

# Untersuchungen über die Kinetik der Spaltung von Di- und Tripeptiden

## II. Mitt.<sup>1</sup>: Über die Hydrolyse in wäßriger Säure

Von H. HARTMANN, J. FERNÁNDEZ \*, J. HEIDBERG \*\* und H. JUNG \*\*\*

Aus dem Institut für physikalische Chemie an der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. **18 b**, 269—271 [1963]; eingegangen am 8. November 1962)

Für eine Gruppe von Di- und Tripeptiden wurden die Geschwindigkeitskonstanten sowie die Arrheniuschen Aktivierungsenergien und Aktionskonstanten der sauren Hydrolyse der einzelnen Peptidbindungen gemessen. Zeitgesetz und Abstufungen der Aktivierungsenergien lassen sich nur unter bestimmten Annahmen über die Solvation der Reaktionsteilnehmer auf der Grundlage des Ingold-Benderschen Mechanismus interpretieren. Aktionskonstante und Aktivierungsenergien weisen einen symbaten Gang auf.

Die Bestimmung der kinetischen Daten zur Hydrolyse einzelner Peptidbindungen in Dipeptiden und höheren Peptiden wird durch die vollständige quantitative Analyse von Peptidhydrolysaten, die bei der Hydrolyse von vor ihrer Spaltung geeignet mit C-14 markierten Peptiden erhalten werden, mit Hilfe der Papierchromatographie und der Zonen-  
elektrophorese ermöglicht<sup>1,2</sup>. In dieser Mitteilung soll über Untersuchungen zur Stabilität der einzelnen

Peptidbindungen in Di- und Tripeptiden gegenüber sauren, hydrolysierenden Agentien berichtet werden.

Die Synthese geeignet C-14-markierter Peptide angemessener spezifischer Aktivität, die Hydrolyse, die Trennung der Hydrolysate sowie die Aktivitätsbestimmung der isolierten Hydrolyseprodukte wurden bereits beschrieben<sup>1</sup>. Die kinetischen Größen wurden, wie in einer früheren Arbeit angegeben, definiert und berechnet.

### Ergebnisse

Spaltung des Glycyl-alanins in Salzsäure verschiedener Konzentration. $k \cdot 10^2 (d^{-1})$					Spaltung der Dipeptide in 0,5 — m · Salzsäure $k \cdot 10^2 (d^{-1})$					
Temp. [°C]	HCl [Mol/l]				Temp. [°C]	Chlor- acetyl- alanin	Glycyl- alanin	Dichlor- acetyl- alanin	Alanyl- glycin	Valyl- glycin
	0,25	0,50	0,75	1,00						
40	—	—	—	1,66	42	10,7	—	3,87	—	—
50	—	1,99	2,81	4,62	52	28,8	2,22	11,4	1,58	—
60	2,24	4,75	7,22	11,0	60	58,2	4,46	25,2	—	—
70	5,17	12,0	19,8	24,8	67	107	8,77	44,0	6,59	0,98
78	9,12	21,6	35,7	—	75	—	17,3	—	13,2	2,63
89,5	24,1	—	—	—	82	—	—	—	26,1	6,16
					90	—	—	—	—	13,9

Tab. 1. Reaktionsgeschwindigkeits-Konstante (Tage<sup>-1</sup>). Die Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten sind bezüglich der Konzentration der Salzsäure nicht normiert.

Valyl-glycyl-alanin	$k (d^{-1})$	Temperatur [°C]						Alanyl-glycyl-alanin	$k (d^{-1})$	Temperatur [°C]			
		60	67	67	75	82	82			30	38	45	52
→ Valin + Glycyl-alanin	$k \cdot 10^3$	2,12	4,18	—	7,97	14,8	14,3	→ Alanin + Glycyl-alanin	$k \cdot 10^3$	1,57	4,62	9,53	15,4
→ Valyl-glycin + Alanin	$k \cdot 10$	3,08	4,71	4,76	9,36	14,5	16,9	→ Alanyl-glycin + Alanin	$k \cdot 10^2$	1,08	2,82	5,87	9,52

Tab. 2. Spaltung der Tripeptide in 0,5-m. Salzsäure.

Gegenwärtige Anschriften: \* Dept. de Fisica Quimica, Universidad de Santiago de Chile, \*\* Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois, \*\*\* Teil der Dissertation H. JUNG, Frankfurt am Main 1958.

<sup>1</sup> H. HARTMANN, J. HEINTGES, H. JUNG u. J. HEIDBERG, Z. Naturforschg. **17 b**, 143 [1962].

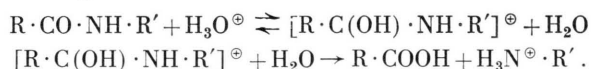
<sup>2</sup> H. HARTMANN, J. HEIDBERG, J. HEINTGES u. H. JUNG, Z. analyt. Chem. **181**, 533 [1961].

Spaltung des Glycylalanins in Salzsäure verschiedener Konzentration			Spaltung der Di- und Tripeptide in 0,5-m. Salzsäure		
[HCl] [Mol/l]	<i>E</i> [Kcal/Mol]	<i>A</i> [1/Mol sec]		<i>E</i> [Kcal/Mol]	<i>A</i> [1/Mol sec]
0,25	19,3 ± 0,6	4,9 · 10 <sup>6</sup>	Chloracetylanin	19,5 ± 0,2	8,3 · 10 <sup>7</sup>
0,50	19,4 ± 0,4	6,0 · 10 <sup>6</sup>	Glycylalanin	20,2 ± 0,4	2,0 · 10 <sup>7</sup>
0,75	20,8 ± 0,6	4,9 · 10 <sup>7</sup>	Dichloracetylanin	20,8 ± 0,6	2,6 · 10 <sup>8</sup>
1,00	19,2 ± 0,4	4,9 · 10 <sup>6</sup>	Alanylglycin	21,3 ± 0,4	6,9 · 10 <sup>7</sup>
			Valylglycin	28,4 ± 0,6	4,4 · 10 <sup>11</sup>
			Valylglycylalanin		
			→ Valin + Glycylalanin	20,4 ± 0,3	1,3 · 10 <sup>6</sup>
			→ Valylglycin + Alanin	18,0 ± 0,7	4,2 · 10 <sup>6</sup>
			Alanylglycylalanin		
			→ Alanin + Glycylalanin	20,4 ± 1,5	2,3 · 10 <sup>7</sup>
			→ Alanylglycin + Alanin	19,8 ± 1,5	5,8 · 10 <sup>7</sup>

Tab. 3. Aktivierungsenergien *E* und Aktionskonstanten *A*. Zur Ermittlung der Aktivierungsenergien und Aktionskonstanten wurden auf der Basis der Arrhenius'schen Gleichung Ausgleichsrechnungen durchgeführt.

### Diskussion

Die Hydrolyse von Amidin in saurer wässriger Lösung stellt dem bisherigen umfangreichen Versuchsmaterial entsprechend eine Folge zweier Elementarprozesse dar, der geschwindigkeitsbestimmenden Wasseranlagerung an die Carbonylgruppe und eines diesem Schritt vorgelagerten prototropen Gleichgewichts:



Die in schwach bis mäßig saurer Lösung beobachtete Reaktionsgeschwindigkeits-Konstante sollte gegen polare Substituenteneinflüsse relativ unempfindlich sein, während durch sterische Veränderungen in der Nähe des Reaktionszentrums ein erheblicher Effekt ausgelöst werden sollte (INGOLD, BENDER<sup>3</sup>).

Das für die Peptidhydrolyse eruierte Zeitgesetz

$$-\frac{d[\text{Peptid}]}{dt} = k[\text{Peptid}]$$

mit der in Näherung gültigen Beziehung

$$k \sim [\text{H}^{\oplus}]$$

ist mit diesem Mechanismus vereinbar.

Da die Aktivitätskoeffizienten der Peptidkationen und Übergangskomplexe sowie des Wassers und Wasserstoffions nicht bekannt sind, wird die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten von der Wasserstoffionenkonzentration etwa auf der Grundlage des Brönsted'schen Ansatzes an dieser Stelle nicht weiter diskutiert.

<sup>3</sup> M. L. BENDER, Chem. Reviews **60**, 53 [1960].

Auch die Abstufungen der Aktivierungsenergien für die Spaltung der Dipeptide lassen sich durch die alleinige Berücksichtigung der sterischen Substituenten-Wirkungen deuten. In der Reihe

	<i>E</i> [Kcal/Mol]
Chloracetylanin	19,5
Glycylalanin	20,2
Dichloracetylanin	20,8
Alanylglycin	21,3
Valylglycin	28,4

dürfte die empirische Aktivierungsenergie wegen der zunehmenden Abstoßung der Atome in allen Konformationen der Übergangskomplexe infolge des wachsenden Raumbedarfs der Substituenten ansteigen. Beim Übergang von den Chlor- zu den Ammoniumverbindungen wird im besonderen die sterische Wirkung der hydratisierten Ammoniumgruppe zur Erhöhung der Aktivierungsenergie beitragen.

Der Einfluß der Substituenten auf die empirische Aktivierungsenergie vermöge des polaren Effektes sollte gering sein, da die Aktivierungsenergie der geschwindigkeitsbestimmenden Wasseranlagerung und die Bildungsenthalpie des Amidiniumions gegenläufig verändert werden, und da bei Vergrößerung des Alkylrestes die Verstärkung des negativierenden induktiven Effektes durch die Erhöhung des positivierenden elektrostatischen Feldes der Ammoniumgruppe, infolge der Verminderung ihrer Abschirmung durch Wassermoleküle und der Herabsetzung der innermolekularen Dielektrizitätskonstanten, zumindest teilweise aufgehoben wird. Vorausgesetzt, daß die Änderung der Bildungsenthalpie des Amidiniumions kleiner als diejenige der Aktivie-

rungsenergie der Wasseranlagerung ist, tritt die dominierende Wirkung des sterischen Effektes bei der sauren Hydrolyse deutlich beim Vergleich der bei Spaltung der Chloracetyl-Verbindungen gemessenen empirischen Aktivierungsenergien hervor. Bei saurer Hydrolyse wächst die empirische Aktivierungsenergie beim Übergang vom Chlor- zum Dichloracetylalanin, bei alkalischer Verseifung nimmt sie wegen des vorherrschenden induktiven Effektes jedoch ab.

Die Erniedrigung der empirischen Aktivierungsenergie für die Spaltung der Peptidbindung bei Aufbau einer Aminosäure am Aminoende eines Dipeptids wird auf den vergrößerten Abstand der aus räumlichen Gründen der Wasseranlagerung hinderlichen, hydratisierten Ammoniumgruppe sowie auf die wegen des erhöhten Ladungsabstandes größere elektrostatische Stabilität des Amidiniumions zurückgeführt. Valin übt hierbei, wie bei der alkalischen Hydrolyse, einen stärkeren Effekt aus als Alanin, möglicherweise deshalb, weil die durch die Hydratation hervorgerufene Schwächung der positivierenden Wirkung der Amid- und Ammoniumgruppe in Valinpeptiden geringer als in den entsprechenden Alaninpeptiden ist.

Die bei Verknüpfung einer Aminosäure mit der Carboxylgruppe eines Dipeptids zu beobachtende Verringerung der empirischen Aktivierungsenergie sollte sich bei Nichtberücksichtigung der Solvatation auf eine sterische Erleichterung der Bildung des Übergangskomplexes nicht zurückführen lassen. Vermutlich wird die Wasseranlagerung an die zu spaltende Peptidbindung durch die im Vergleich zur Carboxylgruppe weniger hydratisierte und überdies stärker positivierende Amidgruppe begünstigt. Nimmt man an, daß die sterische Hinderung der *i*-Propylgruppe bei der Hydrolyse des Valylglycins erst durch das Zusammenwirken mit der hydratisierten Carboxylgruppe des Glycins zur Geltung kommt, so läßt sich das Verschwinden der Unterschiede in den empirischen Aktivierungsenergien der Spaltung des Alanylglycins und Valylglycins beim Übergang zu den am Carboxylende um Alanin verlängerten Peptiden durch die Eliminierung der hydratisierten Carboxylgruppe deuten.

Die Aktionskonstanten für die saure Hydrolyse der Peptide dürften, auch bei Berücksichtigung der Tatsache, daß die Aktionskonstanten nicht auf die Einheit der Konzentration des Wassers bzw. Amidiniumions bezogen werden konnten, im Hinblick auf die geringe Konzentration der Amidiniumionen ebenso wie die Aktivierungsenergien größer als diejenigen für die alkalische Hydrolyse sein. Eindeutig ist der gleichsinnige Gang von Aktivierungsenergie und Aktionskonstante für die saure Hydrolyse in der Reihe der Dipeptide, obwohl die Zunahme der Aktivierungsenergien auf eine wachsende sterische Erschwerung der Hydrolyse zurückgeführt wurde und hierbei gerade eine inverse Beziehung erwartet wird. Die Aktionskonstanten für die Spaltung der Chlorverbindungen liegen vergleichsweise hoch, da die Bildungsentropien der einfach positiv geladenen Chloramidiniumionen sicher wesentlich größer als diejenigen der zweifach positiv geladenen Ammonium-Amidiniumionen sind. Analog dürften die relativ hohen Beträge der Aktionskonstanten der im Tripeptid dem Carboxylende benachbarten Bindungen wegen des größeren Abstandes der beiden Ladungen im Amidiniumion zu deuten sein.

Die Abstufungen der empirischen Aktivierungsenergien und Aktionskonstanten bei Variation der die Peptidbindung aufbauenden Aminosäuren und Peptide wurden mit der hierbei verknüpften Veränderung der Solvatation in Verbindung gebracht. Da die Hydratation in dem relevanten Bereich mit steigender Temperatur zurückgehen dürfte, ist eine Verringerung der Aktivierungsenergie bei Temperaturerhöhung und nicht Temperaturunabhängigkeit zu erwarten. Wenn sich die erhaltenen Meßwerte nach Arrhenius darstellen ließen, so vermutlich deshalb, weil das Temperaturgebiet, in dem die Messungen aus Gründen experimenteller Genauigkeit durchgeführt wurden, klein war. Immerhin liegen die bei höheren Temperaturen bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die wegen sterischer Hinderung besonders erschwerte Spaltung der Bindungen im Valylglycin und Dichloracetylalanin in Arrhenius'scher Darstellung relativ niedrig, wenn die Arrhenius-Geraden durch die zu den niedrigen Temperaturen gehörenden Meßpunkte festgelegt wurden.