

Zur reduktiven Abspaltung von Peptidschutzgruppen mittels Natrium in flüssigem Ammoniak*

Von

H. Nesvadba und H. Roth

Aus dem Peptidlaboratorium der Fa. SANABO, Chem. pharm. Fabrik GmbH.,
A-1120 Wien

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 8. Mai 1967)

Es wird eine Apparatur beschrieben, mit der sich die Abspaltung der in der Peptidchemie üblichen Schutzgruppen mittels Na in fl. NH_3 unter Standardbedingungen durchführen läßt.

An extraction apparatus is described which permits the reductive fission of protecting groups used in peptide chemistry with sodium in liquid ammonia under standard conditions.

Die reduktive Spaltung von N-Benzoyloxycarbonyl- (N-*Cbo*-), N-Tosyl- (N-*Tos*-), N-Trityl-, N-, O- und S-Benzyl-(S-*Bzl*-)Schutzgruppen mittels Natrium in flüssigem Ammoniak wird seit den grundlegenden Untersuchungen von *du Vigneaud* und *Behrens*¹ bei der Synthese von Peptiden² vielfach angewendet.

Obwohl in den letzten Jahren, speziell bei der Synthese hormonaktiver Peptide, Nebenreaktionen bei dieser Methode beobachtet wurden³, sind eingehendere Untersuchungen der Schutzgruppenabspaltung weitestgehend unterblieben. Man hat sich mit der teilweisen Identifizierung der bei der Spaltung von *Cbo*- und *Tos*-geschützten Peptiden aus den Schutz-

* Herrn Prof. Dr. *F. Wessely* mit den besten Wünschen zum 70. Geburtstag.

¹ *R. H. Schiffert* und *V. du Vigneaud*, *J. Biol. Chem.* **108**, 753 (1935), *O. K. Behrens* und *V. du Vigneaud*, *J. Biol. Chem.* **117**, 27 (1937).

² Übersicht in „Chem. of the Amino Acids“ — *J. P. Greenstein* und *M. Winitz*, Wiley & Sons, **1961**, 1239.

³ *H. Kapeller* in: Peptides, Proc. 5th Europ. Peptide Symposium Oxford 1962, Pergamon Press 1963, 3.

gruppen entstehenden Produkte^{1, 4} begnügt, den Mechanismus der Reaktion selbst jedoch nicht weiter untersucht.

Der Einfluß von Feuchtigkeit und die Art der Schutzgruppen⁵, die Menge an flüssigem Ammoniak, der Reinheitsgrad⁶ und die Sequenz des Peptides⁷, die zur Reduktion eingesetzte Menge an Natrium und die Reaktionszeit wurden für die beobachteten Anomalien verantwortlich gemacht.

Zu diesen zählen — um nur wenige aus dem sich zum Teil widersprechenden Tatsachenmaterial herauszugreifen: Entmethylierung von Methionin⁸, Zerstörung von Threonin⁹ und Tryptophan⁷, Racemisierung^{10, 11} sowie die Spaltung gewisser Peptidbindungen¹² bei N-Cbogeschützten Peptiden — langsam verlaufende Reduktion¹³, Deamidierung von Arginin zu Ornithin sowie Peptidspaltung⁵ — bei N-Tosylpeptiden. Nach Beobachtungen von *D. Koleff* in unserem Laboratorium kommt es auch zu einer unvollständigen Abspaltung der N-Tosylgruppierung¹⁴. Wie Modellversuche an N-Tos-S-Bzl-Cystein zeigten, waren trotz Anwendung eines Natrium-Überschusses N-Tosyl-Cystein und Mono-Tos-Cystin im Reaktionsgemisch dünnschichtchromatographisch nachweisbar. Analoge Resultate erhielten wir auch bei N-Tos-S-Bzl-Cysteinylpeptiden¹⁵.

Obwohl man heute in der Peptidsynthese die Na/NH₃-Reduktion — speziell der zu Nebenreaktionen neigenden N-Tosylgruppe — durch Verwendung neuer, acidolytisch leicht spaltbarer Schutzgruppen (etwa der tert. Butyloxycarbonylgruppe^{16, 17}) umgehen kann, bleibt sie für die Abspaltung des noch viel verwendeten S-Bzl-Restes weiterhin die Methode der Wahl. Unserer Meinung nach ist die Ursache eines Teiles der beobachteten Anomalien in der experimentellen Ausführung der Reduktion zu

⁴ *J. Kovacs* und *U. R. Ghatak*, Chem. and Ind. **22**, 913 (1963). — *J. Org. Chem.* **31**, 119 (1966).

⁵ *St. Guttman*, Peptides, Proc. 5th Europ. Peptide Symposium Oxford 1962, Pergamon Press 1963, 41.

⁶ *J. Meienhofer* und *V. du Vigneaud*, *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 2279 (1960). S. auch Diskussionsbemerkung *J. Meienhofer*, Peptides, Proc. 6th Europ. Peptide Symposium, Athen 1963, Pergamon Press 1966, 115.

⁷ *S. Bajusz* und *K. Medzihradzsky*, Peptides, Proc. 5th Europ. Peptide Symposium, Oxford 1962, Pergamon Press 1963, 49.

⁸ *J. A. Stekol*, *J. Biol. Chem.* **140**, 827 (1941).

⁹ *J. Meienhofer*, *Chimia [Aarau]* **16**, 385 (1962).

¹⁰ *M. Brenner* und *R. W. Pfister*, *Helv. chim. Acta* **34**, 2085 (1951).

¹¹ *W. E. Hanby*, *S. G. Waley* und *J. Watson*, *J. Chem. Soc.* **1950**, 3239.

¹² *K. Hofmann* und *H. Yajima*, *J. Amer. Chem. Soc.* **83**, 2289 (1961).

¹³ *J. Meienhofer* und *C. H. Li*, *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 2434 (1962).

¹⁴ *D. Koleff*, *Farmacija Sofia XVI* **6** (1966).

¹⁵ *H. Nesvadba*, unveröffentlicht.

¹⁶ *F. C. McKay* und *N. F. Albertson*, *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 4686 (1957).

¹⁷ *R. Schwyzler*, *P. Sieber* und *H. Kapeller*, *Helv. chim. Acta* **42**, 2622 (1959).

suchen, der mehr Sorgfalt als bisher geschenkt werden sollte. Wie der Literatur zu entnehmen ist, fehlen generelle Beschreibungen^{2, 18} der Methodik, die Ausführung blieb weitgehend dem experimentellen Geschick des einzelnen überlassen. Erst in letzter Zeit gingen z. B. *du Vigneaud* und Mitarbeiter¹⁹ dazu über, bei der Reduktion von Peptiden den Natriumzusatz zu dosieren, indem sie ein mit Na-Metall gefülltes Glasrohr von einigen Millimetern Durchmesser in die Lösung des Peptides eintauchen, und so den Endpunkt der Reduktion, der durch eine Blaufärbung des Ammoniaks gekennzeichnet ist, schrittweise erreichen.

Wir wollen daher mit der Beschreibung der von uns seit einigen Jahren mit Erfolg angewandten „Extraktionsmethode“ eine Möglichkeit zur Einhaltung bestimmter Standardbedingungen aufzeigen, die ein reproduzierbares Arbeiten unter vorgegebenen Versuchsbedingungen erlaubt. Wie auch *Rudinger* und Mitarbeiter inzwischen zeigten, konnten unter Verwendung unserer Versuchsanordnung sowohl die Stöchiometrie der Schutzgruppenreduktion²⁰ erfaßt als auch Aussagen zum Mechanismus²¹ der in vielen Fällen unklar verlaufenden Reaktion gemacht werden.

Das Prinzip der in Abb. 1 schematisch dargestellten Apparatur besteht darin, metallisches Natrium nach dem Extraktionsprinzip* in flüssigem Ammoniak unter Rückfluß zu lösen und in eine Lösung der zu reduzierenden Substanz einzutragen. Dabei lassen sich folgende Versuchsbedingungen exakt und reproduzierbar einhalten:

Flüssiges Ammoniak wird in der Apparatur unter Feuchtigkeitsausschluß über Natrium redestilliert.

Das sich beim Schneiden des Natriummetalls an der Oberfläche bildende Carbonat bzw. Hydroxid verbleibt als Rückstand in der Extraktionshülse.

Eine lokale Überkonzentration bzw. eine Reaktion reduzierbarer Substanz an der Metalloberfläche wird vermieden.

Die Reduktionsdauer wird durch die Geschwindigkeit der Natriumextraktion bestimmt.

Der Reaktionsverlauf, der mitunter stufenweise vor sich gehen kann, bleibt in allen Phasen optisch klar erkennbar.

* *W. E. Truce, D. Tate und D. Burde, J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 2872 (1960) brachten zur reduktiven Spaltung von Sulfiden und Sulfonen mittels Lithium in Methylamin bzw. Natrium in Ammoniak bereits ein einfaches Extraktionsverfahren zur Anwendung.

¹⁸ Siehe auch *E. Schröder und K. Lübke, „The Peptides, Vol. I, Methods of Peptide Synthesis“*, Academic Press New York 1965, Seite 15.

¹⁹ *B. M. Ferrier, D. Jarvis und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem.* **240**, 4264 (1965).

²⁰ *J. Rudinger, Peptides, Proc. 6th Europ. Peptide Symposium, Athen 1963, Pergamon Press 1966, 21.*

²¹ *J. Rudinger, Coll. Czech. Chem. Comm., in Vorbereitung.*

Der Endpunkt der Reaktion bzw. eine durch geringen Natriumüberschuß auftretende Blaufärbung läßt sich exakt einstellen.

Überschüssiges Natrium kann dem Extraktor entnommen und zurückgewogen werden. Damit ist eine genaue Erfassung der stöchiometrischen Verhältnisse der Reaktion möglich.

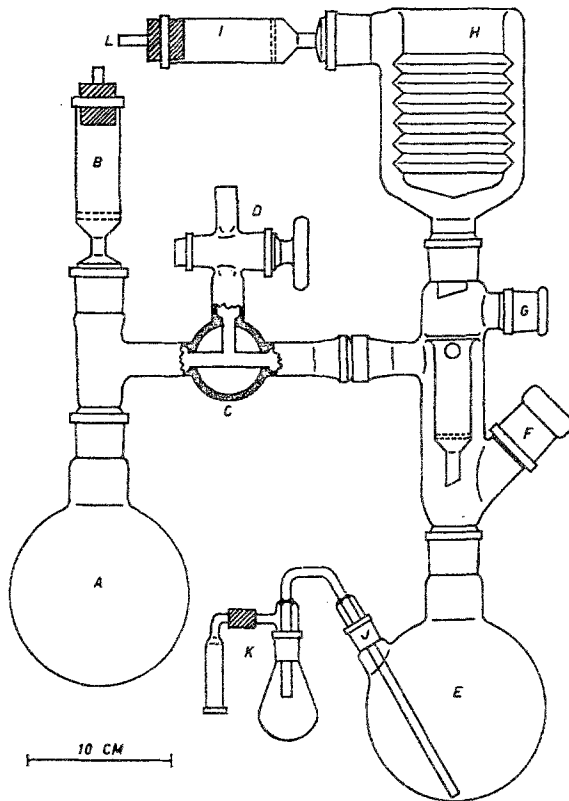


Abb. 1

Zur chromatographischen Verfolgung der Reduktion können Proben unter Feuchtigkeitsausschluß abgelassen werden.

Arbeitsanleitung:

Eine zur Reaktion ausreichende Menge fl. NH_3 (etwa 100 ml auf 1 g Peptid) wird aus einer Stahlbombe direkt in den Kolben A abgelassen und Na bis zur bleibenden Blaufärbung im Überschuß zugesetzt, dann das Trockenrohr B (KOH) durch einen Normalschliffstopfen ersetzt. Über den geöffneten Hahn C wird mittels eines Heizbades (Methanol) Ammoniak in den Kolben E kondensiert, der, für den Fall, daß bei der Reaktion keine

Probeentnahme erwünscht ist, durch einen einfachen Rundkolben ersetzt werden kann. Kühler H wurde vor der Kondensation mit einer Methanol—CO₂-Kältemischung beschickt, desgleichen Kolben E in einem Dewargefäß abgekühlt. Nach Kondensation des gewünschten Ammoniak-Volumens wird Hahn C geschlossen und Kolben A wieder mit dem Trockenrohr B versehen.

Nun wird das vorher mindestens 12 Stdn. im Hochvak. getrocknete, in Röhrchen eingewogene Peptid bei F eingeworfen, Kolben E durch ein Alkoholbad zum Sieden gebracht, wobei vollständige Lösung der Substanz eintritt; mechanische Rührung ist nicht erforderlich. Die berechnete Menge p. a. Natrium (großzügig aus Stangen herausgeschnitten, unter Petroläther eingewogen und vor dem Eintragen kurz zwischen Filterpapier übertrocknet) wird mit einem Glasstab nach und nach bei G in die Extraktionshülse, die mit einer grobporigen Sinterplatte (1 G 1) versehen ist, eingebracht und durch das unter Rückfluß stehende NH₃ in die Lösung extrahiert. Das Ende der Reaktion wird durch eine Blaufärbung des Kolbeninhalts angezeigt. Nach Erreichen des Endpunktes kann durch sofortiges Abkühlen des Reaktionskolbens eine weitere Natrium-Zufuhr unterbunden werden. Überschüssiges Na läßt sich der Extraktionshülse entnehmen und zurückwiegen, wenn eine genaue stöchiometrische Erfassung der Reduktion erwünscht ist.

Durch Einwurf eines Röhrchens mit genügend NH₄Cl bei F wird die blaue Lösung farblos. Die Entfärbung kann auch auf eine andere, dem konkreten Fall angemessene Weise¹⁸ vorgenommen werden.

Der Kolben wird nach dem Einleiten eines trockenen Stickstoffstromes über Hahn D und C abgenommen, NH₃ unter Feuchtigkeitsausschluß an der Wasserstrahlpumpe abgedampft und der verbleibende Rückstand im Vak. über konz. Schwefelsäure von letzten Ammoniakresten befreit. Die weitere Aufarbeitung erfolgt nach den in der Peptidsynthese üblichen Methoden.

Ist eine Probeentnahme während der Reduktion erwünscht, dann wird Kolben E mit seitlichem Ansatz J und Vorlage K verwendet. In die tiefgekühlte Vorlage lassen sich durch Schließen bei L Substanzproben überführen.