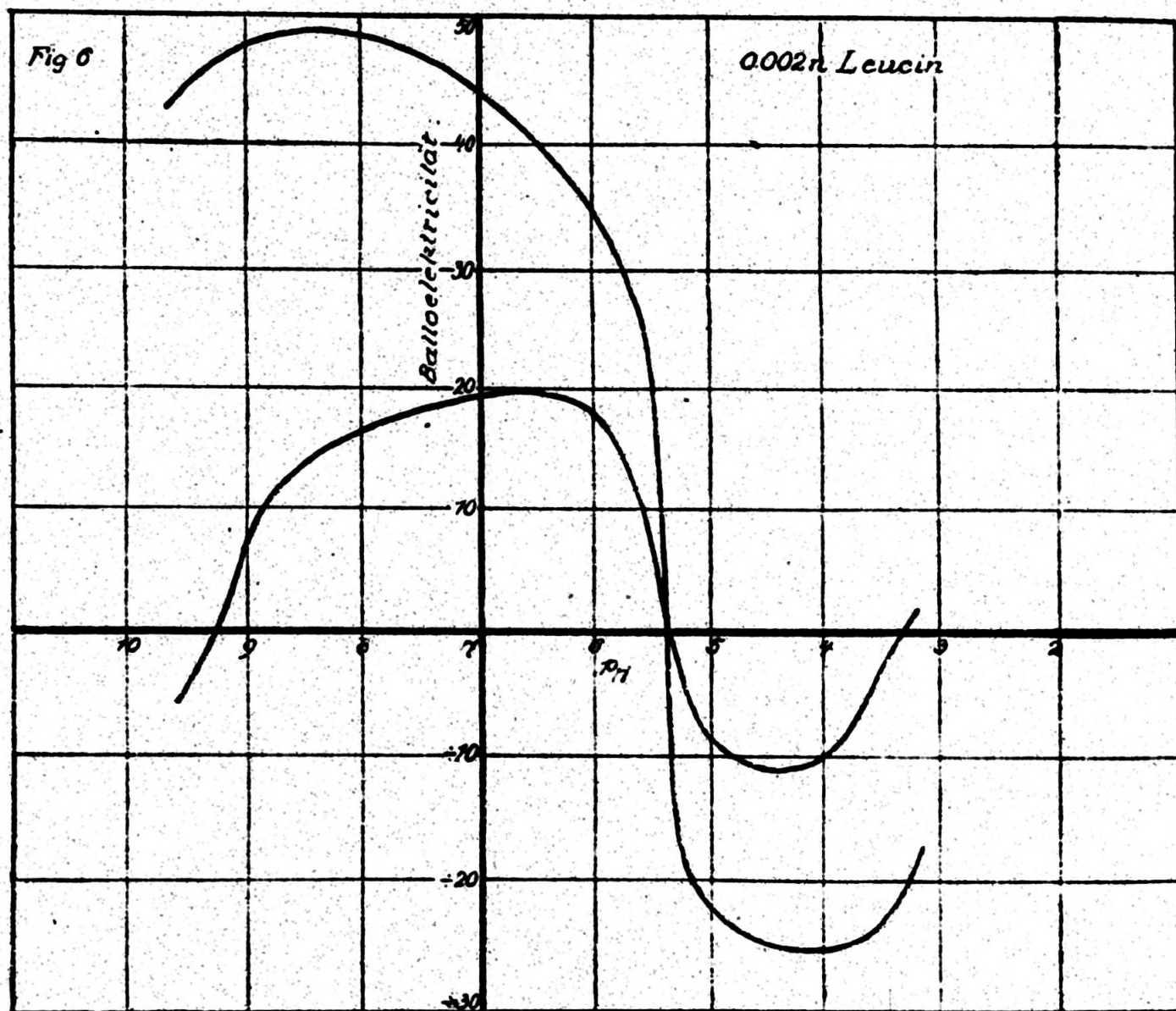
Die Aminosäure mit 5 Kohlenstoffatomen, die Amino-valeriansäure hatten wir in der normalen α -Form nicht zur Verfügung. Dagegen haben wir mit α -Amino-iso-Valeriansäure und mit δ -Aminovaleriansäure einige Versuche ausgeführt. Die erste von diesen Aminosäuren zeigte Ballogramme, die denen der Aminobuttersäuren sehr ähnlich waren (Schnittpunkt bei $p_H = 4,2$ für $0,01$ n und bei $p_H = 4,4$ für $0,015$ n). Die Versuche mit δ -Aminovaleriansäure gaben das überraschende Resultat, daß die Kurve ganz umgekehrt war: Die reine Ampholytlösung war negativ statt positiv, und bei Säurezusatz wurde sie balloelektrisch positiv statt negativ. Der Schnittpunkt lag bei $p_H = 6,5$ sowohl mit wie ohne Alkohol für die Konzentration $0,01$ n.

Von den Aminosäuren mit 6 Kohlenstoffatomen hatten wir sowohl n-Leucin wie auch das gewöhnliche Leucin zur Verfügung. Sie gaben ganz ähnliche Kurven, und wir haben daher, weil wir nur über eine sehr geringe Menge von n-Leucin disponierten, für die folgenden Versuche das gewöhnliche Leucin benutzt, wovon uns so viel zur Verfügung stand, daß wir es durch wiederholte Umkristallisationen reinigen konnten. Die Reinheit wurde mittels Schmelzpunktbestimmungen kontrolliert.

Fig. 6 (mit der Tabelle 4) zeigt die Ballogramme für

0,002 n Leucin mit Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge. Bei der steil verlaufenden Kurve war außerdem 0,2 n Alkohol in der Lösung vorhanden.

Man sieht aus der Figur, daß beide Kurven die Nulllinie in demselben Punkte schneiden, nämlich bei $p_H = 5,3$. Bei einer anderen Versuchsreihe mit 0,02 n Leucin lag der Schnittpunkt bei $p_H = 5,1$. Versuche mit 5 anderen Leucinkonzentrationen gaben die folgenden Resultate betreffs der Lage



des Schnittpunktes: 0,04 n Leucin, $p_H = 5,05$; 0,02 n Leucin, $p_H = 5,05$; 0,015 n Leucin, $p_H = 5,15$; 0,01 n Leucin zeigte in einer Versuchsreihe $p_H = 5$, in einer anderen $p_H = 5,1$. In einer Versuchsreihe, wo statt Salzsäure Phosphorsäure benutzt wurde, lag für 0,01 n Leucin der Neutralpunkt bei $p_H = 5,13$.

Wenn Leucin mit Säure oder Base genau gesättigt ist, zeigen die Lösungen gleich große, aber entgegengesetzte Balloelektrizität. $\frac{n}{100}$ -Leucin mit $\frac{n}{100}$ -HCl gab z. B. den Ausschlag +13,4, und $\frac{n}{100}$ -Leucin mit $\frac{n}{100}$ -NaOH -13,4. Bei

Tabelle 4. 0,002 n Leucin.

$10^4 \cdot C_{HCl}$	ohne Alkohol		mit 0,2n Alkohol		$10^4 \cdot C_{NaOH}$	ohne Alkohol		mit 0,2n Alkohol	
	Ball.	pH	Ball.	pH		Ball.	pH	Ball.	pH
0	19,4	6,2	41,5	6,2	0,5	17	7,45	43	7,45
0,2	7,5	5,5	23	5,5	1	16,6	7,9	47,5	7,9
0,3	0,4	5,4	7,8	5,5	2	14,4	8,4	48	8,4
0,4	-1,6	5,2	-22	5,2	3	12,8	8,75	49	8,55
0,6	-7,5	5,15	-19	5,2	4	10	8,85	48	8,8
0,8	-9,7	4,5	-23,4	4,55	10	2,2	9,16	47	9,16
1	-10,3	4,45	-22,8	4,45	20	-4,7	9,63	43	9,6
1,5	-10,3	4	-28,5	4	50	-7,8	>10	33,5	>10
6	-2,5	3,53	-24	3,53	100	-5		27	
8	-0,3	3,37	-21	3,37	500	-1,5		31,2	
10	1,6	3,22	-17	3,22					

Alkoholzusatz (0,5 n Alkohol) wurden beide Salze stark positiv balloelektrisch.

Vier Versuchsreihen mit 0,002 n Leucin und steigenden Salzsäurekonzentrationen wurden unter Zusatz von verschiedenen — für jede Versuchsreihe konstanten — Natriumchloridmengen ausgeführt. Je mehr Salz, je niedriger verlief die Kurve, aber der Neutralpunkt blieb unverändert. Für einen Zusatz von 0,001 n NaCl war der höchste Punkt der Kurve 7 (ohne Salzzusatz: 19,4) und p_H bei dem Schnittpunkte: 5,1. Für den Zusatz 0,002 n NaCl war der höchste Punkt der Kurve 3,6, der Schnittpunkt bei $p_H = 5,1$. Für den Zusatz 0,004 n NaCl war der höchste Punkt 2,6, der Schnittpunkt $p_H = 5,15$. Für den Zusatz 0,01 n NaCl war der höchste Punkt des Ballogramms 0,9, der Schnittpunkt lag bei $p_H = 5,2$.

Der isoelektrische Punkt des Leucins liegt bei $p_H = 6,06^1)$, während der hier erwähnte Punkt bei $p_H = c. 5,2$ gelegen ist. Nichtsdestoweniger handelt es sich hier wahrscheinlich auch um den isoelektrischen Punkt. Dieser Schnittpunkt ist nämlich für Leucin absolut charakteristisch, da er

¹⁾ Zeitschr. f. physikalische Chemie Bd. 54, S. 532 (1906).

für verschiedene Leucinkonzentrationen und verschiedene Säuren und auch bei Zusatz von Alkohol oder Salz dieselbe Lage hat. Weiter haben die Lösungen auf beiden Seiten dieses Punktes entgegengesetzte elektrische Eigenschaften. Der Grund dafür, daß der p_H des Schnittpunktes bei 5,2 statt 6 liegt, könnte vielleicht darin liegen, daß der Zusatz des Indikatortröpfchens eine konstante Änderung in der Wasserstoffionenkonzentration der Lösungen hervorbrachte, weil ja diese stark verdünnt sind und gar keine Puffern enthalten.

Von anders konstituierten Aminosäuren wurden folgende untersucht:

Phenylalanin wurde in der Konzentration 0,01 n mit Salzsäure untersucht. Die Kurve zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die des Leucins. Der „isoelektrische Punkt“ lag bei $p_H = 4,33$ (theoretisch: 4,5)¹⁾.

Kakodylsäure gab in 0,01 n Lösung mit Salzsäure einen „isoelektrischen Punkt“ bei $p_H = 3,85$ (theoretisch $p_H = 3,9$)²⁾. Das Ballogramm zeigte verschiedene Eigentümlichkeiten, die weitere Untersuchung verdienen. Namentlich verdient die Tatsache Aufmerksamkeit, daß Alkoholzusatz sowohl vor wie nach dem „isoelektrischen Punkt“ positiven Ausschlag verursachte. Ein Minimum des Alkohol-Ballogramms lag bei $p_H = 3,85$.

Theobromin wurde in 3 Konzentrationen untersucht, nämlich 0,0017, 0,005 und 0,01 n. Für alle 3 Konzentrationen lag der „isoelektrische Punkt“ bei Salzsäurezusatz bei $p_H = 4,05$, d. h. ziemlich weit von dem theoretischen p_H dieses Punktes (5,2), aber sehr nahe bei dem von L. Michaëlis und H. Davidsohn³⁾ gefundenen Kristallisationsoptimum für Theobromin (bei $p_H = 4$). Alkoholzusatz gab ganz wie bei Kakodylsäure positiven Ausschlag sowohl vor wie nach dem Schnittpunkte der alkoholfreien Kurve. Für alle 3 Theobrominkonzentrationen zeigten die Alkohol-Ballogramme ein Minimum bei $p_H = 4$.

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 47, S. 250 (1912).

²⁾ Zeitschr. f. physikalische Chemie Bd. 54, S. 532 (1906).

³⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 143 (1910).

Theophyllin wurde in den Konzentrationen 0,01 und 0,005 n untersucht und zeigte ganz wie Theobromin einen „isoelektrischen Punkt“ der alkoholfreien Kurven bei $p_H = 4$ und ein positiv gelegenes Minimum der Alkohol-Ballogramme auch bei $p_H = 4$.

0,01 n Asparaginsäure, 0,01 n Glutaminsäure, 0,025 n α -Amino-Adiphinsäure und 0,025 n Lysin-chlorid wurden untersucht, gaben aber gar keinen balloelektrischen Ausschlag.

0,01 n Asparagin, 0,01 n Serin und 0,01 n α -Amino- δ -oxy-Valeriansäure gaben Ballogramme, die denen von Glycin oder Alanin sehr ähnlich waren.

Acetoxim endlich zeigte sehr eigentümliche balloelektrische Verhältnisse, die mit den Ballogrammen der übrigen hier erwähnten Stoffe nichts gemeinsam hatten.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

Das wichtigste Resultat dieser Untersuchungen ist, daß der isoelektrische Punkt einiger Ampholyten (z. B. Albumin, Leucin etc.) auch iso-balloelektrisch ist, d. h. daß die betreffende Lösung bei der Wasserstoffionenkonzentration des isoelektrischen Punktes gleich viele positive und negative Elektrizitätsträger beim Spritzen an die Luft abgeben.

Andere Ampholyte dagegen (z. B. Glycin, Alanin) zeigen keinen iso-balloelektrischen Punkt.

Man muß daher annehmen, daß einige Ampholytionen balloelektrisch wirksam sind, andere dagegen nicht, und es ist wahrscheinlich, daß dieser Unterschied mit der Hydratisierung der Ionen Zusammenhang hat: Erstens geht es nämlich aus früheren Untersuchungen hervor¹⁾, daß die Hydratisierung von Alkoholen und Fettsäuren eigentümliche balloelektrische Kurven bedingen, und zweitens hat man aus den bekannten Untersuchungen W. Paulis erfahren, daß Eiweiß — für welches ja ein schönes Zusammenfallen des isoelektrischen mit dem iso-balloelektrischen Punkten nachgewiesen wurde — sehr stark hydratisierte Ionen hat.

¹⁾ Zeitschr. f. physikalische Chemie Bd. 92, S. 257 (1917).

Wenn man annehmen darf, daß diese Hydratisierung innerhalb derselben homologen Reihe mit dem Molekulgewicht zunimmt — analog der Hydratbildung der Alkohole und Fettsäuren —, wird es verständlich, daß Glycin- und Alanin-Ionen balloelektrisch unwirksam sind, während Aminobuttersäure, Aminovaleriansäure und Leucin iso-balloelektrische Punkte zeigen ¹⁾).

Nachschrift von Johanne Christiansen.

Die Versuche dieser Abhandlung wurden schon 1914 von meinem Vater und mir gemeinsam ausgeführt. Die Arbeit wurde damals vorläufig beiseite gelegt, weil andere Aufgaben sich aufdrängten, durch welche wir hofften, auch über diese Versuche größere Klarheit zu gewinnen. Weiter hoffte mein Vater an Hand des von ihm 1916—17 konstruierten Kondensator-Ballogometers die Versuche mit den Ampholyten auf breiterer Basis später wieder aufnehmen zu können. Durch den Tod meines Vaters 1917 wurde die Ausführung dieser Pläne gehindert, und ich habe es daher als richtig angesehen, die Versuchsergebnisse von damals zusammenzustellen und mit kurzen Erläuterungen zu versehen.

Obwohl unvollkommen und schwer zu erklären, sind sie doch hoffentlich genügend interessant, um andere Forscher zu weiteren balloelektrischen Untersuchungen dieser Stoffe anregen zu können.

Die Versuche sind im Institute für allgemeine Pathologie ausgeführt worden. Wir sind dem Leiter dieses Institutes, Professor C. J. Salomonsen, wie auch dem Leiter des Carlsberg Laboratoriums, Professor S. P. L. Sörensen, und Assistent S. Palitzsch zu großem Dank verpflichtet.

¹⁾ Für diese Diskussion bin natürlich ich allein verantwortlich. Mein Vater war mit mir in der Auffassung des iso-balloelektrischen Punktes als der isoelektrische Punkt, wie auch in der Hydratbildung der Alkohole und Fettsäuren ganz einig. Inwieweit er auch die Hydratisierung der Aminosäure-Ionen als Erklärung der Ballogramme annehmen wollte, weiß ich dagegen nicht.

Johanne Christiansen.