

BILDUNG VON GLUTAMINSÄURE- γ -ÄTHYLESTER UND GLUTAMINSÄURE- γ -(2-HYDROXY-ÄTHYL)-ESTER BEI DER HYDROLYSE VON GLUTAMINSÄURE- γ -BENZYLESTER MIT DIOXAN/HCl

K. P. POLZHOFFER und K. H. NEY

Unilever Forschungslaboratorium Hamburg

(Received in Germany 3 March 1970; Received in the UK for publication 25 March 1970)

Abstract—During the solid phase peptide synthesis the yields of the individual coupling steps were controlled by amino acid analyses of the peptidyl polymer. In the hydrolysis of peptides containing glutamic acid with dioxan/HCl two substances were formed which were not amino acids. One of the compounds was identified as γ -ethyl glutamate, the other one was probably γ -(2-hydroxyethyl)-glutamate. Dioxan/HCl was favourably replaced by glacial acetic acid/HCl

EINLEITUNG

WÄHREND der Synthese eines Glu-haltigen Eicosapeptids¹ nach der Merrifield-Methode wurden die Umsätze bei den Kupplungsschritten durch Aminosäure-Analysen kontrolliert. Das Peptid-Harz wurde dazu in einem 6n HCl/Dioxan/Wasser-Gemisch²⁻¹⁰ in der Hitze hydrolysiert. Dabei entstanden zwei Substanzen, die bei der Moore- und Stein-Analyse^{11, 12} keiner Aminosäure zugeordnet werden konnten (Abb. 1). Diese Substanzen sollten identifiziert werden.

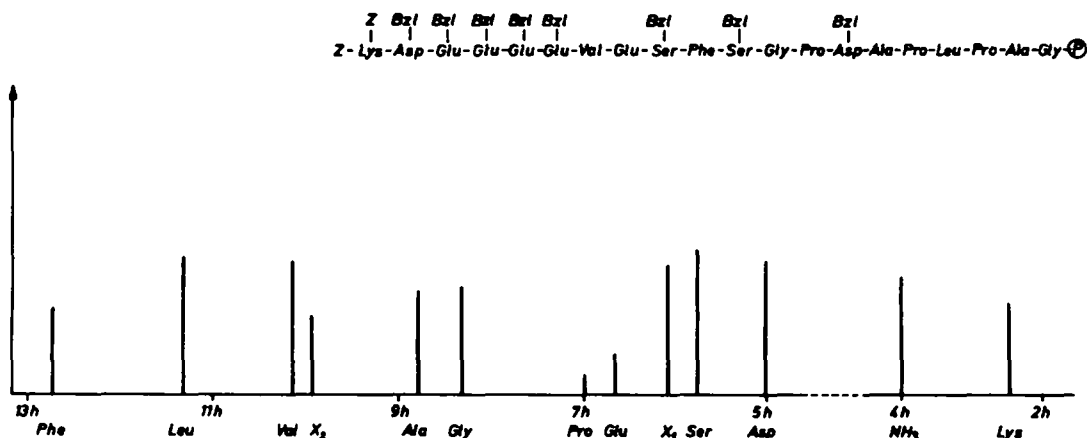


ABB. 1. Eicosapeptidyl-Harz; Hydrolyse: Dioxan/HCl.

METHODEN UND ERGEBNISSE

Vergleicht man das Aminosäure-Chromatogramm des Dioxan/HCl-Hydrolysates des geschützten Eicosapeptidyl-Harzes Z-Lys(Z)-Asp(Bzl)-Glu(Bzl)-Glu(Bzl)-Glu(Bzl)-Val-Glu(Bzl)-Ser(Bzl)-Phe-Ser(Bzl)-Gly-Pro-Asp(Bzl)-Ala-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-P (Abb. 1) mit dem des freien Peptides, hydrolysiert in 6*n* wässriger HCl (Abb. 2), so erkennt man im Falle der Dioxan/HCl-Hydrolyse (Abb. 1) zwei zusätzliche Peaks X_1 und X_2 .

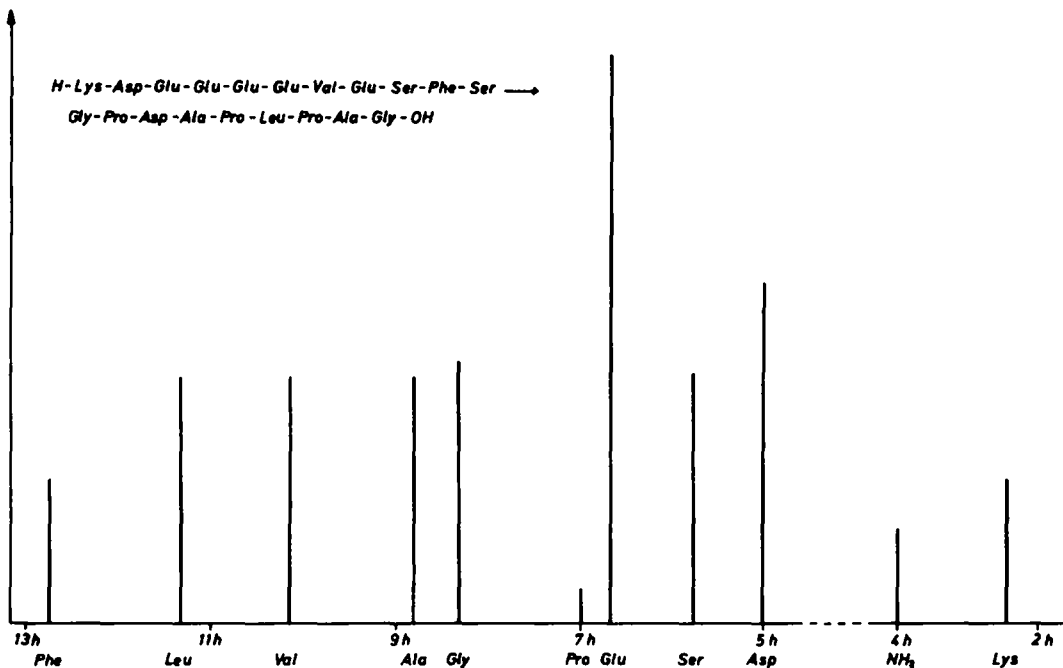


ABB. 2. Eicosapeptid; Hydrolyse: 6*n* HCl.

Zur weiteren Untersuchung wurde von uns statt des wertvollen Eicosapeptidyl-Harzes ein Gemisch von synthetischem β -Benzyl-Asp¹³: γ -Benzyl-Glu¹⁴: O-Benzyl-Ser¹⁵ = 2:5:2 (Molverhältnis) eingesetzt. Das Molverhältnis entspricht dem molaren Aminosäureverhältnis im Peptid. Das Gemisch wurde in Dioxan/HCl, 6*n* wässriger HCl und Eisessig/HCl^{16, 17} hydrolysiert. Nur bei der Dioxan/HCl-Hydrolyse wurden die beiden unbekannten Substanzen X_1 und X_2 gebildet (Abb. 3).

Man könnte annehmen, dass Dioxan/HCl die Schutzgruppen unvollständig abspaltet; X_1 und X_2 wären in diesem Falle β -Benzyl-Asp, γ -Benzyl-Glu oder O-Benzyl-Ser. β -Benzyl-Asp und O-Benzyl-Ser wurden jedoch bei der Chromatographie nach Spackman, Moore und Stein^{11, 12} später als Phe eluiert; γ -Benzyl-Glu konnte mit Citratpuffer bei pH 5-10 nicht vom Austauscher abgelöst werden.

Nach Dioxan/HCl-Hydrolyse von O-Benzyl-Ser, β -Benzyl-Asp und γ -Benzyl-Glu waren nur im Hydrolysat von γ -Benzyl-Glu X_1 und X_2 nachzuweisen. Sie entstehen demnach nur aus einem Glu-Derivat.

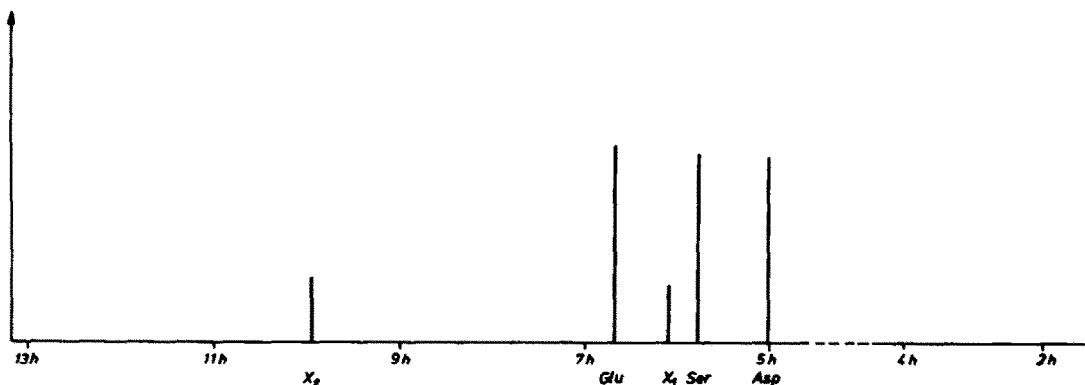


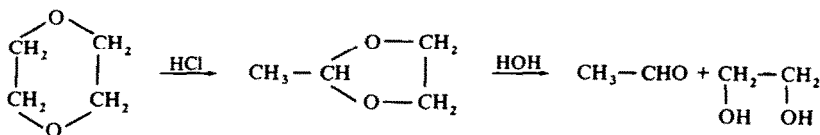
ABB. 3. β -Bzl-L-Asp: γ -Bzl-L-Glu: O-Bzl-L-Ser = 2:5:2 (Molverhältnis); Hydrolyse: Dioxan/HCl; im Vakuum.

In den nächsten Versuchen wurde die Reaktion von γ -Benzyl-Glu in Äthanol/HCl und in Äthylenglykol/HCl untersucht. Bei Äthanol/HCl-Hydrolyse bildet sich Substanz X_2 . Durch Vergleich der Retentionszeiten von X_2 und synthetischem γ -Äthyl-Glu¹⁸ konnte X_2 als γ -Äthyl-Glu identifiziert werden. Die Hydrolyse von γ -Benzyl-Glu mit Äthylenglykol/HCl ergab neben wenig Glu die Substanz X_1 . X_1 kann aus folgenden Gründen als γ -(2-Hydroxyäthyl)-Glu angesehen werden: Die Retentionszeit von X_1 entspricht der einer Aminosäure (Abb. 1). Der Bis(2-hydroxy-äthyl)-Glu-ester ($pK_{NH_2} \sim 9$) würde mit dem üblichen Citratpuffer (pH 5-1) nicht vom Kationenaustauscher eluiert werden.

DISKUSSION

Dioxan/HCl ist zur Hydrolyse von Glutaminsäure-haltigen Peptidyl-Harzen während der Merrifield-Synthese ungeeignet. Aus Glutaminsäure entstehen dabei γ -Äthyl-Glu und γ -(2-Hydroxyäthyl)-Glu.

Die Bildung des Hydroxyäthylesters ist verständlich, da durch Ätherspaltung des Dioxans^{19, 20} Äthylenglykol entsteht.



Die Herkunft des Äthylesters bleibt unklar.

In Eisessig/HCl können die Peptidyl-Harze ohne Verluste an Glu hydrolysiert werden.

Bei der Synthese des Apoferreredoxins²¹ sollen angeblich während der Hydrolyse des Peptid-Harzes in Dioxan/HCl aus γ -Benzyl-Glu bis zu 50% Ser und Thr entstanden sein²². Es ist möglich, dass hierbei X_2 entstand, das mit Ser und/oder Thr verwechselt wurde.

EXPERIMENTELLES

Hydrolysen. Sämtliche Hydrolysen wurden im Vakuum bei 110° während 20 Stdn. durchgeführt. Überschüssiges HCl wurde durch dreimaliges Eindampfen am Rotationsverdampfer abgezogen. Den Rückstand löste man in Citratpuffer vom pH 2.2.

Je 10 μ Mol der Aminosäure-Derivate bzw. 2 mg eines Gemisches aus O-Benzyl-Ser., β -Benzyl-Asp und γ -Benzyl-Glu (molares Verhältnis = 2:2:5) wurden in 2 ml Lösungsmittel aufgenommen.

Lösungsmittel für Hydrolysen: Dioxan: konz. HCl* = 1:1 (v/v); Äthanol: konz. HCl = 1:1 (v/v); Äthylenglykol: konz. HCl = 1:1 (v/v); Eisessig: konz. HCl = 1:1 (v/v); 6n wässriges HCl (dreimal destilliert).

Aminosäure-Analysen. Die Analysen wurden nach der Methode von Spackman, Moore und Stein^{11, 12} am Gerät Dr. Bender/Dr. Hobein ausgeführt.

Die basischen Aminosäuren wurden mit 0.2 m Natriumcitrat-Puffer (pH 7.0) vom schwach sauren Kationenaustauscher Amberlite IRC 50 eluiert. Für die Chromatographie der neutralen und sauren Aminosäuren am stark sauren Amberlite IR 120 wurde ein Puffergradient, bestehend aus 0.2 m Natriumcitrat-Puffer vom pH 3.1 und pH 5.1, verwendet.

Die Aufgabenmenge betrug 1–2 μ Mol je Aminosäure-Derivat. Die Maxima der Aminosäure-Peaks wurden auf den Abbildungen durch Striche markiert.

γ -Äthyl-Glu. In eine Suspension von 35 g (0.24 Mol) L-Glu in 350 ml absolutem Äthanol wurde unter Kühlung trockenes HCl-Gas bis zu einer Gewichtszunahme von 23 g (0.63 Mol) ein geleitet. Man schüttelte bei Raumtemperatur bis Lösung eintrat (20 Min), füllte mit absolutem Äthanol auf 1 l auf, versetzte mit Triäthylamin bis zur alkalischen Reaktion und liess 16 Stdn. bei 0° stehen. Die Kristalle wurden abgesaugt, mit kaltem Äthanol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet; Ausbeute: 29 g (70% d.Th.); Schmp. 1940 (Wasser/Äthanol).

Danksagung—Herrn Dr. W. B. Schulz möchten wir sowohl für die Durchführung der Aminosäure-Analysen als auch für die Interpretation der Aminosäure-Chromatogramme während der Synthese des Eicosapeptids¹ danken. Fräulein I. Plesche, Fräulein U. Dahnke und Fräulein A. Zacher danken wir für kompetente technische Mitarbeit.

* Konz. HCl = rauchende HCl (37%ig), Merck AG.

LITERATUR

- ¹ Eigene Versuchsergebnisse, unveröffentlicht
- ² J. Blake und Choh Hao Li, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 5882 (1968)
- ³ S. Visser, J. Roeloffs, J. E. T. Kerling und E. Havinga, *Rec. Trav. Chim.* **87**, 559 (1968)
- ⁴ H. Takashima, V. du Vigneaud und R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1323 (1968)
- ⁵ H. Klostermeyer, *Chem. Ber.* **101**, 2823 (1968)
- ⁶ S. R. Marshall und R. B. Merrifield, *Biochemistry* **4**, 2394 (1965)
- ⁷ V. A. Najjer und R. B. Merrifield, *Ibid.* **5**, 3765 (1966)
- ⁸ T. Mizoguchi und D. W. Woolley, *J. Med. Chem.* **10**, 251 (1967)
- ⁹ F. Weygand und U. Ragnarsson, *Z. Naturforschung* **21b**, 1141 (1966)
- ¹⁰ J. M. Stewart, J. D. Young, E. Benjamini, M. Shimizu und Ch. Y. Leung, *Biochemistry* **5**, 3396 (1966)
- ¹¹ S. Moore, S. H. Spackman und W. H. Stein, *Analyt. Chem.* **30**, 1185 (1958)
- ¹² D. H. Spackman, W. H. Stein und S. Moore, *Ibid.* **30**, 1190 (1958)
- ¹³ L. Benoiton, *Canad. J. Chem.* **40**, 570 (1962)
- ¹⁴ St. Guttman und R. A. Boissonas, *Helv. Chim. Acta* **41**, 1852 (1958)
- ¹⁵ K. Okawa, *Bull. Chem. Soc. Japan* **29**, 486 (1956)
- ¹⁶ P. Jollès und J. Jollès, *Helv. Chim. Acta* **51**, 980 (1968)
- ¹⁷ H. C. Beyermann, C. A. M. Boers-Boonekamp und H. Maassen van den Brink-Zimmermannova, *Rec. Trav. Chim.* **87**, 257 (1968)
- ¹⁸ H. K. Miller und H. Waelsch, *Arch. Biochem. Biophys.* **35**, 176 (1952)
- ¹⁹ *Ullmanns Encyklopädie der techn. Chemie* Bd. 6, S. 8. Urban und Schwarzenberg, München, Berlin (1955)
- ²⁰ R. Stoermer, *Chem. Ber.* **39**, 2288 (1906)
- ²¹ E. Bayer, G. Jung und H. Hagenmaier, *Tetrahedron* **24**, 4853 (1968)
- ²² G. Jung, Inaugural-Dissertation, Universität Tübingen, 1967