

MICHAL LEBL a KAREL JOŠT

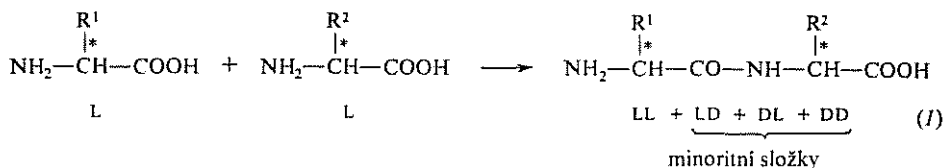
Ústav organické chemie a biochemie,

Československá akademie věd, 166 10 Praha

Došlo dne 9. II. 1977

1. Úvod

Biologicky aktivní peptidy obsahují své stavební kameny, aminokyseliny, v opticky aktivní formě. Většinou patří k L-řadě, výjimku tvoří některé peptidy, izolované hlavně z mikroorganismů, které obsahují i D-aminokyseliny. Stereochemická jednotnost (optická čistota) do značné míry určuje biologické aktivity i fysikálně-chemické chování peptidů. Je proto nutné, aby optická čistota byla zachována jak při izolaci peptidů, tak i při jejich chemické synthese. Racemisaci je možno definovat jako pochod, vedoucí k racemické modifikaci jednoho z čistých enantiomerů. Jen v několika málo případech bylo popsáno její využití. Jedná se zejména o datování fosilního materiálu¹ nebo převedení snadno přístupné L-aminokyseliny na vzácnější enantiomer². Ve všech ostatních případech je racemisace negativním jevem. Platí to zejména o synthese peptidů, kdy může vzniknout racemisací jednotlivých aminokyselinových zbytků směs diastereoisomerů (I).



(Asymetrické uhlíkové atomy jsou označeny hvězdičkou.) Jestliže dochází v každém stupni, ve kterém se tvoří peptidická vazba, k 1% racemisaci, pak v konečném dekapetidů máme tak malé množství diastereoisomerních sloučenin, že čistota syntetizovaného peptidu je dostačující pro většinu účelů. Jestliže by se však podíl racemisace zvýšil v každém stupni na 10%, pak množství diastereoisomerů v syntetizovaném peptidu se bude blížit množství žádaného produktu a pro fysikálně-chemická a zejména biochemická studia by takový peptid byl jen stěží použitelný.

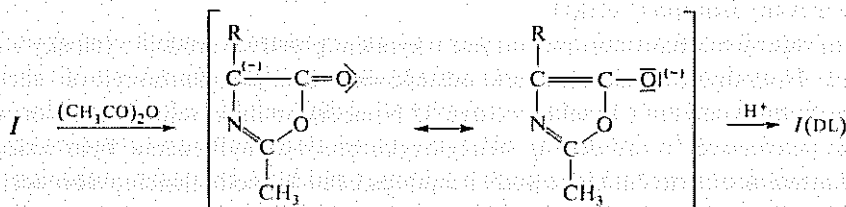
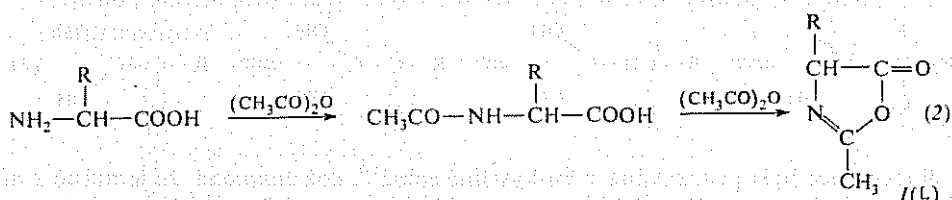
Vzhledem k tomu, že se vzniklé diastereoisomery zjišťují a oddělují podstatně obtížněji než jakékoliv jiné vedlejší produkty, bylo věnováno mnoho úsilí vypracování metod, schopných zjistit i nízký stupeň racemisace, právě tak jako nalezení

vhodných metod při syntese peptidů, zajišťujících co nejvyšší stupeň optické čistoty³. Množství vzniklého racemického produktu nezáleží jen na typu reakce, ale je do značné míry ovlivňováno konkrétními reakčními podmínkami, jako je teplota, druh použitého rozpouštědla, chemická struktura a množství base v reakčním prostředí a konečně i primární strukturou syntetisovaného peptidu. Všechny tyto faktory jsou při syntese peptidů proměnlivé a dají se jen velmi obtížně unifikovat a používat pouze standardní, předem otestované postupy.

Ve snaze vyhnout se racemisaci může nám do značné míry pomoci znalost mechanismu tohoto procesu. Účelem článku je podat přehled o dosavadních znalostech mechanismu racemisace*.

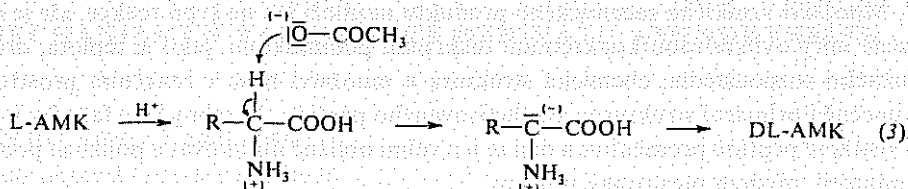
2. Racemisace v kyselém prostředí

Předpokladem zániku optické aktivity aminokyseliny je odtržení protonu z asymetrického uhlíku a vytvoření planárního útvaru zahrnujícího tento uhlík, následované zpětným připojením protonu. Již před více než padesáti lety byl navržen⁴⁻⁶ oxazolón jako mezistupeň. Působením anhydridu kyseliny octové vzniká primárně N-acetylaminokyselina, která je zvláště náchylná k tvorbě cyklu. Vzniklý 2-methyl-4-alkyl-4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-on (*I*) je možné izolovat jako opticky aktivní látku⁷, ovšem dalším působením acetanhydridu dochází k ionisaci a rezonanční stabilisaci vzniklého aniontu následovanou připojením protonu, vedoucím k racemickému produktu (2).

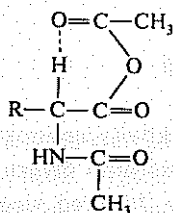


* Zkratky α -aminokyselin, chránících a aktivujících skupin jsou používány podle monografie³. AMK znamená libovolnou α -aminokyselinu. Pro aktivní estery je použito následujících zkratk: OSU pro N-hydroxysukcinimidový, ONP pro *p*-nitrofenylový, OTCP pro 2,4,5-trichlorfenylový, OPCP pro pentachlorfenylový a OPFP pro pentafluorfenylový ester.

Silné zvýšení racemisace bylo pozorováno v přítomnosti acetátových iontů⁸ (3).

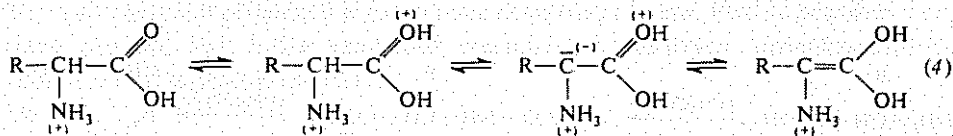


Racemisace N-acetylamínokyseliny v acetanhydridu a kyselině octové je také vysvětlována⁹ tvorbou směšného anhydridu II, který pomocí silné vodíkové vazby napomáhá odtržení α -protonu.



II

Volné aminokyseliny racemisují v kyselém prostředí jiným mechanismem. V přítomnosti kyseliny sírové se karboxylové skupiny aminokyseliny chovají jako akceptory protonů a ve vzniklém dikationtu může dojít, díky silnému tahu elektronů, k odštěpení α -protonu a vzniklý ion se stabilizuje resonancí za ztráty optické aktivity⁹ (4).



Racemisace byla pozorována v 6M-kyselině solné¹⁰, což znamená, že je nutno s ní počítat při totální hydrolyse peptidů (korekce je možná použitím ³HCl a měřením množství inkorporovaného tritia do aminokyselin¹¹; další korekce je však nutná na pozorovaný izotopový efekt).

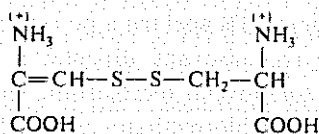
Pro navržený mechanismus racemisace v kyselém prostředí svědčí i výsledky studia chování N-methylaminokyseliny při odštěpování benzyloxykarboxylové chránící skupiny bromovodíkem v kyselině octové. U N-methylaminokyseliny byla pozorována značná racemisace¹²; zatímco u benzyloxykarboxyl-alanyl-leucinu bylo nalezeno 0,1% diastereoisomeru, činil jeho podíl u analogického N-methylleucinového derivátu 17%. N,N-Dimethylaminokyseliny racemisují snadno i v horké kyselině octové¹³.

Rozpouštědlo a použitá kyselina mají značný vliv na racemisaci, která se s klesající polaritou rozpouštědla zmenšuje a je nepatrná při použití chlorovodíku nebo kyseliny trifluoroctové. Důkladně bylo studováno chování peptidů při parciální a totální kyselé hydrolyse¹⁴. Při parciální hydrolyse pouze karboxyterminální dipeptid není

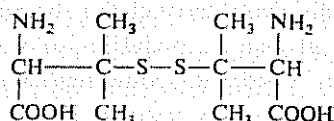
ohrožen racemisací, ostatní dipeptidy obsahují malé množství diastereoisomeru. V totálních hydrolysátech nebyla nalezena racemisace pouze pro amino- a karboxykoncovou aminokyselinu. Pro analytické účely bylo studováno chování směsi volných aminokyselin v kyselém roztoku; bylo zjištěno, že k racemisaci směsi volných aminokyselin dochází většinou v menším rozsahu¹⁰, než při hydrolyse peptidu. Tento nálezn je nutno mít na paměti při eventuální korekci obsahu D-aminokyselin v hydrolysátu.

Řada prací se zabývala vlivem struktury jednotlivých aminokyselin na racemisaci. U kyseliny glutamové byla nalezena závislost racemisace na koncentraci kyseliny chlorovodíkové¹⁵. Při působení 6M-HCl na aminokyseliny mající v postranním řetězci alifatický zbytek (Ala, Abu, Val, Ile, Leu) bylo zjištěno¹⁶, že rychlostní konstanta isomerisace závisí silně na teplotě a je nižší u aminokyselin rozvětvených na β -uhlíku. Japonští autoři¹⁷ studovali rychlosti výměny vodíku za deuterium a racemisace v kyselině octové u derivátů fenylglycinu a alaninu. Zjistili, že rychlost výměny a racemisace jsou si v mezích experimentálních chyb rovny.

Velká pozornost byla věnována aminokyselinám, majícím v molekule síru. U cystinu nebyl nalezen rozdíl rychlosti racemisace mezi působením kyseliny chlorovodíkové a sírové¹⁸. Pro objasnění citlivosti cystinu k racemisaci bylo provedeno mnoho pokusů s podobnými látkami. Vyplývalo z nich, že disulfidická vazba v poloze β má některé zvláštní vlastnosti¹⁹. Například cystein, S-methylcystein, cystathionin, lanthionin a homocystin prakticky neracemisují za podmínek, kdy cystin poskytuje 50% racemátu. Pokusy s deuterovaným chlorovodíkem a vodou prokázaly, že racemisace neprobíhá přes stadium meziprojektu III, neboť nebylo nalezeno žádné deuterium vázané na β -uhlík. Předpoklad, že racemisace úzce souvisí s intermolekulární výměnou disulfidické vazby, nebyl potvrzen, neboť tato výměna je mnohem rychlejší než racemisace¹⁹.



III



IV

Usnadnění odtržení protonu z α -uhlíku, tedy zvýšení jeho kyselosti, musí být způsobeno tím, že síra disulfidického můstku je schopna nést kladný náboj, jehož vliv klesá se vzdáleností od α -uhlíku. Velký vliv náboje v poloze β byl ověřen i tím, že α,β -diaminopropionová kyselina racemisuje v kyselém prostředí ještě rychleji než cystin a α,γ -diaminomáslná kyselina racemisuje v podobném rozsahu jako homocystin. Náboj, který nese disulfidická vazba, by měl být menší než náboj amoniové skupiny a větší než náboj indukovaný 2,4-dinitrofenylovou skupinou v S-(2,4-dinitrofenyl)-cysteinu, který racemisuje o něco pomaleji než cystin. Z faktu, že penicilamindisulfid IV podléhá racemisaci jen napatrně, vyplývá, že dvě methylové skupiny na β -uhlíku zřejmě vliv tohoto náboje do značné míry snižují. Deriváty S-benzylcysteinu, které

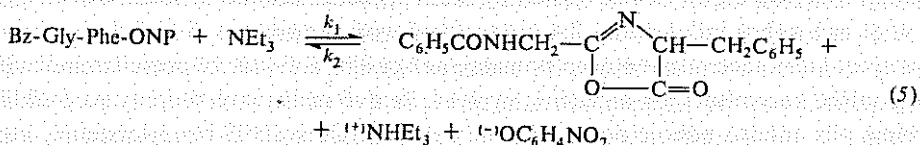
představují důležitý meziprodukt při synthese cystinových peptidů³, se zabývali polští autoři²⁰. Soustředili se na jejich chování v kyselině octové a opět ukázali na důležitost volné aminoskupiny při racemisaci.

Kinetikou racemisace aminokyselin v závislosti na pH a teplotě se zabýval Bada²¹ v souvislosti s datováním kostí z archeologických nálezů. Z jeho výsledků, zaměřených hlavně na kyselinu asparagovou a valin, lze uvést zjištění, že při pH mezi 5–8 rychlost racemisace prakticky nezávisí na pH, což je vlastně jednou z důležitých podmínek této metody datování (srv.¹).

3. Racemisace v basickém prostředí — oxazolonový mechanismus

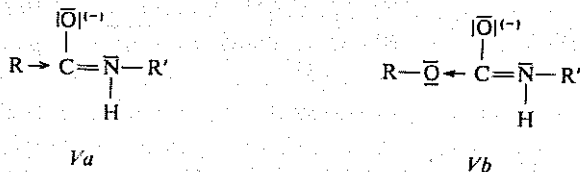
Z hlediska synthesy peptidů je daleko důležitějším případem chování derivátů aminokyselin a peptidů v zásaditém prostředí. I když v některých případech dochází k racemisaci přímou abstrakcí protonu z α -uhlíku, je zřejmě nejčastějším mechanismem přechodná tvorba oxazolonů.

V literatuře je popsána řada přístupů pro důkaz tohoto mechanismu. Při alkalické hydrolyse Z-Gly-Phe-ONP bylo zjištěno²², že rychlost racemisace je desetkrát větší než rychlost hydrolysy a navíc se podařilo izolovat racemický *p*-nitrofenylester. Za podobných podmínek autoři²² nepozorovali racemisaci Z-Gly-MePhe-ONP. (Je nutno mít na paměti, že deriváty α -N-methylaminokyselin jsou ještě náchylnější k racemisaci než deriváty α -aminokyselin; racemisace ovšem probíhá jiným mechanismem — viz dále.) Poměr rychlostí tvorby oxazolonu a racemisace závisí na použité basi²³: u Bz-Leu-OH je při použití triethylaminu tvorba oxazolonu 6000 \times pomalejším procesem než jeho racemisace, při použití ethyldiisopropylaminu pouze 700 \times pomalejším. Při reakci Bz-Leu-ONP s triethylaminem byl prokázán²⁴ vznik oxazolonu podle charakteristického absorpčního maxima v IR spektru a po reakci s ethylesterem glycinu se podařilo izolovat částečně racemisovaný dipeptid a inaktivní oxazolon²⁴. Jeden z nejdůležitějších důkazů oxazolonového mechanismu spočíval na pokusu^{25,26}, kdy k roztoku Bz-Gly-Phe-ONP v dichlormethanu byl přidán jeden ekvivalent triethylaminu a deset ekvivalentů D,L-2-(N-benzoyloxykarbonyl)-4-benzyl-4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-onu. Když optická otáčivost roztoku poklesla na 51% původní hodnoty, byla reakce zastavena a směs esterů byla izolována. Kdyby reakce probíhala přímou výměnou protonu na α -uhlíku, pak by izolovaný ester měl být ze 49% racemický. Jestliže naopak racemisace probíhá přes stadium oxazolonu, velký přebytek dodaného racemického oxazolonu vychytává *p*-nitrofenylátový ion, vzniklý cyklisací *p*-nitrofenylesteru, a zabraňuje tudíž zpětné reakci (k_2) (5).



Isolace opticky čistého původního *p*-nitrofenylesteru přináší přesvědčivý důkaz oxazolového mechanismu racemisace.

Existuje řada faktorů, které ovlivňují tvorbu oxazolonu a jeho racemisaci. V první řadě je to druh chránící skupiny na α -aminoskupině. Při tvorbě peptidické vazby mezi acyl-L-leucinem a ethylesterem glycinu pomocí karbodiimidové metody bylo nalezeno²⁷⁻³⁰, že optická čistota byla zachována z 54, 70 a 94% u benzoylové, acetylové ev. formylové chránící skupiny. Toto pořadí je možno odhadnout i z teoretického pohledu, kdy v pořadí odpovídajícím snadnosti vzniku oxazolonu vzrůstá i nukleofilita karbonylového kyslíku příslušného acylu. Je nepravděpodobné, že by faktorem ovlivňujícím snadnost vzniku oxazolonu byl poměr obsahu *cis* a *trans* amidové vazby³¹, protože v důsledku rychle se ustavující rovnováhy mezi oběma konformery je v roztoku vždy dostatečná koncentrace reaktivní konformace³². Rozdíly mezi acylovou a alkoxykarbonylovou skupinou byly studovány³³ pomocí IR a NMR spektroskopie. Karbonyl v acylové skupině vykazuje absorpci při nižší vlnočtu (1680–1690 cm^{-1}), než ve skupině alkoxykarbonylové (1720–1725 cm^{-1}), což svědčí o delší vazbě C—O (a tudíž i o nižším podílu dvojné vazby) v amidovém karbonylu ve srovnání s urethanovým. Z toho vyplývá, že karbonylový kyslík amidu je nukleofilnější než tentýž v urethanu.



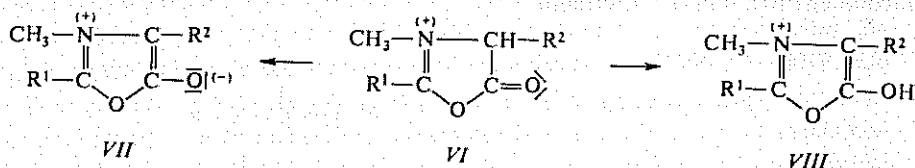
Pravděpodobnější je vzorec *Va* než *Vb*, což vylučuje možnost tvorby oxazolového kruhu u urethanových derivátů aminokyselin. V NMR spektrech amidů v kyselině trifluoroctové je zachován jasný signál N—H protonu, zatímco u urethanů se tento signál ztrácí, což svědčí o zachované basicitě dusíku v posledně uvedených látkách a tedy o nepravděpodobnosti struktury *Vb*. Na důležitost snížení nukleofility atomu acylové chránící skupiny poukázali také polští autoři³⁴, kteří zjistili, že benzylothiokarbonylová skupina díky velké nukleofilitě síry neposkytuje na rozdíl od skupiny benzyloxykarbonylové žádnou ochranu před racemisací.

Pro vlastní syntézu peptidů z uvedených výsledků vyplývá, že je výhodné používat chránící skupiny s minimální možností tvorby oxazolonu: kromě různých skupin urethanového typu je to i skupina *o*-nitrobenzensulfenylová, *p*-toluensulfonylová a trifenylmethylová. Některé chránící skupiny, jako např. ftaloylová, sice neumožňují tvorbu oxazolonů, zato však napomáhají přímé abstrakci protonu z α -uhlíku, a proto vhodné nejsou.

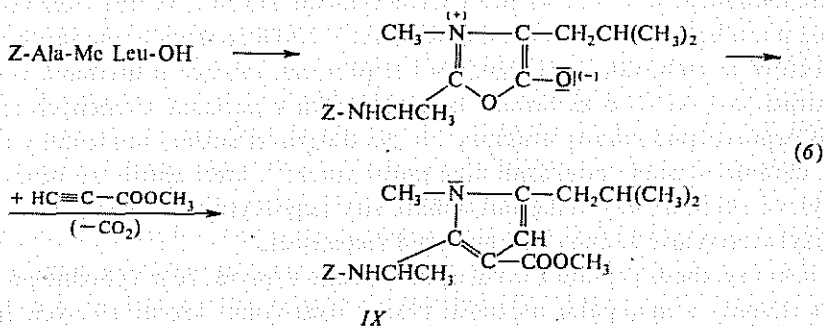
Náchylnost k racemisaci závisí ovšem do značné míry na kyselosti protonu na α -uhlíku, tedy na snadnosti jeho odtržení, a ta je ovlivněna nejen aminochránící skupinou a skupinou aktivující karboxyl, ale i druhem aminokyseliny, tedy substi-

tuentem na α -uhlíku. Japonští autoři³⁵ zjistili, že tendence k racemisaci odpovídá velmi dobře Taftově rovnici, jsou-li použity σ^* polární konstanty substituentů a nedochází-li ke sterickému bránění odtržení protonu na α -uhlíku. Z toho vyplývá, že rozsah racemisace je ovlivněn elektronegativitou substituentu na α -uhlíku. Výjimkou z tohoto pravidla jsou deriváty cystinu, které díky možnosti zapojení elektronů d -orbitalu síry do interakce s elektrony vazby $C_{\alpha}-H$ prostorem a ne pouze po uhlíkatém řetězci, nezaujímají místo určené jim pořadím nukleofilit substituentů³⁶. Totéž platí pro mechanismus přímé abstrakce protonu z α -uhlíku, jehož kyselost je však v nejvyšší míře ovlivňována chránicí a aktivující skupinou.

U *N*-methylaminokyselin byla nalezena racemisace^{12,37}, ať již při alkalické hydrolyse esterů či za podmínek syntesy peptidů. Zjištění, že rozsah racemisace nezávisí na koncentraci base ukazuje na jiný mechanismus racemisace, než je přímá abstrakce protonu z α -uhlíku. Tyto deriváty aminokyselin mohou poskytovat oxazoloniový kation *VI*, který může snadno odštěpit proton a přejít na oxazolium-5-oxid (*VII*) nebo 5-hydroxyoxazoliový kation *VIII*. Tyto látky jsou velmi nestálé a důkazy jejich existence byly nejprve podány pomocí kryoskopických dat³⁸ a později přípravou několika stabilních perchlorátů³⁹.



Kanadským autorům³⁷ se podařilo dokázat jejich přítomnost v reakční směsi pomocí reakce s propiolátem methylnatým (6).

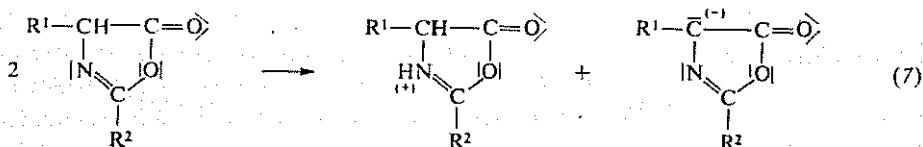


Isolace pyrrolového derivátu *IX* spolu se závislostí na polaritě a iontové síle rozpouštědla dává přesvědčivý důkaz pro navrhovaný mechanismus.

Velkým přínosem pro studium racemisace probíhající oxazolonovým mechanismem byla příprava opticky aktivních oxazolonů^{7,40}. První z těchto látek, 2-fenyl-L-4-benzyl-4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-on připravený z *Bz*-Phe-OH působením acethydridu v dioxanu, byl použit ke studiu rychlosti racemisace a otevírání oxazolonu-

vého kruhu různými nukleofily⁷. Výsledkem těchto pokusů bylo zjištění, že ve všech případech je racemisace mnohem rychlejším procesem než otvírání kruhu a že obě tyto reakce jsou druhého řádu. Později se podařilo připravit opticky aktivní oxazolony odvozené od dipeptidů^{41,42}, jak působením acethydridu, tak i N,N'-diklohexylkarbodiimidu v etheru⁴³.

Polští autoři dokázali⁴⁴, že dusíkový atom oxazolonu je dostatečně basický pro tvorbu solí s kyselinou chlorovodíkovou nebo trichloroctovou. Tato vlastnost sloužila pro vysvětlení racemisace u oxazolonů v neutrálním prostředí tzv. autoracemisací (7).



Takový mechanismus však nepřichází v úvahu v přítomnosti silných basi, obvyklých při syntese peptidů.

Byl rovněž studován^{29,30,45} tzv. „chloridový efekt“, který byl vysvětlován značnou basicitou chloridového aniontu v organických rozpouštědlech²⁴. Podstata spočívá v tom, že uvolnění esterů aminokyselin z jejich hydrochloridů (nebo obecně solí) bezprostředně v reakční směsi vede ke zvýšené racemisaci. Vzhledem k tomu, že však samotný hydrochlorid aminu nezvyšuje racemisaci oxazolonů⁴⁶, ale za přítomnosti esteru aminokyseliny zmenšuje značně rychlost jejich otevírání, byl pozorovaný efekt připisán spíše zvětšené iontové síle rozpouštědla. V poslední době byl „chloridový efekt“ podrobně zkoumán⁴⁷ za použití různých iontů a je nyní vysvětlován jak zvýšenou iontovou silou roztoku, tak i basicitou použitého iontu. „Solný efekt“ byl diskutován⁴⁸ v souvislosti s obecnou a specifickou katalysou tvorby oxazolonů^{49,50}.

Jsou-li rychlosti racemisace a otvírání kruhu srovnatelné, což bylo v některých případech pozorováno⁴⁶, jsou obě druhého řádu. Naproti tomu probíhá-li racemisace mnohem rychleji, je tato reakce pseudo-prvého řádu. Charakter nukleofilu je nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím poměr obou reakcí a tudíž i rozsah zachování původní konfigurace. Atak oxazolonomého kruhu je měřítkem nukleofility činidla a naopak racemisace, tj. odtržení protonu z cyklu, je měřítkem jeho basicity. Methyl-ester glycinu má největší poměr nukleofility k basicitě a tudíž při jeho použití dochází v největší míře k zachování optické aktivity. U esterů alaninu docházíme k méně uspokojivým výsledkům a methylester kyseliny α -aminoisomáselné poskytuje prakticky pouze racemický produkt; je ovšem nutno mít na paměti, že se v těchto případech může uplatnit i sterická zábrana objemných postranních zbytků. Pokud tedy je používán ester glycinu v testech při stanovení množství vzniklého racemátu, musíme počítat s tím, že vlastně dostáváme lepší výsledek, než jaký lze očekávat při použití kterékoli jiné aminokyseliny⁴⁸.

Tvorba oxazolonů z derivátů aminokyselin probíhá daleko snadněji než z peptidů.

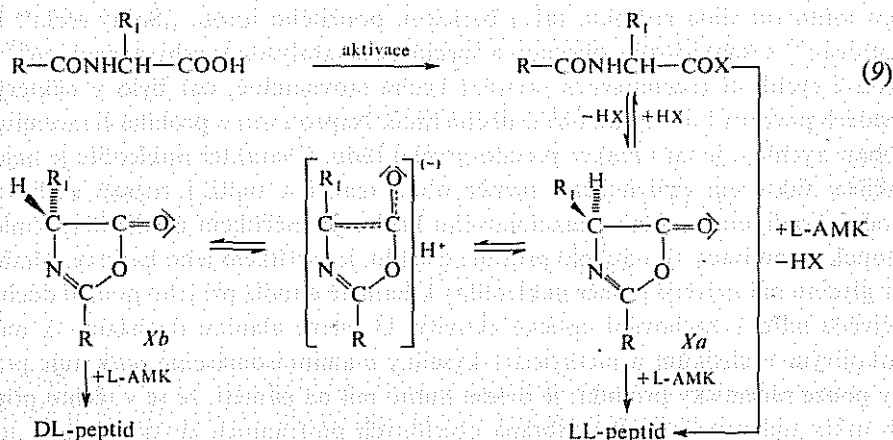
Rozsah racemisace peptidu není příliš ovlivněn⁵¹ charakterem předposlední aminokyseliny peptidického řetězce, ale značně jej ovlivňuje aminochránící skupina. Signifikantní rozdíl byl zjištěn mezi Z-Gly-Phe-ONP a Bz-Gly-Phe-ONP, kde poslední peptid podléhá racemisaci daleko rychleji²⁶. Z toho je vidět, že vliv aminochránící skupiny může být přenášen po peptidickém řetězci.

Pomocí tvorby oxazonů je možno vysvětlit i racemisaci předposlední aminokyseliny, která byla několikrát pozorována při různých příležitostech^{4,9,52,53,54} a v poslední době i podrobně studována^{55,56}. Ztráta optické aktivity probíhá podle schématu navrženého již Bergmannem a Zervasem⁴ (8).



Jestliže peptid obsahuje jako karboxyterminální aminokyselinu glycin, dochází k racemisaci jen ve velmi malém rozsahu. V těchto případech (na rozdíl od peptidů obsahujících jinou karboxyterminální aminokyselinu) nezáleží na množství použitého triethylaminu⁵⁵. To je vysvětlováno malou tendencí glycinu k tvorbě oxazonů^{57,58}. Jestliže je karboxykoncovou aminokyselinou prolin, k racemisaci předposledního zbytku nedochází⁵⁵.

Diskutované poznatky o oxazonovém mechanismu racemisace za podmínek obvyklých při syntese peptidů je možno shrnout do následujícího schématu^{7,25,59,60}, podle kterého je racemisace způsobena rovnováhou obou enantiomerních oxazonů ustavující se přes stádium pseudoaromatického aniontu (9).



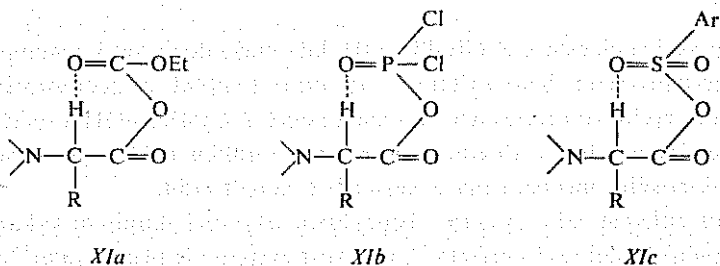
Je nutno poznamenat, že 4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-ony reagují s aminokomponentou přednostně za vzniku DL-diastereoisomeru v případě otevírání esterem L-aminokyseliny a LD-diastereoisomeru, použijeme-li ester D-aminokyseliny. To zna-

mená, že enantiomerní oxazolony *Xa* a *Xb*, které jsou v rovnováze, se otevírají aminokomponentou rozdílně rychle za vzniku peptidu^{60,61}. Rovněž rychlost reakce DL-aminokyselinových derivátů s opticky čistou karboxykomponentou závisí na její konfiguraci⁶². S estery L-aminokyselin vznikají přednostně DL-peptidy, přičemž poměr diastereoisomerů sleduje Curtinův-Hammetův princip, tj. je v přímé závislosti na volné enthalpii přechodových stavů a může být vypočítán podle semiempirické rovnice⁶³, zahrnující parametry chiralit y obou reakčních komponent.

4. Přímá abstrakce protonu z α -uhlíku

Pro případy, kdy dochází ke ztrátě optické čistoty derivátů aminokyselin, u nichž je tvorba oxazonů velmi nepravděpodobná, byl navržen^{9,64,65} mechanismus přímé abstrakce a readice protonu na α -uhlíku. Týká se to hlavně N-ftaloyl- a N-benzyloxykarbonylamínokyselin. Ačkoliv je značně nepravděpodobný vznik oxazonu u derivátů aminokyselin s urethanovou aminochránicí skupinou^{65,66}, byla racemisace N-benzyloxykarbonylamínokyselin opakovaně pozorována⁶⁷⁻⁷¹. Prvním krokem v tomto mechanismu racemisace je odtržení protonu z α -uhlíku, následované stabilizací vzniklého aniontu. Deriváty N-benzyloxykarbonylamínokyselin, které mají v β -poloze skupiny přitahující elektrony nebo schopné zapojení do konjugace, by měly být zvláště náchylné k racemisaci. Tento závěr byl potvrzen⁷² pro deriváty β -kyanoalaninu, S-benzylcysteinu, anhydridu kyseliny asparagové a jejího β -benzylesteru či pro aromatické aminokyseliny⁶⁷. Labilita protonu na α -uhlíku závisí též na druhu chránicí skupiny a na aktivaci karboxylu. K mnohem větší racemisaci než u N-benzyloxykarbonylderivátů dochází u N-ftaloylamínokyselin, což může být vysvětleno⁷³ silným indukčním efektem dvou karboxylových skupin v blízkosti α -uhlíku a možností rozsáhlé konjugace vzniklého aniontu, zahrnující i benzenové jádro.

Velmi vhodným objektem pro studium racemisace probíhající odtržením protonu z α -uhlíku je β -kyanoalanin, který byl i použit jako jedna složka modelového peptidu pro testování racemisace^{74,75}. Na této aminokyselině bylo rovněž ověřeno ovlivnění rozsahu racemisace použitým esterem; bylo zjištěno, že racemisace vzrůstá s klesajícím pK fenolu použitým k aktivaci karboxylu⁷⁶. Nebezpečí přímé abstrakce protonu nastává rovněž v případě použití směsných anhydridů, kdy může dojít k labilitaci protonu na α -uhlíku tvorbou vodíkového můstku ke kyslíku anhydridové skupiny⁷⁷ (viz *XIa*, *XIb*, *XIc*).



Značná pozornost byla věnována studiu⁷⁸⁻⁸⁰ racemisace aktivních esterů N-benzoyloxykarbonyl-S-benzylcysteinu, která probíhá abstrakcí protonu z α -uhlíku. Význam těchto prací spočívá v tom, že současně se stanovením rychlostních konstant racemisace byla studována rovněž kinetika kondensační reakce aktivního esteru s derivátem aminokyseliny, většinou s methylesterem valinu. O této aminokyselině je známo, že tvoří peptidovou vazbu velmi neochotně a tudíž výsledky s ní získané budou méně příznivé ve srovnání s ostatními aminokyselinami. Později byly studovány i aktivní estery jiných aminokyselin^{81,82}, aby byl zjištěn vliv postranního řetězce na racemisaci. Nejdůležitějším kritériem pro hodnocení vhodnosti určitého derivátu pro syntézu peptidů je poměr rychlostí kondensace a racemisace, neboť na něm závisí optická čistota produktu. Rychlost racemisace se snižuje v pořadí: Cys > Ser > Asp > Phe > Glu > Trp > Ala. Pořadí rychlosti racemisace aktivního esteru nezávisí na struktuře postranního řetězce a je OSU > OPFP > OTCP > ONP > OPCP. Rovněž rychlost kondensace s methylesterem valinu není významně ovlivněna charakterem postranního řetězce a je následující: OPFP > OSU > OPCP > OTCP > ONP. Z uvedených údajů je vidět, že pořadí tendence k racemisaci není shodné s pořadím rychlostí kondensačních reakcí; z toho vyplývá pořadí poměrů rychlostí kondensační reakce a racemisace: OPFP > OPCP > OSU > OTCP > ONP. V závislosti na charakteru postranního řetězce je pořadí poměrů rychlostí kondensace k racemisaci: Ala > Trp > Glu > Phe > Asp > Ser > Cys; toto pořadí je opačné než pořadí rychlosti racemisace. Pro alanin a tryptofan je poměr rychlostí velmi vysoký, takže výběr druhu aktivního esteru není tak kritický jako v případě fenylalaninu nebo zvláště cysteinu^{79,81,82}.

| Sloučenina | k_c/k_{rac} |
|-----------------|---------------|
| Z-Ala-OPFP | 23 060 |
| Z-Ala-ONP | 1 100 |
| Z-Phe-OPFP | 1 450 |
| Z-Phe-ONP | 35 |
| Z-Cys(Bzl)-OPFP | 245 |
| Z-Cys(Bzl)-ONP | 5,3 |

Při studiu aktivních esterů Z-Gly-Phe-OH, kde může docházet k racemisaci oxazolovým mechanismem, bylo zjištěno⁸², že tento dipeptid je racemisován rychlostí srovnatelnou s rychlostí racemisace aktivních esterů Z-Cys(Bzl)-OH a tudíž že mechanismus racemisace přímou abstrakcí protonu z α -uhlíku může být vážnou konkurencí oxazolového mechanismu a nesmí být zanedbáván.

Podobnou citlivost jako cystein s benzylovou chránicí skupinou vykazují i jinak na síře chráněné cysteinové deriváty³⁶. Citlivost cysteinu je připisována³⁶ schopnosti

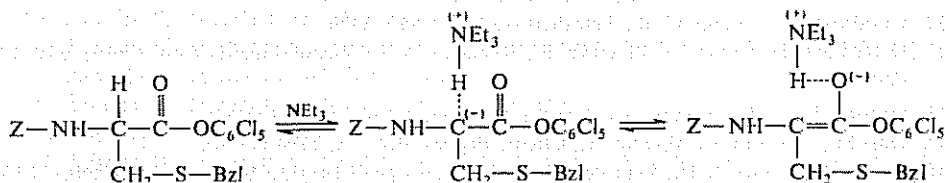
síry v postranním řetězci zeslabovat α -C—H vazbu přijetím záporného náboje, vznikajícího při odtržení protonu z α -uhlíku do svých volných *d*-orbitalů. Racemisace S-benzylcysteinu a derivátů serinu byla dříve vysvětlována tzv. β -eliminací — readičním mechanismem^{70,83}. Ačkoliv β -eliminace byla prokázána izolací dibenzyl-disulfidu⁷⁰ nebo N-benzyl-oxycarbonyl-2,3-didehydroalaninu⁸⁴, případně produktu jeho hydrolysy — kyseliny pyrohroznové⁸⁵ (po působení alkáliemi na deriváty cysteinu nebo serinu), nebo převedením *O*-*p*-toluensulfonylserinu na S-tritylcystein⁸⁶, readiči odstupující skupiny se prokázat nepodařilo. Studium inkorporace [³⁵S]-benzylmerkaptanu do S-benzylcysteinu bylo zjištěno, že přes značnou pozorovanou racemisaci nedošlo k zabudování radioaktivní síry do molekuly derivátu aminokyseliny^{79,80,87}; v tomto případě je tedy možno β -eliminací — readiční mechanismus vyloučit.

5. Isoracemisace

V souvislosti se studiem racemisace S-benzylcysteinu bylo zjištěno pomocí inkorporace deuteria do molekuly aminokyseliny za podmínek racemisace, že tato reakce probíhá mechanismem tzv. isoracemisace, to znamená, že vodík na α -uhlíku zůstává v molekule enantiomeru zachován⁸⁸. K tomuto jevu dochází v nepolárních rozpouštědlech za přítomnosti donoru deuteria (50 ekvivalentů deuteromethanolu) a base. V polárních rozpouštědlech je výměna vodíku paralelní s racemisací⁸⁹.

Termín isoracemisace navrhl Cram^{90,91} pro reakce, u kterých platí, že poměr rychlosti substituce ku rychlosti racemisace je roven nebo blízký nule. (Je-li tento poměr roven jedné, jde o prostou racemisaci, je-li 0,5 jde o inverzi a při nekonečné hodnotě tohoto poměru se jedná o úplnou retenci konfigurace při substituci.)

Pro Z-Cys(Bzl)-OPCP byla nalezena hodnota poměru $k_{\text{subst}}/k_{\text{rac}}$ 0,055 (lit. ^{88,92}) a pro Z-Phe-OPCP 0,03 (lit. ⁹³), což svědčí o značném zastoupení isoracemisace v těchto případech. Pro vysvětlení zachování vodíku v molekule cysteinu bylo navrženo toto schéma⁸⁸ (10):



(10)

Isoracemisace není vyloučena ani u oxazolonů, nebyla však ve spojitosti s těmito látkami ještě studována.

1. Vičar J.: Chem. Listy 71, 160 (1977).
2. Greenstein J. P., Winitz M.: *Chemistry of the Amino Acids*. Wiley, New York 1961.
3. Houben-Weyl. *Methoden der organischen Chemie, Vol. 15. Synthese von Peptiden* (E. Wünsch, Ed.). Thieme Verlag, Stuttgart 1974.
4. Bergmann M., Zervas L.: Biochem. Z. 203, 280 (1928).
5. du Vigneaud V., Meyer C. E.: J. Biol. Chem. 99, 143 (1932).
6. du Vigneaud V., Meyer C. E.: J. Biol. Chem. 98, 295 (1932).
7. Goodman M., Levine L.: J. Amer. Chem. Soc. 86, 2918 (1964).
8. Weygand F., Prox A., Tilak M. A., Hoffter D., Fritz H.: Chem. Ber. 97, 1024 (1964).
9. Neuberger A.: Advan. Protein Chem. 4, 359 (1948).
10. Manning J. M.: J. Biol. Chem. 243, 5591 (1968).
11. Manning J. M.: J. Amer. Chem. Soc. 92, 7449 (1970).
12. McDermott J. R., Benoiton N. L.: Can. J. Chem. 51, 2555 (1973).
13. Ikutani Y.: Bull. Chem. Soc. Jap. 43, 3602 (1970).
14. Weygand F., König W., Prox A., Burger K.: Chem. Ber. 99, 1443 (1966).
15. Wieland T., Paul W.: Chem. Ber. 77, 34 (1944).
16. Nakaparksin S., Gil-Av E., Oró J.: Anal. Biochem. 33, 374 (1970).
17. Matsuo H., Kawazoe Y., Sato M., Ohnishi M., Tatsuno T.: Chem. Pharm. Bull. 18, 1794 (1970).
18. Andrews J. C.: J. Biol. Chem. 97, 657 (1932).
19. Jacobson S. J., Wilson C. G., Rapoport H.: J. Org. Chem. 39, 1075 (1974).
20. Liberek B., Grzonka Z., Michalik A.: Roczn. Chem. 40, 683 (1966).
21. Bada J. L.: J. Amer. Chem. Soc. 94, 1371 (1972).
22. Goodman M., Stueben K. C.: J. Org. Chem. 27, 3409 (1962).
23. Grahl-Nielsen O.: Chem. Commun. 1971, 1588.
24. Williams M. W., Young G. T.: J. Chem. Soc. 1964, 3701.
25. Antonovics I., Young G. T.: Chem. Commun. 1965, 398.
26. Antonovics I., Young G. T.: J. Chem. Soc. C 1967, 595.
27. Antonovics I., Heard A. L., Hugo J., Williams M. W., Young G. T.: Peptides. Proc. 6th European Peptide Symposium, Athens 1963, str. 121. Pergamon Press, Oxford 1966.
28. Heard A. L., Young G. T.: J. Chem. Soc. 1963, 5807.
29. Smart M. A., Young G. T., Williams M. W.: J. Chem. Soc. 1960, 3902.
30. Williams M. W., Young G. T.: J. Chem. Soc. 1963, 881.
31. Siemion I. Z., Konopinska D.: Peptides. Proc. 8th European Peptide Symposium, Noordwijk 1966, str. 79. North-Holland, Amsterdam 1967.
32. Goodman M., Glaser C. B.: Tetrahedron Lett. 1969, 3473.
33. Determann H., Heuer J., Pfaender P., Reinartz M. L.: Justus Liebigs Ann. Chem. 694, 190 (1966).
34. Siemion I. Z., Konopinska D., Dzugaj A.: Roczn. Chem. 43, 989 (1969).
35. Sato M., Tatsuno T., Matsuo H.: Chem. Pharm. Bull. 18, 1794 (1970).
36. Barber M., Jones J. H.: Peptides. Proc. 14th European Peptide Symposium, Wépion 1976, str. 109. Editions Univ. Bruxelles, Bruxelles 1976.
37. McDermott J. R., Benoiton N. L.: Can. J. Chem. 51, 2562 (1973).
38. O'Brien J. L., Niemann C.: J. Amer. Chem. Soc. 79, 80 (1957).
39. Boyd G. V., Wright P. H.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1972, 909.
40. Nowak K., Siemion I. Z.: Roczn. Chem. 35, 153 (1961).
41. Leplawy M. T., Jones D. S., Kenner G. W., Sheppard R. C.: Tetrahedron 11, 39 (1960).
42. McGahren W. J., Goodman M.: Tetrahedron 23, 2017 (1967).

43. Siemion I. Z., Nowak K.: *Rocz. Chem.* **34**, 1479 (1960).
44. Siemion I. Z., Dzugaj A.: *Rocz. Chem.* **40**, 1699 (1966).
45. König W., Geiger R.: *Chem. Ber.* **103**, 2024 (1970).
46. Goodman M., McGahren W. J.: *Tetrahedron* **23**, 2031 (1967).
47. Williams A. W., Young G. T.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1972**, 1194.
48. Goodman M., Glaser C. B.: *Peptides: Chemistry and Biochemistry*. Proc. 1st American Peptide Symposium, Yale 1968, str. 267. Dekker, New York 1970.
49. Kemp D. S.: *Peptides*. Proc. 11th European Peptide Symposium, Vienna 1971, str. 1. North-Holland, Amsterdam 1973.
50. Kemp D. S., Chien S. W.: *J. Amer. Chem. Soc.* **89**, 2745 (1967).
51. Lande S., Landowne R. A.: *Tetrahedron* **22**, 3085 (1966).
52. Esko K., Karlsson S.: *Acta Chem. Scand.* **24**, 1415 (1970).
53. Prox A., Weygand F., König W., Schmidhammer L.: *Peptides*. Proc. 6th European Peptide Symposium, Athens 1963, str. 139. Pergamon Press, Oxford 1966.
54. Weygand F.: *Angew. Chem.* **76**, 61 (1964).
55. Dzieduszycka M., Smulkowski M., Taschner E.: *Peptides*. Proc. 12th European Peptide Symposium, Reinhardsbrunn 1972, str. 103. North-Holland, Amsterdam 1973.
56. Weygand F., Prox A., König W.: *Chem. Ber.* **99**, 1446 (1966).
57. De Tar D. F., Silverstein R., Rogers F. F.: *J. Amer. Chem. Soc.* **88**, 1024 (1966).
58. Schnabel E.: *Justus Liebigs Ann. Chem.* **688**, 238 (1965).
59. Cit. 3, str. 36.
60. Weygand F., Steglich W., de la Lama B. X.: *Tetrahedron, Suppl.* **8**, 9 (1966).
61. Steglich W., Mayer D., de la Lama B. X., Tanner H., Weygand F.: *Peptides*. Proc. 8th European Peptide Symposium, Noordwijk 1966, str. 67. North-Holland, Amsterdam 1967.
62. Ötvös L., Mohácsi T., Tömösközi I., Boromissza É.: *Radiochem. Radioanal. Lett.* **3**, 169 (1970).
63. Ugi I.: *Z. Naturforsch. B* **20**, 405 (1965).
64. Wieland T., Determann H.: *Angew. Chem.* **75**, 539 (1963).
65. Young G. T.: *Peptides*. Proceedings of the Symposium on Methods of Peptide Synthesis, Prague 1958. Collect. Czech. Chem. Commun. Special Issue **24**, 33 (1959).
66. Stelakatos G. C.: *J. Amer. Chem. Soc.* **83**, 4222 (1971).
67. Bodanszky M., Birkhimer C. A.: *Chimia* **14**, 368 (1960).
68. Geiger R., Sturm K., Siedel W.: *Chem. Ber.* **96**, 1080 (1963).
69. Iselin B., Feurer M., Schwyzer R.: *Helv. Chim. Acta* **38**, 1508 (1955).
70. Maclaren J. A., Savige W. E., Swan J. M.: *Aust. J. Chem.* **11**, 345 (1958).
71. Weygand F., Prox A., Schmidhammer L., König W.: *Angew. Chem.* **75**, 282 (1963).
72. Liberek B.: *Tetrahedron Lett.* **1963**, 925.
73. Liberek B.: *Tetrahedron Lett.* **1963**, 1103.
74. Liberek B., Michalik A.: *Peptides*. Proc. 7th European Peptide Symposium, Budapest 1964. *Acta Chim. (Budapest)* **44**, 71 (1965).
75. Liberek B., Michalik A.: *Rocz. Chem.* **40**, 597 (1966).
76. Martynov V. F., Samarcev M. A.: *Ž. Obšč. Chim.* **39**, 940 (1969).
77. Liberek B., Grzonka Z., Michalik A.: *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Chim.* **12**, 375 (1964).
78. Kovacs J., Mayers G. L., Johnson R. H., Cover R. E., Ghatak U. R.: *Chem. Commun.* **1970**, 53.
79. Kovacs J., Mayers G. L., Johnson R. H., Cover R. E., Ghatak U. R.: *J. Org. Chem.* **35**, 1810 (1970).
80. Kovacs J., Mayers G. L., Johnson R. H., Ghatak U. R.: *Chem. Commun.* **1968**, 1066.
81. Kovacs J., Johnson R. H., Kalas T. J., Mayers G. L., Roberts J. E.: *J. Org. Chem.* **38**, 2518 (1973).

82. Kovacs J., Davis E. J., Johnson R. H., Cortegiano H., Roberts J.: *Chemistry and Biology of Peptides*. Proc. 3rd American Peptide Symposium, Boston 1972, str. 359. Ann Arbor Science, Michigan 1972.
83. Bodanszky M., Bodanszky A.: *Chem. Commun.* 1967, 591.
84. Riley G., Turnbull J., Wilson W.: *J. Chem. Soc.* 1957, 1373.
85. Hiskey R. G., Upham R. A., Beverly G. M., Jones W. C.: *J. Org. Chem.* 35, 513 (1970).
86. Photaki I.: *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 1123 (1963).
87. Kovacs J., Mayers G. L., Johnson R. H., Ghatak U. R.: *Peptides: Chemistry and Biochemistry*. Proc. 1st American Peptide Symposium, Yale 1968, str. 337. Dekker, New York 1970.
88. Mayers G. L., Kovacs J.: *Chem. Commun.* 1970, 1145.
89. Matsuo H., Kawazoe Y., Sato M., Ohnishi M., Tatsuno T.: *Chem. Pharm. Bull.* 15, 391 (1967).
90. Almy J., Cram D. J.: *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 4459 (1969).
91. Cram D. J., Gosser L.: *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5457 (1964).
92. Kovacs J., Mayers G. L.: 7th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Riga 1970, str. 17, Zinatne, Riga 1970.
93. Kovacs J., Cortegiano H., Cover R. E., Mayers G. L.: *J. Amer. Chem. Soc.* 93, 1541 (1971).

M. Lebl and K. Jošt (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague*): **Mechanism of Racemization of α -Amino-acid Derivatives**

Racemization of α -amino-acid derivatives and peptides is discussed in terms of reaction mechanism with particular reference to peptide synthesis.