

# Viskositätsstudien an Lösungen von DL-Phenylalaninpolypeptiden.

Von

J. W. Breitenbach, K. Allinger und A. Koref.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 14. Januar 1955.)

DL-Phenylalaninpolypeptide werden unter verschiedenen Bedingungen aus dem N-Carbonsäureanhydrid dargestellt. Die Viskositätserhöhung, die sie in Lösung von Nitrobenzol, Dichloressigsäure und Benzol hervorrufen, wird bestimmt. Es besteht keine Beziehung zwischen dem mittleren Polymerisationsgrad der Polypeptide und den Viskositätseigenschaften ihrer Lösungen. In allen untersuchten Fällen scheint eine starke Aggregation der Polypeptidmolekel in Lösung vorzuliegen.

Makromolekulare DL-Phenylalaninpolypeptide, die durch Polymerisation des N-Carbonsäureanhydrids entstanden sind, zeigen je nach den Entstehungsbedingungen sehr verschiedene Löslichkeitseigenschaften und sehr verschiedenes Viskositätsverhalten in Lösung<sup>1</sup>. Bei der großen Bedeutung, die die Viskosität der Lösung makromolekularer Stoffe heute für die Bestimmung von Molgewichten hat, schien es uns wichtig, das bis jetzt vorliegende Material in drei Richtungen zu erweitern. Erstens durch Messung an DL-Phenylalaninpolypeptiden, deren mittlerer Polymerisationsgrad durch die Kinetik ihrer Bildung innerhalb enger Grenzen festgelegt ist<sup>2</sup>. Zweitens durch Heranziehung eines Lösungsmittels, in dem alle Phenylalaninpolypeptide, ungeachtet ihrer Entstehungsbedingungen, löslich sind; in dieser Richtung hat sich Dichloressigsäure als brauchbar erwiesen<sup>3</sup>. Drittens durch Lichtstreuungsmessungen an

<sup>1</sup> J. W. Breitenbach und F. Richter, Makromol. Chem. 4, 262 (1950).

<sup>2</sup> Vgl. J. W. Breitenbach und K. Allinger, Mh. Chem. 84, 1103 (1953).

<sup>3</sup> C. H. Bamford, W. E. Hanby und F. Happey, Proc. Roy. Soc. London, Ser. A 205, 30 (1950).

Lösungen der Polypeptide. Diese können einen direkten Aufschluß über den Zustand der Polypeptide in Lösung geben. Über die Ergebnisse der Lichtstreuungsmessungen wird in einer folgenden Arbeit berichtet. Hier sollen die Löslichkeits- und Viskositätsverhältnisse behandelt werden.

### 1. Lösungen in Nitrobenzol.

Über die Kinetik der Bildung von Phenylalaninpolypeptiden in Nitrobenzollösung haben wir schon berichtet<sup>2</sup>. Mehrere der im Rahmen der zitierten Arbeit dargestellten Polypeptide wurden für die Viskositätsmessungen verwendet. Ihre Entstehungsbedingungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Bezeichnung stimmt mit der in der kinetischen Arbeit überein.

Tabelle 1. DL-Phenylalaninpolypeptide.  
Polymerisation in Nitrobenzollösung.  
Starter: N-Äthylglycindiäthylamid.

Polypeptid	Polymerisations-		Umsatz des N-Carbonsäureanhydrids	
	Temp. ° C	Dauer Stdn.	%	Mole auf 1 Mol Starter
N 7	50	20	84,6	4,5
N 6	50	4,67	86,8	9,5
N 2	30	21	92,5	10,9
N 8	50	18,5	88,4	20,5
N 4	30	91	98,2	68
N 5	50	34	92,9	66

Die in der letzten Spalte angeführten Zahlen kann man näherungsweise dem mittleren Polymerisationsgrad der gebildeten Polypeptide gleichsetzen<sup>2</sup>.

Tabelle 2. Konzentrationsabhängigkeit von  $\eta_{sp}/c$  in Nitrobenzol.

Bezeichnung	Konz. g/cm <sup>3</sup>	$\eta_{sp}/c$ cm <sup>3</sup> /g
N 4	0,00470	26,5
	0,00282	25,7
N 8	0,0102	72,5
	0,0034	60,0
	0,0017	58,3

Bei der Bildung in Nitrobenzollösung ist das Polypeptid auch am Ende der Reaktion praktisch noch zur Gänze in Lösung. Es tritt nur eine schwache Trübung auf, die durch Filtration leicht entfernt werden konnte. Wird allerdings das Polymere aus der Nitrobenzollösung durch Fällung mit Petroläther (nach Verdünnung mit Benzol) rein gewonnen, so ist es nicht mehr in Nitrobenzol löslich. Deshalb wurde unmittelbar die Viskosität der bei der Polymerisation erhaltenen Lösungen gemessen und nachträglich durch Ausfällen des Polypeptids die

Konzentration bestimmt. An den Lösungen von N 4 und N 8 wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Viskositätszahl<sup>4</sup>  $\eta_{sp}/c$  untersucht (Tabelle 2).

Die Konzentrationsabhängigkeit ist, besonders bei den kleinen Konzentrationen, verhältnismäßig gering und man kann daher ohne weiteres für verschiedene Peptide die etwa bei  $0,005 \text{ g/cm}^3$  bestimmten Zahlen miteinander vergleichen. In Tabelle 3 ist die Viskositätszahl und das aus dem kinetischen Ansatz folgende mittlere Molgewicht  $\bar{M}$  angegeben.

Wenn auch die Zahlen für  $\bar{M}$  mit einer beträchtlichen Unsicherheit behaftet sind, so ist es doch ganz klar, daß keine Beziehung zwischen  $\bar{M}$  und der Viskositätsgröße besteht. Besonders die verhältnismäßig großen Werte von  $\eta_{sp}/c$  für die niedrigmolekularen Peptide zeigen, daß die Lösungen große Aggregate enthalten und daß keine molekulare Verteilung

Tabelle 3. Viskositätszahlen und mittlere Molgewichte.

Bezeichnung	$\eta_{sp}/c$ bei $0,005 \text{ g/cm}^3$	$\bar{M}$
N 7	20	800
N 6	13,5	1600
N 2	7	1800
N 8	62	3200
N 4	27	10000
N 5	32	10000

vorliegt. Bei den Viskositätsmessungen selbst erwies sich die Viskosität der Lösungen als befriedigend konstant. Ein Versuch, bei dem die Nitrobenzollösung von N 4 durch 120 Tage aufbewahrt wurde, zeigte allerdings, daß doch eine Zeitabhängigkeit vorhanden ist. Die Werte für  $\eta_{sp}/c$  betragen nach dieser Zeit

bei $0,00094 \text{ g/cm}^3$	.....	$11,8 \text{ cm}^3/\text{g}$
„ $0,00046$	„	..... $10,6$ „
„ $0,00031$	„	..... $10,4$ „

Die Konzentrationsabhängigkeit ist wieder gering; der Grenzwert ist aber kleiner als die Hälfte des unmittelbar nach der Herstellung der Lösung gemessenen Wertes (siehe Tabelle 2). Die Ursache für diese

<sup>4</sup> Wir schließen uns von jetzt an dem Nomenklaturvorschlag der IUPAC an und bezeichnen die Größe  $\eta_{sp}/c$  als Viskositätszahl, ihren Grenzwert für die Konzentration Null:  $\lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c$  als Grenzviskositätszahl. Diese Größe wurde in unseren Arbeiten Grundviskosität genannt. Als Symbol für die Grenzviskositätszahl wird dasselbe wie früher für die Grundviskosität, nämlich  $[\eta]$ , verwendet. Ihre Dimension ist  $\text{cm}^3/\text{g}$ , das heißt die Konzentrationen werden in  $\text{g/cm}^3$  angegeben. Dadurch ist der Zahlenwert für die Grenzviskositätszahl das Tausendfache des früher verwendeten Zahlenwertes der Grundviskosität. Das ist zu beachten, wenn man Zahlenwerte für  $[\eta]$  aus unseren Veröffentlichungen vor 1955 mit nunmehr erscheinenden vergleicht.

Zeitabhängigkeit ist nicht etwa eine Zerteilung der Aggregate, sondern, wie insbesondere Lichtstreuungsmessungen zeigen, ein Übergang in eine kompaktere Struktur.

## 2. Lösungen in Dichloressigsäure.

Die einmal aus Nitrobenzollösung ausgefällten Polymeren, die, wie schon erwähnt, in Nitrobenzol selbst nicht mehr löslich waren, konnten in Dichloressigsäure gelöst werden. Überhaupt waren alle unter verschiedenen Polymerisationsbedingungen erhaltenen Phenylalaninpolypeptide in Dichloressigsäure löslich. Es erschien daher wichtig zu untersuchen, ob in diesem Lösungsmittel eine Beziehung zwischen mittlerem Molgewicht und Viskositätseigenschaften vorhanden ist. Die reine Dichloressigsäure ist für exakte Viskositätsmessungen schlecht geeignet. Sie ist sehr hygroskopisch und durch geringen Wassergehalt wird die Viskosität stark erhöht. Mit etwa 6 Volumteilen Wasser auf 94 Volumteile Dichloressigsäure erhält man ein Gemisch mit maximaler Viskosität (etwa um 15% größer als reine Dichloressigsäure), das praktisch nicht mehr hygroskopisch ist. Seine Zusammensetzung wurde refraktometrisch kontrolliert, und zwar wurde immer auf  $n_{5461}^{20} = 1,46396$  eingestellt. Dieses Gemisch ist immer noch ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für die Polypeptide und wurde daher für die Viskositätsmessungen verwendet. Es wird im

Tabelle 4. Grenzviskositätszahlen  $[\eta]$  in Dichloressigsäure.

Bezeichnung	$[\eta]$ cm <sup>3</sup> /g	$\bar{M}$
N 2	13	1 800
N 8	12	3 200
N 4	12	10 000

folgenden nur als Dichloressigsäure bezeichnet. Für N 2, N 8 und N 4 wurden die Grenzviskositätszahlen in Dichloressigsäure bestimmt (Tabelle 4).

Es ist offenbar auch in Dichloressigsäure keine Beziehung zwischen  $[\eta]$  und  $\bar{M}$  vorhanden. Bei N 2 und N 8 ist  $[\eta]$  wieder viel größer als

bei molekularer Verteilung zu erwarten wäre.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für Phenylalaninpolypeptide, die unter kinetisch definierten Bedingungen in Benzollösung gewonnen wurden<sup>2</sup>. Die Peptide wurden bei 30° wieder mit N-Äthylglycindiäthylamid als Starter dargestellt. Hier schied sich schon während der Polymerisation ein großer Teil des Polymeren ab. Am Ende der Reaktion wurde auch noch der restliche, in Lösung befindliche Teil des Polymeren mit Petroläther ausgefällt und gemeinsam mit dem während der Reaktion abgeschiedenen abfiltriert und im Vak. getrocknet. In Tabelle 5 sind einige Ergebnisse angeführt.

Innerhalb der Meßgenauigkeit, die bei dem extrem kleinen Viskositätseffekt natürlich nicht sehr groß ist, ist  $\eta_{sp}/c$  konzentrationsunabhängig.

Besonders zusammen mit Tabelle 4 ist es ganz klar, daß man aus Viskositätsmessungen an Dichloressigsäurelösung keinerlei Schlüsse auf das mittlere Molgewicht von Phenylalaninpolypeptiden ziehen kann.

Tabelle 5. Viskositätsmessungen an Peptiden, die in Benzollösung gewonnen wurden.

Bezeichnung	Konz. g/m <sup>3</sup>	$\eta_{sp}/c$ cm <sup>3</sup> /g	$\bar{M}$
B 5	0,006	7,5	600
B 6	0,0158	7,3	1500
	0,0079	6,8	
	0,0045	7,0	
B 3	0,0040	6,3	2200
	0,0016	6,6	
B 4	0,00395	15	5000

### 3. Lösungen in Benzol.

Größere Mengen des benzollöslichen Polypeptids erhält man, wenn man die Polymerisation in Benzollösung bei höherer Temperatur (70° C) und ohne Zufügung einer Startsubstanz durchführt. Auch hier scheidet sich ein Teil des Polypeptids während der Polymerisation unlöslich ab. Durch Zentrifugieren (etwa eine halbe Std. bei 10000 Umdr./Min.) wurde der unlösliche Teil soweit abgetrennt, daß ein Dekantieren der Lösung möglich war. Die Lösung wurde durch Eingießen in Petroläther gefällt. Das Polypeptid war auch nach dem Fällen und Trocknen wieder in Benzol löslich, ebenso in Nitrobenzol und Dichloressigsäure. Der unlösliche Teil löst sich auch in Nitrobenzol nicht, wohl aber in Dichloressigsäure. Bei diesen Polymeren kann man von vorneherein keine quantitativen Angaben über den mittleren Polymerisationsgrad machen, da als Starter wahrscheinlich Phenylalanin wirkt, das in geringer Menge als Verunreinigung des N-Carbonsäureanhydrids anwesend sein dürfte. Da das N-Carbonsäureanhydrid immer gut gereinigt und unter Feuchtigkeitsausschluß aufbewahrt wurde, kann es sich nur um geringe Mengen handeln und die mittleren Polymerisationsgrade werden daher verhältnismäßig groß sein. Diese Erwartung wird bestätigt durch Aminogruppenbestimmung an den Peptiden<sup>5</sup>. Unter der Annahme, daß jede Peptidkette eine endständige primäre Aminogruppe enthält, ist damit ja das mittlere Molgewicht gegeben.

<sup>5</sup> Diese Bestimmungen wurden von Herrn Dr. G. Kainz im II. Chem. Lab. der Universität Wien nach der von ihm entwickelten Methodik (Mikrochim. Acta [Wien] 1953, 349) durchgeführt. Wir möchten auch an dieser Stelle unseren Dank zum Ausdruck bringen.

Das Polypeptid B 12 wurde durch Erhitzen reiner Benzollösung, die 0,125 Mol N-Carbonsäureanhydrid im Liter enthielt, durch 14 Stdn. auf 70° C erhalten. 40% waren in Benzol löslich (B 12 l), der Rest unlöslich (B 12 ul). B 12 l ent-

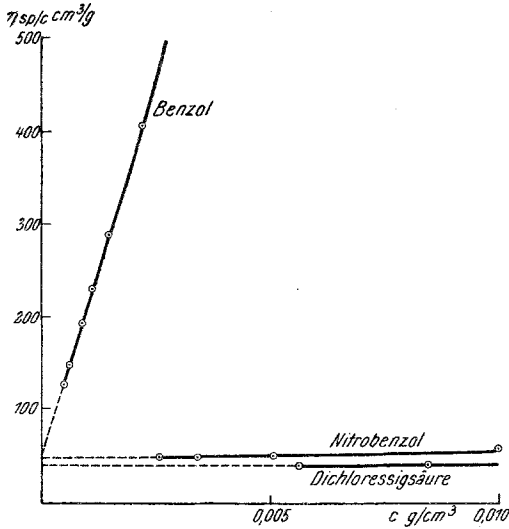


Abb. 1. Viskositätsmessungen an B 12 l in verschiedenen Lösungsmitteln.

zählt 0,14% Aminostickstoff, B 12 ul 0,12%. Innerhalb der Versuchsfehler haben also beide Substanzen das gleiche mittlere Molekulargewicht (~ 10000); das heißt der Unterschied in der Löslichkeit ist sicher nicht auf ein verschiedenes Molekulargewicht zurückzuführen. Besonders bemerkenswert ist an der benzollöslichen Substanz die gegenüber den Effekten in Nitrobenzol und Dichloressigsäure sehr starke Viskositäts-erhöhung in Benzol (Tabelle 6).

Die Konzentrationsabhängigkeit von  $\eta_{sp}/c$  in Benzol ist aber so stark, daß die auf  $c = 0$  extrapolierten Werte, wie man aus Abb. 1 erkennt, doch nicht sehr weit auseinander liegen. Diese abnorm starke Konzentrationsabhängigkeit<sup>1</sup> ist zweifellos auf besonders starke Aggregation bei den hohen Konzentrationen zurückzuführen. Aber auch der verhältnismäßig niedrige Grenzwert für  $c = 0$  hat offenbar nichts mit dem mittleren Molekulargewicht der Polypeptide zu tun. Die Grenzviskositätszahlen sind für Benzol 60, Nitrobenzol 48, Dichloressigsäure 38; die Grenzviskositätszahl von B 12 ul in Dichloressigsäure ist 25.

Noch weiter kompliziert werden die Viskositätsver-

Tabelle 6. Viskositätsmessungen an B 12 l.

Lösungsmittel	Konzentration g/cm³	$\eta_{sp}/c$ cm³/g
Benzol	0,00438	1560
	0,00219	407
	0,00146	291
	0,00109	232
	0,00090	193
	0,00060	146
	0,00045	125
Nitrobenzol	0,01008	58,5
	0,00504	49,5
	0,00336	49,7
	0,00252	49,0
Dichloressigsäure	0,0169	45,6
	0,00845	41,0
	0,00563	40,2

hältnisse dadurch, daß in anderen Fällen auch in Benzollösung nur eine schwache Konzentrationsabhängigkeit vorhanden ist.

In Tabelle 7 und Abb. 2 sind zwei solche Polypeptide angeführt; B 131 und B 141 sind die benzollöslichen Anteile von ebenfalls in Benzollösung bei 70° erhaltenen Polypeptiden.

Die Grenzviskositätszahlen für B 131 sind in Benzol 97, in Nitrobenzol 31, in Dichloressigsäure 26.

Schließlich wurden durch Polymerisation des N-Carbonsäureanhydrids in Benzollösung auch einige benzollösliche Phenylalaninpolypeptide erhalten, die in Nitrobenzol nicht völlig löslich waren. So waren z. B. von dem Polypeptid B 15 42% in Benzol löslich (B 15 l); von diesem benzollöslichen Anteil aber nur 69% in Nitrobenzol löslich (B 15 ll), der Rest unlöslich (B 15 l2). Grenzviskositätszahlen für B 15 l in Dichloressigsäure 18,6; B 15 ul in Dichloressigsäure 12,4; B 15 ll in Nitrobenzol 33.

In der Mehrzahl waren aber die benzollöslichen Peptide auch in Nitrobenzol löslich; alle, wie schon erwähnt, auch in Dichloressigsäure. Aus Dichloressigsäure durch Abdampfen des Lösungsmittels oder durch Ausfällen mit Petroläther wiedergewonnen, war aber die Benzollöslichkeit praktisch vollständig verlorengegangen.

Diskussion.

Ein Verständnis der Eigenschaften der Lösungen der DL-Phenylalaninpolypeptide ist auf Grund der von Breitenbach und Richter<sup>1</sup> entwickelten Vorstellungen möglich. Danach sind bei den ben-

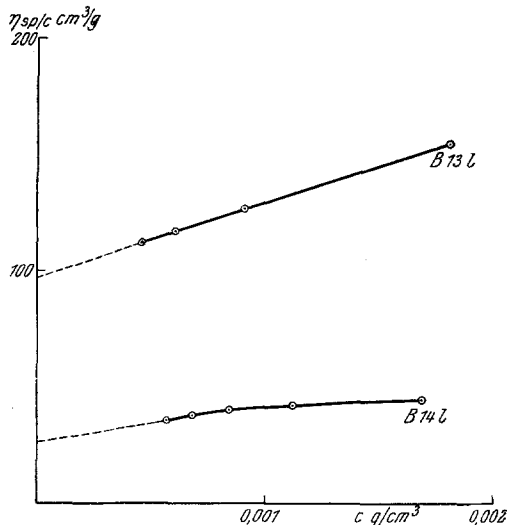
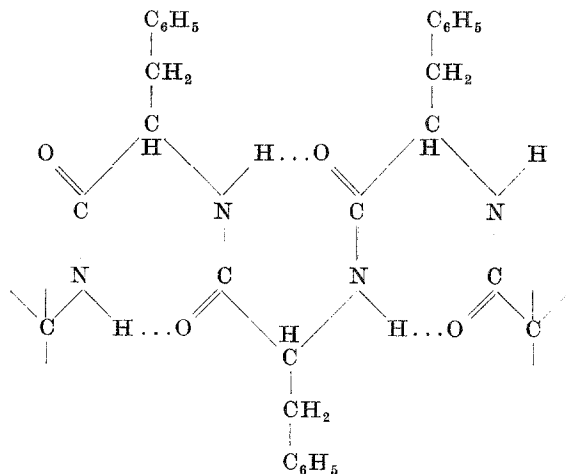


Abb. 2. Viskositätsmessungen an B 131 und B 141 in Benzollösung.

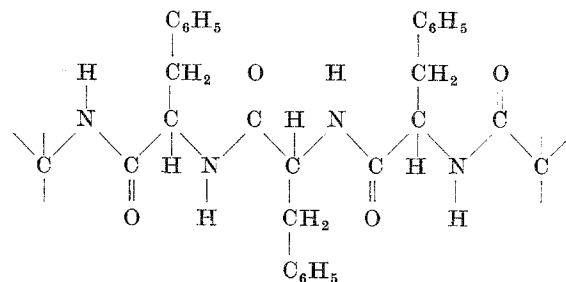
Tabelle 7. Viskositätsmessungen in Benzollösung.

Bezeichnung	Konz. g/cm <sup>3</sup>	$\eta_{sp}/c$ cm <sup>3</sup> /g
B 131	0,00180	155
	0,00090	126
	0,00060	117
	0,00045	112
B 141	0,00168	43,2
	0,00112	41,8
	0,00084	39,8
	0,00067	37,5
	0,00056	35,0

zolllöslichen Peptiden die Wasserstoffbrücken vorwiegend innerhalb einer Molekel abgesättigt, bei den unlöslichen aber zwischenmolekular. *Ambrose* und *Happey*<sup>6</sup> zeigten durch röntgenographische und Ultrarot-aufnahmen, daß den benzollöslichen Peptiden eine gefaltete ( $\alpha_{II}$ )



und den unlöslichen eine gestreckte ( $\beta$ )



Struktur zukommt. Natürlich ist es möglich, daß in den großen ungeordneten (nicht kristallinen) Bereichen der Polypeptide auch andere intramolekulare Wasserstoffbrücken bestehen. Es genügt nach *Bamford*, *Hanby* und *Happey*<sup>7</sup> schon ein geringer Anteil an  $\beta$ -Struktur in einem Polypeptid, um Unlöslichkeit in Benzol zu erzeugen.

Die hohe Viskosität der Benzollösungen ist nicht durch ein hohes Molgewicht der Polypeptide, sondern durch eine starke Aggregation bedingt. Auch bei den niedrigsten gemessenen Konzentrationen ist das

<sup>6</sup> *E. J. Ambrose* und *F. Happey*, *Nature* **163**, 483 (1949).

<sup>7</sup> *C. H. Bamford*, *W. E. Hanby* und *F. Happey*, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A* **206**, 407 (1951).



noch der Fall, so daß der auf die Konzentration 0 extrapolierte  $\eta_{sp}/c$ -Wert kein Maß für das mittlere Molgewicht der Polypeptide ist. Wie schon *Breitenbach* und *Richter* gezeigt haben, kann man die Aggregationsfähigkeit durch geeignete Maßnahmen erhöhen. Allerdings wurde dort aus dem kleinen osmotischen Druck dieser Lösungen auf ein sehr hohes mittleres Molgewicht geschlossen. *Bamford*, *Hanbey* und *Happey*<sup>7</sup> haben zuerst diesen kleinen osmotischen Effekt durch Aggregation zu erklären versucht. Wir stimmen ihnen hierin durchaus zu, wenn wir auch die Schlüsse, die sie aus den Viskositätsmessungen in Nitrobenzol auf die Molgewichte ziehen, nach unseren jetzigen Erfahrungen in keiner Weise bestätigen können. Nach den verhältnismäßig niedrigen Molgewichten, die wir durch Polymerisation in Benzollösung ohne Zusatz von Startern erhalten haben, scheint uns, daß man bei Polypeptiden, die mit einer sehr kleinen Starterkonzentration (kleiner als etwa  $1/100$  Mol Starter auf 1 Mol N-Carbonsäureanhydrid) gewonnen werden, nicht von vorneherein den kinetisch zu erwartenden hohen mittleren Polymerisationsgrad als gesichert wird betrachten können. Gegenwärtig ist die obere Grenze für die Bestimmung mittlerer Polymerisationsgrade durch die Genauigkeit der Endgruppenbestimmung gegeben.

Dichloressigsäure wurde bisher als ein Lösungsmittel angesehen, in welchem Polypeptide in molekularer Verteilung vorliegen. So wird sie von *Ambrose*, *Bamford*, *Elliott* und *Hanby*<sup>8</sup> als bequemes Lösungsmittel zum Vergleich der Molgröße verschiedener Muster von Seidenfibroin bezeichnet. Auch in dieser Richtung mahnen unsere Ergebnisse zur Vorsicht. Natürlich kann man die Befunde an den Phenylalaninpolypeptiden nicht ohne weiteres auf Seidenfibroin übertragen. Es müßte aber doch erst gezeigt werden, daß die Viskosität einer Lösung von Seidenfibroin in Dichloressigsäure tatsächlich durch das mittlere Molgewicht des Seidenfibroins bedingt ist.

<sup>8</sup> *E. J. Ambrose, C. H. Bamford, R. Elliott und W. E. Hanby, Nature 167, 264 (1951).*