

Energetik der Bildung hochmolekularer Polypeptide*¹.

Von

J. W. Breitenbach, J. Derkoseh und F. Wessely.

Aus dem I. und II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 14. März 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 27. März 1952.)

Bei der Bildung hochmolekularer Polypeptide aus α -Amino-N-carbonsäureanhydriden erhält man bei Verwendung einheitlicher Ausgangsprodukte Stoffe, die nur Peptidreste einer Art enthalten^{2,3}. Die Messung der Verbrennungswärme dieser Stoffe erlaubt es sowohl die energetischen Verhältnisse bei ihrer Bildung aus den N-Carbonsäureanhydriden als auch erstmalig die der hypothetischen Kondensation von α -Aminosäuren zu hochmolekularen Polypeptiden zu untersuchen.

Wir haben uns mit Phenylalanin- und Sarkosinpolypeptiden befaßt. Phenylalaninpolypeptid schien uns wegen der Abhängigkeit seiner Löslichkeitseigenschaften von der Art der Betätigung seiner Wasserstoffbrücken besonders interessant, Sarkosinpolypeptid, weil hier, abgesehen von der endständigen NH-Gruppe, die Möglichkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken völlig fehlt.

Substanzen und Experimentelles.

Phenylalanin. Das verwandte Präparat war ein reinstes im Handel erhältliches. Es wurde nochmals aus einem Alkohol-Wassergemisch umkristallisiert und über Phosphorpentoxyd scharf getrocknet.

Sarkosin. Die Substanz war zur Reinigung einige Male aus verdünntem Alkohol umkristallisiert worden.

Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid. Das Präparat wurde aus Phenylalanin und Phosgen dargestellt. Bis zur Verwendung wurde es über Phosphorpentoxyd bei tiefer Temperatur und im Dunkeln aufbewahrt.

* Herrn Prof. Dr. G. Jantsch zum 70. Geburtstag gewidmet.

¹ Kurze Mitteilung gleichen Inhalts: J. W. Breitenbach, J. Derkoseh und F. Wessely, Nature (London), im Druck.

² J. W. Breitenbach und F. Richter, Die makromolekulare Chemie, Bd. IV, S. 262. 1950.

³ F. Wessely, K. Riedl und H. Tuppy, Mh. Chem. 81, 861 (1950).

Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid. Es wurde aus der Sarkosin-N-carboäthoxyverbindung mit Thionylchlorid nach *Leuchs* dargestellt. Die Aufbewahrung erfolgte wie beim Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid, jedoch wurde die Verbindung sofort nach der Trocknung und Reinheitsbestimmung (durch Zersetzung in der Hitze und Wägung des gebildeten CO_2) verbrannt.

Phenylalanin-N-carbonsäuredimethylester. Wurde aus Phenylalanin über die N-Carbomethoxyverbindung dargestellt; ein Öl mit $n_D^{20} = 1,5108$.

Phenylalaninpolypeptide. Es entstehen bei der Peptidbildung in Benzol von Anfang an eine benzollösliche und eine benzolunlösliche Form nebeneinander. Es wurden etwa 4 g Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid in einer Konzentration von 0,16 Mol/l in reinem, jedoch nicht über Natrium getrocknetem Benzol durch 12 Stdn. bei 70° C gehalten. Nach dieser Zeit hatte sich ein Gel abgeschieden. Das Gel wurde von der Lösung durch Zentrifugieren getrennt und mehrmals mit Benzol dekantiert. Aus der Lösung wurde mit Petroläther das benzollösliche Polypeptid ausgefällt, ebenfalls abzentrifugiert und mit Petroläther dekantiert. Da etwas mehr von der löslichen Form entstanden war und wir schon früher festgestellt hatten², daß durch Quellen in Dioxan die lösliche in die unlösliche Form übergeführt werden kann, wurde ein kleiner Teil des Löslichen so behandelt, so daß schließlich von beiden gleichviel vorhanden war. Die unlösliche Form bestand daher zu etwa 80% aus in Benzollösung gebildeter und zu etwa 20% aus in Dioxan gequollener Substanz. Die beiden Phenylalaninpolypeptide wurden im Hochvak. (10^{-2} bis 10^{-3} Torr) bei Zimmertemp. zur Gewichtskonstanz getrocknet, was etwa 6 Monate in Anspruch nahm. Von dieser Zeit wurde durch im ganzen etwa 100 Stdn. unter Kühlung des Trockenmittels (Silicagel) mit flüssiger Luft getrocknet. Zwischendurch wurde das Trockenmittel natürlich öfters im Hochvak. ausgeheizt. Nach etwa 3 Monaten waren noch 90% des benzollöslichen Produktes in Benzol löslich, am Ende der Trocknung immer noch 85%. Es wurde von dem benzollöslichen Polypeptid die Viskosität in Benzol bei 20° C bei verschiedenen Konzentrationen gemessen, worüber die nachfolgende Tabelle 1 Aufschluß gibt.

Tabelle 1. Viskosität vom benzollöslichen Phenylalaninpolypeptid in Benzol.

c in g/l	η_{sp}	η_{sp}/c
1,8	0,279	0,155
0,9	0,115	0,127
0,6	0,070	0,117
0,45	0,050	0,111

Es besteht eine lineare Abhängigkeit der reduzierten spezifischen Viskosität η_{sp}/c von c . Durch Extrapolation nach folgender Gleichung:

$$[\eta] = \eta_{sp}/c - 0,033 \cdot c$$

ergibt sich die Grundviskosität $[\eta]$ des benzollöslichen Polypeptids $[\eta] = 9,6 \cdot 10^{-2}$ l/g. Das benzolunlösliche Polypeptid war auch in m-Kresol unlöslich, gut löslich jedoch in Dichloressigsäure. Viskositätsmessungen in Dichloressigsäure, die wegen der großen Hygroskopizität der Säure nur mit sehr be-

scheidener Genauigkeit durchgeführt werden konnten, ergaben aber doch, daß beide Formen, die benzollösliche und die unlösliche, etwa die gleiche Viskositätserhöhung verursachen.

Sarkosinpolypeptid. Das Produkt entstand bei einem Versuch, das Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid aus Chloroform umzukristallisieren. Die Umwandlung in das Polypeptid war dabei in wenigen Minuten beendet. Die Verbindung wurde zweimal aus alkohol. Lösung mit Äther umgefällt, abgesaugt und im Hochvak. in der vorhin beschriebenen Weise getrocknet.

Es wurde lediglich die Temp. dabei auf etwa 40° C gesteigert. Die Trocknung war nach etwa einer Woche beendet. Das Polypeptid war hernach noch immer gut in Wasser oder Alkohol löslich. Es wurde die Viskosität in Äthylalkohol bei 20° C bei verschiedenen Konzentrationen gemessen, worüber Tabelle 2 informiert.

Nimmt man auch hier eine lineare Abhängigkeit des η_{sp}/c gegen c an, so ergibt sich bei graphischer Extrapolation die Grundviskosität des Sarkosinpolypeptids in Alkohol bei 20° C $[\eta] = 6,8 \cdot 10^{-3}$ l/g. Bemerkenswert erscheint außerdem die große Hygroskopizität dieses Polypeptids.

Die Bestimmung der Verbrennungswärme wurde in dem früher beschriebenen Kalorimeter durchgeführt^{4, 5}. Der Wasserwert des Kalorimeters betrug $2395,5 \pm 1,0$ cal

und wurde mit reiner Benzoesäure vom Bureau of Standards, Washington, bestimmt. Um die gebildete Salpetersäure zu bestimmen, wurde die Bombe 1 Std. nach Beendigung der Verbrennung geöffnet und die Salpetersäure mit $n/13,9$ NaOH und Bromkresolgrün als Indikator titriert. Eine Washburn-Korrektur wurde bei den hier verbrannten Substanzen nicht angebracht, da diese in der Größenordnung der Fehlergrenze der Bestimmung der Verbrennungswärme liegt.

Die Verbrennung der Phenylalaninpolypeptide gelang nur mit Hilfe von Paraffinöl, da ansonsten starke Rußbildung auftrat. Diese ist möglicherweise auf den brüchigen Charakter der Pille zurückzuführen, da sich die hornartigen Phenylalaninpolypeptide nur schwer zerkleinern und entsprechend mangelhaft pressen lassen. Desgleichen war eine Verwendung von Paraffinöl als Hilfssubstanz bei der Verbrennung von Sarkosin, Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid und Sarkosinpolypeptid (welches pulverförmig erhalten wird) nötig. Hier ist die schwere Verbrenbarkeit auf den niederen Wert der Verbrennungswärme zurückzuführen. Das verwandte Paraffinöl war eines „für kalorimetrische Zwecke“ der Fa. Schering-Kahlbaum mit einer angegebenen Verbrennungswärme von 11002 ± 3 cal/g — gewogen im Vak. — entsprechend 11014 cal/g, gewogen in Luft. Die Kontrollbestimmungen mit unserem Kalorimeter ergaben 11011 cal/g, gewogen in Luft. Um eine Zersetzung des sehr empfindlichen Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids durch Wasserdampf zu verhindern, wurden bei der Verbrennung dieser Substanz die sonst angewandten 5 ccm Wasser nicht in die Bombe eingeführt und ein entsprechend niedrigerer Wasserwert der Berechnung zugrunde gelegt.

Ergebnisse und Diskussion.

Über die erhaltenen Verbrennungswärmen gibt die Tabelle 3 Aufschluß, die entsprechenden molaren Größen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die molaren Größen der Polypeptide sind auf ein Grundmol, entsprechend $C_6H_5CH_2CH(NH-)CO-$ bzw. $CH_3(N-)CH_2CO-$, also unter Vernachlässigung der Endgruppen, berechnet. Die aus den erhaltenen

Tabelle 2. Viskosität vom Sarkosinpolypeptid in Alkohol.

c in g/l	η_{sp}	η_{sp}/c
7,94	0,0694	0,00873
3,97	0,0302	0,00760
3,17	0,0242	0,00762
2,64	0,0204	0,00772

⁴ J. W. Breitenbach und J. Derkosch, Mh. Chem. 81, 689 (1950).

⁵ J. W. Breitenbach und J. Derkosch, Mh. Chem. 82, 177 (1951).

Verbrennungsenthalpien errechenbaren Reaktionsenthalpien sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Die Bildung der festen hochmolekularen Polypeptide aus den N-Carbonsäureanhydriden ist ein exothermer Vorgang. Es ist daher verständlich, daß es sich auch in Lösung um einen völlig einseitig verlaufenden

Tabelle 3. Verbrennungswärmen.

Substanz	Einwaage	Einwaage an Paraffinöl	ΔT	$\Delta T_{\text{korr.}}$	Verbrennungswärme cal. pro Gramm	
						im Mittel
Phenylalanin	0,61267		1,7205	1,7320	6719,0	6727,5 \pm 2,9
	0,61716		1,7325	1,7470	6721,3	
	0,61789		1,7345	1,7485	6724,5	
	0,60749		1,7070	1,7200	6728,7	
	0,62070		1,7425	1,7590	6736,0	
	0,61476		1,7270	1,7415	6735,7	
Phenylalanin- N-carbonsäure- anhydrid	0,71331		1,7390	1,7545	5850,4	5835,8 \pm 4,2
	0,70900		1,7290	1,7430	5839,7	
	0,68039		1,6570	1,6695	5832,3	
	0,69445		1,6920	1,7050	5832,9	
Phenylalanin- N-carbonsäure- dimethylester	0,79573		2,0335	2,0545	6134,7	6140,8 \pm 6,2
	0,65371		1,6770	1,6925	6147,0	
Benzollösliches	0,52803	0,06076	1,9260	1,9435	7502,2	7503,2 \pm 6,0
Phenylalanin- polypeptid	0,48801	0,05691	1,7840	1,8035	7514,0	
	0,50997	0,03787	1,7645	1,7790	7493,4	
Benzolunlösliches Phenylalanin- polypeptid	0,42767	0,08375	1,7170	1,7310	7481,0	7479,1 \pm 6,9
	0,38622	0,11355	1,7255	1,7395	7490,1	
	0,40592	0,09382	1,6910	1,7095	7466,3	
Sarkosin	0,69816	0,08120	1,6740	1,6930	4487,4	4484,3 \pm 3,3
	0,65530	0,11124	1,7345	1,7495	4481,5	
	0,68004	0,11212	1,7850	1,8020	4481,3	
	0,67515	0,09357	1,6875	1,7015	4473,7	
	0,68759	0,08531	1,6770	1,6960	4495,5	
	0,67313	0,09825	1,7070	1,7210	4476,0	
	0,69906	0,08150	1,6840	1,6990	4495,0	
Sarkosin-N- carbonsäure- anhydrid	0,64081	0,17364	1,7325	1,7490	3491,7	3509,6 \pm 5,6
	0,64095	0,17424	1,7435	1,7590	3514,6	
	0,65820	0,16514	1,7265	1,7390	3508,2	
	0,69818	0,15364	1,7335	1,7495	3514,5	
Sarkosin- polypeptid	0,50269	0,12252	1,7370	1,7565	5635,0	5626,1 \pm 4,2
	0,48957	0,12818	1,7345	1,7510	5627,7	
	0,51998	0,10934	1,7210	1,7380	5630,4	
	0,49874	0,12081	1,7255	1,7380	5626,8	
	0,51683	0,13905	1,8440	1,8645	5610,5	

den Vorgang handelt, um so mehr, als dabei auch freies CO_2 entsteht, also auch die entropischen Verhältnisse günstiger sind als zum Beispiel bei der Bildung hochmolekularer Substanzen aus ungesättigten Verbindungen.

Die Umwandlung der löslichen Form des Phenylalaninpolypeptids in die unlösliche ist ebenfalls exotherm, und zwar mit einem Betrag, der etwa der Erstarrungswärme niedrigmolekularer Flüssigkeiten entspricht. Wir haben zur Deutung der verschiedenartigen Löslichkeit der beiden Formen schon früher eine Vorstellung entwickelt, die man kurz so formulieren kann: benzollösliche Form — intramolekulare Wasserstoffbrücken, benzolunlösliche Form — intermolekulare Wasserstoffbrücken². Die gemessene Exothermität würde dann bedeuten, daß entweder in der

Tabelle 4. Molare Verbrennungsenergien, -enthalpien und Bildungswärmen.

Substanz	Molare Verbrennungsenergie ΔU	Molare Verbrennungsenthalpie ΔH	Bildungsenthalpie ΔH_B
Phenylalanin	— 1111,3	— 1112,3	— 109,7
Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid ..	— 1115,7	— 1116,1	— 131,5
Phenylalanin-N-carbonsäuredimethylester	— 1456,9	— 1457,9	— 182,8
Benzollösliches Phenylalaninpolypeptid .	— 1104,2	— 1105,2	— 48,5
Benzolunlösliches Phenylalaninpolypeptid	— 1100,7	— 1101,7	— 52,0
Sarkosin	— 399,5	— 400,0	— 121,2
Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid	— 403,9	— 403,8	— 143,1
Sarkosinpolypeptid	— 399,9	— 400,3	— 52,6

Tabelle 5. Reaktionsenthalpien.

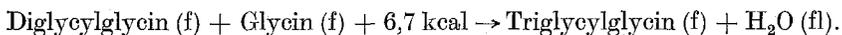
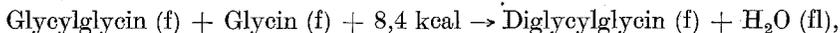
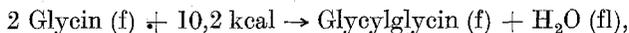
Reaktion	Reaktionsenthalpie ΔH
1. Phenylalanin-NCA (f) \rightarrow benzollösl. Polypeptid (f) \rightarrow CO_2 (g) .	— 10,9
2. Phenylalanin-NCA (f) \rightarrow benzolunlösl. Polypeptid (f) + CO_2 (g)	— 14,4
3. Benzollösl. Polypeptid (f) \rightarrow benzolunlösl. Polypeptid (f)	— 3,5
4. Phenylalanin (f) \rightarrow benzollösl. Polypeptid (f) + H_2O (fl)	— 7,1
5. Sarkosin-NCA (f) \rightarrow Sarkosinpolypeptid (f) + CO_2 (g)	— 3,5
6. Sarkosin (f) \rightarrow Sarkosinpolypeptid (f) + H_2O (fl)	+ 0,3

unlöslichen Form die Wasserstoffbindungen energetisch günstiger sind als in der löslichen, oder daß die Gesamtzahl der Wasserstoffbindungen in der unlöslichen Form größer ist oder schließlich, daß die unlösliche Form räumlich günstiger für die Absättigung anderer Nebenvalenzkräfte

(besonders der Phenylreste) ist. Bei der beträchtlichen Molekelgröße, die diese Polypeptide zweifellos besitzen, ist natürlich nur eine verhältnismäßig geringe intermolekulare Vernetzung durch Wasserstoffbrücken notwendig, um das Polypeptid unlöslich zu machen. Da wir nicht wissen, wie groß diese Vernetzung bei dem hier behandelten Polypeptid war, sind auch irgendwelche quantitativen Schlüsse aus den erhaltenen Zahlen nicht möglich.

Interessante Schlußfolgerungen ergeben sich, wenn man die ebenfalls gemessenen Verbrennungswärmen des Phenylalanins und des Sarkosins mit einbezieht. Das Phenylalanin wurde bereits 1904 von *Fischer* und *Wrede*⁶ verbrannt, die im Mittel 6752,4 cal/g fanden. Dieser Wert ist um etwa 0,37% höher als der von uns gefundene Wert. Ähnliche Unterschiede ergeben sich auch bei der von *Fischer* und *Wrede* ebenfalls verbrannten Benzoesäure. Dies dürfte hauptsächlich darauf zurückzuführen sein, daß bei *Fischer* und *Wrede* der Umrechnungsfaktor von Watt/sec in cal gegenüber dem heute anerkannten Wert um etwa 0,43% zu tief liegt. Das Sarkosin wurde schon 1891 von *Stohmann* und *Langbein*⁷ verbrannt, die im Mittel 4505,9 cal/g fanden. Auch dieser Wert liegt gegenüber dem von uns gefundenen zu hoch.

Die hypothetische Reaktion von festem Phenylalanin zu festem Polypeptid und flüssigem Wasser ist beträchtlich exotherm. Die entsprechende Reaktion beim Sarkosin ist praktisch thermoneutral. Das steht in einem bemerkenswerten Gegensatz zu der von *Wrede*⁸ bei den niedrigmolekularen Glycylpolypeptiden gefundenen Zahlen, nämlich



Diese Werte sind mit dem heute gültigen Umrechnungsfaktor von Watt/sec in cal und Molgewichten berechnet. Glycin und Glycylglycin wurden neuerdings wieder von *Huffman* und Mitarbeitern^{9,10} verbrannt. Aus ihren Zahlen ergibt sich für die erste der oben angeführten Reaktionen $\Delta H = + 6,2$ kcal, ein zwar kleinerer, aber immer noch endothermer Wert. Auch für andere Peptidbildungen mit der Aminogruppe des Glycins erhält *Huffman* ähnliche Werte, für Alanylglycin $\Delta H = + 6,8$ kcal und für Leucylglycin $\Delta H = + 5,6$ kcal.

⁶ *E. Fischer* und *F. Wrede*, Berliner Sitzungsber. 1904, 687.

⁷ *F. Stohmann* und *H. Langbein*, J. prakt. Chem. (2) 44, 336 (1891).

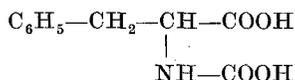
⁸ *F. Wrede*, Z. physik. Chem. 75, 81 (1911).

⁹ *H. M. Huffman*, *S. W. Fox* und *E. L. Ellis*, J. Amer. chem. Soc. 59, 2144 (1937).

¹⁰ *H. M. Huffman*, J. physic. Chem. 46, 885 (1942).

Man muß aus unseren Ergebnissen den Schluß ziehen, daß die Energiebilanz der Peptidbildung offenbar sehr von der Natur der Aminosäure abhängig ist. Bei geeigneten Komponenten ist auch die Bildung hochmolekularer Peptide aus den Aminosäuren selbst eine thermodynamisch mögliche Reaktion. Dieses Ergebnis ist vielleicht für die Diskussion der Bildungsmöglichkeiten von Eiweißkörpern nicht ohne Interesse, denn bisher wurde offenbar den diesbezüglichen Betrachtungen immer ein endothermer Verlauf der Peptidbildung zugrunde gelegt.

Bei der Bildung der Polypeptide aus N-carbonsäureanhydriden liegt es nahe, bei Start mit Wasser die intermediäre Bildung der N-Carbonsäure, z. B.



anzunehmen. Man kann auch bezüglich der energetischen Stellung dieser instabilen α -Amino-N-carbonsäuren eine Schätzung machen. Aus Tabelle 4 sieht man, daß sowohl für das Phenylalanin als auch das Sarkosin die Reaktion

N-Carbonsäureanhydrid (f) + H₂O (fl) → Aminosäure (f) + CO₂ (g)
mit etwa 4 kcal exotherm ist.

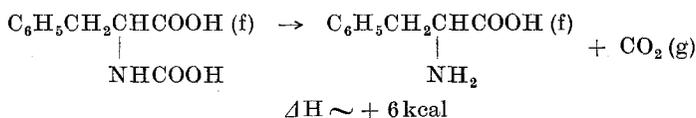
Aus den bekannten Hydratationsenthalpien von festen Säureanhydriden, offene^{4,5}:

Benzoessäureanhydrid . . .	— 10,8 kcal
o-Toluylsäureanhydrid . .	— 8,2 „
p-Toluylsäureanhydrid . .	— 9,4 „
Zimtsäureanhydrid	— 7,7 „

cyclische:

Bernsteinsäureanhydrid .	— 12,8 kcal,
--------------------------	--------------

kann man etwa mit einem Wert von — 10 kcal rechnen. Damit ergibt sich für die Reaktionen



und für



das heißt, es ist umgekehrt die Anlagerung von CO₂ an die Aminogruppe der beiden Aminosäuren ein energetisch möglicher Vorgang.

Im Hinblick auf die bekannte Instabilität der N-Carbonsäuren in Lösung ist dieser Befund bemerkenswert. Um die Abspaltung des CO₂ aus

der N-Carbonsäure wenigstens athermisch zu erhalten, müßte man für die Hydratationsenthalpie der N-Carbonsäureanhydride einen Wert von -4 kcal annehmen!

Es ist interessant, daß die obigen Zahlen auch aus der von uns gemessenen Verbrennungswärme des Phenylalanin-N-carbonsäuredimethylesters eine gute Stütze erhalten.

Wenn man in Betracht zieht, daß die Bildung der flüssigen Methylester aus den festen Säuren und flüssigem Methylalkohol meist eine schwach exotherme Reaktion ist und man etwa den für die Bildung des Bernsteinsäuredimethylesters bekannten Wert von $\Delta H = -3,0$ kcal hier verwendet, so erhält man für die Verbrennungsenthalpie der hypothetischen Phenylalanin-N-carbonsäure $\Delta H = -1107,6$ kcal/Mol und damit in naher Übereinstimmung mit den oben angegebenen Werten für die Hydratationsenthalpie $\Delta H = -8,5$ kcal/Mol und für die Anlagerung von CO_2 an Phenylalanin $\Delta H = -4,7$ kcal/Mol.

Zusammenfassung.

Es werden die Verbrennungswärmen von d-l-Phenylalanin, d-l-Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid, d-l-Phenylalanin-N-carbonsäuredimethylester, einem benzollöslichen und einem benzolunlöslichen Phenylalaninpolypeptid, Sarkosin, Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid und Sarkosinpolypeptid gemessen. Aus den Verbrennungsenthalpien werden die Reaktionsenthalpien für die Bildung hochmolekularer Polypeptide berechnet.