Untersuchungen über die Beziehung zwischen der aussalzenden und flockungshemmenden Wirkung anorganischer Anionen auf Eiweißlösungen.

Von
Dr. Richard Labes.

(Nach Versuchen im Biologischen Laboratorium des städt. Krankenhauses „Am Urban“, Berlin, abgeschlossen in Freiburg i. B.)

(Eingegangen am 27. September 1920.)

In den Arbeiten von L. Michaelis und Rona, Biochem. Zeitschr. 94, 225. 1919; und R. Labes, Arch. f. d. ges. Physiol. ist gezeigt worden, daß die Kationen anorganischer und organischer Elektrolyte mit den H-Ionen um die Bindung und Elektroneutralisation der sauren elektro-negativen (Carboxyl-)Gruppen der amphoteren Eiweißkörper konkurrieren, während die Anionen mit den OH-Ionen der wässerigen Lösung um die Bindung und Entladung der elektropositiven (Amino-) Gruppen des Eiweißes wetteifern, und zwar geht die Stärke ihrer Konkurrenzwirkung weitgehend parallel mit ihrer Adsorbierbarkeit an Kohle. Es zeigt sich dies, wenn man eine Reihe von Versuchsgläsern verschieden stark ansäuert und denaturiertes Serumalbumin zusetzt. Dann haben wir an dem sauren Ende unserer Reihe infolge weitgehender Bindung und Entladung der elektronegativen Eiweißgruppen durch die von der Säure gelieferten elektropositiven H-Ionen das Überwiegen der Dissoziation der elektropositiven Gruppen. Das Eiweiß ist elektropositiv geladen und wandert im elektrischen Strom nach der Kathode; auf der alkalischen Seite der Reihe haben wir infolge des Überwiegens der Wirkung der elektronegativen OH-Ionen elektronegatives Eiweiß.¹⁾ Dazwischen liegt eine H-Ionenkonzentration, bei der weder die elektropositive noch die elektronegative Dissoziation überwiegt, „der isoelektrische Punkt“²⁾. Hier flockt das Eiweiß optimal aus, während

¹⁾ Auch wenn man nicht NaOH oder eine andere Lauge zusetzt, enthält eine wässrige Lösung immer OH⁻-Ionen durch die Dissoziation des H₂O in H⁺ und OH⁻. Es nimmt nur die Konzentration der OH⁻-Ionen mehr und mehr ab, je saurer die Lösung ist; je höher die Konzentration der OH⁻-Ionen, desto weitgehender binden und entladen sie die elektropositiven Gruppen der Eiweißkörper; die Dissoziation der elektronegativen Gruppen erhält daher mehr und mehr das Übergewicht.

²⁾ L. Michaelis, Nernst-Festschrift 1912, S. 308.

bei stärker saurer und bei stärker alkalischer Reaktion die Eiweißlösung klar bleibt. Setze ich nun Salze mit stark adsorbierbaren Kationen zu, so verschiebt sich durch deren Konkurrenz mit den H-Ionen das Flockungsoptimum nach der weniger sauren Seite der Reihe. Überwiegt die Adsorbierbarkeit des Anion, so verschiebt sich das Flockungsoptimum nach der stärker sauren Seite. Loeb¹⁾ hat in einer anderen Reihe von Untersuchungen durch chemische Analyse gezeigt, daß Gelatine auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes wie ein elektropositiv geladenes Kation Anionen bindet, auf der alkalischen Seite dagegen Kationen. Hardy²⁾ hat ferner gezeigt, daß bei der Ausflockung von kathodischem Säureeiweiß die Anionen maßgebend sind, während bei der Ausflockung von anodischem Laugeneiweiß die Kationen die ausschlaggebende Rolle spielen. Berücksichtigt man diese Tatsachen, so ist die Möglichkeit naheliegend, daß die Verschiebung des Flockungsoptimums durch adsorbierbare Anionen nach der sauren Seite mit einer Eiweißsalzbildung aus den Anionen und den bei saurerer Lösung reichlicher vorhandenen Eiweißkationen in nahem Zusammenhang steht. Umgekehrt scheinen die adsorbierbaren Kationen ihren Einfluß auf die Verschiebung des Flockungsoptimums nach der alkalischen Seite dadurch äußern zu können, daß sie die auf der weniger sauren Seite des isoelektrischen Punktes vorhandenen elektronegativen Eiweißanionen durch Salzbildung entladen, und so mit den Wasserstoffkationen konkurrieren. Daß jedenfalls nur elektrisch polare Vorgänge eine solche Verschiebung des Flockungsoptimums hervorrufen können, zeigt auch die von Labes³⁾ gemachte Beobachtung, daß Nichtelektrolyte das Flockungsoptimum des Eiweißes nie verschieben, sondern höchstens verbreitern.

In der erwähnten Arbeit von Michaelis und Rona wurde noch eine zweite Beobachtung gemacht: Eine Reihe von Anionen und Kationen, z. B. die Schwermetalle, sowie die Jod-, Rhodan- und Sulfosalicylsäureanionen, steigern und beschleunigen die Flockung im Flockungsoptimum, während eine Reihe anderer Ionen die Flockung im isoelektrischen Punkte hemmen. Ordnet man die Ionen nach ihrer hemmenden Wirkung, so findet man folgende Reihe:

Diese Reihe verhält sich gerade umgekehrt wie die Reihe der Aussalzungswirkung, die bereits Hofmeister gefunden hatte, in der das Sulfat stärker aussalzend wirkt, als das Chlorid und dieses wieder stärker als das Jodid. Man findet solche Aussalzungswirkungen nicht nur bei Eiweiß, sondern auch bei Körpern wieder, die nichts mit elektrischer

¹⁾ Jaques Loeb, Journ. of general physiol., Sept. 1918, Bd. I u. folg.

²⁾ Hardy, Zeitschr. f. physikal. Chemie **33**, 385. 1900.

³⁾ Labes, Arch. f. d. ges. Physiol.

Ladung zu tun haben. So hat Höber¹⁾ darauf aufmerksam gemacht, daß die Löslichkeit von schwerlöslichen Stoffen wie Äthylacetat, Phenylthiocarbamid und anderen durch Sulfate stärker herabgesetzt wird als durch Chloride, durch diese wieder stärker als durch Jodide. Es hängt diese Aussalzung wohl damit zusammen, daß diese Salze Wasser anziehen und dadurch den zu lösenden Stoffen das Lösungsmittel wegnehmen. Wie kommt es nun, daß beim denaturierten Serumalbumin gerade die Sulfate und die Chloride der Alkalimetalle die Flockung hemmen?

Eine Reihe von Arbeiten lassen vermuten, daß derartige Löslichkeitsbeeinflussungen sich durch Änderung der Konzentration umkehren lassen. So fand z. B. Höber, daß von den Neutralsalzen der Alkalimetalle bei niederen Konzentrationen die Chloride die Koagulationstemperatur stärker erhöhen als die Jodide; bei höheren Konzentrationen ist das Umgekehrte der Fall²⁾. Ferner fand Ehrenberg³⁾, daß bei niederen Konzentrationen die Sulfate eine stärkere Quellung des Eiweißes hervorrufen, als die Jodide; bei höheren Konzentrationen kehrt sich die Wirkung um.

Auch die von Neisser und Friedemann beschriebenen unregelmäßigen Reihen bei der Fällung von Kolloiden durch manche Salze sind wohl hierher zu rechnen; vielleicht auch die Beobachtung von Pauli, daß Zinksulfat in sehr niederen Konzentrationen Eiweiß fällt, in höheren löst, in noch höheren wieder fällt.

Die Tatsache, daß die Aussalzungen durch die meisten Neutralsalze bei saurer Reaktion besonders stark sind (Nachweis des hitzedenaturierten Eiweißes im kochsalzreichen Harn durch Essigsäurezusatz) spricht dafür, daß außer der oben erwähnten unelektrischen Wirksamkeit dieser Salze, wie sie sich bei der Löslichkeitsverminderung von gänzlich unelektrischen Körpern wie Äthylacetat zeigen, noch elektrisch polare Vorgänge hierbei mitwirken. Es schien mir für die Frage der Umkehrung der Anionenreihe bei den bekannten Aussalzungsvorgängen gegenüber den Beobachtungen der Flockungshemmung beim denaturierten Serumalbumin von Bedeutung zu sein, festzustellen, ob sich auch beim denaturierten Serumalbumin die Anionenreihe umkehren läßt, wenn man von niederen zu höheren Konzentrationen übergeht. Ferner ergibt sich die Frage: Besteht eine Beziehung zwischen dem mehr oder weniger nach der sauren Seite verschobenem Flockungsoptimum des Albumins bei niederen Konzentrationen der Alkalineutralsalze und dem Aussalzungsoptimum bei höheren Konzentrationen

¹⁾ Höber, Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe. Erste Auflage Kapitel 8.

²⁾ Höber, Hofmeisters Beiträge **11**, 35. 1907.

³⁾ Biochem. Zeitschr. **53**, 356. 1913.

derselben Salze? — Dieses liegt bekanntlich bei einer viel höheren $[H^+]$ -Ionenkonzentration. — Beide Fragen scheinen sich zu bestätigen: Die Flockungshemmung der Sulfate und Chloride macht bei höherer Konzentration einer Flockungsförderung und einer Verbreiterung der Flockungszone Platz, während sich auch bei den höchsten Konzentrationen der Bromide, Jodide und Rhodanide nie eine Verbreiterung der Flockungszone bemerkbar macht. Es hat sich also diese Anionenreihe der Flockungsbegünstigung bei hohen Konzentrationen tatsächlich umgekehrt. Außerdem scheint das Aussalzungsoptimum der Chloride und Sulfate wie auch der Bromide, Jodide und Rhodanide dem Wesen nach nichts anderes zu sein als das mit steigender Konzentration vom isoelektrischen Punkt des salzfreien Eiweißes bis zu stark saurer Reaktion weiter und weiter verschobene Flockungsoptimum. Beim Casein ist diese mit der Konzentrationssteigerung der Salze kontinuierlich zunehmende Verschiebung bis zum Aussalzungsoptimum bei hohen Konzentrationen sowohl für Jodide als auch für Chloride und Sulfate nachzuweisen. Beim Serumalbumin ist diese mit der Steigerung der Salzkonzentration kontinuierlich zunehmende Verschiebung des Flockungsoptimums nur bei Bromiden, Jodiden und Rhodaniden festzustellen, da bei den Sulfaten und Chloriden in einem mittleren Konzentrationsbereich durch die erwähnte Flockungshemmung die Flockung verschwindet. Sie tritt erst bei einer sehr viel stärkeren Konzentrationszunahme wieder auf, aber ebenso wie es z. B. bei den Jodiden und Bromiden der Fall ist, in einem Gebiet von viel höherer Acidität. Steigert man die Konzentration noch weiter, so nimmt die Flockung in diesen Röhrchen zu. Außerdem wird aber die Flockungszone erheblich nach der weniger sauren und in den Fällen, in denen das Flockungsoptimum noch nicht die höchsten $[H^+]$ -Ionenkonzentrationen erreicht hatte, auch nach der stärker sauren Seite zu verbreitert. Die Verbreiterung ist viel stärker beim Sulfat als beim Chlorid. Bei Jodid, Bromid und Rhodanid dagegen findet man auch bei den höchsten Konzentrationen keine Spur von Verbreiterung der Flockungszone. Daß die Verbreiterung der Flockungszone nur zum geringen Teil auf die durch den Salzzusatz hervorgerufene Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration zurückzuführen ist, zeigen die Messungen der Wasserstoffionenkonzentration mittels der Gaskette.

Methodik.

Zu den Versuchen wurden verwendet: 1. die Reaktionsregulatoren zur Herstellung bestimmter H^+ -Ionenkonzentrationen¹⁾, 2. die Salzlösungen, 3. das dialysierte und denaturierte Serumalbumin.

Die Versuche wurden derart angestellt, daß in jedes Röhrchen einer Versuchreihe 1 Teil Lösung unseres Reaktionsregulators, 10 Teile Salzlösung und

¹⁾ Siehe hierzu L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. Julius Springer, Berlin 1914.

1 Teil denaturiertes Serumalbumin getan wurde. Dann wurde nach 10 Minuten protokolliert, in welchen Röhrchen der Versuchsreihe bei Laboratoriumstemperatur Trübung bzw. Flockung aufgetreten war. Trat eine Trübung noch nachträglich auf, so ist dies in den Versuchstabellen vermerkt. In diesen Tabellen bedeutet ein 0 das Klarbleiben der Eiweißlösung, die Zahl der stehenden Kreuze kennzeichnet den Grad der Trübung: Es bedeutet (+) Spur opak; + opak; ++ leicht trübe, +++ trübe usw., f.Fl. feine Flocken.

1. Die Reaktionsregulatoren.

Als Reaktionsregulatoren zur Herstellung bestimmter Wasserstoffionenkonzentrationen wurden folgende Standardgemische vorrätig gehalten.

Zeichen d. Standardlösung (des Reaktionsregulators)	normal 10	normal 1	normal 1	Aqua destillata	P_H	[H ⁺] normal etwa
	Essigsäure cem	Essigsäure cem	Natriumacetat cem			
0			2,0	18,0	> 6,2	< $0,6 \cdot 10^{-6}$
1	0,63		2,0	17,37	6,2	$0,6 \cdot 10^{-6}$
2	1,25		2,0	16,75	5,9	$1,2 \cdot 10^{-6}$
3	2,5		2,0	15,5	5,6	$2,5 \cdot 10^{-6}$
4	5,0		2,0	13,4	5,3	$5,0 \cdot 10^{-6}$
5		1,0	2,0	17,0	5,0	$10,0 \cdot 10^{-6}$
6		2,0	2,0	16,0	4,7	$2,0 \cdot 10^{-5}$
7		4,0	2,0	14,0	4,4	$4,0 \cdot 10^{-5}$
8		8,0	2,0	10,0	4,1	$8,0 \cdot 10^{-5}$
9		16,0	2,0	2,0	3,8	$16,0 \cdot 10^{-5}$

[H⁺] bedeutet die H⁺-Ionenkonzentration. P_H ihren dekadischen Logarithmus.

Außer diesen Acetatessigsäuregemischen wurden zur Herstellung noch höherer Säuregrade reine Salzsäurelösungen verwendet.

Die Zeichen für diese Standardlösungen sind folgende:

$$10) = \frac{\text{normal}}{100} \text{ HCl}$$

$$11) = \frac{\text{normal}}{10} \text{ HCl}$$

$$12) = \text{normal HCl}$$

$$13) = 10\text{normal HCl}$$

Die Röhrchen, in denen die Lösungen 10), 11), 12) und 13) im Verhältnis 1 : 12 enthalten sind, verhalten sich natürlich anders als die Röhrchen, denen die Acetatessigsäuregemische zugesetzt sind, denn die 12fache Verdünnung der Acetatregulatorgemische ändert die Wasserstoffionenkonzentration kaum, während die 12fache Verdünnung der Salzsäurelösungen die Wasserstoffionenkonzentrationen um annähernd das 12fache herabsetzt. Die Salzsäurelösungen schaffen außerdem noch eine Komplikation: Während nämlich die Reihe der Natriumacetatessigsäuregemische den Vorteil hat, daß sie sich im wesentlichen nur in bezug auf die [H⁺]- und [OH⁻]-Ionenkonzentration unterscheidet, während dagegen die Natrium- und die Acetationenkonzentration sich nur unwesentlich ändert, ändert sich bei den Salzsäurelösungen mit der [H⁺]-Ionenkonzentration auch die Konzentration der Chlorionen, die, wie wir später sehen werden, eine erhebliche Nebenwirkung äußern können. Die zugesetzten Salze ändern nur in sehr hohen Konzentrationen die Wasserstoffionenkonzentration, jedoch ist diese Änderung, wie später durch

Stichprobe gezeigt werden wird, nie so groß, daß sie die Deutung der Tabellen wesentlich zu beeinflussen imstande ist.

Das dialysierte und denaturierte Serumalbumin wurde in folgender Weise hergestellt:

Hammelserum wurde in Schleicher-Schüllschen Dialysierhülsen acht Tage gegen häufig gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert. Die Serumsalze waren dann genügend herausdiffundiert und die Globuline ausgefallen. Von der auf diese Weise salzfrei gemachten Serumalbuminlösung wurden dann 5 ccm in 45 ccm siedendes destilliertes Wasser eingespritzt und dann abgekühlt, so daß eine opake Flüssigkeit entstand, die nach Abkühlen versuchsfertig war.

Der Einfluß von höheren Konzentrationen von Kaliumjodid, Natriumchlorid und Ammoniumsulfat auf die Flockung von denaturiertem Serumalbumin bei verschiedenen Aciditäten. (Tabelle I.)

Wie die Versuchstabelle I zeigt, verschiebt Kaliumjodid bei steigenden Konzentrationen bis zu 90% die Flockungszone des Serumalbumins mehr und mehr nach der sauren Seite, ohne je eine wesentliche Verbreiterung der Fällungszone herbeizuführen. Ganz andere Verhältnisse finden wir beim Natriumchlorid. Bei mittleren Konzentrationen ist die Flockung derartig gehemmt, daß abgesehen von dem später zu besprechenden Röhrchen nirgends eine Flockung erscheint — vom Röhrchen 13 sei zunächst abgesehen. Erst wenn wir die Natriumchloridkonzentration bis auf 7% (1,2 normal) steigern, erscheint wieder eine Flockung. Dies neu auftretende Flockungsoptimum ist aber wesentlich nach der sauren Seite hin verschoben. Bei weiterer Konzentrationssteigerung verbreitet sich dies Flockungsoptimum stark nach der weniger sauren Seite, und die Flockung tritt schneller auf. Ähnlich ist der Befund beim Ammoniumsulfat. Die Flockung, die bei mittleren Konzentrationen nicht sichtbar ist, taucht bei hoher Konzentration im sauren Gebiet auf, um sich dann bei weiterer Konzentrationssteigerung noch stärker und intensiver zu verbreitern, als dies beim Natriumchlorid der Fall ist.

Die Flockungserscheinungen des denaturierten Serumalbumins bei steigenden Konzentrationen der Kaliumneutralsalze. (Tabelle II.)

Um bessere Vergleichsmöglichkeiten für die Anionenwirkung zu haben, werden von jetzt ab nur Salze des gleichen Kations mit verschiedenen Anionen verglichen, zunächst die Salze des Kaliums. Sehen wir zunächst wieder von dem Röhrchen 13 ab, dessen hoher Cl-Gehalt Komplikationen bedingt. Die Tabelle II zeigt, daß bis zu den höchsten Konzentrationen hinauf das Jodid und das Bromid das Flockungsoptimum mehr und mehr nach der sauren Seite verschieben, ohne je die Flockungszone zu verbreitern oder die Flockung merklich stärker zu beschleunigen. Ganz anders wirkt das Chlorid. Bei mittleren Konzentrationen ist das Flockungsoptimum unsichtbar; es taucht erst bei einer 0,54 normalen Lösung in einem Röhrchen mit stärker saurer Reaktion wieder auf und wird bei steigender Konzentration (1,08 normal) noch weiter nach der sauren Seite verschoben. Bei 1,4 normaler Lösung tritt die Verbreiterung der Flockungszone auf, die bei weiterer Konzentrationssteigerung noch mehr zunimmt. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Kaliumsulfat mit dem Unterschied, daß die Verbreiterung der Flockungszone sich schon bei 0,72 normaler Lösung bemerkbar macht. Bei Kaliumsulfat sind leider keine höheren Konzentrationen zu verwenden, da eine 0,72 normale Lösung schon gesättigt ist.

Wir haben also bisher gesehen, daß Bromid und Jodid das Flockungsoptimum mit steigender Konzentration kontinuierlich mehr und mehr nach der sauren

Tabelle I.

Standardlösungen	0	1	2	3	4	5	6	7	8	13
Kontrollreihe mit destilliertem Wasser.										
2,5% Natriumchlorid (0,43 normal)	0	0	++	+++	0	0	0	0	0	0
4,0% " "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++
5,0% " "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++
7,0% " "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++
10,0% " "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++
30,0% " "	0	0	0	0	0	++	++	++	++	++
Kontrollreihe mit destilliertem Wasser.										
0,6% Kalliumjodidlösung (0,036 normal)	0	0	++	+++	0	0	0	0	0	0
8,0% " "	0	0	+	+++	+	0	0	0	0	0 ²⁾
9,0% " "	0	0	0	++	++	0	0	0	0	++
9,0% " "	0	0	0	0	0	0	0	+	f. kl.	++
90,0% " "	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++
90,0% " "	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++
5,0% Ammoniumsulfat (0,38 normal)										
10,0% " "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15,0% " "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ²⁾
20,0% " "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++
28,0% " "	0	0	0	0	0	+	+	+	+	++
38,0% " "	++	++	+++	+++	++	+	+	+	+	++

1) Nach 20 Minuten + +.

2) Nach 10 Minuten + + +.

3) Nach 10 Minuten + +.

Seite verschieben, ohne auch bei höchsten Konzentrationen eine Verbreiterung oder merklich zunehmende Beschleunigung der Flockung hervorzurufen. Im Gegensatz dazu verhalten sich die Chloride und Sulfate. Bei niederen Konzentrationen verschieben sie, wie die Arbeit von Michaelis und Rona gezeigt hat, das Flockungsoptimum des salzfreien denaturierten Serumalbumins ein wenig nach der sauren Seite; bei etwas höheren Konzentrationen hemmen sie die Flockung bereits derart, daß das Flockungsoptimum gänzlich unsichtbar wird, und wir seine Lage nicht feststellen können. Bei weiterer Konzentrationssteigerung erscheint das Flockungsoptimum wieder und wesentlich nach der sauren Seite verschoben, und wir wissen nicht, ob es, ebenso wie es bei den Jodiden und Bromiden der Fall war, in den mittleren Konzentrationen kontinuierlich nach der sauren Seite sich verschoben hat, bis es jetzt an dieser anderen Seite wieder auftauchte, oder ob das Flockungsoptimum, das wir bei höherer Sulfat- und Chloridionenkonzentration wiederfinden, eine prinzipiell neue Erscheinung darstellt. Um den Verlauf des Flockungsoptimums bei mittleren Sulfat- und Chloridionenkonzentrationen

Tabelle II.

Standardlösungen	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Kontrollreihe mit destilliertem Wasser	0	0	+	++	+	0	0	0	0	0				
0,65% Kaliumjodidlösung 0,036 normal	0	0	+	++	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4,0% „ 0,24 „	0	0	0	0	0	++	++	++	++	++	++	(+)	0	++
90,0% „ 5,4 „	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	++	++
1,25% Kaliumbromid 0,1 normal	0	0	0	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0	0
2,5% „ 0,21 „	0	0	0	0	0	++	++	+	0	0	0	0	0	+
6,25% „ 0,52 „	0	0	0	0	0	++	++	++	++	(+)	0	0	(+)	++
12,5% „ 1,05 „	0	0	0	0	0	0	+	++	++	++	++	++	++	++
25,0% „ 2,1 „	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	++	++	++
0,8% Kaliumchlorid 0,11 normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,6% „ 0,22 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4,0% „ 0,54 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(+) ¹⁾
8,0% „ 1,08 „	0	0	0	0	0	0	0	+	++	(+)	0	0	0	++
10,6% „ 1,4 „	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	0	0	0	++
21,2% „ 2,8 „	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	++	++	++
32% „ 4,3 „	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	++	++	++	++
0,15% Kaliumsulfat 0,009 normal	0	0	(+)	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,12% „ 0,18 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6,25% „ 0,36 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(+)	0	0	0	(+) ²⁾
8,3% „ 0,48 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(+)	(+)	0	0	++
12,5% „ 0,72 „	0	0	0	0	0	0	0	(+)	+	++	(+)	0	0	++

¹⁾ Erst nach längerer Zeit Trübung aufgetreten.²⁾ Trübung erst nach 20 Minuten.

tionen zu ermitteln, wurden die Untersuchungen auf Caseinlösungen ausgedehnt, da das Casein in dieser Richtung den Vorteil hat, daß eine stärkere Flockungshemmung durch Sulfate und Chloride sich nicht bemerkbar macht.

Die Anionenwirkung auf die Flockung von Casein bei verschiedener Acidität bei steigenden Salzkonzentrationen. (Tabelle III.)

Bei diesen Versuchen wurden Essigsäure und Natriumacetatlösungen gesondert zu jedem einzelnen Röhrchen zugesetzt, und zwar zunächst die nötige Menge Essigsäure; dann wurde auf 2 ccm mit destilliertem Wasser aufgefüllt; hierzu kamen 2,5 ccm der entsprechenden Salzlösung und zuletzt die Natriumacetatlösung, die gleichzeitig $1\frac{0}{100}$ Casein Hammarsten mitgelöst enthielt. Das Casein ist nämlich auf diese Weise am besten in Lösung zu bringen. Es wurde 0,1 g Casein in 100 ccm $1\frac{1}{10}$ normal Natriumacetat gelöst. Es wurden von dieser Casein-Natriumacetatlösung 0,5 ccm zu jedem Röhrchen der Reihe zugesetzt, nachdem die entsprechenden Mengen Essigsäure, destilliertes Wasser und Salzlösung in die einzelnen Röhrchen hineingetan waren. Nach dem Mischen wurde stark geschüttelt, da sich bei Casein sonst leicht irreversible Fällungen ergeben. Es ist bei den Versuchen mit Casein zu berücksichtigen, daß in der endgültigen Versuchslösung nicht $10\frac{1}{12}$ Salzlösung wie bei der Versuchsanordnung mit Serumalbumin, sondern $5\frac{1}{12}$ Salzlösung enthalten ist.

Bei Ammoniumchlorid, dessen Sättigungskonzentration bei Laboratoriumstemperatur 30% kaum überschreitet, mußte ich infolgedessen, um in der endgültigen Versuchslösung etwa 30% Gehalt zu haben, entsprechende Menge Salz ungelöst zusetzen, und dann nach Zusatz von Essigsäure bis auf 4,5 ccm mit destilliertem Wasser auffüllen.

Es entspricht also die Acidität von Röhrchen 1 im Caseinversuch der Acidität von Röhrchen 2 in den Serumalbuminuntersuchungen usw. bis zu Röhrchen 9.

Da in $\frac{\text{normal}}{1000}$ Salzsäure sich Casein überhaupt nicht löste, wurde die Aciditätsreihe nicht mehr weiter nach der sauren Seite ausgedehnt. Aus den Caseinversuchen — siehe Tabelle III — ergibt sich, daß sowohl das Ammoniumsulfat wie auch das Ammoniumchlorid, die bei niederen Konzentrationen das Flockungsoptimum nur sehr wenig in das saure Gebiet verschieben, dies bei steigenden Konzentrationen mehr und mehr tun, bis bei noch höheren Konzentrationen eine starke Verbreiterung der Flockungszone auftritt, die sich in das wesentlich weniger saure Gebiet erstreckt, und zwar ist die Verbreiterung außerordentlich viel stärker bei Ammoniumsulfat als bei Ammoniumchlorid. Das Ammoniumjodid zeigt selbst bei außerordentlich hohen Konzentrationen keine Spur von Verbreiterung, sondern verschiebt mit steigenden Konzentrationen immer weiter nach der sauren Seite. Man hat wohl eine gewisse Berechtigung zu dem Analogieschluß, daß auch beim denaturierten Serumalbumin die Chloride und Sulfate das Flockungsoptimum, wenn auch unsichtbar, mit steigender Konzentration mehr und mehr nach der sauren Seite zu verschieben, bis es bei weiter steigender Konzentration infolge der beginnenden Aussalzungserscheinung in einem sauren Gebiete wieder sichtbar wird. Es wäre demnach die Tatsache, daß die Aussalzung durch die Neutralsalze der Alkalien gerade im sauren Gebiete am ausgiebigsten verläuft, im wesentlichen darauf zurückzuführen, daß die Anionen dieser Salze stärker adsorbierbar sind, als die Kationen und infolgedessen das Aussalzungsoptimum mit dem leicht nach der sauren Seite verschobenen Flockungsoptimum des Eiweiß, wie es die Versuche von Michaelis und Rona für niedere Konzentrationen festgestellt haben, wesentlich ähnlich ist. Wenn diese Auffassung stimmen würde, müßte sich bei Salzen, die das Flockungsoptimum bei niederen Konzentrationen nach der alkalischen Seite ver-

schieben, bei denen also vermutlich eine Eiweißsalzbildung mit den Kationen im Vordergrund steht, von diesem alkalischen Gebiet aus eine Verbreiterung der Flockungszone zeigen, wenn man zu höheren aussalzenden Konzentrationen übergeht. Das heißt: Ein Aussalzungsoptimum müßte bei solchen Salzen auch in einem weniger sauren Gebiet liegen. Die Daten der Kupferchloridwirkung in Tabelle III sprechen in diesem Sinne. Geht man nämlich von einer 5proz. zur 7proz. CuCl_2 -Lösung über, so verbreitert sich die Flockung auch von dem nach der alkalischen Seite verschobenen Flockungsoptimum aus. Außerdem tritt allerdings noch eine zweite Flockung im stärker sauren Gebiet auf. Welcher Art diese ist, läßt sich ohne weitere Untersuchungen schwer ermitteln.

Vielleicht macht sich bei diesem Säuregrad doch wieder die gegenüber dem Kupferkation bisher zurückgetretene Wirkung des Chloranions auf das Säure-eiweiß bemerkbar.

Die Flockung des denaturierten Serumalbumins bei verschiedenen $[\text{H}^+]$ -Ionenkonzentrationen durch steigende Konzentrationen von Ammoniumsalzen (Tabelle IV).

Die Versuche mit Serumalbumin wurden auch auf die Salze des Ammoniums ausgedehnt, da diese in Wasser bis auf das Bromid eine hohe Löslichkeit zeigen und darum geeignet sind, an manchen Stellen die Verhältnisse noch deutlicher zu beleuchten. Auch hier sehen wir die gleichen Verhältnisse wie bisher. Das Rhodanid und Jodid verschieben das Flockungsoptimum mit steigender Konzentration mehr und mehr nach der sauren Seite, ohne auch bei höchsten Konzentrationen eine Verbreiterung der Flockungszone zu zeigen. Das Chlorid und Sulfat dagegen, das bei mittleren Konzentrationen so stark hemmt, daß das Flockungsoptimum nicht sichtbar ist, verbreitert das Flockungsoptimum bei höherer Konzentration sehr erheblich, und zwar ist dies bei dem bei niederen Konzentrationen stärker hemmenden Sulfat noch stärker der Fall als bei dem Chlorid. Daß die Verbreiterung, die sich beim Übergang von der 26proz. zur 38proz. Ammoniumsulfatlösung von Röhrchen 7 zu Röhrchen 0 zeigt, nicht nur auf Veränderung der Wasserstoffionenkonzentrationen durch die Ammoniumsulfatlösung im Röhrchen 0 vorgetauscht wird, zeigt die Messung der Wasserstoffionenkonzentrationen, die im Röhrchen 7 bei der 26proz. Lösung $p_{\text{H}} = 4,07$, für das Röhrchen 0 bei 38proz. Ammoniumsulfatlösung $p_{\text{H}} = 4,89$ ergibt, also eine über viermal so geringe Acidität.

Daß die Verbreiterung der Flockungszone auch bei Berücksichtigung der veränderten Wasserstoffionenkonzentration bei dem Übergang von 26proz. zu 38proz. Ammoniumsulfatlösung relativ viel erheblicher ist als bei dem doch viel größeren Sprung von 11proz. zu 33proz. Ammoniumchloridlösung, zeigt die Tatsache, daß Röhrchen 9 bei 11proz. Ammoniumchloridlösung eine p_{H} von 3,49 zeigt, während Röhrchen 6 bei 33proz. Ammoniumchloridlösung eine p_{H} von 4,18 zeigt. Eine 11proz. Ammoniumchloridlösung in Röhrchen 11 zeigt eine $p_{\text{H}} = 1,94$.

Wir haben also verschiedentlich gesehen, daß das wieder auftauchende Flockungsoptimum zwar stark nach der sauren Seite verschoben ist, aber durchaus noch nicht immer die extremste Wasserstoffionenkonzentration erreicht hat.

In den meisten Fällen wird aber bei dieser Konzentration und meist bei noch niedrigeren Konzentrationen ein Flockungsoptimum beim Röhrchen 13 beobachtet, dessen Wesen zunächst etwas aus dem Rahmen der anderen Erscheinungen herauszufallen scheint, besonders wenn wir bedenken, daß die Flockung in den Röhrchen 11 und 12 nicht auftritt, obwohl diese doch eine geringere Wasserstoffionenkonzentration haben als das Röhrchen 13 und das geläufige Flockungsoptimum noch nicht einmal die Acidität des Röhrchens 11 erreicht hat. Berücksichtigen wir

Standardlösungen		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0,21% Ammoniumthodanid 0,04 normal	0,48%	0	0	0	0	0	(+)	++	+++	(+)	(+)	0	0	0	0
" "	0,07	0	0	0	0	0	0	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" "	0,27	0	0	0	0	0	0	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" "	0,66	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" "	1,97	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+++	+++	+++	+++	+++
" "	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++
" "	9,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++
0,8% Ammoniumjodid	4,0%	0	0	0	0	0	0	0	++	+++	+++	+++	0	0	0
" "	0,28 normal	0	0	0	0	0	0	0	++	+++	+++	+++	0	0	0
" "	0,51	0	0	0	0	0	0	0	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" "	1,38	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" "	2,76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++
" "	5,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++
1,1% Ammoniumchlorid 0,25 normal	1,1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" "	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" "	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" "	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" "	6,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9,5% Ammoniumsulfat	9,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" "	0,48 normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" "	1,97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" "	2,87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" "	2,87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1) Nach einer halben Stunde zeigt sich erst diese Spur von Trübung.

jedoch folgende Tatsachen: Es genügt bereits eine 1,4 normale Kaliumchloridlösung, um eine Flockungssteigerung im Sinne einer Verbreiterung der Flockungszone hervorzurufen, ja, es ist sogar eine 0,54 normale Kaliumchloridlösung imstande, die Flockungshemmung zu überwinden. Ferner spielt offenbar das Chlorion und nicht das Kaliumion bei diesen Aussalzungserscheinungen die Hauptrolle; denn es müßte ja sonst auch als Kaliumjodid bei den angewendeten höheren Konzentrationen aussalzend im Sinne einer Verbreiterung der Flockungszone wirken, was ja nicht der Fall ist.

Im Hinblick auf diese Tatsachen ist es nicht unwahrscheinlich, daß in Röhrchen 13 mit einer etwa normalen Salzsäurelösung die hohe Konzentration der Chlorionen sich sehr wohl im Sinne einer Aussalzung bemerkbar machen kann, während im Röhrchen 12 die Chlorionenkonzentration nur $\frac{1}{10}$ so stark ist und darum einer viel stärkeren Ergänzungswirkung der Chlor- bzw. Sulfationen der zugesetzten Salzlösung bedarf. Dem Wesen nach kann also die Ausflockung im Röhrchen 13 sehr wohl in die durch die hohe aussalzend wirkende Konzentration der Chlorionen verbreiterte Flockungszone des durch die Anionen in das saure Gebiet verschobenen Flockungsoptimums hineingehören. Diese Wirkung der Chlorionen der Salzsäure gehört wohl unter anderem, zu der besonders von Pauli beschriebenen Erscheinung, daß höhere Konzentrationen von Salzsäure die Viscosität und Hydratation von Eiweißlösungen verringern. Salzzusatz vermindert die Viscosität dann noch weiter¹⁾.

Rückblick.

Es hat sich also die Vermutung bestätigt, daß bei Anwendung höherer Konzentrationen gerade das in verdünnten Lösungen am stärksten flockungshemmende Sulfat- und danach das Chloridanion am stärksten die Flockung begünstigen und so die Hofmeistersche Reihe auch beim Serumalbumin zur Geltung kommt. Dieser scheinbare Gegensatz läßt sich vielleicht so verstehen, daß das Sulfation und das Chlorion in seiner Bindung an Eiweiß seine wasseranziehenden Kräfte beibehält und so die Hydratation des Eiweißsalzes erhöht. Bei steigenden Sulfat- bzw. Chloridionenkonzentrationen macht sich aber auch die Wasseranziehung der nicht an Eiweiß gebundenen gelösten Sulfat- und Chloridionen mehr und mehr bemerkbar, so daß sie dem Eiweißsulfat schließlich das zur Lösung notwendige Wasser streitig machen und so die Flockungshemmung zunächst nur im Flockungsoptimum überwinden. Bei weiterer Konzentrationssteigerung wirken sie dann so stark aussalzend, daß sie die Flockungszone mehr und mehr verbreitern.

Daß die Zurückdrängung der Dissoziation der Eiweißsulfate bzw. Chloride durch steigenden Sulfatzusatz nicht zur Erklärung der Aussalzung allein genügt, zeigt die Arbeit von Loeb²⁾, der nachwies, daß Gelatine bei steigendem Salzsäure- und auch Schwefelsäurezusatz ein Quellbarkeits-, Viscositäts- und Dispersitätsoptimum überschreitet, obwohl die Ionisation der Gelatine, wie Leitfähigkeitsmessungen er-

¹⁾ Pauli und Handowski, Biochem. Zeitschr. **18**, 346.

²⁾ Journ. of general physiol. Sept. 1918, Bd. 1 u. ff.

gaben, weiter zunimmt. Es steht also die Wasserentziehungswirkung hier wohl im Vordergrund.

Durch die vorliegenden Untersuchungen ist außerdem die Vermutung nahegelegt, daß, wie beim Casein, so auch beim Serumalbumin, das Flockungsoptimum mit steigender Alkalineutralsalzkonzentration mehr und mehr in ein Gebiet höherer Acidität verschoben wird, bis zur Lage des Aussalzungsoptimums.

Die allgemein beobachtete Tatsache, daß die Neutralsalze bei extrem saurer Reaktion am besten aussalzen, wäre also auf die Verschiebung des Flockungsoptimums durch die stärker adsorbierbaren Anionen der Alkalineutralsalze nach der sauren Seite zurückzuführen. Salze wie Kupferchlorid, bei denen, wie die Verschiebung des Flockungsoptimums nach der weniger sauren Seite zeigt, die Kationen noch stärker zur Eiweißsalzbildung neigen, haben dagegen auch ein Aussalzungsoptimum in einem alkalischeren bzw. weniger sauren Gebiet.

Es läßt sich also die Beeinflussung der Ausflockung von Eiweißkolloiden durch Salze einerseits auf ihre verschiedenen elektrisch polaren Wechselwirkungen, für die vielleicht eine Parallele zur Adsorption der Ionen durch Kohle besteht, andererseits auf ihre verschiedene Wasseranziehungskraft zurückführen.

Herrn Professor L. Michaelis, der mich bei dieser Arbeit in lebenswürdigster Weise mit Rat und Tat unterstützte, möchte ich auch an dieser Stelle meinen ergebensten Dank aussprechen.