

- rich, E. Lederer, M. Winter & M. Stoll, *Helv.* 47, 1581 (1964); C. Weurman & C. de Rooij, *J. Food Sci.* 26, 239 (1961); J. P. Marion, F. Mügglér-Chavan, R. Viani, J. Bricourt, D. Raymond & R. H. Egli, *Helv.* 50, 1509 (1967); M. Stoll, P. Dietrich, E. Sundt & M. Winter, *Helv.* 50, 2065 (1967); I. Flament, B. Willhalm & M. Stoll, *Helv.* 50, 2233 (1967).
- [2] H. Lange & A. Fincke, *Handbuch für Lebensmittelchemie VI*, Springer Verlag, Berlin 1970, p. 232.
- [3] F. Bopp, *Liebigs Ann. Chem.* 69, 16 (1849).
- [4] E. Fischer, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 39, 2893 (1906).
- [5] T. Matoba & T. Hata, *Agric. biol. Chemistry* 36, 1423 (1972).
- [6] T. Shiba & K. Nunami, *Tetrahedron Letters* 1974, 509.
- [7] K. Takahashi, M. Tadenuma, K. Kitamoto & S. Sato, *Agric. biol. Chemistry* 38, 927 (1974).
- [8] N. Lichtenstein, *J. Amer. chem. Soc.* 60, 560 (1938).
- [9] A. B. Mauger, *J. chem. Soc. Chem. Commun.* 1971, 39.
- [10] R. A. W. Johnstone, T. J. Povalli & J. D. Baty, *J. chem. Soc. Chem. Commun.* 1973, 392.
- [11] P. Saint-Hilaire & J. Solms, *J. agric. Food Chemistry* 21, 1126 (1973).
- [12] A. Johannsen, P. Kollman, S. Rothenberg & J. McKelvey, *J. Amer. chem. Soc.* 96, 3794 (1974).
- [13] C. R. A. Boissonnas, *Helv.* 34, 874 (1951).
- [14] D. E. Nitecki, B. Halpern & J. W. Westley, *J. org. Chemistry* 33, 864 (1968).
- [15] E. Fischer & U. Zuzuki, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 37, 2842 (1904).
- [16] E. Fischer & H. Scheibler, *Liebigs Ann. Chem.* 363, 136 (1908).
- [17] E. Fischer & G. Reif, *Liebigs Ann. Chem.* 363, 118 (1908).
- [18] F. Wrede, L. Bruch & G. Feuerriegel, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 274, 63 (1933).
- [19] M. Bergmann & J. E. Tietzmann, *J. biol. Chemistry* 155, 535 (1944).
- [20] E. Fischer & E. Abderhalden, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 39, 752 (1906).
- [21] E. Fischer, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 39, 2893 (1906).
- [22] E. Fischer & W. Schöller, *Liebigs Ann. Chem.* 357, 1 (1907).
- [23] W. Schöller, *Doctoral Thesis Univ. Berlin*, 1906.
- [24] Th. Curtius & Goebel, *J. prakt. Chem.* 26, 175 (1882).
- [25] J. Preu, *Liebigs Ann. Chem.* 134, 372 (1865).
- [26] E. Erlenmeyer & A. Lipp, *Liebigs Ann. Chem.* 219, 179 (1883).
- [27] M. Bergmann & H. Ensslin, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 174, 76 (1928).
- [28] F. Reindel & W. Hoppe, *Chem. Ber.* 87, 1103 (1954).

116. Selektive Abspaltung säurelabiler Aminoschutzgruppen von Peptiden in Trifluoräthanol^{1) 2)}

von Bernhard Riniker, Bruno Kamber und Peter Sieber

Chemische Forschungslaboratorien der Division Pharma der CIBA-GEIGY AG., Basel

(25. III. 75)

Summary. In building up large polypeptides, it has become the established practice to use acide-labile protecting groups of the *t*-butyl type. Up to now, only one step of selectivity under acidic conditions has been used, consisting in the cleavage of Trt, Bpoc or Ppoc from N(α) without attacking the *t*-butyl protecting groups. We have found that the use of 90% trifluoroethanol as solvent permits the selective cleavage of Trt in the presence of Bpoc or Ppoc under controlled

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen an der Herbstversammlung der Schweiz. Chem. Gesellschaft in Lugano, 19.–20. Okt. 1973.

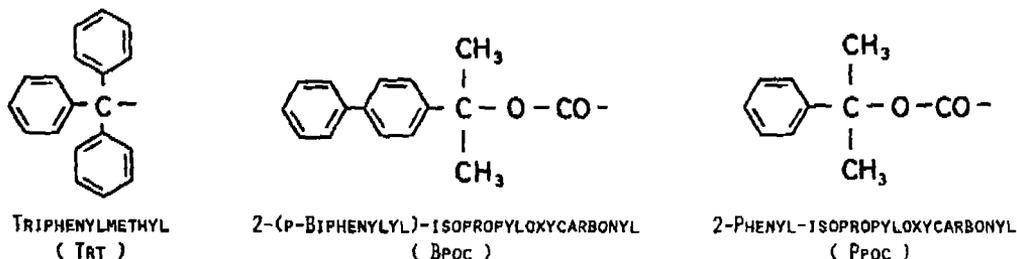
²⁾ Zu der hier verwendeten abgekürzten Schreibweise von Aminosäuren, Peptiden und deren Derivate vgl. [1]. Ferner bedeuten: Bpoc-: [2-(*p*-Biphenyl)-isopropyl]-oxycarbonyl, Ppoc-: [2-Phenylisopropyl]-oxycarbonyl, TFEt: 2,2,2-Trifluoräthanol.

acidolytic conditions. This additional selectivity-step may be utilized when two-chained polypeptides are to be constructed.

The procedure consists in acidolytic cleavage with hydrochloric acid at a constant potential as measured by the glass electrode (pH-stat). The automatic protonation of the freshly deprotected amino groups permits the evaluation of kinetic and quantitative data of the cleavage reaction. The selectivity ratios and cleavage conditions of Trt, Bpoc and Ppoc in N(α) are demonstrated here by reference to a series of model dipeptides. The successful application of this technique in the total synthesis of human insulin, a polypeptide with two peptide chains, has recently been described [8].

Zur Synthese von Peptiden hat sich die Verwendung säurelabiler Schutzgruppen vom *t*-Butyltyp (Boc, *t*-Butylester und *t*-Butyläther) bewährt. Diese können in der letzten Synthesestufe unter relativ milden Bedingungen abgespalten werden. Beim fragmentweisen Aufbau grösserer Polypeptide kann die Benzyloxycarbonylgruppe in N(α) häufig nicht verwendet werden, weil sie, in Anwesenheit schwefelhaltiger Aminosäuren, durch katalytische Hydrierung nicht abgespalten werden kann. Durch diesen Umstand wird die Anwendung von weiteren Schutzgruppen wünschenswert. Diese müssen in einem bestimmten Stadium der Synthese selektiv neben den vom *t*-Butylrest abgeleiteten Gruppen in einer besonders milden Acidolysstufe entfernt werden können. Der Trt-Rest an N(α) erfüllt diese Bedingung; er kann z. B. mittels Essigsäure [2] oder mit Pyridin-hydrochlorid in Methanol [3] eliminiert werden. Als weitere Schutzgruppen, die in diesem Sinn angewendet werden können, kommen noch einige Aralkyloxycarbonylreste in Betracht, unter welchen sich besonders die Bpoc- und Ppoc-Gruppen bestens eignen [4] [5]. Erstere ist in 80 proz. Essigsäure *ca.* 7mal, letztere *ca.* 30mal stabiler als Trt. Als N(α)-Schutzgruppen in Peptiden werden sie mit sehr guter Selektivität in Gegenwart von Schutzgruppen des *t*-Butyltyps entfernt.

Schema 1



Wir stellten fest, dass das Verhältnis der Labilitäten von Trt zu Bpoc oder Ppoc je nach dem zur Abspaltung verwendeten Milieu sehr unterschiedlich ist. Eine stark erhöhte Labilität der ersteren gegenüber den Urethantypen kann vor allem in TFEt beobachtet werden. Dieses Lösungsmittel wird infolge seiner hohen Ionisierungskraft, verbunden mit seiner sehr geringen Nucleophilie, für eine Vielzahl solvolytischer Prozesse bevorzugt angewendet [6] [7]. N(α)-Trt-Derivate von Peptiden werden in trifluoräthanolischer Lösung langsam gespalten. Wir benutzten diese Feststellung zur Ausarbeitung einer zusätzlichen acidolytischen Selektivitätsstufe. Sie kann zum Aufbau von zweikettigen Polypeptiden angewendet werden. So ist es z. B. möglich, in einem Polypeptid mit zwei verschiedenen α -Aminogruppen wahlweise

zuerst die eine und später die andere freizusetzen. Der weitere Aufbau der beiden Ketten kann dann getrennt erfolgen. Diese Methodik war ein wesentliches Merkmal der Totalsynthese von Insulin unter gezielter Bildung der Disulfidbrücken [8]³⁾.

Die mittels Glaselektrode gefundenen «pH»-Werte von Salzsäure in verschiedenartigen Lösungen sind in der Fig. dargestellt⁴⁾. Es fällt auf, dass das gemessene Poten-

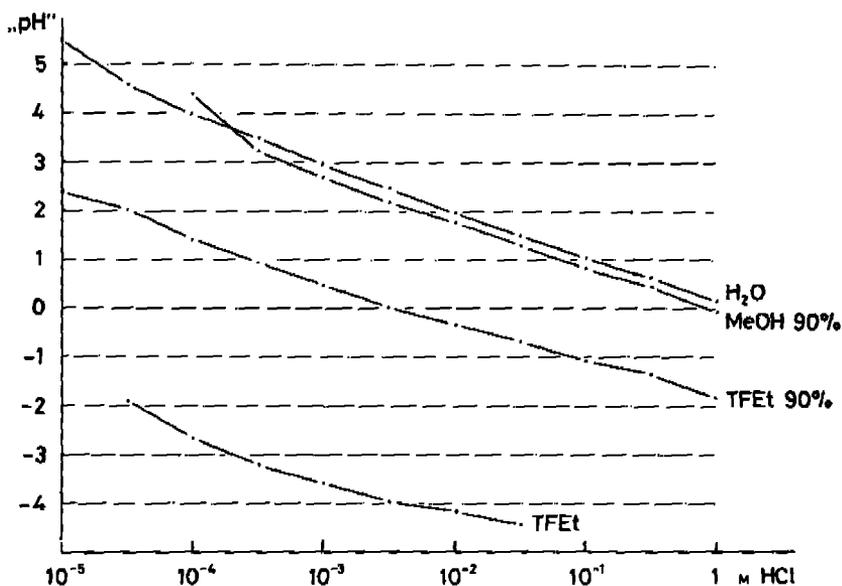


Fig. Mit der Glaselektrode gemessene «pH»-Werte von Salzsäure in verschiedenen Lösungsmitteln

tial sehr stark von der Art des Lösungsmittels abhängt. Im Gegensatz zu 90proz. Methanol (Methanol/Wasser 9:1, *v/v*), das nur eine geringfügige Abweichung gegenüber wässriger Lösung bewirkt, weist die gleichmolare Salzsäure in 90proz. TFet einen um *ca.* 2 bis 2½ Einheiten niedrigeren pH-Wert auf. Noch wesentlich stärker positive Potentiale, entsprechend tieferen «pH»-Werten, erhält man in reinem TFet, doch ist hier die Einstellung der Glaselektrode träge und schlecht reproduzierbar. Die im folgenden beschriebenen Resultate wurden alle im System Salzsäure/90proz. TFet erhalten. Es hat sich sowohl als Lösungsmittel für geschützte Peptide als auch wegen der raschen und gut reproduzierbaren Potentialeinstellung der Glaselektrode bestens bewährt. Falls nötig, kann zur Auflösung besonders lipophiler Verbindungen auch Chloroform (bis *ca.* 20% des Gesamtvolumens) angewendet werden. Zur Einhaltung genau kontrollierbarer Bedingungen ist die Verwendung eines pH-States notwendig. Die bei der Acidolyse freigesetzten α -Aminogruppen werden durch die automatische Zugabe von Salzsäure protoniert, und bei Verwendung eines Schrei-

³⁾ Die Lösung eines zweiten grundsätzlichen Problems bei der Insulinsynthese, nämlich die gezielte Bildung des Cystinringes A6-A11 in Gegenwart eines dritten Cysteinrestes (A7), verdanken wir ebenfalls den besonderen Eigenschaften von Trifluoräthanol.

⁴⁾ Zur Vereinfachung, sowie wegen des nicht streng und reproduzierbar definierten Potentials von Glaselektroden, werden in dieser Arbeit mit «pH» die beim Arbeiten in organischer Lösung auf der pH-Skala des Messgerätes abgelesenen Werte verwendet. Die Glaselektroden wurden wie üblich mittels wässriger Pufferlösungen geeicht.

bers wird durch Aufzeichnung des Säureverbrauches als Funktion der Zeit der Reaktionsverlauf graphisch festgehalten.

In *Tab. 1, 3* und *4* sind die aus den Reaktionskurven errechneten Geschwindigkeitskonstanten k_1 für 9 verschiedene, als Modelle gewählte Dipeptide aufgeführt. Die Acidolyse sowohl der Trt- als auch der Bpoc- und Ppoc-Schutzgruppen erwies sich über die gemessenen Zeiten und innerhalb der Messgenauigkeit als Reaktion 1. Ordnung. Die Versuche wurden ohne die für genaue reaktionskinetische Messungen notwendigen Massnahmen bei Raumtemperatur (22–28°) ausgeführt, so dass die angegebenen k_1 -Werte eine relativ grosse Fehlergrenze enthalten dürften. Die Halbwertszeiten sind bei den zur Abspaltung der Schutzgruppen jeweils geeigneten pH-Werten angegeben⁶⁾. Die Dipeptide wurden so gewählt, dass sie den gesamten Bereich an sterischer Beeinflussung der N(α)-Gruppe durch die Seitenkette der N-terminalen Aminosäure darstellen, von minimaler (Gly-Val) bis zur maximalen (Val-Val) sterischen Hinderung. Aus *Tab. 1* ist ersichtlich, dass diese Variation einen starken Einfluss auf die Acidolysegeschwindigkeit der Trt-Gruppe ausübt, dagegen bei den Bpoc- und Ppoc-Schutzgruppen kaum merkbar ist.

Klostermeyer & Schwertner [3] beobachteten bei der Abspaltung von Trt durch Pyridiniumsalze in Methanol ebenfalls einen beschleunigenden Einfluss mit steigender sterischer Hinderung durch die Aminosäureseitenkette und deuteten diesen Effekt im Sinne einer erschweren Alkylierungs-Rückreaktion. Bei der pH-Stat-Spaltung in 90proz. TFEt, wo unmittelbar Triphenylmethanol gebildet und die freigesetzte Aminogruppe protoniert wird, ist eine Rückreaktion nicht möglich. Wir nehmen daher an, dass die raschere Spaltung der sterisch stärker gehinderten Derivate durch die Beschleunigung des Solvolyseschlusses bedingt ist, der um so rascher verläuft, je höher die innere Spannung der Tritylverbindung ist.

Andererseits ist bei den Bpoc- und Ppoc-Schutzgruppen erwartungsgemäss infolge der grösseren Entfernung der Aminosäureseitenkette vom Aralkylrest praktisch kein Einfluss auf die Spaltungsgeschwindigkeit mehr bemerkbar. In 90proz. TFEt zerfällt die Bpoc- (bzw. Ppoc)-Gruppe bei der Acidolyse in Kohlendioxid und eine Mischung von 2-*p*-Biphenyl- (bzw. 2-Phenyl)-2-propanol und 2-*p*-Biphenyl- (bzw. 2-Phenyl)-propen.

Wenn man die Bedingung stellt, dass bei der Abspaltung einer Schutzgruppe 99% eliminiert werden sollen, ohne dass mehr als 1% der stabileren Gruppe angegriffen werden, so muss ein k_1 -Verhältnis von mindestens 460:1 vorliegen. In der Praxis dürfte für die Entfernung einer einzigen Schutzgruppe im Laufe der Synthese eines komplizierteren Polypeptides (vgl. [8]) im allgemeinen ein Verhältnis von 200 bis 500:1 befriedigen⁶⁾. Die Angaben der relativen k_1 -Werte in *Tab. 1* zeigen, dass bei der Acidolyse bei pH 4 zwischen Trt und Bpoc diese Bedingung erfüllt ist, solange Trt nicht an N-terminales Glycin gebunden ist. In diesem Falle ist die etwas stabilere Ppoc-Gruppe an Stelle von Bpoc vorzuziehen.

In *Tab. 2* sind die k_1 -Werte für Spaltungen bei verschiedenen pH-Werten zusammengestellt. Im Bereich zwischen pH 5 und 3 findet man bei Trt jeweils eine ungefähr 10fach raschere Acidolyse bei Erniedrigung um eine pH-Einheit, im Gegensatz zu Bpoc und Ppoc, wo nur ein Beschleunigungsfaktor von 3 bis 4 auftritt.

⁶⁾ Für 99% Spaltung sind diese Zahlen mit dem Faktor 6,5 und für 99,9% mit 10 zu multiplizieren.

⁶⁾ Bei wiederholter Anwendung einer Acidolysereaktion, wie sie z. B. beim Aufbau einer Peptidkette durch stufenweise Verlängerung um je einen Aminosäurerest erfolgt, sind dagegen wesentlich höhere Selektivitätsanforderungen zu stellen.

Tabelle 1. Acidolysen in 90% TFEt bei $\text{pH} \approx 4$

Verbindung	k_1 (Std. ⁻¹)	k relativ		$t_{1/2}$ (Min.)
Trt-Val-Val-OMe	138	5000	800	0,3
Trt-Leu-Val-OMe	52	2000	300	0,8
Trt-Gly-Val-OMe	7,4	300	40	5,6
Bpoc-Val-Val-OMe	0,15	} 5-10	1	
Bpoc-Leu-Val-OMe	0,15			
Bpoc-Gly-Val-OMe	0,2			
Ppoc-Val-Val-OMe	0,02	} 1		
Ppoc-Leu-Val-OMe	0,03			
Ppoc-Gly-Val-OMe	0,03			

Tabelle 2. Acidolyseselektivitäten bei verschiedenen pH -Werten

Verbindung	pH 5		pH 4			pH 3		
	k_1	k relativ	k_1	k relativ		k_1	k relativ	
Trt-Gly-Val-OMe	0,7	12	7,4	250	50	59	650	100
Trt-Leu-Val-OMe	3,9	65	52	1700	350			
Trt-Val-Val-OMe	11,5	190	138	4600	900			
Bpoc-Leu-Val-OMe	0,06	1	0,15	5	1	0,6	7	1
Ppoc-Leu-Val-OMe			0,03	1		0,09	1	

Demzufolge empfiehlt es sich, die Spaltung von Trt neben Bpoc oder Ppoc bei pH 3 bis 4 vorzunehmen, da sie bei pH 5 weniger selektiv verläuft.

In der nächstfolgenden Stufe der Acidolyseselektivität handelt es sich um die Entfernung von Bpoc oder Ppoc neben den Schutzgruppen vom *t*-Butyltyp, die bis zum beendigten Aufbau des Polypeptides erhalten bleiben sollen. Aus den Tab. 3 und 4 geht hervor, dass mit Salzsäure in TFEt Bpoc bei pH 1 und Ppoc bei pH 0 im Laufe von ca. 10 bis 15 Minuten abgespalten werden. Als Vertreter für die durch Gruppen des *t*-Butyltyps geschützten Peptide bzw. Aminosäureester sind jeweils noch Boc-Leu-Val-OMe und Z-Lys(Boc)-OMe aufgeführt. N(α)-Boc ist bei pH 1 ca. 2500mal stabiler als N(α)-Bpoc und bei pH 0 ca. 1500mal stabiler als N(α)-Ppoc. Wiederum ist es zur Erreichung maximaler Selektivität günstiger, bei möglichst tiefen pH-Werten und entsprechend kurzen Reaktionszeiten zu arbeiten; bei pH 1 ist das k_1 -Verhältnis N(α)-Ppoc/N(α)-Boc 300:1, bei pH 0 dagegen 1500:1. Während dem N(ϵ)-Boc von Lysin etwa doppelt so rasch wie N(α)-Boc abgespalten wird, weisen die übrigen Schutzgruppen des *t*-Butyltyps (*t*-Butyläther von Serin, Threonin und Tyrosin, sowie die mit *t*-Butylalkohol veresterten Carboxylgruppen) eine ähnliche oder höhere Stabilität wie N(α)-Boc auf.

Die Frage, ob Bpoc oder Ppoc als Derivat mit intermediärer Spaltbarkeit zwischen der Trt-Gruppe und den *t*-Butyl-Schutzgruppen verwendet werden soll, kann nicht *a priori* beantwortet werden. Sie wird bei jedem einzelnen Synthesepfad anhand besonderer Überlegungen, wie z. B. über die Art und Anzahl der übrigen Schutzgruppen, zu entscheiden sein.

Tabelle 3. Acidolysen in 90% TFEt bei $\text{pH} \approx 1$

Verbindung	k_1 (Std. ⁻¹)	k relativ	$t_{1/2}$ (Min.)
Bpoc-Val-Val-OMe	32	} ca. 2500	1,3
Bpoc-Leu-Val-OMe	38		1,1
Bpoc-Gly-Val-OMe	31		1,3
Ppoc-Val-Val-OMe	3,8	} ca. 300	11
Ppoc-Leu-Val-OMe	4		10,5
Ppoc-Gly-Val-OMe	4		10,5
Boc-Leu-Val-OMe	0,013	1	
Z-Lys(Boc)-OMe	0,02	1,5	

Tabelle 4. Acidolysen in 90% TFEt bei $\text{pH} \approx 0$

Verbindung	k_1 (Std. ⁻¹)	k relativ	$t_{1/2}$ (Min.)
Ppoc-Val-Val-OMe	40	} ca. 1500	1
Ppoc-Leu-Val-OMe	36		1,2
Ppoc-Gly-Val-OMe	38		1,1
Boc-Leu-Val-OMe	0,023	1	
Z-Lys(Boc)-OMe	0,044	2	

Neben den hier erwähnten Dipeptiden haben wir bisher eine grössere Anzahl weiterer Verbindungen mit Trt, Bpoc und Ppoc in $N(\alpha)$ der pH-Stat-Acidolyse in 90proz. TFEt unterworfen. Die gemessenen k_1 -Werte stimmten im allgemeinen ziemlich gut mit den entsprechenden der vorliegenden Tabellen überein, doch üben auch die Grösse und Aminosäuresequenz der Peptide einen gewissen Einfluss aus. Bei Versuchen zur Variation des Lösungsmittels (70proz. TFEt, 90proz. Methanol, Methylenchlorid usw.) erzielten wir schlechtere Selektivitäten als in 90proz. TFEt, ebenso, wenn z.B. Monochloressigsäure an Stelle von Salzsäure verwendet wurde. Dagegen fanden wir in 90proz. Hexafluoro-2-propanol, wo bei gleicher Salzsäurekonzentration noch stärker positive Elektrodenpotentiale als in 90proz. TFEt gemessen werden, ähnliche Selektivitätsverhältnisse. Bei gleicher pH -Einstellung der Glaselektrode konnten wir in 90proz. Hexafluoro-2-propanol ca. 3- bis 5mal raschere Spaltgeschwindigkeiten beobachten, doch ist dieses Lösungsmittel infolge seiner hohen Flüchtigkeit und beträchtlichen Toxizität weniger geeignet als 90proz. TFEt.

Bei den pH-Stat-Acidolysen in 90proz. TFEt stellten wir bisher keine Nebenreaktionen fest, mit Ausnahme einer geringen (ca. 5%) Indol-Alkylierung durch den [(2-*p*-Biphenyl)-isopropyl]-Rest bei einem tryptophanhaltigen Peptid. Insbesondere kann infolge der sofortigen Protonierung der freigesetzten α -Aminogruppe keine Alkylierung an dieser Stelle stattfinden.

Trt, Bpoc und Ppoc lassen sich auch durch blosses Erwärmen in 100- oder 90proz. TFEt abspalten. So kann z.B. $N(\alpha)$ -Bpoc bei 60° im Laufe von 1-2 Std. selektiv neben den *t*-Butyl-Schutzgruppen entfernt werden, $N(\alpha)$ -Ppoc unter den gleichen Bedingungen in 6-12 Std. Die Reaktion verläuft aber nicht mehr nach einer Kinetik 1. Ordnung, sondern wird durch die Basizität der freiwerdenden Aminogruppen zunehmend stärker gehemmt. Zudem tritt hier, im Gegensatz zur pH-kontrollierten Acidolyse, eine merkliche $N(\alpha)$ -Alkylierung auf - bis gegen 30%, je nach N -terminaler Aminosäure, und vor allem in wasserfreiem TFEt - so dass diese Spaltmethode nur mit Vorsicht für präparative Zwecke gebraucht werden darf. Es wurde nicht untersucht, ob die Alkylierung durch Zusatz von Kationenfängern unterdrückt werden kann. Der Vorteil der Selektivität zwischen Trt einerseits und Bpoc oder Ppoc andererseits geht bei der Spaltung durch Erwärmen in TFEt ebenfalls verloren, da sich hier $N(\alpha)$ -Trt im allgemeinen merklich stabiler als Bpoc und Ppoc erweist.

Anders als in $N(\alpha)$ sind die Stabilitäten von Trt, Bpoc und Ppoc, wenn diese als Schutzgruppen von $N(\epsilon)$ in der Seitenkette von Lysin auftreten. Als Modellverbindungen untersuchten

wir Z-Lys(Trt)-OMe und Z-Lys(Bpoc)-OMe. Letzteres Derivat ergab bei der pH-Stat-Acidolyse in 90proz. TFEt bei pH 1 einen k_1 -Wert von 88 Std.⁻¹, d. h. ca. 2,5mal höher als für Bpoc in N(α). Ebenfalls eine leicht erhöhte Spaltgeschwindigkeit in N(ϵ) gegenüber N(α) beobachtet man bei der Boc-Gruppe (vgl. dazu Tab. 3 und 4). N(ϵ)-Trt dagegen, dessen hohe Säurestabilität bekannt ist [9] [10], lässt sich ohne Zersetzung mit Salzsäure in 90proz. TFEt titrieren ($pK_a = 6$). Unter stärker sauren Bedingungen zerfällt das protonierte N(ϵ)-Trt-Derivat in 90proz. TFEt bei RT, mit einer Halbwertszeit von ca. 20 Min. (k_1 ca. 2,1 Std.⁻¹), und zwar unabhängig vom pH-Wert der Lösung. Es würde sich so die Möglichkeit einer selektiven Bpoc-Abspaltung (in N(α) oder N(ϵ)) bieten: diese Schutzgruppe wird bei pH 0 in weniger als 1 Min. quantitativ abgespalten, bei gleichzeitig nur spurenweisem Angriff von Trt in N(ϵ).

Die pH-Stat-kontrollierte Acidolyse mit Salzsäure in 90proz. TFEt bietet eine selektive und einfache Methode zur Abspaltung von N(α)-Schutzgruppen in Peptiden. Sie ermöglicht eine zusätzliche Selektivitätsstufe zwischen Trt und Bpoc oder Ppoc, die generell für den Aufbau von zweikettigen Polypeptiden von Nutzen ist. Das Verfahren erlaubt zudem den unmittelbaren Einblick in die Kinetik der Spaltreaktion, ergibt quantitative Angaben über die molaren Mengen und liefert die freigesetzte Aminogruppe direkt in der Form des Hydrochlorides. Diese praktischen Vorteile machen die pH-kontrollierte Abspaltung auch dann zur geeignetsten Methode, wenn es sich nicht um die Ausnützung der zusätzlichen Selektivitätsstufe zwischen Trt und Bpoc oder Ppoc handelt, sondern bloss eine dieser drei Gruppen unter Schonung der Schutzgruppen vom *t*-Butyltyp entfernt werden muss.

Experimenteller Teil

Die als Modellsubstanzen verwendeten und hier erstmals dargestellten Dipeptide sowie einige neue Aminosäurederivate sind in Tab. 5 zusammengefasst. Trt-Lcu-Val-OMe und Boc-Lcu-Val-OMe wurden bereits früher beschrieben [11]. TFEt der Fa. *Halocarbon Products Corp.* (Hackensack, N. J., USA) wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Apparatives. pH-Messungen wurden mit den kombinierten Glaselektroden-Messketten *Ingold* 401-S/160 oder *Metrohm* EA 147 vorgenommen. Für pH-Stat-Acidolysen und Titrationsen verwendeten wir den Titrator TTT 1c, kombiniert mit Titrigraph SBR 2c, der Fa. *Radiometer*, Kopenhagen, oder den Combi-Titrator 3D der Fa. *Metrohm*, Herisau.

Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten. 1,5–3 ml 90proz. TFEt wurden im Titriergefäss vorgelegt und mit 0,1N HCl in 90proz. TFEt auf das gewünschte pH eingestellt, worauf man 30–40 μ mol des geschützten Dipeptidderivates, gelöst in 200 μ l Chloroform, zugab. Die Aufzeichnung der zur Protonierung der freiwerdenden α -Aminogruppen benötigten Säuremenge als Funktion der Zeit erfolgte nun automatisch durch das als pH-Stat geschaltete Gerät. Als Säure wurde 0,1N HCl in 90proz. TFEt aus einer 0,5 ml-Kolbenbürette zugegeben. Zur Berechnung der k_1 -Werte wurden jeweils verschiedene Punkte der Kurven ausgewertet.

Diese Methode war bei der Abspaltung von Trt aus Z-Lys(Trt)-OMe infolge Protonierung der Tritylaminogruppe ($pK_a = 6,0$ in 90proz. TFEt) nicht anwendbar. Es wurden daher nach verschiedenen Zeiten Proben entnommen und nach Verdünnen mit dem gleichen Volumen Dioxan zur Bestimmung des nicht gespaltenen Ausgangsproduktes mit wässriger Natronlauge zurücktitriert.

Präparative Acidolysen wurden so ausgeführt, dass die in 90proz. TFEt, nötigenfalls unter Zusatz von Methylenchlorid oder Chloroform, gelösten Peptide ($c = 1$ –10%) bei den gewünschten pH-Werten gespalten wurden.

Bei der Abspaltung von Trt in Gegenwart von Bpoc oder Ppoc bei pH 3–4 ist es zwecks Erreichung der optimalen Selektivität wichtig, dass lokale pH-Unterschreitung während der Säurezugabe möglichst vermieden wird: zu dem in 90proz. TFEt gelösten Peptid ($c \leq 0,005M$) wird vom pH-Stat unter starkem Röhren eine 0,05–0,1N Lösung von HCl in TFEt/H₂O 1:1 dosiert.

Die Aufarbeitung der Ansätze kann, je nach Peptid und pH-Wert der Lösung, auf verschiedene Weise erfolgen, in vielen Fällen z. B. durch einfaches Eindampfen zur Trockne oder Zugabe von *t*-Butylalkohol, Einengen und Lyophilisieren. Die aus den Schutzgruppen ent-

Tabelle 5. *Neue Dipeptid- und Aminosäure-Derivate*

Verbindung	Elementarformel	Lösungsmittel zur Kristallisation	Smp. ^{a)}
Trt-Val-Val-OMe ^{b)}	C ₃₀ H ₃₈ N ₂ O ₂	Methanol/H ₂ O	182-183°
Trt-Gly-Val-OMe ^{c)}	C ₂₇ H ₃₀ N ₂ O ₃		amorph
Bpoc-Val-Val-OMe ^{d)}	C ₂₇ H ₂₆ N ₂ O ₅		amorph
Bpoc-Leu-Val-OMe ^{e)}	C ₂₈ H ₂₈ N ₂ O ₅		amorph
Bpoc-Gly-Val-OMe ^{f)}	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₅	Essigester/Hexan	150°
Ppoc-Val-Val-OMe ^{g)}	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₅	Methanol/H ₂ O	117-118°
Ppoc-Leu-Val-OMe ^{h)}	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₅	Methanol/H ₂ O	115-116°
Ppoc-Gly-Val-OMe ⁱ⁾ ⁿ⁾	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₅		amorph
Trt-Val-ONSu	C ₂₈ H ₂₈ N ₂ O ₄	Methanol/H ₂ O	70-72°
Bpoc-Val-ONp	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₆	Essigester/Hexan	102-105°
Ppoc-Gly-ONp ^{j)}	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₆		ölig
Ppoc-Leu-OH	C ₁₆ H ₂₃ NO ₄	Benzol/Hexan	119-120°
Ppoc-Leu-ONp	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₆	Benzol/Hexan	97-100°
Ppoc-Val-OH	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	Essigester/Hexan	101-103°
Ppoc-Val-ONp ^{k)}	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₆		ölig
Z-Lys(Trt)-OMe ^{l)} ^{k)}	C ₃₄ H ₃₆ N ₂ O ₄		amorph
Z-Lys(Bpoc)-OMe ^{l)} ^{l)}	C ₃₁ H ₃₆ N ₂ O ₄		amorph

^{a)} Die Smp. wurden im *Büchi*-Apparat in offener Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert.

^{b)} Aus Trt-Val-ONSu + HCl · H-Val-OMe + N-Methylmorpholin, 25 Std. bei 60° in CHCl₃; Ausbeute 40%.

^{c)} Aus Trt-Gly-OH + H-Val-OMe + 1-Hydroxybenzotriazol + DCCI, 20 Std. 25° in Essigester. Aus SiO₂-Säule eluiert mit CHCl₃/Hexan 7:3.

^{d)} Aus Bpoc-Val-ONp + HCl · H-Val-OMe + N-Methylmorpholin, 5 Std. 60° in DMF. Aus SiO₂-Säule eluiert mit CHCl₃/Hexan 7:3; Ausbeute 54%.

^{e)} Aus Bpoc-Leu-OH + HCl · H-Val-OMe *via* gemischtes Anhydrid mit Isobutyl-chloroformiat + Triäthylamin, in Acetonitril. Gereinigt an SiO₂-Säule; eluiert mit Essigester/Petroläther 1:1.

^{f)} Kondensation des geschützten Aminosäure-*p*-nitrophenylesters mit HCl · H-Val-OMe + N-Methylmorpholin, über Nacht bei RT. in DMF.

^{g)} Aus Ppoc-Val-ONp + HCl · H-Val-OMe + N-Methylmorpholin, 8 Std. 60° in DMF; Ausbeute 51%.

^{h)} Gereinigt an SiO₂-Säule; eluiert mit CHCl₃/MeOH 97:3.

ⁱ⁾ Gereinigt an SiO₂-Säule; eluiert mit CHCl₃.

^{j)} Aus Z-Lys-OMe · HCl + Trt-Cl + Triäthylamin, 2 Std. 25° in DMF.

^{k)} Aus Z-Lys-OMe · HCl + [2-(*p*-Biphenyl)-isopropyl]-phenylcarbonat + Triäthylamin, 3 Std. 60° in DMF.

standenen Reaktionsprodukte sind sehr lipophil und können daher leicht von den geschützten Peptiden abgetrennt werden, z. B. durch Extrahieren mit Äther.

Die *pK*-Werte der ionogenen Gruppen sind bei der *pH*-Stat-Acidolyse zu berücksichtigen, da sie die zur Schutzgruppenabspaltung benötigte Säuremenge beeinflussen können. Wir fanden bei Titrationen in 90proz. TFEt folgende *pK_a*-Werte: α-NH₂ (Tri- oder höhere Peptide) 5,7-6,3; α-COOH (Tri- oder höhere Peptide) 4,0-4,6; Imidazol von His 5,6; Essigsäure 5,2.

Dünnschichtchromatographie. Der Verlauf der Acidolysen wurde mittels chromatographischer Proben auf Silicagelplatten (SL 254 der Fa. *Antec*, Birsfelden) überprüft, wozu verschiedene wässrig-organische Lösungsmittelsysteme (vgl. z. B. [11]) dienten. Zum Nachweis der lipophilen Produkte aus den Schutzgruppen wurde Toluol als Fließmittel verwendet. Es ergab folgende *R_f*-Werte: Triphenylmethanol 0,21; Trityl-trifluoräthyläther⁷⁾ 0,57; 2-*p*-Biphenyl-2-propanol 0,05; 2-*p*-Biphenyl-2-propanol 0,56.

⁷⁾ Dieses Derivat (Smp. 122°) entsteht, zusätzlich zu Triphenylmethanol, bei der Abspaltung von N(α)-Trt mit 100 od. 90% TFEt bei 60°.

Für wertvolle technische Mitarbeit danken wir Frau *V. von Arx* und den Herren *H. R. Keller* und *B. Sundermann*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Recommendations, *J. biol. Chemistry* **247**, 977 (1972).
- [2] *R. Schwyzer & W. Rittel*, *Helv.* **44**, 159 (1961).
- [3] *H. Klostermeyer & E. Schwertner*, *Z. Naturforsch.* **28b**, 334 (1973).
- [4] *P. Sieber & B. Iselin*, *Helv.* **51**, 614, 622 (1968).
- [5] *P. Sieber & B. Iselin*, *Helv.* **52**, 1525 (1969).
- [6] *F. L. Scott*, *Chemistry & Ind.* **224** (1959).
- [7] *V. J. Shiner, Jr., W. Dowd, R. D. Fisher, S. R. Hartshorn, M. A. Kessick, L. Milakofsky & M. W. Rapp*, *J. Amer. chem. Soc.* **91**, 4838 (1969).
- [8] *P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Riniker & W. Rittel*, *Helv.* **57**, 2617 (1974).
- [9] *G. Amiard & B. Goffinat*, *Bull. Soc. chim. France* **1133** (1957).
- [10] *B. Bezas & L. Zervas*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 719 (1961).
- [11] *B. Kamber*, *Helv.* **54**, 398 (1971).

117. Selektive Synthesen mit Organometallen IV¹⁾: Gezielte Hydroxylierung von Allylstellungen

von **Günter Rauchschalbe** und **Manfred Schlosser**

Institut de Chimie Organique de l'Université, Rue de la Barre 2, CH-1005 Lausanne

(21. 2. 75)

Summary. Conversion of alkenes into 2-alken-1-ols of predictable constitution and configuration can be readily achieved via alkonylpotassium and boronic ester intermediates.

Die gute Zugänglichkeit von Allylmetall-Verbindungen [2–4] lud dazu ein, ihre Abwandelbarkeit durch mancherlei elektrophile Agentien [5] zu erkunden. Aus methodischen Gründen reizte besonders der Ersatz des Metalls durch eine Hydroxyl-Gruppe. Mit Schwierigkeiten musste man rechnen. In Einzelfällen war es ja schon gelungen, Organometall-Verbindungen durch Behandeln mit Luftsauerstoff in die entsprechenden Alkohole oder Phenole zu überführen; die Ausbeuten befriedigten jedoch selten und meist herrschten Stör- und Ausweichreaktionen vor [6–9]. Diese Erfahrung bestätigte sich, als wir (*Z*)-2-Buten-1-yl-kalium [3] zu oxydieren versuchten. Das erhoffte (*Z*)-2-Buten-1-ol war nur als Nebenbestandteil eines Substanzgemisches nachzuweisen, und das Ergebnis besserte sich nicht, als man Nitrobenzol [10] [11] sowie Peroxide [12] [13] oder Perester [13] [14] anstelle des Sauerstoffes als Oxydationsmittel einsetzte.

Offenbar verlangen die empfindlichen und umwandlungsfreudigen Allyl-Derivate ein schonenderes Vorgehen. Als recht brauchbar erwies sich nun ein zweistufiges Verfahren, das zunächst die Organometall-Verbindung **1** mit Fluordimethoxyboran zu einem Boronsäureester **2** kondensiert und diesen dann mit Wasserstoffperoxid unter Freisetzung eines Allylalkohols **3** spaltet. Ausgehend von 2-Buten (*Z/E*-Gemisch) gelangten wir so in 50% Ausbeute zu recht reinem (*Z*)-2-Buten-1-ol (**3**; R = H).

¹⁾ III. Mitt.: s. [1].