

GÜNTER LOSSE

RACEMATSPALTUNG DES DL-ALANYL-GLYCIN-ÄTHYLESTERS
MIT DIBENZOYL-D-WEINSÄURE¹⁾Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Halle (Saale)
(Eingegangen am 18. März 1957)

Es wird die Gewinnung der optisch reinen Antipoden des Alanyl-glycins und Alanyl-glycin-äthylesters durch Spaltung des *racem.*-Alanyl-glycin-äthylesters mit Dibenzoyl-D-weinsäure beschrieben und die Verwendbarkeit der so erhaltenen Ester für die Synthese höherer aktiver Peptide gezeigt.

Die Synthese optisch aktiver Peptide aus D- oder L-Aminosäuren ist auf Grund der üblichen Ausbeuteverluste nicht nur mit Einbußen an optisch aktivem Material verbunden, sondern sie erfordert auch optisch reine Aminosäuren, die nach den bisher angewendeten chemischen oder enzymatischen Verfahren nicht immer leicht zugänglich sind. Nachdem in früheren Arbeiten Racematspaltungen einer Reihe von Aminosäureestern mit D-Weinsäure oder Dibenzoyl-D-weinsäure beschrieben worden sind²⁾, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, ein einfaches Peptid über den Ester mit Dibenzoyl-weinsäure in die Antipoden zu zerlegen, d. h. die aktiven Komponenten erst nach der Synthese aus racemischem Material zu gewinnen. Eingeengt wird die Anwendbarkeit dieser Methode dadurch, daß Peptide mit mehreren asymmetrischen Aminosäurebausteinen bei der Spaltung zahlreiche Diastereomere liefern und unübersichtliche Verhältnisse schaffen. Deshalb sollen sich diese und kommende Arbeiten mit Racematspaltungen von Peptiden mit nur einem asymmetrischen Kohlenstoffatom befassen. Es wird jedoch weiter unten gezeigt, daß sich auch aus den Peptidestern, wie sie durch Racematspaltung anfallen, höhere optisch aktive Peptide aufbauen lassen.

Die Racematspaltung des DL-Alanyl-glycinesters läßt sich wie folgt durchführen: Bringt man aus dem Hydrochlorid nach G. HILLMANN³⁾ in Freiheit gesetzten Alanyl-glycin-äthylester mit Dibenzoyl-D-weinsäure im Mol.-Verhältnis des *neutralen* Tartrates in alkoholischer Lösung zusammen, so wird bei richtiger Alkoholkonzentration etwa 1/3 des eingesetzten Esters mit ca. 80–90-proz. optischer Reinheit als L-Ester-D-hydrogentartrat ausgeschieden. In der Mutterlauge verbleibt der restliche Ester, teilweise als Salz an Dibenzoylweinsäure gebunden, mit einem Gehalt von 40–50% an D-Verbindung.

Bessere Spaltungsergebnisse werden erzielt, wenn man von vornherein die Mengenverhältnisse des *sauren* Tartrates wählt. In diesem Falle scheidet sich die Hälfte des gelösten Salzes mit 90-proz. Reinheit als L-Alanyl-glycin-äthylester-dibenzoyl-

¹⁾ I. Mitteil. über die Racematspaltung von Peptidestern.

²⁾ G. LOSSE und H. JESCHKEIT, Chem. Ber. 90, 1275 [1957]; G. LOSSE, ebenda 87, 1279 [1954]; W. LANGENBECK und O. HERBST, ebenda 86, 1524 [1953].

³⁾ Z. Naturforsch. 1, 682 [1946].

D-hydrogentartrat aus, der in der Mutterlauge verbleibende Rest besteht zu 70% aus D-Alanyl-glycin-äthylester-dibenzoyl-D-hydrogentartrat.

Aus den diastereomeren Salzen erhält man durch Hydrolyse nach J. L. BAILEY⁴⁾ und anschließende Extraktion der Dibenzoylweinsäure die Antipoden des Peptides, die sich durch ein- bis zweimaliges Umfällen optisch rein gewinnen lassen. Weiterhin sind aus den Tartraten durch Überführen in die Hydrochloride⁵⁾ nach HILLMANN³⁾ die aktiven Ester zugänglich. Sorgt man dafür, daß sich die Dibenzoylweinsäure kristallin aus dem Reaktionsprodukt abscheidet, so lassen sich auch die Dibenzoyltartrate direkt nach dem Verfahren von HILLMANN zerlegen. Geht man von den gereinigten Dibenzoyltartraten aus, so werden auf diese Weise nahezu optisch reine Ester und Peptide erhalten.

Die Möglichkeit, die diastereomeren Peptidester-dibenzoyltartrate mit ammoniakalischem Chloroform direkt zu zerlegen, besitzt gerade im Falle des Alanyl-glycin-äthylesters Bedeutung, da das Hydrochlorid stark hygroskopisch ist und sich über diese Stufe nur schwierig trockene chloroformische Esterlösungen darstellen lassen, wie sie bei der BAILEYSchen Synthese⁴⁾ nötig sind. Durch direkte Zerlegung der Tartrate, Vertreibung des Ammoniaks und Umsetzung mit Anhydro-N-carboxyaminoäuren werden dagegen höhere Peptide wie L-Alanyl-L-alanyl-glycin, D-Alanyl-D-alanyl-glycin und L-Leucyl-L-alanyl-glycin in guten Ausbeuten gewonnen.

Herrn Prof. Dr. LANGENBECK danke ich für sein förderndes Interesse an dieser Arbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Ausgangsstoffe: DL-Alanyl-glycin: aus α -Brompropionyl-glycin und Ammoniak^{6,7,8)}. Schmp. 235°. DL-Alanyl-glycin-äthylester durch zweimalige Veresterung des Peptides mit absolut. Alkohol und Salzsäure; das nach dem Vertreiben des Alkohols i. Vak. verbleibende ölige Esterhydrochlorid wurde nach HILLMANN³⁾ unter Zugabe von etwas Natriumsulfat in den Ester übergeführt. Ausb., bezogen auf Peptid: 85% d. Th.

Rohester: $C_7H_{14}O_3N_2$ (174.2) Ber. N 16.00 Gef. N 14.81

Das Hydrochlorid und Hydrobromid des Methylesters erwies sich ebenfalls als stark hygroskopisch.

Dibenzoyl-D-weinsäure: Nach L. BUTLER und L. H. CRETCHER⁹⁾. $[\alpha]_D^{20}$: -110° (c = 0.9, in Äthanol). Schmp. 89--90°.

Spaltung des DL-Alanyl-glycin-äthylesters mit Dibenzoyl-D-weinsäure im Mol.-Verhältnis 2:1: Die Lösung von 14.0 g Ester in 45 ccm absolut. Alkohol wurde mit einer filtrierten Lösung von 15.0 g Dibenzoyl-D-weinsäure in 130 ccm absolut. Alkohol bei Zimmertemperatur vereinigt und 24 Stdn. stehengelassen. Die abgeschiedenen Kristalle von L-Alanyl-glycinester-dibenzoyl-D-hydrogentartrat wurden abgesaugt und getrocknet. Ausb. 13.5 g; Schmp. 181–182°, $[\alpha]_D^{20}$: -65° (c = 0.26, in Äthanol).

$C_{25}H_{28}O_{11}N_2$ (533.3) Ber. C 56.29 H 5.26 N 5.26 Gef. C 55.65 H 5.29 N 5.34

4) J. chem. Soc. [London] 1950, 3462.

5) G. LOSSE und H. JESCHKEIT, Chem. Ber. 90, 1275 [1957].

6) N. ZELINSKY, Ber. dtsch. chem. Ges. 20, 2026 [1887].

7) E. FISCHER und W. AXHAUSEN, Liebigs Ann. Chem. 340, 128, 130 [1905].

8) E. FISCHER und O. WARBURG, Liebigs Ann. Chem. 340, 166 [1905].

9) J. Amer. chem. Soc. 55, 2605 [1933].

Zur Überführung in *L*-Alanyl-glycin wurde das Salz mit überschüssigem 0.37 *n* Ba(OH)₂ 15 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen, dann mit 0.37 *n* H₂SO₄ bis zur Bildung des neutralen Peptidsulfates versetzt, von Bariumsulfat und Dibenzoylweinsäure abgesaugt und Reste von Dibenzoylweinsäure mit Äther extrahiert. Nach Neutralisation mit 0.37 *n* Ba(OH)₂ und Filtration wurde i. Vak. eingeengt und mit Aceton gefällt. Ausb. 83% *L*-Alanyl-glycin. Schmp. 228–231°; $[\alpha]_D^{20}$: +41.1° (c = 1.03, in Wasser), entspr. 86% optischer Reinheit. Durch Umfällen aus Wasser-Aceton erhält man die reine Verbindung: Schmp. 232–234°; $[\alpha]_D^{21}$: +48.3° (c = 1.10, in Wasser).

$C_5H_{10}O_3N_2$ (146.2) Ber. N 19.11 Gef. N 18.76

Die Mutterlauge des Spaltansatzes enthält noch 60–70% des eingesetzten Esters als rohe *D*-Verbindung mit Resten von Dibenzoylweinsäure. Sie wird aufgearbeitet durch Abdestillieren des Alkohols i. Vak. und Ätherzugabe. Dabei wird ein Öl gewonnen ($[\alpha]_D^{21}$: −50° bis −55°; c = 0.4, in Alkohol), das wie beschrieben mit Ba(OH)₂ hydrolysiert wird. Man erhält ein *D*-Alanyl-glycin mit einer optischen Reinheit von 40–50% (Schmp. 222–226°), welches durch fraktionierte Kristallisation aus Wasser-Aceton rein gewinnbar ist. Schmp. 233–235°; $[\alpha]_D^{20}$: −46.6° (c = 1.02, in Wasser).

$C_5H_{10}O_3N_2$ (146.2) Ber. N 19.11 Gef. N 18.93

Spaltung des DL-Alanyl-glycin-äthylesters mit Dibenzoyl-D-weinsäure im Mol.-Verhältnis 1:1: Die Lösung von 22.0 g Peptidester in 100 ccm absol. Alkohol wurde mit einer filtrierten Lösung von 47.0 g *Dibenzoyl-D-weinsäure* in 1100 ccm absol. Alkohol vereinigt und 24 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. *L*-Alanyl-glycin-äthylester-dibenzoyl-D-hydrogentartrat: Ausb. 33.5 g; Schmp. 185°; $[\alpha]_D^{21}$: −67° (c = 0.2, in Alkohol). Nach Umkristallisation aus Alkohol-Äther: Schmp. 188–189°; $[\alpha]_D^{21}$: −64° (c = 0.23, in Alkohol).

$C_{25}H_{28}O_{11}N_2$ (533.3) Ber. C 56.29 H 5.26 N 5.26 Gef. C 56.13 H 5.23 N 5.34

Zerlegung des Salzes mit 0.37 *n* Ba(OH)₂ führt, wie oben beschrieben, in 70–80-proz. Ausbeute zum reinen *L*-Alanyl-glycin: Schmp. 233–235°; $[\alpha]_D^{21}$: +49.1° (c = 1.25, in Wasser).

Ber. N 19.11 Gef. N 18.77

Zur Gewinnung von *L*-Alanyl-glycin-äthylester wird das Tartrat mit wenig Alkohol überschichtet, Chlorwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet und mit viel absol. Äther das schmierige Esterhydrochlorid gefällt⁵⁾, aus dem mit ammoniakalischem Chloroform unter Natriumsulfatzugabe der Ester erhalten wird⁵⁾.

Zur direkten Aufarbeitung des Tartrates zu dem Peptidester zersetzt man das Salz unter gutem Kühlen mit einem geringen Überschuß von ammoniakalischem Chloroform. Zu der klaren Lösung wird dann Kaliumcarbonat zugefügt und mit dem dreifachen Volumen trockenen Chloroforms verdünnt, wobei sich das Ammoniumdibenzoyltartrat abscheidet. Man lässt 1 Stde. stehen, saugt ab, behandelt nochmals mit Kaliumcarbonat und filtriert unter Aktivkohlezugabe. Die Methode ist auch für die Aminosäureester-dibenzoyl-D-tartrate anwendbar⁵⁾. Ausb. 80–90%; $[\alpha]_D^{20}$: +3.2° (c = 14, in Alkohol).

15 Min. mit 0.37 *n* Ba(OH)₂ bei 20° hydrolysiert⁴⁾. Ausb. 88% d. Th. an *L*-Alanyl-glycin: Schmp. 234–235°; $[\alpha]_D^{21}$: +49.2° (c = 0.95, in Wasser).

$C_5H_{10}O_3N_2$ (146.2) Ber. C 41.01 H 6.85 N 19.11 Gef. C 41.15 H 6.63 N 18.93

Aus der Mutterlauge des Spaltansatzes wird durch Abdampfen des Alkohols i. Vak. und Fällung mit Äther das *D*-Alanyl-glycin-äthylester-dibenzoyl-D-hydrogentartrat gewonnen. Ausb. 32.8 g; Schmp. 148–153°; $[\alpha]_D^{21}$: −72° (c = 0.29, in Alkohol). Das Salz wird einmal aus Alkohol-Äther umkristallisiert. Durch Zerlegung des Tartrates mit 0.37 *n* Ba(OH)₂ und

Umfällen des entstandenen Peptides erhält man praktisch reines *D-Alanyl-glycin*: Schmp. 234–236°; $[\alpha]_D^{21} : -46.2^\circ$ ($c = 1.10$, in Wasser). Ber. N 19.11, gef. N 18.79.

Zur Aufarbeitung des Estertartrates auf *D-Alanyl-glycinester* wird wie oben verfahren. Ausb. 80%. $[\alpha]_D^{21} : -2.8^\circ$ ($c = 12$, in Alkohol).

15 Min. bei 21° mit 0.37 *n* Ba(OH)₂ hydrolysiert. Ausb. 79% *D-Alanyl-glycin*: Schmp. 232–233°; $[\alpha]_D^{21} : -45.6^\circ$ ($c = 1.15$, in Wasser).

Gef. C 40.22 H 7.04 N 18.74

Verzichtet man auf ein Umkristallisieren der diastereomeren Peptidester-dibenzoyl-*D*-hydrogentartrate, so wird *L-Alanyl-glycin* und der Äthylester in 80–90-proz. optischer Reinheit, *D-Alanyl-glycin* und sein Äthylester in 60–70-proz. optischer Reinheit gewonnen.

Synthese von Tripeptiden mit optisch aktiven Alanylglycinestern

1. *L-Alanyl-L-alanyl-glycin*

*L-Ananin*¹⁰⁾: Schmp. 289–290°; $[\alpha]_D^{21} : +9.2^\circ$ ($c = 0.8$, in Salzsäure).

*Anhydro-N-carboxy-L-alanin*⁴⁾, Schmp. 69–75°, wurde nach Vorschrift von BAILEY⁴⁾ mit chloroformischer Lösung von *L-Alanyl-glycin-äthylester* und Triäthylamin vereinigt. Nach Aufarbeitung und mehrmaligem Umkristallisieren *L-Alanyl-L-alanyl-glycin*: Schmp. 236 bis 238°; $[\alpha]_D^{21} : -45.8^\circ$ ($c = 1.05$, in Wasser).

2. *D-Alanyl-D-alanyl-glycin*

Darstellung entspr. l. c.⁴⁾ aus *D-Alanin*¹⁰⁾ über den Leuchsschen Körper und die chloroformische Lösung von *D-Alanyl-glycin-äthylester* in Gegenwart von Triäthylamin. Schmp. 232–235°; $[\alpha]_D^{21} : +42.5^\circ$ ($c = 1.12$, in Wasser)¹¹⁾.

3. *L-Leucyl-L-alanyl-glycin*

*L-Leucin*⁵⁾: Schmp. 293–295°, $[\alpha]_D^{21} : -8.8^\circ$ ($c = 1.2$, in Wasser).

*Anhydro-N-carboxy-L-leucin*⁴⁾, Schmp. 69–72°, wurde mit chloroformischer Esterlösung und Triäthylamin umgesetzt⁴⁾. Aufarbeitung und wiederholtes Umkristallisieren führte zum Tripeptid. Schmp. 242–248°; $[\alpha]_D^{21} : -15.3^\circ$ ($c = 1.5$, in Wasser).

¹⁰⁾ W. LANGENBECK und O. HERBST, Chem. Ber. **86**, 1524 [1953].

¹¹⁾ P. A. LEVENE und M. H. PFALTZ, J. biol. Chemistry **70**, 222 [1926].