

groups which may preferentially be removed by catalytic hydrogenation. A number of derivatives and peptides of N<sup>ε</sup>-t-butoxycarbonyl-L-lysine are described, among these are trityl-Lys(BOC)-Lys(BOC)·OH<sup>7)</sup> and PZ·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly·OH, both intermediates in the synthesis of the nonadecapeptide with high corticotropic activity<sup>1)</sup>. The derivatives described here should also be useful for the preparation of ε-peptides of lysine.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung

## 21. Synthese von Peptid-Zwischenprodukten für den Aufbau eines corticotrop wirksamen Nonadecapeptids<sup>1)</sup>

### II. Derivate des L-Seryl-L-tyrosyl-L-serins

von B. Iselin und R. Schwyzer

(6. XII. 60)

Die Synthese von Derivaten des Tripeptids L-Seryl-L-tyrosyl-L-serin (Aminosäuresequenz 1 bis 3 des β-Corticotropins<sup>1)</sup>) unter Verwendung des Carbobenzoyrests zum Schutze der Aminogruppe des N-terminalen Serins ist schon mehrfach beschrieben worden<sup>2) 3) 4)</sup>. Für den Aufbau des ACTH-wirksamen Nonadecapeptids β<sup>1-19</sup>-Corticotropin-Glu<sup>5</sup>-γ-amid<sup>1)</sup> benötigten wir jedoch ein Tripeptidderivat, dessen Aminogruppe durch einen mittels Säurekatalyse leicht abspaltbaren Rest geschützt ist. Wir haben zu diesem Zweck die t-Butyloxycarbonylgruppe gewählt und, ausgehend von t-Butyloxycarbonyl-L-serin-hydrazid (A 1), die Tripeptidderivate B 1–3 und C 1–3 auf dem im untenstehenden Reaktionsschema gezeigten Weg aufgebaut. Das Zwischenprodukt B 1–3 haben wir auch durch Einführung der t-Butyloxycarbonylgruppe in den freien, kristallinen L-Seryl-L-tyrosyl-L-serin-methylester mittels t-Butyloxycarbonylazid<sup>5) 6)</sup> oder t-Butyloxycarbonyl-p-nitrophenol<sup>7)</sup> erhalten.

Auffallend ist die Beständigkeit der säureempfindlichen t-Butyloxycarbonylgruppe unter den stark sauren Bedingungen, die bei der Überführung eines Säurehydrazids in das entsprechende Azid allgemein angewendet werden<sup>8)</sup>. Bei der Herstellung des t-Butyloxycarbonyl-L-serin-azids haben wir festgestellt, dass zwar bei 0°

<sup>1)</sup> R. SCHWYZER, W. RITTEL, H. KAPPELER & B. ISELIN, *Angew. Chem.* **72**, 915 (1960).

<sup>2)</sup> K. HOFMANN, A. JÖHL, A. F. FURLENMEIER & H. KAPPELER, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 1636 (1957).

<sup>3)</sup> ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **41**, 1852 (1958).

<sup>4)</sup> B. ISELIN & R. SCHWYZER, *Helv.* **43**, 1760 (1960).

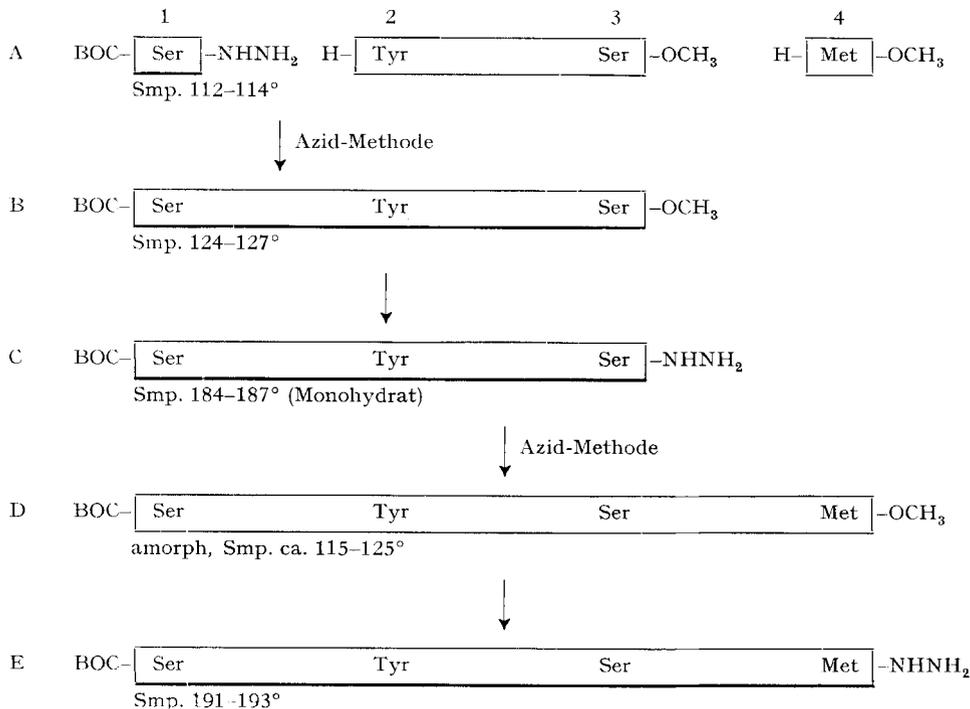
<sup>5)</sup> R. SCHWYZER, P. SIEBER & H. KAPPELER, *Helv.* **42**, 2622 (1959).

<sup>6)</sup> Herstellung von t-Butyloxycarbonylazid: L. A. CARPINO, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4427 (1957); L. A. CARPINO, C. A. GIZA & B. A. CARPINO, *ibid.* **81**, 955 (1959); L. A. CARPINO, *ibid.* **82**, 2725 (1960).

<sup>7)</sup> G. W. ANDERSON & A. C. MCGREGOR, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 6180 (1957).

<sup>8)</sup> Vgl. R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **43**, 1910 (1960).

und höheren Temperaturen die Schutzgruppe langsam abgespalten wird (unter  $\text{CO}_2$ -Entwicklung), aber bei  $-10^\circ$  keine solche Spaltung stattfindet<sup>9)</sup>. Wir haben dieses Verhalten an einem weiteren Beispiel überprüft und, ausgehend vom Hydrazid C 1–3, das Tetrapeptidderivat D 1–4 (Aminosäuresequenz 1 bis 4 des  $\beta$ -Corticotropins; vgl. entsprechendes Carbobenzoxyderivat<sup>2)</sup>) unter Verwendung der Azidmethode hergestellt. Auch in diesem Falle war die *t*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe unter den Bedingungen der Azid-Bildung beständig, so dass die Azid-Methode zur Synthese von *t*-Butyloxycarbonyl-peptid-Derivaten allgemein anwendbar erscheint.



BOC = *t*-Butyloxycarbonyl-; Z = Carbobenzoxy-; stark ausgezogene Basislinie = kristallisiertes Produkt.

### Experimenteller Teil

Die angegebenen Smp. sind in einer Kapillare im Heizbad bestimmt und nicht korrigiert. Papierchromatographie: auf WHATMAN-Papier Nr. 3, absteigend in den Systemen: I = *t*-Amylalkohol (100 ml), Isopropanol (40 ml), Wasser (50 ml), Triäthylamin (0,8 ml), Diäthylbarbitursäure (1,8 g); II = *sec*-Butanol (70 ml), Isopropanol (10 ml), Wasser (40 ml), Monochloressigsäure (3 g); III = *sec*-Butanol (100 ml), Isopropanol (15 ml), Wasser (70 ml), Diäthylbarbitursäure-Na-Salz (0,5 g); IV = *sec*-Butanol (35 ml), Isopropanol (35 ml), Wasser (25 ml), Phosphatpuffer 1,5 M, pH 8 (10 ml); V = *t*-Amylalkohol (100 ml), Isopropanol (40 ml), Wasser (55 ml).

*t*-Butyloxycarbonyl-*L*-serin-methylester. Eine Lösung von 19 g (0,16 Mol) *L*-Serin-methylester (frisch hergestellt aus 25 g Ester-hydrochlorid<sup>2)</sup> in 75 ml trockenem Pyridin wird mit 43 g (0,3 Mol) *t*-Butyloxycarbonylazid<sup>6)</sup> versetzt und 24 Std. bei Raumtemperatur stengelassen.

<sup>9)</sup> Vgl. das entsprechende Verhalten von Trityl-aminosäurehydraziden: B. ISELIN, Arch. Biochemistry Biophysics 78, 532 (1958).

Die schwach gelb gefärbte Reaktionslösung wird darauf im Vakuum bei 30° auf ein kleines Volumen eingengt, mit Essigester verdünnt und die Essigesterlösung unter Eiskühlung mehrmals mit 1N Salzsäure, 1N Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der erhaltene Sirup liefert nach mehrmaliger Extraktion mit Petroläther (Entfernung von überschüssigem t-Butyloxycarbonylazid) 27 g (77%) t-Butyloxycarbonyl-L-serin-methylester als Öl, das direkt weiter umgesetzt wird.

*t-Butyloxycarbonyl-L-serin-hydrazid (A 1).* 27 g roher t-Butyloxycarbonyl-L-serin-methylester werden in 200 ml Methanol gelöst und mit 20 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach 24 Std. wird die Lösung im Vakuum bei max. 30° eingedampft und der erhaltene Sirup zur Entfernung von überschüssigem Hydrazin über Nacht bei 0,1 Torr über konz. Schwefelsäure stehengelassen. Der feste Rückstand wird mit Essigester verrieben, das isolierte kristalline Material bei 0,01 Torr über Schwefelsäure von Spuren Hydrazin befreit und aus Essigester umkristallisiert: 23,3 g (86%); Smp. 112–114°;  $[\alpha]_D^{25} = -9,4^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 4,1$  in Methanol).

$C_8H_{17}O_4N_3$  (219,2) Ber. C 43,82 H 7,82 N 19,17% Gef. C 43,90 H 8,05 N 18,94%

*L-Tyrosyl-L-serin-methylester (A 2–3).* Eine Suspension von 16 g (50 mMol) L-Tyrosyl-L-serin-methylester-hydrochlorid<sup>3)10)</sup> in 50 ml Essigester wird bei 0° mit 12 ml einer 5N-Lösung von Ammoniak in Methanol versetzt und 15 Min. bei 0° gerührt; nach Zugabe von weiteren 50 ml Essigester wird das ausgeschiedene Ammoniumchlorid abfiltriert und das Filtrat im Vakuum vorsichtig eingedampft. Der ölige Rückstand ergibt nach mehrmaligem Verreiben mit Äther 14 g freien Ester, der direkt weiter umgesetzt wird; amorphes Pulver, schwer löslich in Essigester (löslich in Gegenwart von 10% Methanol), leicht löslich in Tetrahydrofuran und Acetonitril; papierchromatographisch einheitlich; Rf-Werte in den Systemen II 0,62, IV 0,69.

*L-Seryl-L-tyrosyl-L-serin-methylester.* 2,0 g (4 mMol) Carbobenzoxy-L-seryl-L-tyrosyl-L-serin-methylester<sup>2)3)4)</sup> werden in 40 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 1 g Palladiumkohle (10% Pd) bei Zimmertemperatur und Normaldruck hydriert, wobei das gebildete Kohlendioxyd in Natronlauge absorbiert wird. Nach Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff (20 Min.) ist die Hydrierung beendet und die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wird im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Beim Verreiben des Rückstandes mit Acetonitril kristallisiert der Ester in Form von feinen Nadeln: 1,21 g (82%); Smp. 155–158°; nach Umkristallisieren aus Wasser oder wenig Alkohol: Smp. 158–160°;  $[\alpha]_D^{26} = +4,6^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 3,9$  in Methanol),  $+11,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,0$  in 0,1N Salzsäure in Methanol); Literaturwert für Hydrochlorid<sup>3)</sup> +10,2° ( $c = 2,6$  in Methanol); Rf-Werte in den Systemen I 0,72, II 0,63, III 0,75, IV 0,74. Der Ester ist bei 0° unbeschränkt haltbar.

$C_{16}H_{23}O_7N_3$  (369,4) Ber. C 52,02 H 6,28 N 11,38% Gef. C 51,69 H 6,53 N 11,36%

*t-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-serin-methylester (B 1–3).* a) Ausgehend von t-Butyloxycarbonyl-L-serin-hydrazid: 11 g (50 mMol) t-Butyloxycarbonyl-L-serin-hydrazid werden rasch in 100 ml auf –10° vorgekühlter 1N Salzsäure (enthaltend 10 g Natriumchlorid zur Gefrierpunktserniedrigung) gelöst und mit einer auf –10° gekühlten Lösung von 4,2 g (60 mMol) Natriumnitrit in 15 ml Wasser versetzt. Nach 5 Min. wird das als Öl ausgeschiedene t-Butyloxycarbonyl-L-serin-azid zweimal mit je 150 ml Essigester (auf –10° vorgekühlt) extrahiert, die Essigesterlösung rasch mit kalter 1N Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Eiswasser gewaschen, kurz über Magnesiumsulfat bei 0° getrocknet und im Vakuum bei max. 20° auf ca. 50 ml eingengt.

Die Lösung des Azids wird bei 0° mit 14 g (50 mMol) rohem L-Tyrosyl-L-serin-methylester in 50 ml trockenem Tetrahydrofuran versetzt und 48 Std. bei +5° stehengelassen. Anschließend wird die Reaktionslösung zur Entfernung von Tetrahydrofuran im Vakuum auf ein kleines Volumen eingengt, mit Essigester verdünnt und bei 0° mit wenig 1N Salzsäure, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen (in einigen Ansätzen schied sich ein Teil des Reaktionsprodukts während dem Waschen aus und wurde abfiltriert), getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand liefert beim Verreiben mit Äther 14,7 g (63%) amorphe Substanz, welche für die folgende Überführung in das Hydrazid genügend rein ist.

Zweimaliges Umkristallisieren aus wenig Aceton ergibt den reinen, kristallinen t-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-serin-methylester: Smp. 124–127°;  $[\alpha]_D^{26} = -23,6^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,9$  in

<sup>10)</sup> L. T. SKEGGS, K. E. LENTZ, J. R. KAHN & N. P. SHUMWAY, J. exp. Med. 108, 283 (1958).

Methanol); schwer löslich in Äther, Benzol, Chloroform; löslich in heissem Essigester und heissem Wasser (beim Kühlen Nadeln, Smp. 97–105°, Hydrat); Rf-Werte in den Systemen I–V > 0,9.

$C_{21}H_{31}O_9N_3$  (469,5) Ber. C 53,72 H 6,66 N 8,95% Gef. C 53,46 H 6,73 N 8,82%

Die Abspaltung der t-Butyloxycarbonylgruppe mittels Chlorwasserstoff in Essigester oder Trifluoressigsäure ergibt papierchromatographisch reinen L-Seryl-L-tyrosyl-L-serin-methylester als Hydrochlorid, bzw. Trifluoacetat.

b) Ausgehend von L-Seryl-L-tyrosyl-L-serin-methylester: Eine Lösung von 369 mg (1 mMol) L-Seryl-L-tyrosyl-L-serin-methylester in 2 ml trockenem Pyridin wird mit 239 mg (1 mMol) t-Butyloxycarbonyl-p-nitrophenol<sup>7)</sup> versetzt und über Nacht bei 20° stengelassen. Die Reaktionslösung wird im Vakuum vorsichtig eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie unter a) weiter aufgearbeitet; Rohprodukt nach Verreiben mit Äther: 295 mg (63%); nach Umkristallisieren aus Aceton: 233 mg (50%), Smp. 123–126°;  $[\alpha]_D^{27} = -23,1^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,0$  in Methanol).

Bei Verwendung von 0,36 g (2,5 mMol) t-Butyloxycarbonylazid an Stelle von t-Butyloxycarbonyl-p-nitrophenol werden unter sonst gleichen Bedingungen 305 mg (65%) Rohprodukt bzw. 245 mg (52%) reine Substanz erhalten.

t-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-serin-hydrasid (C f-3). 14 g (30 mMol) roher t-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-serin-methylester werden in 100 ml Methanol gelöst, mit 5 ml Hydrazinhydrat versetzt und bei Zimmertemperatur stengelassen. Nach kurzer Zeit beginnt die Abscheidung von amorphem Hydrazid, das nach 6 Std. abfiltriert, mit Methanol gewaschen und zur Entfernung von Spuren Hydrazin über Nacht bei 0,01 Torr über konz. Schwefelsäure getrocknet wird: 11,8 g, Smp. 173–176°. Nach Umkristallisieren aus Wasser werden 9,5 g (68%) Hydrazid-monohydrat in Form von filzigen Nadeln vom Smp. 184–187° (nach Sintern bei 150°) erhalten;  $[\alpha]_D^{24} = -3,4^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,76$  in Dimethylformamid),  $-24,9^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,18$  in Eisessig-Wasser 1:1),  $-9^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,01$  in Pyridin); Rf-Werte in den Systemen I 0,87, II 0,83, III 0,86, IV 0,89, V 0,89; einheitlich.

$C_{20}H_{31}O_8N_5 \cdot 1H_2O$  (487,5) Ber. C 49,27 H 6,82 N 14,37% Gef. C 49,52 H 6,89 N 14,22%

Bei Verwendung von reinem Ausgangsmaterial beträgt die Ausbeute an umkristallisiertem Hydrazid 75%.

t-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionin-methylester (D 1-4). 2,44 g (5 mMol) t-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-serin-hydrasid (Monohydrat) werden in das Azid übergeführt (unter den für die Herstellung von t-Butyloxycarbonyl-L-serin-azid angegebenen Bedingungen), und die Lösung des Azids in ca. 30 ml Essigester wird mit 1,63 g (10 mMol) L-Methionin-methylester (frisch aus dem Hydrochlorid<sup>11)</sup> hergestellt und destilliert<sup>12)</sup><sup>13)</sup>, Kp. 58–60° bei 0,02 Torr) versetzt und 48 Std. bei 0° stengelassen. Das als Gallerte ausgeschiedene Reaktionsprodukt wird abfiltriert und mit Essigester und Äther gewaschen: 1,89 g amorphes Pulver; aus dem Filtrat werden nach üblicher Aufarbeitung weitere 0,25 g Substanz gewonnen (total 2,14 g entspr. 71%); nach Umfällen aus Essigester: 1,57 g (52%) amorpher Ester mit unscharfem Smp. bei ca. 115–125°;  $[\alpha]_D^{27} = -29,8^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,1$  in Methanol); Rf-Werte in den Systemen I–IV > 0,9.

$C_{26}H_{40}O_{10}N_4S$  (600,7) Ber. C 51,99 H 6,71 O 26,64% Gef. C 51,90 H 6,81 O 26,68%

t-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionin-hydrasid (E 1-4). Eine Lösung von 0,90 g (1,5 mMol) t-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionin-methylester in 10 ml Methanol wird mit 0,25 ml Hydrazinhydrat versetzt und bei Zimmertemperatur stengelassen. Nach 18 Std. wird das ausgeschiedene amorphe Hydrazid abfiltriert und mit Methanol gewaschen: 0,75 g (83%), Smp. 185–188° (Sintern bei 178°). Das Rohprodukt wird zur Entfernung von Spuren Hydrazin mit Wasser verrieben und darauf aus Wasser umkristallisiert: 0,46 g (51%), filzige

<sup>11)</sup> M. BRENNER & R. W. PFISTER, Helv. 34, 2085 (1951).

<sup>12)</sup> M. BRENNER & W. HUBER, Helv. 36, 1109 (1953).

<sup>13)</sup> Eine Probe des Destillats wurde in das Hydrochlorid zurückgeführt:  $[\alpha]_D^{26} = +26,2^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 4,0$  in Wasser); Literaturwert =  $+26,8^\circ$ <sup>11)</sup>; keine Racemisierung bei der Destillation.

Nadeln vom Smp. 191–193°;  $[\alpha]_D^{25} = -36,7^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,0$  in Wasser-Methanol 1:1); Rf-Werte in den Systemen I–IV  $> 0,9$ .

$C_{25}H_{40}O_9N_6S$  (600,7) Ber. C 49,99 H 6,71 N 13,99% Gef. C 49,69 H 7,06 N 13,82%

Die analytischen Daten verdanken wir Herrn Dr. W. PADOWETZ und die Ausführung der Papierchromatogramme Herrn E. VON ARX.

#### SUMMARY

The synthesis of t-butyloxycarbonyl derivatives of L-seryl-L-tyrosyl-L-serine and L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionine is described. The azide method involving the conversion of a hydrazide into the corresponding azide under acidic conditions was found to be applicable, under carefully selected conditions, to the synthesis of t-butyloxycarbonyl peptide derivatives in spite of the sensitivity of the protecting group toward strongly acidic reagents.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung

## 22. Dünnschicht-Ionophorese und Dünnschicht-Ionophorese-Chromatographie

von C. G. Honegger

(6. XII. 60)

Die Dünnschicht-Chromatographie, welche bereits im Jahre 1938 von ISMAILOV & SHRAIBER<sup>1)</sup> beschrieben wurde, fand erst durch die von STAHL<sup>2)</sup> entwickelte, leicht zu handhabende Technik allgemeine Verbreitung. Es werden dabei anorganische Adsorptionsmittel wie Silicagel oder Aluminiumoxyd unter Zusatz eines Bindemittels (Gips oder Stärke) mit Wasser angerührt und mit Hilfe eines Streichgerätes in dünner Schicht (ca. 0,3 mm) auf Glasplatten aufgezogen. Die getrockneten Adsorptionsschichten können zur chromatographischen Auftrennung verschiedenster Substanzgemische verwendet werden. Nachdem sich diese Methode speziell für die Chromatographie lipophiler Stoffe auszeichnete, wurde sie mit Erfolg auch für die Auftrennung von Aminosäuren<sup>3)4)</sup> und Amininen<sup>5)</sup> angewandt. BRENNER & NIEDERWIESER<sup>4)</sup> beschrieben die Dünnschicht-Chromatographie für die Aminosäureauf-trennung der papierchromatographischen Methode als ebenbürtig oder sogar überlegen. Die Vorteile gegenüber der Papierchromatographie sind: a) Die geringe Diffusion bedingt eine kleinere Fleckengrösse und damit Erhöhung der Empfindlichkeit

<sup>1)</sup> N. A. ISMAILOV & M. S. SHRAIBER, *Farmatsija* 3, 1 (1938).

<sup>2)</sup> E. STAHL, *Pharmazie* 11, 633 (1956); *Chemikerztg.* 82, 323 (1958); *Parfümerie und Kosmetik* 39, 564 (1958); *Arch. Pharmaz.* 292/64, 411 (1959); *Pharm. Rdsch.* 1959, Heft 2, 1.

<sup>3)</sup> M. MOTTIER, *Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.* 49, 454 (1948); E. MUTSCHLER & H. ROCHELMMEYER, *Arch. Pharmaz.* 292/64, 449 (1959); E. NÜRNBERG, *Arch. Pharmaz.* 292/64, 610 (1959).

<sup>4)</sup> M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* 16, 378 (1960).

<sup>5)</sup> K. TEICHERT, E. MUTSCHLER & H. ROCHELMMEYER, *Deutsche Apotheker Zeitung* 100, 283 (1960).