

82. Elektrochemisch-konstitutive Beziehungen beim Haemoglobin

von Wolfgang Pauli und Walther Schwarzacher.

(10. IV. 45.)

Die folgenden Versuche am hochgereinigten Haemoglobin (Hb) wurden seinerzeit¹⁾ im Zusammenhange mit einer Folge systematischer Untersuchungen an anderen wasserlöslichen Proteinen²⁾ ausgeführt. Da jedoch auch seither keine den gleichen Zielen ganz entsprechenden Beobachtungen von anderen Autoren vorliegen und die Beziehungen zu den Erfahrungen mit anderen Eiweisskörpern einer weiteren Ausgestaltung günstige Aussichten bieten, erschien die Bearbeitung derselben angezeigt. Auch hier stand nach der Herstellung eines weitgehend elektrolytfreien, in keiner Weise denaturierten Ausgangsmaterials dessen physikalisch-chemische Charakterisierung sowie dessen genau definierte Proteinsalzbildung – unter Vermeidung jeder elektrochemischen Verzerrung oder Komplikation durch Verwendung von Puffern – im Vordergrund. Dabei hat es sich erwiesen, dass hierin dem Hb unter den Proteinen eine gewisse Schlüsselstellung zukommt. Die Reinigung desselben lässt sich nämlich – nach der Krystallisation – mittels Elektrodialyse (ED) und Elektroddekantation (EDek) bei voller Schonung des Oxyhaemoglobins leicht bis zur elektrischen Leitfähigkeit eines reinen destillierten Wassers durchführen, und diese Hb-Lösung besitzt eine Eigenreaktion, die praktisch mit der H⁺-Aktivität des reinen Wassers von 20° C zusammenfällt. In diesem Bereich liegt auch ($p_H = 6,85-6,95$, G. S. Adair³⁾) der isoelektrische Punkt des Hb. Das ergibt wiederum eine bisher von keinem anderen Protein bekannte strenge Symmetrie der Salzbildung bei nicht zu hohem Zusatz von starken Säuren oder Basen, welche dem in dieser Arbeit angestrebten Vergleich von positiven und negativen Eiweissionen gleicher Grösse und Ladung in elektrochemischer wie in konstitutiver Hinsicht überaus zustatten kommt.

Reinigung des Haemoglobins. 3 l frisches Aderlassblut des Pferdes werden mit *Ringer*-Citratlösung über Nacht klar absedimentiert, mit 0,75-proz. Kochsalzlösung zu gleichen Teilen versetzt in

¹⁾ In den Jahren 1922/23. Ausser gelegentlichen kurzen Hinweisen bisher unveröffentlicht.

²⁾ Pauli und Mitarbeiter, Literatur in Pauli-Valko, „Kolloidchemie der Eiweisskörper“, Dresden-Leipzig 1933.

³⁾ G. S. Adair, Proc. Roy. Soc. London [A], **120**, 573 (1928); vgl. auch R. M. Ferry, J. Biol. Chem. **57**, 819 (1923).

der Kälte absitzen gelassen und der klar abgetrennte Blutkörperchenbrei, mit wenig Wasser gemischt, unter Erwärmen auf 30° C mittels weniger Tropfen Äther hämolysiert. In der trübungsfreien, rubinroten, in eine Kältemischung gestellten Lösung ist die Krystallisation (lange rhombische Nadeln) nach 12 Std. vollendet. Die Krystalle werden mit eisgekühltem Wasser wiederholt abgenutscht und nochmals umkrystallisiert. Die damit bereitete dunkelrote Lösung zeigt verdünnt das typische Oxy-Hb-spektrum. Bei Verwendung frischen defibrinierten Blutes an Stelle des Citrat-versetzten und folgender Entfernung des Serums durch Waschen mit 0,75-proz. Kochsalzlösung in der Zentrifuge war das Ergebnis der Krystallisation völlig gleich. Der gelöste Blutfarbstoff wurde darauf im Faltendialysator¹⁾ in 55 Std. bis zur Leitfähigkeit $\kappa \approx 1 \times 10^{-4}$ r. O. gebracht und darauf im mittleren *Pauli*-ED-Apparat allmählich auf 220 V Elektroden-spannung ansteigend, am Schluss noch bei 440 V der ED unterworfen. Im Anfange kommt es zur Schichtung (EDek), worauf die klare Oberschicht durch reines Wasser unter Mischung ersetzt wird. Nach 60 Std. ED resultierte eine klare Lösung, deren κ zwischen $2,3-5 \times 10^{-6}$ r. O. lag. Beim ruhigen Stehen an der Luft unter Toluol erfolgt ein Leitfähigkeitsanstieg um eine Größenordnung auf 10^{-5} r. O. Dieser bei allen hochgereinigten Eiweisslösungen von *Pauli* und Mitarbeitern beobachtete zeitliche Anstieg geht auf die Reaktion mit dem Luftkohlendioxyd zurück und ist mittels ED völlig reversibel. Eine hochgereinigte Hb-Lösung zeigt keine Elektroschichtung. Diese tritt nur bei der minimalen anfänglichen Säuerung infolge der geringeren Durchlässigkeit der negativen Membranen für Anionen auf. Der Gehalt an Hb betrug 4–5%. Die H⁺-Aktivität reiner Proben bewegte sich zwischen $p_H = 7,048$ bis 6,9, also bei 1×10^{-7} -n., während sie beispielsweise für das noch am nächsten stehende Pseudoglobulin²⁾ im Bereich 0,95% bis 5,49% von $a_H = 7,3 \times 10^{-7}$ bis $1,31 \times 10^{-6}$ -n. ($p_H = 6,136$ bis 5,88) anwächst.

Sämtliche potentiometrischen H⁺-Bestimmungen wurden mit der rotierenden H₂-Elektrode³⁾ ausgeführt, die den Vorzug besitzt, auf der alkalischen Seite eine Störung durch Carbonatbildung weitgehend auszuschalten. Die Werte sind auf 20° C bezogen. Die Cl-Aktivitäten wurden in Serien von 3–5 Calomelektroden vorgenommen und nach Bedarf wiederholt. Alle Leitfähigkeitsmessungen bei $25^{\circ} \pm 0,01^{\circ}$ C. Für die Berechnung des frei gebliebenen Säure- oder Laugenanteils dienen die gut reproduzierbaren⁴⁾ Bestimmungen der Aktivitätskoeffizienten von *G. Scatchard*⁵⁾. Bezüglich der Berechnung der vom Hb aufgenommenen oder abgegebenen Protonen (Säure- oder Laugenbindung) und der Grenzen ihrer Zuverlässigkeit vgl. die Darstellung bei *Pauli-Valko* l. c. Die Ausschaltung des Diffusionspotentials mittels ganz gesättigter KCl-Lösung wird hier nicht

¹⁾ *A. Erlach* und *Pauli*, Koll. Z. **34**, 213 (1924).

²⁾ *v. Klobusitzky* und *Pauli*, Bioch. Z. **260**, 201 (1933).

³⁾ *Pauli* und *J. Matula*, Koll. Z. **21**, 49 (1917).

⁴⁾ *Pauli* und *H. Wit*, Bioch. Z. **174**, 308 (1926); *Pauli* mit *J. Frisch*, Bioch. Z. **202**, 337 (1928).

⁵⁾ *G. Scatchard*, Am. Soc. **47**, 696 (1925).

nur durch die niedrigen $H^+(OH^-)$ -Aktivitäten, sondern auch durch den stark herabsetzend wirkenden gegenläufigen Beweglichkeitsunterschied von Proteinion und Gegenion besonders begünstigt. Viskosimetrische Messungen wurden mit passenden *Wi. Ostwald'schen* Kapillarviskosimetern bei 25° C vorgenommen.

1. Zunächst wurde mittels abgestufter Zugabe starker Säure die Höchstzahl der verfügbaren Proton aufnehmenden, also positiven, sowie durch Laugenzusatz die der Proton abgebenden, negativen Gruppen in der wiederholt beschriebenen Weise potentiometrisch ermittelt.

Diese entstammen im wesentlichen seitenständigen Amino- bzw. Carboxyl-Gruppen in die Peptidketten eingebauter Diamino- bzw. Dicarbonsäuren, wobei die letzten und schwächsten erst in erheblichem Säure- oder Laugenüberschuss zur Reaktion gelangen. Während demgemäss bei Beginn des Zusatzes praktisch die ganze Säure oder Lauge zur Bildung des Hb-Salzes verbraucht wird, so dass z. B. die anwesenden Halogenionen der Säure oder die Alkaliionen der Base als Gegenionen fast zur Gänze der einsinnigen Proteinladung zugehören, besteht in höherem Säure- oder Laugengehalt neben dem hochwertigen Kolloidion ein Überschuss an solchen einwertigen Gegenionen, welcher zu deren gesteigerten Inaktivierung und Assoziation führt. Diese Erscheinung beherrscht dann das Bild in den hohen Säure- oder Laugenkonzentrationen, während der geringe weitere Zuwachs an Eiweissladungen daneben zurücktritt.

In der folgenden Tabelle I finden sich bei steigendem HCl-Zusatz n. die Daten der jeweiligen Normalität der Proteinionen n^{III} einer 1,84-proz. Hb (stets Endkonzentrationen nach der Mischung) mit den potentiometrisch ermittelten H^+ -Aktivitäten a_H^{II} und den zum Ableiten der neben dem Proteinsalz vorhandenen freien Säure benützten Aktivitätskoeffizienten f_{a_H} angeführt.

Tabelle I.
1,84% Hb^{III} + HCl (Fig. 1).

n. HCl	$f_{a_H} \times 10^3$	I_H^{II}	a_H^{II}	$r^{III} \times 10^3$
0,001	967	6,644	$2,27 \times 10^{-7}$	1,0
0,0025	948	5,839	$1,45 \times 10^{-6}$	2,5
0,005	932	5,034	$9,24 \times 10^{-6}$	4,99
0,0125	907	3,951	$1,12 \times 10^{-5}$	12,376
0,025	878	2,796	$1,6 \times 10^{-3}$	23,18
0,05	863	1,747	$1,79 \times 10^{-2}$	29,2

In einer anschliessenden Tabelle II sind die gleichen Daten für ein anderes Hb^{IV} angegeben, dessen Gehalt sich indirekt mit genügender Sicherheit zu 1,96% (Endkonz.) bestimmen liess¹⁾.

¹⁾ Ein offenkundiges Versehen in den Versuchsprotokollen konnte nachträglich leicht richtiggestellt werden. Es betraf die Angabe 1,7842 g Hb auf 20 cm³, was in unserer Tabelle II zu einer Endkonzentration 4,45% führen würde. Das ergäbe den unmöglichen Wert 68×10^{-5} n. statt 156×10^{-5} maximal gebundenes H^+ je 1 g Hb, wie er sich aus Tabelle I und II und in Übereinstimmung mit einer nach unseren (unveröffentlichten) Messungen erschienenen Bestimmung von *K. Felix* und *A. Buchner* (siehe unten) ableitet. Ein weiterer Anhalt ergibt sich aus den Reihendaten der Viskosität mit steigendem Säure-

Tabelle II.
1,96% Hb + HCl (Fig. 1).

n. HCl	$f_{a_{\text{H}}} \times 10^3$	p_{H}^{II}	a_{H}^{II}	$n^{\text{III}} \times 10^3$
0,004675	932	5,15	$7,05 \times 10^{-6}$	4,67
0,01	921	4,11	$7,73 \times 10^{-5}$	9,92
0,02	887	3,44	$3,63 \times 10^{-4}$	19,6
0,03	875	2,60	$2,51 \times 10^{-3}$	27,133
0,04	870	2,03	$9,31 \times 10^{-3}$	29,3
0,05	863	1,756	$1,76 \times 10^{-2}$	29,6

Eine anschauliche Darstellung des Ganges der Normalität n^{III} der Hb-ionen abhängig von der zugefügten Salzsäure geben die entsprechenden Kurven I und II in Fig. 1, welche auch zeigen, dass die beiden Kurven sehr nahe beieinander liegen, entsprechend dem geringen Unterschied im Hb-Gehalt.

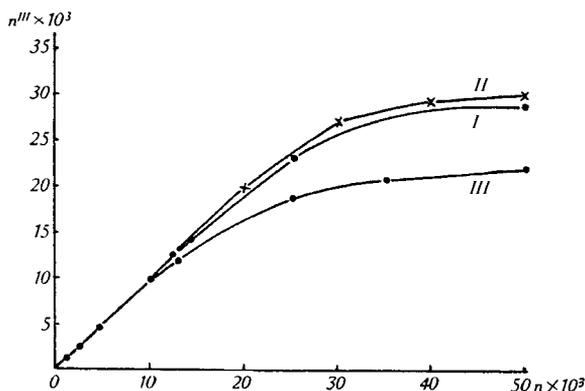


Fig. 1.

n^{III} -Normalität des Hb-Salzes.

I 1,84% Hb + HCl, II 1,96% Hb + HCl, III 1,84% Hb + KOH, LiOH

In der folgenden Tabelle III sind die Normalitäten n^{III} des Hb-Salzes mit steigendem Laugezusatz für KOH und LiOH wiedergegeben. Daneben finden sich die Aktivitätskoeffizienten $f_{a^{\text{OH}}}$, die – z. T. durch graphische Intrapolation abgeleitet – zur Ermittlung der frei gebliebenen Lauge aus der gemessenen a_{H}^{II} (für 20° C aus p_{H} berechnet) dienen. Der Rest $n^{\text{III}} = n - a_{\text{OH}}^{\text{II}}/f_{a^{\text{OH}}}$ stellt die durch Protonabgabe seitens des Hb neutralisierte Lauge dar.

zusatz. Das Viskositätsmaximum lag für 1,84% Hb^{III} bei 0,025-n. HCl, für Hb^{IV} bei 0,03-n. HCl und in späteren Versuchen von Pauli [mit Blank, Bioch. Z. 202, 337 (1928)] für 2,37% Hb bei 0,04-n. HCl. Auch darnach müsste Hb^{IV} nahe 2% liegen. Setzt man oben statt 1,7842 g die Angabe 0,7842 g, dann gibt das in bester Übereinstimmung mit allen Versuchsreihen den Wert 1,96% Hb^{IV} für Tabelle II.

Die Frage der Vernachlässigung eines stärker störenden Einflusses der Gegenionenaktivität des Kolloidions auf die mittlere Aktivität der Gegenionen der Mischung wurde bei früheren Gelegenheiten (*Pauli-Valko* l. c., S. 37) eingehend erörtert. In den niederen Laugenzusätzen zeigen die Ergebnisse für die hier mögliche Breite der f_a -Werte nur geringe Unterschiede. Bei hohem Laugen- (oder Säure-) Überschuss kommt es zu einer teilweisen Anlagerung der Gegenionen des Hb, so dass der freie Rest das mittlere f_a der Gegenionen in der Lösung relativ wenig beeinflusst. Dem Einfluss wird bis zu einem gewissen Grade durch Verwendung des auf die Gesamtkonzentration der Gegenionen bezogenen Aktivitätskoeffizienten Rechnung getragen. Das Verfahren von *K. Felix* (l. c.), bei dem das p_H in freier Lauge oder Säure sowie in Anwesenheit von Hb bestimmt wird und die Differenz der zugefügten Säure oder Lauge für das gleiche p_H als vom Hb neutralisiert gilt, geht, ohne zu grösseren Abweichungen zu führen, in der Vernachlässigung noch weiter, indem die zum Hb gehörigen Gegenionen unberücksichtigt bleiben. Im Grunde ist dieser Weg analog dem von *P. S. Lewis*¹⁾ in Anlehnung an das von *L. Harris* für einfache Aminosäuren angegebene Verfahren beim Hb gewählt. Hier wird jedoch in Anwesenheit von Ammoniumsulfat und wechselndem Zusatz von Schwefelsäure mit und ohne Hb potentiometrisch titriert und die erste Reihe auf die korrespondierenden Punkte der zweiten bezogen.

Tabelle III.
1,84% Hb (Fig. 1).

n. KOH	$f_{a_{OH}} \times 10^3$)	a_{OH}^{II}	$n^{III} \times 10^{-3}$	n. LiOH	a_{OH}^{II}	$n^{III} \times 10^{-3}$	$n^{III} \times 10^{-3}$ **)
0,0025	955	$2,71 \times 10^{-6}$	2,5	0,0025	$1,42 \times 10^{-6}$	2,5	2,5
0,005	929	$1,37 \times 10^{-5}$	4,985	0,005	$6,79 \times 10^{-5}$	4,93	4,956
0,0125	892	$1,93 \times 10^{-4}$	12,28	0,0125	$7,35 \times 10^{-4}$	11,63	11,95
0,025	856	$4,77 \times 10^{-3}$	19,43	0,025	$5,5 \times 10^{-3}$	18,58	19,00
0,05	812	$2,275 \times 10^{-2}$	21,98	0,05	$2,27 \times 10^{-2}$	22,04	22,01

*) Von einem Unterschiede der f_a für KOH und LiOH konnte in diesen Konzentrationen abgesehen werden.

***) Mittelwerte für beide Lösungen.

Wie Tabelle III zeigt, fallen die abgeleiteten Normalitäten n^{III} des Hb-Salzes für beide Laugen nahe zusammen. In Fig. 1 sind die gefundenen Werte n^{III} eingetragen, die Kurve III stellt dort den Gang für beide Alkalilaugen dar.

Man kann nun aus den n^{III} -Werten für Säure und Lauge und dem Hb-Gehalt die Höchstzahl der so nachweisbaren Proton aufnehmenden bzw. abgebenden Gruppen je 1 g Hb ableiten, wie dies für eine Reihe von Proteinen in früheren Arbeiten²⁾ geschehen ist. So bestimmt sich als oberer Grenzwert der H⁺-Aufnahme $156,5 \times 10^{-5}$ -n. für 1 g Hb im Mittel aus 159×10^{-5} -n. (Hb^{III}) und 154×10^{-5} -n. (Hb^{IV}). *K. Felix* und *A. Buchner*³⁾ fanden am 1-proz. Hb den Wert 156×10^{-5} -n. Für unsere Laugen ermittelte sich das Maximum der Protonabgabe

¹⁾ *P. S. Lewis*, *Biochem. J.* **21**, 46 (1927).

²⁾ Literatur bei *Pauli-Valko*, *Kolloidchemie der Eiweisskörper*, 1933, Dresden-Leipzig.

³⁾ *K. Felix* und *A. Buchner*, *Z. physiol. Ch.* **171**, 276 (1927).

126×10^{-5} -n. je 1 g Hb wieder in vorzüglicher Übereinstimmung mit der Angabe 127×10^{-5} -n. bei *K. Felix*.

Aus den Messungen von *P. S. Lewis* (l. c.) würden sich für die von ihm verwendete Schwefelsäure und Ammoniumsulfat $146,4 \times 10^{-5}$ -n. und für Natronlauge $95,4 \times 10^{-5}$ -n. je 1 g Hb Höchstbindung berechnen. Im ersten Falle könnte das Titrationsergebnis durch den hohen Gehalt an zweiwertigen Gegenionen merklich beeinträchtigt worden sein. Die Titration mit Lauge erfolgte in Anwesenheit von Ammoniumsulfat nach dem Formolverfahren *Sørensen's* und liefert ein völlig abweichendes Resultat. Die bemerkenswerten Untersuchungen von *B. Hastings*, *D. D. van Slyke* und Mitarbeitern¹⁾ betreffen vor allem gewisse Unterschiede von reduziertem Hb und CO-Hb und stehen auch wegen ihres geringeren p_H -Bereiches mit unseren Versuchen nur in entferntem Zusammenhang.

Die n^{III} -Kurven gestatten für jeden Punkt der steigenden Säure- oder Laugenzugabe die zugehörige Normalität des positiven oder negativen Hb-ions abzulesen. Aus dem Gehalt und dem Molekulargewicht M des streng monodispersen Hb (M = 69 000, *G. S. Adair*, *The Svedberg*) kann ferner die Ladungszahl Lz der Teilchen abgeleitet werden, und zwar sowohl das erreichbare Ladungsmaximum wie auch die Ionenwertigkeit zu jedem n^{III} -Wert.

Dem Trockengehalt c (g/L) entspricht eine Molarität $m = c/M$, was eine Hb-Wertigkeit $Lz = n^{III}/m$ ergibt. Da, vom Grenzwert der Teilchenladung abgesehen, für das Protongleichgewicht eine merkliche Verteilung nach beiden Seiten anzunehmen ist, werden im allgemeinen die Lz mittlere Ionenwertigkeiten darstellen. Für unser 1,84-proz. Hb^{III} ermittelt sich $m = 2,667 \times 10^{-4}$. Beistehend folgt eine Tabelle mit den berechneten Werten für die optimal verfügbaren positiven bzw. negativen ionischen Gruppen je 1 g und der zugehörigen maximalen Lz je Teilchen für einige wasserlösliche Proteine²⁾.

Tabelle IV.

Protein	M	max. H·Aufn. je 1 g, n. $\times 10^5$	max. H·Abg. je 1 g, n. $\times 10^5$	$\frac{\text{neg.}}{\text{pos.}}$ Gr.	max. Lz·	max. Lz'
Ovalbumin . . .	44 000	110	134	1,22	48	59
Seralbumin . . .	70 000	148	159	1,08	102	110
Pseudoglobulin .	167 000	148	126	0,86	247	213
Hämoglobin . .	69 000	156	127	0,81	108	87

Darnach zerfallen je nach dem Überwiegen der optimal verfügbaren negativen oder der positiven ionischen Anteile diese Proteine in zwei Gruppen. Das Hb gehört mit dem Pseudoglobulin zu den stärker positivierbaren, die zugleich ohne jeden Zusatz kationisch wandern, während elektrolyt-freies Ovalbumin und Seralbumin anionisch überführt werden. Über die elektrochemisch-konstitutiven

¹⁾ *B. Hastings*, *D. D. van Slyke*, *J. M. Neill*, *M. Heidelberger*, *C. R. Harington*, *J. Biol. Chem.* **60**, 89 (1924); *B. Hastings*, *C. D. Murray*, *M. Heidelberger*, ebenda **61**, 317 (1924).

²⁾ Bezüglich d. Mol.-Gew. vgl. *H. Neurath*, *Colloid Cold Spring Harbor Symp.* **3**, 80 (1940).

Beziehungen bei verschiedenen Proteinen im Vergleich mit Hb können am Schlusse nur einige Andeutungen folgen. Sie werden einer anderweitigen näheren Erörterung vorbehalten.

Die kathodische Wanderung des Hb erfolgt im *Pauli-Landsteiner*-Überföhrungsapparat selbst mit 220 V (Überschichtung mit dest. Wasser oder Zusatz und Überschichtung mit 2×10^{-5} -n. KCl) nur zu einem sehr kleinen Bruchteil, der nach 2 Stunden als zart rosa gefärbter, schmaler Saum an der kathodischen Seite eben erkennbar wird. Ebenso wie für die kathodische Wanderung von Pseudoglobulin genögt zu deren Unterdröckung die geringe Menge CaSO₄, die sich darin lösen lässt¹⁾. Dieses Verhalten könnte auf eine merklich bevorzugte interionische Wechselwirkung (Anlagerung) von SO₄'' gegenüber Ca⁺ mit dem zwitterionischen Hb hinweisen (s. u.). Einer weitergehenden elektrochemischen Vergleichbarkeit von Hb und Pseudoglobulin steht jedoch der Unterschied der Molekulargewichte entgegen, der es bewirkt, dass bei sehr naher oder übereinstimmender Protolyse die Ionenwertigkeit der Pseudoglobulin-Teilchen für das gleiche n^{III} fast 2 1/2 mal so gross ist wie die des Hb. Das macht sich schon bei niedrigerem n^{III} elektrochemisch sehr stark geltend.

2. An einer Reihe wasserlöslicher Eiweisskörper war gezeigt worden²⁾, dass der Gang ihrer Viskosität mit stetig steigendem Säurezusatz einen starken Anstieg erfährt, durch ein Maximum geht und wieder abfällt. Bestimmungen der Aktivität der Gegenionen (Chlorion des Proteinchlorids bei Salzsäurezusatz) lehrten, dass der Gang der Viskosität ein gewisses Abbild der Ionisationsverhältnisse des Proteinsalzes darstellt, wie der parallele Verlauf der Aktivität der zugehörigen Gegenionen, seiner Leitfähigkeit, seines osmotischen Druckes sowie der Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinionen erkennen lassen. Der gleiche Parallelismus lässt sich auch am Hb nachweisen. Darüber belehrt die anschliessende Tabelle V und die zugehörige Figur 2.

In der Tabelle sind für Hb^{IV} (1,96%) neben n, n^{III}, a_H^{II}, auch die Cl'-Aktivitäten a_{Cl}^{II}, das zum Protein gehörende Cl' (a_{Cl}^{III} = a_{Cl}^{II} - a_H^{II}) ferner die nach Abzug der κ^{HCl} von κ^{H} auf das Hb-Chlorid entfallende Leitfähigkeit κ^{III} , sowie die rel. Viskositäten η angegeben. Die Ableitung von κ_{HCl} kann, wie bei früheren Gelegenheiten ausgeführt, einer graphischen Darstellung der gemessenen a_H und κ_{HCl} entnommen oder unter Verwendung der Leitfähigkeitskoeffizienten fl erfolgen.

Tabelle V.
Hb^{IV} 1,96-proz. + HCl.

n. HCl	n ^{III} × 10 ³	a _H ^{II}	$\kappa_{\text{Cl}}^{\text{II}} \times 10^3$	a _{Cl} ^{III} × 10 ³	$\kappa^{\text{II}} \times 10^3$	$\kappa^{\text{III}} \times 10^4$	η
0,004 675	4,67	7,05 × 10 ⁻⁶	4,13	4,13	0,384	3,82	1,10
0,01	9,92	7,73 × 10 ⁻⁵	8,17	8,09	0,775	7,41	1,14
0,02	19,6	3,63 × 10 ⁻⁴	14,5	14,14	1,47	13,06	1,36
0,03	27,133	2,51 × 10 ⁻³	19,9	17,39	2,78	16,3	1,58
0,04	29,3	9,31 × 10 ⁻³	25,0	15,69	5,57	13,54	1,39
0,05	29,6	17,6 × 10 ⁻³	31,4	13,8	8,21	1,77	1,23

¹⁾ *Pauli* und *Th. Stenzinger*, *Bioch. Z.* **205**, 71 (1929).

²⁾ Literatur bei *Pauli-Valko*, l. c., S. 238.

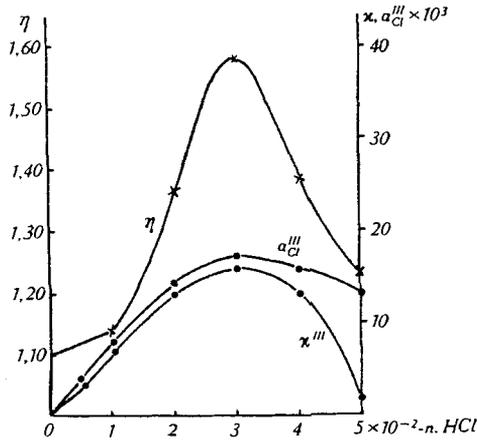


Fig. 2.

1,96% Hb + HCl, η -Viskosität.

a_{Cl}^{III} = Cl'-Aktivität von Hb·Cl. κ^{III} = sp. Leitfähigkeit von Hb·Cl.

Die Übereinstimmung im allgemeinen Verlauf von Viskosität, Gegenionenaktivität a_{Cl}^{III} sowie der Konduktivität κ^{III} des Proteinchlorids und in der Lage der Maxima sind der Tabelle V und Fig. 2 unmittelbar zu entnehmen.

Über die Viskositätsverhältnisse bei Laugenzusatz zu Hb^{III} (1,84 %) orientiert an Messungen mit LiOH die nächste Tabelle VI. In Fig. 3 sind die η und κ^{III} -Werte für das Haemoglobinat eingetragen. Der Gang über ein gleich gelegenes Maximum ist auch hier deutlich erkennbar.

Tabelle VI.

Hb^{III} 1,84% + LiOH, $\eta = 1,058$.

n. LiOH	$n^{III} \times 10^3$	a_{OH}^{II}	$\kappa^{II} \times 10^4$	$\kappa^{III} \times 10^4$	η
0,0025	2,5	$1,42 \times 10^{-6}$	1,40	1,40	1,079
0,005	4,93	$6,79 \times 10^{-5}$	2,94	2,94	1,096
0,0125	11,63	$7,35 \times 10^{-4}$	8,61	7,69	1,134
0,025	18,58	$5,5 \times 10^{-3}$	21,9	10,74	1,285
0,05	22,04	$2,27 \times 10^{-2}$	63,5	4,04	1,273

Die zugehörigen Kurven der Fig. 3 lassen auch für die Bildung der negativen Hb-Ionen am Verlauf von κ^{III} die Beziehung zwischen Viskositätsanstieg und Ionisation anschaulich hervortreten, wie dies vor längerer Zeit analog an der Laugenbindung von Ovalbumin (Pauli und J. Frisch)¹⁾ gezeigt worden war. Die Überschreitung des

¹⁾ Bioch. Z. **202**, 337 (1928).

Maximums erscheint hier an den Überschuss der Gegenionen geknüpft, welcher nahe vor dem Abschluss der Protonabgabe, also der optimalen Feldstärke des Proteinions mit dem weiteren Laugen-zusatz jäh anwächst und zur gesteigerten Inaktivierung und Assoziation der Alkaliionen an das Hb-Ion führt. Es handelt sich zunächst um zwei Hauptphasen des Viskositätsverlaufes, Anstieg und

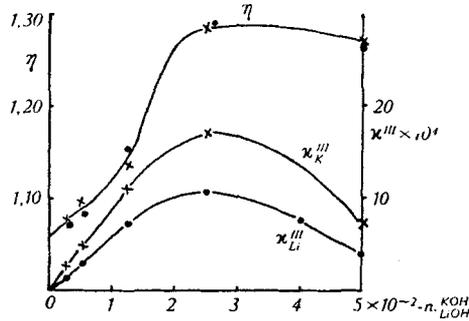


Fig. 3.
 × 1,84% + Hb + KOH, • 1,84% Hb + LiOH.

Abfall, der erstere im Zusammenhang mit dem Gange der wachsenden Aufladung des Proteinions, der letztere mit einer anschließenden, gesteigerten interionischen Wechselwirkung im äusseren Felde desselben.

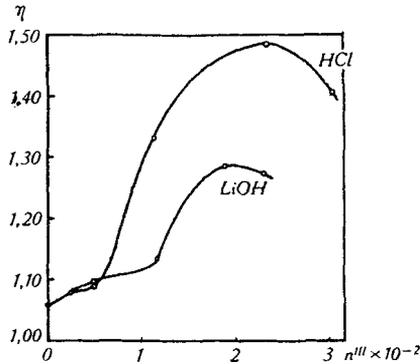


Fig. 4.
 η von 1,84% Hb + HCl und 1,84% Hb + LiOH bezogen auf n''' .

3. Die folgenden Beobachtungen am Hb geben erstmalig direkte Anhaltspunkte für eine Zweiteilung des Mechanismus des Ionisationseffektes auf den Viskositätsanstieg bei einem Protein. In Fig. 4 ist für 1,84-proz. Hb der Gang der Viskosität abhängig von der Normalität (n''') der positiven bzw. negativen Hb-Ionen mit steigendem HCl- bzw. LiOH-Zusatz aufgetragen.

Daran lässt sich feststellen, dass für beide Fälle zunächst ein sanfter Anstieg besteht, der jedoch bei einem bestimmten Punkte fast knickartig in eine steile Erhebung übergeht, wobei der Winkel gegen die Abszisse von etwa 27° auf 70° umschlägt. Dieser Knick liegt für die Säure bei $n^{\text{III}} \approx 0,005$, für die Lauge bei $n^{\text{III}} \approx 0,012$. Bis zu dem ersten Punkte fallen die η -Kurven der positiven und negativen Hb-Ionen praktisch zusammen. Er entspricht etwa 26 positiven Ladungen, der Knick in der Laugenkurve ungefähr 47 negativen Ladungen je Hb-Teilchen. Es gibt somit in unserem Falle einen kritischen Wert der Teilchenladung, bei dessen Überschreiten eine rapide Erhöhung des für η wirksamen Teilchenvolumens einsetzt, das bis dahin nur eine allmähliche Vermehrung erfuhr. Dieser kritische Punkt bedeutet beim positiven Hb-Ion etwa $\frac{1}{6}$, beim negativen etwas über $\frac{1}{2}$ der erreichbaren Höchstladung. Somit besteht zugleich eine stärkere Empfindlichkeit von η oder des dabei wirksamen Ionenvolumens seitens des positiven verglichen mit dem negativen Hb-Ion, ein Hinweis auf eine zu prüfende Verschiedenheit (s. u.) in Bau oder Anordnung der beiden Ionen auch im Falle der Gleichheit der Ladungszahlen (Lz) der Hb-Teilchen. Hier handelt es sich um ein Anfangsgebiet der Säure- oder Laugenwirkung bei einer H⁺- bzw. OH⁻-Aktivität der Grössenordnung 10^{-6} bis 10^{-4} -n., für welches weder ein Teilchenzerfall noch eine Teilchenaggregation (Koagulation) in Frage kommt.

Als Ursache für den beim Übergang in die einsinnig ionische Form eintretenden Viskositätsanstieg wurde von *Pauli* vor längerer Zeit auf die gesteigerte Hydratation und deren topische Anordnung hingewiesen, indem dieselbe zum Unterschiede von der zwitterionischen Form zugleich weiterreichende Solvathüllen schafft. *K. H. Meyer* und *H. Mark*¹⁾ haben dann auf die Bedeutung der begleitenden Gestaltänderung der Proteinteilchen infolge der innermolekularen, ionischen Abstossungskräfte hingewiesen, welche den Übergang aus einer geknäuelten in eine gestreckte Gestalt der Hauptvalenzketten bewirken, eine Annahme, die wohl für zahlreiche Hochpolymere zutreffen dürfte, bei den Eiweissteilchen, die nach allen Erfahrungen komplizierterer Assoziate von Ketten darstellen, einer entsprechenden Abänderung bedarf. *G. Ettisch* und *G. Schulz*²⁾ haben das Prinzip der Gestaltänderung durch die intraionische Abstossung übernommen, indem sie eine bündelweise Anordnung paralleler Hauptvalenzketten zugrundelegen, welche durch die Abstossung ihrer ionischen Gruppen gelockert werden bis zur Abspreizung der Ketten, wobei diese jedoch an einzelnen Stellen verbunden bleiben.

Unser Befund eines kritischen Wertes der elektrischen Aufladung des Hb, dessen Überschreiten nach einem anfänglichen, sanften zu einem steilen Anstieg der Viskosität führt, würde entschieden einer Zweiteilung des zugrundeliegenden Mechanismus entsprechen und zugleich eine Vereinigung der angeführten Gesichtspunkte der verschiedenen Autoren zulassen. Erst sobald die intraionische Abstossung ein gewisses Ausmass erreicht, käme es hier zur Über-

¹⁾ *K. H. Meyer*, *Bioch. Z.* **214**, 253 (1929); *K. H. Meyer* und *H. Mark*, *Der Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe*, Leipzig 1930.

²⁾ *G. Ettisch* und *G. Schulz*, *Bioch. Z.* **239**, 48 (1931).

windung der assoziierenden Kohäsivkräfte im Proteinteilchen, wobei mit Wahrung eines gewissen Zusammenhaltes — unter Eintritt und Blockierung von Wasser — eine beträchtliche Volumvermehrung und damit der jähe Anstieg von η einsetzt. Vor Erreichung dieses Punktes wäre nur die fortschreitende Teilchenhydratation im Sinne der obigen Ausführungen ohne Desassoziaton der Hb-Molekel wirksam. Die Kohäsivkräfte im Hb-Teilchen können mannigfacher Art sein und sich im weiten Feld einerseits von zwitterionischer, elektrostatischer Wechselwirkung zu dipolischer Anziehung bis zur Quadrupolbildung, andererseits von *van der Waals'schen* Kräften bis zu örtlicher, mehr oder minder loser Brückenbindung bewegen. Die ausgeprägte Zweiteilung im Ablauf des intraionisch bedingten Viskositätsanstieges, und zwar sowohl für die negative wie für die positive Aufladung bildet anscheinend eine bemerkenswerte Besonderheit des Hb, doch haben sich anschliessend gewisse Analogien im Verhalten anderer Proteine (s. u.) nachträglich feststellen lassen.

Einen hervorhebenswerten Umstand bedeutet der Unterschied im Viskositätsbild bei positiver Aufladung gegenüber der negativen, bei gleicher Wertigkeit des Hb-Ions (n^{III}). Der jähe Anstieg des η setzt im ersten Falle nicht nur schon bei weniger als der halben Wertigkeit ein wie im zweiten, sondern erreicht auch eine mehr als doppelte Höhe. Man könnte zunächst als Erklärung dafür eine gesteigerte interionische Wechselwirkung des negativen Hb-Ions mit seinen Gegenionen in Betracht ziehen, welche zur stärkeren Abnahme der Aktivitäts- und Leitfähigkeitskoeffizienten und — durch die gesteigerte Inaktivierung und Anlagerung der Gegenionen — auch des innermolekularen Ionisationseffektes im Hb führen würde. Soweit die bisherigen Erfahrungen reichen, lehren sie jedoch, dass im Gegenteil gerade beim negativen Hb-Ion die korrespondierenden Abweichungskoeffizienten der Gegenionen höhere Werte aufweisen als beim positiven Hb-Ion. Auch der dritte Teil der Viskositätskurve, deren Absinken im Überschuss der zugesetzten Säure oder Lauge, verweist im Falle der negativen Hb-Ionen mit seinem sanfteren Abstieg nur auf eine geringere Wechselwirkung mit den Gegenionen. Man wird demnach noch mit anderen Erklärungsmöglichkeiten für den unterschiedlichen Viskositätsverlauf bei positiven und negativen Hb-Ionen zu rechnen haben (s. u.).

4. Unter günstigen Umständen können, wie das folgende Beispiel lehrt, dem Verlauf der Viskosität wertvolle Unterlagen für anderweitige gesetzmässige Beziehungen entnommen werden. Der Gang der n^{III} -Werte mit steigendem Laugenzusatz (Tabelle III, Fig. 1) zu Hb zeigt für KOH und LiOH eine weitgehende Übereinstimmung, zugleich fallen auch die korrespondierenden η -Daten praktisch zusammen (Fig. 2). Da in diesem Bereich die Unterschiede im η der nahe gleichen, freien Laugenanteile völlig vernachlässigbar sind,

darf aus der Übereinstimmung der η -Werte der Schluss auf die gleichen Gestalt- und Hydratationsverhältnisse der gleichwertigen Hb'-Ionen (für dasselbe n^{III}) bei K⁺ oder Li⁺ als Gegenion gezogen werden. Das würde zugleich besagen, dass unter diesen Umständen sowohl die Grenzbeweglichkeit v_{∞} des Hb'-Ions, wie auch dessen interionische Wechselwirkung mit diesen Gegenionen, also die auftretenden Leitfähigkeitskoeffizienten $f\lambda$ gleich sein werden. Da nun in Übereinstimmung mit den Erfahrungen an anderen Proteinen für die Beweglichkeiten auch des höchstwertigen Hb-Ions nur mässige Werte (bis höchstens 30) zu erwarten sind, dagegen deren Unterschied zwischen K ($u_{\infty}^{\text{K}} = 73,52$) und Li ($u_{\infty}^{\text{Li}} = 38,69$) beträchtlich ist, wäre für jede gegebene Normalität (n^{III}) und Leitfähigkeit (κ^{III}) des Hb-Salzes der Wert v_{∞} des zugehörigen Hb'-Ions aus den zwei Gleichungen für K- bzw. Li-Hämoglobinat auf einfache Weise abzuleiten.

Bezeichnen wir die Leitfähigkeit des KHb mit $\kappa_{\text{III}}^1 = \frac{n^{\text{III}}}{1000} \cdot f\mu(v_{\infty}^{\text{Hb}} + u_{\infty}^{\text{K}})$ und die des LiHb mit $\kappa_{\text{III}}^2 = \frac{n^{\text{III}}}{1000} \cdot f\mu(v_{\infty}^{\text{Hb}} + u_{\infty}^{\text{Li}})$, dann ergibt sich für das gleiche n^{III} durch Division der Quotient $q = \frac{\kappa_{\text{III}}^1}{\kappa_{\text{III}}^2} = \frac{v_{\infty}^{\text{Hb}} + u_{\infty}^{\text{K}}}{v_{\infty}^{\text{Hb}} + u_{\infty}^{\text{Li}}}$ und daraus $v_{\infty}^{\text{Hb}} = \frac{q \cdot u_{\infty}^{\text{Li}} - u_{\infty}^{\text{K}}}{1 - q}$.

In der folgenden Tabelle VI finden sich für 1,84-proz. Hb^{III} neben den n -Werten der zugesetzten Lauge, die Mittelwerte der Laugenbindung n^{III} , die Ladungszahlen Lz je Teilchen, ferner die Leitfähigkeiten κ_{III}^1 und κ_{III}^2 in den Mischungen Hb + Lauge, der auf das HbK entfallende Anteil der Leitfähigkeit κ_{III}^1 und der korrespondierende κ_{III}^2 für HbLi und schliesslich die berechneten Grenzbeweglichkeiten v_{∞}^{Hb} der Hb-Ionen.

Tabelle VI.
KOH, LiOH, 1,84% Hb^{III} (Fig. 5).

n. Lauge	$n^{\text{III}} \times 10^3$	Lz	$\kappa_{\text{III}}^1 \times 10^4$	$\kappa_{\text{III}}^2 \times 10^4$	$\kappa_{\text{III}}^1 \times 10^4$	$\kappa_{\text{III}}^2 \times 10^4$	v_{∞}^{Hb}
0,0025	2,5	9,38	2,44	1,40	2,44	1,40	8,267
0,005	4,96	18,69	4,80	2,94	4,80	2,94	16,306
0,0125	11,95	46,05	13,1	8,61	11,98	7,69	22,13
0,025	19,00	68,0	29,7	21,9	16,91	10,74	21,88
0,05	22,01	86,0	—	63,5	7,46*	4,74	22,0

*) Aus κ_{III}^2 berechneter Wert.

Nach diesen Ergebnissen (Fig. 5) wachsen die Grenzbeweglichkeiten v_{∞} des Hb' mit bis $Lz \sim 18$ steigender Wertigkeit nahe linear, allerdings nur um etwa 0,87 für eine Teilchenladung also unvergleichbar mit niedrig molekularen Ionen, welche bei identischer

Atomzahl und Verdoppelung der Wertigkeit eine 1,8-fache Erhöhung¹⁾ von v_{∞} aufweisen. Ab $Lz = 18$ bis $Lz = 46$ wird die Zunahme der Grenzbeweglichkeit stetig geringer, im Mittel um 0,214 je Teilchenladung. Mit Wachsen von Lz über 46 findet keine weitere Zunahme der Grenzbeweglichkeit statt. Mit dieser Ladung erfolgt zugleich das Einsetzen des steilen Viskositätsanstieges. Das würde bedeuten, dass der Effekt der Wertigkeitszunahme durch die mit der Gestaltveränderung des Hb verbundene Erhöhung des Reibungswiderstandes praktisch aufgehoben wird.

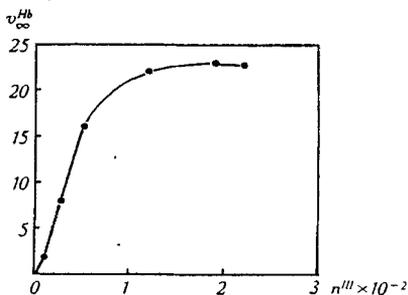


Fig. 5.

v_{∞} von Hb' bezogen auf n^{III} .

Der hier beschrittene Weg zur Ermittlung der Grenzbeweglichkeiten für eine ganze Wertigkeitsreihe von Proteinionen, dessen Resultate durch stärkere Berücksichtigung der CO_2 -Wirkung, wie Arbeiten in N_2 -Atmosphäre u. a., sich noch verschärfen liessen, erscheint für das positive Eiweission kaum gangbar. Hier geben starke einbasische Säuren mit ausreichenden Beweglichkeitsunterschieden der Anionen wie Cl' und CCl_3COO' für das letztere so grosse Unterschiede der Abweichungskoeffizienten²⁾ bis zu beträchtlicher Inaktivierung und Assoziation, dass eine wesentliche Voraussetzung des obigen Verfahrens wegfällt. Diesen Unterschieden der Abweichungskoeffizienten entsprechen die schon vor Jahren von *Pauli* und *H. Handovsky* festgestellten grossen Differenzen der zugehörigen Viskositätskurven. *Pauli* und *J. Matula*³⁾ haben unter entsprechender Ergänzung der ersten Leitfähigkeitsmessungen an Caseinat von *E. Laqueur* und *O. Sackur*⁴⁾ die Äquivalentleitfähigkeiten A_v von zweierlei Caseinatlösungen (0,01-n. NaOH auf je 1 g bzw. 2 g Casein) abhängig von der Verdünnung ermittelt, wobei sie — bei praktisch vernachlässigbarer, hydrolytisch freigesetzter Lauge — bis $6,25 \times 10^{-4}$ -n. gehen konnten. Die Extrapolation auf A_{∞} gab im ersten Fall für das Caseination $v_{\infty} = 32,5$, im zweiten 28. Hier lieferte das für starke niedrigmolekulare Elektrolyte typische Verfahren der Bestimmung von Grenzbeweglichkeiten in Anbetracht der Molekulargrösse plausible Werte für zwei Arten des Caseinations, welche für ein Mol.-Gew. von 100000 die Ladungszahlen 104 bzw. 52 je Teilchen aufweisen würden.

*D. M. Greenberg*⁵⁾ fand mittels der Überführungszahlen unter Extrapolation auf unendliche Verdünnung für das Fibrinon (F) mit Lauge $v_{\infty}^F = 44$, mit Säure $u_{\infty}^F = 78$

¹⁾ *R. Wegscheider*, M **23**, 608 (1902).

²⁾ Vgl. *Pauli* und *J. Safrin*, Bioch. Z. **233**, 86 (1931).

³⁾ Bioch. Z. **99**, 219 (1919); *Pauli*, ebenda **70**, 489 (1915).

⁴⁾ Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **3**, 196 (1903).

⁵⁾ *D. M. Greenberg*, J. Biol. Chem. **78**, 263 (1928).

Werte, deren auffallende Höhe mit dem bei der Herstellung durch Wärme und Alkohol denaturierten Material zusammenhängen dürfte, das jeden Vergleich mit den homodispersen, wasserlöslichen Proteinen ausschliesst.

Vor einiger Zeit¹⁾ wurden mit einem besonderen, für Kolloide ausgearbeiteten Überführungsverfahren²⁾ die Wanderungsgeschwindigkeiten einiger wasserlöslicher reiner Proteine in abgestuften Mischungen mit Säuren und Lauge gemessen, welche physikalisch-chemisch genau definiert waren. Sie liefern Beweglichkeiten der betreffenden Proteinionen für die jeweilige Wertigkeit derselben, welche dem Produkte Grenzbeweglichkeit mit dem zugehörigen Leitfähigkeitskoeffizienten desselben entsprechen. Auf gewisse Zusammenhänge dieser Ergebnisse mit unseren Erfahrungen am Hb soll noch kurz verwiesen werden.

Eine strengere Beziehung unserer unter elektrochemisch definierbaren Bedingungen gewonnenen Beobachtungen zu den Beweglichkeitsbestimmungen in Pufferlösungen, die von *A. Tiselius* technisch sehr vervollkommenet wurden und sich so für verschiedene vergleichende Zwecke überaus wertvoll erwiesen, ist nicht herzustellen, da in Puffergemischen weder eine Bestimmung des Leitfähigkeitsanteils des Kolloidsalzes noch eine zureichende Analyse des Aufbaues der Kolloidionen durchführbar ist.

5. In den Beobachtungen über Bildung und Eigenschaften der Hb-Ionen waren zwei Umstände hervorgetreten: 1. eine deutliche Zweiphasigkeit im Anstieg der Viskosität mit fortschreitender Teilchenladung, wobei auf eine anfängliche Zunahme von η bei Überschreiten eines Schwellenwertes der Aufladung ein jähes Anwachsen der Viskosität folgte, das als einsetzender intraionischer elektrostatischer Desaggregationseffekt im Hb-Ion gedeutet wurde. 2. Eine starke Differenz zwischen positiven und negativen Hb-Ionen zugunsten der ersteren in bezug auf diesen intraionischen Effekt, die sich als bei niedrigerem Schwellenwert der Aufladung einsetzender und steilerer η -Anstieg äusserte. Es lag nun nahe, bei anderen Proteinionen Umschau nach verwandten Erscheinungen zu halten, die der Beachtung bisher entgangen sein konnten. Das gelang zunächst beim Serumalbumin.

Zu einer bisher nur teilweise veröffentlichten Versuchsreihe³⁾ fanden sich die ergänzenden Angaben betreffend den stufenweisen Zusatz niedriger Konzentrationen Säure und Lauge zu 1% hochgereinigtem Serumalbumin. Die folgenden Tabellen VIIa und b sowie Fig. 6 bringen die Werte von η und der spez. Drehung $[\alpha]_D$ in ihrer Abhängigkeit von der Normalität n^{III} des Proteinsalzes.

¹⁾ *P. König* und *Pauli*, *Bioch. Z.* **252**, 325 (1932).

²⁾ *L. Engel* und *Pauli*, *Z. physikal. Ch.* **126**, 247 (1927).

³⁾ *Pauli* und *W. Kölbl*, *Koll. Beih.* **41**, 417 (1935).

Tabelle VIIa.

1% Seralbumin $p_H = 5,27$, $\eta' = 1,054$, $-[\alpha]_D = 54^0$ (Fig. 6).

n. HCl $\times 10^3$	p_H	a_{H}^{II}	$n^{III} \times 10^3$	$-[\alpha]_D$	$(\eta - \eta') \times 10^3$
1,0	4,53	$2,95 \times 10^{-5}$	0,97	56	—
1,75	4,26	$5,50 \times 10^{-5}$	1,693	56	75
3,0	3,95	$1,12 \times 10^{-4}$	2,88	59	112
5,0	3,66	$2,18 \times 10^{-4}$	4,767	66	194
7,5	3,24	$5,75 \times 10^{-4}$	6,88	73	—
10,0	2,99	$1,02 \times 10^{-3}$	8,89	75	354
20,0	2,21	$6,17 \times 10^{-3}$	13,044	83	396

Tabelle VIIb.

(Fig. 6)

n. KOH $\times 10^3$	p_H	a_{OH}^{II}	$n^{III} \times 10^3$	$-[\alpha]_D$	$(\eta - \eta') \times 10^3$
1	6,22	$1,43 \times 10^{-8}$	1,0	54	—
2	7,24	$1,494 \times 10^{-7}$	2,0	54	80
3,5	8,44	$2,38 \times 10^{-6}$	3,5	55	96
5,0	9,96	$7,36 \times 10^{-5}$	4,91	53	115
7,5	10,79	$3,31 \times 10^{-4}$	7,14	55	125
10,0	11,29	$1,68 \times 10^{-3}$	8,14	60	153
20,0	11,86	$6,24 \times 10^{-3}$	12,84	76	272
60,0	—	—	14,7	83	357

Wie neben den Tabellen IIIa und b die Fig. 6 anschaulich darstellt, tritt auch am Seralbumin sowohl bei Säure- als auch bei Laugezusatz ein kritischer Schwellenwert der Ladung des Proteinions mit folgendem steilen Anstieg von η auf, der für Säure schon bei $n^{III} \sim 1,7 \times 10^{-3}$, für Lauge bei etwa $n^{III} \sim 7 \times 10^{-3}$ gelegen ist. Das entspricht einer Ladungszahl 12 für das positive und 49 für das negative Albuminion. Bei der gleichen kritischen Aufladung kommt es auch zu einem Anstieg der optischen Drehung nach einem Vorstadium praktischer Konstanz derselben. Der Zusammenhang von optischer Drehung mit der Ionisation von Proteinsalz war schon vor Jahren¹⁾ erstmalig festgestellt worden. Als weitere Beziehung tritt hier eine gewisse Übereinstimmung bezüglich der Zweiteilung des Effektes und der Lage des kritischen Überganges der zwei Phasen desselben hinzu. Gleiches gilt auch für den beträchtlichen quantitativen Unterschied in Empfindlichkeit und Ausgiebigkeit zugunsten der optischen Drehung der positiven Seralbuminionen. Anderen Beobachtungen²⁾ an negativen Seralbuminionen lässt sich bei näherer Prüfung entnehmen, dass, wie zu erwarten, mit steigender Proteinkonzentration der intraionische Desassoziationseffekt in der η -Kurve viel ausgeprägter wird.

Ein anderes Beispiel bietet das negative Caseination, an dem die Durchsicht früherer Ergebnisse³⁾ zeigt, dass es in 1-proz. Lösung (mit Kalilauge) bei der Proteinsalz-Normalität $n^{III} = 0,01$ einen Schwellenwert für den verstärkten Anstieg von η und in

¹⁾ Pauli, M. Samec, E. Strauss, Bioch. Z. **59**, 470 (1914); spätere Literatur Pauli-Valko l. c.

²⁾ Pauli (mit F. Blank), Bioch. Z. **202**, 373 (1928).

³⁾ Pauli und L. Hofmann, Koll. Beih. **42**, 34 (1935).

dem gleichen Gebiet auch für die optische Drehung aufweist. Auch beim hochgereinigten 1-proz. Pseudoglobulin findet sich, soweit das vorliegende Material¹⁾ reicht, ein Kurvenverlauf von η mit HCl und NaOH, der das Bestehen eines kritischen Übergangs für $n^{\text{III}} \sim 3 \times 10^{-3}$ beim positiven und 7×10^{-3} beim negativen Proteinion anzeigt. Dem würden (für ein Mol.-Gew. 167000) die $Lz \sim 50$ bzw. 117 je Teilchen entsprechen.

Beim kleinvolumigen Ovalbumin mit seinen Höchstladungen $Lz' = 59$ und $Lz' = 48$ ist der Ionisationseffekt auf die Viskosität sehr gering und in 1% Eiweissgehalt ein sicherer Schwellenwert nicht zu erkennen.

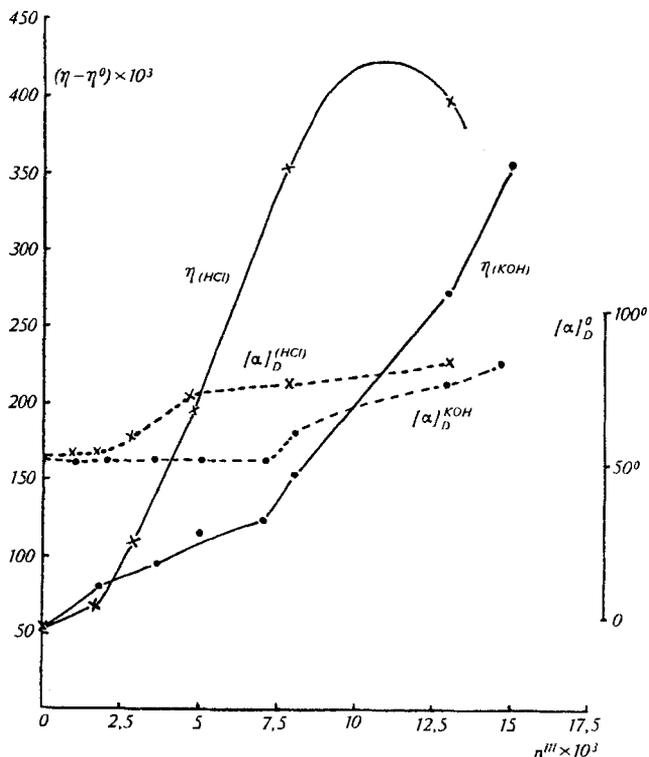


Fig. 6.

1% Seralbumin + HCl
 1% Seralbumin + KOH
 η und $[\alpha]_D^0$ bezogen auf n^{III} .

Auch die, verglichen mit den negativen, stärkere Reaktionsfähigkeit der positiven Hb-Ionen in bezug auf den intraionischen Reibungs- und optischen Drehungseffekt findet ihr Analogon unter anderen Umständen und bei anderen Proteinen wieder. Vor allem wäre hier die bei gleicher Aufladung durchwegs höhere Wanderungsgeschwindigkeit²⁾ der positiven Ionen von Seralbumin, Pseudo-

¹⁾ Pauli (mit F. Blank) Bioch. Z. 202, 373 (1928).

²⁾ P. König und Pauli, Bioch. Z. 252, 325 (1932).

globulin und des unter diesen stärkst sauren Ovalbumin hervorzuheben, die keinesfalls das Ergebnis einer stärkeren Herabsetzung durch gesteigerte interionische Wechselwirkung bei den negativen Proteinionen also den Ausdruck kleinerer Abweichungskoeffizienten darstellt. Hier war schon seinerzeit¹⁾ auf mögliche konstitutive Unterschiede in der topischen Anordnung der positiven und negativen Gruppen hingewiesen worden. Hiefür kommen in Betracht: 1. Die grossen Differenzen in der Länge der die ionischen Endgruppen tragenden Seitenketten, welche bei den gegebenen Abständen sowohl die Feldstärke an der Oberfläche der Kolloidteilchen als auch die interionische Reaktions- und Absättigungsfähigkeit mitbestimmen. 2. Die verschiedene Abschirmbarkeit kurzer und langer ionischer Glieder durch benachbarte nichtionische, anhydrophile Seitenketten. Möglicherweise gehört auch die später von *F. Haurowitz*²⁾ festgestellte Nichtfällbarkeit verschiedener wasserlöslicher Proteine durch Clupein hierher, ein allerdings mehrfacher Deutung fähiges Verhalten, das von diesem Autor auf die verschiedene Zugänglichkeit „exoionischer und endoionischer“ Gruppen bezogen wird.

Von sonstigen Verschiedenheiten der positiven und negativen Proteinionen unter vergleichbaren Verhältnissen dürften sich den angeführten Beispielen zuordnen lassen: Die merklich stärkere Hemmung der Hitzekoagulation reiner Proteine durch Säure gegenüber der Lauge sowie die schon erwähnte Unterdrückung der kationischen Wanderung durch das stärker angelagerte Sulfation des Calciumsulfats bei Hb und Pseudoglobulin.

Die hier im Anschluss an die Erfahrungen am Hb kurz angeführten elektrochemisch-konstitutiven Beziehungen bei den Proteinen sollen bei anderer Gelegenheit eine zusammenfassende Darstellung finden.

Zusammenfassung.

1. Krystallisiertes Oxyhämoglobin wird durch Elektrodialyse ohne jede Denaturierung bis $\alpha = 2,3-5 \times 10^{-6}$ r. O. und zu der Eigenreaktion $p_H = 7,048-6,92$ in 4—5-proz. Lösung gereinigt. Die maximale Protonaufnahme (aus HCl) bzw. Abgabe (an Alkalilauge) wird mit $156,5 \times 10^{-5}$ -n. bzw. 126×10^{-5} -n. je g Hb bestimmt. Das entspricht einer maximalen Ladungszahl (Lz) von 108 positiven bzw. 87 negativen Ladungen je Teilchen. Hb wandert auch in sehr starkem elektrischen Feld nur spurenweise kathodisch.

2. Mit wachsendem Säure- oder Laugenzusatz kommt es zu Anstieg, Maximumbildung und Abfall der Viskosität (η). Die Gegenionenaktivität und Konduktivität des Hb-Salzes zeigen einen damit parallelen Gang, wobei der Anstieg von η der wachsenden Ladung der Hb-Ionen, der Abfall einer zunehmenden Inaktivierung der Gegenionen im Säure- oder Laugenüberschuss entspricht. Die η -Kurven von K- oder Li-Hämoglobinat fallen praktisch zusammen.

¹⁾ *P. König* und *Pauli*, *Bioch. Z.* **252**, 325 (1932).

²⁾ *F. Haurowitz*, *Koll. Z.* **74**, 208 (1936); **77**, 65 (1936).

3. Erstmals konnte eine Zweiteilung des Mechanismus dieses Viskositätsanstieges mit steigender Aufladung des Hb-Ions direkt festgestellt werden, indem erst eine sanfte Erhebung von η bis zu einem kritischen Schwellenwert der Aufladung erfolgt, dem sich ein steiler Anstieg von η anschliesst. Die erste Phase würde einer fortschreitenden Hydratation, die zweite einem intraionischen Desaggregationseffekt der Hb-Ionen entsprechen. Der letztere tritt am positiven Hb-Ion bei niedrigerer Aufladung ein ($Lz' \sim 26$ gegen $Lz' \sim 47$) und ist beträchtlicher als an negativen Hb-Ionen gleicher Wertigkeit.

4. Aus der Gleichheit des Viskositätsbildes von K- und Li-Hb kann für beide auf die gleiche Gestalt und Hydratation der entsprechenden negativen Hb-Ionen und damit auf gleiche Grenzbeweglichkeit v_{∞} derselben geschlossen werden. Der grosse Beweglichkeitsunterschied der Gegenionen K^+ und Li^+ gestattet dann aus den Leitfähigkeiten ihrer Hämoglobinate die Grenzbeweglichkeiten der zugehörigen Hb-Ionen aller Wertigkeitsstufen bis zur maximalen Lz auf einfache Weise abzuleiten.

5. Auch bei anderen Proteinen konnten Analogien bezüglich der Zweiteilung des Ionisationseinflusses auf η und hinsichtlich der quantitativen Unterschiede bei positiven und negativen Eiweissionen im Gange von Viskosität, optischer Drehung u. a. nachträglich festgestellt werden. Die konstitutiven Unterlagen dafür werden kurz erörtert.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

83. *d*-Idose aus *d*-Galaktose (Nachtrag)

von E. Sorkin und T. Reichstein.

(13. IV. 45.)

Kurz nach Erscheinen unserer ersten Mitteilung¹⁾ erreichte uns das Oktober-Heft des Journ. Chem. Soc. London mit einer ausführlichen Arbeit von *Wiggins*²⁾ über denselben Gegenstand. Soweit darin gleiche Reaktionen und Verbindungen beschrieben sind, stimmen die Resultate mit den unseren gut überein. Auf eine Abweichung wird später eingegangen³⁾. Ferner ist uns leider entgangen, dass das 2,3-Ditosylat des 4,6-Benzal- β -methyl-*d*-galaktosids- $\langle 1,5 \rangle$ bereits von *Bacon* und Mitarb.⁴⁾ beschrieben wurde⁵⁾.

Wir haben inzwischen das krystallisierte *d*-Idose-pentacetat (vermutlich die α -Pyranose-Form) mit $Ba(OH)_2$ in Methanol vorsichtig verseift. Die bisher nur als farbloser Syrup erhaltene *d*-Idose zeigte eine spez. Drehung von $[\alpha]_D^{13} = +15,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,274$ in

¹⁾ *E. Sorkin, T. Reichstein, Helv.* **28**, 1 (1945).

²⁾ *L. F. Wiggins, Soc.* **1944**, 522.

³⁾ Vgl. eine demnächst erscheinende Mitteilung von *F. Reber, T. Reichstein*.

⁴⁾ *I. S. D. Bacon, D. L. Bell, I. Lorber, Soc.* **1940**, 1147.

⁵⁾ Wir fanden für diesen Stoff eine etwas höhere Drehung als die englischen Autoren, nämlich $[\alpha]_D^{14} = +39,7^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,336$ in $CHCl_3$). Die Kontrolle ergab $[\alpha]_D^{13} = +35,9^\circ + 2^\circ$ ($c = 0,973$ in $CHCl_3$). *Bacon* und Mitarbeiter⁴⁾ fanden $[\alpha]_D = +29,5^\circ$ ($c = 3$ in $CHCl_3$). Dieser kleine Unterschied blieb bisher unabgeklärt und stellt, soweit wir feststellen konnten, die einzige geringe Diskrepanz in den von *Wiggins* und von uns für gleiche Stoffe gefundenen Konstanten dar.