

große, derbe Krystalle, die sich in konz. Schwefelsäure violettrot lösen, in verd. Alkali unlöslich sind, sich bei 300° dunkel färben und bei 370° unt. Zers. schmelzen. Nach der Analyse scheint das Produkt aus der oben beschriebenen roten Verbindung durch Verlust von 2 Mol. HCl und 1 Mol. Wasser entstanden zu sein, doch läßt sich auf diesen Ergebnissen noch keine Konstitutionsformel aufbauen.

18.69 mg Sbst.: 42.54 mg CO<sub>2</sub>, 5.55 mg H<sub>2</sub>O. — 22.32 mg Sbst.: 50.88 mg CO<sub>2</sub>, 6.39 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>28</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>Cl<sub>4</sub> (541.97). Ber. C 62.00, H 2.98. Gef. C 62.08, 62.17, H 3.32, 3.20.

20.87 mg Sbst.: 56.86 mg CO<sub>2</sub>, 6.00 mg H<sub>2</sub>O. — 71.35 mg Sbst.: 47.65 mg AgCl. C<sub>28</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>Cl<sub>4</sub> (451.02) (?). Ber. C 74.50, H 2.68, Cl 15.72. Gef. C 74.31, H 3.22, Cl 16.52.

Bei den präparativen Arbeiten erfreuten wir uns der Hilfe des Hrn. Dr. Adolph Springmann.

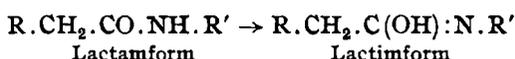
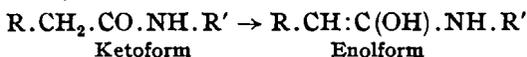
Mailand-Dresden, im Oktober 1930.

#### 460. E. Stiasny und H. Scotti: Das Säure- und Alkali-Bindungsvermögen von Peptiden.

[Aus d. Institut für Gerberei-Chemie d. Techn. Hochschule Darmstadt.]  
(Eingegangen am 17. Oktober 1930.)

Die Eigenschaft der Proteine, Säuren und Alkalien zu binden, ist häufig Gegenstand eingehender Prüfung gewesen. Diese Eigenschaft ist nicht nur für das Verständnis der Konstitution der Proteine und ihrer Reaktionsfähigkeit, sondern auch für jene Erscheinungen wesentlich, welche eine Abhängigkeit von der Säure- bzw. Alkali-Aufnahme aufweisen (Viscosität, Quellung, osmotischer Druck usw.). Der Chemismus der Säure- und Alkali-Bindung wird verschiedentlich aufgefaßt, wobei man grundsätzlich hauptvalentige Bindung und nebenvaleutige Bindung unterscheiden kann. Aber nicht nur die Art der Bindung, sondern auch die Wahl der für die Bindung maßgebenden basischen und sauren Gruppen des Proteins gibt zu verschiedenen Auffassungen Anlaß. Für die Säure-Bindung zieht man in erster Linie die freien Amino-Gruppen der Proteine heran, daneben berücksichtigt man auch die Guanidyl- und Imidazol-Gruppen der Arginin- und Histidin-Reste und den sog. Nicht-amino-Stickstoff in den Pyrrolidin- und Indol-Kernen (Prolin, Oxy-prolin und Tryptophan). Vielfach schreibt man aber auch den Peptid-Gruppen Säure-Bindungsvermögen zu, und diese Ansicht schien durch das Verhalten der Desamino-proteine gestützt zu werden, deren Säure-Bindungsvermögen durch die Desaminierung nur in geringem Maße verringert erscheint.

Für das Basen-Bindungsvermögen kommen in erster Linie die freien Carboxylgruppen, dann einige Hydroxylgruppen (im Tyrosin-, Serin-, Oxyprolin-Rest) und schließlich wieder die Peptidgruppen in Betracht, von denen gewöhnlich angenommen wird, daß sie durch Einwirkung von Alkali in eine tautomere Form umgewandelt werden, die dann alkali-bindend wirkt. Diese tautomere Form kann als Enol- oder Lactim-Form angesprochen werden, je nachdem, wie man sich die tautomere Umwandlung vorstellt:

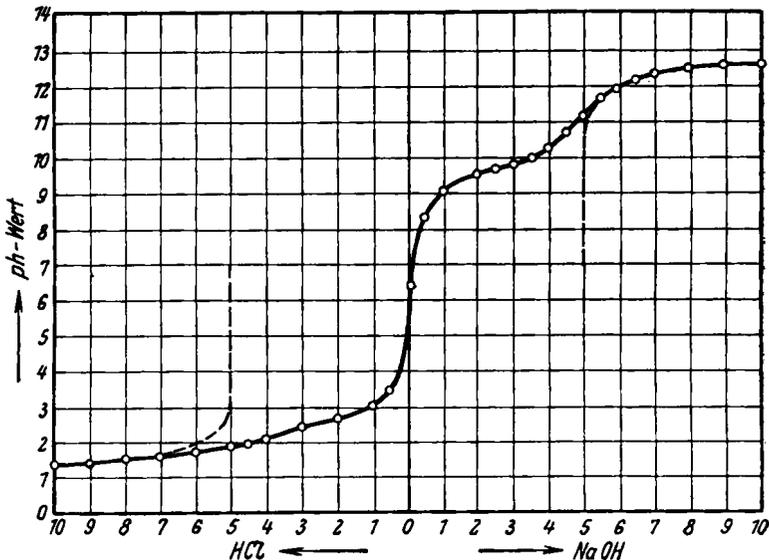


Die vorliegende Arbeit sucht die Frage zu entscheiden, ob die Peptidgruppen für die Säure- oder Alkali-Bindung herangezogen werden dürfen. Die Entscheidung soll sich aus den Titrationskurven ergeben, welche mit Glycin und mit einigen, vom Glycin sich ableitenden Peptiden angestellt wurden. Es handelt sich um die folgenden Stoffe, denen je eine Amino- und Carboxylgruppe und steigende Mengen von Peptidgruppen (aber sonst keine Säure oder Alkali bindenden Gruppen) angehören:

Glykokoll (Glycin)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot COOH$ .....	(Keine Peptidgruppe)
Dipeptid (Glycyl-glycin)	$H_2N \cdot [CH_2 \cdot CO \cdot NH] \cdot CH_2 \cdot COOH$ .....	(Eine " )
Tripeptid (Di-glycyl-glycin)	$H_2N \cdot [CH_2 \cdot CO \cdot NH]_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$ .	(Zwei Peptidgruppen)
Tetrapeptid (Tri-glycyl-glycin)	$H_2N \cdot [CH_2 \cdot CO \cdot NH]_3 \cdot CH_2 \cdot COOH$	(Drei " )
Pentapeptid (Tetra-glycyl-glycin)	$H_2N \cdot [CH_2 \cdot CO \cdot NH]_4 \cdot CH_2 \cdot COOH$	(Vier " )
Hexapeptid (Penta-glycyl-glycin)	$H_2N \cdot [CH_2 \cdot CO \cdot NH]_5 \cdot CH_2 \cdot COOH$	(Fünf " )

Ferner wurden mit Glycin-anhydrid (Diketo-piperazin) Titrationskurven ausgeführt.

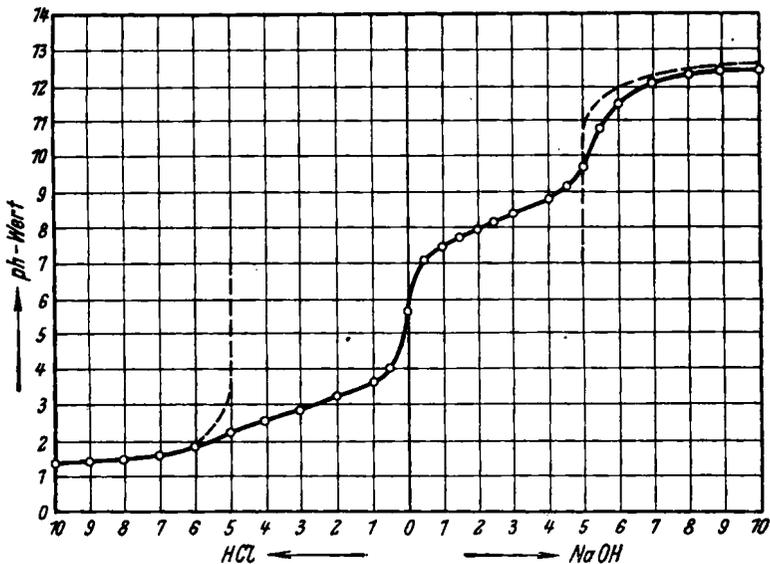
Aus den abgebildeten Titrationskurven (s. Abbild. 1—7; Einzelheiten im Versuchs-Teil) lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Glykokoll verhält sich — wie zu erwarten — wie eine schwache einsäurige Base und eine schwache einbasische Säure. Zusatz von Salzsäure (linke Hälfte des Bildes) verringert anfangs stark den  $p_H$ -Wert der Lösung und wirkt dann langsam  $p_H$ -erniedrigend auf den gebildeten Puffer. Nach Zusatz äquivalenter Salzsäure-Menge (5 ccm  $n/10$ -HCl zu 5 ccm  $n/10$ -Glykokoll) fällt der weitere Kurven-Verlauf mit der Salzsäure-Kurve (gestrichelt) zusammen. Zusatz von Natronlauge (rechte Hälfte des Bildes) erhöht anfangs stark den  $p_H$ -Wert der Lösung und wirkt



Abbild. 1. Alkali-Säure-Titrationskurve von Glykokoll.

dann langsam  $p_H$ -erhöhend auf den gebildeten Puffer. Bei Zusatz der äquivalenten Menge Natronlauge (5 ccm  $n/_{10}$ -NaOH zu 5 ccm  $n/_{10}$ -Glykokoll) zeigt sich ein Wendepunkt der Kurve, die nun in die Natronlauge-Kurve übergeht.

Dipeptid verhält sich bei der Salzsäure-Titration genau so wie Glykokoll insofern, als die Titrationskurve nach Zusatz der zur Neutralisation einer Aminogruppe erforderlichen (äquivalenten) Salzsäure-Menge mit der Salzsäure-Kurve zusammenfällt, also keinen weiteren Salzsäure-Verbrauch für die Peptidgruppe erkennen läßt. Bei der Natronlauge-Titration zeigt aber das Dipeptid ein anderes Bild als das Glykokoll, denn nach Zusatz der — für eine Carboxylgruppe — äquivalenten NaOH-Menge zeigt sich nicht sofort der Wendepunkt der Kurve, und die bei weiterem NaOH-Zusatz gemessenen  $p_H$ -Werte sind niedriger als zu erwarten wäre, wenn die Titrationskurve in die Natronlauge-Kurve übergegangen wäre. Es ist also auch nach Zusatz von 5 ccm  $n/_{10}$ -NaOH zu 5 ccm  $n/_{10}$ -Dipeptid Natronlauge gebunden worden, und hierfür kann nur die Peptidgruppe in Betracht gekommen sein.

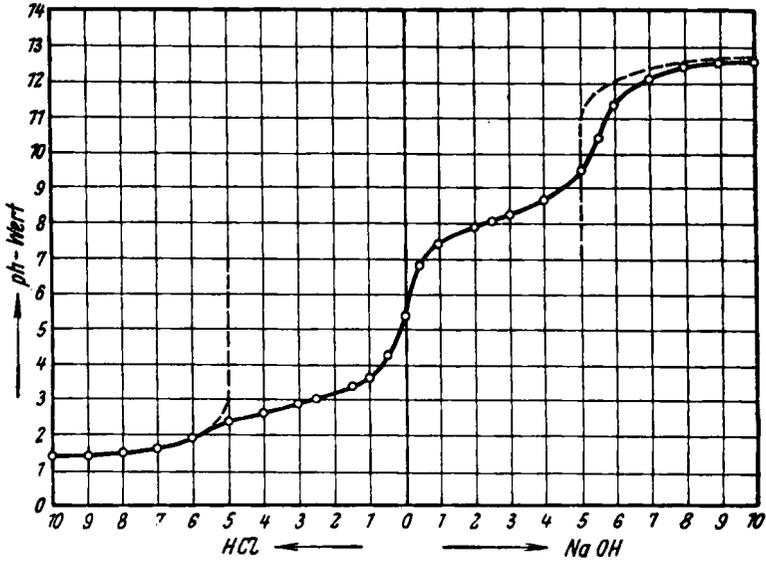


Abbild. 2. Titrationskurve von Glycyl-glycin (Dipeptid).

Als wesentlich für die vorliegende Untersuchung ist hervorzuheben, daß bei den höheren Peptiden (Tri- bis Hexapeptid) Salzsäure-Zusatz nur das Bindungsvermögen der Aminogruppen, nicht aber das Bindungsvermögen der Peptidgruppen erkennen läßt; denn nach Zusatz von 5 ccm  $n/_{10}$ -HCl<sup>1)</sup> zu 5 ccm  $n/_{10}$ -Peptid geht die Titrationskurve sofort in die Salzsäure-Kurve über.

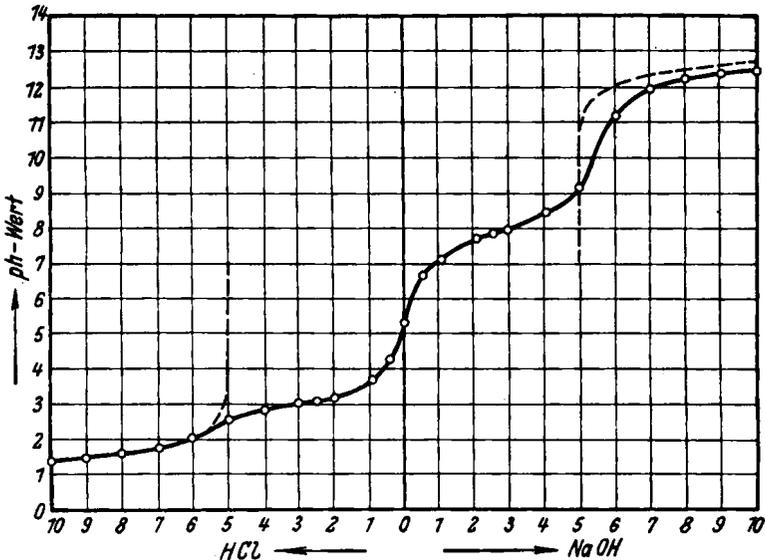
1) Bei den höheren, wenig löslichen Peptiden wurde mit  $n/_{1}$ -HCl gearbeitet.

Beim Natronlauge-Zusatz zeigt sich aber stets, daß der Wendepunkt der Kurve bei Neutralisation der Carboxylgruppe noch nicht eintritt, sondern



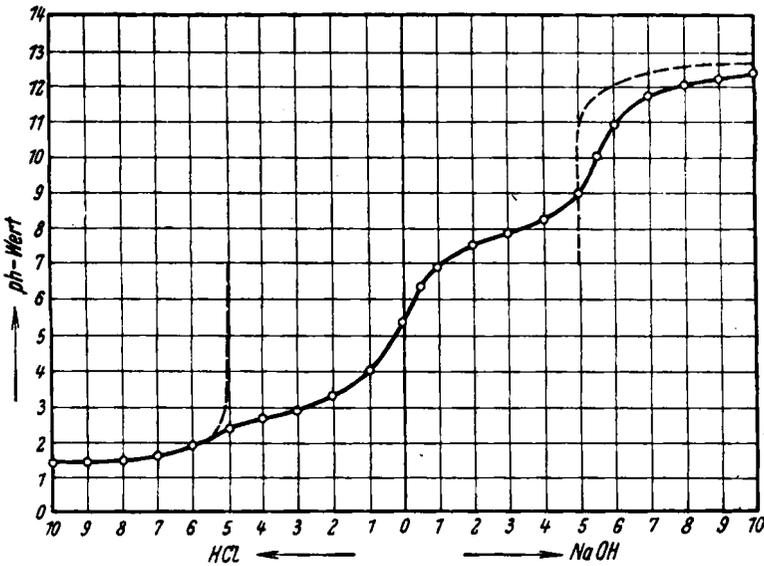
Abbild. 3. Titrationskurve von Diglycyl-glycin (Tripeptid).

um so mehr in der Richtung weiteren Natronlauge-Zusatzes verschoben ist, je mehr Peptidgruppen vorhanden sind. Ebenso bleiben die  $p_h$ -Werte bei fortgesetztem Lauge-Zusatz um so mehr hinter den  $p_h$ -Werten der reinen



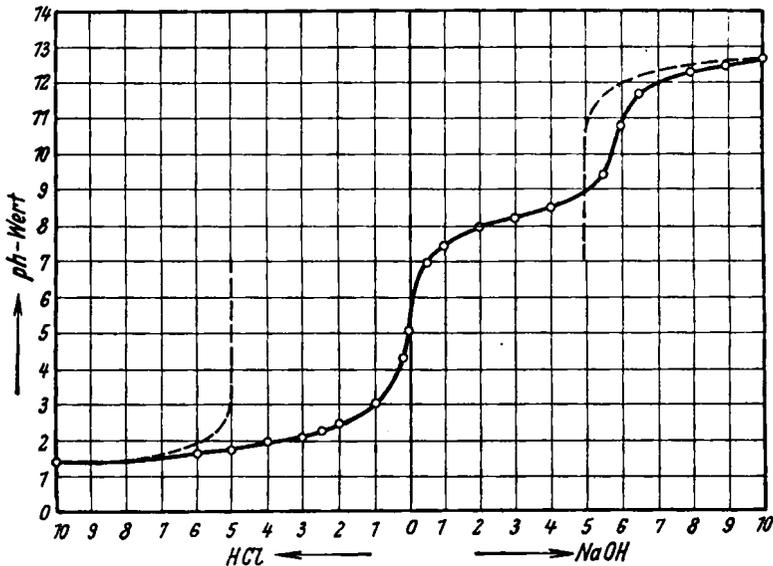
Abbild. 4. Titrationskurve von Triglycyl-glycin (Tetrapeptid).

Natronlauge-Kurve zurück, je mehr Peptidgruppen zur Verfügung stehen. Dies beweist, daß auch die Peptidgruppen sich an der Alkali-Bindung be-



Abbild. 5. Titrationskurve von Tetraglycyl-glycin (Pentapeptid).

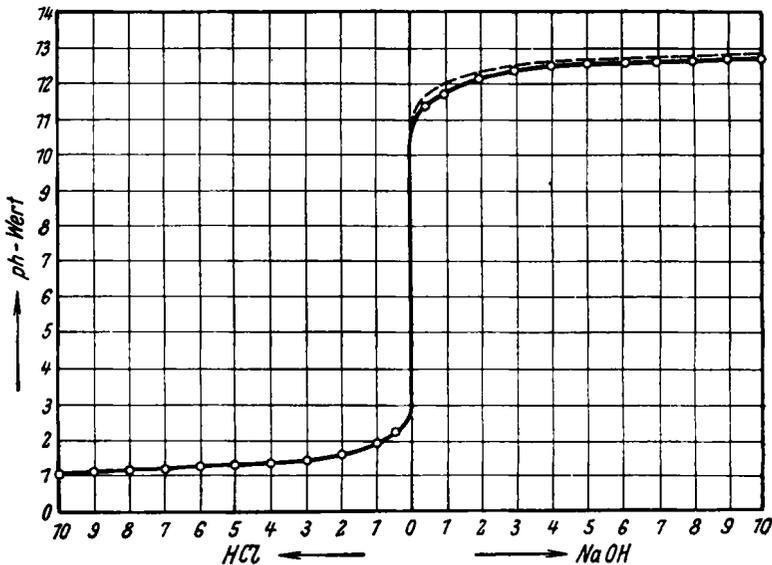
teiligen. Die Titrationskurve des Hexapeptids ist insofern nicht völlig mit den Titrationskurven der anderen Peptide vergleichbar, als das Hexapeptid in ungelöstem (aufgeschlämmt) Zustande verwendet wurde und ein Durch-



Abbild. 6. Titrationskurve von Pentaglycyl-glycin (Hexapeptid).

reagieren mit Natronlauge bei der Titration offenbar nicht stattgefunden hat. Das alkalische Titrationsgebiet zeigt also höhere  $p_H$ -Werte als bei gelöstem Hexapeptid zu erwarten wäre.

Die Titrationskurve des Glycin-anhydrids läßt keine Salzsäure-Bindung erkennen und zeigt im alkalischen Teil nur geringe Alkali-Bindung, die vielleicht durch tautomere Umlagerung der Peptidgruppen ermöglicht wird und — bei weiterem Alkali-Zusatz — zur Aufspaltung des Ringes führt.



Abbild. 7. Titrationskurve von Glycin-anhydrid.

Man erhält also mit geringen Abweichungen die Form einer Salzsäure-Natronlauge-Titrationskurve. Damit soll nicht gesagt sein, daß dem Glycin-anhydrid (und folglich auch der Peptidgruppe) jeglicher Basen-Charakter mangelt. Das von Curtius und Göbel<sup>2)</sup> dargestellte Chloroplatinat des Diketopiperazins beweist vielmehr, daß ein solcher Basen-Charakter vorhanden ist. Die Base ist aber so schwach, ihre Dissoziationskonstante offenbar so niedrig, daß die löslichen Salze praktisch vollständig hydrolysiert sein müssen.

Aus den mitgeteilten Titrationskurven lassen sich außer dem Bindungsvermögen für Säuren und Alkalien noch die Dissoziationskonstanten der untersuchten amphoteren Stoffe und ihre iso-elektrischen Punkte erkennen. Die Dissoziationskonstanten ergeben sich aus den  $p_H$ -Werten bei Halbsättigung. Die iso-elektrischen Punkte lassen sich aus den Dissoziationskonstanten nach der bekannten Formel errechnen:  $p_{Hi} = \frac{1}{2} (p_{Ks} + 14 - p_{Kb})$ , wobei  $p_{Hi}$  den  $p_H$ -Wert beim iso-elektrischen Punkt,  $p_{Ks}$  und  $p_{Kb}$  die negativen Logarithmen der Säure- bzw. Basen-Dissoziationskonstanten vorstellen<sup>3)</sup>. In Tabelle I sind die hieraus sich ergebenden Werte zusammengestellt.

<sup>2)</sup> Curtius u. Goebel, Journ. prakt. Chem. [2] **26**, 175 [1882].

<sup>3)</sup> L. Michaelis, Die Wasserstoff-ionen-Konzentration, I. Teil, S. 61, 2. Aufl., Berlin 1922.

Tabelle I.

	$K_s$	$P_{Ks}$	$K_b$	$P_{Kb}$	$P_{hi}$	$K_s$ aus dem Schrifttum	$K_b$	$P_{hi}$
Glykokoll ..	$1.99 \times 10^{-10}$	9.70	$2.6 \times 10^{-12}$	11.58	6.06	$1.8 \times 10^{-10}$ (Winkelblech)	$2.7 \times 10^{-12}$ (Winkelblech)	6.09
Dipeptid ..	$0.63 \times 10^{-8}$	8.20	$1.35 \times 10^{-11}$	10.87	5.66	$0.33 \times 10^{-8}$ (Dernby)	$0.95 \times 10^{-11}$ (Dernby)	5.52
Tripeptid ..	$1.0 \times 10^{-8}$	8.00	$1.26 \times 10^{-11}$	11.0	5.50			
Tetrapeptid	$1.78 \times 10^{-8}$	7.75	$1.12 \times 10^{-11}$	10.95	5.40			
Pentapeptid	$2.0 \times 10^{-8}$	7.70	$1.12 \times 10^{-11}$	10.95	5.38			
Hexapeptid	$2.5 \times 10^{-8}$	7.60	$1.12 \times 10^{-11}$	10.95	5.32			

Man sieht, daß die Einführung der ersten Peptidgruppen einen stärkeren Einfluß ausübt auf den Säuren- und Basen-Charakter der Peptide als die Einführung weiterer Peptidgruppen. Mit wachsender Zahl der Peptidgruppen nimmt der Säure-Charakter stetig zu; der Basen-Charakter wächst nur bis zum Dipeptid. Der iso-elektrische Punkt wurde auch durch direkte Bestimmung (optimale Alkohol-Fällung von Tri-, Tetra- und Pentapeptid und  $p_H$ -Messungen in Lösungen zunehmender Konzentration (bei Glykokoll und Dipeptid) bestätigt. Er wandert mit wachsender Zahl der Peptidgruppen in das saure Gebiet und hat bei den Polypeptiden schon die Werte zahlreicher Proteine erreicht.

Zusammenfassung: Aus den Titrationskurven wird geschlossen, daß Salzsäure-Bindung durch Peptidgruppen löslicher Peptide nicht stattfindet, daß aber Alkali-Bindung in deutlicher Weise erfolgt. — Es werden Dissoziationskonstanten und iso-elektrische Punkte von Polypeptiden ermittelt.

### Beschreibung der Versuche.

Die Darstellung der zur Untersuchung gelangten Stoffe erfolgte in der Hauptsache nach den im Schrifttum vorhandenen Vorschriften. Zur Identifizierung der Peptide hat sich — neben der Stickstoff-Bestimmung — ein Vergleich der Formol-Titration vor und nach vollständiger Hydrolyse bewährt.

Die Titrationsen wurden mit  $n/10$ - bzw.  $n/1$ -HCl und mit  $n/10$ - bzw.  $n/1$ -NaOH (carbonatfrei) ausgeführt. Bei den leicht löslichen Peptiden (einschließlich des Tripeptids) wurden 5 ccm  $n/10$ -Lösung mit  $n/10$ -HCl (aus der Mikro-bürette) versetzt und nach je 0.5 oder 1 ccm Zusatz (bei konstant gehaltenem Volumen) die Wasserstoff-ionen-Konzentration potentiometrisch (mit der Wasserstoff-Elektrode) bestimmt. Nach Zusatz von 5 ccm  $n/10$ -HCl bzw. NaOH wurde der weitere Zusatz mit  $n/1$ -HCl (bzw. NaOH) fortgesetzt und in Abständen von je 0.05 oder 0.1 ccm bis zu 0.5 ccm fortgesetzt; hierbei wurden die geringen Volum-Differenzen vernachlässigt. Bei den weniger leicht löslichen höheren Peptiden wurden 10 ccm  $n/20$ -Lösung mit  $n/1$ -HCl bzw.  $n/1$ -NaOH titriert, wobei der Zusatz zu je 0.1 ccm erfolgte und bis 1.0 ccm fortgesetzt wurde. Die den abgelesenen Millivolten entsprechenden  $p_H$ -Werte sind in den Diagrammen 1—7 enthalten.