

- [14] *L. P. Hammett & M. A. Paul*, J. Amer. chem. Soc. 56, 830 (1934); *L. P. Hammett*, Chem. Reviews 16, 67 (1935).
- [15] *P. B. Weisz, J. S. Hicks & H. Zollinger*, Trans Faraday Soc. 63, 1801, 1807, 1815 (1967), 64, 1693 (1968); *P. Rys*, Inaugural thesis, ETH Zürich 1970, *R. Ott*, Ph.D. thesis, ETH Zürich 1971.
- [16] *K. S. Unger & P. Rys*, in preparation.
- [17] *G. N. Kormanoshkaya & I. N. Vlodayets*, Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya 10, 1748 (1964).
- [18] *R. S. Parikh*, Text. Res. J. 37, 538 (1967); *H. U. Metha, N. T. Baddi, R. S. Parmar, K. A. Patel & R. S. Patel*, Text. Res. J. 39, 387 (1969).
- [19] *W. A. Reeves*, J. Text. Inst. 53, P 22 (1962); *R. H. Barker & S. L. Vail*, Text. Res. J. 37, 1077 (1967).
- [20] *S. B. Patel, J. Rivlin, T. Samuelson, O. A. Stamm & H. Zollinger*, Text. Res. J. 38, 226 (1968).
- [21] *M. A. Paul & F. A. Long*, Chem. Reviews 57, 1 (1957); *C. H. Rochester*, Acidity Functions, Academic Press, London 1970, chapt. 2.
- [22] *Pentti Salomaa*, Acta Chem. Scand. 11, 125 (1957).
- [23] SNV 195596 (1969).
- [24] *S. Ramanathan, J. Rivlin, O. A. Stamm & H. Zollinger*, Text. Res. J. 38, 63 (1968).

24. N, N'-Alkylidenpeptide: Peptidsynthese-Nebenprodukte bei Einwirkung von Carbonylverbindungen.^{1) 2)}

von **F. Cardinaux** und **M. Brenner**

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(5. X. 72)

Summary. Byproducts of peptide synthesis, formed in the course of accidental attack by Pd-activated oxygen on ethanol and triethylamine in reaction media, have been identified as products of condensation between peptides and acetaldehyde, and demonstrated to represent N, N'-alkylidenepeptides, i.e. derivatives of 4-imidazolidinones. The same products are obtained by direct action of acetaldehyde on the respective peptides, and analogs resulted in some cases when acetaldehyde was replaced by formaldehyde or acetone. The condensation is reversible, imidazolidinone stability depending on structural features of both the involved peptide and carbonyl compound. There are evidently implications of these findings with respect to the chemistry and biochemistry of peptides and proteins.

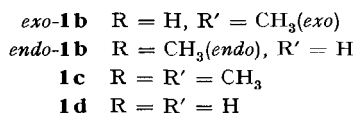
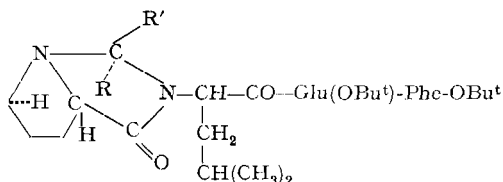
1. Bildung und Struktur. – Bei der Hydrogenolyse der Benzyloxycarbonylpeptidester *Z*-Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t **1a**, *Z*-Val-His-Pro-Phe-OMe **2a** und *Z*-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe **3a** zu den entsprechenden Peptidestern **1**, **2** und **3** fiel schon vor Jahren die Entstehung von dünn-schichtchromatographisch charakterisierbaren peptidartigen Nebenprodukten **1b**, **2b** und **3b** auf [2]. Bemerkenswert war insbesondere, dass diese zwar gleiche Aminosäurezusammensetzung aufwiesen wie **1**, **2** und **3**, aber nicht wie jene nach der peptidsynthetisch gebräuchlichen *p*-Nitrophenylestermethode acylierbar waren. Wir sind im Einverständnis mit den Herren *Rittel, Riniker & Sieber*³⁾ diesem merkwürdigen und störenden Sachverhalt

¹⁾ Auszug aus der Dissertation *F. Cardinaux*, Basel 1972.

²⁾ Teile dieser Arbeit wurden vorgetragen am «11. Europäischen Peptidsymposium» in Wien, 1971 [1].

³⁾ Chemische Forschungslaboratorien der Division Pharmazeutika der CIBA-GEIGY AG., Basel.

nachgegangen. Einen ersten Hinweis auf die Natur der Nebenprodukte bot der Befund, dass deren Bildung der unbeabsichtigten Einwirkung von Luftsauerstoff während der Aufarbeitung der bei der Hydrogenolyse anfallenden Reaktionsgemische zuzuschreiben ist. In der Folge konnten **1b**, **2b** und **3b** durch Belüften von **1**, **2** und **3** in Äthanol/Triäthylamin/Pd-Kohle bei ca. 60° in Ausbeuten bis zu 73% erzeugt und säulenchromatographisch an Kieselgel isoliert werden. Der Verbindung **1b** hat sich die obige 4-Imidazolidinonstruktur zuordnen lassen.



Nomenklatur. Eine systematische Benennung von **1b** und verwandten Substanzen als 4-Imidazolidinonderivate wäre schwerfällig und unübersichtlich. Wir ziehen deshalb vor, solche Verbindungen, ihrer Bildungsweise entsprechend, kurz als N,N'-Alkylidenpeptide zu bezeichnen, wobei N und N' die zwei backbone-Stickstoffatome im N-terminalen Dipeptidrest einer beliebigen Peptidkette sind. Unter einem N,N'-Alkylidentetrapeptid ist danach ein (N,N'-Alkylidendipeptidoyl)-dipeptid zu verstehen. **1b** kann somit als (N,N'-Äthyliden-prolyl-leucyl)-glutamyl(*γ*-*t*-butylester)-phenylalanin-*t*-butylester oder in Anpassung an geltende Abkürzungen [3] als $\begin{array}{l} \text{CHR} \\ | \\ \text{Pro} \end{array}$ -Leu-Glu(OBu^t)-Phc-OBu^t, (R = CH₃) bezeichnet werden [1].

2. Strukturbeweis. – Beim Erwärmen von **1b** in neutraler, wässrig-alkoholischer Lösung wird der Tetrapeptidester **1** freigesetzt. Im Dampfdestillat dieses Partialhydrolysates findet man pro eingesetztes Mol **1b** ein Mol Acetaldehyd. Vergleiche von **1** und **1b** im IR.-Spektrum zeigen einerseits unveränderte Banden der beiden -OBu^t-Reste, andererseits bei **1b** eine verminderte Absorption im Bereich der N-H-(3300–3400 cm⁻¹) und der Amid-II-Schwingungen (1500 cm⁻¹); letztere weist auf ein doppelt substituiertes Peptidstickstoffatom hin. In den NMR.-Spektren⁴⁾ erkennt man die unveränderten -OBu^t-Signale, im Spektrum von **1b** ausserdem die Signale der Äthylidengruppe als scharfes Dublett (*J* = 7 Hz, *δ* = 1,32, CH-CH₃) und Quartett (*J* = 7 Hz, *δ* = 4,36, CH-CH₃). Die angegebene Zuordnung basiert auf einem Doppelresonanzversuch mit Einstrahlung bei *δ* = 4,36. Die Schärfe der Signale ist auffällig. Läge ein Epimerengemisch von *exo*- und *endo-1b* vor, so wäre wegen Nicht-Äquivalenz der zwei Methylgruppen und entsprechender Nicht-Äquivalenz der zugehörigen chemischen Verschiebungen jedes Signal doppelt zu erwarten [4]. Aus dem Fehlen einer solchen Aufspaltung dürfen wir schliessen, dass die Konfiguration der Substanz **1b** einheitlich ist; welche der beiden möglichen Stereoisomeren tatsächlich vorliegt, wird unten diskutiert. – Die Stelle des Äthylidenrestes, das Molekulargewicht von **1b**,

⁴⁾ Wir danken Dr. H. Fuhrer, CIBA-GEIGY AG., Basel, für die Aufnahme der NMR.-Spektren.

die Aminosäuresequenz und die Verteilung der Schutzgruppen ergeben sich aus dem Massenspektrum⁵⁾ (Fig. 1).

McLafferty-Umlagerungen unter Abspaltung von Isobuten aus der Leucin-Seitenkette und aus den *t*-Butyloxygruppen komplizieren das Spektrum; zum Beispiel m/e 586 = M^+ - C_4H_8 , MI 535,5. Aufschlussreich ist die Abspaltung des Imidazolidinonrestes m/e 139 vom Ion m/e 504. Unter Berücksichtigung der Ionen m/e 422 und 237 ist damit die Verknüpfung der Äthylidengruppe mit dem N-terminalen Dipeptidrest bewiesen.

Eine isomere, mit den MS.-Daten möglicherweise ebenfalls vereinbare 5-Imino-oxazolidin-Struktur kann auf Grund der Basizität (pK von **1b** \approx 3-4, von Imidaten \approx 7-9 [5]), der chemischen Verschiebung der Äthylidenprotonen [4], sowie der rela-

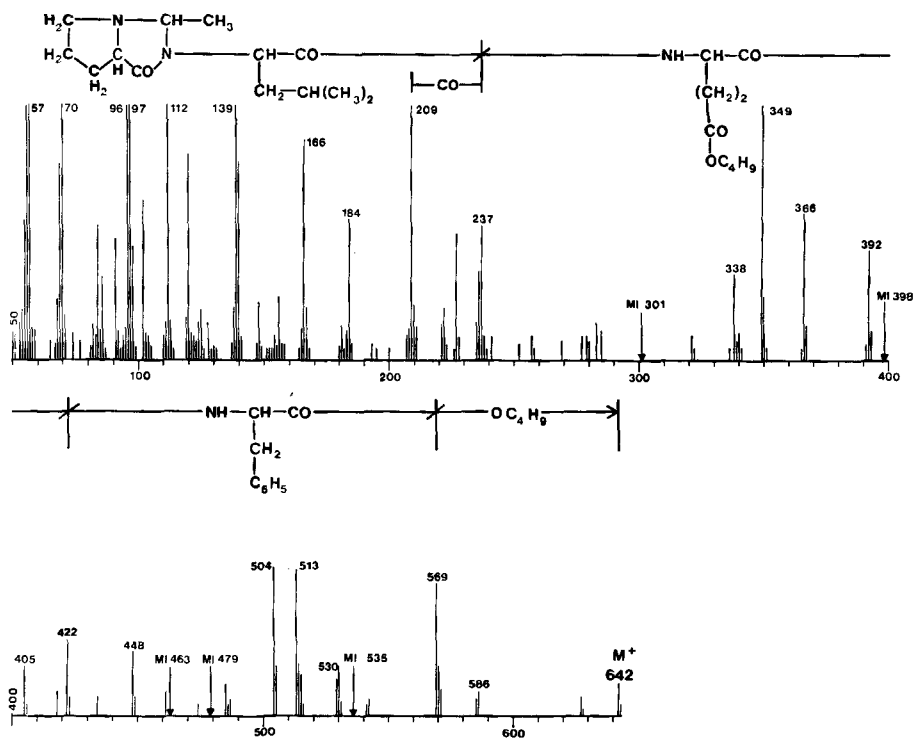


Fig. 1. Massenspektrum von **1b**

$$m/e\ 642 = M^+, C_{35}H_{54}N_4O_7 (\Delta = 9,1)$$

$$422 = M^+ - (Phe-OBu^t)$$

$$237 = 422 - (Glu(OBu^t)), C_{13}H_{21}N_2O_2 (\Delta = 2,7)$$

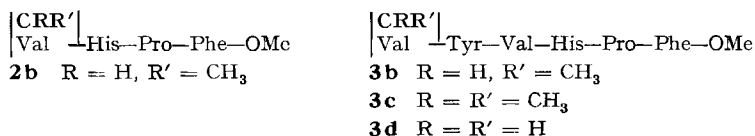
$$139 = C_7H_{11}N_2O (\Delta = 1,6)$$

$$504 = C_{28}H_{44}N_2O_6 (\Delta = 1,5)$$

tiven Beständigkeit von **1b** unter milden Hydrolysebedingungen ausgeschlossen werden.

⁵⁾ Wir danken Dr. H. Hürzeler, CIBA-GEIGY AG., Basel, für die Aufnahme der Massenspektren.

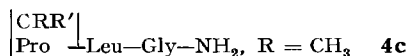
Den Produkten **2b** und **3b** schreiben wir analoge Strukturen zu.



In der Tat spalten sie in neutraler wässriger Lösung beim Erwärmen eine äquivalente Menge Acetaldehyd ab, wobei die freien Peptidester **2** und **3** entstehen. Unterhalb pH ca. 3,5 sind sie, wie **1b**, relativ beständig. In den IR.-Spektren erkennt man beim Vergleich mit den Spektren der freien Peptidester die typischen Unterschiede im Bereich der N-H- und Amid-II-Banden. Im Gegensatz zu **1b**, das bei unserem Darstellungsverfahren einheitlich anfällt, wurden **2b** und **3b** jeweils zu ungefähr gleichen Teilen in zwei isomere Formen chromatographisch aufgespalten⁶⁾.

3. Synthese. – Die Entstehung der Substanzen **1b**, **2b** und **3b** in belüfteten alkoholischen Lösungen legte – nach Identifizierung ihrer Imidazolinonstruktur – die Vermutung nahe, dass sie durch primäre Kondensation der jeweiligen terminalen Aminogruppe von **1**, **2** und **3** mit Acetaldehyd entstanden waren.

Es ist einerseits bekannt, dass Pd²⁺ primäre Alkohole zu Aldehyden dehydriert, und dass metallisches Pd⁰ von Luftsauerstoff, namentlich unter Cu²⁺-Katalyse, zu Pd²⁺reoxidiert werden kann [6]. Ausser Alkoholen greift das System O₂/Pd auch Triäthylamin an, ein Vorgang, der vermutlich ähnlich wie die bekannte Desalkylierung von tert. Aminen mittels CuCl₂ oder O₂/CuCl abläuft [7]; nach unserer Beobachtung entsteht beim Belüften von *Methanol*/Triäthylamin Gemischen in Gegenwart von Pd-Kohle nicht etwa nur Formaldehyd, sondern fast ebensoviel *Acetaldehyd*. Andererseits ist die Bildung von 4-Imidazolidinonen aus peptidischem Material und Carbonylverbindungen nicht völlig neu. Aceton z. B. gibt mit Ampicillin in reversibler Reaktion Hetacillin [8], mit dem Peptidhormon Oxytocin («Aceton-oxytocin») [4], und mit Pro-Leu-Gly-NH₂ **4** die entsprechende, extrem hydrolyseempfindliche N,N'-Isopropylidenverbindung **4c** [4]⁷⁾.



In der Tat entstehen durch Zusatz von ein bis zwei Äquivalenten Acetaldehyd zu 40° warmen, wässrigen oder alkoholischen Lösungen der Peptidester **1**, **2** und **3** die N,N'-Alkylidenderivate **1b**, **2b** und **3b**. Bei grösserem Acetaldehyd-Überschuss, höherer Temperatur oder längerer Reaktionsdauer treten Nebenprodukte auf. Die Zugabe eines Trocknungsmittels von Molekularsiebtypus erweist sich aus denselben Gründen, vermutlich wegen vermehrter Aldehyd-Selbstkondensationen, als ungünstig. Im Gegensatz zu Acetaldehyd, der in alkoholischer Lösung überwiegend als Halbacetal vorliegt [10], reagiert Diäthylacetal in Alkohol selbst bei 80° nicht mit den Peptidestern.

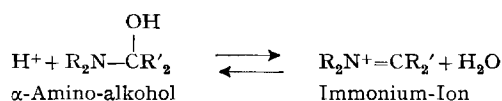
Im Hinblick auf die erwähnte Existenz von N,N'-Isopropylidenpeptiden und im Sinne einer Ergänzung von *Fraenkel-Conrat's* grundlegenden Untersuchungen über die Einwirkung von Formaldehyd auf peptidisches Material [11] lag es nun nahe, das Verhalten von **1**, **2**, **3** auch gegenüber Aceton und Formaldehyd zu überprüfen.

⁶⁾ Die isomeren **2b** unterscheiden sich voneinander geringfügig durch ihre spez. Drehungen.

⁷⁾ Nach Abschluss unserer Arbeiten und Niederschrift der Diss. *F. Cardinaux* erschien eine Arbeit über Imidazolidinon-Synthesen aus Dipeptid-Na-Salzen mit Aceton, Cyclohexanon, Cyclopentanon und Isobutyraldehyd in Methanol [9].

Der Hexapeptidester **3** lieferte bei 50° nach dem Verfahren von *Du Vigneaud* das Isopropylidenderivat **3c**, jedoch kein Methylenderivat **3d**. Der Tetrapeptidester **2** reagierte unter denselben Bedingungen lediglich mit Aceton, und zwar träge, zu einem nicht weiter untersuchten komplexen Gemisch, und der Prolylpeptidester **1** blieb in Gegenwart von Aceton selbst bei Zugabe eines Molekularsiebtrockenmittels unverändert, gab aber mit Formaldehyd ein aussergewöhnlich hydrolysebeständiges Methylenderivat **1d**. In Übereinstimmung mit letzterer Beobachtung entstanden in Pd-Kohle-haltigen, belüfteten Methanol/Triäthylamin-Lösungen nur im Falle von **1** nebeneinander das Äthylidenderivat **1b** und das Methylenderivat **1d**. Sämtliche Substanzen mit Ausnahme von **1d** blieben ölig oder amorph; ihre Charakterisierung basiert auf chromatographischen und spektralen Daten, sowie auf der Identifizierung der hydrolytisch abspaltbaren Carbonylverbindungen.

4. Diskussion. – Offensichtlich geht bei unseren milden Bedingungen (40–60°, schwach basisch) der Umsatz zwischen Peptid und Carbonylverbindung gegebenenfalls nur bis zur Stufe des α -Amino-alkohols, wobei wir annehmen müssen, dass dieses ähnlich einem Halbacetal, nur im Gleichgewicht mit den Edukten existenzfähig ist. Der eventuelle Ringschluss zum 4-Imidazolidinon erscheint insofern ungewöhnlich, als Peptidstickstoff im allgemeinen nicht aminoalkylierbar ist [12]. Er unterscheidet sich hierin von primärem Amidstickstoff und Guanidinstickstoff, eine Erfahrung, die auf *Fraenkel-Conrat* [11] zurückgeht und von *Haworth* [13] bestätigt wurde⁸⁾. Die erhöhte Reaktivität des Peptidstickstoffs ist im vorliegenden Fall ohne Zweifel durch eine günstige Lage zum intermediären kationischen Zentrum bedingt. Ein Imida-



zolidinon ist aber wegen der Reversibilität seiner Bildung gleichwohl nur dann zu fassen, wenn es stabiler ist als alle anderen möglichen Umwandlungsprodukte des α -Amino-alkohols. Die Erfüllung dieser Stabilitätsbedingung hängt u. a. von der Wechselwirkung zwischen der Alkylidenbrücke und der involvierten Peptidstruktur ab. Abschätzbar ist diese Wechselwirkung kaum, es sei denn bei Peptiden mit starren Bauelementen in der Nähe der Brücke, wie z. B. im Fall des prolinhaltigen N,N'-Äthylidenpeptids **1b** und des (N,N'-Isopropyliden-prolyl-leucyl)-glycinamids **4c** von *Du Vigneaud* [4]. Am *Dreiding*-Modell des letzteren mit geminalen Methylgruppen am Alkylidenkohlenstoff erkennt man eine gegenseitige Behinderung zwischen dem *endoständigen* δ -Wasserstoff am L-Prolinring und der *endoständigen* Methylgruppe am Alkylidenkohlenstoff. Diese Behinderung dürfte die erwähnte Hydrolyseempfindlichkeit gerade dieser Substanz hinreichend erklären. Übertragen auf **1b** mit nur einer brückenständigen Methylgruppe heisst dies, dass von den beiden möglichen Epimeren eines, nämlich jenes mit der *endoständigen* Methylgruppe, ähnlich empfindlich sein muss wie **4c**, und dass deshalb im Gleichgewicht nur die andere Form,

⁸⁾ Eine Primärreaktion zwischen Carbonylverbindung und Peptidstickstoff ist unter unseren Bedingungen unwahrscheinlich. Sie erfordert ein stärker alkalisches Milieu, die entstehenden «Carbinolamide» scheinen aber nicht zur Weiterkondensation befähigt zu sein [11].

nämlich jene mit der *exoständigen* Methylgruppe zu erwarten ist. Wie bereits dargelegt, bestätigt das Experiment diese Schlussfolgerung insofern, als **1b** tatsächlich in nur einer Form, vermutlich *exo* **1b** auftritt. Die Bildung von N,N'-Alkylidenpeptiden beschränkt sich offensichtlich nicht auf die in der Literatur genannten Sonderfälle. Unter geeigneten Voraussetzungen ist wohl jede Peptidkette zu derart stabilisierter und gleichwohl reversibler N-terminaler Verknüpfung mit Carbonylverbindungen fähig. Dieser Tatbestand beinhaltet sowohl unter peptidsynthetischen als auch biochemischen Gesichtspunkten eine Bereicherung der reaktiven Möglichkeiten von Peptiden und Proteinen. Zur Illustration verweisen wir lediglich auf *Du Vigneaud's* Idee, den N,N'-Isopropylidenrest als reversible Aminoschutzgruppe zu verwenden [14], oder auf die aktuelle Problematik im Zusammenhang mit dem Chemismus der zahlreichen Assoziate zwischen Carbonylverbindungen und Proteinen.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds und der CIBA-GEIGY AG., Basel, für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Zur *Dünnschichtchromatographie* (DC.) diene «Kieselgel G nach Stahl» (mit Fluoreszenzindikator) der Fa. Merck mit den Fließmitteln (Angaben in Volumteilen): A = Chloroform/Methanol 8:2, B = Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser 150:20:6:11, C = Diäthylketon/Pyridin/Ameisensäure/Wasser 65:18:11:6, D = Chloroform/Aceton 7:3 und E = Petroläther (40–60°)/Äther 7:3.

Die Revelation der Substanzen auf den Platten erfolgte mit UV.-Licht, Ninhydrinreagens [15] oder *Reindel-Hoppe*-Reagens [15].

Zur *Säulenchromatographie* (SC.) diene «Kieselgel 0,05–0,2 mm» (*Merck*). Die freien und geschützten Peptidester wurden durch Chloroform/Methanol oder Äthanol cluiert. Zur Elution mit linearen Konzentrationsgradienten benützten wir die einfache Anordnung nach [16]. Der Gang der Auftrennung wurde durch UV.-Absorbionsmessung bei 254 nm verfolgt.

Zum *Nachweis der Alkylidengruppe* wurden ca. 1 mg N,N'-Alkylidenpeptid mit 0,1 ml Reagens (0,25 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0,6 ml 6N HCl gelöst und mit 25 ml Methanol verdünnt) in der zugeschmolzenen Kapillare während einer Stunde bei 110° erhitzt. Proben (2 μ l) dieser Lösung, des Reagens, sowie von Lösungen authentischer 2,4-Dinitrophenylhydrazone wurden mittels DC. verglichen. (Nachweis mit UV.-Licht oder Besprühen mit 0,2proz. Kaliumhexacyanoferrat in 2N HCl.) Rf. = E/0,26 (Formaldehyd-DNPH); E/0,33 (Acetaldehyd-DNPH); E/0,42 (Aceton-DNPH).

Zur *quantitativen Bestimmung der Alkylidengruppe* wurden ca. 1 μ Mol des N,N'-Alkylidenpeptids in einer kleinen Destillationsapparatur mit ca. 12 ml Wasser unter Rückfluss erhitzt, danach 10 ml des Destillats in einem eisgekühlten Messkolben aufgefangen. Im Destillat konnte Aceton nach [17], Acetaldehyd und Formaldehyd nach [18] spektrophotometrisch bestimmt werden. Die spez. Drehungen $[\alpha]_D$ wurden im *Perkin-Elmer-141*-Polarometer und sind auf $\pm 2^\circ$ genau gemessen.

Synthesen der N,N'-Alkylidenpeptide.

Methode A: 1 g Peptidester wird im Gemisch von 0,1 g Pd/C (10proz.), 2 ml Triäthylamin und 20 ml Methanol oder Äthanol unter Durchleiten von Luft am Rückfluss erhitzt. Nach einigen Stunden filtriert man vom Katalysator ab und dampft i. V. (40°) zur Trockne ein.

Methode B: 1 g Peptidester wird in 20 ml Äthanol gelöst und mit einem einfachen Überschuss von Acetaldehyd (dest., Sdp. 20°) oder Formalin (38proz.) versetzt. Nach einigen Stunden bei 40° filtriert man und dampft i. V. ein.

Methode C (nach *Du Vigneaud* [4]): 1 g Peptidester wird in 20 ml Aceton gelöst und einige Stunden bei 50° gehalten. Man filtriert und dampft i. V. zur Trockne ein.

Ausgangsmaterialien: Peptidester: **1**, Smp. = 152–153°, $[\alpha]_D = -48^\circ$ ($c = 0,4$ in Methanol), Rf. = A/0,43, B/0,36, C/0,10; **2**, Smp. = 98–99°, $[\alpha]_D = -40^\circ$ ($c = 0,5$ in Methanol), Rf. = A/0,29, B/0,08, C/0,18; **3**, Smp. = 137–139°, $[\alpha]_D = -51^\circ$ ($c = 0,5$ in Methanol), Rf. = A/0,42, B/0,04, C/0,13 wurden bei CIBA-GEIGY AG., Basel (vgl. ³) nach *Schwyzler* [2] hergestellt. Wir danken für die Überlassung dieser Substanzen.

1. $\left| \begin{array}{c} \text{CHR}' \\ \text{Pro} \end{array} \right| \text{Leu-Glu(OBu)}^t\text{-Phe-OBu}^t, (R = \text{CH}_3) \mathbf{1b}.$

1.1. 500 mg **1** wurden nach Methode A in Äthanol umgesetzt (2 Std.). SC. an Kieselgel mit Chloroform/Methanol 99:1 ergab 380 mg (73%) **1b** als farblosen Sirup, welcher nicht zur Kristallisation gebracht wurde. $[\alpha]_D^{24} = -42 \pm 2^\circ$ ($c = 0,6$ in Methanol), Rf. = A/0,62, B/0,78, D/0,31. IR. (Chloroform): u.a. Banden bei 3400 und 3500 verringert (NH), 1730 (C=O, Ester), 1680 (Amid-I), 1500 verringert (Amid-II). NMR. (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,96$ ($d, J = 6$ Hz) und $0,92$ ($d, J = 6$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $1,32$ ($d, J = 7$ Hz, $\text{N, N}'\text{-CH-CH}_3$), $2,54$ ($q, J = 4$ Hz) und $3,22$ ($q, J = 4$ Hz, $-\text{CH}_2-$ von Prolin), $3,07$ ($d, J = 7$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$), $3,9$ ($m, \alpha\text{-CH}$ von Prolin), $4,36$ ($q, J = 7$ Hz, $\text{N, N}'\text{-CH-CH}_3$), $4,2\text{-}4,8$ ($m, 3\text{H}$ an $\alpha\text{-C}$), $6,74$ ($d, J = 8$ Hz, $-\text{NH-}$), $7,2$ ($m, 5$ arom. H, 1 NH), $1,5\text{-}2,4$ (m , restliche CH). MS. (vgl. Fig. 1).

Acetaldehyd im Dampfdestillat: 93% d.Th.

Aminosäureanalyse: Pro 0,97, Leu 1,03, Glu 0,93, Phe 1,00.

1.2. 500 mg **1** wurden nach Methode B mit 68 mg Acetaldehyd während 8 Std. umgesetzt. SC. wie oben ergab 410 mg (79%) **1b** als farblosen Sirup. $[\alpha]_D^{24} = -41^\circ$ ($c = 0,5$ in Methanol. Rf.-Werte, IR., NMR.- und Massenspektrum identisch mit dem nach 1.1. gewonnenen Produkt.

2. $\left| \begin{array}{c} \text{CHH}' \\ \text{Pro} \end{array} \right| \text{Leu-Glu(OBu)}^t\text{-Phe-OBu}^t \mathbf{1d}.$

2.1. 100 mg **1** wurden nach Methode A in Methanol während 4 Std. umgesetzt. Bei der SC. an Kieselgel konnten mit 200 ml Chloroform, 200 ml Chloroform/Äthanol 99:1 und 400 ml Chloroform/Äthanol 98:2 zuerst 18 mg **1b** (17%), dann 70 mg **1d** (69%) cluiert werden. Smp. = 138-139° (aus Methanol/Wasser), $[\alpha]_D^{24} = -23^\circ$ ($c = 0,4$ in Methanol), Rf. = A/0,60, B/0,75, D/0,16. IR.-Spektrum (in Chloroform): weitgehend identisch mit dem Spektrum von **1b**. NMR. (100 MHz, CDCl_3): u.a. Signal bei $\delta = 4,60$ ($d, J = 9$ Hz, $\text{N, N}'\text{-CH}_2$). MS.: $M^+ = 628$, im übrigen ist das Spektrum homolog (um -14 m/e) zu demjenigen von **1b**, Fig. 1.

Aminosäureanalyse: Pro 0,96, Leu 1,08, Glu 0,94, Phe 1,00.

2.2. 200 mg **1** wurden mit 0,050 ml Formalin (38proz., entsprechend 20 mg Formaldehyd) nach Methode B in Methanol während 2 Std. umgesetzt. SC. an Kieselgel mit Chloroform/Äthanol 99:1 ergab 184 mg (90%) **1d**. Smp. = 138-139°, $[\alpha]_D^{24} = -24^\circ$ ($c = 0,4$ in Methanol). Rf.-Werte, IR.- und NMR.-Spektrum identisch mit dem nach 2.1. gewonnenen Produkt. Versuche zur Hydrolyse: 10 mg **1d** blieben beim Kochen (2 Std.) in Wasser oder Wasser/Äthanol unverändert.

3. $\left| \begin{array}{c} \text{CHR}' \\ \text{Val} \end{array} \right| \text{His-Pro-Phe-OMe}, (R = \text{CH}_3) \mathbf{2b}.$

3.1. 500 mg **2** wurden während 6 Std. nach Methode A in Methanol umgesetzt. SC. des stark verfärbten Rohproduktes an Kieselgel mit 800 ml eines linearen Gradienten von 5-15% Methanol in Chloroform ergaben 290 mg (55%) **2b**, welches sich mittels DC. (am besten im Fliessmittel B) zu ungefähr gleichen Teilen in die Isomeren **2β** und **2β'** aufzutrennen liess. Das nach dem Abdampfen erstarrte Produkt schmolz unscharf bei 98-102°, $[\alpha]_D^{24} = -96^\circ$ ($c = 0,6$ in Methanol), Rf. **2β** = A/0,49, B/0,29, C/0,35, Rf. **2β'** = A/0,56, B/0,34, C/0,42. IR.-Spektrum (CHCl_3): u.a. Banden bei 3400, 3240 verringert (NH), 1740 (C=O, Ester), 1680 (Amid-I), 1510 verringert (Amid-II), 1440.

Acetaldehyd im Dampfdestillat: 95% d.Th.

Aminosäureanalyse: Val 0,98, His 0,97, Pro 1,05, Phe 1,00.

3.2. 1 g **2** wurden mit 80 mg Acetaldehyd in 20 ml Wasser bei Zimmertemperatur während 24 Std. stehen gelassen, filtriert und i.V. mehrmals unter wiederholter Zugabe von Benzol und absolutem Äthanol eingedampft. SC. des fast farblosen Rohproduktes auf Kieselgel wie unter 3.1. ergab 610 mg (58%) **2b**, welches beim Abdampfen erstarrte. Smp. = 100-102°, $[\alpha]_D^{24} = -102^\circ$ ($c = 0,6$ in Methanol). Rf.-Werte, IR.-Spektrum identisch mit dem nach 3.1. hergestellten Produkt.

Acetaldehyd im Dampfdestillat: 99% d.Th.

Äthanol oder Methanol anstelle von Wasser als Lösungsmittel verwendet, führte zu stark gefärbten Rohprodukten, welche grössere Anteile an diversen Nebenprodukten enthielten (DC.).

4. $\left| \begin{array}{c} \text{CHR}' \\ \text{Val} \end{array} \right| \text{Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe}, (R = \text{CH}_3) \mathbf{3b}$

4.1. 1 g **3** werden während 6 Std. nach Methode A in Methanol umgesetzt. SC. von 500 mg des gelb verfärbten Rohproduktes auf Kieselgel ergaben insgesamt 420 mg (85%) **3b**. Kontrolle

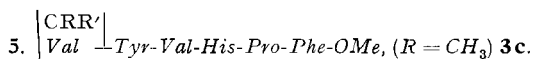
der Fraktionen mittels DC. (Fließmittel C) zeigte, dass bei der SC. eine teilweise Auftrennung der Isomeren erfolgte; es konnten abgetrennt werden: 20 mg (5%) **3 β** , 180 mg (43%) **3 β'** und 220 mg Gemisch **3b**. Die beim Abdampfen erstarrten Substanzen schmolzen unscharf bei 125–130°. **3 β** unterschied sich von **3 β'** in folgenden Daten: $[\alpha]_D^{24}$ **3 β** = -85° , **3 β'** = -82° (beide $c = 0,5$ in Methanol), Rf **3 β** = C/0,31, Rf **3 β'** = 0,38. IR.-Spektrum (CHCl₃) von **3 β** und **3 β'** identisch: u.a. Banden bei 3400 verringert, 1740 (C=O, Ester), 1670 (Amid-II), 1520 (Amid-II) verringert, 1440.

Acetaldehyd im Dampfdestillat: für **3 β** 96% d. Th., für **3 β'** 98% d. Th.

4.2. 1 g **3** wurden nach Methode B mit 112 mg Acetaldehyd in Äthanol während 12 Std. umgesetzt. SC. auf Kieselgel mit Chloroform/Methanol ergab 770 mg (80%) farbloses **3b**, welches laut DC. noch kleine Anteile an unpolaren Verunreinigungen enthielt. 350 mg davon, nochmals der SC. mit 800 ml eines linearen Gradienten von 5–15% Methanol in Chloroform unterworfen, ergaben 214 mg **3b** = Gemisch von **3 β** und **3 β'** ca. 1:1. Das erstarrte Material schmolz unscharf bei 130–132°, $[\alpha]_D^{24} = -87^\circ$ ($c = 0,5$ in Methanol), DC. und IR.-Spektrum identisch mit dem nach 4.1. hergestellten Produkt.

Acetaldehyd im Dampfdestillat: 98% d. Th.

Aminosäurenanalyse: Val 2,06, Tyr 0,85, His 0,98, Pro 0,97, Phe 1,00.



500 mg **3** wurden nach Methode C während 6 Std. mit Aceton umgesetzt. SC. auf Kieselgel mit Chloroform/Methanol ergab 320 mg (68%) **3c**, welches beim Eindampfen erstarrte. Smp. unscharf 120–130°. $[\alpha]_D^{24} = -68^\circ$ ($c = 0,5$ in Methanol), Rf. = A/0,51, B/0,35, C/0,40. IR.-Spektrum weitgehend identisch mit demjenigen von **3b**.

Aceton im Dampfdestillat: 97% d. Th.

Ein Oxalat schmolz bei 164–165° (aus Äthanol).

Formaldehyd und Acetaldehyd aus Triäthylamin und Methanol, bzw. Äthanol mit Pd-Kohle und Luftsauerstoff.

1. Eine Druckflasche (500 ml) enthaltend: 20 ml = 15,8 g (0,50 Mol) Methanol p.a., 100 mg Pd/C (10proz.), 1 ml = 0,73 g (7,2 mMol) Triäthylamin p. a. und ca. 480 ml Luft (ca. 4,5 mMol O₂) wurde verschlossen im Wasserbad von 60° mit einem Magnetührstab gerührt. Nach 4 Std. kühlte man in Eiswasser, filtrierte das gelb verfärbte Reaktionsgemisch vom Katalysator ab und füllte bis 25 ml mit Methanol auf. 1 ml des Filtrats wurden zusammen mit 2 ml 2N Schwefelsäure und 10 ml Wasser destilliert und das Destillat (ca. 9 ml) mit Wasser auf 10 ml ergänzt. 0,25 ml des Destillats enthielten 0,098 μ Mol Acetaldehyd (Bestimmung nach [18]). 2,0 ml des Destillats enthielten 0,67 μ Mol Formaldehyd (Bestimmung nach [18]). Im ganzen Ansatz hatten sich demnach ca. 10^{-4} Mol Acetaldehyd sowie ca. $0,8 \cdot 10^{-4}$ Mol Formaldehyd gebildet.

2. Dieselben Versuchsbedingungen wie unter 1., jedoch mit 20 ml (0,35 Mol) Äthanol (95proz., Uvasol Merck) anstelle des Methanols ergaben 25 ml eines farblosen Filtrats. 1 ml des Filtrats wurden genau wie unter 1. destilliert und das Destillat mit Wasser auf 10 ml ergänzt. 0,1 ml des Destillats enthielten 0,16 μ Mol Acetaldehyd. 5 ml des Destillats enthielten 0,029 μ Mol Formaldehyd. Im ganzen Ansatz hatten sich demnach ca. $4 \cdot 10^{-4}$ Mol Acetaldehyd sowie $3 \cdot 10^{-6}$ Mol Formaldehyd gebildet.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. Cardinaux & M. Brenner, in «Proceedings of the XIth European Peptide Symposium» (Northholland, Amsterdam), im Druck.
- [2] R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler B. Riniker & H. Zuber, Helv. 41, 1287 (1958); R. Schwyzer & P. Sieber, Helv. 49, 134 (1966).
- [3] IUPAC-IUB, J. biol. Chemistry 241, 2491 (1966).
- [4] V. J. Hruby, D. Yamashiro & V. du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. 90, 7106 (1968).
- [5] Osamu Shimomura, Nippon Kagaku Zasshi 81, 1434 (1960); Chem. Abstr. 56, 7299h; P. A. S. Smith, «The Chemistry of Open Chain Organic Nitrogen Compounds», Benjamin Inc., New York 1965, p. 168.
- [6] W. G. Lloyd, J. org. Chemistry 32, 2816 (1967).
- [7] R. A. Jevussi, M. R. McCormick, Chem. Commun. 1969, 639.

- [8] G. A. Hardcastle, D. A. Johnson, C. A. Panetta, A. J. Scott & S. A. Sutherlands, J. org. Chemistry 31, 897 (1966); A. K. Durbin & H. R. Rydon, Chem. Commun. 1970, 1249.
 [9] C. A. Panetta & M. Pesh-Imam, J. org. Chemistry 37, 302 (1972).
 [10] Yoshiro Ogata & Atsushi Kawasaki in «The Chemistry of the Carbonyl Group», Hrsg. J. Zabicky, Interscience, London, Sidney, New York 1970, Vol. II, p. 14.
 [11] H. Fraenkel-Conrat & H. S. Olcott, J. Amer. chem. Soc. 70, 2673 (1948); H. Fraenkel-Conrat, M. Cooper & H. S. Olcott, J. Amer. chem. Soc. 67, 950 (1945).
 [12] H. Hellmann & G. Opitz, « α -Aminoalkylierung», Verlag Chemie, Weinheim 1960, p. 65.
 [13] R. D. Haworth, D. H. Peacock, W. R. Smith & R. Mac Gillivray, J. chem. Soc. 1952, 2972.
 [14] H. Takashima & V. du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. 92, 2501 (1969).
 [15] E. Stahl, «Dünnschichtchromatographie», Springer Verlag, Heidelberg 1966.
 [16] J. J. Wren, J. Chromat. 12, 32 (1963).
 [17] S. Bernisson, Anal. Chemistry 28, 1337 (1956).
 [18] R. Preussmann, H. Hengy, D. Luebbe & H. von Hodenberg, Analyt. chim. Acta. 41, 497 (1968).

25. Demethylierungen am Mesembrin

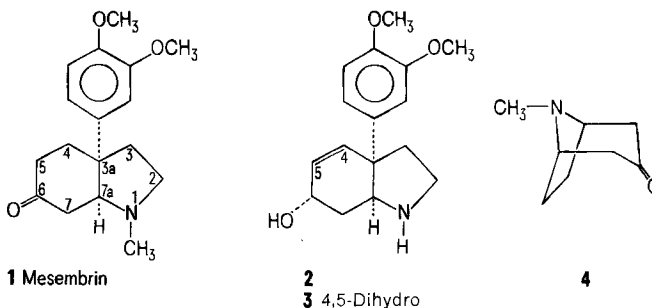
von P. Pfäffli und H. Hauth

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien, SANDOZ AG, Basel

(30. X. 72)

Summary. The N-methyl group of mesembrine (**1**) was split off *via* reaction of chloroformic acid *p*-nitrophenyl ester on the keto-protected alkaloid. O-Demethylation of **1** with borontribromide produced simultaneous ring closure between the carbonyl function and the aromatic part of the molecule.

Mesembrin (**1**), ein Octahydroindol-Derivat, ist das Hauptalkaloid von *Sceletium*-Arten wie *S. expansum*, *S. strictum* und *S. tortuosum* (Familie Aizoaceae) [1]. Obwohl dieses Alkaloid bereits 1914 isoliert wurde [2], erfolgte dessen Strukturklärung erst 1960 durch *Popelak et al.* [3]. In der Folge wurde eine Anzahl weiterer Octahydroindole isoliert, so u. a. auch die beiden N-demethylierten Alkaloide N-Demethyl-mesembrenol (**2**) und N-Demethyl-mesembranol (**3**) [4].



Eine eingehende synthetische Bearbeitung der Mesembrin-Alkaloide setzte 1968 ein [5] [6], vor allem im Hinblick auf ihre enge Verwandtschaft mit den auch von uns bearbeiteten Amaryllidaceae-Alkaloiden vom Typ Crinin. Lediglich *Taguchi et al.* [7]