

# ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

68. Jahrgang · Nr. 10 · Seite 345–360 · 21. Mai 1956

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

## Normale und anomale Gefrierpunktserniedrigung

Von Prof. Dr. WERNER KUHN und HEINZ MAJER

Physikalisch-chemische Anstalt der Universität Basel

Die Molekelpfleßen niedrig-, mittel- und hochmolekularer Substanzen werden gerne und ohne Bedenken mit der kryoskopischen Methode bestimmt. Es wird experimentell gezeigt, daß wässrige Systeme, die ein Netzwerk aus Fäden hochpolymerer Stoffe enthalten und die genau den gleichen Dampfdruck besitzen wie reines Wasser, eine anomale „durch Strukturen bedingte“ Gefrierpunktserniedrigung aufweisen. Der Befund wird theoretisch gedeutet und die Formulierung der Gefrierpunktserniedrigung entsprechend präzisiert.

Die kryoskopische Molekulargewichts-Bestimmung beruht auf der einfachen Aussage, daß der Gefrierpunkt einer z. B. wässrigen Lösung diejenige Temperatur ist, bei welcher der Wasserdampfpartialdruck der Flüssigkeit dem Dampfdruck des Eises gleich ist.

Wenn wir eine Schale mit reinem flüssigem Wasser neben eine Schale mit Eiskristallen stellen, dann ist bei 0 °C, wenn der Dampfdruck  $p$  des reinen Wassers mit dem des Eises übereinstimmt, eine Umwandlung von Wasser in Eis und von Eis in Wasser in jeder Richtung ohne Arbeitsleistung möglich; d. h. Eis und Wasser stehen dann miteinander im Gleichgewicht, wenn die Dampfdrücke übereinstimmen.

Dieses Gleichgewicht wird gestört, wenn, etwa durch Auflösen eines Fremdstoffes im Wasser, der Dampfdruck der Flüssigkeit von  $p$  auf  $p'$  erniedrigt wird. Dann wäre ja bei 0 °C der Dampfdruck über der Lösung kleiner als über dem Eis und die Lösung würde dem Eis über die Dampfphase Substanz entziehen. Das Gleichgewicht zwischen Flüssigkeit und Eis wird wieder hergestellt, wenn wir zu einer tieferen Temperatur  $T_0 - \Delta T$  übergehen. Wenn bei  $T_0 - \Delta T$  der Dampfdruck  $p''$  der Lösung mit dem Dampfdruck des Eises  $p''$  übereinstimmt, so ist zwischen Lösung und Eis bei dieser neuen Temperatur Gleichgewicht vorhanden.  $T_0 - \Delta T$  ist also der Gefrierpunkt der Lösung.

Ebenso erkennt man, daß zwei wässrige Lösungen, welche bei der gleichen Temperatur denselben Dampfdruck besitzen, auch denselben Gefrierpunkt haben müssen. Wenn nämlich die Dampfdrücke der Lösungen mit denen des Eises übereinstimmen, so sind beide Lösungen mit dem Eis im Gleichgewicht, andernfalls herrscht bei beiden Lösungen gegenüber dem Eis Ungleichgewicht.

Für Wasser ist die Gefrierpunktserniedrigung  $\Delta T$ , welche eintritt, wenn in 1000 g Wasser  $m$  Gramm einer Substanz vom Molekulargewicht  $M$  aufgelöst werden, sodaß die Konzentration an Fremdstoff  $c$  Mol pro Liter beträgt, bekanntlich gleich

$$\Delta T = 1,86 \cdot \frac{m}{M} = 1,86 \cdot c. \quad (1)$$

Für andere Lösungsmittel als Wasser gelten entsprechende Beziehungen. Diese Beziehungen wurden in weitestem Maße zur Bestimmung von Molekulargewichten bei niedrig-, mittel- und hochmolekularen Substanzen, oder, wenn das Molekulargewicht bekannt war, zur Bestimmung von Konzentrationen, zur Erkennung von Zustandsänderungen, Dissoziationsvorgängen usw., u. a. auch in physiologischen Systemen, etwa im Innern von Zellen, verwendet.

Wir können nun aber Systeme aufbauen, die trotz gleicher Dampfdrücke große Unterschiede im Gefrierpunkt bis zu einigen Grad Celsius aufweisen<sup>1)</sup>. Anomal verhalten sich

z. B. wässrige Systeme, in welchen neben dem Wasser ein von Fäden hochpolymerer Verbindungen gebildetes Netzwerk vorhanden ist.

Ein solches System können wir z. B. dadurch erhalten, daß wir eine ungefähr 8proz. wässrige Lösung, welche gleiche Teile, also je 4% Polyvinylalkohol und Polyacrylsäure enthält, auf einer horizontal gestellten Platte bei Zimmertemperatur eintrocknen lassen und die so erhaltene Folie, oder Streifen davon, unter Belastung mit etwa 100 kg/cm<sup>2</sup> während etwa 30 sec auf 110 °C erhitzen. Durch diese Heißverstreckung erhält man Folien, welche sich in Wasser nicht auflösen, jedoch ein Mehrfaches ihres Gewichtes an Wasser aufnehmen<sup>2)</sup>. Molekelfäden von Polyvinylalkohol und Polyacrylsäure werden durch diese Heißverstreckung teilweise miteinander verknüpft, so daß, ähnlich wie bei der Vulkanisation von Kautschuk, ein räumliches Netzwerk entsteht, welches nicht mehr in Lösung geht, sondern in Wasser zu einem verdünnten Gel aufquillt, welches im wesentlichen aus Wasser besteht, in welchem aber das Wasser von einem äußerst feinen, durch die Molekelfäden des Netzwerks gebildetem Gerüst durchzogen ist (Bild 1).

Wenn man die Folien unmittelbar in destilliertem Wasser quellen läßt, erhält man ein Gel, welches zu ungefähr 75%

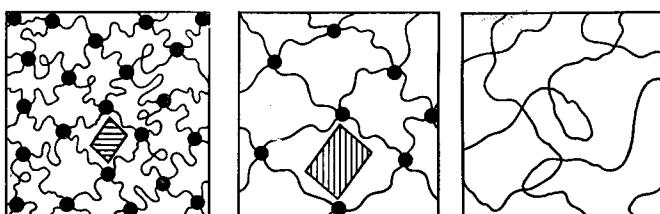


Bild 1  
a) undissoziertes Gel      b) dissoziertes Gel      c) Lösung  
c<sub>Vern. P.</sub> = 8,9 · 10<sup>-3</sup> Mol/l    c<sub>Vern. P.</sub> = 1,4 · 10<sup>-3</sup> Mol/l    c<sub>Vern. P.</sub> = 0  
a = 1,6 · 10<sup>-6</sup> cm            a = 3 · 10<sup>-6</sup> cm            — — —  
ΔT = 2 °C                    ΔT = 0,9 °C                    ΔT = 0  
Charakterisierung und Vergleich der in reinem Wasser zum Gleichgewicht gequollenen Gele und einer Lösung gleicher Konzentration an Fadenmolekülen. Die Vernetzungspunkte sind durch Punkte hervorgehoben. Die Rechtecke veranschaulichen die Größe der in den Gelen möglichen Eiskristalle.

<sup>1)</sup> a) W. Kuhn u. H. Majer: Supplemento a Ricerca sci. 25, Simposio internazionale di chimica n. acron. olecolare [1955]. — b) W. Kuhn u. H. Majer: Z. physik. Chem. 3, 330 [1955]. c) Über entspr. Versuche an benzolischen Kautschukgelen siehe: W. Kuhn, E. Peterli u. H. Majer, J. Polymer Sci. 16, 539 [1955].

<sup>2)</sup> W. Kuhn u. B. Hargitay: Experientia [Basel] 7, 1 [1951]; Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 55, 490 [1951]. W. Kuhn, Z. angew. Physik 4, 108 [1952].

aus Wasser, zu 25% aus Netzwerk besteht, und wenn man dem Wasser eine Spur Alkali zusetzt, ein stärker gequollenes Gel, welches z. B. zu 96% aus Wasser und zu 4% aus Trockensubstanz besteht. In diesem zweiten Falle liegt ein Teil der Polyacrylsäure als Na-Salz vor; das Gel enthält einige Hundertstel Mol Na-Ionen pro Liter<sup>1b)</sup>. Wir werden das durch Quellen in Wasser erhaltene Gel als undissoziiertes Gel, das zweite, in welchem die Polyacrylsäure teilweise ionisiert ist, als dissoziiertes Gel bezeichnen.

Die Gelfäden sind bei beiden Gelarten hochelastisch und verhalten sich in jeder Beziehung ähnlich wie Kautschukfäden. Beim dissozierten Gel genügt z.B. eine Kraft von 17g, um eine Lamelle von 1 mm<sup>2</sup> Querschnitt auf das Doppelte zu dehnen. Es ist möglich, auf Grund der Theorie der Kautschukelastizität aus dem Elastizitätsmodul und übrigens auch aus dem Grade der in Wasser eintretenden Quellung den Vernetzungsgrad des Gels anzugeben<sup>3)</sup>. Die Konzentration der im dissozierten Gel vorliegenden Vernetzungspunkte ergibt sich zu ungefähr  $c_{\text{Vern. P.}} = 1,4 \cdot 10^{-3}$  Mol/Liter. Daraus wiederum folgt, daß der mittlere Abstand zweier die Enden eines Netzbogens festlegenden Vernetzungspunkte im dissozierten Gel etwa  $a = 3 \cdot 10^{-6}$  cm, im undissozierten Gel ungefähr gleich der Hälfte hiervon, nämlich etwa  $a = 1,6 \cdot 10^{-6}$  cm ist (Bild 1).

Selbstverständlich ist es möglich, neben diesen Gelen auch eine wässrige Lösung zu machen, welche Polyvinylalkohol und Polyacrylsäure und gegebenenfalls etwas Alkali, unvernetzt, aber in derselben Konzentration enthält, wie sie z. B. beim dissozierten Gel vorliegt. Man braucht dazu nur die Heißverstreckung zu unterlassen. Die Folien lösen sich dann im Wasser und geben Lösungen, deren Zusammensetzung und Konzentration sich analytisch von der der Gele nicht unterscheiden läßt (Bild 1c). Auch das kryoskopische Verhalten dieser Lösungen wird mit dem kryoskopischen Verhalten der Gele zu vergleichen sein.

Wir wenden uns damit dem kryoskopischen Verhalten dieser Gele zu. Wir betonen, daß man diese Gele mit dem angegebenen Wassergehalt dadurch erhält, daß man die Folien (die dissozierten und auch die undissozierten) in destilliertem Wasser bis zur Sättigung quellen läßt und dabei das Wasser des öfteren erneuert. Wir haben diese Quellung tage- und wochen- oder monateweise stattfinden lassen und so Gele erhalten, welche mit destilliertem Wasser, welches keine analytisch nachweisbaren Mengen von Fremdstoffen enthält, im Gleichgewicht stehen und welche dementsprechend denselben Dampfdruck wie reines destilliertes Wasser besitzen müssen. Daß die Dampfdrücke von Gel und destilliertem Wasser gleich sind, ist nach der langen Berührung des Gels mit dem destillierten Wasser thermodynamisch eine Selbstverständlichkeit; denn wenn das Gel auch nur die winzigste Dampfdruckniedrigung gegenüber dem reinen Wasser besitzen würde, müßte es, auf Grund des kleineren Dampfdruckes, Wasser anziehen und damit seinen Quellungsgrad erhöhen. Daß die Dampfdrücke aber auch wirklich auf  $1/1000$  mm übereinstimmen, haben wir überdies durch eine direkte genaue Messung bestätigt<sup>1b)</sup>.

Obwohl Systeme mit gleichem Dampfdruck auch den gleichen Gefrierpunkt haben sollten, wurde beobachtet, daß die Gefrierpunkte bei weitem nicht übereinstimmen. Während das destillierte Wasser bei 0 °C gefriert, wird beim dissozierten Gel ein Gefrierpunkt von -0,9 °C, beim undissozierten ein Gefrierpunkt von -2,0 °C beobachtet.

<sup>1b)</sup> W. Kuhn, Kolloid-Z. 76, 258 [1936]. W. Kuhn, R. Pasternak u. H. Kuhn, Helv. chim. Acta 30, 1705 [1947]. R. Pasternak u. W. Kuhn, Helv. chim. Acta 31, 340 [1948].

## Experimentelle Bestimmung der Gefriereigenschaften der Gele:

Einer bestimmten Menge des Gels wurden durch ein Kühlbad in gleichen Zeiten kleine, gleich große Wärmemengen entzogen und der zeitliche Verlauf der im Gel-Innern vorhandenen Temperatur beobachtet. Solange in der Probe keine Eisbildung stattfindet, fällt die Temperatur linear ab. Jede ganze oder teilweise Kristallisation gibt sich wegen der freiwerdenden Schmelzwärme durch verlangsamtes Absinken der Temperatur, gegebenenfalls bei Unterkühlung, durch einen Wiederanstieg der Temperatur zu erkennen. Praktisch wurden aus dem Gel ausgestanzte Platten G, sowie ein Thermoelement Th, Th' in einem aus V<sub>4</sub>A-Gaze hergestellten Drahtkörbchen D, D' so untergebracht, daß die Lötstelle des Thermoelementes (in Bild 2 nicht sichtbar) zwischen die Gelplatten zu liegen kam. Die Gelplatten wurden dadurch schwach

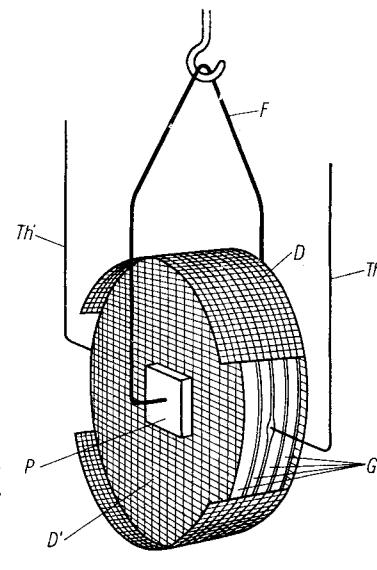


Bild 2  
Halte-Vorrichtung für die zur Gefrierpunktbestimmung benützten Gelproben

[A 723.2]

gegeneinander und gegen das Thermoelement gepreßt, daß die beiden Deckel D, D' des Drahtkörbchens durch eine Stahlfeder F mit einer Kraft von 0,05 g/cm<sup>2</sup> gegeneinander gedrückt wurden. Die Stahlfeder F war dabei durch Plexiglasplättchen P gegen das Gel und das Drahtkörbchen thermisch isoliert. Es erwies sich als günstig, nach dem Einbringen der Gelplatten einen Tropfen destilliertes Wasser zuzugeben, um kleine Hohlräume auszufüllen und die Sättigung des Gels mit Wasser zu gewährleisten.

Die beobachtete Gefrierkurve zeigt Bild 3. Man erkennt zuerst eine Unterkühlung (Kurvanteil A-B), dann einen spontanen Anstieg der Temperatur auf 0 °C (Kurvanteil B-C). Diesem Temperaturanstieg und dem nachfolgenden Kurvanteil C-D entspricht das Gefrieren des außerhalb

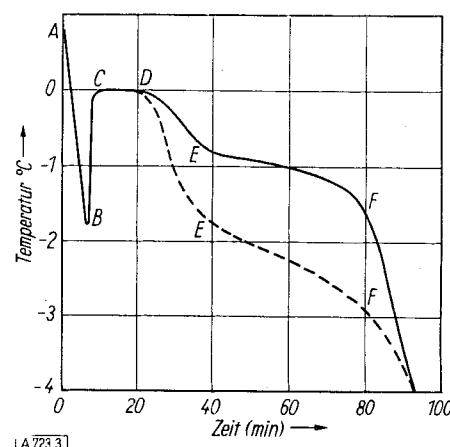


Bild 3  
Gefrierkurve des dissozierten und undissozierten Gels:  
Dissoziertes Gel (96 % Wasser, 2,1 % Polyacrylat, 1,9 % Polyvinylalkohol).  
Undissoziertes Gel (bestehend aus 75 % Wasser, 12,5 % Polyacrylsäure, 12,5 % Polyvinylalkohol).

des Gels befindlichen freien Wassers. Daß dies richtig ist, folgt daraus, daß der Kurventeil C-D vollständig unterdrückt werden kann, wenn man freies Wasser in den Hohlräumen außerhalb des Gels etwa durch Einbringen der gequollenen Gelplatten in Paraffinöl ausschließt. Nach dem Kurventeil C-D fällt die Temperatur etwas rascher ab, und dann erfolgt im Kurventeil E-F ein sehr langsamer Temperaturabfall, in welchem also viel Kristallisierungswärme aus dem Gel freigesetzt wird. Schließlich fällt, vom Punkte F an, die Temperatur wieder rasch ab.

Aus den Abkühlungskurven kann man auf die relative Menge des in den verschiedenen Temperaturgebieten kristallisierenden Wassers schließen (s. Bild 4). Hier bedeutet

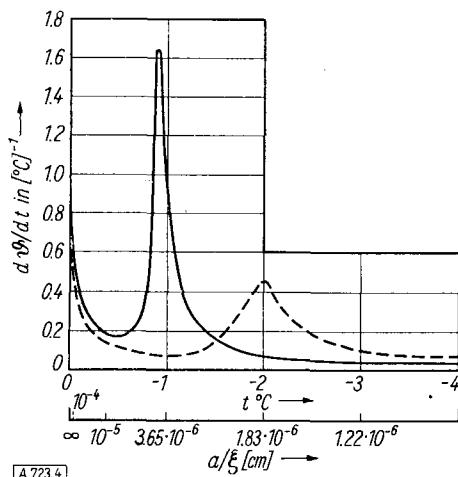


Bild 4

$\frac{d\theta}{dt}$  = relative Menge des pro Grad Temperaturerniedrigung zur Kristallisation gelangenden Wassers. — Dissoziertes Gel (Polyvinylalkohol + Na-Polyacrylat, 96 % Wasser). - - - Undissoziertes Gel (Polyvinylalkohol + Polyacrylsäure, 75 % Wasser)

$\frac{d\theta}{dt}$  die relative Menge des in einem Temperaturintervall  $dt = 1$  ausfrierenden Gel-Eises.  $\frac{d\theta}{dt}$  ist als Ordinate in Abhängigkeit von der Temperatur  $t$  als Abszisse wiedergegeben. Man sieht, daß sich beim dissozierten Gel die Hauptmenge des Gel-Eises in einem engen, bei  $-0,9^\circ$  gelegenen Temperaturintervall abscheidet, beim undissozierten Gel in einem etwas breiteren, bei  $-2^\circ\text{C}$  gelegenen Temperaturintervall.

Somit ist der Gefrierpunkt unserer Systeme, obwohl ihr Dampfdruck mit dem von destilliertem Wasser auf  $1/1000$  mm übereinstimmt, von dem des destillierten Wassers wesentlich verschieden, und auch der Gefrierpunkt der beiden, im übrigen aus derselben Folie gewonnenen Gelproben ist, obwohl ihr Dampfdruck genau übereinstimmt, verschieden. Wenn wir die Gefrierpunktserniedrigung im dissozierten Gel versuchsweise nach Formel (1) deuten würden, müßten wir der in diesem Gel enthaltenen Substanz ein Molekulargewicht  $M = 83$  zuordnen, der im undissozierten Gel ein Molekulargewicht  $M = 232$ , also Molekulargewichte, wie sie in Wirklichkeit etwa bei Harnstoff oder bei Rohrzucker vorkommen. Daß eine solche Deutung nicht in Frage kommt, wird klar, wenn wir neben dem dissozierten Gel, welches wie erwähnt, 4% Trockensubstanz enthält, eine Lösung betrachten, deren Zusammensetzung analytisch der des dissozierten Gels entspricht. Eine solche Lösung erhalten wir, wenn wir die Heißverstreckung der Folien weglassen. Diese lösen sich dann in Wasser vollständig auf, wobei wir dem Wasser noch eine entsprechende Menge Na-Ionen zusetzen können. Wir finden an dieser Lösung denselben Gefrierpunkt wie bei destilliertem Wasser bis auf eine winzige, im wesentlichen von den

Na-Ionen herrührende Abweichung von einigen hundertstel Graden. Wir haben also beim wässrigen Gel und der wässrigen Lösung zwei Systeme von innerhalb der analytischen Genauigkeit gleicher Zusammensetzung, von gleichem Dampfdruck, aber von vollständig verschiedenem Gefrierpunkt.

Offenbar kann die beim Gel beobachtete Gefrierpunktssdepression keinesfalls auf die von der gelösten Substanz auf das Lösungsmittel ausgeübten van der Waalschen Kräfte oder auf eine Hydratisierung der Gelfäden zurückgeführt werden. Die van der Waalschen Kräfte und die Hydratisierung sind ja bei Gel und Lösung gleich. Es ist also die Verknüpfung der Fäden zu einem Netzwerk, welche für die Gefrierpunktserniedrigung im Gel verantwortlich sein muß. Die Zahl der pro Volumeneinheit des Gels vorhandenen Verknüpfungspunkte ist an sich nicht sehr groß; sie beträgt beim dissozierten Gel  $1,4 \cdot 10^{-3}$  Mol/l, beim undissozierten Gel etwa  $8,9 \cdot 10^{-3}$  Mol/l. Wenn wir diese Verknüpfungspunkte als Fremdkörper betrachten würden, kämen wir auf Gefrierpunktserniedrigungen von einigen tausendstel Graden. Es nützt also nichts, den Verknüpfungspunkten an sich eine besondere Wirkung zugeschreiben zu wollen.

Wir werden die Gefrierpunktssdepression besser verstehen, wenn wir versuchen, uns den Vorgang der Eisbildung im Gel etwas genauer vorzustellen. Ein Kristallkeim kann innerhalb des Netzwerks nur solange ungestört wachsen, bis er mit einem der Netzfäden in Berührung gerät (s. Bild 3). Dann hört entweder der Kristall zu wachsen auf oder der Faden muß ausweichen. Letzteres geschieht in der Lösung der nicht miteinander vernetzten Fäden infolge der Brownschen Bewegung, aber nicht im Gel. Im Gel muß entweder der Netzbogen gesprengt werden, wozu besondere Kräfte notwendig sind, oder aber das Wachstum des Kristalls kommt zum Stillstand. Letzteres bedeutet offenbar, daß aus dem im Gel vorhandenen Wasser, im Innern des Gels jedenfalls, nur Mikro- aber keine Makro-Eiskristalle gebildet werden können.

Ein Mikroeskristall muß in Analogie zu kleinen Wasserpflöpfchen einen größeren Dampfdruck und also einen tieferen Schmelzpunkt als ein Makroeskristall besitzen<sup>4)</sup>. Man findet, daß ein Mikroeskristall, dessen Kantenlänge gleich  $a$  (oder dessen Volumen gleich  $a^3$ ) ist, um einen Betrag  $\delta T$  tiefer schmilzt als ein Makroeskristall, dessen Kantenlänge  $a$  praktisch  $\infty$  groß ist, und daß dieser Betrag  $\delta T$  proportional der Grenzflächenspannung  $\sigma_{fl, fest}$  des Eises gegen flüssiges Wasser und umgekehrt proportional der Kantenlänge  $a$  des Eiskristalles ist; in Formeln:

$$\delta T \sim \frac{\sigma_{fl, fest}}{a}$$

Die Grenzflächenspannung von Eis gegen flüssiges Wasser ist interessanter- und merkwürdigerweise nicht bekannt. Wir können sie aus der Grenzflächenspannung von Wasser gegen Luft, die ungefähr  $80 \text{ Erg/cm}^2$  beträgt, schätzen. Da die Dichten von Eis und Wasser um 10% voneinander verschieden sind, können wir die Grenzflächenspannung von Eis gegen Wasser etwa gleich  $1/10$  der Grenzflächenspannung des Wassers gegen Luft, sagen wir  $\sigma_{fl, fest} \sim 10 \text{ Erg/cm}^2$  setzen. Wenn wir die übrigen für das System Eis-Wasser geltenden Zahlenwerte einsetzen, so wird

$$\delta T = \frac{3,65 \cdot 10^{-6}}{a} \xi ; \quad a = \frac{3,65 \cdot 10^{-6}}{\delta T} \xi . \quad (2)$$

Der Faktor  $\xi$  hängt von der Kristallform ab, und ist 1, wenn die Kristalle Würfel oder nahezu Würfel bilden.

<sup>4)</sup> Ausführlich in Z. physik. Chem. im Druck, s. auch <sup>1)</sup>.

Wir setzen nun die Kantenlänge  $a$  der in dem Gel möglichen Kristalle ungefähr gleich dem Abstande der in dem Gel vorhandenen Vernetzungspunkte, welcher ja aus dem Elastizitätsmodul berechnet werden konnte. Wenn wir diesen Wert in (2) einsetzen, und wenn wir  $\xi = 1$  setzen, so erhalten wir für das dissozierte Gel  $\delta T = 1,2^\circ\text{C}$ , während  $0,9^\circ\text{C}$  beobachtet wurden, und für das undissozierte Gel  $\delta T = 2,3^\circ\text{C}$ , gegenüber einem beobachteten Wert von  $2,0^\circ\text{C}$ . Man sieht, daß die berechneten Zahlen mit den beobachteten ungefähr übereinstimmen. Wir glauben daher nicht, daß an der Richtigkeit der Deutung dieser Versuche ein Zweifel möglich ist.

Wir fragen nun, wie sich diese Beobachtungen auf die Kryoskopie und die Auswertung kryoskopischer Messungen im allgemeinen auswirken. Für Systeme, in welchen infolge Vorhandenseins molekularer Netzstrukturen keine makroskopischen, sondern nur mikroskopische Kristalle des Lösungsmittels möglich sind, gilt der Satz, wonach Systeme mit gleichem Dampfdruck denselben Schmelzpunkt haben, im allgemeinen nicht. Man kann den Gefrierpunkt weiterhin als die Temperatur definieren, bei welcher Flüssigkeit und Eis den gleichen Dampfdruck besitzen, muß dann aber beachten, daß der Dampfdruck des Eises von der im System möglichen Größe der Eiskristalle abhängt. Damit wird die Gefrierpunktserniedrigung nicht nur eine Funktion der Dampfdruckerniedrigung, welche durch die im System gelösten Stoffe bewirkt wird, sondern zudem eine Funktion der Größe der im System möglichen Kristalle. Die Beziehung (1) ist in Systemen, in welchen die Größe der zur Ausscheidung gelangenden Eiskristalle begrenzt ist, unrichtig. Sie ist für Wasser zu ersetzen durch die Beziehung

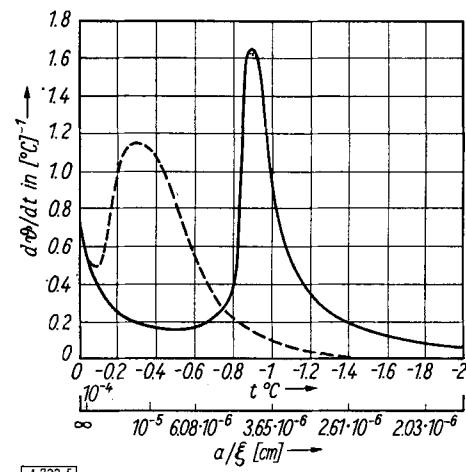
$$\delta T = 1,86 \frac{m}{M} + \frac{3,65 \cdot 10^{-6}}{a} \xi \quad (3)$$

und für nichtwässerige Systeme durch eine entsprechende Beziehung mit geänderten Zahlenkoeffizienten. D. h. die tatsächliche Gefrierpunktserniedrigung ist die Summe eines Beitrages, welcher von der Menge und dem Molgewicht der gelösten Stoffe herrührt, und eines Beitrages, welcher durch die Größe (Kantenlänge)  $a$  der im System möglichen Kristalle bestimmt wird. In Gelen, welche von Fadenmolekülen gebildete Netzstrukturen enthalten, kann der zweite Summand mehrere Grade ausmachen; die einfache Formel (1) ist dann unbrauchbar und irreführend. Wir können in diesen Systemen mit Hilfe der Gefrierpunktserniedrigung keine Molekulargewichte oder Konzentrationen mehr bestimmen. Dagegen können wir bei bekannten Konzentrationen aus der Beziehung (3) die Größe der im System möglichen Kristalle und damit gewisse Parameter der im System vorhandenen Netzstrukturen erhalten.

Ein Beispiel hierfür bieten die an unserem System, oder auch insbes. die an physiologischen Objekten auftretenden Gefrierschäden. Wenn wir dem System, nachdem die mit dem intakten Netzwerk verträgliche Kristallgröße erreicht ist, weiter Wärme entziehen, so wird durch weiteres Wachstum der Kristalle auf die Fäden des Netzwerks ein Druck ausgeübt. Dieser Druck führt in vielen Fällen, besonders beim dissozierten Polyacrylsäure-Polyvinylalkohol-Gel, zum Zerreißnen eines Teils der Netzbogen. Das zeigt sich darin, daß beim ersten Abkühlen der Gefrierpunkt wie erwähnt bei  $-0,9^\circ$  liegt, daß aber nach dem Auftauen, erneuten Sättigen mit destilliertem Wasser und Wiederabkühlen beim zweiten Versuch eine nahezu 3 mal kleinere Gefrierpunktserniedrigung von  $0,3^\circ$  beobachtet wird (s. Bild 5).

Im Sinne von Gleichung (2) kann man daraus schließen, daß beim ersten Abkühlen der Gelprobe Gefrierschäden

auftreten, indem ein Teil der Netzbogen zerrissen wird, so daß die Kantenlänge der im Gel möglichen Eiskristalle vom ursprünglichen Werte  $3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}$  (s. Bild 1b)<sup>5)</sup> auf das Dreifache, also auf etwa  $9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}$  hinaufgesetzt wird. Eine



[A 723-5]

Bild 5

Gefrierschäden am dissozierten Polyvinylalkohol-Na-Polyacrylat-Gel.  $\frac{d\Phi}{dt}$  = relative Menge des pro Grad Temperaturerniedrigung zur Kristallisation gelangenden Wassers. — Erste Gefrierkurve. - - - Zweite Gefrierkurve der gleichen Gelprobe, die nach dem Auftauen erneut bis zur Sättigung gewässert war.

einfache Überlegung zeigt, daß hierfür nicht 70%, sondern nur etwa 15 bis 20% der Netzbogen zerrissen zu werden brauchen. In Übereinstimmung damit wird der Elastizitätsmodul des einmal gefrorenen und wieder aufgetauten Gels um etwa 20% kleiner als der ursprüngliche. Auch diese Beobachtung beweist, daß die Methode zuverlässig und die Deutung richtig ist.

Es sei erwähnt, daß z. B. nach J. Pichotka<sup>6)</sup> beim Muskel 2 Gefrierpunkte, einer bei  $-1,4^\circ\text{C}$  und einer bei  $-2,4^\circ\text{C}$  beobachtet werden, während auf Grund des im Muskel vorhandenen Gehaltes an gelösten Stoffen nur eine Gefrierpunktserniedrigung von  $-0,55^\circ\text{C}$  zu erwarten wäre. Die Differenz, also eine Gefrierpunktserniedrigung von 0,85 bzw. von  $1,85^\circ\text{C}$ , dürfte nach Gleichung (2) durch eine Begrenzung der beim Gefrieren des Muskels in der Muskel-fibrille möglichen Kristallgrößen bedingt sein. Der Vergleich der anomalen, durch Strukturen bewirkten Gefrierpunktserniedrigungen des Muskels mit der unserer Polyacrylsäure-Polyvinylalkohol-Gele von 0,9 (für das dissozierte) bzw.  $2,0^\circ\text{C}$  (für das undissozierte) zeigt, daß für beide Systeme, die ja auch im Trockengehalt und hinsichtlich der bei der Kontraktion auftretenden Kräfte weitgehend übereinstimmen, Netzstrukturen von ähnlicher Dimensionierung in Frage kommen<sup>1b)</sup>.

Wir glauben darum, daß bei Systemen, in welchen die Größe der sich bildenden Kristalle begrenzt ist, die Kryoskopie ein wirksames und empfindliches Mittel sein wird, um die Strukturen solcher Systeme und deren Veränderungen durch verschiedene Einwirkungen festzustellen und zu untersuchen.

## Übersicht

Die klassische Methode der kryoskopischen Molekulargewichts- und Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Prinzip bzw. der Annahme, daß der Gefrierpunkt eines z. B. wässrigen Systems durch den Wasserdampfdruck eindeutig festgelegt sei. Systeme, deren Dampfdruck über-

<sup>5)</sup> In Bild 5 sind die aus Formel (2) berechneten  $\alpha/\xi$ -Werte einge tragen. Um vollständige Übereinstimmung mit den aus dem Elastizitätsmodul berechneten, bei Bild 2 angegebenen  $\alpha$ -Werten zu erzielen, mußte  $\xi = 4/3$  gesetzt werden.

<sup>6)</sup> J. Pichotka, Z. Biol. 195, 181 [1952].

einstimmt, sollten hiernach stets denselben Gefrierpunkt haben. Es wird zunächst experimentell gezeigt, daß ein wässriges System, welches ein aus Fäden hochpolymerer Stoffe gebildetes Netzwerk enthält, und welches auf den Tausendstel Millimeter genau denselben Dampfdruck wie destilliertes Wasser besitzt, gegenüber diesem eine Gefrierpunktsdifferenz von 0,9 bzw. 2,0°C aufweist. Diese anomale Depression wird dadurch gedeutet, daß das Netzwerk zwar keine meßbare Dampfdruckerniedrigung bewirkt, aber die Größe der sich im Gel bildenden Eiskristalle begrenzt. Da die Maschenweite des Netzwerks aus dem

Elastizitätsmodul zu 3 bzw.  $1,6 \cdot 10^{-8}$  cm berechnet wurde, läßt sich aus einer geschätzten Grenzflächenspannung zwischen Eis und Wasser die in diesem System zu erwartende „strukturbedingte“ Gefrierpunktserniedrigung berechnen bzw. abschätzen. Berechnung und Beobachtung stimmen gut überein. Ganz allgemein kann man bei solchen Systemen durch die Kryoskopie anstatt oder neben der Konzentration an Fremdstoffen die Abmessung von im System vorhandenen, die Kristallgröße begrenzenden Strukturen und die Veränderung solcher Strukturen feststellen.

Eingegangen am 24. Februar 1956 [A 723]

## Chemie und Biochemie der Neuraminsäure

Von Professor Dr. E. KLENK\*)

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Köln

Neuraminsäure ist ein Baustein mancher Glykolipoide (Ganglioside) und vieler Glykoproteide. Sie kann als gut kristallisierendes Methylglykosid gefaßt werden. Aus Rindersubmaxillaris-Mucin wurde die außerordentlich alkali-empfindliche N-Acetyl-neuraminsäure gewonnen. Das Influenza-Virus spaltet aus Harn-Mucin, das ein starker Virus-Hämagglyutinations-Hemmstoff ist, sowie aus Erythrocytenstroma N-Acetyl-neuraminsäure enzymatisch ab. Die Zellrezeptoren für das Influenza-Virus dürften mit der N-Acetyl-neuraminsäure identisch sein, zumindest aber diese als wesentlichen Bestandteil enthalten. Schließlich werden noch die bisherigen experimentellen Befunde über die Konstitution der Neuraminsäure diskutiert.

Die Neuraminsäure wurde von mir<sup>1)</sup> 1941 als Spaltprodukt der Ganglioside aufgefunden. Diese sind Glykolipoide, welche im Nervengewebe bei der infantilen amaurotischen Idiotie vom Typ Tay-Sachs in abnormen Mengen gespeichert werden, die aber auch normalerweise im Nervengewebe, allerdings in sehr viel kleineren Mengen, vorkommen.

Bei der sauren hydrolytischen Spaltung der Ganglioside wird die Neuraminsäure unter Bildung von Humin-Substanzen vollständig zerstört. Die Spaltung gelingt aber mit methanolischer Salzsäure im Bombenrohr bei 105°C. Die Neuraminsäure läßt sich dann als verhältnismäßig stabiles, gut kristallisierendes Methylglykosid von der Formel  $C_{11}H_{21}NO_9$ , oder vielleicht  $C_{10}H_{19}NO_8$  fassen. Der Neuraminsäure selbst kommt also die Formel  $C_{10}H_{19}NO_9$  (bzw.  $C_9H_{17}NO_8$ ) zu. Nach allem mußte es sich hier um eine bis dahin noch unbekannte, den Kohlenhydraten nahestehende Polyoxyaminosäure handeln, in welcher eine der Alkohol-Gruppen zur Aldehyd- oder Keto-Gruppe oxydiert ist.

Neuraminsäure liefert zwei charakteristische Farbreaktionen. Bei der Bialschen Orcin-Reaktion entsteht ein rotvioletter Farbstoff. Diese Reaktion ist so empfindlich, daß Zucker in der Regel nicht stört. Man kann also mit dieser Reaktion die Neuraminsäure einigermaßen zuverlässig quantitativ bestimmen. Weiter gibt die Neuraminsäure auch eine für acetylierte Aminozucker charakteristische Reaktion. Diese färben sich nach Vorbehandlung mit Alkali beim Erhitzen mit dem Ehrlichschen Aldehydareagens rot. Die Neuraminsäure gibt diese Reaktion bereits ohne Vorbehandlung mit Alkali. Ein Aminozucker ist aber am Aufbau der Neuraminsäure nicht beteiligt. Aminozucker sind im Gegensatz zu den einfachen Zuckern gegen Salzsäure außergewöhnlich beständig. Sie widerstehen selbst mehrstündigem Erhitzen mit konz. Salzsäure, wobei die gewöhnlichen Zucker unter Humin-Bildung restlos zerstört werden. Wenn man das Methylglykosid so behan-

delt, wird es ebenfalls vollständig zerstört. Im Filtrat läßt sich nach Abtrennung der Humin-Substanzen keine Spur eines Aminozuckers feststellen<sup>1,2)</sup>. Überhaupt läßt sich die Neuraminsäure nicht noch weiter in einfachere Komponenten aufspalten.

### N-Acetyl-neuraminsäure

Substanzen, die sich ähnlich wie die Neuraminsäure beim Erhitzen mit verdünnten Säuren unter Humin-Bildung zersetzen und direkt eine Ehrlichsche Reaktion geben, kommen auch in den Mucinen vor. Eine solche Substanz hatte Blix<sup>3)</sup> 1936 aus Rindersubmaxillaris-Mucin durch sehr milde hydrolytische Spaltung erhalten. Es sollte sich um ein Hexosamin-haltiges Disaccharid von saurem Charakter handeln, das zwei Acetyl-Gruppen enthält. 15 Jahre später zweifelte er<sup>4)</sup> daran, ob die Substanz einen Aminozucker enthalten hatte. Er führte für sie jetzt den Namen Sialinsäure ein. Gleichzeitig sprach er auf Grund der Faroreaktionen die Vermutung aus, daß Sialinsäure auch ein Baustein der Ganglioside ist.

Wir<sup>5)</sup> haben deshalb das Submaxillaris-Mucin auf Neuraminsäure geprüft und das Mucin ähnlich wie die Ganglioside mit methanolischer Salzsäure gespalten. In der Tat konnte eine gut kristallisierte Substanz gewonnen werden, die in jeder Hinsicht mit dem Methylglykosid der Neuraminsäure identisch war. Es bestand also durchaus die Möglichkeit, daß es sich bei dem Blixschen Disaccharid um die Diacetyl-Verbindung der Neuraminsäure gehandelt hat, falls überhaupt eine chemisch wohl charakterisierte Verbindung vorlag.

Wir<sup>6)</sup> haben uns deshalb große Mühe gegeben, die Substanz nach der Vorschrift von Blix wieder darzustellen, erhielten aber immer nur amorphe Substanzen, die zwar sehr Neuraminsäure-reich waren, aber niemals kristallini-

1) E. Klenk, Z. physiol. Chemie 268, 50 [1941].

2) E. Klenk, ebenda 288, 216 [1951].

3) G. Blix, ebenda 240, 43 [1936].

4) G. Blix, Acta chem. Scand. 6, 358 [1952].

5) E. Klenk u. K. Lauenstein, Z. physiol. Chemie 291, 147 [1952].

6) E. Klenk u. H. Faillard, ebenda 298, 230 [1954].

\*) Nach einem Vortrag auf der Sitzung v. 10. 2. 1956 der Gesellschaft Deutscher Chemiker Freiburg i. Br.