

Einwirkung des Phosgens eintritt oder erst beim späteren Eindampfen der Reaktionslösung, ist bisher nicht geklärt.

Es zeigte sich, daß die Zeiten, die vom Beginn der Phosgeneinwirkung (bei 40 bis 45°) bis zum Klarwerden der Suspension verstreichen („Dauer der Reaktion“) von der Struktur der Seitenkette am α -C-Atom der Aminosäure in charakteristischer Weise abhängen (Tab. 1).

Tabelle 1
Umsetzung von Aminosäuren in Dioxan-Suspension mit Phosgen

<i>α-Aminosäure</i>	<i>Dauer der Reaktion</i>
Glycin	nach 6 Stdn. Umsetzung ca. 50%
DL-Alanin	190 Min.
DL- α -Aminobuttersäure	120 Min.
DL-Phenylalanin	100 Min.
DL-Norleucin	40 Min.
DL-Leucin	25 Min.
DL-Isoleucin	10 Min.
DL-Pseudoleucin	5–10 Min.

Derartige Versuche erfordern sehr reine Aminosäure-Präparate. Außer durch Temperatur, Konzentration, Geschwindigkeit des Gasstromes usw. wird die Dauer der Reaktion durch geringe Verunreinigungen stark beeinflusst. So wurde bei einem Ansatz mit leicht verunreinigtem Leucin eine Reaktionszeit von 150 Min. gemessen gegenüber 25 Min. bei einem hochgereinigten Leucinpräparat.

Durch Polymerisation bzw. Copolymerisation in Dioxan mit Wasser als Starter wurden aus den Oxazolid-2.5-dionen die Polypeptide gewonnen.

Die in Tabelle 1 aufgeführte Reihenfolge der Aminosäuren kehrt sich um, wenn man die Zeit beobachtet, die bei der durch Wasser gestarteten Polymerisation der Oxazolid-2.5-dione in Dioxan bis zum Auftreten der ersten unlöslichen Reaktionsprodukte verstreicht (Tab. 2).

Tabelle 2. Zeiten, die vom Beginn der Polymerisation bei 80° nach Zusatz von 0.1% Wasser bis zur ersten Trübung bzw. bis zur Ausflockung unlöslicher Reaktionsprodukte verstreichen.

<i>Polypeptid</i>	<i>Trübung</i>	<i>Flockung</i>
Poly-glycin	2 Min.	4 Min.
Poly-alanin	20 Min.	48 Min.
Poly-phenylalanin	40 Min.	keine Flockung
Poly- α -aminobuttersäure	48 Min.	—
Poly-norleucin	54 Min.	—

Durch Erhöhung der Konzentration des als Starter verwendeten Wassers kann der Bereich der Beobachtungen noch erweitert werden.

Bei der Poly- α -aminobuttersäure traten Flocken, erst 10 Min. nachdem die Konzentration des Wassers auf 0.5% erhöht worden war, auf, beim Norleucin 20 Min. nach der Erhöhung

des Wassergehaltes. Die Lösung des 4-tert.-Butyl-oxazolid-2.5-dions in 90-proz. wäßrigem Dioxan blieb auch nach 5stdg. Versuchsdauer noch klar. Erst 15 Min. nachdem der Wassergehalt auf 15% erhöht worden war, konnte eine sehr feine Trübung beobachtet werden, worauf eine Ausflockung bald folgte.

EIGENSCHAFTEN DER POLYPEPTIDE

Die Polypeptide werden als farblose voluminöse Niederschläge erhalten, die sich nur schwer filtrieren lassen. Nach dem Waschen und Trocknen bilden sie amorphe, vollständig geschmacklose Pulver. Von den untersuchten Substanzen bildet nur das Alanin in Wasser lösliche Polypeptide. Polyglycin ist in konz. Lithiumhalogenidlösung löslich, Poly- α -aminobuttersäure dagegen nicht. Bei den Diketopiperazinen finden sich ähnliche Verhältnisse. Das Glycinanhydrid ist in kaltem Wasser schwer löslich, Alaninanhydrid leicht; das Anhydrid der α -Aminobuttersäure ist sogar in heißem Wasser schwer löslich⁴⁾. Das Polyglycin nimmt unter den wasserunlöslichen Polypeptiden noch in anderer Hinsicht eine Sonderstellung ein. Es ist nämlich auch in Dichloressigsäure, in der alle anderen Polypeptide löslich sind und das Polypseudoleucin quellbar ist, fast unlöslich und unquellbar.

Durch *Copolymerisation* des 4-Methyloxazolid-2.5-dions mit einem LEUCHSSchen Körper, der allein polymerisiert ein wasserunlösliches Produkt ergibt, kann man wasserlösliche Polypeptide erhalten. Hierzu muß im Falle des Glycins und der α -Aminobuttersäure etwa die dreifache Menge Alanin einpolymerisiert sein. Beim Pseudoleucin erhält man selbst noch bei einem sechsfachen Überschuß an 4-Methyloxazolid-2.5-dion im Polymerisationsumsatz wasserunlösliche Polypeptide.

Die mittleren *Molekulargewichte* der Polypeptide wurden nach Rast unter Verwendung des Lactams der *cis*-Hexahydro-*p*-aminobenzoesäure, das VIRTANEN⁵⁾ zur Bestimmung des Molekulargewichts von Plastein herangezogen hatte, ermittelt. In diesem Lactam waren alle dargestellten Polypeptide mit Ausnahme des Polyglycins und Polypseudoleucins löslich. Wir fanden folgende mittleren Werte:

Poly-DL-alanin	400	Poly-DL-phenylalanin	850
Poly-DL- α -aminobuttersäure	700	Polyglycin/Alanin	950
Poly-DL-norleucin	1500	Polyalanin/ α -Aminobuttersäure	900

Der niedrige Wert für das Poly-DL-alanin ist auf eine Verunreinigung durch DL-Alanin zurückzuführen, das von dem wasserlöslichen Polypeptid nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Diese Werte sind untereinander in großem Umfange zwar vergleichbar, geben aber kein zutreffendes Bild der wirklichen Molekulargewichte, wie die nach der Endgruppenmethode bestimmten Molekulargewichte zeigen^{5a)}.

⁴⁾ K. RASKE in E. ABDERHALDEN, *Biochemisches Handlexikon*, Bd. 4, Springer, Berlin 1911, S. 218, 230, 234.

⁵⁾ A. I. VIRTANEN, *Makromolekulare Chem.* 6, 94 (1951).

^{5a)} vgl. II. Mitteilung, *Liebigs Ann. Chem.* 609, 224 (1957).

SAURE HYDROLYSE

Die Grundlage einer vergleichenden Verfolgung des Abbaus von synthetischen Polypeptiden ist die Beobachtung, daß höhere Polypeptide von einem bestimmten Polymerisationsgrad an auf dem Papierchromatogramm mit *Ninhydrin* nicht mehr anfärben sind. Beim Glycin liegt diese Grenze zwischen dem Hexapeptid und dem Nonapeptid, von dem das erstere auf dem Papierchromatogramm gerade noch, das letztere nicht mehr mit *Ninhydrin* sichtbar gemacht werden kann. Die beschriebenen Polypeptide erwiesen sich als hochmolekular genug, um diese Eigenschaft zu zeigen. Nur beim Polyalanin trat ein schwacher Alaninfleck auf. Es konnte jedoch ein von Alanin freies Copolymerisat aus Alanin und Glycin erhalten werden, durch dessen Hydrolyse die beim Vergleich von Polyalanin und Polyglycin auftretenden Unsicherheiten hinsichtlich der Hydrolysierbarkeit dieser beiden Polypeptide behoben werden konnten.

Die Hydrolyse eines Polypeptides, das selbst auf dem Papier nicht mit *Ninhydrin* reagiert, läßt sich am Auftreten der mit *Ninhydrin* anfärbenden Spaltprodukte zwar nicht quantitativ verfolgen, doch läßt die Methode eine Bestimmung der *Reihenfolge* zu, in der die untersuchten Polypeptide gegen die angewandte Säure immer widerstandsfähiger werden.

Es wurden Lösungen bzw. Suspensionen der Polypeptide in den hydrolysierenden Säuren hergestellt und im Brutschrank aufbewahrt. Von diesen Ansätzen haben wir serienweise Proben entnommen und jede Serie auf einem Papierchromatogramm untersucht. Bei dieser Methode erwies sich die von den früheren Bearbeitern als Nachteil empfundene geringere Hydrolysesgeschwindigkeit der Polypeptide als Vorzug, da auf diese Weise Bedingungen ermittelt werden konnten, unter denen bestimmte Polypeptide auch nach langen Zeiten keine mit *Ninhydrin* reagierenden Abbauprodukte ergaben, während andere sehr stark mit *Ninhydrin* reagierende Flecken lieferten (Tab. 3).

Die Hydrolyse mit $2n$ HCl bei 37° ergab eine wegen der Verunreinigung des Poly-DL-alanins mit Alanin nicht ganz eindeutige Bevorzugung des Polyglycinabbaues vor dem Abbau des Polyalanins. Unter diesen Bedingungen bleiben *Polynorleucin* und *Polypseudoleucin* selbst nach 8tägiger Hydrolyse im Rahmen der Aussagemöglichkeit der Methode *unangegriffen* (Tab. 3a). Dieses Ergebnis ist nicht auf die geringe Löslichkeit der Polypeptide des Norleucins und Pseudoleucins in $2n$ HCl zurückzuführen, denn in Dichloressigsäure, worin sich Polynorleucin klar löst, während Polyglycin darin fast unlöslich ist, erfolgt die Hydrolyse des letzteren zwar langsamer als mit $2n$ HCl, doch führt sie nach 50 Tagen zu einem an Glycin überladenen Chromatogramm; das Polynorleucin bildet in diesem Zeitraum auch in homogener Phase keine mit *Ninhydrin* reagierenden Abbauprodukte (Tab. 3b, vgl.

auch Tab. 3c). Bei einem Copolymerisat, das Glycin- und Alaninreste etwa im Verhältnis 1:3 enthielt und von Alanin frei war, wurde nach 26stdg. Hydrolyse unter den Bedingungen, mit denen die Ergebnisse der Tabelle 3c erhalten wurden, ein kräftiger Glycinfleck (+++) neben einem schwachen Alaninfleck (+) erhalten. Dem Polyglycin ist also eindeutig die größere Hydrolysesgeschwindigkeit zuzuordnen.

Tabelle 3
Papierchromatographische Verfolgung der sauren Hydrolyse synthetischer Polypeptide

a) Hydrolyse mit 2n HCl bei 37°					b) Dichloressigsäure bei 37°			
Zeit	Gly	Ala	nLeu	psLeu	Zeit	Gly	nLeu	
1 Stde.	(+)	+	—	—	1 Stde.	—	—	
16 Stdn.	+	+	—	—	26 Stdn.	(+)	—	
40 Stdn.	++	++	—	—	48 Stdn.	(+)	—	
64 Stdn.	+++	++	—	—	70 Stdn.	+	—	
5 Tage	+++	++	—	—	11 Tage	++	—	
					26 Tage	+++	—	
					50 Tage	++++	—	

c) Hydrolyse mit 9n HCl bei 37°					d) Dichloressigsäure + 9n HCl (2:1) bei 50°				
Zeit	Ala	Amb	nLeu	psLeu	Zeit	Amb	nLeu	PhAla	psLeu
1 Stde.	+	—	—	—	1 Stde.	—	—	—	—
16 Stdn.	++	(+)	—	—	28 Stdn.	+	—	+	—
40 Stdn.	+++	+	—	—	4 Tage	++	(+)	++	—
5 Tage	++++	++	—	—	8 Tage	+++	+++	+++	(+)
8 Tage	++++	+++	—	—	20 Tage	++++	+++	+++	+

Zeichenerklärung: — Chromatogramm weist keine mit Ninhydrin reagierenden Stellen auf

(+) sehr schwacher Fleck + schwacher, aber deutlich ausgebildeter Fleck ++ normaler Fleck
+++ starker Fleck ++++ überladenes Chromatogramm

Gly = Glykokoll, Ala = α -Alanin, nLeu = Norleucin, psLeu = Pseudoleucin, Amb = α -Aminobuttersäure, PhAla = Phenylalanin

Auch mit 9n Salzsäure sind Polynorleucin und Polypseudoleucin bei 37° nicht hydrolysierbar. Unter diesen Bedingungen konnte jedoch die größere Hydrolysesgeschwindigkeit von Polyalanin in homogenem System gegenüber Poly- α -aminobuttersäure in nicht homogenem System deutlich sichtbar gemacht werden (Tab. 3c).

Die Erzeugung niedermolekularer Abbauprodukte des Polynorleucins und des Polypseudoleucins gelang schließlich in homogener Phase mit Dichloressigsäure und 9n HCl bei 50°, wobei ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Isomeren zu beobachten war. Das Polypseudoleucin wird wesentlich langsamer abgebaut als das Polynorleucin (Tab. 3d) und erweist sich als ein gegen HCl sehr widerstandsfähiges Polypeptid. Der Versuch, die Verbindung mit 9n HCl im geschlossenen Rohr bei 160° (18 Stdn.) zu hydrolysieren, führte nicht einmal zu einer vollständigen Auflösung des Polypeptids, die beim Polynorleucin schon bei 110° glatt erfolgte.

Polyphenylalanin zeigte eine Hydrolysegeschwindigkeit in der Größenordnung der Poly- α -aminobuttersäure.

Beim Vergleich des mit Polyglycin erhaltenen Chromatogrammes mit denen der anderen Polypeptide fällt auf, daß nur bei jenem außer dem der freien Aminosäure zuzuordnenden Fleck noch weitere, mit Ninhydrin anfärbbare Substanzen zu beobachten sind. Es kann sich auf Grund ihrer Lage nur um Glycylpeptide handeln, deren Flecken in Butanol-Eisessig zwischen dem Glycinfleck und dem Startpunkt liegen. In den anderen Fällen lassen sich Zwischenprodukte der Hydrolyse auf den mit Ninhydrin angefärbten Papierchromatogrammen nicht mit Sicherheit nachweisen.

Das Auftreten papierchromatographisch beobachtbarer Zwischenprodukte bei der Hydrolyse des Polyglycins hat zwei Gründe: 1) Glycylpeptide lassen sich im Vergleich mit anderen Oligopeptiden mit Ninhydrin auf dem Papier leichter sichtbar machen. — 2) Die inneren Peptidbindungen des Polyglycins werden bevorzugt vor den äußeren gespalten^{5a)}.

ABSTUFUNG DER REAKTIONSGESCHWINDIGKEITEN

Auf Grund dieser Beobachtungen lassen sich die Polypeptide in nachstehender Reihenfolge steigender Widerstandsfähigkeit gegenüber der sauren Hydrolyse ordnen:

Polyglycin < Poly-DL-alanin < Poly-DL- α -aminobuttersäure \sim Poly-DL-phenylalanin
< Poly-DL-norleucin \ll Poly-DL-pseudoleucin

Die Oxazolid-dion-Ringe zeigen in Abhängigkeit von den ihnen zugrundeliegenden Aminosäuren folgende Reihe steigender Stabilität:

Glycin < DL-Alanin < DL-Phenylalanin \sim α -Aminobuttersäure < Norleucin \ll Pseudoleucin*)

Die Reihenfolge steigender Reaktionsgeschwindigkeit der entsprechenden Aminosäuren mit Phosgen lautet:

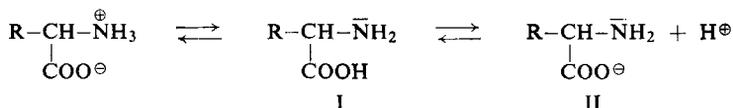
Glycin < DL-Alanin < DL- α -Aminobuttersäure \sim DL-Phenylalanin < DL-Norleucin
< DL-Leucin < DL-Isoleucin < DL-Pseudoleucin

Es handelt sich bei diesen Ergebnissen zunächst um qualitative Befunde. Da aber die Anordnung der Aminosäuren innerhalb der einzelnen Reihen mehrfach von verschiedenen Beobachtern und unter verschiedenen Reaktionsbedingungen reproduziert werden konnte und im Falle der Polymerisation der Oxazolid-2.5-dione sowie bei der Hydrolyse der Polypeptide die Reaktionsbedingungen mehrfach verschärft werden mußten, um einen Überblick über das Verhalten der untersuchten Aminosäuren zu erhalten, erscheinen uns die erhaltenen Ergebnisse für eine Diskussion tragfähig, in der eine Deutung der drei aufgefundenen Reihenfolgen unter einem einheitlichen Gesichtspunkt erfolgt.

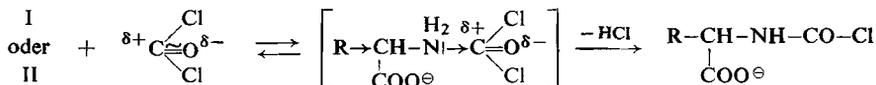
*) Anmerkung bei der Korrektur (26. 7. 1957): Während der Drucklegung erschien eine Veröffentlichung von P. D. BARTLETT und R. H. JONES, J. Amer. chem. Soc. 79, 2153 (1957), in der auf Grund kinetischer Messungen die oben aufgeführte Reihenfolge für die ersten beiden Glieder bestätigt wird.

DISKUSSION

Der erste Schritt der Reaktion der Aminosäuren mit Phosgen, der als geschwindigkeitsbestimmend angenommen wird, läßt sich als ein nucleophiler Angriff der Aminogruppe auf das C-Atom der Carbonylgruppe des Phosgens auffassen, wenn man annimmt, daß in der Dioxanlösung unter anderem folgendes Gleichgewicht besteht:



Zwischen der Addition eines Protons und einer COCl_2 -Molekel an die Aminogruppe der Formen I und II besteht eine Konkurrenz. Wegen der anschließenden irreversiblen HCl -Abspaltung aus dem Aminosäure- COCl_2 -Komplex wird das Gleichgewicht dauernd zur Seite des *N*-Carbonsäurechlorides verschoben:



Die Bildung des *N*-Carbonsäurechlorides geschieht dann umso leichter, je größer die Elektronendichte am Aminostickstoff und damit dessen nucleophile Eigenschaften sind. Berücksichtigt man die +I-Effekte der Aminosäureseitenketten, so erhält man die gefundene Abstufung der Reaktionsfähigkeit der Aminosäuren. Der sterische Einfluß der Seitenketten hat entgegengesetzte Wirkung. Bei der Ammonolyse von Estern mit verschiedenen Aminen, einer von GORDON, MILLER und DAY⁶⁾ und ARNETT, MILLER und DAY⁷⁾ untersuchten nucleophilen Reaktion der NH_2 -Gruppe, wird die Geschwindigkeit in der Hauptsache durch sterische Einflüsse bestimmt, die schon vom Äthylamin an einen beherrschenden Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit zeigen (Methylamin reagiert am schnellsten, tert.-Butylamin am langsamsten!). Eine Erklärung für das andersartige Verhalten der Aminosäuren sehen wir darin, daß bei den Reaktionen der NH_2 -Gruppe der Aminosäuren der sterische Einfluß der benachbarten COOH -Gruppe offensichtlich schon so groß ist, daß eine zusätzliche Wirkung der Seitenketten nicht mehr ins Gewicht fällt.

Die Feststellung von RICHARDSON⁸⁾ über die vorteilhafte Verwendung von Schwefeldioxyd bei der Darstellung der Oxazolid-2.5-dione konnte dahingehend ergänzt werden, daß durch Sättigen einer Glycinsuspension in Dioxan mit SO_2 vor dem Einleiten des Phosgens die

⁶⁾ M. GORDON, J. G. MILLER und A. R. DAY, J. Amer. chem. Soc. **70**, 1946 (1948).

⁷⁾ E. McC. ARNETT, J. G. MILLER und A. R. DAY, J. Amer. chem. Soc. **72**, 5635 (1950).

⁸⁾ Engl. Pat. 717045 v. 20. 10. 1954, Monsanto Chemical Co. (G. A. RICHARDSON) [C. A. **49**, 15951 (1955)].

Reaktionszeit abgekürzt wird. In einem Versuch mit SO_2 löste sich das Glycin schon nach 3 Stdn. auf, während ohne SO_2 nach 6 Stdn. erst die Hälfte des Glycins umgesetzt war. RICHARDSON führt die Rolle, die das SO_2 bei dieser Reaktion spielt, auf die Bildung eines Additionsproduktes zwischen SO_2 und der Aminosäure zurück. Da es uns nicht gelang, die Bildung eines derartigen Komplexes nachzuweisen, schlagen wir folgende Erklärung vor: Das Schwefeldioxyd als wasserähnliches Lösungsmittel erzeugt ein ionisierendes Medium, in welchem die Reaktion, in Analogie zur Ammonolyse der Ester⁷⁾, schneller verläuft als mit unpolaren Lösungsmitteln. Für diese Auffassung können wir inzwischen einen *weiteren experimentellen Befund* anführen: Wenn man die Umsetzung von Glycin mit Phosgen in Dioxan durchführt, dem man diejenige äquivalente Menge *Essigsäureanhydrid* zugesetzt hat, welche der Menge SO_2 entspricht, die sich unter den Reaktionsbedingungen im Dioxan löst, so verläuft die Reaktion mit nahezu der gleichen Geschwindigkeit wie bei Sättigung des Reaktionsansatzes mit SO_2 .

Man kann die Polymerisation der LEUCHSSchen Körper auf zwei Wegen bewirken: 1) *Hitze-polymerisation* der Oxazolid-2.5-dione im Hochvakuum. Man erhält ein Polymerisat unter CO_2 -Abspaltung. 2) *Lösungsmittelpolymerisation*. Die Oxazolid-2.5-dione werden in Lösung durch Zugabe eines Starters polymerisiert.

Über die Polymerisation der Oxazolid-2.5-dione durch Erhitzen ist nur wenig bekannt. O. BAYER⁹⁾ hat vorgeschlagen, daß der LEUCHSSche Körper durch CO_2 -Abspaltung zuerst in die Isocyanatfettsäure übergeht, die mit sich selbst unter Bildung des Polypeptids weiterreagiert. Die Endgruppen sollen durch Spuren H_2O gebildet werden. Dieser Chemismus ist jedoch noch nicht gesichert. Wie Versuche von HEYNS und BROCKMANN¹⁰⁾ über die thermische Polymerisation von mit ^{13}C markiertem Glycin-*N*-Carbonsäureanhydrid beweisen, stammt das abgespaltene CO_2 ausschließlich von dem C-2-Atom des Oxazolidinringes.

Die Polymerisation in Lösungsmitteln als der übliche Weg zur Darstellung von polymeren Peptiden wurde in der letzten Zeit auch in unserem Arbeitskreis eingehend untersucht¹¹⁾. LEUCHS hatte bereits beobachtet, daß Glycin-*N*-carbonsäureanhydrid beim Verreiben mit Wasser und Erwärmen auf über 15° ein wasserunlösliches Polymerisat liefert. Später sind noch eine Reihe anderer Stoffe bekannt geworden, die eine Polymerisation der Oxazolid-2.5-dione auslösen können: Stoffe mit beweglichem Wasserstoff, neben H_2O primäre und sekundäre Amine, Alkohole, Salze, Amide und Ester der Aminosäuren und Peptide. Außerdem können auch tert. Amine und Alkalisalze als Starter verwendet werden. Man erhält dann nach BALLARD und BAMFORD¹²⁾ Polypeptide von besonders hohem Molekulargewicht, teilweise auch Cyclopeptide.

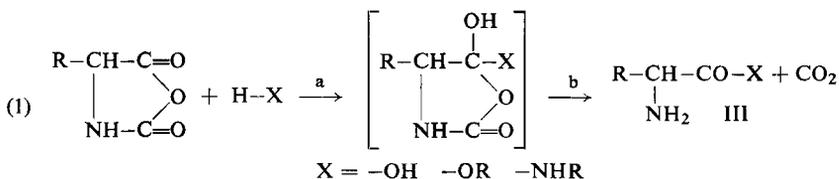
⁹⁾ O. BAYER, *Angew. Chem.* **59**, 257 (1947).

¹⁰⁾ K. HEYNS und R. BROCKMANN, *Z. Naturforsch.* **9b**, 21 (1954).

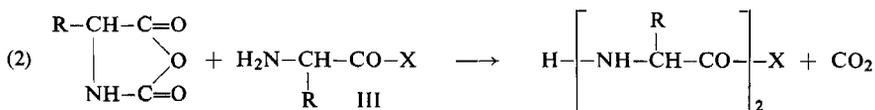
¹¹⁾ K. HEYNS und H. SCHULTZE, in *Vorbereitung*.

¹²⁾ D. G. H. BALLARD, C. H. BAMFORD und F. J. WEYMOUTH, *Proc. Roy. Soc. [London]*, Ser. A **227**, 155 (1955) [*C. A.* **49**, 7285 (1955)].

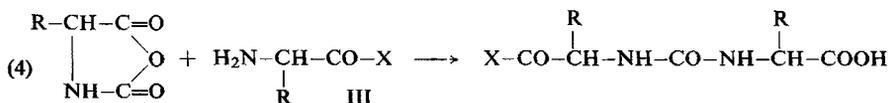
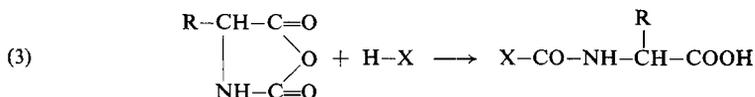
Der Mechanismus der Lösungsmittelpolymerisation der Oxazolid-2.5-dione ist eingehend untersucht worden¹³. Die Reaktion wird durch einen nucleophilen Angriff des Starters HX auf das C-5-Atom des Oxazolidinringes eingeleitet: Startreaktion (1).



Auch hier ist nachgewiesen worden¹⁴, daß nur das C-2-Atom des Oxazolidinringes als CO₂ abgespalten wird. Das Reaktionsprodukt III vermag durch seine freie NH₂-Gruppe mit einem weiteren Oxazolid-2.5-dion zu reagieren: Kettenwachstum (2).



Endgruppenanalyse und kinetische Untersuchungen zeigten jedoch, daß sich neben diesen beiden Reaktionen noch andere Umsetzungen abspielen müssen. Die Polypeptide zeigen nämlich immer einen *Überschuß an freien Carboxylendgruppen* im Vergleich zu den Aminoendgruppen, außerdem lassen sich nach der Totalhydrolyse des Polypeptids substituierte Hydantoinessigsäuren nachweisen. Ferner wird nicht die theoretisch zu erwartende CO₂-Menge entwickelt, sondern bis zu 10% weniger. Alle diese Tatsachen deuten auf eine *Kettenabbruchreaktion* hin. SELA und BERGER¹⁵ formulieren sie als Reaktion des Starters bzw. des Zwischenproduktes III mit dem C-2-Atom des Oxazolidinringes:



Reaktion (3) stellt eine Inaktivierung des Starters dar. Es ist bekannt, daß z. B. Phenylalanin-*N*-carbonsäureanhydrid mit CH₃ONa sowohl unter Bildung von Phenylalaninmethylester (Reaktion mit C-5) als auch unter Bildung des *N*-Carbonsäureesters (Reaktion mit C-2) reagie-

¹³) a) F. WESSELY, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **146**, 72 (1925); b) F. SIGMUND und F. WESSELY, ebenda **157**, 94 (1926); c) S. G. WALEY und J. WATSON, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. A. **199**, 499 (1949) [C. A. **44**, 3775 (1950)]; d) D. G. H. BALLARD und C. H. BAMFORD, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. A **223**, 495 (1954) [C. A. **48**, 7926 (1954)].

¹⁴) H. SCHULTZE, Diplomarbeit Univ. Hamburg 1954.

¹⁵) M. SELA und A. BERGER, J. Amer. chem. Soc. **75**, 6350 (1953).

wie der nucleophile Angriff des X-Ions auf das C-Atom 5. Die Überlegungen des vorigen Absatzes würden also auch in diesem Falle gelten.

In den Kreis dieser Vorstellungen lassen sich widerspruchsfrei die Ergebnisse von ABDERHALDEN und Mitarbeitern¹⁸⁾ über die Aminierungsgeschwindigkeiten der Halogenacyl-phenylalanin-Derivate einordnen. Bei dieser Reaktion lassen sich die Halogenacylreste in folgender *Reihe steigender Stabilität* gegenüber der Einwirkung von *Ammoniak* anordnen:

Chloracetyl = Bromacetyl > Brompropionyl > Brom-n-Capronyl > Bromisocapronyl ≫
Bromisovaleryl ≈ Bromisobutyryl

Die Substitution von Halogen durch Ammoniak an aliphatischen Kohlenstoffatomen ist eine nucleophile Substitutionsreaktion¹⁹⁾. Sie sollte daher mit steigendem +I-Effekt des Restes R sowie durch dessen zunehmende Raumerfüllung verlangsamt werden. Dies entspricht den Beobachtungen.

Die Ergebnisse der Hydrolysenversuche stehen im Einklang mit den von ABDERHALDEN²⁰⁾, LEVENE²¹⁾ und SYNGE²²⁾ aufgestellten Regeln über die Zusammenhänge zwischen der Stabilität der Polypeptide und der chemischen Natur der Aminosäuren, die an den Peptidbindungen beteiligt sind²³⁾: 1) Bei α -Aminosäuren, die einen unverzweigten aliphatischen Rest enthalten, erfolgt die Hydrolyse mit Alkali umso rascher, je kürzer der Rest ist. — 2) Ist der an das α -Kohlenstoffatom gebundene (aliphatische) Rest verzweigt, so erfolgt die Hydrolyse umso langsamer, je näher die Verzweigungsstelle an das α -C-Atom heranrückt.

Diese Regeln sind zum größten Teil aus dem alkalischen Abbau der Peptide abgeleitet worden. Sie gelten jedoch auch für den Säureabbau, wenn auch nach älteren Angaben die Unterschiede zwischen den Peptiden dabei nicht so stark hervortreten sollen. Im Gegensatz dazu wird von P. CRISTOL²⁴⁾ angegeben, daß gerade bei der Säurehydrolyse die Stabilitätsunterschiede der Peptide stärker herauskommen: „Es scheint so, als ob die Besonderheiten der (Peptid-)Struktur von der Stärke des hydro-

¹⁸⁾ E. ABDERHALDEN und F. SCHWEITZER, *Fermentforschung* **11**, 224 (1930); E. ABDERHALDEN und A. BAHN, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **63**, 914 (1930); E. ABDERHALDEN und K. HEYNS, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **206**, 137 (1932); **209**, 27 (1932); **214**, 262 (1933); E. ABDERHALDEN und F. REICH, *ebenda* **193**, 198 (1930); E. ABDERHALDEN und S. BECKMANN, *ebenda* **207**, 93 (1932).

¹⁹⁾ C. K. INGOLD, *Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, Ithaca, New York, Cornell Univ. Press 1953, S. 211.

²⁰⁾ E. ABDERHALDEN und H. MAHN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **169**, 196 (1927); **174**, 47 (1928); E. ABDERHALDEN und H. SICKEL, *ebenda* **170**, 134 (1927); E. ABDERHALDEN und H. BROCKMANN, *ebenda* **170**, 146 (1927); E. ABDERHALDEN und A. BAHN, *ebenda* **210**, 246 (1932); E. ABDERHALDEN und S. SUZUKI, *ebenda* **170**, 158 (1927); **173**, 250 (1928); E. ABDERHALDEN und E. HAASE, *Fermentforschung* **13**, 303 (1933); E. ABDERHALDEN und R. FLEISCHMANN, *ebenda* **9**, 524 (1928).

²¹⁾ P. A. LEVENE, R. E. STEIGER und A. ROTHEN, *J. biol. Chemistry* **97**, 717 (1932).

²²⁾ R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* **39**, 351 (1945).

²³⁾ Zusammenfassende Übersicht: S. J. LEACH, *Rev. pure appl. Chem.* **3**, 25 (1953) [*C. A.* **49**, 7625 (1955)].

lysierenden Reagenzes, angezeigt durch die große Hydrolysegeschwindigkeit (der NaOH), ausgelöscht würden²⁴⁾. Untersuchungen von J. HARRIS²⁵⁾ über die saure Hydrolyse von 19 Dipeptiden bestätigen ebenfalls die oben angeführten Regeln.

Diese Regelmäßigkeiten lassen sich durch *Annahme eines A_{AC}2-Mechanismus* im Sinne C. K. INGOLDS²⁶⁾ zwanglos deuten. Schwieriger ist die Frage zu entscheiden, wie weit man bei dieser Reaktion einen Einfluß induktiver Effekte oder sterischer Faktoren auf die Reaktion annehmen muß, da beide Einflüsse in gleichem Sinne wirken. Auch in diesem Falle gibt das Verhalten des Polyphenylalanins einen Hinweis darauf, daß auch dem induktiven Effekt ein erheblicher Einfluß auf die Reaktion eingeräumt werden muß, denn trotz größerer Raumerfüllung des Benzylrestes gegenüber dem n-Butylrest wird Poly-DL-phenylalanin wesentlich rascher hydrolysiert als Poly-DL-norleucin.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die aufgezeigten Regelmäßigkeiten im Falle der Bildung der Oxazolid-2.5-dione nur durch die Wirksamkeit des *induktiven* Effekts erklärt werden können. Im Falle der Bildung und Hydrolyse der Polypeptide ist eine Unterscheidung zwischen induktiven und sterischen Einflüssen wegen ihrer gleichsinnigen Wirkung nur schwer zu erkennen. Im Verhalten des Phenylalanins zeigen sich aber Hinweise dafür, daß beide Effekte wirksam sind und daß durch vergleichende Untersuchungen zwischen ihnen unterschieden werden kann.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Polypeptide

Darstellung der Oxazolid-2.5-dione

Eine 0.2 molare Suspension der feingepulverten, im Vakuumtrockenschrank bei 100° getrockneten *Aminosäure* in trockenem Dioxan wird in einen 1-l-Dreihalskolben mit Gaseinleitungsrohr, Schlifführer und Rückflußkühler gebracht. Alle Geräte müssen sorgfältig (bei 110°) getrocknet sein; das Dioxan muß durch langsame Destillation über Natrium getrocknet werden. Vor und hinter das Reaktionsgefäß werden je 2 Waschflaschen als Sicherheitsflasche und Waschflasche geschaltet. Das Reaktionsgefäß wird durch ein Wasserbad auf 40–45° gehalten und ein durch H₂SO₄ getrockneter *Phosgen*-Strom so durchgeleitet, daß an der letzten Waschflasche ca. 10 Blasen/Min. austreten. Das ausströmende Phosgen wird in NaOH geleitet, die Reaktion aus Sicherheitsgründen im Freien durchgeführt. Nachdem die Aminosäure in Lösung gegangen ist, wird die Reaktion abgebrochen und das überschüssige Phosgen durch einen Stickstoffstrom vertrieben. Anschließend wird unter Ausschluß der Luftfeuchtigkeit von eventuell ungelöster Aminosäure abfiltriert und das Dioxan an der Wasserstrahlpumpe abdestilliert. Dabei darf die Badtemperatur 50° nicht überschreiten, da

²⁴⁾ P. CRISTOL, C. BENEZECH und A. CRASTES DE PAUJET, Bull. Soc. chim. France **21**, 684 (1954).

²⁵⁾ J. I. HARRIS, R. D. COLE und N. G. PON, Biochem. J. **62**, 154 (1956).

²⁶⁾ Siehe Lit.¹⁹⁾, S. 785.

sonst der zurückbleibende Sirup braun wird und nur noch schwer kristallisiert. Der krist. Rückstand wird in wenig Dioxan gelöst und, wenn nicht anders angegeben, aus Dioxan/Petroläther umkristallisiert.

Polymerisation der Oxazolid-2.5-dione

Das Oxazolid-2.5-dion wird in wenig Dioxan gelöst und eventuell vom Unlöslichen abfiltriert. Anschließend wird so viel Dioxan zugesetzt, daß der Gehalt an Oxazolid-2.5-dion 5% beträgt. Die klare Lösung wird auf dem Wasserbad erhitzt und so viel Wasser als Polymerisations-Starter zugesetzt, daß spätestens nach $\frac{1}{2}$ Stunde eine Trübung auftritt. Anschließend wird 4–6 Stunden auf dem siedenden Wasserbad weiter erhitzt. Die ausflockenden Polypeptide werden abgenutscht, mit Dioxan und, bei wasserunlöslichen Polymerisaten, mit heißem Wasser gewaschen. Die Polypeptide werden im Vakuumexsikkator über KOH getrocknet. Eine Probe wird in Eisessig suspendiert und durch Papierchromatographie mit Butanol-Eisessig auf mit Ninhydrin anfärbbare Anteile untersucht.

Die Polypeptide

1. Polyglycin

a) *Oxazolid-2.5-dion*. — 7.5 g Glycin haben wir in 500 ccm Dioxan suspendiert und Phosgen eingeleitet. Nach 6 Stdn. wurde die Reaktion abgebrochen; 3.8 g Glycin wurden beim Abfiltrieren wiedergewonnen. Beim Abdestillieren kristallisierte der Rückstand schnell. Nach Umkristallisieren wurden 3.5 g (70% d. Th., ber. auf umgesetztes Glycin) in weißen Nadeln erhalten. In Übereinstimmung mit den Literaturangaben besaß die Substanz keinen Schmelzpunkt, sondern polymerisierte beim Erhitzen über 100°. Bei einem zweiten Ansatz wurde vor dem Phosgen gut getrocknetes SO₂ in die Suspension eingeleitet. Das SO₂ wird unter Erwärmung und starker Volumenzunahme schnell absorbiert. Nach 2 Stdn. war die Suspension gesättigt. Anschließend wurde die Temperatur auf 40° gebracht und wie oben weiter gearbeitet. Die Ausbeute bei diesem Ansatz, bei dem das Glycin nach 180 Min. vollständig in Lösung gegangen war, betrug 74% der Theorie. In einem weiteren Ansatz wurden 2.5 g Glycin in 166 ccm Dioxan und 144 ccm Acetanhydrid suspendiert und bei 40° mit Phosgen behandelt. Nach 4 Stdn. war das Glycin vollständig in Lösung gegangen. Ausbeute 63% der Theorie.

b) *Polyglycin*. — Die 5-proz. Lösung des Oxazolid-2.5-dions wurde mit einem Zusatz von 1% H₂O 6 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Trocknen über KOH betrug die Ausbeute 1.95 g (99%), bei einem anderen Ansatz 2.4 g (84%). Die Polypeptide enthielten keine mit Ninhydrin anfärbbaren Anteile.

2. Poly-DL-alanin

a) *4-Methyl-oxazolid-2.5-dion*. — 8.9 g Alanin wurden in 500 ccm Dioxan suspendiert. Beim Einleiten des Phosgens klärte sich die Suspension nach 190 Minuten. Nach dem Abdampfen des Dioxans blieb ein brauner Sirup zurück, der nur langsam kristallisierte. Schmp. 42–44°, Ausbeute 7 g (61% d. Th.).

b) *Polyalanin*. — 7 g des 4-Methyl-oxazolid-2.5-dions wurden in 150 ccm Dioxan gelöst und unter Zusatz von 1% H₂O polymerisiert. Das wasserlösliche Polymerisat wurde nur mit Dioxan gewaschen. Ausbeute 4.2 g (99% d. Th.). Bei der chromatographischen Untersuchung zeigte sich, daß das Polypeptid noch freies Alanin und niedere Peptide enthielt.

3. *Poly-DL- α -aminobuttersäure*

a) *4-Äthyl-oxazolid-2.5-dion*. — 10.3 g α -Aminobuttersäure wurden in 500ccm Dioxan suspendiert. Nach 120 Min. war bis auf einige Flocken alles in Lösung gegangen. Das Rohprodukt wurde in Chloroform gelöst und aus Chloroform-Petroläther umkristallisiert. Weiße Blättchen, Schmp. 112–113°, Ausbeute 11.8 g (91.5% d.Th.).

b) *Poly- α -aminobuttersäure*. — 11.5 g des Oxazolid-2.5-dions wurden in 240ccm Dioxan gelöst und mit 3% H₂O auf dem Wasserbad gekocht. Ausbeute 6.6 g (85% d.Th.). Das Polymerisat war frei von niederen Peptiden.

4. *Poly-DL-norleucin*

a) *4-n-Butyl-oxazolid-2.5-dion*. — 6.6 g DL-Norleucin wurden in 250ccm Dioxan suspendiert. Die Reaktion mit COCl₂ war nach 40 Min. beendet. Nach Umkristallisieren wurden weiße Nadeln erhalten. Ausbeute 7.0 g (88.6% d.Th.), Schmp. 79°. Bei einem zweiten Ansatz betrug die Ausbeute nach einer Reaktionszeit von 35–40 Minuten 92% der Theorie.

b) *Poly-DL-norleucin*. — Die Polymerisation wurde in 5-proz. Dioxanlösung unter Zusatz von 3% H₂O durchgeführt. Ausbeute 12.7 g (95%). Es wurden keine mit Ninhydrin anfärbbaren Anteile festgestellt.

5. *Poly-DL-leucin*

a) *4-Isopropyl-oxazolid-2.5-dion*. — 8.8 g DL-Leucin wurden in 335ccm Dioxan suspendiert. Die Suspension klärte sich beim Einleiten von COCl₂ nach 25 Minuten. Ausbeute nach dem Umkristallisieren 9.7 g (92% d.Th.), Schmp. 47–48°.

b) *Polyleucin*. — 7.0 g des LEUCHSSchen Körpers wurden in 140ccm Dioxan gelöst und mit einem Zusatz von 3% H₂O auf dem Wasserbad gekocht. Ausbeute 4.8 g (95% d.Th.). — Das Polypeptid enthielt keine mit Ninhydrin anfärbbaren Anteile.

6. *Poly-DL-isoleucin*

a) *4-(3-Methyl)-propyl-oxazolid-2.5-dion*. — 8.8 g DL-Isoleucin wurden in 335ccm Dioxan suspendiert. Beim Einleiten des Phosgens trat schon nach 10–15 Min. Klärung der milchigen Suspension ein. Nach Umkristallisieren Schmp. 70–71°, Ausbeute 9.0 g (85.4% d.Th.).

b) *Polyisoleucin*. — Diese 9 g Oxazolid-2.5-dion wurden in 180ccm Dioxan gelöst. Eine Polymerisation trat erst beim Kochen auf dem Wasserbad unter Zusatz von 6% H₂O ein. Ausbeute 6.3 g (97.5% d.Th.). Es konnten keine mit Ninhydrin anfärbbaren Peptide nachgewiesen werden.

7. *Poly-DL-pseudoleucin*

a) *4-tert.-Butyl-oxazolid-2.5-dion*. — 1.9 g DL-Pseudoleucin wurden in 72.5ccm Dioxan suspendiert und mit Phosgen behandelt. Nach 5–10 Min. war das Pseudoleucin in Lösung gegangen. Aus Chloroform/Petroläther kristallisiert der LEUCHSSche Körper in Blättchen aus. Schmp. 120°, Ausbeute 1.9 g (83.5% d.Th.). ABDERHALDEN und FAUST²⁷⁾ erhielten spitze Nadeln von Schmp. 132°.

b) *Poly-pseudoleucin*. — 1 g 4-tert.-Butyl-oxazolid-2.5-dion wurde in 20ccm Dioxan gelöst. Eine Polymerisation trat im siedenden Wasserbad erst ein, nachdem der Wassergehalt des Ansatzes auf 15% erhöht worden war. Ausbeute 0.6 g (84% d.Th.).

²⁷⁾ E. ABDERHALDEN und W. FAUST, *Fermentforschung* **14**, 409 (1935).

8. *Poly-DL-phenylalanin*

a) *4-Benzyl-oxazolid-2.5-dion*. — 11 g DL-Phenylalanin wurden in 335 ccm Dioxan suspendiert. Beim Einleiten des Phosgens ging das DL-Phenylalanin innerhalb von 100 Min. in Lösung. Aus warmem Chloroform/Petroläther wurden weiße Blättchen erhalten. Ausbeute 11.2 g (88% d. Th.), Schmp. 126°.

b) *Poly-DL-phenylalanin*. — 11 g 4-Benzyl-oxazolid-2.5-dion wurden in 220 ccm Dioxan gelöst und durch Zusatz von 6% H₂O polymerisiert. Ausbeute 8 g (94.5% d. Th.). Das Polymerisat war frei von mit Ninhydrin anfärbbaren Peptiden.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurden unter Verwendung von Dioxan als Lösungsmittel folgende *Copolymerisate* hergestellt:

Polypeptid	Eingesetzte Mengen der Oxazolid-dione in g		Menge des gewonnenen Polypeptids in g
Poly-norleucin/phenylalanin	0.20	0.20	0.22
Poly-alanin/ α -aminobuttersäure	0.20	0.23	0.22
Poly-alanin/ α -aminobuttersäure	0.40	0.23	0.40
Poly-alanin/ α -aminobuttersäure	0.30	0.12	0.25
Poly-glycin/alanin	0.10	0.29	0.21
Poly-alanin/pseudoleucin	0.20	0.17	0.12
Poly-alanin/pseudoleucin	0.24	0.08	0.18

Alle Produkte wurden papierchromatographisch und mit der Reaktion von ABDERHALDEN und KOMM²⁸⁾ auf Reinheit geprüft. Nach der Hydrolyse mit Salzsäure konnte in jedem Falle die Aminosäure bzw. Aminosäuren, aus denen das Polypeptid aufgebaut war, papierchromatographisch nachgewiesen werden.

Vergleich der Bildungsgeschwindigkeiten verschiedener Polypeptide

Je 20 mg der *N*-Carboxy-aminosäureanhydride von Glycin, Alanin, α -Aminobuttersäure, Norleucin, Pseudoleucin und Phenylalanin wurden mit je 2 ccm Dioxan versetzt, das 0.1% Wasser enthielt. Der Versuch wurde in Reagenzgläsern ausgeführt. Diese wurden in ein Wasserbad eingesenkt, dessen Temperatur auf $80^\circ \pm 1^\circ$ konstant gehalten wurde und alle 2 Min. auf eine Trübung bzw. Flockung kontrolliert.

Molekulargewichtsbestimmungen in cis-Hexahydro-p-aminobenzoessäure-lactam

Polypeptid	mg Polypeptid	mg Lactam	ΔT	\bar{M}	\bar{p}
Poly-alanin	10.0	77	13.3°	400	5
Poly- α -aminobuttersäure	28.8	248	6.6°	700	8
Poly-norleucin	8.7	69.5	3.4°	1500	13
Poly-phenylalanin	12.4	145	4.0°	850	5
Poly-glycin/alanin	7.7	86.5	3.7°	950	14
Poly-alanin/ α -aminobuttersäure	17.3	165	4.7°	900	12

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden nach dem in der III. und V. Mitteilung dieser Reihe beschriebenen Verfahren durchgeführt²⁹⁾.

²⁸⁾ E. ABDERHALDEN und E. KOMM, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **139**, 181 (1924).

²⁹⁾ K. HEYNS und G. ANDERS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **287**, 1 (1951); K. HEYNS und W. WALTER, ebenda **287**, 15 (1951).

Vergleichende Partialhydrolysen

Je 0.1 mMol (bez. auf das Mol.-Gew. der freien Aminosäure) des feingepulverten Polypeptides wurden mit je 0.5 ccm 2*n* HCl bzw. mit je 0.5 ccm Dichloressigsäure übergossen und bei 37° bebrütet. Für jedes Chromatogramm wurden dieser Lösung bzw. Suspension 10 μ l entnommen.

Je 0.15 mMol Polypeptid (bez. auf das Mol.-Gew. der freien Aminosäure) wurden mit je 0.5 ccm Dichloressigsäure und je 0.25 ccm 9*n* HCl übergossen. In dieser Mischung waren Alanin und α -Aminobuttersäure klar löslich. Die Lösung von Polynorleucin trübte sich beim Hinzufügen der Salzsäure zunächst, wurde jedoch nach dem Umschütteln wieder klar. Im Verlauf der Hydrolyse trat in diesem Falle wieder eine geringe Trübung auf. Das Pseudoleucin löste sich in der angewandten Menge Dichloressigsäure nicht auf, sondern es blieb in der viskosen Lösung eine große Menge stark gequollener Substanz zurück. Auf Zusatz von Salzsäure trübte sich die Lösung schwach.

Über Proteine und deren Abbauprodukte XV

STERISCHE UND INDUKTIVE EFFEKTE BEI DER
DARSTELLUNG UND HYDROLYSE VON POLYPEPTIDEN II

VON KURT HEYNS, HANS FRIEDRICH GRÜTZMACHER und WOLFGANG WALTER

Aus dem Chemischen Institut der Universität Hamburg

Eingegangen am 20. April 1957

Die Kinetik der sauren Hydrolyse synthetischer Polypeptide von Polymerisationsgraden zwischen 15 und 40 wurde untersucht. Dabei wird zwischen dem Abbau der Polypeptidketten von den Enden her sowie der Hydrolyse von Peptidbindungen im Innern der Polypeptidkette unterschieden. Die RG-Konstanten der Hydrolyse der endständigen Peptidbindungen nehmen in der Reihe der aliphatischen Monoamino-monocarbonsäuren mit unverzweigten aliphatischen Seitenketten ständig ab, während sich die RG-Konstanten der inneren Peptidbindungen nach steilem Abfall vom Glycin zur α -Aminobuttersäure bei weiterer Verlängerung der Kette nur noch wenig ändern (Abb. 3). Diese Beobachtungen sowie weiterhin das Verhalten des Poly-DL-phenylalanins, dessen Endgruppen etwa mit der gleichen Geschwindigkeit wie diejenigen der Poly-DL- α -aminobuttersäure und dessen innere Peptidbindungen langsamer als die des Poly-DL-leucins gespalten wurden, lassen sich unter der Vorstellung deuten, daß der Abbau der endständigen Aminosäuren vorwiegend durch die induktiven Effekte der Seitenketten beherrscht wird, während für die Geschwindigkeit der Spaltung der inneren Bindungen sterische Effekte wirksam sind.

In der I. Mitteilung waren 3 Reaktionstypen dargelegt worden, um Ansätze für die Unterscheidung sterischer und induktiver Effekte bei der Bildung und Hydrolyse synthetischer Polypeptide aufzufinden: