

Tafel 3. Derivate des 1.3.4-Thiodiazols

Verbindung	Herstellung	Charakteristik	Analyse
Hydrochlorid	Aus Äther mit Chlorwasserstoff	Sehr hygroskopische, leicht sublimierbare Kristalle	$C_2H_2N_2S \cdot HCl$ (122.6) Ber. HCl 29.84 Gef. HCl 29.59
Hydrobromid	Aus Äther mit Bromwasserstoff	Leicht sublimierbare Kristalle (nicht hygroskopisch)	$C_2H_2N_2S \cdot HBr$ (167.0) Ber. N 16.78 Gef. N 17.01
Pikrat	Aus Äther oder Benzol mit Pikrinsäure	Zitronengelbe Nadeln, Schmp. 98° (Zers.)	$C_2H_2N_2S \cdot C_6H_3O_7N_3$ (315.4) Ber. N 22.22 Gef. N 22.12
Methojodid	Mit Methyljodid (1 Mol.) in wenig Methanol, 3 Stdn., 100–120°. Ausb. quantitativ	Farblose Kristalle, Schmp. 240–241° (Zers., aus Methanol-Wasser)	$C_2H_2N_2S \cdot CH_3J$ (228.1) Ber. N 12.28 Gef. N 11.97
Additionsverbindung mit Silbernitrat	Aus der wäBr. Lös. mit Silbernitrat nach 20–30 Min.	Feinkristallin, Schmp. 169° (Zers.)	$C_2H_2N_2S \cdot AgNO_3$ (256.0) Ber. Ag 42.14 Gef. Ag 42.40
Quecksilber-(II)-chlorid	Aus Wasser mit Quecksilberchloridlösung	Lange, glänzende Nadeln, Schmp. 124 bis 126° (Zers.)	$C_2H_2N_2S \cdot HgCl_2$ (357.6) Ber. N 7.83 Gef. N 7.93

220. Friedrich Weygand, Rolf Geiger und Ursula Glöckler: *N*-Trifluoracetyl-aminosäuren, VI. Mitteil.¹⁾: Spaltung von Peptiden nach Trifluoracetylierung der Peptidbindung²⁾

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin-Charlottenburg]

(Eingegangen am 21. März 1956)

Peptide werden durch Trifluoressigsäure-anhydrid nicht nur an der Aminogruppe, sondern z. Tl. auch an der Peptidbindung trifluoracetyliert. Daneben findet Bildung von unsymmetrischen oder symmetrischen Anhydriden statt. Durch Hydrolyse mit Wasser wird hauptsächlich das *N*-trifluoracetylierte Ausgangspeptid erhalten, es findet aber auch Spaltung der Peptidbindung statt. So liefert z. B. ein Tripeptid neben dem *N*-TFA-Tripeptid die drei Bausteine und die beiden zu erwartenden Dipeptide in *N*-trifluoracetylierter Form. Durch milde alkalische Hydrolyse erhält man daraus die freien Aminosäuren und Peptide, die nach den üblichen Verfahren getrennt und bestimmt werden können. Da Prolinpeptide an der Peptidbindung keinen acylierbaren Stickstoff enthalten, sind sie auf die neue Weise nicht spaltbar. Auf die mögliche Bedeutung dieser Tatsache zur Isolierung von Prolin- und Hydroxyprolin-dipeptiden aus Proteinen wird hingewiesen.

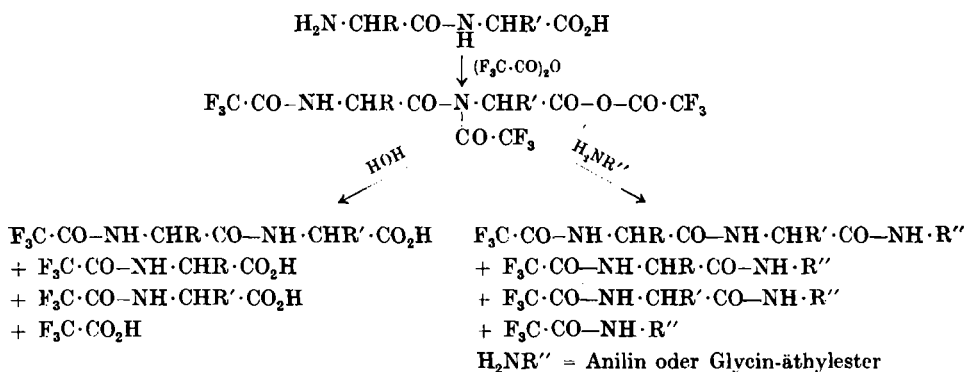
Obwohl die Hauptbedeutung der *N*-TFA-Aminosäuren auf synthetischem Gebiet liegt, ist vielleicht vom analytischen Standpunkt aus nicht ohne Inter-

¹⁾ V. Mitteil.: F. Weygand u. U. Glöckler, Chem. Ber. 89, 653 [1956].

²⁾ z. Tl. vorgetragen von F. Weygand in München, Regensburg und Berlin (31. 1., 1. 3., 9. 3. und 12. 3. 1956).

esse, daß durch Trifluoracetylierung der Peptidbindung und nachfolgende Hydrolyse mit Wasser eine Peptidspaltung bewirkt werden kann.

Eine solche Reaktion wurde aufgefunden, als wir Glycyl-glycin mit 4 Moll. Trifluoressigsäure-anhydrid in Trifluoressigsäure bei 40° behandelten, die flüchtigen Verbindungen i. Vak. abdestillierten und den Rückstand mit Anilin zur Reaktion brachten. Es ließ sich nicht nur *N*-TFA-Glycyl-glycin-anilid neben Trifluoracetanilid isolieren, sondern auch *N*-TFA-Glycinanilid. Mit Wasser an Stelle von Anilin entstand neben *N*-TFA-Glycyl-glycin und Trifluoressigsäure auch *N*-TFA-Glycin. Die Spaltung des an der Peptidbindung trifluoracetylierten Peptids kann auch mit einem Aminosäureester vorgenommen werden, wodurch neue *N*-TFA-Peptide gebildet werden. So ergibt das mit einem Überschuß an Trifluoressigsäure-anhydrid behandelte *N*-TFA-Glycyl-DL-alanin mit Glycin-äthylester neben dem Hauptprodukt *N*-TFA-Glycyl-DL-alanyl-glycin-äthylester auch *N*-TFA-Glycyl-glycin-äthylester und *N*-TFA-Alanyl-glycin-äthylester sowie *N*-TFA-Glycin-äthylester. Der Nachweis dieser vier Verbindungen geschah nach alkalischer Abspaltung der Trifluoracetylreste und Verseifung papierchromatographisch. Im nachfolgenden Schema sind die erwähnten Reaktionen an einem Dipeptid formuliert.



Diese Reaktionsfolgen erinnern an Versuche von M. Bergmann, V. du Vigneaud und L. Zervas³⁾, die vom *N,N'*-Diacetyl-2.5-dioxo-piperazin einmal den Acetylrest auf andere Aminosäuren übertragen konnten und weiterhin durch Alkoholyse in Gegenwart von Arginin (als Base) zunächst *N,N'*-Diacetyl-glycyl-glycin-äthylester erhielten, der mit einem weiteren Mol. Arginin in Alkohol *N*-Acetyl-glycyl-glycin-äthylester lieferte. Weiterhin konnte der diacylierte Peptidester leicht mit einem Mol. Lauge in *N*-Acetyl-glycin gespalten werden.

Gegenüber diesen Versuchen, die im Hinblick auf die Peptidspaltung nicht von allgemeiner Bedeutung sind, weil der Acetylrest nicht ohne Spaltung

³⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **62**, 1909 [1929]. Vergl. hierzu auch die Arbeit von T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang u. H. Rau, Liebigs Ann. Chem. **583**, 129 [1953], über die Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten.

von Peptidbindungen entfernbar ist, besitzt unsere neue Methode den Vorteil, daß die Spaltpeptide leicht durch milde alkalische Hydrolyse erhältlich sind⁴⁾, worauf die üblichen Methoden zur Peptidtrennung (Papierchromatographie, Chromatographie an Ionenaustauschersäulen, Elektrophorese) angewandt werden können. Es ist daher vielleicht möglich, über die Spaltung der an den Peptidbindungen trifluoracetylierten Peptide eine neue Methode zur Sequenzanalyse von Aminosäuren, zumindest in kürzeren Peptiden, auszu- arbeiten.

Bevor die Spaltungsrate von Peptiden quantitativ ermittelt wurde, unter- suchten wir zunächst qualitativ die Spaltung von zwei Tripeptiden und einem Tetrapeptid. Die Peptide wurden in Trifluoressigsäure-anhydrid unter Rück- fluß erhitzt, nach Abdestillieren des Überschusses an Trifluoressigsäure-anhy- drid und der gebildeten Trifluoressigsäure i. Vak. wurde mit Dioxan-Wasser (2:1) bei Zimmertemperatur hydrolysiert, dann mit verd. wäßrigem Ammoniak die N-TFA-Reste abgespalten, i. Vak. zur Trockne gebracht und papier- chromatographiert. Glycyl-glycyl-alanin gab neben dem Ausgangspeptid Glycyl-glycin, Glycyl-alanin, Glycin und Alanin. Dieses wurde in stärkerem Maße abgespalten als Glycin. Nach der Spaltung von Leucyl-glycyl-glycin ließ sich leicht Glycyl-glycin und Glycin nachweisen, folglich müssen die beiden anderen Spaltprodukte Leucyl-glycin und Leucin, die sich nicht gut trennten, ebenfalls vorhanden sein. Nach der dreimal hintereinander vor- genommenen Acylierung und Hydrolyse des Tetrapeptids Isoleucyl-glycyl- valyl-alanin wurden neben dem Ausgangspeptid alle Spaltprodukte durch Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie erfaßt: Isoleucin, Glycin, Valin und Alanin (dieses vorherrschend), ferner die Dipeptide Isoleucyl- glycyl-glycin, Glycyl-valin und Valyl-alanin sowie die Tripeptide Isoleucyl-glycyl- valin und Glycyl-valyl-alanin.

Um zu ermitteln, zu welchem Betrag die Peptidbindungen gespalten wer- den, wurden quantitative Versuche unter den gleichen Reaktionsbedingungen vorgenommen (Ausführung s. Versuchsteil). Die bisherigen Ergebnisse zeigt die folgende Tafel.

Quantitative Spaltungsversuche an der Peptidbindung
trifluoracetylierter Peptide

Peptid	Ileu-gly	Ala-gly	Gly-gly	Gly-val	Gly-ala	Gly-prol
Spaltung in Mol% .	4.1 (3.8*, 4.5**)	7.8	3.0; 2.9	5.5	27.2; 36.1	0
Peptid	Val-ala	Phen-ala	Gly-ser	Ala-ser		
Spaltung in Mol% .	7.0	1.5	5.8	12.7		
Peptid	Leu-gly-gly			Gly-val-ala		
	in Leu + Gly-gly, in Leu-gly + Gly			in Gly + Val-ala, in Gly-val + Ala		
Spaltung in Mol% .	3.6		7.0		1.4	
					4.9	

*) nach der ersten Trifluoracetylierung i. Vak. eingedampft und ohne Hydrolyse noch zweimal nachtrifluor- acetyliert.

**) in Anwesenheit von Äther trifluoracetyliert.

4) Vergl. hierzu die früheren Mitteilungen dieser Reihe.

Wie zu erwarten war, wird Glycyl-prolin auf die neue Weise nicht gespalten, da an der Peptidbindung kein durch den Trifluoracetylrest ersetzbarer Wasserstoff vorhanden ist. Dies bietet vielleicht die Möglichkeit, aus Peptidketten die Prolin- und Hydroxyprolin-dipeptide (Aminosäure-Prolin bzw. Aminosäure-Hydroxyprolin) bzw. Peptide mit der Konstitution Aminosäure-prol-prol oder analoge Verbindungen mit Hydroxyprolin durch häufige Wiederholung der Spaltungsreaktion als solche zu isolieren.

Weiter ergibt sich aus der Tafel, daß die Spaltungsraten im allgemeinen gering sind, was auf zweierlei Ursachen zurückgeführt werden kann. Einmal kann die Hydrolyse der trifluoracetylierten Peptidbindung mit Wasser vorzugsweise zum Peptid und zu Trifluoressigsäure führen. Andererseits kann aber auch die Peptidbindung nur teilweise trifluoracetyliert worden sein. Über den ersten Punkt können wir auf Grund früherer Versuche etwas aussagen. Bei der kürzlich angegebenen neuartigen Peptidsynthese aus dem symmetrischen *N*-TFA-Glycin-anhydrid mit Dicyclohexylamin in Alkohol⁵⁾ tritt als Zwischenprodukt das Bis-*N,N'*-trifluoracetyl-glycyl-glycin-dicyclohexylaminsalz auf, das mit Alkohol zu rund 85 % in *N*-TFA-Glycyl-glycin-dicyclohexylaminsalz und Trifluoressigsäure-äthylester aufspaltet. In den Mutterlaugen findet sich *N*-TFA-Glycin-dicyclohexylaminsalz. Eine „Peptidspaltung“ kann bei dieser Synthese also höchstens zu 15 % d. Th. stattgefunden haben. Um über den zweiten Punkt etwas zu erfahren, wurde folgendermaßen vorgegangen. Es wurden die zu untersuchenden Verbindungen zunächst mit Trifluoressigsäure-anhydrid trifluoracetyliert, sodann wurde i. Vak. eingedampft und durch zweimaliges Nachdestillieren von Benzol jede freie Trifluoressigsäure entfernt. Nach Hydrolyse in Dioxan-Wasser bei Zimmertemperatur wurde mit verd. Natronlauge gegen Methylrot titriert. Bei drei Estern zeigte sich, daß die Peptidbindung nur teilweise trifluoracetyliert wird. Es ergab sich beim *N*-TFA-Glycin-äthylester die Bildung von 0.21 Moll. Bis-*N,N'*-trifluoracetyl-glycin-äthylester, beim *N*-TFA-Valyl-alanin-äthylester 0.42 Moll. Diacylverbindung und beim *N*-TFA-Glycyl-valyl-alanin-äthylester 0.55 Moll. Diacylverbindung, wobei in den beiden zuletzt genannten Fällen außer der Peptidbindung auch noch die *N*-TFA-Aminogruppe weiter trifluoracetyliert sein kann, wie es beim *N*-TFA-Glycin-äthylester der Fall ist. Bei den nicht veresterten *N*-TFA-Peptiden sind die Ergebnisse weniger eindeutig, weil noch die Möglichkeit zur Bildung von unsymmetrischen oder symmetrischen Anhydriden besteht. Ohne Berücksichtigung der am Stickstoff trifluoracetylierten Gruppierungen entstehen aus einem unsymmetrischen Anhydrid bei der Hydrolyse mit Wasser 2 Moll. Säure, aus einem symmetrischen Anhydrid aber nur 1 Mol. Säure pro Mol. eingesetzten Peptids. *N*-TFA-Glycin gibt nach der geschilderten Behandlung 1.06 Moll. Säure, d. h. es liegt im wesentlichen nach der Trifluoracetylierung das symmetrische Anhydrid vor. Vom *N*-TFA-Glycyl-glycin ausgehend, werden 2.4 Moll. Säure titriert, was bedeutet, daß das unsymmetrische Anhydrid entsteht und daß die Peptidbindung und die *N*-TFA-Aminogruppierung zusam-

⁵⁾ F. Weygand u. M. Reiher, Chem. Ber. 88, 26 [1955].

men zu etwa 0.4 Moll. trifluoracetyliert wurden. Wieder anders verhält sich Valyl-alanin, denn es werden 1.23 Moll. Säure titriert. Es muß im wesentlichen als symmetrisches Anhydrid vorliegen. Phenylalanyl-alanin gibt 1.25 Moll. titrierbare Säure und nach dem Erhitzen mit Trifluoressigsäure-anhydrid im Rohr (2 Stdn. auf 60°) nur unwesentlich mehr (1.35 Moll.).

Beim Valyl-alanin haben wir noch untersucht, ob während der Trifluoracetylierung eine Spaltung in Azlactone vor sich geht. Da die Azlactone i. Vak. leicht flüchtig sind¹⁾, hätten sie beim Eindampfen in den Destillaten aufgefunden werden müssen, was nicht der Fall war.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.

Der Research Corporation, New York, danken wir für eine Spende, Hrn. Prof. H. Zahn, Heidelberg, für die Überlassung der untersuchten Serin-peptide.

Beschreibung der Versuche

1. Behandlung von Glycyl-glycin mit einem Überschuß an Trifluoressigsäure-anhydrid in Trifluoressigsäure und Aminolyse mit Anilin: 0.903 g (6.85 mMol) Glycyl-glycin wurden in 4.5 ccm Trifluoressigsäure gelöst und mit 4.5 ccm (30.6 mMol) Trifluoressigsäure-anhydrid versetzt. Dann wurde 15 Min. an einem Rückflußkühler, der mit einem P_2O_5 -Rohr verschlossen war, im Ölbad auf 60° (Badtemperatur) erwärmt und anschließend Trifluoressigsäure-anhydrid und Trifluoressigsäure i. Vak. in eine mit Trockeneis-Aceton gekühlte Vorlage destilliert. Der Rückstand wurde mit 5 ccm Tetrahydrofuran und 2 ccm Anilin 10 Min. gekocht und nach dem Erkalten in 30 ccm 2*N*HCl gegossen. Hierbei fiel zunächst unreines *N*-TFA-Glycyl-glycin-anilid (A) vom Schmp. 170–190° aus, später noch 0.101 g Trifluoracetanilid (B) vom Schmp. 85–90°.

A wurde aus 40 ccm Äthanol umkristallisiert, Ausb. an *N*-TFA-Glycyl-glycin-anilid vom Schmp. 225° 0.770 g. Die Mutterlauge wurde eingedampft und der Rückstand in heißem Benzol gelöst. Der darin unlösliche Anteil ergab nach dem Auskochen mit wenig Äthanol und Abkühlen nochmals 0.106 g *N*-TFA-Glycyl-glycin-anilid vom Schmp. 220 bis 221°. Beim Erkalten der Benzol-Lösung schieden sich 0.120 g einer Substanz vom Schmp. 169° (C) ab, die nach dem Umkristallisieren aus Wasser bei 175° schmolz und mit *N*-TFA-Glycin-anilid vom Schmp. 177°²⁾ keine Schmelzpunktserniedrigung gab. Das benzolische Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand nach Behandlung mit Kohle aus Wasser umkristallisiert: 0.49 g Trifluoracetanilid vom Schmp. und Misch-Schmp. 90°. Es wurden also erhalten:

Trifluoracetanilid 0.591 g (3.13 mMol)

N-TFA-Glycyl-glycin-anilid 0.876 g (2.90 mMol)

N-TFA-Glycin-anilid 0.120 g (0.49 mMol)

Zur Analyse wurde das *N*-TFA-Glycyl-glycin-anilid nochmals aus viel Äthanol umkristallisiert, Schmp. 230°.

$C_{12}H_{12}O_3N_3F_3$ (303.2) Ber. C 47.53 H 3.99 N 13.86 Gef. C 47.58 H 4.15 N 14.10

2. Behandlung von Glycyl-glycin mit Trifluoressigsäure-anhydrid in Trifluoressigsäure und Hydrolyse mit Wasser: 0.547 g (4.38 mMol) Glycyl-glycin wurden in 5 ccm Trifluoressigsäure gelöst und mit 2.6 ccm (17.7 mMol) Trifluoressigsäure-anhydrid in der unter 1. beschriebenen Weise auf 60° erwärmt. Anschließend wurden Trifluoressigsäure-anhydrid und Trifluoressigsäure i. Vak. abdestilliert. Das zurückgebliebene Öl wurde in der Hitze mit wenig Wasser behandelt, bis es sich gelöst hatte, das Wasser i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in Äthanol aufgenommen und von einer Trübung abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand mit Äther ausgezogen, in dem das *N*-TFA-Glycyl-glycin schwer, das *N*-TFA-Glycin aber leicht löslich ist. Ausb. an unlöslichem *N*-TFA-Glycyl-glycin 0.632 g

¹⁾ F. Weygand u. E. Leising, Chem. Ber. 87, 248 [1954].

(63.3% d. Th.), Schmp. 180° (Sintern ab 176°), Schmp. Lit. 185°⁵). Nach dem Eindampfen der äther. Lösung hinterblieben 0.299 g öliges Rückstand, der nach $\frac{1}{2}$ stdg. Verseifung mit halbkonz. Ammoniak mit 90-proz. Methanol papierchromatographiert wurde. Neben Glycyl-glycin war auch eine geringe Menge Glycin vorhanden.

3. Behandlung von Glycyl-DL-alanin mit Trifluoressigsäure-anhydrid in Trifluoressigsäure und Aminolyse mit Glycin-äthylester: 0.212 g (1.35 mMol) Glycyl-DL-alanin wurden in 1.5 ccm Trifluoressigsäure mit 1.0 ccm Trifluoressigsäure-anhydrid (6.8 mMol), wie unter 1. beschrieben, behandelt. Nach dem Abdestillieren der Trifluoressigsäure und des Überschusses an Trifluoressigsäure-anhydrid i. Vak. wurde der Rückstand in 1 ccm Tetrahydrofuran aufgenommen, mit 0.5 ccm Glycin-äthylester (4.8 mMol) versetzt und nach $\frac{1}{2}$ stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur noch kurz auf 70° erwärmt. Von einer geringen Trübung wurde abfiltriert und die Lsg. i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde mit 5 ccm Wasser versetzt, und nach kurzem Erwärmen und Abkühlen wurden die unlöslichen Reaktionsprodukte (A) abfiltriert. N-TFA-Glycin-äthylester wurde durch Waschen mit Benzol entfernt.

Aus der wäßr. Lösung kristallisierte über Nacht eine geringe Menge Substanz vom Schmp. 178–179° (nach Umkristallisieren aus Wasser), die der Analyse nach N-TFA-Glycyl-alanyl-glycin-äthylester darstellte.

$C_{11}H_{16}O_5N_3F_3$ (327.3) Ber. C 40.37 H 4.93 N 12.84 Gef. C 40.11 H 4.92 N 12.93

Der Rückstand A wurde mit 0.5 n Ba(OH)₂ verseift, die Bariumionen wurden mit einem geringen Überschuß an verd. Schwefelsäure gefällt, und nach Abtrennen des Bariumsulfats wurde mit dem schwach basischen Ionenaustauscher Amberlite IR 4B entsäuert. In der Lsg. wurden papierchromatographisch die Peptide Glycyl-glycin, Alanyl-glycin, Glycyl-alanyl-glycin und eine geringe Menge Glycin gefunden.

4. Spaltung von Peptiden durch Trifluoracetylierung und Hydrolyse mit Wasser: Etwa 0.1 mMol Peptid werden in 0.5 ccm Trifluoressigsäure-anhydrid unter Rückfluß (P₂O₅-Rohr) 20 Min. in einem Ölbad (50°) erhitzt. Dann wird i. Vak. zur Trockne gebracht und der Rückstand mit 2 ccm Dioxan + 1 ccm Wasser 30 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen, um die gebildeten Diacylverbindungen und Anhydride zu verseifen.

Soll die Spaltung wiederholt werden, um die Ausb. an Spaltprodukten zu erhöhen, so werden Dioxan, Wasser und gebildete Trifluoressigsäure i. Vak. bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur entfernt, und die beschriebene Prozedur wird beliebig oft wiederholt. Die Flüchtigkeit der N-TFA-Aminosäuren verringert unter diesen Bedingungen die Ausbeute an ihnen nicht merklich.

Die wäßrige-Dioxanlösung wird sodann mit 8 ccm 1 n methanol. Ba(OH)₂ und 8 ccm Wasser versetzt, und nach 10 Min. wird Bariumsulfat durch Zugabe von 8.1 ccm 1 n H₂SO₄ gefällt. Nach Abzentrifugieren des Bariumsulfats wird die überstehende saure Lsg. mit Amberlite IR 4B entsäuert (dieses Vorgehen ist nur bei neutralen oder basischen Aminosäuren und Peptiden angezeigt. Für qualitative orientierende Versuche, bei denen die völlige Entsalzung nicht immer erforderlich ist, genügt es oft, die alkalische Abspaltung der Trifluoracetylgruppe mit halbkonz. Ammoniak vorzunehmen und nach 30 Min. langem Stehenlassen bei Zimmertemperatur Wasser und Ammoniak i. Vak. zu entfernen).

Die neutrale und gegebenenfalls salzfreie Lsg. wird i. Vak. zur Trockne gebracht und für quantitative Bestimmungen in 1 ccm Wasser aufgenommen.

Die Trennung der Spaltstücke erfolgt durch ein- und zweidimensionale Papierchromatographie mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen und durch Hochspannungselektrophorese auf bekannte Weise.

Zur quantitativen Bestimmung der Spaltungsrate von Peptiden wird in Mengen von 2, 5, 10, 15 und 20 cmm auf Papier Schleicher & Schüll 2043b über Nacht aufsteigend mit einem der folgenden Lösungsmittelgemische chromatographiert:

Phenol-Wasser, 80:20 Vol.

n-Butanol-Eisessig-Wasser, 80:20:20 Vol., frisch bereitet

Methanol, 90-proz.

Die zu bestimmenden Aminosäuren oder Peptide werden in den zu erwartenden Konzentrationen, ebenfalls in steigenden Mengen, aufgetragen und ergeben die Eichwerte. Um eine unter den beschriebenen Bedingungen etwa erfolgende Hydrolyse des zu untersuchenden Peptids zu erfassen und von der Spaltungsrate in Abzug bringen zu können, wird das Peptid ohne vorherige Trifluoracetylierung in Dioxan-Wasser unter Zugabe von 1 Tropfen Trifluoressigsäure gelöst, nach 30 Min. mit Bariumhydroxydlösung versetzt, wie die Spaltungsansätze aufgearbeitet und zusammen mit dem gespaltenen Peptid und den zum Vergleich mitlaufenden Aminosäuren und Peptiden chromatographiert. Im allgemeinen ist die Hydrolyse der Peptide unter den Aufarbeitungsbedingungen zu vernachlässigen.

Die Chromatogramme werden nach sorgfältigem Befreien von den Lösungsmitteln durch eine Lösung von 2 g Ninhydrin, 0,075 g Cadmiumchlorid, 6 ccm Wasser, 0,3 ccm Eisessig und 100 ccm Aceton gezogen⁷⁾. Durch 5 Min. langes Erhitzen auf 90° werden die stabilen Farbkomplexe entwickelt. Eine definierte Fläche um die entstandenen Flecken wird ausgeschnitten, der Farbstoff mit 10 ccm Methanol extrahiert und die Extinktion im lichtelektrischen Kolorimeter nach Dr. B. Lange, Berlin, mit Multiflexgalvanometer gemessen. Die Konzentrationen sind der Extinktion proportional. Der Nullwert des Papiers ist zu berücksichtigen. Die Menge der ausschließlich durch Spaltung von Diacylgruppierungen in der Peptidkette entstandenen Aminosäuren bzw. Peptide erhält man nach Abzug der bei der vergleichenden Behandlung durch Hydrolyse entstandenen Verbindungen. Diese Korrekturen sind, wie schon erwähnt wurde, im allgemeinen zu vernachlässigen. Die Ergebnisse zeigt die Tafel, S. 1545.

4. a) Titrationen: Etwa 0,1 mMol Aminosäure, Peptid, *N*-TFA-Aminosäureester oder *N*-TFA-Peptidester werden, wie oben beschrieben, mit 0,5 ccm Trifluoressigsäureanhydrid zur Reaktion gebracht. Dann werden Anhydrid und Trifluoressigsäure vorsichtig, um ein Verspritzen zu vermeiden, i. Vak. abdestilliert, und zur restlosen Entfernung noch vorhandener Trifluoressigsäure wird 2 bis 3 mal mit absol. Benzol i. Vak. nachdestilliert. Der Rückstand wird in 2 ccm Dioxan + 1 ccm Wasser gelöst und 2 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen, dann mit 5 ccm Wasser versetzt und mit $n/_{10}$ NaOH gegen Methylrot bis zum völligen Umschlag titriert. Ergebnisse s. allgemeiner Teil.

221. Günther Ohloff, Heinz Farnow und Gerhard Schade: Zur Kenntnis homologer Alkohole der Terpen- und Sesquiterpenreihe, VI. Mitteil.¹⁾: Eine neue Darstellungsmethode des *l*- α -Äthyl-apo-pinens aus *l*-Nopol

[Aus dem Laboratorium der Dragoco, G.m.b.H., Holzminden]

(Eingegangen am 21. März 1956)

Die Synthese des homologen α -Pinens aus *l*-Nopol wird beschrieben. Dabei ergab sich, daß bei der katalytischen Hydrierung von Vinyl-cycloalkenen mit Dienstruktur bei Verwendung von Raney-Nickel allein die Vinyl-Doppelbindung unter 1,2-Addition abgesättigt wird. Reduktionen unter Anwendung der Birch-Methode und durch Li in $C_2H_5NH_2$ wurden an verschiedenen Verbindungen der Pinen-Reihe durchgeführt.

Die Darstellung des homologen α -Pinens (α -Äthyl-apo-pinen, III) gelang zuerst H. Rupe und A. Héritier²⁾ durch Grignardierung des Myrtenylbromids (VI). W. Treibs³⁾ erhielt bei der Dehydratisierung des Äthyl-apo-

⁷⁾ Nach J. Barrolier, Naturwissenschaften 42, 416 [1955].

¹⁾ V. Mitteil.: G. Ohloff u. G. Schade, Angew. Chem. 67, 427 [1955].

²⁾ Liebigs Ann. Chem. 459, 171 [1927]. ³⁾ Liebigs Ann. Chem. 558, 136 [1947].