Journal für praktische Chemie
Chemiker-Zeitung
© Johann Ambrosius Barth 1994

Einfacher gravimetrischer Racemisierungstest

C. Griehl und H. Jeschkeit

Halle, Institut für Organische Chemie, Martin-Luther-Universität

Eingegangen am 16. Februar bzw. 31. März 1993

Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Jakubke zum 60. Geburtstag gewidmet

Simple Gravimetric Test of Racemization

Der erste Standard-Racemisierungstest wurde 1958 von Anderson und Callahan [1] in die Peptidchemie eingeführt. Bei diesem noch heute verwendeten, inzwischen HPLC-modifizierten Testsystem [2], wird der bei der Peptidverknüpfung von Z-Gly-Phe-OH und H-Gly-OEt gebildete Tripeptidracematanteil durch fraktionierte Kristallisation vom L-Tripeptid getrennt und gravimetrisch bestimmt. Die Empfindlichkeit des Testes wird mit 1–2 % angegeben, der erforderliche Zeitbedarf beträgt wegen der langwierigen Kristallisationsprozesse mehrere Tage.

Durch Zufall fanden wir kürzlich, daß bei der Synthese von Bz-Phe-Gly-OEt mit DCC im Aufarbeitungsprozess der Essigesterlösung ständig ein kristalliner Feststoff anfiel (Fp. 161–162), der sich als optisch inaktiv erwies und auf Grund der analytischen Daten (Drehwert, Elementaranalyse, RP-HPLC, IR) und nach Vergleich mit authentischem Material als Bz-DL-Phe-Gly-OEt **1** identifiziert werden konnte. Die gesuchte L-Verbindung **2** (Fp. 142–143 °C; $[\alpha]_D$: −39.2 °, c = 2 in Dioxan) fand sich in hoher Reinheit im Essigesterfiltrat (Tabelle 1). Wir konnten die extremen Löslichkeitsunterschiede von **1** und **2** in Essigester für den Aufbau eines einfachen Racemisierungstestes nutzen. Grundlage des Testes ist die Kupplung von Bz-Phe-OH mit H-Gly-OEt, die Entfernung der nicht umgesetzten Ausgangsstoffe und Nebenprodukte durch die üblichen Waschoperationen und die fraktionierte Kristallisation des nach Abdampfen des Lösungsmittels erhaltenen Rohproduktes aus einer 2 %igen Essigesterlösung.

Tabelle 1 Analytische Daten der Referenzpeptide

Verb.	Fp. [°C]	$[\alpha]_D$ (c = 2, Dioxan)	C H N	k'[a]	νC = O[b] (cm^{-1})
1	161–162	–	ber. 67.78/6.28/7.91 gef. 67.93/6.45/8.03	3.2	1670
2	142–143	−39.2	gef. 67.63/6.54/7.68	3.2	1670

[a] k' = $(t_r-t_0)/t_0$ (t_0 = 2.63); Säule: 250-4 LiChrospher 100 RP-18, dp = 5 µm der Firma Merck; Fließgeschwindigkeit: 0.8 ml/min; Laufmittel: 60 % wäßr. MeOH; UV-Detektion: 220 nm

[b] Amid I (in DCM)

Beschreibung der Versuche

Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der Racemisierung

2,5 mmol Bz-Phe-OH werden in 30 ml DCM gelöst. Zu der auf 0 °C abgekühlten Lösung fügt man 2,5 mmol frisch destillierten Glycinethylester und anschließend 2,5 mmol Kupplungsreagenz hinzu. Das Reaktionsgemisch wird 1 Std. bei 0 °C und 16 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der beim DCC-Verfahren ausfallende Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert. Die DCM-Phase wird nacheinander mit jeweils 15 ml 2N HCl-Lösung, H_2O, gesättigter $NaHCo_3$-Lösung und H_2O gewaschen, anschließend über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. (Bei Verwendung von DMF wird vor dem Waschprozß das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in DCM aufgenommen). Der nach Entfernen des Dichlormethans isolierte kristalline Rückstand (885 mg bei 100 % Ausbeute) wird mit 45 ml Essigester versetzt, wobei **2** vollständig in Lösung geht. Das kristallin verbleibende **1** wird abgetrennt, die Mutterlauge zur Hälfte eingeengt und eventuell nachfallendes DL-Peptid

Tabelle 2 Beispiele für die Anwendung des Testes mit verschiedenen Kupplungsreagenzien

Kupplungs-reagenzien	Lösungs-mittel	% Ausb.	% DL[a] Bz-Phe-Gly-OEt	% DL[b] Bz-Phe-Gly-OEt
DCC	DCM	78	38	38.3
DCC	DMF	76	39	41.8
DCC-HOBt	DCM	80	0.5	0.8
CMC	DCM	79	73	73.6
EEDQ	DCM	73	1.5	1.0
BOP/NMM	DCM	83	53	51.8
PyBOP/NMM	DCM	85	30	34.2
TBTU/NMM	DCM	80	51	47.7

[a] gravimetrische Bestimmung

[b] HPLC-Enantiomerentrennung, % DL = 2 D/D + L * 100

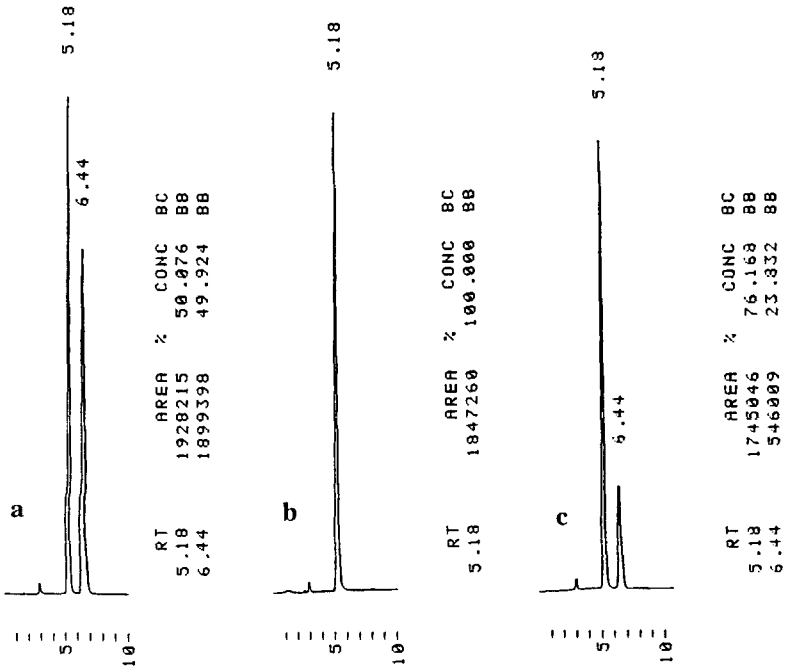

Abb. 1 HPLC-Enantiomerentrennung von Bz-DL-Phe-Gly-OEt (a), Bz-L-Phe-Gly-OEt als Referenzverbindung (b) und dem Rohprodukt der TBTU-Aktivierung (c) an 250-4 ChiraSpher (5 µm) der Firma Merck; Eluent: 80/20 tert-Butylmethylether/THF; Flußrate: 0.8 ml/min; UV-Detektion: 254 nm; t_R Bz-L-Phe-Gly-OEt: 5.18 min; t_R Bz-D-Phe-Gly-OEt: 6.44 min.

isoliert. (Nur bei hohen DL-Anteilen muß der Abtrennprozeß wiederholt werden). Aus der Mutterlauge wird das reine L-Peptid **2** isoliert. Der Racemisierungsgrad ergibt sich aus dem gravimetrisch bestimmten DL-Anteil (siehe Tabelle 2) und zeigt erhebliche Differenzen bei den untersuchten Kupplungsverfahren.

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Testes wurde die Racemisierung auch durch HPLC-Enantiomerentrennung an chiraler Phase bestimmt. Die HPLC-Modifizierung des Testes ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des DL-Anteils im Vergleich zur gravimetrischen Bestimmung. Abbildung 1 zeigt die Enantiomerentrennung der Referenzpeptide Bz-DL-Phe-Gly-OEt (a) und Bz-L-Phe-Gly-OEt (b) sowie des Rohproduktes der TBTU-Aktivierung von Bz-Phe-OH mit H-Gly-OEt (c). Die optimale Enantiomerentrennung gelang an einer ChiraSpher-Phase der Firma Merck (250-4, 5 µm) mit einem tert-Butylmethylether/THF-Gemisch (80:20) als Eluent.

Das vorgestellte Testsystem eignet sich für schnelle orientierende Racemisierungsbestimmungen, z. B. zum Vergleich von Aktivierungsverfahren, Kupplungsbedingungen oder zur Schnelltestung racemisierungssenkender Additive bei Peptidsynthesen. Vorzüge des Testes sind: der hohe Racemisierungsgrad der N-Benzoyl-aminosäure, das in polaren und unpolaren Lösungsmitteln annähernd gleiche Racemisierungsverhalten des Phenylalanins [3], die Erfassung der realen Racemisierung infolge der fehlenden asymmetrischen Induktion durch die Aminokomponenten sowie der mit etwa 24 Std. geringe Zeitbedarf bei einer dem Anderson-Callahan-Test vergleichbaren Genauigkeit.

Literatur

[1] G. W. Anderson, F. M. Callahan, J. Am. Chem. Soc. **80** (1958) 2902

[2] T. Miyazawa, T. Yamada, S. Kuwata, Bull. Chem. Soc. Jpn. **61** (1988) 606

[3] N. L. Benoiton: The Peptides, Vol. 5, Academic Press, New York 1983, 217 ff

[4] Aminosäuresymbole nach einer Empfehlung der IUPAC-IUB Joint Commission [Eur. J. Biochem.: **138** (1984) 9]. Zusätzliche Abkürzungen: Z, Benzyloxycarbonyl; Bz, Benzoyl; DMF, Dimethylformamid; DCM, Dichlormethan; NMM, N-Methylmorpholin; HOBt, N-Hydroxybenzotriazol; HOSu, N-Hydroxysuccinimid; DCC, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid; CMC, N-Cyclohexyl-N'-[β-methylmorpholino-ethyl]-carbodiimid-p-toluolsulfonat; BOP, Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphat; ByBOP, Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat; TBTU, 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat.

Korrespondenzanschrift:

Prof. Dr. H. Jeschkeit
Institut für Organische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Weinbergweg 16
D-06120 Halle