



Over de spreiding van vetzuren, vetten en eiwitten

<https://hdl.handle.net/1874/301715>

19. VII. 1921

Over de spreiding van Vetzuren,
Vetten en Eiwitten

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT

F. GRENDEL

u.

A. qu.
192

OVER DE SPREIDING VAN VETZUREN,
VETTEN EN EIWITTEN

Boek- en Steendrukkerij Eduard IJdo - Leiden

RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT



1089 2564

Over de spreiding van Vetzuren, Vetten en Eiwitten

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN
DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS-
EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN
DEN RECTOR-MAGNIFICUS Dr. A. NOORDTZIJ,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GOD-
GELEERDHEID, VOLGENS BESLUIT VAN DEN
SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BE-
DENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN
NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP

MAANDAG 28 FEBRUARI 1927,
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

FRANÇOIS GRENDEL,

APOTHEKER

GEBOREN TE GOUDA

LEIDEN — EDUARD IJDO — 1927



AAN MIJNE VROUW
AAN MIJNE OUDERS

Volgaarne grijp ik deze gelegenheid aan, om den Hoogleeraren der Utrechtsche Alma Mater, die tot mijn wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen, voor het van hen ontvangen onderricht dank te zeggen.

Hooggeleerde Schoorl, Hooggeleerde de Graaff, U beiden dank ik in het bijzonder voor het vele, waarmee Gij in de jaren, die ik op het Pharmaceutisch Laboratorium heb doorgebracht, mijn kennis hebt verrijkt.

Dat Gij, Hooggeachte, Hooggeleerde de Graaff, terstond bereid waart als mijn Promotor op te treden, vervult mij met gevoelens van oprechte erkentelijkheid.

Hooggeleerde Gorter, al zal Uw bescheidenheid er geen prijs op stellen, toch wil ik U hier danken, dat Gij mij als conservator bij de Kinderkliniek zoo ruimschoots de gelegenheid hebt gegeven dit proefschrift te bewerken.

Ten slotte betuig ik allen, die mij bij mijn onderzoekingen behulpzaam waren, in het bijzonder den laboratoriumbediende Koos Croese, die met onverflauwden werklust zoo menig extra uurtje voor mij heeft opgeofferd, mijn welgemeenden dank.

I N H O U D.

	Bladz.
<i>Inleiding</i>	1

HOOFDSTUK I.

<i>Methodiek</i>	6
Het toestel	6
De meting	8

HOOFDSTUK II.

<i>Over de spreiding van vetzuren</i>	13
Invloed van de temperatuur en den zuurgraad	13
Bespreking der resultaten	16
Invloed van het oplosmiddel	21
Spreiding van zeepoplossingen	26

HOOFDSTUK III.

<i>Over de spreiding van vetten</i>	30
Invloed van de temperatuur en den zuurgraad	30
Invloed van het oplosmiddel	32
Spreiding van natuurvetten	36
Spreidingsgetal	37
Spreiding van phosphatiden en sterinen	39
Toepassingen	44
Spreiding van de lipoïden der chromocyten	44
Spreiding van de lipoïden uit spierweefsel	46
Spreiding van bloedvet	48
Uitvoering der bloedvetbepaling volgens de spreidings-methode	55
Is een wandstandige plaatsing van het vet in de bloedcapillairen mogelijk?	57

HOOFDSTUK IV.

<i>Over de spreiding van eiwitten</i>	59
Onderzoekingen van du Noüy	59
Spreiding van oxyhaemoglobine	62
Spreiding van caseïne	71
Spreiding van plasma-eiwit	78
Spreiding van gelatine	80
Spreiding van pepton en gliadine	83
Bespreking der resultaten	85
 T o e p a s s i n g e n	88
Spreiding van bloedplasma en bloed.	88
Spreiding van spiereiwit	93
Spreiding van melk	95
 S t e l l i n g e n	99

INLEIDING.

Brengt men een kleine hoeveelheid olijfolie op een schoon wateroppervlak, dan kan men waarnemen, dat een vermindering van de oppervlakte-spanning van het water eerst dan optreedt, zoodra de dikte van het olievliesje $1,0 \times 10^{-7}$ cm bedraagt. Maakt men vervolgens door het oppervlak te verkleinen het vliesje geleidelijk dikker, dan houdt deze vermindering weldra op en blijft de oppervlaktetension verder nagenoeg constant. Rayleigh¹⁾ sprak het eerst het vermoeden uit, dat bij die opgegeven dikte het water bedekt zou zijn met een monomoleculair olielaagje.

Ofschoon deze onderzoeken op geheel andere wijze bevestigd werden door Devaux²⁾ en Marcelin³⁾, waren het toch eerst de proeven van Langmuir⁴⁾, die belangstelling voor dergelijke monomoleculaire vliesjes wisten op te wekken. Langmuir ging als volgt te werk: Hij maakte o.a. van palmitinezuur een oplossing in petroleum-aether en bracht van deze oplossing een klein maar bekend gedeelte op een wateroppervlak. De petroleum-aether verdampte en liet het vetzuur als een dun laagje van bepaalde structuur op het wateroppervlak achter. De stof *spreidde*.

Door een eenvoudig hulpmiddel wist hij dan den druk te meten, die dit vliesje bij aanschuiven in horizontale richting over het wateroppervlak, tegen een op dit vloeistofoppervlak liggend plaatje vermocht uit te oefenen. Trachtte hij dan het oppervlak door het vliesje ingenomen te verkleinen, dan moest ook aan de andere zijde een grootere tegenkracht uitgeoefend worden. Hij was zoo gemakkelijk in staat, de grootte van het vliesje onder verschillenden druk te meten en constateerde, dat bij een te grooten druk alle weerstand plotseling uit het vliesje verdween. Langmuir verklaarde dit op de volgende wijze:

Zoolang nog geen druk waarneembaar is, liggen de vetzuur-

1) Rayleigh, Phil. Mag. **48**, 331, (1899).

2) Devaux, Report of the Smithsonian Inst. 1913, pg. 261.

3) Marcelin, Ann. Phys. **I**, 19, (1914).

4) Langmuir, J. Am. Chem. Soc. **39**, 1848, (1917).

moleculen verspreid over het wateroppervlak. Op het oogenblik, dat een druk merkbaar wordt, liggen zij tegen elkaar aan en wordt het wateroppervlak door een monomoleculair laagje vetzuur bedekt. Dit laagje kan dan vervolgens, afhankelijk van den aard der spreidende stof, aan een bepaalden druk weerstand bieden. Onder invloed van dien druk vermindert het in grootte, totdat ten slotte de moleculen over elkaar gaan schuiven en zich aggregaten van het vetzuur vormen.

Nu liggen echter de moleculen volgens de theorie van *Langmuir-Harkins*, bij een spreidende stof niet zoo maar willekeurig op het wateroppervlak, maar zijn daar zeer bepaald op georiënteerd. De COOH -groep van het vetzuur zou namelijk door haar groote affiniteit ten opzichte van het water, naar deze vloeistof zijn toegekeerd, terwijl de onoplosbare vetzuurrest zich juist in tegengestelde richting van het water zou afwenden. De moleculen vetzuur zullen zoo meer of min loodrecht op het wateroppervlak komen te staan als in een palissadenrij. Is deze theorie juist, dan zullen andere hoogere vetzuren per molecuul bij spreiden een even groot oppervlak moeten innemen, omdat daar eveneens dezelfde CH_3 -groep van de onoplosbare vetzuurrest naar buiten is gekeerd en het verschil in lengte bij het meten der oppervlakte niet tot uiting kan komen; evenzoo de hoogere alcoholen, waar de OH -groep dezelfde polaire neiging ten opzichte van het water heeft, als bij de vetzuren de COOH -groep. Bij de vetten, bijv. tripalmitine, zal men dan een driemaal zoo groot oppervlak per molecuul kunnen verwachten, daar ook de veresterde COOH -groep haar waterneiging niet verloochent en hier dus drie vetzuurketens naast elkaar komen te liggen. Het resultaat van de metingen door *Langmuir* verricht, heeft hij in nevenstaande tabel vastgelegd. Zeer sterk blijkt hieruit wel de groote overeenkomst tusschen theorie en experiment.

Dat het molecuul oliezuur een oppervlak inneemt, dubbel zoo groot als dat der vaste vetzuren, meende *Langmuir* te moeten verklaren, door ook aan den dubbelen band evenals aan de COOH -groep, polaire neigingen toe te kennen. Het molecuul oliezuur zou daardoor als het ware omgeknikt op de vloeistof komen te liggen en bij gevolg een dubbel zoo groot oppervlak innemen. Deze verklaring zal echter later blijken onjuist te zijn. Dat stoffen, zooals de hoogere paraffinen, die wel in het bezit zijn van een lange vetzuurketen, maar elke polaire groep missen, niet spreiden, is zoo geheel in overeenstemming met de theorie.

Uit tabel I valt ook gemakkelijk af te leiden, welk oppervlak door 1 milligram van de daarin genoemde stoffen bij spreiden wordt ingenomen. Men behoeft daartoe slechts het oppervlak, dat één molecuul

TABEL I.

Spreadende stof.	Oppervlakte door het molecuul in- genomen in 10^{-16} cm ² .	Lengte van het molecuul in 10^{-8} cm.
palmitinezuur $C_{15}H_{31}COOH$	21	24
stearinezuur $C_{17}H_{35}COOH$	22	25
cerotinezuur $C_{25}H_{51}COOH$	25	31
tristearine $(C_{18}H_{35}O_2)C_3H_5$	66	25
oliezuur $C_{17}H_{33}COOH$	46	11.2
trioleïne $(C_{18}H_{33}O_2)_3C_3H_5$	126	13
trielaïdine $(C_{18}H_{33}O_2)_3C_3H_5$	120	13.6
palmitinezure- cetylēster $C_{15}H_{31}COOC_{16}H_{33}$	23	41
myricylalcohol $C_{30}H_{61}OH$	27	41

TABEL II.

Spreidende stof.	Moleculair gewicht.	Spreiding van 1 mg in m ² .
palmitinezuur	256	0.49
stearinezuur	284	0.47
cerotinezuur	410	0.37
tristearine	890	0.44
oliezuur	282	0.98
trioleïne	884	0.86
trielaïdine	884	0.81
palmitinezure cetylester	480	0.29
myricylalcohol	454	0.36

inneemt met 6×10^{20} ($10^{-3} \times$ de waarde voor de constante van Avogadro)¹⁾ te vermenigvuldigen, om het oppervlak te vinden, dat één millimol der stof spreidt. Dit oppervlak gedeeld door het moleculairgewicht, geeft de spreiding aan per milligram. Deze waarden zijn in tabel II vereenigd.

Men ziet uit deze tabel gemakkelijk, hoe gering de hoeveelheid spreidende stof is, die bijv. nog een oppervlak van 100 cm² kan bedekken. Het ligt nu voor de hand, dat het ook mogelijk moet zijn, om uit de spreiding van een bekende stof, de hoeveelheid dier stof te berekenen. Daartoe zullen echter de verschillende factoren, die op de spreiding invloed uitoefenen, bekend moeten zijn.

Het doel van de hier beschreven onderzoekingen is, deze factoren na te gaan, alsmede de wijze, waarop de metingen moeten geschieden, om tot constante resultaten te leiden.

Waar het verschijnsel van spreiden niet alleen beperkt is tot de

¹⁾ Eenvoudigheidshalve afgerond tot 6×10^{23} .

hoogere vetzuren, esters, alcoholen en vetten, maar het ook mogelijk gebleken is eiwitten te doen spreiden, zoo zal in dit proefschrift, na de behandeling der methodiek, achtereenvolgens besproken worden de spreiding van vetzuren, daarna die van vetten en tenslotte die der eiwitten. Tevens zal op eenige toepassingen van deze nieuwe methode van werken gewezen worden, waarbij dan tegelijkertijd ook nog de spreiding van enkele andere stoffen ter sprake komt.

HOOFDSTUK I.

METHODIEK.

Het toestel, waarmee de proeven werden verricht, is gebouwd naar de aanwijzingen van Langmuir en Adam¹⁾. De ondervinding leerde echter, dat aanvankelijk zeer veel technische kleinigheden de bepalingen bemoeilijkten. Daarom zal hier naast het toestel ook de techniek uitvoerig worden besproken.

Toestel.

Dit bestaat uit een langwerpigen vernikkelden bak (zie fig. 1), waarvan de inwendige afmetingen zijn 60 cm lang, 14 cm breed en 1,8 cm diep, met geheel vlak geslepen randen. Hij staat met behulp van drie stelschroeven op een zware hardsteen plaat, waardoor zoowel een horizontale plaatsing, als de noodige stabiliteit, bij het werken verkregen wordt. Zooals de teekening laat zien, bevindt zich rechts boven den bak een balansje, dat met behulp van statief A vast aan den bak is verbonden en door middel van een schroef B loodrecht op en neer kan worden bewogen. Aan dit balansje is het platte plaatje C verbonden, dat door middel van dezelfde schroef B horizontaal op het vloeistofoppervlak gebracht kan worden.

Aan weerszijden laat het dan met de randen van den bak $\frac{1}{2}$ mm vrij. Het contrapoids D van het balansje moet zoodanig geplaatst zijn, dat dit laatste in evenwicht is, indien het plaatje op het vloeistofoppervlak rust.

Wordt nu op het vloeistofoppervlak voor het balansje een hoeveelheid spreidende stof gebracht en door aanschuiven van staaf E het

¹⁾ Langmuir, l. c. pg. 1.

Adam, Proc. Roy. Soc. Lóndon. A. 101, 452, (1922).

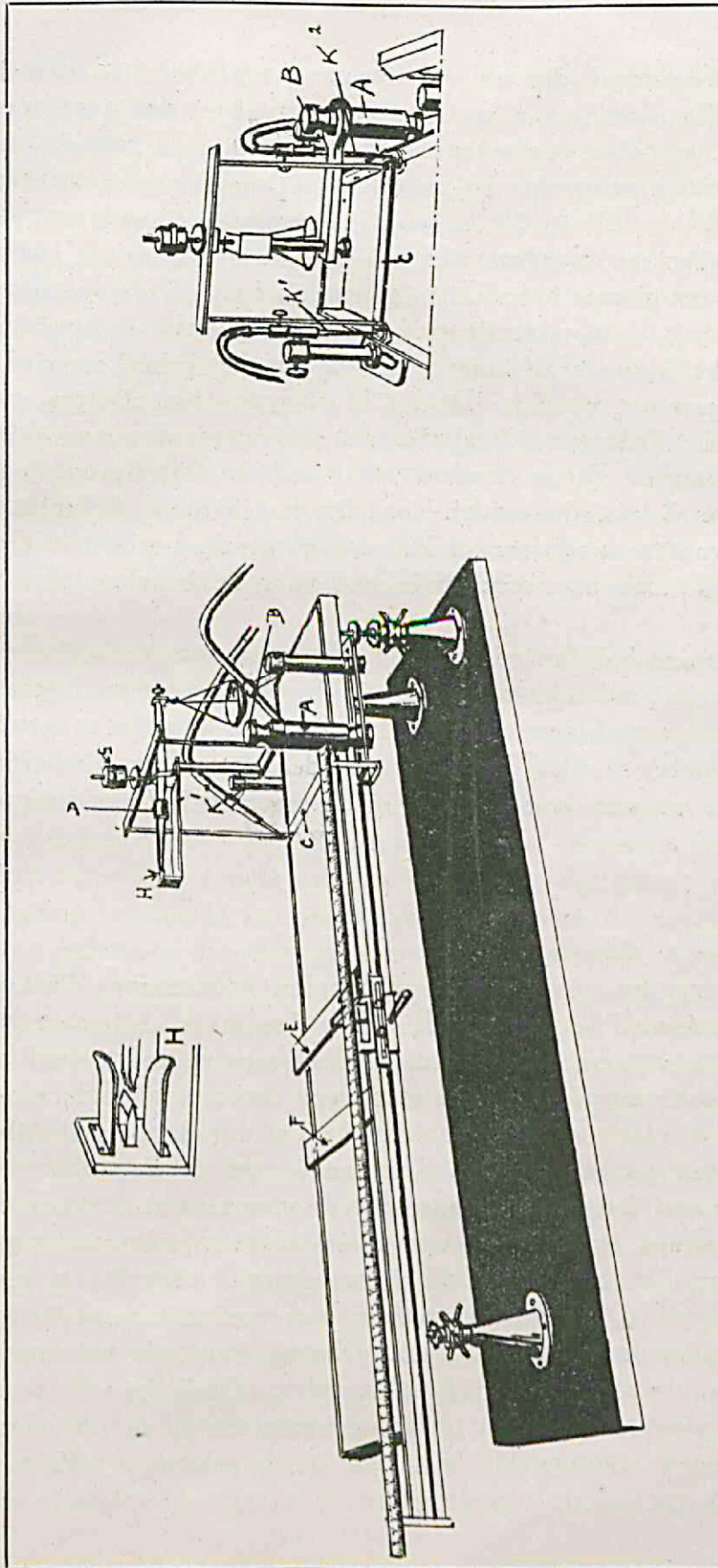


Fig. 1.

oppervlak verkleind, dan zal op een zeker oogenblik het balansje gaan uitslaan. Er moet dan echter voor gezorgd zijn, dat geen spreidende stof door de beide openingen langs het plaatje C naar het schoone wateroppervlak achter het balansje kan ontsnappen. Hiertoe dienen de beide capillairen K^1 en K^2 , zoodanig verstelbaar aangebracht, dat een daaruit onder een overdruk van 5 à 6 cm water tredende luchtstroom, juist daar ter plaatse het vloeistofoppervlak treft. Deze opstelling blijkt voldoende om de spreidende stof voor het balansje te houden. Door het gewicht G hooger of lager te stellen kan het geheel meer of minder gevoelig gemaakt worden. De bij H aangebrachte plaatjes zorgen er voor, dat het balansje zich slechts een weinig uit den evenwichtsstand kan verplaatsen. Dit is noodzakelijk, omdat anders de openingen, die het plaatje C met de randen van den bak vrijlaat, te groot zouden kunnen worden, waardoor ondanks den uit de capillairen tredenden luchtstroom, toch nog spreidende stof voor de bepaling verloren zou gaan.

Langs den bak bevindt zich de meetlat, waarmee de glazen staven E en F los verbonden kunnen worden. Deze staven steken ongeveer 3 cm aan beide kanten buiten den bak uit; hierdoor kunnen ze gemakkelijk met de vingers worden aangepakt, zonder dat er gevaar bestaat, dat vet van de vingers door middel van de staaf op het vloeistofoppervlak komt.

Meting.

Alvorens tot een meting kan worden overgegaan, dient de bak grondig gereinigd te worden. Een van den instrumentmaker komende bak blijkt in zijn voegen zooveel capillair-actieve stof te bevatten, dat eerst een schoonmaak met behulp van een fijnen staalborstel en schuurpapier moet plaats vinden, voordat de bak op de gebruikelijke wijze verder gereinigd kan worden. Dan zorgt men er natuurlijk voor, het inwendige van den bak niet meer met de vingers aan te raken.

Om straks overhevelen van vloeistof te voorkomen, worden de randen van den bak, de beide glazen staven, alsmede het plaatje C geparaffineerd. Dit geschiedt met een zeer verdunde oplossing van vetvrije paraffine in vetvrijen aether. Daarna wordt de bak gevuld met de vloeistof, waarop gespreid zal worden. Ondanks alle voorzorgen blijkt het vloeistofoppervlak toch nog verontreinigd te zijn. Deze verontreinigingen, voornamelijk bestaande uit losgelaten paraffine, worden verwijderd met behulp van de glazen staven op de volgende wijze:

Deze beide staven, die eerst met een vloeistof van dezelfde samenstelling, als die zich in den bak bevindt, zijn afgespoeld, worden achter elkaar van rechts naar links over het vloeistofoppervlak gestreken. Zoo drijven ze de verontreinigingen voor zich uit. De voorste staaf F wordt dan van den bak afgeschoven, waardoor het grootste deel der verontreinigingen mee zal gaan. Het overige gedeelte zou zich dan weer over het vloeistofoppervlak verspreiden, als het hierin niet verhinderd werd door de tweede staaf E. Staaf F wordt vervolgens schoongespoeld, weer over het oppervlak gestreken en als zij achter E is aangeland, deze op haar beurt afgeschoven.

Meestal zijn twee tot drie afstrijkingen voldoende om een schoon oppervlak te verkrijgen. Indien nu het balansje op het vloeistofoppervlak wordt ingesteld, moet bij aanschuiven de staaf het plaatje C tot op eenige mm afstand kunnen naderen, als zich op het schaalte der balans een gewichtje van 50 mg bevindt en de bak met gedestilleerd water gevuld is.

Is de afstand tusschen de staaf en het plaatje grooter, dan wijst dat op een verontreinigd oppervlak. Het is echter niet altijd mogelijk, dezen eisch van eenige mm afstand tusschen staaf en plaatje te handhaven. Bevindt zich in den bak bijv. 0.1 N. HCl en is het geheel op een temperatuur van 40° gebracht, dan moet men met een afstand van 0.8 cm tevreden zijn. Voor meerdere gegevens hierover, zie tabel III.

Is op het vloeistofoppervlak een spreidende stof gebracht, dan kan, als de meting verricht is, het oppervlak hiervan, door het plaatje C op te schroeven, geheel op dezelfde wijze als boven beschreven gereinigd worden; alleen dient dan ook nog dit plaatje van aanhangende spreidende stof bevrijd te worden. Daartoe brengt men dit telkens na een afstrijking even op het vloeistofoppervlak. De aanhangende verontreinigingen verspreiden zich dan over het oppervlak en worden bij de verdere afstrijkingen meegenomen.

Worden metingen bij hoogere temperatuur verricht, dan geschiedt zulks met behulp van een onder den bak aangebracht electrisch verwarmingsapparaat, waarmee de temperatuur binnen 1° constant gehouden kan worden. Metingen bij een temperatuur hoger dan 45° zijn moeilijk te verrichten, daar de paraffine dan begint te smelten, de bak gaat overhevelen en men te groote waarden vindt door sporen van de op het vloeistofoppervlak drijvende paraffine.

Metingen bij 1° zijn gemakkelijk uit te voeren door den bak op een staaf ijs te plaatsen, waar hij door zijn gewicht insmelt en zoo voldoende vast komt te liggen. Door deze staaf ijs in een bak te plaatsen,

die op drie stelschroeven rust, kan ook hier weer een horizontale opstelling van het toestel verkregen worden.

Als opgegeven wordt, dat de metingen bij een bepaalde temperatuur zijn verricht, dan wordt hier steeds mee bedoeld, dat de vloeistof in den bak op die temperatuur gebracht was. De temperatuur van het vliesje zelf, zal afhankelijk van die der omgeving, hiermede meer of minder kunnen verschillen.

Waar bij het bepalen vet een der meest gevreesde verontreinigingen is, wordt al het te gebruiken glaswerk minstens 24 uur in een kaliumbichromaat-zwavelzuur mengsel geplaatst. Daarna wordt het met leidingwater en vervolgens met gedestilleerd water grondig schoongespoeld en zoo noodig gedroogd in een droogstoofje, waarbij men er zorg voor draagt elke mogelijke verontreiniging te vermijden. Men pakt het bijv. nimmer met de vingers, maar slechts met behulp van pincetten aan. Oplosmiddelen als petroleumaether, aether, alcohol en aceton worden van vet bevrijd door overdestilleeren in een geheel uit glas bestaand destilleerapparaat.

Bij de metingen wordt de oppervlakte, die de spreidende stof inneemt, bepaald onder verschillenden druk, door telkens op het schaalteje van het balansje 50 mg bij te plaatsen, totdat breking van het vliesje optreedt. De afmetingen van de balans zijn zoodanig, dat een belasting van 50 mg overeenkomt met een kracht van 2.2 dynes per cm van het vliesje.

Voor en na iedere meting worden blanco-proeven gedaan, waarbij dan nagegaan wordt, hoe groot het oppervlak is, dat de verontreinigingen van den bak innemen onder dezelfde omstandigheden als bij de te nemen proeven.

In tabel III zijn eenige blanco-waarden opgegeven, zooals ze als regel gevonden worden op gedestilleerd water en 0.1 N. HCl bij een temperatuur van 1°, 15° en 40°. De gevonden blanco-waarden worden natuurlijk bij een meting in mindering gebracht.

Uit de gemeten oppervlakken kan weer gemakkelijk met behulp van de constante van Avogadro, het oppervlak, dat één molecuul onder verschillenden druk inneemt, gevonden worden. Deze waarden worden in een druk-oppervlakte kromme vereenigd, waarbij de kracht in dynes per cm als ordinaat, de berekende oppervlakte per molecuul in 10^{-16} cm² ($=1 \text{ Å}^2$) als abscis wordt aangegeven.¹⁾

¹⁾ De moleculaire afmetingen zullen in Ångstrom-eenheden uitgedrukt worden en wel korthedshalve als Å. $1 \text{ Å} = 10^{-8}$ cm.

TABEL III.

Belasting.	Oppervlakte, ingenomen door de verontreinigingen bij de blanco proef op					
	gedestilleerd water			0.1 N. HCl.		
	1°	15°	40°	1°	15°	40°
mg.	$\text{cm}^2 \times 14.$			$\text{cm}^2 \times 14.$		
50	0.1	0.2	0.5	0.2	0.5	0.8
100	0.09	0.18	0.45	0.18	0.45	0.74
150	0.08	0.16	0.4	0.15	0.4	0.7
200	0.07	0.14	0.36	0.13	0.35	0.66
250	0.06	0.12	0.32	0.11	0.31	0.61
300	0.05	0.11	0.27	0.09	0.26	0.57

In de meeste gevallen verloopt deze kromme vanaf een bepaalden druk recht. Waar deze rechte bij verlenging den abscis zal snijden, vindt men de grootte van het oppervlak dat één molecuul inneemt, bij een nuldruk. Als in dit proefschrift de oppervlakte, die een spreidende stof per molecuul inneemt, wordt opgegeven, dan is hiermede steeds deze geëxtrapoleerde waarde bedoeld.

Uit deze rechte is ook gemakkelijk de *compressibiliteit* van het vliesje te berekenen. Staat later de compressibiliteit in dynes opgegeven, dan wordt hieronder steeds verstaan de kracht, die noodig zou zijn om het oppervlak tot de helft te verkleinen.

Hoewel de metingen in dit proefschrift steeds zijn verricht met het beschreven toestel, is sedert kort ook ervaring opgedaan met een kleiner instrument. De afmetingen van den bak van dit toestel zijn inwendig lang 30, breed 7 en diep $\frac{1}{2}$ cm, zoodat het oppervlak, dat hiermede gemeten kan worden, $\frac{1}{4}$ bedraagt van dat van het grootere toestel. Bovendien is het balansje hier niet op den bak gemonteerd maar aan een raam bevestigd, waarop ook de bak rust. Men kan zoo gemakkelijk van bak verwisselen en is toch steeds van een goede opstelling verzekerd.

Terwijl de inhoud van den bak van het grootere toestel $1\frac{1}{2}$ Liter bedraagt, is deze bij het kleinere toestel slechts $\pm 100 \text{ cm}^3$; daaraan is het zonder twijfel te danken, dat blanco-metingen met het kleinere toestel altijd zeer kleine waarden geven bijv. op gedestilleerd water van 15° steeds kleiner dan $0.1 \times 7 \text{ cm}^3$, meestal practisch verwaarloosbaar.

Het laat zich dan ook aanzien, dat dit toestel in veel gevallen het grootere met voordeel zal kunnen vervangen.

HOOFDSTUK II.

OVER DE SPREIDING VAN VETZUREN.

Reeds Langmuir¹⁾ wees er op, dat de spreiding van palmitinezuur grooter werd, indien aan de vloeistof waarop hij spreidde, zoutzuur werd toegevoegd. Ook temperatuursverhoging tot 45° gaf een dergelijk maar dan veel geprononceerder resultaat.

Adam²⁾ heeft in een reeks onderzoeken tal van vetzuren en vetzuurderivaten volgens de door Langmuir aangegeven methode onderzocht en kon diens uitkomsten volkomen bevestigen. Daaruit blijkt duidelijk, dat het monomoleculaire vliesje van palmitinezuur, dat zich vormt bij hogere temperatuur, per molecuul het dubbele oppervlak inneemt van dat bij kamertemperatuur en zich bovendien door een andere compressibiliteit kenmerkt.

Hij onderscheidde deze vliesjes van elkaar met de namen „expanded” en „condensed” en noemde de temperatuur, die noodig was om het expanded vliesje te doen optreden, de „temperature of expansion”.

Hierachter bevinden zich twee aan zijn werk ontleende tabellen.

Tabel IV laat zien, in welke mate het oppervlak door één molecuul palmitinezuur ingenomen, afhankelijk is van de p_H van de vloeistof, waarop gespreid wordt.

Uit tabel V blijkt, hoe ook de temperatuur, waarbij vergrooting van het spreidend oppervlak begint op te treden (temperature of expansion), van dezen zelfden factor afhankelijk is.

Merkwaardigerwijs blijkt Adam in zijn latere onderzoeken, wel steeds systematisch de temperatuur te veranderen van de vloeistof, waarop hij spreidde, maar deze vloeistof zelf constant van samenstelling te houden. In de meeste gevallen was bij zijn onderzoeken de bak ge-

¹⁾ Langmuir, l.c. pg. 1.

²⁾ Adam, Proc. Roy. Soc. London. A. **99**, 336, (1921); **101**, 452, 516 (1922); **103**, 676, 686 (1923); **106**, 694 (1924); **110**, 423, (1926).

TABEL IV.

p _H van de vloeistof, waarop de meting plaats had.		Oppervlakte, ingenomen door het molecuul palmitinezuur in 10 ⁻¹⁶ cm ² .
Buffer- oplossingen. Temperatuur 10—20°.	1	25.1
	2.9—3.1	25.3
	4.2—4.4	25.4
	5 —5.2	25.1
	6	22.1
	7	21.1
	8.5	21

TABEL V.

p _H van de vloeistof, waarop de meting plaats had.		„Temperature of expansion” van palmitinezuur.
Buffer- oplossingen.	1	(25°).
	3	25°
	5	33°
	5.5	35°
	6	38°
	6.5	40°
	8	>50°

vuld met 0.01 N. HCl. Waar voorloopige proefjes ook mij den grooten invloed dezer factoren op de spreiding der vetzuren toonden, is hiernaar een meer uitgebreid onderzoek ingesteld. Als vetzuren werden hiertoe gekozen palmitine-, myristine-, laurine-, caprine- en oliezuur, die achtereenvolgens werden gespreid op gedestilleerd water, 0.001 N. en 0.1 N. HCl, meestal bij een temperatuur van 1° of 2°, 15° en 40°.

Hoewel het zeer interessant zou zijn ook te weten, hoe deze vetzuren zich zouden gedragen bij spreiden op alcalische vloeistoffen, bleek dit onderzoek echter onmogelijk. De waarden toch, die bij blanco-bepalingen onder die omstandigheden verkregen worden, zijn ondanks alle mogelijke voorzorgen zeer groot en bovendien wisselend. Het mocht nog niet gelukken tot betrouwbare uitkomsten te komen, zoodat de metingen slechts konden plaats vinden op neutrale en zure vloeistoffen.

De gebruikte vetzuren waren alle omgekristalliseerde Kahlbaum-preparaten, die bij titratie het juiste moleculairgewicht bleken te bezitten. Uitgegaan werd van 0.01 N. oplossingen in petroleumaether. Al naar gelang van de te verwachten grootte der spreiding werd 0.005 tot 0.02 cm³ hiervan op het vloeistofoppervlak gebracht met behulp van een uitgeijkt pipetje, op de volgende wijze:

Men vult het tot de vereischte deelstreep, laat de vloeistof zich uit den punt terugtrekken door het pipetje een weinig schuin te houden en spoelt deze met eenige cm³ petroleumaether van buiten schoon. Dit afspoelen is noodzakelijk, omdat zich uit den aard der zaak spreidende stof aan den buitenkant van het pipetje bevindt. Vervolgens blaast men, door het pipetje op den rand van den bak te laten rusten, den inhoud horizontaal op het vloeistofoppervlak uit. Wil men, door gebruik te maken van meer verdunde oplossingen, een grootere hoeveelheid bijv. 0.1 cm³ op het vloeistofoppervlak brengen, dan kan dit bij oplossingen van palmitine-, myristine- en oliezuur zonder bezwaar geschieden, evenmⁿ als het daarbij noodzakelijk is de oplossing horizontaal op het vloeistofoppervlak uit te pipeteeren. Bij laurine- en caprinezuur die, zooals blijken zal, gemakkelijk bij spreiden in de vloeistof oplossen, moet echter steeds zoo weinig mogelijk van de oplossing horizontaal op het vloeistofoppervlak worden gebracht.

Het werken met kleine hoeveelheden heeft echter het groote voordeel, dat het maken van verdunningen achterwege kan blijven, waardoor met een minimum vetvrij glaswerk volstaan kan worden.

Het resultaat der metingen is in druk-oppervlakte krommen samengevat (fig. 2—16). Duidelijk blijkt hieruit het verschillend gedrag der vetzuren bij spreiden.

Bespreking der resultaten.

Bezien we fig. 2—4 betreffende het palmitinezuur, dan blijkt, dat op gedestilleerd water een temperatuursverhoging van 1° tot 28° nagenoeg geen vergroting van de spreiding ten gevolge heeft; bij 41° is het oppervlak, dat één molecuul inneemt, slechts met $\pm 5 \text{ \AA}^2$ vermeerderd. Een kracht van 20 dynes per cm is niet in staat deze grootten merkbaar te veranderen.

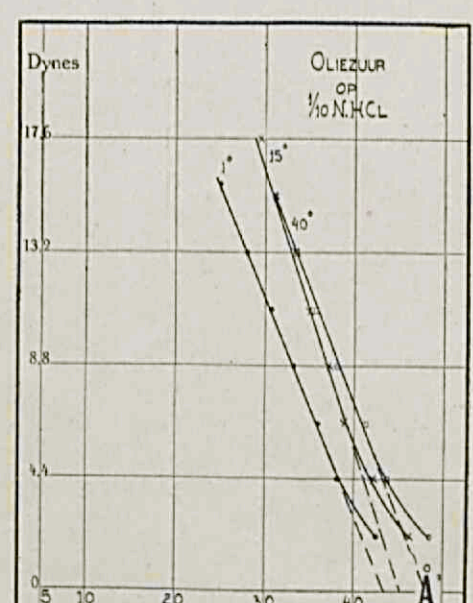
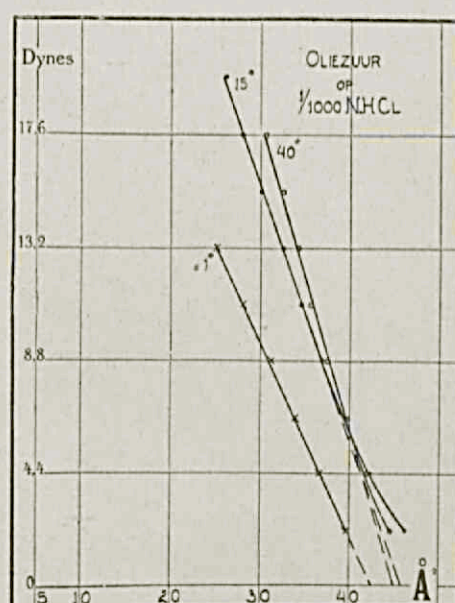
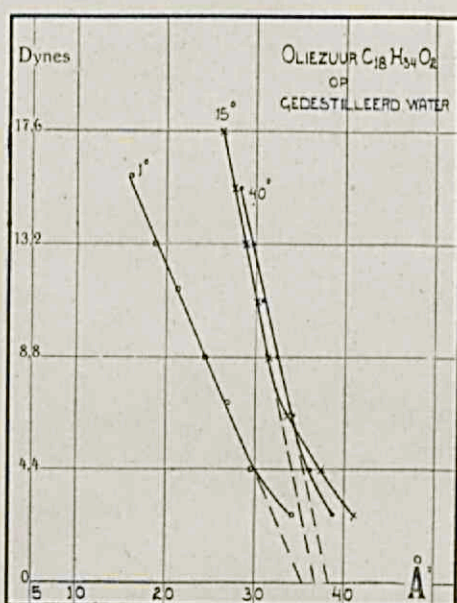
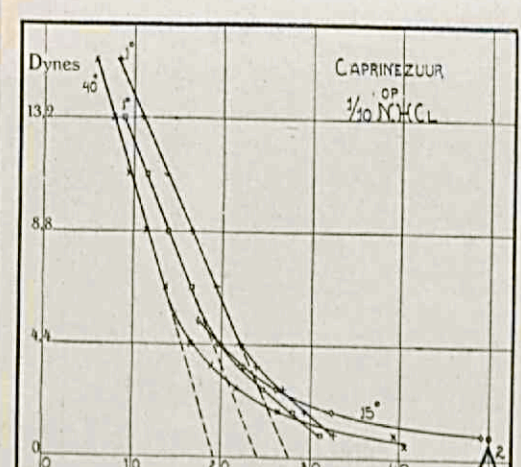
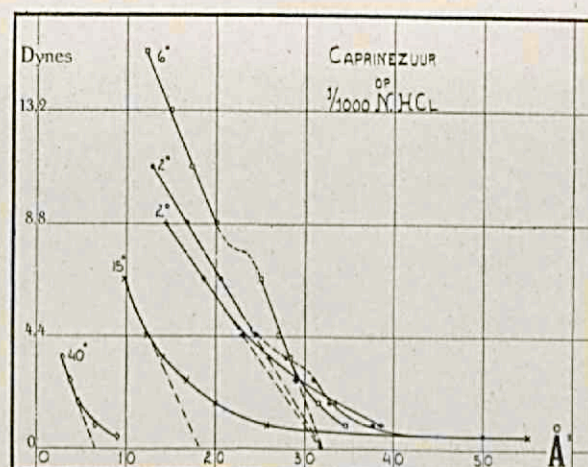
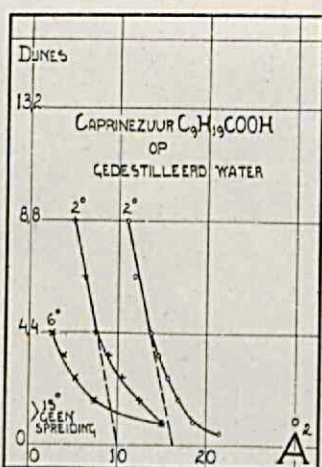
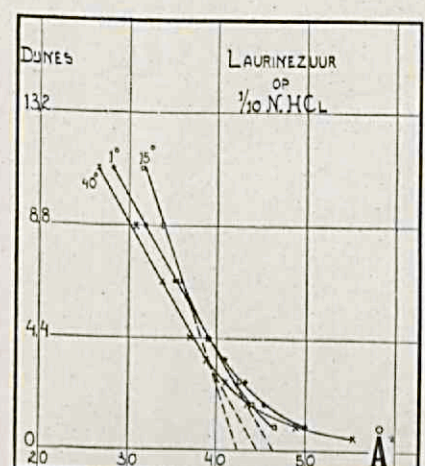
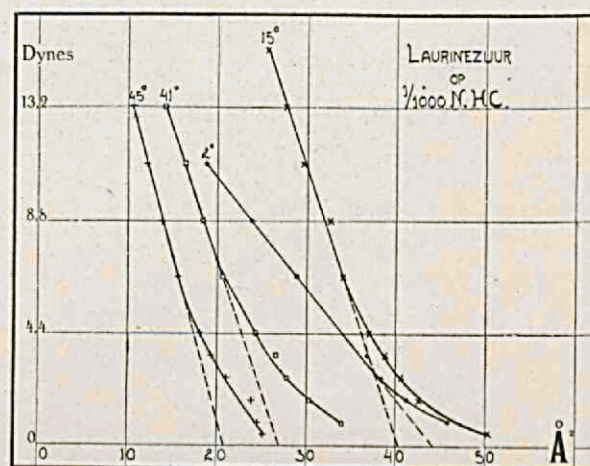
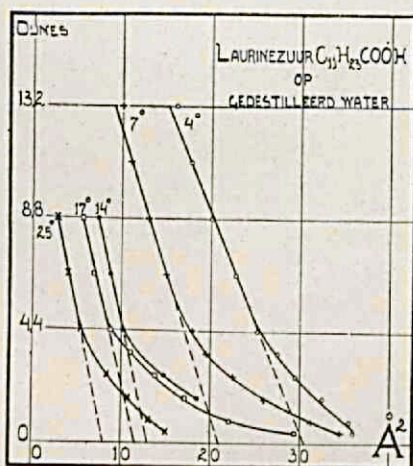
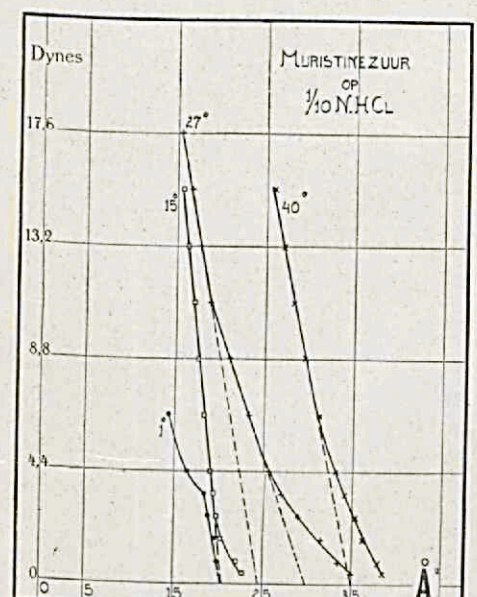
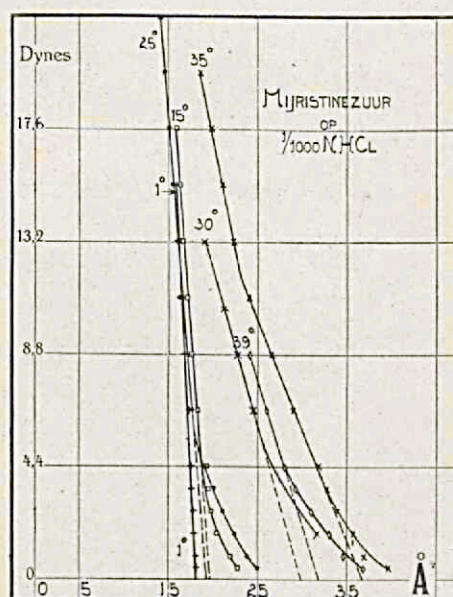
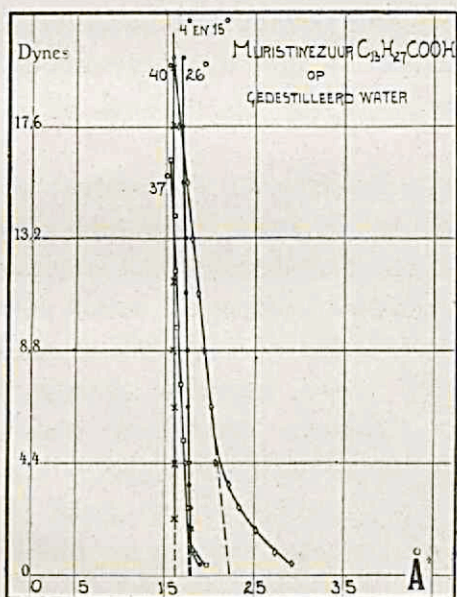
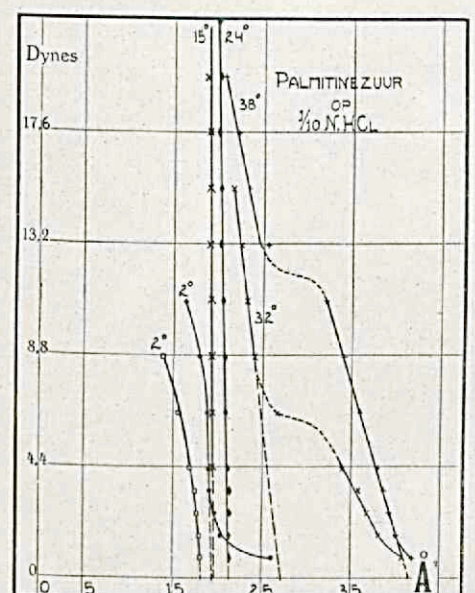
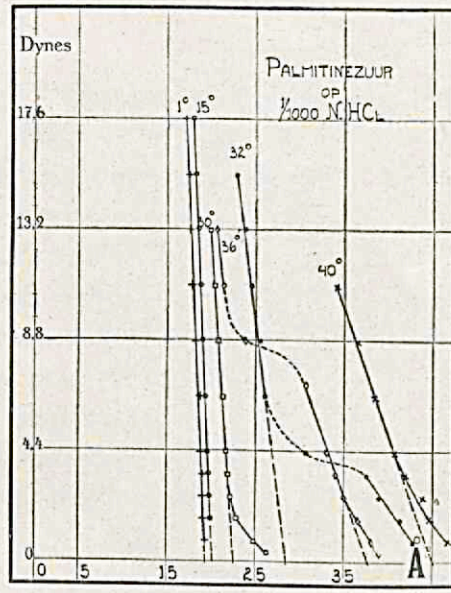
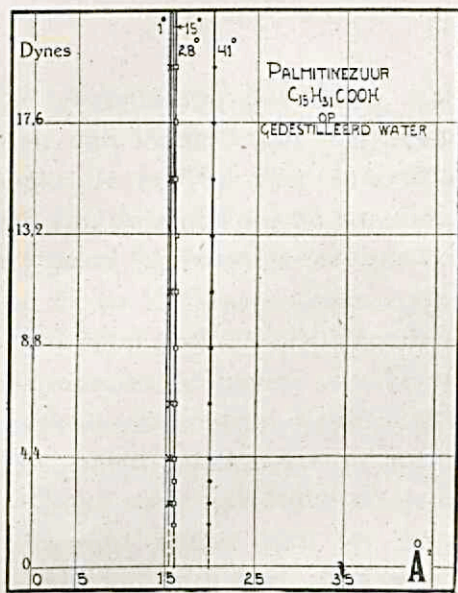
Op 0.001 N. HCl wordt het oppervlak per molecuul bij een temperatuur van 40° ongeveer het dubbele en is dus de overgang van den „condensed” toestand in den „expanded” volkomen. Bij tusschenliggende temperaturen als 32° en 36° zien we bij een bepaalden druk het „expanded” vliesje toch nog in den „condensed” toestand teruggaan. Uit het verloop der krommen is direct te zien, hoe veel gemakkelijker het „expanded” vliesje te comprimeeren is. Op 0.1 N. HCl blijven de resultaten vrij wel dezelfde als op 0.001 N., alleen blijkt hier het monomoleculaire vliesje, dat bij 1° ontstaat, zoo fragiel te zijn, dat het nagenoeg geen druk kan weerstaan. Het breekt en er vormen zich al spoedig, zelfs voor het bloote oog zichtbaar, stukjes palmitinezuur. Vermindert men, voordat duidelijk breking van dit vliesje is opgetreden, den druk hierop door gewichtjes van het balansje af te halen, dan treedt de oorspronkelijke grootte niet meer op. Dit in tegenstelling met de overige metingen bij het palmitinezuur, waar volkomen reversibiliteit bleek te bestaan.

Fig. 5—7 betreffende het myristinezuur doen mutatis mutandis hetzelfde zien als die van het palmitinezuur. Ook hier treedt bij kamertemperatuur steeds de „condensed” toestand op, die bij temperatuursverhoging al spoedig in den „expanded” overgaat.

Fig. 8—13, die het gedrag van laurine- en caprinezuur bij spreiding weergeven laten echter een geheel ander beeld zien. Terwijl toch bij palmitine- en myristinezuur een temperatuursverhoging steeds een vergroting der spreiding tengevolge heeft, zien we hier juist het tegenovergestelde.

Laurinezuur, dat bij 4° op gedestilleerd water nog per molecuul een grootte inneemt van $30 \text{ \AA}^2$, brengt het bij 25° nauwelijks tot $8 \text{ \AA}^2$, caprinezuur, dat bij 2° op gedestilleerd water nog per molecuul $16 \text{ \AA}^2$ inneemt, is bij 25° zelfs niet meer te meten.

De verklaring hiervan is eenvoudig. Het meer gekromde verloop der curven, gepaard met een zeer snelle breking, doet reeds vermoeden, dat oplossen plaats heeft. Gaat men dan ook na, hoe het hier



met de reversibiliteit gesteld is, dan blijken op gedestilleerd water de metingen van beide zuren niet reversibel te zijn. Men is dan ook genoodzaakt de meting zeer snel te verrichten, zoo men niet een groot gedeelte van de stof voor de spreiding verloren wil laten gaan. Dit is ook nog het geval bij laurinezuur, gemeten tusschen 40° en 45° op 0.001 N. HCl; bij 2° en 15° daarentegen op dezelfde vloeistof, wordt de spreiding reeds veel beter, om bij alle drie de onderzochte temperaturen op 0.1 N. HCl uitkomsten te geven, die bij niet te grooten druk reversibel zijn. Natuurlijk bezitten deze monomoleculaire vliesjes niet meer die groote onoplosbaarheid, welke het palmitinezuur-vliesje kenmerkt. Daar toch blijft zelfs bij twee uur staan de grootte van het oppervlak onveranderd; bij laurinezuur echter zien we op 0.1 N. HCl van 1° toch nog na eenigen tijd het oppervlak afnemen. Na tien minuten is dit gemakkelijk te meten.

Evenals bij laurinezuur wordt ook bij caprinezuur op 0.001 N. en 0.1 N. HCl de spreiding beter, maar blijft hier onvolkomen. De metingen zijn irreversibel, hoe snel ze ook geschieden.

Opgemerkt dient nog te worden, dat het verloop van de krommen, zoowel bij laurine- als bij caprinezuur, op een „expanded” spreiding wijst.

De laatste fig. 14—16 laten zien, dat oliezuur ook steeds spreidt in den „expanded” toestand en dat deze spreiding goed verloopt bij alle onderzochte temperaturen op de drie vloeistoffen. Slechts een betrekkelijk kleine vergrooting van het oppervlak, dat één molecuul inneemt, treedt op al naar gelang van den meer of minderen zuurgraad van het water, waarop gespreid wordt. Het is de bij kamertemperatuur reeds optredende „expanded” spreiding van oliezuur, die het oppervlak per molecuul dubbel zoo groot maakt als dat van palmitinezuur en niet de dubbele band, zooals *Langmuir* zich dat eerst dacht.

Tracht men verzadigde vetzuren met kortere keten als caprinezuur te spreiden, dan gelukt dit niet. Wel slaat het balansje, zoodra men de oplossing van het vetzuur op het vloeistofoppervlak brengt, sterk uit, maar het vliesje blijkt geen druk te kunnen weerstaan. Men duwt de moleculen als het ware bij aanschuiven in oplossing. Beschouwt men echter het oppervlak, dat een dergelijk vetzuur inneemt, wanneer het balansje uitslaat, dan blijkt dit oppervlak veel grooter te zijn als overeenkomst met een spreiding van $\pm 45 \text{ \AA}^2$ (de „expanded” spreiding) per molecuul. Het oplosmiddel kan dezen uitslag niet veroorzaken, omdat dezelfde hoeveelheid van een goed spreidend vetzuur onder gelijke omstandigheden bij een dergelijk oppervlak niet den geringsten uitslag

geeft. Men kan dit uitslaan van het balansje moeilijk anders verklaren dan door aan te nemen, dat de lagere vetzuren zich niet meer verticaal, maar meer horizontaal op het wateroppervlak oriënteren. Thermodynamisch heeft Langmuir in een van zijn laatste publicaties¹⁾ uit de vergelijking van Boltzmann afgeleid, dat dit ook bij de lagere vetzuren werkelijk het geval moet zijn.

In tabel VI zijn de uit de krommen door extrapolatie verkregen waarden voor het oppervlak per molecuul, alsmede de hieruit te berekenen compressibiliteit, vereenigd. Men ziet ook hieruit den invloed, dien de temperatuur heeft op de grootte van het oppervlak, dat door één molecuul wordt ingenomen, bij spreiding op gedestilleerd water, 0.001 N. en 0.1 N. HCl. In die gevallen, waar de krommen nagenoeg loodrecht verlopen en dus de kracht, die noodig zou zijn om het vliesje tot de helft te comprimeeren ∞ wordt, is deze kracht in de tabel onder compressibiliteit als > 100 dynes opgegeven. De cijfers onder compressibiliteit vermeld, doen zien, dat deze kracht bij palmitine- en myristinezuur voor het „expanded” vliesje daalt tot ± 20 , bij laurine- en caprinezuur tot ± 7 dynes.

Tabel VII doet meer in het bijzonder den invloed van den zuurgraad zien, bij zooveel mogelijk gelijk gehouden temperatuur.

Uit het vooraangaande blijkt, dat toevoeging van zoutzuur aan de vloeistof, waarop gespreid wordt, de spreiding steeds in eenzelfde richting beïnvloedt. Het doet deze grooter worden, bevordert het optreden van den „expanded” toestand en kan zelfs tot een meetbare spreiding leiden, waar deze op gedestilleerd water uitbleef.

Door temperatuursverandering kan de spreiding zoowel toe- als afnemen. Waar zij de oplosbaarheid van het vetzuur niet noemenswaard verhoogt, vergroot zij de spreiding, in het tegenovergestelde geval vermindert ze die en kan haar geheel doen verdwijnen.

De kleine verschillen, die bij verandering van de temperatuur of den zuurgraad in de grootte der spreiding ontstaan, zullen wel moeten worden toegeschreven aan een meer of minder sterke fixatie van de polaire COOH-groep aan de oppervlakte van het water. Het verschil in grootte van spreiding en van compressibiliteit, dat optreedt bij den overgang van het vliesje van den „condensed” in den „expanded” toestand zal echter op andere wijze verklaard moeten worden. Reeds Adam sprak in zijn eerste publicatie het vermoeden uit, dat het verschil tusschen deze beide vormen van spreiden, toegeschreven zou moeten worden aan

¹⁾ Langmuir, 3rd. Colloid Symposium Monograph (1925).

TABEL VI.

Spreiding uit petroleumaether.									
Vetzuren.	Spreiding op gedestilleerd water.			Spreiding op $\frac{1}{1000}$ N. HCl.			Spreiding op $\frac{1}{10}$ N. HCl.		
	Temperatuur.	Oppervlakte per molecuul.	Compressibiliteit.	Temperatuur.	Oppervlakte per molecuul.	Compressibiliteit.	Temperatuur.	Oppervlakte per molecuul.	Compressibiliteit.
Palmitinezuur	1° 15° 28° 41°	Å² 15 16 16 20	dynes. > 100 > 100 > 100 > 100	1° 15° 30° 32° 36° 40°	Å² 19 20 22.5 28.5 37.5 45	dynes. > 100 > 100 57 37 20 22	2° 15° 24° 32° 38°	Å² ± 18.5 20 21 27 42	breekbaar > 100 > 100 37 23
Myristinezuur	4° 15° 26° 37° 40°	16 16 18 18 22	> 100 > 100 > 100 55 33	1° 15° 25° 30° 35° 39°	18 19.5 19 30 37 32	> 100 > 100 > 100 18 19 18	1° 15° 27° 40°	20 20 25 & 30 35	breekbaar 33 24 & 14 29
Laurinezuur	4° 7° 14° 17° 25° > 25°	± 30 ± 21 ± 13 ± 12 ± 8 <i>niet meetbaar</i>	13 12 ± 11 ± 9 ± 7	2° 15° 41° 45°	44 40 27 20.5	10 20 13 13	1° 15° 40°	46 42.5 44.5	14 21 13
Caprinezuur	2° 6° 15° > 15°	10—16 <i>niet meetbaar</i> " <i>geen spreiding</i>	9 <i>niet meetbaar</i>	2° 6° 15° 40°	32 32 ± 18 <i>niet meetbaar</i>	9 15 ± 7	1° 15° 40°	23—28 <i>niet meetbaar</i> 19.5	10 <i>niet meetbaar</i> 11
Oliezuur	1° 15° 40°	35.5 37 38.5	15 29 28	1° 15° 40°	42.5 45 46	16 23 26	1° 15° 40°	43.5 45 48.5	19 24 21

TABEL VII.

Vetzuren.		Vloeistof, waarop gespreid werd.	Spreiding uit petroleumaether.					
			Oppervlakte, ingenomen door 1 molecuul in Å ² bij een temperatuur van					
			1°—2°	4°—7°	14°—17°	24°—28°	30°—32°	36°—38° 40°—45°
Palmitinezuur	gedest. water		15		16	16		20
	$\frac{1}{1000}$ N. HCl		19		20		22.5—28.5	37.5 45
	$\frac{1}{10}$ N. HCl		± 18.5		20	21	27	42
Myristinezuur	gedest. water			16	16	18		18 22
	$\frac{1}{1000}$ N. HCl		18		19.5	19	30	37
	$\frac{1}{10}$ N. HCl		20		20	25 & 30		35
Laurinezuur	gedest. water			30—21	13—12	± 8	niet meetbaar	27—20.5 44.5
	$\frac{1}{1000}$ N. HCl		44		40			
	$\frac{1}{10}$ N. HCl		46		42.5			
Caprinezuur	gedest. water		10—16	niet meetbaar	geen spreiding			
	$\frac{1}{1000}$ N. HCl		32	32	± 18	niet meetbaar		19.5
	$\frac{1}{10}$ N. HCl		24—28		?			
Oliezuur	gedest. water		35.5		37			38.5
	$\frac{1}{1000}$ N. HCl		42.5		45			46
	$\frac{1}{10}$ N. HCl		43.5		45			48.5

een verandering van aggregatietoestand. Later is hij hier weer op teruggekomen, maar ook thans neemt hij dit evenals andere onderzoekers op dit gebied zooals Cary, Schofield en Rideal weer aan.

De „temperature of expansion” zou dan het smeltpunt van het monomoleculaire vliesje zijn. Vergelijken we echter deze temperatuur met het smeltpunt, dan zien we al naar gelang van den zuurgraad van het water, waarop gespreid wordt, groote verschillen bijv. terwijl het smeltpunt van palmitinezuur 62° bedraagt, ligt de „temperature of expansion” op 0.001 N. HCl tusschen 35° en 40° . Laurine- en caprinezuur, wier smeltpunten respectievelijk 44° en 31° zijn, spreiden op 0.1 N. HCl bij 1° reeds in den „expanded” toestand.

Men moet dan echter bedenken, dat men hier voor zich heeft, een monomoleculair bidimensionaal vliesje, waarvan door sterkere fixatie der polaire groep, het smeltpunt zich in de richting van dat der paraffinen zou kunnen bewegen. De dubbele grootte van het oppervlak per molecuul, die het „expanded” vliesje kenmerkt, zal men of moeten zoeken in het feit, dat de moleculen nu niet meer loodrecht op het wateroppervlak staan, maar daarmee een scherpen hoek vormen, of in een structuurverandering van het molecuul zelf.

Vergelijkt men de druk-oppervlakte krommen der onderzochte verzadigde vetzuren bij spreiding op eenzelfde vloeistof met elkaar, bijv. fig. 2, 5, 8 en 11, dan is hieruit gemakkelijk den invloed te zien, die de lengte der vetzuurketen op de spreiding der verschillende vetzuren heeft. Hoe langer de keten, hoe grooter de druk is die op het vliesje uitgeoefend kan worden en hoe minder kans op oplossen bestaat. Men moet de spreiding van een vetzuur beschouwen als af te hangen van twee in zekeren zin antagonistisch werkende krachten. De polaire COOH-groep, die naar het water toe wil en oplossen zal veroorzaken en de onoplosbare vetzuurrest, die de stof uit het water tracht te houden. De resultante van beide krachten bepaalt den aard der spreiding.

Invloed van het oplosmiddel.

Tog nog toe hebben we de temperatuur en den zuurgraad als factoren leeren kennen die invloed uitoefenen op de spreiding van een vetzuur. Er blijft echter nog een derde factor ter bespreking over en wel het oplosmiddel. Alle onderzoekers gebruiken hiervoor petroleumaether, aether of benzine. Deze oplosmiddelen geven bij spreiden hetzelfde resultaat. Gebruikt men echter alcohol of aceton, dan treden aanzienlijke verschillen op. Men gaat in het algemeen kleinere waarden voor het oppervlak per

molecuul vinden. Van deze oplosmiddelen is alcohol, als de belangrijkste, hier uitvoeriger nagegaan. Daartoe werden van de hierboven besproken vetzuren 0.01 N. oplossingen in alcohol van 96 % gemaakt en deze wederom op gedestilleerd water, 0.001 N. en 0.1 N. HCl onderzocht.

Van deze alcoholische oplossingen moet een zeer kleine hoeveelheid 0.005—0.02 cm³ in horizontale richting op de oppervlakte van de vloeistof gepipeteerd worden. Gebruikt men meer, dan blijkt al spoedig, dat geen constante, maar steeds wisselende en wel te kleine uitkomsten verkregen worden. De alcoholconcentratie wordt plaatselijk te groot en neemt daardoor waarschijnlijk vetzuur mee in oplossing.

De resultaten zijn vereenigd in de fig. 17—30.

Vergelijkt men de druk-oppervlakte krommen uit deze figuren met die uit de fig. 2—16, dan blijkt, dat thans in het algemeen een verschuiving naar links is opgetreden. De waarden voor het oppervlak per molecuul zijn dus kleiner, terwijl de compressibiliteit nagenoeg dezelfde is gebleven. Dit komt zeer duidelijk uit in fig. 17, 20 en 28 bij de spreiding van palmitine-, myristine- en oliezuur op gedestilleerd water. Bij laurinezuur, fig. 23, is dit in mindere mate het geval, wat wel zal moeten toegeschreven aan verkregen grootere routine. Een meting verloopt toch thans in een minimum van tijd, zoodat de factor van het oplossen, die zooals we vroeger zagen, bij laurinezuur een groote rol speelt, meer uitgeschakeld wordt.

De vetzuurketen van caprinezuur bleek te kort om uit alcoholische oplossing op gedestilleerd water spreiding te geven.

Op 0.001 N. HCl vindt men nog slechts bij 40° bij palmitine-, myristine- en oliezuur (fig. 18, 21 en 29) te kleine waarden. Uit het verloop der krommen volgt, dat wel reeds de „expanded” toestand is opgetreden, maar ook, dat deze spreiding nog onvoldoende is. Bij laurine- en caprinezuur (fig. 24 en 26) is de spreiding reeds dezelfde als uit petroleumaether.

Op 0.1 N. HCl wordt dit ook door de overige onderzochte vetzuren bereikt. Krommen, zooals bij palmitinezuur door spreiding uit petroleumaether zeer gemakkelijk verkregen worden, waarbij onder een gegeven druk het „expanded” vliesje nog in den „condensed” overgaat, traden thans niet op.

In tabel VIII zijn de geëxtrapoleerde waarden, gevonden voor de grootte van het oppervlak, dat door één molecuul wordt ingenomen, vereenigd.

SPREIDING DER VETZUREN UIT ALCOHOLISCHE OPLOSSING.

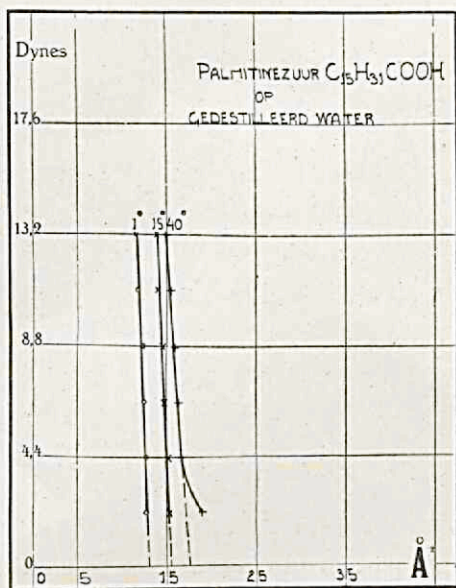


Fig. 17.

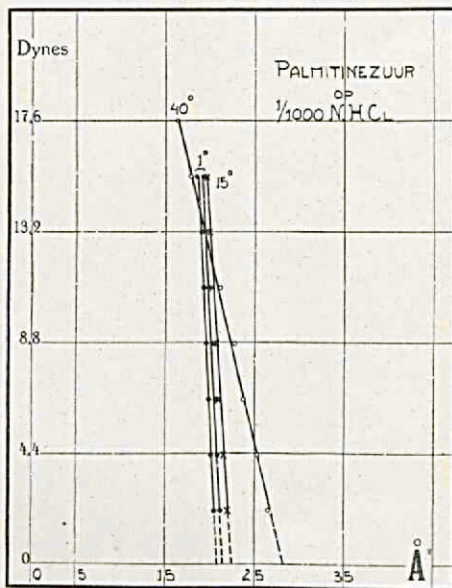


Fig. 18.

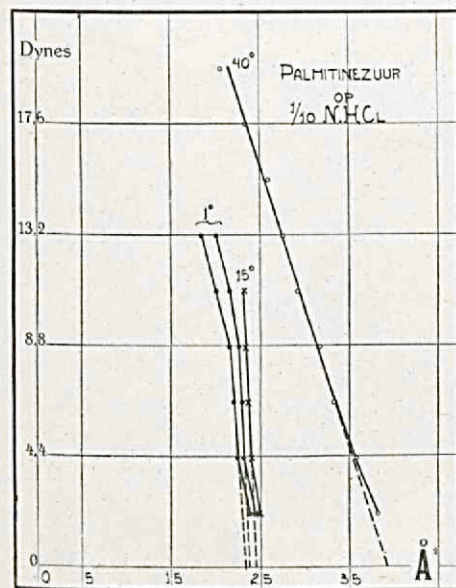


Fig. 19.

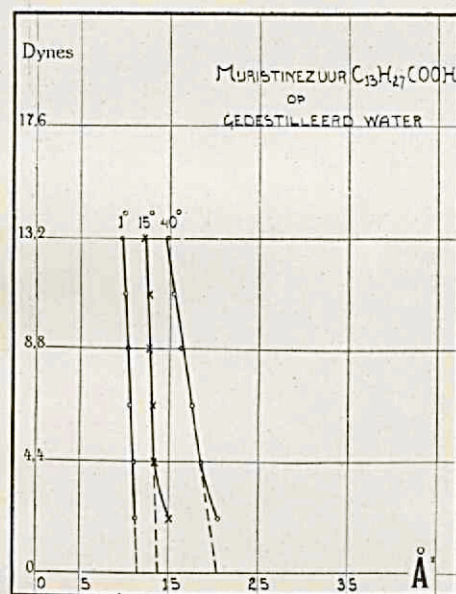


Fig. 20.

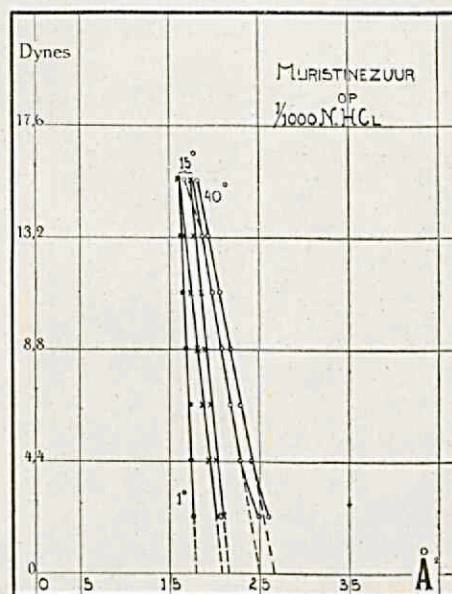


Fig. 21.

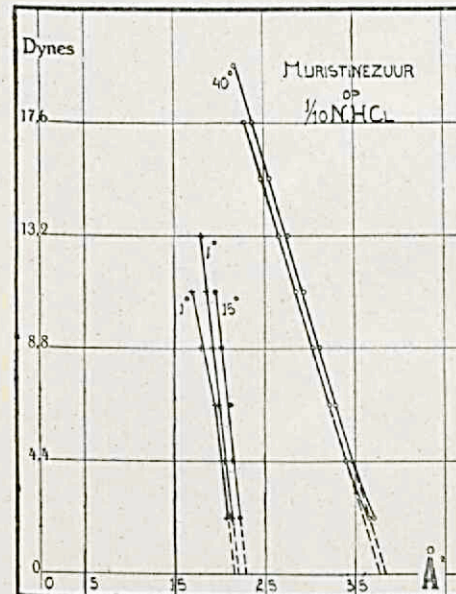


Fig. 22.

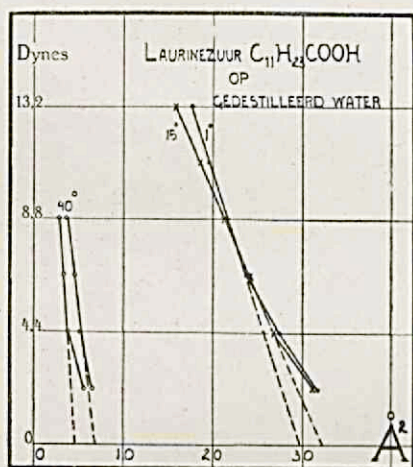


Fig. 23.

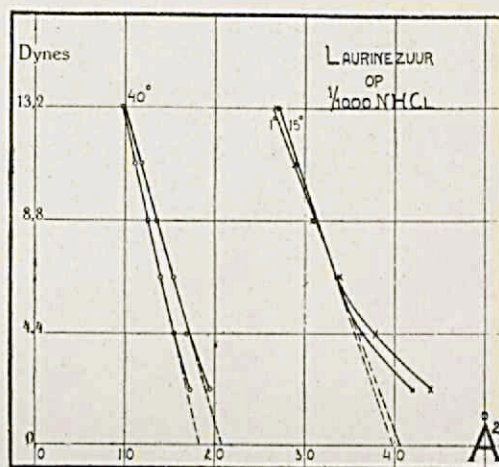


Fig. 24.

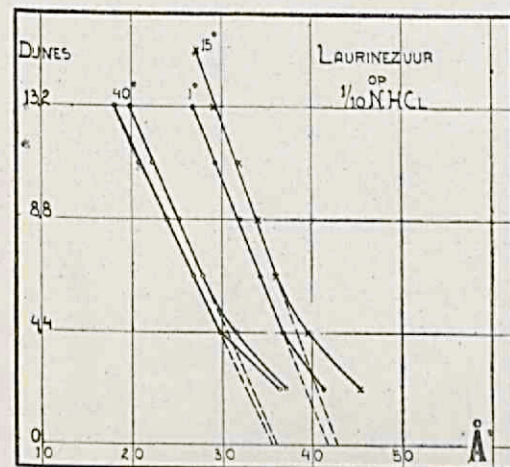


Fig. 25.

Caprinezuur spreidt
uit alcoholische oplossing op
gedestilleerd water
niet.

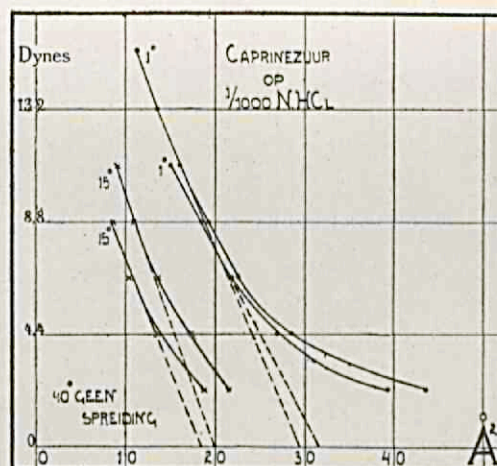


Fig. 26.

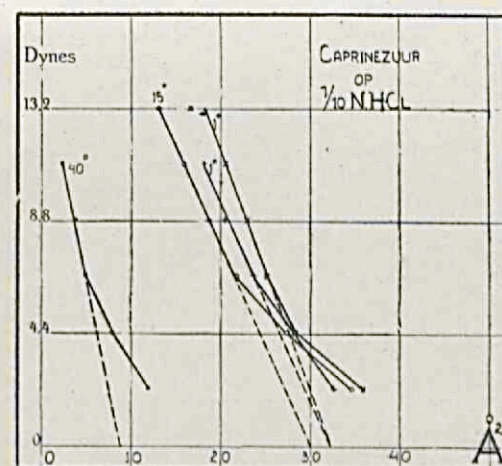


Fig. 27.

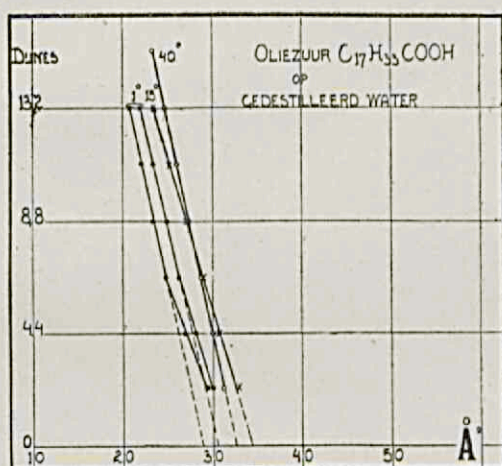


Fig. 28.

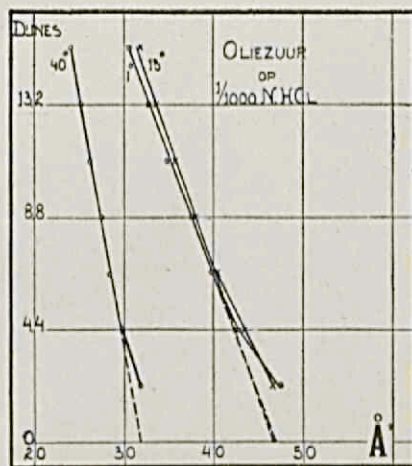


Fig. 29.

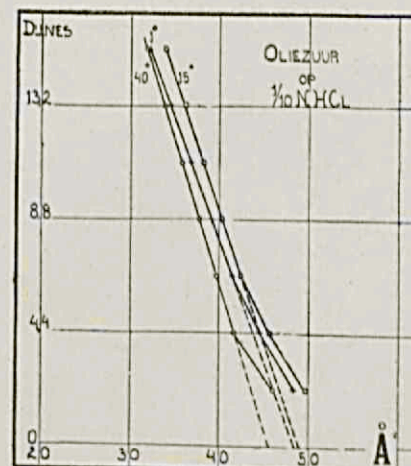


Fig. 30.

TABEL VIII.

Spreiding uit alcohol.				
Vetzuren.	Vloeistof, waarop gespreid werd.	Oppervlakte, ingenomen door 1 molecuul in Å ² bij een temperatuur van		
		1°	15°	40°
Palmitinezuur	gedest. water	12.5	15.5	17.5
	$\frac{1}{1000}$ N. HCl	21	22.5	28
	$\frac{1}{10}$ N. HCl	23	24	39
Myristinezuur	gedest. water	11.5	13.5	20.5
	$\frac{1}{1000}$ N. HCl	18	21.5	25.5
	$\frac{1}{10}$ N. HCl	21.5	22.5	38
Laurinezuur	gedest. water	30	32	5
	$\frac{1}{1000}$ N. HCl	40	40	20
	$\frac{1}{10}$ N. HCl	42	42.5	36
Caprinezuur	gedest. water	<i>geen spreiding</i>		
	$\frac{1}{1000}$ N. HCl	31	19	<i>niet meetbaar</i>
	$\frac{1}{10}$ N. HCl	32.5	30	9
Oliezuur	gedest. water	29.5	34.5	32.5
	$\frac{1}{1000}$ N. HCl	47	47	32
	$\frac{1}{10}$ N. HCl	48.5	49	45.5

Het is moeilijk voor het vinden van de te kleine getallen op gedestilleerd water en 0.001 N. HCl, een verklaring te vinden. Dat bij spreiding uit alcohol gemakkelijker een gedeelte der stof in oplossing zou gaan, moge gelden voor laurinezuur en caprinezuur, mogelijk zelfs voor oliezuur op 0.001 N. HCl bij 40°, maar in de overige gevallen moet de oorzaak een andere zijn. Heeft men toch op het vloeistofoppervlak een vliesje bijv. van palmitine- of myristinezuur, waarvan de grootte in verhouding tot het aantal opgebrachte moleculen te klein is en zuurt men achter de glazen staaf de vloeistof aan tot bijv. 0.1 N. HCl, dan slaat al gauw het balansje uit en wordt de goede eindspreiding bereikt. De spreidende stof lag dus werkelijk quantitatief aan het oppervlak. Mogelijk speelt hier de associatie van het vetzuur in het oplosmiddel een rol.

Hoe sterk de zuurgraad en de temperatuur van de vloeistof, waarop gespreid wordt, de spreiding bevorderen, blijkt uit het volgende.

Een oliezuuremulsie werd gemaakt door oplossen van een bekende hoeveelheid (60 mg) oliezuur in eenige cm³ alcohol van 96 %, waarna deze oplossing onder omroeren in 100 cm³ water van $\pm 80^\circ$ uitgegoten werd. Na afkoelen en zoo noodig aanvullen tot 100 cm³ werd van de verkregen emulsie 0.02 cm³ gespreid. Uit tabel IX, die betrekking heeft op twee verschillende oplossingen, blijkt nu, dat bij spreiding van een dergelijke colloïdale oplossing, mits de temperatuur en de zuurgraad van de vloeistof, waarop de spreiding plaats heeft, juist gekozen zijn, toch nog de goede eindwaarde kan worden bereikt.

TABEL IX.

Oppervlakte, ingenomen door het molecuul oliezuur.				
Vloeistof, waarop gespreid werd.	Temperatuur 15°		Temperatuur 40°	
	Å ²		Å ²	
gedest. water	20.7	20.8	21.2	21.5
10 ⁻³ N. HCl	23.4	23	23.6	24
10 ⁻¹ N. HCl	38.4	35.1	46	45.5

Ook uit het gedrag van een oliezuuremulsie, gemaakt met behulp van arabische gom, nadat gebleken was, dat onder de omstandigheden van de proef de gom een te verwaarlozen spreiding gaf, valt hetzelfde op te merken. Hiertoe werd 0.5 gram oliezuur, na toevoeging van een gelijke hoeveelheid gom, in een vetvrijen mortier met water geëmulgeerd en van de verkregen emulsie, na aanvullen tot 100 cm³, 0.02 cm³ gespreid.

TABEL X.

Oppervlakte, ingenomen door het molecuul oliezuur.				
Vloeistof, waarop gespreid werd.	Temperatuur 15°		Temperatuur 40°	
	Å ²		Å ²	
gedest. water	6 vergroot zich tot 15		6 vergroot zich tot 15	
10—5 N. HCl	6	" " " 15	6	" " " 20
10—4 N. HCl	6	" " " 15	10	" " " 30
10—3 N. HCl	46.5	47.1	47.5	47.5
10—1 N. HCl	48.5	47.9	48	48.2

} deze eindwaarden niet constant.

Tabel X, waarin de resultaten verkregen met twee verschillende oplossingen, vereenigd zijn, doet zien, dat deze emulsie, die op gedestilleerd water een kleinere spreiding geeft als eerstgenoemde, die met behulp van alcohol gemaakt was, op 0.001 N. HCl bij kamertemperatuur reeds de goede eindwaarde geeft. Het aantal metingen is nog te onvolledig, om dit verschil in spreiding tusschen beide emulsies nader te kunnen verklaren. Wel is in het algemeen de indruk verkregen, dat bij het spreiden van emulsies op gedestilleerd water, die emulsies, die zonder toevoeging van alcohol zijn gemaakt, ongeveer een derde van de waarde geven, die men bij spreiden uit petroleumaether verkrijgt; emulsies onder toevoeging van alcohol gemaakt, geven meestal de helft van deze grootte.

Nog kan hieraan worden toegevoegd, dat ook de *tijd* in beide gevallen invloed op de spreiding gaat uitoefenen. Men moet soms vijf tot tien minuten wachten, voordat op gedestilleerd water de eindspreiding

bereikt is en dan blijkt dikwijls toch nog, dat op den langen duur de spreiding zich vergroot. De boven opgegeven waarden, verkregen bij spreiding op gedestilleerd water, zijn dus slechts bij benadering juist.

Bleek uit het voorafgaande, dat een colloïdale oliezuuremulsie tot spreiden is te brengen, dit blijkt ook mogelijk te zijn met zeepoplossingen.

Spreiding van zeepoplossingen.

Voorloopige proefjes, ingesteld om den invloed na te gaan van zuurgraad en temperatuur op de spreiding van deze oplossingen, deden hier echter zien, dat een verhooging van den zuurgraad van de vloeistof, waarop gespreid wordt, niet altijd een vergrooting van het oppervlak met zich meebrengt, maar zelfs tot een verkleining kan leiden, die eerst bij nog grootere zuurconcentratie weer verdwijnt.

Om hierin een beter inzicht te krijgen werden 0.01 N. zeepoplossingen gemaakt van palmitine-, laurine- en oliezuur door deze vetzuren in iets meer dan de theoretische noodige hoeveelheid natronloog op te lossen. Van deze oplossingen werd al naar gelang van de grootte der spreiding 0.005—0.02 cm³ op een vloeistofoppervlak van 1°, 15° en 40° gebracht.

Thans werd echter niet alleen op gedestilleerd water, 0.001 N. en 0.1 N. HCl onderzocht, maar ook nog op enkele tusschenliggende zoutzuurconcentraties, die bij de krommen nader onder hun waterstof-exponent staan opgegeven.

Uit de figuren 34—36 ziet men, dat een verhooging van den zuurgraad bij laurinezuurzeep regelmatig tot een vergrooting van het oppervlak per molecuul leidt, totdat tenslotte de goede eindwaarde wordt bereikt; bij palmitinezure- en oliezure-zeep is dit echter niet het geval (fig. 31—33, 37—39). Daar treedt bij een bepaalde zoutzuurconcentratie $\pm$ 0.001 N. een minimum waarde voor de spreiding op, zooals dit duidelijker blijkt uit fig. 40 en 41, waar de grootte van het oppervlak, ingenomen door één molecuul, als functie van de p_H staat aangegeven.

Ook voor deze zeepoplossingen vindt men op gedestilleerd water weer een veel te kleine spreiding. Evenals bij de oliezuuremulsies werd opgemerkt, wordt ook hier deze spreiding eerst na eenige minuten bereikt. Het vinden van deze kleine waarden kan mogelijk verklaard worden, doordat de moleculen in een zeepoplossing geassocieerd zijn en dat deze associatie ten deele op het wateroppervlak kan blijven bestaan. Zuur verbreekt haar, waardoor de zeep groter gaat spreiden maar waarbij al spoedig vetzuur vrij komt. Dit spreidt bij palmitinezuur en oliezuur

SPREIDING VAN ZEEPOPLOSSINGEN.

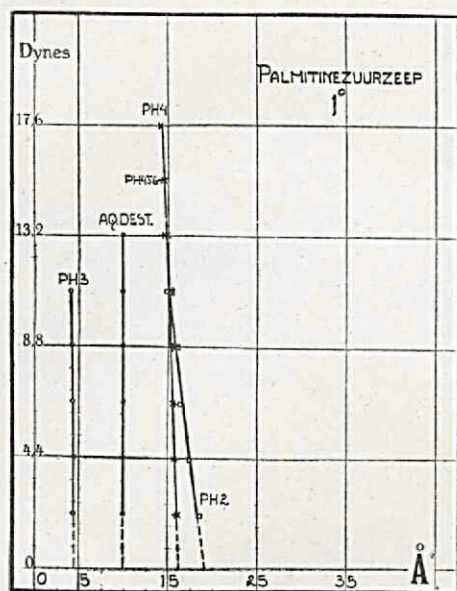


Fig. 31.

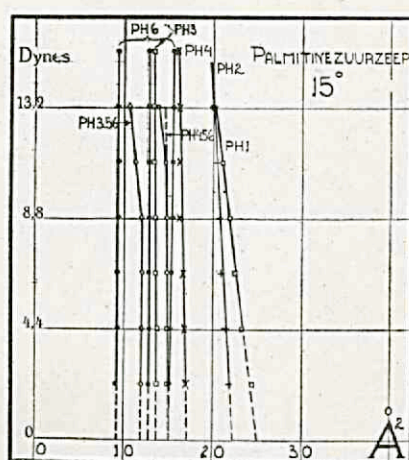


Fig. 32.

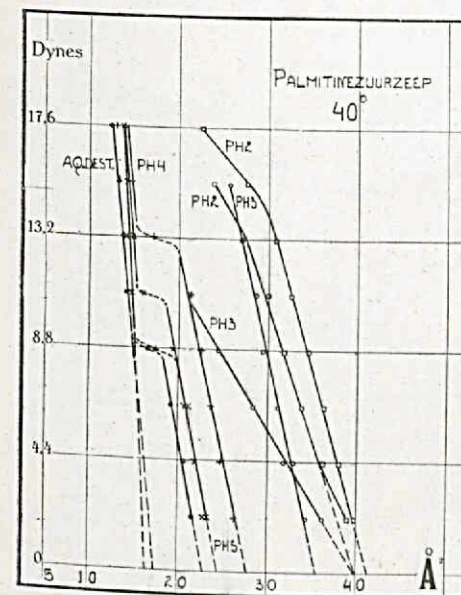


Fig. 33.

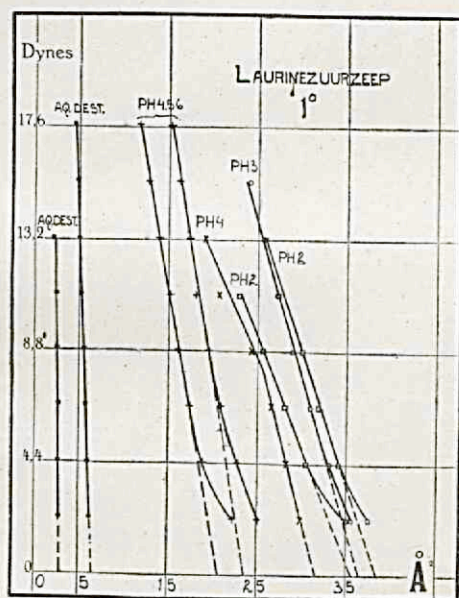


Fig. 34.

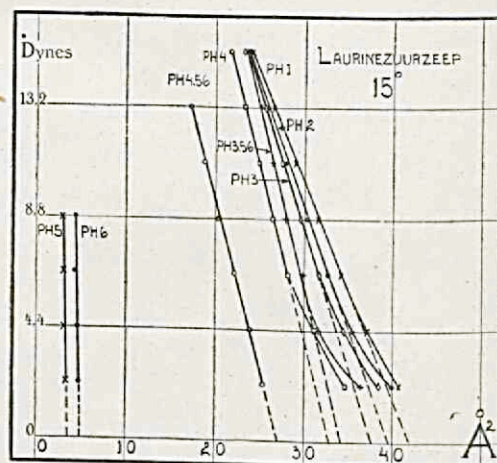


Fig. 35.

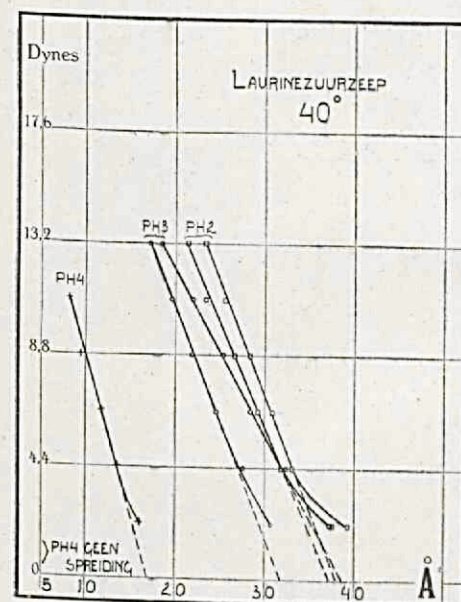


Fig. 36.

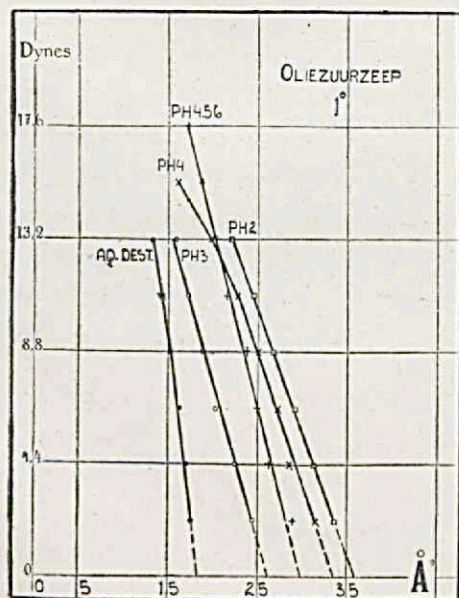


Fig. 37.

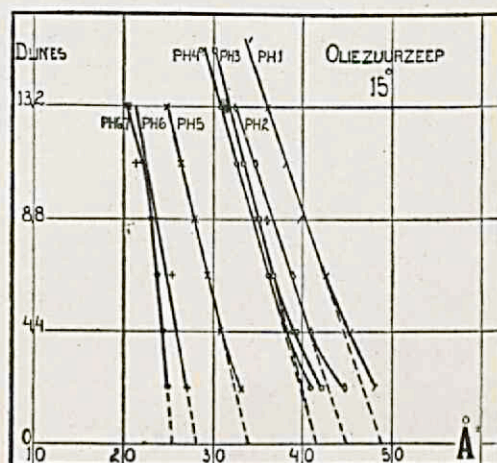


Fig. 38.

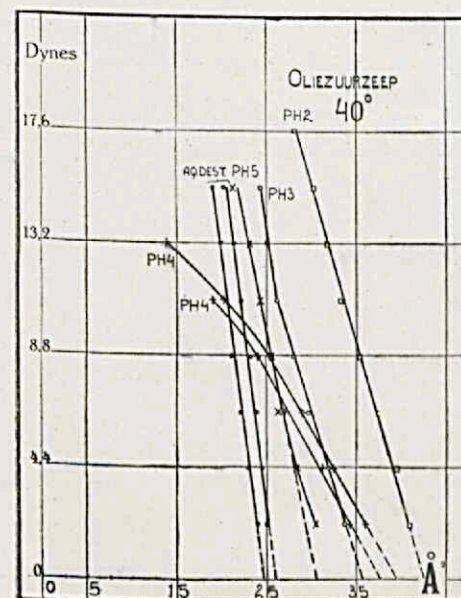


Fig. 39.

minimaal, om eerst wanneer de zuurconcentratie in den bak 0.01 tot 0.1 N. gaat bedragen, weer monomoleculair te gaan spreiden.

Vroeger zagen wij reeds, dat laurinezuur voor zoover het niet door een te hooge temperatuur in oplossing gaat, grootere neiging tot spreiden vertoont dan de beide andere vetzuren. Dit zal dan ook zonder twijfel

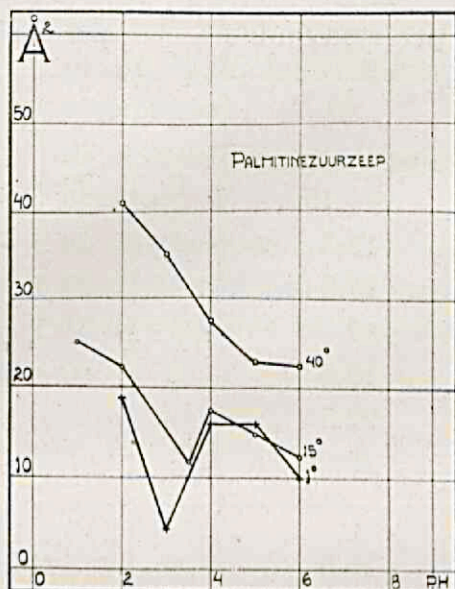


Fig. 40.

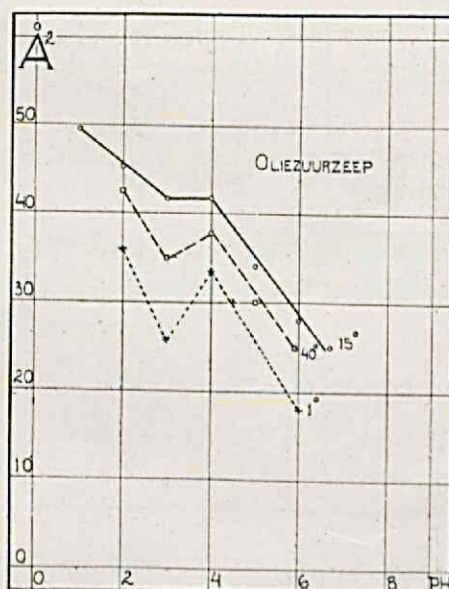


Fig. 41.

de reden zijn, waarom zich bij laurinezuurzeep geen minimum vertoont. Temperatuursverhoging bevordert het spreiden; in overeenstemming hiermee verdwijnt het minimum van palmitinezuurzeep bij 40°, dat van oliezuurzeep reeds bij 15°.

Vreemd doet het nu aan, dat uit fig. 41 blijkt, dat bij oliezuurzeep bij 40° toch weer een minimum optreedt. Zien we echter naar de bijbehorende krommen (fig. 39), dan wordt ons de oorzaak hiervan duidelijk. De op $p_H 4$ verkregen waarden blijken toch een kromme te geven van geheel afwijkende compressibiliteit. Gaat men bovendien na, hoe het hier met de reversibiliteit gesteld is, dan blijkt dat de kromme, die deze weergeeft, nagenoeg de kromme, die op $p_H 5$ verkregen wordt dekt. Ook bij palmitinezure zeep kan bij 40° op $p_H 3$ een dergelijke metastabiele toestand verkregen worden, zooals blijkt uit fig. 33. De uit een dergelijke kromme afgeleide waarde voor de grootte van het oppervlak per molecuul mag dus, in tegenstelling met hetgeen in fig. 41 geschied is, niet vergeleken worden met die der andere krommen, die stabiele toestanden weergeven.

TABEL XI.

Zeepen.	Temperatuur 1°.		Temperatuur 15°.		Temperatuur 40°.	
	p _H .	Oppervlak per molecuul.	p _H .	Oppervlak per molecuul.	p _H .	Oppervlak per molecuul.
Palmitinezuur- zeep		Å ²		Å ²		Å ²
	6	10	6	niet constant 9—15	6	22.5 17*
	4.56	16.5	4.56	15.3	5	24.5 16*
	4	15.5	4	17.3	4	27.5 19*
	3	4.5	3.56	12	3	35.5
	2	19	3	13.8	2	40—41.5
			2	22.5		
			1	25		
Oliezuurzeep	6	18	6.7	25.5	6	25
	4.56	30	6	28	5	30.5
	4	33.8	5	34	4	38 ?
	3	26	4	41.5	3	35.5
	2	36	3	41.5	2	42.5
			2	45		
			1	48.8		
Laurinezuurzeep	6	± 5 wordt kleiner	6	± 5 wordt kleiner	6	spreidt niet
	4.56	22.5	5	± 4 "	5	"
	4	32	4.56	27	4	± 17 wordt kleiner
	3	36.5	4	33	3	32—38
	2	35.5—38.5	3.56	34	2	37.5
			3	37.5		
			2	39.5		
			1	42		

* onder druk.

De grootten van het oppervlak per molecuul bij de spreiding der zeepoplossingen verkregen, zijn in tabel XI vereenigd.

Resumeerende blijkt dus, uit de in dit hoofdstuk besproken gevallen, waar de spreiding onvoldoende was, dat een monomoleculair vliesje toch nog kan worden verkregen, indien aan de drie volgende voorwaarden wordt voldaan:

- 1°. een zeer kleine hoeveelheid van de te spreiden oplossing moet met groote voorzichtigheid horizontaal op het vloeistofoppervlak worden uitgeblazen;
- 2°. de vloeistof, waarop gespreid wordt, moet een voldoende zuurgraad bezitten;
- 3°. de temperatuur moet juist gekozen zijn, waarbij rekening gehouden moet worden met het verschil, dat op kan treden naar gelang het vetzuur spreidt als „condensed” of „expanded”.

HOOFDSTUK III.

SPREIDING VAN VETTEN.

Reeds Langmuir¹⁾ onderzocht, zooals blijkt uit tabel I, de spreiding van eenige zuivere triglyceriden, maar ging in diezelfde verhandeling ook na het gedrag van bijv. lijnolie en wonderolie. Zoo was hij de eerste, die de groote spreiding van wonderolie constateerde, hetgeen in overeenstemming is met de waarde 100×10^{-16} cm², die hij opgeeft voor het oppervlak, dat door één molecuul ricinolzuur zou worden ingenomen.

Ook Adam²⁾ onderzocht verschillende glyceriden op spreiding, maar hield, evenals bij het onderzoek der vetzuren, ook thans de vloeistof in den bak meestal constant van samenstelling. Als oplosmiddel werd steeds petroleumaether gebruikt. Om ook nu weer den invloed te leeren kennen, die de temperatuur en de zuurgraad van de vloeistof in den bak op de spreiding der vetten heeft, zijn door mij een serie vetoplossingen gemaakt, waarvan bij 1°, 15° en 40° de spreiding nagegaan is op gedistilleerd water, 0.001 N. en 0.1 N. HCl. Als vetten werden hiertoe gekozen de volgende triglyceriden: tripalmitine, trilaurine, tricaprine, tricapryline, tricaproïne, tributyrine en trioleïne, waarvan in petroleum-aether $\frac{1}{100}$ molair oplossingen werden gemaakt. Op het vloeistofoppervlak werd hiervan 0.005 cm³ gepipeteerd. Gaat men van meer verdunde oplossingen uit, dan kan evenals we vroeger bij de spreiding van de vetzuren uit petroleumaether zagen, ook zonder bezwaar een grootere hoeveelheid gepipeteerd worden; alleen bij tributyrine en tricaproïne moet, wil men constante uitkomsten verkrijgen, een zoo klein mogelijke hoeveelheid horizontaal op het vloeistofoppervlak worden uitgeblazen. Uit fig. 42—62 is het resultaat der metingen te zien.

Dadelijk valt op, hoe sterk de neiging tot spreiden van de vetzuurketen toeneemt, als er meerdere van die ketens, zooals dit bij de tri-

1) Langmuir, l. c. pg. 1.

2) Adam, l. c. pg. 13.

SPREIDING VAN VETTEN UIT HUN OPLOSSING IN PETROLEUMAETHER.

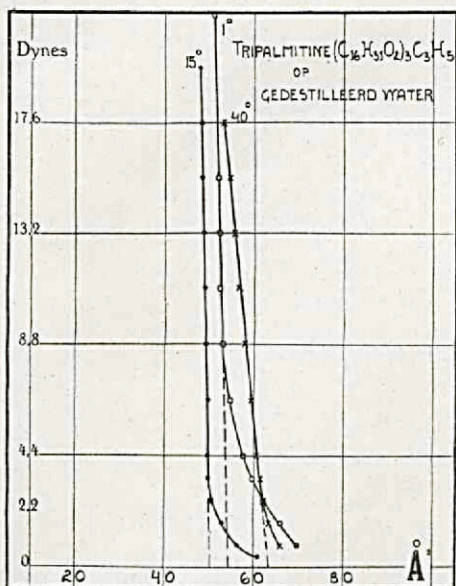


Fig. 42.

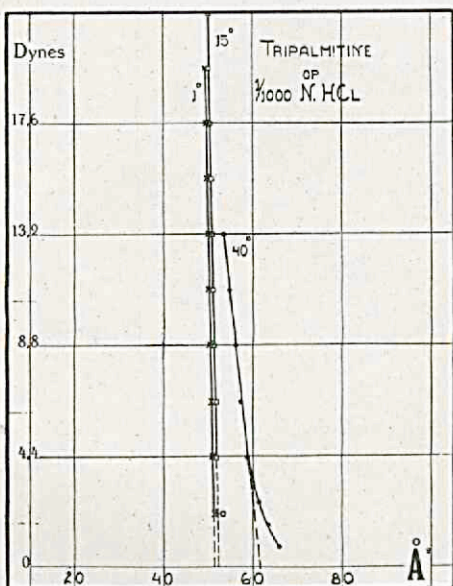


Fig. 43.

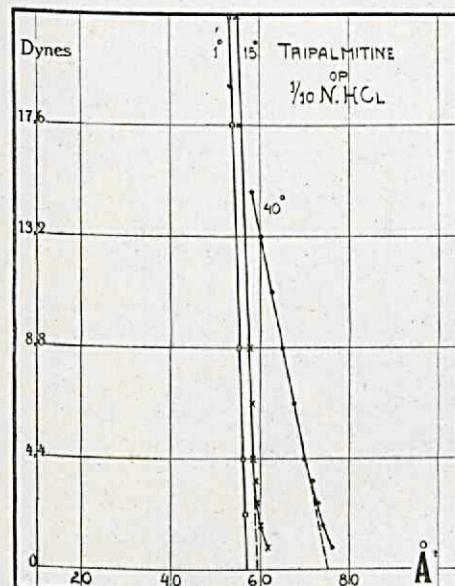


Fig. 44.

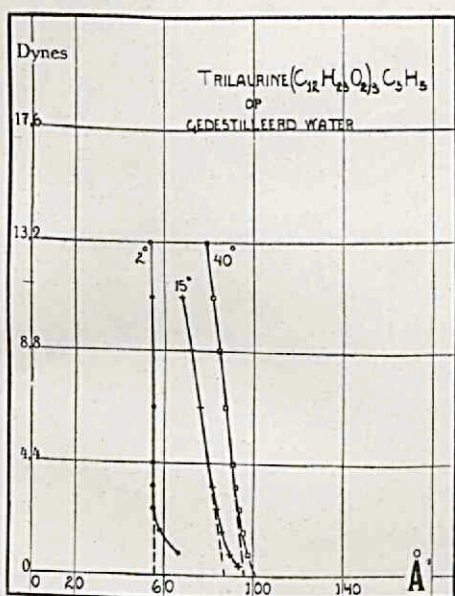


Fig. 45.

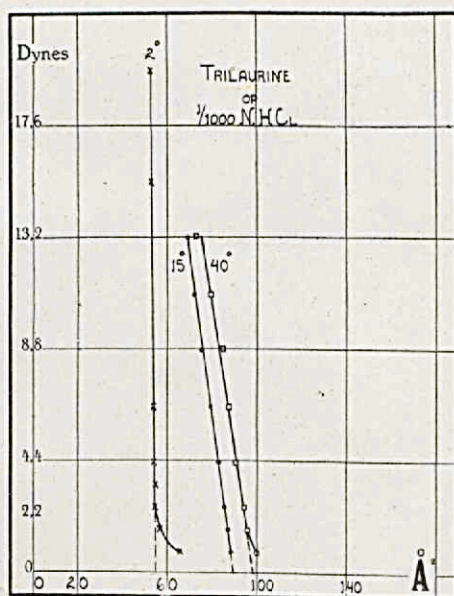


Fig. 46.

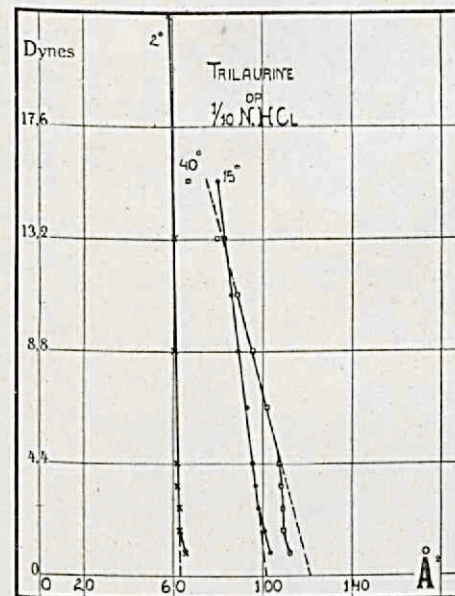


Fig. 47.

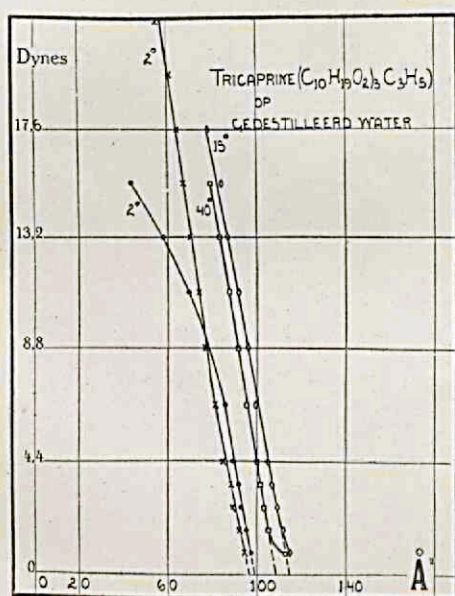


Fig. 48.

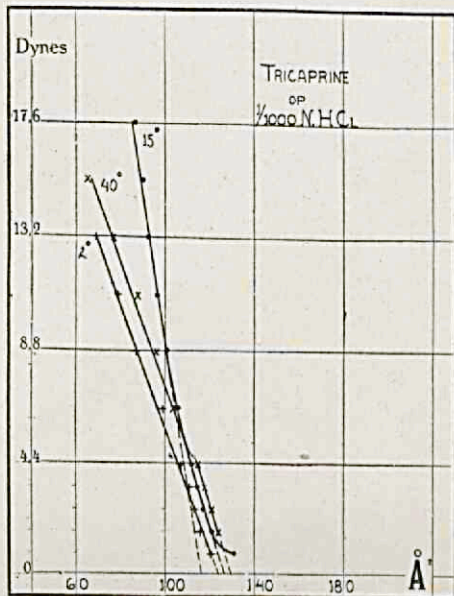


Fig. 49.

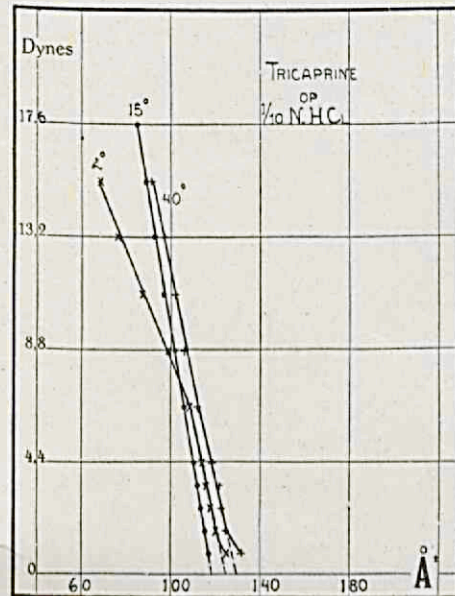


Fig. 50.

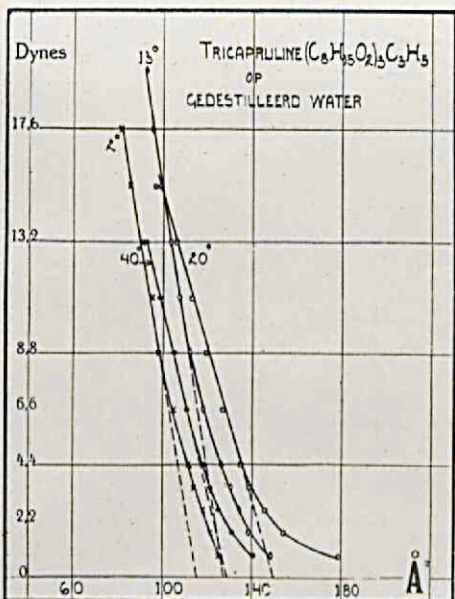


Fig. 51.

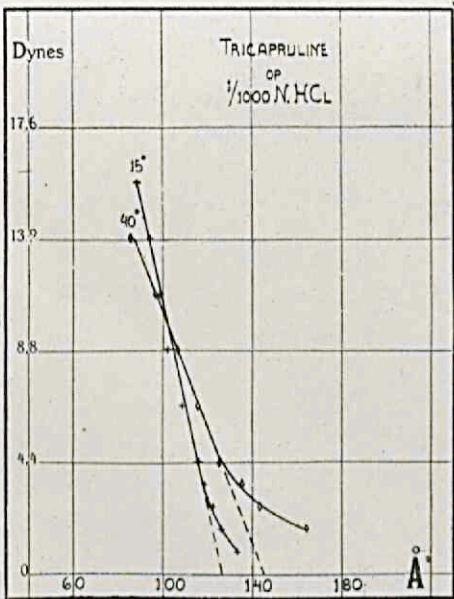


Fig. 52.

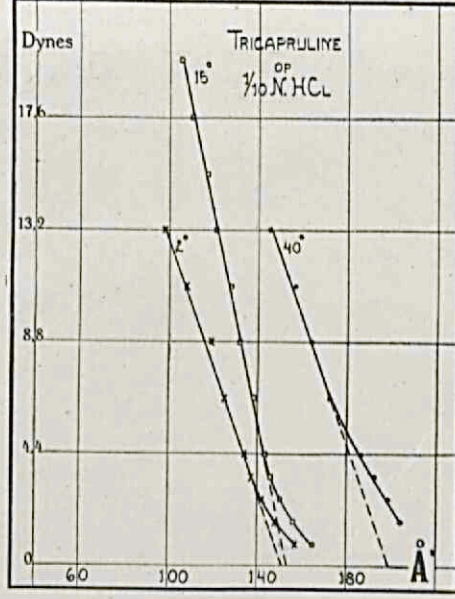


Fig. 53.

SPREIDING VAN VETTEN UIT HUN OPLOSSING IN PETROLEUMAETHER.

(Vervolg).

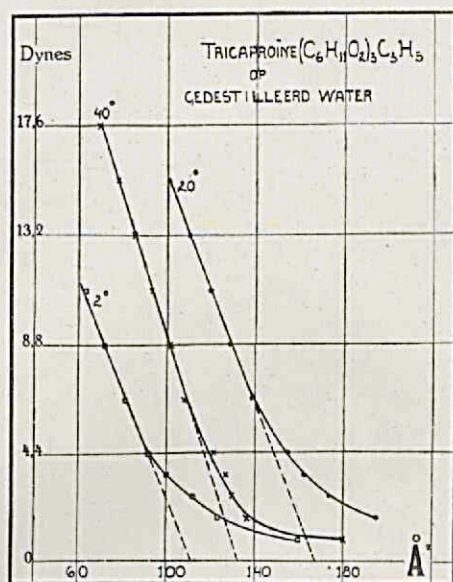


Fig. 54.

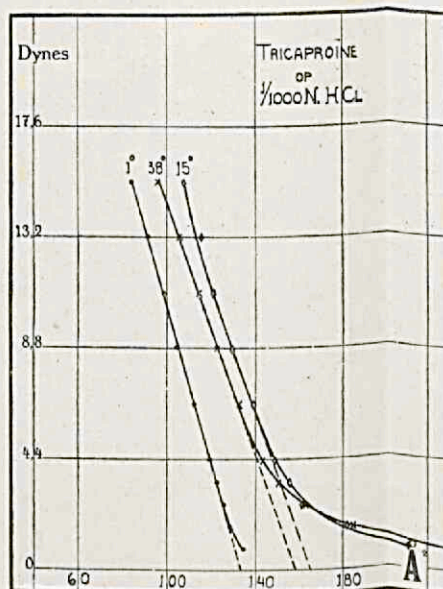


Fig. 55.

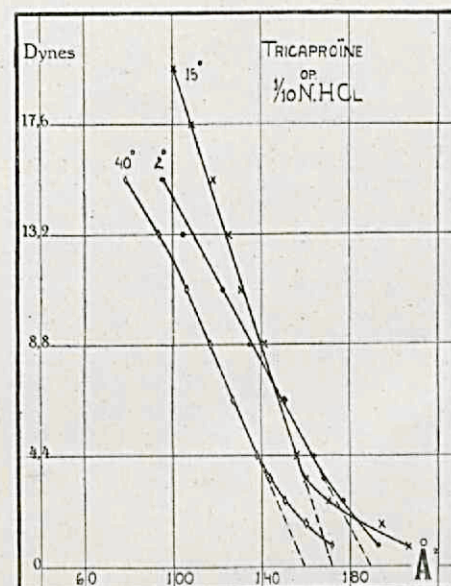


Fig. 56.

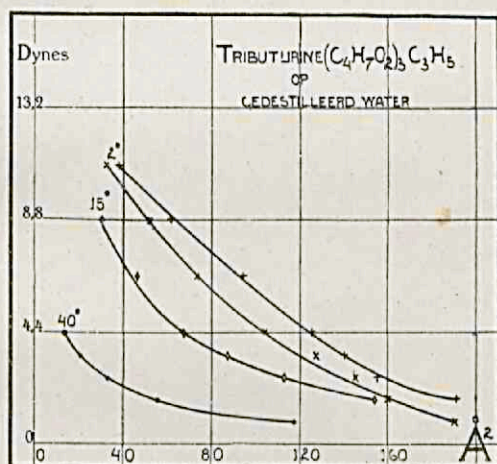


Fig. 57.

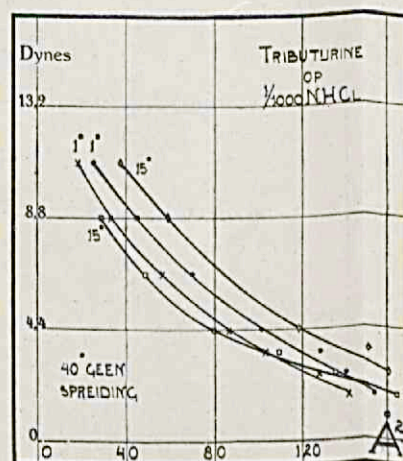


Fig. 58.

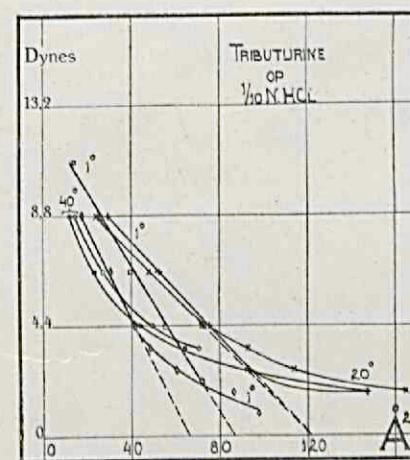


Fig. 59.

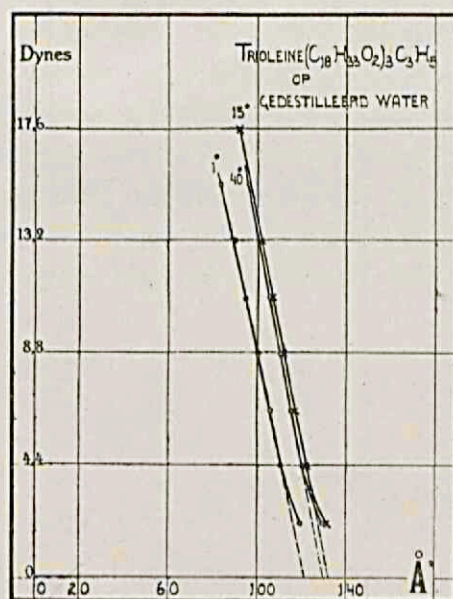


Fig. 60.

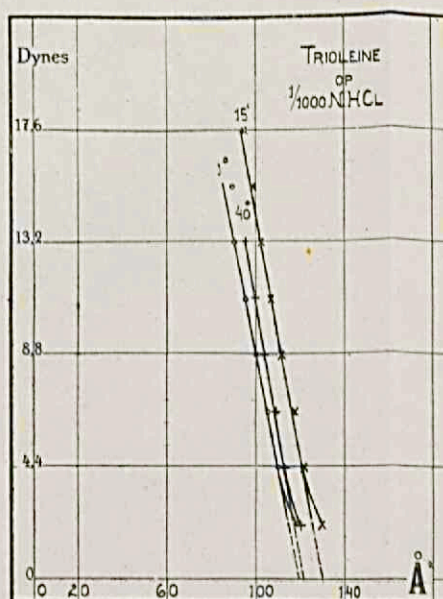


Fig. 61.

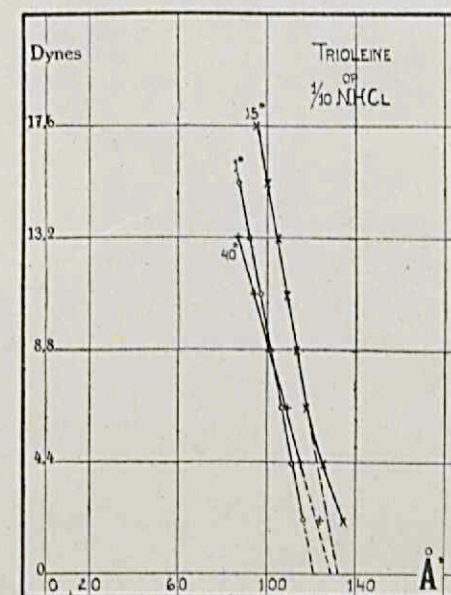


Fig. 62.

glyceriden het geval is, onderling zijn verbonden. Bij het onderzoek naar de spreiding der vetzuren toch is gebleken, dat eerst de vetzuurketen van laurinezuur uit een voldoende aantal C-atomen bestaat om onder bepaalde omstandigheden nog een meetbare spreiding te geven. Bij de vetten echter begint de spreiding reeds bij het tributyrine om bij den volgenden term der reeks, het tricaproïne, meetbaar te worden.

Verder valt waar te nemen, dat ook hier temperatuur en zuurgraad invloed uitoefenen op de spreiding. Beide factoren werken in dezelfde richting, als vroeger bij de vetzuren werd waargenomen.

Tripalmitine, dat bij 40° op gedestilleerd water (fig. 42) een oppervlakte van 64 Å² per molecuul inneemt, bereikt op 0.1 N. HCl een waarde van 75 Å² (fig. 44). Het spreidt dan nog slechts ten deele in den „expanded” toestand, want daarbij behoort als grootte van het oppervlak per molecuul ± 120 Å². Bij de spreiding van palmitinezuur zagen we, dat onder dezelfde omstandigheden het monomoleculaire vliesje geheel in den „expanded” toestand voor ons lag. Dat dit bij tripalmitine niet het geval is, moet niet alleen toegeschreven worden aan het feit, dat het smeltpunt van het triglyceride eenige graden hoger ligt als dat van het overeenkomstige vetzuur, maar dat in het algemeen bij de triglyceriden de invloed, die verhooging van den zuurgraad heeft op de temperatuur waarbij de „expanded” spreiding optreedt, afgenomen is. Deze temperatuur ligt hier veel dichter bij het werkelijke smeltpunt, als dat bij de vetzuren het geval was.

Zagen wij, dat bijv. laurinezuur (smp. 44°) op de drie onderzochte vloeistoffen bij 1° „expanded” spreidde, trilaurine (smp. 46°) daarentegen spreidt onder dezelfde omstandigheden nog steeds „condensed”. Bij verhooging van de temperatuur zien we wel een vergrooting van het oppervlak, dat door één molecuul ingenomen wordt, optreden, maar eerst op 0.1 N. HCl bij 40°, wordt een waarde van 122 Å² bereikt en kan het vliesje eerst als geheel „expanded” beschouwd worden. Hetzelfde zien we bij het tricaprïne (smp. 31°); terwijl caprinezuur steeds „expanded” spreidt, worden hier op 0.001 N. HCl eerst waarden van ± 120 Å² per molecuul gevonden.

Bij het tricapryline (smp. 8°) en tricaproïne, die onder alle omstandigheden steeds „expanded” spreiden, zien we, dat bij verhooging van temperatuur en zuurgraad, waarden voor het oppervlak per molecuul worden gevonden, die 200 Å² gaan naderen. Hieruit volgt, dat de moleculen van deze vetten, waarvan de keten nog slechts een lengte bezit van resp. 6.7 Å en 5.5 Å, geheel scheef op het vloeistofoppervlak liggen. Tributyrine (fig. 57—59) geeft alleen nog een meetbare spreiding

op 0.1 N. HCl. Het is in zijn gedrag het beste te vergelijken met het caprinezuur uit de vetzurreeks. Het spreekt vanzelf, dat waar uit het verloop der krommen volgt, dat zoowel bij het tributyrine als het tricaproïne oplosbaarheid van het vet een rol gaat spelen, deze twee vetten met de meeste voorzorg op het vloeistofoppervlak gebracht dienen te worden.

Trioleïne spreidt, zooals te verwachten was, goed en natuurlijk steeds in den „expanded” toestand.

De uit de krommen af te leiden waarden voor de grootte van het oppervlak, dat door de onderzochte vetten per molecuul wordt ingenomen, alsmede de daaruit te berekenen compressibiliteit, zijn in tabel XII verenigd.

Uit de cijfers onder compressibiliteit vermeld volgt, dat ook bij de vetten in den „condensed” toestand een groote kracht noodig is om een verkleining van het monomoleculaire vliesje te weeg te brengen; zoo zijn bij een temperatuur van 1° tripalmitine en trilaurine nauwelijks te comprimeeren. Bij overgang van den „condensed” in den „expanded” toestand wordt deze kracht kleiner, zoodat tenslotte voor het „expanded” vliesje meestal 20—30 dynes noodig zijn, om dit tot de helft te verkleinen; bij het tricaproïne blijkt hiertoe een kracht van 16—20 dynes voldoende.

Invloed van het oplosmiddel.

Vertoont dus het gedrag der triglyceriden bij spreiden groote analogie met dat der vetzuren, dit blijkt ook het geval te zijn met den invloed van het oplosmiddel. Hier werd dit meer in het bijzonder nagegaan bij oplossingen van tripalmitine, tricaprine, tricapryline en trioleïne in alcohol van 96 %. De concentratie der oplossing en de hoeveelheid, die op het vloeistofoppervlak gebracht werd, was dezelfde als bij de spreiding uit petroleumaether. Het resultaat der metingen staat vermeld in tabel XIII, waaraan nog kan worden toegevoegd dat met aceton als oplosmiddel men tot dezelfde cijfers komt. Het ligt voor de hand, dat ook hier steeds het opbrengen der oplossing met dezelfde voorzorgen moest geschieden, als we vroeger zagen bij de spreiding van vetzuren uit alcoholische oplossing.

De cijfers doen zien, dat de maximale spreiding ook onder de gunstigste omstandigheden van temperatuur en zuurgraad niet meer bereikt wordt.

De gevonden eindwaarden voor de oppervlakten per molecuul zijn uitgezonderd in enkele gevallen bij het tripalmitine, veel te klein

TABEL XII.

Spreiding uit petroleumaether.							
Triglyceriden.	Temperatuur.	Oppervlak per molecuul.		Oppervlak per molecuul.		Oppervlak per molecuul.	
		Compressibili- teit.		Compressibili- teit.		Compressibili- teit.	
		op gedest. water.		op $\frac{1}{1000}$ N. HCl.		op $\frac{1}{10}$ N. HCl.	
		Å ²	dynes.	Å ²	dynes.	Å ²	dynes.
Tripalmitine	1°	54.5	> 100	52	> 100	56.5	> 100
	15°	51	> 100	52.5	> 100	60	> 100
	40°	64	51	62	52	75	33
Trilaurine	2°	55	> 100	55	> 100	62	> 100
	15°	87	24	90	30	102	36
	40°	96	40	98	36	122	16
Tricaprine	2°	97	30	122	15	125	24
	15°	115	27	115	33	118	31
	40°	108	29	128	16	130	25
Tricapryline	2°	115	30	—	—	152	20
	15°	127	34	126	26	154	31
	40°	(bij 13°) 129	24	145	16	200	24
Tricaproïne	2°	110	13	133	21	190	15
	15°	168	19	165	20	172	23
	40°	(bij 20°) 132	18	159 (bij 38°)	19	160	16
Tributyryne	1°	niet meetbaar.		niet meetbaar.		65—68—120	
	15°	"		"		niet meetbaar.	
	40°	"		"		"	
Trioleïne	1°	121	25	119	27	121	27
	15°	132	29	130	31	132	31
	40°	130	29	122	30	129	20

TABEL XIII.

Spreiding uit alcohol.				
Triglyceriden.	Temperatuur.	Oppervlakte per molecuul op gedest. water.	Oppervlakte per molecuul op $\frac{1}{1000}$ N. HCl.	Oppervlakte per molecuul op $\frac{1}{10}$ N. HCl.
Tripalmitine	1°	Å ² 33	Å ² 30	Å ² 36
	15°	34	40—65	47
	40°	36—42	60—85	67—80—105
Tricaprine	1°	90	100	99
	15°	90	93	99
	40°	95	103	100
Tricapryline	1°	105	110	107
	15°	105	103	109
	40°	100	100	94
Trioleïne	1°	73	100	97
	15°	93	100	110
	40°	115	95	108

(meestal $\pm 20\%$). Dat tripalmitine bij 40° op 0.001 N. en 0.1 N. HCl buiten dezen regel valt, vindt zijn oorzaak in het feit, dat de oplossing van dit triglyceride verwarmd (tot $\pm 50^\circ$) op het vloeistofoppervlak gebracht moet worden, daar 0.01 N. alcoholische oplossing bij kamertemperatuur uitkristalliseert. Hierdoor komt het, dat de spreiding van dit triglyceride uit alcohol in die twee gevallen die van petroleumaether zelfs nog overtreft.

Daar tricaproïne mij niet meer ter beschikking stond, kon hiervan de spreiding uit alcohol niet worden nagegaan. Tributyrine, dat uit petroleumaether op 0.1 N. HCl bij 1° nog meetbaar spreidt, doet dit uit alcoholische oplossing niet meer.

Triglyceriden spreiden dus uit alcohol onder de onderzochte omstandigheden onvoldoende, in tegenstelling met de vetzuren, waar het ten slotte toch nog mogelijk is de goede eindwaarde te bereiken. De invloed van alcohol als oplosmiddel is echter in beide gevallen dezelfde, alleen is hier 0.1 N. HCl van 40° nog niet voldoende om de maximale spreiding te geven.

Eenige proeven verricht bij hogere temperatuur deden zien, dat bij $\pm 50^\circ$ de maximale spreiding optreedt. Dit is hier echter verder niet nagegaan, omdat het werken bij een dergelijke temperatuur door het loslaten der paraffine van de randen van den bak te onnauwkeurig wordt.

Van het trioleïne is ook nog met behulp van arabische gom en water ($\frac{1}{2}$ gram trioleïne + $\frac{1}{2}$ gram gom tot 100 cm^3) een emulsie gemaakt en hiervan de spreiding op zoutzuuroplossingen van verschillende concentratie bij 1° , 15° en 40° nagegaan.

TABEL XIV.

Oppervlakte, ingenomen door het molecuul trioleïne.			
Vloeistof, waarop gespreid werd.	Temperatuur 1°	Temperatuur 15°	Temperatuur 40°
	Å ²	Å ²	Å ²
gedest. water	10 vergroot zich tot 35	15 vergroot zich tot 40	20 vergroot zich tot 40
10-5 N. HCl	—	96	98
10-4 N. HCl	92	95	111
10-3 N. HCl	116	119	112
10-1 N. HCl	119	127	129
		129	127
			116
			118
			128
			130

Uit tabel XIV, die weer betrekking heeft op twee verschillende oplossingen, blijkt, dat deze emulsie zich bij spreiden op dezelfde wijze gedraagt, als we vroeger zagen bij de met behulp van arabische gom gemaakte oliezuur-emulsie. Ook hier veel te kleine waarden op gedestilleerd water en op de geringe zoutzuurconcentraties en eerst maximale spreiding op 0.001 N. HCl. Wat vroeger geconstateerd werd bij die oliezuur-emulsie, geldt ook hier. Op gedestilleerd water duurt het eenigen tijd, voordat de eindwaarde bereikt is, die ook thans weer bij benadering $\frac{1}{3}$ bedraagt van de maximale.

In het algemeen doet het voorafgaande zien, dat de invloed, die de verschillende factoren op de spreiding van de onderzochte vetten hebben, dezelfde is als op die der vetzuren.

Spreiding van natuurvetten.

Bespraken we tot nog toe de spreiding van zuivere triglyceriden, thans willen we ons afvragen, hoe spreiden natuurvetten, dus mengsels van triglyceriden. Bij mengen van oplossingen van zuivere triglyceriden met elkaar of van vetzuren met triglyceriden, werd steeds een spreiding gevonden, die gelijk was aan de som van de berekende uit de componenten. Men zal dus ook bij een vet kunnen verwachten, dat de spreiding per molecuul in den „expanded” toestand al naar gelang van de temperatuur, ongeveer 120—130 Å² zal bedragen.

Wel zagen wij, dat bij lagere triglyceriden als het tricapryline en het tricaproïne onder omstandigheden grootere waarden per molecuul

worden gevonden, maar bij de vetten treffen wij deze triglyceriden als zoodanig niet aan. Gemengde triglyceriden als bijv. caprylo-lauro-myristine, (hoofdbestanddeel van cocosvet), caprylo-myristo-oleïne (bestanddeel van palmpitvet), butyro-dioleïne (bestanddeel van botervet) en dergelijke, zullen toch zeker door de gelijktijdige aanwezigheid van lange vetzuurketens naast de kortere, in den „expanded” toestand $\pm 120 \text{ \AA}^2$ per molecuul spreiden.

Natuurlijk zal bij vetten, waarin lagere vetzuren aanwezig zijn, de spreiding van eenzelfde gewichtshoeveelheid groter zijn dan die waarin slechts hogere vetzuren voorkomen. Waar vetten geen bepaald smeltpunt hebben, maar over een zeker temperatuurtraject geleidelijk smelten, zal men uitkomsten kunnen verwachten, die dikwijls tusschen de waarden voor de „condensed” en „expanded” spreiding inliggen.

De spreiding van eenige vetten staat in tabel XV onder hun „spreidingsgetal” vermeld.

Onder het *spreidingsgetal* zal aangegeven worden het aantal m^2 , dat 1 milligram van een spreidende stof spreidt. Waar deze grootte zoowel van de vloeistof, waarop gespreid wordt, als van de temperatuur afhankelijk is, zullen deze gegevens steeds naast het spreidingsgetal moeten worden opgegeven. Wordt geen oplosmiddel genoemd, dan wordt steeds geacht petroleumaether gebruikt te zijn.

De cijfers onder spreidingsgetal vermeld, laten zich alle gemakkelijk verklaren. Een uitzondering alleen wat de grootte der spreiding betreft, maakt wonderolie, die ongeveer het dubbele spreidt van de andere vetten. Dit zal zonder twijfel toegeschreven moeten worden aan de oxygroep die in het ricinolzuur voorkomt. Doordat dit zuur nu twee polaire groepen bevat, plaatst het zich nagenoeg plat op het vloeistofoppervlak. Langmuir¹⁾ geeft als spreiding per molecuul van dit zuur op $100 \text{ \AA}^2$. Een vet als wonderolie, dat een dergelijk vetzuur in groote hoeveelheid bevat, zal noodzakelijkerwijs een groot spreidingsgetal moeten geven.

Bij botervet staan bij 1° en 15° twee spreidingsgetallen opgegeven. Dit komt, omdat bij deze temperaturen de druk-oppervlakte krommen nog uit twee rechten bestaan. Bij een bepaalden druk gaat het „expanded” vliesje in een minder „expanded” over. Door de temperatuur te verhoogen verdwijnt dan ook dit verschil.

Met behulp van het spreidingsgetal is men nu ook in staat uit de spreiding van een vetoplossing, de hoeveelheid daarin aanwezig vet

¹⁾ Langmuir, Transactions of the Faraday Society **15**, 1, (1920).

TABEL XV.

Spreidingsgetal.						
VETTEN.	gedestilleerd water.			$\frac{1}{10}$ N. HCl.		
	1°	15°	40°	1°	15°	40°
Amandelolie	0.82	0.81	0.85	0.82	0.89	0.89
Olijfolie	0.78	0.76	0.82	0.81	0.80	0.82
Sesamolie	0.76	0.80	0.83	0.80	0.80	0.86
Arachisolie	0.75	0.75	0.83	0.78	0.80	0.82
Lijnolie	0.82	0.84	0.90	0.85	0.90	0.92
Levertraan	0.81	0.82	0.84	0.81	0.84	0.84
Wonderolie	1.79	1.79	1.84	1.83	1.88	1.90
Cocosvet	0.91	0.95	1.09	0.92	1.05	1.10
Cacaovet	0.48	0.56	0.77	0.49	0.54	0.80
Reuzel	0.60	0.61	0.81	0.57	0.61	0.80
Rundvet	0.52	0.54	0.79	0.54	0.55	0.81
Blue Band	0.59	0.69	0.81	0.62	0.67	0.81
Botervet	0.72	0.77	0.90	0.71	0.78	0.93
	0.80	0.83		0.77		
Bloedvet (uit plasma)	0.50	0.50	0.52	0.50	0.51	0.52
Bloedvet (totaal)	0.52	0.54	0.54	0.52	0.54	0.55

te bepalen. Men behoeft daartoe slechts het spreidingsgetal te kennen van het vet, waarvan men de hoeveelheid wil bepalen, onder dezelfde omstandigheden als waaronder de meting geschiedt. Heeft men een 0.05 % oplossing in petroleumaether van een vet, waarvan het spreidingsgetal bijv. 8 bedraagt, dan zal bij spreiding van 0.1 cm^3 een oppervlakte ingenomen worden van $28.6 \times 14 \text{ cm}^2$ (de breedte van den bak). Waar bij een goed spreidend vet dergelijke metingen geen grooter verschil opleveren dan $0.2 \times 14 \text{ cm}^2$, vindt men de hoeveelheid vet gemakkelijk binnen 1 % nauwkeurig terug. Het spreekt vanzelf, dat bij het meten van kleinere oppervlakten de nauwkeurigheid minder wordt. Men zal dan ook bij het spreiden van zeer verdunde vet-oplossingen er steeds zorg voor dragen, dat men door de opgebrachte hoeveelheid te vergrooten een oppervlak van voldoende grootte meet. Het zal echter blijken, dat het in veel gevallen niet noodig is een gevonden spreiding in m^2 tot een gewichtshoeveelheid te herleiden.

Spreiding van phosphatiden en sterinen.

Voordat tot de bespreking van eenige toepassingen over gegaan zal worden, moet nog vermeld worden, dat naast de vetzuren en vetten ook phosphatiden zooals lecithine, kephaline en sphingomyeline benevens cholesterine en de vetzure-esters daarvan spreiden. De spreiding berust ook hier op het gelijktijdig voorkomen van één of meerdere polaire groepen, die het molecuul zich naar de vloeistof toe doen richten, naast een onoplosbaar gedeelte.

In tabel XVI staan eenige gegevens omtrent de spreiding van bovengenoemde stoffen vermeld. Het gebruikte lecithine en het sphingomyeline waren preparaten afkomstig van *Levene*. Handelslecithine ex ovo van *Merck* of *Kahlbaum* geeft 15—20 % kleinere waarden.

Men ziet uit de tabel, dat het oppervlak, dat de beide cholesterine-esters innemen niet gelijk is aan de som van de componenten, waaruit deze esters zijn opgebouwd. Hetzelfde vond *Langmuir* reeds voor de palmitinezure-cetylester (zie tabel I). Deze esters spreiden hoogstwaarschijnlijk door de groote lengte van het molecuul, slecht. Het monomoleculaire vliesje is zeer fragiel en breekt reeds bij een kracht van 6—8 dynes. Ze gedragen zich als palmitinezuur bij spreiding op 0.1 N. HCl van 1° (fig. 4).

Fig. 63—68 geven de druk-oppervlakte krommen van het goed

SPREIDING VAN LECITHINE.

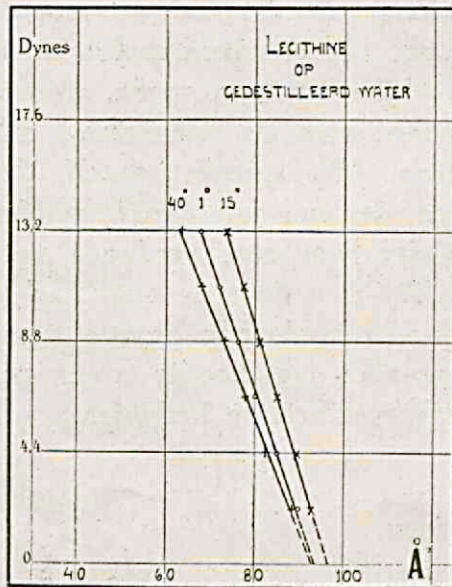


Fig. 63.

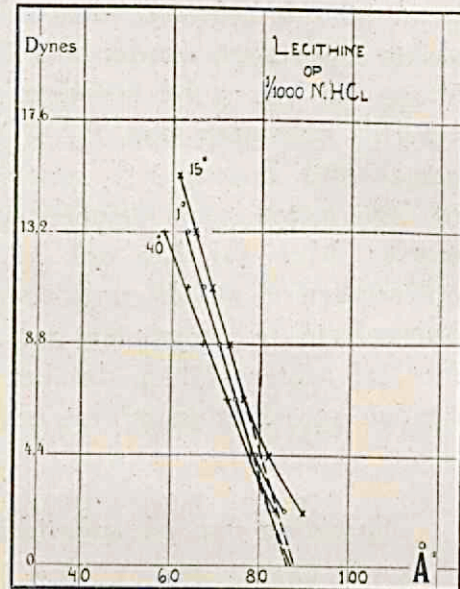


Fig. 64.

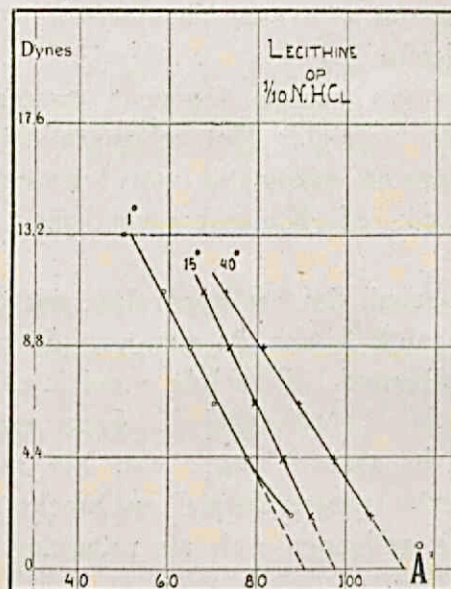


Fig. 65.

SPREIDING VAN CHOLESTERINE.

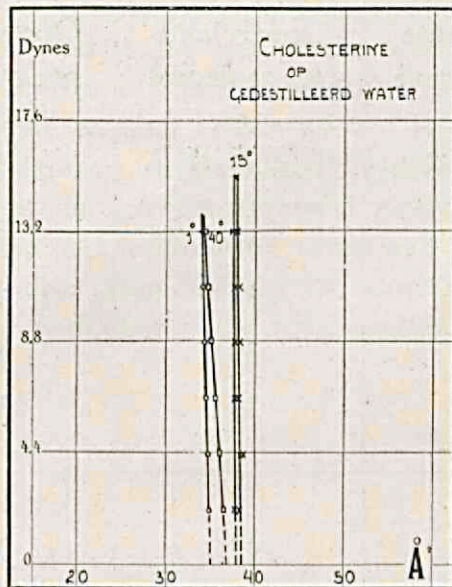


Fig. 66.

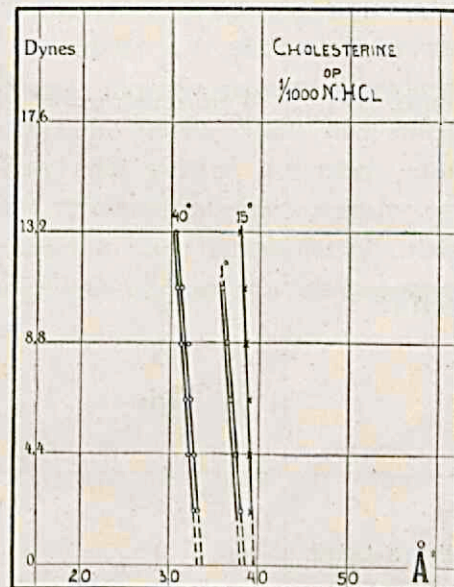


Fig. 67.

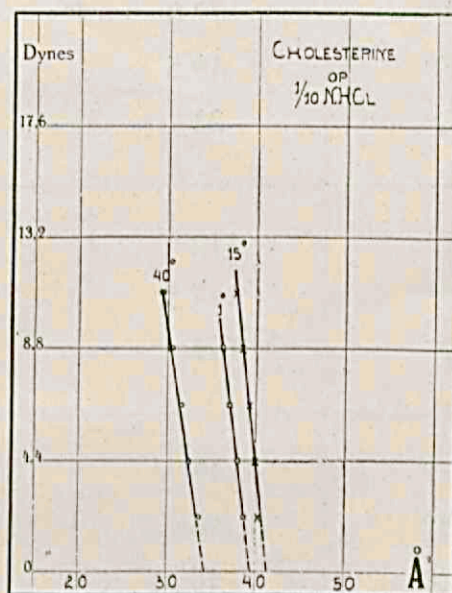


Fig. 68.

TABEL XVI.

Spreiding uit petroleumaether.				
Spreidende stof.	Temperatuur.	Oppervlakte per molecuul op gedest. water.	Oppervlakte per molecuul op $\frac{1}{1000}$ N. HCl.	Oppervlakte per molecuul op $\frac{1}{10}$ N. HCl.
Cholesterine	1°	$\text{\AA}^2$ 35	$\text{\AA}^2$ 38	$\text{\AA}^2$ 39.5
	15°	38.5	39.5	41
	40°	37	33.5	34
Oliezure- cholesterine-ester	1°	33	43	35.5
	15°	27.5	36	31
	40°	29	30.5	32
Palmitinezure- cholesterine-ester	1°	19.0		
	15°	19.5		
	40°	22		
Lecithine	1°	110	102	109
	15°	115	102	117
	40°	110	103	130
Sphingomyeline	1°	44		
	15°	46		
	40°	46		

spreadende lecithine en cholesterine weer. Dit laatste geeft een zeer moeilijk comprimeerbaar vliesje evenals sphingomyeline, terwijl bij lecithine een kracht van 15—25 dynes voldoende is om een verkleining tot de helft teweeg te brengen.

Cholesterine, evenals de oliezure-ester daarvan, gaan in het algemeen bij verhooging van temperatuur minder spreiden. De oorzaak hiervan kan niet zijn, dat een gedeelte van de stof door oplossen voor de spreading verloren gaat zooals we dat bijv. bij laurinezuur zagen, want hier blijft volkomen reversibiliteit bestaan. Men kan zich eerder indenken, dat bij een zoo samengesteld molecuul als het cholesterine bij verandering van temperatuur of zuurgraad bepaalde deelen van het molecuul zich anders gaan oriënteren, waardoor de mogelijkheid van een vergrooting of verkleining van het oppervlak ontstaat.

TOEPASSINGEN.

Spreiding van de lipoiden der chromocyten.

Als eerste toepassing van het besprokene is nagegaan, welk oppervlak de lipoiden innemen, die geëxtraheerd konden worden uit door wasschen met physiologische keukenzoutoplossing, van plasma bevrijde chromocyten. Het bleek ¹⁾, dat onverschillig of met aceton dan wel met een mengsel van alcohol-aether (3:1) geëxtraheerd werd ²⁾, bij volledige extractie steeds door het lipoid een oppervlak werd ingenomen, dat het dubbele bedroeg van dat der geëxtraheerde chromocyten.

In tabel XVII staan eenige resultaten vermeld, waaruit blijkt, dat hoe groot ook het verschil in grootte en in aantal der in 1 cm³ bloed aanwezige chromocyten is, deze verhouding altijd gehandhaafd blijft. Ook spreiding op gedestilleerd water van 37°—40° (lichaamstemperatuur) verandert deze niet. Het oppervlak der chromocyten werd berekend ³⁾ uit de formule $O = 2 D^2$, waarin O het oppervlak der chromocyt en D de te meten doorsnee voorstelt.

Bovenstaande uitkomsten pleiten er wel sterk voor, dat zich om de chromocyt een lipoidlaagje bevindt, twee moleculen dik. Verder bleek ⁴⁾, dat van het oppervlak der lipoidstoffen steeds $\frac{2}{5}$ ingenomen werd door spreidend cholesterine. Dit hooge percentage aan cholesterine maakt het ook begrijpelijk, waarom het monomoleculaire vliesje van deze lipoidstoffen zoo moeilijk comprimeerbaar is (compressibiliteit, 60—70 dynes). Waar literatuur en eigen onderzoek er wel op wijzen, dat het overige oppervlak voor $\frac{4}{10}$ bedekt zal zijn met lecithine en kephaline-achtige verbindingen en voor $\frac{1}{10}$ met spreidend sphingomyeline, is het thans ook mogelijk de dikte van het laagje, dat zich om de chromocyt bevindt, te berekenen.

Immers, wanneer men een gemiddeld soortelijk gewicht van 1 voor de geëxtraheerde lipoiden aanneemt, kan men berekenen uit de spreiding per molecuul, een lengte van 11.5, 29 en 18 Å resp. voor lecithine-

1) Gorter en Grendel, J. of exper. medicine, **41**, 439, (1925).

2) Gorter en Grendel, Proc. Kon. Ac. v. W. A'dam **29**, 314, (1926).

3) Knoll, Archiv. ges. Physiolog. **198**, 367, (1923).

4) Gorter en Grendel, Proc. Kon. Ac. v. W. A'dam **29**, 318, (1926).

TABEL XVII.

Dier.		Aantal chromocyten per mm ³ .	Oppervlakte van één chromocyt.	Oppervlakte der chromocyten uit 1 cm ³ bloed. (a)	Oppervlakte ingenomen door de lipoiden geëxtraheerd uit de chromocyten van 1 cm ³ bloed. (b)	Factor a : b.
			μ^2	m ²	m ²	
Hond	1	8.000.000	98	0.78	1.55	2
	2	6.890.000	90	0.62	1.22	2
	3	9.700.000	101	0.98	1.96	2
	4	4.340.000	124.8	0.54	1.08	2
Schaap	1	9.900.000	29.8	0.30	0.62	2.1
Konijn	1	5.900.000	92.5	0.54	1.07	2
	2	6.600.000	74.4	0.49	0.96	2
	3	6.100.000	90	0.56	1.18	2.1
	4	5.600.000	92.4	0.51	0.92	1.8
	5	5.950.000	92.5	0.55	1.1	2
Mensch	1	4.740.000	99.4	0.47	0.89	1.9
	2	5.200.000	123	0.64	1.2	1.9
	3	2.060.000	90	0.18	0.35	2
Geit	1	16.500.000	20.1	0.33	0.66	2
	2	19.300.000	17.8	0.33	0.63	1.9
	3	14.000.000	23	0.32	0.70	2.2
	4	27.220.000	21.1	0.57	1.17	2
Cavia	1	5.850.000	89.8	0.52	1.02	2
	2	5.630.000	100.8	0.57	1.16	2
	3	5.800.000	92.5	0.53	1.02	2

kephaline¹⁾), sphingomyeline en cholesterine. Nemen deze stoffen nu resp. $\frac{5}{10}$, $\frac{1}{10}$ en $\frac{4}{10}$ van het oppervlak voor hun rekening, dan volgt hieruit, dat de gemiddelde dikte van het lipoïdlaagje zal bedragen 31 Å. In dit verband mag niet onvermeld blijven, dat Fricke²⁾ uit capaciteitsmetingen van het bloed heeft afgeleid, dat de dikte van de lipoïdmembraan, die zich om de chromocyt bevindt, aannemende voor die membraan een diëlectriciteitsconstante van 3, moet bedragen 33 Å.

Blijkt uit het besprokene, dat het bij een onderzoek niet altijd noodig zal zijn te weten, welke gewichtshoeveelheid correspondeert met een gevonden aantal m², dit is ook het geval met de volgende toepassing, waarvan nog slechts voorloopige resultaten op te geven zijn.

Spreading van de lipoïden uit spierweefsel.

Men kan zich afvragen, staat de hoeveelheid lipoïdstof, die zich in spierweefsel bevindt in eenig verband tot het oppervlak, dat door de spierfibrillen wordt ingenomen. Hierop toch wijzen eenige onderzoeken van den laatsten tijd.

Om hierin eenig inzicht te krijgen werden stukjes spierweefsel, na eerst fijngeknijpt, gedroogd en daarna gepulveriseerd te zijn, met aceton en een alcohol-aethermengsel (3:1) volkomen geëxtraheerd. De verkregen extracten tot droog ingedampt en het residu opgenomen in petroleumaether. Na filtratie en aanvullen tot een bepaald volume, werd van deze oplossing de spreading op gedestilleerd water bij kamertemperatuur nagegaan. Ook hier verandert een verhooging van de temperatuur tot 40° de grootte der spreading niet.

De uitkomsten staan in tabel XVIII opgegeven. De naast elkaar afgedrukte getallen hebben betrekking op stukjes weefsel, afkomstig uit dezelfde spier.

Men ziet, dat de spreading der uit één gram skeletspier geëxtraheerde lipoïden bij de drie onderzochte dieren wel verschillend is, maar bij dezelfde diersoort constant. Hetzelfde geldt voor de lipoïdstoffen der hartspier. Wel zijn de uitkomsten meer wisselend als bij die der chromocyten, maar men moet hierbij bedenken, dat het vetvrij prepareren van spierweefsel veel grootere bezwaren met zich meebrengt dan het

1) Het is onverschillig in welke verhouding het kephaline naast het lecithine voorkomt, omdat beide stoffen per molecuul evenveel spreiden. Voor een mengsel van kephaline met 25 % lecithine, een preparaat van Levene, werd een spreading gevonden van 116 Å² per molecuul.

2) Fricke, J. gen. Physiol. 9, 137, (1925—'26).

TABEL XVIII.

Spreiding der lipöïdstoffen geëxtraheerd uit 1 gram spier.				
Dier.	Skeletspier.		Hartspier.	
	m ² .		m ² .	
Konijn	6.75	6.9	17.8	17.9
	6.4	6.6	17.3	
	6.2	6.2	16.6	
	6.9	7.0		
	7.1			
	6.7	6.3		
	6.1			
	7.3	7.6		
	6.4	7.2		
Rat	14.2	13.4	21.5	
	12.7	12.4	21.9	22.1
	13.4			
	12.4	12.7		
	11			
Hond	11.8		20	
	12.9	12	21.4	
	11.8			

vetvrij verzamelen van chromocyten. Eenige metingen van de doorsnee der fibrillen zijn, wat de skeletspier van het konijn betreft, geschied, waaruit benaderd te berekenen is, dat één gram van deze spier een totaal oppervlak bezit van $\pm 5 \text{ m}^2$. Deze voorloopige metingen doen dus een oppervlakte vinden van dezelfde orde van grootte, als ingenomen wordt door de geëxtraheerde lipoïdstoffen. Metingen van de doorsnee der hartspier van het konijn geven veel kleinere waarden, dus een grooter oppervlak per gram spier, wat goed overeenstemt met het vinden van een grootere spreiding der lipoïdstoffen uit dat soort spier.

Spreiding van bloedvet.

Waar, zooals we zagen uit tabel XV, één milligram bloedvet¹⁾ reeds $\frac{1}{2} \text{ m}^2$ spreidt, moet het mogelijk zijn, uitgaande van een kleine hoeveelheid bloed, daarvan het vetgehalte met groote nauwkeurigheid te bepalen. Dan zal echter de zekerheid moeten bestaan, dat deze vetstoffen elkaar bij spreiding niet hinderen en dat dus de gevonden spreiding werkelijk quantitatief de som is van de spreiding der verschillende bestanddeelen. Bij de voorafgaande toepassingen werd dit steeds stilzwijgend verondersteld, daar bij spreiding van mengsels van bekende samenstelling dit altijd het geval bleek te zijn. Bij het schrijven van dit proefschrift kwam mij een publicatie van Leathes onder oogen, die in zijn tweede Croonian lecture²⁾ de spreiding van palmitinezuur, cholesterine en lecithine behandelt. Hij vindt voor de oppervlakten, die deze stoffen bij spreiden innemen, waarden die geheel met de mijne overeenstemmen. Mengt hij echter oplossingen van palmitinezuur met cholesterine, of cholesterine met lecithine, dan blijkt de spreiding niet meer de som van de beide componenten te geven, maar krijgt hij een eindspreiding, die veel kleiner is dan de berekende en wel het sterkst bij mengsels van palmitinezuur met cholesterine. Deze uitkomsten zijn voor mij aanleiding geweest om nog eens de spreiding van eenige mengsels, o.a. de door Leathes gebruikte, na te gaan. Daartoe werden oplossingen in petroleumaether gemaakt, waarin per 100 cm^3 aanwezig was resp. 443 mg trioleïne, 386 mg cholesterine, 330 mg

1) Bloedvet staat kortheidshalve voor de gezamenlijke vetten en lipoiden, die in bloedplasma aanwezig zijn.

Onder totaal bloedvet zal verstaan worden de som van alle vetten en lipoiden, die in bloed, dus in plasma + chromocyten aanwezig zijn.

2) Leathes. The Lancet, **208**, 853, (1925 I).

TABEL XIX.

Onderzochte mengsels.	Spreiding per cm ³ mengsel in m ² .	
	Berekend.	Teruggevonden.
10 cm ³ trioleïne-opl. + 0 cm ³ cholester.-opl.	3.81	—
8 „ „ + 2 „ „	3.50	3.50
5 „ „ + 5 „ „	3.02	2.97
2 „ „ + 8 „ „	2.58	2.58
0 „ „ + 10 „ „	2.27	—
10 cm ³ trioleïne-opl. + 0 cm ³ bloedvet-opl.	3.81	—
8 „ „ + 2 „ „	3.39	3.36
5 „ „ + 5 „ „	2.80	2.83
2 „ „ + 8 „ „	2.18	2.24
0 „ „ + 10 „ „	1.78	—
10 cm ³ cholester.-opl. + 0 cm ³ palmit.zuur-opl.	2.27	—
8 „ „ + 2 „ „	2.06	2.04
5 „ „ + 5 „ „	1.75	1.73
2 „ „ + 8 „ „	1.44	1.46
0 „ „ + 10 „ „	1.23	—
10 cm ³ cholester.-opl. + 0 cm ³ lecithine-opl.	2.27	—
8 „ „ + 2 „ „	2.08	2.09
5 „ „ + 5 „ „	1.79	1.76
2 „ „ + 8 „ „	1.51	1.48
0 „ „ + 10 „ „	1.32	—
10 cm ³ cholester.-opl. + 0 cm ³ bloedvet-opl.	2.27	—
8 „ „ + 2 „ „	2.17	2.16
5 „ „ + 5 „ „	2.02	1.99
2 „ „ + 8 „ „	1.87	1.85
0 „ „ + 10 „ „	1.78	—

palmitinezuur en 159 mg lecithine. De gebruikte bloedvetoplossing bevatte 356 mg per 100 cm³. Deze oplossingen werden in verschillende verhoudingen met elkaar gemengd en van de verkregen mengsels de grootte der spreiding gemeten op gedestilleerd water bij 15°. Onder dezelfde omstandigheden wordt toch, zooals we later zullen zien, ook de spreiding van het geëxtraheerde bloedvet gemeten.

Tabel XIX geeft het resultaat.

De gevonden spreiding blijkt geheel met de berekende overeen te stemmen. Waar Leathes de omstandigheden, waaronder zijn metingen verricht werden, onvolledig opgeeft, blijkt het onopgelost, hoe hij tot andere resultaten kon komen.

Een andere vraag, die men zich bij het meten van bloedvet kan stellen is deze: welke vloeistof moet zich in den bak bevinden en welke temperatuur moet die vloeistof bezitten om tot een constant resultaat te kunnen komen? Immers bloedvet bestaat uit verschillende vetten en lipoïden, die deels „expanded”, deels „condensed” zullen spreiden.

Zouden nu de omstandigheden waaronder de meting geschiedt, zóó zijn, dat nu eens meer de „condensed”, dan weer meer de „expanded” toestand optrad, omdat er gewerkt werd bij een in zekeren zin overgangstemperatuur, dan zouden metingen van het bloedvet moeilijk tot onderling vergelijkbare uitkomsten kunnen leiden.

Tabel XX laat nu zien, op welke wijze de spreiding van bloedvet verandert naar gelang gespreid wordt op gedest. water, 0.001 N. en 0.1 N. HCl bij 1°, 15° en 40°. Niet alleen blijkt, hoe weinig deze omstandigheden op de spreiding van invloed zijn, maar tevens, dat het bloedvet afkomstig van verschillende dieren nagenoeg even veel spreidt. Alleen bij de geit vinden we bij 40° een hogere waarde, mogelijk wellicht door het aanwezig zijn van lagere triglyceriden.

Gaat men nu de spreiding na van totaal bloedvet, dan komt men tot eenzelfde resultaat (tabel XXI); ook hier heeft de temperatuur en de zuurgraad zeer weinig invloed. De spreiding is echter per mg wat groter. Dit werd door mij verwacht, omdat dikwijls tegelijkertijd bij de metingen uit tabel XVII was nagegaan, hoeveel de spreiding bedroeg van 1 mg der uit de chromocyten geëxtraheerde lipoiden en daarvoor dan steeds waarden werden gevonden, onafhankelijk van de diersoort, van 0.57—0.58 m² (bij spreiding op gedestilleerd water van 15°). De spreiding van totaal bloedvet zal dus inderdaad per mg groter moeten zijn dan die van bloedvet. Eenige gegevens hierover staan in tabel XXI; ook hier is de spreiding, die bij de geit gevonden wordt bij 40° weer iets groter dan die bij den mensch en het konijn.

TABEL XX.

Dier.	Temperatuur.	1 mg der uit bloedplasma geëxtraheerde vetstoffen spreidt		
		op gedest. water.	op $\frac{1}{1000}$ N. HCl.	op $\frac{1}{10}$ N. HCl.
		m ² .	m ² .	m ² .
Geit 1	1°	0.51	0.49	0.50
	15°	0.51	0.51	0.51
	40°	0.54	0.55	0.55
Geit 2	1°	0.50	0.50	0.50
	15°	0.51	0.51	0.51
	40°	0.54	0.55	0.55
Konijn 1	1°	0.48	0.49	0.48
	15°	0.49	0.50	0.50
	40°	0.52	0.50	0.52
Konijn 2	1°	0.50	0.50	0.50
	15°	0.50	0.51	0.51
	40°	0.51	0.51	0.52
Mensch	1°	0.50	0.50	0.50
	15°	0.50	0.52	0.52
	40°	0.51	0.52	0.52
Cavia	1°	0.48	0.48	0.51
	15°	0.49	0.50	0.51
	40°	0.50	0.50	0.51

TABEL XXI.

Dier.	Temperatuur.	1 mg totaal bloedvet spreidt		
		op gedest. water.	op $\frac{1}{1000}$ N. HCl.	op $\frac{1}{10}$ N. HCl.
Geit	1°	m ²	m ²	m ²
	15°	0.51	0.51	0.53
	40°	0.52	0.52	0.54
Konijn	1°	0.55	0.55	0.56
	15°	0.53	0.54	0.53
	40°	0.54	0.54	0.54
Mensch	1°	0.54	0.53	0.53
	15°	0.54	0.54	0.54
	40°	0.54	0.54	0.54

TABEL XXII.

Gegevens omtrent de spreiding van eenige in bloed voorkomende vetstoffen.			
Spreidende stof.	Spreiding per molecuul.	Spreidingsgetal.	Gewichts- hoeveelheid, die 1 m ² spreiding geeft.
Lecithine	Å ² 115	0.86	mg 1.2
Kephaline	116	0.87	1.15
Sphingomyeline	46	0.35	2.9
Cholesterine	38.5	0.6	1.7
Oliezure cholesterine-ester	27.5	0.25	4
Palmitinezure cholesterine-ester	19.5	0.19	5.3
tripalmitine	51	0.38	2.6
tristearine	51	0.34	2.9
trioleïne	132	0.92	1.1

} hoogstwaarschijnlijk
 als gemengde
 triglyceriden aanwezig.

Voor het herleiden van de spreiding van bloedvet van m^2 tot de overeenkomstige gewichtshoeveelheid, kan men dus als grootte voor het spreidingsgetal (bij meting op gedest. water van 15°) 0.5 aannemen, voor dat van totaal bloedvet 0.54.

Bezien we tabel XXII, waarin eenige gegevens verzameld zijn, over de spreiding van de in bloed voorkomende vetstoffen, dan blijkt, dat slechts dan bij vermeerdering van het totaal bloedvet, een even groote toename in oppervlak als in gewicht zal worden gevonden, als de onderlinge verhouding van de verschillende vetstoffen gelijk blijft. Dat dit in het meerendeel der gevallen zoo zal zijn, bleek uit tabel XX. Bij bepaalde ziekten kan zich echter deze verhouding wijzigen en voor zoover thans bekend is, treden in die gevallen dan de vetstoffen met het grootste spreidingsgetal, het meest op den voorgrond. Zoo ziet B a n g¹⁾ bijv. bij diabetes de hoeveelheid triglyceriden sterk toenemen, terwijl het gehalte aan cholesterine en de esters daarvan gelijk blijft. In dergelijke gevallen zal men dus volgens deze spreidmethode een grootere waarde voor het bloedvet terugvinden, als met de vermeerdering in gewichtshoeveelheid overeenkomt. Bij adipositas en nephritis kan men hetzelfde verwachten²⁾.

Al de tot nog toe opgegeven getallen waren steeds berekend naar de grootte van de spreiding bij een nuldruk, dus door extrapolatie uit de drukoppervlakte krommen verkregen. Uit vele van de afgedrukte krommen is te zien, hoe deze geëxtrapoleerde grootte zeer weinig verschilt, vooral bij de goed spreidende vetzuren en vetten, van degene, die gemeten wordt bij een belasting van 50 mg op het balansje (2.2 dynes per cm). Zou dit nu ook het geval zijn bij bloedvet, dan kan de uitvoering der bepaling voor vele onderzoeken bijv. voor klinisch werk eenvoudiger zijn, omdat reeds met één meting volstaan kan worden. Dit blijkt nu werkelijk zoo te zijn bij alle metingen op gedestilleerd water van 40° , bij 15° is dit bij het meerendeel der bepalingen eveneens het geval, bij 1° echter treden dikwijls krommen op, die uit twee stukken bestaan, één van meestal sterk wisselende compressibiliteit, die reeds bij ± 6.6 dynes breekt en dan overgaat in de tweede, die nagenoeg geheel samenvalt met de kromme, die bij hogere temperatuur verkregen wordt. De opgegeven spreidingsgetallen zijn uit het tweede deel der kromme geëxtrapoleerd. Het eerste sterk varieerende gedeelte der bij 1° verkregen kromme leidt tot een grootere geëxtrapoleerde waarde. De reden hier-

1) B a n g, Biochem. Z. **94**, 359, (1919).

2) E. M. K o b u s, Diss. Leiden, (1926).

van licht in de aanwezigheid van cholesterine en de cholesterine-esters, die bij verhooging van temperatuur minder gaan spreiden (zie fig. 66 tot 68).

Men zal dus, wanneer men het extrapoleeren wil vermijden en door een enkele meting bij een belasting van 50 mg de oppervlakte wil vinden, die met de geëxtrapoleerde overeenkomt, dienen te werken bij een temperatuur van 15° of hooger. De mogelijkheid blijft echter bestaan, dat men, tenzij gewerkt wordt bij 40° , wat niet aan te raden is, in enkele gevallen met één meting niet tot het juiste resultaat komt. Dit kan men echter voorkomen door telkens na de eerste meting nog een paar maal een gewichtje van 50 mg bij te plaatsen en te zien, of de verkleining van het oppervlak, die daarvan steeds het gevolg is, nagenoeg dezelfde blijft. Is dit werkelijk het geval, dan zou de te construeeren kromme dus recht verlopen en geeft de eerste meting de waarde, die men bij extrapolatie voor het oppervlak zou vinden bij groote benadering aan. Blijkt het tegengestelde, dan moet de waarde uit de kromme worden afgeleid.

Zagen we uit het behandelde, dat het derhalve mogelijk is met deze methode de hoeveelheid bloedvet te bepalen, omdat de verschillende daarin aanwezige vetstoffen zich bij spreiding quantitatief addeeren, vervolgens dat men het gevonden aantal m^2 zeer eenvoudig tot de daarmee overeenkomende gewichtshoeveelheid kan herleiden en tenslotte, dat men voor klinisch onderzoek meestal het construeeren der druk-oppervlakte krommen achterwege kan laten, zoo moet thans nog de uitvoering der methode worden besproken.

Uitvoering der bloedvetbepaling volgens de spreidings-methode.

Het spreekt vanzelf, dat het bloed vetvrij moet worden opgevangen. Heeft men voor het een of andere doel een groote hoeveelheid bloed noodig, dan kan dit het eenvoudigst geschieden door een venapunctie, waarbij de te gebruiken naald vooraf eerst in een sterke soda-oplossing, daarna in een oplossing van kaliumoxalaat wordt uitgekookt. De eerste hoeveelheid uittredend bloed wordt niet gebruikt, de volgende hoeveelheid opgevangen in een weegfleschje, waarin zich voor elke 10 cm^3 op te vangen bloed 50 mg fijn gepoederd kaliumoxalaat bevindt. Dit laatste dient om stolling te voorkomen. Men kan echter evenals bij het bepalen van bloedsuiker geschiedt, ook van bloed gebruik maken, dat uit den vingertop is verkregen. Men heeft daartoe den vingertop slechts flink te ontvetten door hem met behulp van een in alcohol en aether gedrenkt watje af te vegen, te prikken met een op dezelfde wijze gereinigde

vaccinostyle, de eerste druppels bloed met een dito watje weg te wrijven en het vervolgens te voorschijn komende bloed op te zuigen in een vetvrij pipetje van 0.1 of 0.2 cm³ inhoud. Daar dit bloed natuurlijk snel stolt, moet het, nadat het pipetje aan den buitenkant met een schoonen doek is afgeveegd, direct in de extractievloeistof uitgepipeteerd worden. Als extractievloeistof wordt gebruikt een mengsel van sterken alcohol en aether (3 : 1), dit in navolging van Bloor¹⁾. Het geheel wordt dan onder omroeren verwarmd, totdat de aether kookt en daarna in een bekerglas gefiltreerd. Het filtraat tot droog uitgedampt, het residu opgenomen in petroleumaether, waarbij weer tot koken verwarmd wordt en tenslotte de oplossing in een maatkolfje van 10 cm³ gefiltreerd. Na aanvullen tot de deelstreep kan de meting geschieden. Voor 0.2 cm³ bloed wordt 5 cm³ van het mengsel gebruikt, nagespoeld wordt met 10 cm³. Gaat men van meer bloed uit, dan worden deze hoeveelheden naar verhouding vergroot; aangevuld kan echter steeds worden tot 10 cm³. Men spreidt van deze oplossing dan 0.1 cm³. Omdat, als men van 0.2 cm³ bloed is uitgegaan, de spreiding van 0.1 cm³ van de verkregen petroleumaether-oplossing meestal zal schommelen tusschen 4 tot 8 × 14 cm², meet men dus een oppervlak, waar een klein verschil bij een blanco-proef een betrekkelijk grooten invloed heeft. Men kan de fout, die daardoor zou kunnen ontstaan, heel gemakkelijk elimineeren door, wanneer de spreiding van 0.1 cm³ is bepaald, het vloeistofoppervlak niet schoon te maken, maar nadat men de glazen staaf naar achteren heeft teruggeschoven, nog eenige malen 0.1 cm³ op het vloeistofoppervlak te brengen. De spreidende stoffen addeeren zich telkenmale quantitatief en uit de verkregen eindspreiding vindt men dan de gezochte hoeveelheid bloedvet gemakkelijk met een nauwkeurigheid van 1 %.

Men zou voor deze bepaling ook van het kleine toestel gebruik kunnen maken (blz. 11). Hiermede wordt toch op gedestilleerd water bij kamertemperatuur een verwaarloosbare blanco verkregen en bereikt men derhalve bij spreiding van 0.1 cm³, of zoo noodig minder, reeds dezelfde nauwkeurigheid.

Bij het indampen kan men om kookvertraging te vermijden met voordeel gebruik maken van eenige platina-tetraeders als kooksteentjes; zij kunnen telkens door even uitgloeien opnieuw vetvrij gemaakt worden. Bij het onderzoek van bloedplasma gaat men natuurlijk op analoge wijze te werk. Het spreekt vanzelf, dat al het te gebruiken glaswerk vetvrij moet zijn gemaakt b.v. met behulp van een bichromaat-zwavelzuur-

¹⁾ Bloor, J. biol. Chem. **17**, 377, (1914).

mengsel (zie hoofdstuk I). De filttertjes worden door extractie met aceton en aether van elk spoor lipoid bevrijd.

In de Amerikaansche literatuur vindt men dikwijls opgegeven in plaats van het totaal vetgehalte van het bloed, de som van alle vetzuren, die uit de verschillende vetbestanddeelen door verzeeping verkregen kunnen worden. Men volgt dan de werkwijze van Bloor, Pelkan en Allan¹⁾, waarbij een afgemeten hoeveelheid bloed met het alcohol-aether mengsel (3:1) geëxtraheerd wordt, het extract verzeept, de cholesterine daaraan onttrokken met chloroform, waarna ten slotte na aanzuren de vetzuren nephelometrisch worden bepaald. Het moet mogelijk zijn, ofschoon dit door mij niet nagegaan is, dat men in plaats van deze nephelometrische bepaling de vetzuren in petroleum-aether oplost en hen dan volgens de spreidings-methode bepaalt. Hetzelfde geldt voor de cholesterine-bepaling. Men verdampt de chloroform, lost de cholesterine in petroleumaether op, waarna ook hier de spreiding kan plaats vinden.

Is een wandstandige plaatsing van het bloedvet in de capillairen mogelijk?

Het totaal bloedvet afkomstig uit 1 cm³ bloed van cavia, geit en konijn, geeft voor de spreiding waarden, die wisselen van 1.5—2.5 m², dat van den mensch spreidt iets meer 2—4 m². Deze getallen, die op nuchter bloed betrekking hebben, nopen tot een nadere beschouwing.

Lecomte du Noüy komt toch in een van zijn onderzoekingen²⁾, waarvan de methode in het volgend hoofdstuk nader ter sprake komt, tot de conclusie, dat de hoeveelheid eiwit, die in bloedplasma aanwezig is, ongeveer bij benadering in staat is, de wanden van de bloedcapillairen en de zich in het bloed bevindende cellen met een monomoleculaire laag (monolayer) te bedekken. Dit eiwit zou dan wel in een bijzonder gunstige positie zijn geplaatst. Hoewel ik hier in het midden wil laten, of het experiment du Noüy tot deze conclusie wettigt, wil ik mij wel afvragen, is ook een dergelijke plaatsing van bloedvet mogelijk? Hiertoe zal men dienen te berekenen, welk oppervlak een capillair van bepaalden diameter heeft bij gegeven inhoud.

Als grootte van den diameter van de capillair willen we aan-

¹⁾ Bloor, Pelkan and Allan, J. biol. Chem. **52**, 191, (1922).

²⁾ Lecomte du Noüy, J. exp. Medicine, **39**, 37, (1924).

nemen 7μ . Uit de formules voor het oppervlak en den inhoud van een cylinder $2\pi rh$ en $\pi r^2 h$ is direct af te leiden, dat bij een inhoud van 1 cm^3 het oppervlak x zal zijn te vinden uit de vergelijking

$$x = \frac{2}{r}.$$

Drukt men in de vergelijking r in μ uit, dan vindt men het oppervlak x in m^2 . Bij een capillair-wijdte van 7μ en een inhoud van 1 cm^3 behoort dus een oppervlak van 0.57 m^2 . Het totale bloedvet afkomstig uit 1 cm^3 bloed spreidt, zooals we zagen, $1.5\text{--}4 \text{ m}^2$. Hiervan komt ongeveer 1 m^2 (tabel XVII) op rekening van de lipoidstoffen der chromocyten. Men houdt dus voor het plasma over $0.5\text{--}3 \text{ m}^2$. Het totaal oppervlak van de capillair en van de zich in 1 cm^3 bloed bevindende cellen zal naar schatting bedragen $0.57 + 0.5$ (tabel XVII) $= 1.1 \text{ m}^2$. Voor dit oppervlak zal dan aan bloedvet aanwezig zijn $0.5\text{--}3 \text{ m}^2$. Men ziet, dat de beide oppervlakten elkaar in grootte naderen. Als men in aanmerking neemt, hoe sterk de diameter van de capillair kan wisselen ¹⁾, wordt door deze overeenkomst in grootte een wandstandige plaatsing van het bloedvet in hooge mate waarschijnlijk.

¹⁾ Steinach und Kahn, Arch. ges. Physiol. 97, 105, (1903).

HOOFDSTUK IV.

SPREIDING VAN EIWITTEN.

Ofschoon het met behulp van de methode, die in de vorige hoofdstukken beschreven werd, ook mogelijk is tot eiwitvliezen van moleculaire grootte te komen, werden toch dergelijke vliezen eenige jaren vroeger reeds op geheel andere wijze verkregen door *Lecomte du Noüy*¹⁾. De door hem verkregen resultaten zijn van groote beteekenis en worden, zooals we later zullen zien, door de uitkomsten, die het onderzoek omtrent het spreiden van eiwit opleverde, deels bevestigd, deels in een nieuw licht geplaatst. Daarom zal hier zijn onderzoekingswijze in het kort worden toegelicht.

Onderzoekingen van du Noüy.

Met behulp van de ringmethode mat hij de oppervlaktespanning van verschillende sera en vond, dat deze grootte, wanneer hij het serum rustig aan de lucht liet staan en bovendien elk spoor verontreiniging uitsloot, geleidelijk afnam om na zekeren tijd constant te worden. Vooral in de eerste tien minuten zag hij de oppervlaktespanning sterk afnemen. Daarna werd deze vermindering geringer om na ongeveer een half uur haar maximum waarde te bereiken. Deze metingen werden verricht, door van de diverse sera een zekere hoeveelheid op vetvrije horlogeglazen te brengen, die voor dit speciale onderzoek geheel trilvrij waren opgesteld.

Maakte hij nu van deze sera met physiologische keukenzoutoplossing verschillende verdunningen en bracht hij daarvan weer een nauwkeurig afgemeten hoeveelheid (2 cm³) op horlogeglasjes, waarvan vorm en grootte onderling precies gelijk waren, dan zag hij niet alleen hetzelfde verschijnsel, maar bovendien, dat bij een bepaalde verdunning de vermindering der oppervlaktespanning steeds een maximum bereikte. De metingen hadden plaats, nadat de serumverdu-

¹⁾ du Noüy, J. exp. Medicine, **35**, 575, 707; **36**, 115, 547, (1922); **37**, 659, **38**, 87, (1923); **39**, 37, 717; **40**, 129, 133, (1924).

ningen rustig 2 uur gestaan hadden. Deze tijdsduur werd door hem gekozen, omdat bij de onderzochte verdunningen bij langer staan praktisch geen verdere verlaging meer optrad. Zoo vond hij om enkele gevallen te noemen, die betrekking hebben op konijnenserum, een vermindering in oppervlaktespanning bij een verdunning 1 : 100 van 6 dynes, bij 1 : 1000 van 9, bij 1 : 10.000 van 13 tot 16, bij 1 : 100.000 van 11 en bij 1 : 1.000.000 van 3 tot 4 dynes.

De vermindering van de oppervlaktespanning, die na 2 uur staan verkregen wordt, noemde de Noüy kortheidshalve „timedrop” en deze grootte blijkt bij konijnenserum maximaal te zijn bij een verdunning 1 : 10.000. Hij verklaart het optreden van dit maximum door aan te nemen, dat het serumeiwit, dat zich in die twee uur rustig staan quantitatief, zoowel aan de oppervlakte vloeistof-lucht als aan die van vloeistof-glaswand, verzameld heeft, bij de verdunning 1 : 10.000 juist in staat is deze beide oppervlakten met een monomoleculaire laag te bedekken. De vorm van de door hem gebruikte horlogeglasjes was zoodanig, dat, wanneer hij daarop 2 cm³ van de verdunning bracht, de som van de genoemde oppervlakten 26.4 cm² bedroeg. Door horlogeglasjes van andere afmeting te nemen of door het glasoppervlak te veranderen, door kleine glasparels in de vloeistof te brengen, was gemakkelijk uit het optreden van de maximum „timedrop” bij een andere verdunning te bewijzen, dat aan beide oppervlakten voor de adsorptie van de eiwit-moleculen eenzelfde beteekenis toekomt.

Hij gaat dan een stap verder en berekent, uitgaande dus van de hypothese, dat bij die bepaalde verdunning zich een monomoleculair eiwitvliesje gevormd heeft, hoe groot wel het oppervlak is, dat één molecuul serumeiwit inneemt. Deze berekening is eenvoudig. Door een stikstofbepaling kent hij het eiwitgehalte van het serum en weet hij dus ook, hoeveel milligram eiwit in de 2 cm³ van de serumverdunning, die zich op het horlogeglas bevindt, aanwezig is. Als hij nu voor dit eiwit als molecuulgewicht 34000 aanneemt, is uit de constante van Avogadro het aantal moleculen te vinden, dat de 26.4 cm² inneemt. Hij vindt zoo voor het oppervlak van het molecuul serum-eiwit 1250 Å². Uit het molecuulairvolume van het eiwit, waarbij hij gebruik maakt van het door hem bepaalde s.g. 1.275, is dan de dikte van dit monomoleculair eiwitvliesje te berekenen, waarvoor dan 35.4 Å gevonden wordt.

Deze waarde stelt dus voor de gemiddelde lengte van het serumalbumine- en serumglobuline-molecuul. Volledigheidshalve moet ik hier nog aan toevoegen, dat de berekening niet gebaseerd is op een maximum „timedrop” bij een verdunning 1 : 10.000 maar bij 1 : 11.000, omdat nauw-

keuriger onderzoeken deze laatste waarde waarschijnlijker maken. Deze serumverdunding komt overeen met een verdunding van het eiwit van 1 : 168.000.

Doet du Noüy eenzelfde serie metingen, als boven beschreven, bij oplossingen van natriumoleaat en berekent hij daar dan ook de oppervlakte van het molecuul uit, dan komt hij tot een grootte van $50.2 \text{ \AA}^2$, wat wel sterk voor de juistheid van du Noüy's interpretatie pleit. Immers Langmuir vond reeds voor het molecuul oliezuur een oppervlakte van $46 \text{ \AA}^2$ en wij, bij nauwkeuriger meting op gedestilleerd water, $1/1000$ N. en $1/10$ N. HCl resp. 37, 45 en $45 \text{ \AA}^2$ bij 15° (tabel VI). Ook het vinden van een minimum van verdamping bij de serumverdunding, waarbij de maximum „timedrop” optreedt, maakt du Noüy's verklaring, als zou zich aan de oppervlakte een monomoleculair vliesje bevinden, wel zeer aannemelijk.

In een latere verhandeling¹⁾ gaat hij op dezelfde wijze na het gedrag van een zuiver eiwit, nl. kristallijn eieralbumine, met het doel ook hier tot de grootte van dit eiwitmolecuul te komen. Hij maakt daartoe van dit eiwit een reeks verdunningen tusschen 1 : 70.000 en 1 : 250.000 en vindt in tegenstelling met het serumeiwit, dat hier niet bij één bepaalde, maar bij verschillende verdunningen een maximum „timedrop” kan optreden.

De meeste van deze maxima komen echter niet bij elke meting te voorschijn, maar blijven dikwijls achterwege. Slechts bij de verdunningen 1 : 140.000 en 1 : 190.000 worden ze nagenoeg altijd gevonden. Hij zocht dit te verklaren door aan te nemen, dat het molecuul zich bij voorkeur volgens een bepaalde as richt en waar het maximum bij de verdunning 1 : 140.000 verreweg het scherpst is, ziet hij daarin een rangschikking van de eiwitmoleculen in de richting van hun lengte-as.

Het maximum bij de verdunning 1 : 190.000 zou dan op een horizontale ligging duiden. Ook voor het optreden van de maxima bij de andere verdunningen, weet hij een verklaring. Ze zouden niet berusten op de aanwezigheid van een monomoleculair eiwitvlies, maar op één van meerdere moleculen dik. Men wordt toch getroffen door het feit, dat de verdunningen, waarbij zich slechts in de minderheid der metingen maxima vertoonen, steeds veelvoudigen van elkaar zijn. Uit de maxima 1 : 140.000 en 1 : 190.000 berekent hij weer de grootte van het molecuul en komt dan bij een moleculairgewicht van 30800 en een s.g. 1.295, aannemende bovendien, dat het molecuul den vorm

¹⁾ du Noüy, J. biol. chem. **64**, 595. (1925).

heeft van een rechthoekig prisma, tot de volgende afmetingen $30.8 \times 30.8 \times 41.7 \text{ \AA}$.

Terwijl dus de oppervlakten, die du Noüy voor het serum- en het eieralbumine-molecuul (resp. 1250 en $905 \text{ \AA}^2$) vindt, verre het grootste oppervlak, dat we bij de vetten per molecuul vonden, overtreffen, hebben we een lengte, als hij aan deze eiwitmoleculen toekent, 35.4 en $41.7 \text{ \AA}$, reeds eerder ontmoet. Zoo staat in tabel I, zoowel voor palmitinezure cetylester als voor myricylalcohol, een lengte van $41 \text{ \AA}$ opgegeven, terwijl uit de gevonden spreiding voor de oliezure- en de palmitinezure cholestherine-ester (tabel XVI) voor deze beide moleculen een lengte te berekenen is van resp. 40 en $53 \text{ \AA}$.

Is het nu ook mogelijk met behulp van de spreidmethode tot de moleculaire afmetingen van het eiwitmolecuul te komen? Het eerste onderzoek¹⁾ daaromtrent, geschiedde met een oplossing van zuiver oxyhaemoglobine. Wat de spreiding hiervan leerde, bleek bij latere onderzoekingen voor alle andere onderzochte eiwitten mutatis mutandis te gelden. Daarom zal het resultaat van dat onderzoek hier eerst gereleveerd worden.

Spreiding van oxyhaemoglobine.

Het gebruikte oxyhaemoglobine was bereid volgens de methode aangegeven door Heidelberg²⁾. Deze komt in het kort hierop neer:

Bloed (wij gingen uit van paardenbloed) wordt uitgecentrifugeerd en de roode bloedcellen herhaalde malen met physiologische keukenzoutoplossing van 2° gewassen. De bloedcellen worden dan met behulp van een weinig water in een Erlenmeyerkolf overgebracht, een hoeveelheid toluol toegevoegd tot $\frac{1}{7}$ van het volume der gebruikte bloedlichaampjes en terwijl de kolf zich in een ijsbad bevindt, in de oplossing een mengsel van 4 deelen koolzuur- en 1 deel zuurstofgas geleid tot een breiige massa verkregen is. Met dit inleiden wordt dan nog eenige minuten onder krachtig schudden doorgegaan, waarna men de kolf goed gesloten 2×24 uur in een ijskast wegzet. Het oxyhaemoglobine kristalliseert in dien tijd voor het grootste gedeelte uit; door vervolgens bij lage temperatuur te centrifugeeren worden de kristallen uit de dikke pap verkregen. Op een ijskoude poreuse plaat wordt de kristal massa dan gedroogd, waarbij zorg gedragen wordt door herhaald omroeren, uitdrogen aan het oppervlak te voorkomen. Tijdens dit droogproces wordt over de

1) Gorter en Grendel. Versl. Kon. Ac. v. W. A'dam **34**, 1257. (1925).

2) Heidelberg, J. biol. Chem. **53**, 31, (1922).

oppervlakte een zachte stroom koolzuurgas geleid: Het kristallijne oxyhaemoglobine wordt vervolgens in een ijskouden mortier overgebracht en met zooveel water tot een dunne pasta gewreven, dat het eindvolume $3-3\frac{1}{2} \times$ de hoeveelheid oxyhaemoglobine uit de in bewerking genomen bloedlichaampjes in grammen uitgedrukt, bedraagt.

Deze vloeistof wordt dan met een normaal soda-oplossing getitreerd tot een minimum van troebeling. Het geheel weer koud uitgecentrifugeerd en in de heldere oxyhaemoglobine-oplossing bij een temperatuur van 0° weer bovengenoemd gasmengsel ingeleid tot kristallisatie optreedt. Na 2×24 uur staan in de ijskast heeft het oxyhaemoglobine zich kristallijn afgescheiden en kan een hernieuwde omkristallisatie op dezelfde wijze als boven plaats vinden. Het voor de spreiding gebruikte oxyhaemoglobine was zoo $5 \times$ omgekristalliseerd; dialyse had niet plaats. Het eiwit werd in iets meer als de benodigde hoeveelheid soda-oplossing opgelost, en deze oplossing, waarvan de eindconcentratie aan alkali 0.05 N. bedroeg en die 12.5 % oxyhaemoglobine bevatte, voor de spreidingsproeven gebruikt. Bij de bereiding was natuurlijk zoo vetvrij mogelijk gewerkt.

Wanneer men nu van deze oxyhaemoglobine-oplossing op gedestilleerd water van 15° bijv. 0.1 cm^3 druppelde, dan werd wel een kleine spreiding waargenomen, maar constante resultaten konden zoo niet verkregen worden. Als eerste voorwaarde om hier toe te kunnen komen, bleek het noodig, evenals we dat vroeger zagen bij de alcoholische oplossingen der vetzuren en vetten, dat een zeer kleine hoeveelheid, $0.0025-0.005 \text{ cm}^3$, onder de grootste voorzorg horizontaal op het vloeistofoppervlak werd gebracht. Als tweede voorwaarde moet de meting niet direct na het opbrengen plaats vinden, maar men moet hier eenigen tijd wachten, voordat de spreiding haar maximum heeft bereikt en de uitkomsten constant worden. Ook dit namen we, hoewel in mindere mate, reeds bij de vroeger besproken oliezuur-emulsies waar.

Werd niet gespreid op gedestilleerd water, maar op fosphaat-buffermengsels (p_H 5.7—8.0) om een mogelijken invloed van het in de haemoglobine-oplossing aanwezige alcali zooveel mogelijk uit te sluiten, dan bleef het resultaat gelijk; alleen kwam hierbij nog te voorschijn dat op buffermengsels in de buurt van het isoëlectrische punt ¹⁾ van

¹⁾ Hastings, v. Slijke, Neill, Heidelberger and Harington geven op voor het isoëlectrische punt van oxyhaemoglobine uit paardenbloed afkomstig, 6.7: (J. biol. Chem. **60**, 89, 1924).

Michaelis and Davidsohn bepaalden dit punt zonder de soort haemoglobine waarmee gewerkt werd nader aan te duiden op 6.8 (Biochem. Z. **41**, 102, 1912).

het haemoglobine (p_H 6.8) steeds een iets grotere spreiding werd verkregen als op buffermengsels van grotere of kleinere p_H .

Werd voor het moleculairgewicht van oxyhaemoglobine 16000 aangenomen, dan kon weer uit de waarden bij het spreiden gevonden, het oppervlak berekend worden, dat door één molecuul van dit eiwit wordt ingenomen. In tabel XXIII zijn deze oppervlakten, zooals ze na een opgegeven aantal minuten op eenige fosfaatbuffermengsels van verschillende p_H gevonden werden, verzameld, terwijl ze in fig. 69 graphisch als functie van den tijd zijn uitgezet.

Men ziet, dat op deze bufferoplossingen het eiwit ongeveer $\frac{1}{2}$ uur noodig heeft om zijn eindwaarde te bereiken. Deze geleidelijke spreiding werd geïnterpreteerd als het uiteenvallen van een laag geassocieerde moleculen, evenals Cary en Rideal¹⁾ dit beschrijven bij vetzuren. Brengt men deze in substantie op een vloeistofoppervlak, dan heeft de spreiding plaats volgens eenzelfde lijn als bij het oxyhaemoglobine verkregen werd.

Indien nu op phtalaatbuffermengsels (p_H 2.5—5.5) gespreid werd, dan bleek, dat niet alleen, naar gelang de vloeistof zuurder werd, steeds sneller de eindwaarde werd bereikt, maar ook, dat deze vrij plotseling sterk in grootte toenam. Zoo was bijv. op een p_H 4 steeds in 3—4 minuten de eindspreiding bereikt en bedroeg deze reeds het maximum, dat voor de oppervlakte van het oxyhaemoglobine-molecuul bij kamertemperatuur gevonden wordt, nl. $\pm 3000 \text{ \AA}^2$; op een p_H 3 werd deze eindwaarde reeds direct bereikt.

Ging men nu in plaats van op buffermengsels op eenige zoutzuurconcentraties de spreiding na, dan werd iets geheel anders waargenomen. Terwijl op gedestilleerd water (p_H 5.8) tot op water, waarvan de p_H door sporen zoutzuur tot 5 verlaagd was, de spreiding ongeveer gelijk blijft aan die op de fosfaatbuffermengsels, 1400—1800 $\text{\AA}^2$ per molecuul, begint bij verdere zoutzuurtoevoeging vrij plotseling de spreiding zeer snel te verminderen om in de buurt van 0.001 N. HCl een minimum te bereiken. Daarna neemt ze weer snel toe en op 0.1 N. HCl is de maximale spreiding, zooals die op phtalaatbuffermengsels van een p_H 3 verkregen werd, bereikt.

Wat den tijd aangaat, valt hier hetzelfde te vermelden als bij de spreiding op de buffermengsels; zolang de spreiding nog niet maximaal is, duurt het vrij lang, voordat de eindwaarde bereikt wordt, meestal ongeveer $\frac{1}{2}$ uur. Bij de minimale spreiding op 0.001 N. HCl komt men eigenlijk nimmer tot een constante eindwaarde. De vermeerdering in

¹⁾ Cary and Rideal, Proc. Roy. Soc. London. A, **109**, 301 (1925).

TABEL XXIII.

Tijd, waarna de meting plaats vond.	Oppervlakte, ingenomen door 1 molecuul oxy-haemoglobine bij 2.2 dynes per cm. (Mol. gew. 16000). Vloeistof, waarop gespreid werd phosfaatbufferoplossingen.			
Minuten.	p _H 6.5	p _H 6.9	p _H 7.5	p _H 8
	Å ²	Å ²	Å ²	Å ²
1	121	98	86	103
2	350	356	258	—
3	608	695	459	—
4	861	936	643	558
5	1062	1119	775	—
6	1205	1246	—	—
7	—	—	976	861
8	1401	1406	—	—
9	—	—	1160	—
10	1516	1550	—	1033
11	—	—	1263	—
12	1607	—	—	—
13	—	1705	1349	1177
14	—	—	—	—
15	1688	1756	—	—
16	—	—	1435	1234
17	1716	1779	—	—
18	—	—	—	—
19	—	1779	1492	1274
20	—	—	—	—
21	1779	—	—	—
22	—	—	1573	1303
23	—	—	—	—
24	—	1820	—	—
25	1802	—	1607	1325
26	—	—	—	—
27	—	1822	—	—
28	1805	—	1617	1330

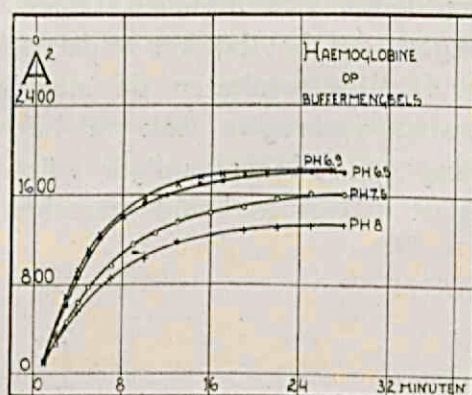


Fig. 69.

grootte is hier echter uiterst gering, valt bovendien moeilijk te meten, omdat bij deze bepaling de vloeistof zoo langen tijd aan de lucht staat blootgesteld, dat ze van dezelfde orde van grootte wordt als de vermeerdering der blanco-waarde. Op 0.01 N. HCl wordt de eindspreiding, die dan nog niet de maximale is, na 5 minuten bereikt, op 0.1 N. HCl wordt deze direct verkregen.

Evenals bij de vetzuren geconstateerd werd, dat bij verhooging van temperatuur de oppervlakten, door de verschillende moleculen ingenomen — zoo tenminste oplosbaarheid buiten gesloten kan worden — in grootte toenemen, werd ook bij het oxyhaemoglobine een dergelijke vergroting onder invloed van de temperatuur waargenomen. Zoo kon bijv. op fosphaatbuffermengsels, door de temperatuur van 15° op 40° te brengen, een spreiding van $1600 \text{ \AA}^2$ per molecuul tot $2200 \text{ \AA}^2$ vergroot worden.

Met een dergelijke vergroting gaat in het algemeen een verandering der druk-oppervlakte kromme gepaard; deze krijgt een schuiner verloop; de compressibiliteit van het vliesje wordt dus grooter. Eenzelfde verandering van deze kromme werd in nog veel sterkere mate opgemerkt in die gevallen, waar de spreiding maximaal was, dus op een phtalaat-oplossing van een $p_H 3$ of op $1/10$ N. HCl. Op een phtalaatbufferoplossing van een $p_H 4$ kon men deze beide vormen van compressibiliteit, gelijk we dat vroeger bij vetzuren zagen, bij bepaalde temperaturen in elkaar zien overgaan.

Nog een tweeden invloed heeft echter de temperatuur, zij verkleint sterk den tijdsduur, die noodig is om de eindspreiding te bereiken. Is, zooals reeds opgemerkt werd, ongeveer $1/2$ uur noodig om de eindspreiding op fosphaatbuffermengsels van 15° te bereiken, bij verhooging der temperatuur tot 40° , wordt deze tijd tot 2 minuten gereduceerd.

Zijn dit in hoofdzaak de resultaten bij het eerste onderzoek naar de spreiding van het oxyhaemoglobine verkregen, waaraan dan nog een beschouwing over de mogelijke afmetingen van het eiwitmolecuul werd vastgeknoopt, het zal straks blijken, dat bij het spreiden van andere eiwitten de gevonden feiten zich herhalen. Eerst wil ik aan het besprokene nog toevoegen, dat het bij het onderzoek naar de spreiding van bloed bleek, dat dezelfde resultaten, die met de zuivere oxyhaemoglobine-oplossing waren verkregen, ook te bekomen zijn met een haemoglobine-oplossing op veel eenvoudiger wijze gemaakt.

Men bevrijdt hiertoe door herhaald wasschen met physiologische

keukenzoutoplossing de roode bloedlichaampjes van aanhangend plasma, haemolyseert ze door toevoeging van water, waarna door centrifugeeren de haemoglobine-oplossing van stroma bevrijd wordt. Met deze oplossing kunnen dan de metingen verricht worden. Zonder twijfel is in deze oplossing ook nog eenig ander eiwit voorhanden; dit blijkt echter bij deze spreiding niet te storen, waaruit dus volgt, dat dit eiwit niet alleen op dezelfde wijze, maar ook nagenoeg evenveel moet spreiden als het haemoglobine zelf. Tegenover de mindere zuiverheid staat het voordeel, dat gewerkt wordt met een oplossing, die geen alcali bevat en bovendien telkenmale, zoo noodig, gemakkelijk versch bereid kan worden.

Met een dergelijke oplossing werd nu de spreiding van het haemoglobine nagegaan op verschillende zoutzuurconcentraties, zooals die nader onder hun p_H in tabel XXIV staan vermeld. Deze metingen hadden tot doel te zien, welken invloed een verandering van de zoutzuurconcentratie op de spreiding van dit eiwit heeft. Tevens hadden nu alle metingen steeds bij drie verschillende temperaturen plaats, waarvoor weer 1° — 2° , 15° — 16° en 40° werden uitgekozen. De concentratie aan haemoglobine in de gebruikte oplossingen was 10—15 %, gespreid werd steeds 0.025 tot 0.005 cm³.

De resultaten staan in tabel XXIV vermeld. De daar opgegeven waarden voor de oppervlakte ingenomen door één molecuul haemoglobine, zijn natuurlijk uit de eindspreiding berekend. In fig. 70 zijn ze als functie van de p_H graphisch afgezet; bovendien staan in de fig. 71, 72 en 73 de druk-oppervlakte krommen van dit eiwit weergegeven, zooals ze verkregen worden op gedestilleerd water, 0.001 N. en 0.1 N. HCl bij de drie onderzochte temperaturen.

We zien uit fig. 70, hoe er als het ware drie gebieden zijn, waar de zuurconcentratie eenigermate kan wisselen, zonder dat daardoor de eindspreiding, mits men de temperatuur constant houdt, beïnvloed wordt; maar tevens ook, hoe sterk in sommige gevallen de invloed van dezen laatsten factor op de spreiding kan zijn. Zoo blijkt op de oplossingen van een p_H 5.0—5.8 een temperatuursverandering van 1° tot 40° bijna een verviervoudiging van de spreiding tengevolge te hebben, terwijl eenzelfde verandering bij de maximale spreiding slechts een vergrooting van ongeveer 12 % met zich meebrengt. Hier kan nog aan worden toegevoegd, dat de concentratie van de gebruikte oplossing op de spreiding geen invloed heeft. Alleen bij zeer verdunde oplossingen wordt de eindspreiding op de zwakkere zuurconcentraties (p_H 5.8—3.0) eenige procenten groter. Op zuurdere vloeistoffen is geen verschil te constateeren.

TABEL XXIV.

Oppervlakte, ingenomen door 1 molecuul haemoglobine (Mol. gew. 16000).			
p _H van de vloeistof, waarop gespreid werd.	Temperatuur 1°.	Temperatuur 15°.	Temperatuur 40°.
	Å ²	Å ²	Å ²
1	2940	3025	3290
1.5	2780	2916	3285
2	1470	1539	2640
2.5	450	786	1485
3	80	137	405
3.5	85	203	405
4	160	324	575
4.5	405	1223	2060
5	570	1669	2220
5.5	590	1725	2230
5.8 (gedest. water)	600	1720	2240

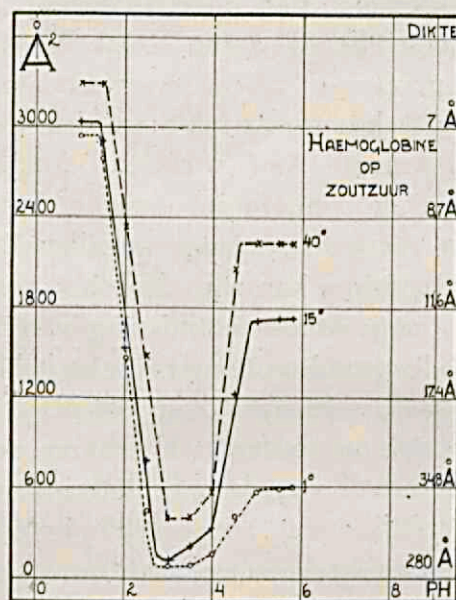


Fig. 70.

Uit het verloop der druk-oppervlakte krommen (fig. 71—73) is gemakkelijk af te leiden, na hetgeen we gezien hebben bij de spreiding van vetten en vetzuren, dat we hier met een goed spreidende stof te maken hebben en dat een mogelijke veronderstelling, als zou bij het spreiden een gedeelte van het eiwit in oplossing kunnen gaan, onjuist moet zijn. De invloeden van druk en temperatuur zijn dan ook, zoolang het vliesje nog niet gebroken is, geheel reversibel; trouwens dat van oplossen geen sprake kan zijn, is ook nog uit het volgende af te leiden: Is in de vloeistof, waarop gespreid wordt, ook maar een spoor eiwit aanwezig, dan zijn daarop geen goede blanco-waarden meer te verkrijgen. En nu blijkt, dat met een vloeistof, waarop vele bepalingen zijn geschied — zonder in dit geval deze vloeistof te vernieuwen — toch nog voor de blanco-proef, die elke bepaling vooraf gaat, waarden worden gevonden, die geheel overeenstemmen met die, als opgegeven in tabel III. Bovendien kan men elke spreiding, die kleiner is dan de maximale — $3000 \text{ \AA}^2$ per molecuul — op deze grootte brengen door aanzuren van de vloeistof tot 0.1 N.HCl , waaruit direct volgt, dat ook bij de kleinere spreiding de stof toch quantitatief aan de oppervlakte ligt.

Uit deze krommen valt verder op te merken, dat de kracht, die noodig is om de eiwitvliesjes tot de helft te comprimeeren, het grootst is op gedestilleerd water (compressibiliteit $34\text{--}46$ dynes), het kleinst op $\frac{1}{10} \text{ N.HCl}$ (compressibiliteit $18\text{--}20$ dynes), terwijl op $\frac{1}{1000} \text{ N.HCl}$ tusschenwaarden worden gevonden (compressibiliteit $25\text{--}31$ dynes). Deze compressibiliteit is dus nagenoeg van dezelfde grootte, als gevonden werd voor de goed spreidende vetzuren en vetten in den „expanded” toestand.

Uit de in tabel XXIV opgegeven waarden voor de oppervlakte, die één molecuul van dit eiwit inneemt, kan de dikte van het vliesje dat bij elk van deze oppervlakten behoort, berekend worden. Als s.g. van het haemoglobine werd voor deze berekening 1.275 gekozen. Bij eenige waarden voor de oppervlakte staan in fig. 70 de daarmee corresponderende dikten opgegeven, waaruit men ziet, dat deze grootte wisselt tusschen 7 en $280 \text{ \AA}$ en slechts bij een spreiding van $500\text{--}600 \text{ \AA}^2$ per molecuul overeenkomt met die, welke du Noüy berekent voor de twee door hem onderzochte eiwitten.

Volledigheidshalve zij hier nog vermeld, dat de waarde voor de dikte, in tegenstelling met die voor de oppervlakte, onafhankelijk van het aangenomen moleculairgewicht is, daar dit bij de berekening wegvalt.

DRUK-OPPERVLAKTE KROMMEN VAN HAEMOGLOBINE.

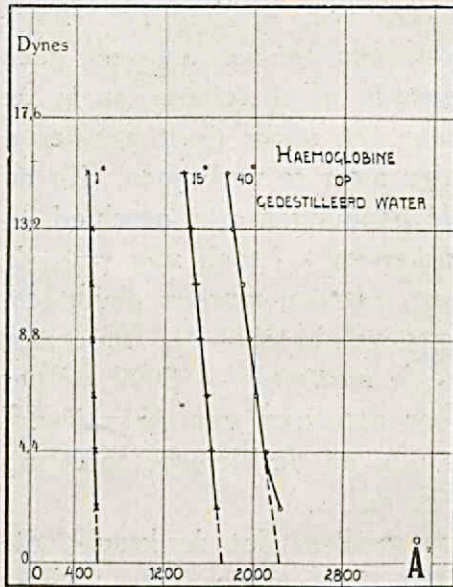


Fig. 71.

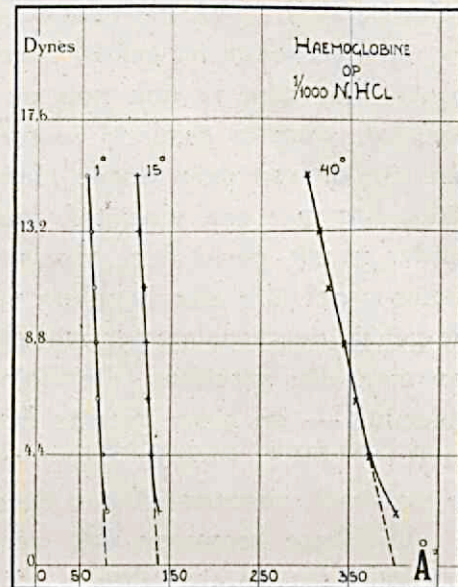


Fig. 72.

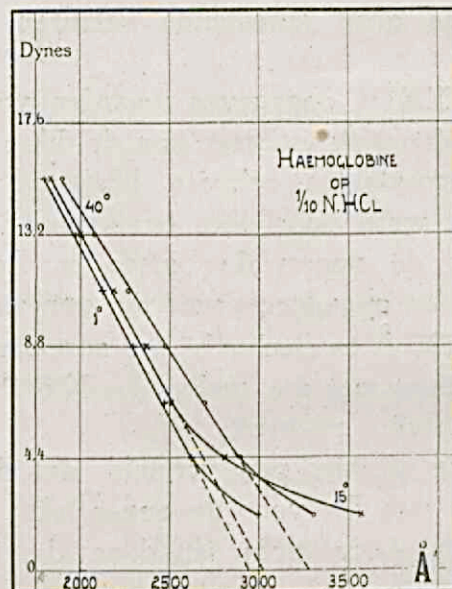


Fig. 73.

Voor ik zal trachten de waargenomen verschijnselen te verklaren, lijkt het mij wenschelijk nog eenige andere eiwitten op hun gedrag bij spreiding na te gaan. Hiertoe werden gekozen caseïne, plasma-eiwit, gelatine, pepton en gliadine, waarvan de drie eerste uitvoeriger zijn onderzocht.

Spreiding van caseïne.

Dit eiwit was een zeer zuiver preparaat, afkomstig uit het laboratorium van Prof. Kruyt, had een watergehalte van 12.5 % en werd voor gebruik nog eenmaal met aether geëxtraheerd, daarna opgelost met behulp van $\frac{1}{10}$ N. natronloog, waarvan voor iedere 100 mg 0.85 cm³ verbruikt werd. De concentratie der oplossing aan luchtdroge caseïne bedroeg bij de verschillende proeven 2 %. Van deze oplossingen werd voor het spreiden 0.0025—0.005 cm³. gebruikt; want ook hier is het eisch, slechts een dergelijke kleine hoeveelheid horizontaal op het vloeistofoppervlak te brengen.

Allereerst werd het gedrag op verschillende zoutzuurconcentraties nagegaan, volledigheidshalve weer bij 1°, 15° en 40° (fig. 74). Daarbij bleek, dat ook deze spreiding op gedestilleerd water en op de zwakkere zoutzuurconcentraties niet direct, maar eerst na eenigen tijd, hier 10—15 minuten, haar eindwaarde bereikt. Wordt de eindspreiding op gedestilleerd water bepaald en daarna op water, waarvan door zoutzuurtoevoeging de p_H geleidelijk verminderd werd — na elke bepaling had een geheele vernieuwing van de vloeistof plaats — dan ziet men eerst, juist in tegenstelling met het haemoglobine, de eindspreiding zich vergrooten om op een zoutzuurconcentratie van een p_H 4.5—4.8 een maximum te bereiken; daarna gaat het snel naar beneden en wordt op ongeveer dezelfde p_H (3.0—3.5) als bij het haemoglobine een minimumwaarde bereikt. Verdere zoutzuurtoevoeging doet de eindspreiding, die nu steeds vlugger bereikt wordt, weer snel toenemen en op $\frac{1}{10}$ N.HCl is een tweede maximum bereikt.

We hebben hier dus een verschijnsel voor ons, dat sterk doet herinneren aan hetgeen we bij de spreiding van palmitinezure- en oliezure zeep bij 1° en 15° onder gelijke omstandigheden vonden. De tijd, die noodig is om bij het eerste maximum de eindspreiding te bereiken, is iets korter dan op de zuurconcentraties ter weerszijden daarvan, maar duurt bij dit maximum toch nog altijd 5 minuten. De maximale spreiding op $\frac{1}{10}$ N. HCl wordt daarentegen oogenblikkelijk bereikt.

TABEL XXV.

Oppervlakte, ingenomen door 1 molecuul caseïne bij spreiding uit alcalische oplossing (Mol. gewicht 12600).			
P _H van de vloeistof, waarop gespreid werd.	Temperatuur 1°—2°.	Temperatuur 15°—16°.	Temperatuur 40°.
	Å ²	Å ²	Å ²
1	1750	2300	2120
2	1370	2070	2020
2.12	—	1860	1920
2.34	—	1770	1720
2.56	1180	1490	1550
2.78	—	1250	—
3	850	800	1450
3.12	—	800	—
3.34	—	800	1200
3.56	730	840	1450
3.78	—	1100	—
4	1070	1300	1520
4.12	1230	1290	—
4.34	1320	1400	—
4.56	1620	1600	1750
4.78	1450	1650	1030
5	1090	—	1020
5.12	750	1040	—
5.34	600	950	980
5.56	—	880	970
5.78	—	830	920
6	470	800	870
6.78	450	730	780

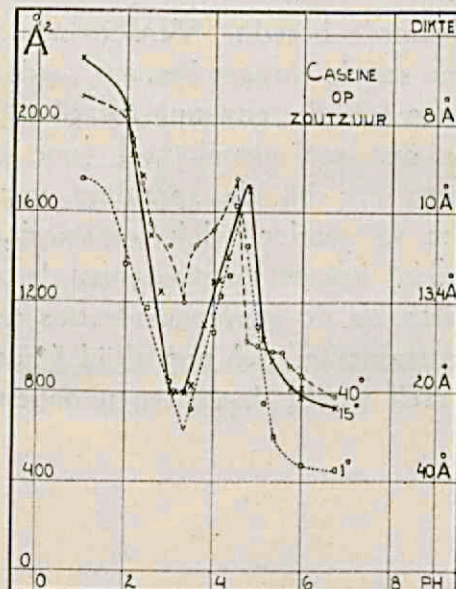


Fig. 74.

De resultaten van deze metingen staan in tabel XXV opgegeven, de oppervlakten door het molecuul ingenomen, zijn berekend naar een moleculairgewicht van 12600 en op luchtdroge caseïne betrokken. In fig. 74 zijn ze graphisch als functie van de p_H uitgezet.

Men neemt waar, hoe scherp het maximum op een p_H 4.5—4.8 en het minimum op een p_H 3.0—3.3 uitkomen; eerstgenoemde p_H valt ongeveer samen met het isoëlectrische punt van het eiwit, laatstgenoemde met die, waarop het zure caseïnesol een maximum van viscositeit vertoont¹⁾. De invloed van de temperatuur op de grootte van de spreiding zijn bij dit maximum en minimum verschillend. Bij het maximum heeft zij nagenoeg geen invloed, bij het minimum wordt, naarmate de temperatuur hoger is, per molecuul een groter oppervlak gevonden; bovendien volgt uit het verloop der desbetreffende kromme, dat het minimum dan neiging tot verdwijnen begint te vertoonen. In dezelfde figuur staan ook de dikten, die met bepaalde oppervlakten correspondeeren opgegeven, zij blijken te varieeren tusschen ongeveer 8 en 40 Å — als s.g. voor de berekening werd 1.3 genomen — zoodat de grootste dikte hier slechts $\frac{1}{7}$ deel bedraagt van die, welke bij het haemoglobine gevonden wordt, terwijl de dikte bij de maximale spreiding voor beide eiwitten tot dezelfde grootte nadert.

Opgemerkt dient nog te worden, dat deze resultaten met het caseïne bereid volgens Hammarsten, zooals de handel dat levert, niet te verkrijgen zijn. Men kan dan wel bij dezelfde uitvoering der proef soms het minimum op ongeveer $\frac{1}{1000}$ N.HCl vinden, maar het maximum op een p_H 4.5—4.8 treft men nimmer aan, dat op $\frac{1}{10}$ N.HCl treedt steeds op; meestal bedraagt de spreiding op gedestilleerd water en de zwakkere zuurconcentraties ongeveer 1200—1600 Å² per molecuul bij 15°, is dus groter dan die van het zuivere caseïne, maar veel minder constant en gaat, naar gelang de p_H van de vloeistof kleiner wordt, geleidelijk in de maximale spreiding over.

Voor dit verschillend gedrag der beide caseïne soorten is m.i. de groote hoeveelheid zouten, waaronder phosphaten, die in het caseïne Hammarsten aanwezig zijn, aansprakelijk. Zij maken, dat de spreiding als het ware op een bufferoplossing plaats heeft en leiden dan ook tot een resultaat, dat daarmee in overeenstemming is; want spreidt men het zuivere caseïne op fosphaatbuffermengsels van een p_H 5.8—7.0, dan wordt bij 15° na verloop van 10 minuten een eindspreading van ongeveer 1500 Å² gevonden en deze gaat op de phtalaat-

¹⁾ Lier, Het caseïnesol. Diss. Utrecht, 1924.

TABEL XXVI.

Oppervlakte, ingenomen door 1 molecuul caseïne (Mol. gew. 12600).				
PH van de vloeistof, waarop gespreid werd.	Grootte op $\text{HNO}_3\text{opl.}(15^\circ)$.	Grootte op $\text{HCl. opl.}(15^\circ)$.	Grootte op $\text{H}_2\text{SO}_4\text{opl.}(15^\circ)$.	Grootte op $\text{H}_2\text{SO}_4\text{opl.}(1^\circ)$.
	$\text{\AA}^2$	$\text{\AA}^2$	$\text{\AA}^2$	$\text{\AA}^2$
1.5	1960	—	1960	1920
2	1629	2070	1920	1840
2.5	1323	1520	1860	1750
3	850	800	1602	1520
3.25	780	800	—	—
3.5	960	840	1240	1170
3.75	1159	1090	—	—
4	1325	1300	1360	1345
4.5	1670	1590	1520	1480
4.75	1600	1650	—	—
5	1295	—	1150	1140
5.5	964	880	902	888
5.8	730	830	680	660

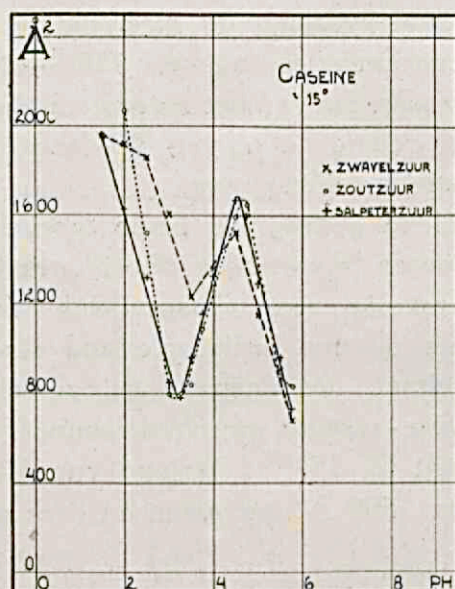


Fig. 75.

bufferoplossingen, naar gelang de p_H kleiner wordt, geleidelijk in de maximale spreiding over. Deze wordt op een p_H 4 reeds na twee minuten bereikt. Evenals bij het oxyhaemoglobine wordt dus op bufferoplossingen nimmer een minimum aangetroffen.

Men kan zich afvragen, zijn de resultaten, zooals ze bij het spreiden op de verschillende zoutzuurconcentraties gevonden werden, ook te verkrijgen als het zoutzuur door andere zuren vervangen wordt? Dit is voor twee zuren, nl. salpeterzuur en zwavelzuur, nader bij 15° onderzocht. In beide gevallen komt men werkelijk tot nagenoeg dezelfde uitkomst (tabel XXVI, fig. 75); alleen is de spreiding, die bij het minimum gevonden wordt, wanneer op zwavelzuur-oplossingen gemeten wordt groter dan op salpeterzuur- of zoutzuur-oplossingen. Ook wanneer bij 1° gespreid wordt, blijft dit verschil bestaan.

Dat het caseïne ook weer goed spreidt, kan blijken uit de drukoppervlakte krommen in de fig. 76—78.

De compressibiliteit van de caseïnevliesjes wisselt afhankelijk van de onderzochte temperatuur, op gedestilleerd water van 16—22, op 0.001 N.HCl van 14—19 en op 0.1 N.HCl van 14—18 dynes en is dus in het algemeen lager, dan die we aantreffen bij het haemoglobine. De vliesjes zijn hier gemakkelijk comprimeerbaar. Hun compressibiliteit is van dezelfde grootte, als gevonden werd bij het tricaproïne.

Werden boven beschreven waarnemingen verricht met het basische caseïnesol, hier zullen ook nog in het kort de resultaten weergegeven worden, die met het zure sol verkregen zijn. De caseïne werd hiertoe met behulp van 0.1 N.HCl opgelost, waarvan voor iedere 100 mg 0.9 cm³ genomen werd. De concentratie der oplossing bedroeg 2 %, waarvan voor het spreiden weer 0.0025—0.005 cm³ op het vloeistofoppervlak gebracht werd. Zooals zich liet verwachten, kon bij het spreiden op buffermengsels geen verschil tusschen de beide oplossingen gevonden worden. Bij de metingen op de verschillende zoutzuurconcentraties werd begrijpelijkerwijs een ander resultaat verkregen. Waar deze metingen van minder belang zijn, werden ze slechts bij 15° verricht. Tabel XXVII, fig. 79, geeft het resultaat weer.

De spreiding blijft vanaf een p_H 6.8—5.0 ongeveer gelijk (600 Å² per molecuul) om op een p_H 4.5—3.0 tot de helft te verminderen, waarna een zeer snelle stijging optreedt, die op 1/10 N.HCl haar maximum (2000 Å² per molecuul) bereikt.

DRUK-OPPERVLAKTE KROMMEN VAN CASEÏNE.

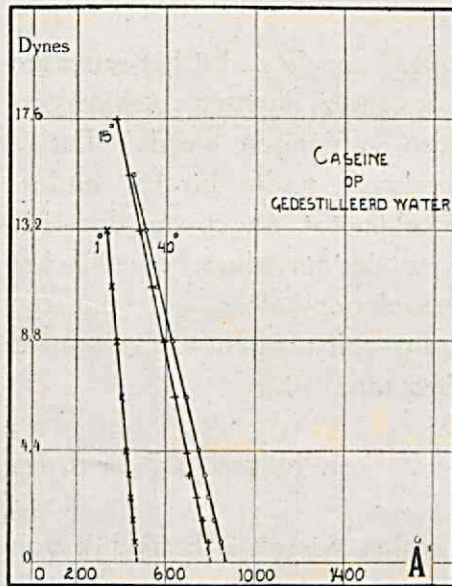


Fig. 76.

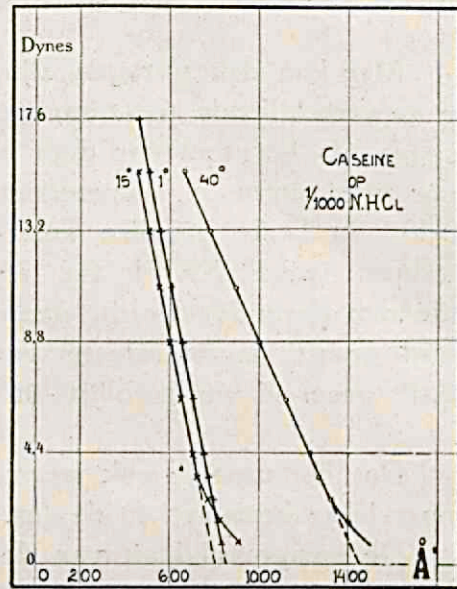


Fig. 77.

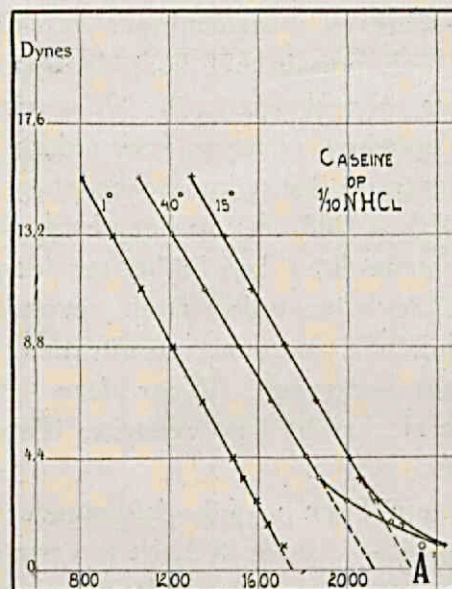


Fig. 78.

TABEL XXVII.

Oppervlakte, ingenomen door 1 molecuul caseïne bij spreiding uit zoutzure-oplossing (Mol. gew. 12600) temperatuur 15°.	
p _H van de vloeistof, waarop gespreid werd.	Oppervlakte in Å ² .
1	1980
2	1700
2.5	1500
3	300
3.5	350
4	340
4.2	350
4.5	350
4.9	600
5.2	660
5.5	600
5.7	580
6	600
6.2	600
6.5	620
6.8	620

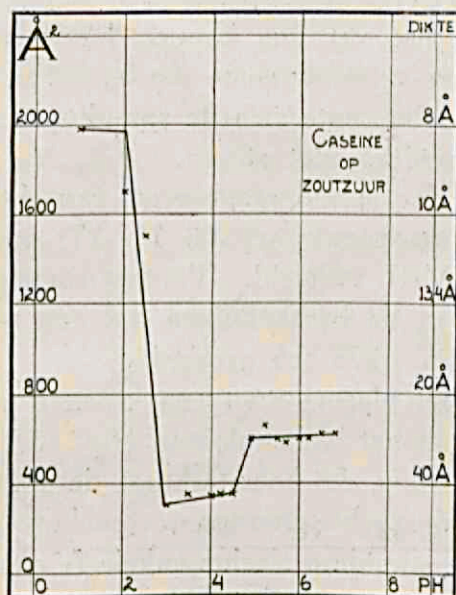


Fig. 79.

Indien het mogelijk geweest was, de spreiding van deze oplossing ook op alcali na te gaan, dan zou men waarschijnlijk naast een minimum ook een tweede maximum hebben zien optreden. Helaas is het tot nog toe onmogelijk gebleken, zooals reeds vroeger gezegd werd, spreidingsproeven op alcalische vloeistoffen uit te voeren.

Spreiding van plasma-eiwit.

Voor het onderzoek van dit eiwit werd evenals ook du Noüy deed, eenvoudig van bloedplasma gebruik gemaakt, dat door centrifugeeren uit vetvrij opgevangen bloed verkregen was. Het eiwitgehalte werd uit het stikstofgehalte berekend met den factor 6.6 (zie blz. 90). Voor de spreiding werd het plasma $10\times$ met gedestilleerd water verdund, waarna de meting weer met $0.025\text{--}0.005\text{ cm}^3$ plaats had. Men kan natuurlijk tegen het gebruik van deze vloeistof, waarin normaliter steeds vetstoffen voorkomen het bezwaar aanvoeren, dat deze bij het spreiden ook mee bepaald zullen worden. Al zou dit bij deze wijze van uitvoeren der meting het geval zijn, wat zeer onwaarschijnlijk is, dan toch nog kan de fout, die zou optreden, zelfs als al die vetstoffen quantitatief zouden mee spreiden, slechts van geringe beteekenis zijn. Een vetbepaling toch, uitgevoerd zooals op blz. 55 staat aangegeven, deed zien, dat van de spreiding van 1 cm^3 van het gebruikte bloedplasma, hoogstens 0.6 m^2 van vet afkomstig kunnen zijn, terwijl dezelfde hoeveelheid plasma op gedestilleerd water 60, op 0.1 N.HCl zelfs 78 m^2 spreidde. Op 0.001 N.HCl is de spreiding zooals gewoonlijk veel minder, hier 7.5 m^2 en zou het vet dus kunnen hinderen. Waar het echter minder op de absolute maat aankomt, die bij dezen zuurgraad gevonden wordt, dan wel, in welke mate zich de spreiding verkleint, kan ook hier een mogelijke vetspreiding niet storen.

De uitkomsten der spreidingsproeven van dit eiwit, die weer op verschillende zoutzuurconcentraties bij 1° , 15° en 40° plaats hadden, staan in tabel XXVIII vermeld. Tevens staan hierbij weer eenige dikten opgegeven; aan de berekeningen ligt een moleculairgewicht van 34000 en een s.g. van 1.275 ten grondslag.

Men ziet, hoe het plasma-eiwit een kromme geeft, die de daarmee corresponderende van het haemoglobine (fig. 70) zeer nabij komt. Op te merken valt verder nog, dat hoe sterk ook de dikte, die bij de minimum spreiding der drie onderzochte eiwitten gevonden wordt, in grootte wisselt, deze bij de maximale spreiding slechts enkele $\text{\AA}^2$ verschilt. Tevens blijkt,

TABEL XXVIII.

Oppervlakte, ingenomen door 1 molecuul plasma-eiwit (Mol. gew. 34000).			
P _H van de vloeistof, waarop gespreid werd.	Temperatuur 1°.	Temperatuur 15°.	Temperatuur 40°.
	Å ²	Å ²	Å ²
1	4770	4820	5500
1.5	3780	4730	5330
2	1204	1460	1600
2.5	516	430	860
3	430	430	860
3.5	568	1550	2064
4	2184	2580	3956
4.5	2890	3690	3900
5	2870	3690	3990
5.5	2870	3670	3870
5.8 (gedest. water)	2750	3610	3870

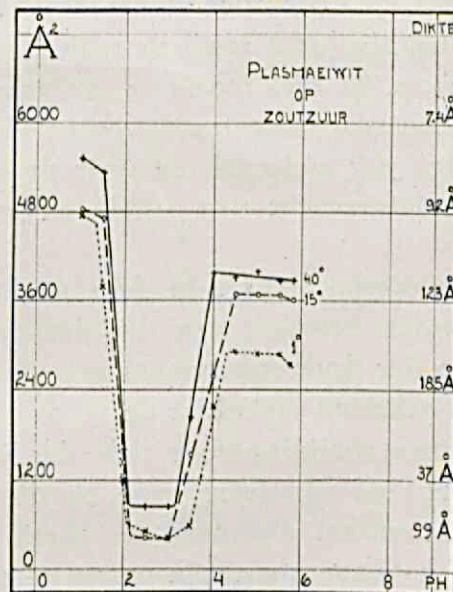


Fig. 80.

dat de dikte, die du Noüy voor het monomoleculaire vliesje van dit eiwit vond, nl. 35.4 Å, bij de spreiding op een p_H ter weerszijden van het minimum aangetroffen wordt.

In fig. 81, 82 en 83 staan weer de druk-oppervlakte krommen, zooals men ze op gedestilleerd water, $1/1000$ N. en $1/10$ N.HCl vindt, opgegeven. Ook hier naar men ziet, een uitmuntend spreidend eiwit, waarvan de invloeden van druk en temperatuur op de vliesjes geheel reversibel zijn. De compressibiliteit, die op gedestilleerd water 23—28, op $1/1000$ N.HCl 26—36, en op $1/10$ N.HCl 21—32 dynes, al naar gelang van de temperatuur bedraagt, komt dus meer met die van de haemoglobine- als met die van de caseïnevliesjes overeen.

Spreiding van gelatine.

Uitgegaan werd van zuivere isoëlectrische gelatine afkomstig uit het laboratorium van Prof. Kruyt, die voor gebruik nog éénmaal met aether was geëxtraheerd, en daarna in een waterige oplossing van 3.3 % voor het spreiden gebruikt werd, waartoe 0.005 cm³ op het vloeistofoppervlak werd gebracht. Een gelatine-oplossing van deze sterkte gelatineert bij kamertemperatuur, zoodat bij elke meting de gelatine-oplossing verwarmd (tot 37°) op het vloeistofoppervlak werd gepipeteerd. Minder geconcentreerde oplossingen konden, om aan dit bezwaar te ontkomen, niet gebruikt worden, omdat de spreiding van dit eiwit gering is en de te meten oppervlakten dan te klein zouden worden.

Fig. 84—86 geven de druk-oppervlakte krommen van dit eiwit bij eenige verschillende temperaturen resp. op gedestilleerd water, $1/1000$ N. en $1/10$ N.HCl weer; fig. 87 die, zooals ze gemeten worden bij 15° op eenige verschillende zoutzuurconcentraties. Voor de berekening van de oppervlakte, ingenomen per molecuul, en voor de dikte van het vliesje werd van een moleculairgewicht van 10800 en een s.g. van 1.3 gebruik gemaakt.

Men neemt gemakkelijk waar, in hoe sterke mate het gedrag van gelatine bij spreiden verschilt van dat der drie reeds behandelde eiwitten. Het verloop der druk-oppervlakte krommen is niet meer recht, maar de lijn is sterk gekromd en neemt de vorm aan van een $PO = K$ lijn. Men heeft hier een spreiding voor zich, die herinnert aan die van laurine- en caprinezuur of van tributyrine bij de vetten. Verhooging van temperatuur doet in het algemeen de spreiding verminderen; de invloeden van druk en temperatuur zijn onder geen omstandigheid hier meer reversibel. Een meting op 0.1 N.HCl bij 2° verricht, verbetert in

DRUK-OPPERVLAKTE KROMMEN VAN PLASMA-EIWIT.

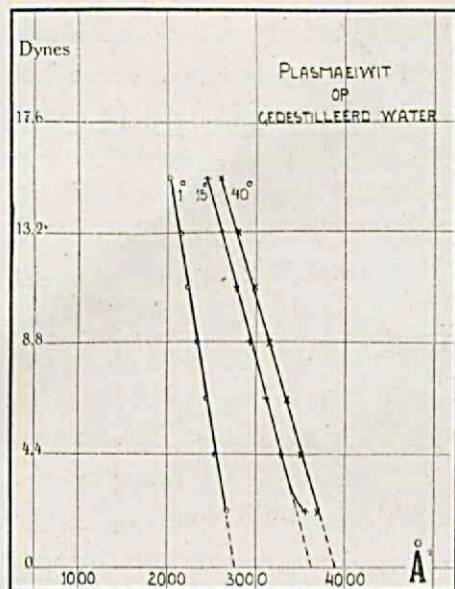


Fig. 81.

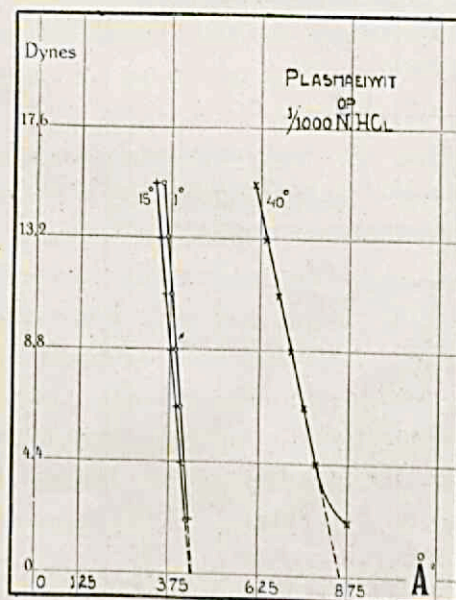


Fig. 82.

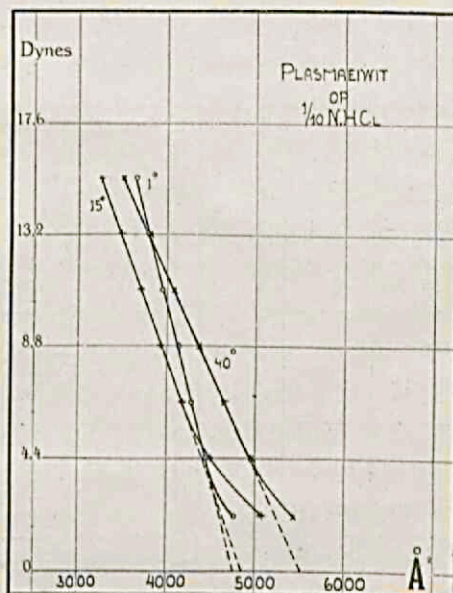


Fig. 83.

DRUK-OPPERVLAKTE KROMMEN VAN GELATINE.

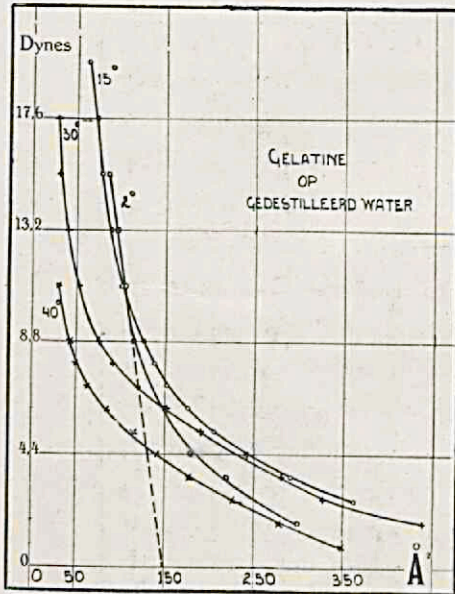


Fig. 84.

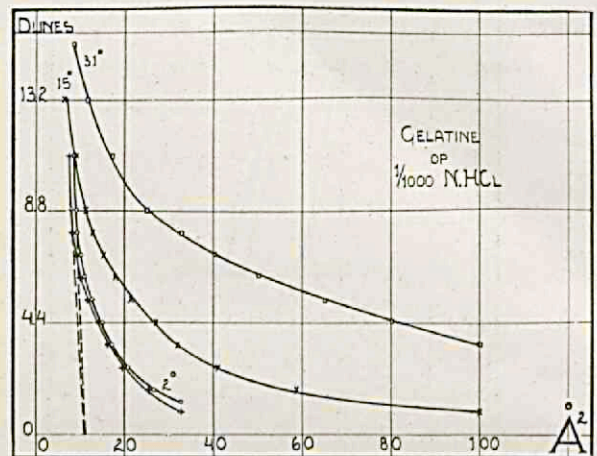


Fig. 85.

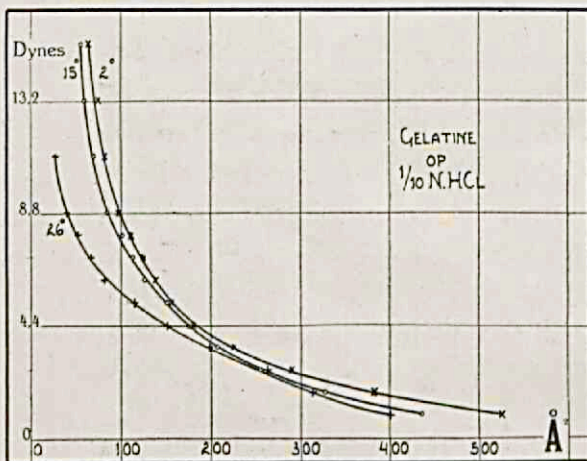


Fig. 86.

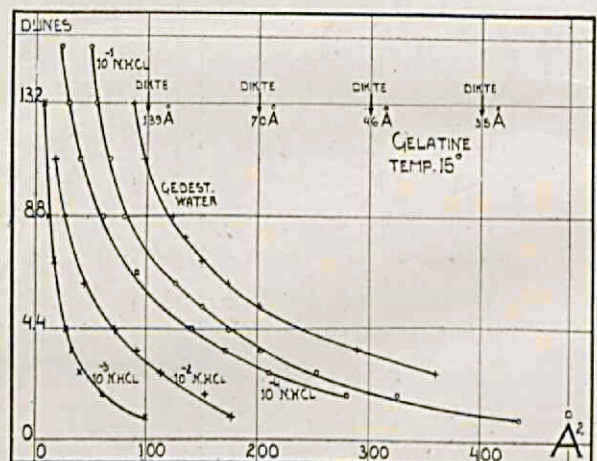


Fig. 87.

tegenstelling met wat we vroeger bij laurine-, caprinezuur en tributyrine zagen, de spreiding niets.

Wil men voldoende onderling vergelijkbare uitkomsten verkrijgen, dan is men verplicht, de bepalingen zoo snel mogelijk te verrichten. Uit fig. 87 is te zien, dat ook hier op $1/1000$ N.HCl de grootte der spreiding een minimum bereikt; op sterkere zoutzuurconcentraties wordt de oppervlakte ingenomen per molecuul weer grooter, maar de spreiding op $1/10$ N.HCl overtreft hier die op water niet.

Men ziet bovendien aan de opgegeven waarden voor de dikte, dat het ook bij zeer kleinen druk niet lukt tot zulke dunne vliesjes te komen, als op $1/10$ N.HCl bij de goed spreidende eiwitten verkregen werden. De kleinste dikte, die we hier aantreffen was ongeveer 30 Å. De bij de krommen opgegeven grootten voor het oppervlak per molecuul en voor de dikte geven niet de absolute waarden weer; alleen door snel een oplossing van de opgegeven concentratie, tot 37° verwarmd, te meten komt men tot bovenstaand resultaat. Kookt men 10 cm³ van de gelatine-oplossing met eenige druppels zoutzuur van 25 % op, dan blijkt dit eiwit het vermogen tot spreiden verloren te hebben.

Spreiding van pepton en gliadine.

Voor het onderzoek naar de spreiding van eerstgenoemd eiwit diende pepton siccum van W i t t e, waarvan een 2 % waterige oplossing gebruikt werd, nadat door aetherextractie het product van vet bevrijd was.

Het onderzochte gliadine was een handelsproduct, dat door oplossen in 70 % alcohol, indampen der verkregen oplossing onder nu en dan toevoegen van eenige druppels alcohol ter voorkoming van troebeling en vervolgens uitgieten van de verkregen stroop in sterken alcohol, gezuiverd werd. Hierop volgde dan nog een aetherextractie. De concentratie der gebruikte oplossing was 1 %, als oplosmiddel diende 70 % alcohol. Van beide eiwitoplossingen werd 0.005 cm³ gespreid.

De resultaten met de peptonoplossing verkregen gelijken zeer veel op die van het gelatine. Ook hier kan men aan de in fig. 88 opgegeven grootten voor het oppervlak en voor de dikte — de berekening had plaats met een moleculairgewicht van 860 en een s.g. van 1.3 — geen al te groote beteekenis toekennen, omdat de tijd, waarin de meting geschiedt en de concentratie van de gebruikte oplossing evenals bij het gelatine, op de spreiding van invloed zijn. Wel spreidt pepton in het algemeen iets

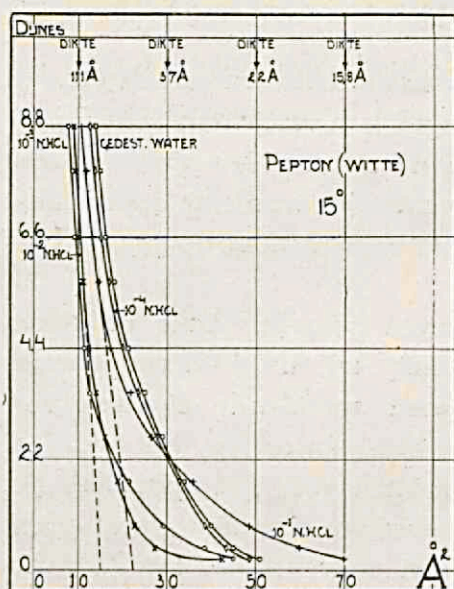


Fig. 88.

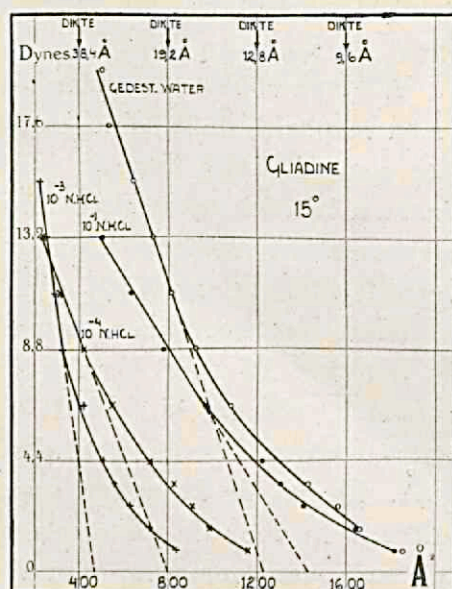


Fig. 89.

beter; ook na even opkoken met zoutzuur blijft de spreading onveranderd. De kleinste maat voor de dikte bedroeg ongeveer 15 Å bij 5 mg belasting op $1/10$ N.HCl. De spreading bij het minimum op $1/1000$ N.HCl bleek op $1/100$ N.HCl nog slechts weinig groter en overtrof op $1/10$ N.HCl ook hier de spreading op gedestilleerd water niet.

Zooals reeds staat opgegeven, werd gliadine gespreid uit een 70 % alcoholische oplossing. Hier kan dus een nieuwe factor — het oplosmiddel — een rol gaan spelen, waaromtrent geen nadere onderzoekingen zijn verricht. Wij hebben ons dan ook tevreden gesteld met het spreiden van de gliadine-oplossing op enkele zoutzuurconcentraties (fig. 89), waaruit direct bleek, dat we hier een veel beter spreidend eiwit voor ons hadden, dat wat vermogen tot spreiden betreft, het midden houdt tusschen de goed en slecht spreidende eiwitten. De invloeden van druk en temperatuur zijn, tenminste wat het rechte deel der kromme betreft, reversibel; alleen waren de uitkomsten der spreading hier meer wisselend en bleek bovendien de concentratie der oplossing van invloed op de grootte van het gevonden oppervlak; bij verdunnen der oplossing wordt toch een relatief kleinere spreading gevonden. In beide gevallen zal de alcohol hier wel aansprakelijk voor zijn. De bij de krommen vermelde getallen voor de grootten van het oppervlak per molecuul — berekend naar een moleculairgewicht van 12000 en een s.g. van 1.3 — gelden dus ook hier uitsluitend voor oplossingen van de opgegeven concentratie; men ziet, dat de dikte bij de maximale spreading 11 Å

bedraagt. Houdt men er rekening mee, dat de gevonden eindspreiding wel te klein zal zijn, omdat uit alcohol werd gemeten, dan stemt deze dikte vrij voldoende met die der goed spreidende eiwitten bij hun maximale spreiding overeen.

De spreiding op $1/10$ N.HCl overtreft weer die op water, zooals dat ook bij die eiwitten het geval is.

Oplossingen van agar-agar, arabische gom en zetmeel, konden nog niet tot spreiden worden gebracht.

Bespreking der resultaten.

Waaraan het zal moeten worden toegeschreven, dat eiwitten spreiden, ligt voor de hand. Het eiwitmolecuul, toch heeft twee ten opzichte van water sterk polaire groepen, de amino- en de carboxyl-groep. Bij hun binding tot CO-NH-groepen, blijven zij hun polair karakter behouden en het is op deze polariteit, dat de spreiding van het eiwit in hoofdzaak berust; daarnaast zal ook de aanwezigheid van vrije polaire groepen eenigen invloed kunnen uitoefenen. De maximale spreiding, die we bij de goed spreidende eiwitten aantreffen, laat zich niet anders verklaren, dan dat nagenoeg al deze CO-NH-groepen naar het wateroppervlak toe gericht zijn. Bij een dergelijke ligging geeft de dikte van het vliesje de gemiddelde lengte van de aminozuren aan, waaruit het eiwit is opgebouwd en wordt het tegelijkertijd duidelijk, waarom deze dikte bij die eiwitten van nagenoeg dezelfde grootte is. Men kan berekenen ¹⁾ uit de getallen voor de afzonderlijke aminozuur-groepen en uit onze gegevens omtrent de grootte der maximale spreiding, dat de gemiddelde spreiding per aminozuur ongeveer $18 \text{ \AA}^2$ bedraagt, dus een oppervlak van dezelfde grootte als een dergelijke vetzuurketen in den „condensed” toestand inneemt. Zonder eenigen twijfel kan dan ook de maximale spreiding als de aminozuur-spreiding van het eiwit beschouwd worden. Het gedrag bij spreiding zal dan afhangen van de lengte en het aantal der onderling verbonden aminozuren. Een eiwit, dat opgebouwd is uit zeer korte aminozuren, zooals bijv. gelatine, waarin voor 25% glycocoll voorkomt met een keten van slechts 2 C-atomen, zal slecht moeten spreiden en zich als tributyrine gedragen, evenzoo pepton, waar het aantal aminozuren klein is. Is dus de maximale spreiding van het eiwit gemakkelijk

¹⁾ Berekend uit de opgaven van Plimmer, Chemical constitution of the proteins Part I, Analysis, 1917.

te interpreteren, moeilijker wordt dit met de uitkomsten, die op de verschillende zoutzuurconcentraties worden gevonden. Laten we dit bespreken aan de hand van hetgeen we gevonden hebben bij de spreiding van het basische caseïnesol.

Op gedestilleerd water wordt een spreiding kleiner dan de maximale waargenomen, evenals we dat bij de zeepoplossingen onder gelijke omstandigheden vonden. Waar oplossen bij het spreiden niet kon worden aangetoond, moet een gedeelte van het eiwit zich op andere wijze aan de spreiding weten te onttrekken, wat niet anders kan, dan dat het op de een of andere manier zijn vetzuurketens tijdelijk weet op te bergen. Men kan zich dit het gemakkelijkst voorstellen, door het eiwitmolecuul zich in bolvormige agglomeraten te laten rangschikken, waarin de vetzuurketens der aminozuren naast elkaar liggen met hun polaire groepen naar het oplosmiddel toe. In deze agglomeraten kan men de aanwezigheid van water aannemen. Bij spreiding op zuur en ook reeds op gedestilleerd water wordt deze bouw verstoord; het eiwit-complex ontrolt zich meer of minder en de aminozuren komen aan het vloeistofoppervlak. Bij het isoëlectrische punt is dit quantitatief geschied en de spreiding derhalve maximaal, wat ons niet behoeft te verwonderen, daar juist fysische eigenschappen zooals viscositeit, zwellings, hydratatie en gelatineering in dit punt een minimum bereiken. Door nu door toevoeging van zuur op een kleinere p_H te gaan spreiden, verandert de grootte der spreiding door de optredende zoutvorming, evenals ook onder denzelfden invloed de genoemde eigenschappen bij het sol zich wijzigen; en op ongeveer dezelfde p_H , waar het sol een maximum van hydratatie en viscositeit vertoont, bereikt de spreiding hier haar minimum en hebben zich de eiwitmoleculen weer geassocieerd. Eerst door op nog zuurdere vloeistoffen te gaan spreiden, vallen deze complexen weer uiteen en komt de aminozuur-spreiding, maar thans terstond onder invloed van de grootere zuurconcentratie, te voorschijn.

Het is wel opvallend, dat, terwijl in de nieuwe literatuur men het moleculairgewicht der eiwitmoleculen steeds groter neemt, bijv. gliadine 72.000, gelatine 150.000, caseïne 192.000, de dikte van die eiwitvliesjes bij hun monomoleculaire spreiding zoo klein is. Men moet zich hierdoor het eiwitmolecuul wel zeer plastisch denken.

Hoe moeten wij de waarden, die du Noüy voor de grootte van het eiwitmolecuul vindt beschouwen? Het onderzoek, dat hij verrichtte aan het zuivere kristallijne eialbumine, waar dus verontreinigingen geen rol meer kunnen spelen, wijzen reeds in de richting, waarin het antwoord te zoeken is. Hij zag daar toch, dat niet alleen bij één bepaalde eiwit-

verduunning steeds een „maximum timedrop” optrad, maar dat dit ook bij tal van andere verdunningen het geval kon zijn. Zoo trof hij dit ook aan bij oplossingen, waarin veel minder eiwit aanwezig was, als in die, waarmee hij zijn berekening deed. Dit had hem kunnen wijzen op het mogelijke bestaan van veel dunnere eiwitvliezen.

Het is in hooge mate waarschijnlijk, dat het de methode en de omstandigheden waaronder hij werkt zijn, die toevallig bij die ééne verdunning het maximum zoo dikwijls doen optreden. Hij begaat dan de fout om uit de oppervlakte, die het eiwit bij dat maximum inneemt, de afmetingen van het molecuul te berekenen, terwijl dit oppervlak slechts één van de vele voorstelt, die het eiwitmolecuul kan innemen. Hij mag er zich niet op beroepen, dat een dergelijke berekening bij een natrium-oleaatoplossing wel tot de goede uitkomst leidt, want er is geen reden, dat een eiwitoplossing zich in deze precies als een zeepoplossing zou gedragen.

Over de spreiding op buffermengsels kan ik kort zijn. Deze is, om nadere conclusies daaruit te trekken, nog niet voldoende systematisch onderzocht, want naast de bufferwerking kan ook hier de zoutconcentratie en de valentie van het kat- en anion op de grootte der spreiding van invloed zijn. In het algemeen wordt hier steeds een betrekkelijk groote spreiding gevonden, een minimale spreiding zooals op $\frac{1}{1000}$ N.HCl gemeten wordt, werd op de onderzochte buffermengsels van een $p_H 2 - p_H 7$ nimmer aangetroffen. Het spreekt vanzelf dat, waar de invloed van een buffer zoo groot is, deze ook tot uiting moet komen als zij zich bevindt in de vloeistof, die gespreid wordt, zooals dat bij de plasmaeiwit- en de haemoglobine-oplossingen het geval was. Men vindt dan bij spreiden op de lagere zuurconcentraties een betrekkelijk stabiel gebied, waar de grootte der spreiding nagenoeg dezelfde blijft, omdat de kleine hoeveelheid zuur in den bak nog geen invloed vermag uit te oefenen. Dat du Noüy bij slechts één serumverdunning de „maximum timedrop” zag optreden, zal ook wel op een dergelijken invloed berusten. Bij de toepassingen zullen we de bufferwerking nog éénmaal ontmoeten.

TOEPASSINGEN.

Evenals het mogelijk bleek aan het spreiden van vetten een quantitative bepaling te verbinden, is dit ook aan de eiwitspreiding mogelijk. Na hetgeen we van deze spreiding zagen, is het begrijpelijk, dat voor dit doel slechts het meten der maximale spreiding in aanmerking komt. Deze kan op twee wijzen verkregen worden: op phtalaatbufferoplossingen van een p_H 2— p_H 3 en op $\frac{1}{10}$ N.HCl, in beide gevallen bereikt de spreiding practisch direct haar maximale grootte. Laatstgenoemde vloeistof werd gebruikt. Deze is toch eenvoudig te maken, omdat het hier niet op een nauwkeurigheid als bij titervloeistoffen vereischt, aankomt; bovendien zijn de blanco's kleiner als op de veel duurdere phtalaatbufferoplossingen. De meting moet bij een bepaalde temperatuur geschieden, omdat deze invloed op de grootte der spreiding heeft. Hiertoe werd 15—20° gekozen, omdat op dit temperatuurtraject geen invloed werd waargenomen.

Berekent men uit de spreiding op 0.1 N.HCl bij 15°, hoeveel 1 milligram plasma-eiwit, caseïne en haemoglobine spreidt, dan vindt men als spreidingsgetal resp. 0.85, 1.0 en 1.1, dus waarden van ongeveer dezelfde grootte, als we bij de vetten in den „expanded” toestand aantreffen. De spreidmethode leent zich derhalve ook tot het bepalen van zeer kleine hoeveelheden eiwit. Nader is dit voor het onderzoek van bloed op eiwit uitgewerkt.

Spreiding van bloedplasma en bloed.

Bij dit onderzoek kwam te voorschijn, dat men niet alleen, zooals we reeds zagen, bloedplasma en de door haemolyse van gewassen bloedlichaampjes verkregen haemoglobine-oplossing kan spreiden, maar ook bloed als zoodanig. De bloedlichaampjes toch springen, zoodra het bloed op de voor eiwit voorgeschreven wijze op een vloeistofoppervlak gebracht wordt, kapot en naast het eiwit van het plasma spreidt ook dat der bloedlichaampjes. Deze totale spreiding is zoo groot, dat wil men tot de bepaling hiervan overgaan, men verplicht is, ook wanneer het grootere toestel gebruikt wordt, het bloed minstens 20—40 $\times$ te verdunnen, waarna dan 0.0025—0.005 cm^3 op de zoutzuur-oplossing gebracht kan worden. Deze verdunning had steeds met water en niet met physiologische keukenzoutoplossing plaats, omdat het bleek, dat als de bloedlichaampjes van tevoren worden gehaemolyseerd, de dan verkregen oplossing gemakkelijker spreidt als die, waarin de bloedlichaampjes nog intact aanwezig

zijn. In het laatste geval kwam het nog al eens voor, dat een gedeelte der opgebrachte vloeistof naar beneden wil zinken, waardoor men niet alleen genoodzaakt is de meting over te doen, maar men bovendien de vloeistof in den bak geheel moet vernieuwen.

Tabel XXIX geeft het resultaat van het onderzoek naar de spreiding van bloedplasma, waarvan de metingen dus plaats hadden op $\frac{1}{10}$ N.HCl bij 15°.

TABEL XXIX.

Gegevens omtrent de spreiding van bloedplasma.			
Dier.	Eiwitgehalte (factor 6.6).	Spreiding van 1 cm ³ .	Spreidingsgetal van plasma-eiwit.
	%.	m ² .	
Mensch	9.2	78	0.85
	7.7	66	0.86
	8.3	70	0.84
	8.5	71	0.84
	8.3	72	0.87
	9.2	79	0.86
	8.0	69	0.86
	8.9	76	0.85
Geit	6.9	58	0.84
	7.0	61	0.87
	6.9	59	0.85
Konijn	6.6	57	0.86
	6.5	56	0.87
	6.5	56	0.87
	5.9	51	0.87
	6.8	57	0.84
	5.7	49	0.86
	6.0	52	0.87
Cavia	5.6	48	0.86

Het eiwitgehalte werd uit een stikstofbepaling afgeleid, met behulp van den eiwitfactor 6.6. Deze factor werd gekozen uit de volgende overwegingen. Het plasma-eiwit is een mengsel van serumalbumine en serumglobuline, die resp. een stikstofgehalte bezitten van 14.6 en 16.17 % en waarvoor dus de factor zou zijn 6.85 en 6.2. Nu is in menschenbloed op 100 cm³ gemiddeld 3.1 gram globuline tegenover 4.5 gram albumine aanwezig. Voor deze verhouding zal de factor bijgevolg 6.6 moeten zijn. Voor de berekening van het eiwitgehalte van het plasma der in de tabel genoemde dieren werd dezelfde factor gekozen, omdat nadere gegevens daaromtrent niet door mij werden gevonden.

Uit tabel XXIX blijkt, dat de spreiding van bloedplasma inderdaad geheel van het eiwitgehalte afhangt; gemiddeld bedraagt het spreidingsgetal 0.86, is bij de verschillende dieren gelijk, waardoor men omgekeerd in staat is, uit een gevonden spreiding het eiwitgehalte in gewichtsprocenten te berekenen.

Voor de bepaling gaat men als volgt te werk: Bloed, dat onder dezelfde voorzorgen wordt opgevangen als bij de bepaling van bloedvet staat vermeld, wordt uitgecentrifugeerd, het afgepipeteerde plasma met gedestilleerd water 10—20 $\times$ bijv. in een vetvrij maatkolfje verdund en hiervan 0.005 cm³ op $\frac{1}{10}$ N.HCl bij 15—20° gespreid. Het oppervlak, dat bij 50 mg belasting wordt ingenomen, komt niet steeds met de daarvoor geëxtrapoleerde waarde overeen. Men berekent deze dus uit de kromme en kan haar dan met behulp van het spreidingsgetal 0.86 tot milligrammen herleiden.

Tabel XXX geeft de resultaten van de spreiding der haemoglobineoplossingen, tabel XXXI die van bloed.

De factor 6.2, die bij de berekening van het eiwitgehalte van bloed gebruikt werd, is aldus afgeleid. Van eenzelfde monster bloed werd behalve de spreiding van het bloed zelf, ook die van het plasma en de bloedlichaampjes gemeten; deze laatste werden daartoe quantitatief door centrifugeeren verzameld, gewasschen, vervolgens gehaemolyseerd en de verkregen oplossing gespreid. Tegelijkertijd werd aan alle drie een stikstofbepaling verricht; met behulp van de factoren 6 en 6.6 is dan te berekenen, hoe groot het eiwitgehalte der in 1 cm³ bloed aanwezige bloedlichaampjes is, en ook dat van 1 cm³ plasma. Door nu van de spreiding van 1 cm³ totaal bloed die der chromocyten af te trekken, vindt men het aantal m², dat het plasma uit 1 cm³ bloed spreidt. Uit de spreiding en het eiwitgehalte van het plasma, valt dan direct te berekenen, hoeveel eiwit met dit aantal m² overeenkomt. Deze hoeveelheid vermeerderd met die der

chromocyten, geeft het eiwit, in 1 cm³ bloed aanwezig, aan. Omdat van het bloed het stikstofgehalte bekend is, kan dan de factor voor de gezamenlijke eiwitten berekend worden. Deze schommelde bij zes verschillende bepalingen tusschen 6.15 en 6.18 en werd tot 6.2 afgerond.

TABEL XXX.

Gegevens omtrent de spreiding van haemoglobine-oplossingen.			
Dier.	Eiwitgehalte (factor 6).	Spreiding van 1 cm ³	Spreidingsgetal van haemoglobine.
	%.	m ² .	
Mensch	9.8	104	1.06
	11	125	1.14
	12.9	146	1.13
Geit	12.2	133	1.09
Konijn	10.3	118	1.14
	12.9	155	1.20
	9.7	104	1.07
Cavia	11.6	132	1.14

De uitkomsten bij het spreiden der haemoglobine-oplossingen verkregen, zijn eenigszins wisselend, de reden hiervan is nog niet opgehelderd; het spreidingsgetal bedraagt gemiddeld 1.12.

TABEL XXXI.

Gegevens omtrent de spreiding van bloed.			
Dier.	Eiwitgehalte factor (6.2).	Spreiding van 1 cm ³	Spreidingsgetal van bloedeiwit.
	%.	m ² .	
Mensch	18.1	190	1.05
	17.0	175	1.03
	17.6	186	1.06
	19.3	202	1.04
	19.3	205	1.06
	21.2	225	1.06
Geit	16.9	179	1.06
	16.4	170	1.04
Konijn	17.2	185	1.07
	14.8	151	1.02
	16.9	180	1.07
Cavia	16.9	175	1.04
	17.3	184	1.06
	15.8	164	1.04

De spreiding van bloed gaf echter uitstekende resultaten, het spreidingsgetal bleek onafhankelijk van de onderzochte diersoort, gemiddeld 1.05 te zijn. Uit de groote spreiding tot ruim 200 m^2 per cm^3 volgt, dat elke nog meetbare hoeveelheid bloed voor de bepaling reeds voldoende is en dat de spreidingsmethode zich dus uitstekend voor serie-onderzoekingen leent. Voor dit doel lijkt mij het eenvoudigst, dat men het uit een vingerprik te voorschijn tredende bloed, in een mélangeur opvangt, zooals men deze ook gebruikt voor het tellen der bloed-lichaampjes, waardoor men direct een 40 tot 100 voudige verdunning met water tot stand kan brengen. Van deze verdunningen wordt dan 0.005 cm^3 op de zoutzuur-oplossing gepipeteerd. Men berekent het eiwitgehalte weer uit de geëxtrapoleerde waarde, in dit geval met een spreidingsgetal van 1.05.

Spreiding van spiereiwit.

Een toepassing op een heel ander gebied is mogelijk, indien zou blijken, dat de invloed, die zuur op de grootte der spreiding bij de behandelde eiwitten heeft, dezelfde zou zijn bij spiereiwit. Zou dit in het bijzonder ook voor melkzuur gelden, dan wordt het duidelijk, dat een theorie der spiercontractie rekening zal moeten houden met den invloed van dit zuur op de grootte van het eiwitmolecuul. Hier zal slechts volstaan worden met het aantonen van dien invloed.

Vetvrij geprepareerde stukjes spier werden fijn geknipt en met ongeveer de viervoudige hoeveelheid water of een zeer zwakke fosphaat-oplossing ($0.01 \text{ M. pH } 7$) geëxtraheerd, na 6 uur staan het extract van de brei afgecentrifugeerd en hiervan het eiwitgehalte uit een stikstofbepaling berekend (factor 6.25). Meestal bleek in deze oplossingen 1 tot 2 % eiwit aanwezig te zijn, zoodat zonder verdunnen 0.005 cm^3 gespreid kon worden. Men kan wel meer geconcentreerde eiwitoplossingen verkrijgen, vooral als men met sterkere fosphaatoplossingen¹⁾ extraheert, maar men verkrijgt dan natuurlijk een oplossing, waarop men door haar bufferwerking den invloed van kleine concentraties zuur niet kan nagaan.

Fig. 90 en 91 geven de druk-oppervlakte krommen van spiereiwit weer, door extractie met gedestilleerd water uit stukjes hondenspier verkregen. De metingen hadden plaats bij 15° zoowel op verschillende zoutzuurconcentraties als op bufferoplossingen van verschillende pH .

¹⁾ Een uitstekende extractievloeistof is een 0.225 M. fosphaatopl. $\text{pH } 7$; Zie H o w e, J. biol. chem. **61**, 493, (1924).

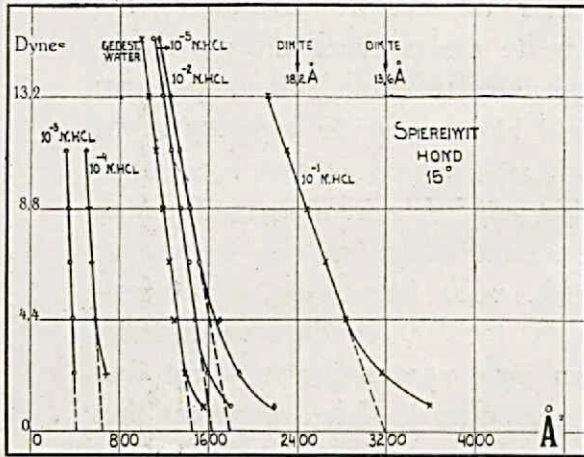


Fig. 90.

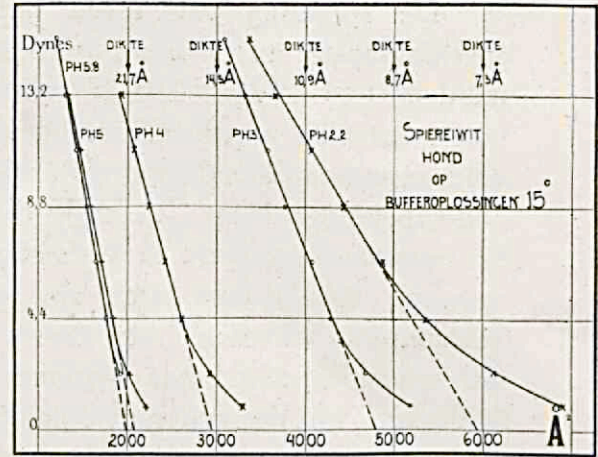


Fig. 91.

Het oppervlak per molecuul werd berekend naar een molecuulairgewicht van 34000; de dikte van het vliesje, door voor dit eiwit een s.g. van 1.3 aan te nemen.

Men ziet, dat dit eiwit uitstekend spreidt. Op 0.001 N.HCl bereikt de spreiding weer een minimum en hoewel op $1/10$ N.HCl de spreiding zelfs het dubbele is van die op gedestilleerd water, blijkt uit de opgegeven dikte, dat men hier nog niet de aminozuur- of de maximale spreiding bereikt heeft.

Op bufferoplossingen neemt bij het kleiner worden der p_H de spreiding steeds toe, maar eerst op een p_H 2.2 wordt hier de maximale spreiding die 6000 Å² per molecuul bedraagt, bereikt. De dikte van het vliesje is dan 7.3 Å.

Men vindt dus bij het onderzochte spiereiwit in tegenstelling met de andere goed spreidende eiwitten, dat op $1/10$ N.HCl de maximale spreiding nog niet wordt bereikt en dat ook de bufferoplossing, waarop dit wel het geval is, veel zuurder moet zijn als gewoonlijk. Dit verschil werd toegeschreven aan de hoeveelheid fosphaat en ook aan mogelijk andere bufferzouten, die in het waterig spierextract aanwezig zijn. Dit is een duidelijk voorbeeld van den invloed, dien een buffer aanwezig in de vloeistof, die gespreid wordt, op de grootte der spreiding heeft. Wat neemt men nu waar, als niet op zoutzuur- maar op melkzuuroplossingen wordt gespreid?

Dit werd nagegaan door weer een spierextract — in dit geval een waterig extract van konijnenspier — te spreiden bij 15° op 0.001 M. zuurkaliumfosphaat-oplossing van een p_H 5.8 en daarna op oplossingen van dezelfde samenstelling waarvan de p_H door melkzuurtoevoeging

verlaagd was. Ofschoon op zuivere melkzuuroplossingen geheel hetzelfde wordt waargenomen, werd op bovengenoemde fosphaatoplossing gespreid, omdat ongeveer een dergelijke concentratie aan fosfaat in spierweefsel aanwezig is. Fig. 92 geeft eenige der resultaten weer.

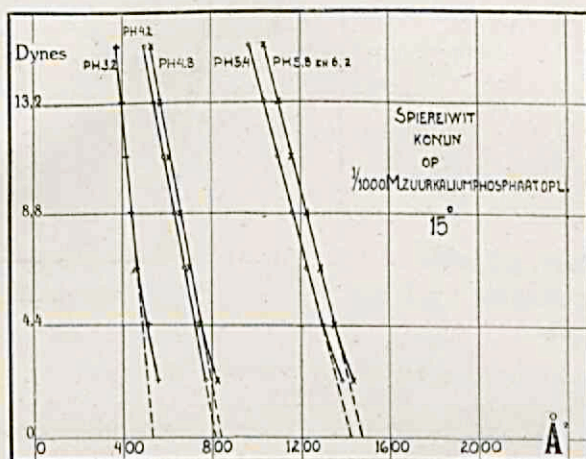


Fig. 92.

De oppervlakte, door het eiwit ingenomen, blijft op een p_H 6.2 tot 5.4 nagenoeg constant, om vrij plotseling op een p_H tusschen 4.8 en 5.4 bijna tot de helft in grootte te verminderen. Hiermee is de sterke invloed van het melkzuur op het spiereiwit aangetoond. Uit de figuur is niet te zien, hoe het eiwit zich gedraagt op oplossingen met een p_H kleiner dan 3.2. De metingen zijn echter wel uitgevoerd; maar de drukoppervlakte krommen staan daarom niet vermeld, omdat een grootere hoeveelheid melkzuur een meetbare spreiding bij de blanco-proef gaat geven, waardoor de bepalingen niet meer voldoende nauwkeurig zijn. Het resultaat is echter, dat de spreiding weer sterk toeneemt, evenals op de sterke zoutzuurconcentraties.

Spreiding van melk.

Tenslotte zal nog het een en ander medegedeeld worden over de spreiding van melk. Dit onderzoek verkeert weliswaar nog in een beginstadium, maar de voorloopige resultaten zijn daarom interessant, omdat we hier een voorbeeld hebben van vet- en eiwitspreiding naast elkaar.

Het onderzoek geschiedde aldus: Van melk werd de spreiding — zoo noodig na verdunning met water — bij verschillende temperaturen op gedestilleerd water en $1/10$ N.HCl gemeten; tegelijkertijd werd ook

TABEL XXXII.

Monster A.

Vloeistof, waarop gespreid werd.	Temperatuur.	Spreiding per cm ³ volle melk ¹⁾ .	Spreiding per cm ³ afgeroomde melk ²⁾ .
gedest. water	1°	m ² . 2	m ² . 0.3
"	15°	11.7	5.4
"	30°	28.9	5.5
"	40°	29	5.55
1/10 N. HCl	15°	49	32.7
	30°	52.6	35.7
	40°	53	36
Spreiding aetherextract van 1 cm ³ volle melk bij 30° 23.8 m ² .		Spreiding aetherextract van 1 cm ³ afgeroomde melk bij 30° 0.31 m ² .	

¹⁾ De volle melk bevatte per cm³ 36 mg eiwit en 30 mg vet.

²⁾ De afgeroomde melk bevatte per cm³ 35 mg eiwit en 1.3 mg vet.

Monster B.

Vloeistof, waarop gespreid werd.	Temperatuur.	Spreiding per cm ³ volle melk ¹⁾ .	Spreiding per cm ³ afgeroomde melk ²⁾ .
gedest. water	1°	m ² . 4	m ² . 0.5
"	15°	25.1	6.4
"	30°	33.9	6.6
1/10 N. HCl	15°	57	35.6
	30°	57.3	35.8
Spreiding aetherextract van 1 cm ³ volle melk bij 30° 27.7 m ² .		Spreiding aetherextract van 1 cm ³ afgeroomde melk bij 30° 0.5 m ² .	

¹⁾ De volle melk bevatte per cm³ 36 mg eiwit en 35 mg vet.

²⁾ De afgeroomde melk bevatte per cm³ 35 mg eiwit en 1 mg vet.

Monster C.

Vloeistof, waarop gespreid werd.	Temperatuur.	Spreiding per cm ³ volle melk ¹⁾ .	Spreiding per cm ³ afgeroomde melk ²⁾ .
gedest. water	15°	m ² . 34	m ² . 8,9
"	30°	38,9	9
1/10 N. HCl	15°	58,8	37,6
	30°	58,9	37,8
Spreiding aetherextract van 1 cm ³ volle melk bij 30° 30,9 m ² .		Spreiding aetherextract van 1 cm ³ afgeroomde melk bij 30° 1,05 m ² .	

¹⁾ De volle melk bevatte per cm³ 39 mg eiwit en 39 mg vet.

²⁾ De afgeroomde melk bevatte per cm³ 38 mg eiwit en 3 mg vet.

het eiwitgehalte uit een stikstofbepaling (factor 7) afgeleid en het vetgehalte volgens de zoutzuurmethode van S m e t h a m bepaald. Bij deze laatste bepaling werd het vet na de weging opgelost in petroleumaether en ook deze oplossing gespreid, zoodat de hoeveelheid vet, behalve in grammen ook in m² bekend was. Bovendien werd steeds een gedeelte der melk door centrifugeeren grootendeels van vet bevrijd en de ontroomde melk op dezelfde wijze als de volle onderzocht.

Tabel XXXII geeft het resultaat van het onderzoek van 3 monsters.

De grootte der spreiding blijkt in hooge mate afhankelijk van de temperatuur te zijn; naarmate deze lager is, worden de waarden zoowel voor de volle als voor de afgeroomde melk kleiner. Bij spreiding van volle melk op gedestilleerd water van 30° verkrijgt men echter een waarde, die ook bij temperatuursverhooging tot 40° practisch niet meer toeneemt; bij afgeroomde melk wordt een dergelijk maximum bij spreiding op gedestilleerd water reeds bij 15° bereikt, op 1/10 N.HCl is dit ook voor de volle melk het geval. Voor dit verschil moet het vet in volle melk aanwezig, aansprakelijk zijn. Dit spreidt op gedestilleerd water bij 15° nog onvoldoende; dat dit bij dezelfde temperatuur op 0.1 N.HCl niet meer het geval is, is geheel in overeenstemming met den invloed, dien zuurtoevoeging, zooals we vroeger zagen, op de spreiding van vetten heeft.

Om nu na te gaan, of het vet volgens zijn volle waarde meespreidt en dus de gevonden eindspreiding de som is van die van vet en eiwit, behoeft men slechts de spreiding van de afgeroomde melk van die van de volle melk af te trekken, waarbij men een correctie kan aanbrengen voor het in de afgeroomde melk nog aanwezige vet en het iets lagere eiwitgehalte. Voert men de berekening voor de uitkomsten, verkregen bij spreiding op gedestilleerd water van 30° , uit, dan vindt men voor de onderzochte monsters A, B en C resp. 23.6, 27.7 en 30.7 m^2 , terwijl de vetspreiding uit petroleumaether in dezelfde volgorde bedraagt 23.8, 27.7 en 30.9 m^2 .

Het verschil tusschen de spreiding van volle en afgeroomde melk op $\frac{1}{10}$ N.HCl bij 30° bedraagt voor dezelfde monsters A, B en C resp. 16.2, 21 en 21.2 m^2 (weer gecorrigeerd voor het verschillend vet- en eiwitgehalte).

Men ziet dus, dat bij spreiding op gedestilleerd water van 30° het vet inderdaad voor zijn volle waarde meespreidt, op $\frac{1}{10}$ N.HCl bij dezelfde temperatuur is dit niet het geval en moet derhalve de spreiding van vet of van eiwit of van beide onvoldoende zijn. Dat de spreiding van afgeroomde melk op $\frac{1}{10}$ N.HCl daarentegen wel de maximale of de aminozuur-spreiding van het melkeiwit vertegenwoordigt, blijkt uit de grootte van de dikte, die het eiwitvliesje bij deze spreiding heeft. Deze bedraagt hier ongeveer 7.7 Å, wanneer men voor het s.g. een waarde van 1.3 aanneemt.

Een nader onderzoek zal nog dienen uit te maken, wat de oorzaak is, dat volle melk bij spreiding op $\frac{1}{10}$ N.HCl bij daarvoor voldoende hoge temperatuur een spreiding geeft, die niet de som is van die van vet en eiwit.

STELLINGEN.

STELLINGEN.

I.

De wijziging door Clark en Collip in de uitvoering van de calciumbepaling in bloed volgens de methode van Kramer en Tisdall aangebracht, verdient geen aanbeveling.

Kramer and Tisdall, J. biol. Chem. **47**, 475, (1921).

Tisdall, J. biol. Chem. **56**, 439, (1923).

Clark and Collip, J. biol. Chem. **63**, 461, (1925).

II.

Lecomte du Noüy heeft geen voldoende bewijs geleverd voor de juistheid van de door hem berekende afmetingen van het molecuul eieralbumine.

J. biol. Chem. **64**, 595, (1925).

III.

De eisch van de Ned. Pharm. Ed. V, dat van Radix Ipecacuanhae voor het gebruik het hout verwijderd moet worden, is irrationeel.

IV.

De methode van Maclean verdient de voorkeur boven andere methoden ter bepaling van het bloedsuikergehalte.

Maclean, Biochem. J. **13**, 135 (1919).

V.

Hydrolyse van zetmeel onder invloed van zouten, aminozuren en peptonen is onwaarschijnlijk.

Biedermann, Biochem. Z. **135**, 282 (1923).

" " **137**, 35 (1923).

Haehn, " " **135**, 587 (1923).

VI.

Bij alle chemische chininepraeparaten had in de Ned. Pharm. Ed. V de chromaatproef dienen opgenomen te worden.

VII.

De microvet-bepaling volgens Bang leidt ook in de uitvoering als door Weehuizen en Weehuizen—Carpentier Alting aangegeven, tot onbetrouwbare uitkomsten.

Bang. Methoden zur Mikrobestimmung
einiger Blutbestandteile 1916.
Pharm. Weekblad 56, 810 (1919).

VIII.

Gistgroei is zonder de gelijktijdige aanwezigheid van het vitamine B onmogelijk.

IX.

Het voorschrift der Ned. Pharm. Ed. V „mag niet in voorraad gehouden worden” had ondanks de gegeven nadere toelichting, evenals het voorschrift „moet versch bereid worden” beter achterwege kunnen blijven.

X.

Aan het onderzoek naar faecaal bacteriën in water volgens den codex alimentarius, dient nog toegevoegd te worden de streptococcenproef en zoo noodig de bepaling van de glucose- en lactose-titer bij 37°.

XI.

Als indicatoren bij de titratie van alcaloïden zijn in het algemeen de sulfonphtaleïnen aan te bevelen.
