

Die Polymerisations-Produkte begannen bereits etwa $5-10^\circ$ vor dem Schmelzen allmählich zu erweichen. Durchgeführte Elementaranalysen sprachen für analoge Zusammensetzung. Für Fraktion I z. B.:

($C_{10}H_{14}$)_x Ber. C 89,49 H 10,51 Cl 0,00.

Gef. C 88,26 H 10,57 Cl 0,83.

B. Spektrophotometrische Messungen

Die halochromen Lösungen aus Cyclohexadien und wasserfreier Perchlorsäure in Eisessig (Abb. 2 und 3) wurden in der Weise hergestellt, daß 1 ml der 0,1- bzw. 0,05-m. Lösung von 1,3-Cyclohexadien in Eisessig in einem 10-ml-Meßkölbchen mit jeweils 5 ml Perchlorsäure-Lösung in Eisessig der vorher berechneten Konzentration versetzt, unmittelbar anschließend im Glycerinbad von $100^\circ (\pm 2)$ 2 Min. lang (± 2 Sek.) erwärmt, danach 2 Min. unter der laufenden Wasserleitung abgekühlt, sodann mit Eisessig bzw. Perchlorsäure-Eisessig-Lösung bis zur Marke aufgefüllt wurde. Anschließend wurde sofort in Quarzküvetten von 0,1 cm Schichtdicke gegen die entsprechenden Perchlorsäure-

Eisessig-Lösungen gemessen.

Die halochromen Lösungen aus Chlorcyclohexen und Quecksilber(II)-chlorid in Acetonitril (Abb. 4) wurden in der Weise hergestellt, daß 1 ml einer 0,1-m. Lösung von Chlorcyclohexen in Acetonitril in einem 10-ml-Meßkölbchen mit 5 ml 1-m. Quecksilberchlorid-Acetonitril-Lösung gemischt wurden, 2 Min. lang (± 2 Sek.) im Glycerinbad auf $70^\circ (\pm 2)$ erwärmt, anschließend 2 Min. lang unter der fließenden Wasserleitung abgekühlt und sodann mit Acetonitril zur Marke aufgefüllt wurde. Anschließend wurde sofort in einer 0,1-cm-Quarzküvette gegen 0,5-m. Quecksilberchlorid-Acetonitril-Lösung gemessen.

Die halochromen Lösungen aus Hexalin und Antimon(V)-chlorid (Abb. 6 und 7) in Tetrachloräthan wurden hergestellt, indem berechnete Volumina 0,01-m. Lösungen von Antimon(V)-chlorid und Hexalin im Meßkolben gemischt und sofort mit Lösungsmittel zur Marke aufgefüllt wurde. Anschließend wurde direkt in Quarzküvetten von 0,1 cm Schichtdicke gegen Vergleichslösungen mit entsprechender Konzentration an Antimon(V)-chlorid gemessen.

Strukturbildung durch Ionendiffusion, Symplexionotropie

Von HEIRICH THIELE und LOTHAR LANGMAACK

Lehrfach für Kolloidchemie, Universität Kiel

(Z. Naturforschg. **12 b**, 14—23 [1957]; eingegangen am 23. August 1956)

Allein durch Ändern des pH-Wertes von Symplexlösungen wurden anisotrope Symplexgele durch Aufladung oder Umladung einer Komponente dargestellt. An einzelnen Beispielen wird diese neue Art einer Strukturbildung näher untersucht und gefunden, daß sich auf diese Weise auch synthetische und native Amphi-Ionen wie auch Proteine als Gele mit geordneten Teilchen — also mit mizellarer Struktur — erhalten lassen. Eine Anwendung der Ergebnisse auf die Morphogenese nativer Strukturen wird diskutiert und an Hand neuerer histologischer Befunde begründet.

Anisometrische Polyelektrolyte können durch Eindiffundieren von Gegenionen in ihre Sole geordnet und zu doppelbrechenden Gelen fixiert werden^{1,2}. Diese Ionotropie kann als eine Vorstufe zur Salz- und Flockung von Polyelektrolyten gelten, wobei das durch die Gegenionen gebildete Salz stark hydratisiert ist³. Durch weitere Untersuchungen wurden Einzelbeobachtungen geklärt und einige Regeln für die Bildung ionotroper Gele gefunden⁴⁻⁹. Der Grad der Orientierung der Polyelektrolyte ist abhängig von der Ladung und der Kettenlänge des Fadenmoleküls sowie von Radius und Valenz des Gegenions. Außerdem gehen naturgemäß von den

spezifischen Eigenschaften des Polyelektrolyten die Eigen- und Formdoppelbrechung, die Löslichkeit und der Hydratationsgrad der gebildeten Salze ein. Ebenso wie die Strömungs-Doppelbrechung kann auch die Anisotropie ionotroper Gele polarisationsoptisch an der Doppelbrechung der Gele gemessen werden. Die bisher untersuchten Polyelektrolyte waren meist Polysäuren, die Gegenionen waren monomere Kationen.

Ausgehend von der gegenseitigen Flockung einer ganzen Reihe von Polyelektrolyten gelangten wir nun über die Koazervation und Symplexbildung zu einer neuen Art der Darstellung ionotroper Gele aus

¹ H. THIELE, Naturwissenschaften **34**, 123 [1947]; Z. Naturforschg. **3 b**, 778 [1948].

² H. THIELE u. H. MICKLE, Kolloid-Z. **111**, 73 [1948] u. **116**, 1 [1950].

³ H. THIELE, Kolloid-Z. **127**, 134 [1952].

⁴ H. THIELE u. G. KIENAST, Kolloid-Z. **136**, 80 [1954].

⁵ H. THIELE u. G. ANDERSEN, Kolloid-Z. **140**, 76 [1955].

⁶ H. THIELE u. G. ANDERSEN, Kolloid-Z. **142**, 5 [1955].

⁷ H. THIELE u. G. ANDERSEN, Kolloid-Z. **143**, 21 [1955].

⁸ H. THIELE, Universitas **5**, 1081 [1950].

⁹ H. THIELE, Discuss. Faraday-Soc. **1954**, 294.

zwei Polyelektrolyten mit gegensinniger Ladung. Bei der näheren Betrachtung einiger solcher Systeme hat sich herausgestellt, daß diese neue Art der Ionotropie aus zwei kolloiden Komponenten eine allgemeinere Art der Strukturbildung ist, welche auch Amphi-Ionen synthetischer und nativer Art einschließt¹⁰. So reagiert Carboxymethylpolyglucosamin auf der alkalischen Seite seines IEP mit Kationen und auf der sauren Seite mit Anionen unter Bildung ionotroper Gele. Das Silbersalz des anionischen Carboxymethylpolyglucosamins ist schwerlöslich. Ebenso wie Na-alginat ergab es mit Ag-Ionen ionotrope Gele. Bei diesem Glucosamin gelang damit zum ersten Mal die Ausrichtung eines Polyampholyten auch mit Anionen und wie erwähnt mit Kationen, Tab. 1.

	MoO ₄ ²⁻	Fe(CN) ₆ ³⁻	Fe(CN) ₆ ⁴⁻	Ca ²⁺	Cd ²⁺	Cu ²⁺
Polyglucosamin-Hydrochlorid	17	42	94	—	—	—
Carboxymethylpolyglucosamin-Na-salz, pH=7	—	—	—	13	35	89
Carboxymethylpolyglucosamin HCl-Salz, pH=3	9	29	68	—	—	—

Tab. 1. Carboxymethylpolyglucosamin 1-proz., Schichtdicke 2,5 mm, Gegenanionen als K-salze, Gegenkationen als Chloride, beide in normaler Lösung. Ordnungsgrad als Gangunterschied in $m\mu$.

Wird die gegenseitige Flockung und Symplexbildung mit der Flockung von Polyelektrolyten verglichen und die Ionotropie als ein Sonderfall der Flockung durch Gegenionen betrachtet, erhebt sich die Frage, ob nicht analog ein Polyelektrolyt mit einem anderen Polyelektrolyten des entgegengesetzten Vorzeichens seiner Ladung unter Bildung eines Gels mit geordneten Teilchen reagieren kann. Wir fanden, daß dies unter bestimmten Bedingungen allgemein möglich ist. An die Stelle der monomeren Gegenionen treten polymere Gegenionen. Man könnte diese Bildung geordneter Gele als Symplex-Ionotropie bezeichnen.

Aber beim Vereinigen von Lösungen antagonistisch geladener Polyelektrolyte, wie etwa Na-alginat und Polyglucosamin-Hydrochlorid entsteht an ihrer Berührungsfläche eine für beide Partner undurchlässige Membran. Daher kann im Gegensatz zur

Ionotropie das Gegenion nicht eindiffundieren. Auf diese Weise kann man also symplexionotrope Gele und Membranen nicht darstellen. Wird ein konzentriertes Sol oder eine Lösung des einen Polyelektrolyten einem verdünnten Sol des Partners hinzugefügt, dann kann, die gegenseitige Flockung und Symplexbildung der Partner einige Zeit andauern, da der kolloidosmotische Druck die primär gebildete Membran sprengt. Neue Membranen werden gebildet, die wiederum zerreißen, bis schließlich der osmotische Druck nicht mehr ausreicht und die Reaktion zum Stillstand kommt. Wir erhielten so zwar doppelbrechende, jedoch im Gegensatz zu ionotropen Gelen erwartungsgemäß unregelmäßige Strukturen.

Dagegen werden Gele mit geordneten Teilchen erhalten, wenn man einer Lösung von Alginsäureglykolester ($c = 0,4$) zentral 0,4 ml Polyäthylenimin ($c = 6,9$) zufügt. Zunächst am Rande der Eintropfstelle, dann fortschreitend wird der Polyester verseift durch die Polybase, welche sogleich mit dem verseiften Anteil reagiert und ein ionotropes Gel bildet.

Schon früher war gefunden worden, daß zur Bildung ionotroper Gele nicht immer die Gegenionen eindiffundieren müssen, sondern sie können bereits in der Lösung des Polyelektrolyten latent vorhanden sein. Es kann etwa als ein komplexes, nicht flockendes Ion vorliegen. Wird nun durch Eindiffundieren geeigneter Ionen, welche selbst nicht ausrichten, wohl aber ein Gel bilden, dieser Komplex zerstört, erfolgt Bildung eines ionotropen Gels durch die freigebliebenen Gegenionen, als ob diese eindiffundiert wären. Ein Beispiel veranschaulicht dies:

Die Kupfer-, Nickel- und Silbersalze der Alginsäure sind schwer löslich. Diffundieren diese Ionen in ein Sol von Na-alginat, so werden geordnete, ionotrope Gele gebildet. Dagegen sind die Salze der Aminkomplexe dieser Metalle mit Alginsäure wasserlöslich. Mit einer ausreichenden Menge Ammoniak wird die Gelbildung verhindert oder bereits entstandenes Metallalginat wieder gelöst^{11, 12}. Läßt man nun H-Ionen in eine Lösung von Kupfertetramminalginat eindiffundieren, so wird der Aminkomplex zerstört. Es werden Cu-Ionen in Freiheit gesetzt, welche ein doppelbrechendes Gel entstehen lassen. Vorzeichen und Betrag der Doppelbrechung entsprechen dem bei ionotropen Gelen ge-

¹⁰ H. THIELE u. L. LANGMAACK, Naturwissenschaften 43, 56 [1956] und Dissertation L. LANGMAACK, Kiel 1956.

¹¹ R. JOHNSTON u. E. G. V. PERCIVAL, J. chem. Soc. [London] 1950, 1994.

¹² R. H. MACDOWELL, Properties of Alginates, London 1955.

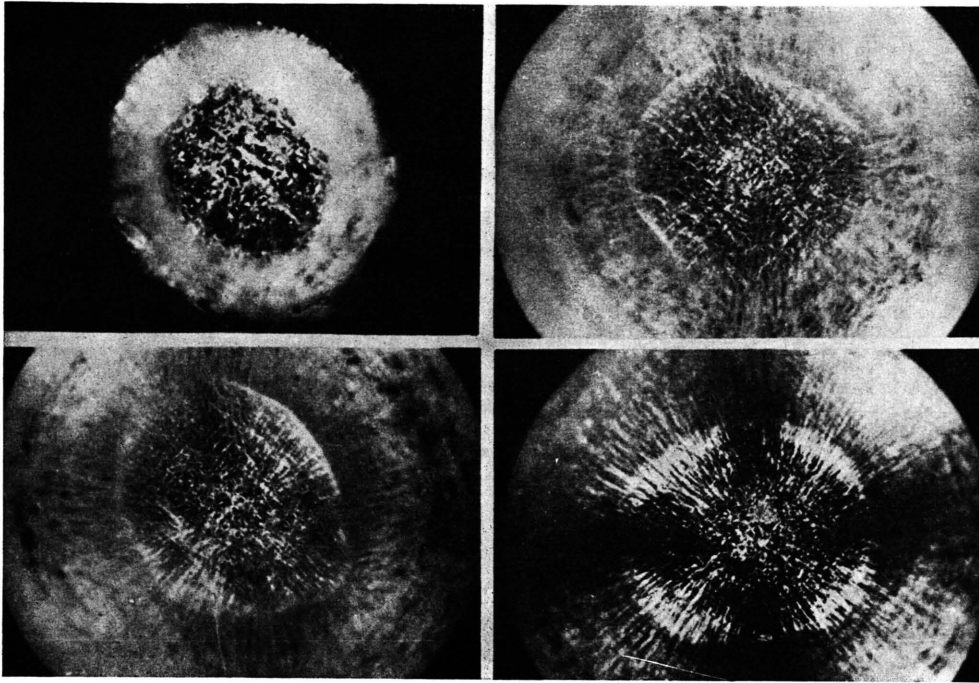


Abb. 2. Einfluß der H-ionenkonzentration bei Symplexen aus Alginsäure und Hydroxyäthylpolyglucosamin, polar. Licht, Nicols +, 5-fach.

die Doppelbrechung völlig verdecken kann, wie andere Versuche ergaben. Die durch eine Trübung verdeckte Doppelbrechung haben wir auf folgende Weise nachgewiesen. Die Symplexgele wurden gleichmäßig zwei Std. gewässert, danach das Wasser durch HCl verdrängt und die Gele in gleichmäßige Quellungszustände gebracht und folgende Werte gemessen: 0,2-n. = +41 m μ , 0,5-n. = +48 m μ und 1-n. = 50 m μ .

Bei der Bildung eines Symplexgels durch zentrifugale Ionendiffusion wird die Diffusionsgeschwindigkeit durch die Umwandlung vom Sol in das Gel kaum verändert*. Also fällt die H-ionenkonzentration von innen nach außen mit der sechsten Potenz der Strecke vom Zentrum**.

Dadurch nimmt die Doppelbrechung nach außen hin ab. Durch zunehmende Annäherung an den IEP des Symplexes nimmt die Entquellung zu, damit steigt die Trübung an. Sind die verfügbaren H-ionen verbraucht, kommt die Reaktion zum Stillstand (Bild links oben).

Während hier meßbare Werte erst mit 1-n. HCl zu erhalten waren, genügen bei anderen Systemen wesentlich geringere Säurekonzentrationen. Bei Alginsäure mit Gelatine konnten Ausrichtungen noch beobachtet werden, wenn einer Lösung vom $p_H=6$ mit 0,25 g/100 ml Gelatine und 0,05 g/100 ml Nalginat nur ein Tropfen einer 0,001-n. HCl hinzugefügt wurde. Allerdings war der gebildete anisotrope Symplex nicht sehr ausgedehnt und löste sich später durch die Pufferwirkung im Sol wieder auf.

Stets erfolgt bei Symplexen im optimalen p_H -Bereich eine maximale Entquellung, aber diese ist bei verschiedenen Komponenten verschieden stark. Sie führt bei einzelnen Symplexen selbst bei maximaler Dehydratation nicht zu einer die Doppelbrechung überdeckenden Trübung, da sie hierfür nicht ausreicht. Die Hauptursachen hierfür sehen wir in hier wirksam werdenden sterischen Faktoren durch verschiedene Abmessungen und Ladungsabstände der einzelnen Polyelektrolyt-Moleküle. Ein gutes Aufeinanderpassen wird starke Dehydratation zur

* In bis zu 5-proz. Gelatingelen diffundiert NaCl mit gleicher Geschwindigkeit wie in Wasser nach BECHOLD und ZIEGLER.

** Durch Bindung der H-ionen.

Folge haben, wie sie beim Symplex aus Alginsäure und Hydroxyäthylpolyglucosamin offenbar gegeben ist.

Wir können die beobachtete Entquellung auch in anderer Weise darstellen. Nach FEINSCHMIDT¹³ haben Symplexe einen eigenen IEP. Da Proteine an ihrem IEP minimal quellen, können wir das Verhalten von Symplexen mit dem von Proteinen vergleichen und kommen zu folgendem Bild:

Komplexkoazervate aus Arabinsäure und Polyglucosamin oder Aminoäthylarabinsäureamid würden Albuminen oder Gelatine entsprechen, da sie an ihrem IEP löslich sind, wenn auch erst bei erhöhter Temperatur. Der Vergleich ist nicht so abwegig, wenn man bedenkt, daß auch isoelektrische Gelatine sich erst beim Erwärmen löst. Andernfalls erfolgt nur eine dem Komplexkoazervat entsprechende maximale Quellung. Weiter wird beim Aussalzen beide Male eine flüssige Phase abgeschieden. Ferner zeigen salzfreie isoelektrische Gelatinelösungen ebenfalls eine beim Erwärmen verschwindende und beim Abkühlen wiederauftretende Trübung. Durch Neutralsalze verschwindet diese Trübung, lipidfreies natives Ovalbumin löst sich dann ebenso wie die Komplexkoazervate.

Symplexe wie etwa Carraghensäure-Hydroxyäthylpolyglucosamin sind beiderseits ihres IEP sowie durch Neutralsalze löslich, sie würden natürlichen Globulinen ähnlich sein. Symplexe aus Carraghensäure und Polyglucosamin oder Alginsäure und Hydroxyäthylpolyglucosamin sind nur auf einer Seite ihres IEP und durch Neutralsalze zu lösen. Der letztere Symplex wäre ein Modell für Zein oder Fibrin, die nicht durch Säure, wohl aber durch Lauge gelöst werden. Wird eine solche alkalische Lösung des Symplexes oder dieser Proteine angesäuert, flocken sie im IEP und lösen sich im Säureüberschuß. Als ein Modell für die Skleroproteine könnte man Symplexe aus Polyacrylsäure und Polyäthylenimin nach Anvernetzung nehmen. Wir untersuchten den unvernetzten Symplex, welcher bei p_H 2–3 und bei p_H 12–13 löslich war. Beim Anquellen des stark dehydratisierten ionotropen Symplexes fanden wir kein Verschwinden der Trübung, aber mit stärkeren Quellungsmitteln wie Phenol, Formamid und Thio glykolsäure gelang es, die Doppelbrechung zu erkennen. Diese Quellungsmittel verwendet man auch für Skleroproteine.

Aus Alginsäure und Polyglucosamin wurden ionotrope Symplexgele dargestellt und dabei das Amin partiell abgebaut oder partiell desaminiert. Zum Vergleich wurden in Abb. 3 die Ordnungsgrade als Gangunterschied dargestellt in bezug auf den Cu-amminkomplex und gefunden, daß eine Ähnlichkeit im Verlauf der Kurven unsere Auffassung bestätigt.

In jedem System steigt der Grad der Ordnung bis zu einem Endwert bei Äquivalenz der Partner. Mit einer Komponente im Überschuß erfolgt zwar stärkere Dehydratation und zunehmende Trübung, aber keine Änderung der Doppelbrechung. Während bei Basenüberschuß vorwiegend Gele mit radialen Kapillaren entstehen, ergaben äquivalente Mengen mehr tangential, sogar gröbere Membranen, die bei weiterer Steigerung der Basenkonzentration zunehmend vernetzt erschienen.

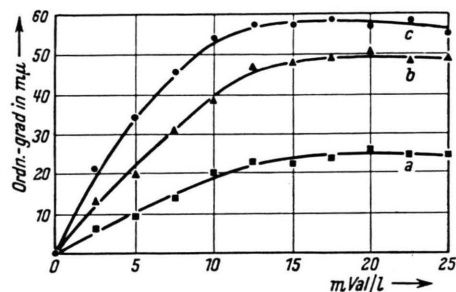


Abb. 3. Cu-alginat = a, Alginsäure, part. abgeb. mit Polyglucosamin = b, Alginsäure mit part. desam. Polyglucosamin = c, Konz. der Alginsäure konstant = 12,5 mVal/l (0,24 g pro 100 ml). Konzentration der Komponente steigend von 0–25 mVal/l.

Aus partiell abgebauter Alginsäure und Polyglucosamin wurden anisotrope Gele aus den sauren Symplexlösungen erhalten, aber nicht weiter untersucht, da bereits das Polyglucosamin allein mit NaOH anisotrope Gele bildete. Carraghensäure und Hydroxyäthylpolyglucosamin sind für sich allein nur schwer zu dehydratisieren. Symplexlösungen beider ergaben anisotrope Gele bei p_H -Werten zwischen 3 und 8, und zwar sowohl aus den sauren wie auch den alkalischen Lösungen durch OH-Ionen und entsprechend durch H-Ionen.

Symplexlösungen mit den p_H -Werten 1,5 und 10 und Konzentrationen von 10 mVal/l für jede Komponente wurden frontal ausgerichtet durch Eindiffundieren von 0,01-n. NaOH oder 0,01-n. HCl. Im ersten Fall wurde gemessen +4,5 mμ und im zweiten Fall +4,0 mμ bei 1 mm Schichtdicke des Gels in Kammern aus planparallelen, isotropen Glasplatten.

Überschuß von Hydroxyäthylpolyglucosamin ergab eine starke Dehydratation der Symplexe bis zum Erscheinen von einzelnen doppelbrechenden Fäden.

Auch aus zwei synthetischen Polyelektrolyten im Symplex wurden doppelbrechende Gele erhalten.

Aus den Lösungen von je 80 mVal/l Polyacrylsäure und Polyäthylenimin bei p_H -Werten von 1,5 und 13 wurden durch Eindiffundieren von 1-n. NaOH oder 1-n.

¹³ J. FEINSCHMIDT, Biochem. Z. 38, 244 [1912].

HCl ionotrope Symplexe erhalten. Diese lösten sich wieder in der nachdiffundierenden Säure oder Base. Dies wurde nicht abgewartet, sondern der Versuch unterbrochen und die stark weißlich-trüben Gele durch Auswaschen mit Wasser von Elektrolyt befreit und dann in verflüssigtem Phenol oder Formamid angequollen.

Weiter haben wir ionotrope Symplexegele aus Polyampholyten mit Polysäuren oder Polybasen dargestellt. Am Beispiel von Gelatine mit Chondroi-

Eindiffundieren von 0,1-n. HCl und von 0,025-n. NaOH Gele dargestellt.

Natives Ovalbumin ergab ziemlich regellose Strukturen mit geringer Doppelbrechung, also niederem Grad der Orientierung. Dagegen ergab hitzedenaturiertes Albumin stark doppelbrechende Gele. Diese Unterschiede sind durch den bekannten Übergang von globulär in fibrillär beim Denaturieren des Ovalbumins hinreichend zu erklären.

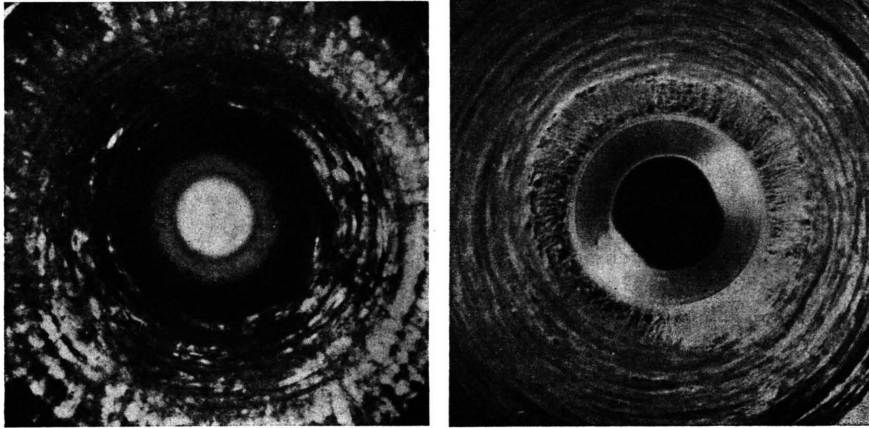


Abb. 4. Symplexegele aus Ovalbumin und Alginat, geordnet durch Eindiffundieren von H⁺-ionen, links nativ, rechts denaturiert. Auffallendes Licht, 1,5-fach.

tinschwefelsäure wurde die Abhängigkeit der Ordnung von der Kettenlänge des einen Partners gezeigt. Hierzu war Gelatine durch Einwirkung von rohem Trypsin abgebaut, als Gegenkomponente diente einmal Chondroitinschwefelsäure und dann Hydroxyäthylpolyglucosamin, einmal bei p_H 7 und dann bei 3. Auf der anderen Seite wurde das Amphi-Ion unverändert gelassen und die Polysäure abgebaut. Hierzu diente Hyaluronsäure, welche durch Hyaluronidase schrittweise abgebaut wurde. Unterhalb einem Mol.-Gew. von 1500 erfolgte keine Symplexbildung mehr. Allgemein können Symplexe mit kürzerer Kette ionotrope Gele mit höherem Grad der Ordnung ergeben, bis dann der Einfluß der zu stark abnehmenden Kettenlänge störend bemerkbar wird.

Die Eigenschaften der Symplexe fanden wir in starkem Maße davon abhängig, ob das Protein im nativen Zustand vorlag oder ob es denaturiert war, wie die beim Denaturieren erfolgende Gestaltsänderung erwarten ließ.

Lösungen von nativem und von hitzedenaturiertem Ovalbumin bei p_H 8 wurden äquivalente Mengen von Na-alginat hinzugefügt und die optimalen Bedingungen gesucht. Dann wurden aus den Symplexlösungen durch

Abb. 4 zeigt 2 Gele aus je 10 mVal/l Ovalbumin und Alginat erhalten durch 0,1-n. HCl, das linke Bild mit nativem Albumin und das rechte Bild mit hitzedenaturiertem Albumin. Das rechte Gel hatte eine glänzende innere Zone mit radialer Strukturierung von Kapillaren. Darauf folgte nach außen scharfes Umschlagen in eine zweite, ebenfalls stark doppelbrechende Zone mit größeren, tangentialen Membranen.

An dem gleichen System wurde die Abhängigkeit der Doppelbrechung vom Konzentrations-Verhältnis der Partner und vom p_H -Wert gemessen und in Abb. 5 graphisch dargestellt. Abb. 5 zeigt 1. die Doppelbrechung der Symplexe aus nativem = A und vom hitzedenaturierten Ovalbumin = B mit Alginat abhängig vom p_H -Wert. 2. Die Doppelbrechung gemessen an Symplexen aus nativem = a sowie hitzedenaturiertem = b Ovalbumin und Alginat in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration bei konstanter Alginatkonzentration und bei p_H 3. Die Werte der Gangunterschiede sind alle positiv und beziehen sich auf jeweils mit 4 ml Reaktionsgemisch entsprechend 2,5 mm Schichtdicke erhaltene Symplexe.

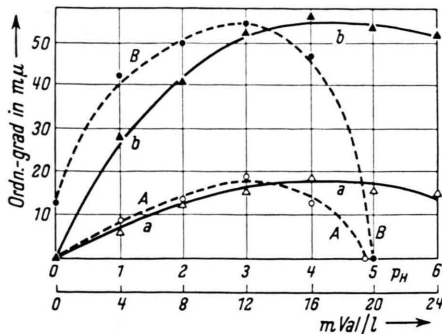


Abb. 5. Grad der Ordnung, pH -Wert und Protein-Konzentration beim Symplex Ovalbumin-Alginsäure.

Aus dem Verlauf der Kurven ersieht man, daß
1. bei Symplexen aus hitzdenaturiertem Ovalbumin die Doppelbrechung 3–4-mal stärker ist als bei Symplexen aus nativem Albumin.

2. Die Orientierung steigt mit zunehmender Albumin-Konzentration bis zu einem Maximum bei einem wenig über Äquivalenz liegenden Quotienten und

3. Die Orientierung ist maximal beim pH -Wert 3.

Gele schlechthin sind nach REIMER¹⁴ homogene Festkörper im rheologischen Sinn. Diese Definition reicht nicht aus für geordnete Symplexgele, welche aus zwei ineinander gestellten, geordneten Raumnetzen bestehen. In manchen Fällen kann eine Komponente für sich aus dem Verband herausgelöst werden, dabei bleibt der Partner für sich geordnet zurück. Hierfür lassen sich bestimmte Verfahren zum Trennen von heteropolaren Symplexen anwenden, im Einzelfall muß die Methode empirisch ermittelt werden. Ist die Konzentration oder die Schichtdicke groß, sollten womöglich fermentative Verfahren verwendet werden.

In Abb. 6 sind schematisch der Aufbau solcher ionotropen Symplexgele und die Trennung der einzelnen Partner zusammengestellt.

Aus Lösungen mit je 20 mVal/l Ovalbumin und Alginat vom pH -Wert 8 wurden mit 0,2-n. HCl die Symplexgele dargestellt, dann mit Wasser ausgewaschen und unter HCl beim pH -Wert 3 die Werte der Doppelbrechung gemessen. Darauf wurde erneut mit Wasser ausgewaschen und die zweite Komponente auf verschiedene Weise aus dem Gelverband herausgelöst. Zur Entfernung des Proteinanteils wurden die Gele wiederholt mit 0,1-n. $Ca(OH)_2$ behandelt, das gebildete Gel von Ca-alginat mit Wasser gewaschen und mit 0,1-n. HCl in Alginsäure umgewandelt.

Zum Entfernen der Alginsäure wurde zunächst das Albumin durch 10-proz. Formaldehydlösung unlöslich

gemacht. Danach wurde mit Wasser gewaschen und die Alginsäure durch 0,5 n. Na_2HPO_4 herausgelöst. Die vollständige Entfernung der anderen Komponente wurde wie folgt sichergestellt. Beim isolierten Alginsäuregel war die Xanthoprotein-Reaktion negativ. Das isolierte Albumingel wurde mit Cu-tetrammin behandelt, mit Wasser gewaschen und zentral ein Tropfen 0,2-n. HCl aufgebracht. Nach 6 Stdn. wurde das Gel mit Wasser wiederholt gewaschen, der ursprüngliche Gangunterschied war unverändert geblieben, also keine Alginsäure mehr vorhanden.

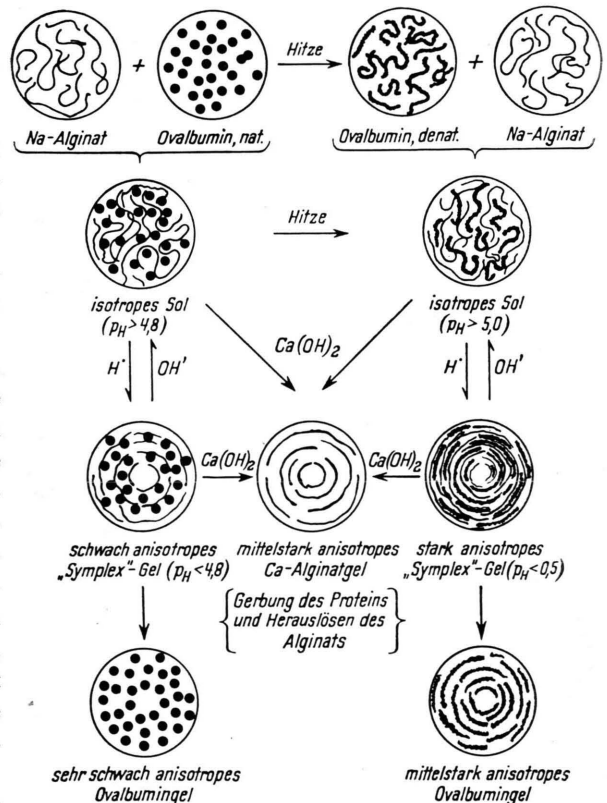


Abb. 6. Ionotrope Symplexgele aus Ovalbumin und Alginat, schematisch mit Trennen in Komponenten.

Mit je 4 ml Lösung einer Schichtdicke von 2,5 mm entsprechend wurden folgende Gangunterschiede gemessen in Millimikron:

1. Alginat + natives Albumin daraus isoliert	14
a) Alginsäure	13
b) Albumin	4
2. Alginat + denaturiertes Albumin daraus isoliert	54
a) Alginsäure	31
b) Albumin	17

¹⁴ M. REIMER, Twelve Lectures on Theoretical Rheology, Amsterdam 1949.

Die schwache Doppelbrechung beim nativen Albumin erklärt sich daraus, daß genau genommen keine globuläre Struktur vorliegt, sondern diese Makromoleküle Rotationsellipsoide sind und exakter so gezeichnet werden müßten.

Aus einem halbsynthetischen Ampholyten, dem Carboxymethylpolyglucosamin, wurden aus alkalischen Lösungen von p_H 8 bei $c = 22 \text{ mVal/l}$ mit 0,5-n. HCl und aus sauren Lösungen mit NaOH nach dem Auswaschen mit Wasser und Anquellen mit verflüssigtem Phenol Gele mit Kreuztextur erhalten, die man auch bei biologischen Objekten findet. Aus einer alkalischen Fibrinlösung von p_H 8,5 und mit $c = 4 \text{ g/l}$ wurden mit 0,1-n. HCl schmale Gele erhalten, deren Doppelbrechung nach dem Anquellen in Formamid, Ameisensäure oder Thio glykolsäure sichtbar wurde, hierzu genügt einstündiges Quellenlassen. Ebenso wie die von DUNGERN¹⁵ gezogenen Fibrinfäden war hier das Vorzeichen der Doppelbrechung positiv zur Längsachse.

Auch aus zwei Poly-Ampholyten wie Gelatine und Clupein mit weit auseinander liegenden IEP wurden Gele, auch solche mit mehreren Bildungszentren, erhalten (5 g/l Gelatine + 2 g/l Clupeinmethylesterhydrochlorid mit 0,1-n. NaOH).

Schließlich hätten sich dann auch Symplexegele mit nur einem Polyampholyten darstellen lassen müssen. Bei diesem Sonderfall löst sich aber das gebildete Gel rasch wieder auf. Denn der Polyampholyt ist nur in seinem IEP-Gebiet schwerlöslich, aber die weiter nachdiffundierenden H- oder OH-Ionen bewirken eben dieses Wiederauflösen. Infolgedessen sieht man keine doppelbrechenden Gelflächen, sondern nur doppelbrechende Ringe, deren Breite von der Ausdehnung des isoelektrischen Bereiches abhängt. Wenn man zugleich mit den aufladenden oder umladenden Ionen eine Vernetzung der geordneten Makromoleküle bewirken könnte, wären auch hier doppelbrechende Flächen darzustellen. Läßt man etwa bei Proteinen gerbende Agenzien mit eindiffundieren, so ist deren Diffusionsgeschwindigkeit sehr viel geringer als die der H-Ionen oder OH-Ionen, so daß das Festlegen der Makromoleküle des Proteins nicht rechtzeitig erfolgen kann.

Durch einfaches Eindiffundieren von H-Ionen und OH-Ionen erhielten wir wie erwartet auch Ansätze einer Orientierung in Gelatinegele. Wir mußten hier von Gelen ausgehen, weil Gelatine als isostabiles Protein an seinem IEP gelöst bleibt, aber früher hatten wir gezeigt, daß aus thixotropen Gelen ohne weiteres ionotrope Gele sich bilden können.

Einer unter Erwärmen bereiteten 1-proz. Gelatine wurde 1-n. NaOH bis zum p_H -Wert 7 hinzugefügt und 4 ml in einer Glasschale erstarren gelassen. Gibt man in die Mitte dieses Gels einen Tropfen 0,1-n. HCl, so sieht man nach vier Std. im Polarisationsmikroskop eine schmale ringförmige doppelbrechende Zone.

Aus diesen Beispielen ergibt sich, daß die Symplexionotropie außer von den spezifischen Faktoren im wesentlichen abhängt von der Struktur, der Kettenlänge und der Ladung der Polyelektrolyt-Moleküle. Mindestens ein Partner muß fibrillär gebaut sein. Verringern der Kettenlänge läßt den Grad der Orientierung schließlich bis auf den Wert Null absinken. Beide Komponenten müssen sterisch zueinander passen. Die Ladung des Polyelektrolyten kann sowohl durch teilweises Substituieren, Blockieren oder Entfernen seiner ionischen Gruppen wie auch durch Ändern des p_H -Wertes verringert werden.

Für biologische Systeme und Vorgänge werden häufig Modelle benützt zum besseren Verständnis ihrer Wirkungsweise. Diese Modelle sind anfangs nur rohe Analoga, aber mit zunehmender Erkenntnis verfeinern sie sich und nähern sich dem natürlichen Vorbild. Ein neueres Beispiel ist der Vergleich der Quellungsarbeit vernetzter Polyacrylate mit der Muskelarbeit¹⁶.

Doppelbrechung, Quellung und Ionenaustausch forderten bereits NAEGELI¹⁷ sowie HERZOG und SCHADE für die biologische Substanz, welche nach FREY-WYSSLING¹⁸ als Struktur mit geordneten Gitterbereichen anzusehen ist. Beim Untersuchen von natürlichem Material sowohl pflanzlicher als auch tierischer Herkunft werden diese Eigenschaften stets gefunden.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, solche Strukturen nachzubilden¹⁹, aber die Synthese mizellarer Strukturen gelang erst nach dem Auffinden der Bil-

¹⁵ M. V. DUNGERN, Z. Biol. **98**, 136 [1937].

¹⁶ W. KUHN u. B. HARGITAY, Experientia [Basel] **7**, 1 [1951].

¹⁷ C. V. NAEGELI, Die Mizellartheorie (Ostwalds Klassiker Nr. 227), Leipzig 1928; Pflanzenphysiologische Untersuchungen, Zürich 1858.

¹⁸ A. FREY-WYSSLING, Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate, Berlin 1938, und New York und Amsterdam 1948.

¹⁹ L. RHUMBLER, in Handb. d. biol. method. Abt. IV, Teil 3, ed. Abderhalden, Berlin 1921; R. E. LIESEGANG, Medizin. Kolloidlehre, Dresden 1935.

dung von Gelen mit geordneten Teilchen durch Ionotropie¹⁻¹⁰. Durch Eindiffundieren von Ionen in Polyelektrolyte werden diese unter partieller Entladung und Dehydratation zu anisotropen quellbaren Gelen geordnet. Der Vorgang ist reversibel. Diese Gele können zunächst als Modelle natürlicher Strukturen gelten. Später fanden sich keine Unterschiede zwischen ionotropen Alginatgelen und biologischen Gelstrukturen²⁰.

Nun enthält biologisches Material oft mehr als nur eine Komponente, häufig ist deren Auftreten paarweise, wofür einige Beispiele angeführt seien:

Nucleinsäure mit Proteinen	(Cytoplasma und Chromosomen)
Hyaluronsäure, Chondroitin- od. Mucoitin-schwefelsäure mit Proteinen	(mesenchymales Gewebe)
Actin mit Myosin	(Muskelfibrillen)
Chitin mit Skleroprotein	(Cuticula von Meerestieren und Insekten)
Chitin mit Polysacchariden	(Zellwände höherer Fungus-arten)

Diese wenigen Beispiele könnten leicht vermehrt und ausgedehnt werden, sie mögen aber genügen, um das Vorkommen natürlicher geordneter Strukturen aus zwei makromolekularen Komponenten zu zeigen. Wir können nun unsere synthetischen anisotropen Symplexgele aus zwei Komponenten als Modelle betrachten, zumindest für diejenigen, bei denen eine heteropolare Bindung der Komponenten nachgewiesen ist.

Die Symplexionotropie ist ebenso wie die Ionotropie nicht mit anderen Formen einer Strukturbildung zu verwechseln, worauf mehrfach hingewiesen wurde. Stark wasserhaltige Gele mit Grundlamellen und Breccien können sich nicht durch eine Sphärokristallisation bilden, LIESEGANG-Ringe sind isotrope, feinkristalline Niederschläge. Jedenfalls bilden sich durch einfaches Eindiffundieren von Ionen in Polyelektrolyte aus ungeordneten Komponenten geordnete Strukturen, während sonst eine Reaktion ungeordneter Partner auch zu ungeordneten Produkten führt²¹. Wenn eine Bildung geordneter Gelstrukturen auf diese Weise erfolgen sollte, erscheint uns nun der Weg über die Symplexionotropie wahrscheinlicher denn

1. Die Bildung kann hierbei durch eine geringfügige pH-Änderung vor sich gehen, wie man sie in physiologischen Systemen häufig finden kann. Mehrwertige Gegenionen sind nicht mehr erforderlich, von denen wir nicht wissen, ob sie der lebende Organismus in ausreichenden Konzentrationen lokalisieren kann, aber pH-Änderungen sind sehr häufig.

2. Reversible Sol-Gel-Umwandlungen sind in Organismen häufig, welche wir nun ohne weitere Hilfhypothesen zwanglos im Sinne der Bildung und Wiederauflösung von ionotropen Symplexen deuten können.

3. Biologische Strukturen bestehen häufig aus zwei Komponenten, aber auch native Strukturen aus einer makromolekularen Komponente können über ein Symplexgel gebildet worden sein, wenn, wie gezeigt, die zweite Komponente nachträglich rein chemisch oder fermentativ wieder entfernt worden ist. So könnte in den Algen ein Protein als Partner zur Ausrichtung gedient haben, welches durch papainähnliche Fermente proteolytisch nachher abgebaut worden ist. Damit würde sich ohne weiteres ein geringer Stickstoffgehalt vieler Polyuronsäuren erklären lassen, der früher zur Annahme eines stickstoffhaltigen Alginats geführt hatte.

4. Gele aus geordneten Polyamphi-Ionen könnten als geordnete Unikomplexe ohne eine zweite Komponente lediglich durch pH-Änderung entstanden sein, wenn wir den Mechanismus der Vernetzung kennen würden.

Da sich symplexionotrope Gele und Membranen *in vitro* auch mit nativen Stoffen unter physiologischen Bedingungen bilden können, wie wir gezeigt haben, wäre es von Interesse, unter kritischer und vorsichtiger Behandlung eine Anwendung auf bestimmte morphogenetische Vorgänge und Strukturen zu versuchen. Hierzu ermutigen unter anderem auch die auf dem Symposion über Kapillaren und Interstitien bekannt gewordenen Ergebnisse²², von denen einige am Schluß wörtlich zitiert werden:

„Auch die Zwischensubstanz des Knochens unterscheidet sich im Prinzip nicht von den beschriebenen Zwischensubstanz-Formen. Hier findet man reife Collagenfibrillen im Sinne unserer Definition und zwischen ihnen eine Kittsubstanz, die auch wieder eine erhebliche Menge an Glykoproteiden enthält.“ (WILLI SCHWARZ S. 36.)

„Chondroitinschwefelsäure A aus Knorpel wird erst mit stärkeren Salzlösungen aus ihrer wohl salzartigen Verankerung dissoziiert, während die Chondroitinschwefelsäure B und C aus Haut, Sehnen usw. erst durch schwaches Alkali von ihrer Bindung gelöst werden können.“ (S. 108.)

„In vitro-Versuche ergaben, daß in Gegenwart von Chondroitinschwefelsäure wie mit anderem Polyelektrolyten aus löslich gemachtem Kollagen wieder Fasern ausgefällt werden, die auch röntgenologisch den natürlichen weitgehend gleichen. Möglicherweise werden also

²⁰ H. THIELE u. G. ANDERSEN, Z. Naturforsch. **10b**, 677 [1955].

²¹ F. PATAT, Naturwissenschaften **40**, 325 [1953].

²² Kapillaren und Interstitien, herausgeg. v. H. BARTHEL-SHEIMER u. H. KÜCHMEISTER, Stuttgart 1955.

die Fibrillen auch innerhalb der Bindegewebssubstanz aus löslichen Vorstufen des Kollagens unter Prägung durch die Mukopolysaccharid-Ketten gebildet.“

„Mukopolysaccharid-Ketten sind über ihre sauren Gruppen an basischen Eiweißkörpern verschieden stark verankert, wie schon anlässlich ihrer Herstellung bemerkt wurde. Wegen der festen Bindung über ihre Sulfatgruppen dürften gerade die Chondroitinschwefelsäuren für die Kittfunktion verantwortlich sein.“

„Auch in vitro bilden sich mit unlöslichem Eiweiß (Kollagen bzw. Albumin) salzartige Komplexe, den hierbei entstehenden Muzingerinnseln verdankt die Körperklasse ihren Namen. Bei niedrigen Polymerisationsgraden kommt es nur zu Trübungsreaktionen.“ (H. GIBIAN, S. 110.)

Diese Zwischensubstanz verhält sich demnach genau so, wie wir es von dem einen Partner eines Symplexes erwarten müssen, dessen Komponenten

durch heteropolare oder Ionenbindung vereinigt sind. Sie wird mehr sein müssen als nur Kittsubstanz, nämlich zur Bildung eines ionotropen Symplexes bei der Morphogenese dienen, wie wir in vitro gezeigt haben.

Es ist nicht überflüssig zu erwähnen, daß wir mit den beschriebenen Systemen ebensogut im Modell andere Strukturen, so auch die der kollagenen Knochensubstanz, durch einfache Ionendiffusion aufbauen können, wie es für Alginat gezeigt worden ist (THIELE und ANDERSEN²³).

Diese Arbeit wurde unterstützt durch Mittel vom Fonds der Chemie und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

²³ H. THIELE u. G. ANDERSEN, *Naturwissenschaften* **42**, 389 [1955].

Ring-Zonenschmelzverfahren für organische Substanzen

Von HERMANN SCHILDKNECHT

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen

(Z. Naturforsch. **12 b**, 23—26 [1957]; eingegangen am 16. Oktober 1956)

Es wird ein Zonenschmelzverfahren beschrieben, mit dem man vorzugsweise organische Substanzgemische im Halbmikro- und Mikromaßstab untersuchen kann. Durch ringförmige Anordnung der Kühl- und Heizaggregate kann die im Ring-Substanzschiffchen eingetragene Verbindung bis zum stationären Zustand zonengeschmolzen werden. Die beschriebene Apparatur erlaubt es, unterhalb Raumtemperatur zu arbeiten und in Verbindung mit einem Zählrohr und Zählgerät den Weg einer radioaktiv markierten Beimengung in einem inaktiven Träger kontinuierlich zu verfolgen.

Was als Endprodukt einer Synthese oder der Aufarbeitung biologischen Materials anfällt, ist selten eine reine Verbindung. Meist müssen hartnäckige Begleitstoffe entfernt werden, um die wirklichen physikalisch-chemischen oder auch physiologischen Eigenschaften kennenzulernen bzw. die gewonnenen Substanzen mit schon bekannten Verbindungen eindeutig vergleichen zu können. Die üblichen Reinigungsmethoden sind oft verlustreich und können vollkommen versagen, wenn man nur über sehr geringe Mengen verfügt. Hier wurde nun das von PFANN¹ für die extreme Reinigung von Metallen entwickelte Zonenschmelzverfahren auch im Mikromaßstab bei organischen Verbindungen mit Erfolg angewandt². In jedem Falle wandert dabei langsam eine flüssige Schmelzzone oft mehrmals durch ein festes, kristallines Material. Die darin gelösten Bei-

mengungen verteilen sich dann zwischen der festen und der jeweils anliegenden flüssigen Phase entsprechend dem Verteilungskoeffizienten

$$k = c_{\text{fest}}/c_{\text{flüssig}}.$$

Ist $k > 1$ so reichert sich die Verunreinigung an dem Ende an, das zuerst erstarrt; umgekehrt befinden sich vorzugsweise Beimengungen mit einem $k < 1$ in dem zuletzt erstarrten Ende. Der Effekt der Reinigung ist schon nach wenigen Zonendurchgängen um so größer, je mehr der Verteilungskoeffizient von 1 verschieden ist. Anders muß bei $k \sim 1$ für viele Schmelzzonen gesorgt werden, wenn man die maximalen Möglichkeiten der Methode erschöpfen will. Die Voraussetzungen hierfür sollten durch die im folgenden beschriebene Apparatur geschaffen werden.

¹ W. G. PFANN, *J. Metals*, **4**, 747, 861 [1952].

² G. HESSE u. H. SCHILDKNECHT, *Z. angew. Chem.* **68**, 641 [1956]; R. HANDLEY u. E. F. G. HERINGTON, *Chem. and Ind.* **29**, 304 [1956].