

Kinetik der sauren Abspaltung von *N*- und *C*-Schutzgruppen bei Peptiden

von Günter Losse, Dieter Zeidler und Thea Grieshaber

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Dresden

Eingegangen am 8. Dezember 1967

Die Spaltungsgeschwindigkeiten der wichtigsten Peptid-*N*- und -*C*-Schutzgruppen in Bromwasserstoff/Eisessig (Tab. 1) und Tetrahydrofuran/Salzsäure (Tab. 3) verschiedener Konzentration sowie in Eisessig (Tab. 2) und wasserfreier Trifluoressigsäure (Tab. 4) werden unter vergleichbaren Bedingungen gemessen. Die Reaktivitäten werden verglichen und Rückschlüsse auf die Peptid-Synthese gezogen.

Für die Abspaltung der heute bei Peptid-Synthesen gebräuchlichen Amino- und Carboxyl-Schutzgruppen*) existieren empirisch ermittelte Standardvorschriften¹⁾, die nur begrenzt einen Vergleich der relativen Reaktivität einzelner Gruppen zulassen.

Wir haben daher die Geschwindigkeiten für die Abspaltung der wichtigsten *N*-Schutzgruppen (Nps, Pmz, Foc, Boc, Tri, Cbo und For) am Modell Glycinbenzylamid und der am häufigsten verwendeten *C*-Schutzgruppen (Tri, Dpm, *t*-But, Bzl) sowie weiterer Ester-Reste am Modell Benzoylglycin unter der Einwirkung von Bromwasserstoff/Eisessig, von Chlorwasserstoff in Tetrahydrofuran und von Trifluoressigsäure verschiedener Konzentration bestimmt.

Die kinetischen Daten für die Spaltung der *N*-Schutzgruppen wurden erhalten nach Neutralisation aliquoter Mengen der Reaktionsansätze durch photometrische Bestimmung des mit Ninhydrin/Hydrindantin angefärbten Glycinbenzylamid-Anteiles.

Die Meßwerte für die Spaltung der *C*-Ester-Gruppen ermittelten wir entsprechend aus der freigesetzten Menge an Hippursäure. Dazu wurden nach Neutralisation aliquote Teile der Reaktionslösung im System Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1) papierchromatographisch

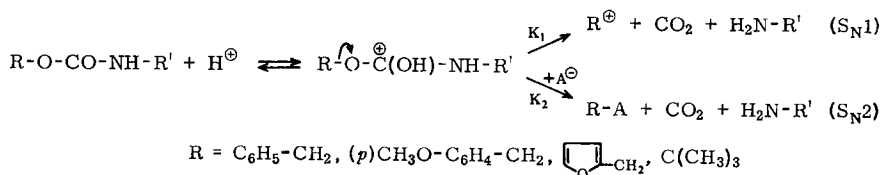
*) Verwendete Abkürzungen: Nps = *o*-Nitro-benzolsulfonyl, Pmz = *p*-Methoxy-benzyloxy-carbonyl, Cbo = Benzyloxycarbonyl, Foc = Furfuryloxycarbonyl, Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, Tri = Trityl, For = Formyl, Dpm = Diphenylmethyl, *t*-But = *tert*-Butyl, Bzl = Benzyl, Phac = Phenacyl, *i*-Prop = Isopropyl, THF = Tetrahydrofuran.

¹⁾ Zusammenfassende Übersicht bei E. Schröder und K. Lübke, *The Peptides*, Academic Press, New York 1965, S. 3, 52; M. Bodanszky und M. A. Ondetti, *Peptide Syntheses*, Interscience Publ., New York 1966, S. 21.

aufgetrennt und die Hippursäure mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd bestimmt²⁾. Der gegenüber Eisessig und Alkoholen stark Solvolyse-empfindliche Tritylester wurde im System Benzol/Chloroform/Äthanol (12:12:1) dünnsschichtchromatographisch abgetrennt.

Die Beständigkeit sämtlicher Schutzgruppen unter den angewendeten chromatographischen Bedingungen ging aus Blindversuchen hervor. Aus einer größeren Zahl von Meßdaten sind im folgenden nur diejenigen für charakteristische Zeitabstände tabelliert; es handelt sich um Mittelwerte aus jeweils 3 Bestimmungen.

Die Säure-katalysierte *Abspaltung von Amino-Schutzgruppen* erfordert im Primärschritt die Protonierung am nucleophilen Zentrum des Bindungssystems. Demgemäß reagieren speziell die Urethan-Gruppen nach folgendem Schema:



Die Benzyloxycarbonyl-Gruppe wird in *Bromwasserstoff/Eisessig* meist bimolekular abgespalten³⁾. Elektronendonatoren im Benzyloxycarbonyl-Rest lenken diese Spaltung vorzugsweise in Richtung auf den $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus; Elektronenakzeptoren bedingen dagegen einen $\text{S}_{\text{N}}2$ -Ablauf⁴⁾.

Bei der Acidolyse von Boc-Derivaten stabilisiert sich das entstandene tert.-Butylkation zum Isobutylen und führt daher bevorzugt zum $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus. Auch die Abspaltung des Trityl-Restes dürfte auf Grund der sterischen Anordnung nach dem $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus verlaufen, während die säurekatalysierten Reaktionen von Nps-Derivaten vom verwendeten Anion abhängig sind^{5,6)}.

Die *Spaltung der Estergruppen* kann nach primärer Protonierung als $\text{A}_{\text{AC}}2$ - bzw. $\text{A}_{\text{AL}}1$ -Mechanismus ablaufen, wobei die Acidolyse der Benzyl- und Isopropylester sicher dem $\text{A}_{\text{AC}}2$ -Typ, die der Trityl-⁷⁻⁹⁾ und tert.-Butylester¹⁰⁾ dem $\text{A}_{\text{AL}}1$ -Typ

²⁾ G. W. Gaffney, K. Schreier, N. Di Ferante und K. I. Altman, J. biol. Chemistry **206**, 695 (1954).

³⁾ R. B. Homer, R. B. Moodie und H. N. Rydon, Proc. chem. Soc. [London] **1963**, 367.

⁴⁾ K. Bláha und J. Rudinger, Collect. czechoslov. chem. Commun. **30**, 585 (1965) [C. A. **62**, 14809 (1965)].

⁵⁾ W. Kessler und B. Iselin, Helv. chim. Acta **49**, 1330 (1966).

⁶⁾ K. Poduska, H. Maassen van den Brink-Zimmermannova, J. Rudinger und F. Šorm, Proc. of the 8. European Peptide Symposium Noordwijk, The Netherlands, Sept. 1966, S. 38.

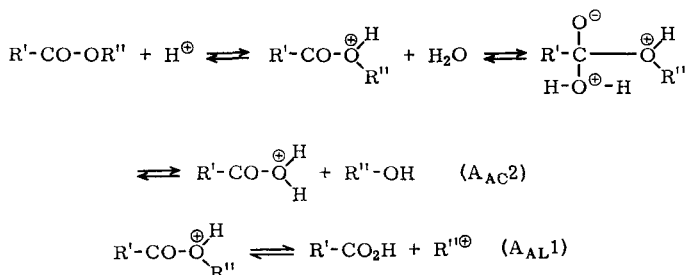
⁷⁾ K. D. Berlin, L. H. Gower, J. W. White, D. E. Gibbs und G. P. Sturm, J. org. Chemistry **27**, 3595 (1962); G. S. Hammond und J. T. Rudesill, J. Amer. chem. Soc. **72**, 2769 (1950).

⁸⁾ L. J. Andrews und R. M. Keefer, J. Amer. chem. Soc. **83**, 3708 (1961); R. M. Keefer und L. J. Andrews, ebenda **84**, 941 (1962).

⁹⁾ C. G. Swain, T. E. C. Knee und A. Mac Lachlan, J. Amer. chem. Soc. **82**, 6101 (1960).

¹⁰⁾ S. G. Cohen und A. Schneider, J. Amer. chem. Soc. **63**, 3382 (1941).

zugeordnet werden muß. Für die Solvolyse der Diphenylmethylester wurde ebenfalls der A_{AC}2-Mechanismus festgestellt^{11, 12)}.



In den Tabellen 1–5 sind die Umsetzungsgrade sowie die daraus graphisch ermittelten RG-Konstanten und Halbwertszeiten für die beiden Schutzgruppentypen zunächst für verschiedene Konzentrationen an Bromwasserstoff/Eisessig sowie für Eisessig wiedergegeben. Das Verhältnis betrug 1 mMol Substrat/30 mMol Säure, so daß die Acidolyse als Reaktion pseudo-erster Ordnung gemessen wurde.

Die Tabelle 1 zeigt unter a) und b), daß die 5 stark säurelabilen *N*-Schutzgruppen (*o*-Nitro-benzolsulfonyl bis Trityl) sowie die *C*-Schutzgruppen (Trityl, tert.-Butyl und Diphenylmethyl) bei genügend kurzer Einwirkungsdauer von konz. HBr/Eisessig, nahezu unabhängig von anwesendem Cbo bzw. Bzl, abgespalten sind. Die Selektion zwischen Nps, Pmz, Foc und Boc gegenüber der Cbo-Gruppe ist bei Anwendung von 0.1–0.05 *m* HBr/Eisessig besonders ausgeprägt (Tab. 1, c–d). Unter diesen Bedingungen sind die Formyl-¹³⁾ und die Phenacyl-Gruppe¹⁴⁾ beständig. Die relativ kleine und daher in der Peptid-Synthese selten verwertbare Reaktivitätsdifferenz zwischen *N*-Cbo- und *C*-Benzylester-Gruppen geht ebenfalls aus Tab. 1 (a und b) hervor. Mit abnehmender Säurekonzentration (Tabb. 1b–d) wird die Reaktivitätsabstufung bei den säurelabilen *N*-Schutzgruppen in der Reihenfolge Nps, Pmz, Foc, Boc und Tri, bei den *C*-Schutzgruppen in der Reihenfolge Tri, t.-But, Dpm bemerkbar, wobei Pmz und Foc einerseits sowie t.-But und Dpm andererseits hinsichtlich ihrer Acidolyse-Empfindlichkeit nahezu gleichwertig sind. Die Diphenylmethyl-oxy-carbonyl-Gruppe als *N*-Schutzgruppe vom Urethan-Typ würde demgegenüber mit der Boc-Gruppe vergleichbare Eigenschaften erwarten lassen.

Bei allen untersuchten Säurekonzentrationen läßt sich die *C*-Tri-, -Dpm- oder -t.-But-Gruppe unabhängig neben *C*-Benzyl-Estern absplalten. In verdünnter Lösung

¹¹⁾ C. A. Bunton, J. N. E. Day, R. H. Flowers, P. Sheel und J. L. Wood, J. chem. Soc. [London] 1957, 963.

¹²⁾ G. J. Harvey und V. R. Stimson, J. chem. Soc. [London] 1956, 3629.

¹³⁾ K. Vogler und P. Lanz, Helv. chim. Acta 43, 270 (1960).

¹⁴⁾ G. C. Stelakatos, A. Paganou und L. Zervas, J. chem. Soc. [London] C 1966, 1191.

Tabelle 1. Spaltung von *N*-geschütztem Glycinbenzylamid bzw. von *C*-geschützter Hippursäure durch Acidolyse mit Bromwasserstoff/Eisessig bei 20°

Abspaltung der Schutzgruppe	0.5	% Glycinbenzylamid bzw. Hippursäure nach	1	2	5	10	20	60	300	2900	4500 Min. K · 10 ⁵	t _{1/2} [Min.]
a) Acidolyse mit 5.5m HBr/Eisessig												
<i>N</i> -Schutzgruppe												
Nps, Pmz, Foc, Boc, Tri	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	> 10 ⁴	—
Cbo	25	46	77	96	100	—	—	—	—	—	1150 ± 90	1.0
For	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—
<i>C</i> -Schutzgruppe												
Tri, t.-But, Dpm	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	> 10 ⁴	—
Bzl	—	—	—	10	25	40	76	—	—	—	39 ± 4	30.3
i-Prop, Phac	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—
b) Acidolyse mit 2m HBr/Eisessig												
<i>N</i> -Schutzgruppe												
Nps, Pmz, Foc, Boc, Tri	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	> 10 ⁴	—
Cbo	—	9	15	31	50	78	96	—	—	—	122 ± 10	9.5
For	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—
<i>C</i> -Schutzgruppe												
Tri, t.-But	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	> 10 ⁴	—
Dpm	—	84	100	—	—	—	—	—	—	—	> 10 ⁴	—
Bzl	—	—	—	—	3.7	8.0	18	58	—	—	5.0 ± 0.5	236.2
i-Prop, Phac	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—
c) Acidolyse mit 0.1m HBr/Eisessig												
<i>N</i> -Schutzgruppe												
Nps	82	97	100	—	—	—	—	—	—	—	5800 ± 700	—
Pmz	50	66	94	100	—	—	—	—	—	—	2200 ± 220	0.5
Foc	50	68	94	98	—	—	—	—	—	—	2200 ± 220	0.5
Boc	30	58	86	100	—	—	—	—	—	—	1620 ± 130	0.7
Tri	8	14	32	62	88	99	—	—	—	—	340 ± 30	3.4
Cbo	—	—	—	—	—	—	3	—	—	99	0.94 ± 0.1	1230
<i>C</i> -Schutzgruppe												
Tri	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	> 10 ⁴	—
t.-But	—	—	14	40	53	75	100	—	—	—	106 ± 20	10.9
Dpm	—	—	15	35	51	72	100	—	—	—	106 ± 20	10.9
Bzl	—	—	—	—	—	—	4	—	—	98	—	—
i-Prop, Phac	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—
d) Acidolyse mit 0.05m HBr/Eisessig												
<i>N</i> -Schutzgruppe												
Nps	63	89	98	—	—	—	—	—	—	—	3200 ± 350	0.3
Pmz	31	53	75	96	100	—	—	—	—	—	1130 ± 90	1.0
Foc	22	40	70	94	98	—	—	—	—	—	1050 ± 50	1.1
Boc	17	28	55	89	98	—	—	—	—	—	695 ± 60	1.7
Tri	—	4	9	23	42	60	92	—	—	—	88 ± 7	13.1
Cbo	—	—	—	—	—	—	1	—	32	—	0.2 ± 0.02	5750

(Tab. 1, c) erfolgt gleichzeitig die Abspaltung der *N*-Pmz-, -Foc- und -Boc-Gruppe schneller als die der *C*-t.-But-Gruppe.

Bemerkenswert ist die hohe Säurelabilität der *N*-Trityl- und besonders der *C*-Trityl-Gruppe in *Eisessig*, worin, außer Nps, alle übrigen Schutzgruppen beständig sind (Tab. 2).

Die Abspaltung von Tri neben Boc mit 75proz. Essigsäure wurde bereits von *Schwyzer* und *Rittel*¹⁵⁾ beobachtet.

Tabelle 2. Acidolyse von *N*-geschütztem Glycinbenzylamid bzw. von *C*-geschützter Hippursäure in *Eisessig* bei 20°

Abspaltung der Schutzgruppe	1	% Glycinbenzylamid bzw. Hippursäure nach						K · 10 ⁵	t _{1/2} [Min.]
		5	30	60	120	300	1200 Min.		
<i>N-Schutzgruppe</i>									
Nps	—	—	2	4	9	20	60	1.24 ± 0.1	930
Tri	—	—	7	13	22	43	98	3.2 ± 0.3	360
Pmz, Foc, Boc, Cbo	—	—	—	—	—	—	0	—	—
<i>C-Schutzgruppe</i>									
Tri	65	100	—	—	—	—	—	—	—
t.-But, Dpm, Bzl	—	—	—	—	—	—	0	—	—
i-Prop, Phac	—	—	—	—	—	—	0	—	—

Zur Abspaltung der Schutzgruppen mit *Salzsäure* arbeiteten wir in *THF/Wasser* (9 : 1) : 1) um Glycinbenzylamid bzw. Hippursäure in Lösung und damit das Reaktionsgemisch während der Messung homogen zu halten, 2) um Alkoholysen der *C*-Ester auszuschließen. Auch hier wurden 30 mMol Säure/1 mMol Substrat in 5.5- bzw. 2.0 *m* Lösung eingesetzt. Die Tabelle 3 (a und b) enthält die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Danach zeigten beide Schutzgruppentypen die gleiche Reihenfolge der Reaktivität wie bei der Abspaltung mit *HBr/Eisessig*, wobei der Wechsel des Lösungsmittels allgemein die Spaltungsgeschwindigkeit vermindert. Dieser Einfluß kommt besonders bei der stark verzögerten, monomolekular verlaufenden Abspaltung der *N*-Trityl-Gruppe zum Ausdruck. Die Nps-Gruppe läßt sich so z. B. mit 5.5- oder 2.0 *m* *HCl* unabhängig von der *N*-Trityl-Gruppe entfernen. Die Cbo-Gruppe ist mit 5.5 *m* *HCl* auch nach 2 Std., d. h. nach bereits weitgehender Detritylierung, noch relativ beständig. Durch 5 min. Einwirkung von 2.0 *m* *HCl* scheint sich auch die Nps-Gruppe ohne wesentlichen Angriff auf die Boc-Gruppe entfernen zu lassen.

In der Reihe der *C*-Schutzgruppen macht sich besonders die Selektivität zwischen Tri und t.-But sowie teilweise auch zwischen t.-But und Bzl bemerkbar.

Die Ergebnisse der Spaltungen mit wasserfreier *Trifluoressigsäure* (Tab. 4) zeigen demgegenüber ein unspezifisches Bild. In Übereinstimmung mit der Literatur¹⁾ ist das Reagens ein gutes Spaltungsmittel für alle säurelabilen Gruppen, wobei auch die Cbo-Gruppe bei längerer Einwirkung nicht verschont bleibt.

¹⁵⁾ R. *Schwyzer* und W. *Rittel*, *Helv. chim. Acta* **44**, 159 (1961).

Tabelle 3. Spaltung von *N*-geschütztem Glycinbenzylamid bzw. von *C*-geschützter Hippursäure durch HCl in THF/Wasser (9:1) bei 20°

Abspaltung der Schutzgruppe	0.5	1	% Glycinbenzylamid bzw. Hippursäure nach								K · 10 ⁵	t _{1/2} (Min.)
			2	5	10	20	60	120	240	1200 Min.		
a) Spaltung mit 5.5 <i>M</i> HCl												
<i>N</i> -Schutzgruppe												
Nps	89	95	97	—	—	—	—	—	—	—	> 10 ⁴	—
Pmz	20	33	47	85	94	—	—	—	—	—	640 ± 50	1.8
Foc	20	35	48	89	95	—	—	—	—	—	640 ± 50	1.8
Boc	—	22	36	68	88	96	—	—	—	—	400 ± 50	3.0
Tri	—	—	—	6	12	22	47	73	—	—	21 ± 2	90
Cbo	—	—	—	—	—	—	—	1.7	—	9.43	0.18 ± 0.02	6400
<i>C</i> -Schutzgruppe												
Tri	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	> 10 ⁴	—
t.-But	—	10	20	44	67	89	—	—	—	—	160 ± 10	7.2
Dpm	—	—	50	83	100	—	—	—	—	—	480 ± 50	2.4
Bzl	—	—	—	—	—	16	33	47	—	95	8.8 ± 0.9	130.5
i-Prop	—	—	—	—	—	—	—	7	—	34	—	—
Phac	—	—	—	—	—	—	—	2	—	16	—	—
b) Spaltung mit 2 <i>M</i> HCl												
<i>N</i> -Schutzgruppe												
Nps	42	60	85	98	—	—	—	—	—	—	1540 ± 150	0.7
Pmz	—	—	4	10	13	—	60	84	97	—	26 ± 3	45.0
Foc	—	—	3	10	13	—	58	86	96	—	26 ± 3	45.0
Boc	—	—	3	6	10	—	55	80	98	—	22 ± 2	53.0
Tri	—	—	—	—	—	—	—	2	7	19	0.45 ± 0.05	2400
Cbo	—	—	—	—	—	—	—	1	2	5	—	—
<i>C</i> -Schutzgruppe												
Tri	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	> 10 ⁴	—
t.-But	—	—	—	—	—	—	13	24	40	—	3.5 ± 0.4	336.0
Dpm	—	—	—	—	—	—	13	24	40	—	3.5 ± 0.4	336.0
Bzl	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—
i-Prop, Phac	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—

Tabelle 4. Spaltung von *N*-geschütztem Glycinbenzylamid bzw. *C*-geschützter Hippursäure mit wasserfreier Trifluoressigsäure bei 20°

Abspaltung der Schutzgruppe	% Glycinbenzylamid bzw. Hippursäure nach					K · 10 ⁵	t _{1/2} [Min.]
	1	60	120	240	1200 Min.		
<i>N</i> -Schutzgruppe							
Nps, Pmz, Foc, Boc, Tri	100	—	—	—	—	—	—
Cbo	—	8	18	22	98	2.8 ± 0.2	410
<i>C</i> -Schutzgruppe							
Tri, t.-But, Dpm	100	—	—	—	—	—	—

Beschreibung der Versuche

Darstellung von *C*-substit. Benzoylglycinen

Hippursäure-tritylester. — Er wurde in Anlehnung an Lit.¹⁴⁾ aus *Ag-hippurat* und *Tritylchlorid* in Chloroform erhalten. Das Rohprodukt wurde aus Essigester und aus Benzol/CHCl₃ umkristallisiert; Schmp. 174°.



Hippursäure-diphenylmethylester (Schmp. 123–124°) und *-tert.-butylester* (Schmp. 109°) wurden nach Lit.¹⁴⁾ dargestellt. — *Hippursäure-benzylester* (Schmp. 88°) und *-isopropylester*

(Schmp. 86–87°) sind durch Veresterung von Hippursäure mit dem entspr. Alkohol in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure gewonnen worden.

Hippursäure-phenacylester. — Man bereitete ihn durch Kochen von 0.1 Mol *Hippursäure* und 0.1 Mol *Phenacylbromid* in 200 ccm THF mit 0.1 Mol *Triäthylamin*. Anschließend wurde mit 2*n* H₂SO₄ sowie mit NaHCO₃-Lösung gewaschen; Schmp. 127°.

C₁₇H₁₅NO₄ (297.3) Ber. C 68.67 H 5.05 N 4.71 Gef. C 68.07 H 5.23 N 4.44

Darstellung von *N*-substit. Glycinbenzylamiden

N-substit. Glycin wurde nach Lit.^{16–22)} hergestellt und mittels der Carbodiimid- oder Chlorameisenester-Methode¹⁾ mit *Benzylamin* umgesetzt.

<i>N</i> -ständiger Substituent	<i>N</i> -substit. Glycin Schmp. [°C]	Dargestellt nach Lit.	<i>N</i> -substit. Glycinbenzylamid Schmp. [°C]	<i>N</i> -substit. Glycinbenzylamid Analysen		
				C	H	N
Nps	141	16)	96	Ber. 56.77 Gef. 56.40	4.76 5.02	13.24 13.05
Pmz	96	17)	132	Ber. 65.84 Gef. 65.55	6.14 6.63	8.53 8.28
Foc	80	18)	107	Ber. 62.49 Gef. 62.62	5.60 6.08	9.72 9.79
Boc	90	19)	74	Ber. 63.62 Gef. 63.30	7.63 8.10	10.60 10.49
Tri	172	20)	157	Ber. 82.72 Gef. 82.92	6.45 6.36	6.89 7.02
Cbo	120	21)	118	Ber. 68.43 Gef. 68.45	6.10 6.00	9.39 9.40
For	151	22)	174	Ber. 62.49 Gef. 62.66	6.29 6.60	14.57 14.29

Spaltungen

a) *Spaltung mit HBr/Eisessig und Eisessig*: Je 1 mMol Substrat wurde in 0.5 ccm Eisessig rasch gelöst und bei 20° mit je 30 mMol *HBr in Eisessig* [5.5 ccm 5.5 *m* (31proz.) bzw. 15 ccm 2.0 *m* (14proz.) bzw. 300 ccm 0.1 *m* (0.8proz.) bzw. 600 ccm 0.05 *m* (0.4proz.)] gemischt (Zeitpunkt 0 der Acidolyse).

Für die Spaltung in *Eisessig* wurde 1 mMol Substrat in 30 mMol *Eisessig* (1.8 ccm) gelöst. Während der für die Auflösung in *Eisessig* benötigten Zeit (ca. 2 Min.) wurde nur die *C*-Tri-Gruppe abgespalten.

Zu den in den Tabbl. 1 und 2 angegebenen Zeiten wurden aliquote Teile (bez. auf die Substratkonzentration) von 0.1–2 ccm entnommen und der Bromwasserstoff sofort mit der äquiv.

¹⁶⁾ J. Goerdeler und A. Holst, *Angew. Chem.* **71**, 775 (1959).

¹⁷⁾ F. Weygand und K. Hunger, *Chem. Ber.* **95**, 1 (1962).

¹⁸⁾ G. Losse, A. Jeschkeit und E. Willenberg, *Angew. Chem.* **76**, 271 (1964).

¹⁹⁾ F. C. McKay und N. F. Albertson, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4686 (1957).

²⁰⁾ L. Zervas und D. M. Theodoropoulos, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 1359 (1956).

²¹⁾ M. Bergmann und L. Zervas, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **65**, 1192 (1932).

²²⁾ J. C. Sheehan und D. H. Yang, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 1154 (1958).

Menge methanol. KOH neutralisiert. — Die Bestimmung des *Glycinbenzylamids* erfolgte nach Verdünnen der neutralisierten Lösungen mit Methanol auf 25 ccm. Mit Essigsäure/Acetat wurde auf pH 5 abgepuffert und nach Anfärbung mit *Ninhydrin/Hydrindantin*²³⁾ bei 578 und 625 nm photometriert. — Zur Bestimmung der *Hippursäure* wurden die mit der äquiv. Menge methanol. KOH versetzten Proben auf *Papier Schleicher & Schüll 2043b* im System Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) absteigend [bei den Spaltungen des Hippursäuretritylestern nach vorheriger Neutralisation mit Triäthylamin an Kieselgel G im System Benzol/Chloroform/Äthanol (12:12:1)] chromatographiert und mit *p-Dimethylamino-benzaldehyd* nach Lit.²⁾ entwickelt. Die orangefarbenen Flecken von Hippursäure-azlacton wurden mit Methanol eluiert und die Lösungen bei 480 nm photometriert.

b) *Spaltung mit HCl in Tetrahydrofuran/Wasser (9:1)*: Je 1 mMol Substrat wurde in 0.5 ccm THF gelöst und mit 30 mMol HCl [5.5 ccm 5.5 M (20.3 % HCl in THF/Wasser = 9:1) bzw. 15 ccm 2.0 M (7.4 % HCl in THF/Wasser = 9:1)] versetzt; zu den in Tab. 3 angegebenen Zeiten wurden aliquote Teile von 0.1 — 1 ccm entnommen und mit der äquiv. Menge methanol. KOH neutralisiert. *Glycinbenzylamid* bzw. *Hippursäure* bestimmte man nach den unter a) angegebenen Methoden.

c) *Spaltung mit Trifluoressigsäure*: 1 mMol Substrat wurde in 3.5 ccm (30 mMol) absol. Trifluoressigsäure gelöst (Zeitpunkt 0 der Messung). Die Bestimmung von *Glycinbenzylamid* bzw. *Hippursäure* erfolgte wie bei a) angegeben.

²³⁾ S. Moore und W. Stein, J. biol. Chemistry **211**, 907 (1954).