

The energy of mixing is the *difference* of two experimental quantities, and in the present calculation, it was found that the error on U^e was about ± 2 J/mol, for all systems.

The results of Table 2 show a trend in the behaviour of the different systems, similar to earlier observations made for the mixtures of *n*-alkanes [12]: U^e is positive and it increases with the difference in size of the molecules.

The extension of an earlier theory [12] to the present case, was also attempted. It was assumed that the constants a_1 and a_2 in the *Van Laar-Lorentz* equation [8] could be written as $a_1 \approx n_1^2$ and $a_2 \approx n_2^2$, in the case of cycloalkanes. The calculated values of U^e showed only a semi-quantitative agreement with the experimental values for the 6 systems considered.

We wish to thank Prof. C. G. Boissonnas for his interest in the present work, and Dr. M. Steiger for technical advice.

REFERENCES

- [1] M. D. d'Almeida, Doctoral Thesis, Neuchâtel 1971.
- [2] M. D. d'Almeida, J. G. Fernandez-Garcia & C. G. Boissonnas, *Helv.* 53, 1389 (1970).
- [3] J. G. Fernandez-Garcia, H. F. Stoekli & C. G. Boissonnas, *Helv.* 49, 1983 (1966).
- [4] W. A. Duncan, J. P. Sheridan & F. L. Swinton, *Trans. Farad. Soc.* 62, 1090 (1966).
- [5] M. B. Ewing, B. J. Levien, K. N. Marsh & R. H. Stokes, *J. Chem. Thermodynamics* 1970, 689.
- [6] J. S. Rowlinson, 'Liquids and Liquid Mixtures', Butterworth, London 1969.
- [7] A. G. Williamson 'An Introduction to Non-Electrolyte Solutions', Olivier and Boyd, Edinburgh and London 1967.
- [8] J. H. Hildebrand & R. L. Scott, 'Regular Solutions', Prentice Hall, Englewood Cliffs N.J. 1962.
- [9] S. E. Wood & J. A. Gray, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 3729 (1952).
- [10] G. C. Benson & J. Singh, *J. Phys. chem.* 72, 1345 (1968).
- [11] 'The Handbook of Physics and Chemistry', The Chemical Rubber Co, Cleveland 1970.
- [12] H. F. Stoekli, J. Fernandez-Garcia, C. G. Boissonnas, *Trans. Farad. Soc.* 62, 3044 (1966).

258. Zur Kontrolle von Solid-phase Peptidsynthesen durch Eluat-Chloridbestimmung

von Peter Fankhauser, Peter Fries und Max Brenner

Institut für Organische Chemie, Universität Basel

(10. IX. 73)

Summary. The origin of chloride ion in chloroform and methylene chloride solutions of tertiary amines is studied. The applicability of such solutions in the analytical control of solid-phase peptide synthesis must be seriously questioned. An alternative procedure, amenable to automation, is suggested.

Zur quantitativen Analyse auf freie Aminogruppen harzfixierter Peptide (Resinopeptide¹⁾) wird oft die Titration des basisch aus den Resinopeptid-hydrochloriden eluierbaren Chlorids herangezogen. Die Methode erlaubt einerseits die direkte Erfassung der bei Deblockierung gebildeten Hydrochloride, andererseits allgemein nach dem

¹⁾ Als Resinopeptid bezeichnen wir die Gesamtheit des harzfixierten Peptidmaterials [2].

Verfahren von *Dorman* [1] die Bestimmung freier Aminogruppen. Als Alternative zu dem von *Dorman* verwendeten, als Quellmittel für DVB-vernetztes Polystyrol angeblich wenig geeigneten Dimethylformamid haben sich heute als Lösungsmittel für das Triäthylamin (TÄA) weitgehend Chloroform (LM 1) und Methylenchlorid (LM 2) durchgesetzt. Nun wird aber erfahrungsgemäss infolge des in solchen Lösungen stets in wenig reproduzierbarer Konzentration vorhandenen freien Chlorids (gleitender Blindwert) die Relevanz der gefundenen Titrationsdaten in Frage gestellt.

Zur Klärung der Herkunft dieses Chlorids wurden 10proz. (v/v) TÄA-Lösungen in LM 1 und LM 2 bereitet und diese in bestimmten Zeitabständen auf ihren Chloridgehalt analysiert. Neben je sechs Handelsqualitäten sind auch speziell aufbereitete Proben in die Untersuchung einbezogen worden, nämlich CaCl_2 -behandeltes und anschliessend destilliertes LM 1²⁾, über Molekularsieb (4 Å, *Union Carbide*) oder basisches Aluminiumoxid (*Woellm*) filtriertes LM 2 und schliesslich LM 1, das mit Calciumchlorid und Aluminiumoxid behandelt worden war.

Chlorid in TÄA/LM 1 ist auf a priori im LM 1 vorhandene Zersetzungsprodukte und schlecht definierbare TÄA-bedingte (?) Zersetzungsreaktionen zurückzuführen. Wir vermuten dies wegen dem unmittelbar nach der Herstellung der Lösung reichlich vorhandenen Initialchloridgehalt, wegen der je nach LM-Qualität unterschiedlichen Chlorid-Bildungsgeschwindigkeit und deren Lichtabhängigkeit, sowie wegen der stets parallel zu hohem Chloridgehalt auftretenden Braunfärbung. Der Initialchloridgehalt (mVal/l) lag zwischen 0,5 und 5; die kleinsten Werte ergab eine Handelsqualität «für Bestimmungen mit Dithizon». Vorbehandlung mit Calciumchlorid erhöhte niedrige Initialchloridgehalte (0,5–1) bis auf etwa 4; nach zusätzlicher Filtration über Aluminiumoxid resultierten Höchstwerte von 4–5. Nach neun Tagen besaßen am Tageslicht gelagerte Lösungen einen Chloridgehalt zwischen 6 und 30, dunkel gelagerte einen solchen zwischen 0,5 und 20. Lösungen in stabilisiertem LM 1 (2% Äthanol oder 1% Petroläther) zeigten die geringste Lichtempfindlichkeit. Ein Zusammenhang mit dem wechselnden Alkoholgehalt der Handelsqualitäten war bei Dunkellagerung nicht festzustellen, wohl aber wiesen Lösungen in mit Calciumchlorid vorbehandeltem LM 1 wiederum am meisten Chlorid auf. Begasung mit Sauerstoff hatte im Dunkeln bei Zimmertemperatur nur geringen Einfluss. Bei 70° dagegen brachte Sauerstoff den Chlorid-Gehalt auf 20–240 mVal/l wobei auch jetzt die höchsten Werte bei mit Calciumchlorid vorbehandeltem Lösungsmittel gefunden wurden.

Das freie Chlorid in TÄA/LM 2 entsteht stöchiometrisch unter Quaternisierung von TÄA zum Chlormethyl-triäthylammoniumkation, vgl. 1. Schon *Wright & Wulff* haben diese Reaktion im Zuge spektroskopischer Arbeiten beobachtet und auch das quaternäre Chlorid 1 in geringer Menge isoliert [3]. Die Bildungsgeschwindigkeit ist nach unseren Befunden sowohl von der LM-Qualität als auch von der Belichtung unabhängig. Eine Beziehung zwischen Verfärbungen und Chloridgehalt besteht nicht. Das Initialchlorid liegt bei Verwendung von destilliertem, Molekularsieb-getrocknetem LM unter 0,1. Die Kinetik der Quaternisierung ist recht komplex. Sowohl die Initial- als auch die über vier Wochen gemittelte Geschwindigkeit betragen bei 25° in 10proz. (v/v) Lösungen etwa 0,6 mmol/h · l. Bei 70° ist die Umsetzung mit einem Grenzgehalt 725 in einigen Tagen praktisch vollständig. Aus allen Ansätzen lässt sich eine dem Chlorid entsprechende Menge an 1 isolieren.

Um abzuklären, ob im Zuge von Solid-phase Synthesen mit einer Beeinflussung der Chloridbildung durch die Trägermatrix oder durch fixierte, aus Nebenreaktionen stammende Ammoniumgruppierungen zu rechnen ist, sind einige zugesetzte Stoffe auf katalytische Effekte überprüft worden. 0,025 M Benzyl-trimethyl-ammoniumhydroxid beschleunigt die Chloridbildung um einen Faktor 2,2; 0,025 M Benzyl-trimethyl-ammoniumchlorid, 20 mVal/l Dowex-1 in der Chlorid- oder Hydroxidform, sowie 10 g/l BOC-Glycyl-Polystyrol 2% DVB sind ohne messbare Wirkung. – Der beobachtete Quaternisierungstyp sollte sich nach [4] nicht auf TÄA beschränken. In der Tat

²⁾ Alkohol in der Triäthylaminlösung kann durch Umesterung Peptidablösung vom Trägerharz bewirken.

bildet das peptidchemisch oft verwendete N-Methylmorpholin in 10proz. Lösung das N-Chlor-methyl-N-methyl-morpholiniumchlorid **2**. Die Initialgeschwindigkeit beträgt bei 25° aber nur etwa 0,12 mmol/h · l; die durchschnittliche Bildungsgeschwindigkeit ist noch etwas geringer. Nach einigen Tagen beginnt die Kristallisation von **2**. Auch Pyridin/LM 2 1:9 wird quaternisiert und zwar zum Methylen-bis-pyridiniumchlorid **3**. Ein entsprechendes Disubstitutionsprodukt war aus **1** oder **2** auch in Gegenwart überschüssigen Amins nicht erhältlich. Die Initialgeschwindigkeit fällt bei **3** weiter auf 0,04 mmol/h · l; infolge seiner Schwerlöslichkeit beginnt **3** schon nach einigen Std. zu kristallisieren. Weil unter Lufteinwirkung (Oxydation zu Phosgen u.a.m.) die Bildungsgeschwindigkeiten von Zersetzungschlorid, von **2** und von **3** von der gleichen Grössenordnung sind, können die reinen Salze nur unter Luftausschluss mühelos isoliert werden.

Eine zuverlässige Kontrolle über den Verlauf von Peptidsynthesen auf Trägerharzen verlangt auf jeder Stufe die Möglichkeit zur analytischen Unterscheidung zwischen 99 und 100% Umsatz. Man muss also die Differenz zwischen sogenannter Total- und Rest-Beladung, z. B. den Aminogruppengehalt vor und nach einer Acylierungsoperation, mit einem maximalen Fehler von 0,5% erfassen können. Bei einer Ansatzgrösse von 1 g Trägerharz, einer Peptidbeladung von beispielsweise 1 mmol/g Harz und einem Eluatvolumen von 3×20 ml (Minimalannahme) lässt diese Forderung dem Analysenverfahren nur noch Raum für einen jeweiligen Chlorid-Anzeigefehler von höchstens $\pm 60 \mu\text{Val/l}$ Eluat! Titrat-Konzentration, Büretten, Titiergefäss und Messkette sind entsprechend anzupassen. Bei Verminderung der Ansatzgrösse vermindert sich auch bei proportionaler Einsparung an Elutionsmittel der zulässige absolute Maximalfehler natürlich im selben Verhältnis. Es muss dann, was manchmal übersehen wird, gegebenenfalls eine kritische Neuanpassung der Versuchsanordnungen erfolgen. Chlorid-Blindwerte infolge von eingeschlepptem Chlorid sind nur tolerierbar, wenn sie im Rahmen des zulässigen Anzeigefehlers konstant bleiben.

Hieraus folgt für die Praxis:

1. Vorratslösungen von Triäthylamin in Chloroform bester Qualität sind zulässig, vorausgesetzt, dass auf Vorbehandlung mit Calciumchlorid verzichtet, Lichteinwirkung ausgeschlossen und häufig eine Blindwertkontrolle vorgenommen wird.

2. Vorratslösungen in Methylenchlorid, wie sie üblich in Syntheseautomaten verwendet werden, sind unzulässig. Bereits eine Stunde nach Blindwertbestimmung übertrifft der tatsächliche Chloridgehalt den Bestimmungswert um ein Vielfaches des zulässigen Bestimmungsfehlers. Mit Unsicherheiten in der Grössenordnung von 5–10% ist auch bei sorgfältigster Arbeitsweise zu rechnen.

3. Auch bei manuellen Einzelanalysen unter Verwendung frisch bereiteter Triäthylamin/Methylenchlorid-Gemische verlangt eine Genauigkeit von 5% in 10 g -Ansätzen eine Blindwertbestimmung mit Zeitkorrektur, die auch noch die Chloridbildung während der Titration zu berücksichtigen hat. Eine Genauigkeit von 1% ist unter vertretbarem Aufwand nicht mehr erreichbar.

4. Der hohe Chloridgehalt in gealterten Lösungen kann indirekt auch andere Analysenverfahren stören. So wird beispielsweise bei der Bestimmung freier Aminogruppen durch Photometrie von Amin-eluierbarer Pikrinsäure aus Resinopeptidpikrat nach *Gysin* [5] auch nicht-peptidisch fixiertes Pikrat erfasst, wenn dieses gegen Chlorid in der Eluierlösung austauschbar ist. Dieser Fall ist z. B. gegeben, wenn das Trägerharz infolge von Nebenreaktionen quaternäre Benzylammoniumgruppen akkumuliert [6].

In Anbetracht der entscheidenden Rolle, welche der Analytik bei der Beurteilung von Festphasensynthesen zukommt [2], und der prinzipiellen Schwierigkeiten, welche mit der Festphasenanalytik verbunden sind [2], sollten zusätzliche durch das Analyseverfahren selbst bedingte Erschwerungen nicht in Kauf genommen werden. Eine Vermeidung der oben diskutierten Unzulänglichkeiten drängt sich auf. In der Tat kann durch Verwendung von halogenfreien Mischungen, welche genügendes Lösungsvermögen für Aminhydrochloride und geeignetes Quellungsvermögen für das Trägerharz besitzen, die Lösungsinstabilität als Fehlerquelle eliminiert werden. Zugleich erleichtert der Wegfall von Fremdchlorid die Automatisierbarkeit der Prozessanalytik. So ist in unserem Laboratorium eine Einrichtung für voll automatisierte Eluat-Analytik entwickelt worden, die mit Dioxan/*t*-Butylalkohol 2:1 (v/v) als Waschlösungsmittel und Dioxan/*t*-Butylalkohol/Triäthylamin 6:3:1 (v/v/v) als Elutionsreagens arbeitet und sich bisher gut bewährt hat. Alle interessierenden Eluate aus dem Syntheseautomaten (Waschlösungen vor der TAA-elution, TAA-eluate, Nachspül-Lösungen) werden in dasselbe Gefäss mit vorgelegter verdünnter Salpetersäure eingeleitet. Die Lösung in diesem Gefäss wird durch Zugabe von 0,1N AgNO₃-Lösung aus einer automatischen Bürette auf einem konstanten elektrochemischen Potential gehalten und der AgNO₃-Verbrauch wird laufend registriert. Diese praktisch wartungsfreie Einrichtung bestimmt den Eluat-Chloridgehalt mit der oben verlangten Genauigkeit, obwohl infolge starker Verdünnung (das Volumen des Titrationsgefässes muss alle Eluate eines Synthesecyclus auffangen) die maximal erzielbare Genauigkeit nicht voll ausgenutzt wird. Für kleine Restbelastungen kann der Erfassungsbereich durch sorgfältige Einzeltitration der Eluate um eine Grössenordnung nach unten erweitert werden. Inwiefern solche Einzeltitrationen die Aussagekraft der Analyse im Sinne einer schärferen Produktkontrolle erhöhen, ist von Fall zu Fall unter zusätzlichen Erwägungen [2] zu entscheiden. Eine ausführliche Veröffentlichung dieser Methodik ist in Vorbereitung.

Die vorliegende Arbeit wurde vom *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* (Projekt Nr. 2.410.70) unterstützt.

Experimenteller Teil

Alle Smp. sind korrigiert. Chloridbestimmungen: Alle Proben wurden mit etwa gleichen Volumina 10proz. aq. HNO₃ gemischt und in heterogener Mischung potentiometrisch mit 0,1N bzw. 0,01N AgNO₃ titriert. Elektroden: Ag und Hg/HgSO₄.

1. Weisse prismatische Nadeln aus Methylenchlorid/Petroläther, stark hygroskopisch, zerfl. an der Luft. Smp. 185° (Lit. [3]: 186°) Zers., nach Primär-Smp. bei 80° und anschliessender Neukristallisation. Leicht löslich in Wasser, Methanol, Äthanol, Eisessig, Chloroform; löslich in Methylenchlorid; unlöslich in Äther, Essigester, Petroläther, Benzol.

C ₇ H ₁₇ Cl ₂ N	Ber. C 45,17	H 9,21	N 7,53	Cl total 38,09	Chlorid 19,04%
(186,13)	Gef. „ 44,79	„ 9,56	„ 7,12	„ 37,2	„ 19,5 %

IR. (Methylenchlorid): 3650, 3350, 3020, 2950, 1615, 1470, 1395, 1355, 1260, 1180, 1170, 1150, 1095, 1035, 1005, 970, 935, 890, 795 cm⁻¹. – NMR. (CD₃)₂SO: 5,65 (2H, s, –CH₂Cl); 3,51 (6H, q); 1,28 (9H, t, CH₃–) [*J* = 7,5 Hz].

Pikrat: Smp. 230–231° (aus Wasser):

C ₁₃ H ₁₉ Cl N ₄ O ₇ (378,78)	Ber. C 41,22	H 5,06	N 14,79%	Gef. C 41,06	H 5,20	N 15,02%
---	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

2. (Vgl. [7]). Weisse pulverige Substanz, nimmt an der Luft Wasser auf, ohne das Aussehen zu verändern. Plättchen aus Methanol mit ca. 1 mol Kristallwasser. Zersetzt sich ungeschmolzen

oberhalb 240°. Leicht löslich in Wasser; wenig löslich in Methanol; unlöslich in Alkohol, Äther, Chloroform.

$C_{11}H_{12}Cl_2N_2$	Ber. C 54,33	H 4,97	N 11,52	Chlorid 29,16%
(243,17)	Gef. „ 54,35	„ 4,82	„ 11,22	„ 29,65%

Die Substanz enthält nach *Karl-Fischer*-Bestimmung 6,09% Wasser (Ber. für 1 mol: 6,89%); die Analysenwerte sind auf Trockengewicht korrigiert. – IR. (KBr): 3440, 3390, 3020, 2995, 2950, 2865, 1630, 1575, 1490, 1380, 1355, 1295, 1235, 1220, 1175, 1015, 840, 825, 780, 765, 690, 670, 565, 555, 470 cm^{-1} . – NMR. (D_2O): 9,6–8,2 (10 H, *m*, Pyridinreste); 7,48 (2 H, *s*, $-CH_2-$); 4,65 (*s*, H_2O , HDO).

Pikrat: Smp. 245° (aus Wasser), (Lit. [8] 245–249°).

3. Weisse rhombische Kristalle aus Äthanol/Äther, hygroskopisch. Smp. 184–185°. Leicht löslich in Wasser, Methanol; heiss löslich in Äthanol; unlöslich in Äther, Chloroform.

$C_6H_{13}Cl_2NO \cdot H_2O$	Ber. C 35,31	H 7,41	Chlorid 17,37%
(186,09)	Gef. „ 35,35	„ 7,54	„ 17,65%

IR. (KBr): 3430, 2980, 2870, 1465, 1425, 1410, 1350, 1285, 1260, 1230, 1200, 1115, 1050, 1035, 1015, 1000, 945, 895, 850, 825, 775, 705, 620, 505 cm^{-1} . – NMR. (CD_3)₂SO: 5,72 (2 H, *s*, $-CH_2Cl$); 3,81 (8 H, *m*, $-CH_2-CH_2-$); 3,30 (3 H, *s*, CH_3-).

Pikrat: Smp.: 230–231° (aus Wasser).

$C_{12}H_{16}ClN_4O_8$ (378,74) Ber. C 38,05 H 3,99 N 14,79% Gef. C 38,15 H 4,25 N 14,56%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. C. Dorman, *Tetrahedron Letters* 1969, 2319.
- [2] P. Fankhauser & M. Brenner, in A. Katsoyannis 'The Chemistry of Polypeptides', S. Plenum Publishing Corporation, New York, in press.
- [3] D. A. Wright & C. A. Wulff, *J. org. Chemistry* 35, 4252 (1970).
- [4] H. Böhme, M. Hilp, L. Koch & E. Ritter, *Chem. Ber.* 104, 2018 (1971).
- [5] B. Gisin, *Analyt. chim. Acta* 58, 248 (1971).
- [6] J. Rudinger, in H. C. Beyerman, 'Peptides 1966', S. 89, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1967.
- [7] K. G. Mizuch, N. M. Kasathin & Ts. M. Gel'fer, *Ž. obšč. Chim.* 27, 189 (1957).
- [8] L. C. King, *J. Amer. chem. Soc.* 70, 242 (1948).

259. Specifically $\pi \rightarrow \pi^*$ Induced Photoreactions of α, β -Unsaturated Ketones: Hydrogen Abstraction by the α -Carbon¹⁾

(Preliminary Communication)

by Jean Gloor, Gérald Bernardinelli, Raymond Gerdil, and Kurt Schaffner

Département de Chimie Organique, Université de Genève, 1211 Genève 4

(4. X. 73)

Summary. Irradiations at 254 nm of the α, β -unsaturated γ -dimethoxy-methyl ketone **7** in iso-octane and *t*-butyl alcohol afforded in a specifically $\pi \rightarrow \pi^*$ -induced process and in high chemical yield the epimeric products **9** and **10**. These products were not formed on $n \rightarrow \pi^*$ excitation of **7** at > 340 nm, but triplet energy transfer to 1,3-cyclohexadiene could be observed. Photolyses of the hexadeuterio analog **7-d₆** at 254 nm led to the fully deuterated products (*cf.* **9-d₆**) in both solvents, with stereospecific incorporation of a deuterium atom in position C(1 α). The structures

¹⁾ Presented at the VIIth International Conference of Photochemistry, Jerusalem, September 1973.