

Über die Hydrolysegeschwindigkeit bei der Säurespaltung von Dipeptiden, IV¹

Von

Mutumi Muramatu und Ryozo Hirohata

(Aus dem Laboratorium für Eiweißchemie der Medizinischen Hochschule, Ube, Kreis Yamaguchi)

Yoshiya Kanda und Shinichi Shibuya

(Aus dem Chemischen Institut der Universität Kyushu, Fukuoka, Japan)

(Der Schriftleitung zugegangen am 19. Dezember 1961)

In den beiden voranstehenden Mitteilungen¹ wurde die Geschwindigkeit der Hydrolysen von Dipeptiden des Typus Gly-X bzw. X-Gly durch 1,5*n*, 6*n* und konz. Salzsäure systematisch untersucht und gefunden, daß dabei die räumliche Anordnung der Aminosäure X eine entscheidende Rolle spielt, vorausgesetzt, daß es sich bei X um eine einfache Monoaminocarbonsäure handelt.

Bei der Hydrolyse durch 1,5*n* HCl war die Geschwindigkeitskonstante *k* für die Peptide X-Gly ungefähr um $\frac{1}{3}$ kleiner als die der entsprechenden Peptide Gly-X, was wir durch die Annahme erklärten, daß die Hydrolyse durch Annäherung von Cl⁻-Ionen und Protonen an die Peptidbindung zustande kommt.

Nun erhebt sich die Frage, wie die Hydrolysegeschwindigkeit eines Peptids sein wird, welches aus zwei beliebigen Aminosäuren außer Glycin besteht. In der vorliegenden Mitteilung wird deshalb die Hydrolyse von X-Val und X-Ileu studiert, wobei X eine beliebige, meist essenzielle Aminosäure außer Glycin darstellt. Wie nach den Ergebnissen der vorangehenden Arbeiten zu erwarten war, ist die Hydrolyse von Dipeptiden mit voluminösen Aminosäureresten durch sterische Hinderung sehr erschwert. Als Besonderheit wurde bei der Hydrolyse mit 1,5*n* HCl beobachtet, daß sich dabei in manchen Fällen die entsprechenden Diketopiperazine bilden.

Beschreibung der Versuche

Die Synthese der Dipeptide und die Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit geschah analog den Angaben in den vorangehenden Mitteilungen¹. Die Tabelle gibt die Schmelzpunkte und den N-Gehalt der Verbindungen an.

Nachweis der Diketopiperazine

a) 50 mg *racem.* Alanyl-valin wurden in 100 ml 1,5*n* HCl gelöst und 4 Stdn. in einem verschlossenen Röhrchen gekocht. Das Hydrolysat wurde im Vak. eingengt und getrocknet, um HCl möglichst zu entfernen. Die wäßrige Lösung des Rückstandes wurde durch eine Säule mit 5 ml Amberlite IR-120 (H⁺-Form) laufen

¹ II. u. III. Mitteil.: M. Muramatu, R. Hirohata, Y. Kanda et al., diese Z. 332, 256, 263 [1963], voranstehend.

Untersuchte Dipeptide.

Dipeptid	Schmp. (°C)	N (%)	
		Gef.	Ber.
DL-Ala-DL-Val	221—224	14,68	14,87
L-Met-DL-Val	212—216	10,99	11,28
L-Leu-DL-Val	241—245	12,07	12,17
L-Phe-DL-Val	244—246	10,37	10,60
L-Tyr-DL-Val	227—232	9,69	9,99
DL-Val-DL-Val	265—272	12,88	12,95
DL-Ileu-DL-Val	249—254	12,43	12,17
(L-CyS-DL-Val) ₂	160—163	12,80	12,78
L-Lys-DL-Val · 2HCl . .	136—138	12,91	13,20
DL-Ala-DL-Ileu	210—212	13,66	13,85
L-Met-DL-Ileu	202—204	10,82	10,68
L-Leu-DL-Ileu	244—250	11,39	11,46
L-Phe-DL-Ileu	240—242	10,09	10,07
L-Tyr-DL-Ileu	216—222	9,80	9,52
DL-Val-DL-Ileu	254—262	12,19	12,17
DL-Ileu-DL-Ileu	248—252	11,51	11,47
(L-CyS-DL-Ileu) ₂	155—158	12,03	12,01
L-Lys-DL-Ileu · 2HCl . .	127—129	11,96	12,65

gelassen. Durchlauf und Waschwasser wurden vereinigt und im Vak. getrocknet. Es wurden wenige ninhydrinnegative Kristalle gewonnen, die nach 24stdg. Hydrolyse mit 6*n* HCl im geschlossenen Röhrchen Alanin und Valin ergaben, wie papierchromatographisch nachgewiesen wurde.

b) und c) 200 mg *racem.* Alanyl-isoleucin (b) und 200 mg L-Phenylalanyl-DL-valin (c) wurden wie oben behandelt und dabei etwa je 5 mg ninhydrinnegativer Substanz gewonnen. Zers.-Punkte: 216—217° (b) bzw. 267—268° (c). Die nach b) erhaltene Substanz zeigte denselben Zersetzungspunkt wie eine durch Erhitzen von *racem.* Alanyl-isoleucin in Äthylenglykol dargestellte Probe. Auch eine Mischprobe zeigte keine Erniedrigung des Zersetzungspunktes.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 zeigt die Hydrolysegeschwindigkeit der Dipeptide X-Val und X-Ileu in 1,5*n*, 6*n* und konz. Salzsäure. Nur bei 6 der 18 untersuchten Substanzen setzte die Hydrolyse in 1,5*n* HCl sofort ein, und zwar immer, wenn X gleich Cystin, Valin oder Isoleucin darstellte. Die Kurven der übrigen Peptide verliefen anfangs unterhalb der Abszisse, was durch Bildung der ninhydrinnegativen Diketopiperazine zu erklären ist (s. u.).

Viel einfacher verlaufen die Kurven bei Hydrolyse mit 6*n* und konz. Salzsäure. Abb. 2 zeigt, daß nur 4 der Peptide in konz. HCl noch nach 3 Stdn. durch eine monomolekulare Reaktion gespalten werden, nämlich immer wenn X gleich Valin oder Isoleucin ist.

In 1,5*n* HCl nimmt besonders für die Peptide mit X gleich Alanin, Leucin oder Phenylalanin zunächst die Ninhydrinfarbe ab, was wir durch Bildung der entsprechenden Diketopiperazine deuteten. Diese Vermutung konnten wir durch Isolierung dieser Substanzen aus dem Hydrolyse-Ansatz bestätigen. Ihre IR-Spektren wiesen im Vergleich zu

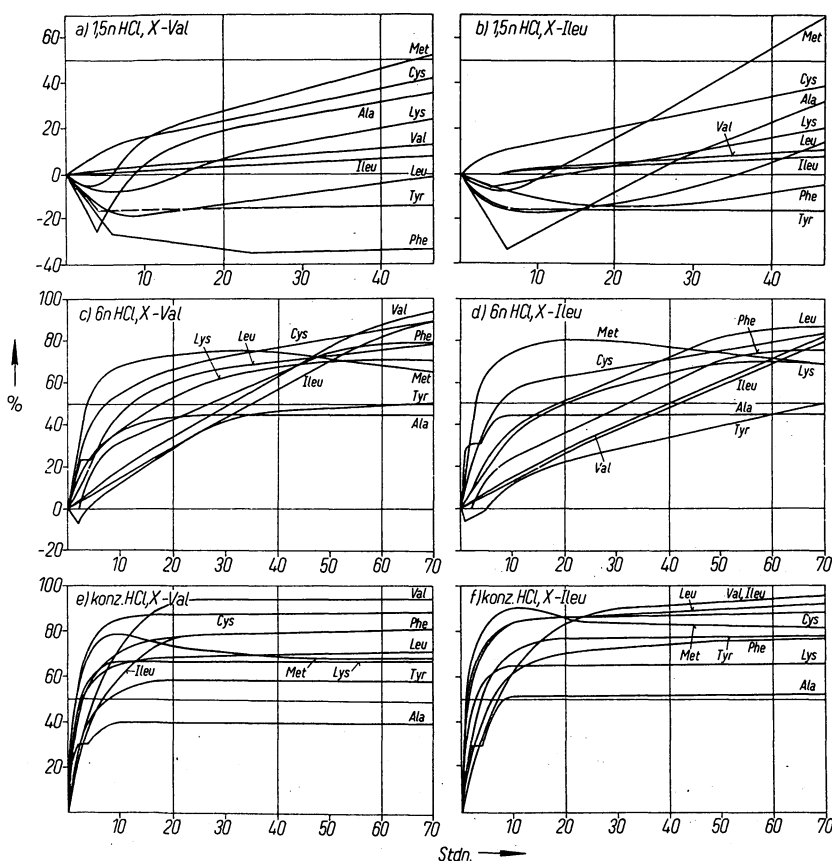


Abb. 1. Hydrolyse von Dipeptiden des Typus X-Val und X-Ileu in 1,5*n*, 6*n* bzw. konz. HCl. Als Kurvenbezeichnung ist nur die Aminosäure X angegeben. Bei X = Cys handelt es sich um L-Cystyl-di-DL-valin bzw. L-Cystyl-di-DL-isoleucin, bei Ala, Val und Ileu um die Racemate, sonst um die L-Aminosäuren. Die prozentuale Spaltung wurde durch Messung der Ninhydrinfärbung ermittelt.

denen der offenkettigen Dipeptide die bekannten² charakteristischen Unterschiede auf.

Nach den Ergebnissen der vorangehenden Mitteilungen war zu erwarten, daß die Hydrolyse von Dipeptiden um so langsamer verläuft, je größer die Reste der darin enthaltenen Aminosäuren sind. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß bei der Behandlung von Dipeptiden, die aus zwei voluminösen Aminosäuren bestehen, mit 1,5*n* HCl gleichzeitig eine Anhydridbildung eintritt, die jedoch ebenfalls durch sterische Faktoren beeinflusst wird.

² L. J. Bellamy, *The Infra Red Spectra of Complex Molecules*, S. 205, 213 f., 224 ff., Methuen & Co. Ltd., London 1959.

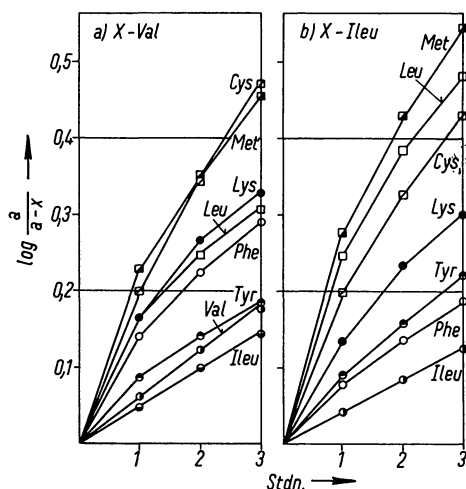
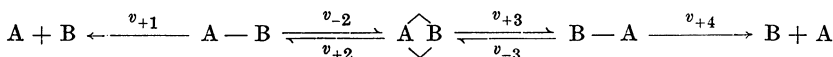


Abb. 2. Reaktionskinetik der Hydrolyse bei Dipeptiden des Typus X-Val und X-Ileu durch konz. HCl. a = Anfangskonzentration, $a-x$ = zur Zeit t jeweils noch vorhandene Konzentration an Dipeptid. Kurvenbezeichnungen s. Abb. 1.

Es ist anzunehmen, daß sich die Säurehydrolyse eines Peptids A—B nach folgendem Schema vollzieht, wobei v jeweils eine Reaktionsgeschwindigkeit bedeutet:



Die Hydrolysenkurve verläuft nun je nach der Größe der einzelnen Teil-Reaktionsgeschwindigkeiten, die durch sterische Behinderung von A bzw. B beeinflusst werden. Bei Valyl-valin, Isoleucyl-valin, Valyl-isoleucin und Isoleucyl-isoleucin scheint die Behinderung auf v_{-2} bzw. auch auf v_{-3} stärker als auf v_{+1} bzw. auch auf v_{+4} zu wirken; infolgedessen kommt keine Anhydridbildung vor.

Die Verzögerung bei Valyl-isoleucin und Isoleucyl-isoleucin (Abb. 1b), von Phenylalanyl-valin und Phenylalanyl-isoleucin in Abb. 1c bzw. d, sowie das kleine Plateau von Alanyl-valin in Abb. 1c und e und auch das von Alanyl-isoleucin in Abb. 1d und f sehen wir als Gleichgewichtszustand zwischen v_{+1} und v_{-2} oder $v_{+1} + v_{+4} + v_{+3} + v_{+2}$ an.

Die Cystin-Dipeptide sind, wie schon in der II. Mitteil.¹ beschrieben wurde, tetrapeptidähnlich, deshalb ist der Ringschluß sehr erschwert, folglich muß immer $v_1 > v_2$ sein.

Bei der Hydrolyse von Dipeptiden des Typus Gly-X wurde bereits in der I. Mitteil.³ die Anhydridbildung als wahrscheinlich hingestellt, allerdings mit $1n$ H₂SO₄. In dieser Mitteilung wurde die Bildung von Diketopiperazinen sichergestellt. In der II. Mitteil. wurden mehrere Gly-X-Peptide mit 1,5*n* HCl hydrolysiert, jedoch konnte niemals eine

³ R. Hirohata, Y. Kanda, M. Nakamura, N. Izumiya, A. Nagamatsu, T. Ono, S. Fujii u. M. Kimitsuki, diese Z. **295**, 368 [1953].

solche Neigung festgestellt werden. Möglicherweise ist die Bildungsfähigkeit von Diketopiperazinen aus Dipeptiden beim Erhitzen mit 1*n* H₂SO₄ größer als mit 1,5*n* HCl.

Diese und die beiden voranstehenden Arbeiten wurden mit finanzieller Unterstützung des „Tanabe Forschungsfonds für essentielle Aminosäuren“ durchgeführt, wofür wir auch hier ergebenst danken.

Zusammenfassung

Einige Dipeptide des Typus X-Val und X-Ileu wurden mit 1,5*n*, 6*n* und konz. HCl hydrolysiert. Bei der Behandlung mit 1,5*n* HCl tritt manchmal Diketopiperazin-Bildung ein. Die Anhydride wurden IR-spektroskopisch und durch Mischschmelzprobe identifiziert. Die Beziehung zwischen Hydrolyse und Anhydridbildung wurde diskutiert.

Summary

Some X-Val and X-Ileu peptides were hydrolysed with 1.5 N, 6 N and conc. HCl. 1.5 N HCl sometimes resulted in diketopiperazine formation. The anhydrides were identified by IR-spectra and mixed melting points. The relationship between hydrolysis and anhydride synthesis is discussed.

Professor Dr. R. Hirohata, Dept. of Biochemistry, Daiichi Pharmaceutical College, Takamiya, Fukuoka, Japan.
