

209. Polyampholyte mit verschiedener Ladungsverteilung

von E. Stutz und H. Deuel.

(20. IX. 55.)

Durch Kopolymerisation von bifunktionellen Monomeren, die außerdem noch saure und basische Gruppen tragen, können Polyampholyte hergestellt werden¹⁾. Die Eigenschaften von Kopolymerisaten hängen in starkem Masse von der Anordnung der Monomeren in der Makromolekel ab²⁾. Kürzlich wurden sowohl statistische Kopolymere als auch Propofkopolymere aus Acrylsäure und 2-Vinylpyridin hergestellt³⁾.

In der vorliegenden Arbeit werden aus Pektinen (partielle Methylester der Polygalakturonsäure) Polyampholyte mit verschiedener Ladungsverteilung gewonnen und einige ihrer Eigenschaften untersucht. Dazu wird zunächst das Pektin mit Diazomethan vollständig verestert. Bei der partiellen Hydrolyse dieses polymeren Esters mit NaOH bzw. Pektinesterase bis zu einem bestimmten Veresterungsgrad entstehen zwei Pektine mit verschiedener Verteilung der COOH- und COOCH₃-Gruppen.

Nach partieller *alkalischer* Verseifung sind die COOH- bzw. COOCH₃-Gruppen eher einzelnstehend, bei einem Präparat mit dem Veresterungsgrad von 50% daher abwechselnd längs der Fadenmolekel angeordnet⁴⁾. Dies darf wegen der zunehmenden negativen Aufladung der Makromoleküle und der abnehmenden Verseifungskonstanten im Laufe der Verseifung angenommen werden⁵⁾. Nach partieller *enzymatischer* Verseifung dagegen stehen die COOH- bzw. COOCH₃-Gruppen eher blockmäßig beieinander, da die Pektinesterase für ihre Wirksamkeit eine der COOCH₃-Gruppe benachbarte COOH-Gruppe benötigt⁶⁾.

Die beiden partiellen Methylester der Polygalakturonsäure – mit gleichem Veresterungsgrad von 50 oder 75%, aber verschiedener Verteilung der COOH- und COOCH₃-Gruppen – werden nun durch Umsetzung mit Diaminen⁷⁾ (Fig. 1) in Polyampholyte mit verschiedener Verteilung der negativen und positiven Ladungen übergeführt (Fig. 2).

¹⁾ M. Frankel & E. Katchalsky, J. Amer. chem. Soc. **64**, 2264 (1942); T. Alfrey, H. Morawetz & E. B. Fitzgerald, ibid. **72**, 1864 (1950); S. Akobari, H. Tani & J. Noguchi, Nature **167**, 159 (1951); E. Katchalsky, Adv. Protein Chemistry **6**, 123 (1951); H. L. Wagner & F. A. Long, J. physic. Chemistry **55**, 1512 (1951); G. Smets & M. Cläsen, J. Polymer Sci. **8**, 289 (1952); A. S. Dunn & H. W. Melville, Nature **169**, 699 (1952); J. A. Hicks & H. W. Melville, J. Polymer Sci. **12**, 461 (1954).

²⁾ H. Mark, Angew. Chem. **67**, 53 (1955).

³⁾ G. van Paesschen & G. Smets, Bull. soc. chim. belg. **64**, 173 (1955).

⁴⁾ J. Solms & H. Deuel, Helv. **38**, 321 (1955).

⁵⁾ H. Deuel, Ber. Schweiz. Bot. Ges. **53**, 219 (1943); H. Deuel, J. Solms & H. Altermatt, Viertelj. Naturforsch. Ges. Zürich **98**, 49 (1953); A. Katchalsky & J. Feitelson, J. Polymer Sci. **13**, 385 (1954).

⁶⁾ T. H. Schultz, H. Lotzkar, H. S. Owens & W. D. Maclay, J. physic. Chemistry **49**, 554 (1945); R. Speiser, M. J. Copley & G. C. Nutting, ibid. **51**, 117 (1947); J. Solms & H. Deuel, Helv. **38**, 321 (1955).

⁷⁾ H. Deuel & H. Neukom, Nature **159**, 882 (1947).

In Tab. 1 sind die Ausgangspektine mit einem Veresterungsgrad von ca. 50%, die aus einem fast vollständig veresterten Pektin durch Verseifung mit NaOH bzw. Pektinesterase gewonnen wurden, charakterisiert. Zu Lösungen dieser Pektine in Formamid wurde ein Überschuss an Äthylen- oder Hexamethylen-diamin zugegeben. Die dadurch gebildeten Polyampholyte sind ebenfalls in Tab. 1 charakterisiert. Die Reaktion der Ester mit den Diaminen verlief dabei praktisch quantitativ, so dass die vicr Polyampholyte ein Verhältnis $-\text{COOH}/-\text{NH}_2$ von ca. 1 aufweisen.

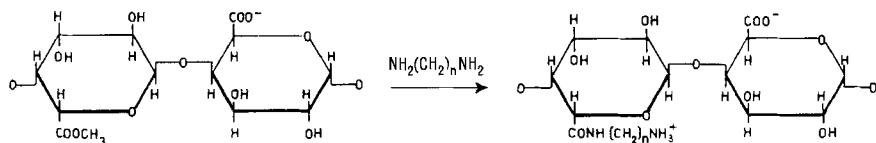


Fig. 1.
Reaktion von Pektin mit Diaminen.

Tabelle 1.

Charakterisierung der Ausgangspektine und der aus ihnen gewonnenen Polyampholyte.

Verseifungsart	Ausgangspektine			Äthylenediamin-Derivate				Hexamethylenediamin-Derivate			
	$-\text{COOH}$ Milliäq. pro g TS	$-\text{COOCH}_3$ Milliäq. pro g TS	Ver- esterungs- grad, %	$-\text{COOH}$ Milliäq. pro g TS	$-\text{NH}_2$ Milliäq. pro g TS	Ami- dierungs- grad, %	Symbol	$-\text{COOH}$ Milliäq. pro g TS	$-\text{NH}_2$ Milliäq. pro g TS	Ami- dierungs- grad, %	Symbol
alkalisch . .	2,28	2,22	49,5	2,00	2,20	52,5	Da	1,90	1,70	47,5	Ha
enzymatisch	2,32	2,18	48,5	2,10	1,95	48,0	De	1,90	1,78	48,5	He

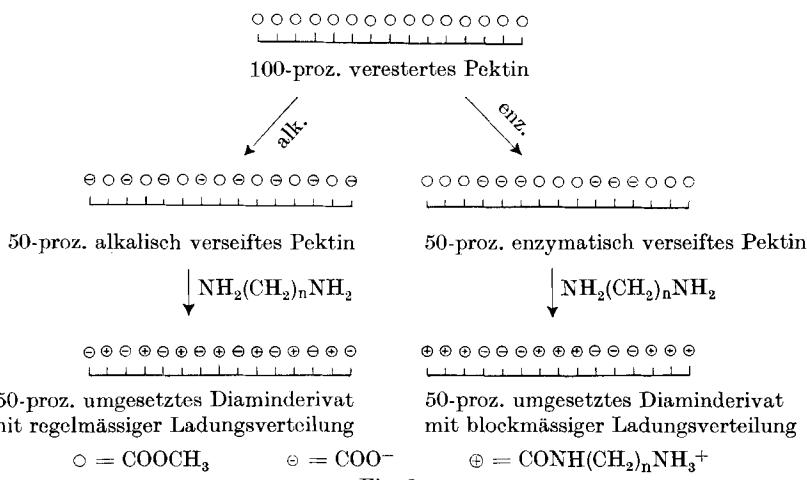


Fig. 2.

Schematische Darstellung der Gewinnung von Polyampholyten verschiedener Ladungsverteilung aus Pektin.

Die Titrationskurven der Polyampholyte Da und De (s. Fig. 3) sind einander sehr ähnlich, obwohl für De mit blockmässiger Anordnung der negativen und positiven Ladungen grössere pK-Werte zu erwarten wären¹⁾. Fig. 4 zeigt die Titrationskurven von zwei Polyampholyten, die durch Verseifung mit NaOH bzw. Pektinesterase bis zu einem Veresterungsgrad von 75% und durch anschliessende Umsetzung mit Äthylendiamin gewonnen wurden. Das Verhältnis $-COOH/-NH_2$ beträgt also hier ca. $1/3$. Die Titrationskurven für diese beiden Präparate sind weitgehend ähnlich; es kommt hier jedoch der Ampholytcharakter deutlicher zum Ausdruck.

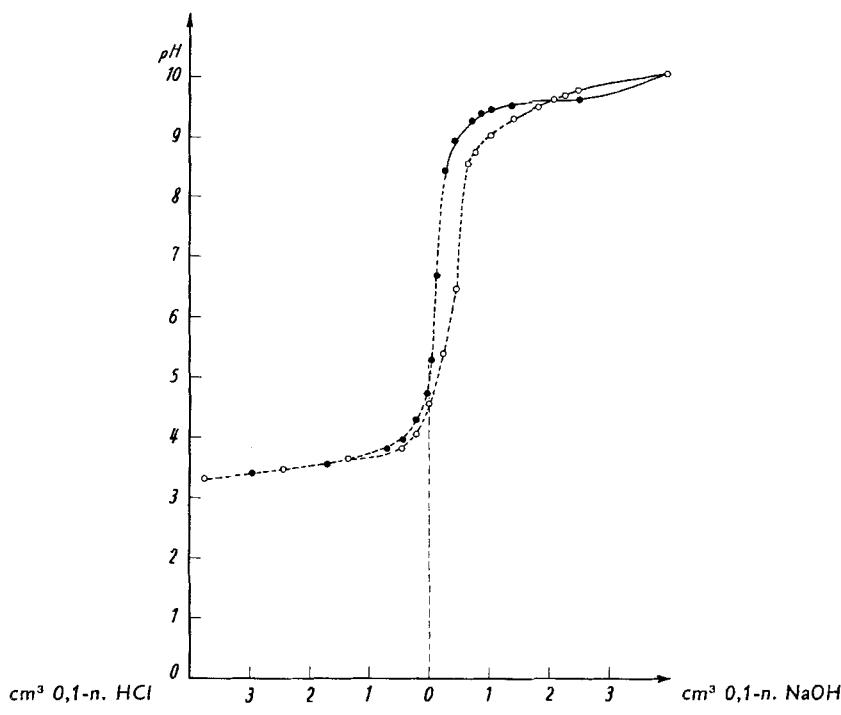


Fig. 3.

Titrationskurven von Polyampholyten mit 50 % sauren und 50% basischen Gruppen.

- Derivat mit regelmässiger Ladungsverteilung, gelöst
- Derivat mit regelmässiger Ladungsverteilung, geflockt
- Derivat mit blockmässiger Ladungsverteilung, gelöst
- Derivat mit blockmässiger Ladungsverteilung, geflockt

In Tab. 2 sind die pH-Flockungsbereiche der vier Polyampholyte, die in Tab. 1 charakterisiert sind, angegeben.

¹⁾ P. Doty & G. Ehrlich, Ann. Rev. physic. Chemistry **3**, 81 (1951); A. Katchalsky, J. Polymer Sci. **12**, 159 (1954).

Tabelle 2.
pH-Flockungsbereich der Polyampholyte.
 2,0 g Polyampholyt pro 1 Mischung.
 kF = keine Flockung.

Präparat	Da	De	Ha	He
pH der wässerigen Suspension . . .	4,7	4,6	5,0	4,9
pH-Flockungsbereich	2,1—8,3	0—9,3	kF	0—9,0

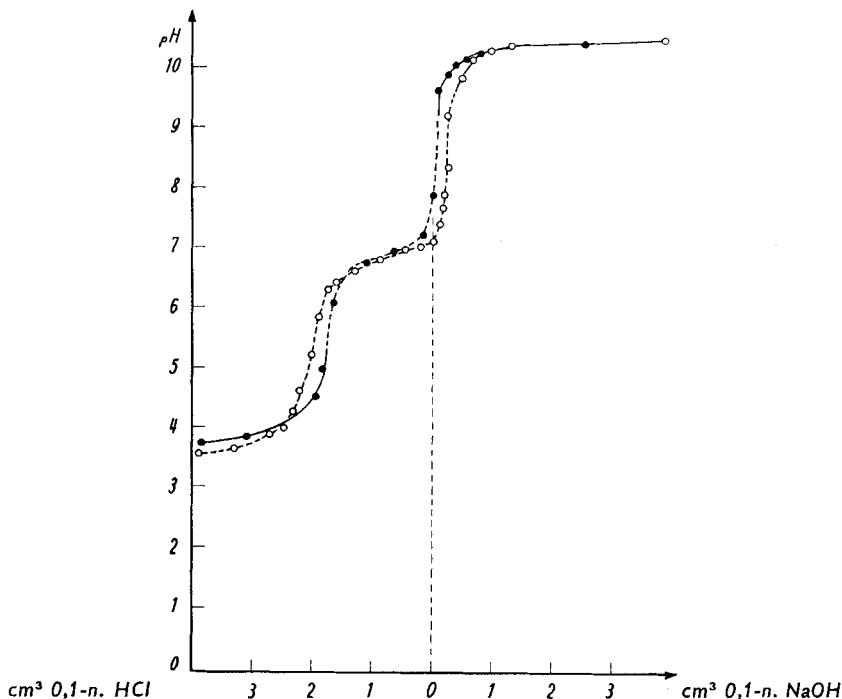


Fig. 4.

Titrationskurven von Polyampholyten mit 25% sauren und 75% basischen Gruppen.

- Derivate mit regelmässiger Ladungsverteilung, gelöst
- Derivate mit regelmässiger Ladungsverteilung, geflockt
- Derivate mit blockmässiger Ladungsverteilung, gelöst
- Derivate mit blockmässiger Ladungsverteilung, geflockt

Präparat Da flockt in einem mittleren pH-Bereich aus; in saurerem und alkalischerem Milieu ist es gut wasserlöslich. Nur bei diesem Polyampholyt kann der Niederschlag im mittleren pH-Gebiet durch Zusatz von NaCl aufgelöst werden. — Präparat De ist im gesamten sauren Gebiet unlöslich und geht erst oberhalb pH 9,3 in Lösung. Durch die blockartige Verteilung der negativen und positiven Ladungen sind hier intermolekulare elektrostatische Wechselwir-

kungen begünstigt. Für die Unlöslichkeit bei stark saurer Reaktion dürften H-Brücken eine Rolle spielen. — Bei den Präparaten mit einem kleineren $-COOH/-NH_2$ -Verhältnis (Fig. 4) sind die Flockungsbereiche gegen höhere pH-Werte verschoben. — Bemerkenswert ist, dass Präparat Ha im gesamten pH-Gebiet, selbst am IEP, löslich ist. Dies dürfte mit den langen Seitenketten, $-CONH(CH_2)_6NH_2$, in Zusammenhang stehen. Man hat wiederholt bei Polyelektrylyten beobachtet, dass sogar hydrophobe Seitengruppen die Wasserlöslichkeit erhöhen können¹⁾. Präparat He verhält sich ähnlich wie De; der Einfluss der blockmässigen Ladungsverteilung überwiegt denjenigen der Seitengruppen. — Die Löslichkeit der untersuchten Polyampholyte bei verschiedenem pH ist ähnlich wie bei gewissen Eiweissen. Die beobachteten weiten Flockungsbereiche hängen eventuell mit dem hohen Gehalt an ionogenen Gruppen und der Inhomogenität bezüglich Molekulargewicht und Verseifungsgrad zusammen²⁾.

Im alkalischen Gebiet, in dem alle vier Polyampholyte löslich sind, wurde die Flockung durch Elektrolyte untersucht (Tab. 3). Wie zu erwarten war, ist De elektrolytempfindlicher als Da, und He als Ha. Ähnlich ist auch enzymatisch verseiftes Pektin z. B. Ca-empfindlicher als alkalisch verseiftes gleichen Veresterungsgrades³⁾. Im Gegensatz zum Na-Pektat⁴⁾ werden die untersuchten Polyampholyte durch NaOH im Überschuss nicht geflockt.

Tabelle 3.

Elektrolytflockung der Polyampholyte.

2,25 g Polyampholyt pro 1 Mischung. Anfangs-pH mit NaOH auf 10,5 eingestellt. Angaben in Milliläq. Elektrolyt pro 1 Mischung, die minimal zur Flockung nötig sind.

kF = keine Flockung.

Präparat Elektrolyt	Da	De	Ha	He
NaCl	kF	200	kF	kF
NaOH	kF	kF	kF	kF
Ba(OH) ₂	7,5	0,4	kF	1,5

Papierelektrophoretische Untersuchungen ergaben, dass Da und Ha im sauren bzw. alkalischen Gebiet in ziemlich geschlossenen Banden kathodisch bzw. anodisch wandern. De und He zeigten keine Wanderung.

Es wurden auch Polyampholyte aus sauer verseiften Pektinen hergestellt. Bei diesen sind wahrscheinlich die negativen und positiven Ladungsstellen am ehesten nach den Gesetzen des Zufalls angeordnet. Diese Präparate verhielten sich jedoch weitgehend gleich wie die aus alkalisch verseiften Pektinen hergestellten Polyampholyte.

¹⁾ H. Deuel, J. Solms & H. Allermatt, Viertelj. Naturforsch. Ges. Zürich **98**, 49 (1953); R. R. Becker & M. A. Stahmann, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3707 (1954).

²⁾ R. Speiser, M. J. Copley & G. C. Nutting, J. physic. Chemistry **51**, 117 (1947); C. H. Hills, H. H. Mottern, G. C. Nutting & R. Speiser, Food Techn. **3**, 90 (1949).

³⁾ C. H. Hills, J. W. J. White & G. L. Baker, Proc. Inst. Food Techn. **1942**, 47.

⁴⁾ H. Deuel & J. Solms, Kolloid-Z. **124**, 65 (1951).

Experimenteller Teil.

1. Herstellung der Pektine gewünschten Veresterungsgrades. Je 5 l einer 1-proz. wässerigen Lösung von Handelspektin (*Obipektin AG.*, Bischofszell) mit einem Veresterungsgrad von ca. 70% wurden mit 50 cm³ 5-proz. NaClO₂-Lösung versetzt und 14 Std. bei 0° stehengelassen. Dann wurde das Pektin mit Alkohol ausgefällt, abgepresst und mit HCl-Alkohol und Alkohol gewaschen. Das Pektin wurde wieder in Wasser gelöst und durch ein Gemischbett von Ionenaustauschern (1 Vol. *Dowex 50* auf 2 Vol. *Dowex 2*) perkoliert, mit Alkohol gefällt, mit abs. Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum bei 45° über P₂O₅ getrocknet. Mit Diazomethan in Äther wurde bei ~30° vollständig verestert¹⁾. Zur Gewinnung von Pektinen mit einem Veresterungsgrad von 50 und 75% wurde dieses Präparat mit NaOH, HCl oder Pektinesterase partiell verseift. Die alkalische Verseifung erfolgte bei 0° während 48 Std. mit der berechneten Menge an NaOH. Sauer wurde in 0,5-n. HCl bei 40° verseift. Zur enzymatischen Verseifung mit Pektinesterase aus Orangenschalen²⁾ wurde mit verd. NaOH laufend ein pH von 7 eingestellt. Am Ende wurde das Enzym durch Aufkochen inaktiviert. Alle Pektinpräparate wurden durch Perkolation über ein Gemischbett von Ionenaustauschern gereinigt und dann der Gefrier trocknung unterworfen.

2. Herstellung der Polyampholyte. Je 8 g Pektin wurden bei Zimmertemperatur in 300 cm³ frisch dest. Formamid gelöst. Die Lösungen wurden auf 0° gekühlt, mit ca. 50 g Äthylendiamin bzw. Hexymethylen diamin versetzt und 18 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde mit Aceton gefällt und mit HCl-Alkohol, Alkohol und Aceton gewaschen. Die Hydrochloride der Polyampholyte wurden in wässriger Suspension in schlauchförmige Membranen eingefüllt. Diese Schläuche wurden während einer Woche in einer Suspension von *Dowex 2* in der OH-Form bis zur Cl-Freiheit geschüttelt. — Auch durch heterogene Umsetzung der Pektine in flüssigem Äthylendiamin entstanden Polyampholyte; diese sind jedoch nach dem Trocknen weder in Säure noch in Lauge löslich. — Die freien COOH-Gruppen der Amphotyten wurden durch Formol titration nach *Sörensen* und der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt (Tab. 1).

3. Eigenschaften der Polyampholyte. Die Titrationskurven wurden mit einem Präzisions-pH Messgerät Typ 111 der *Polymetron AG.*, Zürich, mit Glas- und Kalomel bezugselektrode aufgenommen. Für die Flockung bei verschiedenem pH (Tab. 2) wurden je 5 cm³ einer 1-proz. Lösung der Polyampholyte in 25 cm³ Messkölbchen gegeben, mit steigenden Mengen von 0,1-n. NaOH oder HCl versetzt und mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Nach 1 Std. wurde das pH gemessen und das Koagulationsverhalten notiert. Für die Elektrolytflockung (Tab. 3) wurden je 2 cm³ der Polyampholytlösung mit 1 cm³ Elektrolytlösung versetzt und mit dest. Wasser auf 4 cm³ ergänzt. Zur Papier elektrophorese dienten der Apparat des Techn. Büro *Zemp*, Zürich³⁾, und *Whatman*-Papier 1. Es wurden 1-proz. Lösungen der Polyampholyte von pH 10 aufgetragen. Als Wanderungsmittel wurde ein Boratpuffer von pH 9,8 nach *Clark & Lubs* und ein Citrat puffer von pH 2,0 nach *Sörensen* benutzt⁴⁾. Die Anfärbung der Chromatogramme erfolgte nach *Reindel & Hoppe*⁵⁾.

Herrn Dr. J. Solms sind wir für Mithilfe dankbar. — Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel aus den *Arbeitsbeschaffungskrediten* des Bundes ermöglicht. Wir danken bestens für diese Unterstützung.

¹⁾ *H. Deuel, G. Huber & R. Leuenberger*, Helv. **33**, 1226 (1950).

²⁾ *L. R. MacDonnell, E. F. Jansen & H. Lineweaver*, Arch. Biochemistry **6**, 389 (1945).

³⁾ *Ch. Wunderly*, Die Papier elektrophorese, Aarau 1954, S. 23.

⁴⁾ *J. D'Ans & E. Lax*, Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Wien 1949, S. 1592.

⁵⁾ *F. Reindel & W. Hoppe*, Chem. Ber. **87**, 1103 (1954).

SUMMARY.

Partial alkaline hydrolysis of polygalacturonic acid methyl ester gives products in which the COOH- and COOCH₃-groups are distributed alternatively along the chain molecule. Partial enzymatic hydrolysis, on the other hand, gives products in which the COOH- and COOCH₃-groups, respectively, are grouped together in blocks.

These partial methyl esters of polygalacturonic acid were reacted with diamines to give polyampholytes with a different distribution pattern of COOH- and NH₂-groups along the chain molecule.

The polyampholyte prepared with ethylene diamine and displaying an alternating distribution of COOH- and NH₂-groups is water insoluble at pH 2 to 8. It migrates to the anode in strongly alkaline and to the cathode in strongly acidic solution. The solutions of the polyampholyte are rather stable towards electrolytes.

The polyampholytes with blockwise distribution of the COOH- and NH₂-groups, respectively, are soluble only at high pH values and show almost no electrophoretic migration. In solution they are very sensitive towards electrolytes.

Decreasing the ratio $-\text{COOH}/-\text{NH}_2$ favors the solubility at lower pH values.

The long side chains of the hexamethylene diamine derivatives make these polyampholytes less sensitive towards electrolytes and more soluble in water.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

210. Pentachlorocyclohexanes par chloration du tétrachloro-1,2,4,5-cyclohexane F.174°

par Roland Jaunin et Angelo Germano.

(3 X 55)

Tandis qu'on connaît de nombreux exemples de di-, tri-, tétra- et hexachlorocyclohexanes, aucun pentachlorocyclohexane n'a été décrit dans la littérature. Ayant précédemment étudié la chloration du tétrachloro-1,2,4,5-cyclohexane F.174° (I) en vue d'obtenir des hexachlorocyclohexanes¹⁾, nous nous sommes proposés dans le présent travail de limiter la chloration du dérivé tétrachloré I au stade des pentachlorocyclohexanes. Nous y sommes parvenus en traitant le composé I par le chlorure de sulfuryle en présence de lumière UV., obtenant ainsi un mélange dont nous avons pu séparer, par chromatographie sur charbon activé, deux pentachlorocyclohexanes F.56° (II) et F.107° (III).

¹⁾ Helv. 35, 392 (1952).