

Kinetik der Polypeptidbildung aus d,l-Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid.

Von

J. W. Breitenbach und K. Allinger.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 5 Abbildungen.

(Eingelangt am 17. Juli 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 8. Okt. 1953.)

Es wird die Geschwindigkeit der Kohlendioxydabspaltung aus d,l-Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid unter dem Einfluß von N-Äthylglycindiäthylamid und p-Chloranilin in Nitrobenzol- und Benzollösung gemessen. Das Kohlendioxyd wird nach Absorption in Natronlauge durch Leitfähigkeitsmessung quantitativ bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstanten für Start- und Wachstumsreaktion der Polypeptidbildung werden angegeben. An einigen der erhaltenen Polypeptide werden Endgruppenbestimmungen ausgeführt und ein Vergleich mit dem kinetisch zu erwartenden Endgruppengehalt durchgeführt.

Einleitung.

Von *Breitenbach* und *Richter*¹ wurden kinetische Versuche über die Bildung hochmolekularer Polypeptide aus Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid und Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid angestellt. Diese Versuche wurden in Nitrobenzol- und Benzollösung ohne sonstige wirksame Zusätze ausgeführt. Die Ergebnisse zeigten aber doch, daß auch in diesem Falle die Reaktion wahrscheinlich durch zufällig anwesende Substanzen eingeleitet wird, die imstande sind, mit der Anhydridgruppierung zu reagieren und das Anhydrid in einen Aminokörper überzuführen. Als solche Startsubstanzen kommen vor allem Amino- oder Hydroxylverbindungen in Frage. Formuliert für Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid und ein Amin R—NH₂ laufen also folgende Reaktionen ab²:

¹ J. W. Breitenbach und F. Richter, Makromol. Chem. 4, 262 (1950).

² R. B. Woodward und C. H. Schramm, J. Amer. Chem. Soc. 69, 1551 (1947).

gestellt⁶. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus absolutem Essigester-Petroläther, Schmp. 127° (Zers.) wurde es in kleinen Portionen im Hochvak. eingeschmolzen und so aufbewahrt. Es zeigte auch nach Monaten noch keinerlei Veränderungen, auch nicht im Verhalten bei den kinetischen Versuchen. Insbesondere blieb in den Einschmelzröhrchen das Hochvak. aufrecht, ein Zeichen, daß keine Polymerisation eingetreten ist.

Als Starter wurden N-Äthylglycindiäthylamid⁷, $C_2H_5 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot N(C_2H_5)_2$, und p-Chloranilin verwendet. Ersteres wurde unter Luftabschluß und Kühlung aufbewahrt. Sdp.₂₀ 113 bis 115°. Seine Reinheit wurde durch potentiometrische Titration überprüft. Dabei wurde die basische Dissoziationskonstante bei 26° zu $6 \cdot 10^{-6}$ bestimmt. Das trockene p-Chloranilin wurde durch Sublimation im Vak. gereinigt. Schmp. 70°.

Als Lösungsmittel wurden verwendet: Nitrobenzol, das über festem KOH einige Stdn. erhitzt und im Vak. destilliert wurde; p. A. Benzol, über Na. aufbewahrt. Brechungsindex des Nitrobenzols: $n_{5460}^{20} = 1,55842$.

Versuchsmethodik.

Das bei der Bildung der Polypeptide abgespaltene CO₂ wurde, wie erwähnt, durch einen inerten Gasstrom (hochgereinigter Stickstoff) aus dem Reaktionsgefäß in eine mit verd. Natronlauge gefüllte Leitfähigkeitszelle nach *Waugh*⁸ gespült und dort absorbiert. Aus dem Widerstand in einem bestimmten Zeitpunkt ließ sich das bis dahin entwickelte Gas bestimmen.

Die Leitfähigkeit wurde mit einer *Kohlrausch*-Brücke gemessen. Als Nullanzeiger diente ein Verstärkerröhrenvoltmeter für 50 Hz Wechselstrom mit Nullpunktanzeige durch ein Mikroamperemeter. Unter den gewählten Versuchsbedingungen (zirka 0,1 g Anhydrid Einwaage und 50 ccm 0,03876 n Natronlauge mit 1 Vol.-% n Butanol als Zellenfüllung) gestattete diese Anordnung den jeweiligen Umsatz auf 1/100 genau zu bestimmen.

⁶ Wir danken Herrn Prof. Dr. *F. Wessely* herzlich für die Überlassung des für die Synthese benötigten Phosgens.

⁷ Das N-Äthylglycindiäthylamid wurde uns von Herrn Dr. *E. Kvasnicka* überlassen, wofür wir ihm auch an dieser Stelle herzlich danken.

⁸ *J. G. Waugh*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. 9, 96 (1937).

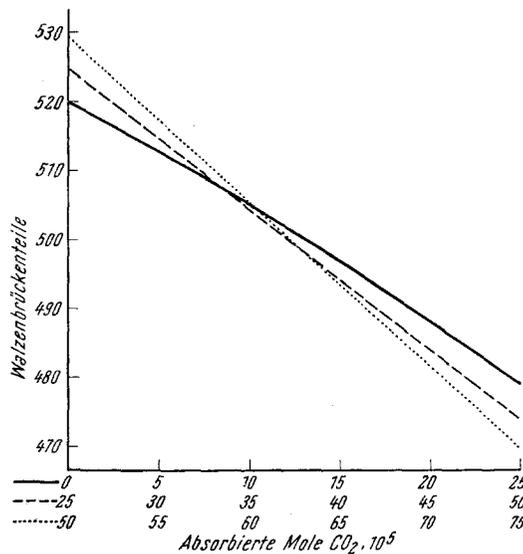


Abb. 1. Eichkurven für die CO₂-Bestimmung durch Leitfähigkeitsmessung.

Eine genaue Beschreibung der Versuchsmethodik findet sich in der Dissertation von K. Allinger⁹.

Die Eichung der Anordnung erfolgte in der Weise, daß in den Zersetzungskolben eine schwefelsaure Natriumoxalatlösung gebracht und gemessene Mengen einer gestellten Kaliumpermanganatlösung zugesetzt wurden; das entwickelte CO₂ wurde ebenso wie bei den Polymerisationsversuchen durch einen Stickstoffstrom in das Leitfähigkeitsgefäß übergetrieben. Es wird so für eine bestimmte Laugenfüllung der Zelle eine direkte Beziehung zwischen Widerstand und entwickelten Molen CO₂ erhalten.

Um immer im Gebiete optimaler Meßgenauigkeit zu bleiben, wurde mit drei verschiedenen Vergleichswiderständen gearbeitet; in Abb. 1 sind die drei Eichkurven wiedergegeben. Die Walzenbrücke war in 1000 Teile geteilt, die Vergleichswiderstände waren für 0 bis 25 · 10⁻⁵ Mole 50, für 25 · 10⁻⁵ bis 50 · 10⁻⁵ Mole 60 und für 50 · 10⁻⁵ bis 75 · 10⁻⁵ Mole 75 Ohm.

Tabelle 1. Polymerisation des d,l-Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrids (NCA) in Nitrobenzollösung.

Starter: N-Äthylglycin-diäthylamid.

a) Bei 30° C.

Versuch					
N 1			N 2		
Konzentration des Anhydrids Mol/l.....			38,74 · 10 ⁻³		
38,9 · 10 ⁻³			3,27 · 10 ⁻³		
Konzentration des Starters Mol/l.....			50,37 · 10 ⁻⁵		
0,783 · 10 ⁻³			38,74 · 10 ⁻³		
Gesamtmenge des Anhydrids Mole.....			3,27 · 10 ⁻³		
50,57 · 10 ⁻⁵			50,37 · 10 ⁻⁵		
Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole CO ₂ · 10 ⁵	Umsatz % d. NCA	Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole CO ₂ · 10 ⁵	Umsatz % d. NCA
0,167	1,2	2,4	0,417	8,9	17,7
0,333	2,0	4,0	0,5	10,4	20,6
0,5	2,9	5,8	0,75	13,3	26,4
1,0	5,1	10,1	1,0	16,15	32,1
1,5	7,0	13,9	2,5	30,0	59,6
2,0	8,5	16,9	3,0	32,4	64,4
3,5	13,4	26,6	3,5	34,9	69,4
5,5	19,3	38,3	4,0	36,85	73,2
19,5	40,6	80,4	4,5	38,5	76,5
21,0	41,65	82,5	11,5	46,1	91,6
22,0	42,4	83,6	21,0	46,55	92,5
68,5	48,3	95,7			
72,0	48,35	95,8			

⁹ K. Allinger, Dissertation Universität Wien (1953).

Versuch					
N 3			N 4		
Konzentration des Anhydrids Mol/l			32,98 · 10 ⁻³		
Konzentration des Starters Mol/l			9,72 · 10 ⁻³		
Gesamtmenge des Anhydrids Mole			49,47 · 10 ⁻⁵		
			37,86 · 10 ⁻³		
			0,5477 · 10 ⁻³		
			49,21 · 10 ⁻⁵		
Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole CO ₂ · 10 ⁵	Umsatz % d. NCA	Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole CO ₂ · 10 ⁵	Umsatz % d. NCA
0,167	15,0	30,3	0,333	1,0	2,0
0,333	21,8	44,0	1,0	2,55	5,2
0,500	26,3	53,1	2,0	5,0	10,2
0,667	29,5	59,6	4,0	9,5	19,3
0,833	31,8	64,2	6,0	13,9	28,3
1,0	33,8	68,2	18,0	32,5	66,1
1,5	37,7	76,1	21,5	35,7	72,8
2,0	39,9	80,6	68,0	47,6	97,0
3,0	41,35	83,5	70,0	47,8	97,4
4,0	41,75	84,3	72,0	47,8	97,4
			75,5	47,86	97,5
			91,0	48,3	98,2

Ergebnisse und Diskussion.

Versuche mit N-Äthylglycindiäthylamid in Nitrobenzol.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Geschwindigkeitsmessungen der CO₂-Abspaltung aus Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid in Nitrobenzollösung bei Zusatz von N-Äthylglycindiäthylamid zusammengestellt.

Lediglich in einem Falle (N 4) wurde eine CO₂-Menge erhalten, die einer fast völligen Umsetzung des Anhydrids nach den Reaktionen 1 und 2 entspricht. Wenn auch in einigen Fällen bei längerer Versuchsdauer eine merklich größere CO₂-Entwicklung zu erhalten gewesen wäre, so sieht man doch, daß immer im späteren Teil der Reaktion eine abnorme Verlangsamung eintritt, wenn auch niemals ein völliger Stillstand zweifelsfrei beobachtet wurde. Zur Erklärung dieses Verhaltens könnte man annehmen, daß ein Teil des Anhydrids ohne CO₂-Abspaltung reagiert, etwa durch Umwandlung in ein Hydantoinderivat, wie das von *Wessely* und *John*¹⁰ bei der Zersetzung des Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrids mit Pyridin nachgewiesen wurde. Als mögliche Ursache für diese Umwandlung und damit die unvollständige Kohlendioxydabspaltung wurde dort schon eine teilweise Umlagerung des Anhydrids in das isomere Isocyanat diskutiert. Schon der Umstand, daß es nicht zu einem völligen

¹⁰ *F. Wessely* und *M. John*, Z. physiol. Chem. 170, 38 (1927).

Reaktionsstillstand kommt, macht aber das Auftreten solcher Nebenreaktionen in dem erforderlichen Ausmaß in unserem Falle unwahrscheinlich. Die Verlangsamung der Reaktion ist wahrscheinlich auf eine geringere Reaktionsfähigkeit der Peptide bei fortschreitender Reaktion zurückzuführen (vgl. S. 1117).

Die Versuche N 6, N 7 und N 8 zeigen, daß bei Änderung der Anhydridkonzentration auf das Vierfache bei konstant gehaltener Starterkonzentration der prozentuelle Umsatz am Anfang praktisch konstant

b) Bei 50° C.

Versuch					
N 5			N 6		
Konzentration des Anhydrids Mol/l			38,93 · 10 ⁻³		
Konzentration des Starters Mol/l			0,5477 · 10 ⁻³		
Gesamtmenge des Anhydrids Mole			50,62 · 10 ⁻⁵		
Konzentration des Anhydrids Mol/l	38,93 · 10 ⁻³		39,95 · 10 ⁻³		
Konzentration des Starters Mol/l	0,5477 · 10 ⁻³		3,668 · 10 ⁻³		
Gesamtmenge des Anhydrids Mole	50,62 · 10 ⁻⁵		51,94 · 10 ⁻⁵		
Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole CO ₂ · 10 ⁵	Umsatz % d. NCA	Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole CO ₂ · 10 ⁵	Umsatz % d. NCA
0,167	1,5	3,0	0,167	6,95	13,3
0,333	2,6	5,2	0,333	12,2	23,4
0,500	3,7	7,3	0,500	17,4	33,4
0,667	4,6	9,1	0,667	21,6	41,6
0,833	5,5	10,9	0,833	24,4	46,8
1,00	6,45	12,8	1,00	27,7	53,2
1,25	7,8	14,5	1,25	31,05	59,5
1,50	9,1	18,0	1,50	34,2	65,7
1,75	10,35	20,5	1,75	36,6	70,3
2,00	11,6	23,0	2,00	38,6	74,1
2,25	12,8	25,4	2,50	41,4	79,5
2,50	14,0	27,7	3,00	43,05	82,7
4,00	21,2	42,0	3,50	44,05	84,6
4,25	22,4	44,4	4,00	44,7	85,8
4,50	23,6	46,7	4,667	45,2	86,8
5,00	25,1	49,7			
5,5	26,9	53,3			
6,0	28,6	56,6			
6,5	30,0	59,4			
7,0	31,4	62,2			
8,0	33,85	67,0			
9,0	35,8	70,9			
10,0	37,4	74,1			
24,0	46,0	91,1			
28,0	46,4	91,9			
34,0	46,9	92,9			

Versuch					
N 7			N 8		
Konzentration des Anhydrids Mol/l			84,73 · 10 ⁻³		
19,59 · 10 ⁻³					
Konzentration des Starters Mol/l			3,643 · 10 ⁻³		
3,668 · 10 ⁻³					
Gesamtmenge des Anhydrids Mole			50,84 · 10 ⁻⁵		
50,94 · 10 ⁻⁵					
Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole CO ₂ · 10 ⁵	Umsatz % d. NCA	Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole CO ₂ · 10 ⁵	Umsatz % d. NCA
0,083	3,8	7,5	0,167	6,5	12,8
0,167	6,8	13,4	0,333	12,4	24,4
0,333	11,8	23,2	0,500	17,8	35,1
0,500	16,05	31,6	0,667	21,5	42,4
0,667	19,0	37,4	0,833	25,65	50,5
0,833	22,2	43,7	1,00	28,4	55,9
1,00	25,4	50,0	1,25	32,75	64,5
1,25	28,5	56,1	1,50	35,6	70,1
1,50	30,15	59,4	1,75	38,5	75,8
2,0	34,7	68,3	2,0	40,05	78,9
2,5	37,7	74,2	2,5	42,4	83,5
3,0	39,4	77,6	3,0	43,5	85,7
3,5	40,35	79,5	3,5	44,0	86,7
4,0	41,0	80,7	4,0	44,2	87,1
20,0	43,1	84,6	18,5	44,9	88,4

bleibt; die Reaktion ist daher in bezug auf das Anhydrid von erster Ordnung. Im späteren Verlaufe tritt eine kleine Abweichung auf; es ist für die Konzentration des Anhydrids *c* die Halbwertszeit:

$$\begin{aligned}
 c = 0,0196 \text{ Mol/l} & \dots\dots\dots 1 \text{ Std.}, \\
 0,0400 & \text{ ,, } \dots\dots\dots 0,92 \text{ Stdn.}, \\
 0,0847 & \text{ ,, } \dots\dots\dots 0,83 \text{ ,, } .
 \end{aligned}$$

Diese kleinen Abweichungen führen wir auch auf sekundäre Störungen des Verlaufes nach erster Ordnung zurück.

Ein Vergleich von Versuch N 5 und N 6 zeigt, daß bei einer Erhöhung der Starterkonzentration auf das 6,7fache die Reaktionsdauer, nach der ein gleicher Umsatz erreicht ist, auch auf 1/6,7 abnimmt, was auch erste Ordnung in bezug auf die Starterkonzentration bedeutet.

In Abb. 2 ist der Reaktionsverlauf logarithmisch dargestellt. Man sieht (Versuche N 5, N 6 und N 8), daß der Reaktionsverlauf über einen großen Teil des Umsatzes der ersten Ordnung gehorcht; erst im späteren Verlaufe tritt die schon erwähnte Verlangsamung ein.

Kinetik: Nach dem oben angegebenen Reaktionsmechanismus setzt sich der gemessene Anhydridumsatz aus zwei Reaktionsgeschwindigkeiten zusammen¹¹:

$$-\frac{dc_A}{dt} = k_1 \cdot c_A \cdot c_S + k_2 \cdot c_A \cdot (c_{S0} - c_S),$$

(c_A = Konzentration des Anhydrids, c_S = Konzentration des Starters, c_{S0} = Anfangskonzentration des Starters, c_{A0} = Anfangskonzentration des Anhydrids), daneben gilt noch für c_S

$$-\frac{dc_S}{dt} = k_1 \cdot c_A \cdot c_S.$$

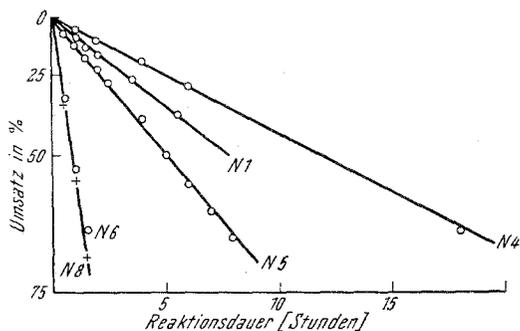


Abb. 2. Reaktionsverlauf nach erster Ordnung.

Ein strenger Verlauf nach erster Ordnung ergibt sich aus diesem Ansatz nur, wenn

$$k_1 = k_2.$$

Die Versuchsergebnisse zeigen daher, daß sich bei Start mit N-Äthylglycindiäthylamid k_1 und k_2 zumindest nicht größenordnungsmäßig voneinander unterscheiden.

Eine einfache Integration der Differentialgleichung zur Ermittlung der Zeitabhängigkeit von c_A ist nicht möglich, wohl aber erhält man eine einfache Integralbeziehung zwischen c_A und c_S von der Form

$$\frac{c_{A0}}{c_{S0}} \cdot \left(1 - \frac{c_A}{c_{A0}}\right) = \frac{k_2}{k_1} \cdot \ln \frac{c_{S0}}{c_S} - \left(\frac{k_2}{k_1} - 1\right) \cdot \left(1 - \frac{c_S}{c_{S0}}\right),$$

$$\frac{c_A}{c_{A0}} = 1 - \frac{c_{S0}}{c_{A0}} \cdot \left[\frac{k_2}{k_1} \cdot \ln \frac{c_{S0}}{c_S} - \left(\frac{k_2}{k_1} - 1\right) \cdot \left(1 - \frac{c_S}{c_{S0}}\right) \right],$$

für $k_1 = k_2$

$$\frac{c_A}{c_{A0}} = 1 - \frac{c_{S0}}{c_{A0}} \cdot \ln \frac{c_{S0}}{c_S}.$$

Nach dieser Beziehung ist für $k_1 = k_2$ 90% Starterumsatz schon erreicht für einen Anhydridumsatz bei N 5 von 3,2%, bei N 8 von 10% und bei N 6 von 21%. Ist k_2 kleiner als k_1 , dann werden die Zahlen für den Anhydridumsatz noch kleiner, im umgekehrten Falle größer, z. B. für $k_2/k_1 = 2$ bei Versuch N 8 16% anstatt 10%. Für den größten Teil des bei diesen Versuchen beobachteten Verlaufes erster Ordnung

¹¹ S. G. Waley und J. Watson, J. Amer. Chem. Soc. 70, 2299 (1948).

ist daher die Konzentration des freien Starters klein gegen die Konzentration der wachsenden Peptidketten und man kann die gemessene Geschwindigkeitskonstante mit der der Wachstumsreaktion der Polypeptidkette gleichsetzen. Ihr Wert ergibt sich aus den Versuchen N 5 und N 6 im Mittel zu 226. Bei Versuch N 7, mit dem größten Verhältnis c_{So}/c_{Ao} , ist die Geschwindigkeit am Anfang größer, als es diesem Wert der Geschwindigkeitskonstante entspricht. Das spricht dafür, daß k_1 größer ist als k_2 , da ja ein meßbarer Einfluß eines solchen Größenunterschiedes am ehesten bei dem größten Verhältnis c_{So}/c_{Ao} sich bemerkbar machen muß. Der Effekt ist aber zu klein, um daraus quantitative Schlüsse auf k_1 zu ziehen. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird hier bei hohen Starterkonzentrationen schon zu groß; wir haben daher bei einer niedrigeren Temperatur einen entsprechenden Versuch ausgeführt.

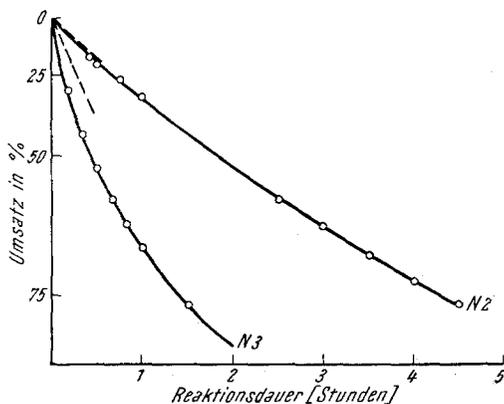


Abb. 3. Abweichung von der ersten Ordnung bei großem Starter-Anhydridverhältnis.

Betrachten wir bei 30° zunächst die Versuche N 1 und N 4 mit kleinem Molverhältnis Starter zu Anhydrid (Abb. 2). Sie verlaufen ebenfalls bis mindestens 70% Umsatz nach erster Ordnung und gestatten daher, die Geschwindigkeitskonstante k_2 zu berechnen; es werden die Werte 109 und 115, im Mittel 112, erhalten.

Bei einem Starter-Anhydridverhältnis von etwa 0,1 (Versuch N 2) ist am Anfang schon eine etwas größere Reaktionsgeschwindigkeit vorhanden; beim Wert 0,3 (Versuch N 3) ist die Geschwindigkeitserhöhung so deutlich (Abb. 3), daß man versuchen kann, daraus zu einer Abschätzung von k_1 zu gelangen. Die Reaktion verläuft allerdings auch hier schon so rasch, daß der erste gemessene Umsatz (nach 10 Min. Reaktionsdauer) schon 30% beträgt. Diese Geschwindigkeit läßt sich mit k_2/k_1 etwa 0,5 quantitativ wiedergeben. Das bedeutet, daß bei 30° die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen Starter und Anhydrid etwa doppelt so groß ist als zwischen wachsender Kette und Anhydrid. Die Werte für k_2 bei 30 und 50° entsprechen der Arrhenius-Gleichung

$$k_2 = 2,97 \cdot 10^3 \cdot e^{-6940/RT} \text{ Lit. Mol}^{-1} \cdot \text{sec.}^{-1}.$$

Versuche in Benzollösung.

Mit dem gleichen Starter wurden auch einige Versuche bei 30° in Benzollösung angestellt (Abb. 4). Aus verschiedenen Ursachen (besonders die größere Flüchtigkeit des Benzols ist für unsere Meßmethode ungünstig) haben diese Versuche nicht die gleiche Genauigkeit wie die in Nitrobenzol.

Auch hier kommt es bei höheren Umsätzen immer zu einer starken Verlangsamung der Reaktion, so daß niemals eine 100%ige CO₂-Abspaltung beobachtet wurde.

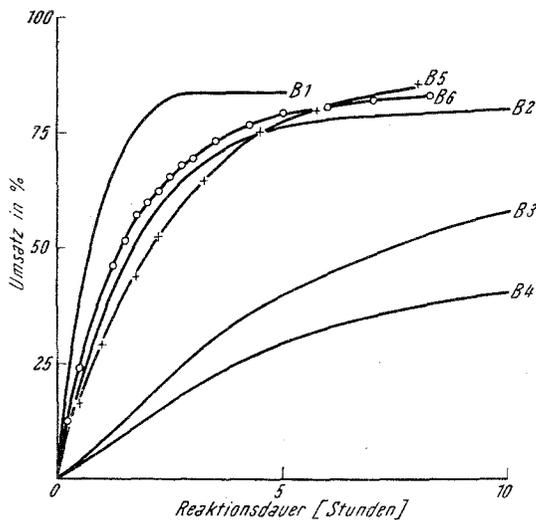


Abb. 4. Polypeptidbildung in Benzollösung.

Vers. Nr.	Konzentration des Anhydrids	Konzentration des Starters
B 1	$16,45 \cdot 10^{-3}$ Mol/l	$6,99 \cdot 10^{-3}$ Mol/l
B 2	$17,23 \cdot 10^{-3}$ „	$2,795 \cdot 10^{-3}$ „
B 3	$18,37 \cdot 10^{-3}$ „	$0,932 \cdot 10^{-3}$ „
B 4	$17,50 \cdot 10^{-3}$ „	$0,466 \cdot 10^{-3}$ „
B 5	$10,47 \cdot 10^{-3}$ „	$2,886 \cdot 10^{-3}$ „
B 6	$30,62 \cdot 10^{-3}$ „	$2,886 \cdot 10^{-3}$ „

Auch sonst sind die Verhältnisse den in Nitrobenzol angetroffenen im allgemeinen recht ähnlich, wenn auch die Streuungen größer sind. Versuch B 3 und B 4 geben für k_2 die Werte 109 und 152. Trotz der offensichtlichen Ungenauigkeit kann man wohl schließen, daß auch quantitativ ziemliche Übereinstimmung mit den Versuchen in Nitrobenzol besteht. Versuche mit einem großen Starter-Anhydridverhältnis (Versuche B 1 und B 5) zeigen allerdings hier keine wesentliche Erhöhung der Anfangsgeschwindigkeit, so daß vielleicht k_2/k_1 näher bei eins liegt.

Versuche mit *p*-Chloranilin in Nitrobenzol.

Ein charakteristisch andersartiges Verhalten der Umsatzgeschwindigkeit, nämlich eine autokatalytische Geschwindigkeitszunahme bei niedrigen Umsätzen, ist zu erwarten, sobald k_1 klein gegen k_2 wird¹². Das ist der Fall bei Systemen, denen keine besondere Startsubstanz zugesetzt wurde und bei denen wahrscheinlich geringe Wassermengen, die dem hygroskopischen Anhydrid anhaften, die Rolle des Starters übernehmen. Um an einem definierten Starter dieses Verhalten einwandfrei messen zu können, ist es notwendig, eine Substanz zu verwenden, deren k_1

¹² Vgl. H. Dostal und H. Mark, Z. physikal. Chem., Abt. B 29, 299 (1935).

zwar klein gegen k_2 , aber doch groß gegen die Geschwindigkeitskonstante des Wassers ist, um von unvermeidlichen Wasserspuren möglichst wenig gestört zu werden. Nimmt man die Basizität der Substanzen als ein ungefähres Maß für ihre kinetische Wirksamkeit, dann ist es wahrscheinlich, daß aromatische Amine etwa geeignete Startgeschwindigkeiten hervorrufen werden; wir haben daher p-Chloranilin verwendet, das dieser Erwartung voll entsprochen hat (Tabelle 2).

Kinetik: Eine einfache Auswertung der Versuche mit p-Chloranilin ist möglich unter der Annahme, daß die Starterkonzentration während der Versuchsdauer praktisch konstant bleibt und der durch Reaktion 1 bewirkte Anhydridumsatz neben dem nach Reaktion 2 vernachlässigt werden kann. Aus den Ansätzen

$$-\frac{dc_A}{dt} = k_2 \cdot c_A \cdot (c_{S_0} - c_S),$$

$$-\frac{dc_S}{dt} = k_1 \cdot c_A \cdot c_{S_0}$$

folgt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit v vom Beginn an zunimmt und nach einem Umsatz von ein Drittel des Anhydrids einen Maximalwert v_{\max} (in der Zeiteinheit umgesetzte Bruchteile) erreicht, der gegeben ist durch

$$v_{\max}^2 = \frac{8}{27} \cdot c_{A_0} \cdot c_{S_0} \cdot k_1 \cdot k_2.$$

Die Lage der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit stimmt bei den Versuchen N 9, N 10 und N 11 mit der theoretisch geforderten überein (Abb. 5), ein Beweis, daß die gemachte Voraussetzung, geringer Starterumsatz, zutrifft. Zur Berechnung von $k_1 \cdot k_2$ aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit soll Versuch N 11 mit der höchsten Starterkonzentration herangezogen werden, da hier die Gefahr der Verfälschung durch störende Verunreinigungen am geringsten ist. Die Maximalgeschwindigkeit beträgt 13,5%/Std. und damit ist

$$k_1 \cdot k_2 = 8.$$

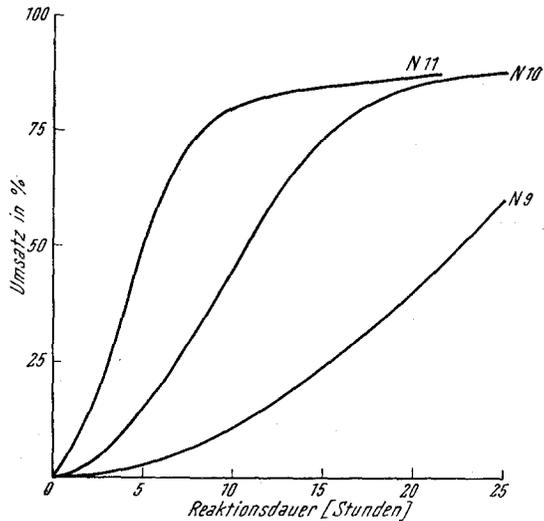


Abb. 5. Reaktionsstart mit p-Chloranilin im Nitrobenzol bei 50° C.

Mit dem oben erhaltenen Wert für k_2 ist dann

$$k_1 = 0,036$$

und

$$k_2/k_1 = 6000.$$

Tabelle 2. Polymerisation des d,l-Phenylalanin-N-carbonsäure-anhydrids (NCA) in Nitrobenzollösung bei 50° C.
Starter: p-Chloranilin.

Versuch					
N 9			N 10		
Konzentration des Anhydrids Mol/l			38,5 · 10 ⁻³		
Konzentration des Starters Mol/l			3,8 · 10 ⁻³		
Gesamtmenge des Anhydrids Mole			50,05 · 10 ⁻⁵		
Konzentration des Anhydrids Mol/l	38,5 · 10 ⁻³		Konzentration des Starters Mol/l	3,8 · 10 ⁻³	
Gesamtmenge des Anhydrids Mole			50,05 · 10 ⁻⁵		
Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole CO ₂ · 10 ⁵	Umsatz % d. NCA	Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole CO ₂ · 10 ⁵	Umsatz % d. NCA
2,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0
3,0	0,2	0,4	1,0	0,3	0,6
3,5	0,45	0,9	1,5	0,65	1,25
4,0	0,7	1,4	2,0	1,3	2,5
4,5	0,95	1,9	2,5	2,1	4,0
5,5	1,45	2,9	3,0	3,2	6,2
6,5	2,1	4,2	4,25	5,9	11,5
8,5	3,75	7,5	4,5	6,3	12,2
9,5	4,5	9,0	5,0	7,5	14,6
22,5	25,0	50,0	5,5	8,9	17,3
23,5	27,1	54,2	6,5	11,4	22,2
24,5	29,0	58,0	7,0	12,8	24,9
25,5	30,6	61,2	7,5	14,7	28,5
27,0	33,15	66,3	8,0	16,2	31,4
28,5	35,15	70,3	8,5	18,2	35,3
30,0	37,0	74,0	9,0	19,8	38,4
33,2	40,1	80,2	9,5	21,5	41,8
47,0	46,0	92,0	10,5	25,0	48,5
124,0	46,6	93,2	11,5	28,4	55,1
195,0	47,0	94,0	12,5	32,0	62,1
			23,5	45,0	87,3
			24,0	45,0	87,3
			26,5	45,2	87,65
			33,0	45,3	87,8
			48,0	45,3	87,8

Versuch N 10, bei dem die Konzentration des p-Chloranilins nur ein Fünftel der von Versuch N 11 beträgt, liefert ziemlich übereinstimmende Werte, nämlich

$$k_1 \cdot k_2 = 9,7,$$

$$k_1 = 0,043,$$

$$k_2/k_1 = 5300.$$

Bei Versuch Nr. 9 mit $1/50$ der Starterkonzentration von Versuch N 11 ist allerdings die Abweichung beträchtlich. Es würde sich ein $k_1 = 0,16$ ergeben; wahrscheinlich ist diese zu große Geschwindigkeit durch geringe Mengen von Verunreinigungen bedingt.

Einige orientierende Versuche mit p-Chloranilin in Benzol-lösung zeigten dort prinzipiell gleichartige Verhältnisse.

Durch den experimentellen Nachweis, daß je nach der chemischen Natur des Starters ein ganz verschiedenartiger Reaktionsverlauf zu erreichen ist, hat der eingangs diskutierte Reaktionsmechanismus eine wichtige Stütze erhalten; insbesondere sind wohl die mit p-Chloranilin erhaltenen autokatalytischen Reaktionsverläufe in dieser Hinsicht überzeugend. Die früher ohne besonderen Starterzusatz erhaltenen Ergebnisse lassen sich offenbar alle als Startwirkungen von Wasserspuren deuten, da ja niemals eine Berührung des Anhydrids mit der Luftfeuchtigkeit (bei der Einwaage usw.) völlig vermieden wurde.

Versuch N 11		
Konzentration des Anhydrids Mol/l.....		$39,71 \cdot 10^{-3}$
Konzentration des Starters Mol/l.....		$193,4 \cdot 10^{-3}$
Gesamtmenge des Anhydrids Mole		$51,62 \cdot 10^{-5}$
Reaktionsdauer Stdn.	Entwickelte Mole $\text{CO}_2 \cdot 10^3$	Umsatz % d. NCA
0,5	1,5	2,9
1,0	3,5	6,8
1,5	5,3	10,3
2,0	7,1	13,8
2,5	10,3	20,0
3,0	13,5	26,2
3,5	16,0	31,1
4,0	19,5	37,8
4,5	22,7	44,0
5,0	25,5	49,5
5,5	28,4	55,1
6,0	31,2	60,6
6,5	33,5	65,0
7,0	35,25	68,4
7,5	36,8	71,4
8,0	38,25	75,1
8,5	39,5	76,6
21,5	45,0	87,2

Endgruppen und mittlerer Polymerisationsgrad.

Nach dem diskutierten Reaktionsmechanismus sollte beim Start mit N-Äthylglycindiäthylamid, das ja praktisch vollständig umgesetzt wird, der mittlere Polymerisationsgrad der am Ende der Reaktion vorhandenen Polypeptide gleich dem Molverhältnis Anhydrid zu Starter sein. Da bei der Reaktion die sekundäre Aminogruppe des Starters verschwindet und dafür eine primäre Aminogruppe an der Polypeptid-

kette entsteht, kann eine Endgruppenbestimmung nach *van Slyke* durchgeführt werden¹³.

Die experimentell ermittelten Amino-Stickstoffwerte zeigen die erwartete Abhängigkeit vom Anhydrid-Starterverhältnis, allerdings liegen sie durchwegs etwas höher als berechnet. Für diese Differenz besteht eine plausible Erklärungsmöglichkeit, wenn man bedenkt, daß in keinem Fall eine vollständige Umsetzung des Anhydrids beobachtet wurde

Tabelle 3. Endgruppenbestimmung nach *van Slyke*.

Versuch	Molverhältnis Anhydrid/ Starter	Anhydrid- umsatz %	Aminostickstoff (primär)	
			ber.	gef.
N 5	71,2	93,1	0,14	0,20
N 1	49,7	95,5	0,20	0,28
B 3	19,7	79,5	0,57	0,99
N 6	10,9	88,0	0,89	1,29
N 3	3,4	84,7	2,41	2,97

und daher ein mit dem Polymeren ausgefalltes Anhydrid die Quelle für den zusätzlichen Aminostickstoff sein kann. Es ergibt damit auch die Endgruppenbestimmung keinen Widerspruch zu dem angenommenen Reaktionsmechanismus.

Es erscheint daher auch gerechtfertigt, für die Endprodukte der mit p-Chloranilin angeregten Polypeptidbildung aus den kinetischen Größen mittlere Molgewichte zu berechnen. Nach den kinetischen Ansätzen von S. 1113 ist dieser mittlere Polymerisationsgrad \bar{P} :

$$\bar{P} = \sqrt{\frac{1}{2} \cdot \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{c_{A_0} - c_A}{c_{S_0}}}$$

Das ergibt für N 9 $\bar{P} = 82$, für N 10 $\bar{P} = 48$ und für N 11 $\bar{P} = 23$.

Bemerkenswert ist der Endgruppengehalt, der an einem Phenylalaninpolypeptid ermittelt wurde, das durch Polymerisation in Benzollösung ohne Starterzusatz bei 70° durch 14 Stdn. erhalten wurde. Das Anhydrid wurde hier vor der Polymerisation im Hochvak. getrocknet und dann Benzol über Natrium im Hochvak. dazu destilliert. Trotzdem enthielt das Polypeptid 0,14% Aminostickstoff, was als Endgruppe gerechnet, einem mittleren Molgewicht von 9800 entspricht, wobei es nach den Ergebnissen der gestarteten Polymerisation möglich erscheint, daß das mittlere Molgewicht in Wirklichkeit etwa um höchstens 40% höher liegt.

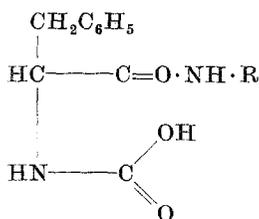
Dieses Polypeptid ergab in Benzollösung bei einer Konzentration von 1 g/l eine reduzierte spezifische Viskosität von 0,23. Für ein ähnliches Peptid mit $\eta_{sp}/c = 0,18$ hatten wir früher aus osmotischen Messungen in Benzollösung auf ein Molgewicht von 670000 geschlossen¹. Es ist aber

¹³ Die Analysen wurden von Herrn Dr. G. Kainz ausgeführt, wofür wir ihm herzlich danken. Vgl. G. Kainz, Mikrochim. Acta (Wien), im Druck.

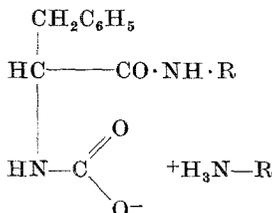
nach den hier mitgeteilten Ergebnissen klar, daß in Benzollösung das Polypeptid nicht molekulardispers vorliegt und daß der geringe gemessene osmotische Druck auf Aggregation zurückzuführen ist. Das ermittelte osmotische Molgewicht gibt also nur ein Maß für die Stärke der Aggregation. Bemerkenswert ist, daß, während die Aggregation in Benzollösung zu Systemen mit hoher Viskosität führt, in Nitrobenzol Aggregate entstehen, die eine viel geringere Viskositätserhöhung verursachen, obwohl es sich, wie die starke Lichtstreuung der Nitrobenzollösung zeigt, ebenfalls um sehr große Aggregate handelt¹⁴.

Diese Beobachtung liefert vielleicht eine Erklärung für die auffällige Geschwindigkeitsabnahme bei höheren Umsätzen. Aus der verhältnismäßig geringen Viskositätserhöhung, verbunden mit einer sehr großen Trübung, muß man schließen, daß die Peptidketten im Nitrobenzol zu verhältnismäßig kompakten, sehr großen Teilchen aggregieren. Diese Aggregation wird mit zunehmender Reaktionsdauer immer mehr in Erscheinung treten und dazu führen, daß ein großer Teil der endständigen Aminogruppen nicht mehr mit Anhydrid reagieren kann.

Es ist natürlich auch möglich, daß das CO_2 -Defizit nicht durch nicht umgesetztes Anhydrid verursacht wird, sondern ein entsprechender Teil des Anhydrids ohne Abspaltung von CO_2 reagiert. Wenn man annimmt, daß intermediär die freie N-Carbonsäure:



entsteht, so kann diese ihr Proton anstatt an die eigene Aminogruppe, was zur CO_2 -Abspaltung führt, auch an die endständige Aminogruppe einer anderen Peptidkette abgeben, was zu einer Stabilisierung führen würde:



¹⁴ Über Viskositäts- und Lichtstreuungsmessungen der Lösungen von Phenylalaninpolypeptiden werden wir später ausführlich berichten.

Eine Reaktion zwischen der freien N-Carbonsäure und der endständigen Aminogruppe einer Peptidkette könnte auch unter Wasserabspaltung zur Amidbildung und damit zur Entstehung von Ketten, die eine Harnstoffgruppierung enthalten, führen. Man muß immerhin berücksichtigen, daß in einzelnen Fällen (z. B. Versuch N 10) doch am Ende des Versuches ein praktisch völliger Reaktionsstillstand beobachtet wurde. In diesem Falle wurden nur 88% des theoretisch möglichen Kohlendioxyds abgespalten. Das völlige Aufhören der CO₂-Entwicklung macht es unwahrscheinlich, daß noch 12% des Anhydrids unverändert vorhanden sind. Beim gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse ist es aber verfrüht, den Einfluß solcher Reaktionen auf die Kinetik des Prozesses eingehender zu diskutieren.

Wir haben die angenehme Pflicht, der *van 't Hoff-Stiftung* für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit zu danken.