

Konstitutionsermittlung von Peptiden.

III. Über eine schonende Methode zur Umwandlung von Peptiden in Hydantoinpeptide.

VII. Mitteilung über Peptide¹.

Von

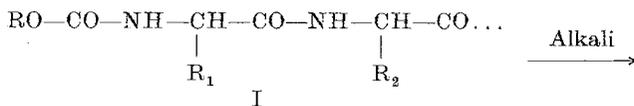
F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 14. Okt. 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 30. Okt. 1952.)

In früheren Mitteilungen^{1, 2} wurden Methoden zur Bestimmung der Aminosäure³, der ihr benachbarten und der Aminosäure³ in Di-, Tri- und Tetrapeptiden beschrieben. Dabei werden die beiden ersteren als Hydantoin IV abgespalten, während letztere mit NaBH₄ zum Aminoalkohol reduziert wird.

Zur Abspaltung der beiden benachbarten Aminosäuren als Hydantoin wird das Carbalkoxypeptid I mit Alkali erhitzt, wobei über das intermediär entstehende Hydantoinpeptid II das Carbonyl-aminosäure-peptid III erhalten wird, das dann bei Säurebehandlung das substituierte Hydantoin IV abspaltet.

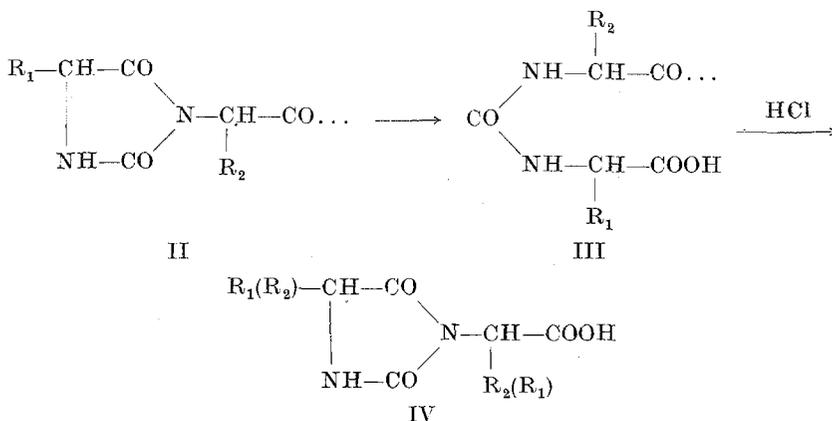


In der vorliegenden Arbeit soll nun über Möglichkeiten berichtet werden, die Umwandlung der Peptide in die Hydantoinpeptide unter mildereren Bedingungen als bisher zu erreichen. So wollten wir die bisherige Unsicherheit in der Feststellung der Reihenfolge der Aminosäure und der ihr folgenden eliminieren und zu exakten Schlüssen kommen.

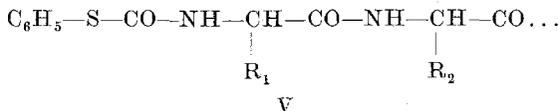
¹ VI. Mittlg.: F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich, Mh. Chem. **83**, 1426 (1952).

² F. Wessely, K. Schlögl und G. Korger, Mh. Chem. **83**, 1156 (1952); Nature (London) **169**, 708 (1952).

³ Über die Bezeichnung der Aminosäuren siehe vorige Mittlg., loc. cit.



1947 hatte *G. C. H. Ehrensward*⁴ in einer kurzen Mitteilung ein neues Verfahren zum Schutze der Aminogruppe bei Peptidsynthesen angegeben. Er verwendete an Stelle der von *Bergmann* und *Zervas*⁵ eingeführten N-Carbobenzoxy-Verbindungen die Phenylthiocarbonyl-(PTC)-Verbindungen V, die durch Umsetzung von Aminosäure- oder Peptidestern mit PTC-Chlorid, das wiederum aus Phosgen und Thiophenol erhältlich ist, darstell-



bar sind. Direkte Kupplung der freien Aminosäuren oder Peptide mit PTC-Chlorid nach *Schotten-Baumann* gab keine oder nur schlechte Ausbeuten. Die Vorteile der PTC-Verbindungen sollten in ihrer besseren Kristallisationsfreudigkeit und höheren Schmelzpunkten gegenüber den Cbz-Verbindungen liegen. Durch Erhitzen dieser PTC-Verbindungen mit Pb-Acetat in Äthanol oder durch Behandeln mit 0,1 n Alkali in der Kälte in Gegenwart von PbO sollten sie dann wieder in die freien Aminosäuren oder Peptide und in Bleithiophenolat gespalten werden.

A. Lindenmann, *N. H. Khan* und *K. Hofmann*⁶ konnten jedoch vor kurzem zeigen, daß bei der Behandlung von PTC-Dipeptidestern mit Bleisalzen in der geschilderten Weise nicht die freien Ester regeneriert wurden, sondern durch Thiophenolabspaltung daraus die entsprechenden Hydantoinester erhalten worden waren. Dieser Hydantoinringschluß ist der von uns untersuchten Reaktion von Carbalkoxypeptiden mit Alkali durchaus analog. Auch hier wird ja Alkohol abgespalten, nur sind die dabei entstehenden Hydantoinpeptide II in alkalischer Lösung unbeständig und erleiden Ringöffnung zu den entsprechenden Harnstoffderivaten III.

Diese Verwendung von PTC-Peptiden schien uns nun zur Bestimmung der Aminosäure und der ihr benachbarten und überdies zur Festlegung

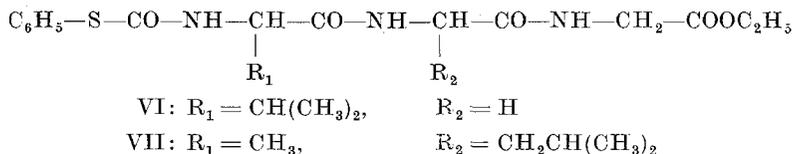
⁴ Nature (London) **159**, 500 (1947).

⁵ Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1192 (1932).

⁶ J. Amer. chem. Soc. **74**, 476 (1952).

der Reihenfolge der beiden Aminosäuren in Peptiden geeignet. Da dem aus dem PTC-Peptid durch Thiophenolabspaltung mittels Bleisalzen erhaltenen Hydantoinpeptid eine definierte Struktur zukommt, so konnte ja aus dem daraus durch Hydrolyse erhaltenen Hydantoin IV, dessen Struktur sich mittels einer von uns angegebenen Methode^{1, 2} bestimmen läßt, auf die *Aminosäure* geschlossen werden. Eine Umlagerung isomerer Hydantoine ineinander ist — wie früher gezeigt¹ — mit Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Es wurde nun dieses Verfahren an 2 Tripeptiden geprüft und tatsächlich als gut anwendbar gefunden. Außerdem konnten wir noch feststellen, daß die PTC-Peptidester schon beim bloßen Erhitzen in Äthanol in verschiedenem Ausmaß unter Bildung des Hydantoinpeptidesters Thiophenol abspalten. Quantitativ konnte dies allerdings nur in einem der beiden untersuchten Fälle, nämlich dem des PTC-Valyl-glycyl-glycin-esters VI erreicht werden, bei dem der Ringschluß zum Hydantoin von vornherein wegen der Größe des Restes der *Aminosäure* Valin gegen den der benachbarten Aminosäure Glycin begünstigt war. Näheres über die Möglichkeiten der Hydantoinbildung und deren Abhängigkeit von der Größe der Aminosäuren wurde bereits früher^{1, 2} ausgeführt.

Zur Darstellung von PTC-DL-Valyl-glycyl-glycin-äthylester⁷ VI und PTC-DL-Alanyl-DL-leucyl-glycin-äthylester VII wurden die entsprechenden Tripeptidester mit $\frac{1}{2}$ Mol PTC-Chlorid in Essigester umgesetzt. Die dabei erhaltenen Verbindungen VI bzw. VII waren leicht zur

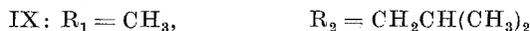
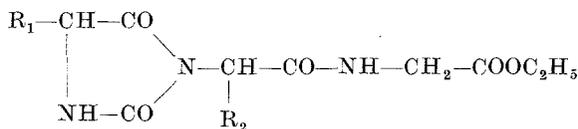


Kristallisation zu bringen, besaßen im Rohzustand die Schmelzpunkte 166 bis 169° bzw. 172 bis 174° und zeigten richtige Analysenwerte. Die Schmelzpunkte sanken jedoch schon nach einigem Lagern, noch mehr aber beim Umlösen aus Äthanol, wobei stets deutlicher Geruch nach Thiophenol auftrat. Die Äthoxylwerte der so behandelten Verbindungen lagen höher als die der Rohprodukte, was ebenfalls auf eine Abspaltung von Thiophenol hindeutete. Beim 2- bis 3stündigen Erhitzen der äthanolischen Lösungen schließlich erhielten wir aus VI den entsprechenden Hydantoinpeptidester N-(5-Isopropyl-hydantoin-3-acetyl)-glycin-ester VIII, der nach Mischschmelzpunkt mit dem nach der Pb-Acetatmethode erhaltenen Produkt identisch war, während die Alkohol-

⁷ Für die Überlassung des Tripeptides sind wir Herrn Dir. Dr. F. Mietzsch, Bayerwerke Elberfeld, zu großem Dank verpflichtet.

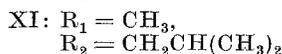
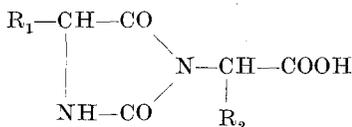
behandlung von VII unter ebenfalls deutlicher Thiophenolabspaltung nur ein nicht kristallisierendes Produkt lieferte.

Die beiden rohen PTC-Ester VI und VII gaben beim kurzzeitigen Erhitzen mit Pb-Acetat (10 Min.) in 70%igem Äthanol Abspaltung der berechneten Menge Pb-Thiophenolat unter Bildung der gewünschten Hydantoinpeptidester VIII und IX. Während bei VI, wo dieser Ring-



schluß aus früher erörterten^{1, 2} Gründen bevorzugt erfolgen mußte, die Ausbeuten gut waren und kein freier Tripeptidester papierchromatographisch in der Mutterlauge (exper. Teil) nachzuweisen war, war die Ausbeute bei dem Peptidester VII mit der für einen Ringschluß ungünstigen Konstitution Ala-Leu-Gly schlechter und es konnte auch freier Tripeptidester in der Mutterlauge des Hydantoinpeptidesters IX nachgewiesen werden.

Die Hydrolyse des Hydantoinpeptidesters VIII mit HCl endlich gab die in der Literatur bereits beschriebene⁸ und dort auf anderem Wege gewonnene 5-Isopropyl-hydantoin-3-essigsäure X einerseits, papier-



chromatographisch reines Glycin andererseits. Das Hydantoin X wurde noch mit HCl unter Druck hydrolysiert und zeigte dann im Papierchromatogramm Valin und Glycin.

Ähnlich eindeutig lagen die Verhältnisse bei der Hydrolyse von IX. Dabei wurde das Hydantoin nur ölig erhalten; es konnte aber nach Hydrolyse (Alanin und Leucin) und Abbau mit NaBH_4 ^{1, 2} als 5-Methylhydantoin-3- α -isocapronsäure XI erkannt werden. In der vom Hydantoin durch Ätherextraktion befreiten wäßrigen Lösung fand sich Glycin, das mit wenig Leucin und Spuren Alanin verunreinigt war.

Der Vorteil der Verwendung von PTC-Peptidestern an Stelle von Carballoxy-estern zur Bestimmung der Aminosäure und der ihr benachbarten liegt in der schonenden Methode des Ringschlusses sowie

⁸ St. Goldschmidt und K. Strauß, Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 1218 (1930):

in der Möglichkeit, auch die Reihenfolge der genannten Aminosäuren feststellen zu können.

Der *Nachteil* liegt vor allem in der Tatsache, daß, wie erwähnt, die Umsetzung mit PTC-Chlorid mit dem *Peptidester* erfolgen muß, was ein primäres Verestern des Peptides erfordert, wobei anschließend nur die Hälfte des Esters zur Umsetzung gelangt, während die andere Hälfte als Chlorhydrat gebunden wird.

Da es vor allem für höhere Peptide wünschenswert ist, die Verwendung der Ester zu vermeiden, haben wir versucht, die Umlagerung der Carbalkoxyverbindungen I, die aus den Alkalisalzen der Peptide in wäßriger Lösung darstellbar sind, in Carbonyl-amino-säurepeptide III (über die Hydantoinpeptide II) unter milderer Bedingungen, als es bisher durch Erhitzen mit 1 n oder 0,5 n NaOH möglich war, zu erreichen. Bei diesem Erhitzen könnte nämlich im Falle komplizierterer Peptide ein Angriff auf die restliche Peptidkette erfolgen. Allerdings wurde dies bei den bisher untersuchten Peptiden, wenn überhaupt, nur in ganz geringem Maße beobachtet und war für die Methode keineswegs störend.

Wir prüften nun die Möglichkeit, die Carbalkoxypeptide I mit alkoholischem Alkali in III umzulagern. Hierbei hofften wir, einerseits einen Angriff auf die Peptidbindung wegen des Arbeitens in alkohol. Lösung einzuschränken, andererseits haben wir tiefere Temperaturen (65 bis 80° gegen 100°) und kürzere Erhitzungszeiten (1 Std. gegen 2 bis 3 Stdn.) als bisher angewandt. Auch dadurch wird das Ausmaß des Angriffes auf die Peptidbindung herabgesetzt.

Tatsächlich ließ sich nun in dem von uns geprüften Fall des N-Carbäthoxy-glycyl-glycin-äthylesters beim Erhitzen sowohl mit äthanol. NaOH als auch mit methanol. KOH glatte Umwandlung in das Carbonyl-bisglycin (Gly-CO-Gly) erzielen, das als solches, als Diäthylester und auch papierchromatographisch identifiziert wurde⁹. Außerdem wurde beim Erhitzen mit HCl Hydantoin-3-essigsäure IV ($R_1 = R_2 = H$) erhalten. Allerdings schied sich beim bloßen Erhitzen von Carbäthoxy-diglycin-ester mit alkohol. Lauge bald ein Niederschlag ab, der wahrscheinlich das in Alkohol unlösliche Alkalisalz des freien Carbäthoxy-dipeptids darstellt, das damit weitgehend der weiteren Umsetzung entzogen wird. Das auf diese Weise erhaltene Produkt war nämlich stets ein Gemisch aus Gly-CO-Gly und dem freien Carbäthoxy-dipeptid, die sich papierchromatographisch gut nebeneinander nachweisen ließen.

Wir haben daher nach halbstündigem Erhitzen mit der alkohol.

⁹ Über die papierchromatographische Trennung und Identifizierung von Carbalkoxypeptiden, Hydantoinpeptiden, Carbonyl-aminosäurepeptiden und Hydantoinen IV wird in Kürze an anderer Stelle berichtet werden.

Lauge noch soviel Wasser zugegeben, bis der Niederschlag eben in Lösung ging (zirka 60%iger Alkohol), dann noch 30 Min. erhitzt und erhielten auf diese Weise ausschließlich Carbonyl-bisglycin.

Die Isolierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Eindampfen der wäßrig-alkoholischen Lösung, Versetzen mit dem Säureäquivalent (1 n HCl), Eindampfen im Vakuum und Auskochen des Rückstandes mit absol. Äthanol.

Es ist also möglich, die Umlagerung von I in III auch unter schonenderen Bedingungen als bisher durchzuführen, was in manchen Fällen — vor allem bei empfindlicheren Peptiden — einen Vorteil bieten dürfte.

Experimenteller Teil.

DL-Valyl-glycyl-glycin-äthylester.

1,2 g DL-Valyl-glycyl-glycin⁷ wurden in 30 ml absol. Äthanol suspendiert und unter Eiskühlung mit HCl-Gas gesättigt. Es trat rasch Lösung ein und gegen Ende fiel wieder ein Niederschlag aus. Anschließend wurde noch 5 Min. am Wasserbad zum Sieden erhitzt. Die klare Lösung schied beim Kühlen 1,2 g (78% d. Th.) des Esterchlorhydrats aus. Aus absol. Äthanol Stäbchen. Schmp. 194 bis 198¹⁰.

$C_{11}H_{21}O_4N_3 \cdot HCl$. Ber. Cl 11,99, OC_2H_5 15,24. Gef. Cl 12,23, OC_2H_5 15,29.

Die Substanz erwies sich im Papierchromatogramm (*Schleicher-Schüll* 2043 b, Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5) als einheitlich. $R_F = 0,60$.

Der Ester wurde in üblicher Weise aus dem Chlorhydrat mit Kaliumkarbonat und Essigester in einer Ausbeute von 90% d. Th. in Freiheit gesetzt. Er stellt ein zähes gelbliches Öl dar. Für die weitere Verwendung wurde der rohe Ester herangezogen.

N-Phenylthiocarbonyl-DL-valyl-glycyl-glycin-äthylester (VI).

1,4 g Tripeptidester lösten wir in 15 ml absol. Essigester und versetzten mit einer Lösung von 0,52 Phenylthiocarbonyl-chlorid (0,55 Mol) in 2 ml Essigester. Es erfolgte rasch Trübung und Abscheidung eines zähen Öles, das nach einiger Zeit zu einem Kristallbrei erstarrte. Nach 12 Stdn. Stehen bei Zimmertemp. wurde abgesaugt und der Niederschlag zur Befreiung von Esterchlorhydrat mit Wasser, verd. HCl und wieder mit Wasser gewaschen. Ausbeute 0,8 g (74% d. Th.). Schmp. 166 bis 169° (Geruch nach Thiophenol beim Schmelzen).

$C_{18}H_{25}O_5N_3S$. Ber. C 54,67, H 6,37, N 10,63, OC_2H_5 11,39.

Gef. C 54,92, H 6,24, N 10,78, OC_2H_5 11,21.

Nach 2maligem Umlösen aus Äthanol (Nadeln) lag der Schmp. bei 148 bis 150°.

Gef. OC_2H_5 13,80.

Wurde die Substanz vom Schmp. 166 bis 169° mit Äthanol 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt, so trat deutlicher Geruch nach Thiophenol auf. Der Ab-

¹⁰ Alle Schmelzpunkte dieser Arbeit wurden im Mikroschmelzpunktsapparat nach *Kofler* bestimmt.

dampfrückstand schmolz, einmal aus Äthanol-Äther umgelöst, von 135 bis 137° und gab keine Depression im Mischschmp. mit VIII.

N-(5-Isopropyl-hydantoin-3-acetyl)-glycin-äthylester (VIII).

0,59 g rohes VI wurde mit einer warmen Lösung von 0,31 g Pb-Acetat 3 H₂O (0,55 Mol) in 30 ml 70%igem Äthanol übergossen und 10 Min. am siedenden Wasserbad erhitzt. Schon nach kurzem setzte die Abscheidung von Pb-Thiophenolat ein. Dieses wurde nach Köhlen abgesaugt und mit Äthanol gewaschen. Nach dem Trocknen wog es 0,31 g (97% d. Th.). Das klare Filtrat dampften wir im Vak. zur Trockene ein und lösten den Rückstand (0,42 g = 98% d. Th.) 2mal aus Äthanol-Äther um. Ausbeute 0,25 g (59% d. Th.). Prismen. Schmp. 136 bis 138°.

Die Mutterlauge war, wie aus dem Papierchromatogramm hervorging, frei von Tripeptidester und anderen ninhydrinpositiven Substanzen.

C₁₂H₁₉O₅N₃. Ber. C 50,52, H 6,71, N 14,73, OC₂H₅ 15,80.

Gef. C 50,94, H 6,77, N 14,75, OC₂H₅ 15,64.

5-Isopropyl-hydantoin-3-essigsäure (X).

0,186 g VIII erhitzen wir mit 10 ml HCl (1 : 1) 2 Stdn. unter Rückfluß. Hierauf wurde im Vak. abgedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und die Lösung mit Äther im Apparat extrahiert. In der von X mit Äther bereiten wäßr. Lösung war nur Glycin nachzuweisen. Der Ätherrückstand lieferte 0,100 g (77% d. Th.) bald erstarrendes Öl. Aus Äther-Petroläther + wenig Äthanol Blättchen. Schmp. 150 bis 152°. Die Literatur⁸ gibt als Schmp. 148° an.

C₈H₁₂O₄N₂. Ber. C 48,00, H 6,04, N 14,00. Gef. C 47,86, H 5,98, N 14,18.

Ein Teil des Hydantoin wurde 5 Stdn. bei 140 bis 150° mit konz. HCl unter Druck hydrolysiert. Das Hydrolysat gab im Papierchromatogramm Glycin und Valin.

N-Phenylthiocarbonyl-DL-alanyl-DL-leucyl-glycin-äthylester (VII).

1,2 g Tripeptidester¹, gelöst in 10 ml absol. Essigester, wurden mit 0,39 g PTC-Chlorid (0,55 Mol) in 2 ml Essigester versetzt; unter Selbsterwärmung fiel rasch ein Niederschlag aus, der nach mehreren Stdn. abgesaugt wurde. Die Mutterlauge dampften wir im Vak. ein und vereinigten den Rückstand mit dem abgesaugten Produkt. Die weitere Reinigung erfolgte durch Waschen mit Wasser, verd. HCl und Wasser. Ausbeute 0,5 g (57% d. Th.). Schmp. 172 bis 174°.

C₂₀H₂₉O₅N₃S. Ber. N 9,95, OC₂H₅ 10,64. Gef. N 10,30, OC₂H₅ 10,77.

Auch hier trat nach 2maligem Umlösen aus Äthanol Depression des Schmelzpunktes ein (163 bis 165°), während deutlicher Geruch nach Thiophenol sowohl beim Erhitzen als auch beim Schmelzen auftrat. Mehrstündiges Erhitzen der äthanol. Lösung führte nur zu einem nicht kristallisierenden Öl.

Für das Produkt vom Schmp. 163 bis 165° wurde ein Äthoxylgehalt von 12,32 gefunden.

N-(5-Methyl-hydantoin-3-α-isocapronyl)-glycin-äthylester (IX).

Die Darstellung des Hydantoinpeptidesters IX erfolgte aus dem rohen Produkt VII (0,436 g) und Pb-Acetat (0,210 g = 0,55% d. Th.) in der für VIII

beschriebenen Weise. Hierbei wurden 0,195 g (90% d. Th.) Pb-Thiophenolat gewonnen.

Aus dem Abdampfrückstand des Filtrats erhielten wir bei Behandeln mit Äthanol-Äther-Petroläther 0,173 g kristallisiertes Produkt (54% d. Th.) vom Schmp. 95 bis 99°. Die Mutterlauge gab im Papierchromatogramm einen Fleck mit dem R_F -Wert (0,71) des Tripeptidesters.

Zur Analyse wurde noch 2mal aus wenig Äthanol-Äther-Petroläther umgelöst. Schmp. 98 bis 100°.

$C_{14}H_{23}O_5N_3$. Ber. C 53,66, H 7,39, OC_2H_5 14,38.

Gef. C 53,48, H 7,35, OC_2H_5 13,97.

Hydrolyse des Hydantoinpeptidesters IX.

0,15 g IX wurden mit 10 ml HCl (1 : 1) 2 $\frac{1}{2}$ Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Abdampfen im Vak., Aufnehmen des Rückstandes in Wasser und Ätherextraktion.

Der Ätherrückstand (0,10 g = 90% d. Th.) war ein Glas, das nach Druckhydrolyse unter den für X angegebenen Bedingungen im Papierchromatogramm ausschließlich Alanin und Leucin zeigte. Die Konstitutionsermittlung mit $NaBH_4$, wie sie früher^{1, 2} beschrieben worden war, ergab im Papierchromatogramm viel Alanin neben wenig Leucin, was die Struktur des Hydantoins als 5-Methyl-hydantoin-3- α -isocaproensäure XI bewies.

Die von XI durch Extraktion befreite wäßr. Lösung enthielt mit wenig Alanin und Leucin verunreinigtes Glycin.

Carbonyl-bisglycin aus N-Carbäthoxy-glycyl-glycin-äthylester.

0,46 g Carbäthoxy-diglycin-ester wurden mit 4 ml (2 Mol) 1 n äthanol. NaOH (bzw. methanol. KOH) $\frac{1}{2}$ Std. am siedenden Wasserbad erhitzt. Nach zirka 10 Min. bereits schied sich ein Niederschlag aus, der nach weiteren 20 Min. durch Zugabe von etwa 2 ml Wasser in Lösung gebracht wurde. Nach weiteren 30 Min. Erhitzen dampften wir im Vak. ein, versetzten den Rückstand, der in wenig Wasser gelöst worden war, mit 4 ml 1 n HCl und dampften erneut zur Trockene. Der gut getrocknete Rückstand wurde dann mehrfach mit absol. Äthanol ausgekocht. Ausbeute 0,26 g (75% d. Th.) an Carbonyl-bisglycin, das durch Eindampfen der äthanol. Lösung gewonnen wurde. Schmp. 187 bis 193° (lebhaft Zersetzung).

Die Verbindung wurde sowohl papierchromatographisch⁹ als auch durch Überführen in den Diäthylester (kurzes Erhitzen mit äthanol. HCl) vom Schmp. 147 bis 149°, der keine Depression im Mischschmp. mit einer authentischen Probe gab, identifiziert. Beim 2stünd. Erhitzen mit Salzsäure, Abdampfen im Vak. und Extraktion des in Wasser aufgenommenen Rückstandes mit Äther erhielten wir Hydantoin-3-essigsäure, die wieder durch Schmp. (195 bis 197°), Mischschmp. und papierchromatographisch charakterisiert wurde.

Die Mikro-C-, H- und N-Analysen sowie die Halogenbestimmung wurden von Herrn Dr. G. Kainz im Mikrolaboratorium des II. Chemischen Institutes ausgeführt.

Zusammenfassung.

1. Zur Bestimmung der Aminosäure und der ihr benachbarten und zur Feststellung der Reihenfolge dieser Aminosäuren in Peptiden können

die Phenylthiocarbonyl-peptidester herangezogen werden. Diese erleiden beim Erwärmen mit Bleiacetat unter Abspaltung von Bleithiophenolat Ringschluß zu den entsprechenden Hydantoinpeptidestern, wie an 2 Tripeptidestern gezeigt werden konnte. Die Abspaltung von Thiophenol erfolgt auch bereits beim bloßen Erhitzen der äthanolischen Lösung der PTC-Ester.

2. Die Alkoholabspaltung aus N-Carbäthoxy-diglycin-ester über die Hydantoin-3-essigsäure zum Carbonyl-bisglycin kann in schonender Weise durch Erwärmen mit alkoholischer Lauge erfolgen, wodurch ein Angriff auf Peptidbindungen in geringerem Maße zu befürchten ist als bei der bisherigen Methode (Erhitzen mit 1 n NaOH).