

Rolf Geiger und Walter Siedel

## Abspaltung der *N*-Formylgruppe durch Hydrazin-acetat, Hydrazinderivate und Hydroxylamin

Aus den Farbwerken Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning, Frankfurt (Main)  
(Eingegangen am 9. April 1968)

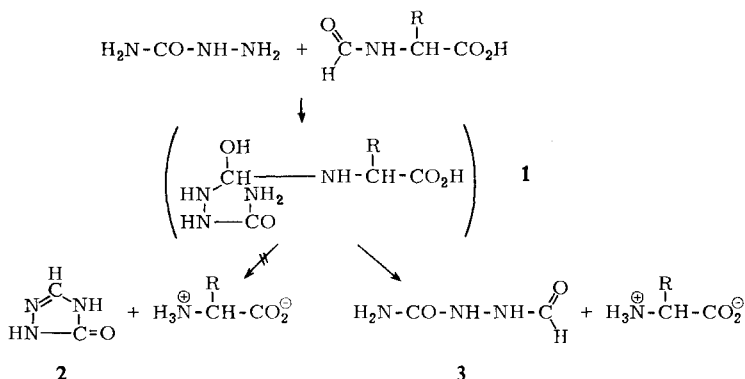
Hydrazin, Hydroxylamin und zahlreiche Hydrazinderivate übernehmen die *N*-Formylgruppe von *N*-Formyl-aminen, *N*-Formyl-aminosäuren und *N*-Formyl-peptiden. Die Reaktion läuft bevorzugt in Anwesenheit schwacher Säuren ab und kann zur schonenden Entfernung der *N*-Formylschutzgruppe bei Peptidsynthesen dienen.

Man hat schon mehrmals versucht, *N*-Formyl-aminosäuren bei Peptidsynthesen einzusetzen<sup>1–7</sup>). Die *N*-Formylgruppe verleiht den Peptiden günstige Kristallisations- und Löslichkeitseigenschaften und ist gegenüber Protonensolvolyse, alkalischer Verseifung und unter den Bedingungen der katalytischen Hydrierung ausreichend stabil<sup>8</sup>). Die Abspaltungsbedingungen<sup>2,3,6,9,10</sup>) sind aber zumindest für höhere Peptide unvorteilhaft. So mußten Hofmann und Mitarbb. bei der Synthese von Peptiden mit der Sequenz des  $\alpha$ -MSH und des ACTH<sup>11</sup>) über *N* $\epsilon$ -Formyl-lysin-Peptide bei der Abspaltung der Formylgruppen mit heißer verd. Salzsäure spürbare Verluste hinnehmen; im Falle des  $\alpha$ -MSH wurde nur die Desacetylverbindung erhalten<sup>12</sup>).

Auf der Suche nach verbesserten Abspaltungsmethoden faßten wir die Umformylierung ins Auge. Bekanntlich läßt sich die *N*-Formylgruppe von Formamid auf Aminosäuren übertragen<sup>13</sup>). In umgekehrter Weise hofften wir nun, z. B. durch Reaktion mit Semicarbazid als Formylgruppen-Akzeptor zu einer Reaktionsfolge zu gelangen, bei der die Formylgruppe über das Zwischenprodukt **1** unter Bildung von 1.2.4-Triazolol-(5) (**2**) abgespalten und stabilisiert würde.

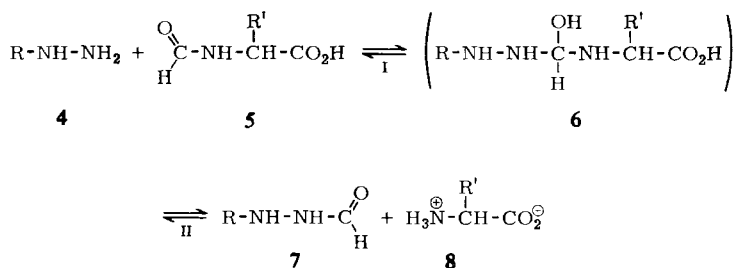
Die experimentelle Prüfung dieser Hypothese ergab, daß bei der Reaktion einer *N*-Formyl-aminosäure mit Semicarbazid die freie Aminosäure entsteht; doch betrug

- 1) A. Hillmann und G. Hillmann, Z. Naturforsch. **6b**, 340 (1951).
- 2) S. G. Waley, Chem. and Ind. **1953**, 107.
- 3) S. G. Waley und J. Watson, Biochem. J. **57**, 529 (1954).
- 4) K. Vogler und P. Lanz, Helv. chim. Acta **43**, 270 (1960).
- 5) K. Inouya und H. Otsuka, Bull. chem. Soc. Japan **34**, 1 (1961).
- 6) J. C. Sheehan und D. H. Yang, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1154, 1158 (1958).
- 7) K. Hofmann, E. Stutz, G. Spühler, H. Yajima und E. T. Schwarz, J. Amer. chem. Soc. **82**, 3727 (1960).
- 8) R. A. Boissonas und G. Preitner, Helv. chim. Acta **36**, 875 (1953).
- 9) G. Losse und W. Zönnchen, Angew. Chem. **72**, 385 (1960).
- 10) G. Losse und D. Nadolski, J. prakt. Chem. **24**, 118 (1964).
- 11) K. Hofmann, H. Yajima, T.-Y. Liu und N. Yanaihara, J. Amer. chem. Soc. **84**, 4475 (1962).
- 12) K. Hofmann und H. Yajima, J. Amer. chem. Soc. **83**, 2289 (1961).
- 13) F. Micheel, Liebigs Ann. Chem. **575**, 90 (1952).



die Ausbeute zunächst nur etwa 50%, und bei der papier- und dünn-schichtchromatographischen Charakterisierung der Reaktionsprodukte war **2** nicht nachweisbar. Schließlich fanden wir, daß die Reaktion unter Bildung von **3** und freier Aminosäure abläuft, und daß Hydrazin selbst der beste Formylgruppen-Akzeptor ist<sup>14,15</sup>. Die Formylgruppe ist nach der Reaktion papierchromatographisch als Formylhydrazin nachweisbar.

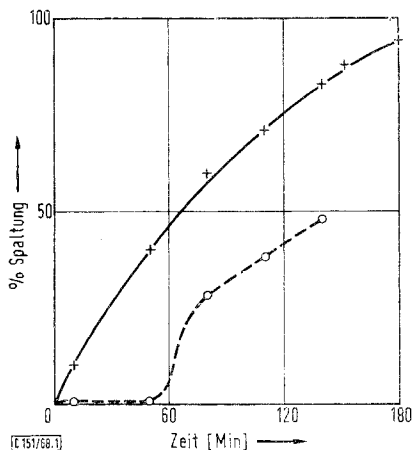
Die Übertragung der *N*-Formylgruppe ist eine Gleichgewichtsreaktion; bei Einwirkung eines großen Überschusses Formylhydrazin oder Formylphenylhydrazin auf Phenylalanin wurde in geringer Menge *N*-Formyl-phenylalanin nachgewiesen.



Das Gleichgewicht der Reaktion ist also stark nach **7** und **8** hin verschoben. Daß dennoch zur Erzielung guter Ausbeuten ein größerer Überschuß an Hydrazin und längere Reaktionszeiten vorteilhaft sind, führen wir darauf zurück, daß Reaktion I als geschwindigkeitsbestimmender Schritt langsam abläuft und **6** im Gleichgewicht nur in sehr geringer Menge vorliegt.

<sup>14</sup>) Bekanntgemachte niederländische Patentanmeldung Nr. 67. 11728, Priorität 27. 8. 1966, Erf. *R. Geiger*.

<sup>15</sup>) Nach Niederschrift des Manuskripts erreichte uns die Veröffentlichung von *H. Yajima, Y. Okada, Y. Kinomura* und *H. Minami*, *J. Amer. chem. Soc.* **90**, 527 (1968), welche *N*-Formylgruppen von MSH-Peptiden ebenfalls mit Hydrazin-acetat abspalten. Wir haben die Methode (4 Stdn., 65°, in methanolischer Lösung) auch bei der Synthese von  $\alpha$ -MSH aus seinem *N*-Formyl-Lys<sup>11</sup>-Derivat angewandt und erhielten nach Chromatographie an Carboxymethylcellulose ein chromatographisch und elektrophoretisch reines  $\alpha$ -MSH mit  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-61 \pm 2^\circ$  ( $c = 0.5$  in 10proz. Essigsäure).



Spaltung von *N*-Formyl-phenylalanin in 80proz. Äthanol bei 65°; ×—× mit 2*m* Hydrazinacetat; o---o mit 2*m* Hydrazin

Wie aus der Abbild. zu erkennen, beschleunigt Säurekatalyse die Reaktion. Ohne Säurezusatz, d. h. bei Verwendung von Hydrazin anstelle des Acetats, verläuft die Reaktion komplizierter und nimmt erst nach geraumer Zeit merklichen Umfang an. Dieses Verhalten erklärt auch, warum die Überführung eines Alkylesters in ein Hydrazid<sup>4,16)</sup> mittels Hydrazinhydrats auch in Anwesenheit von *N*-Formylgruppen mit hoher Ausbeute gelingt.

Die Reaktionsbedingungen sind den von *Schwyzler* und Mitarbb.<sup>17)</sup> für die Abspaltung der Phthaloylgruppe mit Hydrazinacetat empfohlenen ähnlich. Man erhitzt z. B. mit überschüssigem methanolischem 2*m* Hydrazinacetat 15 Stdn. auf 50–55° oder besser 4 Stdn. auf 60–65°. Die Reaktion wird bevorzugt in alkoholischer oder alkoholisch-wässriger Lösung ausgeführt, jedoch können auch Lösungsmittel wie Phenol, Dimethylacetamid, Dioxan u. a. eingesetzt werden, die unter den Reaktionsbedingungen keine Veränderung erleiden. Dimethylformamid wird durch Hydrazin gespalten. Auch einige Hydrazinderivate selbst, wie z. B. Phenylhydrazin oder Alkoxy-carbonylhydrazine, können bei der Spaltungsreaktion gleichzeitig als Lösungsmittel dienen.

Wir haben auch unter diesen Bedingungen das Verhalten des Serins gegenüber Racemisierung geprüft und keine Racemisierung gefunden<sup>17)</sup>. Schutzgruppen vom Urethantyp wurden nicht angegriffen. Benzyloxycarbonyl-asparagin und -glutamin blieben ebenfalls unverändert, jedoch entstanden aus Peptid-methylestern bis zu 50% Hydrazid. *n*-Alkylester müssen deshalb vor Anwendung der Reaktion verseift werden. *tert.*-Butylester sind erwartungsgemäß — auch gegenüber der thermischen Belastung — stabil. Eine Spaltung von Peptidbindungen haben wir bisher ebenfalls noch nicht beobachtet. Bei Peptiden der Asparaginsäure, insbesondere in Nachbarschaft von Serin, dürfte jedoch Vorsicht geboten sein.

<sup>16)</sup> *K. Hofmann, T.-Y. Liu, H. Yajima, N. Yanaiharu und S. Lande*, J. Amer. chem. Soc. **83**, 2294 (1961).

<sup>17)</sup> *R. Schwyzler, A. Costopanagiotis und P. Sieber*, Chimia [Aarau, Schweiz] **16**, 295 (1962); Helv. chim. Acta **46**, 870 (1963).

Beim Studium der Literatur fanden wir eine Veröffentlichung von *Miyamoto* und Mitarbb.<sup>18)</sup>, die bereits die Hydrazinolyse von *N*-Formyl-aminosäuren und -peptiden beobachtet und für präparative Zwecke genutzt hatten. Die Spaltung wurde dort aber mit Hydrazin selbst erzwungen. Die hierfür notwendigen Reaktionsbedingungen, die kompliziertere Peptide nicht mehr ohne Schaden überstehen dürften, mögen dazu beigetragen haben, daß diese Beobachtung nicht weiter ausgebaut und beachtet wurde.

In den Tabellen 1 und 2 sind die Spaltungsraten, die mit einer Reihe von Hydrazin-derivaten und anderen Verbindungen unter standardisierten, unzureichenden Spaltungsbedingungen erzielt wurden, aufgeführt. Die im Hinblick auf den erforderlichen Überschuß an Spaltungsreagens unzureichenden Bedingungen wurden deshalb gewählt, weil wir sicher sein wollten, auch Abspaltungsreagentien mit einer dem Hydrazin überlegenen Wirkung aufzufinden.

Die angegebenen Spaltungsraten wurden papierchromatographisch aus der logarithmischen Beziehung zwischen Fleckengröße und Konzentration ermittelt. Bei einer Fehlerbreite von  $\pm 10\%$  reicht die Genauigkeit für den geforderten Zweck, rasch einen Überblick über eine größere Zahl von Verbindungen zu gewinnen, aus.

Tab. 1. Spaltung von *N*-Formyl-phenylalanin durch Hydrazin und Hydrazinderivate; Reaktionsbedingungen: 1 mMol *N*-Formyl-phenylalanin + 3 mMol Hydrazinverb. in 3 ccm Lösungsmittel, 4 Stdn., 60°

$\begin{array}{c} R^1 \\ \diagdown \\ N-N \\ \diagup \\ R^2 \end{array} \begin{array}{c} R^3 \\ \diagdown \\ N-N \\ \diagup \\ H \end{array}$			R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Lösungsmittel	Verb.	Zusätze	mMol	% Spaltung
H	H	H	60proz. ÄtOH	—	—	70				
H	H	H	90proz. ÄtOH	—	—	67				
H	H	H	60proz. ÄtOH	AcOH	3	85				
H	H	H	60proz. ÄtOH	AcOH	6	66				
H	H	H	60proz. ÄtOH	HCl	3	1				
H	H	H	60proz. ÄtOH	HCl	6	15 <sup>a)</sup>				
H	H	H	DAA <sup>b)</sup>	—	—	80				
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	90proz. ÄtOH	—	—	48				
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	60proz. ÄtOH	AcOH	3	52				
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	DAA	—	—	42				
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	Phenol	—	—	49				
<i>p</i> -CH <sub>3</sub> O—C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	60proz. ÄtOH	AcOH	3	52				
<i>p</i> -HO—C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	60proz. ÄtOH	AcOH	3	4				
CH <sub>3</sub>	H	H	60proz. ÄtOH	AcOH	3	10				
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	60proz. ÄtOH	AcOH	3	2				
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	60proz. ÄtOH	—	—	2				
CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	60proz. ÄtOH	AcOH	3	8				
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	60proz. ÄtOH	AcOH	3	4				
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	90proz. ÄtOH	AcOH	3	8				
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	H	H	90proz. ÄtOH	—	—	53				
CH <sub>3</sub> CO	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	90proz. ÄtOH	—	—	2				
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OCO	H	H	60proz. ÄtOH	—	—	72				
NH <sub>2</sub> —CO	H	H	60proz. ÄtOH	—	—	45				
NH <sub>2</sub> —C(NH)	H	H	60proz. ÄtOH	AcOH	3	5				
CH <sub>3</sub> CO	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	90proz. ÄtOH	—	—	1				
<i>o</i> -Tolyl	H	<i>o</i> -Tolyl	90proz. ÄtOH	—	—	0				
<i>p</i> -Tolyl	H	<i>p</i> -Tolyl	90proz. ÄtOH	—	—	8				
	<i>N</i> -Amino-piperidin		60proz. ÄtOH	AcOH	3	4				

a) Spaltung durch Säure. b) Dimethylacetamid.

18) *M. Miyamoto, Y. Kawamatsu, M. Shinohara* und *Y. Ueno*, J. pharmac. Soc. Japan [Yakugakuzasshi] **81**, 439 (1961).

Tab. 2. Spaltung von *N*-Formyl-phenylalanin durch verschiedene Reagentien. Reaktionsbedingungen wie bei Tab. 1; Lösungsmittel 60proz. Äthanol

Spaltungsreagens	Zusätze		% Spaltung
	Verb.	mMol	
Hydroxylamin	AcOH	3	72
<i>O</i> -Methyl-hydroxylamin	AcOH	3	66
Ammoniak	AcOH	3	0
<i>n</i> -Propylamin	AcOH	3	0
<i>n</i> -Propylamin	—	—	0
Diäthylamin	—	—	0
Natriumcarbonat	—	—	0
Piperidin	—	—	0
Piperidin	AcOH	3	0
Äthanolamin	AcOH	3	1
Äthanolamin	—	—	2
Diäthanolamin	—	—	0
Glycinamid	AcOH	3	0

### Beschreibung der Versuche

1. *Spaltung von N-Formyl-phenylalanin mit den in Tab. 1 und 2 aufgeführten Reagentien*  
 3.86 g (20 mMol) *N-Formyl-phenylalanin* werden in 40 ccm 90proz. Äthanol gelöst; 2 ccm dieser Lösung werden mit je 3 mMol *Reagens* und ggf. Zusätzen gemischt. Dann wird mit Äthanol/Wasser im geforderten Verhältnis auf 3.0 ccm aufgefüllt und die Lösung im verschlossenen Reagensglas unter Stickstoff 4 Stdn. bei 60° aufbewahrt. Nach Verdünnen mit Wasser oder Wasser/Äthanol auf 6.0 ccm werden 0.5 und 1 cmm je dreimal zusammen mit je 0.5 und 1.0 cmm einer Verdünnungsreihe von Phenylalanin auf Papier der Firma Schleicher & Schüll 2043 b aufgetragen und 15 Stdn. aufsteigend im Laufmittel *n*-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser (30 : 6 : 20 : 24) chromatographiert. Nach sorgfältigem Besprühen mit Ninhydrin, Entwickeln der Farbe (10 Min. 90°) und Markieren der Fleckenausdehnung mit Bleistift wird die Fläche der Flecken mit Hilfe eines Ott-Kompensations-Planimeters der Firma Bender & Hobein gemessen und durch Vergleich der Flächen die (angenäherte) Spaltungsrate ermittelt.

Die Chromatographie wird nun so wiederholt, daß durch geeignete Verdünnung des Reaktionsansatzes und Wahl der Phenylalanin-Vergleiche die zu ermittelnde Konzentration inmitten einer Reihe von Vergleichswerten liegt. Die unbekannte Konzentration an Phenylalanin wird aus dem Vergleich der Mittelwerte aus der fünfmaligen Ausmessung von je 5 Punkten an Hand einer für jeden Versuch neu zu erstellenden Eichkurve auf halblogarithmischem Papier ermittelt.

### 2. Bestimmung der in der Abbild. aufgetragenen Spaltungsraten

193 mg (1 mMol) *N-Formyl-phenylalanin* werden in 100.0 ccm 2*m* Hydrazin bzw. Hydrazinacetat in 80proz. Äthanol bei 65° gelöst und im Thermostaten bei dieser Temperatur aufbewahrt. Nach 10 Min. beginnend, werden im Abstand von etwa 40 Min. Proben von 0.1 bis 0.5 ccm entnommen und mit Puffer pH 2.2 auf 1.0 ccm aufgefüllt. Die Probemenge wird so bemessen, daß im ccm etwa 0.2—1 µMol Phenylalanin enthalten sind. Das Phenylalanin wird dann im Aminosäureanalysator Unichrom der Firma Beckman bestimmt.

### 3. Präparative Spaltung von *N*-Formyl-aminosäuren und -peptiden mit Hydrazin und Hydrazin-derivaten

Die Reinheit der Aminosäuren und Peptide wird nach Abspaltung der *N*-Formylgruppe durch *N*-Bestimmung, Chromatographie und Bestimmung der opt. Drehung im Vergleich zu authent. Material gesichert.

a) 1.59 g (10 mMol) *N*-Formyl-*L*-leucin, 2.48 ccm (30 mMol) 80proz. Hydrazinhydrat und 1.8 ccm (30 mMol) Essigsäure werden in 12 ccm 60proz. Äthanol 16 Stdn. bei 50° aufbewahrt. Nach dieser Zeit sind 0.8 g Leucin ausgefallen, die abfiltriert und mit Äthanol gewaschen werden. Man engt das Filtrat i. Vak. ein und versetzt den Rückstand mit 10 ccm Aceton, wobei weitere 0.32 g *L*-Leucin ungelöst zurückbleiben. Sie werden abfiltriert und mit Aceton und Äthanol gewaschen. Gesamtausb. 1.12 g (85%).

b) 1.59 g (10 mMol) *N*-Formyl-*L*-leucin, 2.24 g (20 mMol) Semicarbazid-hydrochlorid und 1.6 g (20 mMol) Natriumacetat werden in 15 ccm 50proz. Äthanol 16 Stdn. bei 55° aufbewahrt. Man saugt vom ausgefallenen *L*-Leucin ab, das mit 50proz. Äthanol gewaschen wird (0.8 g) und bringt das Filtrat i. Vak. zur Trockne. Beim Versetzen des Rückstandes mit Aceton bleibt ein Niederschlag zurück, der abfiltriert und mit Wasser und 50proz. Äthanol digeriert wird. Man erhält so weitere 0.11 g *L*-Leucin, zusammen 0.91 g (70%).

c) 1.93 g (10 mMol) *N*-Formyl-*L*-phenylalanin werden in 6 ccm Dimethylacetamid gelöst. Man versetzt mit 5 ccm (59 mMol) Phenylhydrazin und erwärmt 6 Stdn. auf 60°. Durch Fällen mit Äther und Digerieren des Niederschlags mit Äthanol erhält man 1.06 g *L*-Phenylalanin (64%).

d) 3.86 g (20 mMol) *N*-Formyl-*L*-phenylalanin werden mit 13 g (0.1 Mol) *tert*-Butyloxycarbonyl-hydrazin 30 Min. auf dem Dampfbad erwärmt. Nach dem Erkalten gibt man 50 ccm Äther zu und isoliert 3.1 g *L*-Phenylalanin (94%).

e) 1.43 g (10 mMol) *N*-Formyl-*L*-prolin werden in 5 ccm Äthanol gelöst und nach Zusatz von 6.5 g (50 mMol) *tert*-Butyloxycarbonyl-hydrazin 3 Stdn. auf 70° erwärmt. Man dampft i. Vak. ein, versetzt den Rückstand mit Äther und filtriert 862 mg *L*-Prolin (75%) ab.

f) 500 mg (1.6 mMol) *N*<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-*N*<sup>ε</sup>-formyl-*L*-lysin werden in 10 ccm 2*m* methanolischer Hydrazinacetat-Lösung 20 Stdn. auf 50° erwärmt. Dann bringt man i. Vak. zur Trockne und versetzt den Rückstand mit Aceton. Man erhält 350 mg *N*<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-*L*-lysin (76%).

g) 432 mg (2 mMol) *N*-Formyl-*L*-leucyl-glycin werden in 10 ccm 2*m* methanolischer Hydrazinacetat-Lösung 20 Stdn. auf 50° erwärmt. Man verdünnt mit 20 ccm 50proz. Methanol und rührt 30 Min. gleichzeitig mit 4 ccm Ionenaustauscher Amberlite IRC-50 und 10 ccm Amberlite IR-45. Dann filtriert man vom Ionenaustauscher ab, wäscht ihn mit 50proz. Methanol und bringt die Lösung i. Vak. zur Trockne. Der Rückstand wird mit etwas Aceton verrieben. Man erhält 248 mg *L*-Leucyl-glycin (66%).