

Streulichtmessungen an Lösungen von DL-Phenylalaninpolypeptiden.

Von

J. W. Breitenbach und A. Koref.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 14. Februar 1955.)

Zur Ermittlung der Aggregation der Polypeptidmoleküle wird die Intensität des Streulichtes der Lösungen von synthetischen DL-Phenylalaninpolypeptiden unter Verwendung eines Zeiß-Stufenphotometers in einem Winkelbereich von 35° bis 120° gemessen.

Lösungen in Nitrobenzol enthalten sehr große Aggregate und zeigen eine gewisse Instabilität, die in einer Zunahme der Teilchengewichte bei sehr langem Stehen der Lösung zum Ausdruck kommt. Benzollösungen zeigen zwar eine größere Viskositätserrhöhung, enthalten aber Teilchen mit geringerem Teilchengewicht, das allerdings immer noch viel größer ist als dem mittleren Molgewicht der einzelnen Polypeptidketten entsprechen würde. Sie sind deutlich instabiler als die Nitrobenzolsysteme.

Am meisten dem molekulardispersen Lösungszustand nähern sich die Lösungen in Dichloressigsäure, bei denen auch qualitative Zusammenhänge zwischen den Streulicht- und Viskositätsgrößen gefunden wurden.

Durch Viskositätsmessungen an Lösungen von DL-Phenylalaninpolypeptiden haben wir schon nachgewiesen, daß in den verwendeten Lösungsmitteln (Nitrobenzol, Dichloressigsäure, Benzol) diese Stoffe keineswegs molekular dispers gelöst sind¹. Durch Messung der Intensität des Streulichtes solcher Lösungen mußte es möglich sein, eine genauere Kenntnis vom Zustand der Phenylalaninpolypeptide in Lösung zu erhalten.

¹ J. W. Breitenbach, K. Allinger und A. Koref, Mh. Chem. 86, 269 (1955).

Apparatur.

Zunächst war im Hinblick auf die verhältnismäßig niedrigen mittleren Molgewichte der Polypeptide nur beabsichtigt, Intensitätsmessungen unter 90° zum Primärstrahl zu machen. Für derartige Messungen war auch der Apparat vorhanden, mit dem, unter Benützung eines *Pulfrich*-Stufenphotometers, Streulichtmessungen an Polystyrollösungen ausgeführt worden waren. Es zeigte sich aber bald, daß in den meisten Fällen die Streuintensitäten der Lösungen der Phenylalaninpolypeptide zu groß waren, um in dieser einfachen Weise ausgewertet zu werden. Daher mußte die Winkelabhängigkeit des Streulichtes gemessen werden. Eine dazu geeignete Apparatur für visuelle Beobachtung unter Verwendung des *Pulfrich*-Stufenphotometers wurde im Anschluß an die Konstruktion von *Rhees* und *Foster*² gebaut³. Die Lichtquelle und das optische System zur Teilung des Primärstrahles sind dabei auf einer Scheibe drehbar montiert, während sich unbeweglich in der Scheibenachse die Küvette befindet, sowie ein rechtwinkeliges Prisma, das bei den verschiedenen Scheibenstellungen immer die gleiche Intensität des Vergleichslichtes für das *Pulfrich*-Photometer liefert. Die photometrisch zu vergleichenden Strahlenbündel liegen senkrecht übereinander; daher ist auch das Stufenphotometer senkrecht zu seiner sonst üblichen Lage montiert. Die Apparatur erlaubt Messung des Streulichtes unter Winkeln von 35 bis 120° . Soweit es die Intensität der Lichtquelle (Quecksilberquarzbrenner Philips HP 125 W) zuließ, wurde besonderer Wert auf gute Ausblendung des Primärstrahles und auch des Streulichtes gelegt. Es wurde mit der Wellenlänge 546μ (*Schott*-Absorptionsfilter) und 436μ (*Zeiss*-Interferenzfilter) gemessen. Zur Schwächung des Vergleichslichtes wurden 1 bis 3 Milchglasscheiben verwendet. Dünnwandige, kegelförmige Küvetten (Kölbchen) wurden nach den Angaben von *Zimm*⁴ hergestellt. Sie gestatteten Messungen mit einem Mindestvolumen von 3 cm^3 Lösung. Die Kalibrierung und Eichung der Apparatur erfolgte durch Vergleich mit einer fixen Lichtquelle, mit wäßr. Fluoresceinlösung, mit einer Toluollösung des *Debyeschen* Polystyrols und mit einer Ludoxsuspension⁵.

Nitrobenzollösungen.

Messungen der Intensität des Streulichtes unter 90° wurden an Polypeptiden ausgeführt, die unter definierten kinetischen Bedingungen in Nitrobenzollösung durch Anregung mit N-Äthylglycindiäthylamid dargestellt worden waren⁵. Aus dem Verhältnis zwischen umgesetztem N-Carbonsäureanhydrid und Starter läßt sich hier das mittlere Molgewicht der Polypeptide abschätzen.

Da die Polypeptide nach dem Fällern mit Petroläther in Nitrobenzol nicht mehr löslich waren, mußten die Lichtstreuungsmessungen, ebenso wie früher die Viskositätsmessungen, unmittelbar an den bei der Polymerisation erhaltenen Lösungen vorgenommen werden. Diese wurden auch direkt mit

² R. C. *Rhees* und J. F. *Foster*, Iowa State Coll. J. Sci. **27**, 1 (1952).

³ Die experimentellen Einzelheiten sind beschrieben bei A. *Koref*, Dissertation Universität Wien (1955).

⁴ B. H. *Zimm*, J. Chem. Physics **16**, 1099 (1948).

⁵ J. W. *Breitenbach* und K. *Allinger*, Mh. Chem. **84**, 1103 (1953).

Nitrobenzol weiter verdünnt. Die Lösungen wurden vor der Messung durch Filtrieren und Zentrifugieren in einen optisch einwandfreien Zustand gebracht.

Zur Auswertung der Lichtstreuungsmessungen nach

$$K c/R_{90} = 1/\bar{M}_w + 2 B c$$

muß die Größe K

$$K = 2 \pi^2 n^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 / \lambda^4 N$$

bestimmt werden⁶. Es bedeutet c die Konzentration der untersuchten Lösung, R die auf Beobachtungsabstand und Primärintensität genormte Streuintensität [R_{90} (unter Streuwinkel von 90°) heißt: „Rayleigh-Verhältnis“], \bar{M}_w den Gewichtsmittelwert des Molgewichtes der streuenden Teilchen, B den zweiten Virialkoeffizienten in der Beziehung für den osmotischen Druck π

$$\pi = RT (c/M + B c^2),$$

n den Brechungsindex und N die Loschmidtsche Zahl.

Für Nitrobenzol ist bei 20° für $546 \text{ m}\mu$: der Brechungsindex $n = 1,55811$ und sein Konzentrationsgradient $\frac{\partial n}{\partial c} = 0,0407 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$; $K = 1,485 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ g}^{-2}$; für $436 \text{ m}\mu$: $n = 1,58768$, $\frac{\partial n}{\partial c} = 0,038 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, $K = 3,31 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ g}^{-2}$.

Die Konzentrationsgradienten des Brechungsindex sind extrem klein. In Tabelle I sind die Ergebnisse der Streulichtmessung für zwei Polypeptide angegeben.

Tabelle I. Streulichtmessungen an Phenylalaninpolypeptiden in Nitrobenzollösung.

N_2 : $\bar{M} \sim 1500$; N_4 : $\bar{M} \sim 10000$.

N 2		N 4	
Konz. (g/cm ³) · 10 ³	$\frac{K c}{R_{90}} \cdot 10^7$	Konz. (g/cm ³) · 10 ³	$\frac{K c}{R_0} \cdot 10^7$
5,05	11,1	4,70	0,841
3,61	9,97	3,36	0,826
2,54	8,12	2,35	0,813
1,70	7,50	1,57	0,847
1,27	6,96	0,94	0,904
		0,58	0,888
		0,33	0,854
0	5,5	0	0,84

⁶ Bezüglich der Bezeichnung vgl. besonders *H. J. L. Trap* und *J. J. Hermans*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **73**, 167 (1954).

Die Konzentrationsabhängigkeit von $\frac{Kc}{R_{90}}$ ist zwar in beiden Fällen sehr verschieden, die Extrapolation auf $c = 0$ läßt sich aber gut durchführen. Die Grenzwerte sind in der untersten Reihe von Tabelle 1 angegeben. Der Reziprokwert dieser Größe sollte dem Gewichtsmittel des Teilchengewichtes gleich sein. Für N 2 ergibt das $1,82 \cdot 10^6$, für N 4 $1,19 \cdot 10^7$. Diese unerwartet großen Werte, die von der unerwartet großen Intensität des Streulichtes der Lösungen herrühren, bedingen, daß die oben durchgeführte Auswertung nicht korrekt ist. Die großen Teilchen können nicht mehr als punktförmige Streuzentren betrachtet werden; daher sind die angegebenen Werte für M_w durch Interferenzverluste noch zu klein. Unerwartet ist diese große Lichtstreuung, abgesehen von den kleinen mittleren Molgewichten der Polypeptide, vor allem deshalb, weil

die Nitrobenzollösungen verhältnismäßig wenig viskos sind¹. Für N 2 beträgt die Grenzviskositätszahl $[\eta]$ $7 \text{ cm}^3/\text{g}$, für N 4 $24 \text{ cm}^3/\text{g}$. Daraus folgt, daß die aus sehr vielen Molekeln bestehenden Aggregate einen verhältnismäßig kompakten Bau haben müssen.

Man konnte bei diesen Messungen immer noch das Bedenken haben, daß direkt an den in der Nitrobenzollösung gebildeten Polymeren gemessen wurde. Nitrobenzollösliche Polymere können aber auch durch Polymerisation des N-Carbonsäureanhydrids in Benzollösung ohne Zusatz eines Starters erhalten werden⁷.

Zu dem im Hochvak. getrockneten N-Carbonsäureanhydrid wurde Benzol im Hochvak. über Natrium zudestilliert. Die im Hochvak. eingeschmolzene Lösung ($0,16 \text{ Mol/l}$) wurde durch 12 Stdn. bei 70°C gehalten. Das entstandene Polypeptid hatte sich zum Teil ausgeschieden. Dieser unlösliche Anteil wurde durch Dekantieren und Zentrifugieren abgetrennt. Der in Lösung befindliche Anteil wurde mit Petroläther ausgefällt. Der benzollösliche Anteil war auch zur Gänze in Nitrobenzol löslich.

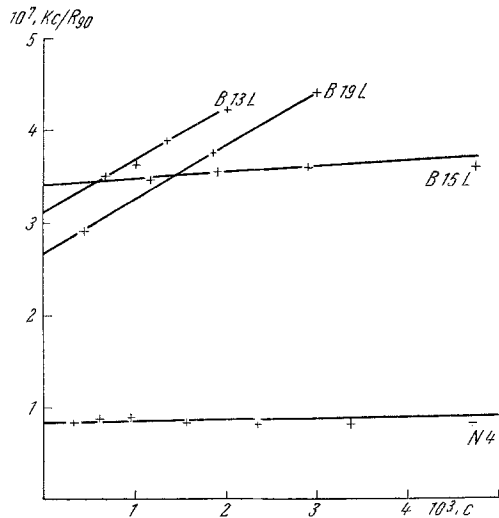


Abb. 1. Streulichtmessungen an Nitrobenzollösungen von DL-Phenylalaninpolypeptiden unter 90° .

⁷ J. W. Breitenbach und F. Richter, Makromol. Chem. B 4, 262 (1950).

Mit diesen Polypeptiden konnten also durch Einwägen und Auflösen in normaler Weise Lösungen in Nitrobenzol bereitet werden. In Abb. 1 sind Meßergebnisse an drei solchen Lösungen wiedergegeben; zum Vergleich ist auch noch N 4 aufgenommen. Auch hier treten verschiedene Neigungen auf, aber die Grenzwerte liegen doch in der gleichen Größenordnung. Als untere Grenze der mittleren Partikelgewichte erhält man für B 13 L: $3,20 \cdot 10^6$; für B 19 L: $3,60 \cdot 10^6$ und für B 15 L: $2,90 \cdot 10^6$. Die Grenzviskositätszahlen sind für B 13 L: 31, für B 15 L: 33. Es kann also kein Zweifel bestehen, daß es sich in Nitrobenzollösung um sehr große, verhältnismäßig kompakte Aggregate handelt, bei denen kein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und der Viskosität der Lösungen besteht. Es schien nun interessant, wenigstens an einer solchen Lösung eine Bestimmung der Winkelabhängigkeit der Intensität des Streulichtes vorzunehmen. Dazu wurde ein Polypeptid B 23 L, dessen Verhalten auch in Benzol- und Dichloressigsäurelösung untersucht werden konnte, verwendet. Es wurde, wie oben angegeben, durch Polymerisation in Benzollösung bei 70° erhalten. 44,6% dieses Peptids waren bei Raumtemperatur in Benzol und Nitrobenzol löslich. Der lösliche Anteil hatte einen Gehalt an Aminostickstoff von 0,05, der unlösliche von 0,19%^s.

Nach mehrmonatigem Stehen des festen B 23 L war es noch immer in Benzol löslich, in Nitrobenzol erfolgte bei Raumtemp. nur mehr Quellung, keine Lösung; allerdings ging beim Erhitzen auf 100° durch 5 Stdn. der größte Teil in Lösung.

An dem benzollöslichen Anteil wurden die in Tabelle 2 angeführten Zahlen gewonnen.

Tabelle 2. DL-Phenylalaninpolypeptid B 23 L in Nitrobenzol.

$10^7 \cdot K c/R_\theta$ ⁹ bei $546 m\mu$ (c in g/cm^3 , θ in Graden).

θ \ $10^5 \cdot c$	89	223	357	536	893
35	2,09	2,07	2,15	2,18	2,33
40	2,11	2,145	2,16	2,26	2,35
45	2,15	2,16	2,24	2,255	2,40
60	2,32	2,32	2,36	2,45	2,59
75	2,47	2,47	2,51	2,57	2,70
90	2,66	2,69	2,73	2,80	2,93
105	2,895	2,875	2,95	2,99	3,14
120	3,06	3,07	3,14	3,20	3,35

^s Analysen von Dr. G. Kainz, Mikroanalytisches Labor. des II. Chem. Universitätslaboratoriums.

⁹ In den hier und im folgenden angeführten $K c/R_\theta$ -Werten ist R_θ schon durch den Thomson-Faktor $(1 + \cos^2 \theta)$ dividiert.

In Abb. 2 ist aus diesen Angaben ein *Zimm*-Diagramm gezeichnet. Der Grenzwert von $\frac{Kc}{R_\theta}$ für $c = 0$ und $\Theta = 0$ beträgt $1,90 \cdot 10^{-7}$; das entspricht einem Gewichtsmittelwert des Teilchengewichtes von $5,25 \cdot 10^6$. Damit ist das Vorliegen von Partikeln, die größenordnungsmäßig größer sind als die Peptidmolekel, in Nitrobenzollösung endgültig bewiesen. Die geringe Konzentrationsabhängigkeit von Kc/R_θ entspricht einem sehr kleinen 2. Virialkoeffizienten, sein Zahlenwert ist im vorliegenden Falle $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-2}$.

Benzollösungen.

Auch in Benzollösung wurde an diesem Phenylalaninpolypeptid die Winkelabhängigkeit des Streulichtes untersucht.

Die Benzollösungen waren sehr viel empfindlicher gegen Luftfeuchtigkeit als die Nitrobenzollösungen, wobei aber sehr große Unterschiede zwischen den einzelnen Proben auftraten. Beim Stehen im offenen Kolben betrug die

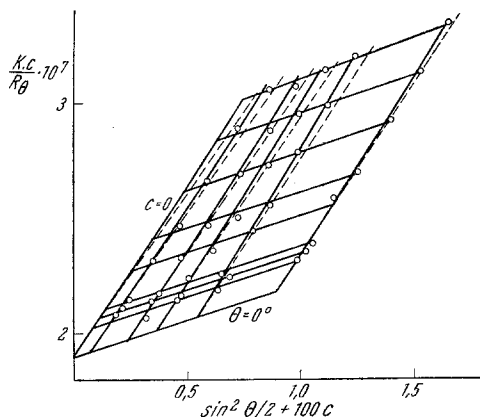


Abb. 2. *Zimm*-Diagramm für B 23 L in Nitrobenzollösung.

Tabelle 3. Messung des Streulichtes an Benzollösungen von B 23 L.

$$n_{546}^{20} = 1,50404; \quad \frac{\partial n}{\partial c} = 0,0936 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}; \quad K_{546} = 7,31 \cdot 10^{-8};$$

$$n_{436}^{20} = 1,52166; \quad \frac{\partial n}{\partial c} = 0,101 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}; \quad K_{436} = 2,15 \cdot 10^{-7};$$

$$10^7 \frac{Kc}{R_\theta}; \quad c \text{ in g/cm}^3; \quad \Theta \text{ in Graden.}$$

$$\lambda = 546 \text{ m}\mu.$$

$\Theta \backslash 10^5 \cdot c$	90	144	320	800
35	13,4	12,1	10,15	7,75
40	13,7	12,2	10,25	7,69
45	13,8	12,6	10,25	7,92
60	14,35	13,1	10,8	9,04
75	15,15	13,9	11,8	9,63
90	15,6	14,4	12,7	11,05
105	16,3	15,3	14,0	12,2
120	16,9	15,9	14,8	13,1

$$\lambda = 436 \text{ m}\mu.$$

$\frac{10^5 \cdot c}{\theta}$	90	144	320	800
35	13,7	12,7	11,1	8,12
40	13,9	13,1	11,15	8,52
45	14,1	13,15	11,5	9,05
60	15,2	14,0	12,85	10,3
75	16,0	15,2	14,4	12,1
90	17,1	16,3	15,6	14,2
105	17,9	17,6	17,4	16,0
120	19,15	18,9	18,6	18,1

Zeit, innerhalb welcher Ausflockung eines Niederschlages eintrat, wenige Minuten bis einige Stunden. Bei B 23 L trat auch beim Verdünnen der Lösungen mit Benzol eine Trübung auf; es wurde daher jede Konzentration für die Lichtstreuungsmessung durch eine eigene Einwaage bereitet. Auch im intensiven Licht der Lichtstreuungsapparatur waren die Lösungen meist

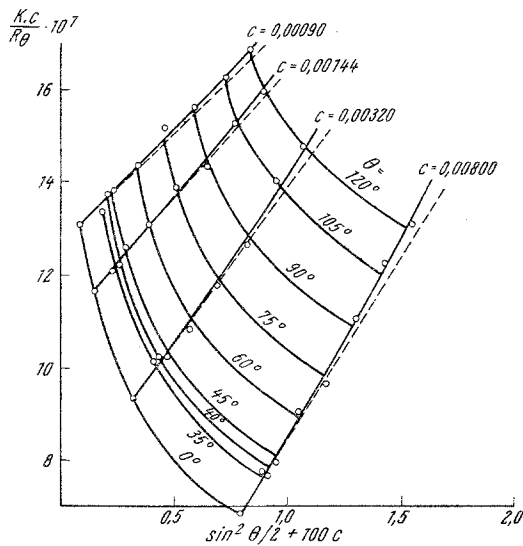


Abb. 3. Zimm-Diagramm für B 23 L in Benzollösung ($\lambda = 546 \text{ m}\mu$).

nicht völlig stabil. Durch eigene Versuche wurde sichergestellt, daß tatsächlich die Belichtung eine Trübung hervorruft. Aus all dem ergibt sich, daß die Messungen an den Benzollösungen größere Fehler haben als die an den Nitrobenzollösungen. Es war aber doch möglich, bei Einhaltung der nötigen Vorsichtsmaßregeln reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (Tabelle 3).

Die Intensität des Streulichtes ist zwar in Benzol größer, $\frac{R_\theta}{Kc}$ aber kleiner als in den Nitrobenzollösungen. Der Grenzwert für $\frac{Kc}{R_\theta}$ ist

$14,3 \cdot 10^{-7}$, entsprechend einem Gewichtsmittelwert des Teilchengewichtes von $7 \cdot 10^5$. Der Wert, der bei $436 \text{ m}\mu$ erhalten wird, stimmt damit völlig überein. Auffallend ist, daß Kc/R_θ mit steigender Konzentration abnimmt. Formal würde das einen negativen 2. Virialkoeffizienten bedeuten. Wahrscheinlich ist eine Zunahme des Aggregationsgrades mit steigender Konzentration vorhanden, die auch für die starke Krümmung verantwortlich ist.

Um zu sehen, ob die an B 23 L beobachtete, ungewohnte Konzentrationsabhängigkeit eine allgemeinere Bedeutung hat, wurde noch ein Peptid untersucht, dessen Lösungen weniger gegen äußere Einflüsse empfindlich waren, so daß die zu vermessenden Lösungen durch Verdünnung einer Ausgangslösung hergestellt werden konnten. Es war das die Substanz B 21, die unter den gleichen Bedingungen gewonnen wurde wie B 23. Bei dieser Substanz waren 45,7% in Benzol bei Raumtemperatur löslich (B 21 L); von dem benzollöslichen Anteil waren 23,6% (also 10,8% von B 21) in Nitrobenzol unlöslich (B 21 L 2). Die Benzollösungen von (B 21 L 2) konnten mit Benzol verdünnt werden, ohne sich zu trüben.

Tabelle 4. Lichtstreuung von Benzollösungen von B 21 L 2.

$$10^7 \frac{Kc}{R_\theta}; \quad c \text{ in g/cm}^3; \quad \theta \text{ in Graden}; \quad \lambda = 546 \text{ m}\mu.$$

$\theta \backslash 10^5 \cdot c$	66,2	159	250	397
35	35,3	35,45	34,3	33,3
40	36,6	35,3	34,3	33,1
45	35,6	34,4	34,6	34,3
60	36,5	34,3	35,0	33,9
75	36,2	35,4	34,9	34,6
90	36,7	36,0	35,0	34,6
105	37,0	36,6	34,9	35,1
120	37,1	35,5	35,7	35,2

Tatsächlich verhält sich diese Substanz ziemlich abweichend von B 23. Die Winkelabhängigkeit der Streuintensität ist so gering, daß man daraus schon auf kleine Partikeldimensionen schließen muß. Damit stimmt völlig das Gewichtsmittel des Partikelgewichtes überein, das sich aus dem Grenzwert von $\frac{Kc}{R_\theta}$ zu $2,7 \cdot 10^5$ ergibt. Die größere Stabilität dieser Lösungen ist also auf die viel geringere Partikelgröße zurückzuführen. Die Konzentrationsabhängigkeit von $\frac{Kc}{R_\theta}$ ist sehr gering, entspricht aber doch auch einem negativen Virialkoeffizienten. Das Benzol ist in diesem Sinne ein sehr schlechtes Lösungsmittel für die Phenyl-

alaninpolypeptide, und es ist verständlich, daß bei B 23, wo von vornherein viel größere Aggregate vorliegen, das System eine merkliche Instabilität besitzt. Allerdings wurden auch bei Systemen mit etwa gleichem Teilchengewicht sehr verschiedene Stabilitätsverhältnisse angetroffen. Allgemein scheinen Lösungen mit lockerer Teilchenstruktur (größere Dissymmetrie) instabiler zu sein als solche mit kompakteren Teilchen.

Wäßrige Dichloressigsäurelösungen.

Nachdem wir über den Lösungszustand des Phenylalaninpolypeptids B 23 L in Nitrobenzol und Benzol Aufschluß gewonnen hatten, schien es uns wichtig, auch die Verhältnisse in Dichloressigsäure kennenzulernen. In reiner Dichloressigsäure ist es wegen ihrer großen Hygroskopizität sehr schwierig, reproduzierbare Meßergebnisse zu erhalten. Es wurde daher, ebenso wie bei den Viskositätsmessungen, eine wasserhaltige Dichloressigsäure verwendet, deren Zusammensetzung durch ihren Brechungsindex ($n_{546}^{20} = 1,46396$) kontrolliert wurde. Die Verwendung dieses Gemisches als Lösungsmittel für die Lichtstreuungsmessungen

Tabelle 5. Messung des Streulichtes an Lösungen in wasserhaltiger Dichloressigsäure.

$$\lambda = 546 \text{ m}\mu.$$

$$n_{546} = 1,46396; \quad \frac{\partial n}{\partial c} = 0,124 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}; \quad K = 1,21 \cdot 10^{-7};$$

$$10^7 \frac{K c}{R_{\Theta}}; \quad c \text{ in g/cm}^3; \quad \Theta \text{ in Graden.}$$

$\Theta \backslash 10^3 \cdot c$	85	170	272	408	680
35	56,9	56,4	58,3	58,9	62,9
40	55,2	57,5	58,2	58,2	64,6
45	56,1	56,5	57,3	60,4	65,0
60	55,7	57,2	56,7	61,0	63,9
75	56,9	56,3	58,6	61,5	64,4
90	56,3	57,1	59,0	59,8	65,6
105	56,7	57,2	57,0	60,9	65,9
120	58,3	57,1	58,0	59,8	65,6

ergibt natürlich Komplikationen bei der Auswertung der Messungen. Überhaupt erwies sich die Dichloressigsäure für die Streulichtmessungen experimentell am unangenehmsten; es war sehr schwierig, völlig staubfreie Lösungen zu erhalten, besonders bei kleinen Konzentrationen war es oft unmöglich, brauchbare Streuwerte zu messen. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse für B 23 L angeführt.

Innerhalb der, wie schon erwähnt, allerdings recht großen Versuchsfehler ist keine Winkelabhängigkeit von $\frac{Kc}{R_{\Theta}}$ vorhanden; dementsprechend ist auch der Gewichtsmittelwert des Partikelgewichtes verhältnismäßig klein, nämlich 185 000. Messung bei $\lambda = 436 \text{ m}\mu$ liefert ein damit übereinstimmendes Ergebnis, nämlich 178 000. Da diese Werte in einem Lösungsmittel-(Dichloressigsäure)-Fällungsmittel(Wasser)-Gemisch erhalten wurden, stellen sie zweifellos nur obere Grenzwerte für das Gewichtsmittel dar. Der zweite Virialkoeffizient ergibt sich zu $7,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-2}$, also bedeutend größer als in Nitrobenzol.

Wenn schon der Absolutwert der in Dichloressigsäure ermittelten Partikelgewichte keine große Bedeutung hat, so läßt sich aber in diesem Lösungsmittel ein Vergleich des benzollöslichen und benzolunlöslichen Anteiles von in Benzollösung gewonnenen Phenylalaninpolypeptiden durchführen (Tabelle 6).

Tabelle 6. Messung des Streulichtes in wäßriger Dichloressigsäure. Benzolunlöslicher Anteil von B 23.

$$\lambda = 546 \text{ m}\mu.$$

$$10^7 \cdot \frac{Kc}{R_{\Theta}}; \quad c \text{ in g/cm}^3; \quad \Theta \text{ in Graden.}$$

Θ \ $10^5 \cdot c$	89,4	223	358	536	894
35	286	275,5	285	282	294,5
40	276	271	276	279,5	300
45	275	289,5	288	286	288
60	281	277	277	289	289
75	270	276	276	292	289
90	271	284	275	290	293,5
105	284	274	282	284	291,5
120	280	287	271	284	298

Auch diese Lösungen zeigen keine Dissymmetrie; der Gewichtsmittelwert des Partikelgewichtes liegt bei $3,6 \cdot 10^4$, also noch bedeutend niedriger als für den benzollöslichen Anteil.

Bei B 23 L und B 23 U in wäßriger Dichloressigsäure kommen zum erstenmal die Lichtstreuungswerte in die Größenordnung der aus dem Endgruppengehalt folgenden mittleren Molekulargewichte, die für B 23 L etwa 30 000 und für B 23 U etwa 8 000 betragen.

Wir haben noch Messungen an zwei analogen Polymeren durchgeführt. Wegen der fehlenden Dissymmetrie wurde nur unter 90° gemessen.

B 15 stimmt in seinem Verhalten mit B 23 überein, bei B 20 ist aber doch auch das Teilchengewicht des benzolunlöslichen Anteils offenbar größer, als mit einem molekulardispersen Zustand vereinbar wäre.

Tabelle 7. Gewichtsmittelwerte des Teilchengewichtes (obere Grenzwerte) aus Streulichtmessungen in wäßriger Dichloressigsäure.

Polypeptid	Benzollöslicher Anteil		Benzolumlöslicher Anteil	
	% der Gesamtmenge	\overline{M}_w	% der Gesamtmenge	\overline{M}_w
B 15	42	$14,8 \cdot 10^4$	58	$2,7 \cdot 10^4$
B 20	43	$16,9 \cdot 10^4$	57	$11,2 \cdot 10^4$

Diskussion.

Als ein Hauptergebnis der Lichtstreuungsmessungen ist die Bestätigung des schon aus den Viskositätsmessungen gezogenen Schlusses anzusehen, daß weder in Nitrobenzol noch in Benzol eine molekulardisperse Lösung der DL-Phenylalaninpolypeptide eintritt. Bei den untersuchten Lösungen in wäßriger Dichloressigsäure, bei denen es sich um in Benzol-lösung entstandene Polypeptide handelt, scheint aber, im Gegensatz zu den Ergebnissen der Viskositätsmessungen, ein solcher Lösungszustand möglich.

Die höchsten Partikelgrößen wurden in Nitrobenzol gefunden. Das ist überraschend, da Benzollösungen im allgemeinen eine höhere Viskositätszunahme aufweisen. Dieser Umstand spricht jedenfalls für eine sehr verschiedenartige Struktur der Aggregate in den beiden Flüssigkeiten. In Tabelle 8 sind für das Polypeptid B 23 L die Viskositätszahlen und die Werte für $\frac{R_0}{Kc}$ in den verschiedenen Lösungsmitteln angeführt.

Tabelle 8. Vergleich von Lichtstreuungs- und Viskositätsgrößen.

Konzentration g/cm ³	Nitrobenzol		Benzol		Dichloressigsäure	
	$\frac{R_0}{Kc}$	η_{sp}/c	$\frac{R_0}{Kc}$	η_{sp}/c	$\frac{R_0}{Kc}$	η_{sp}/c
0,0018	$5,1 \cdot 10^6$	37	$0,8 \cdot 10^6$	314	$0,18 \cdot 10^6$	30
0,0005	$5,2 \cdot 10^6$	35	$0,73 \cdot 10^6$	132	$0,18 \cdot 10^6$	30
0	$5,25 \cdot 10^6$	34	$0,70 \cdot 10^6$	64	$0,185 \cdot 10^6$	30

Es ist außerdem auffallend, daß sich die extrem starke Konzentrationsabhängigkeit der Viskositätszahl in Benzol nicht auch in einer entsprechend starken Abhängigkeit des $\frac{R_0}{Kc}$ -Wertes spiegelt. Ein quantitativer Zusammenhang besteht dagegen zwischen η_{sp}/c und der aus der Dissymmetrie des Streulichtes berechneten Größe L (siehe S. 290); $L^3 c/\eta_{sp}$ ist für die verschiedenen Konzentrationen annähernd konstant.

Zweifellos laufen aber auch in einer Lösung bestimmter Konzentration sowohl in Benzol als auch in Nitrobenzol zeitliche Änderungen irreversibler Natur in den Aggregaten ab. Bei Benzollösung ist dabei oft ein starker Einfluß der Luftfeuchtigkeit festzustellen, in dem Sinne, daß bei Berührung mit Luft die Lösungen sich rasch trüben und Polymeres ausfällt. Beim Nitrobenzol konnte kein Feuchtigkeitseinfluß festgestellt werden, auch wurden keine sichtbaren Trübungen bei langem Stehen beobachtet. Daß aber doch Änderungen vor sich gehen, zeigten sowohl Lichtstreuung als auch Viskositätsmessungen an einer Lösung, die etwa 4 Monate gestanden war (Tabelle 9).

Tabelle 9. Alterung einer Nitrobenzollösung des Phenylalaninpolypeptides N 4.

	Gemessen	
	unmittelbar	nach 4 Monaten
$\frac{R_{90}}{K c}$ bei $c = 0,00094 \text{ g/cm}^3$	$11,9 \cdot 10^6$	$21,7 \cdot 10^6$
$[\eta]$	24	9,4

Grenzviskositätszahl und Trübung ändern sich in entgegengesetzter Richtung. Es tritt nicht nur eine Aneinanderlagerung der Teilchen, sondern offenbar auch eine gewisse Schrumpfung, also Übergang in eine kompaktere Struktur, ein.

Eine genaue Angabe von mittleren Assoziationsgraden aus den Partikelgewichten und aus den, etwa durch Endgruppenbestimmungen ermittelten, mittleren Polymerisationsgraden ist nicht möglich, da ja die Streulichtmessung Gewichtsmittelwerte für das Teilchengewicht liefert. Eine verhältnismäßig kleine Anzahl großer Partikel kann schon einen großen Wert für die Lichtstreuung ergeben, ohne deshalb den Zahlenmittelwert des Teilchengewichtes entsprechend zu erhöhen. Wenn also bei B 23 L mit einem Endgruppenmolekulargewicht $\sim 10^4$ in Nitrobenzollösung ein Lichtstreuungsteilchengewicht von $5 \cdot 10^6$ auftritt, so kann man nicht auf einen *mittleren* Assoziationsgrad von einigen Hundert schließen; dieser kann vielmehr um eine Größenordnung oder mehr kleiner sein. Man kann nur mit Sicherheit sagen, daß Teilchen mit so hohem (und natürlich auch noch höherem) Assoziationsgrad in der Lösung vorhanden sind.

Unter der Unsicherheit, die aus der unbekanntem Verteilung der Teilchengröße stammt, leidet vor allem die Ermittlung der mittleren Teilchendimension. Nimmt man eine statistische Verteilung der Teilchengrößen und Aufbau der Teilchen als statistische Knäuel an, so erhält man für die Wurzel aus dem mittleren Abstandsquadrat der Ketten-

enden L (alle in einem Assoziat befindlichen Molekel als eine Kette betrachtet) für B 23 L

$$\begin{array}{ll} \text{in Benzol} & 625 \text{ \AA}, \\ \text{in Nitrobenzol} & 890 \text{ \AA}. \end{array}$$

Nach *Benoit*¹⁰ besteht zwischen der statistischen Knäueldimension L von Polypeptiden und ihrem Polymerisationsgrad P die Beziehung

$$L = 3,82 \sqrt{P} \text{ \AA}.$$

Betrachtet man wieder ein Assoziat als eine einzige Kette, so erhält man aus den mittleren Teilchengewichten in

$$\begin{array}{ll} \text{Benzol} & L = 264 \text{ \AA}, \\ \text{Nitrobenzol} & L = 720 \text{ \AA}. \end{array}$$

Wenn man auch diesen Werten schwerlich eine absolute Bedeutung wird zumessen können, da alle räumlichen und energetischen Einflüsse bei ihrer Berechnung vernachlässigt sind, so lassen sie doch einen interessanten Vergleich zu. In Benzol ist die experimentelle Knäueldimension das 2,4fache, in Nitrobenzol nur das 1,2fache der berechneten. Auch daraus kann man auf einen kompakteren Bau der Aggregate in Nitrobenzol schließen.

Daß keine Beziehung zwischen dem mittleren Polymerisationsgrad der Phenylalaninpolypeptide und der Grenzviskositätszahl ihrer Lösungen bestehen kann, ist nach den hier festgestellten hohen Assoziationsgraden ganz klar. Aber auch mit den gemessenen Teilchengewichten stehen in Nitrobenzollösung die Grenzviskositätszahlen in keiner Beziehung. Z. B. ist für N 4

$$\bar{M}_w > 12 \cdot 10^6, \quad [\eta] = 24,$$

für B 23 L

$$\bar{M}_w = 5,25 \cdot 10^6, \quad [\eta] = 34.$$

In wäßriger Dichloressigsäure scheint, wenigstens qualitativ, eine solche Beziehung zu bestehen. Es wurde gefunden für

$$\text{B 23 L} \quad \bar{M}_w = 1,85 \cdot 10^5, \quad [\eta] = 29,5,$$

$$\text{B 15 L} \quad \bar{M}_w = 1,48 \cdot 10^5, \quad [\eta] = 18,6,$$

$$\text{B 15 U} \quad \bar{M}_w = 0,27 \cdot 10^5, \quad [\eta] = 12,4.$$

Wie schon erwähnt, rückt hier das \bar{M}_w schon sehr in die Nähe des aus dem Endgruppengehalt gefolgerten mittleren Polymerisationsgrades. Vielleicht wird also eine eingehendere Untersuchung der Verhältnisse in Dichloressigsäure sich doch auch noch für die Polymerisationsgradbestimmung als wertvoll erweisen.

¹⁰ *H. Benoit*, J. Polymer Sci. **3**, 376 (1948).

Es ist klar, daß das beobachtete unterschiedliche Verhalten der Phenylalaninpolypeptide in den verschiedenen Lösungsmitteln durch eine verschiedenartige Struktur der Polypeptidketten bedingt ist. Insbesondere die beobachtete Instabilität der Lösungen beweist, daß auch innerhalb eines Lösungsmittels noch Strukturänderungen der Polypeptidketten ablaufen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die Umwandlung innermolekularer Wasserstoffbrücken in zwischenmolekulare, verbunden mit dem Übergang von einer stärker gefalteten in eine mehr gestreckte Struktur.

Für den Bau des Streulichtmeßgerätes wurden uns von der Österreichischen Akademie der Wissenschaften Mittel aus der *Figdor*-Stiftung und aus Stiftungszuschüssen zur Verfügung gestellt. Wir danken auch an dieser Stelle bestens für dieses Entgegenkommen.

Herrn Prof. Dr. *F. Wessely* haben wir für die großzügige Unterstützung bei der Herstellung der Polypeptide zu danken.