

Mitteilung aus dem Chemischen Institut der Universität Riga (Lettland).
Analytisches Laboratorium. Vorstand: Prof. M. Straumanis

Molekulargewichtsbestimmungen an Abbauprodukten des Edestins durch Fällungstitation

Von Br. Jirgensons

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 5. Januar 1942)

Nach den bisherigen Untersuchungen¹⁾ erwies sich die Fällungstitation als eine sehr einfache und gute Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts an Gliedern verschiedener polymerhomologen Reihen. Im Falle echter polymerhomologen Reihen, wie z. B. bei den Abbauprodukten des Glykogens²⁾, gibt die Methode genaue Resultate. Im Falle der Reihen Aminosäuren - Polypeptide - Protein, wo ein makromolekularer Stoff aus verschiedenen Bausteinen zusammengesetzt ist und die chemische Zusammensetzung sowie Struktur nicht bei allen Gliedern der Reihe die gleiche ist, kann man mit der Fällungstitation für die Molekulargewichte (M) Näherungswerte erhalten. In einigen Fällen, z. B. bei der Thermolyse der Gelatine³⁾, wo eine regelmäßige Desaggregation und Hydrolyse der Gelatineteilchen stattfindet, kann man mit der Fällungstitation die M der Abbauprodukte sogar recht genau bestimmen. Bei Ovalbumin und Casein dagegen kann man nur

¹⁾ H. Staudinger u. W. Heuer, Z. physik. Chem. (A) 171, 129 (1934); G. V. Schulz u. Br. Jirgensons, ebenda (B) 46, 105 (1940); E. Husemann, J. prakt. Chem. [2] 158, 163 (1941); E. H. Lovell u. H. Hibbert, J. Amer. chem. Soc. 61, 1916 (1939).

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

³⁾ Br. Jirgensons, J. prakt. Chem. (im Druck).

annähernd richtige Zahlen erhalten¹⁾. Da die Abbauprodukte aber meistens keine einheitlichen Stoffe sind, muß man sich mit einem Durchschnittswert für das Molekulargewicht begnügen. Die Näherungswerte sind hinsichtlich der Genauigkeit vollkommen ausreichend.

Wie in einer noch nicht veröffentlichten Arbeit gezeigt werden soll, hat auch die Temperatur und besonders die Wasserstoffionenkonzentration einen großen Einfluß auf die Fällbarkeit. Bei vergleichender Titration eines Proteins und dessen Abbauprodukten muß man darauf achten, daß das p_H möglichst nahe vom isoelektrischen Punkte liegt. Auch Neutralsalze haben einen Einfluß auf die Fällbarkeit, so daß eine Pufferung überhaupt nicht oder nur mit sehr kleiner Salzkonzentration zulässig ist.

Die Grundgröße bei der Fällungstitration ist die Fällbarkeit, die mit γ^* bezeichnet wird. Werden v_0 ccm einer Lösung durch Aceton titriert und v ccm des Acetons für die Titration bis zur Trübung verbraucht, so ist $\gamma^* = \frac{v}{v + v_0}$. Für die Reihen Aminosäuren - Polypeptide - Protein gilt nun die Beziehung $\gamma^* = \alpha - \beta \log M$, wo α und β für jede Reihe charakteristische Konstanten sind²⁾. Die Ermittlung dieser Konstanten ist aber nicht unbedingt nötig. Viel einfacher kann man ein unbekanntes M graphisch ermitteln. Die Gleichung ist die einer Geraden. Die Ermittlung eines unbekanntes M geschieht folgendermaßen: Man titriert die Lösungen des betreffenden Proteins (mit bekanntem M), sowie die Lösungen der wichtigsten Aminosäuren, trägt die γ^* -Punkte in ein Koordinatensystem und konstruiert eine Gerade (auf die Abszisse trägt man $\log M$ auf). Nun titriert man das Abbauprodukt, trägt den γ^* -Wert auf der Geraden auf, fällt auf die Abszisse eine Lotrechte und liest auf der Abszisse den betreffenden $\log M$ ab. Will man genauere Resultate erhalten, so muß man die Titrationsen bei konstanter Temperatur und mit möglichst reinen Stoffen ausführen. Die Titration muß auch mit Lösungen verschiedener Konzentration vorgenommen werden,

¹⁾ Br. Jirgensons, J. prakt. Chem. [2] 159, 303 (1942); Kolloid-Z. 98, 70 (1942).

²⁾ Br. Jirgensons. a. a. O.

das am einfachsten durch fortschreitende Verdünnung einer Grundlösung erreichbar ist. Von der Konzentrationsabhängigkeit der Fällbarkeit, mit Hilfe der Intrapolation, ermittelt man dann den γ^* -Wert bei der gleichen Konzentration (c) der Substanzen der Reihe, deren γ^* -Werte auf der Geraden aufgetragen werden.

In dieser Versuchsreihe wurde der Abbau von Edestin in 8,0-molarer Harnstofflösung untersucht und die Molekulargewichte der Abbauprodukte durch Fällungstitration bestimmt. An einem Abbauprodukt wurde das M auch durch kryoskopische Bestimmungen festgestellt, wobei sich herausstellte, daß das kryoskopisch ermittelte M mit dem mit der Fällungstitration bestimmten annähernd übereinstimmt.

Versuchsteil

6,5 g Edestin aus Hanfsamen (von der Firma Hoffmann-La Roche) wurde in 8,0-molarer Harnstofflösung gelöst¹⁾, filtriert und 4 Stunden auf kochendem Wasserbade, weiter auf einem Drahtnetz (Rückflußkühler) mit kleiner Flamme direkt gekocht. Dabei erfolgt eine teilweise Hydrolyse des Harnstoffs, wobei Ammoniakbildung feststellbar war. Nach bestimmten Zeitperioden wurden aus dem Gemisch Proben genommen, durch HCl neutralisiert und mit Aceton titriert.

Das Edestin löste sich im 8,0-molaren Harnstoff gut. Die Lösung hatte einen $[\alpha]_D = -66,0^\circ$ und relative Viscosität (im Vergleich zu 8,0-molarer Harnstofflösung) 1,665. Die Lösung hatte eine schwach gelblich-braune Farbe. Bei der Thermolyse wurde eine Verstärkung der Farbtiefe beobachtet.

Die letzte Probe, d. h. das Abbauprodukt, das durch 4-stündige Erhitzung auf dem Wasserbade und weiterem 8-stündigem Kochen auf der Flamme erhalten wurde, wurde dialysiert. Die Dialyse wurde in einem Cellophansäckchen gegen warmes destilliertes Wasser ausgeführt und der Endpunkt durch kryoskopische Untersuchung des Außenwassers bestimmt. Nachher wurde die Konzentration des dialysierten Abbauprodukts durch Eindampfen und Trocknung bei 110–120° einer bestimmten Menge der Lösung festgestellt. Nach 3-tägiger Dialyse erwies sich die Lösung des Abbauprodukts als frei von niedermolekularen Beimengungen, und war 2%, d. h. fast ebenso konzentriert wie die Urösung. Damit ist bewiesen, daß bei dem Abbau fast keine niedermolekulare Abbauprodukte sich gebildet haben, denn solche könnten durch die Membran passieren, und die Konzentration des Abbauprodukts sollte erheblich kleiner sein als vorher.

¹⁾ Vgl. Wo. Pauli u. L. Hofmann, Kolloid-Beih. 42, 34 (1935).

Die kryoskopische Messung erfolgte in der üblichen Weise mit einem Beckmannschen Thermometer. Die Titrationsen wurden wie früher mit reinem Aceton ausgeführt. Die Endpunkte waren scharf, die Resultate gut reproduzierbar. Geringe Änderungen des p_H , z. B. von 6,7 auf 7,3 haben bei dem Edestin und deren Abbauprodukten nur einen geringen Einfluß auf die γ^* -Werte.

In der Tab. 1 sind die Resultate der Fällungstiteration des Edestins und deren Abbauprodukte zu ersehen. Alle diese Titrationsen wurden mit nicht dialysierten, harnstoff- und chlorammoniumhaltigen Lösungen ausgeführt. c ist die Konzentration am Trübungspunkt; c wurde durch fortschreitende Verdünnung der Grundlösung mit 8,0-molarem Harnstoff variiert.

Tabelle 1

Edestin und die Abbauprodukte des Edestins in 8,0-mol. Harnstofflösung.

$$v_0 = 5,0 \text{ ccm. } T = 20^\circ. \quad c = \frac{v_0}{v_0 + v} \cdot c_a$$

(c_a = Konzentration des Edestins am Anfang der Titration)

a) Nicht abgebautes Edestin in 8,0-mol. Harnstoff, $p_H = 6,7$.

c_a ‰	v ccm	γ^*	c ‰
2,0	3,40	0,405	1,190
1,0	3,55	0,416	0,585
0,5	3,62	0,421	0,290
0,25	4,02	0,446	0,139

b) Durch 4-stündigen Abbau erhaltenes Abbauprodukt (T_4) in 8,0-mol. Harnstofflösung, $p_H = 7,7$.

1,6	4,00	0,445	0,889
0,8	4,32	0,463	0,430
0,4	4,60	0,479	0,208
0,2	5,34	0,516	0,097

c) Durch 8-stündigen Abbau gewonnenes Abbauprodukt (T_8) in 8,0-mol. Harnstofflösung, $p_H = 7,2$.

2,0	4,32	0,463	1,071
1,0	4,65	0,482	0,518
0,5	5,12	0,506	0,247
0,25	5,51	0,524	0,119

In der Tab. 2 sind die Resultate mit dem dialysierten Abbauprodukt zusammengestellt. Da Edestin selbst in rein wäßriger Lösung nicht zu erhalten ist (die nicht abgebaute Lösung des Edestins in 8,0-mol. Harnstoff bei der Dialyse flockt aus), sind für die Molekulargewichtsbestimmungen nur die Resultate verwendbar, die von den Titrationsen der harn-

stoffhaltigen Lösungen zu erhalten sind. Um vergleichbare Resultate zu erhalten, muß man also zu der reinen dialysierten Lösung des Abbauprodukts die entsprechende Menge Harnstoff-zusetzen. Aus der Tab. 2 sind aber auch die Resultate der Titration der rein wäßrigen Lösung erkennbar, sowie die Resultate von den Titrationen der Gemische mit NaCl. Die Resultate der Titrationen in Gegenwart von NaCl (und Abwesenheit von Harnstoff) zeigen, daß die γ^* -Werte des Abbauprodukts viel höher sind (0,44—0,61) als die γ^* -Werte eines nicht abgebauten Edestins im 2 n-NaCl (0,29—0,34), was mit den allgemeinen Prinzipien der Fällungstitration in Einklang steht (vgl. Abb. 3).

Tabelle 2

Durch 12-stündigen Abbau gewonnenes Abbauprodukt des Edestins (T_{12}), dialysiert. $v_0 = 5,0$ ccm. $T = 20^\circ$.

a) Dialysiertes Abbauprodukt. T_{12} + Harnstoff 8,0-mol. im Liter des Gemisches, $p_H = 7,2$.

c_a ‰	v ccm	γ^*	c ‰
1,6	5,15	0,507	0,788
0,8	6,38	0,562	0,352
0,4	7,20	0,590	0,194
0,2	8,13	0,620	0,076

b) T_{12} in rein wäßriger Lösung, $p_H = 7,1$

2,0	2,02	0,288	1,42
1,0	2,38	0,322	0,677
0,5	2,93	0,370	0,315
0,25	4,20	0,456	0,136

c) T_{12} versetzt mit 2 n-NaCl (ohne Harnstoff, 1 n-NaCl im Gemisch), $p_H = 7,0$

1,0	4,02	0,446	0,554
0,5	6,00	0,545	0,227
0,25	8,05	0,617	0,096

d) Nicht abgebautes Edestin in 2 n-NaCl (ohne Harnstoff)

$p_H = 6,1$		$p_H = 6,9$	
γ^*	c	γ^*	c
0,288	1,426	0,317	1,362
0,294	0,706	0,323	0,677
0,303	0,347	0,325	0,338
0,314	0,171	0,342	0,165

In der Tab. 3 sind die Resultate der Titrationsen einiger Aminosäuren (Lösungen in 8,0-mol. Harnstoff) zusammengestellt. Die entsprechenden γ^* -Werte wurden für die Konstruierung der $\gamma^* - \log M$ -Geraden verwendet.

Tabelle 3

Fällbarkeit einiger Aminosäuren aus 8,0-mol. Harnstoff. $T = 20^\circ$.

Asparagins.-Na, $p_H = 7,1$		Glykokoll, $p_H = 7,4$		Leuzin, $p_H = 7,3$	
γ^*	c	γ^*	c	γ^*	c
0,678	0,646	0,721	0,558	0,725	0,275
0,728	0,273	0,780	0,194	0,835	0,082
0,790	0,105	0,868	0,066	0,910	0,022
0,840	0,040				

Die Konzentrationsabhängigkeit der Fällbarkeit ist in der Abb. 1 sichtbar. Es besteht hier anscheinend überall ein linearer

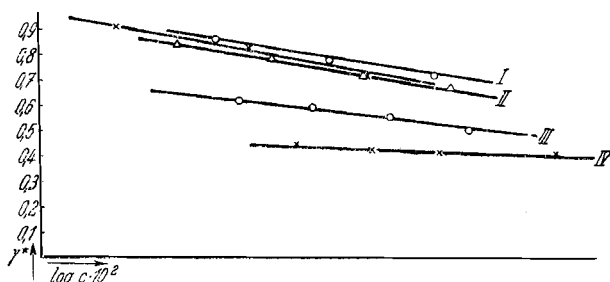


Abb. 1. Die Abhängigkeit der Fällbarkeit von der Konzentration (alle Substanzen in 8,0-molarer Harnstofflösung).

I = Glykokoll

III = Abbauprodukt T_{12}

II = Asparaginsäures Na

IV = Edestin

Zusammenhang zwischen Fällbarkeit und dem $\log c$, gemäß der Theorie von G. V. Schulz¹⁾.

In der Tab. 4 sind nun die wichtigsten Resultate über den Zusammenhang zwischen M und der Fällbarkeit zusammengestellt. Die γ^* -Werte sind auf eine konstante Gleichgewichtskonzentration $c = 0,3\%$ durch Intrapolation (von den Geraden der Abb. 1 und der Tab. 1) umgerechnet. Im Falle der Abbauprodukte T_4 und T_8 , wegen dem durch Neutralisation des

¹⁾ G. V. Schulz, Z. physik. Chem. (A) 179, 321 (1937).

Tabelle 4

Die Abhängigkeit der Fällbarkeit vom Molekulargewicht bei $c = 0,3$.

	γ^*	$\log M$	M
Glykokoll . . .	0,76	1,87	75,0
Leuzin	0,72	2,11	131,1
Asparaginsäure	0,71	2,12	133,0
Abbauprod. T_{12}	0,55	3,58	3 800
„ T_3	0,49	4,10	(12 000)
„ T_4	0,47	4,25	(17 000)
Edestin	0,42	4,69	50 000

NH_4OH im Gemisch befindlichen Chlorammonium, sind die γ^* -Werte etwas zu groß¹⁾. Nicht vollständig geklärt ist auch die Frage über den M des Edestins in Harnstofflösung. Nach osmotischen Messungen von N. F. Burk und D. M. Greenberg²⁾ hat Edestin in konz. Harnstofflösung ein M von etwa 50000.

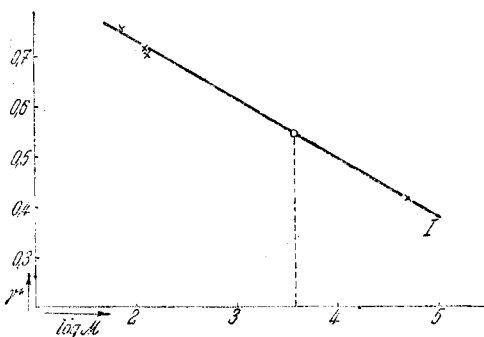


Abb. 2. Die Abhängigkeit der Fällbarkeit von dem Molekulargewicht.
 × = die Punkte der Aminosäuren und des Edestins
 ○ = der Punkt des Abbauproduktes T_{12}

Nach den mit Hilfe der Ultrazentrifuge ausgeführten Messungen von Svedberg und Stamm³⁾ hat Edestin in wässriger NaCl-haltiger Lösung ein $M = 210000$. Für die Bestimmungen in Harnstofflösungen scheint die Zahl 50000 richtiger zu sein, da auch die γ^* -Werte des nicht abgebauten Edestins in 2n-NaCl

¹⁾ B. Jirgensons, Biochem. Z. 310, 225 (1942).

²⁾ N. F. Burk u. D. M. Greenberg, J. biol. Chem. 87, 197 (1930).

³⁾ The Svedberg u. A. J. Stamm, J. Amer. chem. Soc. 51, 2170 (1929).

kleiner sind als die γ^* -Werte des nicht abgebauten Edestins im Harnstoff (vgl. Tab. 1 und 2).

Interessant war es nun, die durch Fällungstitration ermittelten Werte mit denen zu vergleichen, die mit anderen Methoden erhalten worden sind. Es wurden kryoskopische Messungen an einer dialysierten Lösung des Abbauprodukts T_{12} ausgeführt. Die Resultate sind in der Tab. 5 zusammengestellt.

Tabelle 5
Kryoskopische Bestimmungen am Abbauprodukt T_{12} .
0,50 g Substanz in 25 g Wasser, $K = 1850$.

Gefrierpunkte der Lösung	Gefrierpunkte des Dialysewassers	
3,066°	3,076°	$d = 3,074 - 3,068 = 0,006°$
3,070	3,073	
3,071	3,073	$M = \frac{1850 \cdot 0,5}{25 \cdot 0,006} = 6170$
3,066	3,074	

In der Abb. 3 ist aus den Resultaten der Fällungstitration des Edestins und einiger Aminosäuren von harnstofffreien, NaCl-haltigen Lösungen noch $\gamma^* - \log M$ -Geraden konstruiert.

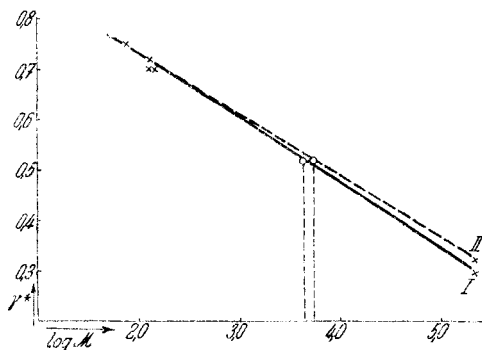


Abb. 3. Die Abhängigkeit der Fällbarkeit vom Molekulargewicht.

× = die Punkte der Aminosäuren und des Edestins (M bekannt)

○ = der Punkt des Abbauprodukts T_{12}

I = Vergleichspunkt des Edestins bei $p_H = 6,1$

II = Vergleichspunkt des Edestins bei $p_H = 6,9$

Für das Edestin wurde der $\log 210\,000 = 5,32$ genommen (nach Svedberg u. Stamm, a. a. O.). Der γ^* -Wert des Edestins in 2n-NaCl bei $c = 0,3$ beträgt 0,30 ($p_H = 6,1$) oder 0,32 ($p_H = 6,9$).

Gemäß den in Tab. 2 angeführten Resultaten wurde für die NaCl-haltigen Lösungen des T_{12} bei $c = 0,3$ ein $\gamma^* = 0,52$ ermittelt. Mit Hilfe der in Abb. 3 konstruierten Geraden erhält man für das Abbauprodukt T_{12} , dann $\log M = 3,625$ ($p_H = 6,1$) und $3,725$ ($p_H = 6,9$). Der erste Logarithmus entspricht einem $M = 4200$, der zweite (von der getrichelten Geraden) einem $M = 5300$. Diese Zahlen sind also in brauchbarer Übereinstimmung mit der kryoskopisch ermittelten Zahl 6100.

Zusammenfassung

Edestin wurde durch Erhitzung in 8,0-molarer Harnstofflösung abgebaut und das mittlere Molekulargewicht der Abbauprodukte durch Fällungstitration bestimmt. Für ein Abbauprodukt, das durch 12-stündige Erhitzung erhalten wurde, wurde das Molekulargewicht zu 3800—5300 bestimmt. Durch kryoskopische Messungen wurde für dieses Abbauprodukt $M = 6100$ gefunden.

Dem Vorstand des Analytischen Laboratoriums, Herrn Prof. Dr. M. Straumanis, dankt der Verfasser für das große Entgegenkommen, das er ihm während der Ausführung dieser Arbeit zeigte.