

THEODOR WIELAND und HEINZ BENDE¹⁾Über Peptidsynthesen, 31²⁾**Chromatographische Trennung einiger diastereomerer Dipeptide und Betrachtungen zur Konformation**

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

(Eingegangen am 1. August 1964)

Gemische der diastereomeren Alanyl-tyrosine, Valyl-tyrosine, Alanyl-phenylalanine und Methionyl-alanine wurden im 100-mg-Maßstab an Sephadex G-25- oder G-50-Säulen in Pyridin/Wasser (1:1 Mol) glatt in die L-L-Formen und D-L-Formen getrennt. Aus dem Vergleich einiger Eigenschaften der Diastereomeren (pK -Werte, NMR-Spektren) kann man annehmen, daß die D-L-Dipeptide eine durch intramolekulare Wasserstoffbrücke stabilisierte Ringform, die L-L-Dipeptide eine gestreckte Konformation bevorzugen.

Diastereomere Peptide können in vielen Fällen durch Kristallisation voneinander getrennt werden. Statt des „klassischen“ Verfahrens, bei dem meistens nur die eine Form bequem und mit befriedigenden Ausbeuten rein erhalten wird (während man bei der anderen den Schwierigkeiten einer Mutterlaugen-Aufarbeitung begegnet), sucht man seit längerer Zeit für analytische Zwecke die Chromatographie in all ihren Formen anzuwenden. Schon 1950 haben HINMAN et al.³⁾ beobachtet, daß sich das Racemat L-Valyl-L-valin/D-Valyl-D-valin vom Racemat L-Valyl-D-valin/D-Valyl-L-valin bei der Papierchromatographie im R_F -Wert um ca. 5% unterscheidet. Später konnten H. KIHARA, M. IKAWA und E. E. SNELL⁴⁾ die gleichen Diastereomeren besonders gut mit Pyridin/Wasser (4:1 Vol.) auf Papier trennen. E. TASCHNER und Mitarbb.⁵⁾ dehnten die Untersuchung erfolgreich auf 15 weitere diastereomere Dipeptidpaare aus, wonach T. SOKOLOWSKA und J. F. BIERNAT⁶⁾ das Pyridin/Wasser-Gemisch zur papierchromatographischen Trennung von mehr als einem Dutzend diastereomerer Dipeptide empfohlen. Auch einige Tripeptide aus Glutaminsäure und Alanin⁷⁾ und sogar zwei Hexapeptide, die nur eine Aminosäure (Tyrosin) unterschiedlicher Konfiguration enthielten, konnten papierchromatographisch unterschieden werden⁸⁾. Über die papierchromatographische Trennung diastereomerer Aminosäuren, die unser Thema nur am Rande berührt, siehe die Literatur bei D. O. GRAY und Mitarbb.⁹⁾

An Säulen von Ionenaustauschern wurden auf Grund ihres geringfügig verschiedenen Wanderungsunterschieds in gepufferter, saurer Lösung — außer einigen diastereomeren Ami-

¹⁾ Dissertat. Univ. Frankfurt a. M. 1964, D 30.

²⁾ 30. Mittel.: TH. WIELAND und K. VOGELER, Liebigs Ann. Chem. **680**, [1965], in Vorbereitung.

³⁾ J. W. HINMAN, E. L. CARON und H. N. CHRISTENSEN, J. Amer. chem. Soc. **72**, 1620 [1950].

⁴⁾ J. biol. Chemistry **236**, 172 [1961].

⁵⁾ E. TASCHNER, T. SOKOLOWSKA, J. F. BIERNAT, A. CHIMIACK, C. WASIELEWSKI und B. RZESZOTARSKA, Liebigs Ann. Chem. **663**, 197 [1963].

⁶⁾ J. Chromatogr. [Amsterdam] **13**, 269 [1964].

⁷⁾ H. SACHS und E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1811 [1954].

⁸⁾ B. RINIKER und R. SCHWYZER, Helv. chim. Acta **44**, 658 [1961].

⁹⁾ D. O. GRAY, J. BLAKE, D. H. BROWN und L. FOWDEN, J. Chromatogr. [Amsterdam] **13**, 276 [1964].

nosäuren — die Dipeptide L-Leucyl-L-tyrosin und D-Leucyl-L-tyrosin¹⁰⁾ sowie L-Alanyl-L-alanin und L-Alanyl-D-alanin¹¹⁾ voneinander getrennt. Die geringe Kapazität (einige mg Peptid pro Säule von 1 × 100 cm) haben diese Verfahren mit der gaschromatographischen Trennung beidseits geschützter Dipeptide gemeinsam, wie sie in letzter Zeit vor allem durch F. WEYGAND und Mitarbb.¹²⁾ studiert wurde. Präparativ interessant erscheint bisher lediglich die Gegenstromverteilung, z. B. der Benzyloxycarbonyl-glycyl-DL-alanyl-DL-phenylalanyl-glycine durch die Arbeitsgruppe G. W. KENNER¹³⁾.

Wir haben es uns zum Ziel gesetzt, eine chromatographische Methode zur präparativen Trennung diastereomerer Peptide auszuarbeiten. Unter Vermeidung der bisher allein aus den papierchromatographischen Ergebnissen vorgezeichneten Cellulose, die, als Pulver angewandt, die Erwartungen meistens enttäuscht, haben wir andere Adsorbentien ausprobiert. Im Anschluß an einen Befund J. DÖLLINGS¹⁴⁾, der L-Tryptophyl-L- γ -hydroxyleucinamid vom L-D-Diastereomeren auf Kieselgel mit Methanol/Chloroform (1:1 Vol.) als Laufmittel gut abtrennen konnte, zeigten sich bei weiteren vier diastereomeren Dipeptiden bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel die in Tab. 1 angegebenen R_F -Unterschiede.

Tab. 1. Dünnschichtchromatographische Trennung diastereomerer Peptide an Kieselgel G in 1-proz. wasserhaltigem Methanol

R_F -Werte der Diastereomeren	Met-Ala	Ala-Phe	Ala-Tyr	Val-Tyr
R_F 1 (L-L)	0.41	0.38	0.44	0.53
R_F 2 (D-L)	0.37	0.28	0.35	0.42

Die Übertragung des Trennvorgangs auf die Säule hat sich aber nicht zur einfachen präparativen Isolierung der Komponenten anwenden lassen; nach dem Abdampfen der Lösungen blieben ölige Rückstände ohne Kristallisationsneigung. Es scheint, als ob in Gegenwart des Kieselgels das Methanol teilweise veresternd einwirkt und daß sich aus den Dipeptidestern an der aktiven Oberfläche größere Moleküle bilden. Zusammen mit der geringen Kapazität läßt dies das Kieselgel für größere Ansätze ungeeignet erscheinen. Aluminiumoxydschichten erwiesen sich bei Versuchen mit mehreren Laufmitteln als unfähig zur Trennung diastereomerer Dipeptide.

Beim Vergleich von Laufmitteln auf der Cellulosedünnschicht hat sich die Pyridin/Wasser-Mischung (20% H₂O)⁴⁾ zur Trennung diastereomerer Dipeptide am besten bewährt. Eine Versuchsreihe ergab, daß das Mischungsverhältnis von genau 1 Mol Pyridin und 1 Mol Wasser (82:18 cm) ein optimales Trennergebnis bei verschiedenen diastereomeren Dipeptiden gab (s. Tab. 2). Wie in den anderen bisher bekannten Fällen zeigt stets das Diastereomere mit zwei gleichkonfigurierten Zentren (L-L oder D-D) den größeren R_F -Wert.

10) S. BLACKBURN und P. TELLEY, *Biochem. Acta* **20**, 423 [1956].

11) F. NEUHAUS, *J. biol. Chemistry* **237**, 778 [1962].

12) F. WEYGAND, A. PROX, L. SCHMIDHAMMER und W. KÖNIG, *Angew. Chem.* **75**, 282 [1963]; *Angew. Chem. internat. Edit.* **2**, 183 [1963].

13) O. W. CLAYTON, J. A. FARRINGTON, G. W. KENNER und J. M. TURNER, *J. chem. Soc. [London]* **1957**, 1398.

14) Diplomarb. Univ. Frankfurt a. M. 1964.

Tab. 2. Dünnschichtchromatographische Trennung diastereomerer Dipeptide auf Cellulose MN 300 in Pyridin/Wasser (1:1 Mol)

	Met-Ala	Ala-Phe	Ala-Tyr	Val-Tyr
R_F von L-L oder D-D	0.47	0.48	0.55	0.70
R_F von D-L oder L-D	0.34	0.33	0.39	0.52

Mit zunehmendem Wassergehalt des Pyridins werden die Flecke kleiner und runder, d. h. die Kapazität der Schicht steigt. Gleichzeitig nehmen aber auch die R_F -Werte zu und ihre relativen Differenzen ab, so daß eine säulenchromatographische Trennung schwieriger wird. Bei Zunahme des Pyridingehalts sinken die R_F -Werte, doch bilden sich weniger kompakte längliche Flecke, worunter die präparative Trennbarkeit der Substanzen ebenfalls leidet.

PRÄPARATIVE CHROMATOGRAPHIE

Die Übertragung der analytischen Ergebnisse in den präparativen Maßstab gelang uns mit dem vernetzten Dextran-Gel Sephadex, das im selben Pyridin/Wasser-Gemisch gequollen als Säulenfüllung verwendet wurde. Um den Einfluß des Vernetzungsgrades auf den Trennerfolg kennenzulernen, verglichen wir mit einem Gemisch von je 100 mg L-Alanyl-L-tyrosin und D-Alanyl-L-tyrosin an gleich dimensionierten Säulen die Sorten G-10, G-25, G-50 und G-100. Die Eluate wurden automatisch fraktioniert aufgefangen und nach Tüpfeln und Dünnschichtchromatographie auf Cellulosepulver durch Ninhydrinfärbung analysiert (s. Abbild. 1). Die Daten und Ergebnisse des Vergleichs sind der Tab. 3 zu entnehmen

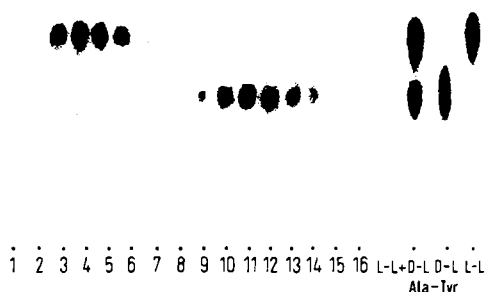
Tab. 3. Chromatographische Trennung von je 100 mg L-Alanyl-L-tyrosin und D-Alanyl-L-tyrosin in Pyridin/Wasser (1:1 Mol) an verschiedenen Sephadex-Sorten

Sephadex-Sorte	Säulen-dimensionen (cm)	Füll-gewicht (g)	V_t ccm	V_e (ccm)		V_s ccm
				L-L	D-L	
G-10	90 × 1.5	70	160	153	176	23
G-25	92 × 1.5	37.5	165	180	250	70
G-50	103 × 1.5	27.5	185	280	360	80
G-100	90 × 1.5	12	150	250	320	70

Man sieht, daß in allen Fällen (bis auf G-10) die Volumina bis zum Auftreten des Konzentrationsmaximums (V_e) für das L-L- und D-L-Diastereomere größer sind als die Füllungsvolumina V_t der Säulen und daß zwischen den Konzentrationsmaxima verschieden große Volumdifferenzen (V_s = Separationsvolumen) bestehen. V_s ist am kleinsten bei Sephadex G-10. Da das Gesamtelutionsvolumen für jedes Dipeptid mindestens 50 ccm beträgt, ist an G-10 die Trennung unvollständig. Bei den anderen Sorten ist sie gelungen. G-100 weist wegen seiner weichen Konsistenz Schwierigkeiten in der Handhabung und zu geringe Durchflußgeschwindigkeiten auf, so daß nur die gleichermaßen geeigneten Gele G-25 und G-50 für weitere Versuche herangezogen wurden.

Die Wirkungsweise dieser Füllkörper beruht hier sicher nicht auf dem Molekularsiebeffekt; sie dürften vielmehr besonders geeignete Träger der stationären Phase einer Verteilungschromatographie sein. Bei Erhöhung der Menge unserer Testmischung auf 500 mg beobachteten wir noch weitgehende Trennung an der G-50-Säule. Es zeigte sich, daß mit zunehmender Beladung V_s kleiner, die Trennung also schlechter wird, während die Volumina, in denen die diastereomeren Peptide austreten, nur wenig zunehmen. Das Elutionstempo beeinflußt die Trennergebnisse kaum, so daß für präparative Zwecke mit der ungedrosselten Tropfgeschwindigkeit von ca. 25 cm pro Stunde gearbeitet werden konnte.

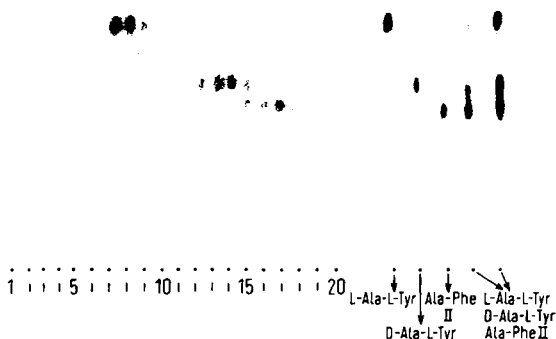
Über die Trennung der diastereomeren Alanyl-tyrosine an der G-50-Säule gibt Abbild. 1 Auskunft. Die jeweils eingesetzten 100 mg an synthetischem L-Alanyl- und D-Alanyl-L-tyrosin sind völlig getrennt und nach Abdampfen des Lösungsmittels im Exsikkator nahezu quantitativ zurückgewonnen worden.



Abbild. 1. Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Säulen-Trennung von L- und D-Alanyl-L-tyrosin an Sephadex; links: Fraktionen aus der Säule, rechts: Testgemische (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 514)

Sodann wurden an der gleichen Säule 205 mg eines DL-Valyl-L-tyrosins getrennt, das durch Peptidsynthese aus Benzyloxycarbonyl-DL-valin und L-Tyrosin-methylester, Entfernung der Schutzgruppen und Kristallisation aus Wasser/Isopropylalkohol erhalten worden war. Die chromatographische Trennung lieferte mit $V_s = 90$ cm die beiden reinen Diastereomeren, die L-L-Verbindung in etwas größerer Menge als die D-L-Verbindung, was durch eine geringe Anreicherung beim Kristallisieren des Gemisches zu erklären ist. Die gleiche Säule wurde weiterhin zur Trennung von 70 mg eines ungleichen Gemisches der diastereomeren Alanyl-phenylalanine mit gleichem Erfolg verwendet. Auch 30 mg DL-Methionyl-DL-alanin ließen sich glatt in die diastereomeren Racemate zerlegen.

Um die Grenzen der Leistungsfähigkeit zu erkennen, wurde die Mischung der beiden Alanyl-tyrosine (je 100 mg) zusammen mit dem langsamer wandernden Alanyl-phenylalanin (Racemat aus D-L und L-D, 30 mg), deren R_F -Werte bei der Dünnschichtchromatographie auf Cellulose sich wie 0.44 : 0.35 : 0.28 verhalten, mit demselben Lösungsmittel an derselben Säule chromatographiert. Über den Trennverlauf, bei welchem die beiden langsameren Peptide nicht ganz voneinander getrennt wurden, gibt die Abbild. 2 Auskunft.



Abbild. 2. Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Säulen-Trennung der diastereomeren Alanyl-tyrosine und Alanyl-phenylalanin an Sephadex.
Links: Fraktionen aus der Säule, rechts: Testgemische

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG EINIGER EIGENSCHAFTEN DIASTEREOMERER DIPEPTIDE

1. Rotation

Die Abhängigkeit der Drehung bei verschiedenen Wellenlängen von der Konzentration und dem Lösungsmittel wurden am L-Alanyl-L-tyrosin und D-Alanyl-L-tyrosin mit dem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter (0.005, Zeiss) gemessen. Einige der Daten sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Tab. 4. Abhängigkeit der spezif. Drehung von L-Alanyl- und D-Alanyl-L-tyrosin von der Konzentration und vom Lösungsmittel

Lösungsmittel	Konz. <i>c</i> in g/100 ccm	$[\alpha]_D$ von L-L	$[\alpha]_D$ von D-L
1 Wasser	2.0	+ 43.2° *)	+ 31.8°
2 Wasser	6.33	+ 146.4°	—
3 Wasser	6.42	—	+ 32.7°
4 0.5 <i>n</i> HCl	2.04	+ 23.1°	+ 22.2°
5 Pyridin/Wasser (50 Mol-%)	1.26	+ 80.0°	+ 44.5°

*) Lit.: +43.14°¹⁵⁾.

Hier fällt auf, daß beim L-L-Diastereomeren eine sehr ausgeprägte Abhängigkeit der Drehung von der Konzentration besteht (Nr. 2), die beim D-L-Diastereomeren völlig fehlt (Nr. 3). Die Formen der Rotationsdispersionskurven weisen keine prinzipiellen Unterschiede auf. Der von E. ABDERHALDEN und A. HIRSZOWSKI¹⁵⁾ am „d“-Alanyl-*l*-tyrosin festgestellte Wert trifft auf das L-L-Diastereomere zu; das dort als Vorstufe benutzte D- α -Brompropionyl-L-tyrosin hat bei der Ammonolyse Walden-sche Umkehr erfahren.

2. *pK*-Werte

An den diastereomeren Alanyl-alaninen hat E. ELLENBOGEN¹⁶⁾ festgestellt, daß beim optisch gleichartigen (L-L oder D-D) *pK*₁ gegenüber dem optisch gemischten (L-D

¹⁵⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 41, 2840 [1908].

¹⁶⁾ J. Amer. chem. Soc. 78, 369 [1956].

oder D-L) um ca. 0.2 Einheiten erhöht, pK_2 um ca. 0.15 Einheiten erniedrigt ist. Wir haben die entsprechenden pK -Werte durch Titration unter Reinststickstoff (Titrigraph von Radiometer) bei den diastereomeren Alanyl-tyrosinen und Leucyl-tyrosinen, unter Einbeziehung der pK_3 -Werte, bestimmt und hierbei prinzipiell gleiches Verhalten gefunden (Tab. 5).

Tab. 5. pK -Werte diastereomerer Peptide bei der Ionenstärke 0.1 und bei 25°

Peptid	Ala-Tyr		Ala-Ala		Leu-Tyr	
	L-L	D-L	L-L	D-L	L-L	D-L
pK_1	3.22	3.06	3.30	3.12	3.46	3.12
pK_2	8.08	8.29	8.14	8.30	7.84	8.38
pK_3	10.24	10.16			10.09	10.35
$pK_2 - pK_1 (\Delta)$	4.86	5.23	4.84	5.18	4.38	5.26

Es scheint somit dieser deutliche, gleichmäßige Unterschied in den Differenzen allgemeine Bedeutung zu haben. Die kleineren Δ -Werte deuten auf größeren Abstand der dissoziierenden Gruppen und damit auf gestrecktere Molekülgestalt der einheitlichen Dipeptide hin. Hiermit im Einklang steht ihr etwa einhalbmal so großes dielektrisches Inkrement in wäßriger Lösung¹⁷⁾.

3. IR-Spektren

Daß sich die IR-Spektren diastereomerer Peptide unterscheiden, ist lange bekannt. Das konnte durch die Aufnahmen der diastereomeren Alanyl-phenylalanine, Alanyl-tyrosine und Valyl-tyrosine in KBr-Preßlingen bestätigt werden. Auf die Wiedergabe der Spektren soll hier verzichtet werden, da ihr Aussagewert für die Konformation in Lösung gering ist.

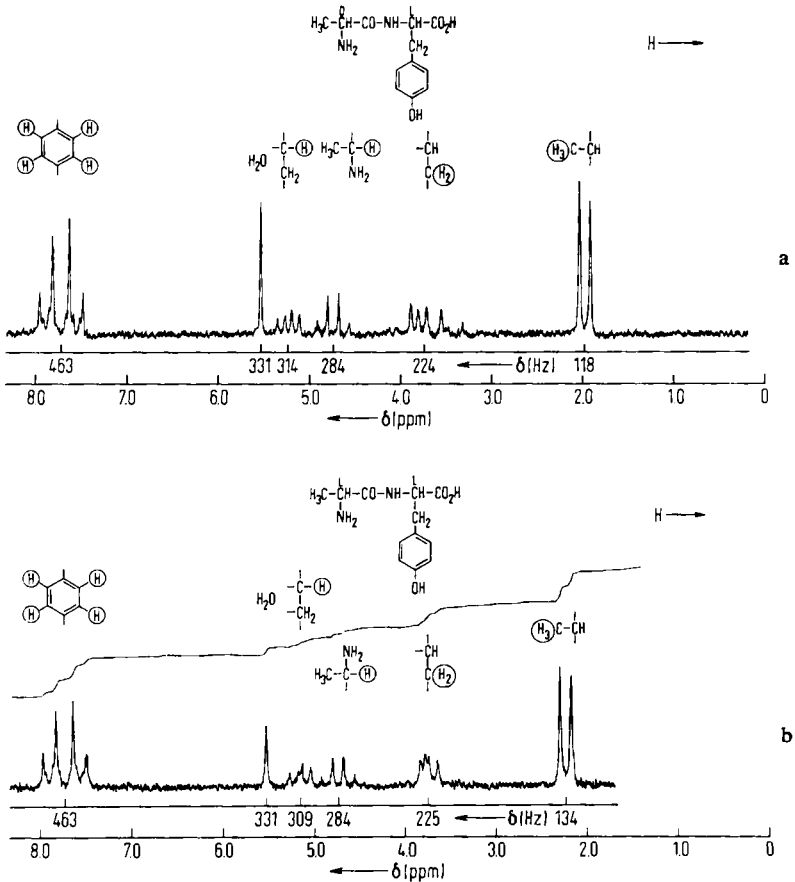
4. NMR-Spektren*)

Es wurden die NMR-Spektren von L-Alanyl-L-tyrosin und D-Alanyl-L-tyrosin, L-Valyl-L-tyrosin und D-Valyl-L-tyrosin sowie von den Racematen L-(bzw. D-)Alanyl-L-(bzw. D-)phenylalanin und L-(bzw. D-)Alanyl-D-(bzw. L-)phenylalanin in D₂O gemessen, nachdem die beweglichen Protonen so weitgehend wie möglich gegen Deuteronen ausgetauscht waren. Die bei den 3 Proben im wesentlichen übereinstimmenden Befunde sollen anhand des Spektrums der Alanyltyrosine besprochen werden. Abbild. 3 zeigt die Protonensignale einer 10-proz. D₂O-Lösung, deren Lage im Vergleich zum inneren Standard des Restwassers (Peak bei 331 Hz von einem Tetramethylsilan-Standard feldabwärts) verglichen wird. Die an sich problematische Wahl des H₂O-Protonensignals ist dadurch gerechtfertigt, daß es sich um Lösungen des „gleichen“ Stoffes in gleicher Konzentration handelt, eine Verschiebung des Signals also in beiden Fällen die gleiche sein sollte. Im mittleren pH-Bereich ist die Lage dieses Signals in Lösungen verschiedener Aminosäuren als praktisch konstant gefunden worden¹⁸⁾. Tab. 6 gibt die Zuordnung der Signalgruppen (von rechts nach links).

*) Die NMR-Spektren wurden von Herrn Dr. P. PFAENDER aufgenommen, dem wir auch für seine wirkungsvolle Beteiligung bei der Diskussion und Deutung herzlich danken.

17) P. M. HARDY, G. W. KENNER und R. C. SHEPPARD, *Tetrahedron* [London] **19**, 95 [1963].

18) M. TAKEDA und O. JARDETZKY, *J. chem. Physics* **26**, 1346 [1957].



Abbild. 3. NMR-Spektren von D-Alanyl-L-tyrosin (a) und L-Alanyl-L-tyrosin (b) in D₂O

Tab. 6. Signalgruppen der NMR-Spektren der diastereomeren Alanyl-tyrosine. Chemische Verschiebung δ in Hz (vom TMS-Bezugspunkt feldabwärts)

Signal	Zuordnung	L-Ala-L-Tyr δ (Hz)	J (Hz)	D-Ala-L-Tyr δ (Hz)	J (Hz)	
1	d	-CH ₃	134	7	118	7
2	q	-CH ₂ -	225	6	224	5/10
3	q	-CH-ND ₃ ⁺	284	7	284	7
4	q	-CH-CO ₂ ⁻	309	6	314	5
5	s	H ₂ O	331		331	
6	dd	-C ₆ H ₄ -	463	8.5/8.5	463	8/9

d = Dublett, q = Quadruplett, s = Singulett, dd = Doppeldublett.

Beim Vergleich der Signallagen ergibt sich, daß die meisten bei beiden Diastereomeren übereinstimmen oder wenig divergieren, während die der Methylgruppen des

L- bzw. D-Alanins (Signal 1 in Tab. 6) im Dipeptid um 16 Hz voneinander abweichen, und zwar in dem Sinn, daß im optisch gemischten Dipeptid (D-L) die Abschirmung der Methylprotonen stärker sein muß (feldaufwärts verschoben). Die NMR-Spektren der diastereomeren Valyl-tyrosine zeigen grundsätzlich die selben Unterschiede: hier sind die Signale sämtlicher Protonen der Isopropylgruppe beim D-L-Diastereomeren gegenüber der L-L-Verbindung ebenfalls feldaufwärts verschoben, und zwar die der Methylprotonen (Dublett) um ca. 20 Hz, die des tert. H (Multipllett) um 18 Hz. Weiterhin sind, und zwar nur beim D-Valyl-L-tyrosin, die Dubletts der beiden Methylprotonen um 1 Hz gegeneinander verschoben, so daß eine Aufspaltung der Signale eintritt, die auf Ungleichwertigkeit beider Methylgruppen hindeutet. Die Lagen der von den aromatischen Protonen herrührenden Doppeldubletts (bei 459 bzw. 458 Hz) stimmen auch hier praktisch überein.

Die beiden Alanyl-phenylalanine wurden ebenfalls nach H/D-Austausch in D₂O, aber wegen ihrer Schwerlöslichkeit als Na-Salze gemessen. Auch hier beobachtet man die stärkere Abschirmung des Felds beim D-L-Diastereomeren, doch beträgt der Unterschied in der Lage der Signale der Methylprotonendublette, vielleicht wegen der Entladung der Aminogruppe beim Na-Salz, nur 4.5 Hz.

Bei den diastereomeren Leucyl-tyrosinen, gelöst in Trifluoressigsäure, haben F. A. BOVEY und G. v. D. TIERS¹⁹⁾ schon eine ähnliche Beobachtung gemacht. Sie fanden, daß speziell die Signale der Methylenprotonen des Leucinteils bei der D-L-Verbindung um 0.29 ppm (ca. 17 Hz) weiter nach rechts verschoben sind und für die Protonen der Methylgruppen die Rechtsverschiebung etwa die Hälfte ausmacht, woraus auf eine stärkere Abschirmung beim D-L-Peptid zu schließen ist. Es wird dies durch die Annahme eines geringeren Abstands der Seitenkette vom Benzolring des Tyrosins im D-L-Diastereomeren gedeutet.

5. Betrachtungen zur Konformation

Auch die vorliegenden Meßergebnisse führen zur Vorstellung von einer kompakteren Form der D-L-Dipeptide gegenüber den L-L-Formen in wäßriger Lösung. Berücksichtigt man bei der Peptidbindung die planare Anordnung mit bevorzugt

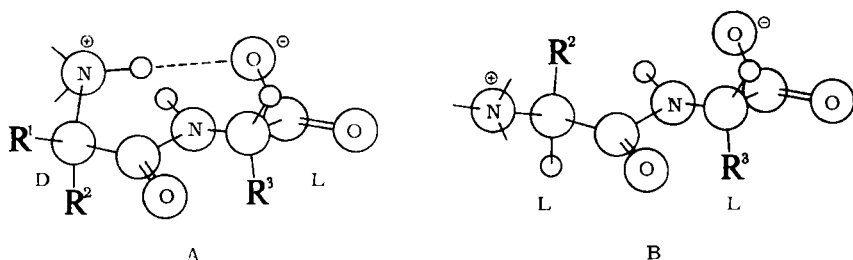
trans-ständigen Seitenketten, $\begin{array}{c} \text{C} \\ \diagdown \\ \text{N}-\text{C}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{H}' \quad \text{C} \end{array}$ ²⁰⁾, sowie das Bestreben maximaler An-

näherung ungleich geladener Gruppen und die stabilisierende Rolle von Wasserstoffbrückenbindungen, auch in wäßriger Lösung, so scheint für ein Dipeptid eine cyclische Konformation A bevorzugt zu sein.

Beim D-L-Dipeptid ist R² = H, d. h. die Seitenketten R¹ und R³ stehen zueinander *trans* und werden sich räumlich nicht beeinflussen. Anders beim L-L-Dipeptid, wo R¹ = H, so daß sich die *cis*-ständigen Seitenketten (R² und R³) behindern und das Molekül unter Preisgabe der intramolekularen H-Brücke (zu Gunsten einer intermolekularen) diesem Zwang entgehen und eine gestreckte Konformation (B) einnehmen kann.

¹⁹⁾ J. Amer. chem. Soc. **81**, 2870 [1959].

²⁰⁾ L. PAULING und R. B. COREY, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] **11**, 180 [1954].



Mit diesen Vorstellungen im Einklang steht der beobachtete größere Ladungsabstand in den L-L-Peptiden¹³⁾, der mit einer Schwächung des Zwitterionencharakters einhergeht (pK -Werte, Tab. 5). ELLENBOGEN¹⁶⁾ schließt aus Entropieberechnungen, daß bei optisch einheitlichen Peptiden der Ladungszustand der Aminogruppe keinen Einfluß auf die Molekülgestalt hat, was etwa dann zu erwarten ist, wenn die Molekel von vornherein gestreckt vorliegt. Bei D-L-Peptiden wird hingegen bei Entladung der Ammoniumgruppe eine Auffaltung begünstigt, was durch Wegfall der H-Brücke in A erklärt werden kann. Auch die Unterschiede in den NMR-Spektren (S. 510) lassen sich anhand der vorgeschlagenen Konformationen verstehen: In den optisch einheitlichen Dipeptiden werden sich die Ladungen weniger gut kompensieren als in den gemischten, die positive Ladung wird die Elektronen der Seitenkette R^2 stärker anziehen und so die diamagnetische Abschirmung der Protonen in R^2 schwächen (Antishielding). Tatsächlich sind die entsprechenden Signalgruppen bei den L-L-Dipeptiden gegenüber den D-L-Verbindungen feldabwärts verschoben (S. 511). Auch die relativ geringere chemische Verschiebung der R^2 -Protonensignale in alkalischer Lösung ist als Folge der Entladung der Ammoniumgruppierung gut zu verstehen. Bei der Entladung der Carboxylatgruppe (D-Leucyl-L-tyrosin in Trifluoressigsäure¹⁸⁾) bleibt die stärkere Rechtsverschiebung der R^2 -Protonensignale beim D-L-Peptid erhalten. Wir brauchen also zur Erklärung der verschiedenen chemischen Verschiebungen nicht wie bei l. c.¹⁸⁾ eine Einwirkung der beiden Seitenketten aufeinander anzunehmen, zumal in beiden Diastereomeren die Signale der Protonen des Benzolrings exakt übereinstimmen. Ein der Ammoniumgruppe entsprechender Ladungseffekt der Carboxylatgruppe auf die ihr benachbarte Seitenkette R^3 läßt sich in den NMR-Spektren nicht nachweisen. Dies steht im Einklang mit dem Fehlen eines negativierenden Effekts dieser Gruppierung überhaupt, wie es sich z. B. auch in der schwachen Basizität der Aminogruppe von α -Aminosäuren bemerkbar macht²¹⁾.

Ob auch die auf S. 508 geschilderte, nur beim L-L-Peptid vorhandene, auffallend große Abhängigkeit der Drehung von der Konzentration mit dem unterschiedlichen Molekelzustand zusammenhängt, sei hier als Frage aufgeworfen.

²¹⁾ Vgl. hierzu z. B. TH. WIELAND u. a. in Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), Bd. XII/2, S. 293, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1958.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die *Dünnschichtchromatographie* wurde mit Pyridin (79 g)/Wasser (18 g) auf 20 × 20-cm-Glasplatten ausgeführt, die mit einer wäßr. Suspension von Cellulosepulver (MN 300) bis zu einer Bedeckung von 20–40 g/cm² besprüht waren. Sie können lufttrocken oder nach Trocknen bei 110° gleich gut verwendet werden. Bei einem Fleckdurchmesser von 1 cm sind 10 µg Alanyl-tyrosin mit Ninhydrin noch sehr gut nachweisbar. Der von S. YANARI²²⁾ an den diastereomeren Leucyl-tyrosinen festgestellte Intensitätsunterschied der Ninhydrinfärbungen auf Papier konnte an unseren diastereomeren Dipeptiden auf der Cellulosedünnschicht nicht beobachtet werden.

Präparative Chromatographie

Für die Versuche wurde eine 100 × 1.5-cm-Säule mit im Elutionsmittel Pyridin/Wasser (im Molverhältnis 1) gequollenem Sephadex G-50 medium gefüllt und äquilibriert, bis der Brechungsindex des austretenden Eluats mit dem des eingesetzten Elutionsmittels (n_D^{20} ca. 1.480) übereinstimmte. Als Testpeptid diente DL-Alanyl-L-tyrosin. Die Trennung wurde durch Tüpfeln und dünnschichtchromatographisch verfolgt. Bei Beladungen bis 200 mg konnte vollständige, bis 500 mg weitgehende und bis 1000 mg noch überwiegende Trennung erzielt werden.

Eine Verbesserung der Trennung durch Einsatz konzentrierter Probelösungen wird bei Peptiden durch die Viskosität ihrer Lösungen erschwert; denn in viskosen Lösungen führt die Behinderung der Diffusion zu einer Verbreiterung der Trennzonen. Damit das Quellgleichgewicht der Gelbettfüllung nicht gestört wird, sollten Probelösung und Elutionsmittel in ihrer Zusammensetzung (vor allem in ihrem Pyridinanteil) übereinstimmen. In der Pyridin/Wasser-Mischung ist die Quellung von Sephadex gegenüber Wasser z. B. um $\frac{1}{3}$ vermindert. Wird das Quellgleichgewicht der Füllung durch die aufgebrauchte Probenlösung zu stark gestört, dann entstehen — vorzugsweise im oberen Säulenteil — Quellungs- oder Schrumpfrisse im Gel. Sie beeinträchtigen die laufende Trennung kaum und verschwinden beim anschließenden Äquilibrieren wieder. Ist das Elutionsmittel jedoch luftgesättigt, dann scheiden sich an diesen Stellen leicht kleine Luftbläschen aus, und die Säule wird unbrauchbar. Dies tritt regelmäßig dann ein, wenn als Folge der aufgebrauchten Probenlösung bzw. durch Schwankungen der Raumtemperatur ein zu großer Konzentrations- oder Temperaturgradient auftritt und dadurch örtlich die Sättigungskonzentration für Luft überschritten wird. Der Einsatz von Elutionsmittel, das durch Evakuieren entgast worden ist, kann hier vorbeugen.

In Pyridin/Wasser sind Peptide nur wenig löslich, besonders wenn sie in reiner Form vorliegen. In diesem Fall ist es besser, die Lösung in Wasser vorzunehmen und das Säulengleichgewicht etwas zu stören, als mit einem zu großen Volumen zu starten. Die Probenlösung kann auch heiß aufgebracht werden oder Lösungsvermittler (z. B. Natronlauge) enthalten, ohne daß dadurch die Trennung wesentlich gestört wird.

Vielfach bilden Peptide (besonders die Diastereomeregemische) übersättigte Lösungen, die gut aufgebracht werden können. Zweckmäßig ist es dann, verdünnt und warm zu lösen und am Rotationsverdampfer einzuziehen. Nach dem Einziehen der Lösung in das Gelbett ist ein Auskristallisieren nicht mehr zu befürchten. Verschiedene reine Diastereomere der verwendeten Peptide sind in dem Elutionsmittel sehr wenig löslich, so beim Alanyl-tyrosin die optisch reinen (D-D und L-L) und beim Methionyl-alanin und Alanyl-phenylalanin die optisch gemischten Formen (D-L und L-D). Werden sie als konzentrierte übersättigte Lösung aufgebracht, dann verlassen sie nach der Trennung auch die Säule als übersättigte Lösung und kristallisieren

22) J. biol. Chemistry **220**, 683 [1956].

im Eluat, z. B. beim Alanyl-tyrosin das L-L-Isomere, wenn auf der 100×1.5 -cm-Säule > 200 mg Peptid eingesetzt wurden. Bei einer Trennung von 500 mg kristallisierten z. B. in vier aufeinanderfolgenden Fraktionen à 7.5 ccm insgesamt über 100 mg reines L-Alanyl-L-tyrosin direkt aus.

Trennung der diastereomeren Alanyl-tyrosine: Je 100 mg synthetisch hergestelltes reines *D*- und *L*-Alanyl-L-tyrosin wurden gemeinsam in 1 ccm Wasser warm gelöst und auf die Säule aufgebracht. Die Säule war bereits dreimal vorher zu Trennungen benutzt worden. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 13.5 ccm/cm²·Stde. mit dem Elutionsgemisch Pyridin/Wasser im Molverhältnis 1 wurden nach einem Vorlauf von 235 ccm 15 Fraktionen à 11 ccm aufgefangen, die bei der Tüpfelprobe sowohl ninhydrin- als auch Pauly-positiv reagierten. Die Tüpfelprobe zeigte ein Minimum der Farbintensität bei Frakt. 8 und zwei Maxima bei Frakt. 4 bzw. 11 . Das Dünnschichtchromatogramm (Abbild. 1) zeigt, daß die nur in den Fraktionen 1 bis 7 enthaltene schnellere Komponente dem L-Alanyl-L-tyrosin entspricht, während die nur in den Fraktionen 8 – 15 enthaltene langsamere Komponente mit dem *D*-Alanyl-L-tyrosin identisch ist.

Die Fraktionsgruppen 1 – 7 und gesondert 8 – 15 wurden i. Vak. über konz. Schwefelsäure eingetrocknet und ausgewogen. Dabei ergaben sich für

L-Ala-L-Tyr 98 mg Auswage (= 98% des Einsatzes) und für

D-Ala-L-Tyr 95 mg Auswage (= 95% des Einsatzes).

Die geringen Verluste sind auf die Entnahmen für die Tüpfelprobe und die Dünnschichtchromatographie sowie auf Aufbereitungsverluste zurückzuführen.

Trennung der diastereomeren Valyl-tyrosine: 205 mg kristallisiertes, aus heißem Wasser mit Isopropylalkohol gefälltes und i. Vak. bei 61° über P_2O_5 getrocknetes *DL*-Valyl-L-tyrosin wurde in 3 ccm Pyridin/Wasser ($1:1$) auf dieselbe Sephadex G-50-Säule gegeben. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 14 ccm/cm²·Stde. wurden nach einem Vorlauf von 190 ccm 15 Fraktionen à 15 ccm aufgefangen, die bei der Tüpfelprobe sowohl ninhydrin- als auch Pauly-positiv reagierten. Die Tüpfelprobe zeigte ein Minimum an bei Frakt. 7 und zwei Maxima bei Frakt. 3 bzw. 9 . Wie das Dünnschichtchromatogramm zeigt, sind die beiden Diastereomeren vollständig getrennt worden.

Die Fraktionen wurden einzeln i. Vak. über konz. Schwefelsäure eingetrocknet und der Rückstand ausgewogen. Aus den Fraktionen 1 – 6 wurden insgesamt 120 mg *L*-Valyl-L-tyrosin und aus den Fraktionen 7 – 15 insgesamt 103 mg *D*-Valyl-L-tyrosin isoliert, zusammen also 223 mg statt der eingesetzten 205 mg. Die Diskrepanz ist durch den höheren Gehalt an Kristallwasser bei den ausgewogenen Proben zu erklären.

Die spezif. Drehung $[\alpha]_D$ wurde in $6N$ HCl bei $c = 0.7$ für die beiden getrennten Diastereomeren gesondert bestimmt zu:

$[\alpha]_D^{23}$: $+40.8^\circ$ für das schneller laufende bzw.

$[\alpha]_D^{23}$: -45.4° für das langsamere.

HUKUOKA²³⁾ gibt für das L-Valyl-L-tyrosin·H₂O in $5N$ HCl bei $c = 2$ einen Wert von $[\alpha]_D^{23}$: $+32.8^\circ$ an. Danach ist dem schneller laufenden Diastereomeren die L-L-Form zuzuordnen.

Trennung der diastereomeren Alanyl-phenylalanine: Die obige Säule wurde mit 70 mg *DL*-Alanyl-*DL*-phenylalanin in 5 ccm Pyridin/Wasser ($1:1$) beschickt. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 8.5 ccm/cm²·Stde. wurden nach einem Vorlauf von 370 ccm 16 Fraktionen à 10 ccm aufgefangen, die ninhydrinpositiv reagierten. Wie das Dünnschichtchromatogramm zeigt, ist das schneller laufende Antipodenpaar in Frakt. 3 – 10 , das langsamere in Frakt. 10 – 16 enthalten. Bis auf die Frakt. 10 sind die Diastereomeren also vollständig getrennt. Die Zuordnung der Diastereomeren wurde nicht durch Synthese bewiesen, es dürfte aber

²³⁾ J. chem. Soc. Japan **79**, 420 [1958].

sehr wahrscheinlich sein, daß das Paar L-L und D-D der schnelleren und das Paar L-D und D-L der langsameren Komponente entsprechen. Aus der Fleckengröße auf der Dünnschicht ist ein deutliches Überwiegen der schnelleren Komponente zu erkennen.

Die beiden Fraktionsgruppen, und gesondert die Mischfrakt. 10, wurden i. Vak. über Schwefelsäure eingetrocknet und gewogen:

Frakt. 1—9	34 mg
Frakt. 10	5 mg
Frakt. 11—16	27 mg
Summe	66 mg

das sind 94% des eingesetzten Peptids.

In ähnlicher Weise konnten auf der gleichen Säule 32 mg *DL-Methionyl-DL-alanin* glatt getrennt werden. Die gleiche Technik diente zur Trennung des auf S. 507 erwähnten Gemisches der drei Dipeptide *L-Alanyl-L-tyrosin* (100 mg), *D-Alanyl-L-tyrosin* (100 mg) und *D-L + L-D-Alanyl-phenylalanin* (30 mg).

Peptidsynthesen

D-Alanyl-L-tyrosin: 0.01 Mol *Benzyloxycarbonyl-D-alanin* wurden nach der für die „Anhydridmethode“ in l. c.²⁴⁾ angegebenen allgemeinen Arbeitsvorschrift — mit dem Unterschied einer nur dreiminütigen Bildungszeit des gemischten Anhydrids²⁵⁾ — mit 0.01 Mol *L-Tyrosinbenzylester* (Herstellung vgl. l. c.²⁴⁾) umgesetzt. Der feste Dipeptidbenzylester wurde sogleich in Isopropylalkohol mit Pd-Mohr zum freien Dipeptid hydriert. Aus heißem Wasser kamen auf Zusatz von Isopropylalkohol 1.9 g (76%) stäbchenförmige Kristalle vom Schmp. 253° (ohne vorherige Umwandlung). $[\alpha]_D^{25}$: +31.8° (in Wasser, $c = 2$). Läuft im Dünnschichtchromatogramm auf Cellulose in Pyridin/Wasser (1:1 Mol) langsamer als das Diastereomere.

$C_{12}H_{16}N_2O_4$ (252.1) Ber. C 57.14 H 6.36 N 11.11 Gef. C 56.33 H 6.28 N 11.04

L-Alanyl-L-tyrosin: Aus *Benzyloxycarbonyl-L-alanin* wie vorstehend. Aus heißem Wasser/Pyridin resultierten 1.8 g Stäbchen vom Schmp. 265—266° (nach Umwandlung in Nadeln bei 205° ohne Schmelzen). Wandert im Dünnschichtchromatogramm auf Cellulose in Pyridin/Wasser (1:1 Mol) rascher als das Diastereomere. $[\alpha]_D^{25}$: +43.2° (in Wasser, $c = 2$) (Lit.¹⁵⁾: +43.15°.

$C_{12}H_{16}N_2O_4$ (252.1) Ber. C 57.14 H 6.36 N 11.11 Gef. C 56.98 H 6.41 N 11.15

²⁴⁾ H. DETERMANN, O. ZIPP und TH. WIELAND, Liebigs Ann. Chem. **651**, 172 [1962].

²⁵⁾ H. DETERMANN und TH. WIELAND, Liebigs Ann. Chem. **670**, 136 [1963].