

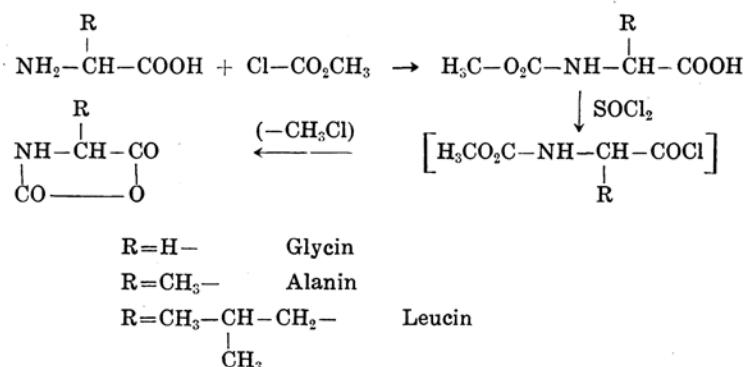
## Über die hochkondensierten Produkte aus einigen Aminosäuren.

Von Yukichi GO und Hisaya TANI.

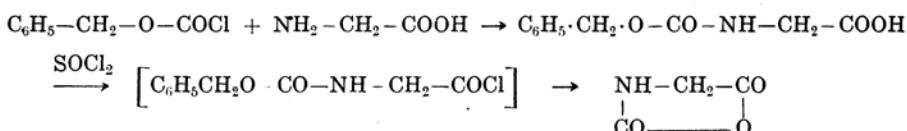
(Eingegangen am 12. October 1939.)

Früher untersuchte einer von uns<sup>(1)</sup> das hochkondensierte Produkt von Glycin und stellte fest, dass die Debye-Scherrer-Aufnahme dieser Substanz praktisch identisch mit der des nur aus Glycin aufgebauten Polypeptids war, dessen Kettenlänge grösser ist als die von Hexaglycylglycin. Wir haben jetzt die Untersuchung auf die hochkondensierten Produkte von *l*-Alanin und von *l*-Leucin erweitert und studierten einige Eigenschaften dieser Körperklasse.

Die hochkondensierten Produkte sind nach H. Leuchs<sup>(2)</sup> aus dem *N*-Carbonsäureanhydrid der Aminosäuren dargestellt worden.



Nach dieser Methode wird reines *N*-Carbonsäureanhydrid aus Leucin leicht gewonnen, aber im Falle von Alanin und Glycin ist die Reinigung verhältnismässig schwer. Deshalb gewannen wir zuerst Carbobenzoxy-glycin<sup>(3)</sup> und dann reines Glycin-*N*-carbonsäureanhydrid einfach durch die Einwirkung von Thionylchlorid darauf.



Alle nach solcher Methode hergestellten krystallisierten *N*-Carbonsäureanhydride gehen, unter Verlust von Kohlenstoffdioxyd, in pulverig hochmolekulare Verbindungen über, wenn sie in Wasserdampf stehen gelassen, oder in Pyridin gelöst und dann auf 100° erhitzt werden. Die

(1) K. H. Meyer und Y. Go, *Helv. Chim. Acta*, **17** (1934), 1488.

(2) H. Leuchs, *Ber.*, **39** (1906), 857; **40** (1907), 3243; **41** (1908), 1721.

(3) M. Bergmann und L. Zervas, *Ber.*, **65** (1932), 1192.

Elementaranalyse dieser hochkondensierten Produkte ergibt Übereinstimmung mit den aus den obigen Formeln berechneten Werten.

Die Molekulargewichtsbestimmung solcher Substanzen ist nach üblicher Methode unmöglich. Da Polyglycin<sup>(4)</sup> aber löslich in wässriger Lithiumbromidlösung ist, bestimmten wir Amino-Stickstoff in solcher Lösung nach der van Slykeschen Methode. Wenn solches Polyglycin natürlich auch keine einheitliche Substanz ist, so können wir, unter der Annahme, dass es sich um ein Polypeptid handelt, doch für die mittlere Kettenlänge Werte von 18 bis 101 und für das mittlere Molekulargewicht Werte von 1044 bis 5775 erhalten. Diese Werte verändern sich natürlich je nach den Kondensationsbedingungen. Da Polyalanin und Polyleucin aber nicht in Lösungszustand gebracht werden können, war bei ihnen die Bestimmung von Amino-Stickstoff nicht möglich.

Die Seide enthält grössere Mengen von Glycin, aber die Wolle grössere Mengen von Leucin, und die erstere ist löslich in Lithiumbromidlösung, dagegen die letztere unlöslich. Vergleicht man dieses Verhalten mit den Löslichkeitsunterschieden unserer synthetischen Polypeptiden, so beruhen diese Löslichkeitsunterschiede nicht auf der Bindungsart von Aminosäuren in Eiweisskörpern, sondern auf den Eigenschaften der in Eiweisskörpern enthaltenen Aminosäuren. Die mit Pirkrinsäure und Natriumcarbonat gemachte Diketopiperazin-Reaktion über Polyaminoäuren ist negativ.

**Enzymatische Untersuchung.** Wir studierten, welches Verhalten solche Verbindungen gegen Enzym zeigen. Die Kettenlänge des angewandten Polyglycin wird als etwa 26 angenommen.<sup>(5)</sup> Diese Substanz wird nicht mit allen benutzten proteolytischen Enzymen verdaut, wie im experimentellen Teil gezeigt wird.

Abderhalden<sup>(6)</sup> untersuchte die Wirkung von Erepsin auf die nur aus Glycin aufgebauten Peptide bis zum Dekapeptid. Er zeigte, dass diese Polypeptide bis zum Hexaglycin mit Erepsin verdaut, aber dass die höheren Peptide nicht verdaut werden. Hieraus kann man schliessen, dass unsere Substanz zum mindesten kein kleineres Peptid als Hexaglycin enthält. Trypsin kann alle niederen bereits synthetisch gewonnenen Peptide bis zum Eikosapeptid nicht verdauen. Doch ist es bisher nicht bekannt, ob Trypsin die höheren Peptide als Eikosapeptid verdaut. Es ist aber jetzt durch unsere Untersuchung festgestellt, dass Polypeptide von grösserer Kettenlänge als Eikosapeptid nicht verdaut werden, da wir gefunden haben dass unser Polyglycin und Poly(glycin+leucin)<sup>(7)</sup> nicht verdaut werden.

**Ergebnisse der Röntgenuntersuchung.** Die nur aus Glycin aufgebauten Peptide bis zum Hexaglycin geben voneinander verschiedene Röntgenogramme. Doch geben die höheren Peptide als Hexaglycin praktisch identische Diagramme. Da unsere Polyglycine das gleiche

(4) Die Hochkondensationsprodukte aus Aminosäuren werden später kurz als Polyglycin u. s. w. bezeichnet.

(5) Siehe: Experimenteller Teil, Verbindung (VIII).

(6) E. Abderhalden, *Fermentforschung*, **12** (1931), 42.

(7) Poly-(glycin+leucin) wird durch Erhitzung eines äquimolekularen Gemisches von N-Carbonsäureanhydride des Glycins und Leucins in Pyridin dargestellt.

Diagramm wie die Peptide von grösserer Kettenlänge als Heptaglycin geben, kann man für unser Polyglycin mindestens eine grössere Kettenlänge als Heptaglycin annehmen. Ausserordentlich grosse Ringe (z. B. hochgliedrige Ringe) geben auch die gleichen Diagramme wie zwei parallele Ketten. Daher können wir nicht erkennen, ob diese Substanzen Ringe oder Ketten enthalten.

Die Aufnahmen des Polyleucin und Polyalalanin können nicht mit denen der nur aus Alanin oder Leucin stufenweise synthetisch aufgebauten Peptide verglichen werden, da Aufnahmen der letzteren noch unbekannt sind. Man kann aber wohl ähnliche Zusammehänge wie im Falle von Glycin annehmen. Im Falle von Leucin entsprechen die Werte (11 Å und 4.8 Å) den der gewöhnlichen wasserlöslichen kugelförmigen Eiweisskörper.<sup>(8)</sup>

Weil die Werte der grössten Gitterdimensionen um so höher werden, je länger die Seitenketten der Aminosäureresidue sind, schliessen wir, dass diese Werte auf der Seitenkettenlänge beruhen.

Die Aufnahme des aus Glycin und Alanin gleichzeitig hergestellten Hochkondensationsproduktes zeigt die Einzeldiagramme von Polyglycin und Polyalalanin; jedoch ist die Aufnahme so unscharf, dass sie schon beinahe ein amorphes Diagramm ist. Wir schliessen daher, dass die Substanz neben dem reinen Polyglycin und Polyalalanin auch noch ein aus Glycin- und Alaninresiduen unregelmässig aufgebautes Kondensationsprodukt enthält.

Die im Wasserdampf dargestellten Substanzen geben stets stärkere und deutlichere Aufnahmen als die in Pyridin dargestellten.

Diese Ergebnisse zusammen mit den oben erwähnten enzymatischen Verhältnissen sprechen dafür, dass diese Substanzen kleinere Kettenlängen als Hexapeptid nicht enthalten. Ob diese Substanzen nur grössere Ketten oder Gemische von Ketten und Ringen enthalten, können wir nach den obigen beiden Methoden nicht entscheiden.

### Experimenteller Teil.

**A. Darstellung von N-Carbonsäureanhydrid aus einigen Aminosäuren.** 1. *Glycin-N-Carbonsäureanhydrid.* (I). Eine Mischung von 35g. (1 Mol) Carbobenzoxylglycin<sup>(9)</sup> und 100g. (5 Mol) Thionylchlorid werden, unter Abschluss von Luftfeuchtigkeit, etwa eine Stunde auf dem Wasserbad auf 40° erwärmt. Im Laufe der Zeit wird die Krystallmasse aus der klaren Lösung abgeschieden. Nach dem Abdestillieren des überschüssigen Thionylchlorids unter verminderter Druck wird der Rückstand mit wasserfreiem Benzol gut gewaschen. Schwach gelbliche Krystalle (15.3g.) werden erhalten. Ausbeute 92% d. Theor. Umkrystallisiert aus Äthylacetat. Farblose Krystalle. Schmp. 100°.

2. *Carbomethoxy-l-alanin.* (II). Zu der Lösung von *l*-Alanin (1 Mol) in n-Natronlauge (1 Mol), wird bei 0° unter dauerndem Umrühren Chlorkohlensäuremethylester (1.1 Mol) tropfenweise zugesetzt. Nach Zusatz von wässriger Natriumcarbonatlösung (0.5 Mol) wird das Umrühren einige Stunden fortgesetzt. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung mit n-Salzsäure versetzt und unter verminderter Druck zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit Äther extrahiert und dieser mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft, so erhält man farblosen Sirup. Ausbeute etwa 85% d. Theor.

(8) Für gewöhnliche wasserlösliche kugelförmige Eiweisskörper ergeben sich zwei Halos: 4.5 Å und 10-11 Å.

3. *L-Alanin-N-Carbonsäureanhydria*. (III). 2.8 g. des oben erwähnten Sirups werden mit 4c.c. Thionylchlorid auf dem Wasserbad bei 40° etwa eine halbe Stunde erwärmt. Nach dem Abdestillieren von überschüssigem Thionylchlorid unter verminderter Druck bei 40°, erhitzt man weiter bis auf 65° und lässt bei dieser Temperatur stehen. Die sirupöse Masse erstarrt nach etwa einer halben Stunde und wird dann mit wenig abs. Äther gewaschen. Ausbeute 1.6 g. oder 70% d. Theor. Umkrystallisiert aus abs. Äther, farblose lange Nadeln. Schmp. 92° (u. Zerset.). (Gefunden: N, 12.73. Berechnet für C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>N: N, 12.18%).

4. *Carbomethoxy-l-leucin*. (IV). Die Reaktion wird unter ähnlichen Bedingungen wie im Falle des oben erwähnten Carbomethoxy-*l*-alanin (II) durchgeführt. Durch Zusatz von N-Salzsäure werden die Krystalle abgeschieden und abfiltriert. Ausbeute 80% d. Theor. Umkrystallisiert aus abs. Äther und wasserfreiem Petroläther. Schmp. 52°. (Gefunden; C, 48.67; H, 8.10. Berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N · ½H<sub>2</sub>O: C, 48.46; H, 8.14%).

5. *l-Leucin-N-Carbonsäureanhydrid*. (V). 9.05g. der oben erwähnten Krystalle (IV) werden unter verminderter Druck getrocknet. Der erhaltene Sirup wird mit 12c.c. Thionylchlorid etwa eine halbe Stunde auf dem Wasserbad auf 40° erwärmt. Das überschüssige Thionylchlorid wird unter verminderter Druck bei 40° abdestilliert. Im Laufe von etwa 40 Minuten erstarrt die sirupöse Masse. Ausbeute 6.9g. oder 90% d. Theor. Umkrystallisiert aus abs. Äther und wasserfreiem Petroläther. Schmp. 77–78° (u. Zerset.). (Gefunden: N, 9.05. Berechnet für C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N: N, 8.92%).

#### B. Kondensation von Aminosäure-N-carbonsäureanhydriden.

I. Unter Wasserdampf. Im geschlossenen Gefäße werden die Krystalle von N-Carbonsäureanhydrid fünf bis sieben Tage über Wasserstehen gelassen. Die erhaltene pulvige hochkondensierte Masse wird, nach dem Trocknen im Exsiccator über Phosphorpentooxyd, gewogen, und die Gewichtsabnahme bei der Kondensation wird mit der Menge verglichen, die sich für befreites Kohlendioxyd berechnen lässt.

1. *Polyglycin*. (a) N-Carbonsäureanhydrid dargestellt nach der Leuchsschen Methode. (VI). N-Carbonsäureanhydrid: 1.5705g. Gewichtsabnahme: 0.6663g daher CO<sub>2</sub>-Abspaltung: 97.41% d. Theor.

Gesamt-Stickstoff nach mikro-Kjeldahl. (Gefunden: N, 24.95, 27.71. Berechnet für C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ON: N, 24.57%).

Bestimmung des Amino-Stickstoffs: 0.4370g. der Substanz werden mit 50%iger wässriger Lithiumbromidlösung versetzt und auf 10c.c. aufgefüllt. Zur Bestimmung werden je 2c.c. dieser Lösung benutzt und nach der mikro-van Slyke Methode bestimmt. (Gefunden: N, 0.405, 0.402%).

$$100 \times \frac{14}{n \times 57 + 18} = 0.40 \quad \text{daher } n \approx 61$$

$$\frac{\text{Amino-N}}{\text{Gesamt-N}} \approx \frac{1}{61} \quad \text{Molekulargewicht} \approx 3095$$

(b) N-Carbonsäureanhydrid dargestellt nach der Bergmannschen Methode. (VII).

N-Carbonsäureanhydrid: 11.1646g. Gewichtsabnahme: 4.5735g. daher CO<sub>2</sub>-Abspaltung: 94.09% d. Theor.

Bestimmung des Amino-Stickstoffs: Die Ausführung der Bestimmung schliesst sich ganz an die im Falle (a) beschriebene Methodik an. (Gefunden: N, 1.373%).

$$\text{daher } \frac{\text{Amino-N}}{\text{Gesamt-N}} \approx \frac{1}{18} \quad \text{Molekulargewicht} \approx 1044$$

(c) Umgefälltes Polyglycin (VIII).

Die oben beschriebene Substanz (VII) wird in gesättigter Lithiumbromidlösung gelöst und mit der zehnfachen Menge Wasser umgefällt.

Amino-Stickstoff: N, 0.919%.

$$\frac{\text{Amino-N}}{\text{Gesamt-N}} \approx \frac{1}{26} \quad \text{Molekulargewicht} \approx 1492$$

2. *Polyalanin* (IX). *N*-Carbonsäureanhydrid: 0.5556g. Gewichtsabnahme: 0.2005g. daher CO<sub>2</sub>-Abspaltung: 94.31% d. Theor.

Gesamt-Stickstoff nach mikro-Kjeldahl: Gefunden: N, 19.90. 19.89. Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>ON: N, 19.72%.

3. *Polyleucin*. (X). *N*-Carbonsäureanhydrid: 1.8561g. Gewichtsabnahme: 0.4761g. daher CO<sub>2</sub>-Abspaltung: 91.58% d. Theor.

Gesamt-Stickstoff nach mikro-Dumas: Gefunden: N, 12.04. Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>ON: N, 12.39%.

**II. Unter Erhitzung mit wasserfreiem Pyridin.** Wasserfreie Pyridinlösungen der *N*-Carbonsäureanhydride werden etwa 15 Minuten auf dem Wasserbad auf 100° erhitzt und die dabei abgeschiedenen Substanzen filtriert.

1. *Polyglycin*. (XI). 0.73g. des *N*-Carbonsäureanhydrids dargestellt nach der Leuchsschen Methode werden in 15c.c. wasserfreiem Pyridin gelöst. Die erhaltene Substanz wird abfiltriert und mit Alkohol gewaschen. Farbloses Pulver. Ausbeute 0.15g.

Amino-Stickstoff Bestimmung: 81.1 mg. Substanz werden mit 50% iger Lithiumbromidlösung versetzt und auf 2c.c. aufgefüllt. Gefunden: N, 0.243%.

$$\text{daher } \frac{\text{Amino-N}}{\text{Gesamt-N}} = \frac{1}{101} \quad \text{Molekulargewicht} = 5775$$

2.. *Polyalanin*. (XII) 0.50g. *N*-Carbonsäureanhydrid werden in 15c.c. wasserfreiem Pyridin gelöst.

Gesamt-Stickstoff Bestimmung: Gefunden: N, 19.01. Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>ON: N, 19.72%.

3. *Polyleucin*. (XIII) 2.0g. *N*-Carbonsäureanhydrid werden in 10c.c. wasserfreiem Pyridin gelöst. Nach beendeter Reaktion wird mit *n*-Hexan versetzt, die dabei ausgefällt Substanz abfiltriert und mit *n*-Hexan gewaschen. Farblose Pulver. Ausbeute 1.1g.

Gesamt-Stickstoff Bestimmung: Gefunden: N, 12.40. Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>ON: N, 12.39%.

### C. Enzymatische Versuche mit Polyglycin und Poly-(glycin+leucin).

1. *Herstellung der Substratlösungen*. Da die beiden Substrate in Wasser nicht löslich sind, benutzten wir ihre Suspensionen.

a). Polyglycin. Zu der Lösung von 1.5g. Polyglycin (VII) in wässriger gesättigter Lithiumbromidlösung werden 130c.c. Wasser zugesetzt, die dabei ausgefällt Substanz abzentrifugiert und wiederholt mit Wasser gewaschen bis sie von Lithiumbromid befreit ist. Diese Substanz wird mit M/15 sekundäres Natriumphosphat (pH 8.4) oder mit M/5 Acetat-Puffer (pH 5.0) versetzt und auf 100c.c. aufgefüllt.

b) Poly-(glycin + leucin). 1.7g. Poly-(glycin + leucin) werden mit M/15 sekundärem Natriumphosphat (pH 8.4) versetzt und auf 50c.c. aufgefüllt.

2. *Verdauungs-Versuche*. a). Mit Papain. Papainlösung: 10% iger wässrige Lösung von Papain (E. Merck) wurden nach den Angaben von A. Purr<sup>(9)</sup> mit Cystein aktiviert.

Ansatz A: 4% Gelatinlösung 5c.c. + Acetat (pH 5.0) 2c.c. + Papainlösung 1c.c.  
 Ansatz B: P-G. 5c.c. + Papainlösung 1c.c. Ansatz C: M/5 Acetat (pH 5.0) 5c.c. + Papainlösung 1c.c.

Verdauungsversuche bei 30°.

Stdn.	COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)		
	A	B	C
1/3	0.64	—	—
1	1.01	—	—
24	—	0.01	0.00
48	—	0.04	0.00

b). Mit Erepsin. Erepsinlösung ist aus dem Glycerinextrakt der frischen Schleimhaut von Schweinedärmen hergestellt worden. Dieses Präparat enthält Aminopolypeptidase und wenig Dipeptidase, aber nicht Trypsin.

Ansatz A: Leucylglycin 5c.c. + Erepsinlösung 1c.c. Ansatz B: *dl*-Leucylglycylglycin 5c.c. + Erepsinlösung 1c.c. Ansatz C: P-G. 5c.c. + Erepsinlösung 1c.c. Ansatz D: M/15 Phosphat (*pH* 8.4) 5c.c. + Erepsinlösung 1c.c.

Verdauungsversuche bei 30°.

Stdн.	COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)			
	A	B	C	D
1/3	—	1.64	—	—
1	0.75	2.53	—	—
5	—	—	0.00	0.00
24	—	—	0.03	0.01
48	—	—	-0.03	0.03

Ansatz A: *dl*-Leucylglycylglycin 5c.c. + Erepsinlösung 1c.c. Ansatz B: P-G-L. 5c.c. + Erepsinlösung 1c.c. Ansatz C: Phosphat (*pH* 8.4) 5c.c. + Erepsinlösung 1c.c.

Verdauungsversuche bei 30°.

Stdн.	COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)		
	A	B	C
1	1.80	—	—
24	—	0.02	0.01
48	—	0.18	0.11

c). Mit Trypsin. Chymotrypsinfreie Trypsinlösung ist nach Angaben von Northrop<sup>(10)</sup> hergestellt worden.

Ansatz A: 6% Caseinlösung 5c.c. + Phosphat (*pH* 8.4) 2c.c. + Trypsinlösung 1c.c. Ansatz C: M/15 Phosphat (*pH* 8.4) 5c.c. + Trypsinlösung 1c.c.

Verdauungsversuche bei 30°.

Stdн.	COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)		
	A	B	C
1/3	0.64	—	—
1	0.77	—	—
16	—	0.02	-0.01
48	—	-0.09	0.00

d). Mit Trypsin-Kinase. Trypsin-Kinase-Lösung ist nach Waldschmidt-Leitzt<sup>(11)</sup> hergestellt worden.

(10) J. H. Northrop und M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.*, **16** (1933), 267.

(11) E. Waldschmidt-Leitz und K. Linderström-Lang, *Z. physiol. Chem.*, **166** (1927), 241.

Ansatz A: 0.04 Mol Chloracetyl-L-Tyrosin 5c.c. + Trypsin-Kinase 1c.c. Ansatz  
 B: P-G. 5c.c. + Trypsin-Kinase 1c.c. Ansatz C: P-G-L. 5c.c. + Trypsin-Kinase 1c.c.  
 Ansatz D: Phosphat (pH 8.4) 5c.c. + Trypsin-Kinase 1c.c.

Verdauungsversuche bei 30°.

Stdn.	NH <sub>2</sub> -Zuwachs (c.c.)	COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)		
	A	B	C	D
1/3	0.351	—	—	—
1	0.720	—	—	—
5	—	0.03	0.01	0.04
24	—	0.13	0.17	0.14
48	—	0.22	0.36	0.27

D. Röntgenographische Untersuchung.

Cu K<sub>α</sub>    57 KV.    6 mA.    7 Stdn.

Substanz	Herstellungs Methode	Netzebenenabstände in Å			
		11.9 (s.s.st.)	4.8 (m.)	5.3 (s.st.)	4.4 (st.)    3.7 (m.)
Polyleucin	H <sub>2</sub> O	11.9 (s.s.st.)	4.8 (m.)		
	Pyridin	11.5 (s.s.st.) 5.1 (m.)			
Polyalanin	H <sub>2</sub> O		5.3 (s.st.)	4.4 (st.)    3.7 (m.)	
	Pyridin		5.4 (m.)	4.3 (m.)    3.8 (schw.)	
Polyglycin	H <sub>2</sub> O			4.2 (s.s.st.) 3.9 (schw.)	3.1 (m.)
	Pyridin			4.4 (m.)	3.9 (schw.)    3.5 (m.)
Poly-(glycin +alanin)	Pyridin	5.1 (s.s.schw.)	4.4 (m.)	3.7 (s.s.schw.)	

An dieser Stelle möchten wir Herrn. Prof. Dr. Shiro Akabori für seine freundliche Unterstützung unseren besten Dank aussprechen.

*Institut für Faserforschung,  
Kaiserliche Universität zu Osaka.*