

Gaschromatographische Untersuchung der Racemisierung bei Peptidsynthesen [*]

VON PROF. DR. F. WEYGAND, DR. A. PROX, DIPL.-CHEM. L. SCHMIDHAMMER
UND DIPL.-CHEM. W. KÖNIG

ORGANISCH-CHEMISCHES INSTITUT DER TECHNISCHEN HOCHSCHULE MÜNCHEN

Herrn Professor Dr. Adolf Butenandt in Verehrung zum 60. Geburtstag gewidmet

Es wird gezeigt, daß sich viele diastereoisomere N-Trifluoracetyl-dipeptid-methylester an Golay-Säulen gaschromatographisch trennen lassen. Hierdurch ist es erstmals möglich, die bei der Peptidsynthese auftretende Racemisierung unabhängig von der Messung der optischen Drehung oder von enzymatischer Spaltung mit großer Genauigkeit quantitativ zu untersuchen, ohne daß die Peptide isoliert werden müssen. – Einige bekannte Methoden der Peptidknüpfung wurden am Beispiel der Synthese von Carbobenzoxy-L-valyl-L-valin-methylester geprüft, und die Synthese von N-Trifluoracetyl-L-valyl-L-valin-methylester wurde als Modell für die Verknüpfung von Peptiden untersucht. Der Einfluß zahlreicher Faktoren auf die Racemisierung wurde ermittelt; es ließen sich allgemeine Schlußfolgerungen für die Peptidsynthese ziehen.

Einleitung

Seitdem man es unternommen hat, längerkettige Peptide aus optisch aktiven Aminosäuren herzustellen, spielen die sterische Reinheit der eingesetzten Aminosäuren und die Racemisierung bei den Synthesen eine viel größere Rolle als früher. Man hat berechnet [1], daß bei der Synthese eines aus hundert Aminosäuren bestehenden Peptides nur noch 37% all-L-Peptid entstehen, wenn die eingesetzten Aminosäuren nur zu 99% sterisch einheitlich sind.

Da sich praktisch reine L-Aminosäuren herstellen lassen und meist auch die Derivate, die für die Peptidsynthese benötigt werden, durch Umkristallisieren gereinigt werden können, ist die Racemisierung von ausschlaggebender Bedeutung für die sterische Einheitlichkeit des erhaltenen Peptids.

Die Racemisierung kann physikalisch und enzymatisch festgestellt werden. Wesentlich ist, daß nach einer Peptidsynthese keine Fraktionierung auftritt oder vorgenommen wird, ehe diese Methoden angewendet werden, da sonst falsche Schlüsse gezogen werden können. Unter diesem Gesichtspunkt genügen die bisher bekannt gewordenen Methoden im allgemeinen nicht.

Folgende Methoden wurden bisher angewendet:

a) Reinheitsprüfung mit Hilfe der optischen Drehung. – Die Messung der spezifischen Drehung ist mit einem durchschnittlichen Fehler von 2–3% behaftet [2]. Es werden genau wägbare, analysenreine Substanzen benötigt, d.h. in den meisten Fällen kristallisierte Verbindungen, bei deren Isolierung eine Fraktionierung auftreten kann.

b) Saure Totalhydrolyse und Untersuchung der isolierten Aminosäuren auf sterische Einheitlichkeit. – Da bei der sauren Hydrolyse Racemisierung eintritt [3], sind die Ergeb-

nisse fehlerhaft. Eine gewisse Korrektur ist dadurch möglich, daß man die in dem zu untersuchenden Peptid vorhandenen Aminosäuren einer analogen Säurebehandlung unterwirft und den beobachteten Racemisierungsgrad berücksichtigt [4].

c) Enzymatische Verfahren. – Die Anwendung enzymatischer Verfahren unterliegt einigen einschränkenden Voraussetzungen [5]:

1. Das Enzym muß gegenüber dem zu untersuchenden Peptid genügend aktiv sein.
2. Das Peptid muß stereospezifisch gespalten werden.
3. Nicht gespaltene Peptidanteile müssen sich mit hoher Empfindlichkeit nachweisen lassen.
4. Das Enzym darf weder durch das Substrat noch durch die Hydrolysenprodukte oder durch Verunreinigungen gehemmt werden.

Eine unvollständige Spaltung kann also auf anderen Ursachen als auf dem Vorhandensein von Diastereoisomeren beruhen. Demzufolge können nur gereinigte Peptide untersucht werden. Hierfür sind die enzymatischen Methoden hervorragend geeignet, nicht aber zur Untersuchung der bei einer Peptidsynthese auftretenden Racemisierung.

Ein interessantes enzymatisches Verfahren wurde von Greenstein und Mitarbeitern vorgeschlagen: man verwendet eine Aminopeptidase aus Nieren, die auch diastereoisomere Peptide hydrolysiert und oxydiert die D-Aminosäuren mit D-Aminosäureoxydase.

d) Spezielle Methoden. – Young und Mitarbeiter [6] haben die Racemisierung bei der nach verschiedenen Methoden ausgeführten Synthese von N-Acetyl-L-leucyl-glycin-äthylester untersucht. Der Racemisierungsgrad wurde aus der optischen Drehung, dem IR-Spektrum sowie den Schmelzpunkten bestimmt. Die meist öligen Produkte erschweren eine genaue Untersuchung.

Anderson und Callahan [7] haben gefunden, daß sich Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanyl-glycin-äthylester von der DL-

[4] B. Riniker u. R. Schwyzer, *Helv. chim. Acta* 44, 658 (1961).

[5] Vgl. [1], S. 1254.

[6] N. B. North u. G. T. Young, *Chem. and Ind.* 1955, 1597; N. A. Smart, G. T. Young u. M. W. Williams, *J. chem. Soc. (London)* 1960, 3902.

[7] G. W. Anderson u. F. M. Callahan, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 2902 (1958).

[*] Auszugsweise vorgetragen auf dem V. Europäischen Peptidsymposium in Oxford/England im September 1962.

[1] J. P. Greenstein u. M. Winitz: *Chemistry of the Amino Acids*. Wiley, New York 1961, S. 946.

[2] Vgl. [1], S. 947.

[3] A. Neuberger, *Advances Protein Chem.* 4, 339 (1948).

Verbindung durch fraktionierte Kristallisation aus 2-proz. Äthanollösung trennen läßt, wobei das Racemat zuerst ausfällt. Bemerkenswert ist, daß offensichtlich auch Rohprodukte eingesetzt werden können. Zur Auswertung müssen jedoch beide Fraktionen vollständig auskristallisieren.

Nach einem Verfahren von Kenner und Mitarbeitern [8] wird die Synthese von Carbobenzoxy-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl-glycin aus Carbobenzoxy-glycyl-L-alanin und L-Phenylalanyl-glycin oder L-Phenylalanyl-glycinmethylester untersucht. Die Diastereoisomere werden durch multiplikative Verteilung getrennt. Unter Umständen findet keine vollständige Trennung statt; dann muß die Drehung der DL-Fraktion kontrolliert werden. Kleine Mengen können nur noch abgeschätzt werden.

e) Chromatographische Verfahren. – Einige diastereoisomere Peptide ließen sich papierchromatographisch trennen [4, 9].

Gaschromatographische Trennung von diastereoisomeren N-Trifluoracetyl-dipeptid-methylestern

Bei der gaschromatographischen Analyse von N-TFA-Dipeptid-methylestern [*] [10–12] gelang es uns erstmals, zwei diastereoisomere Dipeptid-Derivate, N-TFA-L-Alanyl-L-phenylalanin-methylester und N-TFA-L-Alanyl-D-phenylalanin-methylester, an einer nur 2 m langen Säule zu trennen [10]. Inzwischen haben wir an Kapillarsäulen nach Golay weitere diastereoisomere N-TFA-Dipeptid-methylester trennen können. Dabei wurden zwei je 50 m lange Stahlsäulen verwendet, von denen die eine mit Polypropylenglykol (R-Säule von Perkin-Elmer) und die andere mit Polyphenyläther belegt war, (Säule OS 138 von Perkin-Elmer). Tabelle 1 zeigt die bisher untersuchten und getrennten N-TFA-Dipeptid-methylester zusammen mit den Versuchsbedingungen.

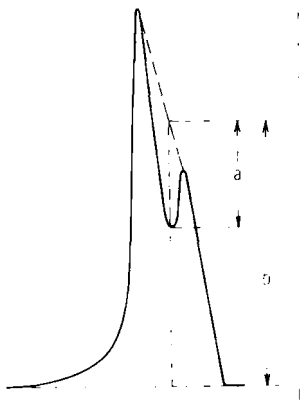


Abb. 1. Graphische Ermittlung der Auflösung $\delta = a/b$ [%].
Ordinate: Substanzmenge
Abszisse: Zeit

[8] D. W. Clayton, J. A. Farrington, G. W. Kenner u. J. M. Turner, J. chem. Soc. (London) 1957, 1398.

[9] J. W. Hinman, E. L. Caron u. H. N. Christensen, J. Amer. chem. Soc. 72, 1620 (1950); E. Taschner, Vortrag auf dem 5. Europäischen Peptidsymposium, Oxford 1962.

[*] TFA = Trifluoracetyl.

[10] F. Weygand, B. Kolb, A. Prox, M. A. Tilak u. I. Tomida, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 322, 38 (1960).

[11] F. Weygand, B. Kolb u. P. Kirchner, Z. analyt. Chem. 181, 396 (1961).

[12] F. Weygand, A. Prox, E. C. Jorgensen, R. Axén u. P. Kirchner, Z. Naturforsch., im Druck.

Tabelle 1. Gaschromatographische Trennung von diastereoisomeren N-Trifluoracetyl-dipeptid-methylestern an Kapillarsäulen. Bei allen Messungen wurde Stickstoff als Trägergas und Myristinsäuremethylester (C_{14}) als Standard verwendet.

Peptid	Kapillarsäule [a]	Trenntemp. [°C]	Strömung [Nml/min]	Gesamtretention C_{14} [min]	q_G [b] L.L.	q_G [b] D.L.	Auflösung [%]
Ala-Ala	R	180	2,19	25,13	0,92	0,86	93
Ala-Val	R	180	2,19	25,44	1,07	1,12	78
Ala-Leu	R	180	2,19	25,25	1,62	1,67	59
Ala-Phe	OS	221	1,62	9,38	5,16	5,84	99
Ala-Met	OS	221	1,62	8,94	3,55	3,72	51
Ala-But [c]	OS	184	0,70	39,50	0,72	—	Schulter
Val-Val	R	180	2,19	25,00	1,07	1,19	98
Val-Leu	R	180	2,19	24,88	1,64	1,77	87
Val-Phe	OS	221	1,62	8,88	5,37	6,11	100
Val-Met	OS	221	1,62	8,88	3,79	3,94	74
Leu-Val	R	180	2,19	25,13	1,45	1,58	99
Leu-Leu	R	180	2,19	25,19	2,14	2,29	92
Leu-Ileu	R	180	2,19	25,00	1,99	2,19	96
Leu-Met	OS	221	1,62	9,06	4,58	4,77	60
Leu-Pro	R	180	2,19	25,00	2,58	2,64	69
Leu-Phe	OS	221	1,62	9,44	6,39	7,20	99
Ileu-Val	OS	185	0,70	38,88	0,98	1,04	93
Pro-Val	OS	192	0,68	18,00	2,19	2,74	100
Met-Ala	OS	221	1,62	8,81	2,78	2,84	10
Met-Val	OS	221	1,62	8,88	3,15	3,41	93
Phe-Ala	OS	221	1,62	8,88	4,10	4,32	88
Phe-Val	OS	221	1,62	9,31	4,96	5,42	98
Phe-Leu	OS	221	1,62	9,29	6,55	6,78	70
Phe-But [c]	OS	221	1,62	8,81	4,79	5,18	96
Glu- α -Ala	OS	221	1,62	8,94	2,50	2,55	46
Glu- α -Val	OS	221	1,62	8,88	2,80	3,01	96
Glu- α -Leu	OS	221	1,62	8,75	3,82	3,92	79
Glu- α -Ileu	OS	221	1,62	8,88	3,70	3,96	94
Glu- γ -Ala [d]	OS	221	1,62	8,94	—	4,35	14
Glu- γ -Val [d]	OS	221	1,62	8,88	—	5,23	17
Glu- γ -Leu [d]	OS	221	1,62	8,75	—	7,36	Schulter
Glu- γ -Ileu [d]	OS	221	1,62	8,88	—	7,04	6
Ser-Leu [e]	OS	184	0,70	38,88	1,19	1,23	87
But-Val [c]	OS	193	0,68	34,69	0,83	0,90	97

[a] R = 50 m lange Stahlsäule mit Polypropylenglykol belegt (R-Säule von Perkin-Elmer); OS = 50 m lange Stahlsäule mit Polyphenyläther belegt (OS 138-Säule von Perkin-Elmer.)

[b] q_G ist die relative Gesamtretention der Diastereoisomeren, bezogen auf die Gesamtretention des Standards = 1,00. Wegen der Asymmetrie der Banden (siehe Abb. 2) wurden die Gesamtretentionen aus den Bandenanfängen bestimmt.

[c] But = α -Aminobuttersäure. Diese Verbindungen wurden aus Methionin-dipeptiden durch Entschwefelung mit Raney-Nickel erhalten [12].

[d] Es liegt noch keine Zuordnung der Banden vor.

[e] Als N-TFA-(O-Trimethylsilyl)-Ser-Leu-OCH₃ untersucht [12].

Die Trennung wird durch die Auflösung δ charakterisiert [13] (vgl. Abb. 1). Aus dem Zusammenhang zwischen Auflösung und Stoffüberlagerung (Tabelle 2) [14], der allerdings nur für ideale Gauss-Verteilungskurven gilt, folgt, daß beispielsweise bei 90% Auflösung 0,9% der nicht vollständig abgetrennten zweiten Komponente nicht mehr erkannt werden können. Für die quantitative Untersuchung der Racemisierung bei Peptidsyn-

Tabelle 2. Zusammenhang zwischen Auflösung und Stoffüberlagerung

Auflösung δ [%]	Stoffüberlagerung [%]
50	12,5
80	3,2
90	0,9
99	0,0001

[13] R. Kayser: Chromatographie in der Gasphase. Bibliographisches Institut, Mannheim 1961, Bd. I, S. 51.

[14] Vgl. [13], S. 53, Tab. 2 von dort entnommen.

thesen sind also nur Trennungen mit einer Auflösung über 90% brauchbar, wenn weniger als 1% der diastereoisomeren Verbindung nachgewiesen werden sollen. Die Auflösung wird durch Schwanzbildung beeinträchtigt, was in Tab. 1 berücksichtigt wurde. Sicherlich läßt sich die Auflösung der in Tab. 1 aufgeführten Verbindungen durch Veränderung der gaschromatographischen Bedingungen noch verbessern.

Abb. 2 zeigt Beispiele für die Diastereoisomerentrennung an einer R-Säule. Die Verbindungen wurden, in Essigester gelöst, gemeinsam aufgegeben.

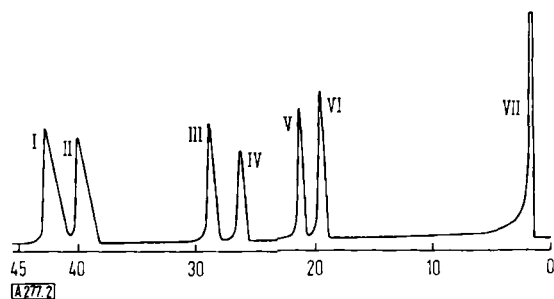


Abb. 2. Gaschromatographische Trennung von diastereoisomeren N-Trifluoracetyl-dipeptid-methylestern. 50-m-Stahlsäule, belegt mit Polypropylenglykol (Golay-Säule R von Perkin-Elmer). Trägergas: Stickstoff. Trenntemperatur: 180 °C. Strömungsgeschwindigkeit: 2,19 Nml/min.

- I = N-TFA-L-Leu-D-Leu-OCH₃
- II = N-TFA-L-Leu-L-Leu-OCH₃
- III = N-TFA-L-Leu-D-Val-OCH₃
- IV = N-TFA-L-Leu-L-Val-OCH₃
- V = N-TFA-L-Val-D-Val-OCH₃
- VI = N-TFA-L-Val-L-Val-OCH₃
- VII = Essigester

Abszisse: Zeit [min]

Racemisierungsuntersuchungen

Allgemeines

Die gaschromatographische Diastereoisomerentrennung ist bis jetzt auf Dipeptide mit zwei optisch aktiven Aminosäuren beschränkt. Tripeptide wurden noch nicht untersucht. LL- und DD-Verbindungen einerseits sowie LD- und DL-Verbindungen andererseits können nicht unterschieden werden. Daher kann nicht festgestellt werden, welche der beiden Aminosäuren bei einer Peptidsynthese racemisiert. Bei Dipeptidsynthesen unter Verwendung eines Aminosäureesters kann jedoch angenommen werden, daß höchstens die N-terminale, aktivierte Aminosäure racemisiert. Gegenteiliges wurde nicht beobachtet.

Die Vorteile der gaschromatographischen Untersuchung sind bedeutend. Die diastereoisomeren N-TFA-Dipeptid-methylester werden unabhängig von Lösungsmitteln, nicht umgesetzten Ausgangsverbindungen, Nebenprodukten, Zusätzen und sonstigen Verunreinigungen getrennt, und die Empfindlichkeit des Verfahrens übertrifft alle bisher angewendeten Methoden. Bei hoher Auflösung kann ein Diastereoisomeregehalt von weniger als 1% noch quantitativ bestimmt werden. Es läßt sich daher die Racemisierung bei den verschiedenartigsten Methoden der Peptidsynthese feststellen; die Be-

einflussung der Racemisierung durch induktive und sterische Effekte, durch Temperaturänderungen, durch Lösungsmittel und Zusätze wie Salze und tert. Basen kann schnell untersucht werden.

Trennbar sind nur die N-Trifluoracetyl-dipeptid-methylester. Ersetzt man jedoch andere Aminoschutzgruppen nach beendeter Peptidsynthese durch den Trifluoracetyl-Rest, ohne daß eine Fraktionierung oder Racemisierung stattfindet, so wird die Methode allgemein anwendbar. Aus den weiter unten zu besprechenden Ergebnissen folgt, daß beim Ersatz des Carboxybenzoxy-Restes durch den Trifluoracetyl-Rest keine Racemisierung stattfindet.

Infolge des starken induktiven Effektes der CF₃-Gruppe sollte bei der Synthese von N-TFA-Dipeptid-methylestern eine mindestens ebenso starke Racemisierung wie bei der Verknüpfung von N-Acyl-dipeptiden mit Peptid- oder Aminosäure-estern auftreten [4, 6, 15–23].

Die Fraktogramme werden durch integrale Ausmessung der Banden ausgewertet. Es wurde nachgewiesen, daß die Flächeninhalte praktisch linear von der Zusammensetzung einiger aus reinen Komponenten hergestellten Testmischungen abhängen. Die Testmischungen bestanden aus N-TFA-L-Valyl-L-valin-methylester und N-TFA-L-Valyl-D-valin-methylester sowie dem Diastereoisomerenpaar des N-TFA-Leucyl-valin-methylesters. Das Flächenverhältnis der Banden entsprach jeweils genau dem Gewichtsverhältnis der Komponenten. Für die Messungen wurde ein Flammenionisationsdetektor verwendet.

Es wird also die prozentuale Menge der diastereoisomeren Verbindung in der Gesamtmenge des Peptids ermittelt. Der Racemisierungsgrad ergibt sich durch Verdoppelung dieses Wertes. Der mittlere Fehler der Einzelmessung betrug ± 0,4 %. Bei der gaschromatographischen Untersuchung findet keine z. B. thermisch bedingte Racemisierung statt.

Ergebnisse

Bis jetzt wurden folgende Verfahren zur Herstellung der Peptidbindung untersucht:

1. Methode der aktivierten Ester (p-Nitrophenylester [24], Cyanmethylester [25, 26], Thiophenylester in Eisessig [27] und Vinylester [28]).
2. Dicyclohexylcarbodiimid-Methode [29].

- [15] J. R. Vaughan jr., J. Amer. chem. Soc. 74, 6137 (1952).
- [16] [a] G. W. Anderson, J. Blodinger u. A. D. Welcher, J. Amer. chem. Soc. 74, 5309 (1952); [b] G. W. Anderson u. R. Paul, ibid. 80, 4423 (1958).
- [17] J. A. Farrington, P. J. Hextall, G. W. Kenner u. J. M. Turner, J. chem. Soc. (London) 1957, 1407.
- [18] K. Hofmann, M. E. Woolner, G. Spühler u. E. T. Schwartz, J. Amer. chem. Soc. 80, 1486 (1958).
- [19] W. Grassmann, E. Wünsch u. A. Riedel, Chem. Ber. 91, 455 (1958).
- [20] R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel u. H. Zuber, Helv. chim. Acta 41, 1287 (1958).
- [21] H. Schwarz u. F. M. Bumpus, J. Amer. chem. Soc. 81, 890 (1959).
- [22] R. Schwyzer u. B. Iselin, Helv. chim. Acta 43, 1760 (1960).
- [23] K. Lübke u. E. Schröder, Z. Naturforsch. 16b, 765 (1961).
- [24] M. Bodanszky, Nature (London) 175, 685 (1955).
- [25] R. Schwyzer u. Mitarb., Helv. chim. Acta 38, 69, 80, 83 (1955).
- [26] F. Weygand u. W. Swodenk, Chem. Ber. 90, 639 (1960).
- [27] F. Weygand u. W. Steglich, Chem. Ber. 93, 2983 (1960).
- [28] F. Weygand u. W. Steglich, Angew. Chem. 73, 99 (1961).
- [29] J. P. Sheehan u. G. P. Hess, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

3. Azid-Methode [30].
4. Carbonyldiimidazol-Methode [16b].
5. Phosphorazo-Methode [31].
6. Methode der gemischten Anhydride [32].
7. Methode nach Woodward [33].
8. Methode nach Patchornik [34].

Bei der Ausführung hielten wir uns an die in den Originalarbeiten angegebenen Vorschriften; Besonderheiten sind in den Tabellen vermerkt.

Wir haben uns zunächst auf die Untersuchung der Synthese des Valyl-valins beschränkt, da sich hier der durch die beiden Isopropyl-Seitenketten bedingte sterische Effekt stark auswirken sollte. Für alle Versuche wurde L-Valin aus derselben Charge verwendet. Da bei einigen Synthesen keine Racemisierung beobachtet wurde, muß auch dieses L-Valin frei von Racemat gewesen sein. Wenn in den Tabellen der Racemisierungsgrad zu weniger als 2% angegeben ist, bedeutet das, daß unter den Versuchsbedingungen kein meßbares Signal für N-TFA-D-Val-L-Val-OCH₃ zu beobachten war.

a) Carbobenzoxo-valyl-valin-methylester

Der Carbobenzoxo-L-valyl-L-valin-methylester wurde folgendermaßen behandelt: nach dem Abdestillieren des leichtflüchtigen Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Essigester aufgenommen und die Lösung mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung, verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Essigesters im Vakuum wurde durch Erhitzen mit wasserfreier Trifluoressigsäure der Carbobenzoxo-rest entfernt [35]. Anschließend wurde die Trifluoressigsäure abdestilliert und mit Trifluoressigsäure-methylester unter Zusatz von Triäthylamin der Trifluoracetylrest eingeführt [36]. Die leichtflüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Essigester gelöst und mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde die Lösung in den Gaschromatographen gegeben. Bei allen Versuchen wurde auf die Bestimmung der Ausbeute verzichtet.

Bei der Synthese von Carbobenzoxo-L-valyl-L-valin-methylester nach den meisten Methoden tritt keine Racemisierung ein. Es ist dabei gleichgültig, ob der freie Valinmethylester verwendet oder erst im Lösungsmittel mit Triäthylamin aus dem Hydrochlorid freigesetzt wird. Lediglich bei der Cyanmethylester-Methode fanden wir eine Racemisierung von 2% (8 Std. bei 110°C in Essigester). Bei nur zweistündigem Erhitzen [25] hatte sich noch kein Peptid gebildet, woraus sich der reaktionsverlangsamende Einfluß der Isopropylgruppen zu erkennen gibt. Auch bei der Umsetzung von Carbobenzoxo-L-valin-thiophenylester in Eisessig mit freiem L-

Valin fanden wir Racemisierung, und zwar 29%. Bei sterisch wenig gehinderten Aminosäuren hatten wir seinerzeit [27], allerdings auf dem früher üblichen Wege, ermittelt, daß bei der Peptidsynthese aus Carbobenzoxo-aminosäure-thiophenylestern und Aminosäuren in Eisessig keine Racemisierung stattfindet.

b) N-Trifluoracetyl-valyl-valin-methylester

Ganz anders ist das Bild, das sich bei der Synthese von N-Trifluoracetyl-L-valyl-L-valin-methylester ergibt (Tabelle 3). Nur die Synthesen nach der Azid-Methode und der Vinylester-Methode verlaufen ohne Racemisierung [37].

Tabelle 3. Racemisierung bei der Darstellung von N-TFA-L-Val-L-Val-OCH₃

Methode	freier Ester	Ester·HCl. + N(C ₂ H ₅) ₃	Lösungsmittel	Temp. [°C]	Zeit [Std.]	Racemisierungsgrad [%]
Aktivierte Ester						
O-Vinyl	+	—	Malonester	+24	72	<2
O-Vinyl	+	—	Cyanessigester	+100	2	<2
O—CH ₂ CN	+	—	Essigester	+24	48	[b]
O—CH ₂ CN	+	—	Essigester	+110	2	[c]
			(Bad)			
O—CH ₂ CN	+	—	Essigester	+110	13	16,8
			(Bad)			
O—CH ₂ CN	—	+	Essigester	+110	8	21,6
			(Bad)			
S—C ₆ H ₅	freie Aminosäure		Eisessig	+130	2	38,6
			(Bad)			
Dicyclohexylcarbo-diimid	+	—	CH ₂ Cl ₂	—10	72	2,4
	+	—	CH ₂ Cl ₂	+24	72	7,2
	—	+	CH ₂ Cl ₂	—10	48	18,4
	—	+	CH ₂ Cl ₂	+24	48	42,0
Azid [a]	+	—	Essigester	—10	43	<2
	—	+	Essigester	—10	43	<2
Carbonyldiimidazol	+	—	THF [d]	—10	19	18,4
	+	—	THF	+24	23	90,8
	—	+	THF	+24	22	90,2
Woodward	+	—	CH ₃ CN	+24	13	69,4
Patchornik N-Bromsuccinimid	—	+	DMF [e]	0	7 min	23,4

[a] Aus umkristallisiertem N-TFA-L-Val-NHNH-Trityl hergestellt.

[b] Kein Peptid.

[c] Sehr wenig Peptid.

[d] THF = Tetrahydrofuran.

[e] DMF = Dimethylformamid.

Die Racemisierung bei den anderen Verfahren hängt vom Lösungsmittel, der Reaktionstemperatur und davon ab, wie der L-Valin-methylester eingesetzt wurde. Mit freiem Ester ist die Racemisierung geringer als wenn der Ester im Lösungsmittel aus dem Hydrochlorid mit Triäthylamin freigesetzt wird. Hierbei bleibt, je

[37] Nicht untersucht wurden bis jetzt die p-Nitrophenylester-Methode und die Phosphorazo-Methode. Die Methode der gemischten Anhydride ist nicht anwendbar, da bekannt war, daß sich hierbei leicht die 2-Trifluormethyloxazol-5-one bilden [F. Weygand, W. Steglich u. H. Tanner, Liebigs Ann. Chem. 658, 128 (1962)]. Nach neueren, gemeinsam mit W. v. Philipsborn und D. Mayer ausgeführten Untersuchungen (NMR-Spektren) liegen diese Verbindungen in der Pseudooxazolone-Form vor (unveröffentlicht).

[30] T. Curtius, Ber. dtsch. chem. Ges. 35, 3226 (1902); J. I. Harris u. T. S. Work, Biochem. J. 46, 582 (1950); N. A. Nyman u. R. M. Herbst, J. org. Chemistry 15, 108 (1950).

[31] S. Goldschmidt u. H. Lautenschlager, Liebigs Ann. Chem. 580, 68 (1953).

[32] T. Wieland u. R. Sehring, Liebigs Ann. Chem. 569, 122 (1950); R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta 34, 874 (1951); J. R. Vaughan jr., J. Amer. chem. Soc. 73, 3547 (1951); T. Wieland u. H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1951).

[33] R. B. Woodward, R. A. Olofson u. H. Meyer, J. Amer. chem. Soc. 83, 1010 (1961).

[34] Y. Wolma, P. M. Gallop u. A. Patchornik, J. Amer. chem. Soc. 83, 1263 (1961).

[35] F. Weygand u. W. Steglich, Z. Naturforsch. 14b, 472 (1959).

[36] F. Weygand u. R. Geiger, Chem. Ber. 92, 2099 (1959).

nach Lösungsmittel, stets ein Teil des Triäthylaminhydrochlorids in Lösung.

Die für die Racemisierung maßgeblichen Faktoren wurden an der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode untersucht. Aus Tabelle 4 ergibt sich, daß der Racemisierungsgrad bei einer Temperatursteigerung von -10°C auf

Tabelle 4. Einfluß der Temperatur auf die Racemisierung bei der Synthese von N-TFA-L-Val-L-Val-OCH₃ mit Dicyclohexylcarbodiimid. Lösungsmittel: Dichlormethan

freier Ester	Ester-HCl + 0,9 Äqu. TAA [°]	Temp. [°C]	Zusätze	Zeit [Std.]	Racemisierungsgrad [%]
+	—	—10	—	72	2,4
+	—	+24	—	72	7,2
+	—	—10	100 Mol-% TAA·HCl [°]	48	5,2
+	—	+24	100 Mol-% TAA·HCl	41	68,0
—	+	—10	—	48	<2
—	+	+24	—	41	43,6

[°] TAA = Triäthylamin.

Tabelle 5. Einfluß von Triäthylamin auf die Racemisierung bei der Synthese von N-TFA-L-Val-L-Val-OCH₃ mit Dicyclohexylcarbodiimid. Zur Synthese wurde der freie Ester eingesetzt.

Lösungsmittel	Temp. [°C]	Triäthylamin [Mol-%]	Zeit [Std.]	Racemisierungsgrad [%]
CH ₂ Cl ₂	+24	10	41	22,0
CH ₂ Cl ₂	+24	30	47,5	38,4
CH ₂ Cl ₂	+24	50	47,5	63,6
CH ₂ Cl ₂	+24	100	70	89,8
CH ₂ Cl ₂	—10	10	48	3,8
THF [°]	—10	10	90	3,6
THF	+24	10	24	17,0

[°] THF = Tetrahydrofuran.

Tabelle 6. Einfluß von Salzen auf die Racemisierung bei der Synthese von N-TFA-L-Val-L-Val-OCH₃ mit Dicyclohexylcarbodiimid. Zur Synthese wurde der freie Ester eingesetzt.

Lösungsmittel	Temp. [°C]	Salz [°] [Mol-%]	Zeit [Std.]	Racemisierungsgrad [%]
CH ₂ Cl ₂	+24	10 TAA·HCl	47	10,6
CH ₂ Cl ₂	+24	50 TAA·HCl	47	35,4
CH ₂ Cl ₂	+24	100 TAA·HCl	41	68,0
CH ₂ Cl ₂	—10	100 TAA·HCl	48	5,2
THF	—10	100 TAA·HCl	90	4,4
THF	+24	100 TAA·HCl	24	8,8
CH ₂ Cl ₂	+24	100 TAA·Ac	70	83,0
CH ₂ Cl ₂	+24	100 Py·HCl	70	36,4
CH ₂ Cl ₂	+24	100 Ester-HCl	67	13,4
THF	+24	100 LiBr	68	26,6
CH ₂ Cl ₂	+24	[**]	69	12,4

[°] TAA·HCl = Triäthylamin-hydrochlorid

TAA·Ac = Triäthylammonium-acetat

Py·HCl = Pyridin-hydrochlorid

Ester-HCl = Hydrochlorid des L-Val-OCH₃

[**] Zusatz von 100 Mol-% N-TFA-L-Val + 100 Mol-% L-Val-OCH₃

+24°C erheblich ansteigt. Der Zusatz von Triäthylamin (Tabelle 5) ergibt ebenfalls eine sehr wesentliche Erhöhung des Racemisierungsgrades. Aber auch Triäthylamin-hydrochlorid (Tabelle 6) bewirkt in Abhängigkeit von seiner Konzentration eine verstärkte Racemisierung. In Methylenchlorid und Tetrahydrofuran ist die Racemisierung nur bei tiefen Temperaturen

bei Verwendung des aus seinem Hydrochlorid mit Triäthylamin freigesetzten Esters gering. Auch andere Salze wie Triäthylammoniumacetat [38] oder Pyridinhydrochlorid in Methylenchlorid sowie Lithiumbromid in Tetrahydrofuran rufen eine beträchtliche Racemisierung hervor. Demgegenüber bewirkt L-Valinmethylester-hydrochlorid nur eine Zunahme der Racemisierung auf etwa das Doppelte.

Tabelle 7 zeigt, daß in Dimethylformamid, das häufig angewendet wird, bei 24°C eine erhebliche Racemisierung auftritt. Der gebildete Dicyclohexylharnstoff bleibt hier in Lösung.

Tabelle 7. Einfluß des Lösungsmittels auf die Racemisierung bei der Synthese von N-TFA-L-Val-L-Val-OCH₃ mit Dicyclohexylcarbodiimid.

freier Ester	Ester-HCl + 0,9 Äqu. TAA [a]	Lösungsmittel [b]	Zusatz [Mol-%] [a] [c]	Zeit [Std.]	Racemisierungsgrad [%]
Temperatur: -10°C					
+	—	CH ₂ Cl ₂	10 TAA	48	3,8
+	—	CH ₂ Cl ₂	100 TAA·HCl	48	5,2
—	+	CH ₂ Cl ₂	—	48	<2
+	—	THF	10 TAA	90	3,6
+	—	THF	100 TAA·HCl	90	4,4
—	+	THF	—	90	<2(1,8)

Temperatur: $+24^{\circ}\text{C}$

+	—	CH ₂ Cl ₂	10 TAA	41	22,0
+	—	CH ₂ Cl ₂	100 TAA·HCl	41	68,0
—	+	CH ₂ Cl ₂	—	41	43,6
+	—	THF	10 TAA	24	17,0
+	—	THF	100 TAA·HCl	24	8,8
—	+	THF	—	24	19,0
+	—	DMF	—	70	53,4
+	—	DMF	10 TAA	90	59,4
+	—	DMF	100 TAA·HCl	91	62,6
—	+	DMF	—	91	58,8

[a] TAA = Triäthylamin.

[b] THF = Tetrahydrofuran, DMF = Dimethylformamid.

[c] TAA·HCl = Triäthylamin-hydrochlorid.

Mit zunehmender Reaktionszeit steigt der Racemisierungsgrad nur geringfügig. Er beträgt nach 24 Std. 56,0%, nach 48 Std. 57,2% und nach 96 Std. 61,8%, wenn man von freiem L-Val-OCH₃ ausgeht, in CH₂Cl₂ bei 24°C arbeitet und dem Ansatz 100 Mol-% Triäthylamin-hydrochlorid zusetzt.

Da beim Arbeiten nach der Carbonyldiimidazol-Methode starke Racemisierung festgestellt wurde, haben wir geprüft, wie sich ein Zusatz an Imidazol oder N-Benzylimidazol auf die Ergebnisse der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode auswirkt. In beiden Fällen betrug der Racemisierungsgrad etwa 80%. Auch der Zusatz von Wasser zum Lösungsmittel (Tetrahydrofuran) bewirkte starke Racemisierung (55,8%). Wir nehmen an, daß die Racemisierung bei der Peptidsynthese nach der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode in erster Linie auf der intermediären Bildung von Oxazolonen, die sehr schnell racemisieren, beruht. Tatsächlich kann man das 2-Trifluormethyl-4-isopropyl-pseudooxazol-5-on (1) als Zwischenprodukt bei der Umsetzung von N-TFA-L-Valin mit L-Valinmethylester und Dicyclohexylcarbodiimid in absolutem Tetrahydrofuran

[38] Bei diesem Versuch entstand auch N-Acetyl-valin-methylester.

bei 20 °C nachweisen (Abb. 3). Das sich schnell bildende Pseudooxazon reagiert mit Valinmethylester zum N-TFA-DL-Valyl-L-valin-methylester [39]. Es verschwindet daher mit zunehmender Reaktionszeit.

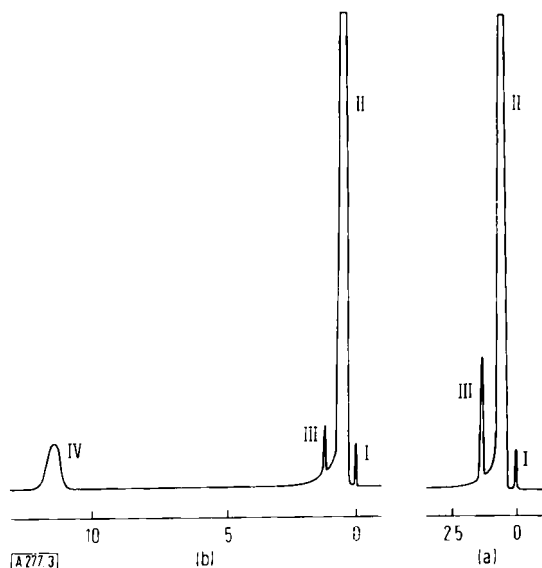


Abb. 3. Gaschromatographischer Nachweis der Oxazon-Bildung bei der Synthese von N-TFA-Val-Val-OCH₃ nach der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode. a) Nach 30 min Reaktionszeit; b) nach 75 min Reaktionszeit.

Reaktionsbedingungen: je 10⁻³ Mol N-TFA-L-Val-OH, L-Val-OCH₃ und Dicyclohexylcarbodiimid wurden in 1 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran bei 20 °C miteinander umgesetzt.

Gaschromatographie: 2-μl-Proben wurden an 2 m langen mit Silicofett belegten, gepackten Säulen bei 172 °C mit 30 Nml Helium/min getrennt.

I = Luft.

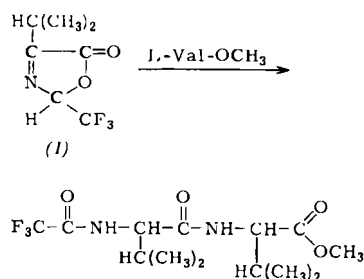
II = Tetrahydrofuran.

III = 2-Trifluormethyl-4-isopropyl-pseudooxazol-5-on.

IV = Caprinsäure-methylester als Vergleichssubstanz.

Abzisse: Zeit [min].

Bei der Umsetzung von destilliertem 2-Trifluormethyl-4-isopropyl-pseudooxazol-5-on (I) (aus DL-Valin gewonnen) mit L-Valinmethylester in absolutem Tetrahydrofuran bei 20 °C entstehen 74% LL- und 26% DL-N-TFA-dipeptidmethylester, wie gaschromatographisch festgestellt wurde.



Schlußfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen und erweitern die bisherigen Erfahrungen über die Racemisierung bei Peptidsynthesen. Bei Verwendung von N-Acylamino-

säuren mit Schutzgruppen vom Urethan-Typ (Carbobenzoxgruppe) ist die Gefahr der Racemisierung am geringsten. Synthesen über Azide nach Curtius verlaufen racemisierungsfrei, da auch bei der Synthese des N-Trifluoroacetyl-dipeptidesters keine Racemisierung beobachtet wurde. Ebenso gut ist die Vinylester-Methode. Leider lassen sich aber Vinylester von Peptiden noch nicht glatt herstellen.

Bei allen anderen Methoden, die von N-Acyl-Peptiden ausgehen, ist mit Racemisierung zu rechnen. Deshalb sollten diese Methoden zur Synthese von Peptiden nicht angewendet werden, zumal dabei der Ausschluß von Salzen jeglicher Art, starken Basen und polaren Lösungsmitteln unbedingt erforderlich ist.

Die Ergebnisse, die bei Zusatz von Imidazol oder N-Benzylimidazol bei der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode erhalten wurden, geben wichtige Hinweise für die Synthese von histidin-haltigen Sequenzen. Bereits K. Hofmann und Mitarbeiter [18] haben bei der Peptidsynthese aus Carbobenzox-L-His-L-Phe-L-Nitro-Arg-OH und L-Tyr-Gly-O-Benzyl mit Dicyclohexylcarbodiimid Racemisierung am Arginin-Teil des Peptids beobachtet, und ebenso haben Riniker und Schwyzer [4] bei der Umsetzung von Carbobenzox-L-Val-L-Tyr-OH mit L-Val-L-His-L-Pro-L-Phe-OCH₃ Racemisierung (etwa 30%) im Tyrosinteil des Hexapeptids gefunden. Wir möchten diese Racemisierungen auf die Anwesenheit des Histidins zurückführen, da wir bei Imidazol- oder N-Benzylimidazol-Zusatz einen starken Anstieg der Racemisierung beobachteten. Histidin-haltige Sequenzen sollten daher nur über Acylaminosäuren mit Urethanstruktur oder aus Acylpeptiden nach der Azidmethode dargestellt werden.

Diese Einschränkungen gelten selbstverständlich nicht, wenn Glycin carboxylendständig ist. Das Verhalten von carboxylendständigem Prolin oder von N-Methylaminosäuren, bei denen die Oxazonbildung nicht möglich ist, muß noch untersucht werden, ebenso stehen Untersuchungen mit Tosyl- oder Phthalylaminosäuren noch aus.

Weitere Untersuchungen sollen den Einfluß der Seitenketten der N-terminalen Aminosäure auf die Synthese von N-TFA-Dipeptid-methylestern klären, vor allem bei den racemisierungsempfindlichen Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin [4, 21, 40]. Es sollte möglich sein, auch die Racemisierung bei der Verknüpfung von Acyl-peptiden mit Peptidestern gaschromatographisch zu untersuchen, wenn die Partialhydrolyse mit 5 bis 6 N HCl zu den Dipeptiden racemisierungsfrei verläuft. Bisher haben wir nur Carbobenzox-Gly-L-Ala-L-Phe-Gly-OCH₃ partial hydrolysiert und in dem mit Methanol/HCl veresterten und N-trifluoracetylierten Hydrolysat – allerdings bei noch nicht über 90-proz. Auflösung – nur N-TFA-L-Ala-L-Phe-OCH₃ und kein diastereoisomeres Peptid gefunden. Damit im Zusammenhang steht die Frage, ob man D-Aminosäuren, die in Peptiden vorkommen, gaschromatographisch in Form der N-TFA-Dipeptid-methylester nachweisen kann.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit durch eine Sachspende.

Eingegangen am 17. Dezember 1962

[A 277]

[39] F. Weygand u. U. Glöckler, Chem. Ber. 89, 653 (1956); F. Weygand, W. Steglich u. H. Tanner, Liebigs Ann. Chem. 658, 128 (1962).

[40] B. Iselin u. R. Schwyzer, Helv. chim. Acta 43, 1760 (1960), Racemisierung bei der Darstellung von Carbobenzox-L-Val-L-Tyr-O-[p-NO₂-C₆H₄].