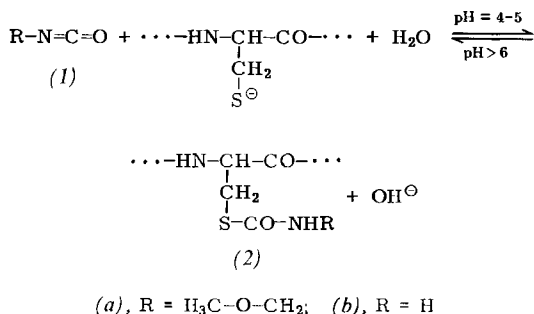


N-Methoxymethyl-*S*-carbamoyl-Derivat (*2a*) des Cysteins ist bis pH=6 ausreichend stabil (s. Tabelle 1). Im Vergleich dazu beträgt die Halbwertszeit des unsubstituierten *S*-Carbamoyl-Derivates (*2b*) aus Cyanat und Cystein nur etwa 10 min bei 25 °C und pH=6^[2].



Methyl-, Äthyl- und tert.-Butyl-isocyanat reagieren bei pH=4–7 in wäßrigem Milieu nur sehr langsam und sind daher wenig geeignet.

Die Deblockierung der SH-Funktion unter Abspaltung der *N*-Methoxymethyl-carbamoyl-*S*-Schutzgruppe gelingt leicht und unter schonenden Bedingungen im alkalisch-wäßrigen Milieu (s. Tabelle 1). Bei pH=9.6 ist die Abspaltung vom Cystein nach 30 min, vom Glutathion nach 60 min vollständig.

Tabelle 1. Abspaltung der Schutzgruppe aus Cystein (Cys) und Glutathion (GSH) bei Raumtemperatur.

pH	t [min]	SH-Freisetzung [%]	
		Cys	GSH
9.6	30	100	80
8.6	100	100	55
7.6	100	67	20
6.0	180	2	1.5

Methoxymethyl-isocyanat (*1a*) wurde als Schutzgruppe zur reversiblen Blockierung der SH-Funktion in Cystein, Glutathion, Papain und selektiv an Cys¹⁴-Cys³⁸ reduziertem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen^[3] eingesetzt.

Die enzymatische Aktivität von Papain wurde durch Reaktion von Methoxymethyl-isocyanat mit der reaktiven Thiolgruppe von Cys²⁵ augenblicklich blockiert. Die proteolytische Aktivität des bei pH = 5.6 inaktivierten Enzyms ließ sich durch Inkubation bei pH = 8.8 und 20 °C innerhalb von 60 min zu 50% regenerieren.

Die beiden SH-Gruppen der selektiv mit Natriumtetrahydridoborat im Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen reduzierten Disulfidbrücke^[3] lassen sich unter den beschriebenen Bedingungen quantitativ mit (*1a*) umsetzen. Der zweifach *S*-carbamoylierte Inhibitor ist gegenüber Trypsin vollständig inaktiv. Die Abspaltung der SH-Schutzgruppen bei pH=9.5 und 20 °C in Gegenwart von Glycylglycin und die anschließende Oxidation der benachbarten Thiolgruppen zur Disulfidbrücke unter Sauerstoffzutritt beim gleichen pH-Wert regenerieren die Aktivität des Inhibitors innerhalb von 60 min vollständig.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

1 µmol Peptid oder Protein wurde in 0.5 ml 0.2 M Natrium-succinat-Puffer (pH=4.0) gelöst und pro mol Cystein 350 µmol Methoxymethyl-isocyanat (*1a*)^[4], gelöst in Dimethylformamid [50 µl (*1a*) in 150 µl DMF], bei Raum-

temperatur unter Rühren zugefügt. Bei gleichzeitiger leichter CO₂-Entwicklung erfolgt innerhalb von 2 min quantitative Umsetzung. Es wird noch 3 min bis zur vollständigen Zersetzung des Reagens gerührt und anschließend die Lösung zur Abtrennung der Reaktionsprodukte und Puffersalze der Gelfiltration an Sephadex G-15 oder Bio Gel P-2 in 10-proz. Essigsäure unterworfen. Das *N*-Methoxymethyl-*S*-carbamoyl-Derivat (*2a*) kann in saurer Lösung oder aus saurer Lösung lyophilisiert aufbewahrt werden. Mit NaBH₄ unter Stickstoff reduzierte Disulfidbrücken können direkt im Reaktionsansatz nach Abstumpfen der zur Zerstörung des überschüssigen Reduktionsmittels verwendeten Säure bei pH=4 mit (*1a*) umgesetzt werden. – Papain wird bei pH=5.6 gelöst und mit nur 20 statt 350 µmol (*1a*) versetzt.

Zur Abspaltung der SH-Schutzgruppe werden 1 µmol geschütztes Peptid oder Protein in 0.5 ml 0.1 M Tris/HCl-Puffer (pH=9.5) gelöst, 1 mg Glycylglycin als Cyanatfänger zugesetzt und die Lösung 60 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Vermeidung unerwünschter Reoxidationen der SH-Gruppen ist die Abspaltung unter Stickstoff durchzuführen.

Eingegangen am 18. Juni 1973 [Z 863]

[1] G. E. Means u. R. E. Feeney: Chemical Modification of Proteins. Holden-Day, San Francisco 1971.

[2] G. R. Stark, W. H. Stein u. S. Moore, J. Biol. Chem. 235, 3177 (1960); G. R. Stark, ibid. 239, 1411 (1964).

[3] L. F. Kress u. M. Laskowski, Sr., J. Biol. Chem. 242, 4925 (1967).

[4] Der Bayer AG, Leverkusen, danken wir für eine Probe.

[2 + 2]-Photocycloadditionen mit Phenanthren – mechanistische Modelle für Zweistufenprozesse^[**]

Von Gerd Kaupp^[*]

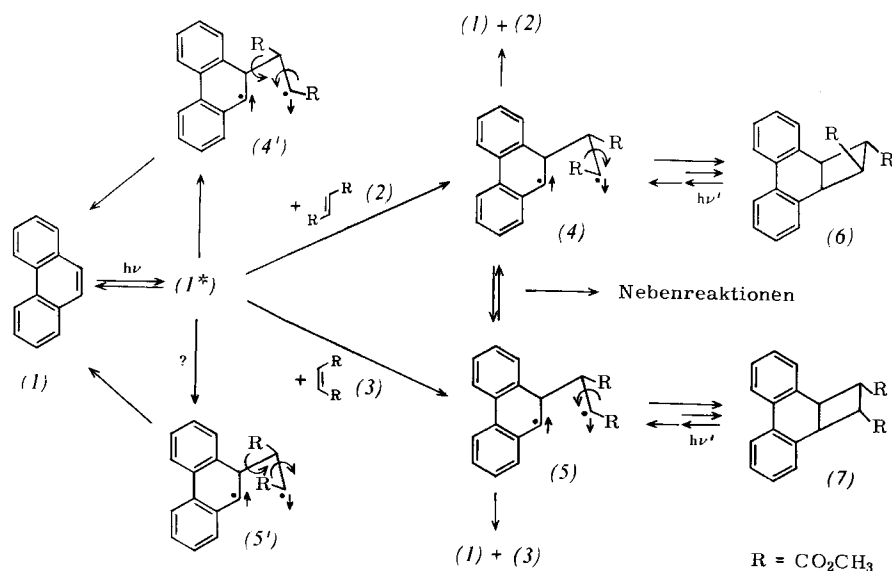
Das anhaltende Interesse an konzertierten Singulett- sowie Triplett-Photocycloadditionen^[1] und der experimentelle Nachweis kinetisch wirksamer Zwischenprodukte bei intramolekularen Modellen^[2] legen mechanistische Entscheidungen auch bei intermolekularen Beispielen nahe. Wir berichten jetzt über experimentelle Ergebnisse an einem typischen Modellsystem (Fluoreszenz, selektive Anregung, keine komplizierende *cis/trans*-Isomerisierung) für nicht stereospezifische [2π + 2π]-Photoadditionen. Mangelnde Stereoselektivität spricht für Zwischenprodukte mit internen Rotationen, jedoch sind zusätzliche Daten notwendig, um dem Postulat konkurrierender supra- und antarafacialer Additionen^[1] zu begegnen. Hierzu sind die Photoadditionen von Phenanthren (*1*)^[3] mit Malein- (*3*) und Fumarsäuredimethylester (*2*) zu (*6*) und (*7*) geeignet^[4]. Das Ergebnis wurde inzwischen durch Annahme von Exciplexen^[5,6] (elektronisch angeregten π-Komplexen mit der Möglichkeit zur Lumineszenz) sowie nicht synchroner Triplettmechanismen^[6] gedeutet. Dagegen führt eine Kombination von Ausbeute-, Quantenausbeute- und Lumineszenzmessungen unter Zuhilfenahme von Molekülmodellen zu einem Verständnis des kaum variierenden (*6*):(*7*)-Verhältnisses (s. Tabelle 1) auf der Grundlage eines zweistufigen Singulettmechanismus^[4] entsprechend dem Formelschema.

[*] Dr. G. Kaupp
Chemisches Laboratorium der Universität
78 Freiburg, Albertstraße 21

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Für den formulierten Singulettmechanismus sind die folgenden Befunde relevant:

1. Die Lebensdauer der Phenanthren-Fluoreszenz ($\phi_F = 0.13$) ist mit $57.5 \text{ ns}^{[7]}$ verhältnismäßig groß.
2. Die Phenanthren-Fluoreszenz wird von (2) und (3) ($4.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$; Benzol) zu 92 bzw. 48% gelöscht^[4].
3. Die Reaktion mit (3) wird von Sauerstoff nicht verlangsamt, sondern beschleunigt.
4. Die von Phenanthren sensibilisierte Isomerisierung der Olefine (2) und (3) ist in Benzol verhältnismäßig langsam und verläuft in beiden Richtungen (s. Tabelle 1).
5. In Äthylbromid, welches die Bildung von Triplett-Phenanthren begünstigt (die Phenanthren-Fluoreszenz ist in Äthylbromid 12-mal schwächer als in Benzol), tritt neben Bildung von (6) und (7) eine schnelle Umwandlung (3) → (2) ein (s. Tabelle 1).



Neben den Lösdaten und dem präparativ wichtigen Sauerstoffeinfluß belegen Ausmaß und Richtung der sensibilisierten *cis/trans*-Isomerisierungen, daß unter den experimentellen Bedingungen eine Spinumkehr im elektronisch angeregten Phenanthren kaum zum Zuge kommt, wenn diese nicht durch äußere Schweratomeffekte beschleunigt wird. Das in allen Fällen praktisch gleiche (6):(7)-Verhältnis^[8] belegt eine – nach Molekülmodellen plausible – gegenseitige Umwandlung der Zwischenprodukte (4) und (5). Hierfür spricht auch eine scheinbare Diskrepanz: Die Anfangsquantenausbeuten sind für die Reaktionen von Phenanthren mit (2) und (3) innerhalb der Fehlergrenze

gleich [$\phi = 0.010$; $4.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$ (2) oder (3); Benzol; N_2], obwohl (2) die Phenanthren-Fluoreszenz viel wirkungsvoller löscht als (3) (siehe oben). Ein Vergleich der sensibilisierten Olefin-Isomerisierungen unter Standardbedingungen (s. Tabelle 1) zeigt jedoch, daß (2) schneller isomerisiert als (3).

Offenbar bildet Fumarsäureester (2) bei nahezu gleicher Annäherungsgeometrie mit elektronisch angeregtem Phenanthren zwei isomere Zwischenprodukte (4) und (4'), wobei die Fluoreszenzfähigkeit verlorengeht^[9]. Das *syn*-Zwischenprodukt (4'), welches bestenfalls (6), jedoch nicht (7) bilden könnte, zerfällt dann wieder zu Phenanthren und (2) oder (3), weil durch partielle Rotation um die neu gebildete σ -Bindung – auch im Einklang mit Molekülmodellen – die sterische Hinderung und gleichzeitig die Orbitalüberlappung der radikalischen Zentren abnimmt. Die Reaktion mit (3) erfordert nicht die wenig

plausible Annahme von (5'). Bei den *anti*-Rotameren (4) und (5) ist die Orbitalüberlappung für die Vierringbildung zu (6) bzw. (7) günstiger (vgl. auch^[2]), jedoch überwiegt der Zerfall zu (1) und (2) bzw. (1) und (3), wie die geringen Quantenausbeuten zeigen.

Zur weiteren Sicherung des Formelschemas dienen die Belichtungen von (6) ($F_p = 114^\circ\text{C}$)^[10] und (7)^[11] ($F_p = 116^\circ\text{C}$). Aus (6) (Anregung der längstwelligen Absorptionsbande) bildet sich Phenanthren schneller als aus (7) (s. Tabelle 2), und bei partiellem oder weitgehendem Umsatz von (6) läßt sich – im Einklang mit dem Zwischenproduktmechanismus – chromatographisch (7) isolieren.

Tabelle 1. Selektive Belichtung von 1.12 mmol Phenanthren (1) in Gegenwart von 11.2 mmol (2) oder (3) [a].

Olefin	Lösungsmittel [ml]	(1) Umsatz [%]	(6) Ausb. [%]	(7) Ausb. [%]	(2)/(3) [b]
(2)	Benzol, 250	34	17.5	11.5	93/7
(3)	Benzol, 250	31	18	12	5.5/94.5
(2)	Benzol, 50	55	20	13.5	87/13
(3)	Benzol, 50	50	29	19	8/92
(3)	Benzol, 50 [c]	89	44	29	5/95
(3)	$\text{C}_2\text{H}_5\text{Br}$, 50	81	33	22	>99/1

[a] Quecksilber-Hochdrucktauchlampe Hanau Q-81; Wertheimer UVW-55-Filterglas [% Transmission: <1 ($\lambda = 315 \text{ nm}$); 12.5 (334); 31 (365); <1 (410)]; N_2 ; 20°C ; 12 h; Anthracen-Verunreinigungen im Phenanthren werden durch Belichtung konzentrierter Lösungen, Filtration und Sublimation entfernt.

[b] Nach Reaktionsabbruch.

[c] Bei Durchleiten von Sauerstoff.

Tabelle 2. 313-nm-Belichtung von 10^{-3} mol/l (6) und (7) [a]; Ausbeute an Phenanthren (1) [b] und Quantenausbeute Φ [c].

Reaktionsmedium	Ausb. (1) [%] Φ aus (6)	Ausb. (1) [%] Φ aus (7)
CH ₃ CN/N ₂	95 0.75	82 0.45
CH ₃ CN/O ₂	96 0.8	80 0.4
1.0 mol/l <i>trans</i> -Piperylen in CH ₃ CN/N ₂	92 0.75	67
C ₂ H ₅ Br/N ₂	50 0.45	35

[a] Bandpass 4.8 nm; 20°C

[b] UV-Analyse nach vollständigem Umsatz.

[c] Phenanthren-Bildung bis etwa 30% Umsatz.

Weitere Hinweise geben die unterschiedlichen Fluoreszenz-Intensitäten [(6): $\Phi_F=0.015$; (7): $\Phi_F=0.15$; Cyclohexan/N₂; 20°C; $\lambda_{fl}^{max}=313, 326, 337$ Sch, 355 Sch, 375 Sch; Stokesche Verschiebung: 4 nm] und Photolyse-Geschwindigkeiten [(6) schneller als (7)] bei -190° (Äther/Alkohol-Glas)^[12]. Da demnach bei den Photoreversionen – trotz konkurrierender Lumineszenz – keine wesentlichen thermischen Aktivierungsbarrieren auftreten, wird erneut deutlich, daß stufenweise Mechanismen mit möglichst geringer geometrischer und chemischer Änderung bei jedem Teilschritt zutreffen, und es ist zu schließen, daß die *cis*-disubstituierte Vierringbindung in (6) zuerst gespalten wird [vgl. (7)].

Auch die Photoreversionen verlaufen ohne vorübergehende Multiplizitätsänderung, wie Quantenausbeute- und Ausbeute-Messungen unter variierten Bedingungen zeigen (s. Tabelle 2):

1. Sauerstoff hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Quantenausbeuten und Phenanthrenausbeuten.
2. Der übliche Triplettlöcher *trans*-Piperylen vermindert die Bildungsgeschwindigkeit von Phenanthren aus (6) fast nicht; eine Verlangsamung der Phenanthrenbildung aus (7) ist wegen verminderter Produktausbeute zu erwarten.
3. In Äthylbromid wirkt kein günstiger Schweratomeffekt für die Phenanthrenbildung: Verminderte Anfangsgeschwindigkeit und verminderte Ausbeute laufen parallel.

Es wird angenommen, daß die Rotameren (4) und (5) [auch (4')] teilweise von zugesetzten oder während der Reaktion entstehenden Stoffen zu den uneinheitlichen (wahrscheinlich polymerisierenden) Nebenprodukten abgefangen werden, weil Phenanthren unter den Bestrahlungsbedingungen auch bei verlängerter Belichtung stabil ist. Die Ergebnisse zeigen, daß sehr verschiedene Beobachtungen, welche nach der Methode der Potentialhyperflächen offenbar nicht vorausberechnet werden können^[13], auf empirisch-experimenteller Grundlage zusammenhängend verständlich sind^[14]. Die Versuche legen nahe, Variationen von Anfangsquantenausbeuten unter dem Einfluß von Triplettlöchern oder von möglichen Schweratomeffekten nur dann im Sinne von Triplettmechanismen zu deuten, wenn nicht zugleich die Produktausbeute beträchtlich variiert.

Eingegangen am 19. Juni 1973 [Z 865]

[1] R. B. Woodward u. R. Hoffmann: Die Erhaltung der Orbitalsymmetrie, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1972; N. D. Epiotis, J. Amer. Chem. Soc. 94, 1941 (1972).

[2] G. Kaupp, Angew. Chem. 83, 361 (1971); Angew. Chem. internat. Edit. 10, 340 (1971); Chimia 25, 230 (1971); Angew. Chem. 84, 259 (1972); Angew. Chem. internat. Edit. 11, 313 (1972); Liebigs Ann. Chem. 1973, 844.

[3] Weitere Beispiele bei T. Miyamoto, T. Mori u. Y. Odaira, Chem. Commun. 1970, 1598.

[4] Vorgetragen auf der gemeinsamen Tagung VÖCh-GDCh (Mai 1972) in Wien [G. Kaupp, Allg. Prakt. Chem. 23, 80 (1972)] sowie auf dem IV. IUPAC-Symposium on Photochemistry (Juli 1972) in Baden-Baden [Manuscripts of Contributed Papers: Nr. 32, S. 110 (1972)].

[5] S. Farid, J. C. Doty u. J. L. R. Williams, J. C. S. Chem. Commun. 1972, 711; bei nicht völlig selektiver Belichtung mit 350-nm-Fluoreszenzlampen (Rayonet- oder Gräntzel-Reaktor) fanden auch wir säurelabile 1:1-Addukte; demgegenüber schließt die Verwendung von Wertheimer UVW-55-Filterglas eine Anregung von (2) und (3) aus.

[6] R. A. Caldwell, J. Amer. Chem. Soc. 95, 1690 (1973).

[7] I. B. Beriman: Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules. Academic Press, New York 1971.

[8] Auch in Acetonitril – 4.5% Umwandlung (3) → (2) – werden (6) und (7) im Verhältnis 3:2 erhalten.

[9] Mit hochgereinigtem Phenanthren und (2) oder (3) konnte neben der verbleibenden Monomer-Fluoreszenz keine langwellige Exciplex-Lumineszenz nachgewiesen werden.

[10] NMR (CDCl₃), (6): $\tau=1.95-2.4$ (2 H, m); 2.55–3.1 (6 H, m); 5.55–6.45 (4 H, m); 6.25 (3 H, s); 6.50 (3 H, s); (7): $\tau=1.95-2.25$ (2 H, m); 2.5–2.8 (6 H, m); 5.7–5.9 (2 H, AA'BB'); 6.23 (6 H, s); 6.45–6.65 ppm (2 H, BB'AA'); die stark strukturierten UV-Spektren von (6) und (7) sind nahezu deckungsgleich; beide Addukte sind bis mindestens 230°C (24 h) stabil.

[11] D. Bryce-Smith u. B. Vickery, Chem. Ind. (London) 1961, 429.

[12] Unter diesen Bedingungen konkurriert ein gelbgrünes Nachleuchten.

[13] Herrn Professor L. Salem und Herrn Professor N. D. Epiotis danke ich sehr für diesbezügliche Mitteilungen.

[14] Über weitere Beispiele und Anwendungen soll später berichtet werden.

CIDNP-Nachweis einer photokatalysierten C–C-Spaltung bei der UV-Bestrahlung von Glykolaldehyd in wäßriger Lösung

Von Karl-Gerhard Seifert und Joachim Bargon^[*]

Glykolaldehyd (1) kann als einfachster Zucker und Modell für Aldosen angesehen werden. Sein photochemisches Verhalten ist daher von Interesse in der Biochemie.

Wir haben (1) in wäßriger Lösung photolysiert und die Produkte anhand der chemisch induzierten dynamischen Kernspin-Polarisation (CIDNP)^[1] untersucht. Da sich (1) in Wasser im Gleichgewicht mit zwei dimeren Formen und seinem Hydrat befindet, ist das ¹H-NMR-Spektrum ziemlich komplex: der monomere Aldehyd liegt so nur zu 4% vor^[2] und verursacht die schwachen Resonanzlinien bei $\delta=9.7$ (Formyl-H) und 4.5 ppm (Methylen-H)^[3a].

Während der UV-Bestrahlung^[3b] einer neutralen Lösung von (1) in D₂O im aufgeböhrten Probenbehälter eines

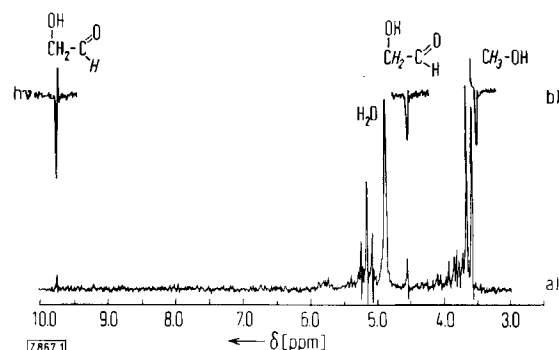


Abb. 1. a) ¹H-NMR-Spektrum von (1) in D₂O; b) CIDNP-Spektrum von (1) während der UV-Bestrahlung.

[*] Dr. K.-G. Seifert und Dr. J. Bargon ^[**]
Molecular Physics Department, IBM Research Laboratory
San Jose, California 95193 (USA)

[**] Korrespondenzautor.