



# **Complexcoacervatie met chondroïtinezwavelzuur en mucoïtine : bijdrage tot de kennis der verhouding van collageen en gelatine**

<https://hdl.handle.net/1874/317347>



*H. Ge. 192, 1933.*

# COMPLEXCOACERVATIE MET CHONDROITINEZWAVELZUUR EN MUCOITINE.

Bijdrage tot de kennis der verhouding van  
kollageen en gelatine.

A. H. A. DE WILLIGEN

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.

es.  
echt









COMPLEXCOACERVATIE MET CHONDROITINEZWAVEL-  
ZUUR EN MUCOITINE.

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER VERHOUDING VAN  
KOLLAGEEN EN GELATINE.

RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT



2452 813 9



# COMPLEXCOACERVATIE MET CHONDROITINEZWAVELZUUR EN MUCOITINE.

Bijdrage tot de kennis der verhouding van  
kollageen en gelatine.

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN  
DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVER-  
SITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-  
MAGNIFICUS **DR. C. G. N. DE VOOYS**, HOOGLEERAAR  
IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBE-  
GEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER  
UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDEN-  
KINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUUR-  
KUNDE OP MAANDAG 16 JANUARI 1933, DES NAMID-  
DAGS TE VIER UUR

DOOR

**ANNE HERMAN ARIE DE WILLIGEN**  
GEBOREN TE ROTTERDAM

---

KEMINK EN ZOON N.V. - OVER DEN DOM - UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.





*Aan mijn Ouders.*



Bij de voltooiing van dit proefschrift wil ik gaarne gebruik maken van de gelegenheid om U, Oud-Hoogleraren en Hoogleraren van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, te bedanken voor het van U genoten onderwijs.

Hooggeleerde K r u y t, Hooggeachte promotor, ik betuig U mijn hartelijken dank voor Uw belangstelling en steun, welke ik in mijn studietijd in zoo ruime mate mocht ondervinden. In het bijzonder geldt mijn dankbaarheid de groote vrijheid, die Gij mij bij de practische uitwerking van dit onderwerp hebt gelaten.

U, Hooggeleerde C o h e n, ben ik dankbaar voor Uw onderricht, in het bijzonder wat betreft de practische opleiding in Uw laboratorium.

Hooggeleerde v a n R o m b u r g h, ik dank U voor Uw onderwijs in de organische chemie. Ook U, Hooggeleerde R u z i c k a, ben ik daarvoor erkentelijk.

Hooggeleerde W o l f f, Hooggeleerde B a r r a u, aanvaardt mijn dank voor de wijze, waarop Gij tot mijn wetenschappelijke vorming hebt bijgedragen door Uw leiding bij de studie van de wiskunde.

Tevens wil ik hierbij mijn dank betuigen aan de zeer velen, die mij op eenigerlei manier hebben geholpen bij de practische uitwerking van dit onderzoek, in het bijzonder den directeur van de gemeentelijke slachtplaats te Utrecht, den Heer J. P. v a n d e r S l o o t e n, voor zijn hulp bij het uitzoeken van geschikt materiaal; den Heer I. S l i s W z n, assistent van het pharmaceutisch laboratorium der Universiteit en D r. G. v a n R o m b u r g h, conservator aan het organisch laboratorium der Universiteit, voor hun hulp bij de mechanische bewerking van dat materiaal; en den Heer W. H. K i s j e s voor zijn hulp bij de verdere bewerking.

---





## INLEIDING.

H. R. K r u y t heeft in een lezing voor de Biochemische en Colloidchemische secties der Nederlandsche Chemische Vereeniging <sup>1)</sup> het kollageen voorgesteld als

„een complexcoacervaat van twee stoffen, moederstoffen van eenerzijds „gelatine” anderzijds „mucine”, die gescheiden worden door kalk, waarin slechts de mucine oplost.”

Het doel van dit onderzoek is deze hypothese te toetsen aan het feitenmateriaal, dat in de literatuur aanwezig is, en dat eigen experiment ons zal verschaffen.

---



## INHOUD.

### A. Literatuuroverzicht.

|                                                    | blz. |
|----------------------------------------------------|------|
| I. OVER COMPLEXCOACERVATIE . . . . .               | 1    |
| II. DE AFBRAAKPRODUCTEN VAN KOLLAGEEN . . . . .    | 8    |
| 1. De gelatine . . . . .                           | 8    |
| 2. De „pigskin”-gelatine . . . . .                 | 9    |
| 3. Het mucine . . . . .                            | 10   |
| a. Inleiding 10; b. Het chondroitinezwavelzuur 11. |      |
| III. SAMENVATTING . . . . .                        | 13   |

### B. Experimenteel gedeelte.

|                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. COACERVATIE VAN CHONDROITINEZWAVELZUUR<br>MET EIWITTEN . . . . .                                                                                                                                                                   | 14 |
| 1. Bereiding van het chondroitinezwavelzuur . . . . .                                                                                                                                                                                 | 14 |
| 2. Analyses van het chondroitinezwavelzuur . . . . .                                                                                                                                                                                  | 16 |
| 3. Meting van de viscositeit van het chondroitinezwavel-<br>zuursol . . . . .                                                                                                                                                         | 18 |
| 4. Ontleding van het chondroitinezwavelzuur . . . . .                                                                                                                                                                                 | 19 |
| 5. Meting der viscositeit van coacerveerende mengsels van<br>chondroitinezwavelzuur en gelatine . . . . .                                                                                                                             | 20 |
| 6. Invloed van kleine electrolytconcentraties op de visco-<br>siteitsmetingen aan coacerveerende mengsels van chon-<br>droitinezwavelzuur en gelatine . . . . .                                                                       | 27 |
| 7. Meting van de troebeling van coacerveerende mengsels<br>a. De fotometer 28; b. Meting van de troebeling bij mengsels<br>van solen van chondroitinezwavelzuur en gelatine 30; c. In-<br>vloed van electrolyten op de troebeling 32. | 28 |
| 8. Het macrocoacervaat . . . . .                                                                                                                                                                                                      | 36 |
| 9. Coacervatie met albumine . . . . .                                                                                                                                                                                                 | 37 |
| 10. Conclusie . . . . .                                                                                                                                                                                                               | 37 |

|                                                                                                                                                                                                                  |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|                                                                                                                                                                                                                  | blz. |
| II. OVER HET MUCOITINE . . . . .                                                                                                                                                                                 | 39   |
| 1. Inleiding . . . . .                                                                                                                                                                                           | 39   |
| 2. Literatuur over het mucine uit het glasachtig vocht van<br>oogen . . . . .                                                                                                                                    | 39   |
| 3. Bereiding van het mucoitine . . . . .                                                                                                                                                                         | 40   |
| 4. Meting van de viscositeit van het mucoitinesol bij ver-<br>schillende pH's . . . . .                                                                                                                          | 41   |
| 5. Coacervatie met gelatine . . . . .                                                                                                                                                                            | 42   |
| 6. Conclusie . . . . .                                                                                                                                                                                           | 43   |
| III. DE „PIGSKIN”-GELATINE . . . . .                                                                                                                                                                             | 45   |
| 1. Inleiding . . . . .                                                                                                                                                                                           | 45   |
| 2. Viscositeit en alkoholgetallen van de „pigskin”-gelatine                                                                                                                                                      | 45   |
| 3. De complexcoacervatie van solen van „pigskin”-gela-<br>tine met die van chondroitinezwavelzuur en arabische<br>gom . . . . .                                                                                  | 48   |
| IV. DE ISOELECTRISCHE TROEBELING VAN GELATINE                                                                                                                                                                    | 50   |
| 1. Zuivering van de gelatine . . . . .                                                                                                                                                                           | 50   |
| 2. Ultramicroscopische waarnemingen . . . . .                                                                                                                                                                    | 51   |
| 3. Invloed van pH, concentratie en electrolytgehalte op de<br>iso-electrische troebeling . . . . .                                                                                                               | 52   |
| a. Uitvoering van de metingen 52; b. Invloed van de gelatine-<br>concentratie op de iso-electrische troebeling 53; c. Invloed van<br>electrolyten op de iso-electrische troebeling bij verschillende<br>pH's 54. |      |
| 4. Conclusie . . . . .                                                                                                                                                                                           | 59   |
| V. EXPERIMENTEN AAN KOLLAGEEN . . . . .                                                                                                                                                                          | 64   |
| 1. Inleiding . . . . .                                                                                                                                                                                           | 64   |
| 2. Isoleering van mucine en eiwit uit het kollageen . . .                                                                                                                                                        | 64   |
| a. Oriënteerende proefnemingen 64; b. Het mucine 65; c. Het<br>eiwit verkregen door behandeling met zout 67.                                                                                                     |      |
| 3. Experimenten met de gelatine, bereid door uittrekken<br>met zout . . . . .                                                                                                                                    | 68   |
| 4. Conclusie . . . . .                                                                                                                                                                                           | 69   |
| C. Samenvatting . . . . .                                                                                                                                                                                        | 71   |



## A. LITERATUUROVERZICHT.

### I. Over complexcoacervatie.

Het onderzoek van H. R. K r u y t en zijn medewerkers<sup>2)</sup> heeft bewezen, dat het verschil tusschen suspensioide en emulsoide solen is gelegen in de eigenschap van deze laatste kolloiden, dat zij, na ontlading, nog voor uitvlokken worden beschut, doordat zij een hoeveelheid water zeer vast aan zich binden. Voor het uitvlokken van een sol is dan niet alleen noodig het wegnemen van de lading van de deeltjes, maar ook een verwijderen van dit water, daar het een vereeniging tot vlokken belet. Voegt men b.v. bij een ontladen sol een groote overmaat alkohol, dan krijgt men een neerslag, evenals bij uitvlokking van een suspensoid.

We moeten ons dit gebonden water niet voorstellen als een bepaalde hoeveelheid, scherp gescheiden van de overige vloeistof. Een dergelijke grens zou beteekenen een oppervlakte-energie, waardoor de begrensde omhulsels de neiging zouden vertoonen zich te vereenigen. Met v a n B e m m e l e n<sup>3)</sup> moeten we aannemen, dat het water aan de oppervlakte van het deeltje zeer vast gebonden is, en geleidelijk minder sterk wordt beïnvloed, naarmate het verder van de kern verwijderd is.

Deze opvatting vindt steun in het feit, dat we ook in staat zijn het water gedeeltelijk weg te nemen. Voegt men bijvoorbeeld in het bovenstaande voorbeeld de alkohol druppelsgewijs toe, dan scheidt de kolloide stof zich niet af als amorfe vlokken, maar als fijne druppeltjes, die zich onder daarvoor geschikte omstandigheden tot een laag vloeistof vereenigen. H. G. B u n g e n b e r g de J o n g en H. R. K r u y t<sup>4)</sup> geven aan dit verschijnsel den naam coacervatie.

De afscheiding van de kolloide stof als een vloeistof beteekent, dat de vaste deeltjes water meevoeren in een toestand, waarin het niet mengbaar is met de overige vloeistof. Door het wegnemen van een deel van het water is er iets gebeurd aan de buitenzijde van het gehydrateerde deeltje. De scheiding tusschen vrij en gebonden wa-



ter, die eerst niet aanwezig was, treedt nu op; er is een grensvlak-energie ontstaan, die leidt tot een vereeniging van de waterlagen van verschillende deeltjes. Toch is er binnen deze mantels nog de zelfde toestand als te voren. De eigenlijke deeltjes krijgen geen gelegenheid zich te vereenigen, wat blijkt uit het feit dat de coacervatie bij toevoeging van een weinig water oogenblikkelijk verdwijnt.

Voor dit geval, het eenvoudigste van alle vormen van coacervatie, bezitten we geen verklaring, die ons duidelijk maakt wat er precies aan de hydratatie is veranderd. Dat maakt het zooveel te moeilijker, een inzicht te krijgen in het ingewikkelder geval, dat de titel noemt: De complexcoacervatie. Hieronder verstaan we de ontmenging, die optreedt bij het samenvoegen van twee tegengesteld geladen lyophiele solen.

Het best onderzochte voorbeeld is het systeem gelatine-arabische gom. Bij een pH beneden 4,7 treedt daarin coacervatie op.

H. G. B u n g e n b e r g d e J o n g e n W. A. L. D e k k e r<sup>5)</sup> bestudeeren dit stelsel als volgt: Bij een bepaalde pH wordt de viscositeit gemeten (boven 40°) van de solen van gelatine en arabische gom en van mengsels daarvan in verschillende verhoudingen. Boven het iso-electrische punt van de gelatine, waar beide solen negatief zijn, is de viscositeit van de mengsels gelijk aan de som van die van de samenstellende hoeveelheden sol, met water tot hetzelfde totale volumen verdund. Beneden pH 4,7, dus als de gelatine positief geladen is, blijkt de gevonden waarde steeds lager dan de zoo berekende, en wel des te meer, naarmate de mengsels sterker troebel zijn.

Een groote verdienste van de genoemde onderzoekers is, dat ze deze verlagingen beter vergelijkbaar maken door de gemeten waarden uit te drukken in % van de additief berekende viscositeit. Immers het blijkt, dat deze procentueele waarden de sterkte der coacervatie bepalen, en wel in dien zin, dat de coacervatietroebeling het grootst is bij dezelfde mengverhouding der componenten als waarbij deze procentueele viscositeitswaarde een minimum is.

B u n g e n b e r g d e J o n g e n D e k k e r bepalen vervolgens voor verschillende pH bij welke verhouding van de componenten de grootste coacervatie optreedt. Deze verhouding verschuift naar een lagere gelatineconcentratie bij dalende pH-waarden.

We zullen ons eerst rekenschap ervan geven, welke hier de sta-

biliteitsfactoren zijn. Voor de beide solen afzonderlijk zijn het de hydratatie en de lading, voor de arabische gom is de laatste negatief, voor de gelatine positief. In het mengsel beletten deze ladingen het samentreden van de deeltjes niet, integendeel, de elektrische tegenstelling trekt de deeltjes met kracht bijeen, tegen het streven van de hydratatie in. Er ontstaat een evenwicht tusschen deze beide tendensen. De deeltjes blijven niet geheel vrij, maar toch heeft geen uitvlokking plaats; er ontstaat een tusschentoestand, het coacervaat.

Het is duidelijk, dat aan dezen evenwichtstoestand de meeste stof deelneemt, als de grootst mogelijke elektrische tegenstelling bestaat, d.w.z. als de totale hoeveelheid positieve electriciteit gelijk is aan de totale hoeveelheid negatieve. Deze totale hoeveelheden worden bepaald door het product van de hoeveelheid stof en de lading per oppervlakteëenheid. Deze laatste kunnen wij voor gelatine in het isoëlectrisch punt als nul beschouwen, terwijl de (positieve) lading stijgt bij dalende waarden van de pH beneden 4,7. De invloed van het waterstofion op de arabische gom is klein, de lading behoudt over groote pH-gebieden practisch de zelfde negatieve waarde. Zoo is het duidelijk, dat er bij afnemende pH steeds minder gelatine noodig is om een bepaalde lading van de arabische gom te neutraliseeren. Dit brengt dan tevens mede, dat de minimum-viscositeit (uitgedrukt in %, als boven) bij dalende pH ook naar kleinere gelatineconcentratie verschuift.

Het eenvoudigste gedraagt zich het mengsel, waarbij de ladingen elkaar precies opheffen, doordat we bij een gegeven pH de juiste mengverhouding hebben uitgekozen. Bij de menging ontstaat een afscheiding in kleine druppeltjes, waarin zich vrijwel alle kolloide stof ophoopt. Ze bezitten geen lading, en daardoor is er niets dat ze belet langzaam samen te vloeien tot een laag vloeistof.

Is er een overmaat van één van de componenten, dan is er weliswaar een begin van vereeniging van tegengesteld geladen deeltjes, maar door de overmaat van één soort komt aan elke ophooping een eind. Er blijft een lading over die verder samengroeien belet. Hierdoor ontstaat een sol van grootere deeltjes, die niet samenvloeien. De grootte van de deeltjes hangt af van de hoeveelheid lading die overschiet. Dicht bij het maximum ontstaan nog microscopisch zichtbare bolletjes, die alleen de neiging tot samenvloeien missen. Naarmate we ons verder van dit punt verwijderen worden



ze steeds kleiner en al zeer spoedig blijven de mengsels helder; de beïnvloeding blijkt dan nog alleen uit de viscositeit. Aan deze gedeeltelijk geacoacerveerde solen geeft H. G. Bungenberg de Jong<sup>6)</sup> den naam complexsolen.

Door de elektrische tegenstelling weg te nemen wordt de coacervatietoestand opgeheven. Niet alleen gebeurt dit als de positieve lading van de gelatine wordt weggenomen door de pH te verschuiven tot boven 4,7, het heeft ook plaats wanneer zooveel zoutoplossing wordt toegevoegd, dat de lading van een of beide componenten wordt weggenomen. Het is voor den eindtoestand onverschillig, of de componenten eerst worden gemengd, en de electrolyt wordt toegevoegd, nadat de druppeltjes zijn ontstaan, of dat de beide solen er te voren van zijn voorzien en eerst daarna samengevoegd. Als de concentratie van het zout groot genoeg is, wordt het mengsel helder, mits de temperatuur boven de gelatineeringstemperatuur blijft.

Bij bestudeering van de viscositeit blijkt het volgende<sup>5)</sup> (fig. 1):

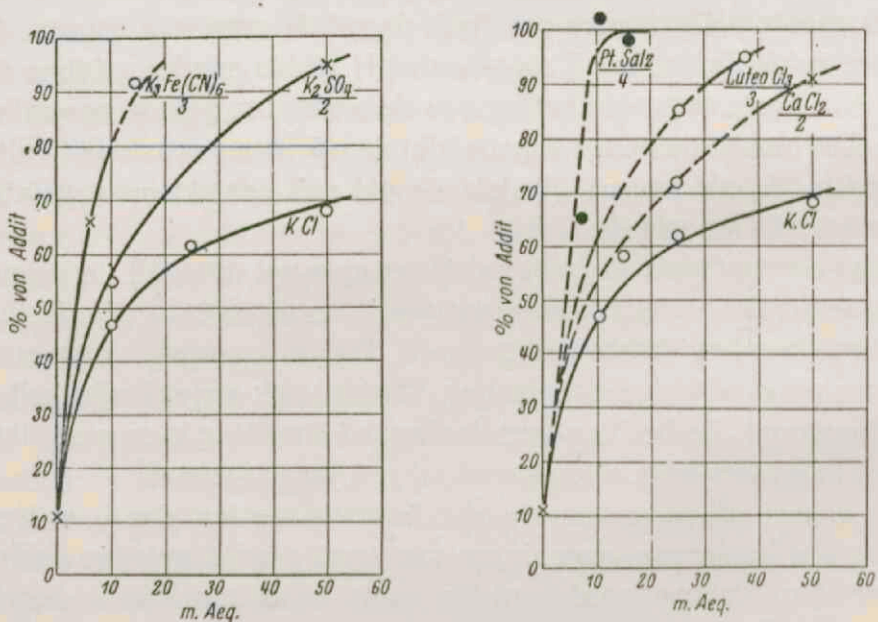


Fig. 1. Invloed van electrolyten op de procentueele viscositeit van een coacerveerend mengsel.

Overgenomen uit het artikel van H. G. Bungenberg de Jong, *Protoplasma* 15, 110 (1932).

Als we KCl toevoegen nadert de viscositeit geleidelijk tot de waarde, welke te berekenen is uit die van de samenstellende solen voorzien

van dezelfde hoeveelheid KCl. Met meerwaardige ionen wordt de additiviteit al bij een veel lagere electrolytconcentratie bereikt; de hoeveelheid electrolyt, noodig om de coacervatie op te heffen, is voor  $K_2SO_4$  kleiner dan voor KCl, en voor  $K_3Fe(CN)_6$  weer kleiner dan voor  $K_2SO_4$ . Evenzoo geldt, dat de voor opheffing benodigde concentratie  $BaCl_2$  kleiner is dan die voor KCl en dat die voor  $LuCl_3$  nog weer kleiner is. We zien hieruit duidelijk, dat de componenten in het gecoacerveerde systeem een gelijkwaardige plaats innemen; het is onverschillig of we eerst de gelatine (de positieve component) of eerst de arabische gom (de negatieve component) ontladen.

We hebben op pag. 4 de voorstelling gegeven, dat de deeltjes los opgeenghoopt zijn, verbonden door hun tegengestelde ladingen, die het streven van de deeltjes naar een grootere hydratatie in bedwang houden. Het gedrag van het coacervaat bij toevoeging van electrolyt past goed in deze voorstelling: Zoodra de lading van één van beide componenten (of van beide tegelijk) voldoende vermindert, peptiseert dit streven naar solvatatie de deeltjes tot een sol.

Deze opheffing van de verlaging van de viscositeit geldt (in sterkere of mindere mate) voor elke pH en voor alle concentratieverhoudingen, waar van een verlaging sprake is, ook voor complexsolen. Dit beteekent echter niet dat aan deze laatste, als zij zonder electrolyt al niet of nauwelijks troebel zijn, niets bijzonders waar te nemen valt. Integendeel, door alleen de viscositeit van de mengsels te beschouwen, zouden we aan een zeer belangrijk verschijnsel voorbijgaan.

We hebben gezien, dat er mengsels zijn, die niet coacerveeren, omdat een overschot van lading een onbegrensd samengroeien van de deeltjes belet. H. G. B u n g e n b e r g d e J o n g e n A. F. W e s t e r k a m p <sup>6)</sup> voegen nu aan een dergelijk complexsol (gelatine met lecithine) electrolyt toe en bestudeeren den invloed op de troebeling. Zij kiezen daarvoor een mengsel met een overschot van positieve lading uit. Hieraan onderzoeken ze den invloed van KCl,  $K_2SO_4$ ,  $K_3Fe(CN)_6$ . De eerste hoeveelheden daarvan geven een sterke toename van de troebeling, en wel ongeveer tot aan hetzelfde niveau als voor het best coacerveerende mengsel bij de gekozen pH. Deze waarde bereiken zij bij een kleinere concentratie, naar gelang ze KCl,  $K_2SO_4$  of  $K_3Fe(CN)_6$  gebruiken.

Zij vergelijken dit verschijnsel met de uitvlokking van een lyo-



phoob sol. Als de geringe overmaat lading aan de buitenzijde wordt weggenomen, krijgen de kleine aggregaten van deeltjes gelegenheid tot coacervaten samen te vloeien. Eerst bij grootere concentraties electrolyt treedt het opheffen van de tegengestelde ladingen in en verdwijnt dus een voorwaarde voor complexcoacervatie; er heeft dus een snelle vermindering van de troebeling plaats.

Na deze algemeene eigenschappen van complexcoacervaten moeten hier nog twee bijzondere gevallen worden besproken, omdat ze voor ons onderzoek van belang zijn.

1°. Bungenberg de Jong<sup>7)</sup> stelde zich de vraag, of coacervatie mogelijk is onder de omstandigheden zooals ze in het dierlijk lichaam voorkomen, namelijk bij een neutrale reactie en bij een belangrijke concentratie aan zouten. Daarvoor is allereerst noodig een eiwit met een iso-electrisch punt, dat bij een veel hoger pH ligt dan dat van gelatine, d.w.z. één dat bij pH 7 positief geladen is. Bovendien moet het coacervaat een grooten weerstand tegen electrolyten bezitten. Bij de combinatie gelatine-arabische gom is 50 m. mol. KCl voldoende voor opheffing, terwijl in dierlijke weefsels de concentratie van 160 m. mol NaCl + enkele m. molen  $\text{Ca}^{++}$  normaal is.

Door uitkiezen van geschikte componenten wist hij enkele gevallen te verwezenlijken, waarbij inderdaad onder deze omstandigheden complex-coacervatie optrad. Als positieve component nam hij clupeïne, dat zijn isoëlectrisch punt heeft bij pH 12,1. Als negatief bestanddeel waren bijvoorbeeld thymusnucleïnaat en soyaboonen-lecithine bruikbaar.

2°. Bungenberg de Jong<sup>8)</sup> deelt mede dat als regel het vermogen, om bij kamertemperatuur te gelatineeren, niet verloren gaat als men een gelatinesol laat coacerveeren. Het in de warmte ontstane macrocoacervaat stolt dan na afkoeling tot een gel, evenals het oorspronkelijke sol. Hieruit ziet men duidelijk, hoe door de coacervatie alleen de buitenzijde van den watermantel verandert, en de kern van het deeltje onveranderd blijft; als de kern werkelijk beïnvloed was, zou de gelatineering daarvan een merkbaren invloed hebben ondergaan. Omgekeerd is het gelatinesol door gelatineering niet van zijn coacervatiemogelijkheid beroofd. De bovengenoemde onderzoeker mengde in de warmte gelatine- en arabische-gomsolen bij een pH, waarbij geen complexcoacervatie plaats

vond. Hij legde het gel, dat hieruit bij afkoelen ontstond, in verdund zuur en veranderde zoo de pH tot in het gebied, waarin bij solen coacervatie mogelijk is. Het gel werd daarbij troebel en verloor zijn neiging tot opzwellen; bij toevoeging van electrolyten verdween de troebeling en kwam de neiging tot opzwellen terug.

Deze resultaten maken het geoorloofd, bestanddeelen van het dierlijk lichaam als coacervaten te beschouwen; vaste deelen daarvan, zooals het kollageen, kan men veronderstellen te zijn ontstaan door een coacervatie en een gelatineering, terwijl hun bestendigheid nog geheel of gedeeltelijk aan den coacervatietoestand is toe te schrijven.



## II. De afbraakproducten van kollageen.

Uit kollageen zijn een drietal substanties te bereiden, die onze aandacht vragen uit een oogpunt van complexcoacervatie:

- 1°. De gelatine.
- 2°. De „pigskin” gelatine.
- 3°. De mucine of mucoïde.

### 1. De Gelatine.

Bij de gewone bereidingswijze van gelatine behandelt men het kollageen gedurende vele weken met kalkmelk. Een gedeelte van de eiwitten gaat daarbij in oplossing. Na een bepaalden tijd wordt deze bewerking onderbroken. De vaste stof die dan overblijft, wordt met aangezuurd water gewasschen en met warm water in een oplosbaren vorm, de gelatine, gebracht.

De gelatine-industrie stelt zich hierbij niet ten doel een bepaalde chemische stof te isoleeren. Integendeel, men wijzigt de details van het proces naar gelang van het doel, waarvoor het product moet dienen, en daardoor ontstaan gelatines met zeer uiteenlopende eigenschappen.

In kolloïdchemisch opzicht hebben deze gelatines verschillende punten van overeenkomst. Het isoëlectrisch punt b.v. ligt steeds in de buurt van pH 4,7. Er is een reeks van eigenschappen, die bij dit punt een uitgesproken maximum of minimum bezitten. Zoo hebben de solen hier een minimum voor de viscositeit, voor het electrisch geleidingsvermogen en voor de hoeveelheid alcohol noodig voor precipitatie. De gelen hebben een minimum sterkte in dit punt.

Een zeer karakteristieke gelatine-eigenschap is de isoëlectrische troebeling. Laat men een 1 % gelatinesol van pH 4,7 eenige uren bij kamertemperatuur staan, dan wordt het sterk opalescent. Kraemer<sup>9)</sup> en Briefer<sup>10)</sup> onderzochten den invloed van de pH op de troebeling bij verschillende temperaturen. Het sol bezit bij 40° bij iedere pH hetzelfde, zeer geringe Tyndall-licht. Bij temperaturen beneden 30° heeft de intensiteits-pH-kromme een scherpe piek; het gel is helder behalve voor een klein pH-gebied bij het isoëlectrische punt. Een verschuiven van de pH met ongeveer 0,5 is voldoende om het verschijnsel geheel te doen verdwijnen.

H. R. Kruyt<sup>1)</sup> deelt mede dat deze troebelings-pH-kromme een

ander verloop krijgt bij het toevoegen van zouten. Bij stijgende zoutconcentratie wordt het maximum steeds lager, en bovendien wordt de kromme vlakker. Uit de bijgevoegde afbeelding blijkt, dat de troebeling voor een pH, vlak boven of beneden het iso-electrische punt, eerst sterker, dan weer minder wordt.

Deze invloed van electrolyten vertoont een sterke overeenkomst met de opheffing van een complexcoacervaat. Een uitgebreider feitenmateriaal zal moeten uitmaken in hoeverre we hier werkelijk met hetzelfde verschijnsel te doen hebben.

## 2. De „pigskin”gelatine.

Er is onder den naam gelatine nog een tweede product in den handel, dat in chemisch opzicht zeer veel van de gewone qualiteiten verschilt. Men noemt het „pigskin”gelatine.

Een nauwkeurige beschrijving van de bereidingswijze is in de literatuur niet te vinden. Bij de bereiding verwerkte men oorspronkelijk varkenshuid. Toch kan in het uitgangsmateriaal niet de oorzaak liggen van het verschil in chemische eigenschappen, omdat B r i e f e r <sup>10)</sup> uit de eene helft van een kalfshuid „pigskin”-, uit de andere helft gewone gelatine bereidde. Hij vermeldt, dat hij voor de bereiding van de „pigskin”gelatine het kollageen omzet met zwavelzuur, zonder daarbij nadere bijzonderheden op te geven. Ook in de andere artikelen <sup>11)</sup> over deze gelatinesoort ontbreken nadere bijzonderheden.

Men isoleert door deze behandeling met zuur een geheel andere stof. Deze heeft zijn isoëlectrisch punt bij 8, wat beteekent, dat de twee gelatinesoorten ongeveer evenveel uiteenloopen in eigenschappen als een zwak zuur en een zwakke base. Over een groot pH-gebied zijn ze tegengesteld geladen.

De eigenschappen, die we bij de gewone gelatine noemden, hebben bij de „pigskin”gelatine lang niet zulke scherpe maxima of minima. B r i e f e r en C o h e n <sup>12)</sup> geven o.a. een viscositeits-pH-kromme met een vlak gedeelte van pH 5,5 à 6,0 tot omstreeks 8,0. Onder verschillende andere voorbeelden is de eenige uitzondering hierop, een functie, die hij „jelly-consistency” noemt, met een scherp minimum bij pH 7,5.

De iso-electrische troebeling komt bij de „pigskin”gelatine ook



voor, alleen treedt ze op in een veel grooter pH-gebied. Kraemer<sup>9)</sup> vond, dat de gelen troebel zijn van pH 6-8.

Door deze vlakke maxima en minima kunnen we het isoëlectrisch punt niet met een zeer groote nauwkeurigheid aangeven; het sol is waarschijnlijk in het geheele traject van pH 6-8 slechts zwak geladen.

### 3. Het mucine.

#### a. Inleiding.

Het derde product behoort tot de groep van mucinen en mucoiden. Hammarsten<sup>13)</sup> rangschikt deze stoffen onder de glycoproteïden, waarmede bedoeld worden die eiwitten, die o.a. koolhydraten als afbraakproducten hebben. Hij grondt een scheiding tusschen de mucinen en de andere stoffen uit deze groep op de eigenschap, dat „ihre natürlichen oder mit einer Spur Alkali dargestellten Lösungen schleimig fadenziehend sind und mit Essigsäure einen in einem Ueberschusse der Säure unlöslichen oder jedenfalls sehr schwer löslichen Niederschlag geben.” Tot de mucoiden worden gerekend alle stoffen uit deze groep, die een van deze eigenschappen niet bezitten.

Een iets nauwkeuriger afbakening van het begrip mucine of mucoid geeft het handboek van Oppenheim<sup>14)</sup>, door te bepalen, dat onder de splitsingsproducten een belangrijke hoeveelheid glucosamine (beter en algemeener zou zijn hexosamine) aanwezig moet zijn. Ter vereenvoudiging zullen we verder steeds spreken van mucine, ook waar anders soms de naam mucoid gebruikt wordt.

In alle fibrillair bindweefsel in het dierlijk lichaam is een grootere of kleinere hoeveelheid mucine aanwezig. De grootste hoeveelheid bevindt zich in het kraakbeen<sup>15)</sup>, waar het in ballen tusschen de kollagene vezel ligt. Hawk en Gies<sup>16)</sup> toonden het aan in osseïne, de kollagene stof uit been. Loebisch<sup>17)</sup> vond het in pezen, van Lier<sup>18)</sup> in de huid. Deze stoffen hebben nogal uiteenlopende eigenschappen afhankelijk van het materiaal, waaruit ze zijn bereid; als regel ontbreekt de eigenschap, dat de oplossing „fadenziehend” is.

De histologen uit de tweede helft van de vorige eeuw beschouwden het mucine als een bind- of plakmiddel, waarmee de kollageen-

fibrillen waren verbonden<sup>18)</sup>. Volgens deze opvatting behoort het dus niet tot de eigenlijke kollagene stof.

Indien deze meening algemeen als juist werd erkend, zou een verder onderzoek van deze stoffen achterwege kunnen blijven. We zouden er dan toch niets uit leeren over het kollageen zelf. Nagelotte<sup>20)</sup> en Levi<sup>21)</sup> ontkennen echter het bestaan van een dergelijke intermicellaire stof. Daarom stelt dit onderzoek zich op het standpunt, dat de mucinen een wezenlijk deel van het kollageen zijn.

#### b. Het Chondroitinezwavelzuur.

De mucinen uit de verschillende soorten kollageen hebben allen gemeen, dat het gedeelte van de stof, dat de koolhydraatreacties geeft, er uit is af te scheiden in den vorm van een stikstof- en zwavelhoudende verbinding, het chondroitinezwavelzuur.

Reeds aan Boedeker<sup>22)</sup> was het bekend, dat er door kraakbeen met zuren te koken, een oplossing ontstaat die een alkalische koperoplossing reduceert. C. Th. Mörner<sup>15)</sup> was de eerste wien het gelukte het chondroitinezwavelzuur af te scheiden uit het mengsel met eiwitten, waaruit het chondromucine bestaat.

Hij behandelde het kraakbeen met kaliloog en verwijderde uit deze oplossing de eiwitten door indampen met bariumcarbonaat en azijnzuur, gevolgd door een neerslaan met tannine. Zoo verkreeg hij een kolloide stof, die hij eerst „Chondroitsäure” noemde. In het tweede artikel voerde hij den naam chondroitinezwavelzuur in, omdat het, bij koken met zoutzuur, zwavelzuur afsplitste.

Met eiwitten geeft het na aanzuren met verdund azijnzuur een neerslag, waarvan de volgende beschrijving wordt gegeven:

„Ein mechanisches Gemenge von Chondroitsäure und Glutin in welchem das letztere in ziemlich grossem Ueberschuss vorhanden sein muss, bietet Reagentien gegenüber ein interessantes Verhalten dar; es gibt eine solche Lösung mit Essigsäure eine im Ueberschuss unlösliche, aus feinen, microscopisch kleinen Kugelchen verschiedener Grösse bestehende, flockige Fällung; mit Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure eine in ueberschüssiger Säure leicht lösliche Fällung von derselben physikalischen Beschaffenheit; Kochsalz oder Ferrocyankalium verhindert das Auftreten dieser Fällungen und löst sie, wenn entstanden, wieder auf.”



K. A. H. M ö r n e r <sup>23)</sup> bevestigt dit.

De beschrijving, dat het neerslag uit bolletjes bestaat en oplost in zouten, wekt het vermoeden, dat we hier te doen hebben met een coacervatieverschijnsel.

Na C. T h. M ö r n e r <sup>15)</sup> is het chondroitinezwavelzuur nog door een groot aantal andere onderzoekers <sup>24)</sup> bereid en onderzocht. Hun aandacht werd geheel in beslag genomen door het organisch-chemisch onderzoek van de afbraakproducten. S c h m i e d e b e r g <sup>25)</sup> ontdekte dat er bij koken van zijn preparaten met zoutzuur een hexosamine ontstond, verkregen via verschillende niet nauwkeurig gedefinieerde tussenstadia. Hij hield dit eindproduct voor glucosamine. Door P. A. L e v e n e <sup>26)</sup> is echter uitvoerig bewezen, dat het hexosamine uit het chondroitinezwavelzuur van het kraakbeen niet is glucosamine, maar zijn isomeer chondrosamine. Voor ons onderzoek is dit verschil van zeer weinig belang.

Geen van deze schrijvers geeft meer eenige aanwijzing over een neerslag van hun preparaten met eiwitten.



### III. Samenvatting.

De directe weg tot toetsing van de in de inleiding geformuleerde hypothese, zou zijn, te trachten aan het kollageen zelf eigenschappen te ontdekken, die typisch zijn voor een complexcoacervaat. Deze weg leek ons als begin niet zeer vruchtbaar, daar het kollageen niet oplost onder omstandigheden, die de lading van een of beide componenten zou opheffen, b.v. in een sterke zoutoplossing. Dit is niet in strijd met onze hypothese. Het is mogelijk, dat het kollageen als complexcoacervaat is ontstaan, terwijl toch het verouderde, tot een bepaalden vorm gegroeide materiaal, ten gevolge van zijn structuur geen zeer typische coacervateigenschappen meer vertoont.

Het in de vorige bladzijden gegeven overzicht geeft ons drie andere indirecte wegen, met name een verdere bestudeering van:

1. De isoëlectrische troebeling van gelatine.
2. De eigenschappen van de „pigskin”gelatine.
3. het neerslag van het chondroïtinezwavelzuur van M ö r n e r met eiwitten.

Het volgen van den onder 3 genoemden weg leek het beste resultaat op te zullen leveren bij een aanvatten van het vraagstuk. Daarom vangt het experimenteel gedeelte daarmee aan.

---

## B. EXPERIMENTEEL GEDEELTE.

### I. Coacervatie van chondroitinezwavelzuur met eiwitten.

#### 1. Bereiding van het chondroitinezwavelzuur.

Voor de bereiding gebruikten we kraakbeen van den neus van koeien en van den neus, de schouderbladeren en de ribben van kalveren. Deze beenderen werden ten minste drie dagen in 30 % alkohol bewaard, waarna alle vliezige aanhangsels gemakkelijk konden worden verwijderd. 5 Kilogram fijngesneden stukken werden met water gewasschen, in een vleeschmolen gemalen en gedurende twee dagen behandeld met 10 L. 2 % kaliloog. We schonken de vloeistof af, trokken de rest opnieuw gedurende 12 uur met kaliloog uit, en waschten de toen nog overgebleven stof ten slotte tweemaal met drie liter water. Nogmaals met loog behandelen leverde geen verdere opbrengst.

C. Th. Mörner<sup>15)</sup> zuurde de zoo verkregen vloeistof aan, verwijderde het neerslag, dat daarbij ontstond en behandelde het filtraat met tannine om de eiwitten neer te slaan. Na filtratie overtuigde hij zich dat er, door meer tannine toe te voegen, noch bij zure, noch bij alkalische, noch bij neutrale reactie een neerslag ontstond. Daarna verwijderde hij de overmaat tannine met loodacetaat-oplossing, en een overmaat van dit laatste met zwavelwaterstof. Het filtraat dialyseerde hij tegen gedestilleerd water. Ten slotte sloeg hij het preparaat neer door toevoeging van alkohol en een weinig zout-oplossing.

Omdat Mörner de eenige is, die aangeeft, dat het chondroitinezwavelzuur met eiwitten een neerslag geeft, hebben we eerst dit voorschrift op kleine schaal nauwkeurig nagewerkt. Inderdaad bleek een oplossing van dit preparaat met gelatine coacervatieverschijnselen te vertoonen. Er ontstonden bij menging op 40° kleine druppeltjes, en bij menging van vrij geconcentreerde oplossingen bij wat hogere temperatuur gelukte het een macrocoacervaat te krijgen.

Tegen de bereidingswijze van Mörner is intusschen als be-



zwaar aan te voeren, dat het in het geheel niet zeker is, dat geen tannine of verontreinigingen van het gebruikte tanninepreparaat achterblijven. Het is mogelijk, dat de coacervatie geheel hierdoor veroorzaakt zou zijn. Ter contrôle deden we daarom een blancoproef: Ongeveer dezelfde hoeveelheid tannine, als bij de bereiding van het preparaat was gebruikt, werd neergeslagen met een loodacetaatoplossing. Na verwijdering van het lood gaf het filtraat met een gelatineoplossing geen neerslag.

Toch loopen we een kans op noodelooze verontreiniging van het preparaat. Een tweede hoeveelheid werd daarom volgens een voorschrift van *Levene* verwerkt.

*Levene*<sup>26)</sup> zuurde het alkalische extract van 5 K.G. kraakbeen met azijnzuur aan en dampte de vloeistof op waterbad in tot het halve volumen onder toevoeging van bariumcarbonaat. Na verwijdering van het neerslag door decanteeren en centrifugeeren dampte hij opnieuw in onder toevoeging van bariumcarbonaat en azijnzuur tot een volumen van 2 Liter. Hij centrifugeerde de vloeistof en schonk de heldere gele oplossing onder heftig roeren in 16 L. ijsazijn uit. Het chondroitinezwavelzuur sloeg neer in den vorm van een „zuur kaliumzout”; hij waschte dit met azijnzuur, alcohol en aether en droogde het.

Dit ruwe product verwerkte hij tot het „bariumzout” door het op te lossen en vervolgens neer te slaan met basisch loodacetaat; dit neerslag werd na uitwasschen gesuspenderd in een oplossing, die 20 gram bariumacetaat en 10 cm<sup>3</sup> ijsazijn per liter bevatte. Door langdurig inleiden van zwavelwaterstof zette hij zoo het loodzout om in het bariumzout, terwijl zich een goed filtreerbaar loodsulfide vormde.

Ook dit preparaat gaf met gelatineoplossing een complexcoacervaat. Het groote gehalte aan barium (28 % asch!) maakte echter dit product onbruikbaar voor een nauwkeurige bestudeering van de coacervatie. Een poging om het bariumacetaat te vervangen door een aequivalente hoeveelheid natriumacetaat mislukte, daar er bij deze bewerking een zeer stabiel loodsulfidesol ontstond. De methode werd daarom voor de eerste preparaten (genummerd L 1 tot L 5) zoo gewijzigd, dat het lood werd neergeslagen in een 10 % natriumacetaatoplossing. We waren toen genoodzaakt, de oplossing van dit laatste zout te bevrijden door een langdurige electrodialyse.



Dit tusschen perkamenten membranen gedialyseerde sol werd ingedampt door er een warmen luchtstroom (beneden  $30^{\circ}$ ) over te leiden. Het droogt dan in tot doorschijnende bruine blaadjes (L 1 en L 2).

Dit product heeft een sterk zuur karakter, een  $\frac{1}{2}$  % oplossing had een pH van  $\pm 2,3$ . Direct na de bereiding gaf een oplossing geen neerslag met bariumchloride. Reeds na enkele weken begon het echter blijkbaar om te zetten; de oplossing in water vertoonde dan sulfaatreactie, de vaste stof werd kleverig en vervloede ten slotte tot een bruine stroop. Voor het uitvoeren van nauwkeurige experimenten was dit preparaat dus evenmin geschikt, daar het tijdens het gebruik te sterk veranderde.

Voor het eerste deel van het onderzoek werd de oplossing gevonden door de dialyse tot het hoog noodige te beperken, en het sol niet in te dampen, maar het direct na de dialyse in de ijskist te plaatsen en daar te bewaren. Na deze gewijzigde bewerking was er geen merkbare ontleding, er trad gedurende een maand geen merkbare verandering van de viscositeit op, en in dienzelfden tijd had de sulfaatreactie steeds negatief resultaat (solen no. L 3 en L 5).

Later kwamen we op de gedachte het basisch-loodacetaat-neerslag niet om te zetten met zwavelwaterstof, maar suspendeerden we het in verdund azijnzuur en onderwierpen deze suspensie aan electro-dialyse. Het lood scheidde zich af in den vorm van naaldjes op de negatieve electrode en op het membraan, dat zich tegen deze electrode bevond. Toen al het metaal zich had afgezet, en het sol bij inleiden van zwavelwaterstof geen neerslag of sterke bruinkleuring meer vertoonde, ververschten we de membranen, en dialyseerden nog eenigen tijd door. We verkregen daarmee aschvrije solen, die, in de ijskist geplaatst, maanden lang goed bleven (L 6 en L 8).

De droge preparaten, ook het bariumzout, gaven een sol door ze even bij kamertemperatuur met water te schudden. De zoo bereide solen en ook de solen L 3 - 8 waren vrij van eiwit, ten minste ze gaven geen biureetreactie. Het waren typisch solen van lyophiele kol-loiden, ze waren n.l. viskeus, en na toevoegen van een overmaat alcohol vlokten ze uit na ontlading met electrolyten.

## 2. Analyses van het chondroitinezwavelzuur.

Ter vergelijking van de verschillende preparaten onderling en

met die van andere onderzoekers bepaalden we als regel het asch-, stikstof- en zwavelgehalte. Hierbij leverde het drogen van de preparaten eenige moeilijkheden. De preparaten L 1 en L 2 ontleedden, zoowel in een vacuumexsiccator als bij verwarmen op  $100^{\circ}$ — $105^{\circ}$ . Ook de later bereide solen L 3 - L 8 lieten zich niet tot constant gewicht drogen. Op geen van beide manieren was een nauwkeurige bepaling van het gehalte aan droge stof van de preparaten uit te voeren.

We hebben daarom voorloopig de analyses van de vaste stoffen L 1 en L 2 berekend op de aan de lucht gedroogde preparaten, zooals ze voor oriënteerende experimenten zijn gebruikt. De berekening bij de solen L 3 - L 8 is gedaan op een onnauwkeurige bepaling van de vaste stof, die geschiedde door het sol op waterbad in te dampen en  $\frac{1}{2}$  uur op  $100^{\circ}$ — $105^{\circ}$  te verwarmen. Gezien het feit, dat zelfs de verhouding stikstof—zwavel in de verschillende preparaten sterk uiteenliep, was het onmogelijk uit deze analyses conclusies te trekken; men kan dus zonder bezwaar met deze onnauwkeurige bepaling genoegen nemen.

TABEL 1. Analyses van chondroïtinezwavelzuur-preparaten.

| Preparaat             | Concentratie van het sol | Aschgehalte | Stikstofgehalte  | Zwavelgehalte    | Verhouding van het aantal moleculen zwavel en stikstof |
|-----------------------|--------------------------|-------------|------------------|------------------|--------------------------------------------------------|
| bereid volgens Mörner | —                        | 21.6 %      | 2.36 %           | 5.94 %           | 1.10                                                   |
| L 1                   | —                        | 0.4 %       | 2.35 %<br>2.38 % | 6.20 %<br>6.26 % | 1.15                                                   |
| L 3                   | —                        | 5.2 %       | 2.50 %           | 5.76 %           | 1.01                                                   |
| L 5                   | 0.70 %                   | 14 %        | 3.09 %<br>3.13 % | 6.54 %<br>6.42 % | * 0.92                                                 |
| L 6                   | 0.52 %                   | 0.9 %       | 2.84 %           | 6.18 %           | 0.95                                                   |
| L 8                   | 0.21 %                   | 2.4 %       | —                | —                | —                                                      |

Het aschgehalte werd bepaald door de op  $100^{\circ}$ — $105^{\circ}$  gedroogde stof in een oven te verbranden en de asch daarin bij  $500^{\circ}$  tot constant gewicht te gloeien.



De stikstofbepaling geschiedde als micro-Kjeldahl-bepaling. De goede werking van het apparaat werd daarbij steeds van te voren gecontroleerd door het analyseren van een oplossing van acetanilide van bekende sterkte.

Het gehalte aan als zwavelzuur afsplitsbare zwavel werd bepaald door het chondroitinezwavelzuur eenige malen met salpeterzuur in te dampen. Dit indampen geschiedde met verschillende hoeveelheden salpeterzuur en gedurende verschillende tijden. Het gevormde zwavelzuur werd bepaald als bariumsulfaat. Er bleek een goede overeenstemming te bestaan tusschen bepalingen aan eenzelfde preparaat, dat op verschillende wijze met salpeterzuur behandeld was.

De resultaten van deze analyse zijn vermeld in tabel 1. Stikstof- en zwavelgehalte, die daarin voorkomen, zijn berekend op de vaste stof minus de daarin aanwezige asch.

### 3. Meting van de viscositeit van het chondroitinezwavelzuursol.

We maten de viscositeit van een sol bij verschillende pH, om uit te maken of het chondroitinezwavelzuur zich gedraagt als een steeds negatief geladen kolloid of als een eiwit, dus amfooteer.

In tabel 2 vindt men de uitkomsten van deze metingen, gedaan bij 25°. Kolom 2 bevat de verhouding van de uitvloeitijd van een sol met een chondroitinezwavelzuurconcentratie van 1 %, dat met loog op verschillende pH was gebracht, tot den uitvloeitijd van water.

Het is onnoodig deze verhouding om te zetten in een relatieve viscositeit door rekening te houden met het spec. gewicht van het sol t.o.v. water van dezelfde temperatuur; dit spec. gew. verschilde voor deze solen minder dan 0,001.

Een  $\frac{1}{2}$  % sol voldeed onder de omstandigheden van onze experimenten aan de wet van Poiseuille. Het gaf in den viscosimeter volgens B u n g e n b e r g d e J o n g <sup>29</sup>) („driebollenviscosimeter") bij drie verschillende drukken, waarbij de uitvloeitijden voor water waren 243,3; 314,8 en 434,7 sec., een verhouding van de uitvloeitijden ( $t_s/t_o$ ) van 1,089; 1,089; 1,087.

Uit tabel 2 en ook uit tabel 4 en fig. 2, die dezelfde waarden vermelden voor het sol L 5 bij 42,36°, blijkt, dat er geen minimum in viscositeit voorkomt. Het chondroitinezwavelzuursol is in het geheele onderzochte pH-gebied negatief geladen.



TABEL 2. Viscositeit van het sol L 1 bij 25° en verschillende pH.

| pH  | $t_s/t_o$ |
|-----|-----------|
| 2.3 | 1.189     |
| 2.6 | 1.203     |
| 3.0 | 1.208     |
| 3.8 | 1.220     |
| 4.4 | 1.223     |
| 6.4 | 1.224     |
| 8.0 | 1.112     |

#### 4. Ontleding van het chondroitinezwavelzuur.

Bij de bereiding van het chondroitinezwavelzuur deelden we reeds mede, dat deze stof gemakkelijk ontleeft. De gedachte lag nu voor de hand, dat de omzetting van het kollageen in de lijmfabriek beschouwd kan worden als de opheffing van het coacervaat door afbraak van de negatieve component, het chondroitinezwavelzuur. Daarom onderzochten we iets nauwkeuriger onder welke omstandigheden van temperatuur en zuurgraad een totale ontleding snel tot stand komt.

Als criterium voor de mate van ontleding gebruikten we steeds het vermogen gelatine te coacerveeren. We namen ongeveer dezelfde hoeveelheid sol, dat we (zoo noodig) aanzuurden tot een pH van omstreeks 3. Dit sol werd zeer verdund, zoodat eventueel toegevoegde zouten niet konden storen; vervolgens voegden we eenige druppels gelatinesol toe. We noemden het sol ontleed, zoodra hierbij geen neerslag meer optrad. Deze ontleding ging steeds gepaard met het optreden van een sterke sulfaatreactie (neerslag met bariumchloride).

Om het gedrag van het sol bij verwarming te bepalen, hielden we gedurende verschillende tijden afgemeten hoeveelheden sol (in toegesmolten glazen buizen) op een bepaalde temperatuur. Na 1, 2,

3, 6 en 10 uur verwarmen werd een buis geopend en de coacervatie op de beschreven wijze getoetst.

Om een verandering van de pH door het ontstane zwavelzuur te voorkomen, werd verhit in een bufferoplossing, bereid door aan het sol een gelijk volumen 10 % natriumacetaatoplossing en zuur of alkali toe te voegen.

Het zuivere sol L 5 (pH 2,5) zette zich bij 100° in 4 uur om. Ge-neutraliseerde solen (pH  $\pm$  6,0) waren bij 100° zeer bestendig, ze waren in 10 uur nog niet sterk ontleed. Het was noodig, daarvoor de temperatuur hooger op te voeren. Bij 130° trad ook bij neutrale solen in 10 uur omzetting op; gebufferde solen van pH 4,0 en 4,6 ontleedden in drie uur, een gebufferd sol pH 6,0 in 10 uur.

##### 5. Meting der viscositeit van coacerveerende mengsels van chondroitine-zwavelzuur en gelatine.

Voor een kwantitatieve bestudeering van de complexcoacervatie in mengsels van gelatine en chondroitinezwavelzuur volgen we de methode van Bungenberg de Jong en Dekker<sup>5)</sup>, door de viscositeit van de solen en hun mengsels te meten. De verhouding van deze gemeten waarde tot de, uit de viscositeit van de componenten additief berekende waarde is daarbij een maatstaf voor de sterkte van de coacervatie.

De genoemde onderzoekers brachten eerst de afzonderlijke solen op dezelfde pH en maten de viscositeit van deze isohydrische solen en hun mengsels. In hun geval (gelatine en arabische gom) was daartegen geen bezwaar. Geen van beide solen was oorspronkelijk sterk zuur of sterk alkalisch en ze waren beide practisch electrolytvrij. Voor het bereiken van een bepaalde pH in het gebied, waarin coacervatie optreedt, moest aan beide solen zuur worden toegevoegd. Deze aangezuurde mengsels liepen zoo niet sterk uiteen in electrolytgehalte.

In een later artikel waarschuwt Bungenberg de Jong<sup>27)</sup> tegen het toepassen van deze methode op solen, die sterk in pH verschillen.

Men moet dan voor tusschenliggende pH-waarden aan het eene sol zuur, aan het andere alkali toevoegen, zoodat in de verschillende mengsels verschillende zoutconcentraties ontstaan. Men moet zich dan voor elke verhouding en voor elke pH afzonderlijk reken-



schap geven van het electrolytgehalte, en de additieve viscositeit berekenen uit de viscositeit van de componenten, die deze zelfde hoeveelheid electrolyt bevatten. In ons geval was het wel zeer ingewikkeld. We hadden een sol, met een zeer lage pH, dat voor het bereiken van de pH 4,7 een hoeveelheid alkali gebruikte van ongeveer 8 m. aeq. per L. Bovendien bezat het sol een gehalte natriumacetaat van bijna 20 m. aeq. per L.

Om de hoeveelheid electrolyt niet grooter te maken dan strikt noodig was, gingen we als volgt te werk:

We mengden chondroitinezwavelzuur- en gelatinesolen in een bepaalde verhouding en voegden bij dit mengsel achtereenvolgens verschillende hoeveelheden zuur en alkali. Van elk van deze mengsels bepaalden we de viscositeit (tabel 3 en 4). De verkregen resultaten stelden we voor in de krommen van fig. 2 en 3. Nadat deze bepaling voor een aantal mengsels en voor de afzonderlijke componenten was geschied in het pH-gebied van 2,3 tot 4,7, interpoleerden we voor alle mengsels bij één bepaalde pH de juiste viscositeit. Op deze waarden pasten we de rekenwijze van *Bungenberg de Jong en Dekker* toe. Men vermijdt zoo niet alleen een te groote zoutconcentratie, maar ook alle fouten in de pH-bepaling, die door het steile verloop van de viscositeits-pH-kromme van gelatine een zeer grooten invloed op het resultaat kunnen hebben.

We gebruikten een fotografische gelatine van de Lijm- en Gelatinefabriek te Delft, hetzelfde preparaat dat *H. Galema*<sup>30)</sup> bij zijn onderzoek gebruikte. We reinigden deze gelatine door wasschen met 0,003 n. zoutzuur, volgens het voorschrift van *Loeb*<sup>31)</sup>. Na een uur inweken in water bij kamertemperatuur werd een oplossing verkregen door 30 minuten op 60° te verwarmen. De irreversibele reactie van dit sol bij 42,36° bedroeg in tien uur omstreeks 2 % van de verhouding  $\frac{t_s - t_o}{t_o}$ . Waar de metingen meestal binnen veel korteren tijd na de bereiding werden uitgevoerd, behoefde als regel hiervoor geen correctie te worden aangebracht.

Als chondroitinezwavelzuur gebruikten we het sol L 5.

De pH-metingen werden uitgevoerd aan den viscosimeterinhoud na afloop van de viscositeitsmeting. Elke bepaling werd gedaan met



de chinhydronelectrode, steeds colorimetrisch gecontroleerd met broomkresolgroen of thymolblauw. Van tijd tot tijd deden we ook een bepaling met de waterstofelectrode. De met  $\pm$  aangeduide bepalingen zijn slechts volgens één methode gemeten.

Ook de zeer sterk geacoacerveerde mengsels voldeden aan de

TABEL 3. Notatie van de mengsels in de tabellen 4, 5 en 7.

| Volumenverhouding<br>van de solen |                                  | Concentratie van het<br>sol in gewichts % |                                  | Verhouding van de<br>componenten in %<br>van de totale conc. |                                  | Notatie |
|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------|
| Gelatine                          | Chondroi-<br>tinezwa-<br>velzuur | Gelatine                                  | Chondroi-<br>tinezwa-<br>velzuur | Gelatine                                                     | Chondroi-<br>tinezwa-<br>velzuur |         |
| 5.0                               | 0                                | 0.25                                      | 0                                | 100                                                          | 0                                | 5.0—0.0 |
| 4.9                               | 0.1                              | 0.245                                     | 0.007                            | 97                                                           | 3                                | 4.9—0.1 |
| 4.5                               | 0.5                              | 0.225                                     | 0.035                            | 87                                                           | 13                               | 4.5—0.5 |
| 4.0                               | 1.0                              | 0.20                                      | 0.07                             | 74                                                           | 26                               | 4.0—1.0 |
| 3.0                               | 2.0                              | 0.15                                      | 0.14                             | 51                                                           | 49                               | 3.0—2.0 |
| 2.0                               | 3.0                              | 0.10                                      | 0.21                             | 32                                                           | 68                               | 2.0—3.0 |
| 1.0                               | 4.0                              | 0.05                                      | 0.28                             | 15                                                           | 85                               | 1.0—4.0 |
| 0                                 | 5.0                              | 0                                         | 0.35                             | 0                                                            | 100                              | 0.0—5.0 |

wet van Poiseuille. Een mengsel van 4 c.c.  $\frac{1}{2}$  % gelatinesol en 1 c.c. 0,35 % sol L 5 gaf, bij drie verschillende drukken in den „driebollenviscosimeter”<sup>29)</sup>, voor de uitvloeitijden voor water 243,3; 314,8; 434,7 sec., een verhouding van de uitvloeitijden  $t_s/t_0$  van resp. 1,033; 1,033; 1,032 (temperatuur 42,36°).

Ook hier is de viscositeit alleen uitgedrukt in de verhouding  $t_s/t_0$ . Bij omzetting in de relatieve viscositeit zou men het s.g. in rekening brengen, om het bij de berekening van de additieve viscositeit er weer uit te deelen. We hebben ons dit overbodige werk bespaard.

In tabel 4 zijn de uitkomsten van de metingen gerangschikt volgens de mengsels, zooals die in tabel 3 zijn omschreven. Deze waarden zijn grafisch voorgesteld in fig. 2 en 3. Uit deze krommen hebben we voor een bepaalde waarde van de pH de viscositeit geïnterpoleerd, zoowel voor de afzonderlijke componenten als voor

alle mengsels (tabel 5 kolom 3). Indien bij deze pH geen coacervatie van de mengsels optrad, zou hun viscositeit te berekenen zijn uit die van de gelatine (a) en het chondroitinezwavelzuur (b); voor

TABEL 4. Viscositeit van de mengsels uit tabel 3 bij verschillende pH.

| Mengsel | pH     | $t_s/t_0$ | Mengsel | pH    | $t_s/t_0$ |
|---------|--------|-----------|---------|-------|-----------|
| 5.0—0.0 | 4.72   | 1.080     | 4.0—1.0 | 5.05  | 1.103     |
|         |        | 1.079     |         | 4.47  | 1.040     |
|         | 4.47   | 1.089     |         | 3.85  | 1.025     |
|         | 4.40   | 1.094     |         | ± 3.3 | 1.019     |
|         | 4.24   | 1.160     |         | 3.02  | 1.017     |
|         | 4.14   | 1.174     |         | 2.23  | 1.018     |
|         | 3.88   | 1.262     | 3.0—2.0 | 5.08  | 1.105     |
|         | 3.40   | 1.444     |         | 4.43  | 1.085     |
|         | ± 3.4  | 1.459     |         | 3.98  | 1.064     |
|         | 2.33   | 1.366     |         | 3.33  | 1.057     |
|         |        |           |         | 2.39  | 1.026     |
| 4.9—0.1 | 4.96   | 1.043     | 2.0—3.0 | 4.66  | 1.146     |
|         | 4.27   | 1.046     |         | 4.14  | 1.119     |
|         | 3.95   | 1.039     |         | 3.75  | 1.113     |
|         | 3.78   | 1.136     |         | 3.01  | 1.100     |
| 4.5—0.5 |        |           |         | 2.81  | 1.093     |
|         | 4.85   | 1.068     | 1.0—4.0 | 2.91  | 1.147*)   |
|         | 4.34   | 1.019     |         | 4.27  | 1.150*)   |
|         | 4.04   | 1.008     | 0.0—5.0 | 4.56  | 1.171     |
|         | 3.29   | 1.011     |         | 4.17  | 1.187     |
|         | 2.25   | 1.138     |         | 3.62  | 1.199     |
|         | ± 3.85 | 1.003     |         | 3.17  | 1.201     |
|         |        |           |         | 2.30  | 1.193     |
|         |        |           |         |       |           |
|         |        |           |         |       |           |
|         |        |           |         |       |           |

een mengsel van  $m \text{ cm}^3$  gelatine en  $n \text{ cm}^3$  chondroitinezwavelzuur zou het zijn  $\frac{am + bn}{m + n}$ . Deze getallen zijn aangegeven in tabel 5 in de vierde kolom. In de vijfde kolom bevinden zich de getallen, die aangeven hoeveel % de gevonden waarde van de berekende uit-

\*) Daar deze solen na een- of tweemaal doorlopen den viscosimeter verstopten is de nauwkeurigheid van deze metingen niet groot.

maakt. De tabel geeft deze berekeningen voor 5 verschillende pH's;

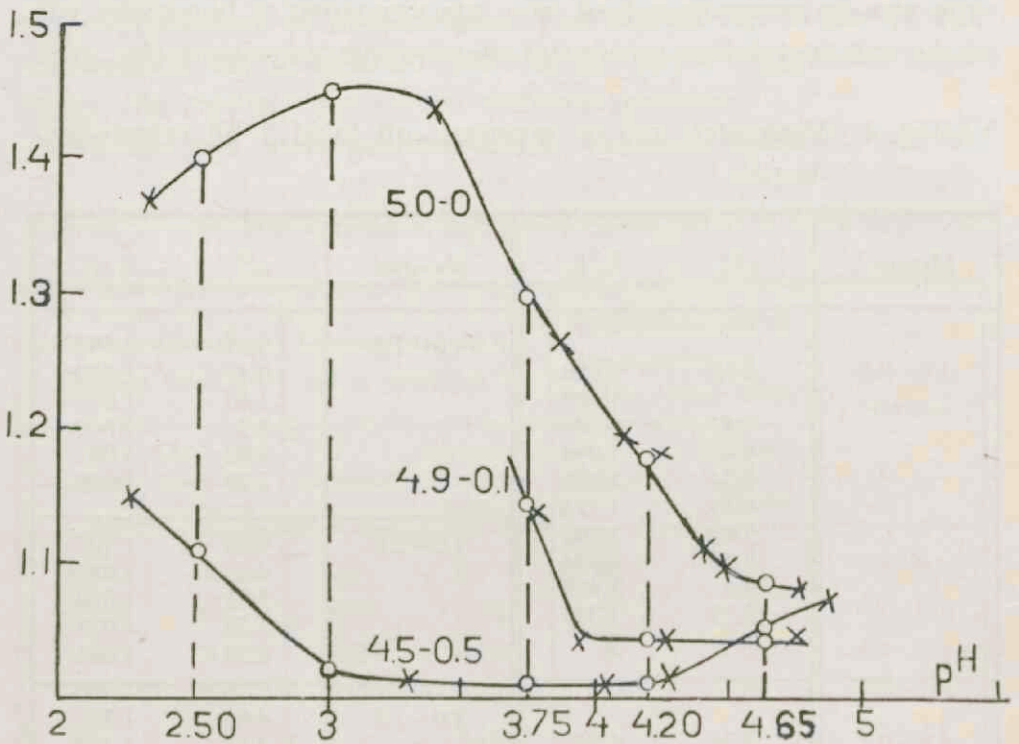


Fig. 2.

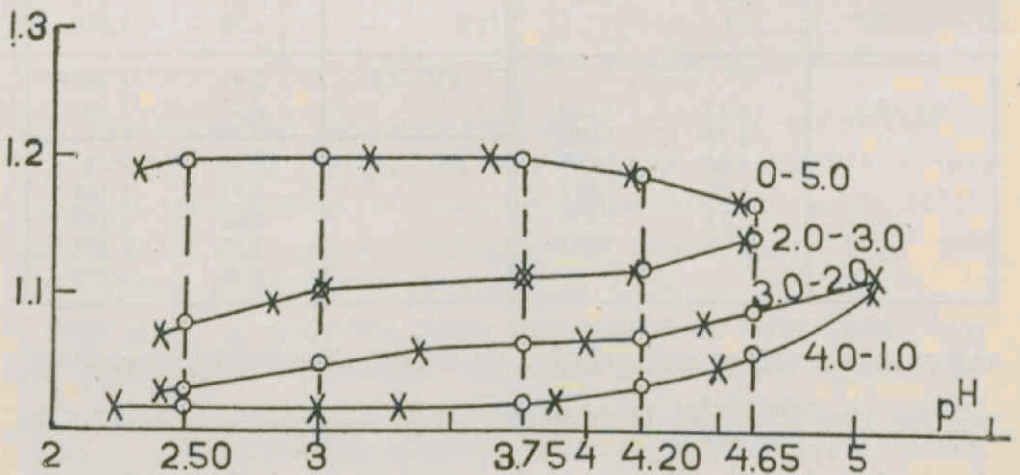


Fig. 3.

in de figuren 4 - 8 zijn deze verhoudingen grafisch voorgesteld als functie van de verhouding van de componenten. Deze figuren geven ons een duidelijk overzicht van de sterkte van de coacervatie bij



TABEL 5. Gemeten viscositeit van de mengsels van chondroïtine-zwavelzuur- en gelatinesolen uitgedrukt in % van de berekende waarde.

| pH   | Mengsel   | Viscositeit<br>geïnterpo-<br>leerd uit de<br>figuur | Additief<br>berekende<br>viscositeit | Geïnterpo-<br>leerde waarde<br>in % van de<br>berekende |
|------|-----------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 2.5  | 5.0—0.0   | 1.40                                                | 1.40                                 | 100                                                     |
|      | 4.5—0.5   | 1.11                                                | 1.38                                 | 29                                                      |
|      | 4.0—1.0   | 1.017                                               | 1.36                                 | 5                                                       |
|      | 3.0—2.0   | 1.03                                                | 1.32                                 | 9                                                       |
|      | 2.0—3.0   | 1.08                                                | 1.28                                 | 28                                                      |
|      | 0.0—5.0   | 1.20                                                | 1.20                                 | 100                                                     |
| 3.0  | 5.0—0.0   | 1.45                                                | 1.45                                 | 100                                                     |
|      | 4.5—0.5   | 1.04                                                | 1.42                                 | 10                                                      |
|      | 4.0—1.0   | 1.017                                               | 1.40                                 | 4                                                       |
|      | 3.0—2.0   | 1.05                                                | 1.35                                 | 14                                                      |
|      | 2.0—3.0   | 1.10                                                | 1.30                                 | 33                                                      |
|      | (1.0—4.0) | (1.15)                                              | 1.25                                 | (60)                                                    |
| 3.75 | 5.0—0.0   | 1.29                                                | 1.29                                 | 100                                                     |
|      | 4.9—0.1   | 1.14                                                | 1.29                                 | 48                                                      |
|      | 4.5—0.5   | 1.01                                                | 1.26                                 | 4                                                       |
|      | 4.0—1.0   | 1.02                                                | 1.26                                 | 8                                                       |
|      | 3.0—2.0   | 1.06                                                | 1.25                                 | 24                                                      |
|      | 2.0—3.0   | 1.11                                                | 1.23                                 | 48                                                      |
| 4.2  | 5.0—0.0   | 1.16                                                | 1.16                                 | 100                                                     |
|      | 4.9—0.1   | 1.04                                                | 1.16                                 | 25                                                      |
|      | 4.5—0.5   | 1.01                                                | 1.16                                 | 6                                                       |
|      | 4.0—1.0   | 1.035                                               | 1.17                                 | 21                                                      |
|      | 3.0—2.0   | 1.07                                                | 1.17                                 | 42                                                      |
|      | 2.0—3.0   | 1.12                                                | 1.18                                 | 67                                                      |
| 4.65 | (1.0—4.0) | (1.15)                                              | 1.18                                 | (83)                                                    |
|      | 0.0—5.0   | 1.19                                                | 1.19                                 | 100                                                     |
| 4.65 | 5.0—0.0   | 1.09                                                | 1.09                                 | 100                                                     |
|      | 4.9—0.1   | 1.043                                               | 1.09                                 | 48                                                      |
|      | 4.5—0.5   | 1.05                                                | 1.10                                 | 50                                                      |
|      | 4.0—1.0   | 1.06                                                | 1.11                                 | 55                                                      |
|      | 3.0—2.0   | 1.09                                                | 1.12                                 | 75                                                      |
|      | 2.0—3.0   | 1.14                                                | 1.14                                 | 100                                                     |
| 4.65 | 0.0—5.0   | 1.17                                                | 1.17                                 | 100                                                     |

wisselende pH en mengverhouding. De minima in deze krommen vallen samen met de maxima van de troebeling, zooals ze visueel zijn beoordeeld aan de mengsels, die voor de bovenstaande metingen

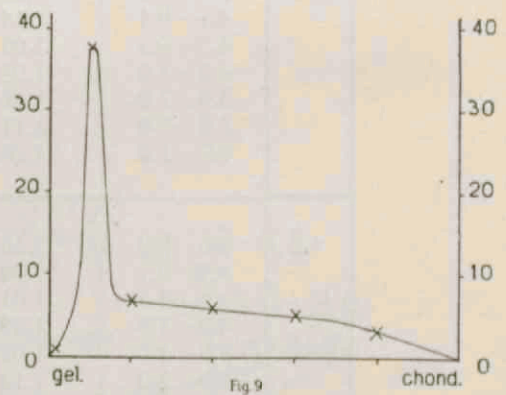
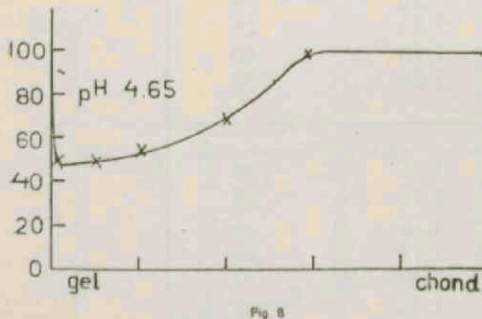
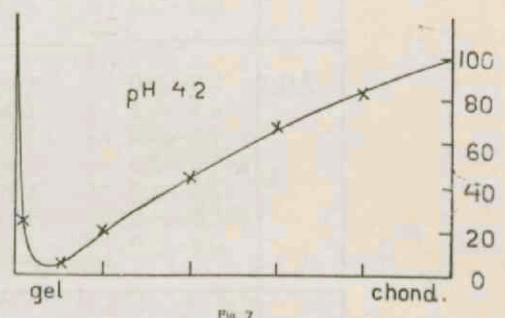
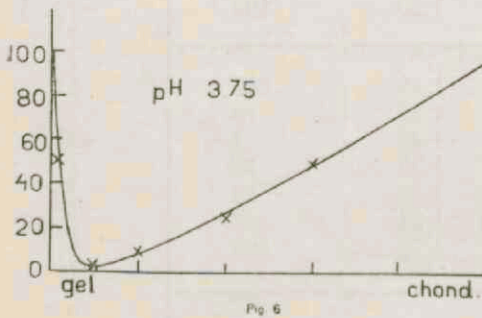
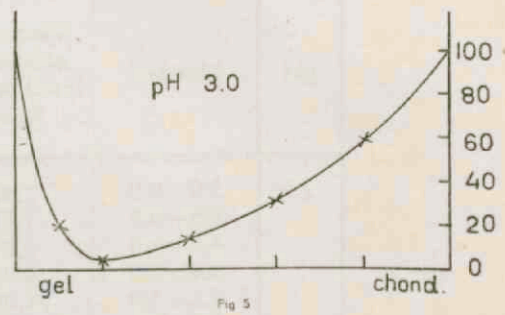
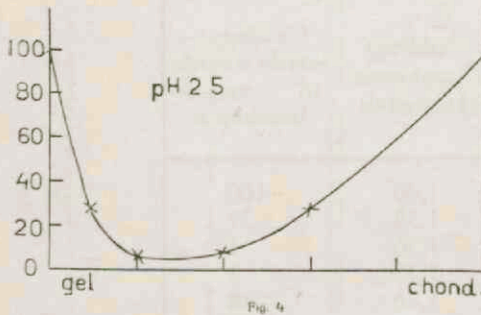


Fig. 4—8. Procentuele viscositeit van mengsels van chondroitine-zwavelzuur en gelatine.

Fig. 9. Troebeling van het mengsel bij pH 3.8.

hadden gediend en zooals ze met den fotometer zijn waargenomen (pag. 28).

Evenals bij Bungenberg de Jong en Dekker verschuift het minimum uit deze figuren (dus het maximum van de coacervatie) bij daling van de pH naar een steeds kleinere verhou-

ding gelatine-chondroitinezwavelzuur. Daar dan de lading van eenzelfde hoeveelheid gelatine steeds toeneemt, is er ook hier bij het minimum steeds een ongeveer constante verhouding van de hoeveelheid lading van positieve en negatieve component.

Het blijkt duidelijk, dat de verhouding van de deelnemende massa onbelangrijk is. Een sterke coacervatie krijgt men alleen, wanneer er tusschen de hoeveelheid positieve en negatieve lading een bepaald evenwicht bestaat.

#### 6. Invloed van kleine elektrolytconcentraties op de viscositeitsmetingen aan coacerveerende mengsels van chondroitinezwavelzuur en gelatine.

Bij de berekening van de procentueele verlaging van de viscositeit, zooals die is voorgesteld in de figuren 4-8, is geen rekening gehouden met het verschillend gehalte aan electrolyt, dat de mengsels bevatten. Er zou hierdoor een belangrijke fout kunnen zijn ontstaan. Toen bij latere waarnemingen bleek, dat kleine concentraties electrolyt een grooten invloed op de troebeling van deze mengsels hebben en wij ook de beschikking hadden over een beter aschvrij sol, voerden we een aantal viscosimetrische bepalingen uit om na te gaan, hoe groot de gemaakte fout zou zijn.

We kozen daarvoor één pH en wel de eigen pH van het sol L 8 (2,5). We maten de viscositeit van dit sol, van een op pH 2,5 gebracht  $\frac{1}{4}$  % gelatinesol en van mengsels van deze twee, eerst zonder electrolyt en vervolgens met een concentratie van resp. 5, 10 en 20 m. aeq. per L. kaliumchloride. In tabel 6 staan deze metingen vermeld, geheel op dezelfde wijze uitgevoerd als de vorige. De zesde kolom geeft evenals de vierde kolom van tabel 5 een berekende waarde en de zevende kolom geeft aan welk percentage het gevonden getal is van het berekende.

Uit de geringe verschillen van de getallen in de laatste kolom voor één mengsel bij verschillende concentraties KCl is duidelijk dat KCl-concentraties tot 20 m. aeq. per L. geen merkbaren invloed hebben op de op deze wijze berekende verlaging van de viscositeit. Voor fouten in de uitkomsten van tabel 5 ten gevolge van aanwezige electrolyt behoeft dus niet te worden gevreesd. Een verdere bespreking van deze getallen zullen we uitstellen tot na de troebelingsmetingen (pag. 32).



TABEL 6. Viscositeit van mengsels van gelatine- en chondroitine-zwavelzuursolen waaraan kaliumchloride is toegevoegd. pH 2,5; temperatuur 42,36°.

| Electro-<br>lytconc. | Concentratie van de<br>compon. in gew. % |                                   | Verhouding<br>van de conc.<br>van de com-<br>ponenten | Gemeten<br>viscositeit | Berekende<br>viscositeit | Gemeten<br>waarde in<br>% van de<br>berekende |
|----------------------|------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------|
|                      | Gelatine                                 | Chondroi-<br>tine zwa-<br>velzuur |                                                       |                        |                          |                                               |
| 0                    | 0.25                                     | 0                                 | 100— 0                                                | 1.381                  | 1.381                    | 100                                           |
|                      | 0.225                                    | 0.026                             | 90— 10                                                | 1.132                  | 1.361                    | 37                                            |
|                      | 0.20                                     | 0.053                             | 79— 21                                                | 1.020                  | 1.341                    | 6                                             |
|                      | 0.15                                     | 0.105                             | 59— 41                                                | 1.023                  | 1.302                    | 8                                             |
|                      | 0.10                                     | 0.158                             | 39— 61                                                | 1.053                  | 1.262                    | 20                                            |
|                      | 0                                        | 0.158                             | 0—100                                                 | (1.110)                | (1.110)                  | (100)                                         |
| 5 m. aeq.<br>K Cl    | 0.25                                     | 0                                 | 100— 0                                                | 1.306                  | 1.306                    | 100                                           |
|                      | 0.225                                    | 0.026                             | 90— 10                                                | 1.096                  | 1.286                    | 34                                            |
|                      | 0.20                                     | 0.053                             | 79— 21                                                | 1.015                  | 1.266                    | 6                                             |
|                      | 0.15                                     | 0.105                             | 59— 41                                                | 1.015                  | 1.226                    | 7                                             |
|                      | 0.10                                     | 0.158                             | 39— 61                                                | 1.042                  | 1.185                    | 23                                            |
|                      | 0                                        | 0.158                             | 0—100                                                 | (1.063)                | (1.063)                  | (100)                                         |
| 10 m. aeq.<br>K Cl   | 0.25                                     | 0                                 | 100— 0                                                | 1.249                  | 1.249                    | 100                                           |
|                      | 0.225                                    | 0.026                             | 90— 10                                                | 1.084                  | 1.234                    | 36                                            |
|                      | 0.20                                     | 0.053                             | 79— 21                                                | 1.014                  | 1.219                    | 7                                             |
|                      | 0.15                                     | 0.105                             | 59— 41                                                | 1.014                  | 1.188                    | 8                                             |
|                      | 0.10                                     | 0.158                             | 39— 61                                                | 1.037                  | 1.159                    | 23                                            |
|                      | 0                                        | 0.158                             | 0—100                                                 | (1.059)                | (1.059)                  | (100)                                         |
| 20 m. aeq.<br>K Cl   | 0.25                                     | 0                                 | 100— 0                                                | 1.202                  | 1.202                    | 100                                           |
|                      | 0.225                                    | 0.026                             | 90— 10                                                | 1.074                  | 1.191                    | 39                                            |
|                      | 0.20                                     | 0.053                             | 79— 21                                                | 1.015                  | 1.180                    | 8                                             |
|                      | 0.15                                     | 0.105                             | 59— 41                                                | 1.014                  | 1.156                    | 9                                             |
|                      | 0.10                                     | 0.158                             | 39— 61                                                | 1.038                  | 1.134                    | 28                                            |
|                      | 0                                        | 0.158                             | 0—100                                                 | (1.053)                | (1.053)                  | (100)                                         |

#### 7. Meting van de troebeling van coacerveerende mengsels.

##### a. Defotometer.

We vergeleken de troebeling van de coacerveerende mengsels bij de meting van de viscositeit door ze in reeksen buisjes in opvallend licht te plaatsen en te noteeren welke mengsels bij deze opstelling het sterkst troebel leken. Aangezien we de mengsels van één pH dikwijls eerst eenige dagen na elkander maten, ontstond de behoefte de troebeling in een getal vast te leggen, om zoo de verschillende reeksen te kunnen vergelijken. Het laboratorium bezat hiervoor een

instrument, een fotometer van Jobin, die ook door v. d. Minne<sup>28)</sup> is gebruikt.

Het principe daarvan is het volgende:

Men vergelijkt de sterkte van twee lichtbundels, door ze ieder één van twee naast elkaar gelegen vlakjes te laten verlichten, die door een scherp rand gescheiden zijn. Zoodra de beide vlakjes gelijk verlicht zijn, ziet men deze afscheiding niet meer.

De eerste lichtbundel passeert een cuvet, waarin de te meten troebele vloeistof zich bevindt; de tweede gaat door een verschuifbare wig van gelijkmatig troebel materiaal. Op deze wig is een schaalverdeeling aangebracht; bovendien behooren bij het instrument eenige troebele glaasjes, waarvan de troebeling gelijk is aan een bekend aantal schaaldeelen van de wig. Deze glaasjes kunnen in een van beide bundels worden ingeschakeld en maken door het gebruik in passende combinatie het toestel ook voor zeer troebele vloeistoffen bruikbaar.

Men meet de troebeling van een vloeistof door combinatie van deze glaasjes, gevolgd door een verschuiven van de wig, totdat de grens tusschen de verlichte vlakjes verdwenen is.

Vóór het gebruik moet worden uitgezocht, welke lichtsterkte voor een bepaald materiaal een aangename vergelijking mogelijk maakt. Verder moet men uit verschillende gekleurde glaasjes een keus doen, en ze inschakelen in een of beide lichtbundels, zoodat de beide vlakjes dezelfde kleur hebben. Tenslotte moet voor elke meting opnieuw worden gecontroleerd, of de lichtbundel op de juiste wijze door het toestel valt en niet door onderdeelen gedeeltelijk wordt onderschept. Dit geschiedt door in de lichtbundels een loupe plaatsen en de verschillende prisma's, die de stralen op een plaats vereenigen, te verstellen, totdat twee beelden van de lichtbron, elk afkomstig uit een der bundels, nauwkeurig samenvallen.

De troebeling werd steeds genoteerd in schaaldeelen van den fotometer, met een groote troebeling kwam overeen een groote waarde van deze verdeeling. Van alle waarnemingen trokken we af de aflezing voor een gelijke cuvet, gevuld met gedestilleerd water, zoodat een heldere oplossing wordt aangegeven door de notatie 0. Het gelukte mij na eenige oefening verschillende bepalingen aan hetzelfde troebele mengsel binnen 0,3 schaaldeelen te doen overeenstemmen. Alleen de weinig troebele mengsels gaven moeilijkhe-



den; als de te meten waarde minder dan 3 schaaldeelen van die van gedestilleerd water verschilde, was een goede overeenstemming — hier dubbel noodig — niet te bereiken. In geval van twijfel zijn deze gevallen niet aangeduid met een getal, maar met de aanwijzing „opal.” en „zw. opal.”. Voor de latere metingen van de troebeling van gelatinegelen is de nauwkeurigheid in dit gebied vergroot door den lichtbundel een 5 maal langeren weg door de vloeistof te laten afleggen. Bij dezelfde troebeling wordt het aantal schaaldeelen dan ook omstreeks 5 maal zoo groot en de fout door de meting daardoor naar verhouding 5 maal zoo klein.

De coacerveerende mengsels met gelatine als component moesten worden gemeten boven 40°, daar bij kamertemperatuur de druppeltjes gelatineeren en de troebeling slecht reproduceerbaar is.

Op een dergelijke verwarming was de fotometer niet ingericht, en door den zeer compacten bouw was een verwarming op constante temperatuur, b.v. door stroomend water, ook moeilijk aan te brengen.

Ik ging daarom als volgt te werk: De afgemeten hoeveelheden van de solen werden afzonderlijk in een thermostaat van 42,5° gehangen; ze bleven daarin minstens 15 minuten. Ook de cuvet van den fotometer werd van te voren op deze temperatuur gebracht.

Ik mengde de solen, vulde oogenblikkelijk de cuvet en plaatste die in den fotometer. De instelling van de wig 60 sec. na menging werd als de juiste waarde genoteerd. In deze minuut had ik steeds gelegenheid enkele malen opnieuw in te stellen en af te lezen. Indien deze waarden sterk schommelden werd de proef als mislukt beschouwd en herhaald.

De troebeling bleef als regel  $1\frac{1}{2}$  à 2 minuten goed constant, daarna werd de invloed van het uitzakken van de druppeltjes merkbaar. Daar we maten op geringe hoogte boven den bodem van de cuvet nam dan de lichtsterkte van den te meten lichtbundel sterk af.

#### b. Meting van de troebeling bij mengsels van solen van chondroitinezwavelzuur en gelatine.

De hoeveelheid van het sol L 5 die, na de metingen, in tabel 4 vermeld, was overgebleven, was niet groot genoeg om daarmee geheel op dezelfde manier ook de troebeling te bestudeeren. We



moesten genoeg nemen met een kleiner aantal experimenten waarbij slechts één methode gevolgd werd en wel die, waarbij we de afzonderlijke solen voor de menging op een bepaalde pH brachten.

We bereidden hiervoor een  $\frac{1}{2}$  % gelatinesol en brachten het met een gelijk volume verdund zoutzuur op een pH resp. 2,6, 3,8 en 4,5. Evenzoo brachten we het 0,7 % chondroitinezwavelzuursol met een gelijk volumen loog op dezelfde pH.

TABEL 7. Troebeling van mengsels van solen van chondroitinezwavelzuur en gelatine bij verschillende pH.

| Mengsels | pH   |      |          |
|----------|------|------|----------|
|          | 2.6  | 3.8  | 4.5      |
| 4.9—0.1  | 0    | 0.6  | zw opal. |
| 4.5—0.5  | 11.9 | 37.2 | 0        |
| 4.0—1.0  | 36.1 | 6.8  | 0        |
| 3.0—2.0  | 37.2 | 5.9  | 0        |
| 2.0—3.0  | 25.0 | 5.2  | 0        |
| 1.0—4.0  | 10.5 | 3.3  | 0        |

Tabel 7 geeft een overzicht van de troebeling van de hiermee gemaakte mengsels. Bij pH 2,6 ligt een weinig scherp maximum bij de mengsels met 4 en 3 cm<sup>3</sup>. gelatine. Dit ligt bij dezelfde verhouding als het minimum in tabel 5, 5e kolom voor de pH 2,5.

Bij pH 3,8 ligt het maximum zeer scherp bij de verhouding 4,5 - 0,5; wat ook met tabel 5 overeenstemt. Bij pH 4,5 is alleen bij solen met zeer weinig chondroitinezwavelzuur nog een spoor van troebeling waar te nemen. De verlaging van de viscositeit is in overeenstemming hiermede veel minder sterk.

Zeer fypisch is het verschil tusschen de kromme van de fotometeraflezing bij pH 3,8 (fig. 9) en die van de verlaging van de viscositeit bij dezelfde pH (fig. 6). Hier is duidelijk zichtbaar het verschijnsel van het complexsol; de viscositeit wijst uit, dat de solen elkaar bij alle verhoudingen reeds sterk beïnvloeden. Voor een macroscopische ontmenging is bovendien noodig, dat de solen elkaar in electrisch opzicht precies neutraliseeren. In paragraaf c. komt dit nog veel sterker uit.

### c. Invloed van electrolyten op de troebeling.

Zoodra we beschikten over een goed electrolytvrij chondroitinezwavelzuurpreparaat, bestudeerden we den invloed van electrolyten op de troebeling. We werkten hierbij met één bepaalde pH n.l. 2,5, de eigen pH van het sol L 6. In de thermostaat werden geplaatst een afgemeten hoeveelheid van een  $\frac{1}{2}$  % gelatinesol, dat met zuur op pH 2,5 was gebracht, en een afgemeten hoeveelheid sol L 6. Het volumen van deze beide solen was tezamen steeds 5 cm<sup>3</sup>. Aan het chondroitinezwavelzuur voegden we dan nog 5 cm<sup>3</sup> electrolytoplossing toe. De mengsels werden gemeten met den fotometer, op de wijze zooals op pag. 28 uitvoerig beschreven is.

Voor een totale verdwijning van de troebeling voor alle verhoudingen is noodig een concentratie aan KCl, BaCl<sub>2</sub> of K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> van 160 m. aeq. per L. Bij de driewaardige electrolyten K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> zijn alle mengsels helder bij 75 m.aeq. per L.

In tabel 8 bevinden zich de uitkomsten van deze metingen. Uit de verschillende verhoudingen zijn er drie uitgekozen en in een grafiek uitgezet. Fig. 10 geldt voor het mengsel, dat zonder electrolyt de hoogste troebeling bezit en waar dus de hoeveelheden tegengestelde lading gelijk zijn. Fig. 11 geldt voor een mengsel met overmaat positieve lading in verhouding 2 : 1 en fig. 12 voor een mengsel met overmaat negatieve lading in de verhouding 1 : 2. De mengsels zijn aangeduid volgens dezelfde methode als in tabel 3: Het eerste getal is een volumen gelatinesol, het tweede een volumen chondroitinezwavelzuursol. Doordat het sol L 6 een andere concentratie bezit dan het sol L 5 is de verhouding van de gewichtshoeveelheden een andere dan in tabel 3; de gewichtshoeveelheden van de componenten verhouden zich als de opgegeven volumina.

Nog veel duidelijker dan bij B u n g e n b e r g d e J o n g e n W e s t e r k a m p <sup>6)</sup> komt uit deze figuren naar voren het verschijnsel van de vorming van een „complexsol”.

Het wezenlijke in het coacervatieverschijnsel is de wederzijdsche verlaging van de hydratatie. In de verlaging van de viscositeit, zooals we die in tabel 5 en 6 hebben berekend, hebben we een maatstaf, waarnaar we de grootte van deze beïnvloeding kunnen beoordeelen. Uit tabel 6 blijkt nu, dat kleine electrolytconcentraties



TABEL 8. Invloed van electrolyten op de troebeling van mengsels van chondroitinezwavelzuur- en gelatinesolen.  
pH. 2,5; temperatuur 42,5°.

a. KCl.

| Mengsels | m. aeq. KCl per L. |      |      |      |      |      |      |      |     |
|----------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
|          | 0                  | 2    | 5    | 10   | 20   | 40   | 80   | 120  | 140 |
| 4.5—0.5  | 3.2                | 3.8  | 12.4 | 33.3 | 35.0 | 33.4 | 16.5 | 9.8  | 2.9 |
| 4.0—1.0  | 38.7               | 37.4 | 34.5 | 34.3 | 36.2 | 34.6 | 28.0 | 25.0 | —   |
| 3.5—1.5  | 16.7               | 40.3 | 33.5 | 37.9 | 36.6 | 35.0 | 28.9 | 26.9 | —   |
| 3.0—2.0  | 7.8                | 23.4 | 33.5 | 37.7 | 36.0 | 34.0 | 27.7 | 25.3 | —   |
| 2.5—2.5  | 5.8                | 14.4 | 33.2 | 36.9 | 35.4 | 33.7 | 26.7 | 25.3 | —   |
| 2.0—3.0  | 4.4                | 11.4 | 17.9 | 32.9 | 35.0 | 33.4 | 23.4 | 15.8 | 8.4 |

b. BaCl<sub>2</sub>.

| Mengsels | m. aeq. BaCl <sub>2</sub> per L. |      |      |      |      |      |      |     |
|----------|----------------------------------|------|------|------|------|------|------|-----|
|          | 1                                | 2    | 5    | 10   | 40   | 80   | 120  | 140 |
| 4.5—0.5  | 3.5                              | 4.5  | 5.9  | 11.6 | 11.0 | 6.8  | 0    | 0   |
| 4.0—1.0  | 34.4                             | 34.1 | 34.2 | —    | 32.6 | —    | 3.8  | —   |
| 3.5—1.5  | 30.2                             | 36.4 | 35.1 | —    | 32.7 | 30.5 | 8.9  | 2.3 |
| 3.0—2.0  | 22.7                             | —    | 34.7 | —    | —    | —    | 11.0 | 3.5 |
| 2.5—2.5  | 10.8                             | 22.6 | 33.9 | —    | 29.8 | 28.8 | 12.6 | 3.9 |
| 2.0—3.0  | 7.9                              | 16.7 | 33.9 | 32.9 | 29.8 | 29.3 | 8.1  | 3.8 |

c. K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

| Mengsels | m. aeq. K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per L. |      |      |      |      |      |      |     |
|----------|-----------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|-----|
|          | 2                                             | 5    | 10   | 20   | 40   | 80   | 120  | 140 |
| 4.5—0.5  | 7.0                                           | 35.2 | 33.2 | —    | 32.0 | 24.4 | 4.2  | 0   |
| 4.0—1.0  | 33.6                                          | —    | 34.2 | —    | 33.4 | 29.8 | 10.6 | 7.0 |
| 3.5—1.5  | 36.9                                          | —    | 35.1 | —    | 32.9 | 30.4 | 12.6 | 3.3 |
| 3.0—2.0  | 14.4                                          | —    | 35.2 | —    | 32.5 | 30.2 | 10.6 | 2.9 |
| 2.5—2.5  | 9.2                                           | —    | 34.2 | —    | 32.2 | 29.2 | 8.7  | 2.8 |
| 2.0—3.0  | 6.6                                           | —    | 26.7 | 32.9 | 30.7 | 26.0 | 6.6  | 3.0 |



d.  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ .

| Mengsels | m. aeq. $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ per L. |      |      |     |
|----------|-------------------------------------------|------|------|-----|
|          | 1.66                                      | 3.33 | 6.67 | 27  |
| 4.5—0.5  | 6.4                                       | —    | 6.3  | 3.1 |
| 4.0—1.0  | 35.3                                      | —    | 33.8 | —   |
| 3.5—1.5  | 35.7                                      | —    | 34.7 | —   |
| 3.0—2.0  | 35.5                                      | —    | 32.7 | —   |
| 2.5—2.5  | 15.9                                      | —    | 32.8 | —   |
| 2.0—3.0  | 4.5                                       | 34.1 | 22.8 | —   |

e.  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ .

| Mengsels | m. aeq. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ per L. |      |      |      |      |      |
|----------|---------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
|          | 0.25                                              | 0.75 | 3    | 7.5  | 15   | 60   |
| 4.5—0.5  | 7.6                                               | 36.2 | 35.3 | —    | 34.1 | 15.2 |
| 4.0—1.0  | —                                                 | 35.1 | 36.3 | —    | 34.7 | 14.4 |
| 3.5—1.5  | —                                                 | 22.6 | 37.0 | —    | 34.5 | 13.6 |
| 3.0—2.0  | —                                                 | 9.6  | 31.0 | —    | 34.2 | 10.6 |
| 2.5—2.5  | —                                                 | 6.7  | 21.6 | —    | 33.6 | 8.0  |
| 2.0—3.0  | —                                                 | 4.1  | 12.8 | 25.0 | 27.0 | 6.7  |

daarbij geen invloed hebben, ondanks het feit, dat ze voor de afzonderlijke solen de viscositeit merkbaar verlagen, en daar dus waarschijnlijk een verandering in ladings- en hydratatietoestand hebben veroorzaakt. Eerst bij veel grotere concentratie geeft toevoeging van zouten een opheffing van het verband, dat het coacervaat bijeenhoudt.

Wat betreft den uitwendigen vorm van het verschijnsel vindt men daarentegen wel een invloed van kleine electrolytconcentraties. Mengsels, waarin door een overmaat van een component een overschot van lading aanwezig is, worden niet sterk troebel, omdat de lading kleine complexen van deeltjes stabiliseert. Een dergelijk sol (overmaat negatieve component) met een troebeling van 6,7, vertoonde onder het microscoop een groot aantal zeer kleine deeltjes, waarvan de grootte varieerde van 1 tot 4 micron.

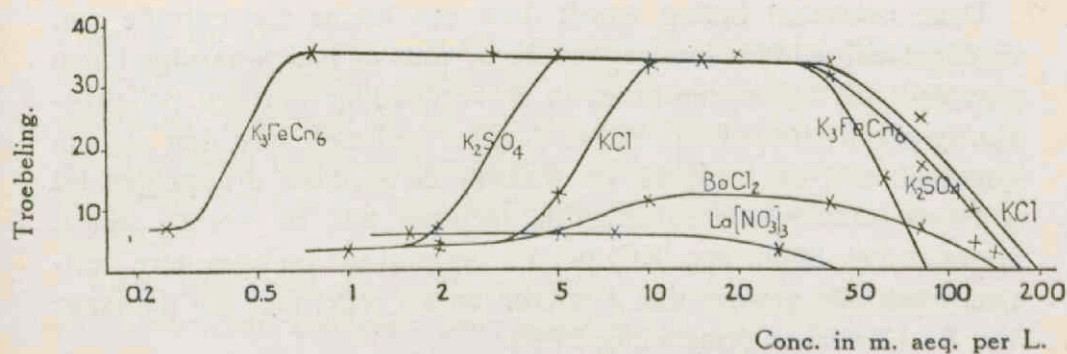


Fig. 10. Invloed van electrolyten op de troebeling van het positief geladen mengsel 4.5—0.5.

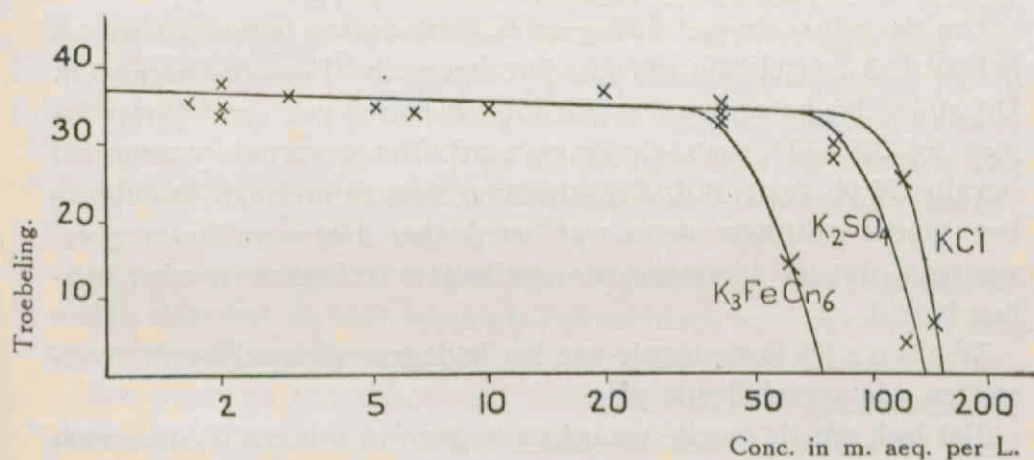


Fig. 11. Invloed van electrolyten op het mengsel met de maximale troebeling.

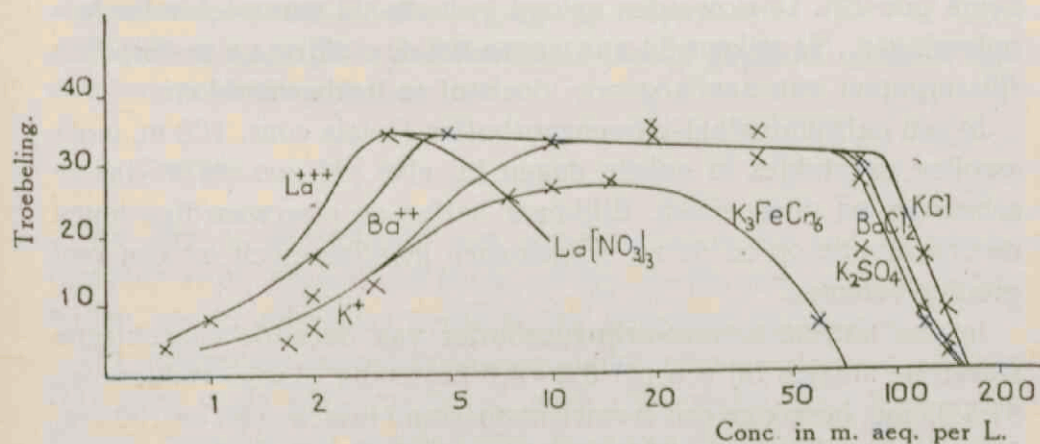


Fig. 12. Invloed van electrolyten op de troebeling van het negatief geladen mengsel 2.0—3.0.

Deze overmaat lading wordt door een kleine concentratie aan tegengesteld geladen ion weggenomen; voor de meerwaardige ionen geschiedt dit bij concentraties in de verhouding van den Schultze-Hardy-regel. Het sol van kleine deeltjes gedraagt zich dan als een lyophoob sol, dat uitvlokt, en waarbij de kleinere druppeltjes tot grootere samenvloeien. Hetzelfde mengsel van de vorige alinea, voorzien van 80 m. aeq. KCl per L., bestond uit veel grootere deeltjes, bijna alle grooter dan 4 micron en als regel met een doorsnee van 8 - 12 micron (troebeling 27,9).

#### 8. Het macrocoacervaat.

Om de gelijkenis met collageen te bestudeeren bereidden we uit het sol L 3 en gelatine een grootere hoeveelheid macro-coacervaat. Dit stonde bij kamertemperatuur tot een stevig gel, dat bij verwarmen tot 32—33° weer vloeibaar werd. Het gevormde coacervaat bevatte 34 % vaste stof. Een structuur was er niet aan te ontdekken. Onder gekruiste nicols was het donker. Het is er dus nog ver vandaan, dat we hiermede een synthetisch collageen zouden hebben bereid.

Wilson<sup>38)</sup> bestudeerde van het collageen de zwelling in vloeistoffen van verschillende pH.

Het leek ons de moeite waard na te gaan of een macrocoacervaat zich daarbij op dezelfde wijze gedraagt.

Hiervoor sloegen we een aantal pastilles van gelijken vorm en gelijk gewicht. Deze werden gelegd in herhaald ververschte bufferoplossingen. Na telkens 24 uur wogen we de stukjes, na ze tusschen filtreerpapier van aanhangende vloeistof te hebben ontdaan.

In een natriumfosfaat-citroenzuurbuffer (totale conc. 100 m. mol) zwollen de stukjes in enkele dagen bij elke pH zoo sterk, dat ze scheurden en uiteenvielen. Blijkbaar heffen de meerwaardige ionen de coacervatie op en de nu vrijgekomen gelatine zwelt tot een veel grooter volumen.

In een natriumacetaat-azijnzuurbuffer van dezelfde concentratie waren de stukjes bij een pH 3,2 - 4,6 bestendig, d.w.z. stukjes van 87 à 93 mg. bereikten een evenwichtstoestand tusschen 80 en 100 mg. In de mengsels boven pH 4,6 vielen ze eveneens uiteen.

Het leek ons mogelijk, het vlakke verloop van de pH zwellings-



kromme bij Wilson uit dit oogpunt te verklaren. De kromme vertoont twee minima gescheiden door een weinig hoger gelegen maximum. Ziet men nu af van dit maximum, dat misschien zijn oorzaak vindt in een systematische fout, dan is deze kromme gelijkvormig aan een uit onze metingen met acetaatbuffer te tekenen kromme.

Later deed zich een verklaring voor, die zich bij onze eigen experimenten aan collageen beter aansluit (zie pag. 70).

#### 9. Coacervatie met albumine.

Het is ons niet gelukt om met albumine een coacervaat te krijgen. Er ontstaat wel een neerslag, als men de solen mengt, maar het is vlokkig en onder het microscoop ziet men geen druppels. Het is niet oplosbaar in zoutoplossing, hoewel dezelfde zoutconcentratie het mengsel helder doet blijven, als men het voor de menging aan de afzonderlijke componenten toevoegt. Alleen in verdunde natronloog lost het neerslag snel op.

Het mengsel leent zich niet voor bestudeering met den viscosimeter, daar het de buis verstopt. Fotometrisch waarnemen gaf ook geen reproduceerbare waarden.

We trachtten een coacervaat zeer geleidelijk te laten ontstaan, door aan de beide solen zooveel zout toe te voegen, dat bij menging geen neerslag ontstond. Voegden we nu druppelsgewijs water toe, tot juist een neerslag zichtbaar was, dan was dit al dadelijk niet meer oplosbaar bij toevoeging van meer zout.

Blijkbaar gaat de coacervatie hier steeds gepaard met een denaturatie van de albumine.

#### 10. Conclusie.

We zijn er in geslaagd een complexcoacervatie aan te toonen tusschen twee stoffen, die beide uit het dierlijk lichaam zijn te bereiden, en die misschien beide in het collageen voorkomen.

Dit coacervaat is niet bestendig onder physiologische condities. Daarvoor is de pH, waarboven geen coacervatie meer kan voorkomen, namelijk het iso-electrisch punt van de gelatine (4,7), veel te laag. We moeten daarom zoeken, of uit het collageen een stof te bereiden is, die bij een veel hogere pH nog positief geladen is.

Wat betreft de negatieve component, ook deze behoeft niet beslist dezelfde stof te zijn, als die we uit het kraakbeen hebben bereid. Wel is het waarschijnlijk, dat in het kollageen een stof uit de groep van de mucinen voorkomt. Het leek ons daarom van belang dit onderzoek uit te breiden op andere mucinen van het dierlijk lichaam. Daarvoor kozen we het mucine, dat voorkomt in het glasachtig oogvocht.

---

## II. Over het mucoitine.

### 1. Inleiding.

Om bij de mucinen in het algemeen te onderzoeken, of zij stoffen bevatten, die met eiwitten complexcoacervatie kunnen geven, was het belangrijk als tweede vertegenwoordiger van deze groep een stof te nemen, die in eigenschappen sterk van het chondromucine afwijkt.

We lieten ons daarbij leiden door de resultaten van *Levene*<sup>26)</sup>. Deze klassificeerde de mucinen naar gelang van de suikers, die ze bij afbraak leverden. Uit het chondroitinezwavelzuur ontstond daarbij chondrosamine; uit de stof, die hij op dezelfde wijze uit een aantal andere mucinen afzonderde, bereidde hij glucosamine. Op grond van dit verschil maakte hij onderscheid tusschen chondroitinezwavelzuur uit kraakbeen en uit sommige andere bindweefsels, en mucoitinezwavelzuur uit een groot aantal slijmstoffen.

Van de mucoitinezwavelzuur bevattende stoffen uit het onderzoek van *Levene* was het eenige mucine, dat voor ons in voldoende hoeveelheid te verkrijgen was, dat uit het glasachtig vocht van runderoogen.

### 2. Literatuur over het mucine uit het glasachtig vocht van oogen.

In de oudere literatuur komt telkens opnieuw de vraag naar voren, of er in het glasachtig vocht wel een mucine voorkomt. Men twijfelt er aan, omdat er als regel geen duidelijk neerslag ontstaat, als men de vloeistof aanzuurt, die langzaam uit het geleachtige lichaam uitlekt. De oorzaak van deze moeilijkheid ligt vooral in het buitengewoon geringe totaal aan vaste stof in deze vloeistof; het is niet gemakkelijk bij het toch al zoo geringe gehalte aan eiwitstoffen nog verschillende bestanddeelen te onderscheiden.

Evenals bij het chondromucine is het *C. Th. Mörrner*<sup>32)</sup> die het bestaande feitenmateriaal ordent en aanvult. Hij brengt het alleen niet zoo ver als bij het kraakbeen; hij bewijst dat er een glycoproteid aanwezig is en gaat na onder welke omstandigheden er een neerslag met azijnzuur ontstaat, maar hij komt niet op het denkbeeld eveneens de eiwitten te verwijderen.

Uit het onderzoek van *Levene*<sup>26)</sup> moet nog worden vermeld,



dat zijn mucoitinezwavelzuur een veel geringer zwavelgehalte heeft dan het chondroitinezwavelzuur. Hij veronderstelt, dat het tijdens de bereiding gedeeltelijk is ontleed.

### 3. Bereiding van het mucoitine.

Ik sneed 425 runderoogen open en perste het glasachtig lichaam er uit, zooveel mogelijk zonder aanhangende deelen zooals lens en netvlies. Aan deze gelei werd  $\frac{1}{4}$  van zijn volumen 5 % kaliloog toegevoegd. Na een nacht inwerken bij kamertemperatuur was vrijwel alles omgezet tot een door verontreinigingen bruینگekleurde stroop, die het typische kenmerk vertoonde van een mucine: Met een staafje waren er lange draden uit te trekken, die slechts langzaam tot druppels samentrokken.

De alkalische vloeistof werd geheel volgens dezelfde methode bewerkt als bij het kraakbeen; ze werd aangezuurd, ingedampt met bariumcarbonaat en uitgegoten in azijnzuur. Ik loste het neerslag, dat zich vormde, op in water en sloeg deze oplossing neer met basisch-loodacetaatoplossing. Het lood werd ten slotte verwijderd door electrolyse en electrodialyse.

Na deze bewerking verkreeg ik een volkomen helder sol met een pH van omstreeks 3. Het werd in de ijskist bewaard.

Het sol bevatte 0,21 % vaste stof. Het aschgehalte was minder dan  $\frac{1}{2}$  %; het stikstofgehalte was 2,84 % (beide berekend op de vaste stof).

Op de wijze, zooals bij het chondroitinezwavelzuur is beschreven (pag. 17), was er in het sol geen gebonden zwavelzuur aan te toonen. 30 cm<sup>3</sup> sol gaven na herhaalde behandeling met salpeterzuur geen neerslag met bariumchloride.

Daar er in dit preparaat geen gebonden zwavelzuur aanwezig is, heeft het ook geen zin om den naam „mucoitinezwavelzuur” te gebruiken en kan met het woord „mucoitine” worden volstaan. We bedoelen met dit woord niet, zooals L e v e n e, dat het product zijn zwavel door ontleding heeft verloren. We hebben daarvoor geen enkele reden. Veeleer is het waarschijnlijk, dat ook in de vloeistof in het oog het mucine reeds geheel of grootendeels uit een zwavelvrij mucoitine is opgebouwd. Als argument hiervoor geldt dat, zooals uit het volgende onderzoek zal blijken, het product zijn eigen-

schap, eiwitten te coacerveeren, niet verloren heeft. Een ontleed „mucoitinezwavelzuur” zou deze eigenschap evenmin bezitten als een ontleed chondroitinezwavelzuur.

#### 4. Meting van de viscositeit van het mucoitinesol bij verschillende pH's.

Het sol vertoont tusschen pH 2,4 en 4,5 de viscositeits-pH kromme van een steeds negatief geladen lyophiel kolloid (tabel 9 en fig 13).

TABEL 9. Viscositeit van mengsels van 10 c.c. mucoitinesol en 5 c.c. zuur of alkali bij 23,75°.

| pH        | $t_s/t_o$ |
|-----------|-----------|
| 2.42      | 1.275     |
| 2.59      | 1.310     |
| 3.06      | 1.339     |
| 3.40      | 1.344     |
| 3.72      | 1.351     |
| 3.89      | 1.332     |
| 4.06      | 1.310     |
| $\pm 4.2$ | 1.295     |
| 4.39      | 1.256     |

Onder de omstandigheden van deze metingen voldoet het aan de wet van Poiseuille: Bij uitvloeitijden voor water in den „drie-bollen-viscosimeter” <sup>29)</sup> van 310,4; 408,5; 578,9 sec. was de verhouding  $t_s/t_o$  resp. 1,341; 1,339; 1,339.

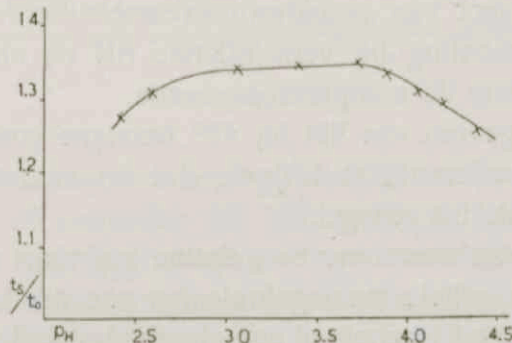


Fig. 13. Viscositeit van het mucoitinezwavelzuursol bij verschillende pH's.

### 5. Coacervatie met gelatine.

Bij menging van mucoitine- en gelatinesolen bij een pH beneden 4,7 ontstaat een troebeling, die vooral boven 40° zeer duidelijk uit microscopisch kleine druppeltjes bestaat. Deze druppeltjes lossen op in alkali en boven 40° in een  $\frac{1}{2}$  n. zoutoplossing.

Wegens de geringe hoeveelheid preparaat moesten we ons beperken tot enkele metingen met den fotometer; we maten de troebeling van mengsels bij verschillende pH bij 42,5° (tabel 10) en

TABEL 10. Mengsels van gelatine en mucoitine bij verschillende pH. (temp. 42,5°).

| Concentraties in gewichts %. |           | pH 3.1 | pH 3.8 | pH 4.4 |
|------------------------------|-----------|--------|--------|--------|
| Gelatine                     | Mucoitine |        |        |        |
| 0.123                        | 0.0025    | 0      | 0      | 2.8    |
| 0.120                        | 0.005     | 0      | 0      | 6.1    |
| 0.113                        | 0.012     | 0      | 5.8    | 2.8    |
| 0.100                        | 0.025     | 2.5    | 26.7   | 0      |
| 0.075                        | 0.050     | 26.5   | 3.5    | 0      |
| 0.050                        | 0.075     | 3.9    | 0      | 0      |

den invloed van enkele electrolyten op de troebeling bij pH 3,1, de eigen pH van het mucoitinesol (tabel 11).

Het mengsel van mucoitine- en gelatinesolen gedraagt zich geheel zooals een mengsel van chondroitinezwavelzuur en gelatine: Het vertoont een troebeling bij verschillende pH en electrolytgehalten die typisch is voor de complexcoacervatie.

Door centrifugeeren van het bij 42° ontstane coacervaat gelukte het een macrocoacervaat te krijgen, dat bij kamertemperatuur in eenige uren stolde tot een gel.

Het mengsel van mucoitine en gelatine gedraagt zich typisch als een mucine. Een enkele maal gelukte het ons om bij afkoelen van een bij 40° gemengd troebel sol een vloeistof te krijgen, die „fadenziehend” was.



TABEL 11. Invloed van electrolyt op de troebeling van mengsels van gelatine en mucoïtine bij pH 3,1 (temp. 42,5°).

## a. KCl.

| Concentraties in gewichts % |           | Conc. KCl in m. aeq. per L. |      |      |      |      |
|-----------------------------|-----------|-----------------------------|------|------|------|------|
| Gelatine                    | Mucoïtine | 0                           | 1    | 5    | 10   | 25   |
| 0.100                       | 0.025     | 2.5                         | 6.8  | 19.0 | 18.6 | 10.2 |
| 0.075                       | 0.050     | 26.5                        | —    | 24.9 | 22.1 | 15.0 |
| 0.050                       | 0.075     | 3.9                         | 12.9 | 16.4 | 16.1 | 3.9  |

b. BaCl<sub>2</sub>.

| Concentraties in gewichts % |           | Conc. BaCl <sub>2</sub> in m. aeq. per L. |      |      |      |    |
|-----------------------------|-----------|-------------------------------------------|------|------|------|----|
| Gelatine                    | Mucoïtine | 0                                         | 1    | 5    | 10   | 25 |
| 0.100                       | 0.025     | 2.5                                       | 7.1  | 18.4 | 12.5 | 0  |
| 0.075                       | 0.050     | 26.5                                      | —    | 23.1 | 20.2 | 0  |
| 0.050                       | 0.075     | 3.9                                       | 20.3 | 13.0 | 14.0 | 0  |

c. K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

| Concentraties in gewichts % |           | Conc. K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in m. aeq. per L. |      |      |      |    |
|-----------------------------|-----------|--------------------------------------------------------|------|------|------|----|
| Gelatine                    | Mucoïtine | 0                                                      | 1    | 5    | 10   | 25 |
| 0.100                       | 0.025     | 2.5                                                    | 16.5 | 20.1 | 19.5 | 0  |
| 0.075                       | 0.050     | 26.5                                                   | —    | 23.2 | 21.4 | 0  |
| 0.050                       | 0.075     | 3.9                                                    | 13.6 | 15.1 | 12.7 | 0  |

## 6. Conclusie.

Uit een tweetal mucinen hebben we afgezonderd de stoffen, die bij afbraak van de proteïden van deze groep de koolhydraatreacties geven. Het zijn twee producten met zeer verschillende eigenschappen. Het chondroïtinezwavelzuur heeft een gehalte van 6 % aan gemakkelijk afsplitsbaar zwavelzuur. In het mucoïtine is geen als zwavelzuur gebonden zwavel aan te toonen. Volgens Levene<sup>26)</sup>

zijn er wel is waar uit beide stoffen aminohexosen te verkrijgen, maar verschillende, n.l. chondrosamine en glucosamine.

Uit het werk van *Levene* zou men kunnen opmaken, dat de eigenlijke reden, waarom chondromucine en het mucine uit oogen in dezelfde groep zijn gerangschikt, ligt in de overeenkomst in chemische eigenschappen van deze hexosaminen. Ons onderzoek bewijst daarentegen, dat deze overeenkomst een toevallige is, en dat ze tot de mucinen worden gerekend om de eigenschap, die daarvoor in de physiologische chemie als eenig criterium geldt, n.l. — volgens de genoemde definitie van *Hammarsten*<sup>13)</sup> — dat hun neutrale of alkalische oplossing met azijnzuur een neerslag geeft.

Ons onderzoek heeft bewezen, dat een tweetal negatieve kolloiden, die men uit de mucinen kan isoleeren, in staat zijn met eiwitten complexcoacervatie te geven. Dit is een krachtig argument voor de hypothese, dat men door het toevoegen van azijnzuur aan een oplossing van een mucine niets anders doet, dan de pH van een mengsel van eiwitten met een negatieve component zoo te verschuiven, dat men komt in een gebied, waar complexcoacervatie optreedt. De mucine is dus niets anders dan een dergelijk mengsel van eiwitten en een „koolhydraat”, dat in staat is complexcoacervatie te geven.

Het is merkwaardig, dat de opvatting van mucine als een *mengsel* van twee stoffen ook de eerste hypothese is geweest, die over de mucinen is opgesteld, en wel door *Landwehr*<sup>33)</sup> in het jaar 1881.

### III. De „Pigskin“-gelatine.

#### 1. Inleiding.

Aan het eind van het experimenteel gedeelte over het chondroitine-zwavelzuur zochten we naar een eiwit met een isoëlectrisch punt hoger dan pH 7, dat een van de bestanddeelen van het kollageen zou kunnen zijn. Op het eerste gezicht leek het, dat dit te vinden is in de „pigskin“-gelatine. Men vermeldt hiervan immers als isoëlectrisch punt pH 8,0. Als het werkelijk zou blijken, dat dit eiwit bij neutrale reactie positief geladen is, dan zou dat een zeer groote steun zijn voor onze hypothese over het kollageen.

Daarom bestudeerden we aan deze gelatine eenige eigenschappen, die in het isoëlectrisch punt een uitgesproken maximum of minimum hebben, en onze keus viel daarbij op de viscositeit en op de hoeveelheid alcohol, die juist een troebeling teweeg brengt. Vervolgens bestudeerden we met behulp van den fotometer de omstandigheden, waaronder „pigskin“-gelatine als positieve component aan complex-coacervatie kan deelnemen.

#### 2. Viscositeit en alcoholgetallen van de „pigskin“-gelatine.

We ontaschten deze gelatine, een preparaat merk „Grayslake“, volgens de methode van L o e b <sup>31)</sup>, door wasschen met 0.003 n. zoutzuur. Daarbij kregen we een preparaat, waarvan een  $\frac{1}{4}$  % sol een pH van 3,8 had, en dat dus zeker nog een groote hoeveelheid zuur bevatte. We moesten onze metingen tot boven pH 8,0 uitsprekken en zouden dus al dit zuur met loog moeten neutraliseeren, d.w.z. dat we het sol onnoodig op een groote zoutconcentratie zouden brengen.

De invloed van een dergelijke toevoeging van zouten is onderzocht door H o l l e m a n <sup>34)</sup>; hij vindt, dat elke toevoeging van electrolyten de viscositeits-pH-kromme nivelleert. Op deze manier zouden we het effect, dat we wilden meten, voor een kleiner of grooter gedeelte kwijtraken als gevolg van het toevoegen van alkali.

Om dit te vermijden behandelden we de „pigskin“-gelatine met verdunde natronloog. Met een drietal baden (10, 10 en 20 m. mol) brachten we de pH tot boven 8,0. De overmaat alkali werd verwijderd door het sterk gezwollen gelatinepoeder met koud gedestil-



leerd water te overgieten, een half uur te laten staan en dan de bovenstaande vloeistof af te schenken. Dit geschiedde twaalf maal achtereen, de pH daalde daarbij tot 6,2. Van dit product konden we verwachten, dat het electrolytgehalte tot een zeer gering bedrag was teruggebracht. (Het aschgehalte was beneden 0,2 %.)

De bereiding van de solen voor de viscosimetrische bepalingen en de metingen zelf geschieden geheel op dezelfde wijze als bij de gewone gelatine. De uitkomsten van de metingen staan vermeld in tabel 12 en fig. 14. De getallen werden gecorrigeerd voor irreversibele reactie; deze correctie bedroeg niet meer dan 2 eenheden in de laatste decimaal.

TABEL 12. Viscositeit van een  $\frac{1}{4}$  % sol van „pigskin”-gelatine bij verschillende pH (temperatuur 42,36°).

| pH   | $t_s/t_0$ |
|------|-----------|
| 3.19 | 1.814     |
| 3.64 | 1.744     |
| 5.02 | 1.242     |
| 5.12 | 1.228     |
| 5.9  | 1.128     |
| 6.28 | 1.107     |
| 6.6  | 1.108     |
| 7.63 | 1.105     |
| 8.01 | 1.102     |
| 8.57 | 1.116     |
| 9.01 | 1.133     |

Onze metingen van de viscositeit van de „pigskin”-gelatine stemmen in hoofdzaak overeen met die van B r i e f e r<sup>12</sup>). De viscositeits-pH lijn van fig. 14 bezit een zeer vlak traject van pH 6,2 tot 8,0, met een zwak minimum bij 8,0. Uit dit gedrag van het verloop van de viscositeit bij verandering van de pH is af te leiden, dat de lading van de gelatine in dit geheele gebied gering is, doch waarschijnlijk positief en dat het isoëlectrisch punt, hoewel het niet zeer duidelijk waarneembaar is, ligt in de nabijheid van pH 8.

Voor een dergelijk vlak gedeelte in een overigens sterk stijgende en dalende viscositeits-pH kromme kunnen we een reden vermoeden

den: We kunnen te maken hebben met een mengsel van twee stoffen, waarin coacervatie optreedt.

Indien dit bij de „pigskin”-gelatine het geval was, zouden we bij een bepaalde pH de juiste uitbalanceering van de ladingen heb-

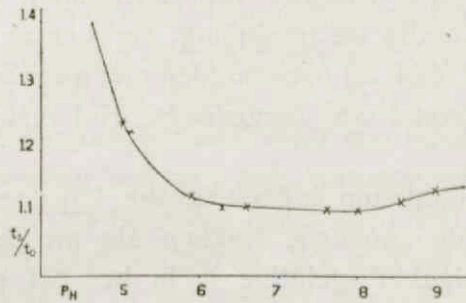


Fig. 14. Invloed van de pH op de viscositeit van „pigskin”-gelatine.

ben en dus een coacervatie moeten zien. Hiervan is echter geen sprake; de solen zijn helder in het geheele pH-gebied van 6 tot 8.

Het is niet onmogelijk, dat we deze coacervatie niet zien, omdat de tegenstelling tusschen de ladingen niet groot genoeg is om de

TABEL 13. Alkoholgetallen voor een  $\frac{1}{2}$  % sol van „pigskin”-gelatine bij 42,5°.

| pH   | cm <sup>3</sup><br>alkohol |
|------|----------------------------|
| 4.45 | 7.65                       |
| 4.84 | 7.25                       |
| 5.54 | 7.0                        |
| 6.52 | 6.75                       |
| 6.9  | 6.75                       |
| 7.42 | 6.4                        |
| 7.98 | 6.6                        |

hydratatie te overwinnen. Om een coacervatie te krijgen zouden we dan slechts de hydratatie moeten verminderen b.v. door toevoeging van alcohol. M.a.w. we verwachten, dat de hoeveelheid alcohol, noodig om in het gelatinesol juist een troebeling teweeg te brengen,

ergens midden in het gebied tusschen pH 6 en 8 een scherp minimum zal vertoonen.

Om dit na te gaan brachten we 5 cm<sup>3</sup> 1½ % sol in een thermostaat op 42,5° en druppelden daarbij alcohol, die eveneens van te voren op dezelfde temperatuur was gebracht. Daarvoor gebruikten we een verdeelde pipet voorzien van een mantel, waar door warm water stroomde. Zoodra de troebeling, veroorzaakt door bijvoegen van een druppel alcohol, bij omschudden niet meer verdween, noteerden we hoeveel alcohol was toegevoegd. Het resultaat is opgeteekend in tabel 13.

Van een scherp minimum is geen sprake. Uit deze alcoholgetallen kunnen we dezelfde conclusie trekken als uit de viscositeit: De lading van de „pigskin”-gelatine is in het pH gebied van 6 - 8 gering, en het iso-electrisch punt ligt omstreeks pH 8.

### 3. De complexcoacervatie van solen van „pigskin”-gelatine met die van chondroitinezwavelzuur en arabische gom.

De coacervatie van „pigskin”-gelatine met chondroitinezwavelzuur verloopt in het pH-gebied 2,5 - 4,5 precies zooals die van gewone gelatine. Op dezelfde manier als in tabel 7 is in tabel 14 ver-

TABEL 14. Troebeling van mengsels van solen van „pigskin”-gelatine en chondroitinezwavelzuur (sol 26).

| Mengsels in gewichts % |                        | pH 2.5 | pH 4.2 |
|------------------------|------------------------|--------|--------|
| Gelatine               | Chondroitinezwavelzuur |        |        |
| 0.245                  | 0.005                  | 1.4    | 2.4    |
| 0.225                  | 0.025                  | 8.8    | 23.9   |
| 0.20                   | 0.05                   | 34.2   | 4.9    |
| 0.15                   | 0.10                   | 33.6   | 2.1    |
| 0.10                   | 0.15                   | 25.0   | 2.2    |
| 0.05                   | 0.20                   | 11.6   | 0.4    |

meld de troebeling van verschillende mengsels bij een tweetal waarden van de pH (temperatuur 42,5°). De maxima liggen bij dezelfde verhouding van de componenten; de coacervatie wordt bij pH 2,5



door dezelfde zoutconcentraties opgeheven, namelijk 160 m. aeq. KCl,  $K_2SO_4$  en  $BaCl_2$  per L.

Boven pH 5,6 vindt in het geheel geen coacervatie meer plaats. Dit zou natuurlijk, behalve een vermindering van de lading van de gelatine, ook gelegen kunnen zijn in een specifieke eigenschap van het chondroïtinezwavelzuur. Om deze mogelijkheid uit te sluiten, werden de experimenten herhaald met arabische gom. Daarbij hadden we dezelfde ervaring: Boven pH 5,6 à 5,8 is er bij geen enkele verhouding van de componenten meer een troebeling te ontdekken.

Het wordt hierdoor wel niet zeer waarschijnlijk gemaakt, dat de „pigskin”-gelatine als positieve component zou kunnen optreden in het complexcoacervaat kollageen. We moeten er immers rekening mede houden, dat er in het dierlijk lichaam ook nog een groote concentratie aan zouten is, zoodat, zelfs als er in de mengsels van „pigskin”-gelatine en negatieve component bij pH 6 à 7 een spoor van coacervatie zou zijn aan te toonen, deze toch geheel zou verdwijnen na toevoegen van b.v. 150 m. aeq. KCl per L.

De „pigskin”-gelatine heeft ons dus voor het doel van ons onderzoek alleen negatief resultaat opgeleverd.

#### IV. De isoelectrische troebeling van gelatine.

##### 1. Zuivering van de gelatine.

Nadat we door de meting aan mengsels van chondroitinezwavelzuur en gelatine ervaring gekregen hadden over de troebeling van coacerveerende mengsels, pasten we deze ervaring toe op de isoelectrische troebeling van gelatine.

Daarbij kwam het er op aan, een zeer zuiver preparaat te bereiden, omdat kleine hoeveelheden electrolyt de troebeling sterk verminderen. Het wasschen met zoutzuur volgens de methode van L o e b <sup>31)</sup> was hier niet voldoende, daar er zuur achterblijft, waardoor de troebeling veel van zijn sterkte verliest. Uit voorloopige proefnemingen bleek, dat het zeer wenschelijk was de troebeling veel verder op te voeren door een betere zuivering.

We onderwierpen daarvoor de gelatine aan een verdere reiniging volgens een voorschrift van K n a g g s <sup>35)</sup>. In de middelste kamer van den electrodialysator brachten we een gel met een concentratie van ongeveer 10 %. Dit gel werd onderworpen aan een electrodialyse, zonder membranen, tegen stroomend gedestilleerd water. Nadat geconstateerd was, dat door deze bewerking het geleidingsvermogen niet meer daalde, zetten we de dialyse nog twee dagen voort met een stroom van dubbel gedestilleerd water. Aan het gezuiverde gel werd een weinig thymol toegevoegd, om sterken groei van micro-organismen te voorkomen. De droging geschiedde in een warme luchtstroom.

K n a g g s <sup>35)</sup> verkreeg zoo een gelatine met de bijzondere eigenschap, dat gelen van 2 % of minder niet alleen zeer troebel waren, maar bovendien na 24 à 48 uur uitzakten tot een volumineus precipitaat.

Het gelukte ons niet, de stabiliteit van het gel zoo ver te beïnvloeden. Hoewel het geleidingsvermogen van het gel ongeveer dat van gedestilleerd water was, zoodat er geen electrolyt meer aanwezig kon zijn, waren gelen van 1 % bij kamertemperatuur zeer lang bestendig. Wel trad na eenige dagen een sterke synerese op, maar van uitvlokken was geen sprake. Ook  $\frac{1}{2}$  % en  $\frac{1}{4}$  % gelen vlokten niet uit.



## 2. Ultramicroscopische waarnemingen.

We begonnen het onderzoek van deze gezuiverde gelatine ermede, dat we eenige malen een isoëlectrisch sol lieten afkoelen en het dan onder microscoop en ultramicroscoop bekeken.

Behalve de onvermijdelijke kleine verontreinigingen zijn er onder het microscoop geen deeltjes te zien. Van een eigenlijke coacervatie is dus geen sprake.

Onder het ultramicroscoop neemt men wel iets waar van de troebeling. Natuurlijk is er een sterk Tyndall-licht. Bovendien kregen we den indruk, dat er in het beeld een zekere structuur aanwezig is. Herhaaldelijk zagen we, na scherpe instelling op een van de weinige goed zichtbare deeltjes, een aantal kleine lichtende puntjes, die flikkerden en uitdoofden als we de lichtkegel een weinig verschoven. Toch was er geen sprake van een karakteristiek beeld; het was bijvoorbeeld nooit zoo duidelijk, dat men er zonder fantasie een teekening van zou kunnen maken.

Ditzelfde experiment was reeds eerder gedaan door *Bachmann*<sup>36)</sup>. Hij liet een gelatinesol afkoelen onder de microscoop. Daarbij vormden zich geleidelijk vlokjes, die zich bij voortgaande gelatineering tot grootere groepen aaneensloten. Het beeld, dat zoo ontstond, was duidelijk genoeg om het door een niet deskundige te doen nateekenen. Deze teekening geeft enkele stukken gel eenigszins schematisch weer in den vorm van een netwerk.

Hij deelt mede dat dit netwerk niet bij alle gelatinesoorten duidelijk zichtbaar is; hij heeft voor het onderzoek een geschikte soort uitgezocht. Jammer genoeg vermeldt hij niets over de pH van zijn sol, hetgeen te begrijpen is, daar in 1912 nog niet voldoende bekend was, hoe sterk de eigenschappen van een eiwit veranderen met de pH. Tot onze spijt is de pH ook niet meer na te gaan, daar Dr. W. *Bachmann* op ons verzoek om inlichtingen mededeelde, dat hij het materiaal niet meer bezat. Ongetwijfeld hangt deze netvormige structuur samen met de isoëlectrische troebeling van de gelatine.

*K. Krishnamurti*<sup>42)</sup> zag in iso-electrische gelatine bolvormige deeltjes.

We herhaalden het experiment van *Bachmann* met verschillende gelatinesoorten in verschillende concentraties. Als materiaal gebruikten we behalve de fotografische gelatine, die gezuiverd was



zooals op pag. 50 is beschreven, ook nog een preparaat, gemerkt „Winterthur Hart”, dat aschvrij gemaakt was door wasschen met 0,001 n. zoutzuur. Een sol van dit preparaat had een pH van 4,7; bij afkoeling ontstond daaruit een zeer troebel gel.

De concentratie van het gel varieerden we van  $\frac{1}{4}$  tot 2 %. We hebben deze praeparaten door verschillende andere personen laten bekijken; geen van hen zag een netvormige structuur. In al deze preparaten zagen we slechts een zeer sterk, weinig gedifferentieerd Tyndall-licht.

Aan een niet isoëlectrisch gel is geen ultramicroscopisch beeld waar te nemen. Een gel met pH 3,5 of 4,0 bijvoorbeeld geeft slechts een flauwe Tyndall-kegel, te zwak om er nog een structuur in te onderscheiden.

### 3. Invloed van pH, concentratie en electrolytgehalte op de isoëlectrische troebeling.

#### a. Uitvoering van de metingen.

Evenals alle eigenschappen van gelen is de isoëlectrische troebeling sterk afhankelijk van kleine veranderingen in de bereidingswijze; om reproduceerbare waarden te verkrijgen bleek het noodig alle experimenten nauwkeurig volgens hetzelfde voorschrift uit te voeren:

We lieten de gelatine minstens een uur zwellen in water, en losten ze op door 30 min. te verwarmen op 60°. Daarna brachten we de kolf in een thermostaat op 40° en mengden het sol bij die temperatuur met electrolytoplossingen en eventueel met zuur of alkali. We plaatsten deze mengsels in de cuvetten van den fotometer van Jobin in een thermostaat op 20° (binnen 0,05° constant).

Na de bereiding nam de troebeling eerst sterk toe, meestal was na 4 uur de grootste vermeerdering geëindigd, maar zelfs na 24 uur was soms nog geen evenwichtstoestand bereikt. Als meest geschikte tijd voor de beoordeeling werd gekozen 18 uur na plaatsing op 20°. In de 20 à 30 minuten, noodig voor het meten van een serie gelen, was de verandering, die dan optrad, te verwaarlozen.

Na 18 uur werden de cuvetten geplaatst in den fotometer van Jobin en werd de troebeling gemeten, zooals op pag. 28 is aangegeven.

Naar gelang van de sterkte van de troebeling gebruikten we twee soorten cuvetten. De lichtbundel had hierin 1 c.m. resp. 5 c.m. te doorloopen. Deze cuvetten waren gemaakt van spiegelglas, dat door „Dekhotinsky-cement” werd bijeengehouden. In de richting waarin de lichtbundel de cuvetten moest doorloopen, werden ze zorgvuldig op de juiste lengte gebracht door het inpassen van een houten vorm.

Het schoonmaken van deze cuvetten leverde eenige moeilijkheden op. Er was geen sprake van om ze te ontvetten met zuren en ze uit te stoomen (zooals we deden met al het andere glaswerk), daar dan het kitmiddel losliet. Het samenplakken van deze glaasjes was een tijdroovende bezigheid en het lukte niet altijd even goed, omdat het glas door de herhaalde verwarming spoedig barstte. Bij het schoonmaken vermeden we daarom zoo lang mogelijk om de kit los te maken; we spoelden de cuvetten enkele malen om met water van  $45^{\circ}$  à  $50^{\circ}$ , en lieten ze dan twee uur staan met herhaald ververscht gedestilleerd water.

Men loopt bij een dergelijke oppervlakkige omspoeling eenig risico, dat er resten van het gel en van de daarin aanwezige electrolyt in de naden achterblijven. Een invloed daarvan op de volgende meting werd zooveel mogelijk verminderd door een systematische opeenvolging van de experimenten. We gebruikten de cuvetten bij alle series in dezelfde volgorde, zoodat in elke cuvet steeds een ongeveer even troebel gel aanwezig was. We begonnen met de éénwaardige ionen en eindigden met de driewaardige. Daardoor kon een grondiger reiniging worden beperkt tot enkele gevallen, waarin we een geheel nieuwe reeks begonnen.

#### b. Invloed van de gelatine-concentratie op de isoëlectrische troebeling.

De troebeling van de gelen is niet evenredig met de concentratie. Beneden  $\frac{1}{4}$  % is er geen merkbare gelatineering en daarmee ook geen troebeling. Dan volgt er een gebied waar de fotometeraflezing (vermeld in tabel 15) een groote waarde aanneemt. Het maximum ligt bij 1 %; dan nemen de waarden weer af. De concentraties van 5 % en hoger zijn helder; de kleine waarden van tabel 15 voor de concentraties 5 en 10 % zijn geheel veroorzaakt door verontreini-



TABEL 15. Invloed van de concentratie van de gelatine op de troebeling.

| Conc.           | Troebeling<br>1 c.m. |
|-----------------|----------------------|
| $\frac{1}{4}\%$ | 4.4                  |
| $\frac{1}{2}\%$ | 18.0                 |
| 1 %             | 19.7                 |
| 2 %             | 10.2                 |
| 5 %             | 5.0                  |
| 10 %            | 6.9                  |

gingen, het sterke Tyndall-licht is daar geheel verdwenen.

### c. Invloed van electrolyten op de isoëlectrische troebeling.

We bestudeerden den invloed van electrolyten op de troebeling aan 1 % gelatinegelen bij drie verschillende waarden van de pH. Deze waarden kozen we zoo, dat we, evenals bij de mengsels van chondroitinezwavelzuur en gelatine, bestudeerden den invloed op een positief, een neutraal en een negatief geladen gel.

De eerste serie metingen, vermeld in tabel 16, werd uitgevoerd bij pH 4,45. Daarvoor moest bij de bereiding zoutzuur worden toegevoegd tot een concentratie van 0,25 m. aeq. per L.

Voor de tweede serie metingen (tabel 17) gebruikten we gelen bereid uit het gelatinepreparaat zonder zuur of alkali. De pH van deze gelen was 4,7.

Bij de derde serie (tabel 18) brachten we de pH op 4,85 door toevoegen van 0,5 m. aeq. per L. natronloog.

De getallen uit de tabellen 16, 17 en 18 zijn uitgezet in fig. 15, 16, resp. 17.

De invloed van de pH op de isoëlectrische troebeling is zeer groot; het gel zonder toevoeging van electrolyt is bij pH 4,7 sterk troebel, bij pH 4,45 en 4,85 bijna geheel helder. Een scherpe controle van de pH was daarom noodig, ze werd uitgevoerd colorimetrisch (met broomkresolgroen) en met de waterstofelectrode voor zoover het geleidingsvermogen dat toeliet.



TABEL 16. Invloed van electrolyten op de troebeling van 1 % gelatinegelen bij pH 4,45.

| Electrolyt            | Conc. in m. aeq. per L. | Troebe-ling 5 c.m. | Electrolyt    | Conc. in m. aeq. per L. | Troebe-ling 5 c.m. | Troebe-ling 1 c.m. |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|---------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| KCl                   | 0                       | 7.7                | $K_2SO_4$     | 0                       | 7.7                |                    |
|                       | 0.2                     | 8.6                |               | 0.05                    | 8.6                |                    |
|                       | 0.4                     | 9.3                |               | 0.1                     | 14.7               |                    |
|                       | 1.0                     | 14.4               |               | 0.2                     | 18.7               |                    |
|                       | 2.0                     | 16.9               |               | 0.5                     | 24.3               |                    |
|                       | 3.0                     | 15.0               |               | 1.0                     | 20.4               |                    |
|                       | 4.0                     | { 14.2             |               | 1.5                     | 16.3               |                    |
|                       |                         | { 14.4             |               | 2.0                     | 12.6               |                    |
|                       | 10                      | 8.6                |               | 5.0                     | 7.9                |                    |
|                       | 20                      | 6.0                |               | 10                      | 6.0                |                    |
|                       | 30                      | 4.4                |               |                         |                    |                    |
| BaCl <sub>2</sub>     | 0                       | 7.7                | $K_3Fe(CN)_6$ | 0                       | 7.7                | 2.8                |
|                       | 0.05                    | 8.4                |               | 0.002                   | 9.5                | —                  |
|                       | 0.1                     | 9.1                |               | 0.005                   | 9.7                | —                  |
|                       | 0.2                     | 9.5                |               | 0.01                    | { 10.4             | 2.8                |
|                       | 0.5                     | 9.5                |               |                         | { 9.8              | —                  |
|                       | 1.0                     | 8.6                |               | 0.03                    | 14.4               | —                  |
|                       | 2.0                     | 7.6                |               | 0.05                    | 17.4               | 4.4                |
|                       | 10.0                    | 4.7                |               | 0.10                    | 36.1               | 11.0               |
|                       |                         |                    |               | 0.15                    | 40                 | —                  |
| Luteo-cobalt-chloride | 0                       | 7.7                |               | 0.20                    | ∞                  | 14.0               |
|                       | 0.02                    | 7.2                |               | 0.30                    | ∞                  | —                  |
|                       | 0.1                     | 7.0                |               | 0.60                    | { 43               | 11.5               |
|                       | 0.2                     | 7.0                |               |                         | { 35.5             | —                  |
|                       | 0.5                     | 7.0                |               | 0.75                    | 10.2               | —                  |
|                       | 2.0                     | 7.8                |               | 1.20                    | 12.2               | 5.0                |
|                       | 5.0                     | 6.2                |               | 1.5                     | 10.8               |                    |
|                       |                         |                    |               | 3.0                     | { 6.6              |                    |
|                       |                         |                    |               |                         | { 7.1              |                    |
|                       |                         |                    |               |                         |                    |                    |

Om te zorgen, dat eventueele scherpe maxima ons niet zouden ontgaan, maten we een zoo groot mogelijk aantal verschillende concentraties en besteedden minder aandacht aan het doen van duplobepalingen. Over het algemeen is de overeenstemming van de in de tabellen vermelde duplobepalingen bevredigend, en ook waar een dergelijke contrôle ontbreekt, liggen de waarden bij grafische voorstelling vrij goed op een vloeiend verloopende kromme. Bij elke serie werd steeds een gel zonder electrolyt bij de zelfde pH gemeten, de troebeling hiervan verschilde zelden meer dan een schaaldeel; als ze meer dan een eenheid van het gemiddelde afweek werd de

TABEL 17. Invloed van electrolyten op de troebeling van 1 % gelatinegelen bij pH 4,7.

| Electrolyt                    | Conc. in<br>m. aeq.<br>per L | Troebe-<br>ling<br>1 c.m. | Electrolyt    | Conc. in<br>m. aeq.<br>per L | Troebe-<br>ling<br>1 c.m. |
|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------|------------------------------|---------------------------|
| KCl                           | 0                            | 18.7                      | $K_2SO_4$     | 0                            | 18.7                      |
|                               | 0.2                          | 16.9                      |               | 0.1                          | 13.0                      |
|                               | 0.4                          | 14.0                      |               | 0.2                          | 10.5                      |
|                               |                              | 14.1                      |               | 0.5                          | 8.8                       |
|                               | 1.0                          | 9.7                       |               | 1.0                          | { 5.4                     |
|                               | 2.0                          | 8.2                       |               |                              | { 4.6                     |
|                               | 4.0                          | 6.2                       |               | 2.0                          | { 4.5                     |
|                               | 10                           | { 3.7                     |               |                              | { 4.6                     |
|                               |                              | { 4.0                     |               | 5.0                          | 3.1                       |
| $BaCl_2$                      | 0                            | 18.7                      | $K_4Fe(CN)_6$ | 0                            | 18.7                      |
|                               | 0.1                          | 15.7                      |               | 0.005                        | 19.7                      |
|                               | 0.2                          | 13.2                      |               | 0.01                         | 18.5                      |
|                               | 0.5                          | 8.4                       |               | 0.02                         | 17.1                      |
|                               | 1.0                          | 6.4                       |               | 0.03                         | 16.7                      |
|                               | 2.0                          | 5.1                       |               | 0.05                         | 11.6                      |
|                               | 5.0                          | 3.2                       |               | 0.15                         | 5.0                       |
|                               |                              |                           |               | 0.25                         | 3.4                       |
| Luteo-<br>cobalt-<br>chloride | 0                            | 18.7                      |               |                              |                           |
|                               | 0.04                         | 23.2                      |               |                              |                           |
|                               | 0.10                         | 19.3                      |               |                              |                           |
|                               |                              | 19.3                      |               |                              |                           |
|                               | 0.20                         | 13.5                      |               |                              |                           |
|                               | 0.5                          | 16.0                      |               |                              |                           |
|                               |                              | 5.6                       |               |                              |                           |

geheele serie afgekeurd en overgedaan. In de tabellen is van deze bepalingen alleen het gemiddelde vermeld.

Bij de gekleurde driewaardige zouten namen we de voorzorg, na te gaan of de kleur invloed op de fotometeraflezing had. Voor de oplossingen van deze electrolyten in de grootste gebruikte concentratie was de instelling van den fotometer dezelfde als die voor gedestilleerd water.

We bestudeerden behalve de invloed van meerwaardige positieve en negatieve ionen ook nog die van de lyotrope reeks KCl - KBr -  $KNO_3$  - KJ - KCNS. De invloed van deze zouten op de troebeling is vermeld in tabel 19, de verschillen, die daar in één kolom vermeld

TABEL 18. Invloed van electrolyten op de troebeling van 1 % gelatinegelen bij pH 4,85.

| Electrolyt                    | Conc. in m. aeq. per L. | Troebe-<br>ling<br>5 c m. |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| KCl                           | 0                       | 5.0                       |
|                               | 0.5                     | 6.5                       |
|                               | 1.0                     | 6.2                       |
|                               | 2.0                     | 7.4                       |
|                               | 5.0                     | 7.7                       |
| BaCl <sub>2</sub>             | 0                       | 5.0                       |
|                               | 0.2                     | 7.6                       |
|                               | 0.5                     | 8.7                       |
|                               | 1.0                     | 10.2                      |
|                               | 2.0                     | 11.5                      |
|                               | 5.0                     | 4.4                       |
| Luteo-<br>cobalt-<br>chloride | 0                       | 5.0                       |
|                               | 0.05                    | 6.7                       |
|                               | 0.2                     | 8.7                       |
|                               | 0.3                     | 7.0                       |
|                               | 0.5                     | 32.2                      |
|                               | 1.0                     | 20.5                      |

TABEL 19. Invloed van de lyotrope reeks van anionen op de troebeling van 1 % gelatine bij pH 4,7.

Lengte van de cuvet bij de beide laagste concentraties 1 cm, bij 5 m. aeq. per L. 5 cm.

| Electrolyt       | Concentratie in m. aeq. per L. |     |      |
|------------------|--------------------------------|-----|------|
|                  | 1                              | 2   | 5    |
| KCl              | 9.7                            | 7.5 | —    |
| KBr              | 10.4                           | 7.0 | 13.8 |
| KNO <sub>3</sub> | 10.7                           | 7.1 | 14.8 |
| KJ               | 10.1                           | 7.3 | 14.0 |
| KCNS             | 10.2                           | 6.5 | 13.5 |



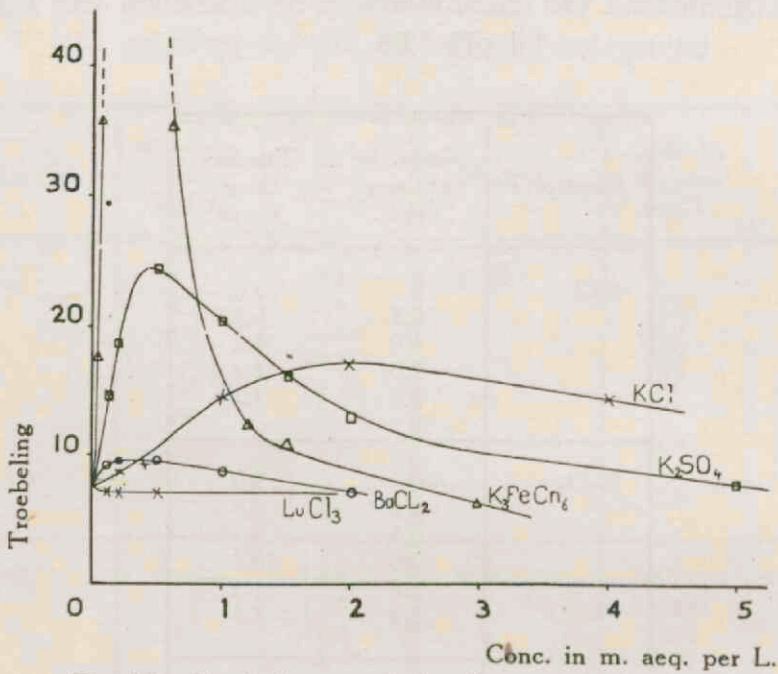


Fig. 15. Troebeling van 1% gelatinegel bij pH 4.45.

staan, zijn zeker kleiner dan de experimenteele fout; eenige lyotrope werking is dus met deze waarnemingen niet aangetoond.

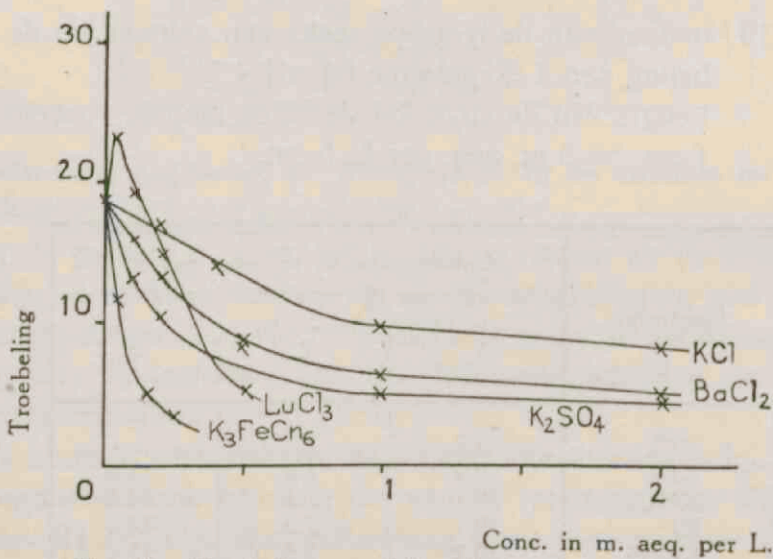


Fig. 16. Troebeling van 1% gelatinegel bij pH 4.7.

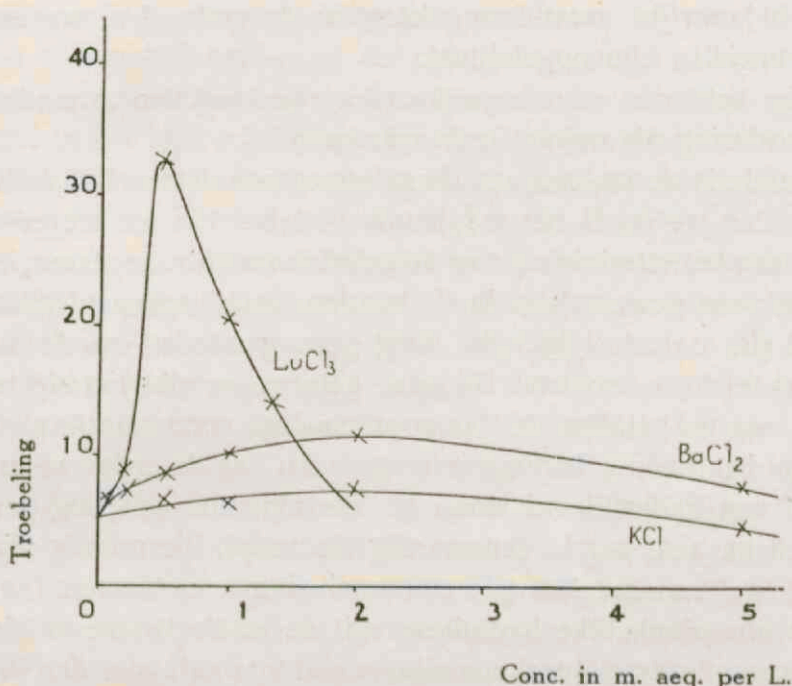


Fig. 17. Troebeling van 1% gelatinegel bij pH 4.85.

#### 4. Conclusie.

Zoowel uit de literatuur als uit onze eigen ervaring weten we, dat in het isoëlectrische gelatinesol geen coacervatie voorkomt en dat er ook bij afkoelen geen werkelijk coacervaat ontstaat. In tegenstelling tot het ontstaan van een coacervaat komt de troebeling langzaam te voorschijn, het duurt drie à vier uur eer een zichtbare verandering is opgetreden. Daarentegen wordt de gelatine weer helder, zodra we het gel in een sol omzetten. Als men een blokje gel op 35° à 40° brengt, zijn de eerste druppels vloeistof, die bij het smelten ontstaan, reeds geheel helder. De isoëlectrische troebeling is dus een typisch gelatineeringsverschijnsel.

Het is natuurlijk mogelijk om het toch als een coacervatieverschijnsel op te vatten. Daarvoor zouden er in het gel andere omstandigheden van lading resp. hydratatie moeten zijn dan in het sol. Het is niet onmogelijk, dat er bij den overgang van sol- in geltoestand dergelijke groote veranderingen voorkomen; de mutarotatie<sup>40)</sup> die daarbij optreedt, geeft ons reden te veronderstellen, dat

er een belangrijke verandering komt in de moleculen, waaruit de gelatinemicellen zijn opgebouwd.

Er zijn echter in onze experimenten twee redenen te vinden om deze verklaring als onjuist te beschouwen.

De eerste is de invloed van de gelatineconcentratie. Uit de literatuur kenden we reeds het maximum uit tabel 15; we schreven het toe aan een verontreiniging van de gelatine met b.v. zoutzuur, waarmee het was gewasschen. In de hogere gelatineconcentraties zou dan het eigen electrolytgehalte hoog genoeg worden om de troebeling niet te doen ontstaan. Bij onze gelatine bereikt het electrolytgehalte van de gelatine de daarvoor noodige concentratie niet; het 10 % gel heeft een geleidingsvermogen, dat van de orde van grootte van dat van gedestilleerd water is. We zijn hier dus nog ver van de 4 à 5 m. aeq. per L. eenwaardig electrolyt, die noodig zijn om een 1 % gel van dezelfde pH zijn troebeling te ontnemen.

Onze oorspronkelijke hypothese, dat de isoëlectrische troebeling een coacervatieverschijnsel zou zijn, is niet in staat, voor den invloed van de concentratie een verklaring te geven. We zouden een troebeling verwachten ongeveer evenredig met de gelatineconcentratie, zeker geen maximum.

De tweede reden is de invloed van electrolyten op de troebeling. Als we hier met een coacervatieverschijnsel te maken hadden, dan zou de invloed van electrolyten in hoofdzaak moeten overeenstemmen met die op het systeem chondroitinezwavelzuur-gelatine. In het bijzonder brengt de theorie van de uitvlokking van het complexcoacervaatsol met zich mede, dat de troebeling bij toevoeging van de eerste hoeveelheden electrolyt wel groter kan worden, maar dat de stijging van de fotometerwaarden eindigt, zoodra alle sol is uitgevlokt. D.w.z. onverschillig de waardigheid van de toegevoegde ionen komt de maximale troebeling altijd op ongeveer dezelfde hoogte: De troebeling van een mengsel, waarin alle kolloide stof aan de coacervatie deelneemt.

In fig. 15 ziet men, dat de toevoeging van meerwaardige ionen een geheel andere invloed uitoefent. De gelen worden door toevoegen van kaliumferricyanide drie tot vier maal zoo troebel als met kaliumchloride. We kunnen ons dit moeilijk als een uitvlokking van een complexcoacervaatsol denken.

We zoeken de verklaring in een geheel andere richting. Er is een



zekere overeenkomst tusschen onze resultaten bij toevoegen van zouten aan gelatinegelen en de resultaten van Galema<sup>30)</sup>, die den invloed onderzocht van electrolyten op de viscositeit van solen bij 42°. In het bijzonder heeft zijn fig. 2 groote gelijkenis met onze fig. 15, wanneer men een van beide omgekeerd denkt. Men vindt daar denzelfden invloed van KCl,  $K_2SO_4$ ,  $K_3Fe(CN)_6$ .

Met kleine concentraties wordt van elk van deze drie zouten de viscositeit van een gelatinesol sterk verlaagd; bij verdere toevoeging van electrolyt bereikt de viscositeit een minimum, om bij hogere concentraties weer vrij sterk te stijgen. Bij Galema komt steeds naar voren, dat deze minima op zeer verschillende hoogten liggen, het minimum voor  $K_2SO_4$  is lager dan dat voor KCl, en het minimum voor  $K_3Fe(CN)_6$  is weer veel lager dan dat voor  $K_2SO_4$ .

Onze metingen hebben met die van Galema<sup>30)</sup> gemeen, dat de maxima in troebeling in dezelfde volgorde liggen als de minima van de viscositeit en dat de verhouding van de maxima hier ongeveer dezelfde is als die van de minima daar.

We willen nu deze overeenkomst verklaren door te veronderstellen, dat ladings- en hydratatioestand van sol en gel in hoofdzaak overeenstemmen. Een maximum van de troebeling valt dan samen met een minimum hydratatie.

Met deze veronderstelling hebben we de mogelijke verklaring van de isoëlectrische troebeling tot twee vragen teruggebracht. De eerste vraag is, waarom de hydratatioestand van de gelatinedeeltjes bij toevoeging van electrolyten op de beschreven wijze verandert. Voor het antwoord hierop sluiten we ons aan bij de bespreking van dit verschijnsel door Kruyt en Galema<sup>41)</sup>. Deze onderzoekers verklaren den invloed van de verschillende electrolyten als een resultante van de verandering van den hydratatioestand door de ontladende, resp. omladende werking van de ionen eenerzijds en van de verandering door hun lyotrope werking anderzijds.

De tweede vraag is hoe men zich begrijpelijk moet maken, dat de troebeling groot is bij kleinen omvang van de hoeveelheid gebonden water. Daarvoor moeten we nagaan, welke functie de hydratatie heeft in de bouw van het gel.

De gelstructuur wordt veroorzaakt door een kracht, die de deeltjes samenbindt. Dat er een dergelijke kracht bestaat, merken we als we het gel uittrekken: Het bezit een zekere trekvastheid.

Deze kracht zal er naar streven de deeltjes zoo dicht mogelijk samen te pakken, d.w.z. het sol bij gelatineeren uit te vlokken. Dat dit in werkelijkheid niet gebeurt, is een gevolg van het streven naar hydratatie, dat zich tegen deze opeenpakking verzet. Op den duur ontstaat er tusschen deze beide factoren een evenwicht.

Allereerst moet er hier op worden gewezen, dat de kracht die het gel samenhoudt niet van denzelfden aard is als de kracht, die een complexcoacervaat doet ontstaan, want de gelatineering wordt niet opgeheven door toevoeging van electrolyt. We kunnen nu het vermoeden uitspreken, dat het ontstaan van deze kracht een chemische oorzaak heeft, n.l. dat de deeltjes van het gel uit andere moleculen zijn opgebouwd dan die van het sol. Deze verklaring vindt steun in onze opvatting van de mutarotatie (pag. 59).

Uit de gegeven voorstelling van een gel, als strevende naar een evenwichtstoestand tusschen hydratatie en een aantrekkende kracht tusschen de deeltjes, ontstaat de volgende beschouwing over de ontwikkeling van den geltoestand <sup>39</sup>):

Bij het begin van de gelatineering treedt een chemische omzetting op, waardoor er op enkele plaatsen op de deeltjes centra van aantrekking ontstaan. De deeltjes van het sol worden daardoor eenigszins vastgelegd, waarbij hun stand weinig verschilt van de plaats, waarop ze zich toevallig in het sol bevinden. In dit eerste bouwsel heeft er een verdere ontwikkeling van de gelstructuur plaats, die wordt veroorzaakt door vermeerdering van het aantal centra van aantrekking. Deze vermeerdering heeft slechts geleidelijk invloed op den stand van de deeltjes. Slechts wanneer er door Brownsche beweging een deeltje uit het verband raakt, krijgt dit gelegenheid die stand in te nemen, welke het zoo dicht bij de omringende deeltjes brengt als de hydratatie maar toelaat.

Bij een sterk gehydrateerd sol is deze nawerking gering; de evenwichtstoestand verschilt dan niet zoo veel van de verdeeling van de deeltjes, zooals die in het sol was. Als dit sol helder was, is er geen enkele reden, waarom het gel troebel zou zijn.

Ook bij een geconcentreerd sol is deze nawerking niet groot, omdat het groote aantal deeltjes de onderlinge verschuiving zeer belemmert en omdat de hoeveelheid gebonden water uiteraard zooveel grooter is t.o.v. het totale volumen dan bij een verdund sol. Ook hier ziet men gemakkelijk in, dat de evenwichtstoestand niet zooveel



zal verschillen van de verdeeling van de deeltjes, zooals die in het sol was; ook deze gelen zijn helder.

In een weinig gehydrateerd, verdund sol is de toestand anders. Daar kunnen we ons wel degelijk een sterke nawerking indenken. Na verloop van tijd worden de geldeeltjes in groepjes opeengehoopt. In andere deelen van het gel ontstaan er dan plekken, waar minder deeltjes zijn dan tevoren; de regelmatige verdeeling van de stof wordt door de nawerking verstoord en dit nemen we waar als iso-electrische troebeling.

Op den duur zullen de deeltjes in totaal een kleiner volumen innemen dan in het sol, er blijft een hoeveelheid intermicellaire vloeistof over. We zijn gewoon dit aan te duiden met het woord syneresis.

Ten slotte, als de hydratatie zeer gering is, kan men zich indenken dat er gebeurt, wat K n a g g s <sup>35)</sup> beschrijft, n.l. dat de gelatine geheel ineenzakt en „uitvlokt”.



## V. Experimenten aan kollageen.

### 1. Inleiding.

Aan het slot van het literatuuroverzicht merkten we op, dat het kollageen een weinig aantrekkelijk materiaal is voor kolloïdchemische experimenten. Toch eischt onze werkhypothese, dat we enkele veronderstellingen aan deze stof zelf zullen toetsen, te meer nu het onderzoek van de „pigskin”-gelatine ons zoo weinig heeft opgeleverd.

In de eerste plaats moeten we experimenteel bevestigen, dat het kollageen een stof bevat, die met eiwitten complexcoacervatie kan geven. Wel is waar hebben vele onderzoekers, waaronder *Levene*<sup>26)</sup>, uit pezen en huid stoffen afgezonderd, waaraan ze den naam chondroïtinezwavelzuur geven, maar een identiteit met het overeenkomstige product uit kraakbeen staat allermintst vast. Deze identiteit is tenslotte voor ons niet het belangrijkste; beslissend voor dit onderzoek is alleen de vraag, of de stof, die b.v. *Levene* uit pezen isoleert, in staat is met eiwitten complexcoacervatie te geven.

In de tweede plaats moeten we het eiwit uit het kollageen afscheiden in een voor kolloïdchemisch onderzoek toegankelijk, d.w.z. oplosbaren vorm, waarbij de ontleding zoo gering mogelijk moet zijn. De kans bestaat, dat we zoo de eiwitcomponent krijgen, die we in de „pigskin”-gelatine tevergeefs zochten: Een eiwit, dat bij pH 7 nog positief geladen is.

Door langdurige inwerking van zuren of alkalien wordt het kollageen omgezet in een stof, die beter oplosbaar is in warm water. Indien deze bewerking een opheffing van den coacervatietoestand is, moeten we zuur of alkali kunnen vervangen door een zoutoplossing. We hebben daarom onze isoleering van de bestanddeelen van het kollageen uitgevoerd door extractie met een natriumchloride-oplossing; aan een minder snelle werking van dit reagens zijn we tegemoet gekomen door verhooging van de temperatuur.

### 2. Isoleering van mucine en eiwit uit het kollageen.

#### a. Oriënteerende proefnemingen.

Als materiaal voor dit gedeelte van het onderzoek gebruikten we

pezen van runderpooten. We ont deden ze van alle aanhangende vleesch en los weefsel en gebruikten alleen de stevige blanke stukken.

Het was noodig deze pezen voor het gebruik goed te ontsmetten. We waschten ze daarvoor eenige malen met water, waaraan aether was toegevoegd. Ondanks deze ontsmetting ontstond er uit enkele hoeveelheden een rottingsproduct, dat zoo kwalijk reekte, dat we niet licht in de verzoeking zouden zijn gekomen om ze verder te verwerken.

Bij voorloopige proefnemingen hadden we gevonden, dat men bij een zoutconcentratie van  $\pm \frac{1}{4}$  n. en een temperatuur van  $42^\circ$  belangrijke hoeveelheden materiaal uit de pezen uittrekt. Zoowel bij een lagere als bij een hogere zoutconcentratie geschiedt de aantasting van de pezen veel langzamer.

Verder deden we vooraf nog een onderzoek om uit te maken of men met deze methode van uittrekken soms een interfibrillaire stof verwijdert en dus de fibrillen van elkander losmaakt (zie pag. 10). Daarvoor sneden we van een pees een aantal dunne schijfjes ter dikte van  $\frac{1}{2}$  tot 1 m.m. loodrecht op de richting van de vezels; bij het uittrekken met zout zouden de korte stukjes vezel dan zeer gemakkelijk los moeten laten. Dit was niet het geval; de schijfjes bleven intact bij behandeling bij  $42^\circ$  met een zoutoplossing, die telkens na 24 uur werd ververscht, zoo lang tot er geen mucinen meer in de zoutoplossing overgingen.

We hebben hier een argument tegen de opvatting van de mucinen als een interfibrillaire stof en een steun voor de meening, dat deze stoffen tot de kollagene vezel zelf behooren.

#### b. H e t m u c i n e.

Voor het onderzoek naar het mucine uit het kollageen werd 1 K.G. van het gereinigde materiaal gemalen en vervolgens met 2 liter  $\frac{1}{4}$  n. natriumchlorideoplossing op  $42^\circ$  gebracht. Telkens na twee of drie dagen schonken we de vloeistof af en voegden nieuwe zoutoplossing toe. In deze extracten ontstond een neerslag bij verdunnen en aanzuren. Het uittrekken werd voortgezet, totdat de vloeistof op deze wijze geen neerslag meer gaf; dit duurde tien dagen.

We verdunnen het extract met een gelijk volume water en voegden zoutzuur toe, om het mucine neer te slaan. De hoeveelheid



zoutzuur, die daarbij het meeste neerslag gaf, werd opgezocht met behulp van een reeks reageerbuisproefjes. We verzamelden de neerslagen uit alle extracten en verkregen in totaal enkele grammen van het nog vochtige product.

Om hieruit het chondroitinezwavelzuur te isoleeren volgden we de methode van *Levene*, zooals op pag. 15 is beschreven. Om al te groote verliezen op de toch al zoo geringe hoeveelheid stof te voorkomen, sloegen we de behandeling met bariumcarbonaat en azijnzuur over, uit de overweging, dat eiwitten van het type van gelatine op deze wijze toch niet te denatureeren zijn.

De bewerking geschiedde dus als volgt:

We losten het neerslag op in verdunde alkali en goten deze oplossing uit in de achtvoudige hoeveelheid ijsazijn. Het neerslag werd opgelost in verdunde alkali en de behandeling met ijsazijn werd herhaald. Vervolgens werd het neerslag opgelost in verdunde alkali en neergeslagen met basisch-loodacetaatoplossing. Het lood werd uit dit neerslag verwijderd door inleiding van zwavelwaterstof in een azijnzure oplossing. De zoo verkregen vloeistof bezat niet het vermogen, om met eiwitten coacervatie te geven, en met een overmaat alcohol, na toevoeging van een weinig zoutoplossing, ontstond er geen neerslag. Er was dus bij deze handelwijze blijkbaar in het geheel geen kolloid overgebleven.

Dat we met deze methode geen spoor van een negatief kolloid isoleerden, kon in de eerste plaats het gevolg zijn van het feit, dat we bij uittrekken met zout op 42° zooveel eiwitstoffen hadden meegesleept, dat het chondroitinezwavelzuur bij de bewerking in de verschillende eiwitneerslagen was achtergebleven. In de tweede plaats kon het te wijten zijn aan het overslaan van de behandeling met bariumcarbonaat en azijnzuur.

Om hierover zekerheid te krijgen trokken we een voorraad pezen bij kamertemperatuur gedurende vier dagen uit met  $\frac{1}{50}$  n. NaOH. Het filtraat behandelden we met bariumcarbonaat en azijnzuur precies zooals op pag. 15 voor het kraakbeenextract is beschreven. Het dikke neerslag, dat bij indampen ontstond, bewees, dat er wel degelijk iets uit de pezen was getrokken. Bij filtreren en uitgieten van het filtraat in azijnzuur ontstond er echter geen spoor van neerslag.

We hebben dus uit pezen geen stof geïsoleerd, die in staat is om met eiwitten coacervatie te geven. Dat wil niet zeggen, dat we op



grond hiervan ontkennen dat de mogelijkheid bestaat, dat een dergelijke stof in kollageen zou voorkomen; het onbevredigde resultaat van deze pogingen tot isoleering maakt het alleen waarschijnlijk, dat er niet in alle kollageen een groote hoeveelheid van deze stof aanwezig is.

c. Het eiwit, verkregen door behandeling met zout.

Wat er overbleef na de op pag. 54 genoemde extractie met zout, gebruikten we om de eiwitten van het kollageen langs een zoo min mogelijk ingrijpende weg te isoleren.

Er was bij deze bewerking oogenschijnlijk nog niet veel veranderd. De pezen waren vrijwel niet gezwollen en bij bezien in gepolariseerd licht was het prachtige kleurenspeel blijven bestaan. Het bleek dan ook niet mogelijk dit kollageen in warm water tot een gelatine op te lossen. Bij verwarmen met water krulden de stukjes om tot harde bolletjes, die eerst na uren koken gedeeltelijk in oplossing gingen. Het resultaat was dan, dat de afbraak van het kollageen geen bruikbaar preparaat gaf, omdat de ontstane gelatine ook weer werd afgebroken (wat bleek uit het feit, dat de oplossing niet gelatineerde).

Voor het oplossen was noodig een voorafgaande opzwellling, hetzij met zuren, hetzij met alkaliën.

Om ook bij deze zwellling zoo min mogelijk afbraak van het kollageen te verkrijgen, volgden we de volgende methode:

De stukjes kollageen werden eerst met gedestilleerd water omgeroerd, om de hoofdmassa van het zout te verwijderen. Dan werd het water vervangen door verdund zoutzuur (concentratie 10 m. mol. per L.). We ververschten dit tweemaal in den loop van een dag en lieten het kollageen ten slotte gedurende den nacht er in staan. De geheele inwerking geschiedde bij kamertemperatuur, d.w.z. beneden  $20^{\circ}$ . De pH daalde daarbij hoogstens gedurende zeer korten tijd beneden 3,9.

Het sterk gezwollen product was gemakkelijk oplosbaar door verwarmen op  $70-80^{\circ}$ . We hielden de pH daarbij op 3,9 door toevoegen van zoutzuur. Na twee uur verwarmen schonken we de vloeistof af; de nog overgebleven stukjes kollageen werden toen

nogmaals twee uur met water verwarmd. Het grootste deel van het uitgangsproduct werd op deze wijze opgelost. De oplossing werd gefiltreerd en ingedampt in een luchtstroom; de overmaat electrolyt werd verwijderd door electrodialyse van het gel op de wijze als bij de gelatine geschiedde. Hoewel de stroomsterkte daarbij daalde tot  $\pm 1\frac{1}{2}$  maal die voor gedestilleerd water, verkregen we een product met een aschgehalte van 1,76 %.

### 3. Experimenten met de gelatine, bereid door uittrekken met zout.

Om te weten te komen, of we hier werkelijk te doen hadden met een eiwit, dat bij pH 7 positief geladen was, bepaalden we de viscositeit van een  $\frac{1}{4}$  % sol bij verschillende pH (tabel 20). Uit de tabel ziet men duidelijk, dat de viscositeit gelijk blijft bij verschuiven

TABEL 20. Invloed van de pH op de viscositeit van het gelatine-preparaat, bereid uit pezen.

| pH   | $t_s/t_o$ |
|------|-----------|
| 3.9  | 1.125     |
| 4.35 | 1.075     |
| 4.60 | 1.065     |
| 4.80 | 1.055     |
| 5.3  | 1.054     |
| 5.75 | 1.050     |
| 5.8  | 1.051     |
| 6.4  | 1.051     |
| 6.9  | 1.051     |
| 7.7  | 1.053     |
| 8.6  | 1.054     |
| 9.4  | 1.057     |

van de pH van 5,75 tot 7,7, en dat we dus een gelatine hebben bereid overeenkomend met de „pigskin”-gelatine.

Het verschil tusschen de viscositeit bij pH 5,8 en die bij pH 7,7 is hier nog minder dan bij de „pigskin”-gelatine; waarschijnlijk ligt dat voor een deel daaraan, dat we de daar besproken fouten



niet konden vermijden (vgl. blz. 45). Een  $\frac{1}{4}$  % sol had namelijk een pH van 3,9; door de geringe opbrengst (8 gram) konden we de bij de „pigskin”-gelatine beschreven wassching niet toepassen.

Dit resultaat van de viscositeitsmetingen gaf niet veel hoop, dat er bij pH 7 nog een coacervatie met chondroïtinezwavelzuur zou plaats hebben. Inderdaad was er geen coacervatie aan te toonen. De mengsels van een sol van het preparaat met het sol L 8 waren bij alle verhoudingen van de componenten helder bij elke pH boven 5,7.

Beneden deze pH verliep de coacervatie op dezelfde wijze als bij de mengsels van „pigskin”-gelatine en chondroïtinezwavelzuur, zooals blijkt uit de troebelingsmetingen van tabel 21.

TABEL 21. Troebeling van mengsels van het gelatinepreparaat, bereid uit pezen, en chondroïtinezwavelzuur, temp. 42,5°.

| Concentraties in gewichts-% |                        | pH 3.9 | pH 4.6 | pH 5,3    |
|-----------------------------|------------------------|--------|--------|-----------|
| gelatine                    | chondroïtinezwavelzuur |        |        |           |
| 0.245                       | 0.002                  | —      | 0      | 0         |
| 0.238                       | 0.005                  | 2.9    | —      | zw. opal. |
| 0.225                       | 0.01                   | 5.3    | 26.9   | 14.8      |
| 0.20                        | 0.02                   | 32.2   | 26.4   | 0         |
| 0.15                        | 0.04                   | 8.8    | 0      | —         |
| 0.10                        | 0.06                   | 3.0    | 0      | —         |

#### 4. Conclusie.

Voor de hypothese, dat de oorzaak van de onoplosbaarheid van het kollageen ligt in een complexcoacervatietoestand, heeft dit deel van ons onderzoek weinig opgeleverd.

We zijn er niet in geslaagd, uit dit materiaal twee stoffen te isoleren, die samen complexcoacervatie geven. Daaruit volgt, dat de samenstelling van het kollageen niet zoo eenvoudig is als we dachten.

Wel hebben we aangetoond, dat er met een  $\frac{1}{4}$  n. natriumchloride-oplossing uit pezen een substantie wordt opgelost, waardoor het



overblijvende deel beter oplosbaar wordt in water. Dit feit is echter geen krachtig argument voor het aannemen van een complexcoacervatietoestand.

Toch leert dit onderzoek ons wel iets over de verhouding van kollageen en gelatine. Onze bereidingswijze van gelatine uit pezen was er op gericht, om zoo veel mogelijk alles te vermijden, wat een belangrijke verandering van de eiwitstoffen in de hand zou werken. We mogen daarom de conclusie trekken, dat de bereiding van de gewone gelatine een veel ingrijpender proces is dan de fabricage van de „pigskin“-gelatine.

Een tweede argument voor deze conclusie volgt uit de zwelling van het kollageen, zooals die is beschreven door Wilson<sup>38</sup>) (zie pag. 28). Een gel van „pigskin“-gelatine zal ongeveer hetzelfde verschijnsel vertoonen dat Wilson bij het kollageen waarneemt, n.l. dat de zwellings-pH-kromme een vlak verloop heeft van pH 5 tot 8. Uit deze overeenkomst volgt eveneens, dat het kollageen in chemisch opzicht veel meer gelijkt op de „pigskin“- dan op de gewone gelatine.

---

### C. SAMENVATTING.

We zijn uitgegaan van de hypothese, dat de onoplosbaarheid van het kollageen geheel of ten deele het gevolg zou zijn van een complexcoacervatietoestand.

Als schakel in het bewijs van deze hypothese onderzochten we het coacervatieverschijnsel in mengsels van solen van gelatine met die van chondroitinezwavelzuur en mucoïne. Dit onderzoek heeft ons geleid tot de conclusie, dat de mucinen moeten worden beschouwd als mengsels van eiwitten en negatief geladen kolloïden en dat het neerslag, dat ontstaat bij aanzuren van een alkalische oplossing van een mucine, een complexcoacervaat is.

Indien er in het kollageen een mucine aanwezig is, dan is er dus ook een negatief lyophiel kolloïd, dat als negatieve component van een complexcoacervaat zou kunnen optreden.

Een positieve component meenden we te hebben gevonden in de „pigskin“-gelatine. Dit bleek niet waar te zijn, daar dit eiwit met chondroitinezwavelzuur en met arabische gom geen complexcoacervatie vertoont boven pH 5,7.

Het verschijnsel van de iso-electrische troebeling van gelatine beschouwden we eveneens oorspronkelijk als een complexcoacervatieverschijnsel. Ook dit bleek niet juist. Ons onderzoek van den invloed van temperatuur, concentratie en electrolyttoevoeging op deze troebeling liet geen twijfel, dat het verschijnsel een typische eigenschap van het gel is. Duidelijk bleek, dat de troebeling daarin alleen optreedt als de hydratatie van de gelatine gering is.

Ten slotte trachtten we uit pezen zoowel de negatieve als de positieve component te winnen. Het gelukte ons niet, stoffen te isoleren, die samen complexcoacervatie gaven. Daardoor wordt onze hypothese onwaarschijnlijk; we hebben ons den toestand veel te eenvoudig voorgesteld. Als eenig argument ter verdediging van onze

voorstelling blijft over het feit, dat het ons gelukt is een klein deel van het kollageen in oplossing te doen gaan door uittrekken met een zoutoplossing.

Ten slotte hebben we uit de poging om uit pezen een gelatine te bereiden door uittrekken met een zoutoplossing geleerd, dat bij de bereiding van de gewone gelatine een veel sterkere afbraak van het kollageen plaats heeft dan bij de bereiding van de „pigskin”-gelatine.

---



### Literatuur.

1. H. R. Kruyt, Chem. Weekblad **28**, 148 (1931).
2. H. R. Kruyt, Colloids, New York 1927, pag. 167 enz.
3. J. M. van Bemmelen, Z. anorg. Chem. **13**, 233 (1896).
4. H. G. Bungenberg de Jong en H. R. Kruyt, Proc. Acad. Sci. Amsterdam, **32**, 849 (1929). Kolloid-Z. **50**, 39 (1930).
5. H. G. Bungenberg de Jong en W. A. L. Dekker, Biochem. Z. **212**, 318 (1929).
6. H. G. Bungenberg de Jong en R. F. Westerkamp, Biochem. Z. **234**, 367 (1928).
7. H. G. Bungenberg de Jong, Biochem. Z. **221**, 392 (1931).
8. H. G. Bungenberg de Jong, Protoplasma **15**, 110 (1932).
9. O. Kraemer, J. Phys. Chem. **31**, 764 (1927); **32**, 384 (1928). Coll. Symposium Mon. **4**, 102 (1926).
10. M. Briefer, Ind. Eng. Chem. **21**, 266 (1929).
11. Behalve no. 9 ook nog: A. C. Dahlberg, Ind. Eng. Chem. **20**, 397 (1928).
12. M. Briefer, Ind. Eng. Chem. **20**, 408 (1928).
13. O. Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie, München 1926, pag. 127.
14. C. Oppenheimer, Handbuch der Biochemie, Jena 1909, deel I, pag. 319.
15. C. Th. Mörner, Skand. Arch. f. Physiologie, **1**, 228 (1889); Z. physiol. Chem. **20**, 357 (1894).
16. Hawken Gies, Am. Journ. of Physiol. **5**, 387 (1901).
17. Loebisch, Z. physiol. Chem. **10**, 40 (1886).
18. E. H. B. van Lier, Z. physiol. Chem. **61**, 177 (1909).
19. Literatuuroverzicht bij E. H. B. van Lier, diss. Utrecht 1909.
20. Nageotte, Bulletin d'histologie appliquée, **4**, 73 (1927).
21. Levi, Archiv. f. exp. Zellforschung, **11**, 189 (1931).
22. Boedeker, Ann. **117**, 111 (1861).

23. K. A. H. Mö r n e r, Skand. Arch. f. Physiologie **6**, 332 (1895).
24. Behalve no. 25 en 26 nog:  
     P o n s, Arch. internat. de Physiol. **8**, 393 (1909).  
     K u r a K o n d o, Biochem. Z. **26**, 116 (1910).  
     O d d i, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. **33**, 376 (1894).  
     K r a w k o v, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. **40**, 195 (1897).  
     F. M ü l l e r, Zeitschrift für Biologie **42**, 534 (1901); Ergebnisse der Physiologie **1**, 83 (1902).  
     H. S t e u d e l, Z. physiol. Chem. **34**, 359 (1902).  
     A. O r g l e r e n C. N e u b e r g, Z. physiol. Chem. **37**, 407 (1903).  
     S. F r ä n c k e l, Ann. **351**, 344 (1906).  
     F. A l z o n a, Biochem. Z. **66**, 408 (1914).  
     O. S c h m i e d e b e r g, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. **87**, 1 en 47 (1920).  
     K. H a r p u d e r, Biochem. Z. **169**, 308 (1926).  
     E. J o r p e s, Biochem. Z. **204**, 354 (1926).  
     W. W. S a v j a l o v, Z. physiol. Chem. **126**, 219 (1923); Chem. Zentr. 1930, I, 2571.  
     T. T a k a h a t a, Z. physiol. Chem. **136**, 82 (1924).
25. O. S c h m i e d e b e r g, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. **28**, 355 (1891).
26. P. A. L e v e n e, Hexosamines, mucins and mucoids, Monog. Rock. Inst. **18**. New York 1922.
27. H. G. B u n g e n b e r g d e J o n g e n O n g S i a n G w a n, Biochem. Z. **221**, 182 (1930).
28. V a n d e r M i n n e, diss. Utrecht, pag. 9 (1928).
29. H. G. B u n g e n b e r g d e J o n g, Rec. trav. chim. **42**, 1 (1923).
30. H. G a l e m a, diss. Utrecht, 1931.
31. J. L o e b, J. Am. Chem. Soc. **44**, 213 (1922).
32. C. T h. M ö r n e r, Z. physiol. Chem. **18**, 245 (1894).
33. L a n d w e h r, Z. physiol. Chem. **5**, 371 (1881).
34. L. W. J. H o l l e m a n, diss. Leiden, 1932.
35. J. K n a g g s, A. B. M a n n i n g e n S. B. S c h r i j v e r, Biochem. J. **17**, 483 (1923).
36. W. B a c h m a n n, Z. anorg. allem. Chem. **73**, 125 (1912).

37. H. R. Kruyt en H. J. C. Tendeloo, J. Phys. Chem. **29**, 1303 (1925).
  38. J. A. Wilson en A. F. Gallun, Ind. Eng. Ch. **15**, 71 (1923).
  39. gedeeltelijk ontleend aan:  
H. R. Kruyt, Colloids, 2de druk. New York 1930, pag. 234.  
H. G. Bungenberg de Jong, Z. physik. Chem. **130**, 205 (1927).
  40. Trunkel, Biochem. Z. **26**, 493 (1910).  
C. R. Smith, J. Am. Chem. Soc. **41**, 135 (1912).  
Vlès et Villinger, Compt. rend. **180**, 439 (1925).  
R. M. Bogue, J. Am. Chem. Soc. **47**, 1694 (1925).  
E. O. Kraemer, J. Phys. Chem. **29**, 1169 (1925); **32**, 894 (1928).  
Fanselow, Colloid Symposium **6**, 237 (1928).
  41. H. R. Kruyt en H. P. Galema, artikel in Kolloidchem. Beihefte in druk.
  42. K. Krishnamurti, Proc. Roy. Soc. London, **129**, 497 (1930).
-





## STELLINGEN.

---

- I. De schematische voorstelling van de electrische dubbellaag bij E u c k e n is in strijd met de berekeningen van M ü l l e r.  
A. Eucken, Z. physik. Chem. B **1**, 375 (1928).  
H. Müller, Kolloidchem. Beihefte **26**, 274 (1927).
- II. Het bestaan van allotropie bij het zink is zeer twijfelachtig.  
M. Straumanis, Z. physik. Chem. B **13**, 316 (1931); **19**, 63 (1932).
- III. De poging van K r a c e k, om zijn verklaring van de onregelmatigheden in de spec. warmte van natriumnitraat te gebruiken ter verklaring van de polymorfie van ammoniumnitraat en andere nitraten, is aan bedenking onderhevig.  
F. C. Kracek, S. B. Hendricks en E. Posnjak, Nature **128**, 410 (1931).
- IV. De wijze, waarop S t a u d i n g e r uit de viscositeit van solen van sterk gesolvateerde kolloïden conclusies trekt betreffende de constitutie van deze stoffen, is onjuist.  
H. Staudinger, Z. physik. Chem. A **153**, 391 (1931).
- V. C h e s s i n leidt af, dat als een holomorfe functie met reële periode aan het eene einde van een periodenstrook een limiet heeft, ze ook een limiet heeft aan het andere einde. Deze afleiding is onjuist.  
A. S. Chessin, American Journal of Mathematics **19**, 228 (1897).
- VI. Het ontbreken van optische isomeren bij benzydine-2-2'-disulfonzuur en het bestaan van optische isomeren bij phenyl benzydinedisulfonaat toont aan, dat de „obstakeltheorie" voor diphenylderivaten geen absolute geldigheid bezit.  
W. M. Stanley en R. Adams, J. Am. Chem. Soc. **52**, 4471 (1930).  
M. S. Lesslie en E. E. Turner, J. Chem. Soc. Juli 1932 pag. 2021.

VII. De methode van Criegee verschaft ons geen volkomen zekerheid inzake de ringstructuur van suikers.  
Criegee, Ann. 495, 211 (1932).

VIII. Het is weinig waarschijnlijk, dat het deel van de gelatine, dat Sheppard afscheidt door coagulatie bij verwarming, identiek is met de fractie, die Kunitz en Northrup uit de gelatine afscheiden door zuivering volgens Knaggs.  
S. E. Sheppard, J. H. Hudson en R. C. Houck, Kolloid-Z. 58, 348 (1931).

















