

224. Werner Kuhn, Carolina Catharina Molster und Karl Freudenberg¹⁾: Zur Kinetik des Abbaus polymer-homologer Ketten: Die Geschwindigkeit der Hydrolyse einiger Aminosäure-Derivate.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Heidelberg.]

(Eingegangen am 8. Juni 1932.)

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über die Hydrolyse der Cellulose und Stärke²⁾ wurde unter anderem die Frage behandelt, welche Stellung ein sog. Biosan (ringförmiges Biose-anhydrid) unter den Oligo- und Poly-sacchariden einnehmen sollte. Da ein solches Biosan unbekannt ist, und auch die übrigen Modelle in der Zucker-Chemie schwer zugänglich sind, wurde die alkalische Hydrolyse des Di-, Tri- und Tetrapeptids des Glycins, sowie des Glycin-anhydrids untersucht. Außer der Gegenüberstellung mit den Zuckern konnten Ergebnisse für die Eiweiß-Chemie erwartet werden, was auch eintraf.

Messungen von Glycin-anhydrid und Glycyl-glycin hat P. A. Levene³⁾ ausgeführt, und E. Abderhalden⁴⁾ hat die hydrolytische Spaltung verschiedener Peptide verglichen; diese Ergebnisse werden weiter unten angeführt.

Die Hydrolyse wurde in der Weise verfolgt, daß die Menge an freiem Carboxyl durch Titration nach Sörensen in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt wurde. Für die Berechnung der Reaktionskonstanten der verschiedenen Glycyl-glycin-Bindungen aus dem Hydrolysen-Verlauf wurden die folgenden Definitionen und Formeln zugrunde gelegt. Die genaue Ableitung der Formeln findet sich in der holländischen Dissertation von C. C. Molster⁵⁾.

Für das Dipeptid $\frac{1}{2}$ sei k_2 die Geschwindigkeitskonstante für die Spaltung von Baustein 1 und 2. Der Spaltungsgrad α ist dann bestimmt aus:

$$1 - \alpha = e^{-k_2 t} \dots \dots \dots (1)$$

Für das Glycin-anhydrid A \square A sei k_A die Reaktionskonstante jedereinzeln der beiden (identischen) Verknüpfungsstellen A. Nach Auflösung der einen derselben reagiert die übrig bleibende Verknüpfungsstelle nach k_2 weiter. Sind zur Zeit t von N_0 ursprünglich vorhandenen Verknüpfungsstellen S Stellen gelöst, so ist der Spaltungsgrad $\alpha = \frac{S}{N_0}$; k_A bestimmt sich aus der Zeit-Abhängigkeit von α und der Konstanten k_2 durch die Beziehung⁶⁾

$$1 - \alpha = \frac{k_2 - k_A}{k_2 - 2k_A} \cdot e^{-2k_A t} - \frac{k_A}{k_2 - 2k_A} \cdot e^{-k_2 t} \dots \dots \dots (2)$$

¹⁾ Theoretisch von W. Kuhn, experimentell von K. Freudenberg u. C. C. Molster durchgeführt.

²⁾ a) K. Freudenberg, B. 54, 770 [1921]; b) K. Freudenberg u. E. Braun, A. 460, 288 [1928]; c) W. Kuhn, B. 63, 1503 [1930]; d) K. Freudenberg, W. Kuhn, W. Dürr, Fr. Bolz u. G. Steinbrunn, B. 63, 1510 [1930]; e) K. Freudenberg, K. Friedrich u. Mitarbeiter, B. 63, 1961 [1930]; f) K. Freudenberg u. W. Kuhn, B. 65, 484 [1932]; g) W. Kuhn, Ztschr. physikal. Chem. (A) 159, 368 [1932]; h) K. Freudenberg, K. Friedrich u. I. Bumann, A. 494, 41 [1932].

³⁾ Journ. biol. Chem. 81, 697 [1929], 82, 167 [1929]; vergl. 63, 661 [1925].

⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. 170, 146, 158 [1927].

⁵⁾ Over de Hydrolysesnelheid van enige Polypeptiden en Diketopiperazinen, door C. C. Molster, Amsterdam 1932. ⁶⁾ Werner Kuhn, B. 63, 1509 [1930].

Für das Tripeptid (Diglycyl-glycin $\frac{1}{a} \left| \frac{2}{b} \right| \frac{3}{c}$) seien die Geschwindigkeitskonstanten der Bindungen von Baustein 1 und 2 mit k_a bzw. der Bindungen von Baustein 2 und 3 mit k_β bezeichnet. Ist k_a oder k_β gelöst, reagiert der Rest nach k_2 weiter. Es gilt dann für die Abhängigkeit des Spaltungsgrades α von der Zeit die Beziehung (2), wenn dort anstatt k_A die Größe $\frac{k_a + k_\beta}{2} = k_3$ (mittlere Konstante = Anfangs-Hydrolysenkonstante im Tripeptid) gesetzt wird.

$$\text{Triglycyl-glycin, } \frac{1}{a} \left| \frac{2}{b} \right| \frac{3}{c} \left| \frac{4}{d} \right|.$$

Die Konstanten der drei im Tetrapeptid vorliegenden Bindungen seien durch k_a , k_b , k_c bezeichnet. In Analogie zum vorigen Falle des Tripeptids werden wir den Mittelwert der drei Konstanten $\frac{k_a + k_b + k_c}{3} = k_4$ setzen (Anfangs-Hydrolysenkonstante).

Während es aber im vorigen Falle für den weiteren Reaktionsverlauf gleichgültig war, ob k_a oder k_β zuerst reagierte, indem auf alle Fälle aus dem Tripeptid ein Dipeptid entstand, tritt im Falle des Tetrapeptids ein Unterschied auf, ob zuerst eine der Randbindungen k_a , k_c oder aber die Mittelbindung k_b reagiert. Bei Lösung von k_a oder k_c entsteht Monopeptid und Tripeptid, bei Lösung von k_b entstehen zwei Moleküle Dipeptid. Da das Dipeptid nach k_2 , das Tripeptid mit den Konstanten k_a u. k_β weiterreagiert, ergibt sich also ein Unterschied in der Geschwindigkeit des weiteren Verlaufes der Hydrolyse, für den Fall, daß k_b groß bzw. klein gegenüber den Randkonstanten k_a und k_c ist.

Wenn andererseits das Verhältnis $q = \frac{k_a + k_c}{2 k_b}$ gegeben ist, so läßt sich sofort aus-

sagen, daß von 100 Mol. Tetrapeptid $100 \cdot \frac{k_b}{k_a + k_b + k_c} = 100 \frac{1}{2q + 1}$ Mol. in der Mitte

(nach k_b) reagieren, während $100 \cdot \frac{k_a + k_c}{k_a + k_b + k_c} = 100 \frac{2q}{2q + 1}$ Mol. an einer der Rand-

bindungen k_a oder k_c aufgespalten werden. Wenn also k_4 und q vorgegeben sind, während k_1 und k_2 aus den Versuchen am Dipeptid und Tripeptid festgelegt sind, ist der ganze Reaktionsverlauf vollständig bestimmt. Man erhält dann für den Spaltungsgrad:

$$\begin{aligned} 1 - \alpha = e^{-3k_1 t} & \left[1 - \frac{1}{1 + 2q} \frac{2k_4}{3k_4 - k_2} - \frac{4q}{1 + 2q} k_4 \left\{ \frac{k_3 - k_2}{(3k_4 - 2k_3)(2k_3 - k_2)} + \right. \right. \\ & \left. \left. \frac{k_3}{(3k_4 - k_2)(2k_3 - k_2)} \right\} \right] + e^{-2k_2 t} \frac{4q}{1 + 2q} k_4 \frac{k_3 - k_2}{(3k_4 - 2k_3)(2k_3 - k_2)} + \\ & e^{-k_2 t} \left[\frac{1}{1 + 2q} \frac{2k_4}{3k_4 - k_2} + \frac{4q}{1 + 2q} k_4 \frac{k_3}{(3k_4 - k_2)(2k_3 - k_2)} \right] \dots \quad (3) \end{aligned}$$

während z. B. die Ausbeute an Dipeptid (Zahl der Bausteine, die in Form von Dipeptid vorliegen, geteilt durch insgesamt vorhandene Bausteine) im Verlauf des Abbaus des Tetrapeptids gleich ist

$$\begin{aligned} \varphi_D = \frac{3}{2} e^{-3k_1 t} \frac{k_4}{3k_4 - k_2} & \left[\frac{4q}{1 + 2q} \frac{k_3}{3k_4 - 2k_3} - \frac{2}{1 + 2q} \right] + \\ \frac{3}{2} e^{-2k_2 t} \frac{4q}{1 + 2q} \frac{k_2 k_4}{(3k_4 - 2k_3)(k_2 - 2k_3)} & + \frac{3}{2} e^{-k_2 t} \left[\frac{2}{1 + 2q} \frac{k_4}{3k_4 - k_2} + \right. \\ & \left. \frac{k_4 k_3}{(3k_4 - k_2)(2k_3 - k_2)} \cdot \frac{4q}{1 + 2q} \right] \dots \dots \dots (4) \end{aligned}$$

Der beobachtete Hydrolysenverlauf läßt sich nun tatsächlich in allen Fällen durch die Formeln 1–3 genau darstellen. Die genauen Zahlenangaben und Kurven befinden sich in der erwähnten Dissertation; dort sind auch genaue Angaben über die Meßmethodik gemacht. Für die die Hydrolyse charakterisierenden Konstanten wurden folgende Werte gefunden:

	<i>n</i> -NaOH			0.1- <i>n</i> -NaOH		0.5- <i>n</i> -NaOH	0.07- <i>n</i> -NaOH
	20°	34°	0°	20°	34°	25°	20°
Glycin-anhydrid. k_A	0.23	—	—	0.021	0.035	<i>0.18</i>	—
Glycyl-glycin k_2	0.00075	—	—	0.000025	0.000084	<i>0.00027</i>	—
Diglycyl-glycin ... $\frac{k_a + k_\beta}{2} = k_3$	0.0015	—	—	—	—	—	—
Triglycyl-glycin ... $\frac{k_a + k_b + k_c}{3} = k_4$	0.00245	—	—	—	—	—	—
$q = \frac{k_a + k_c}{2 k_b}$	0.3	—	—	—	—	—	—
$\frac{k_a + k_c}{2}$	0.0014	—	—	—	—	—	—
k_b	0.0046	—	—	—	—	—	—
<i>d,l</i> -Alanin-anhydrid. k_A	0.056	0.0719	—	0.0028	0.0058	—	—
<i>d,l</i> -Alanin-alanin ... k_2	—	—	—	—	—	<i>0.000078</i>	—
<i>d</i> -Alanin-anhydrid. k_A	—	—	<i>0.0157</i>	—	—	—	<i>0.00139</i>

Die kursiv gedruckten Zahlen entstammen den Arbeiten von P. A. Levene. Seine Ergebnisse sind hier neu berechnet, und zwar sind sie auf natürliche Logarithmen und Minuten bezogen; ferner wurde zur Berechnung von k_A die für die Anhydride allein zutreffende Formel (2) verwendet⁷⁾. Daß höhere Peptide rascher als niedrige gespalten werden, hat auch E. Abderhalden (l. c.) angegeben.

Von den Ergebnissen, die in dieser Zusammenstellung enthalten sind, seien die folgenden hervorgehoben: Der Übergang von Glycyl-glycin zum Glycin-anhydrid erhöht die Geschwindigkeitskonstanten der Glycyl-glycin-Bindung für die Spaltung mit *n*-NaOH um mehr als das 300-fache. Für die Spaltung mit n_{10} -NaOH beträgt der Faktor bei $t = 20^\circ$ beinahe das 1000-fache, bei $t = 34^\circ$ ist er = 400. Wenn man die Abhängigkeit der Reaktionskonstanten von der Temperatur gemäß der Formel $k = Ae^{-U/RT}$ ansetzt (U = Aktivierungswärme, A = sterischer Faktor), so ergibt sich für

	<i>A</i>	<i>U</i> Cal/mol
Glycyl-glycin	2.5×10^6	14.9×10^3
Glycin-anhydrid	2.3×10^3	6.5×10^3

Beim Glycin-anhydrid ist also die Aktivierungswärme nur halb so groß wie im Glycyl-glycin; das muß als chemischer Einfluß gedeutet werden.

⁷⁾ Einzelheiten in der Dissertation C. C. Molster.

Während dieser Einfluß die Reaktionsgeschwindigkeit des Glycin-anhydrids vor der des Glycyl-glycins begünstigt, liegt der sterische Faktor für das Glycyl-glycin um einen Faktor 1000 günstiger. Dies ist wohl als sterische Abschirmung im Falle des Glycin-anhydrids zu deuten. Von den beiden starken, in entgegengesetzter Richtung tendierenden Einflüssen ist der chemische der entscheidende.

Der Übergang von Glycyl-glycin zum Diglycyl-glycin hat eine Erhöhung der Reaktionskonstanten auf das Doppelte zur Folge. Welche der beiden Konstanten k_a und k_β im Diglycyl-glycin die höhere ist, läßt sich durch kinetische Messung nicht feststellen. Offenbar hat auch hier der chemische Einfluß der beiden benachbarten Peptid-Bindungen eine gegenseitige Erhöhung der Reaktionskonstanten zur Folge.

Im Triglycyl-glycin ist die Reaktionskonstante gegenüber dem Diglycyl-glycin wiederum angestiegen. Dabei ist aber interessant, daß die mittlere Konstante der Randbindungen $(k_a + k_c)/2$ angenähert gleich $(k_a + k_\beta)/2 = k_\beta$, also gleich der Geschwindigkeitskonstanten im Diglycyl-glycin ist. Ein Vergleich der Formeln zeigt in der Tat, daß k_a ganz analog wie k_x gelegen ist. Ein Unterschied im Wesen der beiden Bindungen findet sich nur darin, daß in weiterer Entfernung von k_a noch ein Glycylrest angehängt ist. In analoger Weise zum optischen, optisch-aktiven Verhalten usw. wird man den experimentellen Befund $k_x = k_a$ dahin deuten dürfen, daß die Reaktionskonstante k_a im Diglycyl-glycin durch Hinzutreten eines Glycylrestes am anderen Ende des Moleküls nicht mehr stark modifiziert wird (Entfernungssatz!). Das ganz Analoge, vom anderen Ende des Moleküls her betrachtet, gilt für $k_\beta = k_c$. Die Erhöhung von k_4 gegenüber k_3 ist also der besonders großen Reaktionskonstanten der Mittelbindung k_b zuzuschreiben. Diese Konstante ist etwa 3-mal größer als die mittlere Konstante der Randbindungen $(k_a + k_c)/2$. Nach den vorigen Betrachtungen hat man sich infolgedessen vorzustellen, daß bei der Hydrolyse des Triglycyl-glycins etwa 62% der Moleküle in der Mitte aufspalten, nur die restlichen 38% an den Randbindungen k_a und k_c .

Wenn man annehmen darf, was nach dem Obigen nahe gelegt ist, daß die Hinzufügung eines weiteren Glycylrestes die Reaktionskonstanten der entfernt liegenden Bindungen nicht weiter beeinflußt, so läßt sich die mittlere Reaktionskonstante (Anfangs-Hydrolysenkonstante) eines Tetraglycyl-glycins voraussehen: $k_5 = (k_a + k_c + 2k_b)/4$, und allgemein für ein (n-Glycyl)-glycin $k_{(n+1)} = [k_a + k_c + (n-2)k_b]/n$, wo $k_a + k_c$ und k_b aus der obigen Tabelle zu entnehmen sind.

Die Feststellung, daß das Tetrapeptid von Alkalien vorzugsweise in der Mitte gespalten wird, darf nicht ohne weiteres auf die fermentative Spaltung übertragen werden. Auffallend ist, daß die Geschwindigkeit der Hydrolyse des Glycinanhydrids um 2–3 Zehnerpotenzen größer ist als die Geschwindigkeit der Hydrolyse der Peptide. Es ist nicht ausgeschlossen, daß ein „Biosan“ in ähnlicher Weise von den zugehörigen Oligo- und Polysacchariden abweichen würde. Es ist ferner beachtenswert, daß die Geschwindigkeit der alkalischen Hydrolyse bei den Peptiden des Glycins mit steigender Gliederzahl zunimmt, während sie bei der sauren Hydrolyse der Saccharide vom Cellobiose- und Maltose-Typus abnimmt. Es mag hier jedoch erwähnt

werden, daß bei der Acetolyse der Cellulose das Verhältnis der Konstanten sich umgekehrt⁸⁾, also den Peptiden entspricht.

Ein präparatives Ergebnis dieser Arbeit, die Darstellung von Glycylglycin betreffend, wird in der nachstehenden Mitteilung angeführt.

225. Karl Freudenberg, Helmut Eichel und Fritz Leutert: Synthesen von Abkömmlingen der Amino-säuren.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Heidelberg.]

(Eingegangen am 8. Juni 1932.)

Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten über Insulin haben wir eine Anzahl synthetischer Versuche unternommen in der Absicht, einige uns interessierende, bisher unbekannte Typen von Amino-säure-Verbindungen herzustellen. Wir stießen hierbei auf die ausgedehnte Verwendbarkeit der α -Azido-säuren, die uns in Gestalt der α -Azido-propionsäure und ihres Chlorids wegen ihrer Überführbarkeit in Amino-säure-Derivate bereits bei unseren stereochemischen Arbeiten gute Dienste geleistet hatten¹⁾. Das erwähnte Säure-chlorid und ebenso das Chlorid der Azido-essigsäure läßt sich mit Phenolen oder Amino-säuren umsetzen; nascierender Wasserstoff verwandelt die Azido-acetylverbindungen in die entsprechenden Amino-säure-Derivate. Diesen Übergang haben M. O. Forster und H. E. Fierz²⁾ bereits vor längerer Zeit an den einfachen Azido-säuren selbst gezeigt, indem sie z. B. Azido-propionsäure in Alanin verwandelten.

Wir beschreiben im folgenden die auf diesem Wege ausgeführte Synthese des Glycin-phenylesters und eines einfachen Dipeptides³⁾. Die Darstellung der uns interessierenden Ester der Amino-säuren mit den Oxy-säuren gelang jedoch erst, als wir die katalytische Hydrierung der Azidogruppe zur entsprechenden Aminogruppe vornahmen. Dieses bereits seit längerer Zeit von uns angewendete Verfahren⁴⁾ erlaubt z. B. die glatte Umwandlung der Azidoacetyl-milchsäure in Glycyl-milchsäure und erschließt damit eine Körperklasse von physiologischem Interesse, deren Verhalten gegen Fermente zur Zeit geprüft wird. Wir sehen uns zu dieser Veröffentlichung schon jetzt veranlaßt, weil inzwischen A. Bertho und J. Maier gleichfalls

⁸⁾ Hierüber wird später berichtet. Es läßt sich schon jetzt sagen, daß die mögliche Gesamtausbeute an Disaccharid von 67 %, die bisher als höchste Zahl gelten konnte, wahrscheinlich um einige Prozente höher anzusetzen ist. Dieses Einzelergebnis steht im Einklang mit der seit meiner ersten Arbeit über Cellulose (1921; vergl. l. c. 2a) entwickelten Vorstellung von langen einheitlichen Cellobiose-Ketten. Zu der unlängst veröffentlichten Synthese der methylierten Cellotriose (K. Freudenberg u. W. Nagai, A. 494, 63 [1931]) sei nachgetragen, daß auch die Drehung des synthetischen Produktes vollständig mit dem aus Cellulose (l. c. 2e und 2h) gewonnenen übereinstimmt. Die Zweifel an der Molekülgröße und Konstitution unserer krystallisierten Methylcellotriose, wie sie M. Ulmann u. K. Hess sowie C. Trogus äußern (Naturwiss. 18, 316/317 [1932]), kann ich nicht anerkennen. K. Freudenberg.

¹⁾ K. Freudenberg u. A. Luchs, B. 61, 1084 [1928]; K. Freudenberg, W. Kuhn u. I. Bumann, B. 63, 2380 [1930]; vergl. W. Kuhn u. E. Knopf, Ztschr. physikal. Chem. (B) 7, 292 [1930]. ²⁾ Journ. chem. Soc. London 93, 1862 [1908].

³⁾ Kurz mitgeteilt in Sitz.-Ber. Heidelberg. Akad. d. Wiss. 1931, 9. Abhandl.

⁴⁾ Dtsch. Reichs-Pat. Anmeld. vom 22. Jan. 1932.