

Mitteilung aus dem Chemischen Institut der Universität Riga

Molekulargewichtsbestimmungen durch Fällungstitration

Von **B. Jirgensons**

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 22. Mai 1942)

Die klassischen Methoden der Molekulargewichtsbestimmung für gelöste niedermolekulare Stoffe sind Kryoskopie und Ebullioskopie. Diese Methoden beginnen zu versagen, wenn die Molekulargewichte (M) die Grenze $M = 10^3$ überschreiten. Die Kryoskopie, die den größten Anwendungsbereich hat, gibt im Falle $M = 10^3$ noch brauchbare Resultate; oberhalb von $5 \cdot 10^3$ sind die Differenzen der Gefrierpunkte, besonders im Falle wäßriger Lösungen, aber zu klein, so daß Abweichungen von $\pm 10-50\%$ eintreten können¹⁾. Oberhalb von $M = 5 \cdot 10^3$ beginnt der Anwendungsbereich der osmotischen Methoden, die in der letzten Zeit von mehreren Forschern zu sehr exakten Bestimmungsmethoden ausgearbeitet worden sind²⁾. Die besten Resultate gibt diese Methode im Bereich von $M = 10^4 - 5 \cdot 10^5$. Unterhalb von 10^4 sind Schwierigkeiten wegen der Durchlässigkeit der Membranen; oberhalb von $5 \cdot 10^5$ sind die Effekte

¹⁾ In einigen Fällen gibt die Kryoskopie ganz falsche Resultate. Vgl. K. Hess u. Mitarb., Liebigs Ann. Chem. 448, 99 (1926); H. Staudinger, Ber. dtsh. chem. Ges. 68, 474 (1935); E. Husemann, Liebigs Ann. Chem. 527, 195 (1937).

²⁾ S. P. L. Sørensen, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 106, 1 (1919); Wo. Ostwald, Kolloid-Z. 49, 60 (1929); J. Duclaux u. Nodzu, Rev. gén. Colloides 7, 385 (1929); N. F. Burk u. D. M. Greenberg, J. biolog. Chem. 87, 197 (1930); G. V. Schulz, Z. physik. Chem. (A) 176, 317 (1936); G. V. Schulz in „Die Methoden der Fermentforschung“, herausgegeben von Bamann u. Myrbäck, S. 717—726.

zu klein. Sehr zuverlässige Resultate für die Kolloide geben auch die Methoden der Ultrazentrifugierung³⁾. Gute Resultate sind im Gebiet oberhalb von 10^4 zu erhalten, und mit den besten Apparaten kann man auch unterhalb von $M=10^4$ mit Erfolg arbeiten. Für die Bestimmung der Teilchengröße, besonders für anorganische Kolloide, sind vor allem die Ultramikroskopie⁴⁾ und Elektronenmikroskopie⁵⁾ von Bedeutung. Die drei letztgenannten Methoden sind aber wegen der Umständlichkeit nur in beschränktem Umfang anwendbar. Bei Vertretern polymerhomologer Reihen mit Fadenmolekülen kann man gute Resultate auch mit Hilfe der Viscosimetrie erhalten⁶⁾. In einigen Fällen dagegen kann man mit der Viscosimetrie nur Näherungswerte erhalten⁷⁾. Umständlicher und für praktische Zwecke weniger ausgearbeitet sind die Methoden der Diffusion⁸⁾, der Dialyse⁹⁾ und einige andere¹⁰⁾.

Überblickt man die Ergebnisse, so ist ersichtlich, daß besonders im Gebiete von $M=10^3-10^4$ eine neue einfache Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts von großer Bedeutung wäre.

Die Fällungstitration ist eine neue Methode der Molekulargewichtsbestimmung, die an der Einfachheit alle andere Methoden übertrifft. Die Methode ist für die Glieder verschiedener polymerhomologer Reihen anwendbar. Der Anwendungsbereich ist sehr groß: von $M=10^2$ bis zu etwa $M=5 \cdot 10^5$.

³⁾ The Svedberg u. K. O. Pedersen, Die Ultrazentrifuge, 1940; G. Schramm, Kolloid-Z. 97, 106 (1941).

⁴⁾ F. V. v. Hahn, Dispersoidanalyse, 1928.

⁵⁾ E. Husemann u. H. Ruska, J. prakt. Chem. [2] 156, 1 (1940); Naturwiss. 28, 534 (1940); M. v. Ardenne u. H. H. Weber, Kolloid-Z. 97, 322 (1941).

⁶⁾ H. Staudinger, Organische Kolloidchemie, II. Aufl. 1941, S. 189.

⁷⁾ z. B. H. Staudinger u. H. Warth, J. prakt. Chem. [2] 155, 261 (1940).

⁸⁾ z. B. D. Krüger u. H. Grunski, Z. physik. Chem. (A) 150, 115 (1930); M. Samec u. Knop, Kolloid-Beih. 39, 438 (1934).

⁹⁾ H. Brintzinger, Z. anorg. allg. Chem. 168, 145 (1927); 196, 33 (1931) u. a.

¹⁰⁾ R. Signer, Liebigs Ann. Chem. 478, 246 (1930); K. Hess u. M. Ulmann, Liebigs Ann. Chem. 504, 81 (1933); Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 2131 (1934).

Die Möglichkeit, durch Fällungstiteration Molekulargewichte zu bestimmen, beruht darauf, daß innerhalb einer polymerhomologen Reihe die Löslichkeit mit steigendem Molekulargewicht abnimmt¹¹⁾. Da die direkte Bestimmung der Löslichkeit, besonders an den Hochpolymeren, mit verschiedenen Schwierigkeiten verbunden ist¹²⁾, wurde ein anderes Verfahren angewandt, um die Löslichkeit zu charakterisieren¹³⁾. Dieses besteht darin, daß man bei Lösungen verschiedener Glieder einer polymerhomologen Reihe ermittelt, welche Menge von einem bestimmten Fällungsmittel zugesetzt werden muß, um eine soeben beginnende Ausfällung zu erreichen. Dieser Fällungspunkt ist leicht an der auftretenden Trübung zu erkennen und läßt sich scharf reproduzieren. Es werden also zur Ausfällung der Substanz um so kleinere Fällungsmittelmengen benötigt, je höher das Molekulargewicht ist, wie Staudinger und Heuer an Polystyrolen¹⁴⁾, G. V. Schulz und B. Jirgensons an Nitrocellulosen, Stärketriacetaten und Polymethacrylsäureestern¹⁵⁾ und E. Husemann an Abbauprodukten des Glykogens¹⁶⁾ zeigten. Dasselbe wurde auch von Lovell und Hibbert an Polyäthylenoxyden¹⁷⁾ und von B. Jirgensons an Abbauprodukten der Proteine¹⁸⁾ festgestellt.

¹¹⁾ H. Staudinger, Ber. dtsh. chem. Ges. 59, 3019 (1926).

¹²⁾ Bodenkörperregel — die Löslichkeit ist von der Menge des Bodenkörpers abhängig, vgl. Wo. Ostwald, Kolloid-Z. 43, 249 (1927); 41, 163 (1927); 58, 215 (1932); M. Wadano, Kolloid-Z. 93, 324 (1940); Über die Erklärung der Bodenkörperregel bei polymolekularen Stoffen, H. Staudinger u. W. Heuer, Z. physik. Chem. (A) 171, 139 (1934); H. Staudinger, Org. Kolloidchemie, II. Aufl., 1941, S. 39; G. V. Schulz, Z. physik. Chem. 179, 312 (1937).

¹³⁾ H. Staudinger u. W. Heuer, vgl. Anm. 12; E. W. Mardles, Kolloid-Z. 49, 4 (1929).

¹⁴⁾ Vgl. Anm. 12 u. 13.

¹⁵⁾ G. V. Schulz u. B. Jirgensons, Z. physik. Chem. (B) 46, 105 (1940).

¹⁶⁾ E. Husemann, J. prakt. Chem. [2] 158, 163 (1941).

¹⁷⁾ E. H. Lovell u. H. Hibbert, J. Amer. Chem. Soc. 61, 1916 (1939).

¹⁸⁾ B. Jirgensons, J. prakt. Chem. [1] 159, 303 (1942); Kolloid-Z. 98, 70 (1942); J. prakt. Chem. [2] 160, 21 (1942). Über fraktionierte Fällung anderer Hochpolymeren vgl. noch z. B. S. Glückmann, Kolloid-Z. 76, 84 (1936); W. O. Baker, W. S. Fuller, J. H. Heiß, J. Amer. Chem. Soc. 63, 2142 (1941) konnten auch an die ω -Oxy-undecansäure Polyester die M durch Fällungstiteration gut bestimmen.

Die theoretischen Grundlagen der Methode stammen von G. V. Schulz¹⁹⁾ sowie von Lovell und Hibbert²⁰⁾. Da die Abhängigkeit zwischen der Löslichkeit und dem M eine komplizierte ist und die Löslichkeitsversuche auch relativ umständlich sind, wurden neue, einfachere Beziehungen gesucht. Es wurde gezeigt, daß eine sehr einfache, lineare Beziehung zwischen M und der Fällbarkeit besteht. Die Fällbarkeit (γ^*) ist die Konzentration des Nichtlösungsmittels am Trübungspunkt. Wird v_0 ccm einer Lösung titriert und v ccm des Fällungsmittels verbraucht, so ist

$$\gamma^* = \frac{v}{v + v_0}.$$

Die theoretischen Überlegungen von Schulz sind mit der Annahme verknüpft, daß bei der Fällung das Gemisch in zwei flüssige Phasen sich trennt, wobei der makromolekulare Stoff die eine Phase anreichert. Eine solche Trennung und Abscheidung einer flüssigen Phase ist auch tatsächlich oft zu beobachten²¹⁾, und nach G. V. Schulz kann man auch einen stark gequollenen Niederschlag einer flüssigen Phase gleichsetzen. Für die Verteilung eines Stoffes zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten, in denen er molekular gelöst ist, gilt die Boltzmannsche Gleichung

$$(1) \quad \frac{c_1}{c_2} = e^{E/RT},$$

worin c_1 und c_2 die Konzentrationen in den beiden Phasen und E die Veränderung der potentiellen Energie eines Mols beim Übergang von der Phase 1 nach 2 ist. Nach Brönsted²²⁾ ist E dem Molekulargewicht (M) oder dem Polymerisationsgrad (P) proportional. Bezeichnet man mit ϵ diese Energieänderung pro Grundmolekül, so ist

$$(2) \quad E = P\epsilon.$$

¹⁹⁾ G. V. Schulz, Z. physik. Chem. (A) 179, 312 (1937); vgl. Anm. 15.

²⁰⁾ E. H. Lovell u. H. Hibbert, J. Amer. chem. Soc. 61, 1916 (1939).

²¹⁾ Vgl. auch H. Erbring u. K. Sakurada, Kolloid-Z. 73, 191 (1934).

²²⁾ J. N. Brönsted, Z. physik. Chem. (A), Bodenstein-Festband 279 (1931).

Setzt man in der Gleichung (1) statt E $P\varepsilon$, so erhält man

$$(3) \quad \frac{c_1}{c_2} = e^{P\varepsilon/RT}.$$

Das Verteilungsgleichgewicht wird also um so einseitiger, je höher der Polymerisationsgrad des Stoffes ist. Setzen wir nun der einen Phase ein Fällungsmittel zu, so verändern wir die Übergangsenergie. Es wird angenommen, daß ε dem Gehalt der betreffenden Phase an Fällungsmittel (γ) proportional ist

$$(4) \quad \varepsilon = A + B\gamma,$$

worin A und B Konstanten sind. Von (3) und (4) bekommt man dann:

$$(5) \quad \frac{c_1}{c_2} = e^{P(A+B\gamma)/RT}$$

oder

$$(6) \quad \ln \frac{c_1}{c_2} = P \frac{A + B\gamma}{RT}.$$

Die Gültigkeit dieser Gleichung wurde zuerst von Schulz an dem Verteilungsgleichgewicht zweier Polyäthylenoxyde zwischen Wasser und einer Mischung von Chloroform und Benzol nachgewiesen²³).

Von der Gleichung (6) kann man nun leicht die Beziehungen zwischen der Löslichkeit (c oder c_1/c_2) und Fällbarkeit (γ), sowie zwischen Fällbarkeit und Polymerisationsgrad ermitteln, wenn man die anderen Größen konstant setzt. Für die Abhängigkeit $c = f(\gamma)_{P,T}$ erhält man dann:

$$(7) \quad \ln c = a - b\gamma,$$

worin a und b Konstanten sind. Die Gültigkeit dieser Gleichung wurde an Polystyrolen, Stärketriacetaten, Nitrocellulosen, Polymethacrylsäureestern²⁴), Polyäthylenoxyden²⁵), bei vielen Proteinen, sogar bei der Aussalzung²⁶) und bei Abbauprodukten der Proteine²⁷) erwiesen. Auch bei den Abbauprodukten des Glykogens gilt die Gleichung (7)²⁸). Es sind aber auch Aus-

²³) G. V. Schulz, vgl. Anm. 19.

²⁴) Vgl. Anm. 15.

²⁵) Vgl. Anm. 20.

²⁶) E. J. Cohn, *Physiol. Rev.* 5, 410 (1925); S. P. L. Sörensen, *Kolloid-Z.* 53, 102, 170 (1930).

²⁷) B. Jirgensons, *J. prakt. Chem.* [2] 159, 303 (1942); *Kolloid-Z.* 98, 70 (1942); *J. prakt. Chem.* [2] 160, 21 (1942).

²⁸) E. Husemann, *J. prakt. Chem.* [2] 158, 163 (1941).

nahmen bekannt, z. B. bei den Proteinen²⁹⁾, wenn kein linearer Zusammenhang zwischen Löslichkeit (Konzentration der fällbaren Substanz am Trübungspunkt) und der Konzentration des Fällungsmittels besteht.

Die Gleichung (7) ist auch insofern wichtig, daß man von der Neigung der Geraden (Konstante b) Schlußfolgerungen über die Teilchenform ziehen kann. Sind die Teilchen kugelförmig, so sind die Geraden verschiedener Glieder einer polymerhomologen Reihe parallel; im Falle linearer Moleküle dagegen haben die Geraden verschiedene Neigung³⁰⁾. Bei den Proteinen sind aber die Neigungen der Geraden auch stark vom p_H der Lösung abhängig³¹⁾.

Den Polymerisationsgrad oder das Molekulargewicht kann man von der Abhängigkeit $\gamma = f(P)_{c, T}$ ermitteln. Von der Gleichung (6) erhält man

$$(8) \quad \gamma = \alpha + \beta/P,$$

wo α und β Konstanten sind. Später wurde noch eine dritte Konstante m eingeführt (vgl. Anm. 15). Die Fällbarkeit, wie anfangs angedeutet wurde, ist die Konzentration des Nichtlösungsmittels am Trübungspunkt und wurde durch γ^* bezeichnet. Die Gleichung (8) erhält dann folgende Form:

$$(9) \quad \gamma^* = \alpha + \beta/P^m.$$

Eine bisher stillschweigend gemachte Voraussetzung für die Gültigkeit der Gleichung (8) bzw. auch der Gleichung (2) war, daß alle Radikale eines Makromoleküls in gleicher Weise mit dem Lösungsmittel in Wechselwirkung treten können. Dies kann nur bei linear gebauten Kettenmolekülen der Fall sein. Im Falle sphäromakromolekularen Stoffen dagegen treten nur die an der Oberfläche befindlichen Teile der Makromoleküle in Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel. Sind die Moleküle kugelförmig, so nimmt E [vgl. Gleichung(2)] nur proportional $P^{2/3}$ zu (vgl. Anm. 22). Das ist der Grund der Einführung einer dritten Konstante m . Die Berücksichtigung dieser Konstante ist insofern wichtig, daß im Falle sehr genauer

²⁹⁾ B. Jirgensons, Biochem. Z. **311**, 332(1942); Kolloid-Z. **98**, 70(1942).

³⁰⁾ G. V. Schulz u. B. Jirgensons, vgl. Anm. 15.

³¹⁾ Vgl. Anm. 29. In einigen Fällen kann die Konstante b sogar das Minusvorzeichen auf Plus ändern.

Messungen die Resultate der Fällungstitration Schlußfolgerungen über die Teilchenform zu ziehen erlauben (vgl. Abb. 2).

Schulz ging von der Voraussetzung aus, daß der Bodenkörper als flüssige Phase abscheidet bzw. daß der Niederschlag stark gequollen ist. Lovell und Hibbert (vgl. Anm. 20), die mit Polyäthylenoxyden gearbeitet hatten, fanden dagegen, daß bei diesen Stoffen, die krystallinische Niederschläge geben, zwar die Gleichung (7), nicht aber die Gleichung (8) oder (9) gültig ist. Auf Grund der Beziehungen, die zwischen Löslichkeit und Lösungswärme, sowie zwischen Schmelzpunkt und P bestehen, gelangen diese Forscher zu einer Gleichung

$$(10) \quad RT \ln c = R \ln P + \frac{AP^2}{a + bP} + \frac{BP^2}{a + bP} \gamma,$$

worin a , b , A , B Konstanten sind. Diese Gleichung wurde an molekular einheitlichen Polyäthylenoxyden bestätigt.

Schließlich wurde von B. Jirgensons³²⁾ eine empirische Beziehung zwischen Fällbarkeit und M vorgeschlagen:

$$(11) \quad \gamma^* = \alpha_1 - \beta_1 \log M,$$

wo α_1 und β_1 Konstante sind. Diese Beziehung wurde an verschiedenen Beispielen der Reihen Aminosäuren–Polypeptide–Protein geprüft und als gültig erwiesen (vgl. Anm. 36, 38, 39).

Das Hauptziel der Fällungstitration ist die Bestimmung von Molekular- oder Micellargewicht. Im Falle der Hochpolymeren, wo das M sich zwischen 10^4 und 10^5 bewegt, sind die Niederschläge entweder stark gequollen oder sogar flüssig. In diesen Fällen sind die Gleichungen (8) bzw. (9) mit Erfolg anwendbar. Bei den Titrationen in den Reihen Aminosäuren–Polypeptide–Proteine, wo streng genommen keine echten polymerhomologen Reihen vorliegen, und die Werte von M zwischen 10^2 und 10^6 , d. h. in 4 Zehnerpotenzen variieren können, gilt die Gleichung (11).

Um die Berechnung der Konstanten zu entbehren, ist es sehr vorteilhaft, die gesuchten Molekulargewichte graphisch zu ermitteln. Im Falle der Abbauprodukte der Proteine verfährt man folgendermaßen. Man titriert die Lösungen der wichtigsten Aminosäuren und des Proteins. Von den Größen

³²⁾ B. Jirgensons, J. prakt. Chem. [2] 159, 303 (1942).

des betreffenden $\log M$ und den Werten von γ^* wurde eine Gerade konstruiert. Dann titriert man die Lösungen des Abbauproduktes, dessen M unbekannt ist, und mit Hilfe der Geraden ermittelt man von dem γ^* -Wert den $\log M$.

Die Titration wird mit 1,0—10,0 ccm einer Lösung bei konstanter Temperatur ausgeführt. In einem kleinen Këlbchen mißt man die Lösung, stellt es in ein großes Becherglas mit Wasser, das konstante Temperatur hat, und unter ständigem Umschwenken titriert man mit dem Nichtlösungsmittel. Ist die Trübung schon durch kleine Mengen des Nichtlösungsmittels erreichbar, z. B. 1,0—2,0 ccm, so muß man eine Mikrobürette verwenden. Sind die Titrationswerte hoch, z. B. 10 bis 20 ccm, so kann man brauchbare Resultate auch mit einfacher Bürette erhalten.

Die Endpunkte kann man in den meisten Fällen sehr genau bestimmen. Man titriert bis zur beginnenden Opaleszenz oder Trübung. Besonders scharfe Endpunkte erhält man im Falle einheitlicher Stoffe; bei uneinheitlichen Substanzen sind die Endpunkte weniger scharf. Einige Beispiele sind in Tab. 1 sichtbar.

Tabelle 1

Cyclohexanmenge in Kubikzentimetern, die zu benzolischen Lösungen von Polymethacrylsäureester bis zur Trübung zugesetzt wurden (Konzentration der Ausgangslösungen 0,5 und 1%)

M	0,5%-ige Lösungen				1,0%-ige Lösungen			
	Einzelwerte	Mittelwert	Abweichg. %		Einzelwerte	Mittelwert	Abweichg. %	
13 500	11,12	11,20	11,16	± 0,4	10,31	10,39	10,35	± 0,4
23 500	8,53	8,56	8,55	± 0,2	8,10	8,14	8,12	± 0,25
50 000	7,16	7,14	7,15	± 0,15	6,87	6,88	6,88	± 0,15
75 000	6,90	7,00	6,95	± 0,7	6,74	6,65	6,70	± 0,65
83 500	6,68	6,74	6,71	± 0,45	6,45	6,40	6,43	± 0,4
138 000	6,40	6,33	6,37	± 0,5	6,26	6,21	6,24	± 0,3
246 000	6,16	6,08	6,12	± 0,6	5,84	5,90	5,87	± 0,5
440 000	6,03	6,02	6,025	± 0,25	5,92	5,96	5,94	± 0,35

Die Schärfe der Endpunkte ist auch von der Auswahl des Lösungs- und Fällungsmittels abhängig. Im Falle der Abbauprodukte der Proteine, sowie an den Proteinen selbst, erhält man mit Aceton scharfe Endpunkte, so daß man verhältnis-

mäßig rasch titrieren kann. Mit Methyl-, Äthyl- oder Propylalkohol dagegen kommt die Opaleszenz und Trübung oft nur sehr stetig zutage, so daß man mit diesen Flüssigkeiten oft keine zuverlässigen Resultate erhalten kann. Die Gültigkeit des einen oder anderen Fällungsmittels kann man am besten durch Reihenversuche entscheiden, indem Koagulationsserien mit ansteigenden Mengen des Nichtlösungsmittels eine längere Zeit beobachtet werden³³⁾.

Die Resultate der Fällungstitration sind in den folgenden Tabellen und Abbildungen dargestellt^{33a)}.

In der Abb. 2 sind die γ^* -Werte gegen $\frac{1}{P}$, $\frac{1}{\sqrt{P}}$ und $\frac{1}{P^{3/2}}$ aufgetragen. Man erhält Gerade, wenn man γ^* gegen $\frac{1}{P^{3/2}}$ oder gegen $\frac{1}{\sqrt{P}}$ aufträgt, was mit den oben erwähnten Schlußfolgerungen in Einklang steht, da die Glykogene bekanntlich korpuskulare Moleküle haben³⁴⁾. Aus den Tab. 2, 3 und 5 sind auch die Abweichungen von den durch osmotische Bestimmungen ermittelten Polymerisationsgeraden zu ersehen. Bei den Nitrocellulosen und Abbauprodukten des Glykogens sind die Abweichungen sehr gering, höchstens bis zu $\pm 10\%$. Schlechter ist die Übereinstimmung bei Polystyrolen und Polymethacrylsäureestern³⁵⁾ (Tab. 5).

Aus den Tabellen ist zu ersehen, daß die Fällungstitration mit Erfolg bis zu $M=10^5$ anwendbar ist. Weiter werden die Versuchsfehler schon zu groß. Die besten Resultate sind im Bereich von $M=10^3$ — $5 \cdot 10^4$ zu erhalten.

In den Abb. 1 a bis 1 d ist die Fällbarkeit gegen den reziproken Polymerisationsgrad aufgetragen. Hierbei ergeben sich

³³⁾ B. Jirgensons, Kolloid-Beih. 44, 285 (1936); Kolloid-Z. 61, 41 (1932); Z. physik. Chem. (A) 158, 56 (1931); Biochem. Z. 240, 218 (1931) u. a.

^{33a)} Die Tab. 1—3 und Abb. 1 stammen von der Arbeit Schulz und Jirgensons (vgl. Anm. 15), die Tab. 4 sowie Abb. 2 von der Arbeit Husemann (vgl. Anm. 16). Die P -Werte in der Tab. 4 sind nach der Gleichung (9) berechnet, wobei m als gleich $\frac{2}{3}$ angenommen wurde.

³⁴⁾ E. Husemann u. H. Ruska, J. prakt. Chem. [2] 156, 1 (1940); E. Husemann, J. prakt. Chem. [2] 158, 163 (1941).

³⁵⁾ G. V. Schulz u. B. Jirgensons, Z. physik. Chem. (B) 46, 114 (1940).

Tabelle 2
Fällungsversuche an Nitrocellulosen (Aceton-Wasser)

M (osmotisch)	P	1/P · 10 ³	c	γ*	c	γ*	c	γ*	c	γ*	P durch Fällung	Abweich. %
47 700	185	5,43	—	—	—	—	2,23	0,212	5,02	0,199 ₆	181	-3
56 800	208	4,81	0,385	0,232	1,50	0,206	2,52	0,199	5,34	0,187	204	-2,5
72 000	265	3,78	—	—	—	—	2,80	0,176 ₆	5,78	0,169	247	-7
79 000	289	3,46	0,530	0,177	1,87	0,163	2,97	0,161	6,12	0,155 ₆	295	+2
205 000	750	1,33	0,695	0,117 ₅	2,34	0,1132	3,58	0,114	7,26	0,110	805	+7,5
270 000	995	1,01	—	—	—	—	3,67	0,1075	7,37	0,104 ₉	1010	+1,5
307 000	1130	0,855	0,720	0,110	2,42	0,105	3,69	0,1042	7,44	0,102 ₄	1140	+1
395 000	1450	0,690	—	—	—	—	3,75	0,100	7,53	0,099 ₅	1360	-6,5

Anfangskonzentration: c₀ = 1,0 c₀ = 3,3 c₀ = 5,0 c₀ = 10

Tabelle 3
Fällungsversuche an Stärketriacetaten (Chloroform-Äther)

M	P	1/P · 10 ²	e	γ*	c	γ*	c	γ*	c	γ*	P ber.	Abweich. %
7 200	25	4,00	0,735 ^{*)}	0,815	—	—	2,41	0,760	5,25	0,738	23	-8
10 500	36,5	2,74	0,613	0,695	1,63	0,674	3,36	0,664	7,00	0,653	40	+9,5
24 000	83,5	1,20	0,74	0,626	2,0	0,601	4,07	0,594	8,35	0,583	88	+5,5
33 000	115	0,87	0,515	0,599 ₆	2,09	0,562	4,23	0,577	8,70	0,564 ₅	122	+6
45 000	156	0,641	0,322	0,589	2,11	0,579	4,30	0,570	8,65	0,566	149	+4,5
60 000	208	0,481	0,354	0,559	2,17	0,568	4,38	0,562	8,92	0,554	183	-12
155 000	539	0,186	—	—	2,31	0,540	4,63	0,538	9,72	0,515	(1700)	—

Anfangskonzentration: c₀ = 2 c₀ = 5 c₀ = 10 c₀ = 20 c₀ = 40

*) c₀ = 4

Tabelle 4

Abbauprodukte des Glykogens, P osmotisch und durch Fällungstitration

Nr. des Präparates	P osmotisch	γ^*	P nach Gleichung (9)	Abweichung in %
III	2780	0,374	2650	- 4,7
IV	1630	0,383	1650	+ 1,1
V	1240	0,390	1240	\pm 0
VI	850	0,405	780	- 8,3
VII	680	0,412	640	- 5,9
VIII	320	0,454	290	-10
IX	228	0,472	230	+ 0,9
X	125	0,533	124	- 0,8

Tabelle 5

 P osmotisch und durch Fällungstitration. Polystyrole und Polymethacrylsäureester

	M	P osmotisch	P durch Fällung	Abweichung %
Polystyrole	36 000	346	343	- 1
Benzol-methanol	82 000	790	820	+ 4
	165 000	1585	1650	+ 4
	225 000	2160	1830	-15
	305 000	2930	3600	+22
Polymethacryls-methylester	13 500	135	132	- 2
	23 500	235	255	+ 4
Benzol-cyclohexan	50 000	500	490	- 2
	75 000	750	600	-20
	120 000	1200	1240	+ 3,3
	246 000	2460	4200	+70

gemäß der Gleichung (8) Geraden mit der Neigung β . Die Gleichung (8) gilt streng genommen nur dann, wenn die verschiedenen Polymeren am Trübungspunkt dieselbe Gleichgewichtskonzentration (c) haben. Diese ist niedriger als die Anfangskonzentration (c_a):

$$c = \frac{v_0}{v_0 + v} \cdot c_a.$$

Durch den Zusatz des Fällungsmittels wird die Lösung verdünnt, und zwar bei jedem Einzelversuch in etwas anderem Maße. In der Abb. 1a bis 1d sind in der oberen Geraden die γ^* -Werte eingezeichnet, die zur Gleichgewichtskonzentration $c = 1$ gehören. Sie wurden durch Interpolation aus den Ge-

raden der Konzentrationsabhängigkeit der Fällbarkeit ermittelt. Die zweite in die Abb. eingezeichnete Linie verbindet die Meßpunkte, bei denen die Fällbarkeit in Lösungen von gleicher Anfangskonzentration bestimmt wurde. Obgleich bei diesen Messungen die Gleichgewichtskonzentration nicht übereinstimmt,

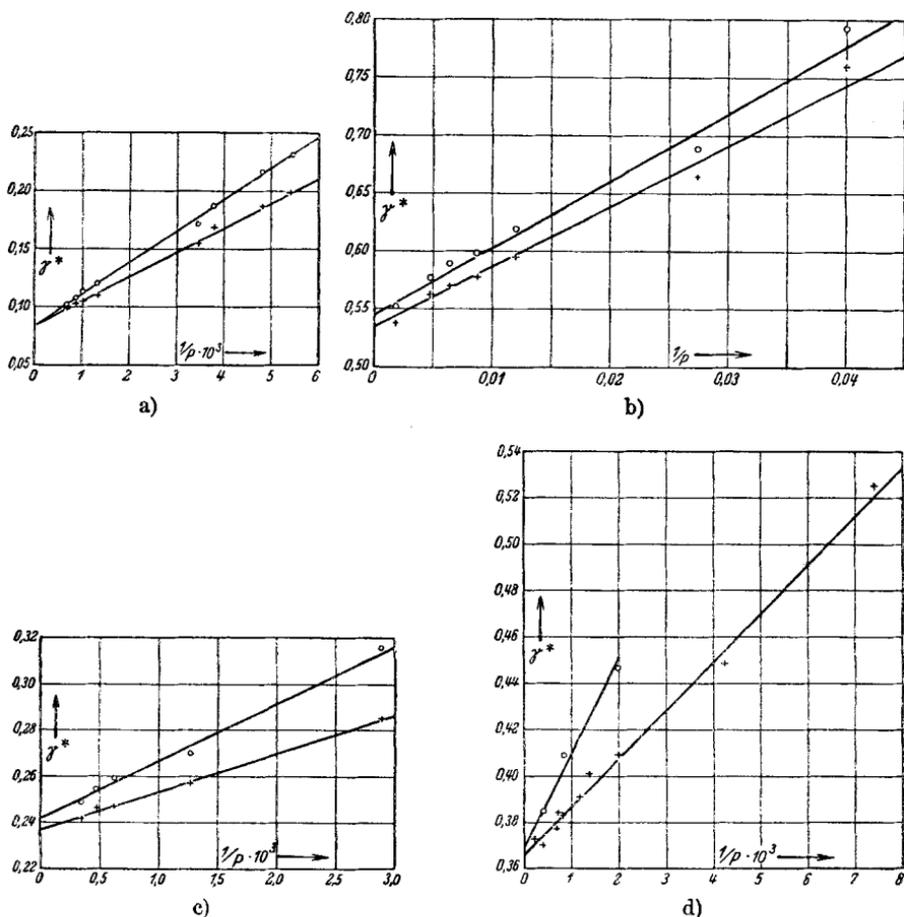


Abb. 1. Fällbarkeit in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad
 a) Nitrocellulosen aus Acetonlösungen durch Wasser-Acetongemisch gefällt.
 b) Stärketriacetate aus Chloroform mit Äthyläther gefällt.
 c) Polystyrole aus Benzollösung durch Methanol titriert.
 d) Poly-methacrylsäure-methylester aus Benzol durch Cyclohexan gefällt.
 ○ Gleichgewichtskonzentration $c=1,0$ × Anfangskonzentration $c_a=10$

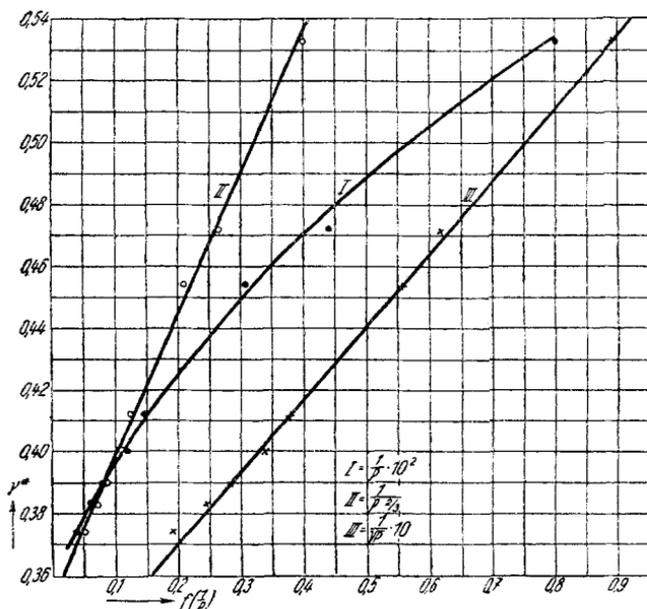


Abb. 2. Abhängigkeit der Fällbarkeit (γ^*) vom Molekulargewicht für die Abbauprodukte des Glykogens

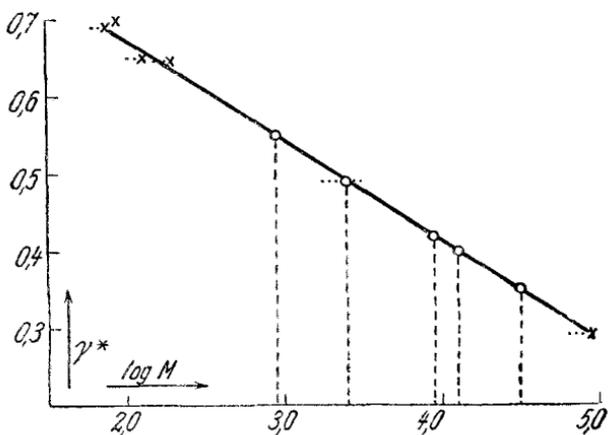


Abb. 3. Abhängigkeit der Fällbarkeit (γ^*) vom Molekulargewicht für die Abbauprodukte der Gelatine

- × Die Punkte einiger Aminosäuren und Dipeptide (sowie der Gelatine) mit bekanntem M
- Die durch graphische Interpolation ermittelten Punkte für verschiedene Abbauprodukte der Gelatine

erhält man auch in diesem Falle einen linearen Zusammenhang, also

$$\gamma^* = \alpha' + \beta'/P$$

oder

$$(12) \quad P = \frac{\beta'}{\gamma^* - \alpha'}$$

Die Konstanten sind in Tab. 6 zusammengestellt (vgl. Anm. 15 und 35).

Tabelle 6

Konstanten der Gleichungen (8) und (12) für 27° C
(c_0 = Anfangskonzentration bei der Bestimmung von α' und β')

Gelöster Stoff	Lösungsmittel	Fällungsmittel	α	β	α'	β'	c_0
Nitrocellulosen	Aceton	Wasser	0,084	27	0,084	21	5
		Äthyläther	0,544	6,0	0,535	5,2	10
Stärketriacetate	Chloroform	Methanol	0,242	18,0	0,237	16,5	10
Polystyrole	Benzol	Cyclohexan	0,396	41	0,366	21	10
Poly-Methacrylsäuremethylester							

Für praktische Molekulargewichtsbestimmungen eignet sich besonders die Gleichung (12), da man hierbei die Gleichgewichtskonzentration nicht auszurechnen braucht.

Ferner sind die Resultate mit Abbauprodukten der Proteine angeführt.

Tabelle 7

Fällbarkeit der Abbauprodukte der Gelatine. $T=15^\circ$, $v_0 = 5,0$ ccm

Substanz	c_a (%)	v ccm	γ^*	M
Gelatine, elektrodialis. $p_H = 5,3$	2,0	1,92	0,278	90 000
	1,0	2,00	0,286	
	0,5	2,04	0,290	
	0,25	2,05	0,291	
	0,125	2,18	0,304	
Abbauprodukt I $p_H = 5,3$	2,0	2,10	0,296	31 600 (durch Fällung)
	1,0	2,69	0,350	
	0,5	2,82	0,361	
	0,25	3,03	0,378	
	0,125	3,67	0,424	
Abbauprodukt II $p_H = 5,4$	2,0	2,35	0,320	12 800 (durch Fällung)
	1,0	2,97	0,373	
	0,5	3,48	0 411	
	0,25	3,74	0,428	
	0,125	4,62	0,481	

Tabelle 7 (Fortsetzung)

Substanz	c_a (‰)	v ccm	γ^*	M
Abbauprodukt III $p_H = 5,3$	2,0	2,91	0,368	8900 (durch Fällung)
	1,0	3,20	0,390	
	0,5	3,72	0,427	
	0,25	4,68	0,484	
	0,125	5,13	0,506	
Abbauprodukt IV	2	4,35	0,465	2500 (durch Fällung)
	1,0	4,53	0,476	
	0,5	5,05	0,502	
	0,25	5,56	0,527	
	0,125	6,50	0,565	
Abbauprodukt V	2,0	5,20	0,510	900 (durch Fällung)
	1,0	6,00	0,546	
	0,5	6,73	0,574	
	0,25	7,92	0,613	
	0,125	9,05	0,645	
Glykokoll	2,0	7,55	0,602	75
	1,0	11,48	0,697	
	0,5	16,82	0,770	
	0,25	23,70	0,827	

Die Molekulargewichte der Abbauprodukte wurden durch graphische Interpolation ermittelt³⁶⁾ bei einer Gleichgewichtskonzentration $c = 0,3$ ‰. Diese wurde von der Konzentrationsabhängigkeit der Fällbarkeit durch Interpolation gewonnen. Die Anfangskonzentration c_a wurde durch fortschreitende Verdünnung einer 2 ‰-igen Grundlösung variiert, so daß die Herstellung der Lösungen und auch die Titration nur sehr wenig Zeit beansprucht.

In der Tab. 8 sind die γ^* -Werte bei der Gleichgewichtskonzentration $c = 0,3$ ‰ und die $\log M$ [gemäß der Gleichung (11)] zusammengestellt. Die graphische Ermittlung von unbekanntem M ist aus der Abb. 3 ersichtlich. Mit den Kreuzen sind die Punkte der Aminosäuren bzw. Dipeptide und des Proteins bezeichnet. Da diese Substanzen sicher bekanntes M haben, wurden sie als Vergleichssubstanzen genommen, und durch diese Punkte wird die Gerade gezogen. Mit den Kreisen sind die Punkte der Abbauprodukte bezeichnet. Zieht man von einem

³⁶⁾ B. Jirgensons, J. prakt. Chem. **160**, 21 (1942). Diese Abbauprodukte wurden durch Thermolyse in reiner wäßriger Lösung einer elektrodialytisch gereinigten Gelatine gewonnen.

Kreis auf die Abszisse die Lotrechte, so kann man den $\log M$ direkt ablesen.

Tabelle 8

Die Abhängigkeit $\gamma^* = f(M)$ bei $c = 0,3$ für Abbauprodukte der Gelatine

Substanz	γ^*	$\log M$	
Glykokoll	0,69	1,87	
Alanin	0,70	1,95	
Glycil-glycin . .	0,65	2,12	
Glycil-leucin . .	0,64	2,27	
Gelatine	0,29	4,95	
Abbauprodukt I	0,35	4,50	} durch graphische Interpolation
„ II	0,40	4,11	
„ III	0,42	3,95	
„ IV	0,49	3,41	
„ V	0,55	2,95	

Einige durch Fällungstitration bestimmte Werte des M wurden durch kryoskopische Messungen nachgeprüft. Die Resultate sind in der Tab. 9 zusammengestellt.

Tabelle 9

Vergleich der durch Fällungstitration und durch Kryoskopie ermittelten Molekulargewichte einiger Abbauprodukte der Proteine

Substanz	M durch Kryoskopie	M durch Fällungs- titration	Abweichung %
Abbauprodukt der Gelatine IV ³⁷⁾	2300	2500	- 8,5
	2600		
	3300		
Abbauprodukt der Gelatine V ³⁷⁾	1300	900	- 29
	1300		
	1200		
Abbauprodukt des Edestins ³⁸⁾	6170	3800	- 28
		4200	
		5300	
Abbauprodukt des Ovalbumins ³⁹⁾ (Lysalbinsäure)	2300	4400	+ 91
Abbauprodukt des Caseins ⁴⁰⁾	580	1500	+ 40
	1550		

³⁷⁾ B. Jirgensons, J. prakt. Chem. [2] 160, 21 (1942).

³⁸⁾ B. Jirgensons, J. prakt. Chem. 160, 65 (1942).

³⁹⁾ B. Jirgensons, Kolloid-Z. 98, 70 (1942).

⁴⁰⁾ B. Jirgensons, Biochem. Z. 257, 429 (1933); J. prakt. Chem. 159, [2] 303 (1942).

Es ist also mit einer Abweichung von 10—90 % zu rechnen. Da die Abweichungen positiv und auch negativ sind, so kann man annehmen, daß das Verfahren im Grunde richtig ist. Die Gründe, die solche Abweichungen verursachen, können folgende sein. 1. Verschiedenheit in der chemischen Zusammensetzung und Struktur der einzelnen Glieder der Reihen Aminosäuren-Polypeptide-Proteine. Die Proteine bestehen aus verschiedenen Aminosäuren, wobei das Verhältnis zwischen hydrophilen und lipophilen Gruppen in verschiedenen Aminosäuren, sowie verschiedener Polypeptide verschieden ist. 2. Die Löslichkeit und Fällbarkeit ist von der Ionisation bzw. p_H der Lösung abhängig. Es ist fast unmöglich, immer den gleichen Ionisationsgrad einzuhalten. Der Einfluß von p_H ist z. B. bei den Abbauprodukten des Edestins sichtbar. Die Zahlen von $M=3800$ und 4200 (Tab. 9) wurden erhalten von den Titrationen beim p_H , das stark von dem isoelektrischen Punkt des Edestins abweicht, die Zahl 5300 dagegen beim $p_H = 6,9$, d. h. beim isoelektrischen Punkte des Edestins. Die letzte Zahl ist auch mit dem kryoskopisch ermittelten Wert 6170 in viel besserer Übereinstimmung als die ersten Zahlen. Für die Eiweißlösungen und dessen Abbauprodukte kann man auch Salzpuffer anwenden. Man kann so einen konstanten p_H gewährleisten. Jedoch besteht dann die Gefahr, durch die Einwirkung der Salze die Teilchengröße zu beeinflussen. Wenigstens bei der Gelatine, die labile Micellen hat, können Neutralsalze, wie z. B. NaCl, sehr beträchtliche Änderungen der γ -Werte hervorrufen⁴¹⁾. Die Pufferung soll mit möglichst geringer Salzkonzentration ausgeführt werden.

Der dritte Vorwand, mit dem die Abweichungen in der Tab. 9 erklärt werden können, ist die Unsicherheit der Kryoskopie. Für die Abbauprodukte des Caseins kann man mit der Kryoskopie keine übereinstimmende Zahlen erhalten. Auch für die gut dialysierten Lösungen der Lysalbinsäuren erhielt C. Paal⁴²⁾ seinerzeit nur $M=800—1200$, der Verfasser 2300. C. Kennedy und Gorter⁴³⁾ untersuchten die Lysalbinsäuren auf den Gehalt der Aminosäuren; sie stellten fest, daß die

⁴¹⁾ B. Jirgensons, Biochem. Z. **310**, 225 (1942); Biochem. Z. **311**, 332 (1942).

⁴²⁾ C. Paal, Ber. dtsh. chem. Ges. **35**, 2195 (1902).

⁴³⁾ C. Kennedy u. R. A. Gorter, J. Amer. chem. Soc. **39**, 2734 (1917).

Lysalbinsäure aus verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzt ist, wobei die Molverhältnisse derselben nicht gleich sind. Daraus wird die Schlußfolgerung gezogen, daß das M der Lysalbinsäure viel größer als 800—1200 sein muß. Es ist wahrscheinlich, daß der von B. Jirgensons durch Fällungstiteration gefundene Wert $M=4400$ und nicht der kryoskopische ($M=800—1200$ oder 2300) der richtige ist. Auch die chemische Zusammensetzung der Abbauprodukte des Caseins spricht zugunsten einem höheren M (1500—1800), während die Kryoskopie niedrigere Werte ergab. Zur Zeit haben wir aber keine andere Methode, mit deren Hilfe im Gebiet von $M=10^3—10^4$ wir die durchschnittlichen Molekulargewichte an einem nicht einheitlichen Stoff ganz sicher und exakt bestimmen könnten.

Wichtig ist noch der Einfluß der Temperatur auf die γ -Werte. In den meisten Fällen werden die γ -Werte mit der Temperatur erhöht, so z. B. bei den Polystyrolen (vgl. Anm. 15 und 19), den Abbauprodukten des Glykogens (vgl. Anm. 16), sowie der Gelatine⁴⁴⁾. Dagegen erniedrigen sich beim Albumin die γ -Werte mit der Temperatur (vgl. Anm. 39 und 44). Bei der Gelatine ist es nachgewiesen, daß mit Erhöhung der Temperatur eine Desaggregation stattfindet. Dagegen ist beim Ovalbumin eine Aggregation der Albuminteilchen mit der Temperatur wahrscheinlich.

Aus den Daten der Fällungstiteration, wenn die Fällung mit verschieden konz. Lösungen vorgenommen wird, kann nun auch die Löslichkeit im gemischten Lösungsmittel leicht ermittelt werden. Man trägt zuerst auf die Ordinate die γ , auf die Abszisse die Gleichgewichtskonzentration ($\log c$) der fällbaren Substanz. Für die verschiedenen Polymeren einer Reihe erhält man Gerade, die bestimmte Neigungen haben. Zieht man nun von einem bestimmten γ (z. B. $\gamma^*=0,4$ oder $\gamma=30$ Vol.-%) parallel der Abszisse eine Gerade, die die $\gamma=f(c)$ -Geraden schneidet, so bekommt man in den Schnittpunkten die Löslichkeiten (c) der verschiedenen Polymeren in dem betreffenden Lösungsmittelgemisch. Die so ermittelten Werte von c (Löslichkeit) kann man nun als Funktion des M graphisch darstellen. Die Abhängigkeit, z. B. bei den Abbauprodukten des Glykogens,

⁴⁴⁾ B. Jirgensons, Biochem. Z. 311, 332 (1942).

ist keine lineare, auch dann nicht, wenn die eine Variable logarithmisch genommen wird.

Zusammenfassend kann man sagen, daß man mit der Fällungstitration das Molekulargewicht oder die Teilchengröße an die Glieder polymerhomologer Reihen sehr einfach und mit brauchbarer Genauigkeit in den Fällen bestimmen kann, in denen die Konstanten bestimmt sind. Besondere Apparatur ist nicht nötig. Die Genauigkeit beträgt meistens 5—30%. Für viele praktische Zwecke, z. B. wenn man sich über die Abbaustufe eines Proteins oder Polysacharids orientieren will, und wo meist die Substanzen uneinheitlich sind, genügt solche Genauigkeit vollständig. Der Anwendungsbereich erstreckt sich von $M \sim 10^2$ bis zu $M \sim 5 \cdot 10^5$. Die Genauigkeit ist am größten bei $M = 5 \cdot 10^2$ — $5 \cdot 10^4$. Für die Messungen braucht man wenig Substanz und die Bestimmung ist in kurzer Zeit ausführbar. Werden die Lösungen verschiedener Konzentration titriert, so kann man aus den Resultaten der Fällungstitration auch noch die Löslichkeit der Polymere in Lösungsmittelgemischen verschiedener Zusammensetzung sehr leicht ermitteln. Außerdem kann man von den Resultaten der Fällungstitration Schlußfolgerungen über die Teilchenform ziehen.