

Friedrich Weygand, Wolfgang König, Axel Prox und Klaus Burger

Racemisierung bei der Partial- und Totalhydrolyse von Peptiden

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Eingegangen am 3. November 1965)

Die bei der Partialhydrolyse von Peptiden mit methanolischer Salzsäure und die bei der Totalhydrolyse von isoleucinhaltenen Peptiden mit konz. Salzsäure auftretende Racemisierung wurde gaschromatographisch bestimmt. Zur Deutung der geringfügigen Racemisierung der mittelständigen Aminosäuren wird ein Azlactonmechanismus vorgeschlagen.

Die gaschromatographische Diastereoisomerentrennung von *N*-Trifluoracetyl-dipeptid-methylestern¹⁾ ermöglicht es, die bei der Partialhydrolyse von Peptiden mit 8.5*n* methanolischer HCl bei 70° (24 Stdn.) auftretende Racemisierung in einfacher Weise zu bestimmen. Die gebildeten Dipeptid-methylester-hydrochloride werden in die *N*-TFA-Verbindungen übergeführt und der gaschromatographischen Analyse an einer Kapillarsäule unterworfen. Die Peptide selbst wurden durch die racemisierungsfreie stufenweise Verlängerung um jeweils eine Benzyloxycarbonylamino-säure hergestellt.

Tab. 1. Racemisierung bei der Partialhydrolyse von Peptiden mit 8.5*n* methanolischer HCl, 24 Stdn. bei 70°

Peptid	Menge an diastereoisomerem Dipeptid in %			
	Leu-Phe	Phe-Ala	Phe-Val	Val-Val
<i>N</i> -TFA-L-Leu-L-Phe-OCH ₃	0			
H-L-Leu-L-Phe-L-Ala-OH	1.6	0		
H-L-Leu-L-Phe-L-Val-OH	1.8		0	
H-L-Leu-L-Phe-L-Val-L-Val-OH	4.7		3.6	0

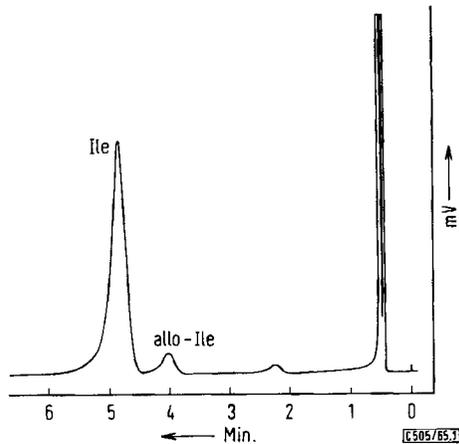
Aus Tab. 1 geht hervor, daß stets in demjenigen Peptid, dessen Carboxylgruppe durch Spaltung der Peptidbindung gebildet wird, eine geringe Racemisierung gefunden wird.

Danach war zu erwarten, daß die aus einem solchen Dipeptid gebildete carboxyl-endständige Aminosäure auch zu einem geringen Grade racemisiert ist. Um diese Frage auch für die Totalhydrolyse von Peptiden prüfen zu können, wurde ein weiteres Verfahren der Diastereoisomerentrennung angewandt²⁾.

¹⁾ F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer und W. König, *Angew. Chem.* **75**, 282 (1963); *Angew. Chem. internat. Edit.* **2**, 183 (1963).

²⁾ Erstmals erwähnt: F. Weygand, Proc. VI. Europ. Peptidsymposium Sept. 1963, Athen, Pergamon Press, Oxford (im Druck), ferner F. Weygand, *Z. analyt. Chem.* **205**, 406 (1964).

α -Aminosäuren liefern bei der Umsetzung mit Hexafluoraceton die 2.2-Bis-trifluor-methyl-oxazolidone-(5)^{2,3)} (1). Die entsprechenden Derivate des L-Isoleucins und des durch Racemisierung daraus hervorgehenden D-allo-Isoleucins lassen sich, da sie diastereoisomere Verbindungen sind, gaschromatographisch trennen und bestimmen. Ein solches Gaschromatogramm zeigt die Abbild. Mit Hilfe dieser Methode wurden die mit konz. Salzsäure bei 90° (26 Stdn., Bombenrohr) gewonnenen Totalhydrolysate einer Reihe von L-Isoleucinhaltigen Peptiden untersucht.



Gaschromatographische Trennung von Ile/allo-Ile über die entspr. 2.2-Bis-trifluormethyl-oxazolidone-(5) (1). Aufgegebene Menge: 0.1 μ l (in THF); 50-m-Stahl-Kapillarsäule mit Polyphenyläther (OS-138); Trenntemperatur 82° isoth.; Durchflußgeschwindigkeit 0.8 Nml N₂/Min.; Teilungsverhältnis 1:35; FID

Tab. 2. Racemisierung des L-Isoleucins bei der Totalhydrolyse von Peptiden mit konz. Salzsäure, 26 Stdn. bei 90°

Peptid	% D-allo-Isoleucin	Peptid	% D-allo-Isoleucin
H-L-Ile-Gly-OH	0	H-L-Ile-L-Phe-L-Val-OH	0
H-L-Ile-L-Pro-OH	0	H-L-Phe-L-Ile-L-Phe-OH	0.9
H-L-Ile-L-Phe-OH	0	H-L-Ala-L-Ile-L-Phe-OH	~0.5

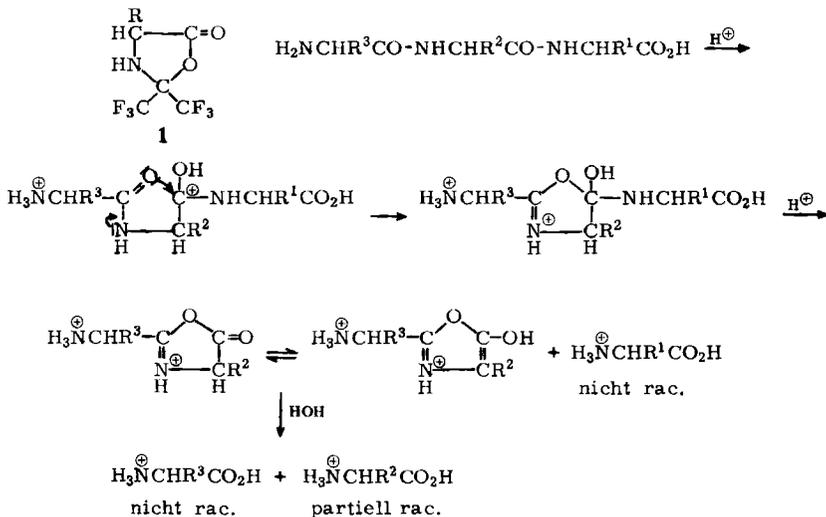
Aus Tab. 2 ergibt sich, daß aminoendständiges L-Isoleucin nicht, mittelständiges aber zu geringem Grade racemisiert wird.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann also aus einem Peptid unter den angegebenen Bedingungen bei der Partialhydrolyse nur das carboxylendständige Dipeptid racemisierungsfrei erhalten werden und bei der Totalhydrolyse offenbar nur die carboxylendständige und aminoendständige Aminosäure.

Zur Erklärung dieser Befunde kann ein Azlactonmechanismus herangezogen werden. Diese Vorstellungen sind in dem folgenden Schema für die Hydrolyse eines Tripeptids

³⁾ F. Weygand und K. Burger, Chem. Ber., in Vorbereitung.

formuliert. Es erklärt die Tatsache, daß nur die mittelständigen Aminosäuren racemisiert werden. Der Umfang dieser Racemisierungen ist offenbar gering, weil in der Hauptsache eine normale Hydrolyse abläuft.



Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Förderung dieser Untersuchungen und Fräulein I. Kessler für die Durchführung der gaschromatographischen Analysen.

Beschreibung der Versuche

Die Bedingungen der Partialhydrolyse mit 8.5*n* methanolischer HCl sind in anderem Zusammenhang bereits mitgeteilt worden⁴⁾, ebenso die anschließende *N*-Trifluoracetylierung und die gaschromatographische Analyse.

Totalhydrolyse der L-isoleucinhaltigen Peptide, Überführung in die 2.2-Bis-trifluormethyl-oxazolidone-(5) und gaschromatographische Untersuchung: Etwa 0.1 mmol der zu untersuchenden Peptide wurden in 4 ccm konz. Salzsäure im Bombenrohr 26 Stdn. auf 90° erhitzt, worauf i. Vak. zur Trockne eingedampft wurde. Den in Wasser gelösten Rückstand neutralisierte man mit Amberlite IR 4b oder mit Lewatit MIH 59 und dampfte wiederum ein. Zwecks Überführung in die 2.2-Bis-trifluormethyl-oxazolidone-(5) wurde der Rückstand in 1 ccm Dimethylsulfoxyd gelöst. In einer geschlossenen, mit Trockeneiskühler versehenen Apparatur wurde Hexafluoraceton auf die DimethylsulfoxydLösung aufgeteilt. Sobald der Rückfluß des Hexafluoracetons einsetzte, wurde dessen Zufuhr unterbrochen. Nach etwa einer Stde. wurde mit Methylenechlorid verdünnt und der größte Teil des Dimethylsulfoxyds mit Wasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen der Methylenechloridlösung mit Natriumsulfat wurde gaschromatographiert unter Verwendung einer 50 m langen Stahlkapillare, belegt mit Polyphenyläther (Golay-Säule OS 138; Perkin-Elmer Fraktometer 116 E; Trägergas Stickstoff, Temp. 82°, Teilungsverhältnis 1:35, Flammenionisationsdetektor). Das Verhältnis von L-Isoleucin: D-allo-Isoleucin ergab sich aus den Flächenverhältnissen nach Planimetrierung.

⁴⁾ H. C. Beyerman, W. Maassen van den Brink, F. Weygand, A. Prox, W. König, L. Schmidhammer und E. Nintz, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **84**, 213 (1965). [505/65]