

**392. C. Endoh, F. E. M. Lange und F. F. Nord: Kryolyse, Diffusion und Teilchengröße, III. Mittel.<sup>1)</sup>: Untersuchungen an Gummi arabicum und Poly-acrylsäure.**

[Aus d. Veterinär-physiolog. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 25. September 1935.)

1) Einleitung.

Auf Grund der früher erhobenen Befunde<sup>2)</sup> konnte in den ersten Mitteilungen dieser Reihe an den Gliedern verschiedenster Körperklassen der Nachweis erbracht werden, daß sowohl lyophile als auch lyophobe Biokolloide unter dem Einfluß des Frostes eine irreversible Desaggregation-Aggregation ihrer Teilchen erleiden. Es oblag uns aber noch, weitere Beweise dafür zu erbringen, daß die durch den Frost bewirkte Veränderung ausschließlich physikalischer Art ist und keineswegs strukturchemischer Natur sein kann.

Es standen uns hierzu zwei Wege offen. Eine strukturchemische Veränderung müßte im Falle einer Verbindung wie z. B. der Poly-acrylsäure, wenn man ihr die von Staudinger und Kohlschütter<sup>3)</sup> angenommene Formel zugrunde legt, durch eine Veränderung der Leitfähigkeit zum Ausdruck kommen.

Andererseits war es erforderlich, noch einen Nachweis dafür zu erbringen, daß die durch eine physikalische Vorbehandlung hervorgerufene Veränderung der bisher als konstant angesehenen Teilchengrößen gewisser Kolloide in allen von uns untersuchten Temperatur-Bereichen unterhalb des Eis-Punktes von Wasser einen irreversiblen Vorgang darstellt. Dieser Beweis konnte weiter dadurch ausgebaut werden, daß wir mit Hilfe der Messung von Diffusionsgeschwindigkeiten von Lösungen lyophiler Kolloide gleicher Konzentration die neu entstandene Teilchengröße derart vergleichen haben, daß wir die Gegenüberstellung nicht nur zwischen den Diffusionsgeschwindigkeiten gefroren gewesener bzw. ungefrorener Lösungen vornahmen, sondern, daß wir gefroren gewesene Lösungen gleicher Konzentrationen durch unmittelbares Frieren mit einer solchen Lösung verglichen haben, die in höherer Konzentration gefroren und nach dem Auftauen auf dieselbe Verdünnung gebracht wurde.

Für die entgegenkommende Förderung der Untersuchung sei der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft, der I.-G.-Chemiker-Hilfe und dem Reichs-Kuratorium für Technik in der Landwirtschaft verbindlich gedankt. Der eine von uns (C. Endoh) ist der Kaiserl. Japan. Regierung für ein Reise-Stipendium, das ihm die Teilnahme an der vorliegenden Untersuchung ermöglichte, zu ergebenstem Dank verpflichtet.

---

<sup>1)</sup> I. u. II. Mittel. F. E. M. Lange u. F. F. Nord, *Biochem. Ztschr.* **278**, 173 und **281**, Heft 4—6 [1935].

<sup>2)</sup> F. F. Nord, O. M. von Ranke-Abonyi u. G. Weiß, *B.* **65**, 1148 [1932]. *Ergebn. d. Enzymforsch.* **2**, 47 [1933]; hier auch weitere Literatur.

<sup>3)</sup> *B.* **64**, 2093 [1931].

2) Leitfähigkeit und konduktometrische Titrationsen von gefrorenen und ungefrorenen Poly-acrylsäure-Lösungen<sup>4)</sup>.

Bei den kolloiden Nicht-elektrolyten wird die Leitfähigkeit in wäßriger Lösung bei gleicher Kolloid-Konzentration durch den Dispersitätsgrad bestimmt. Je mehr Teilchen vorhanden sind, um so mehr ionisierte Teilchen können gebildet werden, und um so besser ist infolgedessen die Leitfähigkeit. Entfällt dagegen der größere Teil der Leitfähigkeit auf die durch Dissoziation gebildeten H-Ionen, so muß man in Übereinstimmung mit unseren früheren Ausführungen<sup>5)</sup> über die Veränderung der Leitfähigkeit durch Frost-Wirkung annehmen, daß in diesem Fall eine Änderung des Dispersitätsgrades keine Änderung der Leitfähigkeit hervorrufen kann. Durch das Gefrieren der Poly-acrylsäure können also der Dispersitätsgrad und damit die kolloid-chemischen Eigenschaften geändert werden, nicht aber ihre Leitfähigkeit, der Dissoziationsgrad und die damit verbundenen strukturchemischen Eigenschaften.

Sämtliche Messungen wurden in einem Thermostaten bei der Temperatur  $24.85^{\circ} \pm 0.05^{\circ}$  ausgeführt. Wir verwendeten für unsere Messungen zwei Leitfähigkeitsgefäße (a und b). In den folgenden Tabellen sind die von uns gemessenen spez. Leitfähigkeiten von verschiedenen Poly-acrylsäure-Lösungen<sup>6)</sup> im ungefrorenen und bei verschiedenen Gefriertemperaturen gefrorenen Zustände angeführt.

Tabelle 1.

0.1-proz. „gelöste“ Poly-acrylsäure, Zelle a.

| Gefriertemperatur | Brücken-Abschnitt | gestöpselter Widerstand | Spez. Leitfhgkt. $\cdot 10^4$ |
|-------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------------|
| ungefroren .....  | 508.4             | 400                     | 1.794                         |
| -17° .....        | 509.5             | 400                     | 1.786                         |
| -79° .....        | 509.1             | 400                     | 1.787                         |

Tabelle 2.

0.1-proz. „gelöste“ Poly-acrylsäure, Zelle b

| Gefriertemperatur | Brücken-Abschnitt | gestöpselter Widerstand | Spez. Leitfhgkt. $\cdot 10^4$ |
|-------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------------|
| -2° .....         | 630               | 2000                    | 1.624                         |
| ungefroren .....  | 624               | 2000                    | 1.668                         |
| -5° .....         | 630               | 2000                    | 1.624                         |
| -17° .....        | 634               | 2000                    | 1.599                         |
| -79° .....        | 631               | 2000                    | 1.615                         |

Tabelle 3.

1-proz. „gelöste“ Poly-acrylsäure, Zelle b.

| Gefriertemperatur | Brücken-Abschnitt | gestöpselter Widerstand | Spez. Leitfhgkt. $\cdot 10^4$ |
|-------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------------|
| ungefroren .....  | 630               | 400                     | 8.15                          |
| -2° .....         | 621.5             | 400                     | 8.45                          |
| -5° .....         | 631               | 400                     | 8.1                           |
| -17° .....        | 637               | 400                     | 7.9                           |
| -79° .....        | 637               | 400                     | 7.9                           |

<sup>4)</sup> Die hier beschriebenen Messungen sind im Physikal.-chem. Institut d. Universität durchgeführt worden. Hrn. Prof. Dr. Bodenstein danken wir auch an dieser Stelle für sein Entgegenkommen. <sup>5)</sup> l. c., Fußnote <sup>3)</sup>, S. 1168. <sup>6)</sup> l. c., Fußnote <sup>1)</sup>, S. 183.

Tabelle 4.

2-proz. „gelöste“ Poly-acrylsäure, Zelle a.

| Gefriertemperatur | Brücken-Abschnitt | gestöpselter Widerstand | Spez. Leitfhgkt. $\cdot 10^8$ |
|-------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------------|
| ungefroren .....  | 388               | 100                     | 1.17                          |
| -79° .....        | 400               | 100                     | 1.113                         |
| -17° .....        | 390               | 100                     | 1.16                          |

Tabelle 5.

2-proz. „gelöste“ Poly-acrylsäure, Zelle b.

| Gefriertemperatur | Brücken-Abschnitt | gestöpselter Widerstand | Spez. Leitfhgkt. $\cdot 10^8$ |
|-------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------------|
| ungefroren .....  | 518               | 400                     | 1.288                         |
| -2° .....         | 503.5             | 400                     | 1.365                         |
| -5° .....         | 498.5             | 400                     | 1.392                         |
| -17° .....        | 488               | 400                     | 1.452                         |
| -79° .....        | 508               | 400                     | 1.341                         |

Die Genauigkeit unserer Leitfähigkeitsmessungen ermittelten wir durch Messung der gleichen KCl-Lösung:

Tabelle 6.

Eine KCl-Lösung, Zelle b. Gestöpselter Widerstand: 400.

|                    |       |      |       |      |      |       |       |
|--------------------|-------|------|-------|------|------|-------|-------|
| a .....            | 452.5 | 464  | 475.5 | 475  | 485  | 477.5 | 491.5 |
| $\cdot 10^8$ ..... | 1.66  | 1.60 | 1.52  | 1.53 | 1.47 | 1.515 | 1.43  |

Aus ihr folgt, daß man bei unseren Messungen mit Schwankungen von etwa 10% rechnen muß. Diese sind auf den Einfluß des Luft-Sauerstoffes und auf die Abwanderung von Ionen aus dem Glas zurückzuführen. Die elektrische Meßeinrichtung gestattete, die Leitfähigkeit mit einer Genauigkeit von 0.18% zu ermitteln. Vier Messungen der Leitfähigkeit einer und derselben Füllung der Zelle (zwischen jeder Messung Veränderung der Brücken-Stellung) ergaben bei einem Rheostaten-Widerstand von 400 Ohm für den Brücken-Abstand jedesmal den Wert  $472 \pm 0.2$ . Das ergibt für die Leitfähigkeit einen größten Fehler von 0.18%. Unsere Messungen der Leitfähigkeit liefern bei gleicher Konzentration und verschiedenen Gefriertemperaturen innerhalb der oben angegebenen Schwankungen übereinstimmende Werte. Die Messungen der Leitfähigkeit von Poly-acrylsäure-Lösungen ergaben also keine Unterschiede zwischen gefrorenen und ungefrorenen Lösungen.

Der Nachweis, daß die rein chemischen Eigenschaften der Poly-acrylsäure unter dem Einfluß des Frostes nicht geändert werden, wird noch besser durch konduktometrische Titrations der Säure erbracht. Wir haben Poly-acrylsäure-Lösungen mit Natronlauge titriert. Die Messungen wurden mit derselben Apparatur in der Zelle b ausgeführt. Der Fehler der Leitfähigkeitsmessung bleibt bei ein und derselben Titration während der Messung konstant, wie aus den Kurvenbildern, welche für ungefroren und gefroren parallele Titrationskurven zeigen, zu ersehen ist.

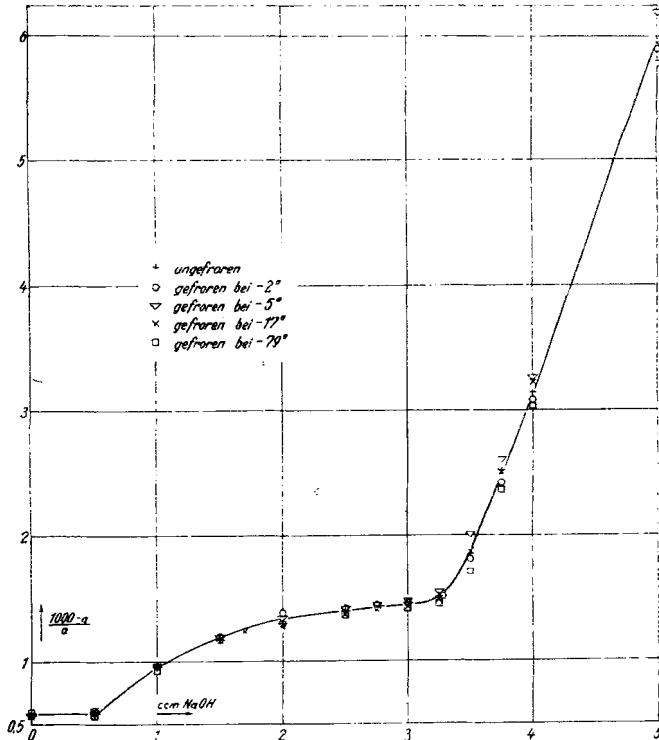


Fig. 1. Konduktometrische Titration von gelöster Poly-acrylsäure. Konzentrat. 0.1 %. Eingeschalteter Widerstand  $R = 2000 \Omega$ .

Die Kurven Nr. 1—5 auf S. 2007—2009 liefern den gleichen Wert für den Neutralpunkt und würden, wenn der Einfluß des Luft-Sauerstoffs und der Löslichkeit des Glases ausgeschaltet wäre, offenbar in eine Kurve zusammenfallen. Hieraus folgt, daß nicht nur die Ionen-Konzentration zwischen ungefroren und gefroren gewesenen Poly-acrylsäure-Lösungen die gleiche ist, sondern auch die Pufferung.

Die in den Kurvenbildern angegebene Anzahl ccm NaOH sind nicht ccm 0.1-n. NaOH, sondern bei der gelösten Poly-acrylsäure sind sie mit dem Titer: 1.018 und bei der gequollenen mit dem Titer: 1.42857 zu multiplizieren. Wir erhielten für 25 ccm Säure bis zum Neutralpunkt einen in der Tabelle 7 auf S. 2009 zusammengestellten Verbrauch von auf 0.1-n. umgerech-

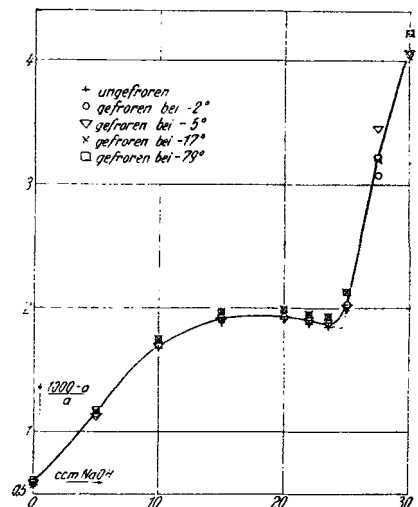


Fig. 2. Konduktometrische Titration von gequollener Poly-acrylsäure. Konzentrat. 1 %. Eingeschalteter Widerstand  $R = 400 \Omega$ .

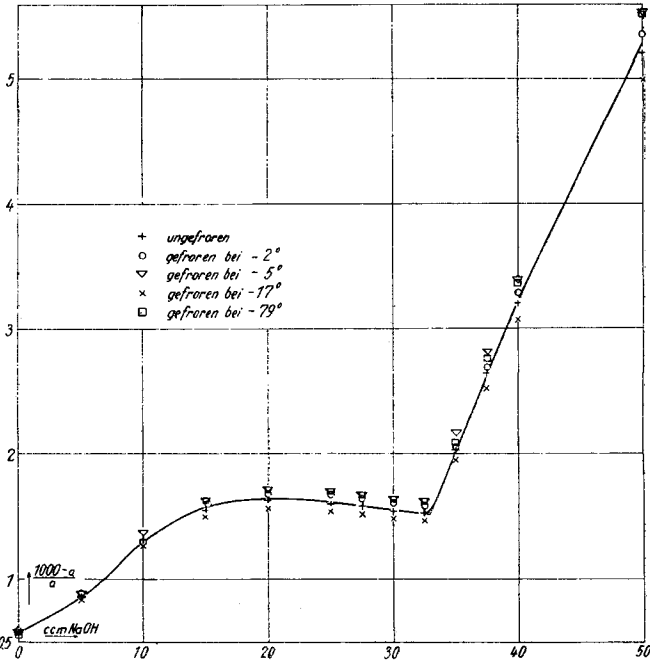


Fig. 3. Konduktometrische Titration von gelöster Poly-acrylsäure. Konzentrat. 1%. Eingeschalteter Widerstand  $R = 400 \Omega$ .

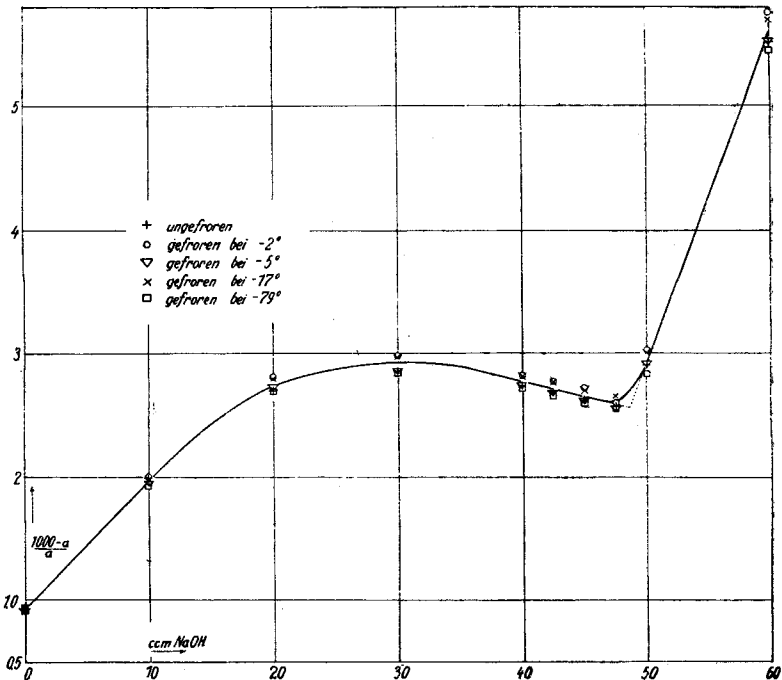


Fig. 4. Konduktometrische Titration von gequollener Poly-acrylsäure. Konzentrat. 2%. Eingeschalteter Widerstand  $R = 400 \Omega$ .

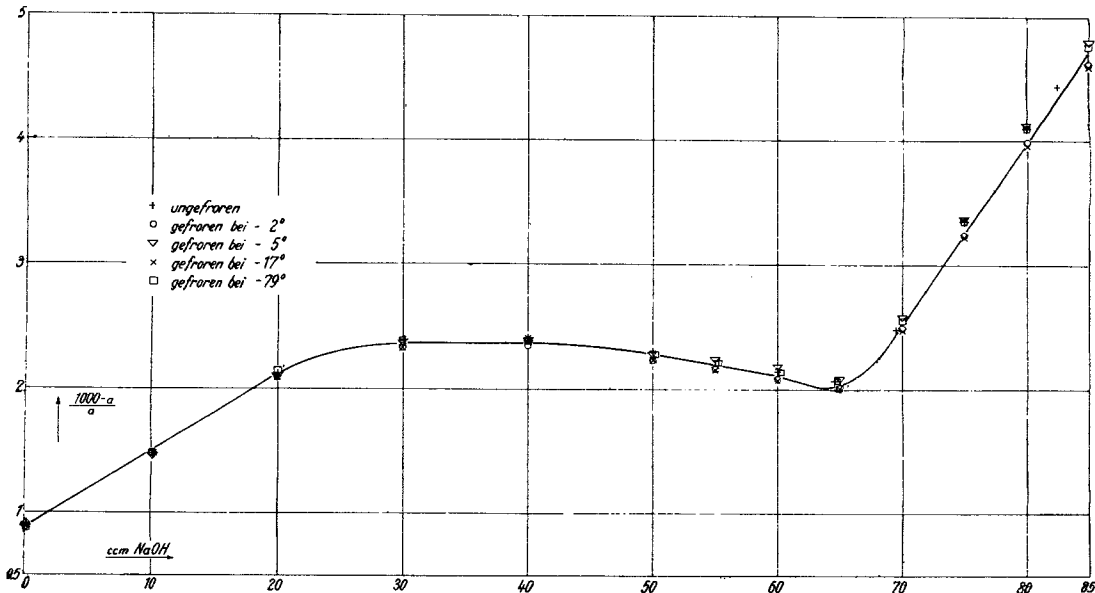


Fig. 5. Konduktometrische Titration von gelöster Poly-acrylsäure. Konzentrat. 2 %.  
Eingeschalteter Widerstand  $R = 400 \Omega$ .

netter Natronlauge. Eine genau 1-proz. Poly-acrylsäure würde, wenn alle Carboxylgruppen neutralisiert werden, 34.93 ccm 0.1-n. NaOH für 25 ccm Säure benötigen. Unsere Lösungen sind nicht genau 2-, 1- und 0.1-proz.

Tabelle 7.

|                         | 1 % aus 2 % gequoll.<br>hergest. |           | durch Verdünnen aus 2 % gelöst<br>hergest. |            |              |
|-------------------------|----------------------------------|-----------|--|------------|--------------|
| Konzentration . . . . . | 2 % gequ.                        | 1 % gequ. | 2 % gelöst                                 | 1 % gelöst | 0.1 % gelöst |
| ccm NaOH . . . . .      | 69.432                           | 35.143    | 67.341                                     | 33.544     | 3.405        |

### 3) Verdünnungs-Versuche.

Im folgenden wird weiter bewiesen, daß die Wirkung des Frostes auf lyophile Kolloide irreversibel ist. Eine 2-proz. Lösung von „gelöster“ Poly-acrylsäure wurde gefroren und der Diffusionskoeffizient der Säure im ungefrorenen und gefrorenen Zustande gemessen. Wir fanden eine Abnahme des Diffusionskoeffizienten, d. h. ein Überwiegen der Aggregation. Die ungefrorene und die gefrorene gewesene Lösung wurden auf 0.1% verdünnt und wiederum der Diffusionskoeffizient bestimmt. Auch im verdünnten Zustand diffundierte die gefrorene gewesene Lösung langsamer als die ungefrorene. Als wir jedoch die 0.1-proz. Lösung direkt bei  $-17^{\circ}$  gefrieren ließen, zeigte diese, wie aus unseren früheren Versuchen zu erwarten war, eine Beschleunigung der Diffusion. Die Aggregation ist also gegen das Verdünnen beständig. Dieser Experimentalbefund unterstützt unsere früheren<sup>6a)</sup> Ausführungen über den Geltungsbereich und die Reichweite der van-der-Waals'schen Kräfte.

<sup>6a)</sup> Gertrud Weiß u. F. F. Nord, Ztschr. physikal. Chem. (A) 166, 5 [1933].

Die Ausführung der Versuche geschah ganz so wie bei unseren früheren Diffusionsmessungen. Als Kältequelle stand uns aber ein von der Firma Alfred Teves, Frankfurt a. M. gebauter Tiefkühlschrank zur Verfügung, der eine automatische Regulierung der Temperatur zwischen  $0^{\circ}$  und  $-30^{\circ}$  ermöglichte und mit einer außerhalb des Schrankes angebrachten elektrischen Kontrolle der inneren Luft-Temperatur ausgerüstet war. Der Nutzraum des Schrankes beträgt etwa  $41 \times 43 \times 44$  cm. Die Ergebnisse dieses Verdünnungs-Versuches sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 8. Diffusionskoeffizienten von Poly-acrylsäure

Zellkonstante  $k_v = 0.082$ . 0.001 % Poly-acrylsäure entsprechen 6.4 Interferometer-Teilen.  
Inhalt des Becherglases: 10 ccm.

| Konzentration | Gefrier-temperatur                    | Zeit in Stdn. | Interferometerwert I | Diffusionskoeffizient |
|---------------|---------------------------------------|---------------|----------------------|-----------------------|
| 1. 2%         | ungefroren                            | 0.25          | 209                  | 1.32                  |
| ↓             |                                       |               | 245                  |                       |
|               |                                       |               | 185                  |                       |
|               |                                       |               | 220                  |                       |
| 2. 0.1%       | ungefroren                            | 5             | 90                   | 0.553                 |
| ↓             |                                       |               |                      |                       |
| 3. 0.1%       | $-17^{\circ}$                         | 5             | 95                   | 0.584                 |
| ↕             |                                       |               |                      |                       |
| 4. 0.1%       | aus Nr. 5 durch Verdünnen hergestellt | 5             | 87                   | 0.535                 |
| ↑             |                                       |               |                      |                       |
| 5. 2%         | $-17^{\circ}$                         | 0.25          | 84                   | 0.510                 |
|               |                                       |               | 88                   |                       |
|               |                                       |               | 88                   |                       |
|               |                                       |               | 71                   |                       |

Tabelle 9. Diffusionskoeffizienten von Gummi-arabicum-Lösungen.

Zellkonstante  $k_n = 0.0976$ . 0.001 % Gummi entspricht 6 Interferometer-Teilen. Inhalt des Becherglases bei 2%: 20 ccm, bei 0.1%: 10 ccm.

| Konzentration | Gefrier-temperatur                    | Zeit in Stdn. | Interferometerwert I | Diffusionskoeffizient |
|---------------|---------------------------------------|---------------|----------------------|-----------------------|
| 1. 2%         | ungefroren                            | 0.5           | 33                   | 0.234                 |
| ↓             |                                       |               | 32                   |                       |
|               |                                       |               | 30                   |                       |
|               |                                       |               | 25                   |                       |
| 2. 0.1%       | ungefroren                            | 5             | 21                   | 0.1636                |
| ↓             |                                       |               |                      |                       |
| 3. 0.1%       | $-79^{\circ}$                         | 5             | 23                   | 0.179                 |
| ↕             |                                       |               |                      |                       |
| 4. 0.1%       | aus Nr. 5 durch Verdünnen hergestellt | 5             | 18                   | 0.140                 |
| ↑             |                                       |               |                      |                       |
| 5. 2%         | $-79^{\circ}$                         | 0.5           | 29                   | 0.195                 |
|               |                                       |               | 24                   |                       |
|               |                                       |               | 23                   |                       |
|               |                                       |               | 22                   |                       |

Übereinstimmende Ergebnisse wie beim eben beschriebenen Verdünnungs-Versuch erhielten wir bei einem ganz analog ausgeführten Versuch mit Gummi-arabicum-Lösung<sup>7)</sup>. Wir benutzten für diesen Versuch eine Zelle mit der Porenweite G3, weil die 2-proz. Gummi-Lösung sich nur schwer durch eine Membran G4 hindurchsaugen läßt. Die Diffusionskoeffizienten der Gummi-Lösung sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

#### 4) Erörterung.

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war die Beobachtung, daß sowohl lyophile als auch lyophile Biokolloide unter dem Einfluß des Frostes je nach ihrer Konzentration eine Desaggregation bzw. Aggregation ihrer Teilchen erleiden. Die ausgeführten Diffusionsmessungen haben weiter die Erkenntnis zu Tage gefördert, daß die bisher als konstant angesehenen Teilchengrößen gewisser Kolloide sich als von ihrer Vorbehandlung abhängig erweisen. Diese Beobachtung trifft sowohl für chemisch einheitliche als auch solche Substanzen zu, welche unter Anwendung der Ultra-zentrifugen-Technik vielleicht noch verschiedene Sedimentations-Geschwindigkeiten ihrer Teilchen erkennen lassen würden. Aus unseren Versuchen geht einwandfrei hervor, daß Diffusionsmessungen an der gleichen Substanz, ohne daß diese eine chemische Veränderung erlitten hatte, die Errechnung verschiedener Teilchengrößen ermöglicht. Die Ermittlung von Molekulargewichten auf dieser Grundlage, wie dies z. B. im Falle der Cozymase<sup>8)</sup> oder des Polysaccharids des Pneumococcus III<sup>9)</sup> geschehen ist, muß daher dieser Feststellung entsprechend gewertet werden.

Die Ultra-zentrifugen-Technik ist aus dem Bedürfnis hervorgegangen, „für die Biochemie und die Physiologie nähere Kenntnisse über die Molekulargewichte der Eiweißkörper zu sammeln“<sup>10)</sup>. Es erhebt sich daher die dringende Frage, zu welchen Ergebnissen ihre Anwendung auf in der hier beschriebenen Weise vorbehandelte Kolloide als experimentelle Grundlage zur Bestimmung von Teilchengrößen führen wird.

<sup>7)</sup> Gum ghatti selected von British Drug Houses Ltd., London. — Bezügl. der Eigenschaften des Substrates und der Lösungen vergl. l. c., Fußnote <sup>2)</sup>, S. 1151, und bei O. M. von Ranke-Abonyi u. F. F. Nord, Kolloid-Ztschr. 58, 200 [1932].

<sup>8)</sup> Euler, Myrbäck u. Nilsson, Ztschr. physiol. Chem. 168, 187 [1927], 225, 125 [1934].

<sup>9)</sup> Babers u. Goebel, Journ. biol. Chem. 89, 391 [1930].

<sup>10)</sup> The Svedberg, Naturwiss. 22, 230 [1934]; vergl. hierzu auch die Ausführungen von W. D. Lansing u. F. O. Kraemer, Journ. Amer. chem. Soc. 57, insbesondere S. 1376 [1935].