

QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN ZUM ACIDOLYSE- UND JODOLYSEVERLAUF BEI S-ARYLALKYL-SCHUTZGRUPPEN

G. LOSSE und T. STÖLZEL

Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden, DDR

(Received in Germany 18 December 1971; Received in the UK for publication 20 January 1972)

Zusammenfassung—Am Modell Acetyl-cystein-methylamid wurde unter in der Peptidchemie üblichen Bedingungen die Abspaltungsgeschwindigkeit von Kationen und Olefine bildenden S-Arylalkyl-Schutzgruppen in TFA, 5·5 m oder 0·2 m HBr/Eisessig und in Jod/Methanol bestimmt. In 5·5 m HBr/Eisessig wurden Trityl, α -Methylbenzhydryl und α,α -Dimethylbenzyl schnell und weitgehend unabhängig von Benzhydryl oder 4,4'-Dimethoxybenzhydryl abgespalten. Letzteres ist nach Anisol- oder Phenolzusatz gut entfernbar. Jodolytisch liessen sich Trityl, 4,4'-Dimethoxybenzhydryl und α,α,α' -Trimethylbenzhydryl rasch abspalten.

Abstract—Rates of cleavage of arylalkylthioethers attached to acetyl-cysteine-methylamide and forming cations or olefins were measured under conditions usual in peptide chemistry in TFA, 5·5 m or 0·2 m HBr/glacial acetic acid and in iodine/methanol. In 5·5 m HBr/glacial acetic acid trityl, α -methylbenzhydryl and α,α -dimethylbenzyl were removed quickly and almost independently of benzhydryl or 4,4'-dimethoxybenzhydryl. The latter is easily removable in presence of anisol or phenol. 4,4'-Dimethoxybenzhydryl and α,α,α' -trimethylbenzhydryl were removed quickly by means of iodine trityl.

FÜR den Schutz des Cystein-Schwefels in der Peptidsynthese steht heute ein grosses Arsenal an Blockierungsgruppen mit variablen Abspaltungsbedingungen zur Verfügung (Tabelle 1). Die Synthese einfacher Cysteinpeptide bereitet daher keinerlei prinzipielle Schwierigkeiten.

Für den Aufbau komplizierter Cystein- und insbesondere die gezielte Synthese

TABELLE 1. S-SCHUTZGRUPPEN ZUR PEPTIDSYNTHESE*

1. S-Alkyl	2. Thioacetale und -aminale	3. S-Acyle
t-Butyl (Bu) ^{1, 2}	Benzylthiomethyl (Btm) ¹⁴	t-Butyloxycarbonyl (Boc) ²⁰
Benzyl (Bzl) ^{3, 4}	Tetrahydropyranyl (Thp) ¹⁵	Benzyloxycarbonyl (Z) ^{21, 22}
4-Nitrobenzyl ⁵	Isobutyloxymethyl ¹⁶	4-Methoxy-benzyloxycarbonyl (Z(OMe)) ²³
4-Methoxybenzyl ⁶	Acetamidomethyl ^{17, 18}	Acetyl (Ac) ²²
Diphenylmethyl (Benzhydryl, Bzh) ^{7, 8}	2,2,2-Trifluor-1-acylamino-äthyl ¹⁹	Benzoyl (Bz) ^{22, 24}
4,4'-Dimethoxy-benzhydryl ^{7, 9}		Äthylcarbamoyl ²⁵
Trityl (Trt) ^{7, 10, 11}	4. Disulfide	
t-Arylalkyle ¹²	S-Äthylmercapto (S-Et) ^{26, 27}	5. Einbau des Cys-Schwefels in heterocycl. Systeme
β,β -Diäthoxycarbonyl-äthyl ¹³	S-t-Butylmercapto (S-Bu) ²⁷	
	S-Cys (Eigenschutz, symm. Cystinpeptide) ^{28, 29}	Thiazolidin-Derivate ³⁰
		Cystein-thiolacton ³¹

* Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochem. Nomenclature Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **348**, 256 (1967), *J. Biol. Chem.* **241**, 2491 (1966); **242**, 555 (1967).

unsymmetrischer Cystinpeptide mit mehreren Disulfidbrücken wie Insulin werden jedoch S-Schutzgruppen von sehr spezifischem Verhalten und abgestufter Reaktivität benötigt. Vor allem für den Deblockierungsschritt müssen weitgehende Anforderungen wie komplikationslose, vollständige Entfernung des Substituenten bei hoher Selektivität zu anderen geschützten, beispielsweise auch anderen geschützten S-Funktionen erfüllt werden. So sind stark alkalische Spaltungsbedingungen oder die Spaltung mit Schwermetallsalzen bei den meisten Schutzgruppen nicht gefahrlos, da sie β -Eliminierungen begünstigen.^{32, 33} Bei Anwendung von Schutzgruppen des S-Acyl-Typs lassen sich nur unter bestimmten Voraussetzungen im Kupplungsschritt der Peptidsynthese S \rightarrow N-Wanderungen ausschliessen.^{24, 34, 35} Den Idealbedingungen am nächsten scheiner heute die Arylkylthioäther bei Anwendung acidolytischer,^{7, 9, 12, 36} jodolytischer¹¹ und rhodanolytischer^{8, 10} Deblockierungsbedingungen sowie die S-Disulfide bei thiololytischer^{26, 27} oder sulfitololytischer^{27, 28} Spaltung zu kommen. Die stufenweise rhodanolytische Abspaltung von Trt- und Bzh-Gruppen unter gleichzeitiger Aktivierung der freigelegten S-Funktion wurde von Hiskey³⁷ ausführlich studiert und zur gezielten Synthese eines Triscystinpeptides vom Insulintyp angewendet. Vorher konnte schon Zervas³⁴ durch kombinierte Anwendung von Bz- mit Trt-Gruppen bzw. Trt- mit Bzh-Gruppen die Insulinsequenz A 6-12 mit intrachenarer 6-11-Disulfidbrücke und S-geschütztem Cys in 7-Position synthetisieren.

Ausser den genannten Vorteilen besitzen die Arylkylgruppen den Vorzug, dass sich diese durch Änderung der Substitution am α -C-Atom und aromatischen Kern weitgehend variieren lassen, wodurch eine gewisse Skala differenzierter Deblockierungsbedingungen ermöglicht werden könnte. Um über präparative Aussagen hinausgehende quantitative Daten zum Verhalten dieses S-Schutzgruppen-Typs zu gewinnen, haben wir am Modell N-Acetyl-L-cystein-methylamid die Geschwindigkeit der Acidolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) und HBr in Eisessig sowie die Jodolyse in Methanol bei 20° folgender Arylkyl-Gruppen abgestufter Reaktivität gemessen:

Reihe A: Trityl (Trt), 4,4'-Dimethoxybenzhydryl (Dmb), Benzhydryl (Bzh)

Reihe B: $\alpha, \alpha, 4,4'$ -Trimethylbenzhydryl, α, α -Dimethyl-4-methoxy-benzyl, α, α -Dimethylbenzyl, α -Methylbenzhydryl.

Die unter A genannten Vertreter sind in der Lage, mehr oder weniger stabile Kationen und die unter B genannten darüberhinaus durch Vorliegen von β -H-Atomen Olefine zu bilden.

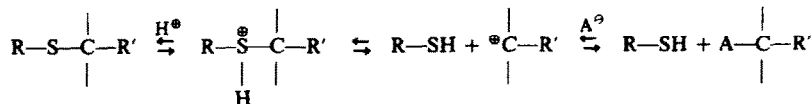
Die Acidolyse wurde unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung mit 45 mMol TFA bzw. HBr (5:5 m in Eisessig) oder mit 10 mMol HBr (0:2 m in Eisessig) je mMol Substrat durchgeführt. Für die Vertreter der Reihe A nahmen wir eine weitere Messreihe unter Zusatz von 6 mMol Anisol, in einigen Fällen auch Phenol je mMol Substrat als Kationenfänger auf.

Um den Anfangsfehler bei den kinetischen Untersuchungen klein zu halten, wurde in allen Fällen das Substrat in Eisessig (0:55 ml je mMol Substrat) vorgelöst.

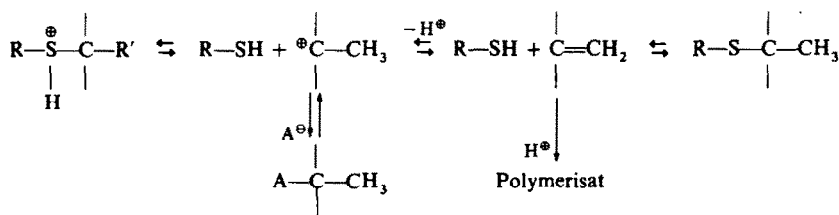
Die Jodolyse führten wir in 0:1 m Lösung mit äquimolarer Menge Jod in 90% igem wässrigen Methanol durch. Entsprechend dem Ziel der Arbeit haben wir die Reaktionsbedingungen weitgehend an in der Peptidchemie übliche Abspaltungsbedingungen angelehnt, um praktisch verwertbare Aussagen über das Verhalten der Schutzgruppen machen zu können.

I. Acidolyseversuche

Die acidolytische Spaltung von Thioäthern folgt der Reaktionsgleichung



und wird unter den hier angewandten $\text{S}_{\text{N}}1$ -Bedingungen im wesentlichen durch Acidität des Reaktionsgemischs und Stabilität des gebildeten Carbonium-Ions beeinflusst. Für die Substrate der Reihe B ($\text{R}' = \text{CH}_3$) kommen als Einflussfaktoren noch das Verhältnis von Substitution: Eliminierung sowie die Basizität und Polymerisationstendenz des Olefins hinzu.



Die Stabilität der freigesetzten Carbonium-Ionen sowie die Basizität und Polymerisationstendenz des eliminierten Olefins wird hierbei durch Elektronendonatoren

innerhalb der Schutzgruppe $\text{C}-\text{R}'$ bzw. des korrespondierenden Olefins $\text{C}=\text{CH}_2$

erhöht, während das Verhältnis Substitution: Eliminierung von weiteren, den Energieinhalt des Olefins bestimmenden Grössen abhängt.

1 *Acidolyse mit TFA*. Abb. 1 gibt die Resultate der Substituentenreihe A in kalter TFA wieder. Die Bzh-Gruppe lässt sich nicht entfernen. Die Abspaltung der Trt-Gruppe führt zu einem Gleichgewicht, welches in weniger als einer Minute erreicht wird und bei 25% Spaltung liegt. Die Dmb-Verbindung wird anfangs zu nur etwa 2% gespalten. Nach einer auf einen autokatalytischen Prozess hindeutenden Inkubationsperiode von ca 40 Minuten steigt die Abspaltung langsam an. Offenbar dienen hier die freigesetzten Dmb-Gruppen als Kationenfänger und verschieben laufend das anfangs erreichte Gleichgewicht.

Die von Photaki⁷ ermittelten Spaltungsraten für diese Cystein-S-Äther stimmen gut mit unseren Ergebnissen überein.

Bei der acidolytischen Abspaltung von N- und S-Schutzgruppen hat sich vielfach^{7, 12, 36} der Zusatz von Phenol oder Anisol bewährt, welches die bei der Abspaltung gebildeten Kationen wahrscheinlich durch Friedel-Crafts-Alkylierung abfängt. Die Ergebnisse zeigen, dass Anisolzusatz die Abspaltungsgeschwindigkeit der Bzh- und Dmb-Gruppe deutlich anhebt, während die Gleichgewichtslage bei der Trt-Gruppe etwas erniedrigt wird. Insgesamt folgt die Reaktivitätsabstufung innerhalb beider Versuchsreihen der Abb. 1 der Stabilität der Kationen $^\oplus\text{CR}''\text{R}'''$.

Nach König¹² lassen sich mit siedender TFA und Anisolzusatz die Bzh-Gruppe in 15 bis 30 Minuten und die Dmb-Gruppe in etwa 10 Minuten vollständig abspalten, während die Trt-Gruppe praktisch unangegriffen bleibt.

Entsprechend Abb. 2 liefern auch die Substituenten der Reihe B in kalter TFA niedrige Umsatzgeschwindigkeiten und Spaltungsraten. Im Verlaufe der Messungen

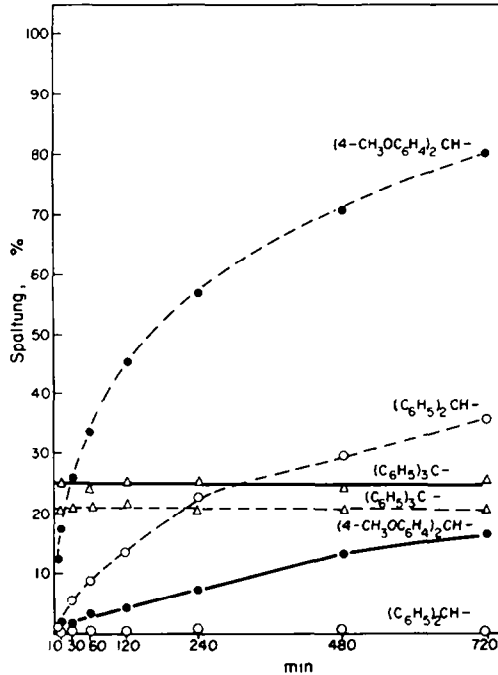


ABB 1. Acidolyse von S-Arylalkylgruppen mit TFA bei 20°; Reihe A; (— Messwerte ohne, ---- Messwerte mit Anisolzusatz)

scheiden sich aus diesen Lösungen Niederschläge oder Öle ab, die auf Polymerisation des primär gebildeten, deprotonierten Kations und irreversible Verschiebung des Gleichgewichtes hindeuten. Die Abspaltungsgeschwindigkeit wird hier somit durch die Polymerisationsgeschwindigkeit bestimmt, welche aus der Basizität des Olefins resultiert. Die Reaktivitätszunahme entspricht daher der wachsenden Donatorwirkung der Substituenten im Olefin. Auch in siedender TFA gelingt die Abspaltung dieser Substituenten nur schwierig.¹²

2 *Acidolyse mit HBr/Eisessig.* Wie in TFA entsprechen auch hier für Reihe A die Reaktivitätsabstufungen den bekannten Substituenteneinflüssen $\text{Trt} > \text{Dmb} > \text{Bzh}$ (Abb. 3), wobei die Reaktionsgeschwindigkeiten und Abspaltungsraten bei HBr wesentlich höher liegen. Etwa übereinstimmend mit l.c.⁷ wird die Tritylverbindung in weniger als einer Minute zu 85%, die Dmb-Verbindung in 60 Minuten zu 30% gespalten. Zusatz von Anisol beeinflusst nur die Spaltung der Dmb-Verbindung positiv und führt nach 60 Minuten zu einer Spaltung von 75%. Wird Anisol durch Phenol ersetzt, so steigt die Spaltungsrate nach 40 Minuten auf 85%. Daneben wurde in dieser Messreihe vor allem bei den schnell und weitgehend spaltenden Verbindungen nach Erreichen des Maximalwertes eine kontinuierliche Abnahme des SH-Gehaltes der Reaktionsmischungen beobachtet. Wir führen dies auf Acylierung des Cysteinschwefels durch das Spaltungsreagens, bei Vorliegen von $\text{CH}_3\text{—O}$ -Substituenten innerhalb der S-Schutzgruppe auch auf irreversible Alkylierung durch Methylbromid zurück, welches unter diesen Bedingungen durch Ätherspaltung gebildet werden kann. Es wurden daher bei diesen Spaltungen niemals echte Gleichgewichte, sondern

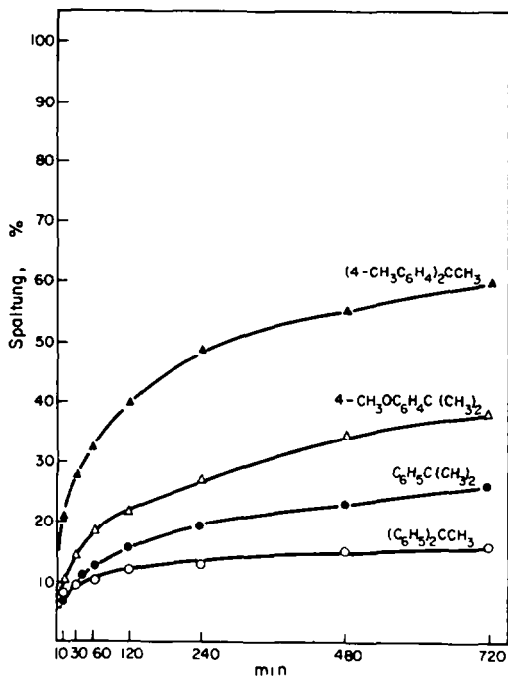


ABB 2. Acidolyse von S-Arylalkylgruppen mit TFA bei 20°; Reihe B

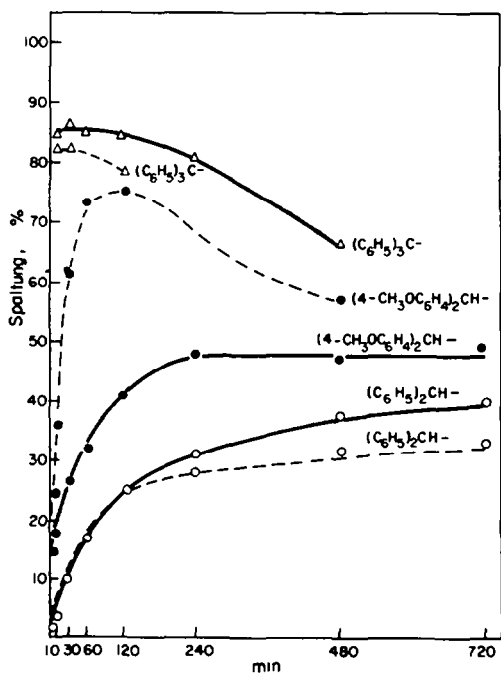


ABB 3. Acidolyse von S-Arylalkylgruppen mit 5.5 m HBr/Eisessig bei 20°; Reihe A; (— Messwerte ohne, ---- Messwerte mit Anisolzusatz)

höchstens stationäre Zustände erreicht, bei denen sich die Geschwindigkeiten der Haupt- und Nebenreaktionen die Waage halten.

Durch Reduzierung der HBr-Konzentration auf 0.2 m (Tabelle 2) wird bei einer Spaltungsrate der Trt-Gruppe von ca 80%⁷ in einer Minute und absoluter Stabilität der Benzhydryl-Gruppe ein erheblicher Rückgang der SH-Acylierung bewirkt.

TABELLE 2. ACIDOLYSE VON S-ÄRYLALKYLGRUPPEN MIT 0.2 m HBr/EISSESSIG BEI 20°; REIHE A (ABSPALTUNG IN %)

Substituent	5	10	30	60	120	240	480	Min.
Trityl-	79.0	79.0	78.8	78.5	77.6	75.7	71.8	
4,4'-Dimethoxybenzhydryl-	22.0	24.4	25.8	27.8	31.7	38.5	45.0	
Benzhydryl-	0.5	0.5	0.6	0.7	0.8	1.3	2.4	

Nach Abb. 4 besitzen auch die Olefinbildner der Reihe B in 5.5 m HBr/Eisessig durchweg höhere Reaktivität als in TFA (vgl. Abb. 2), wobei auch Gleichgewichtszustände entstehen, die mit Ausnahme der α,α -Dimethyl-4-methoxy-benzyl-Verbindung bereits innerhalb der ersten Minuten erreicht werden.

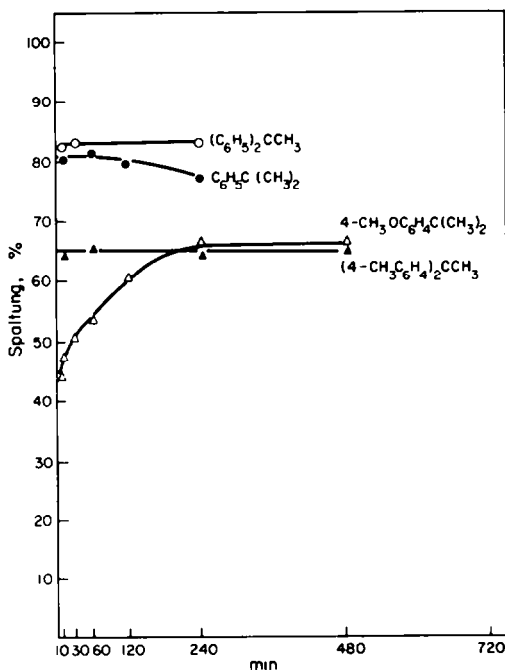


ABB 4. Acidolyse von S-Ärylalkylgruppen mit 5.5 m HBr/Eisessig bei 20°; Reihe B

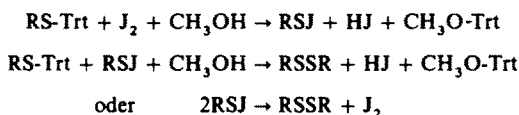
Im Gegensatz zu den Reaktionen in TFA sind keine Anzeichen für eintretende Polymerisationen vorhanden, da alle Reaktionslösungen homogen blieben und auch keine Verschiebung der Gleichgewichte nach höheren Spaltungsraten bei längerer Säureeinwirkung eintritt. Bemerkenswert ist, dass die im Gleichgewicht erhaltenen

Abspaltungsraten hier in umgekehrter Reihenfolge liegen wie die in Abb. 2 angeführten Vergleichswerte mit TFA. Dies könnte so gedeutet werden, dass bei Wegfall von Polymerisationen die Olefin-Basizität nunmehr das Ausmass der Rückreaktion mit R-SH und damit die Gleichgewichtslage bestimmt. Das Gleichgewicht muss dann entsprechend der Abstufung in Abb. 4 umso weiter auf der Seite des ungespaltenen Thioäthers liegen, je basischer das der Schutzgruppe entsprechende Olefin ist.

Da alle Acidolysereaktionen komplexen Charakter besitzen, war eine kinetische Auswertung durch Erfassung nur eines Reaktionspartners nicht möglich.

II. Jodolyseversuche

Kamber und Rittel¹¹ fanden, dass sich die Trt-Gruppe vom Cysteinschwefel oxydativ durch Jod in Methanol nach wahrscheinlich folgendem Reaktionsverlauf abspalten lässt:



Die Reaktion wird durch Austritt eines stabilen Trt-Kations mit anschliessender Bildung des Sulfenyljodids ermöglicht.

Um das Verhalten weiterer S-Schutzgruppen unter diesen Bedingungen kennenzulernen, haben wir von den synthetisierten S-Arylalkyl-Derivaten entsprechend Tabelle 3 die Spaltungsgeschwindigkeit gemessen.

TABELLE 3. JODOLYSE VON S-ARYLALKYLGRUPPEN MIT JOD IN METHANOL/WASSER (9:1) BEI 20°; MOLVERHÄLTNIS 1:1 IN 0.1 M LÖSUNG (ABSPALTUNG IN %)

Substituent	Reihe									k Min. [l·Mol ⁻¹ ·Min ⁻¹]
		5	10	30	60	120	240	480		
Tryl-	A	92.7	96.1	100						15.0 ± 5.0
4,4'-Dimethoxy- benzhydryl-	A	90.2	92.6	97.5	100					8.4 ± 3.0
α,4,4'-Trimethyl- benzhydryl-	B	85.5	90.7	96.8	99.0	100				6.14 ± 0.60
α,α-Dimethyl- 4-methoxybenzyl-	B	82.0	85.2	89.8	91.0					3.78 ± 0.60
α-Methyl-benzhydryl-	B	63.5	64.7	68.7	72.6	78.8	85.1	90.6		0.167 ± 0.015
α,α-Dimethyl- benzyl-	B	54.9	58.0	61.9	66.7	73.7	80.1	86.6		0.110 ± 0.012
Benzhydryl-	A	10.0	12.5	17.5	22.4	28.1	34.6	40.0		—

Die Abspaltungsgeschwindigkeit steigt hier weitgehend parallel mit der Stabilität der freigesetzten Arylalkyl-carboniumionen, also der Donatorwirkung der Substituenten [⊕]CR'R''R''', an. Die angeführten k-Werte liessen sich graphisch gut unter Zugrundelegung eines Geschwindigkeitsgesetzes 2. Ordnung aus den in Tabelle 3 nur auszugsweise wiedergegebenen Zeit-Umsatzraten ableiten.

III. Diskussion der Ergebnisse

Die meisten der hier untersuchten Spaltungen sind komplexe Reaktionen. Teilweise treten echte Gleichgewichte auf, daneben Zustände, in denen sich Hin- und Neben-

reaktionen zeitweise die Waage halten sowie vorgelagerte Gleichgewichte mit Folge-reaktionen. Eine detaillierte quantitative Beschreibung dieser Systeme ist daher nicht ohne weiteres möglich. Alle Versuche wurden in enger Anlehnung an die in der Peptidchemie üblichen Standardbedingungen ausgeführt. Deshalb lassen sich auch unter dem Vorbehalt, dass nur Modellversuche vorliegen, für die Peptidsynthese allgemein gültige Aussagen machen.

Acidolyseversuche. Alle Spaltungen in kalter TFA (Abb. 1 und 2) liefern äusserst langsame bzw. unvollständige Umsätze bei wenig differenziertem Verhalten der einzelnen Substituenten, so dass eine praktische Anwendung kaum in Betracht kommt. Wie Zervas⁷ und König¹² zeigten, kann die Reaktionszeit durch Temperaturerhöhung verkürzt werden, doch schädigt siedende TFA biologisch aktive Peptide stark.^{9,38} In 5·5 m HBr/Eisessig ist bei allen hochaktiven Vertretern: Trt (Abb. 3, Reihe A) sowie α -Methylbenzhydryl, α,α -Dimethyl-benzyl (Abb. 4, Reihe B) in wenigen Minuten ein Gleichgewicht erreicht, das etwa bei 80% liegt. Präparativ dürften sich hier quantitative Spaltungsraten durch kurzzeitige Wiederholung der HBr-Einwirkung erreichen lassen, niemals jedoch durch Verlängerung der Reaktionszeit, welche nur die SH-Acylierung begünstigen würde. Gute Selektivität besteht zwischen den genannten Gruppen bei Reaktionszeiten < 5 Minuten und der Bzh-Gruppe.

Bei Verdünnung des Spaltreagens auf 0·2 m (Tabelle 2) wird die Tritylgruppe nicht merklich langsamer zu 80% abgespalten und völlige Selektivität zur Bzh-Gruppe erreicht. Leider lässt sich bei keinem der heute in der Literatur bekannten Verfahren eine quantitative und schonende Abspaltung der Bzh-Gruppe^{7,8,12,39} erzielen. Eventuell könnte sie durch die Dmb-Gruppe ersetzt werden, welche unter den Bedingungen der Trt-Abspaltung (5·5 m HBr, ohne Anisol, < 1 Minute) nur wenig angegriffen, jedoch durch 5·5 m HBr mit Anisolzusatz in 60 Minuten zu 75% (Abb. 3), mit Phenol in 40 Minuten zu 85% abgelöst wird und auch jodolytisch (Tabelle 3) gut entfernbar ist.

Jodolyseversuche. Geeignete S-Schutzgruppen für die Jodolyse sind ausser der Trt-Gruppe die beiden nächsten Vertreter aus Tabelle 3: Dmb und $\alpha,4,4'$ -Trimethylbenzhydryl. Mit gewissen Einschränkungen der Selektivität lassen sich die Trt- und Dmb-Gruppe in Gegenwart der Bzh-Gruppen spalten. Letztere wird in der dazu erforderlichen Zeit von 10 bis 30 Minuten zu ca 10 bis 20% oxydiert. Die Abspaltung der Bzh-Gruppe selbst gelingt auch jodolytisch nur unvollständig. Versuche, die jodolytische Abspaltung der Bzh-Gruppe in Anlehnung an Hiskey's Rhodanalyse-Bedingungen⁸ durch Zusatz von TFA/Eisessig zu katalysieren, brachten keine wesentliche Verbesserung der Resultate.

Wegen der wenig befriedigenden Eigenschaften der S-Bzh-Gruppe sollte für die stufenweise selektive Deblockierung von Cystein-SH-Gruppen mehr die Kombination von S-Alkyl-mercapto-Gruppen (1. Deblockierungsschritt) mit den hier als besonders acidolyse- oder jodolyseaktiv ausgewiesenen Resten (2. Deblockierungsschritt) erwogen werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Darstellung der Substrate

(a) N-Acetyl-L-cystein-methylamid

N,N'-Diacetyl-L-cystin-bis-(dicyclohexylammoniumsalz). Aus N,N'-Diacetyl-L-cystin⁴⁰ und Dicyclohexylamin in Methanol/Äther. Ausb. 58·5% d.Th. Schmp. 184–189°.

N,N'-Diacetyl-L-cystin-bis-(cyanmethylester). 6.87 g (10 mMol) *N,N'*-Diacetyl-L-cystin-bis-(dicyclohexylammoniumsalz) wurden im Verlauf von 3 Std. bei -10 bis -15° in eine Mischung aus 11.0 g (146 mMol) Chloracetoneitril und 4.15 ml (30 mMol) Triäthylamin eingetragen und nach einer weiteren Stunde die Kühlung entfernt. Nach 24 Std. bei Zimmertemperatur wurde mit 145 ml Essigester und 135 ml verd. HCl (1:15) geschüttelt und vom ausgeschiedenen Dicyclohexylammoniumchlorid abgesaugt. Das Salz wurde 5mal mit Essigester ausgewaschen, die wässrige Phase noch 2mal mit Essigester extrahiert und die vereinigten Essigester-Lösungen nacheinander mit verd. HCl (1:15), verd. KHCO_3 -Lösung und NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 und Abdampfen des Lösungsmittels im Vak. wurde aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 2.22 g (55% d.Th.) Schmp. 124 – 125° ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$ (402.32) Ber: C, 41.79; H, 4.51; N, 13.93; S, 15.91; Gef: C, 41.81; H, 4.86; N, 13.36; S, 15.67%).

N,N'-Diacetyl-L-cystin-bis-(methylamid). 11.66 g (29 mMol) *N,N'*-Diacetyl-L-cystin-bis-(cyanmethylester) in 100 ml wasserfreiem THF wurden unter Eiskühlung mit einer Lösung von 2.0 g (64 mMol) Methylamin in 20 ml THF und 0.18 ml (3 mMol) Eisessig als Katalysator versetzt. Nach einer Stunde unter Kühlung und 4 Tagen bei Raumtemp. wurde abgesaugt, wobei das Produkt als Gel anfiel, mit THF, THF/Petroläther (1:1; 1:3) und Petroläther gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Ausb. 8.6 g (85% d.Th.) Schmp. 273 – 274° $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 78.5^\circ$ ($c = 1.0$, H_2O)⁴¹

S,S'-Quecksilber-bis-(*N*-acetyl-L-cystein-methylamid). Die Reduktion von 5.26 g (15 mMol) *N,N'*-Diacetyl-L-cystin-bis-(methylamid) wurde mit Na in ca 500 ml flüssigem NH_3 durchgeführt, bis die Blaufärbung ungefähr 10 Minuten bestehen blieb. Durch Zugabe von 2.40 g NH_4Cl wurde entfärbt und NH_3 unter schwachem N_2 -Strom abdampfen lassen. Nach Trocknen über konz. H_2SO_4 im Vak. wurde die Substanz mit 75 ml wasserfreiem Methanol bei 40° eluiert und von den anorganischen Salzen unter N_2 abgefrittet. Zur Reinigung wurde darus nach Zahn⁴¹ das *S,S'*-Quecksilber-bis-(*N*-acetyl-L-cystein-methylamid) hergestellt. Ausb. 7.53 g (91% d.Th.) Schmp. 271° (Zers.). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 28.0^\circ$ ($c = 1.0$, Ameisensäure)⁴¹.

N-Acetyl-L-cystein-methylamid. In eine Suspension von 9.45 g *S,S'*-Quecksilber-bis-(*N*-acetyl-L-cystein-methylamid) in 180 ml Methanol wurde unter Rühren langsam trockener H_2S eingeleitet. Nach 4 Std. wurde unter N_2 vom HgS abgesaugt, mit Methanol nachgewaschen und das Lösungsmittel im Vak. unter N_2 bei 30° abdestilliert. Ausb. 6.05 g (100% d.Th.) Nach Umkristallisieren aus Methanol: Schmp. 193 – 200.5° . $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 35.0^\circ$ ($c = 1.0$, H_2O)⁴¹ ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (176.17) Ber: C, 40.90; H, 6.87; N, 15.90; S, 18.17; Gef: C, 40.89; H, 7.02; N, 15.20; S, 17.63%). Jodometrische Titration ergab 100 Mol-% SH.

(b) Arylalkylthioäther

Die Arylalkylthioäther wurden nach der allgemeinen Vorschrift von König u.a.¹² aus *N*-Acetyl-L-cystein-methylamid und dem entsprechenden Carbinol oder Olefin hergestellt. Die nach dem Abdestillieren der Säure im Vak. bei 40° zurückbleibenden Öle wurden in 100–150 ml Essigester aufgenommen und nacheinander mit NaHCO_3 - und NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel im Vak. entfernt und die Rückstände aus Essigester/Äther bzw. Essigester/Petroläther und Methanol/Wasser umkristallisiert.

2. Durchführung der Kinetik-Versuche

(a) Acidolyse der Arylalkylthioäther

Als Messverfahren wählten wir die spektralphotometrische SH-Bestimmung mit 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagens⁴²), weil bei dieser Reaktion kaum Störungen durch im Reaktionssystem vorhandene Stoffe zu erwarten waren. Durch Blindversuche wurde ausgeschlossen, dass unter den Messbedingungen eine Reaktion zwischen Substrat und DTNB eintritt. Ferner wurden Eichkurven unter Verwendung von umkristallisiertem und jodometrisch kontrolliertem *N*-Acetyl-L-cystein-methylamid in Gegenwart der aus den Acidolyse-Ansätzen resultierenden Salzmengen an CF_3COONa und CH_3COONa bzw. NaBr und CH_3COONa aufgenommen und dabei nachgewiesen, dass diese Salze die SH-Bestimmung nicht stören. Die Extinktionsmessungen erfolgten an Lösungen vom pH-Wert 8 (m/15 Phosphatpuffer⁴³) mit 40% Methanol als Lösungsvermittler bei 412 nm. Der für die photometrische Bestimmung günstigste SH-Gehalt lag zwischen 0.02 und 0.25 μMol je 5 ml Lösung.

Acidolyse mit Trifluoressigsäure. 1 mMol Substrat wurde in 0.55 ml wasserfreiem Eisessig gelöst, mit N_2 gespült, 30 Minuten auf 20° thermostatiert und mit 3.45 ml (45 mMol) thermostatisierter, wasserfreier Trifluoressigsäure ($t = 0$) gemischt. Nach Zeitabständen von 1, 2, 5, 10, 30, 60, 120, 240, 480 und 720 Minuten wurden Proben von 0.1 ml in 10 ml-Masskolben gefüllt, in welchen die zur Unterbrechung der Reaktion erforderliche Menge von 0.605 ml 2 n NaOH vorgelegt war. Die Masskolben wurden mit 5 ml Methanol und Phosphat-Puffer pH = 8,⁴³ der ausserdem zur Stabilisierung der SH-Lösungen 0.03 Mol/l Äthyl-

TABELLE 4. PHYSIKALISCHE DATEN UND ANALYSEN DER DARGESTELLTEN ARYLALKYL-THIOÄTHER

R in Ac—Cys—NHCH ₃ R	Rein- Ausb.	Schmp.	$[\alpha]_D^{25}$	Summenformel (Mol.-Gew.)		C%	Analysen		S%
							H%	N%	
Trityl-	63%	180.5–182.5°	+ 13.3°(a)	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₂ S (418.57)	Ber. Gef.	71.74 71.69	6.26 6.54	6.69 6.99	7.66 7.51
α,4,4'-Trimethyl- benzhydryl-	50%	160–162.5°	+ 14.7°(a)	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂ S (384.55)	Ber. Gef.	68.71 68.56	7.34 7.39	7.29 7.08	8.34 8.55
4,4'-Dimethoxy- benzhydryl-	50%	117–123°	– 6.6°(a)	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₄ S (402.43)	Ber. Gef.	62.67 62.55	6.51 6.57	6.96 6.89	7.95 7.93
α-Methyl-benzhydryl-	61%	136–138°	+ 13.2°(a)	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂ S (356.41)	Ber. Gef.	67.39 67.38	6.79 6.93	7.86 8.14	8.98 9.03
Benzhydryl-	74%	156–158.5°	– 8.8°(a)	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₂ S (342.38)	Ber. Gef.	66.65 66.70	6.48 6.41	8.18 8.28	9.35 9.26
α,α-Dimethyl-4- methoxybenzyl-	56%	123–125.5°	– 13.7°(b)	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O ₃ S (324.37)	Ber. Gef.	59.24 59.06	7.46 7.62	8.64 8.51	9.86 9.83
α,α-Dimethyl-benzyl-	84%	143–144.5°	– 17.9°(b)	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂ S (294.34)	Ber. Gef.	61.20 60.46	7.53 7.61	9.52 9.38	10.87 10.68

(a): c = 5.0, Methanol.

(b): c = 5.0, Chloroform.

endiamintetraacetat⁴⁴ enthielt, beschickt, mit 2 n NaOH auf pH 7·8–8 eingestellt und mit Puffer bis zur Marke aufgefüllt.

Bei der Versuchsreihe mit Anisol wurde der Reaktionslösung vor der Trifluoressigsäure-Zugabe 0·652 ml (6 mMol) Anisol zugesetzt. Für die Neutralisation der Probenahmen waren 0·52 ml 2 n NaOH erforderlich.

Acidolyse mit 5·5 m HBr/Eisessig. 1 mMol Substrat wurde in 1·52 ml Eisessig gelöst und nach Thermostatieren auf 20·0° mit 6·66 ml thermostatierter 6·75 m HBr/Eisessig-Lösung (Bromgehalt <0·01 %) versetzt. Die resultierende Lösung enthielt 45 mMol HBr je mMol Substrat bei 5·5 Mol HBr/l Lösung. Es wurden Proben von 0·2 ml entnommen, für deren Neutralisation etwa 0·81 ml 4 n NaOH in 10 ml-Masskolben vorgelegt wurden.

In der Versuchsreihe mit Anisol wurden vor der HBr/Eisessig-Zugabe 0·652 ml (6 mMol) als Kationenfänger zugesetzt. Für den Reaktionsabbruch in den Proben wurden 0·72 ml 4 n NaOH vorgelegt. Hier wie bei den Substraten mit CH₃O-Gruppen durfte zur Vermeidung von Nebenreaktionen nur bis zu einem pH von 6–7 neutralisiert und erst kurz vor der SH-Bestimmung mit NaOH auf pH 7·5–8 eingestellt werden.

Acidolyse mit 0·2 m HBr/Eisessig. 1 mMol Substrat wurde in 1·22 ml Eisessig gelöst und nach Thermostatierung auf 20·0° im 50 ml-Masskolben mit 0·205 m HBr/Eisessig-Lösung aufgefüllt, das entspricht 10 mMol HBr je mMol Substrat. In den üblichen Zeitabständen wurden Proben von 1·0 ml entnommen, unter Kühlung zu 3·0 ml 5 n NaOH und 4 ml Methanol gegeben und nach Einstellen auf pH 7·5–8 der SH-Gehalt gemessen.

(b) Jodolyse der Arylalkylthioäther

Das bei dieser Reaktion entstehende N,N'-Diacetyl-L-cystin-bis-(methylamid) wurde polarographisch durch Auswerten der Disulfidstufenhöhe bestimmt. In einer Reihe von Vorversuchen wurde nachgewiesen, dass sich weder die Substrate polarographisch reduzieren lassen, noch dass die entsprechenden Carbinole oder deren Folgeprodukte unter den Messbedingungen durch Reaktion mit J₂, HJ und Methanol die polarographische Disulfidbestimmung stören. Die Halbstufenpotentiale von S₂O₃²⁻, J⁻ und S₄O₆²⁻ fallen nicht mit dem Halbstufenpotential der Disulfidstufe zusammen.

1 mMol Substrat wurde im 10 ml-Masskolben in 1·72 ml Methanol gelöst und bei 20·0° thermostatiert. Mit 8·0 ml 0·125 m J₂-Lösung in Methanol/H₂O 87·5:12·5 wurde bis zur Marke aufgefüllt, so dass die resultierende Lösung 1 mMol J₂ und 10% H₂O als Lösungsvermittler enthielt. Zu den üblichen Zeiten wurden Proben von 0·2 ml in 10 ml-Masskolben gegeben, die zwecks Abfangen des J₂-Überschusses zur Reaktionsunterbrechung 0·4 ml n/10 Na₂S₂O₃-Lösung enthielten, und mit Leitelektrolyt (Phosphatpuffer mit 33% Isopropanol, pH = 7·06) aufgefüllt.

Die polarographischen Messungen wurden (Gerät OH 102 der Firma Radelkis, Budapest) unter folgenden Bedingungen ausgeführt: Tropfelektroden Durchmesser 0·05 mm, Tropfgeschwindigkeit 3 Sekunden je Tropfen, Empfindlichkeit 8 · 10⁻⁸, Temperatur 25°, Bereich 0 bis -2 V Als Bezugs elektrode diente eine gesättigte Kalomelektrode.

LITERATUR

- ¹ H. C. Beyerman und J. S. Bontekoe, *Rec. Trav. chim.* **81**, 691 (1962)
- ² F. M. Callahan, G. W. Anderson, R. Paul und J. E. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 201 (1963)
- ³ R. H. Sifferd und V. du Vigneaud, *J. Biol. Chem.* **108**, 753 (1935)
- ⁴ J. L. Wood und V. du Vigneaud, *Ibid.* **130**, 109 (1939)
- ⁵ C. Berse, R. Boucher und L. Piché, *J. Org. Chem.* **22**, 805 (1957)
- ⁶ S. Akabori, S. Sakakibara, Y. Shimonishi und Y. Nobuhara, *Bull. Chem. Soc. Japan* **37**, 433 (1964)
- ⁷ I. Photaki, J. Taylor-Papadimitriou, C. Sakarellos, P. Mazarakis und L. Zervas, *J. Chem. Soc. (C)* 2683 (1970)
- ⁸ R. G. Hiskey und M. A. Harpold, *Tetrahedron* **23**, 3923 (1967)
- ⁹ R. W. Hanson und H. D. Law, *J. Chem. Soc.* 7285 (1965)
- ¹⁰ R. G. Hiskey, T. Mizoguchi und E. L. Smithwick jr., *J. Org. Chem.* **32**, 97 (1967)
- ¹¹ B. Kamber und W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **51**, 2061 (1968)
- ¹² W. König, R. Geiger und W. Siedel, *Chem. Ber.* **101**, 681 (1968)
- ¹³ Th. Wieland und A. Sieber, *Liebigs Ann.* **722**, 222 (1969)
- ¹⁴ P. J. E. Brownlee, M. E. Cox, B. O. Handford, J. C. Marsden und G. T. Young, *J. Chem. Soc.* 3832 (1964)
- ¹⁵ G. F. Holland und L. A. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3765 (1958)

- ¹⁶ R. G. Hiskey und J. T. Sparrow, *J. Org. Chem.* **35**, 215 (1970)
- ¹⁷ D. F. Veber, J. D. Milkowski, R. G. Denkwalter und R. Hirschmann, *Tetrahedron Letters* 3057 (1968)
- ¹⁸ B. Kamber, *Helv. Chim. Acta* **54**, 927 (1971)
- ¹⁹ F. Weygand, W. Steglich, I. Lengyel und F. Fraunberger, *Chem. Ber.* **99**, 1932 (1966)
- ²⁰ E. Schnabel, J. Stoltefuss, H. A. Offe und E. Klauke, *Liebigs Ann.* **743**, 57 (1971)
- ²¹ M. Sokolovsky, M. Wilchek und A. Patchornik, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1202 (1964)
- ²² L. Zervas, I. Photaki und N. Ghelis, *Ibid.* **85**, 1337 (1963)
- ²³ I. Photaki, *J. Chem. Soc. (C)* 2687 (1970)
- ²⁴ R. G. Hiskey, T. Mizoguchi und T. Inui, *J. Org. Chem.* **31**, 1192 (1966)
- ²⁵ St. Guttman, *Helv. Chim. Acta* **49**, 83 (1966)
- ²⁶ N. Inukai, K. Nakano und M. Murakami, *Bull. Chem. Soc. Japan* **40**, 2913 (1967)
- ²⁷ U. Weber und P. Hartter, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**, 1384 (1970)
- ²⁸ H. Zahn und G. Schmidt, *Liebigs Ann.* **731**, 91, 101 (1970)
- ²⁹ W. Lunkenheimer und H. Zahn, *Ibid.* **740**, 1 (1970)
- ³⁰ J. C. Sheehan und D.-D. H. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1158 (1958)
- ³¹ D. Fleš, A. Markovac-Prpić und V. Tomašić, *Ibid.* **80**, 5654 (1958)
- ³² R. G. Hiskey, R. A. Upham, G. M. Beverly und W. C. Jones, jr., *J. Org. Chem.* **35**, 513 (1970)
- ³³ H. Zahn und W. Danho, H. Klostermeyer, H. G. Gattner und J. Repin, *Z. Naturforsch.* **24b**, 1127 (1969)
- ³⁴ L. Zervas, I. Photaki, A. Cosmatos und D. Borovas, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4922 (1965)
- ³⁵ I. Photaki, *Ibid.* **88**, 2292 (1966)
- ³⁶ S. Sakakibara, Y. Shimonishi, M. Okada und Y. Kishida, in H. C. Beyerman et al., *Peptides*, Proc. 8th Europ. Peptide Sympos. Noordwijk, Sept. 1966, S. 44. North-Holland, Amsterdam (1967)
- ³⁷ R. G. Hiskey, A. M. Thomas, R. L. Smith und W. C. Jones, jr., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 7525 (1969)
- ³⁸ A. Previero, M.-A. Coletti-Previero und L.-G. Barry, *Biochim. Biophys. Acta* **181**, 361 (1969)
- ³⁹ R. G. Hiskey, G. W. Davis, M. E. Safdy, T. Inui, R. A. Upham und W. C. Jones, jr., *J. Org. Chem.* **35**, 4148 (1970)
- ⁴⁰ R. Marshall, M. Winitz, S. M. Birnbaum und J. P. Greenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4538 (1957)
- ⁴¹ H. Zahn und W. Sroka, *Mh. Chem.* **98**, 745 (1967)
- ⁴² G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70 (1959)
- ⁴³ *Tabellenbuch Chemie* VEB Dutscher Verlag für Grundstoffindustrie, S. 317 Leipzig (1968)
- ⁴⁴ R. T. Louis-Ferdinand und G. C. Fuller, *J. Pharm. Sci.* **58**, 1155 (1969); K. Hofmann, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **250**, 256 (1970)