

**Einfluss von ionischen Flüssigkeiten auf die Regioselektivität  
von Peptidacylierungsreaktionen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
Herrn Dipl.-Chem. Christian Wespe

geb. am: 26.01.1980 in: Wolfenbüttel

Gutachter

- 1.
- 2.
- 3.

Halle (Saale),

Cuiusvis hominis est errare, nullius nisi insipientis in errore perseverare

Marcus Tullius Cicero

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Geschichte der ionischen Flüssigkeiten .....	1
1.2 Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten.....	5
1.2.1 Umweltverträglichkeit von ionischen Flüssigkeiten.....	5
1.2.2 Brennbarkeit von ionischen Flüssigkeiten.....	6
1.2.3 Dampfdruck und Gasphasenverhalten von ionischen Flüssigkeiten.....	7
1.2.4 Schmelz- und Gefrierpunkt von ionischen Flüssigkeiten .....	8
1.2.5 Allgemeingültige Eigenschaften aller ionischen Flüssigkeiten .....	9
1.3 Industrielle Anwendung von ionischen Flüssigkeiten .....	9
1.3.1 Isomerisierung von 3,4-Epoxybut-1-en.....	9
1.3.2 Der BASIL™-Prozess .....	10
1.3.3 Der Fusel®-Prozess .....	10
1.4 Beeinflussung des Verlaufes chemischer Reaktionen durch ionische Flüssigkeiten .....	11
1.4.1 Friedel-Crafts-Reaktionen in ionischen Flüssigkeiten .....	11
1.4.2 Heck-Reaktionen in ionischen Flüssigkeiten.....	11
1.4.3 Diels-Alder Reaktionen in ionischen Flüssigkeiten .....	12
1.4.4 Produktverteilung der Reaktion zwischen Toluol und Salpetersäure in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten .....	13
1.4.5 Glykosylierungen in ionischen Flüssigkeiten .....	13
1.4.6 Synthese von Peptiden in ionischen Flüssigkeiten.....	14
1.5 Biokatalyse in ionischen Flüssigkeiten.....	15
1.6 Methoden zur chemischen Peptidmodifizierung.....	16
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Materialien</b> .....	<b>20</b>
3.1 Substanzen.....	20
3.1.1 Ionische Flüssigkeiten.....	20
3.1.2 Chemikalien .....	20
3.1.3 pH-Papiere .....	20
3.2 Geräte .....	21
3.2.1 Chromatographie .....	21
3.2.2 Massenspektrometrie.....	21
3.2.3 NMR-Spektroskopie.....	21
3.2.4 UV/Vis Spektroskopie.....	21
3.2.5 Peptidsyntheseroboter .....	21
3.2.6 Dielektrische Spektroskopie .....	22
<b>4. Methoden</b> .....	<b>23</b>
4.1 Darstellung von ionischen Flüssigkeiten.....	23
4.1.1 1,2,3-Trimethylimidazoliumdimethylphosphat [MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] ...	23
4.1.2 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazoliumdiethylphosphat [EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 23	23

4.2	Darstellung von Peptiden .....	24
4.2.1	Darstellung von Pentapeptiden .....	24
4.2.2	Darstellung von längeren Peptiden.....	25
4.2.3	Darstellung von Suc-AXaaPF-pNA .....	25
4.3	Darstellung von Aktivestern .....	26
4.3.1	Darstellung von Furansäure- <i>N</i> -hydroxysuccinimid.....	26
4.4	Acylierung von Peptiden in ionischen Flüssigkeiten.....	26
4.4.1	Generelle Acylierungsmethode für Peptide.....	27
4.4.2	Acylierung von Pentapeptiden .....	27
4.4.3	Konzentrationsabhängigkeit der Acylierung von H-GAKAY-OH.....	29
4.4.4	Acylierung von längeren Peptiden.....	29
4.4.5	Acylierung von Lysinamid in ionischen Flüssigkeiten .....	30
4.4.6	Acylierung von Peptiden mit verkürzter Seitenkette .....	30
4.4.7	Acylierung von Peptiden mit mehreren <i>N</i> <sup>ε</sup> -Funktionen .....	30
4.4.8	Phloretylierung von H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH in C2-methylierten ionischen Flüssigkeiten.....	30
4.4.9	Temperaturabhängigkeit der Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten .....	31
4.4.10	pH-Abhängigkeit der Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten .....	31
4.5	Bestimmung von p <i>K</i> <sub>a</sub> -Werten in ionischen Flüssigkeiten .....	31
4.6	Bestimmung von Aktivierungsparameter von Acylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten.....	32
4.6.1	Bedingungen der Peptidacylierungskinetik in ionischen Flüssigkeiten.....	32
4.6.2	Acylierung von Ac-GAKAY-OH und H-GAK(Ac)AY-OH in [EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ].....	33
4.6.3	Acylierung von Ac-GAKAY-OH und H-GAK(Ac)AY-OH in [EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ].....	33
4.7	Einfluss von ionischen Flüssigkeiten auf das <i>cis/trans</i> -Gleichgewicht von Peptidylprolylbindungen.....	34
4.8	<sup>1</sup> H-HR-NMR-Untersuchungen zur Peptid-IF Interaktion.....	35
4.9	Dielektrische Messungen .....	35
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
5.1	Darstellung von ionischen Flüssigkeiten.....	37
5.1.1	1,2,3,-Trimethylimidazoliumdimethylphosphat [MMMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]..	37
5.1.2	1-Ethyl-2,3-dimethylimidazoliumdiethylphosphat [EMMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	38
5.2	Darstellung von Peptiden .....	38
5.3	Acylierung von Peptiden in ionischen Flüssigkeiten.....	38
5.3.1	Regioisomerenüberschuss <i>re</i> .....	38
5.3.2	Acylierung von Pentapeptiden .....	39
5.3.3	Konzentrationsabhängigkeit des IF-Effektes .....	44
5.3.4	Acylierung von längererkettigen Peptiden in ionischen Flüssigkeiten....	46
5.3.5	Acylierung von Peptiden mit mehreren <i>N</i> <sup>ε</sup> -Aminofunktionen.....	48

5.3.6	Acylierung von Lysinamid in ionischen Flüssigkeiten .....	52
5.3.7	Acylierung von Peptiden mit verkürzter Lysinseitenkette.....	54
5.3.8	Phloretylierung von H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH in C2-methylierten ionischen Flüssigkeiten.....	55
5.3.9	Temperaturabhängigkeit der Regioselektivität von Peptidacylierungen in IFs .....	57
5.3.10	pH-Abhängigkeit der Regioselektivität von Peptidacylierungen in IFs.....	58
5.4	Bestimmung von pK <sub>a</sub> -Werten in ionischen Flüssigkeiten .....	59
5.5	Dielektrische Eigenschaften.....	62
5.6	Bestimmung von Aktivierungsparametern von Acylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten .....	62
5.7	Einfluss von IFs auf das Verhältnis der <i>cis/trans</i> -Konformere von Peptidylprolylbindungen.....	65
5.8	<sup>1</sup> H-HR-NMR-Untersuchungen zur Peptid-IF-Interaktion .....	68
<b>6.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
6.1	Acylierung von Peptiden in ionischen Flüssigkeiten.....	72
6.1.1	Einfluss des Lösungsmittels auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen.....	72
6.1.2	Einfluss der Peptidsequenz auf die Regioselektivität von Acylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten.....	73
6.1.3	Einfluss des Acyldonors auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten .....	78
6.1.4	Konzentrationsabhängigkeit des IF-Effektes .....	79
6.1.5	Regioselektivität in imidazoliumbasierten C2-methylierten und nicht-methylierten ionischen Flüssigkeiten.....	81
6.1.6	Einfluss einer Verkürzung der Lysinseitenkette auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen .....	82
6.1.7	Temperaturabhängigkeit der Peptidacylierung in ionischen Flüssigkeiten .....	83
6.1.8	pH-Abhängigkeit der Peptidacylierung in ionischen Flüssigkeiten .....	84
6.1.9	Regioselektivitätsverhalten bei Acylierungsreaktionen von Peptiden mit mehreren N <sup>ε</sup> -Funktionen in ionischen Flüssigkeiten .....	84
6.2.	Physikochemischer Hintergrund der regioselektivitätsinduzierenden Wirkung von ionischen Flüssigkeiten in Peptidacylierungsreaktionen.....	86
6.2.1	pK <sub>a</sub> -Werte von Aminofunktionen in ionischen Flüssigkeiten .....	86
6.2.2	Aktivierungsparameter von Peptidacylierungsreaktionen .....	90
6.2.3	<i>cis/trans</i> -Verhältnis von Peptidylprolylbindungen in ionischen Flüssigkeiten .....	94
6.2.4	<sup>1</sup> H-HR-NMR-Untersuchung zur Peptid-IF Interaktion.....	98
6.3	Hypothese zur regioselektivitätsinduzierenden Wirkung von ionischen Flüssigkeiten in Peptidacylierungsreaktionen.....	100
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>102</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>104</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Zur Abkürzung der Aminosäuren sind die Drei- bzw. Einbuchstabenkodierungen nach Vorschlag der IUPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur verwendet worden (*Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37)

APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization
APTDI	Atmospheric-pressure thermal desorption ionization
ATR	Attenuated total reflection
BASIL	Biphasic acid scavenging utilizing ionic liquids
Biotin-OSu	Biotin <i>N</i> -hydroxysuccinimidester
[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat
[BMIM][Br]	1-Butyl-3-methylimidazoliumbromid
[BMIM][Cl]	1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid
[BMIM][OTf]	1-Butyl-3-methylimidazoliumtriflat
[BMIM][PF <sub>6</sub> ]	1-Butyl-3-methylimidazoliumhexafluorophosphat
[BMIM][SCN]	1-Butyl-3-methylimidazoliumthiocyanat
[BMIM][TFMS]	1-Butyl-3-methylimidazoliumtrifluormethansulfonat
Dab	Diaminobutansäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential scanning calorimetry
DSS	4,4-Dimethyl-4-silapentan sodium sulfonate
EC50	Mittlere effektive Konzentration
[EMIM][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	1-Ethyl-3-methylimidazoliumtrifluormethansulfonat
[EMIM][CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	1-Ethyl-3-methylimidazoliummethansulfonat
[EMIM][Cl]	1-Ethyl-3-methylimidazoliumchlorid
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	1-Ethyl-3-methylimidazoliumdiethylphosphat
[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	1-Ethyl-3-methylimidazoliumdimethylphosphat
[EMIM][OH]	1-Ethyl-3-methylimidazoliumhydroxid
[EMIM][PF <sub>6</sub> ]	1-Ethyl-3-methylimidazoliumhexafluorophosphat
[EMIM][SCN]	1-Ethyl-3-methylimidazoliumthiocyanat
[EMMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	1-Ethyl-2,3-dimethylimidazoliumdiethylphosphat
ESI	Electrospray ionization
[EtNH <sub>3</sub> ][NO <sub>3</sub> ]	Ethylammoniumnitrat
FAB	Fast atom bombardment
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FTICR-MS	Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
FT-IR	Fourier-transform infrared-spectroscopy
Fur-OSu	Furansäure <i>N</i> -hydroxysuccinimidester
[H <sub>2</sub> NiPr <sub>2</sub> ][BF <sub>4</sub> ]	Diisopropylammoniumtetrafluoroborat

HCTU	2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
[HMIM][BF <sub>4</sub> ]	1-Hexyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat
HPLC	High performance liquid chromatography
HR-MAS	High resolution magic angle spinning
IF	Ionische Flüssigkeit
LC50	Mittlere letale Dosis
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
[MIM][Cl]	1-Methylimidazoliumchlorid
[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	1,2-Dimethylimidazoliumdimethylphosphat
[MMMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	1,2,3-Trimethylimidazoliumdimethylphosphat
MNDO	Modified neglect of differential overlap
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear magnetic resonance
Orn	Ornithin
pH	Potentia hydrogenii
Phloretin-OSu	3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester
pNA	<i>para</i> -Nitroanilin
QSAR	Quantitative structure activity relationship
<i>re</i>	Regioisomerenüberschuss
Suc	Succinyl
TFE	Trifluorethanol
TFA	Trifluoracetic acid
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Tetramethylsilan
TSIL	Task-specific ionic liquid
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
VOCs	Volatile organic compounds

# 1. Einleitung

Ionische Flüssigkeiten (IFs) sind organische Salze, welche bei Temperaturen unter 100 °C flüssig sind. Die Lösungsmittleigenschaften dieser Flüssigkeiten können leicht durch den Austausch von Kat- und Anionen variiert werden, so dass diese einfach an die Erfordernisse einer Reaktion angepasst werden können. Im Folgenden soll die Geschichte von IFs, ihre Eigenschaften, ihre industrielle Verwendung und ihr Einfluss auf den Verlauf chemischer Reaktionen erläutert werden.

## 1.1 *Geschichte der ionischen Flüssigkeiten*

Die erste literaturbekannte ionische Flüssigkeit wurde von GABRIEL im Jahre 1888 dargestellt. Er dampfte eine mit Salpetersäure übersättigte Vinylaminlösung ein und gewann so Ethanolammoniumnitrat [(EtOH)NH<sub>3</sub>][NO<sub>3</sub>]. GABRIEL stellte zwar den niedrigen Schmelzpunkt von 52-55 °C dieser Verbindung fest, diskutiert aber nicht die besonderen Eigenschaften dieser ersten ionischen Flüssigkeit aus<sup>1</sup> (oft wird diese Entdeckung falsch zitiert und GABRIEL und WEINER<sup>2</sup> zugeschrieben). 26 Jahre später im Jahre 1914 neutralisierte WALDEN Ethylamin mit Salpetersäure und erhielt dadurch ein Salz, welches schon bei 13-14 °C schmolz<sup>3</sup> und bei dem es sich um Ethylammoniumnitrat [EtNH<sub>3</sub>][NO<sub>3</sub>] handelte. WALDEN erkannte, dass er mit diesen bei Raumtemperatur flüssigen Salzen eine neue Klasse von Flüssigkeiten entdeckt hatte. In seiner Arbeit warf WALDEN grundlegende Fragen auf, wie z.B. die nach dem Dissoziationsgrad der Ionen in ionischen Flüssigkeiten, die auch heute noch fast hundert Jahre später nicht abschließend geklärt sind<sup>4</sup>. Zwanzig Jahre später wurde ein Verfahren von GRAENACHER basierend auf IFs patentiert<sup>5</sup>. Er verwendete verschiedene Halogenide stickstoffhaltiger Basen wie 1-Benzylpyridin um Cellulose zu lösen. Gelöst in diesen IFs zeigte die Cellulose eine erhöhte Reaktivität in Veretherungs- und Veresterungsreaktionen. Wie bei dem Dissoziationsgrad von IFs zeigt auch dieses Patent den Weitblick der frühen Forschung zu ionischen Flüssigkeiten, da das Lösen von Cellulose in der Papierherstellung auch heute noch eines der Hauptanwendungsfelder von flüssigen Salzen ist.

Im Jahre 1948 wurde die elektrolytische Abscheidung von Aluminium in Mischungen aus Aluminium(III)-chlorid und 1-Ethylpyridiniumbromid beschrieben<sup>6,7</sup>. Dieses System erfüllt in einem Bereich von 63 bis 68 mol% AlCl<sub>3</sub> die Kriterien eines IFs da es bei Raumtemperatur flüssig ist. Durch seinen flüssigen



Aggregatzustand kann es in elektrochemischen Anwendungen genutzt werden. Der Nachteil dieser Bromid/Chlorid-Mischung ist allerdings seine hohe Komplexität, da es aus zwei verschiedenen Halogeniden bestand. Dies erforderte sehr genaues Arbeiten weil die Eigenschaften des IFs von dem Verhältnis von vier verschiedenen Ionen zueinander abhingen. 25 Jahre später konnten OSTERYOUNG<sup>8</sup> und GILBERT<sup>9</sup> mit einer Mischung aus 1-Butylpyridiniumchlorid und  $\text{AlCl}_3$  ein System vorstellen, dass nur noch aus zwei Salzen mit gleichen Anionen, nämlich dem Chlorid-Ion, bestand und daher einfacher in der Handhabung war. Obwohl hauptsächlich für grundlegende Untersuchungen der Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten verwendet, war das 1-Butylpyridiniumchlorid/ $\text{AlCl}_3$ -System auch schon aus industrieller Perspektive interessant, wie ein Patent der *United States Air Force* zur Entwicklung von Batterieelektrolyten demonstrierte<sup>10</sup>. Das von OSTERYOUNG entwickelte System zeigte trotz seiner Vorteile immer noch einige Schwächen. Zum einen war es nur in einem sehr schmalen Mischungsverhältnis bei Raumtemperatur flüssig, zum anderen ist das Pyridinium-Kation anfällig gegenüber Reduktionsreaktionen, was die Anwendung dieser ionischen Flüssigkeit in der Elektrochemie erheblich einschränkte. Mittels MNDO (MNDO = Modified Neglect of Differential Overlap) semi-empirischen Molekülorbital Berechnungen konnten WILKES und HUSSEY von 60 verschiedenen Heterozyklen die Energien der LUMOs, welche Auskunft über deren Reduktionsstabilitäten geben, bestimmt werden<sup>11</sup>. Gestützt auf diesen Studien wurde vorhergesagt, dass das seit 1884 bekannte 1,3-Dialkylimidazolium-Kation<sup>12</sup> reduktionsstabiler sein sollte. Aufgrund dieser richtigen Prognose wurde 1982 basierend auf dem 1,3-Dialkylimidazolium-Kation das mittlerweile klassische ionische Flüssigkeiten-System 1,3-Dialkylimidazoliumchlorid- $\text{AlCl}_3$  entwickelt<sup>13</sup>. Wie theoretisch vorhergesagt zeigt dieses System deutlich verbesserte elektrochemische Eigenschaften. Weiterhin ist es nur gering viskos bei Raumtemperatur in einem breiten Zusammensetzungsbereich. Eine interessante Eigenschaft dieses ionischen Lösungsmittels ist, dass seine Azidität abhängig von der Zusammensetzung der Mischung ist. Bei einem Molenbruch des  $\text{AlCl}_3$  unter 0,5 ist das System basisch, darüber sauer. Ein Nachteil, der einen breiten Durchbruch in der industriellen Anwendung verhinderte, war die Hydrolyseempfindlichkeit des Salzes. Um Feuchtigkeit auszuschließen musste noch immer unter Schutzgasatmosphäre gearbeitet werden.

WILKES und ZAWOROTKO stellten 1992 eine neue Generation von „luft- und wasserstabilen“ ionischen Lösungsmitteln vor<sup>14</sup>. Sie wurden durch anorganische Metathese von 1-Ethyl-3-methylimidazoliumiodid mit den entsprechenden Silbersalzen von Tetrafluoroborat, Nitrat, Nitrit, Acetat und Sulfat gewonnen. Im gleichen Jahr präsentierten COOPER und O’SULLIVAN die ebenso „stabilen“ ionischen Flüssigkeiten [EMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] und [EMIM][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] auf dem „8th International Molten Salts Symposium“<sup>15</sup>. Auch wenn diese IFs deutlich stabiler gegenüber Luft und Feuchtigkeit als die AlCl<sub>3</sub>-Systeme sind, muss mit ihnen dennoch in trockener Atmosphäre gearbeitet werden. Sie sind hygroskopisch und zum Teil nur wenig hydrolysestabil. Fluorhaltigen IFs wie [EMIM][PF<sub>6</sub>] beispielsweise können nach Kontakt mit Wasser HF freisetzen. Was zum einen zu ihrer Zersetzung und zum anderen einen deutlichen Abfall des pH-Wertes bewirkt. Durch die Verwendung hydrophoberer Anionen wie Triflat oder Trifluormethansulfonat konnte das hygroskopische Verhalten der IFs entscheidend reduziert werden<sup>16</sup>. Mit den zwischenzeitlich bekannten Methoden zur Darstellung neuer IFs und der Verwendung neuer Kationen wie Phosphonium oder Pyrrolidinium sollte es theoretisch möglich sein, mehr als eine Millionen einfache IFs zu synthetisieren<sup>17</sup>.

Im weiteren Verlauf der neunziger Jahre wurde ein tieferes Verständnis über die Natur der IFs erreicht. Durch die Erkenntnis, dass unsymmetrische Kationen zu geringeren Gitterenergien führen und dadurch den Schmelzpunkt absenken, waren Prognosen über den Schmelzpunkt von IFs möglich<sup>18</sup>. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Salze von 1,3-Dimethylimidazolium-bzw. 1,3-Diethylimidazolium-Kationen (Punktgruppe C<sub>2v</sub>) einen höheren Schmelzpunkt als Salze des unsymmetrischeren 1-Ethyl-3-methylimidazolium Kations (Punktgruppe C<sub>s</sub>) besitzen<sup>19</sup>. Gleiches ist bei Pyrrolidinium- und Ammonium-Kationen zu beobachten<sup>20</sup>. Dieser Zusammenhang konnte vor kurzem in einer computergestützten *quantitative structure activity relationship* (QSAR) Studie bestätigt werden<sup>21</sup>. Ein weiterer Faktor, welcher den Schmelzpunkt von IFs beeinflusst, ist die An- oder Abwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen<sup>22</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass IFs ohne starke Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Kat- und Anionen wie Dialkylimidazoliumtetrafluoroborate<sup>23</sup> oder -hexafluorophosphate<sup>24</sup> bei geringeren Temperaturen schmelzen als IFs mit Anionen die starke Wasserstoffbrücken ausbilden wie es z.B. bei Halogeniden der Fall ist.

Mit dem *Pollution Prevention Act of 1990*<sup>25</sup> wurde in den Vereinigten Staaten das Konzept der *green chemistry* geboren. In den folgenden Jahren wurden zwölf Prinzipien formuliert, nach denen chemische Prozesse zu entwickeln seien, damit sie als grün – somit ökologisch unbedenklich – zu bewerten seien<sup>26</sup>. Das zwölfte Prinzip besagte, dass Prozesse so gestaltet sein sollten, dass die Gefahr einer Freisetzung von umweltgefährdenden Substanzen minimiert wird. Da die meisten in der chemischen Industrie verwendeten Lösungsmittel *volatile organic compounds* (VOCs), also flüchtige organische Verbindungen sind, besteht bei ihrer Verwendung ein erhöhtes Freisetzungsrisiko. Der sehr geringe Dampfdruck von IFs macht sie daher zu einer idealen Alternative für VOCs, z.B. in Extraktionsprozessen<sup>27</sup>.

Ein weiterer Vorteil von IFs ist die Möglichkeit sie als sog. Designer-Lösungsmittel<sup>28</sup> einzusetzen. Da sich IFs aus Anionen und Kationen bestehen, sollte es basierend auf diesem modularen Aufbau möglich sein, durch entsprechende Kombination von Kat- und Anionenpaaren IFs zu generieren, die physikochemische Eigenschaften besitzen, welche optimal auf die jeweilige Problemstellungen abgestimmt sind. Auf Basis dieser Vorstellungen wurde das *task-specific-ionic-liquid*-Konzept (TSIL) entwickelt<sup>29,30</sup>. Das Jahr 2000 markierte den Beginn des Einsatzes von IFs in der Biokatalyse. Die Enzyme *Candida antarctica* lipase<sup>31</sup>, Thermolysin<sup>32</sup> und R312 aus *Rhodococcus*<sup>33</sup> zeigten in [BMIM][BF<sub>4</sub>] und [BMIM][PF<sub>6</sub>] vergleichbare oder bessere Reaktivitäten als in den für diese Enzyme bisher verwendeten organischen Lösungsmittelsystemen. In IFs wurden aber nicht nur Biomoleküle wie Enzyme zur Katalyse verwendet sondern auch zur Darstellung von IFs benutzt. 2005 wurde durch Neutralisierung von [EMIM][OH] mit Aminosäuren IFs basierend auf den 20 proteinogenen Aminosäuren dargestellt.<sup>34</sup>

Im Jahre 2006 konnten verschiedene IFs zum ersten Mal destilliert werden<sup>35</sup>. Durch diese Entdeckung wurde die bis dahin allgemein akzeptierte Annahme, dass IFs keinen Dampfdruck besitzen, widerlegt<sup>35</sup> (s. 1.2.3). Diese Verdampfbarkeit ermöglicht neue Reinigungsstrategien für die Synthese von IFs, gleichzeitig hinterließ sie Kratzer am uneingeschränkt grünen Image der IFs. Erwähnt werden muss jedoch, dass ihr Dampfdruck aber trotz der prinzipiellen Verdampfbarkeit um Größenordnungen unter denen molekularer Lösungsmittel bleibt. Daher ist ihre Verwendung als Ersatz für VOCs weiterhin gerechtfertigt<sup>36</sup>.

## 1.2 Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten

In der Literatur werden IFs viele Eigenschaften zugewiesen, bei denen zweifelhaft erscheint, ob sie tatsächlich allgemeine Eigenschaften von IFs sind<sup>36-38</sup>. Teilweise werden Positionen, wie die Behauptung IFs hätten keinen Dampfdruck, bezogen, welche schon widerlegt sind<sup>35</sup>. Oft werden aus Eigenschaften spezieller IFs allgemein geltende Eigenschaften aller IFs gemacht. So werden IFs häufig mit *green chemistry* in Verbindung gebracht oder es wird behauptet sie seien prinzipiell nicht brennbar. Im Folgenden wird diskutiert werden, welche Eigenschaften IFs besitzen und ob diese allgemeingültig für alle IFs sind.

### 1.2.1 Umweltverträglichkeit von ionischen Flüssigkeiten

Die Gefahr von Luftverschmutzungen durch IFs ist durch den niedrigen Dampfdruck dieser Verbindung sehr gering. Eine Belastung des Abwassers ist gerade bei großindustriellen Prozessen hingegen wahrscheinlich. Daher ist zu untersuchen, ob IFs das aquatische Ökosystem beeinflussen. Um dies zu überprüfen, wurden die Algen *Oocystis submarina* und *Cyclotella meneghiniana* mit verschiedenen Imidazolium-basierenden Tetrafluoroboraten in Kontakt gebracht<sup>39</sup>. Während *Oocystis* sich nach fünf Tagen an geringe IF-Konzentrationen gewöhnen kann und wieder beginnt zu wachsen, wird das Wachstum von *Cyclotella* durch die IFs effektiv unterdrückt. In Experimenten mit dem Wasserfloh *Daphnia magna* konnten die letalen Konzentrationen (LC50) von ausgewählten imidazoliumbasierten IFs bestimmt werden. Sie liegen in der Größenordnung von molekularen Lösungsmitteln, die in großindustriellen Prozessen verwendet werden<sup>40</sup>. In weiteren Studien mit *Daphnia magna* und *Pseudokirchneriella subcapitata*<sup>41</sup> bzw. *Scenedesmus quadricauda* und *Chlamydomonas reinhardtii*<sup>42</sup> wurde die mittlere effektive Konzentration (EC50) einer Reihe von IFs bestimmt. Alle getesteten IFs zeigen EC50-Werte, die teilweise um mehrere Größenordnungen unter 100 mg/l liegen und somit toxischer als konventionelle Lösungsmittel sind. Sie können daher nicht als wenig giftig für Wasserorganismen bezeichnet werden. Alle Studien zeigen, dass diejenigen IFs, die längere Alkylketten besitzen, giftiger für Wasserorganismen sind als IFs mit entsprechend kürzeren Ketten. Weiterhin liegen die LC50 und EC50-Werte der IFs über den Werten der analogen Natrium-Salze. Die Giftigkeit beruht folglich nicht auf den Eigenschaften der einzelnen Ionen sondern entsteht maßgeblich erst bei der Kombination von An- und Kationen zu IFs.

Der Einfluss von IFs auf eine Vielzahl von Bakterien wurde mit ähnlichen Ergebnissen untersucht. *Lactobacillus rhamnosus* zeigt in Gegenwart von Dialkylimidazoliumhexafluorophosphaten abgesenkte Milchsäureproduktion. Das Ausmaß der Verringerung korreliert auch hier mit der Länge der Alkylketten<sup>43</sup>. Imidazolium- und Pyridinium-basierten IFs zeigen gegenüber *Vibrio fischeri* ebenfalls eine mit der Alkylkettenlänge steigende Toxizität. Octyl- und hexylsubstituierte IFs sind für dieses Bakterium sogar giftiger als konventionelle Lösungsmittel wie Benzen oder Phenol<sup>44</sup>. [BMIM][BF<sub>4</sub>] und [BMIM][PF<sub>6</sub>] haben auch auf die Bakterien *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* und *Bacillus cereus* substanzielle inhibitorische Effekte<sup>45</sup>. Der negative Einfluss einer erhöhten Alkylkettenlänge zeigt sich ebenso bei der Inhibierung von Enzymen wie Acetylcholinesterase<sup>46</sup> und AMP-Deaminase<sup>47</sup> sowie in Tierexperimenten mit *Caenorhabditis elegans*<sup>48</sup>, *Physa acuta*<sup>49</sup> und *Danio rerio*<sup>50</sup>. Während IFs für den Nematode *C. elegans* nicht akut toxisch zu sein scheinen, erreichen sie bei dem Zebrafisch *Danio rerio* LC50-Werte teilweise sehr deutlich unter 100 mg/l. Es lässt sich feststellen, dass IFs nicht weniger giftig als molekulare Lösungsmittel sind. Die Cytotoxizität hängt stark von dem verwendeten Kation<sup>51</sup>, der Länge der Alkylketten, deren Funktionalisierung ab<sup>52,53</sup>. Viele IFs halten demnach nicht das zweite– Verwendung von ungiftigeren Produkten – und das dritte Grundprinzip – Darstellung von für Mensch und Umwelt ungefährlichen Substanzen – ein. Weiterhin wird auch das vierte Prinzip – Nutzung erneuerbarer Rohstoffe – verletzt, obwohl mittlerweile es auch IFs, die auf regenerativen Rohstoffen basieren dargestellt wurden<sup>54</sup>. Eine grundsätzliche Verbindung von IFs und *green chemistry* kann somit nicht gezogen werden. Nichtsdestotrotz können einige IFs wertvolle Beiträge zu einer umweltschonenderen Chemie leisten

### 1.2.2 Brennbarkeit von ionischen Flüssigkeiten

Experimentell konnte gezeigt werden, dass viele Alkylimidazolium-basierte IFs aufgrund ihres sehr geringen Dampfdruckes<sup>55</sup> nicht brennbar sind<sup>56</sup>. Aus diesen Studien wurde eine prinzipielle Nichtbrennbarkeit von IFs abgeleitet. 2002 konnte jedoch mit 1-Ethyl-3-methylimidazoliumtetranitroborat ein IF mit einem hohen Energiegehalt dargestellt werden, dass sowohl brennbar als auch explosiv ist<sup>57</sup>. Seine Instabilität verhinderte aber seine Anwendung als Sprengstoff oder Treibmittel. 1-Ethyl-4,5-dimethyltetrazoliumtetranitroaluminat hingegen ist ebenfalls brennbar und explosiv, es zeichnet sich aber trotz seines Energiegehaltes durch eine höhere

Stabilität aus<sup>58</sup>. Andere Beispiele wie Triazoliumperchlorat bzw. -nitrat<sup>59</sup> oder die Nitrat- und Perchloratsalze von 1,2,3,4-Tetrazin sind ebenso potentielle Sprengstoffe und somit brennbar. Die Brennbarkeit von 20 weiteren IFs wurde von SMIGLAK et al. getestet. Dazu wurden 40 mg der zu testenden IFs in einem Tiegel für 5-7 Sekunden in eine Brennerflamme gehalten. Alle getesteten IFs verbrannten, die Schnelligkeit ihrer Pyrolyse variierte mit der Ionenzusammensetzung<sup>37</sup>. Nichtbrennbarkeit ist daher keine allgemeine Eigenschaft von IFs.

### 1.2.3 Dampfdruck und Gasphasenverhalten von ionischen Flüssigkeiten

Die ursprüngliche Annahme, dass IFs nicht destillierbar seien, beruht auf Experimenten in denen ein [EMIM][Cl]-AlCl<sub>3</sub> System keinen messbaren Dampfdruck zeigte<sup>60</sup>. Bei einem zweifachen Überschuss an AlCl<sub>3</sub> bildete sich zwar eine Gasphase bei Temperaturen über 190 °C. Diese bestand aber aus dissoziierten IFs. Es lagen demnach keine Ionen sondern nicht geladene Moleküle vor<sup>61</sup>. Im Jahre 2006 konnte die Annahme des nicht existenten Dampfdruckes jedoch von EARLE et al. widerlegt werden<sup>35</sup>. Eine Reihe verschiedener aprotischer IFs mit sowohl unterschiedlichen Kat- als auch Anionen sind ohne Zersetzung bei reduziertem Druck und Temperaturen zwischen 200-300 °C destillierbar. Allerdings zeigen sich zum Teil deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Struktur der jeweiligen IFs. Bistriflatamide sind einfacher zu destillieren als beispielsweise Tosylate oder Hexafluorophosphate. Halogenide, Sulfate und Carboxylate neigen dagegen zur Zersetzung unter De- oder Transalkylierung der Kationen.

Die Natur der in der Gasphase auftretenden IFs-Spezies blieb auch nach weiteren erfolgreichen thermischen Verdampfungen<sup>62,63</sup> umstritten<sup>36</sup>. Eine Reihe von frühen massenspektrometrischen Untersuchungen mittels *fast atom bombardment* (FAB)<sup>64</sup>, *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI)<sup>65</sup> und *electrospray ionization* (ESI)<sup>66</sup> legten die Existenz von Ionenclustern in der Gasphase nahe. Die Bedingungen, unter denen sich derartige Cluster bildeten, sind aber weit von den Destillationsbedingungen entfernt. Neuere massenspektrometrische Untersuchungen mittels *atmospheric-pressure thermal desorption ionization mass spectrometry* (APTDMI-MS)<sup>67</sup>, *atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry* (APCI-MS)<sup>68</sup>, *fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry* (FTICR-MS)<sup>69</sup> und durch eine Verdampfung von dünnen IF-Filmen im Ultrahochvakuum mit anschließender MS-Detektion zeigen<sup>62</sup>, dass die gebildeten IF-Spezies hochgradig von den gewählten

experimentellen Bedingungen abhängen. Es wurden isolierte Kationen<sup>67</sup>, neutrale IF-Aggregate<sup>68</sup> und neutrale Ionenpaare<sup>62,69</sup> gefunden. Der starke Einfluss der Untersuchungsbedingungen wurde auch in einer theoretischen Arbeit bestätigt<sup>70</sup>. Da die Bedingungen, die denen der Destillation von aprotischen IFs am nächsten kamen, zu neutralen Ionenpaaren führen, ist anzunehmen, dass die Destillation über diese ungeladenen Spezies erfolgt.

#### 1.2.4 Schmelz- und Gefrierpunkt von ionischen Flüssigkeiten

Ein Lösungsmittel sollte für einen bestimmten chemischen Prozess so gewählt werden, dass seine physikochemischen Eigenschaften den Reaktionsablauf optimal unterstützen. IFs als Designerlösungsmittel bieten dabei ein hohes Maß an Adaptionmöglichkeiten. Da fast alle chemischen Reaktionen aber nur in beschränkten Temperaturbereichen kontrolliert ablaufen, ist die prinzipielle Eignung eines Lösungsmittels dadurch limitiert, dass das gewünschte Lösungsmittel in diesem Temperaturbereich flüssig sein muss. Folglich muss die Reaktionstemperatur, abgesehen von einigen Ausnahmen wie z.B. Reaktionen in überkritischen Fluids, zwischen Schmelz- und Siedepunkt des Lösungsmittels liegen. Viele IFs zeigen weite Temperaturbereiche zwischen ihren Schmelz- und Siede- bzw. Zersetzungspunkt in denen sie als Lösungsmittel verwendet werden können. Eine möglichst genaue Kenntnis und Prognose sowohl der Schmelzpunkte von IFs, die vielfach deutlich über denen molekularer Lösungsmittel liegen, als auch der Siede- bzw. Zersetzungspunkte ist von eminenter Wichtigkeit. Eine Abschätzung des Schmelzpunktes ist über die Symmetrie der Kationen möglich<sup>18</sup>. Symmetrische Ionen ermöglichen eine höhere Packungsdichte und stärker ionische Wechselwirkungen, was somit zu erhöhten Schmelzpunkten führt. QSAR-Untersuchungen mit Imidazolium<sup>71</sup>, Pyridinium<sup>72</sup> und Ammoniumbromiden<sup>73</sup> zeigen, dass neben der Symmetrie des Kations auch seine Größe, Ladung und die Ladungsverteilung entscheidend für den Schmelzpunkt sind<sup>74</sup>. In einer Studie mit ausgewählten Imidazolium-basierten IFs wurde gezeigt, dass Analoges auch für den Einfluss des Anions gilt<sup>21</sup>.

Charakteristisch für IFs ist zudem, dass sie deutliche Unterschiede in ihren Schmelz- und Gefrierpunkten aufweisen können. Eine verflüssigte IF-Probe kann auch nach Absenken der Temperatur unter den Schmelzpunkt des IFs in einem metastabilen Zustand flüssig bleiben. Dieser Effekt der Unterkühlung konnte für verschiedene

Imidazolium-Salze festgestellt werden<sup>75,76</sup>. Eine *differential scanning calorimetry* (DSC) Studie des Schmelz- und Gefrierungsverhaltens von [BMIM][Br] und [BMIM][Cl] zeigt, dass [BMIM]<sup>+</sup>-Kationen im flüssigen und im festen Zustand in verschiedenen Konformationen auftreten. Während im festen Zustand die Methylen-C-Atome der Butylfunktion *gauche-trans* zueinander stehen, existiert im flüssigen Zustand sowohl eine *gauche-trans* als auch eine *trans-trans* Konformation. Mit dem Phasenübergang muss also eine Umwandlung der Konformere stattfinden. Aufgrund dieses entropischen Effektes sind viele IFs zudem nur schwer zu kristallisieren<sup>77</sup>.

### 1.2.5 Allgemeingültige Eigenschaften aller ionischen Flüssigkeiten

Da IFs sich aus fast frei kombinierbaren Ionenpaaren zusammensetzen, sind ihre Eigenschaften sehr weit gefasst. So können IFs ungiftig oder giftig, explosiv oder schlecht brennbar sein. Dieses weitgefaste Spektrum ist gerade eines der Hauptvorteile von IFs, sie sind Designerlösungsmittel, die den Bedürfnissen einer bestimmten Aufgabenstellung angepasst werden können. Daher kann man als allgemeine Eigenschaft von IFs nur zwei Punkte angeben.

- Ionische Flüssigkeiten sind Salze
- Ionische Flüssigkeiten haben einen Schmelzpunkt von unter 100 °C

## 1.3 Industrielle Anwendung von ionischen Flüssigkeiten

### 1.3.1 Isomerisierung von 3,4-Epoxybut-1-en

Der erste großindustrielle Prozess, in dem IFs eingesetzt wurden, ist die Isomerisierung von 3,4-Epoxybut-1-en zu 2,5-Dihydrofuran und Crotonaldehyd. Dieser Prozess benötigt zwingend eine LEWIS-Säure als Katalysator und eine LEWIS-Base, die bei Temperaturen unterhalb des Siedepunktes von 2,5-Dihydrofuran, welches als Lösungsmittel verwendet wird, flüssig ist. Dieses Kriterium erfüllen auch Nicht-IF-Basen aber mit dem IF Phosphoniumiodid wurden die besten Raumzeitausbeuten erhalten<sup>78</sup>.

Die *Eastman Chemical Company* unterhielt von 1996 an eine Anlage mit einer Kapazität von 1400 t/a für diesen Prozess, die jedoch im Jahr 2004 wegen mangelnder Produktnachfrage stillgelegt wurde<sup>79</sup>.



### 1.3.2 Der BASIL™-Prozess

In Deutschland fand 2002 die erste großindustrielle Anwendung von IFs in Ludwigshafen durch die BASF statt. Bei der Herstellung von Alkoxyphenylphosphinen aus den entsprechenden Chloriden wird klassischer Weise die entstehende Säure mit der Base Triethylamin abgefangen. Das entstehende Salz bildet eine Suspension, welche zu technischen Problemen, wie hoher Viskosität und schlechter Durchmischbarkeit führt. Im BASIL™-Prozess (*Biphasic Acid Scavenging utilizing Ionic Liquids*)<sup>80</sup> wird als Base 1-Methylimidazol verwendet. Das bei Einsatz dieser Base entstehende Salz [MIM][Cl] ist ein IF, das sich als diskrete Phase im Reaktor abscheidet und daher leicht abtrennbar ist. Weiterhin katalysiert 1-Methylimidazol die Reaktion, so dass sich die Ausbeute von 50% auf 98% und die Raumzeitausbeute von lediglich  $8 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  auf beachtliche  $690.000 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  erhöhen lies<sup>81</sup>. Anstelle eines Rührkessels kann nun ein kontinuierlich betriebener, nur daumengroßer Strahldüsenreaktor verwendet werden<sup>82</sup>. Das 1-Methylimidazol kann durch Basen aus dem entstandenen IF regeneriert werden<sup>80</sup>. Für diesen hocheffizienten Prozess wurde 2004 der *ECN Innovation Award* verliehen<sup>83</sup>.

### 1.3.3 Der Fusel®-Prozess

Traditionell erfolgt die Dimerisierung von kurzen Alkenen wie Propen und Buten zu längeren, verzweigten und somit kommerziell wertvolleren Alkenen über den Dimersol-Prozess. Diese Reaktion wird durch Komplexe der Form  $[(\text{PR}_3)_3\text{NiCH}_2\text{R}][\text{AlCl}_4]$  katalysiert. Es wird entweder lösungsmittelfrei oder in aromatischen bzw. halogenierten Kohlenwasserstoffen gearbeitet<sup>84</sup>.

Darauf basierend hat sich der Difasol-Prozess etabliert. In diesem werden auf Chloroaluminat (III)-basierende IFs anstelle der traditionellen Lösungsmittel des Dimersol-Prozesses verwendet. Die Aktivität des Katalysators ist im IF-System ebenso wie die Selektivität der gebildeten Dimere deutlich erhöht. Da sich die Produkte als eine neue Phase abscheiden, ist die Produktabtrennung erleichtert. Auch in diesem Prozess erhöht sich die Raumzeitausbeute. Die Verwendung von IFs ermöglicht zudem auch die Darstellung höherer Olefine<sup>85,86</sup>.

## 1.4 *Beeinflussung des Verlaufes chemischer Reaktionen durch ionische Flüssigkeiten*

### 1.4.1 **Friedel-Crafts-Reaktionen in ionischen Flüssigkeiten**

Friedel-Crafts-Reaktionen<sup>87</sup> beschreiben die  $\text{AlCl}_3$ -katalysierte Acylierung bzw. Alkylierung von Aromaten. Schon 1976 wurden sie zum ersten Mal in IFs durchgeführt<sup>88-90</sup>. Die Verwendung von dem zu dieser Zeit bereits bekannten IF  $[\text{EMIM}][\text{Cl-AlCl}_3]$  als Lösungsmittel bietet sich an, da das  $\text{AlCl}_3$  sogleich als Katalysator für die Friedel-Crafts-Reaktionen dienen kann. Acetylierungen von Anthracen und anderen Aromaten in solchen IF-Systemen liefern sehr effizient und selektiv die stereoelektronisch bevorzugten Produkte<sup>91</sup>. Eine erhöhte Selektivität konnte auch bei der Alkylierung von  $\alpha$ -Methylnaphthalen beobachtet werden. So bilden sich in Ammoniumaluminaten die gewünschten Monoalkylierungsprodukte in deutlich höheren Ausbeuten als in konventionellen Lösungsmittelsystemen<sup>92,93</sup>. IFs wie 1-Ethylpyridiniumtetrafluoroborat oder -trifluoracetat zeigen ebenfalls bei Acylierungen<sup>94</sup> und Alkylierungen<sup>95</sup> von Benzen, im Vergleich zu traditionellen Lösungsmittelsystemen, signifikant höhere Umsätze und Selektivitäten. Bei der Acylierung konnte in IFs eine im Vergleich zu molekularen Lösungsmitteln verringerte Aktivierungsenergie der Bildung des für die Friedel-Crafts-Reaktion notwendigen Acylium-Kationes<sup>96</sup> festgestellt werden. Die damit einhergehende Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der Acylierungsreaktion erklärt die verbesserten Ausbeuten<sup>94</sup>.

### 1.4.2 **Heck-Reaktionen in ionischen Flüssigkeiten**

Bei der Heck-Reaktion<sup>97</sup> handelt es sich um eine Palladium-katalysierte Olefinierung von Arylhalogeniden. Sie ist eine der am besten untersuchten chemischen Reaktion überhaupt und wird sowohl in der Forschung als auch in der Industrie vielfach angewendet. In IFs finden diese Reaktionen mit erhöhten Reaktivitäten im Vergleich zu molekularen Lösungsmitteln statt. Pd-katalysierte Alkenylierungen von Iodbenzen verlaufen beispielsweise in  $[\text{BMIM}][\text{Br}]$  und  $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$  unter Ultraschall bei 30 °C mit Ausbeuten zwischen 73-87%, während in DMF und NMP kein Umsatz zu beobachten ist<sup>98</sup>. Andere z. B. ammonium<sup>99</sup>- oder guanidiniumbasierte<sup>100</sup> IFs zeigen ebenso erhöhte Aktivitäten und Ausbeuten. NMR-Studien belegen, dass die Katalysatorstruktur und damit seine Aktivität stark

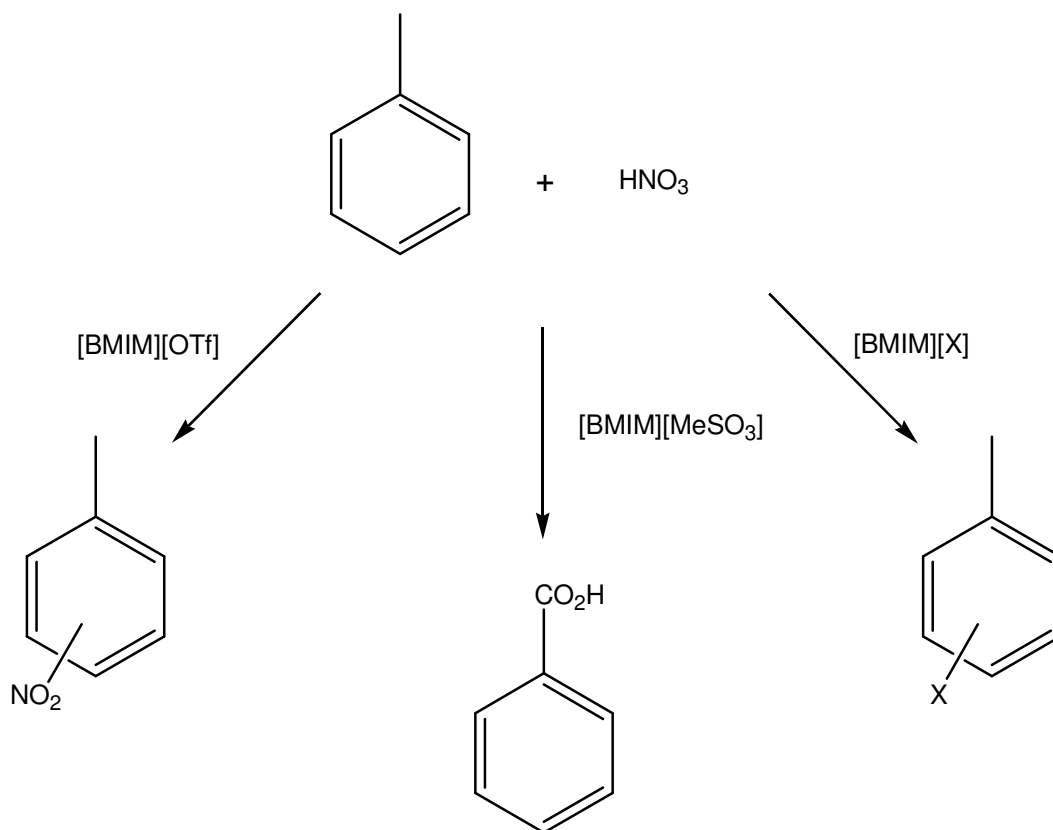
abhängig von der Natur des Anionens der IFs ist<sup>101</sup>. So sind mit Iodiden höhere Aktivitäten als mit Bromiden und Chloriden zu beobachten<sup>102</sup>. IFs haben aber nicht nur Einfluss auf Katalysatoraktivitäten und Ausbeuten sondern auch auf die Regioselektivität von Heck-Reaktionen. Die Arylierung elektronenreicher Olefine erfolgt in [BMIM][BF<sub>4</sub>] mit einer  $\alpha$ -Regioselektivität >99/1<sup>103,104</sup>. Diese sehr hohe Regioselektivität lässt sich über eine Beeinflussung des Reaktionsweges der Heck-Reaktion durch IFs erklären. Grundsätzlich können Heck-Reaktionen über zwei Reaktionswege erfolgen, einem neutralen und einem ionischen. Der neutrale führt zu  $\beta$ -Substitutionsprodukten, während der ionische  $\alpha$ -Substitutionsprodukte generiert<sup>105</sup>. In IFs scheint die Reaktion über den ionischen Weg zu verlaufen und führt somit zur  $\alpha$ -Substitution<sup>104</sup>. Dieser regioselektivitätsinduzierende Charakter von IFs tritt bei der Arylierung von *N*-Acyl-*N*-vinylamin bereits auf, wenn nur zehn Äquivalente des IFs [H<sub>2</sub>NiPr<sub>2</sub>][BF<sub>4</sub>] verwendet werden<sup>106</sup>. Es wird diskutiert, dass die hohe Ionenstärken der IFs dazu führen, dass die Heck-Reaktion über den ionischen Reaktionsweg erfolgt<sup>107,108</sup>.

### 1.4.3 Diels-Alder Reaktionen in ionischen Flüssigkeiten

Diels-Alder-Reaktionen<sup>109</sup> sind 4+2 Cycloadditionen zwischen einem konjugierten Dien und einem Dienophil. Die Geschwindigkeit dieser Reaktionen wird in vielen Fällen erhöht, wenn ein IF als Lösungsmittel verwendet wird. So ist die Reaktion von Cyclopentadien mit Methylvinylketon in tetrafluoroboratbasierenden IFs deutlich schneller als in molekularen Lösungsmitteln<sup>110</sup>. Weiterhin wurde bei der Reaktion zwischen Cyclopentadien und Methacrolein in verschiedenen imidazoliumbasierten IFs eine *endo:exo*-Selektivität von 15:85 bis 10:90 festgestellt<sup>111</sup>. Für dieses spezielle System konnte mit quantenchemischen Berechnungen die experimentell beobachtete *exo*-Selektivität bestätigt werden. Demzufolge wirken Imidazolium-Kationen als schwache LEWIS-Basen und erhöhen somit die Asynchronität der Reaktion. Von den vier möglichen Reaktionspfaden (*endo-cis*, *exo-cis*, *endo-trans*, *exo-trans*) ist der *exo-cis* Pfad energetisch bevorzugt<sup>112</sup>. Hieraus lässt sich keine generelle *exo*-Selektivität von IFs ableiten, schon ein Austausch von Methacrolein gegen Crotonaldehyd führt unter ansonsten gleichen Bedingungen zu einer *endo*-Selektivität<sup>111</sup>. Diese ist auch mit anderen Dienophilen<sup>113</sup> und anderen IFs<sup>114</sup> zu erreichen. Es zeigt aber eindeutig, dass IFs die Selektivität von Diels-Alder Reaktionen verbessern können.

### 1.4.4 Produktverteilung der Reaktion zwischen Toluol und Salpetersäure in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten

Ein Beispiel für eine bemerkenswerte Beeinflussung des Reaktionsverlaufes durch IFs ist die Reaktion zwischen Toluol und Salpetersäure<sup>115</sup>. In Abhängigkeit von dem verwendeten IF werden unterschiedliche Produkte gebildet. In [BMIM][OTf] wird Nitrotoluol in quantitativen Ausbeuten erzeugt. Wird hingegen ein Imidazoliumhalogenid verwendet, so entsteht nicht Nitrotoluol bei der Reaktion mit Salpetersäure sondern Brom bzw. Chlortoluol. In IFs mit Methansulfonat als Anion wirkt Salpetersäure nicht wie ein Nitrierungsmittel sondern als Oxidationsmittel. Es entsteht Benzoesäure. Durch die Wahl eines geeigneten IFs ist es somit möglich, die Reaktion in drei vollständig unterschiedliche Richtungen ablaufen zu lassen (s. Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1** Die Reaktion zwischen Toluol und Salpetersäure führt in drei verschiedenen IFs zu drei unterschiedliche Produkten.

### 1.4.5 Glykosylierungen in ionischen Flüssigkeiten

Glykosylierungen beschreiben die Übertragung eines Saccharides auf eine andere funktionelle Gruppe. Die Glykosylierung von Peptiden und Proteinen ist eine der

wichtigsten posttranslationalen Modifikationen in der Natur und hat hohe Bedeutung bei der Steuerung von Signaltransduktion- aber auch Erkennungsprozessen. Daher ist die chemische Darstellung von glykosylierten Peptid- bzw. Proteinprodukten von hohem Interesse.

Glykosyltrichloracetimide reagieren in [BMIM][PF<sub>6</sub>] mit verschiedenen Alkoholen und Zuckern mit guten Ausbeuten<sup>116</sup>. Während in dieser Reaktion die  $\alpha/\beta$ -Selektivitäten an den anomeren C-Atomen vergleichbar mit denen in molekularen Lösungsmitteln sind, kann in anderen IF-Systemen eine deutliche Erhöhung beobachtet werden. Die Glykosylierung von Cyclohexylmethanol mit Glucopyranosylfluorid<sup>117</sup> bzw. von verschiedenen Alkoholen mit Glucopyranosyl-diethylphosphit<sup>118</sup> in imidazoliumbasierten Trifluoromethansulfonaten und Trifluoromethansulfonimiden zeigt eine klare Tendenz zu  $\beta$ -Selektivitäten. In anderen IF-Reaktionssystemen sind Selektivitäten von über 99:1 zu erreichen. Die Reaktion zwischen verschiedenen Glykosylfluoriden und -acetaten mit Arylalkoholen in [HMIM][BF<sub>4</sub>] erfolgt mit einem  $\alpha/\beta$ -Verhältnis von <1:99. Es ist sogar die Umsetzung von ungeschützten Methylglycosiden mit gleichen Selektivitäten möglich<sup>119</sup>. Der Umsatz von verschiedenen Monosacchariden mit Arylalkoholen in 1-Ethyl-3-methylimidazoliumbenzoat erfolgt hingegen ausschließlich mit  $\alpha$ -Selektivität<sup>120</sup>.

Der in klassischen, organischen Reaktionen beobachtete Einfluss von IFs auf Stereo- und Regioselektivitäten ist somit auch beim Umsatz von Biomolekülen wie Zuckern festzustellen.

#### 1.4.6 Synthese von Peptiden in ionischen Flüssigkeiten

Die Synthese von Peptiden in IFs wurde bisher nur rudimentär untersucht. Erste Arbeiten konnten zeigen, dass die Synthese von Peptiden mit bekannten Aktivierungsmethoden in [BMIM][PF<sub>6</sub>] möglich ist. Es konnten Pentapeptide und cyclische Peptide dargestellt werden<sup>121,122</sup>. Da in diesen Studien nur Aminosäuren ohne reaktive Seitenketten eingesetzt wurden, kann noch keine Aussage über die Möglichkeit in IFs auch bei Peptiden selektive Reaktionen durchzuführen getätigt werden. Weitere Anwendungsfelder sind der Einsatz von IFs als Kupplungs- und Entschützungsreagenzien<sup>123</sup> sowie als spurloser Träger in der Peptidsynthese<sup>123,124</sup>.

## 1.5 Biokatalyse in ionischen Flüssigkeiten

Seit den 1980iger Jahren wurde versucht die Eigenschaften von Enzymen durch Variierung des Reaktionsmediums zu beeinflussen. Durch Verwendung von organischen Medien sank jedoch die Aktivität deutlich ab<sup>125</sup>. Ein Vorteil war, dass sich in den hydrophoberen organischen Lösungsmitteln mit Substraten arbeiten ließ, die in rein wässrigen Medien unlöslich waren<sup>126</sup>. Bei der Verwendung von IFs als Medium für die Biokatalyse besteht die Möglichkeit, IFs als *task-specific solvents* auf die Eigenschaften von Enzymen abzustimmen und so die Vorteile von organischen Medien – ein breiteres Substratspektrum – mit denen von wässrigen Medien – hohe Aktivitäten und Reaktionsraten – zu verbinden<sup>127</sup>. Schon eine der früheren Studien mit der alkalinen Phosphatase aus *E.coli* konnte zeigen, dass in wässrigen Lösungen von [EtNH<sub>3</sub>][NO<sub>3</sub>] sogar eine Aktivierung des Enzymes auftrat. Dieser Effekt erreichte ein Maximum bei 10% (v/v) IF-Gehalt<sup>128</sup>. Der erste Versuch eine Biokatalyse in einem IF mit weniger als 5% Wassergehalt durchzuführen war die Synthese von Z-Aspartam. Hierbei wurde Z-geschütztes Aspartat mit Phenylalaninmethylester in [BMIM][PF<sub>6</sub>] unter Verwendung von Thermolysin als Katalysator in einer gleichgewichtskontrollierten Reaktion umgesetzt<sup>32</sup>. Es wurden im Vergleich zu dem konventionellen Lösungsmittel Ethylacetat 40% der Umsatzrate erreicht. Ein weiteres Beispiel für den erfolgreichen Einsatz von IFs in der Biokatalyse ist die proteasekatalysierte Ligation von spaltungssensitiven Peptiden. Diese Ligation wurde gemäß des Substratmimetikum-Konzeptes<sup>129</sup> unter Katalyse von Trypsin, Chymotrypsin bzw. V8-Protease durchgeführt. Eine sekundäre Hydrolyse von spaltungssensitiven Bindungen in den Edukten bzw. entstandenen Peptidprodukten konnte durch Verwendung von 60% (v/v) [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] erfolgreich unterdrückt werden<sup>130</sup>.

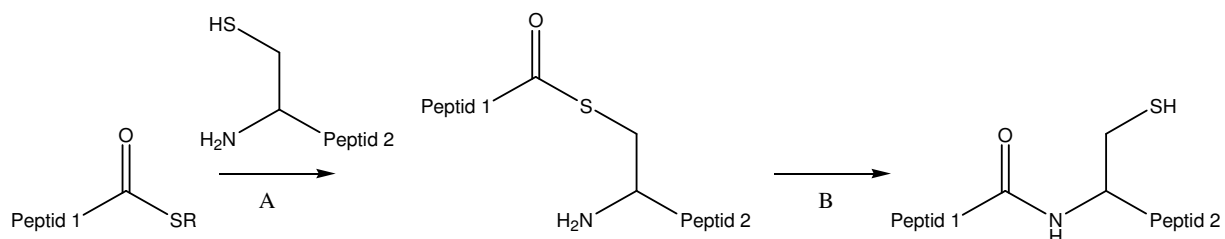
Eine allgemeine Prognose der Anwendbarkeit von IFs in der Biokatalyse scheitert auch hier an der Vielzahl der IFs, deren unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften und dem dadurch gegebenen unvorhersehbaren Einfluss auf enzymatische Reaktionen. Es ist zurzeit nicht möglich anhand von Parametern wie Polarität oder der Hofmeisterserie vorherzusagen, welche Enzyme mit welchen IFs kombinierbar sind. Für jede einzelne Enzymreaktion muss separat das optimale IF gefunden werden. Im Vergleich zu konventionellen organischen Lösungsmitteln

zeigte sich aber, dass die meisten Enzyme höhere Konzentration an IFs tolerieren und einen geringeren Aktivitätsverlust aufweisen<sup>127</sup>.

## 1.6 Methoden zur chemischen Peptidmodifizierung

Die Darstellung modifizierter Peptide erfolgt in der Regel durch Verwendung der von Robert Bruce MERRIFIELD eingeführten Festphasenpeptidsynthese<sup>131</sup>. An einem polymeren Träger werden bei dieser Technik sequentiell vollgeschützte Aminosäurebausteine angeknüpft. Durch diese Synthesestrategie konnten Peptide mit einer Länge von bis zu 124 Aminosäuren bereits dargestellt werden<sup>132,133</sup>. In der Routineanwendung werden aber nur Peptidketten von einer Länge bis etwa 50 Aminosäuren synthetisiert, da die Akkumulation von Rumpf- bzw. Fehlsequenzen zu verringerten Produktausbeuten und komplizierten Reinigungen führt. Durch die Verwendung von Aminosäurebausteinen ist es leicht möglich nichtproteinogene oder modifizierte Aminosäuren einzuführen. Ein Nachteil dieses Ansatzes ist die fehlende Regio- und Chemoselektivität der zur Peptidbindungsknüpfung notwendigen Additions-Eliminierungsreaktion. Da bei einer Synthesestrategie, die wie in der ribosomalen Peptidsynthese das Produkt vom *N*-Terminus her aufbaut, die Gefahr einer Epimerisierung gegeben ist<sup>134</sup>, wird meistens vom *C*-Terminus her das Peptid aufgebaut. Daher ist eine Schutzgruppenstrategie, die es ermöglicht Schutzgruppen an den Seitenkettenfunktionen und an der *N*<sup>α</sup>-Aminofunktion separat voneinander zu entfernen, notwendig<sup>135,136</sup>. Die daraus resultierende schlechte Atomökonomie<sup>137</sup> und die zur Vermeidung von Fehlsequenzen notwendige Verwendung von starken Überschüssen an Kupplungsreagenzien und Aminosäuren sowie Harzen führen zu hohen Kosten und beschränken die großindustrielle Anwendung. Weiterhin wirkt die Begrenzung auf 50-60 Aminosäuren in der Routineanwendung limitierend für die Darstellung größerer Peptide oder Proteine. Sollen letztgenannte modifiziert werden, ist die direkte Einführung schon veränderter Aminosäurebausteine nur noch mit sehr geringen Ausbeuten möglich. Man ist daher auf geeignete Ligationmethoden angewiesen, um mittels Festphasenpeptidsynthese dargestellte Peptidfragmente zu größeren Proteinen zu kondensieren. So kann z.B. mittels *native chemical ligation* (NCL)<sup>138,139</sup> oder der Staudinger Ligation<sup>140,141</sup> eine Segmentligation komplett ungeschützter Peptidfragmente durchgeführt werden. Beide Techniken stellen aber hohe Anforderungen an das darzustellende Substrat. NCL ist auf ein *N*-terminales Cystein

bzw. Cystein-Analogon in dem *N*-terminalen Peptidfragment angewiesen und bedarf der in der Praxis häufig schwierigen Synthese von *C*-terminalen Thioestern im *C*-terminalen Fragment. Der Mechanismus der NCL ist in Abbildung 1.2 dargestellt.



**Abbildung 1.2** Mechanismus der *native chemical ligation*, A: Transthioesterifizierung, B: *S-N*-Acylwanderung.

Die Sulfhydryl-Funktion des *N*-terminalen Cysteins greift in der NCL das Carbonyl-C-Atom des Thioesters nukleophil an und führt so zu einer Umesterung. Nach dieser Transthioesterifizierung erfolgt spontan eine *S-N*-Acylwanderung, indem die Aminofunktion des Cysteins ebenfalls nukleophil das Carbonyl-C-Atom des neuentstandenen Thioesters attackiert. Dieses führt schließlich zur Ausbildung der nativen Peptidbindung. Die Staudinger Ligation stellt zwar geringere Anforderungen an die Peptidsequenz, bedarf aber eines *N*-terminalen Peptidazids in einem Peptidsegment. Weiterhin muss der *C*-Terminus in einen Phosphinothioester umgewandelt werden. Unter Reduktion des Azids zum Amin wird in dieser Ligation eine Peptidbindung geknüpft. Die Synthese des Azids und des Phosphinothioesters kann in Abhängigkeit von der Peptidsequenz sehr anspruchsvoll sein.

Eine weitere Möglichkeit zur Peptidligation ist die Verwendung von Proteasen. Diese Enzyme können nicht nur die Hydrolyse, sondern auch die reverse Hydrolyse von Peptidbindungen und somit deren Knüpfung katalysieren. Als Katalysator verändern Proteasen nicht das thermodynamische Gleichgewicht, sondern nur die Geschwindigkeit in der sich dieses Gleichgewicht einstellt. Man unterscheidet zwei unterschiedliche Strategien der proteasekatalysierten Peptidbindungsknüpfung: die thermodynamisch und die kinetisch kontrollierte Synthese. Unter thermodynamischer Kontrolle stellt sich ein Gleichgewicht gemäß der freien Energie der Produkte und Edukte ein. Die Reaktionsgeschwindigkeiten und Ausbeuten sind daher häufig gering. Bei kinetischer Kontrolle sind deutlich höhere



Geschwindigkeiten und Ausbeuten zu beobachten. Hierfür sind aber Enzyme wie Serin- bzw. Cysteinproteasen, welche ein Acylenzymintermediat bilden, notwendig<sup>126</sup>. Der Einsatz von Enzymen ermöglicht effiziente Synthesen unter milden und auch umweltfreundlichen Bedingungen. Trotzdem weist auch die enzymatische Ligation einige Nachteile auf. So kann es zu Problemen mit der Substratlöslichkeit kommen und es besteht die Gefahr, dass, falls die Edukte oder die Produkte eine Erkennungssequenz der verwendeten Protease tragen, sie hydrolysiert werden.

Eine weitere Option zur Modifizierung von Peptiden ist die direkte Funktionalisierung der Seitenketten im Peptid oder Protein. Aminofunktionen können mit aminoreaktiven Reagenzien wie Succinimid- oder Pentafluorphenolaktivester<sup>142,143</sup> funktionalisiert werden, während Cysteinseitengruppen mit Maleimiden derivatisiert werden können<sup>144</sup>. Tritt in einem Peptid oder Protein mehr als eine reaktive funktionelle Gruppe auf, zeigen sowohl die Amino- als auch die Sulfhydrylfunktionalisierung eine sehr geringe Selektivität. Es entsteht ein breites Spektrum an isomeren Produkten. Für viele Anwendungen sind solche Produktgemische nicht einsetzbar. So ist beispielsweise die Einzelmolekülspektroskopie<sup>145</sup> ebenso wie die Pharmazie auf die Verwendung von Peptiden angewiesen, die ausschließlich an einer definierten Position markiert sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entwicklung von schutzgruppenfreien Acylierungsreaktionen, die hohe Selektivitäten zeigen, sowohl für die Modifizierung von Peptiden als auch für deren Synthese von besonderem Interesse wäre.

## 2. Zielsetzung

In der Literatur veröffentlichte Arbeiten zeigen, dass IFs Einfluss auf die Regioselektivitäten von Reaktionen nehmen können. Diese Auswirkung von IFs wurde bei klassischen organischen Reaktionen wie der Heck-Reaktion aber auch bei der Modifizierung von Biomolekülen wie Zuckern untersucht. Die Möglichkeit die Regioselektivität von Peptidmodifizierungsreaktionen mit IFs zu beeinflussen wurde hingegen noch nicht beleuchtet. Dabei würde gerade die Peptidchemie, die aufgrund des trifunktionalen Charakters vieler Aminosäuren auf eine komplexe Schutzgruppenstrategie angewiesen ist, besonders von lösungsmittelinduzierter Variation des Regioselektivitätsverhaltens profitieren.

Ziel dieser Arbeit ist es daher den Einfluss von IFs auf die Regioselektivität von aktivstervermittelten Peptidacylierungsreaktionen zu untersuchen. Die Auswirkung des Lösungsmittels soll durch Acylierung von Modellpeptiden in verschiedenen IFs ermittelt werden. Da es wahrscheinlich erscheint, dass auch die Peptidsequenz die Regioselektivität beeinflusst, sollen Pentapeptidbibliotheken verschiedener Sequenz und längere Modellpeptide ebenfalls in IFs acyliert werden. Weiterhin soll der Einfluss des Acyldonors, des pH-Wertes, der Länge der Lysinseitenkette und der Reaktionstemperatur bestimmt werden.

Auswirkungen der IFs auf die Regioselektivität der Peptidacylierungsreaktionen sollen mit physikochemischen Methoden analysiert werden. Veränderungen des  $pK_a$ -Wertes der nukleophilen Aminofunktionen der Peptide in IFs sollen durch *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR) untersucht werden. Ebenso sollen die dielektrischen Eigenschaften von IFs untersucht werden. Der Einfluss der IFs auf den Übergangszustand der Acylierungsreaktion soll durch Eyring-Kinetiken bestimmt werden. Weiterhin soll ermittelt werden, ob direkte Interaktionen zwischen IFs und in ihnen gelösten Peptiden auftreten. Dazu könnten Peptidylprolylbindungen als ein Sondensystem für direkte Peptid-IF Interaktionen verwendet werden. Zusätzlich soll diese Interaktion auch mit NMR-Techniken untersucht werden.

### 3. Materialien

#### 3.1 Substanzen

##### 3.1.1 Ionische Flüssigkeiten

Die ionischen Flüssigkeiten 1,3-Dimethylimidazoliumdimethylphosphat [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], 1-Ethyl-3-methylimidazoliumdimethylphosphat [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], 1-Ethylimidazoliumdiethylphosphat [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurden bei Solvent Innovation (Köln) gekauft. Es wurde eine Reinheit von 99,5% angegeben und eine Reinheit von 98% garantiert.

Die ionischen Flüssigkeiten 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluorborat [BMIM][BF<sub>4</sub>], 1-Butyl-3-methylimidazoliumthiocyanat [BMIM][SCN] und 1-Butyl-3-methylimidazoliumtrifluormethansulfonat [BMIM][TFMS] wurden bei Fluka (Steinheim) erworben. Die Reinheit wurde mit >97% angegeben. Eigene NMR-Untersuchungen zeigten eine Reinheit von >99%.

##### 3.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Reagenzien und Chemikalien entsprachen der höchsten kommerziell verfügbaren Reinheit und wurden von einem der folgenden Hersteller bezogen: Bachem (Weil am Rhein), Biosolve LTD (Valkenswaard, Niederlande), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Fluka (Steinheim), Iris Biotech GmbH (Marktredwitz), Merck (Darmstadt), Novabiochem (Schwalbach), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim).

Harze für die Festphasenpeptidsynthese wurden von Novabiochem (Schwalbach) und Iris Biotech GmbH (Marktredwitz) bezogen.

##### 3.1.3 pH-Papiere

Für die Bestimmung von pH-Werten wurden pH-Papiere der Firmen Merck und Macherey-Nagel verwendet. Von der Firma Merck wurden pH-Indikatorstäbchen Spezialindikator in den pH-Bereichen pH 0-2,5, 2,5-4,5, 4,0-7,0, 6,5-10 und 11,0-13,0 sowie Alkalit pH-Indikatorstäbchen pH 7,5-14 benutzt. Darüber hinaus wurde Alkalit pH-Indikatorpapier pH 9,5-13,0 verwendet.

Von der Firma Macherey-Nagel wurden pH-Fix Indikatorstäbchen in den pH-Bereichen 0,3-2,3, 1,7-3,8, 3,6-6,1, 5,1-7,2, 6,0-7,7, 7,5-9,5, 7,9-9,8 und 6,0-10,0 benutzt.

## 3.2 Geräte

### 3.2.1 Chromatographie

Die chromatographische Analyse von Proben erfolgte mit einer Acquity™ Ultraperformance LC von waters™ bestehend aus einem TUV-Detector, sample manager und einem binary solvent manager oder einem HPLC-System der Firma Thermo separation products™ bestehend aus Spectrasystem AS3000 Autoinjektor, einem Spectrasystem UV1000 Detektor und einem Spectrasystem P2000 Pumpensystem.

Die Aufreinigung von Peptiden wurde mit einer präparativen HPLC der Firma ABIMED-Gilson bestehend aus einem 305/6 Pump System und einem 118 UV/Vis Detektor durchgeführt.

### 3.2.2 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen von Peptiden und anderen Produkten wurde mit einem waters micromass ZQ, einem MALDI Ultraflex IITM Bruker™ bzw. ESI Apex II/7 Tesla™ Spektrometer durchgeführt.

### 3.2.3 NMR-Spektroskopie

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen der ionischen Flüssigkeiten ohne Peptid wurde mit einem Avance® 400 NMR-Spektrometer der Firma Bruker-Biospin®(Rheinstetten, Deutschland) gearbeitet. Alle Spektren der IFs mit Peptiden wurden auf einem Avance 400 NMR-Spektrometer, welches mit einem Triple-Resonanz-HR-MAS-Probenkopf ausgerüstet war, bei der Firma Bruker Biospin GmbH in Ettlingen/Karlsruhe gemessen.

### 3.2.4 UV/Vis Spektroskopie

Die UV/Vis-spektroskopischen Bestimmungen von Peptidkonzentrationen und die Untersuchungen von Acylierungskinetiken wurden an einem Agilent 8453 Spektroskop mit einem HAAKE K20 Thermostat durchgeführt.

### 3.2.5 Peptidsyntheseroboter

Die verwendeten Peptide wurde an einem Syro II Peptidsyntheseroboter von der Firma Multisyn Tech bzw. an einem Abi 433a Peptidsyntheseroboter der Firma applied biosystems dargestellt.

### **3.2.6 Dielektrische Spektroskopie**

Die Dielektrizitätskonstante der ionischen Flüssigkeiten wurde mit einem high resolution alpha dielectric analyzer der Firma HP vermessen.

## 4. Methoden

### 4.1 Darstellung von ionischen Flüssigkeiten

Die IFs 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazoliumdiethylphosphat [EMMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 1,2,3-Trimethylimidazoliumdimethylphosphat [MMMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurden durch direkte Alkylierung von 1,2-Dimethylimidazol dargestellt. Die Verwendung von Trimethylphosphat als Alkylierungsmittel führt zu dem IF [MMMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], während Triethylphosphat das Produkt [EMMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] generierte.

#### 4.1.1 1,2,3-Trimethylimidazoliumdimethylphosphat [MMMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Durch Verwendung verschiedener Reaktionsbedingungen konnten drei Synthesestrategien erarbeitet werden: Lösungsmittelfreie Alkylierung, Alkylierung in Dichlormethan und Alkylierung in Essigester.

##### 4.1.1.1 Lösungsmittelfreie Methylierung von 1,2-Dimethylimidazol

Eine Lösung von 5 ml (56 mM) 1,2-Dimethylimidazol und 6,5 ml (56 mM) Trimethylphosphat wurde 24 h bei 50 °C gerührt. Das entstehende Produkt wurde mit kaltem Essigester gewaschen, getrocknet und aus Dichlormethan umkristallisiert.

##### 4.1.1.2 Methylierung von 1,2-Dimethylimidazol in Dichlormethan

5 ml (56 mM) 1,2-Dimethylimidazol und 6,5 ml (56 mM) Trimethylphosphat wurden in 7 ml Dichlormethan gelöst und 24 h bei 50 °C gerührt. Nach Zugabe von 10 ml Essigester schied sich ein viskoses Öl ab. Dieses wurde mehrfach in Dichlormethan aufgenommen und erneut mit Essigester versetzt bis ein Feststoff ausfiel. Dieser wurde aus Dichlormethan umkristallisiert.

##### 4.1.1.3 Methylierung von 1,2-Dimethylimidazol in Essigester

5 ml (56 mM) 1,2-Dimethylimidazol und 6,5 ml (56 mM) Trimethylphosphat wurden in 7 ml Essigester gelöst und 24 h bei 50 °C gerührt. Das Produkt fiel in Form von weißen, kristallinen Nadeln aus.

#### 4.1.2 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazoliumdiethylphosphat [EMMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Eine Lösung von 5 ml 1,2-Dimethylimidazol und 9,6 ml Triethylphosphat wurde bei 120 °C 8 h gerührt. Der gebildete Feststoff wurde mit wenig Dichlormethan gelöst

und durch Zugabe von Essigester präzipitiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus Dichlormethan umkristallisiert.

## 4.2 Darstellung von Peptiden

### 4.2.1 Darstellung von Pentapeptiden

Es wurden 34 Pentapeptide hergestellt, sie sind zwei Bibliotheken zuzuordnen. Die erste Bibliothek bestand aus Peptiden der Sequenz H-XaaAKAY-OH, die zweite folgte der Sequenz H-VXaaKXaaY-OH (siehe Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1** dargestellte Pentapeptide

XaaAKAY-Bibliothek	VXaaKXaaY-Bibliothek
AAKAY	VEKEY
EAKAY	VFKFY
FAKAY	VGKGY
GAKAY	VHKHY
HAKAY	VIKIY
IAKAY	VLKLY
LAKAY	VMKMY
MAKAY	VNKNY
PAKAY	VPKPY
QAKAY	VQKQY
RAKAY	VRKRY
SAKAY	VSKSY
TAKAY	VTKTY
VA-Dab-AY	VVKVY
VAKAY	VWKWY
VA-Orn-AY	VYKYY
WAKAY	
YAKAY	

Sie wurden mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese<sup>131</sup> in DMF dargestellt. Als polymerer Träger wurde ein Wang-Harz gewählt. Für die Schutzgruppen wurde die orthogonale Fmoc/tBu-Strategie verwendet. Zur Aktivierung der

Carboxykomponente wurde HCTU benutzt. Nach vollendeter Synthese wurden die Peptide mit einer Lösung bestehend aus 95% TFA, 2,5% TIS und 2,5% H<sub>2</sub>O vom Harz abgespalten. Zur Reinigung wurden die Peptide mit Ether gefällt und anschließend durch präparative HPLC aufgereinigt. Alle verwendeten Peptid-Chargen zeigten korrekte Massen und wiesen durch UPLC bestimmte Reinheiten von über 99,5% auf (siehe Anhang).

#### 4.2.2 Darstellung von längeren Peptiden

Als Modell für längere und hydrophobere Peptide wurden das 16mer Peptid H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH und das 29 mer *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68A) Fragment H-VVFSAPVLEP TGPLHTQFGY HIIKVLRYN-OH gewählt. Für Untersuchungen mit Peptiden, die mehr als eine Lysinseitenkette beinhalten, wurde das Parvulin 10 64-92 (C68A) Fragment zu dem Parvulin 10 64-92 (C68K) H-VVFSKPVLEP TGPLHTQFGY HIIKVLRYN-OH, welches zwei Lysine trägt, und zu dem Parvulin 10 64-92 (C68K, T74K, Q80K) H-VVFSKPVLEP KGPLHTKFGY HIIKVLRYN-OH, welches vier Lysine beinhaltet, variiert. Diese Peptide und Proteinfragmente wurden ebenfalls mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese dargestellt. Die Synthese erfolgte an einem 2-Chlorochlortritylharz unter Verwendung der Fmoc/tBu-Schutzgruppenstrategie in DMF. Zur Aktivierung der Carboxykomponente wurde HCTU und DIPEA verwendet. Nach vollendeter Synthese wurden die Peptide mit einer Lösung bestehend aus 95% TFA, 2,5% TIS und 2,5% H<sub>2</sub>O vom Harz abgespalten. Zur Reinigung wurden die Peptide mit Ether gefällt und anschließend durch präparative HPLC aufgereinigt. Alle verwendeten Peptid-Chargen zeigten korrekte Massen und wiesen durch UPLC bestimmte Reinheiten von über 99,5% auf (siehe Anhang).

#### 4.2.3 Darstellung von Suc-AXaaPF-pNA

Es wurden sechs verschiedene Tetrapeptide der Sequenz Suc-AXaaPF-pNA dargestellt. Die variable Aminosäure wurde dabei durch Lys, Gly, Phe, Ala, Glu und Asp ersetzt. Die Synthese erfolgte in Lösung unter Verwendung der Fmoc/tBu-Schutzgruppenstrategie. Die Aktivierung erfolgte mit HCTU und DIPEA. Als Lösungsmittel wurde DMF verwendet. Ausgehend von dem kommerziell verfügbaren Phe-pNA wurden die verbleibenden Aminosäuren schrittweise gekuppelt. Die Fmoc-Abspaltung erfolgte mit Morpholin. Der Succinyl-Rest wurde

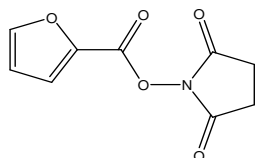


mit Bernsteinsäureanhydrid eingeführt. Die Entschützung der Seitenkettenfunktionen wurde mit 95% TFA, 2,5% TIS und 2,5% H<sub>2</sub>O durchgeführt. Durch präparative Aufreinigung konnten Peptidfraktionen mit hoher Reinheit (UPLC >99,5) und der korrekten Masse erhalten werden (siehe Anhang).

### 4.3 Darstellung von Aktivestern

#### 4.3.1 Darstellung von Furansäure-*N*-hydroxysuccinimid

195 mg (1,5 mM) Furansäurechlorid und 254 mg (2,25 mM) *N*-Hydroxysuccinimid wurden in Dioxan gelöst. Nach Zugabe von 6 mM DIPEA wurde die Lösung 4 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde verdampft und der Rückstand in Acetonitril gelöst. Nach Ansäuern mit HCl wurde das Produkt mit Wasser präzipitiert.

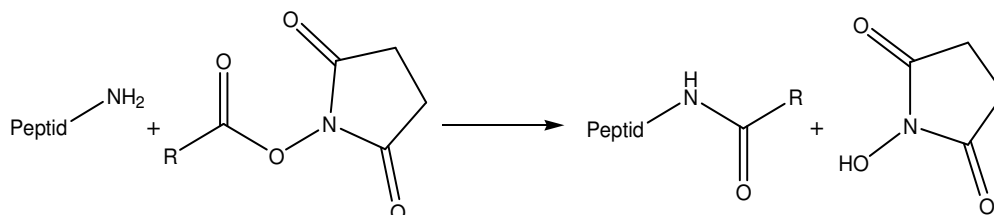


MS (ESI),  $m/z$  ber. für C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>O<sub>5</sub> (209): 210 [M+H]<sup>+</sup>.

HPLC (Säule: Vydac C18, 5 μm, 4,6 x 250 mm; eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN; Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 100% B 30 min), Wellenlänge: 220 nm; tr: 12 min, Reinheit: >99,5% (HPLC).

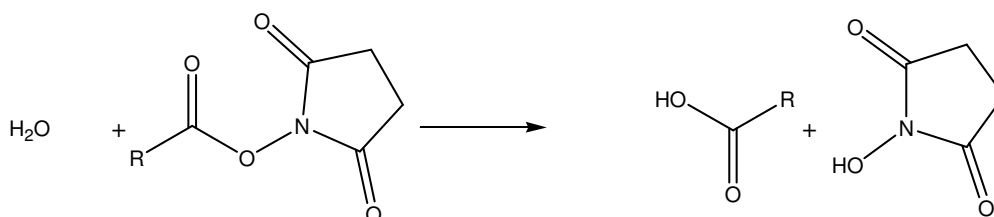
### 4.4 Acylierung von Peptiden in ionischen Flüssigkeiten

Die Acylierung von peptidischen Aminofunktionen mittels Succinimidaktivestern erfolgt gemäß der Reaktionsgleichung 4.1. Bei der Aminofunktion kann es sich um eine *N*-terminale *N*<sup>α</sup>-Funktion oder um eine *N*<sup>ε</sup>-Funktion einer Lysinseitenkette handeln. Es sind somit *N*-terminal, seitenketten und mehrfach markierte Produkte möglich.



**Reaktionsgleichung 4.1** Aminolyse eines Aktivesters

Eine Konkurrenzreaktion der Aminolyse des Aktivesters ist seine Hydrolyse (s. Reaktionsgleichung 4.2). Bedingt durch diese Konkurrenzreaktion und durch die Möglichkeit der Mehrfachmarkierung führt eine äquimolare Umsetzung des Aktivesters mit einem Peptid nicht zum vollständigen Umsatz des Peptides.



**Reaktionsgleichung 4.2** Hydrolyse eines Aktivesters

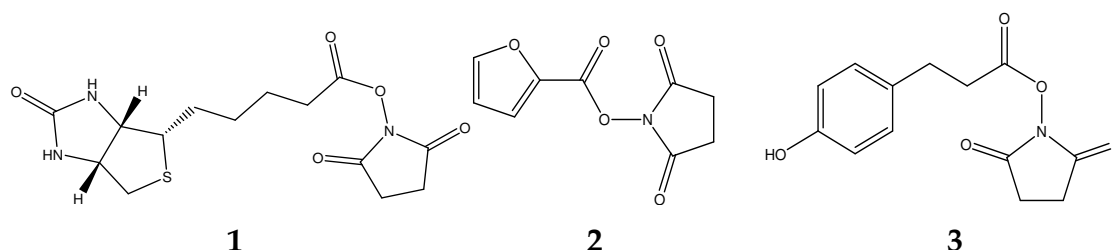
#### 4.4.1 Generelle Acylierungsmethode für Peptide

Die Konzentration einer Peptidlösung in 50 mM MOPS-Puffer wurde auf 16 mM eingestellt und mittels UV-VIS-Spektroskopie überprüft. 20 µl dieser Peptidlösung wurden mit 160 µl Hauptlösungsmittel vermischt. Die Hauptlösungsmittel waren verschiedene IFs, IF-Mischungen, Wasser bzw. Salzlösungen. Der pH-Wert dieser Mischung aus MOPS-Puffer und Hauptlösungsmittel wurde mit NaOH und HCl auf 8,2 eingestellt. Der pH-Wert wurde mit pH-Papier ermittelt. Jeweils zwei Proben von 80 µl Volumen wurden entnommen und auf 30°C temperiert. Durch Zugabe von 8 µl einer 16 mM Acyldonor-Lösung in DMF wurde die Acylierung gestartet. Der Reaktionsansatz setzte sich somit aus 80% Hauptlösungsmittel, 10% MOPS-Puffer und 10% DMF zusammen. Er wurde über Nacht geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer Stopplösung bestehend aus 95% DMSO und 5% TFA beendet. Der Reaktionsansatz wurde mittels chromatographischer Methoden analysiert und gebildete Produkte durch Massenspektrometrie charakterisiert. Monoacylierte Produkte wurden im *post source decay modus* fragmentiert und mittels *tandem*-Massenspektrometrie wurde analysiert, ob die N<sup>α</sup>- oder die N<sup>ε</sup>-Aminofunktion modifiziert war. Die massenspektrometrischen Daten sind im Anhang ausführlich aufgeführt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

#### 4.4.2 Acylierung von Pentapeptiden

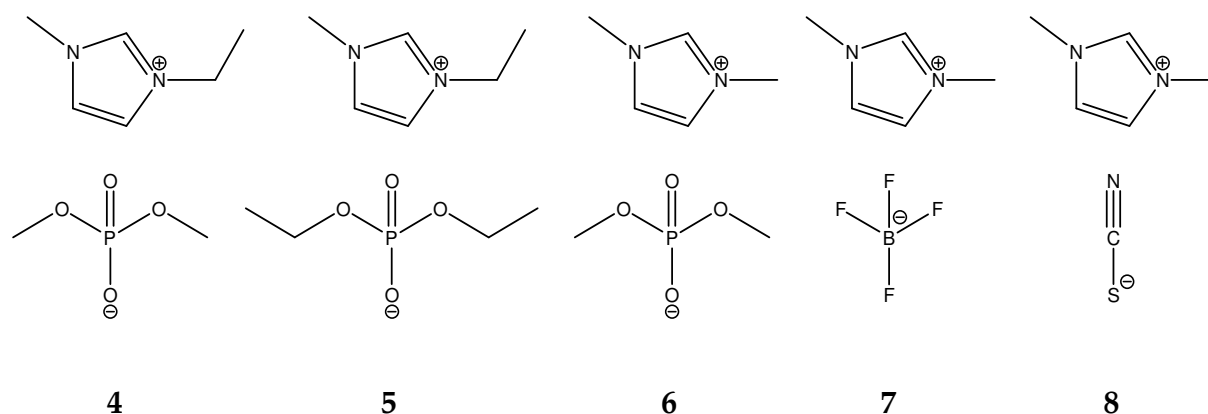
Die 32 Peptide der beiden Pentapeptidbibliotheken wurden gemäß der generellen Acylierungsmethode acyliert. Während für das Pentapeptid H-GAKAY-OH die Acyldonoren 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester

(Phloretin-OSu), Biotin-*N*-hydroxysuccinimidester (Biotin-OSu) und Furansäure-*N*-hydroxysuccinimidester (Fur-OSu) verwendet wurden, sind die restlichen Peptide der beiden Bibliotheken ausschließlich mit Phloretin-OSu markiert worden (siehe Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1.** verwendete Acylierungsmittel, **1** Biotin-*N*-hydroxysuccinimidester (Biotin-OSu), **2** Furansäure-*N*-hydroxysuccinimidester (Fur-OSu), **3** 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure-*N*-hydroxysuccinimidester (Phloretin-OSu)

Als Hauptlösungsmittel dienen für beide Bibliotheken das 1-Ethyl-3-methylimidazoliumdimethylphosphat [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und das 1-Ethyl-3-methylimidazoliumdiethylphosphat [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Die *N*-terminal variierte Bibliothek wurde außerdem noch in MOPS-Puffer als Hauptlösungsmittel acyliert. Für das Pentapeptid H-GAKAY-OH wurden darüber hinaus als Hauptlösungsmittel noch 1-Butyl-3-methylimidazoliumthiocyanat [BMIM][SCN], 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat [BMIM][BF<sub>4</sub>], 1,3-Dimethylimidazolium Dimethylphosphat [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], MOPS-Puffer und eine 5,71 M NaCl-Lösung, welche somit die Ionenstärke von [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] aufwies, verwendet (siehe Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2** Verwendete IFs, **4** [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], **5** [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], **6** [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], **7** [BMIM][BF<sub>4</sub>], **8** [BMIM][SCN]

Die chromatographische Analyse erfolgte an dem Thermoseparation HPLC-System. Es wurde eine C18-Säule verwendet. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm analysiert. Als Eluent A wurde 95% Wasser, 4,9% ACN und 0,1% TFA und als Eluent B 95% ACN, 4,9% Wasser und 0,1% TFA verwendet. Es wurde ein Gradient benutzt, der in den ersten fünf Minuten isokratisch 100% Eluent A pumpte, dann wurde in 25 Minuten linear der Anteil von Eluent B von 0 auf 50% erhöht. Die Flussrate lag bei 1 ml/min. Diese Analysemethodik wurde bei allen Experimenten mit Pentapeptiden verwendet.

#### 4.4.3 Konzentrationsabhängigkeit der Acylierung von H-GAKAY-OH

Das Pentapeptid H-GAKAY-OH wurde gemäß der generellen Acylierungsmethode unter Verwendung von Phloretin-OSu acyliert. Als Hauptlösungsmittel wurden Mischungen aus Wasser und [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], Wasser und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bzw. [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] verwendet. Die Lösungsmittel wurden so zusammengegeben, dass sich Mischungen mit den Volumenanteilen 0/1, 1/4, 1/1, 4/1 und 1/0 ergaben.

#### 4.4.4 Acylierung von längeren Peptiden

Zur Untersuchung des Acylierungsverhaltens von längeren, hydrophoberen Peptiden wurden das 16mer Peptid H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH und das 29 mer *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68A) Fragment H-VVFSAPVLEP TGPLHTQFGY HIIKVLYRN-OH als Modell gewählt. Die Acylierung wurde wie unter 4.4.1 beschrieben durchgeführt. Als Acyldonor wurden Phloretin-OSu, Biotin-OSu und Fur-OSu verwendet. [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], [BMIM][SCN] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurden als Hauptlösungsmittel benutzt. Die chromatographische Analyse der entstandenen Produkte wurde an dem waters UPLC unter Verwendung einer 5 cm BEH C18 Säule bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Als Eluent A wurde 99,9% Wasser und 0,1% TFA und als Eluent B 99,9% ACN, 0,1% TFA verwendet. Es wurde ein Gradient benutzt, der in 3,5 Minuten linear den Anteil von Eluent B von 20% auf 50% erhöhte. Die Flussrate lag bei 0,5 ml/min. Diese Analysemethodik wurde bei allen Experimenten mit dem 16mer Modellpeptid und dem 29 mer *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68A) Fragment verwendet.

#### 4.4.5 Acylierung von Lysinamid in ionischen Flüssigkeiten

Lysinamid wurde gemäß der generellen Acylierungsmethode mit Phloretin-OSu in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] umgesetzt. Die Identität der N<sup>α</sup>- bzw. N<sup>ε</sup>-acylierten Produkte wurde über ihre Retentionszeiten in der HPLC bestimmt. Die Retentionszeiten der Produkte wurden vorher mit separat synthetisierten Phloretyl-Lys-OH bzw. mit H-Lys(Phloretyl)-OH ermittelt.

#### 4.4.6 Acylierung von Peptiden mit verkürzter Seitenkette

Die drei Pentapeptide H-VA-Lys-AY-OH, H-VA-Dab-AY-OH und H-VA-Orn-AY-OH unterscheiden sich in der Länge ihrer Lysin- bzw. lysinanalogen Seitenkette. Sie wurden mit dem Acyldonor Phloretin-OSu nach der unter 4.4.1 beschriebenen Methode in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] umgesetzt.

#### 4.4.7 Acylierung von Peptiden mit mehreren N<sup>ε</sup>-Funktionen

Die Proteinfragmente Parvulin 10 64-92 (C68K) und Parvulin 10 64-92 (C68K, T74K, Q80K), welche zwei bzw. vier Lysine enthalten, wurden mit den Acyldonoren Phloretin-OSu, Fur-OSu und Biotin-OSu in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] nach der generellen Acylierungsmethode markiert. Die chromatographische Analyse der entstandenen Produkte wurde an dem waters UPLC unter Verwendung einer 15 cm BEH300 C18 Säule bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Als Eluent A wurde 99,9% Wasser und 0,1% TFA und als Eluent B 99,9% ACN, 0,1% TFA verwendet. Für das Parvulin 10 64-92 (C68K) wurde ein Gradient benutzt, der 0,5 Minuten isokratisch 28% Eluent B pumpt, bis zur 4. Minute den Anteil von Eluent B auf 30%, bis zur 6. Minute auf 33% und bis zur 10. Minute auf 43% linear erhöhte. Die Flussrate lag bei 0,3 ml/min. Das Parvulin 10 64-92 (C68K, T74K, Q80K) wurde mit einem Gradienten analysiert, der den Anteil von Eluent B linear von 25% auf 40% erhöhte, die Flussrate lag auch hier bei 0,3 ml/min.

#### 4.4.8 Phloretylierung von H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH in C2-methylierten ionischen Flüssigkeiten

Das 16mer Peptid H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH wurde mit Phloretin-OSu in [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], 1,2,3-Trimethylimidazoliumdimethylphosphat [MMMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazoliumdiethylphosphat [EMMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] umgesetzt. Da es sich bei den C2-methylierten

Imidazoliumderivaten um Salze mit einem Schmelzpunkt über 100°C handelt, konnte nicht nach der generellen Acylierungsmethode gearbeitet werden. Die Vorschrift wurde so variiert, dass nicht in 80% (v/v) IF, 10% (v/v) MOPS-Puffer und 10% (v/v) DMF sondern in Gewichtsprozenten der gleichen prozentualen Verteilung gearbeitet wurde.

#### **4.4.9 Temperaturabhängigkeit der Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten**

Zur Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf das Peptidacylierungsverhalten in IFs wurden die Peptide H-GAKAY-OH, H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH und das Parvulin 10 64-92 (C68A) bei 4 °C und bei 30 °C mit Phloretin-OSu gemäß der generellen Acylierungsmethode umgesetzt.

#### **4.4.10 pH-Abhängigkeit der Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten**

Zur Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes auf das Peptidacylierungsverhalten in IFs wurden die Peptide H-GAKAY-OH, H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH und das Parvulin 10 64-92 (C68A) bei pH 7,5 und pH 8,2 mit Phloretin-OSu gemäß der generellen Acylierungsmethode umgesetzt.

### **4.5 Bestimmung von $pK_a$ -Werten in ionischen Flüssigkeiten**

Die  $pK_a$ -Werte der  $N^\alpha$ -Aminofunktionen von Serinamid, Valinamid und H-MAK(Ac)AY-OH und der  $pK_a$ -Wert der Lysinseitenkette von Ac-MAKAY-OH wurden in Wasser, [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] mittels *Fourier-Transform-Infrared-spectroscopy* (FT-IR) bestimmt. Um Bedingungen zu wählen, die denen der Acylierungsreaktion möglichst ähnlich sind, wurden die Aminosäuren und die Peptide in 80% IF und 20% Wasser gelöst. Auf MOPS-Puffer und DMF wurde verzichtet um Signalüberlagerungen im IR-Spektrum zu vermeiden. Da IFs selbst starke Signale hervorrufen, musste mit einer hohen Peptid- bzw. Aminosäureamidkonzentration von 25 mM gearbeitet werden. Es wurde nun eine  $pK_a$ -Titration durchgeführt, indem der pH-Wert dieser Peptid-IF Lösungen mit NaOH und HCl auf definierte Werte zwischen 2 und 14 eingestellt wurde. Zur pH-Wertbestimmung wurde pH-Papier verwendet. Es wurden für jedes Peptid bzw. Aminosäureamid zehn Proben verschiedener pH-Werte entnommen und auf einer

abgeschwächten Totalreflexions (*Attenuated Total Reflection*: ATR) Messzelle vermessen. Die zehn Spektren verschiedener pH-Werte eines Peptides bzw. Aminosäureamides wurden auf pH-sensitive Banden untersucht. Die Signalintensität dieser Banden wurde gegen den pH-Wert aufgetragen und der  $pK_a$ -Wert durch nicht-lineare Regression ermittelt.

#### ***4.6 Bestimmung von Aktivierungsparameter von Acylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten***

Für die Bestimmung der Aktivierungsparameter von Peptidacylierungsreaktionen in IFs wurde die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit dieser Reaktion untersucht. Als Peptide wurden H-GAK(Ac)AY-OH und Ac-GAKAY-OH verwendet, [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurden als IFs gewählt. Biotin-OSu wurde als Acyldonor verwendet.

##### **4.6.1 Bedingungen der Peptidacylierungskinetik in ionischen Flüssigkeiten**

Die Konzentration einer H-GAK(Ac)AY-OH und einer Ac-GAKAY-OH Peptidlösung in 50 mM MOPS-Puffer wurde auf 7,5 mM eingestellt und mittels UV-VIS-Spektroskopie überprüft. Jeweils 120  $\mu$ l dieser Peptidlösung wurden mit jeweils 960  $\mu$ l der beiden IFs vermischt. Der pH-Wert dieser Mischung aus MOPS-Puffer und IFs wurde mit NaOH und HCl unter Verwendung von pH-Papier auf 8,2 eingestellt. Jeweils zwei Proben von 500  $\mu$ l Volumen wurden entnommen und temperiert. Nachdem 50  $\mu$ l der Reaktionslösung als Nullwert entnommen wurden, ist die Kinetik durch Zugabe von 50  $\mu$ l einer 150 mM Biotin-OSu-Suspension in DMF gestartet worden. Der Reaktionsansatz setzte sich somit aus 80% IF, 10% MOPS-Puffer und 10% DMF zusammen. Es wurden nun nach neun unterschiedlichen Zeitpunkten 50  $\mu$ l-Proben entnommen und in eine Stopplösung bestehend aus 95% DMSO und 5% TFA gegeben. Die unterschiedlichen Zeitwerte der Kinetik wurden mittels chromatographischer Methoden analysiert und gebildete Produkte durch Massenspektrometrie charakterisiert. Die Geschwindigkeitskonstante der Acylierungsreaktion wurde unter Annahme einer Kinetik pseudo-erster Ordnung aus der Bildung der acylierten Produkte berechnet.

Formel 4.1 
$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}}$$

h: Plancksches Wirkungsquantum

$\Delta H^\ddagger$ : Aktivierungsenthalpie

k: Geschwindigkeitskonstante

$k_B$ : Boltzmannkonstante

R: Allgemeine Gaskonstante

$\Delta S^\ddagger$ : Aktivierungsentropie

T: Temperatur

Mit Hilfe der Eyring-Gleichung (siehe Formel 4.1) lassen sich aus der Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Temperaturen durch Auftragung des natürlichen Logarithmus des Quotienten der Reaktionsgeschwindigkeit und der Temperatur gegen die inverse Temperatur die Aktivierungsparameter berechnen (siehe Formel 4.2).

Formel 4.2 
$$\ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$$

Der Anstieg der Geradengleichung, welches sich durch lineare Regressionsrechnung aus den Messpunkten ergibt, führt somit zur Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$ . Die Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  ist über den Ordinatenschnittpunkt berechenbar. Die Messung wurde dreimal wiederholt.

#### 4.6.2 Acylierung von Ac-GAKAY-OH und H-GAK(Ac)AY-OH in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Die Acylierungskinetiken wurden bei Temperaturen von 25, 30, 35, 40 und 45 °C vermessen.

#### 4.6.3 Acylierung von Ac-GAKAY-OH und H-GAK(Ac)AY-OH in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Die Acylierungskinetiken wurden bei Temperaturen von -12, 1, 5, 9, und 13 °C vermessen.



#### 4.7 Einfluss von ionischen Flüssigkeiten auf das *cis/trans*-Gleichgewicht von Peptidylprolylbindungen

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die Tetrapeptide Suc-AAPF-pNA, Suc-ADPF-pNA, Suc-AEPF-pNA, Suc-AFPF-pNA, Suc-AGPF-pNA und Suc-AKPF-pNA verwendet. Es wurde untersucht, in welchem *cis/trans*-Verhältnis ihre Peptidylprolylbindungen in unterschiedlichen Lösungsmitteln auftreten. Es wurde der Einfluss von [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], [BMIM][SCN], [BMIM][TFMS], TFE, einer 6 M Guanidiniumhydrochlorid Lösung, einer 6 M Harnstofflösung und einer 35 mM HEPES-Lösung als Lösungsmittel auf das *cis-trans* Verhältnis untersucht. Das IF [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ist bei Raumtemperatur nur metastabil flüssig und relativ viskos. Da zum Lösen des Substrates eine 100% IF-Lösung verwendet wurde, war die Verwendung des [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] leider nicht möglich. Weiterhin wurden zur Bestimmung des Einflusses von LiCl eine 0,55 M Lösung dieses Alkalihalogenides in [BMIM][SCN] verwendet. Die Bestimmung des *cis/trans*-Verhältnisses erfolgte über den proteasegekoppelten Peptidylprolylisomerisierungstest<sup>146</sup>. Dieser basiert auf der Konformerspezifität von Proteasen wie Chymotrypsin gegenüber den *trans*-Konformere prolinhaltiger Peptiden. In dem Fall der Tetrapeptide der Sequenz Suc-A-Xaa-PF-pNA spaltet Chymotrypsin stark bevorzugt die Peptide, welche ein *trans*-Konformer an der P<sub>2</sub>-Position gemäß SCHECHTER und BERGER<sup>147</sup> aufweisen. Eine Proteolyse erfolgte in den zu untersuchenden Tetrapeptide nach dem Phe und setzt somit 4-Nitroanillin frei. Die resultierende Verschiebung der UV-Absorptionsbande kann bei 390 nm UV-spektroskopisch verfolgt werden. Bei einer ausreichend hohen Proteasekonzentration ist die Geschwindigkeit der Spaltung des *trans*-Konformers um mindestens eine Größenordnung schneller als die des *cis*-Konformers. Das *trans*-Konformer setzt sich folglich in einer schnellen Phase um, während in einer zweiten, langsamen Phase die Spaltungsgeschwindigkeit durch die Isomerisierungsgeschwindigkeit der Peptidylprolylbindung limitiert. Eine Extrapolation der zweiten Phase auf den Startpunkt ermöglicht somit über das Verhältnis der Amplituden beider Phasen die Berechnung des *cis*-Gehaltes.

Zur Bestimmung des *cis*-Gehaltes wurden 1290 µl eines HEPES-Puffers (35mM, pH 7,8) mit 250 µl einer wässrigen Chymotrypsinlösung (5 mg/ml) 5 min bei 10 °C inkubiert. Anschließend wurden 60 µl einer 1,6 mM Lösung der zu untersuchenden

Tetrapeptide und in dem zu untersuchenden Lösungsmittel zugeführt und durchmischt. Die Freisetzung des *para*-Nitroanilins wurde bei 390 nm UV/Vis-spektroskopisch beobachtet. Als Referenzwert wurden Spektren von 60  $\mu$ l 1,6 mM Lösungsmittel-Peptid-Lösung in 1540  $\mu$ l HEPES-Puffer (35 mM, pH 7,8) aufgenommen. Die angegebenen Datenpunkte stellen den Mittelwert von vier unabhängigen Messungen dar.

#### 4.8 $^1\text{H}$ -HR-NMR-Untersuchungen zur Peptid-IF Interaktion

Zur Bestimmung von Peptid-IF Interaktionen wurden wässrige IF-Lösungen aus [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [BMIM][SCN] mit und ohne Zugabe der Peptide H-GAKAY-OH und H-SAKAY-OH mit  $^1\text{H}$ -NMR untersucht. Aufgrund der unter 4.7 beschriebenen Probleme konnte das [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] nicht eingesetzt werden. Die IF-Lösungen bestanden zu 70% aus IF und zu 30% aus D<sub>2</sub>O, es wurde DSS als interner Standard zugegeben. Für die Messung mit Peptid wurden dieses in einer Konzentration von 50 mg/ml in der beschriebenen IF-Wasser Mischung gelöst. Der pH-Wert der Lösungen wurde vor D<sub>2</sub>O-Zugabe mit NaOD und DCl unter Verwendung von pH-Papier auf einen Wert von 6,3 eingestellt. Dieser Wert entsprach dem pH-Wert, der sich nach Lösen von H-GAKAY-OH in [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ergab. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 300 K. Die  $^1\text{H}$ -NMR-chemischen Verschiebungen der IFs ohne Peptidzugabe wurden zunächst mittels hochauflösender NMR-Spektroskopie direkt aus den eindimensionalen NMR-Spektren ermittelt. Die Messung der  $^1\text{H}$ -NMR-chemischen Verschiebung der IFs nach Peptidzugabe wurden in Karlsruhe bei der Firma Bruker-Biospin an einem NMR-Spektrometer mit einem HR-MAS-Probenkopf durchgeführt. Aus den ermittelten chemischen Verschiebungen der einzelnen Protonensignale vor und nach Peptidzugabe wurde jeweils die Differenz gebildet. Diese dient zur Bestimmung des IF-Einflusses auf die chemische Verschiebung der Protonen. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen und die Auswertung der Daten wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. C. Mrestani-Klaus durchgeführt.

#### 4.9 Dielektrische Messungen

Zur Bestimmung der dielektrischen Eigenschaften wurden Lösungen von 80% (v/v) [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bzw. [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 20% (v/v) Wasser hergestellt. Der pH-Wert dieser Lösungen wurde mittels pH-Papier mit NaOH bzw. HCl auf 8,2

eingestellt. Diese Bedingungen entsprachen somit den Bedingungen der  $pK_a$ -Wert-Titration. Die Messungen erfolgten in einem Frequenzbereich von 1 Hz-10 MHz bei Temperaturen von 240, 250 und 260 K. Die Durchführung der Messungen und Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Joshua Rume Sangoro aus dem Arbeitskreis von Professor Kremer (Universität Leipzig).

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Darstellung von ionischen Flüssigkeiten

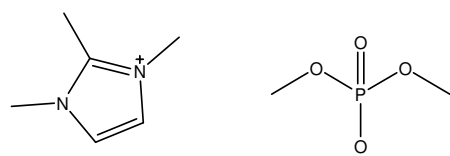
#### 5.1.1 1,2,3-Trimethylimidazoliumdimethylphosphat [MMMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Die lösungsmittelfreie Synthesemethode (siehe 4.1) lieferte schon nach drei bis vier Stunden bei 50 °C als Produkt einen gelblich-braunen Feststoff. Diese Verfärbung ist typisch für Oxidationsprodukte des Imidazolium-Kations. Die Ausbeute dieses nach filtration erhaltenen Rohproduktes lag bei 88%. Waschen des Produktes mit Essigester verbesserte die Reinheit nicht, das Produkt blieb weiterhin gelblich-braun. Erst nach Umkristallisation aus Dichlormethan wurden weiße Nadeln hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 52% erhalten.

Der Syntheseansatz in Dichlormethan verfärbte sich bei 50 °C über Nacht gelblich-braun. Eine Produktbildung konnte über Dünnschichtchromatographie festgestellt werden. Nach Zugabe von Essigester schied sich das Produkt als viskoses Öl ab. Nach mehrfachem Lösen in Dichlormethan und erneuten Abscheiden mit Essigester konnte das Produkt in reiner Form in Ausbeuten unter 10% erhalten werden.

Der Syntheseansatz in Essigester führte nach 4-6 Stunden bei 50 °C zu weißen Kristallen in einer gelblich-braunen Reaktionslösung. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde diese über Nacht weitergeführt. Das Produkt konnte durch Dekantieren des Essigesters und mehrfaches Waschen mit Essigester in hochreiner Form mit einer Ausbeute von 68% erhalten werden. Der Syntheseweg in Essigester ist aufgrund der hohen Reinheit, der guten Ausbeuten und der einfachen Handhabung der zu bevorzugende.

#### 1,2,3-Trimethylimidazoliumdimethylphosphat ([MMMIM] [Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]):



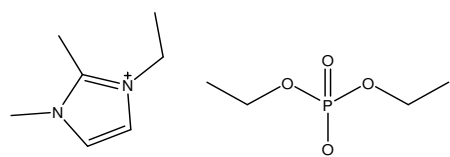
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, referenziert auf internes TMS bei 0 ppm); 3,05 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-C), δ 3,52 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-O-P), 3,54 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-O-P), 3,93 (s, 6 H, N-CH<sub>3</sub>), 7,45 (s, 2 H, N-CH=CH-N) ppm.

Reinheit: >99,5% (NMR & UPLC-Messungen bei 220 nm)

### 5.1.2 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazoliumdiethylphosphat [EMMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Die zuvor beschriebene IF-Synthesestrategie in Essigester konnte nicht auf [EMMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] übertragen werden, da sich bei 50 °C kein Produkt bildete. Die geringere Reaktivität des Triethylphosphates im Vergleich zum Trimethylphosphat erforderte eine höhere Energiezufuhr und somit das Arbeiten bei höheren Temperaturen. Da Essigester bei einer Temperatur von 76,5 °C siedet, ist es nicht möglich bei einer Reaktionstemperatur über dieser zu arbeiten. In siedenden Essigester konnten nur Umsatzraten unter 5% beobachtet werden. Daher wurde im Folgenden der lösungsmittelfreie Ansatz favorisiert. Bei einer Temperatur von 120 °C war nach 8 h eine Produktbildung zu beobachten. Es entstand ein in Essigester unlöslicher, gelb-brauner Feststoff. Dieser konnte erst durch Fällen mit Essigester aus Dichlormethan und anschließendem Umkristallisieren aus Dichlormethan zu weißen Nadeln aufgereinigt werden. Die Ausbeute lag bei 40%.

#### 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazoliumdiethylphosphat [EMMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, referenziert auf internes TMS bei 0 ppm); δ 1,24-1,26 (t, 6H, P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,54-1,58 (t, 3H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,04 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-C), 3,92-3,95 (q, 4 H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-P), 4,06 (s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>), 4,34-4,39 (q, 2H, N-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7,37-7,41 (d, 2H, N-CH=CH-N) ppm.

Reinheit: >99,5% (NMR & UPLC Messungen bei 220 nm)

## 5.2 Darstellung von Peptiden

Alle 40 Peptide konnte in Reinheiten von >99,5% dargestellt werden und wurden durch Massenspektrometrie charakterisiert. Die massenspektrometrischen und chromatographischen Daten sind im Anhang aufgeführt.

## 5.3 Acylierung von Peptiden in ionischen Flüssigkeiten

### 5.3.1 Regioisomerenüberschuss *re*

Die in den folgenden Studien verwendeten Peptide weisen bis auf zwei Ausnahmen zwei nukleophile Aminofunktionen auf, die N<sup>α</sup>-Funktion des N-Terminus und die

$N^\epsilon$ -Funktion der Lysin-Seitenkette. Acylierungsreaktionen können daher prinzipiell zu drei Produkten, den beiden isomeren Monoacylierungsprodukten und dem biacylierten Produkt führen. Um den Einfluss von Lösungsmitteln auf die Regioselektivität der Acylierungsreaktionen zu verdeutlichen, wird in dieser Arbeit ein neuer Faktor eingeführt, der Regioisomerenüberschuss *re*. Dieser beschreibt die Regioselektivität in Analogie zum Enantiomerenüberschuss. Dabei werden nur die monoacylierten Produkte betrachtet. Der Quotient aus der Differenz der relativen Produktausbeuten und der Summe dieser wird als Regioisomerenüberschuss *re* definiert (siehe Gleichung 5.1).

Gleichung 5.1

$$re = \frac{\left[ \text{product}_{N^\alpha} \right] - \left[ \text{product}_{N^\epsilon} \right]}{\left[ \text{product}_{N^\alpha} \right] + \left[ \text{product}_{N^\epsilon} \right]}$$

Ein negativer *re*-Wert repräsentiert ausgeprägte  $N^\epsilon$ -Acylierung, während ein positiver Wert  $N^\alpha$ -Acylierung darstellt. Die relativen Produktausbeuten ebenso wie die Umsatzraten der Peptidnukleophile sind im Anhang angegeben.

### 5.3.2 Acylierung von Pentapeptiden

Die Phloretylierung des Pentapeptides H-GAKAY-OH im wässrigen MOPS-Puffersystem bildete Produkte, die einem *re*-Wert von 0,42 und einem Umsatz von 71% entsprachen. Wurde anstelle des Puffersystems ein IF verwendet bei Konstanthaltung aller sonstigen Parameter, so konnte ein deutlicher Einfluss auf den *re*-Wert festgestellt werden. In dimethylphosphathaltigen IFs wie [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bzw. [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] konnte eine deutliche Regioselektivität zum *N*-Terminus festgestellt werden. Die Acylierung erfolgte in beiden IFs mit einem *re*-Wert von 0,88. Bei Verwendung von Diethylphosphat als Anion wie im [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] trat hingegen ein signifikant verringerter *re*-Wert von -0,96 auf. In Abhängigkeit vom verwendeten IF konnte der *re*-Wert somit im Vergleich zum wässrigen Puffersystem um 0,46 erhöht bzw. um 1,38 erniedrigt werden. Dies entspricht der größten beobachteten Änderung der Regioselektivitäten in IFs. Andere IFs wie [BMIM][BF<sub>4</sub>] (*re*: 0,28) oder [BMIM][SCN] (*re*: -0,05) erzeugten *re*-Werte, die zwischen diesen beiden Extremen lagen (siehe Tabelle 5.1). Die IFs hatten ebenso Einfluss auf den Umsatz der Peptidnukleophile. Dieser lag in Abhängigkeit von dem verwendeten IF zwischen 41% für [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 66% für [BMIM][SCN] (siehe Anhang).

Weiterhin wurde der Einfluss der Ionenstärke auf die Regioselektivität untersucht. Dazu wurde eine Kochsalzlösung, welche die Ionenstärke der verwendeten [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]-Lösung aufwies, genutzt. Die Regioselektivität in diesem Medium war der des einfachen wässrigen Systems sehr ähnlich und lag mit 0,39 um 0,03 unter diesem.

Zur Untersuchung des Einflusses des Acyldonors auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen wurde der verwendete Aktivester variiert. Es wurde neben dem Phloretin-OSu Biotin-OSu und Fur-OSu benutzt (siehe Tabelle 5.1). In [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurde mit Biotin-OSu ein *re*-Wert von 0,91 bzw. 0,84 erreicht und mit Fur-OSu Werte von 0,76 bzw. 0,64. In diesen dimethylphosphat-basierten IFs wurden wieder die deutlichsten N<sup>α</sup>-Acylierungen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] *re*-Werte von -0,74 für das Biotin-OSu und -0,89 für das Fur-OSu erhalten, in diesem IF wurde folglich hauptsächlich die Seitenkette modifiziert. [BMIM][SCN] und [BMIM BF<sub>4</sub>] lagen in ihrem Regioselektivitätsverhalten wieder zwischen den alkylphosphathaltigen IFs. Die Ergebnisse der Reaktion in dem wässrigen Puffersystem und der NaCl-Lösung zeigten nur marginale Unterschiede, die erhaltenen *re*-Werte lagen bei 0,49 bzw. 0,46 unter Verwendung von Biotin-OSu und bei 0,50 bzw. 0,51 wenn mit Fur-OSu acyliert wurde. Die IFs zeigen also auch bei verändertem Acyldonor den gleichen Einfluss auf die Regioselektivität der Acylierungsreaktion (siehe Tabelle 5.1).

**Tabelle 5.1** Acylierung von H-GAKAY-OH in IFs mit verschiedenen Acyldonoren

Hauptlösungsmittel	<i>re</i>		
	Phloretin-OSu	Biotin-OSu	Fur-OSu
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	-0,96	-0,74	-0,89
[BMIM][SCN]	-0,05	-0,45	-0,23
[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	0,28	0,24	-0,01
NaCl-Lösung	0,39	0,46	0,51
MOPS-Puffer	0,42	0,49	0,50
[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	0,88	0,84	0,64
[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	0,88	0,91	0,76

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) Hauptlösungsmittel, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Acyl-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% (± 2,5%).

Der Umsatz der Peptide wurde, wenn anstelle des Phloretin-OSu mit Biotin-OSu gearbeitet wurde, marginal schwächer und falls Fur-OSu verwendet wurde, um bis zu 12% geringer (siehe Anhang).

Der Einfluss der Peptidsequenz auf den beobachteten Regioselektivitätseffekt bei Verwendung von IFs als Lösungsmittel wurde untersucht, indem Acylierungsstudien mit zwei Pentapeptidbibliotheken mit dem Acyldonor Phloretin-OSu durchgeführt wurden. Die erste Bibliothek bestand aus Peptiden der allgemeinen Sequenz H-Xaa-AKAY-OH. Durch Austausch der *N*-terminalen Aminosäure sollte die Auswirkung der variablen Aminosäure auf die Regioselektivität der Phloretylierung untersucht werden. Die zweite Bibliothek enthielt Pentapeptide der allgemeinen Sequenz H-V-Xaa-K-Xaa-Y-OH. Mit dieser wurde der Effekt der Aminosäuren in unmittelbarer Nachbarschaft zur Lysinseitenketten auf die *re*-Werte der Acylierungsreaktion studiert. Als IFs wurden [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] gewählt, da sie ein das jeweils ausgeprägteste Regioselektivitätsverhalten der Acylierung des Peptides H-GAKAY-OH induzieren. Weiterhin haben sie das gleiche Kation und unterscheiden sich somit nur in ihrem Anion. Jegliche Unterschiede in den Regioselektivitäten der Acylierung können somit auf das Anion zurückgeführt werden.

Während in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die *re*-Werte für alle Peptide der XaaAKAY-Bibliothek negativ waren, konnten in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ausschließlich positive Werte beobachtet werden (siehe Tabelle 5.2). Die Regioselektivität der Phloretylierungsreaktion in den betrachteten IFs variierte folglich deutlich unter den ausgewählten Pentapeptiden.

Im Vergleich zu den *re*-Werten der Acylierungsreaktion in IFs ist die Regioselektivität im entsprechenden wässrigen Milieu moderat. Es wurde ein durchschnittlicher *re*-Wert von -0,27 bestimmt. Die Peptide H-AAKAY-OH und H-YAKAY-OH waren mit *re*-Werten von 0,05 und 0,65 die einzigen Peptide, welche im wässrigen System einen positiven *re*-Wert aufwiesen. Alle anderen zeigten negative Werte. Das Peptid H-TAKAY-OH war mit -0,70 das mit dem geringsten *re*-Wert. In [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] hingegen sind ausschließlich negative *re*-Werte zu beobachten. Der durchschnittliche *re*-Wert liegt bei -0,82. H-IAKAY-OH, H-PAKAY-OH und H-TAKAY-OH weisen mit -1,00 den geringsten und H-QAKAY-OH mit -0,40 den höchsten *re*-Wert auf.



**Tabelle 5.2** Acylierung von H-XaaAKAY-OH mit Phloretin-OSu in Puffer, [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Peptide	<i>re</i>		
	Puffer	[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]
AAKAY	0,05	0,31	-0,91
EAKAY	-0,23	0,41	-0,75
FAKAY	-0,51	0,08	-0,90
GAKAY	0,42	0,88	-0,96
HAKAY	-0,52	0,38	-0,55
IAKAY	-0,42	0,26	-1,00
LAKAY	-0,26	0,38	-0,65
MAKAY	-0,32	0,40	-0,83
PAKAY	-0,36	0,13	-1,00
QAKAY	-0,41	0,41	-0,40
RAKAY	-0,21	0,09	-0,97
SAKAY	-0,65	0,48	-0,88
TAKAY	-0,70	0,39	-1,00
VAKAY	-0,36	0,29	-0,98
WAKAY	-0,50	0,30	-0,87
YAKAY	0,65	0,25	-0,46

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF/H<sub>2</sub>O, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ist das Regioselektivitätsverhalten invers zu dem gerade beschriebenen. Im Durchschnitt wurde ein *re*-Wert von 0,34 erreicht. H-GAKAY-OH ist in diesem IF das Peptid mit der maximalen Tendenz zur N<sup>α</sup>-Acylierung mit einem *re*-Wert von 0,88. Das Peptid H-FAKAY-OH hingegen zeigt mit 0,08 die geringste Tendenz zum N-Terminus in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] (siehe Tabelle 5.2).

Die Bedeutung der Aminosäure, welche sich in Nachbarschaft zum Lysin befindet, für den beobachteten IF-Effekt wurde mit einer weiteren Pentapeptidbibliothek der Sequenz H-VXaaKXaaY-OH untersucht. Als N-terminale Aminosäure wurde Valin gewählt, da diese in den vorhergehenden Studien ein durchschnittliches Regioselektivitätsverhalten aufwies. Der Einfluss der Aminosäurereste um die N<sup>ε</sup>-

Aminofunktion sollte daher auch repräsentativ für andere *N*-terminale Aminosäuren sein.

In [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] lagen die *re*-Werte zwischen -1,00 und -0,86, im Durchschnitt -0,95. Die *re*-Werte in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] waren zwischen 0,02 und 0,51, durchschnittlich wurde 0,31 erreicht. Es sind die gleichen Tendenzen wie bei der *N*-terminal variierten Bibliothek zu beobachten. [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] präferiert *N*<sup>ε</sup>-Acylierung, während [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] *N*<sup>α</sup>-Modifizierung bevorzugt (siehe Tabelle 5.3). Wie auch in der vorangegangenen Untersuchung wurden in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] deutlich negative, in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] hingegen ausschließlich positive *re*-Werte erreicht.

**Tabelle 5.3** Acylierung von H-VXaaKXaaY-OH mit Phloretin-OSu in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Peptide	<i>re</i>	
	[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]
VEKEY	0,02	-1,00
VFKFY	0,08	-0,96
VGKGY	0,07	-0,96
VHKHY	0,14	-1,00
VIKIY	0,50	-0,94
VLKLY	0,42	-0,95
VMKMY	0,37	-0,89
VNKNY	0,04	-0,91
VPKPY	0,60	-0,97
VQKQY	0,36	-1,00
VRKRY	0,50	-1,00
VSKSY	0,23	-1,00
VTKTY	0,36	-1,00
VVKVY	0,51	-0,88
VWKWY	0,22	-0,86
VYKYY	0,51	-0,88

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% (± 2,5%).

Betrachtet man die Schwankung der *re*-Werte innerhalb der beiden Bibliotheken in den Dialkylphosphat-basierten IFs, so ist festzustellen, dass in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die Standardabweichung der *re*-Werte als Maß für die Variabilität in beiden Fällen bei 0,18 liegt. In [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ist für die *N*-terminale Bibliothek eine Abweichung von 0,19 und für die intern variierte von 0,05 zu beobachten. Die *re*-Werte in dem Seitenketten dirigierenden IF [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] schwanken stärker innerhalb der *N*-terminal variierten Bibliothek als in der intern veränderten Bibliothek.

Die Umsatzrate der Acylierungsreaktion schwankte in Abhängigkeit von der verwendeten Peptidsequenz zwischen 21% und 54% in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und zwischen 15% und 41% in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Die Umsatzzraten im wässrigen Puffersystem waren höher, sie lagen zwischen 44% und 81% (siehe Anhang).

### 5.3.3 Konzentrationsabhängigkeit des IF-Effektes

Der Einfluss der IF-Konzentration auf die beobachteten Regioselektivitäten der Peptidacylierungsreaktionen wurde beispielhaft an der Phloretylierung von H-GAKAY-OH untersucht.

Die Reaktionslösung setzte sich aus 80% eines variablen Anteils, 10% DMF und 10% MOPS-Puffer zusammen. Bestand der variable Anteil vollständig aus Wasser, so wurde ein *re*-Wert von 0,42 erhalten.

**Tabelle 5.4** Abhängigkeit der *re*-Werte von Peptidacylierungsreaktionen in IF-Wasser Mischungen von der IF-Konzentration unter Verwendung von H-GAKAY-OH und Phloretin-OSu

IF-Wasser Mischung	<i>re</i>	
	[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]
0/1	0,42	0,42
1/4	0,49	0,18
1/1	0,59	-0,12
4/1	0,75	-0,64
1/0	0,88	-0,96

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF-Wasser Mischung, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% (± 2,5%).

Eine Veränderung des variablen Anteils durch Erhöhung des IF-Anteils an der IF-Wasser-Mischung in 25%-Schritten erhöhte die Regioselektivität von 0,42 über 0,49, 0,59 und 0,75 auf 0,88, wenn [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] als IF verwendet wurde. Bei Benutzung von [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] sank der *re*-Wert schrittweise von 0,42 über 0,18, -0,12, und -0,64 auf -0,96 ab (siehe Tabelle 5.4).

Eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit wurde für Mischungen aus den zwei zuvor betrachteten IFs festgestellt. Wurde mit einer IF-Mischung gearbeitet, bei der der variable Anteil zu 100% aus [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bestand, so zeigte die Reaktion mit einem *re*-Wert von -0,96 eine fast ausschließlich N<sup>ε</sup>-Acylierung. Diese schwächte sich ab, wenn der Anteil an [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] gesenkt und im gleichen Maß der Anteil an [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] erhöht wurde. So lag der *re*-Wert bei einer Zusammensetzung von 75% [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 25% [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei -0,66, ein Verhältnis von 50% zu 50% führte bereits zu einem positiven Wert von 0,17. Bei diesem Verhältnis tritt somit mehrheitlich N<sup>α</sup>-Acylierung auf. Durch eine weitere Erhöhung des [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]-Anteils auf 75%, verstärkte sich die Tendenz zur N-terminalen Reaktion, der *re*-Wert lag bei 0,64. Bestand der variable Anteil der IF-Mischung zu 100% aus [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], wurde ein *re*-Wert von 0,88 erreicht (siehe Tabelle 5.5).

**Tabelle 5.5** Abhängigkeit der *re*-Werte von Peptidacylierungsreaktionen in IF-IF-Mischungen von der IF-Konzentration unter Verwendung von H-GAKAY-OH und Phloretin-OSu

[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]/[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] Mischung	<i>re</i>
0/1	-0,96
1/4	-0,66
1/1	0,17
4/1	0,64
1/0	0,88

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF-IF Mischung, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

Sowohl in einer IF-Wasser- als auch in einer IF-IF-Mischung ist der *re*-Wert abhängig von der Konzentration der verwendeten IFs. Wird mit [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ein Seitenketten-präferierendes IF verwendet, so ist verstärkt eine N<sup>ε</sup>-Acylierung zu

beobachten; wird hingegen mit [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ein N-terminal dirigierendes IF verwendet, so wird häufiger die N<sup>α</sup>-Aminofunktion acyliert.

Die Ausbeuten an acyliertem Peptid lagen in Abhängigkeit von der gewählten IF-Wasser bzw. IF-IF-Mischung zwischen den Werten, die für Wasser und die beiden IFs ermittelt wurden (siehe Anhang).

### 5.3.4 Acylierung von länger-kettigen Peptiden in ionischen Flüssigkeiten

Die bisherigen Experimente wurden mit Pentapeptiden durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte lediglich auf kürzere Peptide beschränkt sind, wurden Acylierungsstudien mit länger-kettigen Peptiden durchgeführt. Als Modelle wurden das 16mer-Peptid H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH und das *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68A) Fragment H-VVFSAPVLEP TGPLHTQFGY HIIKVLRYR-NH<sub>2</sub> gewählt. Beide Peptide besitzen jeweils eine N<sup>α</sup>- und eine N<sup>ε</sup>-Aminofunktion. Die Peptide zeichnen sich neben der erhöhten Sequenzlänge auch durch eine, im Vergleich zu den relativ hydrophilen Pentapeptiden, erhöhte Hydrophobizität aus.

Als Acyldonor wurden Phloretin-OSu, Biotin-OSu und Fur-OSu verwendet. Die IFs [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [BMIM][SCN] wurden als Lösungsmittel benutzt. In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] zeigte die Acylierung von H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH mit *re*-Werten von 0,38 für die Phloretylierung, 0,27 für die Biotinylierung und 0,12 für die Furoylierung eine klare Bevorzugung der N-terminalen Aminofunktion. Bei Verwendung von Biotin-OSu und Phloretin-OSu erfolgte die Acylierung des Parvulinfragmentes mit einer sogar noch stärkeren Tendenz zur N<sup>α</sup>-Acylierung. Es wurden *re*-Werte von 0,49 für den Acyldonor Phloretin-OSu und 0,50 für Biotin-OSu ermittelt. Fur-OSu führte mit 0,12 zu einem *re*-Wert, dieser trat auch bei der Acylierung des Hexadecamers auf (siehe Tabelle 5.6).

In [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurden für H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH Werte von -0,65 (Phloretin-OSu), -0,96 (Biotin-OSu) bzw. -0,52 (Fur-OSu) und für das Proteinfragment -0,98 (Phloretin-OSu), -0,90 (Biotin-OSu) bzw. -0,98 (Fur-OSu) bestimmt. Die Modifizierung erfolgt also in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] mit einer ausgeprägten Selektivität zur Seitenkette (siehe Tabelle 5.6).

In [BMIM][SCN] wurden für das 16mer Modellpeptid Regioselektivitäten von 0,16 (Phloretin-OSu), 0,03 (Biotin-OSu) bzw. -0,25 (Fur-OSu) generiert. Das Parvulinfragment zeigte in diesem IF *re*-Werte von 0,09 (Phloretin-OSu), -0,35 (Biotin-OSu) bzw. -0,53 (Fur-OSu). Die *re*-Werte liegen somit zwischen den in

[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] beobachteten Werten. Es treten in Abhängigkeit des Acyldonors und des Acylakzeptors positive und negative *re*-Werte auf. Insgesamt ist eine leichte Tendenz zur N<sup>ε</sup>-Modifizierung zu beobachten. Im Vergleich zu der starken Bevorzugung einer bestimmten Aminofunktion in den beiden dialkylphosphathaltigen IFs führt die Reaktion in [BMIM][SCN] zu einer ausgeglicheneren N<sup>α</sup>- und N<sup>ε</sup>-Modifizierung (siehe Tabelle 5.6).

**Tabelle 5.6** Acylierung von längeren Peptiden mit verschiedenen Acyldonoren in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], [BMIM][SCN] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

IF/Peptid	<i>re</i>		
	Phloretin-OSu	Biotin-OSu	Fur-OSu
<i>[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>			
LIVDAVLEPVKAAGAY	0,38	0,27	0,12
VVFSAPVLEPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN	0,49	0,50	0,12
<i>[BMIM][SCN]</i>			
LIVDAVLEPVKAAGAY	0,16	0,03	-0,25
VVFSAPVLEPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN	0,09	-0,35	-0,53
<i>[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>			
LIVDAVLEPVKAAGAY	-0,65	-0,96	-0,52
VVFSAPVLEPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN	-0,98	-0,90	-0,98

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Acyl-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% (± 2,5%).

Es ist festzuhalten, dass folglich auch bei längeren Peptiden die gleichen Tendenzen zu beobachten sind wie bei den zuvor untersuchten Pentapeptiden. [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ist das IF, welches eine N<sup>α</sup>-Acylierung am stärksten bevorzugt, [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] hingegen präferiert die N<sup>ε</sup>-Markierung, [BMIM][SCN] liegt in seiner Beeinflussung der Regioselektivität zwischen diesen beiden Extremfällen. Die Wahl des Acylakzeptors und des Acyldonors wirkt sich auf die Regioselektivität aus. Dieser Effekt ist aber im Vergleich zu der Auswirkung der IFs klein. Dieses Verhalten wurde ebenfalls bei den hydrophilen Pentapeptide beobachtet.

Die Ausbeute lag für diese hydrophoberen Peptide in Abhängigkeit von dem verwendeten Acyldonor zwischen 20-40%. Die genauen Daten werden im Anhang genannt.

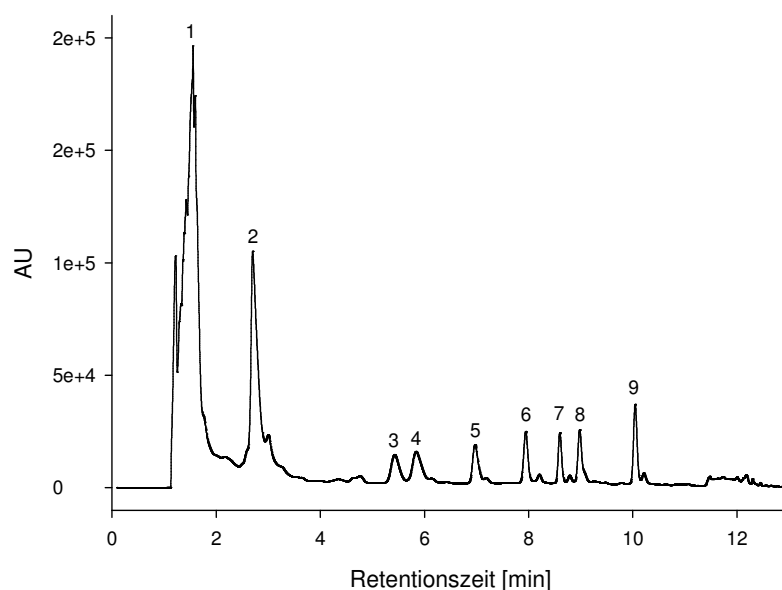
### 5.3.5 Acylierung von Peptiden mit mehreren $N^\epsilon$ -Aminofunktionen

Die bisher untersuchten Peptide wiesen alle zwei nukleophile Aminofunktionen auf. Daraus ergeben sich nach Gleichung 5.2 drei verschiedene Produkte von denen zwei isomer sind.

$$\text{Gleichung 5.2} \quad p = 2^n - 1 \quad \begin{array}{l} p: \text{Anzahl der möglichen Produkte} \\ n: \text{Anzahl nukleophiler Aminofunktionen} \end{array}$$

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Acylierungsstudien ausgewählter Peptide mit mehr als zwei Aminofunktionen und somit einer größeren Anzahl möglicher Produkte dargestellt. Als Modellsystem wurde für diese Studie das bereits erwähnte *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68A) Fragment gewählt. Durch einen Aminosäureaustausch in Position 68 wurde das Parvulin 10 64-92 (C68K) Fragment generiert. Dieses wies nun 3 Aminofunktionen auf und konnte somit 7 verschiedene Produkte aus Acylierungsreaktionen bilden. Weitere Austausche an Position 74 und 80 führten zu dem Fragment 64-92 (C68K, T74K, Q80K). Acylierungsreaktionen dieses Modellproteinfragmentes führen aufgrund der fünf Aminofunktionen zu 31 theoretisch möglichen Produkten.

In Abbildung 5.1 ist die chromatographische Auftrennung der durch Acylierung mit Phloretin-OSu gebildeten Produkte ausgehend vom *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68K) in [BMIM][SCN] dargestellt. Dieses IF wurde gewählt, weil es verglichen mit den dialkylhaltigen IFs lediglich geringe regioselektivitätsinduzierende Wirkung besitzt und somit sowohl  $N^\alpha$ - als auch  $N^\epsilon$ - markierte Produkte auftreten. Das erhaltene UPLC-Profil verdeutlicht, dass alle entstehenden Acylierungsprodukte des *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68K) auftrennbar sind. Alle aufgelösten Peptidpeaks weisen eine Schulter bzw. einen sehr kleinen nachfolgenden Peak auf. Massenspektrometrische Untersuchungen dieser Peaks führen zu  $m/z$ -Verhältnissen und Fragmentierungsmustern in den *tandem*-MS-Spektren vergleichbar mit dem Hauptpeak. Es sollte sich daher um Isomere handeln. Da das verwendete Proteinfragment prolinhaltig ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen um cis/trans-Konfigurationsisomere der Peptidylprolylbindung handelt.



**Abbildung 5.1** Chromatogramm der Acylierung von *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68K) mit Phloretin-OSu in [BMIM][SCN] bei 280 nm, 1: IF, 2: Peptidedukt, 3: Acylierungsprodukt K<sup>87</sup>, 4: Acylierungsprodukt K<sup>68</sup>, 5: Acylierungsprodukt N<sup>α</sup>, 6: Acylierungsprodukt K<sup>68,87</sup>, 7: Acylierungsprodukt N<sup>α</sup>,K<sup>87</sup>, 8: Acylierungsprodukt N<sup>α</sup>,K<sup>68</sup>, 9: Acylierungsprodukt N<sup>α</sup>,K<sup>68</sup>,K<sup>87</sup>, Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Acyl-OSu)=1,6 mM.

Eine Verwendung von *re*-Werten zur Beschreibung der Regioselektivitätsverteilung ist für den Fall von mehr als zwei nukleophilen Aminofunktionen nicht sinnvoll, da für diesen Fall der Regioisomerenüberschuss nicht definiert ist. Daher wird im Folgenden die relative Produktausbeute der Acylierungsprodukte der verschiedenen Aminofunktionen in Prozent angegeben. Die Ergebnisse der Acylierung mit verschiedenen Acyldonoren in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] sind in Tabelle 5.7 dargestellt.

Der Umsatz des *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68K) mit Phloretin-OSu führt in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] zu folgender Produktverteilung: Die N<sup>ε</sup>-Aminofunktionen der Lysine an Position 68 und 87 werden zu 11 bzw. 10 Prozent markiert, während die N<sup>α</sup>-Funktion zu 69% acyliert wird. Zweifachacylierungen treten in geringerem Umfang auf. Eine Doppelacylierung der beiden Seitenkettenaminofunktionen findet mit einer relativen Produktausbeute von 2% statt. Eine Zweifachmarkierung des N-Terminus und einer der N<sup>ε</sup>-Funktionen tritt jeweils zu 4% auf. Die Furoylierung erfolgt in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] mit einer ähnlichen Tendenz zur N<sup>α</sup>-Acylierung.



**Tabelle 5.7** Acylierung von *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68K) in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

IF / acylierte Position	Phloretin-OSu [%]	Fur-OSu [%]	Biotin-OSu [%]
<i>[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>			
K <sup>68</sup>	11	22	25
K <sup>87</sup>	10	16	
N <sup>α</sup>	69	55	70
K <sup>68</sup> + K <sup>87</sup>	2	2	
N <sup>α</sup> + K <sup>87</sup>	4	1	5
N <sup>α</sup> + K <sup>68</sup>	4	2	
N <sup>α</sup> + K <sup>68</sup> + K <sup>87</sup>	0	2	0
<i>[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>			
K <sup>68</sup>	15	25	37
K <sup>87</sup>	28	38	
N <sup>α</sup>	9	12	2
K <sup>68</sup> + K <sup>87</sup>	24	15	
N <sup>α</sup> + K <sup>87</sup>	5	3	50
N <sup>α</sup> + K <sup>68</sup>	8	5	
N <sup>α</sup> + K <sup>68</sup> + K <sup>87</sup>	11	2	11

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Acyl-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% (± 2,5%).

55% der gebildeten Produkte sind N-terminal markiert, die einzelnen Seitenkettenfunktionen werden zu 22% bzw. 16% acyliert. Eine Zweifachfuroylierung findet zu 2% für K<sup>68</sup> und K<sup>87</sup> bzw. N<sup>α</sup> und K<sup>68</sup> statt. 1% der gebildeten Produkte sind N-terminal und an K<sup>87</sup> markiert. Die Dreifachacylierung fand zu 2 % statt.

Bei der Biotinylierung waren sowohl die an den Seitenketten markierten Produkte als auch die zweifach markierten Produkte chromatographisch nicht aufgetrennbar werden. Daher können diese Produkte nur zusammen angegeben werden. Mit Biotin-OSu wurden die Seitenketten zusammen zu 25% monoacyliert, die N<sup>α</sup>-Funktion allein wurde zu 70% markiert, Doppelmarkierungen fanden zu 5% statt und eine Dreifachmarkierung konnte nicht beobachtet werden.

Unter Verwendung von [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] als IF wird mit Phloretin-OSu nur 9% N<sup>α</sup>-acyliertes Produkt gebildet. Die Modifizierung an K<sup>68</sup> trat zu 15% und die an K<sup>87</sup> zu 28% auf. Eine Doppelmarkierung dieser funktionellen Gruppen fand zu 24% statt. Zusammengenommen reagierten 67% der Produkte ausschließlich an der Seitenkette. Der N-Terminus und K<sup>87</sup> wurden gemeinsam zu 5% und die N<sup>α</sup>-Funktion in Kombination mit K<sup>68</sup> wurden zu 8% markiert. Eine Dreifachmarkierung trat zu 11% auf. Unter Verwendung von Fur-OSu entstanden 12% N-terminal modifiziertes Produkt, K<sup>68</sup> wurde zu 25% und K<sup>87</sup> zu 38% markiert. Eine gemeinsame Acylierung von K<sup>68</sup> und K<sup>87</sup> erfolgte zu 15%. 78% der Produkte waren also ausschließlich an der Seitenkette modifiziert. Eine Doppelmarkierung vom N-Terminus und K<sup>68</sup> fand zu 5% statt, während 3% der Produkte N<sup>α</sup>- und K<sup>87</sup>-acyliert waren. Eine Biotinylierung führte zu 37% zu einfacher Seitenkettenacylierung, zu 2% zu einfacher N-terminaler Markierung, zu 50% zu Doppel- und zu 11% zu Dreifachacylierung (siehe Tabelle 5.7).

**Tabelle 5.8** Acylierung von *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68K, T74K, Q80K) in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Acyldonor	[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]
<i>Phloretin-OSu</i>		
N <sup>α</sup> [%]	54	3
Σ N <sup>ε</sup> <sub>mono</sub> [%]	34	42
Σ N <sup>ε</sup> <sub>poly</sub> [%]	12	56
<i>Fur-OSu</i>		
N <sup>α</sup> [%]	34	0
Σ N <sup>ε</sup> <sub>mono</sub> [%]	61	55
Σ N <sup>ε</sup> <sub>poly</sub> [%]	5	45
<i>Biotin-OSu</i>		
N <sup>α</sup> [%]	50	0
Σ N <sup>ε</sup> <sub>mono</sub> [%]	42	46
Σ N <sup>ε</sup> <sub>poly</sub> [%]	8	53

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Acyl-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% (± 2,5%).

Die Acylierung von *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68K, T74K, Q80K) kann theoretisch zu 31 verschiedenen Produkten führen. Es gelang jedoch nicht sowohl die mehrfachmarkierten als auch die vier  $N^\epsilon$ -monoacylierten Produkte chromatographisch voneinander zu trennen. Es konnte daher nur zwischen  $N^\alpha$ -monoacyliert,  $N^\epsilon$ -monoacyliert und mehrfachmarkiert unterschieden werden (siehe Tabelle 5.8).

In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] konnte der *N*-Terminus mit Phloretin-OSu zu 54%, mit Fur-OSu zu 34% und mit Biotin-OSu zu 50% markiert werden. Die vier Seitenkettenfunktionen wurden zusammengefasst zu 34% mit Phloretin-OSu, zu 61% mit Fur-OSu und zu 42% mit Biotin-OSu acyliert. Mehrfachacylierungen traten zu 12% mit Phloretin-OSu, zu 5% mit Fur-OSu und zu 8% mit Biotin-OSu auf.

In [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] zeigt sich hingegen ein anderes Bild. Mit Phloretin-OSu wurden 3% und sowohl mit Fur-OSu als auch mit Biotin-OSu konnte keines der gebildeten Produkte dem *N*-terminal acylierten zugeordnet werden. Eine Monoacylierung der Seitenketten erfolgte mit Phloretin-OSu zu 42%, mit Fur-OSu zu 55% und mit Biotin zu 46%. Mehrfachacylierungen traten zu 56% mit Phloretin-OSu, zu 45% mit Fur-OSu und zu 53% mit Biotin-OSu auf (siehe Tabelle 5.8).

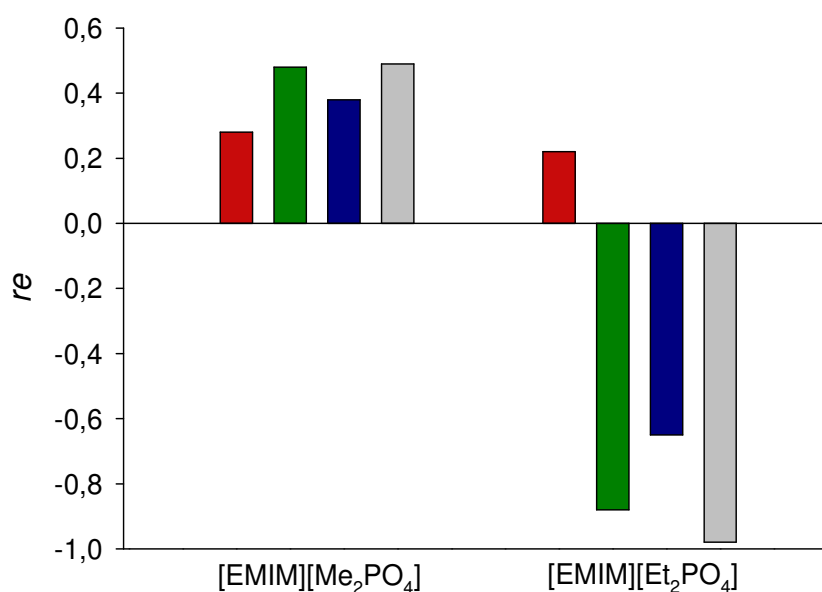
Vergleicht man die Auswirkungen der ausgewählten IFs auf die Acylierung von Peptiden mit zwei nukleophilen Aminofunktionen mit der Acylierung von denen mit mehr als zwei Aminofunktionen, lässt sich feststellen, dass die grundsätzliche Tendenz erhalten bleibt. In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] sind  $N^\alpha$ -Acylierungen bevorzugt und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]  $N^\epsilon$ -Markierungen. Wenn man die ausschließlich *N*-terminal markierten Produkte mit den ausschließlich seitenkettenmarkierten Produkten vergleicht, lässt sich für die Phloretylierung in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] von *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68K) ein *re*-Wert von 0,52 berechnen, für [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ein *re*-Wert von -0,76. Diese Werte liegen im Bereich der zuvor untersuchten Pentapeptide.

### 5.3.6 Acylierung von Lysinamid in ionischen Flüssigkeiten

In den bisher beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der festgestellte regioselektivitätsinduzierende Effekt von IFs sowohl bei hydrophileren Pentapeptiden als auch bei längerkettigen, hydrophoberen Peptiden auftrat. In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die regioselektive Acylierung maximal verkürzter Peptide möglich ist. Als Modell für ein maximal verkürztes Peptid wurde Lysinamid gewählt. Es weist eine der Peptidbindung ähnliche Säureamidbindung

auf und ähnelt somit einem Peptid in seinen Eigenschaften. Weiterhin beinhaltet es zwei nukleophile Aminofunktionen, sodass Acylierungen zu regioisomeren Produkten führen können.

Die Phloretylierung von Lys-NH<sub>2</sub> in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] erfolgte mit den in Abbildung 5.2 gezeigten Regioselektivitäten. Als Vergleich sind in der Abbildung noch die Regioselektivitäten der Phloretylierung von H-SAKAY-OH, H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH und *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68A) angegeben.

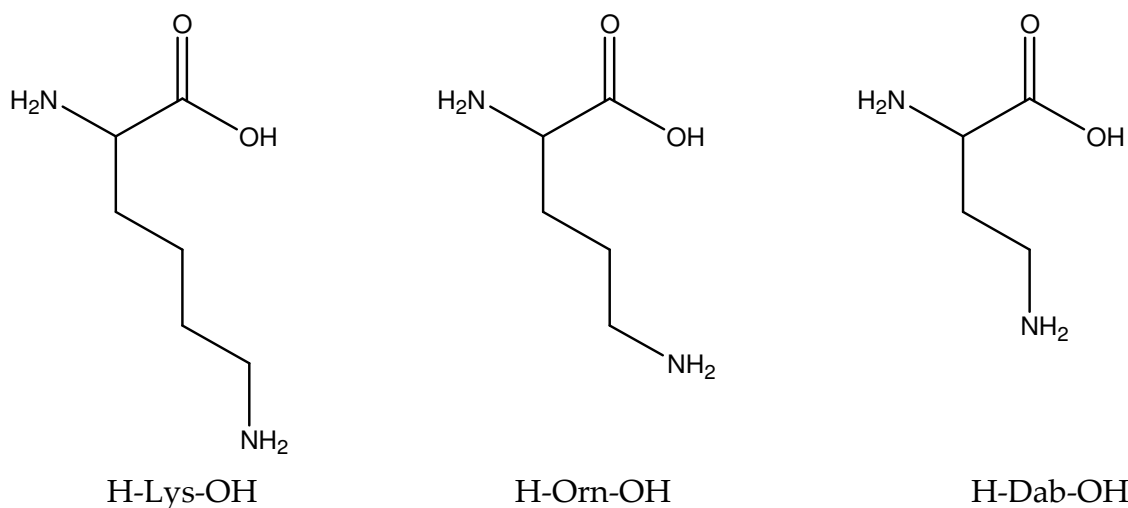


**Abbildung 5.2** Phloretylierung von verschiedenen Peptiden und Lys-NH<sub>2</sub> in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], rot: Lys-NH<sub>2</sub>, grün, H-SAKAY-OH, blau: H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH, grau: *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68A), Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

Während die Acylierung der Peptide, hier noch einmal anhand der *re*-Werte der Phloretylierung von H-SAKAY-OH als Beispiel für ein Pentapeptid, dem 16mer-Modellpeptid und dem Proteinfragment gezeigt, einen deutlichen Unterschied in den Regioselektivitäten in den beiden IFs aufweist, liegen die *re*-Werte der Phloretylierung des Lysinamids bei 0,28 in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 0,22 in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. In beiden IFs ist für das Aminosäurederivat folglich eine Tendenz zur *N*-terminalen Acylierung zu beobachten. Die bei Peptiden auftretenden Regioselektivitätseffekte waren nicht vorhanden.

### 5.3.7 Acylierung von Peptiden mit verkürzter Lysinseitenkette

Ein weiterer noch nicht untersuchter Aspekt war der Einfluss der aminoreaktiven Seitenkettenstruktur auf die Regioselektivität der Peptidmarkierungsreaktion. Als Modell wurde das Pentapeptid H-MAKAY-OH verwendet, da es im Vergleich zu anderen Pentapeptiden weder die  $N^\alpha$ - noch die  $N^\epsilon$ -Aminofunktion sequenzbedingt überdurchschnittlich bevorzugt. Somit sollte der Einfluss einer Strukturvariierung der Seitenkette auf die Regioselektivität beobachtbar sein. Die Aminosäure Lysin, welche die  $N^\epsilon$ -Aminofunktion trägt, wurde gegen Ornithin (Orn) und Diaminobutansäure (Dab) ausgetauscht. Die Seitenkette wurde dabei von vier Methyleneinheiten (Lysin) auf drei (Orn) bzw. zwei (Dab) verkürzt (siehe Abbildung 5.3).



**Abbildung 5.3** Strukturen der Diaminocarbonsäure Lysin (H-Lys-OH), Ornithin (H-Orn-OH) und Diaminobutansäure (H-Dab-OH)

Die Auswirkung dieses Austausches auf die Regioselektivität ist in Tabelle 5.9 für die Phloretylierung der drei Modellpeptide dargestellt. In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] nahmen die *re*-Werte mit zunehmender Länge der Seitenkette von H-MA-Dab-AY-OH (0,66) über H-MA-Orn-AY-OH (0,49) zu H-MAKAY-OH (0,40) ab. Der gleiche Trend konnte in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] beobachtet beobachtet. Hier nahmen die *re*-Werte mit steigender Kettenlänge ebenfalls von -0,31 für Dab über -0,59 für Orn auf -0,83 für das Lysin ab. Durch eine Verlängerung der Seitenkette wurde also eine Phloretylierung an dieser Stelle bevorzugt.

Die Ausbeute an acylierten Produkten wurde gering von der Verkürzung der Seitenkette beeinflusst. Sie führte zu einer leichten Verringerung der Ausbeute sowohl in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] als auch in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] (siehe Anhang).

**Tabelle 5.9** Phloretylierung von Peptiden mit variabler Seitenkettenlänge in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

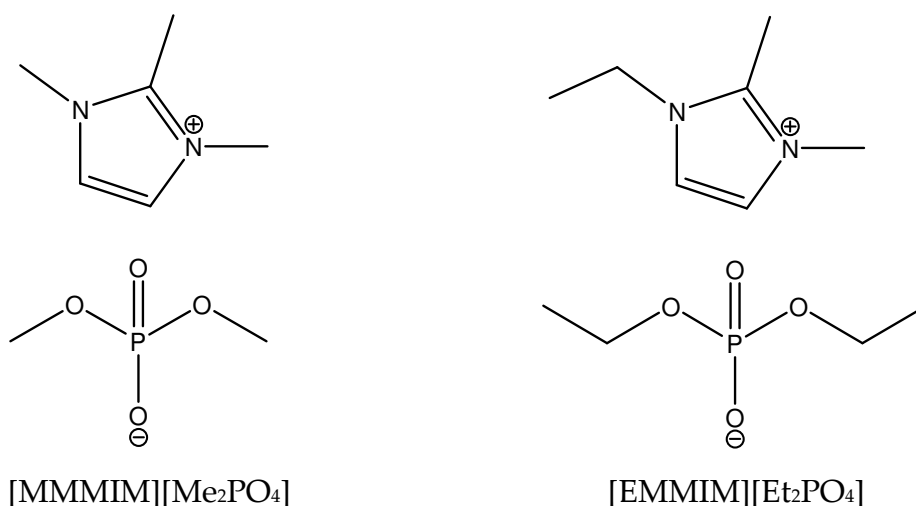
Peptid	<i>re</i>	
	[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]
MAKAY	0,40	-0,83
MA-Orn-AY	0,49	-0,59
MA-Dab-AY	0,66	-0,31

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

### 5.3.8 Phloretylierung von H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH in C2-methylierten ionischen Flüssigkeiten

In den bisherigen Untersuchungen wurden IFs verwendet, die als Kationen 1,3-Dialkylimidazolium enthielten. Es ist aus der Literatur bekannt, dass das Proton an der Position 2 des Imidazoliumringes eine erhöhte Azidität aufweist<sup>148-150</sup>. Im Folgenden sollte der Einfluss dieses aziden Protons auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen festgestellt werden. Dazu wurden folgende IFs synthetisiert, die an dem C2-Atom des Imidazoliumringes methyliert sind und somit kein azides Proton mehr aufweisen: 1,2,3-Trimethylimidazoliumdimethylphosphate ([MMMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]) und 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazoliumdiethylphosphate ([EMMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]) (siehe Abbildung 5.4).

Als Modellreaktion wurde die Phloretylierung des 16mer Peptides H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH gewählt. Da die methylierten IFs einen Schmelzpunkt von über 100 °C besaßen, mussten die Reaktionsbedingungen im Vergleich zu den vorangegangenen Untersuchungen variiert werden. Es wurde nicht in 80 Volumenprozent sondern in 80 Gewichtsprozent IF gearbeitet. Durch den Schmelzpunkt von über 100 °C sind diese neuen Imidazoliumsalze formal keine IFs mehr. Für die Untersuchung des Einflusses der C2-Protonen ist es aber unerheblich, ob es sich bei den Verbindungen um IFs oder geschmolzene Salze handelt.



**Abbildung 5.4** Strukturen der C2-methylierten IFs 1,2,3-Trimethylimidazolium-dimethylphosphat  $[\text{MMMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  und 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazolium-diethylphosphat  $[\text{EMMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$

Die Acylierung erfolgte in  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  mit einem *re*-Wert von -0,77 und in  $[\text{EMMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  von -0,27. Die Reaktion in dem *N*-terminal dirigierenden  $[\text{MMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  fand mit einer Regioselektivität von 0,36 statt, während in dem C2-methyliertem  $[\text{MMMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  0,30 erreicht wurden. Es lässt sich feststellen, dass sich die in  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  und  $[\text{MMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  erhaltenen *re*-Werte, die unter Bedingungen, die auf Gewichtsprozenten basierten, generiert wurden, leicht von den Werten, die auf Volumenprozenten aufbauten, unterschieden. Dies lässt sich auf die veränderte Zusammensetzung der IF-Lösung zurückführen. Drastischer als diese Änderungen ist der Einfluss der C2-Methylierung. In  $[\text{EMMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  liegt der *re*-Wert nur noch bei -0,27. Die Methylierung sorgt im Vergleich zum  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  zu einer Verringerung der Regioselektivität um 0,50. Der Rückgang liegt prozentual bei 65%. Die Methylierung des *N*-terminal dirigierenden IFs führt zu einem ähnlichen Effekt, der in seiner Ausprägung aber schwächer ist. Der *re*-Wert verringert sich um 0,06 bzw. um 17%. Sowohl bei dem  $N^\alpha$ - als auch bei dem  $N^\epsilon$ -präferierenden IF führte eine Methylierung an der C2-Position demnach zu einer Reduktion der beobachteten Regioselektivität (siehe Tabelle 5.10).

Die Ausbeute wurde durch die C2-Methylierung nur unwesentlich beeinflusst. Diese lag für  $[\text{MMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  bei 31% und für  $[\text{MMMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  bei 39%. Eine wenn auch geringe Erhöhung der Ausbeute zeigte sich auch bei den diethylphosphatbasierten IFs, hier führte die C2-Methylierung zu einer Steigerung von 34% auf 37% (siehe Anhang).

**Tabelle 5.10** Phloretylierung von H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH in C2-methylierten und C2-nichtmethylierten IFs

IF	<i>re</i>
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	-0,77
[EMMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	-0,27
[MMMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	0,30
[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	0,36

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (m/m) IF, 10% (m/m) DMF, 10% (m/m) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Acyl-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

### 5.3.9 Temperaturabhängigkeit der Regioselektivität von Peptidacylierungen in IFs

Zur Bestimmung des Temperatureinflusses auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen wurden die Peptide H-GAKAY-OH, H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH und H-VVFSAPVLEP TGPLHTQFGY HIIKVLYRN-OH in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei 4 °C und 30 °C mit Phloretin-OSu umgesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 5.11 zusammengefasst.

**Tabelle 5.11** Phloretylierung von verschiedenen Peptiden in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei unterschiedlichen Temperaturen

Peptid	T [°C]	<i>re</i>	
		[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]
GAKAY	4	0,91	-0,63
	30	0,88	-0,96
LIVDAVLEPVKAAGAY	4	0,57	-0,45
	30	0,38	-0,65
VVFSAPVLEPTGPLHTQFGYHIIKV	4	0,73	-0,32
	30	0,49	-0,98

Bedingungen: pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] erhöhte sich der *re*-Wert der Acylierung von H-GAKAY-OH von 0,88 auf 0,91 wenn die Temperatur von 30 °C auf 4 °C abgesenkt wurde. Bei dem 16mer hatte dies eine Erhöhung von 0,38 auf 0,58 und bei dem Parvulinfragment von



0,49 auf 0,73 zur Folge. Der *re*-Wert der Phloretylierung des Pentapeptides in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] erhöhte sich von -0,96 auf -0,63 bei einer Temperaturabsenkung auf 4 °C. Die gleiche Tendenz ist bei dem 16mer-Peptid und bei dem Proteinfragment festzustellen. Hier erhöht sich der *re*-Wert von -0,65 auf -0,45 bzw. von -0,98 auf -0,32. Eine Temperaturerniedrigung hat folglich in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] eine Verbesserung der Regioselektivität zur Folge, während sie sich in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] verringert (siehe Tabelle 5.11).

Die Temperaturerniedrigung hatte auch Auswirkungen auf die Ausbeute. Diese lagen mit 14-23% deutlich unter denen bei 30 °C bestimmten Werten (siehe Anhang).

### 5.3.10 pH-Abhängigkeit der Regioselektivität von Peptidacylierungen in IFs

Die Peptide H-GAKAY-OH, H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH und H-VVFSAPVLEP TGPLHTQFGY HIIKVLYRN-OH wurden in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei verschiedenen pH-Werten mit Phloretin-OSu acyliert. Ziel der Experimente war es den Einfluss des pH-Wertes auf die Regioselektivität zu untersuchen.

Eine Verringerung des pH-Wertes von 8,2 auf 7,5 hatte eine generelle Erhöhung des *re*-Wertes zur Folge. Für das Pentapeptid H-GAKAY-OH erhöhte sich der Wert von 0,88 auf 0,92 in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] von -0,96 auf -0,54. Die gleiche Tendenz war auch mit dem Hexadecapeptid zu beobachten. Hier stieg die Regioselektivität von 0,38 auf 0,56 in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und von -0,65 auf -0,30 in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] an. Das Parvulinfragment zeigt ebenfalls eine verbesserte *N*-terminale Regioselektivität bei einer pH-Wert-Erniedrigung. In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] stieg der *re*-Wert von 0,49 auf 0,63 an, während in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] eine Erhöhung von -0,98 auf -0,60 zu beobachten war (siehe Tabelle 5.12).

Die Absenkung des pH-Wertes führte zu einer deutlichen Verringerung der Ausbeute. Sie lag bei einem pH-Wert von 7,5 in Abhängigkeit von IF und Peptid zwischen 4% und 10% (siehe Anhang).

**Tabelle 5.12** Phloretylierung von verschiedener Peptide in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei verschiedenen Temperaturen

Peptid	pH	<i>re</i>	
		[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]
GAKAY	7,5	0,92	-0,54
	8,2	0,88	-0,96
LIVDAVLEPVKAAGAY	7,5	0,56	-0,30
	8,2	0,38	-0,65
VVFSAPVLEPTGPLHTQFGYHIIKV	7,5	0,63	-0,60
LYRN	8,2	0,49	-0,98

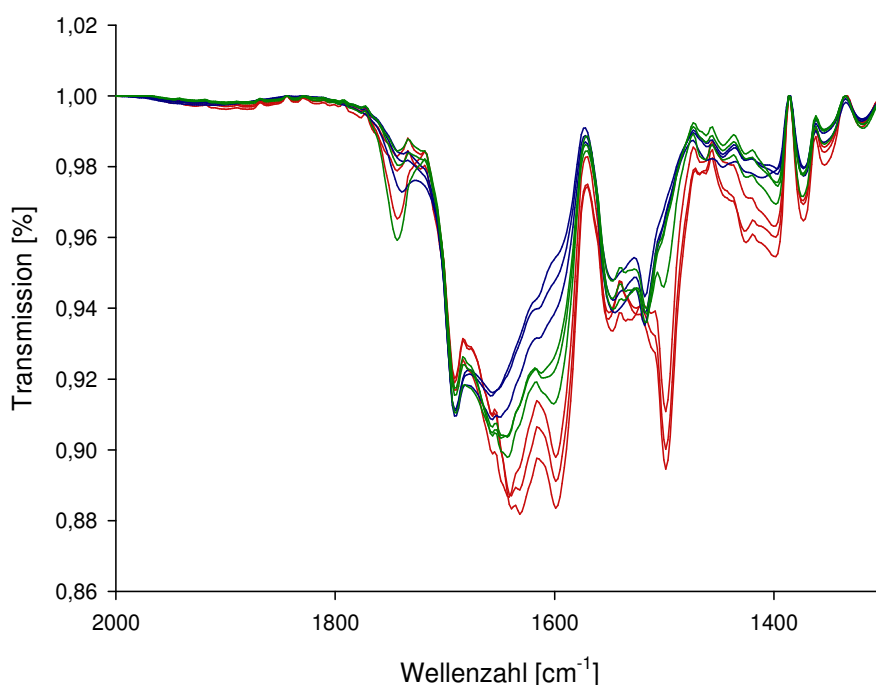
Bedingungen: T=30, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=5 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

#### 5.4 Bestimmung von pK<sub>a</sub>-Werten in ionischen Flüssigkeiten

In den bisherigen Untersuchungen zur Peptidacylierung in IFs konnte gezeigt werden, dass IFs die Regioselektivität dieser Reaktionen beeinflussen. Ein Faktor, welcher diesen Effekt der IFs erklären könnte, ist der individuelle pK<sub>a</sub>-Wert der einzelnen Aminofunktionen in IFs. Daher wurden mittels *Attenuated Total Reflection Fourier-Transform-Infrared-Spectroscopy* (ATR-FT-IR) die pK<sub>a</sub>-Werte der Aminofunktionen von Serinamid und Valinamid in H<sub>2</sub>O, [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bestimmt. Mit Serin wurde eine Aminosäure gewählt, die in den Acylierungsstudien der Pentapeptidbibliotheken als N-terminale Aminosäure zu einer starken IF-bedingten Differenz in den *re*-Werten führte, während mit Valin durchschnittliche Unterschiede erreicht wurden. Weiterhin wurden die Pentapeptide H-MAK(Ac)AY-OH und Ac-MAKAY-OH untersucht. Die Acetylierung des Pentapeptides war notwendig, da sich die IR-Schwingungen der freien N<sup>α</sup>- und N<sup>ε</sup>-Funktion überlagerten. Die Pentapeptidsequenz H-MAKAY-OH wurde für diese Studien gewählt, weil sie in den Acylierungsstudien zu den Sequenzen gehörte, die eine deutliche IF-bedingte Differenz in ihren *re*-Werten zeigten. Falls der regioselektivitätsinduzierende Effekt mittels IR-spektroskopischen Methoden beobachtbar ist, sollten folglich mit diesem Peptide starke Signale auftreten.

Zur Durchführung einer pK<sub>a</sub>-Titration der Aminofunktion wurde die N-H-Deformationsschwingung dieser Funktion gewählt. Diese lag in Abhängigkeit vom

Lösungsmittel und der Aminokomponente zwischen 1666 und 1490  $\text{cm}^{-1}$ . In IFs sind die Schwingungen leicht aus dem aus Wasser bekannten Bereich<sup>151</sup> verschoben. Eine  $\text{pK}_a$ -Titration ist mit dieser Schwingung möglich, da die Schwingung der protonierte Form der Aminofunktion – die Ammoniumspezies – in einem davon abweichenden Wellenzahlbereich auftritt. Daher wird die Signalintensität der N-H Deformationsschwingung der Aminofunktion durch Deprotonierung dieser mit steigendem pH stärker. In Abbildung 5.5 sind IR-Spektren von Ac-MAKAY-OH in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Eine deutliche pH-Abhängigkeit der N-H-Deformationsschwingung bei 1505  $\text{cm}^{-1}$  ist zu erkennen.



**Abbildung 5.5** FT-IR-Spektren von Ac-MAKAY-OH in 80% [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 20% H<sub>2</sub>O bei unterschiedlichen pH-Werten; blau: pH 3,7-4,8; grün: 6,3-9,8; rot: 11,8-14,0

Der  $\text{pK}_a$ -Wert der  $N^\alpha$ -Funktion des Serin-NH<sub>2</sub> wurde in Wasser bestimmt und beträgt in diesem Lösungsmittel 7,45. Wird [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], wie unter 4.5 beschrieben, verwendet, so verschiebt sich der Wert auf 7,69. In [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ist die Beeinflussung ausgeprägter, der  $\text{pK}_a$ -Wert liegt in diesem IF bei 7,89. Ähnliche Effekte sind für das Valinamid zu beobachten. In Wasser wurde ein Wert von 7,83 ermittelt, in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] lag dieser bei 8,37 und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei 8,44. Das Pentapeptid H-MAK(Ac)AY-OH, welches eine freie  $N^\alpha$ -Funktion aufweist, zeigt

einen  $pK_a$ -Wert bei 7,31. [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] verschiebt diesen Wert auf 7,85 und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] auf 8,21 (siehe Tabelle 5.13).

**Tabelle 5.13**  $pK_a$ -Werte von  $N^\alpha$ - und  $N^\epsilon$ - Funktionen von Peptiden und Aminosäureamiden in Wasser, [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Aminokomponente / Lösungsmittel	$N^\alpha$ -Funktion	$N^\epsilon$ -Funktion
<i>Ser-NH<sub>2</sub></i>		
H <sub>2</sub> O	7,45	
[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	7,69	
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	7,89	
<i>Val-NH<sub>2</sub></i>		
H <sub>2</sub> O	7,83	
[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	8,37	
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	8,44	
<i>MAK(Ac)AY</i>		
H <sub>2</sub> O	7,31	
[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	7,85	
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	8,21	
<i>Ac-MAKAY</i>		
H <sub>2</sub> O		10,25
[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]		11,16
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]		10,79

Bedingungen: 80% (v/v) IF, 20% (v/v) H<sub>2</sub>O, c(Aminokomponente)=25 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 2 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

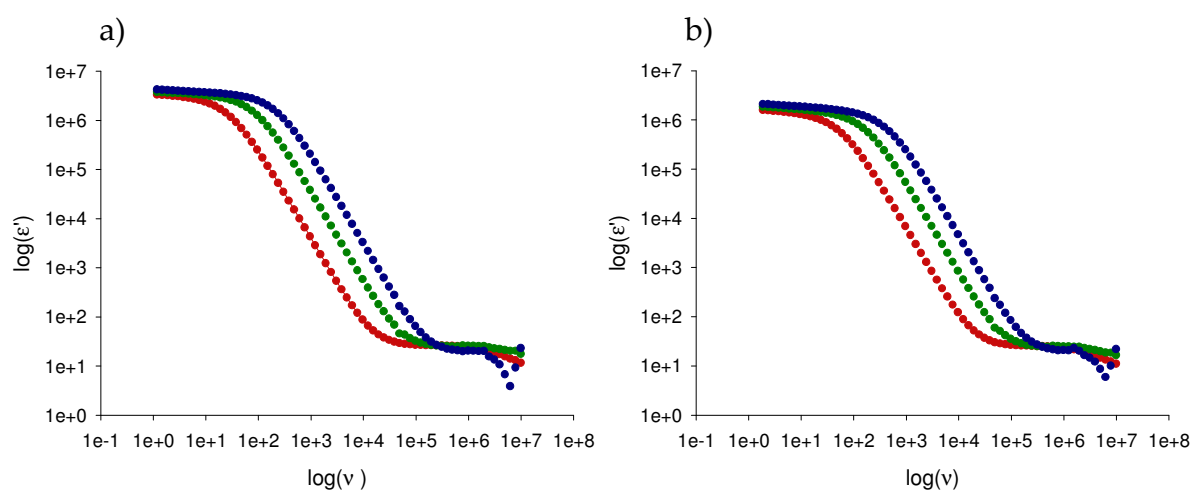
Die Bestimmung des  $pK_a$ -Wertes der  $N^\epsilon$ -Funktion des Ac-MAKAY-OH ergibt in Wasser 10,25. In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] liegt dieser Wert bei 11,16 und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei 10,79.

Es lässt sich demnach bei der Bestimmung des  $pK_a$ -Wertes der  $N$ -terminalen Aminofunktion bei dem Peptid H-MAK(Ac)AY-OH und den beiden Aminosäureamiden feststellen, dass IFs den  $pK_a$ -Wert von Aminofunktionen erhöhen. Dabei verschiebt das seitenkettendirektierende [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die Werte stärker in den basischen Bereich als [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Bei der Ermittlung des  $pK_a$ -Wertes der  $N^\epsilon$ -Funktion ist zunächst festzustellen, dass auch hier beide IFs eine

Verschiebung in den basischen Bereich hervorrufen. Der  $pK_a$ -Wert der Seitenkettenaminofunktion ist aber in diesem Fall für das [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] größer als für das [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>].

### 5.5 Dielektrische Eigenschaften

Ionische Flüssigkeiten sind hochgeladene Medien. Ihre dielektrischen Eigenschaften sind daher deutlich von der Messfrequenz beeinflusst<sup>152</sup>. Abbildung 5.6 zeigt die Abhängigkeit der dielektrischen Funktion von der jeweiligen Frequenz.



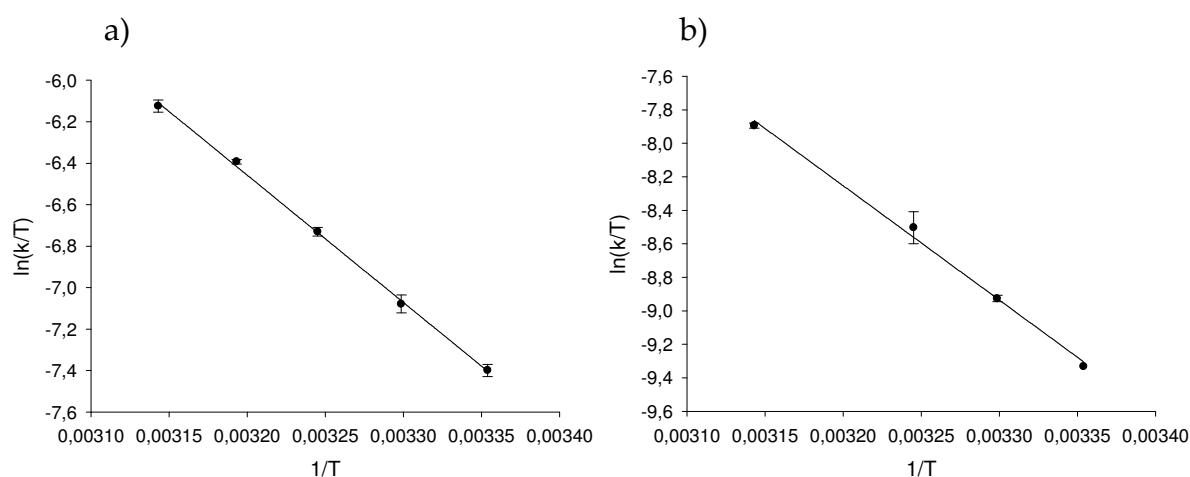
**Abbildung 5.6** Dielektrische Funktionen von Lösungen aus 80% [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] (a) bzw. [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] (b), 20% Wasser in Abhängigkeit von der Frequenz bei verschiedenen Temperaturen; pH 8,2; rot: 240 K, grün: 250 K, blau: 260 K.

Aus dem sich bei hohen Frequenzen bildenden Plateau der  $\log(\epsilon')$ -Werte lässt sich die relative Dielektrizitätskonstante ohne Beeinflussung durch störende Elektrodenpolarisation ablesen<sup>152</sup>. Für diese Messung wurden Lösungen aus 80% IF und 20% Wasser verwendet. Sie hatten somit die gleiche Zusammensetzung wie die Lösungen für die unter 5.4 beschriebene  $pK_a$ -Wert-Titration. Bei 240 K und einer Frequenz von 0,2 MHz (Plateaubereich) ergibt sich somit eine relative Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  von 25,5 für [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 26,2 für [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>].

### 5.6 Bestimmung von Aktivierungsparametern von Acylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten

Neben der Erhöhung der  $pK_a$ -Werte ist die Beeinflussung des Übergangszustandes der Reaktion eine weitere Möglichkeit, wie IFs die Regioselektivität von

Acylierungsreaktionen verändern könnten. Unter Anwendung der Theorie des aktivierten Komplexes<sup>153</sup> lassen sich durch Eyring-Auftragung der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der Acylierungsreaktion Informationen über die Aktivierungsparameter dieser Reaktion gewinnen (siehe 4.6.1). Die Acylierung von GAK(Ac)AY und Ac-GAKAY in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurde als Modellreaktion untersucht (siehe Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7** Eyringdarstellung von Peptidacylierungsreaktionen in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] a) Biotinylierung von GAK(Ac)AY, b) Biotinylierung von Ac-GAKAY. Bedingungen: pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=0,75 mM, c(Biotin-OSu)=15 mM; jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen, 1°C < T < 45°C

Die Acetylierung der N<sup>α</sup>- und der N<sup>ε</sup>-Funktion ermöglichte die separate Betrachtung der Aktivierungsparameter der einzelnen Aminofunktionalitäten. Es wurde dabei mit einem 20fachen Überschuss an Acyldonor gegenüber dem Peptid gearbeitet. Dieser war notwendig um zum Einen den Einfluss der Aktivesterhydrolyse auf das Reaktionsgeschehen zu unterdrücken und zum Anderen, um die Kinetik der Reaktion zu einer pseudo-ersten-Ordnung zu verschieben. Die Auswertung einer Kinetik 2. Ordnung würde andernfalls ein komplexes mathematisches Modell erfordern. Als Acyldonor wurde Biotin-OSu gewählt, da dieser kommerziell verfügbar und verhältnismäßig preiswert war. Die notwendigen hohen Überschüsse hätten für Phloretin-OSu hohe Kosten verursacht bzw. hätten für Fur-OSu einen größeren synthetischen Aufwand erforderlich gemacht. Die sich aus der Eyringdarstellung ergebenden Aktivierungsparameter der betrachteten Peptidacylierungen sind in Tabelle 5.14 dargestellt.

**Tabelle 5.14** Aktivierungsparameter der Biotinylierung von Ac-GAKAY-OH und H-GAK(Ac)AY-OH in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Peptid	IF	$\Delta S^\ddagger$	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger_{303,15\text{ K}}$
		[J/mol K]	[kJ/mol]	[kJ/mol]
Ac-GAKAY	[EMIM] [Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	-116	31,2	66,4
Ac-GAKAY	[EMIM] [Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	-84,4	56,7	82,3
GAK(Ac)AY	[EMIM] [Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	-189	15,8	73,1
GAK(Ac)AY	[EMIM] [Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	-87,0	51,0	77,4

Bedingungen: pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=0,75 mM, c(Biotin-OSu)=15 mM, jeder Wert entspricht dem Durchschnitt 3 unabhängiger Messungen mit einem Fehler kleiner 5% ( $\pm 2,5\%$ ),  $1^\circ\text{C} < T < 45^\circ\text{C}$ .

Für die N<sup>ε</sup>-Biotinylierung von Ac-GAKAY-OH konnte in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] eine Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  von -116 J/mol K festgestellt werden, die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$  lag bei 31,2 kJ/mol. Für die freie Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger$  ergibt sich somit für 303,15 K ein Wert von 66,4 kJ/mol. Die N-terminale Biotinylierung von H-GAK(Ac)AY-OH erfolgte in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] mit einer Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  von -189 J/mol K und die Bestimmung der Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$  ergab 15,8 kJ/mol. Für die N<sup>α</sup>-Acylierung bei 303,15 K lag in diesem IF die freie Aktivierungsenthalpie bei 73,1 kJ/mol. Vergleicht man die Aktivierungsparameter der Acylierungen beider Peptidisomere in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] miteinander, so ist auffällig, dass  $\Delta S^\ddagger$  für den N-Terminus um 73 J/mol K unter der Aktivierungsentropie der Seitenkettenreaktion liegt. Die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$  ist für die N-terminale Reaktion um 15,4 kJ/mol geringer als für die N<sup>ε</sup>-Reaktion. Dagegen ist durch den starken entropischen Term die freie Aktivierungsentropie bei 303,15 K für die N-terminale Reaktion 6,5 kJ/mol größer als die der Seitenkettenreaktion.

In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] konnte für die Acylierung von Ac-GAKAY-OH eine Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  von -84,4 J/mol K beobachtet werden. Die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$  lag bei 56,7 J/mol K. Es ergab sich somit eine freie Aktivierungsenthalpie von 82,3 J/mol K bei 303,15 K. Bei der Biotinylierung von H-GAK(Ac)AY-OH wurde für die Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  ein Wert von -87,0 J/mol K erhalten. Die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$  beträgt 51 kJ/mol. Bei 303,15 K wurde für die freie Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger$  77,4 kJ/mol berechnet. Bei einem Vergleich der

$N^\alpha$ - und der  $N^\epsilon$ -Biotinylierung ist festzustellen, dass in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]  $\Delta S^\ddagger$  für die  $N$ -terminale Acylierung um 2,6 J/mol K geringer ist. Wie in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ist auch in diesem IF die Aktivierungsentropie der  $N^\alpha$ -Modifizierung kleiner, die Differenz der  $\Delta S^\ddagger$ -Werte ist aber um den Faktor 30 geringer.  $\Delta H^\ddagger$  ist in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] für die  $N^\epsilon$ -Reaktion um 5,7 kJ/mol größer.  $\Delta G^\ddagger$  ist für die  $N$ -terminale Reaktion bei 303,15 K um 4,9 kJ/mol geringer. Daraus lässt sich ableiten, dass in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] aufgrund der starken Differenzen in  $\Delta S^\ddagger$ -Werten die  $\Delta G^\ddagger$ -Werte für die  $N^\epsilon$ -Biotinylierung kleiner sind, während in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wegen der unterschiedlichen  $\Delta H^\ddagger$ -Werte die  $N^\alpha$ -Acylierung geringere  $\Delta G^\ddagger$ -Werte zeigt (siehe Tabelle 5.14).

### 5.7 Einfluss von IFs auf das Verhältnis der *cis/trans*-Konformere von Peptidylprolylbindungen

Das *cis/trans*-Verhältnis der Konformere ausgewählter prolinhaltiger Tetrapeptiden wurde mittels des Protease-gekoppelten Peptidylprolylisomerisierungstests bestimmt (siehe 4.7)<sup>146,154-156</sup>. Der *cis*-Anteil der Peptidylprolylbindungen ist abhängig von dem Lösungsmittel, in welchem das Peptid gelöst ist. Das sich im Gleichgewicht einstellende *cis/trans*-Verhältnis ist folglich auf Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel und dem Peptid zurückzuführen<sup>156</sup>. Aus diesem Gleichgewicht lässt sich gemäß der Gleichung 5.3 mit der Gleichgewichtskonstante  $K$  eine Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  berechnen.  $R$  ist die allgemeine Gaskonstante und  $T$  die Temperatur in K. Somit ermöglicht dieser Test eine Quantifizierung von Peptid-Lösungsmittel-Interaktionen.

Gleichung 5.3  $\Delta G = R T \ln K$

Neben der Phenylalanylprolylbindung, in der eine Aminosäure mit aromatischer Seitenkette C-terminal an das Prolin gebunden war, wurden noch weitere Peptidylprolylbindungen untersucht: Alanylprolyl- als Beispiel für unpolare Aminosäureseitenketten, Lysylprolyl- als Beispiel für basische Seitenketten, Glutanyl- und Aspartylprolyl- für saure Seitenketten und Glycylprolylbindungen für ein Beispiel ohne Seitenkette.

Die Auswirkungen der IFs auf das *cis/trans*-Gleichgewicht der Peptide mit Peptidylprolylbindung sind mit Ausnahme der Glycylprolylhaltigen qualitativ sequenzunabhängig. Als Beispiel für alle verwendeten Peptide wird der Einfluss von



IFs auf den *cis*-Gehalt der Konformere anhand des Suc-AFPF-pNA besprochen. Für eine quantitative Betrachtung des Einflusses der IFs auf das *cis/trans*-Gleichgewicht wurden die Differenzen aus den  $\Delta G$ -Werten für das Gleichgewicht in wässrigem HEPES-Puffer und denen in den IFs bzw. chaotropen Salzlösungen berechnet. Diese  $\Delta\Delta G_{\text{HEPES}}$ -Werte sind ebenso wie der *cis*-Gehalt der Peptidkonformere in Tabelle 5.15 und 5.16 dargestellt. In HEPES-Puffer ergibt sich ein Wert von 23,4% für den *cis*-Gehalt von Suc-AFPF-pNA. In chaotropen Guanidiniumhydrochlorid- oder Harnstofflösungen senkt sich der *cis*-Gehalt auf 18,9 bzw. 20,0% ab. Diese Änderung des *cis/trans*-Verhältnisses ist verknüpft mit einer Absenkung der freien Enthalpie von 637 bzw. 471 J/mol. In IFs ist der *cis*-Anteil der Peptidyl-Prolylbindung noch deutlicher erniedrigt; in [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurde ein Gehalt von 7,4%, in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] von 7,5%, in [BMIM][SCN] von 6,4% und in [BMIM][TFMS] von 9,2% festgestellt. In Bezug auf HEPES-Puffer ergaben sich somit  $\Delta\Delta G$ -Werte von -3,1 kJ/mol für [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], von -3,5 kJ/mol für [BMIM][SCN] und von -2,6 kJ/mol für [BMIM][TFMS]. Die Änderungen sind für die vier untersuchten IFs ähnlich, wobei [BMIM][TFMS] die geringste Auswirkung zeigt. Die  $\Delta\Delta G$ -Werte sind für die IFs im Vergleich zu den GdmCl und den Harnstofflösungen um den Faktor fünf höher.

Wie in dem besprochenen Beispiel reduzieren IFs den beobachteten *cis*-Gehalt auch bei den anderen untersuchten prolinhaltigen Tetrapeptiden (siehe Tabelle 5.15-5.1.6). So ergaben sich  $\Delta\Delta G$ -Werte zwischen -0,5 bis -1 kJ/mol für das Suc-AAPF-pNA (in TFE konnte der literaturbekannte *cis*-Anteil von 10,8%, welcher 0,3 kJ/mol entspricht, ermittelt werden<sup>155</sup>) oder Werte zwischen -2,3 bis -4,0 kJ/mol für das Suc-AEPF-pNA. Eine Ausnahme stellte das Suc-AGPF-pNA dar. Während in [BMIM][TFMS] eine Absenkung des *cis*-Gehaltes von 22,9% auf 12,2% in Bezug auf HEPES-Puffer zu beobachten ist, erhöhen [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] diesen Wert auf 37,4% bzw. 40,5%. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Tetrapeptiden erhöhen die dialkylhaltigen IFs hier den Anteil des *cis*-Konformers (Tabelle 5.16).

Die Verwendung einer 0,55 M LiCl-Lösung in [BMIM][SCN] verändert die Auslenkung des *cis/trans*-Gleichgewichtes im Vergleich zum LiCl-freien [BMIM][SCN] nur geringfügig. Die Werte weichen nahe der Fehlergrenze von einander ab.

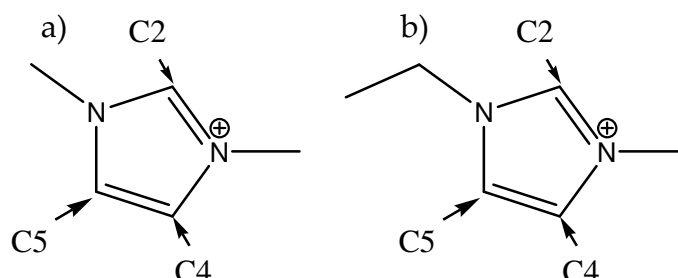
Tabelle 5.15 *cis*-Gehalt und  $\Delta\Delta_{\text{GHEPES}}$ -Werte verschiedener Suc-AXaaPF-pNA-Tetrapeptiden in unterschiedlichen Lösungsmitteln.

IF/Peptid	<i>cis</i> -Gehalt [%]	$\Delta\Delta_{\text{GHEPES}}$ [J/mol]	IF/Peptid	<i>cis</i> -Gehalt [%]	$\Delta\Delta_{\text{GHEPES}}$ [J/mol]
<i>Suc-AAPF-pNA</i>					
[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	8,7 ± 0,4	-928 ± 113	[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	37,4 ± 0,1	1645 ± 9
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	9,9 ± 0,2	-596 ± 52	[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	40,5 ± 0,3	1952 ± 29
[BMIM][SCN]	8,6 ± 0,6	-961 ± 174	[BMIM][SCN]	18,0 ± 0,2	-711 ± 31
[BMIM][SCN]/LiCl	8,4 ± 0,6	-1022 ± 117	[BMIM][SCN]/LiCl	19,3 ± 0,1	-495 ± 15
[BMIM][TFMS]	8,6 ± 0,2	-961 ± 59	[BMIM][TFMS]	12,2 ± 0,2	-1744 ± 43
Guanidinium HCl	12,4 ± 0,8	-10 ± 168	Guanidinium HCl	21,7 ± 0,3	-121 ± 41
Harnstoff	10,2 ± 0,2	-518 ± 50	Harnstoff	20,3 ± 0,2	-332 ± 28
TFE	10,8 ± 0,4	-367 ± 96	TFE	21,4 ± 0,2	-176 ± 27
HEPES	12,4 ± 0,3		HEPES	22,9 ± 0,2	
<i>Suc-AKPF-pNA</i>					
[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	5,3 ± 0,2	-1421 ± 88	[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	6,8 ± 0,2	-1556 ± 70
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	5,4 ± 0,1	-1378 ± 45	[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	7,4 ± 0,1	-1345 ± 34
[BMIM][SCN]	6,0 ± 0,1	-1115 ± 41	[BMIM][SCN]	9,4 ± 0,8	-731 ± 213
[BMIM][SCN]/LiCl	6,6 ± 0,3	-876 ± 112	[BMIM][SCN]/LiCl	9,8 ± 0,7	-622 ± 180
[BMIM][TFMS]	5,7 ± 0,1	-1244 ± 43	[BMIM][TFMS]	8,1 ± 0,3	-1115 ± 93
Guanidinium HCl	10,1 ± 0,1	215 ± 25	Guanidinium HCl	10,0 ± 0,3	-570 ± 77
Harnstoff	7,2 ± 0,1	-656 ± 35	Harnstoff	10,6 ± 0,1	-417 ± 24
HEPES	9,3 ± 0,2		HEPES	12,4 ± 0,2	
<i>Suc-AEPF-pNA</i>					
[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	7,4 ± 0,1	-3153 ± 30	[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	2,6 ± 0,1	-4050 ± 86
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	7,5 ± 0,1	-3122 ± 33	[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	2,6 ± 0,2	-4054 ± 179
[BMIM][SCN]	6,5 ± 0,1	-3484 ± 38	[BMIM][SCN]	4,4 ± 0,1	-2772 ± 55
[BMIM][SCN]/LiCl	6,9 ± 0,1	-3334 ± 36	[BMIM][SCN]/LiCl	4,8 ± 0,2	-2557 ± 101
[BMIM][TFMS]	9,3 ± 0,1	-2570 ± 27	[BMIM][TFMS]	5,2 ± 0,1	-2359 ± 47
Guanidinium HCl	18,9 ± 0,1	-637 ± 15	Guanidinium HCl	9,6 ± 0,1	-804 ± 27
Harnstoff	20,0 ± 0,1	-471 ± 14	Harnstoff	9,8 ± 0,1	-750 ± 26
HEPES	23,4 ± 0,3		HEPES	13,0 ± 0,1	

Bedingungen: siehe 4.7; jeder Wert entspricht dem Mittelwert vier unabhängiger Messungen.

## 5.8 <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen zur Peptid-IF-Interaktion

Für die Beschreibung der Position der Protonen am Imidazolium-Kation wird im Folgenden die in Abbildung 5.8 erläuterte Nummerierung verwendet.



**Abbildung 5.8** Nummerierung der Protonen in den mit <sup>1</sup>H-NMR untersuchten Imidazolium-Kationen, a) [MMIM], b) [EMIM]

Die <sup>1</sup>H-NMR-chemische Verschiebung des C2-Protons des [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] lag bei 9,29 ppm, wenn es in einer Lösung aus 70% [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 30% D<sub>2</sub>O bei einem pH-Wert von 6,3 bei 300 K gemessen wurde. Die Zugabe von H-GAKAY-OH bei einer Endkonzentration von 50 mg/ml führte zu einer Hochfeldverschiebung um -0,08 auf 9,21 ppm. Die analoge Zugabe von H-SAKAY-OH resultierte in einer Änderung der chemischen Verschiebung um -0,09 auf 9,20 ppm. Die Ringprotonen an Position C4 und C5 des Imidazolium-Kations verschieben sich nach Peptidzugabe ebenso zu höherem Feld. In der entsprechenden Messung ohne Peptid lag die chemische Verschiebung bei 7,89 ppm, nach Zugabe von H-GAKAY-OH bei 7,83 ppm und von H-SAKAY-OH bei 7,82 ppm. Die Differenz der chemischen Verschiebung lag also bei -0,05 und -0,07. Die homotopen Methylfunktionen des Imidazoliumringes zeigen sowohl in Gegenwart von H-GAKAY-OH als auch H-SAKAY-OH eine Änderung der chemischen Verschiebung um 0,02 ppm. Während ohne Peptid die Methylprotonen einen  $\delta$ -Wert von 4,15 ppm zeigen, ist mit Peptid in beiden Fällen ein Wert von 4,13 zu beobachten. Die beiden Methylfunktionen des Dimethylphosphat-Anions verschieben sich von 3,61 ppm auf 3,62 ppm bzw. bleiben konstant bei 3,59 ppm. Insgesamt ist für die Imidazoliumprotonen eine Hochfeldverschiebung zu beobachten. Sie ist für das C2-Proton am stärksten und für die Methylseitenketten am schwächsten ausgeprägt. Die Beeinflussung des Anions durch Peptidzugabe ist marginal (siehe Tabelle 5.17).

**Tabelle 5.17**  $^1\text{H-NMR}$  chemische Verschiebungen der Protonen des  $[\text{MMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  in An- bzw. Abwesenheit von H-GAKAY-OH und H-SAKAY-OH bei pH 6,3 und 300 K

	C2H	C4,5H	CH <sub>3</sub>	$[\text{Me}_2\text{PO}_4]$ CH <sub>3</sub>
$[\text{MMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]/\text{D}_2\text{O}$	9,29	7,89	4,15	3,61; 3,59
$[\text{MMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]/\text{D}_2\text{O}/\text{GAKAY}$	9,21	7,83	4,13	3,62; 3,59
$\Delta\delta$	-0,08	-0,05	-0,02	0,01; 0
$[\text{MMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]/\text{D}_2\text{O}/\text{SAKAY}$	9,20	7,82	4,13	3,62; 3,59
$\Delta\delta$	-0,09	-0,07	-0,02	0,01; 0

Neben den Untersuchungen in  $[\text{MMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  wurden auch in  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  analoge  $^1\text{H-NMR}$ -Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.18 dargestellt. Ohne Peptid wird das C2-Proton bei 9,19 ppm detektiert. Die Zugabe von H-SAKAY-OH und H-GAKAY-OH führt zu einer Tieffeldverschiebung um 0,18 auf 9,37 ppm. Die diastereotopen C4- und C5-Protonen werden um 0,09 bzw. 0,08 von 7,82 bzw. 7,76 ppm auf 7,91 bzw. 7,85 ppm bei H-GAKAY-OH Zugabe und auf 7,91 bzw. 7,84 ppm bei H-SAKAY-OH Zugabe verschoben. Sowohl die Methylprotonen als auch die Methylenprotonen der Ethylfunktion werden um 0,03 ppm zu tieferem Feld verschoben. Die Methylprotonen liegen bei 4,10 ppm ohne Peptid und bei Peptidzugabe bei 4,13 ppm, die Methylenprotonen werden von 4,43 auf 4,46 ppm verschoben. Die Methylprotonen der Ethylfunktion des Diethylphosphat-Anions zeigen keine Beeinflussung, sie weisen eine chemische Verschiebung von 1,61 ppm auf. Die Protonen der Ethylfunktion des Aniones werden um 0,01-0,02 ppm zu höherem Feld verschoben. Im Gegensatz zu  $[\text{MMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  sind für die Imidazoliumprotonen des  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  keine Hochfeldverschiebungen sondern Verschiebungen zu tiefem Feld zu beobachten. Die Stärke der Verschiebungen an den jeweiligen Positionen des Ringes ist zwischen den IFs vergleichbar. Das C2-Proton wurde am stärksten, die C4 und C5 Protonen schwächer verschoben. Die geringste Verschiebung ist für die Alkylfunktionen zu beobachten. Die Beeinflussung des Anions ist deutlich geringer als die des Kations und weist im  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  im Vergleich zum Kation in die entgegengesetzte Richtung (siehe Tabelle 5.18).

**Tabelle 5.18**  $^1\text{H}$ -NMR-chemische Verschiebungen der Protonen des  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  in An- bzw. Abwesenheit von H-GAKAY-OH und H-SAKAY-OH bei pH 6,3 und 300 K

	C2H	C4,5H	CH <sub>3</sub>	Et- CH <sub>2</sub>	Et- CH <sub>3</sub>	$[\text{Et}_2\text{PO}_4]$ CH <sub>2</sub>	$[\text{Et}_2\text{PO}_4]$ CH <sub>3</sub>
$[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]/\text{D}_2\text{O}$	9,19	7,82 7,76	4,10	4,43	1,61	3,94	1,25
$[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]/$ $\text{D}_2\text{O}/\text{GAKAY}$	9,37	7,91 7,85	4,13	4,46	1,61	3,92	1,23
$\Delta\delta$	0,18	0,09 0,09	0,03	0,03	0	-0,02	-0,02
$[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]/$ $\text{D}_2\text{O}/\text{SAKAY}$	9,37	7,91 7,84	4,13	4,46	1,61	3,93	1,23
$\Delta\delta$	0,18	0,09 0,08	0,03	0,03	0	-0,01	-0,02

In weiteren Untersuchungen wurde als IF  $[\text{BMIM}][\text{SCN}]$  verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.19 dargestellt. Für das C2-Proton konnte im  $[\text{BMIM}][\text{SCN}]$  nach Peptidzugabe keine Verschiebung festgestellt werden. Es wird bei 9,00 ppm detektiert, unabhängig ob H-SAKAY-OH vorhanden ist. Gleiches gilt für die Methylfunktion (4,09 ppm), die  $\beta$ -Methylenfunktion (1,97 ppm) und die  $\delta$ -Methylfunktion (0,97 ppm). Geringe Verschiebungen um 0,01 ppm zu höherem Feld wurden für die C4- und C5-Protonen (7,74, 7,68 ppm), die  $\alpha$ -Methylenprotonen (4,37 ppm) und die  $\gamma$ -Methylenprotonen (1,41 ppm) festgestellt. Die beobachteten Verschiebungen sind im Vergleich zu  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  und  $[\text{MMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  sehr gering (siehe Tabelle 5.19). Die Auswirkung einer Zugabe von H-GAKAY-OH konnte bisher aufgrund der begrenzten Messzeit, die uns die Firma Bruker-Biospin freundlicher Weise an ihrem  $^1\text{H}$ -HR-MAS-NMR-System zur Verfügung stellte, nicht mehr untersucht werden.

**Tabelle 5.19**  $^1\text{H}$ -NMR-chemische Verschiebungen der Protonen des [BMIM][SCN] in An- bzw. Abwesenheit von H-SAKAY-OH bei pH 6,3 und 300 K

	C2H	C4,5H	CH <sub>3</sub>	Bu $\alpha\text{CH}_2$	Bu $\beta\text{CH}_2$	Bu $\gamma\text{CH}_2$	Bu $\delta\text{CH}_3$
[BMIM][SCN]/D <sub>2</sub> O	9,00	7,75 7,69	4,09	4,38	1,97	1,42	0,97
[BMIM][SCN]/D <sub>2</sub> O/SAKAY	9,00	7,74 7,68	4,09	4,37	1,97	1,41	0,97
$\Delta\delta$	0	-0,01	0	-0,01	0	-0,01	0

## 6. Diskussion

### 6.1 Acylierung von Peptiden in ionischen Flüssigkeiten

#### 6.1.1 Einfluss des Lösungsmittels auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen

Bei allen durchgeführten Acylierungsreaktionen von Peptiden zeigte sich, dass die Regioselektivität der Modifizierung stark abhängig von dem als Lösungsmittel verwendeten IF war. In dimethylphosphathaltigen IFs wie [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] oder [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurde eine generelle Bevorzugung einer N<sup>α</sup>-Acylierung beobachtet, während in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] hauptsächlich die Lysinseitenkette reagierte. Acylierungen in anderen IFs wie [BMIM][SCN] oder [BMIM][BF<sub>4</sub>] führten zu *re*-Werten, die zwischen denen der methyl- und ethylphosphathaltigen IFs lagen. Die Regioselektivität wird somit von IFs beeinflusst. Da es sich bei IFs um flüssige Salze handelt, weisen sie eine hohe Ionenstärke auf. Das könnte eine Ursache für die beobachtete Regioselektivitätsinduzierung sein. Um dieses zu untersuchen wurden Acylierungen am Beispiel des Modellpentapeptid H-GAKAY-OH analysiert. Als Medium fand eine wässrige NaCl-Lösung, welche die gleiche Ionenstärke wie die [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]-Reaktionslösung aufwies, Anwendung. Hierbei zeigte sich, dass unabhängig vom verwendeten Acyldonor die *re*-Werte in der NaCl-Lösung im Vergleich zum rein wässrigen System ohne zusätzliche Salzzugabe praktisch unverändert waren. Mit Phloretin-OSu und Biotin-OSu zeigten die Acylierungen bei hoher Ionenstärke sogar eine marginal starke Tendenz zur Seitenkette. Da es sich bei der eingestellten Ionenstärke um die eines N-terminal dirigierenden IFs handelte und keine merkliche Erhöhung des *re*-Wertes auftrat, kann die Ionenstärke nicht Ursache der festgestellten Regioselektivitäten sein. Für andere Reaktion wie der Heck-Reaktion ist hingegen ein Einfluss der Ionenstärke auf das Reaktionsverhalten beschrieben<sup>107,108</sup>. Die Heck-Reaktion erfolgt aufgrund der hohen Ionenstärke der IFs in diesen über einen ionischen Reaktionsweg. Der in molekularen Lösungsmitteln ebenfalls mögliche neutrale Reaktionsweg wird nicht besprochen. Durch diese Diskriminierung des neutralen Reaktionsweges in IFs erfolgt die Heck-Reaktion mit der für den ionischen Reaktionsweg typischen hohen  $\alpha$ -Regioselektivität. Im Gegensatz zur Heck-Reaktion wird bei der Acylierung von Aminofunktionen, die

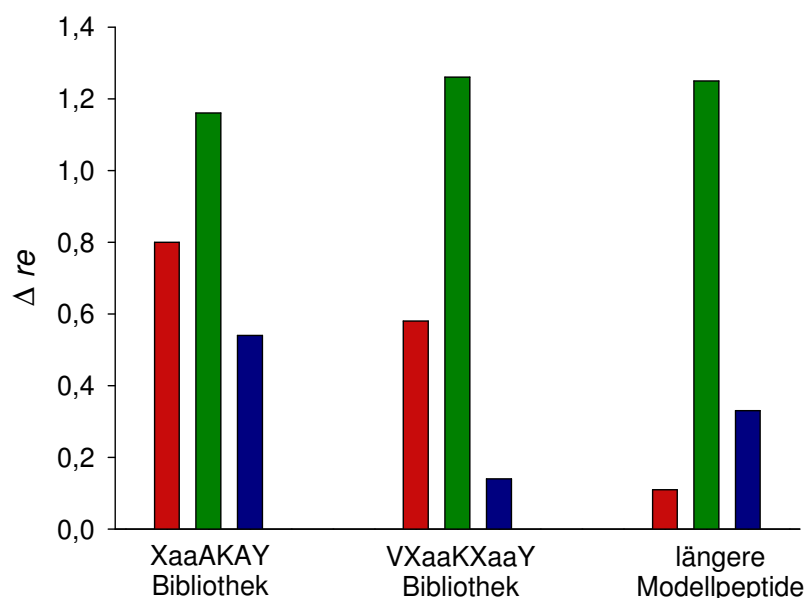
über einen Additions-Eliminierungsmechanismus verläuft, die Regioselektivität nicht über den Reaktionsmechanismus bestimmt sondern darüber bestimmt, welche Aminofunktion –  $N^\alpha$  oder  $N^\epsilon$  – reagiert. Daher hat hier die Ionenstärke keinen Einfluss auf die Regioselektivität der Reaktion.

### 6.1.2 Einfluss der Peptidsequenz auf die Regioselektivität von Acylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten

Neben Lösungsmitteln beeinflussen auch noch andere Faktoren die beobachtete Regioselektivität. So beeinflusst auch die Peptidsequenz die Regioselektivität der Acylierungsreaktion. In diesem Abschnitt soll diskutiert werden, ob dieser Sequenzeinfluss von den Auswirkungen der Lösungsmittel überwogen wird. Für das Pentapeptid H-FAKAY-OH konnte in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ein *re*-Wert von 0,08 beobachtet werden, während für H-GAKAY-OH ein Wert von 0,88 ermittelt wurde. Dieser sequenzbedingte Unterschied von 0,8 ist der Stärkste für die N-terminal variierte Pentapeptidbibliothek gefundene in diesem Lösungsmittel. In [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurden die deutlichsten Unterschiede in den *re*-Werten für die Peptide H-YAKAY-OH und H-IAKAY-OH oder H-PAKAY-OH bzw. H-TAKAY-OH gefunden. Für diese Peptide wurden Werte von -0,46 bzw. -1,00 ermittelt, woraus sich eine Differenz von 0,54 ergibt (s. 5.3.2). Beide Differenzbeträge geben den maximalen Einfluss der Peptidsequenz auf die Regioselektivität in dem jeweiligen IF an. Eine weitere Möglichkeit den Einfluss der Peptidsequenz auf die Regioselektivität zu evaluieren, wäre die Maximaldifferenz der *re*-Werte individueller Sequenzen vom Mittelwert einer Bibliothek zu betrachten. Hierbei wird aber nicht der maximale Einfluss der Peptidsequenz auf die Regioselektivität sondern nur eine gemittelte Abweichung bestimmt. Da es Ziel dieser Analyse sein soll zu bestimmen, ob der Lösungsmittel- den Sequenzeinfluss überwiegt, ist es sinnvoll mit der maximalen und nicht mit der schwächeren, gemittelten Sequenzauswirkung zu arbeiten. Vergleicht man den maximalen Sequenzeinfluss mit den Auswirkungen der Natur der IFs auf den *re*-Wert, so kann beurteilt werden, ob die Sequenz oder das Lösungsmittel einen stärkeren Einfluss auf den *re*-Wert besitzt. Für die Betrachtung des IF-Einflusses wird der durchschnittliche *re*-Wert der Acylierung einer Pentapeptidbibliothek in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] mit dem für die analogen Reaktionen in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] verglichen. Der durchschnittliche *re*-Wert in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] für die Bibliothek mit der Peptidsequenz H-XaaAKAY-OH beträgt



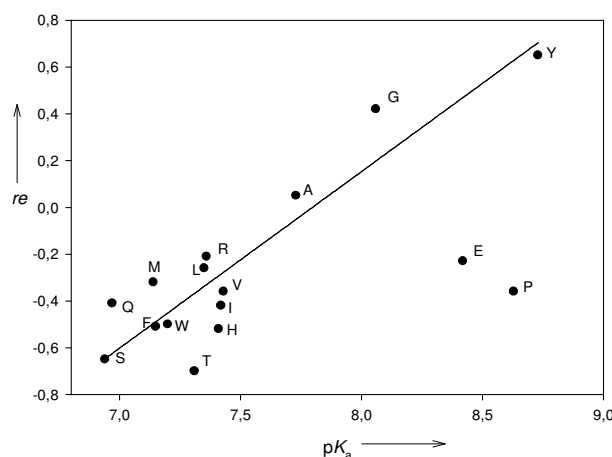
0,34 und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] -0,82. Es liegt demzufolge ein Differenz von 1,16 vor. Dieser durchschnittliche durch die IFs gegebene Unterschied ist mehr als doppelt so groß wie der stärkste durch die Sequenz gegebene Effekt in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 1,45fach so ausgeprägt wie der größte Sequenzeffekt in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 6.1 dargestellt.



**Abbildung 6.1** Darstellung des Einflusses der Peptidsequenz und der Natur der IFs auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen, rot: maximale sequenzbedingte  $re$ -Wertdifferenz in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], grün: durchschnittliche IF-bedingte  $re$ -Wertdifferenz, blau: maximale sequenzbedingte  $re$ -Wertdifferenz in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

Für die Acylierung der *N*-terminalen Position variierten Peptidbibliothek konnte zwar ein Sequenzeffekt festgestellt werden, dieser ist aber im Vergleich zu dem inherenten regioselektivitätsinduzierenden Effekt der IFs deutlich schwächer. Für die an Position 2 und 4 variierte Bibliothek ist das Überwiegen des IF-Effektes sogar noch ausgeprägter. Der durchschnittliche  $re$ -Wert liegt in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei 0,31 und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei -0,95, woraus sich ein erhöhter Differenzbetrag von 1,26 ergibt. Aus diesem lässt sich ein ebenfalls erhöhter Einfluss der IFs auf die Regioselektivität der Peptidacylierungsreaktion der intern variierten Peptide ableiten. Die stärkste sequenzbedingte Abweichung in der Regioselektivität liegt in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei 0,58 und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei 0,14. Die IF-bedingte Abweichung in den durchschnittlichen  $re$ -Werten liegt mit 1,26 bei dem 9fachen der maximalen sequenzabhängigen Differenz in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und bei dem 2,2fachen

der sequenzbedingten Abweichung in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Auch in der intern variierten Bibliothek überwiegt der IF-Effekt den Sequenzeffekt demnach deutlich. Ein Versuch, die erhaltenen Regioselektivitäten mit QSAR-Daten der ausgetauschten *N*-terminalen Aminosäuren<sup>157-159</sup> zu korrelieren, scheiterte. Eine Auftragung der *re*-Werte gegen verschiedene QSAR-Datensätze für die *N*-terminale Aminosäure der Pentapeptidbibliothek lieferte nur breit gestreute Datenpunkte, die in keinem linearen oder exponentiellen Zusammenhang zueinander standen. Die unterschiedlichen Regioselektivitäten können also nicht allein abhängig von der Struktur der *N*-terminalen Aminosäure sein. Da sich die Sequenz dieser untersuchten Peptide nur in jener Position unterschied, liegt somit keine alleinige Abhängigkeit von der Peptidsequenz vor. Solch eine direkte Sequenzabhängigkeit könnte auch nicht die Tatsache erklären, dass in verschiedenen IFs unterschiedliche Regioselektivitäten beobachtet werden. Der beobachtete Effekt könnte vielmehr in einer Wechselwirkung zwischen Peptid und IF begründet zu sein. Im Gegensatz zu den Acylierungen in IFs konnte für die bei der Reaktion in Wasser beobachteten Regioselektivitäten der *N*-terminal variierten Bibliothek (s. 5.3.2) eine Korrelation zwischen den erhaltenen *re*-Werten und den p*K*<sub>a</sub>-Werten der *N*-terminalen Aminofunktion von Pentapeptiden<sup>160,161</sup> festgestellt werden (siehe Abbildung 6.2).



**Abbildung 6.2** Korrelation zwischen *re*-Werten der Phloretinierung von XaaAKAY-OH Peptiden in Wasser und p*K*<sub>a</sub>-Werten der *N*-terminalen Aminosäure von Pentapeptiden

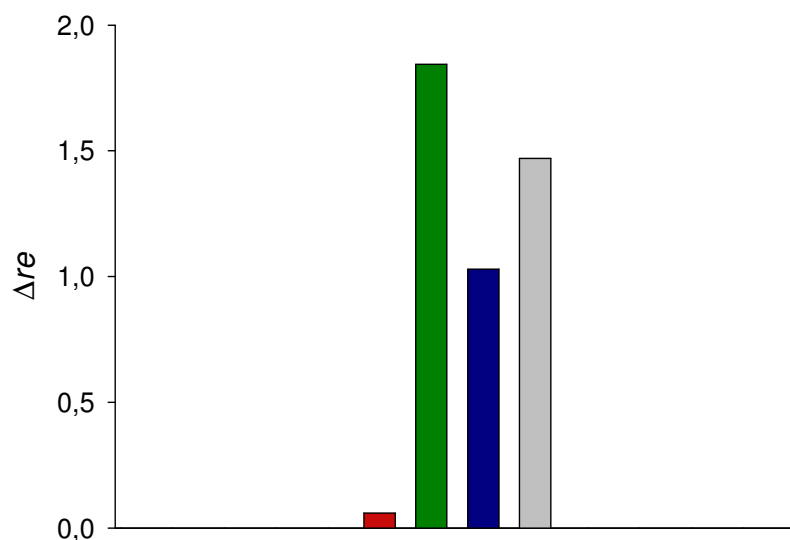
Der *re*-Wert steigt demzufolge mit zunehmendem p*K*<sub>a</sub>-Wert der *N*-terminalen Aminosäure an. Bei einem konstanten pH-Wert führen erhöhte p*K*<sub>a</sub>-Werte der *N*<sup>α</sup>-Funktion zu einer geringeren Konzentration der deprotonierten und somit reaktiven

Aminofunktion, die effektive Nukleophilkonzentration sinkt folglich. Es wäre somit zu erwarten, dass mit steigendem  $pK_a$ -Wert sich weniger *N*-terminalmarkiertes Produkt bildet und daher der *re*-Wert sinkt. Dieses wird aber nicht beobachtet. Im Gegenteil, eine Steigerung des  $pK_a$ -Wertes vergrößert den *re*-Wert. Erklärbar ist dies durch die Tatsache, dass eine Erhöhung des  $pK_a$ -Wertes auch mit einer Verstärkung der Nukleophilie der deprotonierten Spezies einher geht. Die Konkurrenzreaktion zwischen  $N^\alpha$ - und  $N^\epsilon$ -Funktion scheint demnach in Wasser durch die Nukleophilie der beteiligten Aminofunktion beeinflusst zu werden. Es gibt zwei deutliche Ausreißer aus der  $pK_a$ -*re*-Korrelation: Prolin und Glutaminsäure. Prolin ist als einzige Iminosäure sterisch gehindert. Durch die schlechtere Zugänglichkeit der Aminofunktion ist die gesenkte Reaktivität in Vergleich zu den anderen Aminosäuren zu verstehen. Bei der Glutaminsäure wäre es denkbar, dass eine eventuell ionische Interaktion zwischen der sauren Seitenkette und dem *N*-Terminus stattfindet. Mit dieser Bildung eines Sechsringses könnte die gesenkte Reaktivität der Glutaminsäure erklärt werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob die bei den Pentapeptidbibliotheken festgestellte relative Sequenzunabhängigkeit auch bei längererkettigen, hydrophoberen Peptiden auftritt. Das 16mer Peptid H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH zeigte bei einer Phloretylierung in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] einen *re*-Wert von 0,38, während die Acylierung des *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68A) unter diesen Bedingungen mit einer Regioselektivität von 0,49 erfolgt. Der sequenzbedingte Unterschied des *re*-Wertes liegt also bei 0,11. In [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] verlief die Phloretylierung des 16mer Peptides mit einem *re*-Wert von -0,65 und des Proteinfragmentes mit einem *re*-Wert von -0,98. Hier liegt die Differenz bei 0,33. Während der IF-abhängige Regioselektivitätsunterschied bei 1,25 liegt, ist der sequenzabhängige bei 0,11 bzw. 0,38 (siehe Abbildung 6.1). Der regioselektivitätsinduzierende IF-Effekt überwiegt demnach deutlich die Auswirkung des Sequenzeffektes sowohl in den beiden hydrophileren Pentapeptidbibliotheken als auch bei den längeren, hydrophoberen Peptiden.

Für Lysinamid konnten hingegen *re*-Werte von 0,28 in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 0,20 in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] festgestellt werden. Hier beeinflussten die IFs den *re*-Wert nur um 0,08. Die IFs zeigen somit bei diesem Acylakzeptor sehr geringe regioselektivitätsinduzierende Wirkung. Ein Vergleich zu dem IF-induzierten Regioselektivitätsdifferenz anderer Acylakzeptoren ist in Abbildung 6.3 dargestellt.

Dieser drastische Unterschied in der Wirkung der IFs muss, da die Reaktionsbedingungen ansonsten gleich waren, auf die unterschiedlichen Eigenschaften des Acylakzeptors zurückzuführen sein. Kürzere Peptide und Aminosäureamide ähneln sich sehr in ihrer Struktur und in ihren Eigenschaften. Sie sind beide aus Aminosäuren aufgebaut und weisen beide Amidbindungen auf, trotzdem sind diese drastischen Abweichungen zu beobachten. Peptide und Aminosäureamide unterscheiden sich aber durch die Existenz eines Peptidrückgrates welche nur in Peptide und nicht in Aminosäureamide auftritt. Es ist daher anzunehmen, dass ein Peptidrückgrat notwendig für die Entwicklung des beobachteten regioselektivitätsinduzierenden Effektes ist. Die Ergebnisse legen somit eine Interaktion zwischen dem Peptidrückgrat und den IFs nahe.



**Abbildung 6.3** Darstellung des Einflusses der Peptidsequenz auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen mit Phloretin-OSu, rot: Lys-NH<sub>2</sub>, grün: H-GAKAY-OH, blau: H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH, grau: *E.coli* Parvulin 64-92 (C68A)

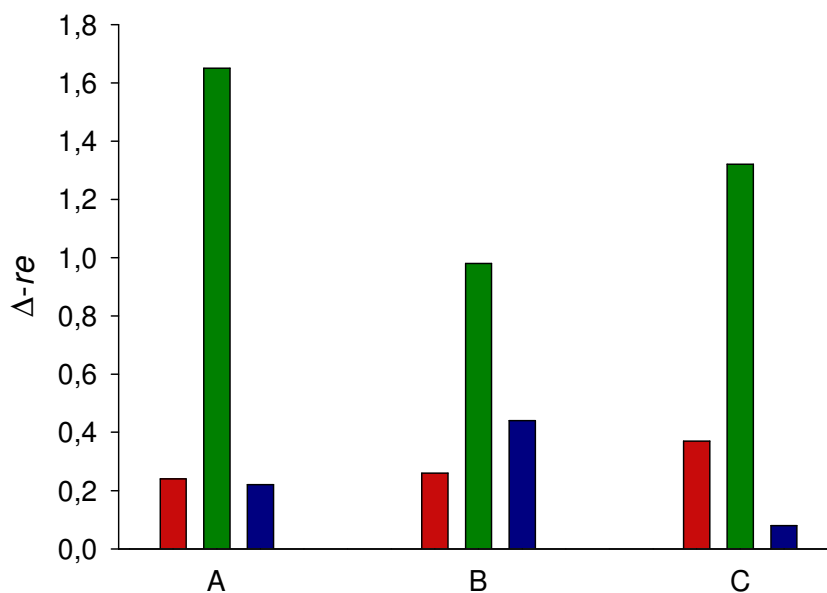
Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass IFs Regioselektivität in Acylierungsreaktionen von Peptiden induzieren können, wenn der Acylakzeptor eine gewisse Kettenlänge nicht unterschreitet. Auch die Sequenz der zu acylierenden Peptide hat Auswirkungen auf die Regioselektivität der Acylierungsreaktion. Dieser Einfluss ist aber deutlich geringer als der der IFs.

### 6.1.3 Einfluss des Acyldonors auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten

Für die Diskussion des Einflusses der Acyldonorstruktur auf die Regioselektivität soll auf die gleiche Methodik wie bei der Analyse der Sequenzabhängigkeit des Acylakzeptors zurückgegriffen werden. Die acyldonorbedingten Unterschiede in den *re*-Werten sollen mit den IF-bedingten verglichen werden. Hierfür wurden das Pentapeptid H-GAKAY-OH, das Hexadecamerpeptid H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH und das Proteinfragment H-VVFSAPVLEP TGPLHTQFGY HIIKVLRN-OH mit den Acyldonoren Phloretin-OSu, Biotin-OSu und Fur-OSu zur Reaktion gebracht. Die entsprechenden Ergebnisse sind in 5.3.2 und 5.3.4 dargestellt.

In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] lagen die acyldonorbedingten Regioselektivitätsunterschiede für das Pentapeptid H-GAKAY-OH bei maximal 0,24, während in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die maximale acyldonorbedingte Differenz der *re*-Werte 0,22 betrug. Die durchschnittlichen *re*-Werte für die drei Acylierungsmittel waren im [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 0,79 und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] -0,86. sodass sich ein IF-induzierter Regioselektivitätsunterschied von 1,65 ergab. Der Einfluss des IFs ist 6-7fach stärker als der Einfluss des Acyldonors bei der Umsetzung von H-GAKAY-OH. Für das Hexadecamerpeptid liegt der maximale Acyldonoreinfluss im [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei 0,26 und im [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei 0,44. Der IF-Einfluss ist gegeben durch die Differenz der durchschnittlichen *re*-Werte in den beiden IFs bei einem Wert von 0,98 (siehe Abbildung 6.4).

Wieder ist die Auswirkung des Lösungsmittels um den Faktor 2-3,5 größer als der Einfluss des Acyldonor. Als weiterer Acylakzeptor wurde das *E.coli* Parvulin 64-92 (C68A) Fragment untersucht. Hier ergab sich ein maximaler Acyldonoreffekt von 0,37 im [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] während im [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] lediglich eine Differenz von 0,08 bestimmt wurde. Der Unterschied der durchschnittlichen *re*-Werte in den beiden IFs lag bei 1,32. Er ist um das 16fache größer als der Acyldonoreinfluss in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] um das 3,5fache stärker.



**Abbildung 6.4** Darstellung des Einflusses des Acyldonor und der Natur der IFs auf die Regioselektivität der Acylierungsreaktionen verschiedener Peptide, rot: maximale acyldonorbedingte *re*-Differenz in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], grün: durchschnittliche IF-bedingte *re*-Differenz, blau: maximale acyldonorbedingte *re*-Differenz in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], A: H-GAKAY-OH, B: H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH, C: *E.coli* Parvulin 64-92 (C68A)

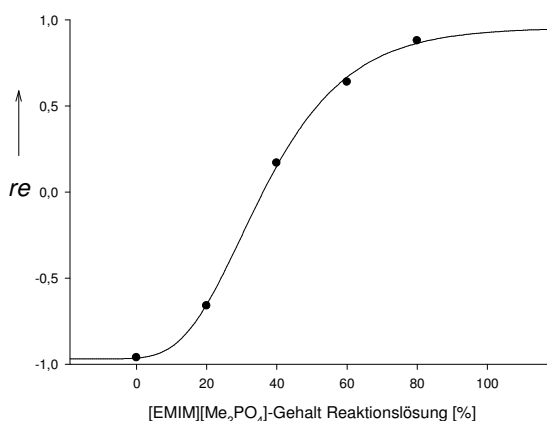
Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Struktur des Acyldonors die Regioselektivität beeinflusst. Diese Auswirkung ist aber um den Faktor 2-16 – also wesentlich – geringer als der IF-Effekt.

#### 6.1.4 Konzentrationsabhängigkeit des IF-Effektes

Die Experimente zur Konzentrationsabhängigkeit des IF-Effektes zeigen, dass der *re*-Wert in Abhängigkeit von der IF-Konzentration variiert. In Wasser-IF-Mischungen erhöhte sich der Wert schrittweise von 0,42 auf 0,88, wenn die [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]-Konzentration sukzessive von 0 auf 80% erhöhte wurde. Verwendete man [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] so erniedrigte sich der *re*-Wert bei gleicher Vorgehensweise auf -0,96. In Mischungen aus beiden IFs waren die gleichen Tendenzen zu beobachten, je mehr [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] verwendet wurde, desto größer wurde der *re*-Wert, je mehr [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] desto kleiner wurde der Wert. Interessant ist, dass es zu keiner vollständigen Sättigung der regioselektivitätsinduzierenden Wirkung von IFs kam. Dieses ist insofern erstaunlich, als dass schon bei der geringsten eingesetzten IF-Konzentration – 20% des Volumens des Reaktionsansatzes – das IF in einem

tausendfachen Überschuss zu dem Peptid vorliegt. Trotz des großen Überschusses führt eine weitere Erhöhung der IF-Konzentration zu einer Verstärkung des IF-Effektes und somit zu einer Verbesserung der Regioselektivität. In Abbildung 6.5 ist die Konzentrationsabhängigkeit des *re*-Wertes der Acylierung von H-GAKAY-OH in der [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]/[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] Mischung dargestellt.

In dieser Darstellungsform ist gut zu erkennen, dass der Zusammenhang zwischen *re*-Wert und IF-Konzentration sigmoidalen Charakter aufweist. Eine Regressionsrechnung zeigt, dass eine Plateaubildung und somit eine vollständige Sättigung des Effektes erst bei Werten unter 0 bzw. über 100% zu beobachten ist. Da diese Werte natürlich nur mathematisch aber nicht physikalisch sinnvoll sind, kann eine vollständige Sättigung des Effektes nicht erreicht werden.



**Abbildung 6.5** Konzentrationsabhängige Phloretylierung von H-GAKAY-OH in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]/[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]-Mischungen (s. 5.3.3)

Eine Konzentrationserhöhung an IF führt folglich durch den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich und (nach der Regressionsrechnung auch darüber hinaus) zu einer Verstärkung des IF-Effektes. Dies ist insofern erstaunlich, da in der Literatur bei anderen Reaktionen Sättigungen beobachtet werden konnten. So hat das IF [H<sub>2</sub>NiPr<sub>2</sub>][BF<sub>4</sub>] auch regioselektivitätsinduzierende Wirkung bei der Arylierung von *N*-Acyl-*N*-vinylamin durch eine Heck-Reaktion. Hier ist aber schon bei einem zehnfachen Überschuss des IFs gegenüber dem Amin keine weitere Verbesserung festzustellen<sup>106</sup>. Bei der Peptidacylierung zeigt hingegen ein 300fach größerer Überschuss an IF noch deutliche Wirkung auf die Regioselektivität. In der Literatur finden sich keine Angaben über die Ursache der Sättigung bei der Heck-Reaktion, sodass erst weiterführende Studien klären werden können, warum die Acylierungs- und Heck-Reaktionen ein unterschiedliches Sättigungsverhalten zeigen.

### 6.1.5 Regioselektivität in imidazoliumbasierten C2-methylierten und nicht-methylierten ionischen Flüssigkeiten

Es konnte in den durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass die Phloretylierung von H-LIVDAVLEPV KAAGAY-OH in 80% (m/m) IF in Abhängigkeit des verwendeten Salzes mit unterschiedlichen Regioselektivitäten abläuft. In [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurde ein *re*-Wert von -0,77 erreicht, während in dem C2-methyliertem [EMMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] nur ein Wert von -0,27 generiert wurde. Eine ähnliche Abschwächung der regioselektivitätsinduzierenden Wirkung durch C2-Methylierung wurde bei den dimethylphosphathaltigen IFs beobachtet. Hier ging der *re*-Wert von 0,36 auf 0,30 zurück. Die C2-Methylierung reduziert folglich sowohl bei dem N-terminal als auch bei dem seitenkettendirektierenden IF die beobachtete Regioselektivität. Eine Veränderung am Kation hat also hier deutlichen Einfluss auf die Regioselektivität der Acylierungsreaktion. Dies ist insofern bemerkenswert, da in den initialen Studien mit dem Pentapeptide H-GAKAY-OH der Einfluss des Kations sehr gering war. Der *re*-Wert der Phloretylierung lag sowohl in [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] als auch in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei 0,88. Die zusätzliche Methylenfunktion hatte in diesem Fall keine Auswirkung. Für die weiterführenden Untersuchungen wurden die IFs [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ausgewählt und sie zeigten wie schon diskutiert deutliche Unterschiede in ihrem Regioselektivitätsverhalten, obwohl ihre Kationen identisch waren. Aus diesen Ergebnissen heraus war daher anzunehmen, dass das Kation für die Regioselektivität eine untergeordnete Rolle spielt. Die Ergebnisse der C2-methylierten IFs zeigen nun, dass das Kation durchaus Einfluss auf die Regioselektivität nimmt, wenn eine Modifizierung an der C2-Position stattfand. Es ist aus der Literatur bekannt, dass das veränderte C2-Proton besondere Eigenschaften besitzt. Es ist azid, so dass mit stärkeren Basen es möglich ist Carbene von imidazoliumbasierten IFs zu erzeugen<sup>162</sup>. Weiterhin sorgt diese erhöhte Azidität dafür, dass das C2-Proton ein guter Interaktionspartner ist. Es konnten für verschiedene imidazoliumbasierte IFs starke Wechselwirkungen zwischen dem Gegenion bzw. Lösungsmittelmolekülen und dem C2-Proton beobachtet werden<sup>162-164</sup>. Es ist daher vorstellbar, dass die reduzierte Regioselektivität durch die Methylierung auf den Verlust des C2-Protons als Interaktionspartner zurückzuführen ist. Dieses würde auf eine direkte Interaktion zwischen dem Kation und dem Peptid hindeuten, welche für die Regioselektivitätsinduzierung notwendig ist. Die



Acylierungsstudien zeigen eindeutig (s. 5.3), dass das Anion steuert, ob  $N^\alpha$ - oder  $N^\epsilon$ -Acylierung stattfindet. Während demnach über das Kation entschieden wird, ob der IF-Effekt auftritt, sollte das Anion steuern, ob  $N^\alpha$ - oder  $N^\epsilon$ -Selektivität zu beobachten ist. In 6.2.4 werden die Ergebnisse der  $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen diskutiert, die zu einem tieferen Verständnis dieses Sachverhaltes beitragen.

### 6.1.6 Einfluss einer Verkürzung der Lysinseitenkette auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen

In den IFs  $[\text{EMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  und  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  wurde die Auswirkung einer Verkürzung der Lysinseitenkette auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen untersucht. Als Modell wurde das Pentapeptid H-MAKAY-OH gewählt. Die Seitenkette des Lysins wurde von ursprünglich vier Methyleneinheiten auf drei (Orn) bzw. zwei (Dab) verkürzt. In  $[\text{EMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  wurde H-MAKAY-OH mit einem *re*-Wert von 0,40 phloretyliert, während mit H-MA-Orn-AY-OH eine Erhöhung auf 0,49 und mit H-MA-Dab-AY-OH eine auf 0,66 zu beobachten war. Je kürzer die Seitenkette ist, desto seltener wird sie markiert. In  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  wurden *re*-Werte von -0,98 für das H-MAKAY-OH, -0,59 für das H-MA-Orn-AY-OH und -0,31 für das H-MA-Dab-AY-OH generiert. Die gleiche Tendenz wie für das  $[\text{EMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  ist auch hier zu beobachten, je kürzer die Seitenkette ist, desto weniger  $N^\epsilon$ -Acylierung tritt auf.

Eine Verkürzung der Seitenkette bringt die reaktive Aminofunktion näher an das Peptidrückgrat heran. Bezieht man die Ergebnisse der Lysinamidacylierung und der Acylierung in C2-methylierten IFs mit ein, welche eine Interaktion des Kations des IFs mit dem Peptidrückgrat nahe legen, so ist es vorstellbar, dass das Peptidrückgrat durch eine Interaktion mit dem IF durch dieses umhüllt wird. Wird nun die Seitenkette verkürzt, so kommt die reaktive Aminofunktion dieser Rückgratummantelung näher. Dadurch könnte die Funktionalität abgeschirmt werden, dies würde Seitenkettenacylierung erschweren, sodass, gegeben durch die gesenkte Wahrscheinlichkeit für  $N^\epsilon$ -Acylierung, der gesteigert *re*-Wert erklärt werden könnte. Unterstützt wird diese Annahme ebenfalls durch die beobachteten Reduktionen der Umsatzrate bei einer Verringerung der Länge der Seitenkette (siehe Anhang).

Es ist bekannt, dass beispielsweise in Diels-Alder Reaktionen Abschirmungseffekte in IFs auftreten können, die zu erhöhten Selektivitäten führen. Dies wurde bei

Reaktionen von Cyclopentadien<sup>165</sup> und Isopren<sup>166</sup> mit verschiedenen carbonylhaltigen Dienophilen in Phosphoniumtosylaten beobachtet. Hier führte eine Interaktion zwischen dem Carbonylsauerstoff und dem Phosphor des IFs zu einer Adduktbildung, welche den sterischen Anspruch der Carbonylfunktion deutlich steigerte und somit zur Bildung der sterisch bevorzugten Produkte führt. Eine analoge Abschirmung der verkürzten Seitenkettenfunktion durch das das Peptidrückgrat umgebende IF wäre folglich auch im Falle der Peptidacylierung vorstellbar.

### 6.1.7 Temperaturabhängigkeit der Peptidacylierung in ionischen Flüssigkeiten

Bei der Phloretylierung des H-GAKAY-OH, des Hexadecapeptides und des Parvulinfragments beeinflusst eine Temperaturerniedrigung von 30 °C auf 4 °C in Abhängigkeit von dem als Lösungsmittel verwendeten IF die beobachtete Regioselektivität. In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] verbesserte sich die Regioselektivität nach Absenkung der Temperatur bei der Acylierung der drei Peptide. Dies ist die zu erwartende Tendenz bei einer kinetisch kontrollierten Konkurrenzreaktion. Eine Temperaturerniedrigung senkt gemäß der Maxwell-Boltzmann-Verteilung die mittlere Energie der reaktiven Teilchen ab, so dass nun weniger Teilchen die notwendige Energie besitzen, um die Aktivierungsbarrieren der Acylierungsreaktion zu überwinden. Da es sich um eine exponentielle Verteilung handelt, wird bei einer kinetisch kontrollierten Konkurrenzreaktion das Verhältnis der Teilchen, welche die niedrigere Aktivierungsbarriere überwinden, zu denen, welche die höhere Barriere überwinden, günstiger. Daher wird bei geringerer Temperatur mehr von dem Produkt gebildet, welches über den energieärmeren Übergangszustand entsteht. Dieses ist im Falle des [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] offensichtlich das N<sup>α</sup>-acylierte Produkt. Das Regioselektivitätsverhalten in diesem IF entspricht somit nach dem beschriebenen Modell den Erwartungen.

Für Acylierung in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ist bei allen drei Modellpeptiden zu beobachten, dass sich die Regioselektivität bei Temperaturerniedrigung verschlechtert. Der deutlich negative *re*-Wert lässt darauf schließen, dass es sich bei dem seitenkettenmarkierten Produkt um das mit der geringeren Aktivierungsbarriere handelt. Trotzdem führt eine Temperaturerniedrigung nicht zu der erwarteten Verbesserung der Regioselektivität. Es ist vielmehr eine deutliche Verschlechterung

zu beobachten. Die oben beschriebene einfache Erklärung für den Temperatureffekt ist daher auf [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] nicht anwendbar. Untersuchungen des Einflusses von IFs auf den Übergangszustand und die Aktivierungsparameter von Peptidacylierungsreaktionen konnten eine Erklärung für den beobachteten Temperatureffekt liefern. Diese Ergebnisse werden in 6.2.2 diskutiert.

### 6.1.8 pH-Abhängigkeit der Peptidacylierung in ionischen Flüssigkeiten

Eine Absenkung des pH-Wertes von 8,2 auf 7,5 führte bei allen untersuchten Peptiden und in allen Lösungsmitteln zu einer Erhöhung des *re*-Wertes. Es wurde somit anteilig mehr *N*-terminal markiertes Produkt generiert. Dieses ist nachvollziehbar, da sich die Aminofunktion der Lysinseitenkette und die des *N*-Terminus stark in ihrem p*K*<sub>a</sub>-Wert unterscheiden. Der Wert der *N*<sup>ε</sup>-Funktion ist deutlich höher als der des *N*-Terminus. Somit wird bei einer Absenkung des pH-Wertes das Verhältnis der deprotonierten und somit reaktiven Aminospezies zugunsten des *N*-Terminus verändert. Dies hat zur Folge, dass sich mit dem Verhältnis der reaktiven Funktionalitäten auch das Produktverhältnis in Richtung *N*<sup>α</sup>-Acylierung verschiebt. Dieses Verhalten ist das aus molekularen Lösungsmitteln bekannte<sup>167</sup>. Es war nicht zu erwarten, dass in IFs bei einer Absenkung des pH-Wertes grundsätzlich andere Ergebnisse als in molekularen Lösungsmitteln auftreten.

### 6.1.9 Regioselektivitätsverhalten bei Acylierungsreaktionen von Peptiden mit mehreren *N*<sup>ε</sup>-Funktionen in ionischen Flüssigkeiten

Die Acylierungen des *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68K), welches drei nukleophile Aminofunktionen aufweist, verlief in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] mit einer eindeutigen Tendenz zum *N*-Terminus. Bei der Phloretylierung waren 69% der entstehenden Produkte *N*<sup>α</sup>-acyliert, bei der Biotinylierung 70% und bei der Furoylierung 55%. Wenn man unter Vernachlässigung von Mehrfachmarkierungen aus diesen Daten *re*-Werte berechnet, so ergeben sich 0,53 für den Umsatz mit Phloretin-OSu, 0,18 für Fur-OSu und 0,47 für Biotin-OSu. Diese Werte sind sogar etwas besser als die des *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68A), welches nur zwei Aminofunktionen trägt. Die Tatsache, dass der *re*-Wert bei einer höheren Anzahl von Aminofunktionen höher ist, lässt sich dadurch erklären, dass in dieser Berechnung die Mehrfachacylierungen vollständig vernachlässigt werden. Der *N*<sup>α</sup>-dirigierende Effekt des [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

tritt demnach auch bei einer Verdoppelung der Anzahl von Seitenkettenfunktionen auf und ist in seiner Ausprägung fast unbeeinflusst.

Bei der Verwendung des seitenkettendirektierenden [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] stellte sich die Frage, ob dieses IF in der Lage ist zwischen den beiden N<sup>ε</sup>-Funktionalitäten zu differenzieren. Mit Phloretin-OSu wurde das K<sup>68</sup> zu 15% und das K<sup>87</sup> zu 28%, mit Fur-OSu zu 25% und 38% markiert. Die biotinylierten Produkte konnte nicht getrennt werden. Bei Phloretin-OSu und Fur-OSu war somit ein Unterschied von 13% zu beobachten, dieser ist aber deutlich weniger ausgeprägt als zwischen N<sup>α</sup> und N<sup>ε</sup>-Funktionen. Bezieht man noch mit ein, dass mit Phloretin-OSu 24% und mit Fur-OSu 15% aller Produkte sowohl an K<sup>68</sup> und K<sup>87</sup> markiert sind, verringert sich die Unterscheidbarkeit der Seitenkettenfunktionen weiter, sodass von einer Differenzierbarkeit nicht mehr gesprochen werden kann. Werden die Monoacylierungsprodukte der Seitenkette zusammengefasst und für die Berechnung von *re*-Werten verwendet, so ergeben sich für die Phloretylierung -0,65, für die Furoylierung -0,63 und für die Biotinylierung -0,89. Bezieht man die ausschließlich an der Seitenkette diacylierten Produkte noch in die *re*-Wertberechnung mit ein, so senkt sich der Wert für die Phloretylierung auf -0,76 und für die Furoylierung auf -0,73. Es ist bemerkenswert, dass diese *re*-Werte größer sind als die für das *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68A). Obwohl mehr Seitenkettenfunktionen vorhanden sind wird hier der N-Terminus etwas besser acyliert.

Wird nun die Anzahl der Aminofunktionen im *E.coli* Parvulin 10 64-92 (C68K, T74K, Q80K) auf fünf erhöht, so können theoretisch 31 verschiedene Produkte entstehen. Im [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ist weiterhin eine starke Tendenz zum N-Terminus zu beobachten. Bei der Phloretylierung sind 54% der entstehenden Produkte ausschließlich N<sup>α</sup>-acyliert. Das IF ist also in der Lage aus 31 Produkten ein einziges so stark zu bevorzugen, dass es zu 54% gebildet wird. Bei der Furoylierung traten noch 34% und bei der Biotinylierung 50% N-terminale Modifizierung auf. Diese Werte liegen deutlich über einem Wert von 3%, der einer Produktgleichverteilung entspräche. Der dirigierende Effekt des [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bleibt somit auch bei einer Erhöhung der Anzahl der Aminofunktionen vorhanden, er schwächt sich aber im Vergleich zu Systemen mit weniger Aminofunktionen ab.

Für das [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] liegen relativ wenig Daten vor, da die Modifizierungsprodukte selbst mit UPLC nur in einfach-N-terminal einfach-Seitenketten und mehrfach markierte Produkte aufgelöst werden konnten. Somit ist

eine Differenzierung der in diesem IF bevorzugten Seitenkettenprodukte nicht mehr möglich. *N*-terminale Reaktionen werden auch hier stark unterdrückt, es wurden bei Fur-OSu und Biotin-OSu keine ausschließlich *N*<sup>α</sup>-acylierten Produkte detektiert, mit Phloretin-OSu tritt in 3% der Fälle solch eine Markierung auf. Die *re*-Werte lägen somit bei -1 bzw. -0,86.

Insgesamt lässt sich sagen, dass der regioselektivitätsinduzierende Effekt von IFs auch bei Peptiden mit mehr als einer Lysinseitenkette auftritt. Die Auswirkungen mehrerer Funktionalitäten lassen sich besser bei [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] als bei [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] beobachten, weil sich hier das präferierte Produkt leichter chromatographisch analysieren lässt. Es lässt sich feststellen, dass je mehr Aminofunktionen auftreten, die Regioselektivität der Acylierung geringer wird.

## ***6.2. Physikochemischer Hintergrund der regioselektivitätsinduzierenden Wirkung von ionischen Flüssigkeiten in Peptidacylierungsreaktionen***

Die bisher diskutierten Sachverhalte bezogen sich auf das Acylierungsverhalten und waren eher deskriptiver Natur. Es wurde analysiert welche Effekte bei den Acylierungen auftraten. Es war teilweise möglich aus diesen Ergebnisse Schlüsse zu ziehen und erste Modelle wie die Interaktion des Peptidrückgrates mit den IF-Molekülen zu entwickeln. In diesem Abschnitt soll nun der Versuch unternommen werden die Experimente, welche den gefundenen regioselektivitätsinduzierenden Effekt von IFs nicht nur beschreiben sondern ihn zu erklären helfen, zu diskutieren.

### **6.2.1 pK<sub>a</sub>-Werte von Aminofunktionen in ionischen Flüssigkeiten**

Bei Aminofunktionen handelt es sich um protonierbare Gruppen. Die Nukleophilie der protonierten Ammoniumspezies ist wesentlich geringer als die der nicht protonierten Aminofunktion, wodurch folglich die protonierte Form nicht als Nukleophil agieren kann. Sie nimmt demnach nicht an Peptidacylierungsreaktionen, welche nach einem Additions-Eliminierungsmechanismus verlaufen, teil. Gemäß der Henderson-Hasselbalch-Gleichung<sup>167</sup> ist der Protonierungsgrad eines Säure-Basepaares bei einem gegebenen pH-Wert von dem pK<sub>a</sub>-Wert der korrespondierenden Säurefunktion abhängig. Durch Beeinflussung des pK<sub>a</sub>-Wertes kann die Konzentration der nukleophilen und somit reaktiven Aminofunktionen alteriert werden. Eine selektive Variierung der pK<sub>a</sub>-Werte der *N*<sup>α</sup>- und der *N*<sup>ε</sup>-

Aminofunktion durch IFs, würde folglich auch das Verhältnis an reaktiven *N*-terminalen und Seitenkettenfunktionalitäten beeinflussen. Ein derartiger IF-spezifischer Effekt könnte somit den beobachteten Regioselektivitätseffekt erklären. Die Ergebnisse der  $pK_a$ -Titration von Serinamid, Valinamid, H-MAK(Ac)AY-OH und Ac-MAKAY-OH in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] mittels FT-IR-Spektroskopie zeigten, dass die  $pK_a$ -Werte von peptidischen Aminofunktionen in IFs generell zu höheren Werten verschoben wurden. Bei einem konstanten pH-Wert liegt daher in den untersuchten IFs eine höhere Konzentration an der nichtreaktiven Ammoniumspezies vor als im rein wässrigen System. Dies erklärt die im Vergleich zum IF-freien System beobachteten Reduktionen der Umsatzrate der Peptide in IF-haltigen Reaktionsmedien. Liegt weniger nukleophile Aminokomponente vor, so ist zudem die Hydrolyse des Aktivesters als Konkurrenzreaktion bevorzugt. Es ist weiterhin festzustellen, dass [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die  $pK_a$ -Werte von *N*<sup>α</sup>- und *N*<sup>ε</sup>-Aminofunktionen in unterschiedlich starkem Ausmaß verschieben. Die *N*<sup>α</sup>-Funktion von Ser-NH<sub>2</sub> wird in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] auf einen  $pK_a$ -Wert von 7,69 verschoben während selbige in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] einen Wert von 7,89 erreicht. Im erstgenannten *N*-terminal dirigierenden IF ist der  $pK_a$ -Wert somit geringer als im Seitenketten-präferierenden. Als Folge liegt in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei einem definierten pH-Wert eine höhere Konzentration an deprotonierte und daher reaktive *N*<sup>α</sup>-Funktionen vor als in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Dieser Sachverhalt ist auch bei den anderen untersuchten *N*-terminalen Funktionen von Aminosäureamiden und Peptiden zu beobachten. Für Valinamid wird in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ein  $pK_a$ -Wert von 8,37 und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] von 8,44 festgestellt. In H-MAK(Ac)AY-OH tritt eine noch deutlichere Differenz von 0,36 auf. Alle untersuchten  $pK_a$ -Werte von *N*<sup>α</sup>-Aminospezies sind in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] größer als in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Die Untersuchungen zum Einfluss der beiden IFs auf den  $pK_a$ -Wert der *N*<sup>ε</sup>-Aminofunktionen zeigten einen inversen Trend. In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wurde für Ac-MAKAY-OH ein  $pK_a$ -Wert von 11,16 ermittelt während der Wert in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei nur 10,79 lag. Die Differenz von -0,37 weist im Vergleich zu den vorher besprochenen in die entgegengesetzte Richtung. Die Aminofunktion der Seitenkette ist bei einem konstanten pH-Wert in dem seitenkettenbevorzugenden [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] häufiger deprotoniert als in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Im *N*<sup>α</sup>-dirigierendem [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ist somit im Vergleich zum [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] der  $pK_a$ -Wert des *N*-Terminus zu geringeren und der der Seitenkette zu höheren Werten verschoben,

während für [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] exakt das Gegenteil gilt. Der pK<sub>a</sub>-Wert einer in einem IF präferierten Aminofunktion ist im Vergleich zu dem Wert dieser Aminofunktion in einem anderen nicht bevorzugenden IF abgesenkt. Das derart verbesserte stöchiometrische Verhältnis der reaktiven funktionellen Gruppen zueinander erklärt somit den regioselektivitätsinduzierenden Effekt von IFs in Peptidacylierungsreaktionen. Da aber der pK<sub>a</sub>-Wert der Seitenkettenfunktion auch im [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] noch immer über dem der N<sup>α</sup>-Funktion liegt und in diesem IF trotzdem eine klare Tendenz zur N<sup>ε</sup>-Acylierung auftritt, kann die Verschiebung der pK<sub>a</sub>-Werte nicht der alleinige Auslöser des Effektes sein. Es muss neben diesem somit noch andere Ursachen geben.

Neben den Auswirkungen auf die Regioselektivität ist ebenso zu diskutieren auf welche Ursachen die beobachtete pK<sub>a</sub>-Wert-Verschiebung zurückzuführen ist. Von klassischen anorganischen Salzen ist bekannt, dass diese Einfluss auf den pK<sub>a</sub>-Wert von protonierbaren Gruppen nehmen können. Aus der Debye-Hückel-Theorie<sup>168</sup> ergibt sich, dass in verdünnten, wässrigen Salzlösungen die Ionenstärke der Lösung den mittleren Aktivitätskoeffizienten von gelösten Teilchen beeinflusst. Mathematisch wird dieser Zusammenhang durch das Debye-Hückelsche Grenzgesetz beschrieben<sup>169</sup>. In Gleichung 6.1 ist dieses mit  $f_{\pm}$  als mittleren Aktivitätskoeffizienten,  $z$  als Ladungszahl und  $I$  als Ionenstärke dargestellt. Der Faktor  $A$  ist in Gleichung 6.2 mit  $k_B$  als Boltzmannkonstante,  $\epsilon$  als relative Dielektrizitätskonstante,  $\epsilon_0$  als Dielektrizitätskonstante des Vakuums,  $e$  als Elementarladung,  $T$  als Temperatur und  $N_A$  als Avogadro-Konstante beschrieben.

$$\text{Gleichung 6.1} \quad \log f_{\pm} = -A|z_+z_-|\sqrt{I}$$

$$\text{Gleichung 6.2} \quad A = \frac{1}{2} \left( \frac{e_0^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon k_B T} \right)^{\frac{3}{2}} \sqrt{8000\pi N_A}$$

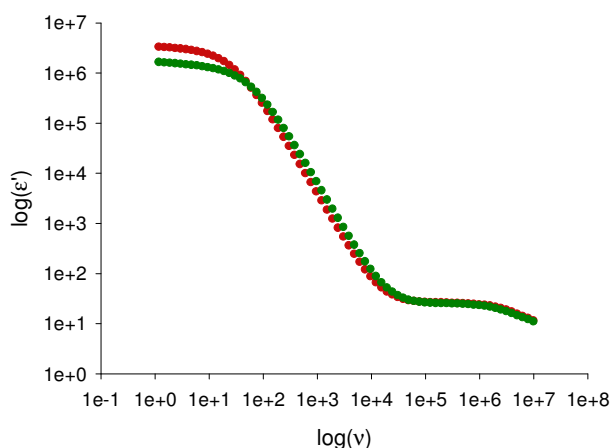
Wird das Grenzgesetz auf das Protonierungsgleichgewicht angewandt, so ergibt sich der sekundäre kinetische Salzeffekt<sup>169</sup>. Dieser ist in Gleichung 6.3 mit  $K_C$  als theoretische konzentrationsbasierte Gleichgewichtskonstante und  $K_A$  als beobachtbare, aktivitätsbasierte Gleichgewichtskonstante dargestellt.

$$\text{Gleichung 6.3} \quad \log K_C = \log K_A + 2A\sqrt{I}$$

Eine hohe Ionenstärke  $I$  und ein hoher Faktor  $A$  reduzieren demnach den beobachtbaren  $K_A$ -Wert bzw. erhöhen den  $pK_a$ -Wert. Eine Erhöhung des  $pK_a$ -Wertes konnte auch bei den Experimenten in IFs festgestellt werden. Die allgemeine Erhöhung der  $pK_a$ -Werte in IFs entspricht folglich nach der Debye-Hückeltheorie den Erwartungen und scheint auf die hohe Ionenstärke der IFs zurückzuführen zu sein. Die Ionenstärke (siehe Gleichung 6.4) von  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  und  $[\text{EMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  ist gegeben durch die Ladungszahl der die IFs konstituierenden Ionen und der gleichen Dichte dieser IFs annähernd identisch. Daher kann diese nicht die unterschiedlichen Verschiebungen der  $N^\alpha$ - und  $N^\epsilon$ -Aminofunktion in den untersuchten IFs erklären.

Gleichung 6.4 
$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

Eine weitere Variable in Gleichung in Gleichung 6.1 ist der Faktor  $A$ . Dieser wird durch die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  und die Temperatur bestimmt. Die Messung der Dielektrizitätskonstanten von  $[\text{EMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  und  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  unter den Bedingungen der  $pK_a$ -Titration führte zu Werten von 25 und 26. Die dielektrischen Funktionen der IFs ähneln sich folglich ebenso. Dies ist in Abbildung 6.6 exemplarisch für 240 K dargestellt.



**Abbildung 6.6** Dielektrische Funktion von  $[\text{EMIM}][\text{Me}_2\text{PO}_4]$  (rot) und  $[\text{EMIM}][\text{Et}_2\text{PO}_4]$  (grün) bei 240 K

Der hochfrequente Bereich beider dielektrischer Funktionen ist nahezu identisch. Lediglich im niederfrequenten Bereich sind geringe Abweichungen zu beobachten. Diese sind jedoch auf eine unterschiedliche Elektrodenpolarization und verschiedene Leitfähigkeiten der untersuchten IFs zurückzuführen und sind ohne Auswirkung auf



die Dielektrizitätskonstante<sup>170,171</sup>. Stattdessen ermöglichen diese Rückschlüsse auf Ladungs- und Massetransportmechanismen in IFs. Momentan ist aber kein Zusammenhang zwischen diesen Transportmechanismen und  $pK_a$ -Wertverschiebungen ersichtlich. Zudem sind die dielektrischen Eigenschaften der untersuchten IFs insgesamt zu ähnlich um als Ursache für die beobachteten Effekte zu gelten. Demnach scheint wahrscheinlich, dass es in IFs andere Ursachen für die Beeinflussung des Protonierungsgleichgewichtes der Aminofunktionen existieren als die aus anorganischen Salzlösungen bekannten.

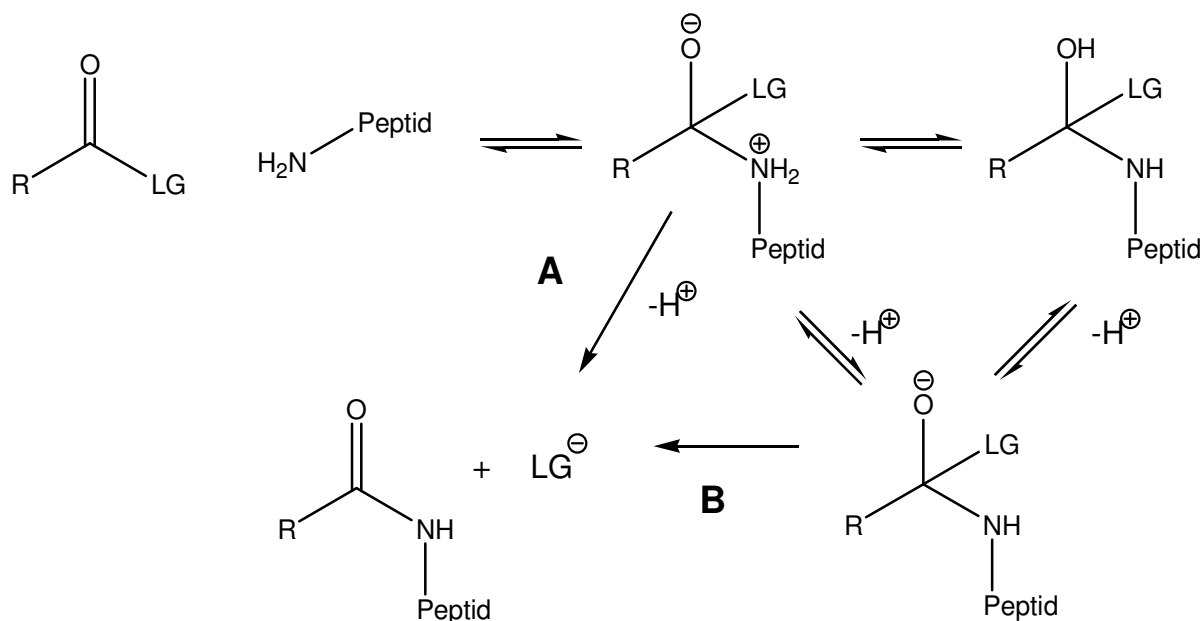
Bezüglich der generellen Anwendbarkeit der Debye-Hückel-Theorie muss jedoch erwähnt werden, dass ihr einige vereinfachende Modellvorstellungen zugrunde liegen. So werden Ionen als Punktladungen behandelt und es wird angenommen Coulombinteraktionen seien die einzigen auftretenden Kräfte. Weiterhin gilt diese Theorie streng nur für verdünnte Salzlösungen. Die genannten Annahmen treffen jedoch auf 80% IF-Lösung nicht zu. Daher war nicht zwangsläufig zu erwarten, dass die aus der Chemie anorganischer Salze abgeleitete Theorie des sekundären kinetischen Salzeffektes auf IFs direkt übertragbar ist. Trotzdem sind zwei Tendenzen zu erkennen: eine hohe Ionenstärke führt zu einer Erhöhung des  $pK_a$ -Wertes der Aminofunktionen und die relative Dielektrizitätskonstante scheint keinen Einfluss auf die unterschiedliche Verschiebung der  $N^\alpha$ - und  $N^\epsilon$ -Funktionen in verschiedenen IFs zu haben.

### 6.2.2 Aktivierungsparameter von Peptidacylierungsreaktionen

Wie im Abschnitt 6.2.1 gezeigt wurde, haben IFs Einfluss auf den  $pK_a$ -Wert von Aminofunktionen. Weitere Größen, die von IFs verändert werden, sind die Aktivierungsparameter der Peptidacylierungsreaktion, die das Verhalten des Übergangszustandes beschreiben. Über die Acylierung von Aminen wurden umfangreiche mechanistische Studien in molekularen Lösungsmitteln durchgeführt<sup>172,173</sup>. In Abbildung 6.7 ist ihr allgemeiner Reaktionsweg dargestellt.

Ob die Eliminierung der Abgangsgruppe direkt aus der zwitterionischen Spezies erfolgt, hängt von der Güte der Gruppe ab. Gute Abgangsgruppen eliminieren direkt (Weg A), schlechte über das anionische Zwischenprodukt (Weg B)<sup>172</sup>. Bei der Reaktion über Weg A ist die Bildung des Zwitterions der geschwindigkeitsbestimmende Schritt<sup>173</sup>. Da es sich bei den für die Peptidacylierung

verwendeten Aktivestern um Reaktanden mit guten Abgangsgruppen handelt, ist von einer Reaktion über Weg A auszugehen.



**Abbildung 6.7** Reaktionsmechanismus der Acylierung von Peptiden in molekularen Lösungsmitteln mit Aktivestern; LG: *leaving group* (Abgangsgruppe), Succinimidyl; R: Acyldonorrest, Biotinyl, Furoyl, Phloretyl; A: Reaktionsweg für gute Abgangsgruppen; B: Reaktionsweg für schlechte Abgangsgruppen.

Das zwitterionische Produkt steht gemäß des Mechanismus im Gleichgewicht mit dem Edukt und da es sich bei seiner Bildung um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt handelt, ist die Aktivierungsbarriere für seine Bildung die Höchste im gesamten Reaktionsverlauf. Somit kann das zwitterionische Produkt als aktivierter Komplex angesehen und die Eyring-Theorie<sup>153</sup> angewendet werden. Dies gilt mit der Einschränkung, dass sich der Reaktionsmechanismus in IFs nicht von denen in molekularen Lösungsmitteln unterscheidet. Leider existieren noch keine Untersuchungen zu diesem Thema, sodass die weiteren Ausführungen auf der Annahme beruhen, dass der Mechanismus unverändert bleibt.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die freie Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger$  bei 303,15 K für die N<sup>α</sup>-Biotinylierung eines Pentapeptides um 4,9 kJ/mol niedriger als die für eine N<sup>ε</sup>-Markierung war. In [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] hingegen konnte festgestellt werden, dass  $\Delta G^\ddagger$  für die Seitenkettenreaktion im Vergleich zur N-terminalen um 11,0 kJ/mol niedriger war. Die Analyse des Einflusses von IFs auf den Übergangszustand ergibt also, dass die N<sup>α</sup>-Reaktion im [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] bei 303,15 K kinetisch bevorzugt wird, während im

[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die N<sup>ε</sup>-Reaktion die Präferierte ist. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der Peptidacylierungstudien, die einen dirigierenden Effekt des [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] zum N-Terminus und des [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] zur Seitenketten zeigten, überein. Berechnet man aus der Eyring-Gleichung die Geschwindigkeitskonstanten der N-terminalen und der Seitenkettenreaktion in dem jeweiligen IF bei 30 °C, so kann unter der Annahme einer kinetischen Kontrolle ein theoretischer *re*-Wert ermittelt werden. Dazu werden die Geschwindigkeitskonstanten ins Verhältnis zueinander gesetzt und angenommen, dass dieses Verhältnis dem Verhältnis der gebildeten Produkte der N<sup>α</sup>- und der N<sup>ε</sup>-Acylierung entspricht. Die Berechnung liefert für die Biotinylierung von H-GAKAY-OH den theoretischen *re*-Wert von -0,87 für [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und 0,75 für [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Die experimentell ermittelten Regioselektivitäten liegen mit -0,74 und 0,84 nahe bei diesen theoretischen Werten, sie scheinen folglich die Realität widerzuspiegeln. Die Beeinflussung des Übergangszustandes ist demnach eine weitere Ursache für die regioselektivitätsinduzierende Wirkung von IFs in Peptidacylierungsreaktionen.

Weiterhin ist festzustellen, dass sich nicht nur die freie Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger$  sondern auch die Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  und die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$  der N<sup>α</sup>- und der N<sup>ε</sup>-Reaktion in beiden IFs deutlich voneinander unterscheiden.  $\Delta S^\ddagger$  wurde in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] mit -116 J/mol K für die N-terminale Reaktion und mit -189 J/mol K für die Seitenkettenreaktion bestimmt. Die Differenz ist mit 73 J/mol K drastisch. In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] hingegen konnte nur ein Unterschied von 2,6 J/mol K beobachtet werden. Der Übergangszustand der N<sup>α</sup>-Reaktion war auch in diesem IF mit -87 J/mol K der komplexere. Da die Peptidacylierung über einen Additions-Eliminierungsmechanismus verläuft, der eine Oxanionen-Spezies als energiereiches und instabiles Zwischenprodukt generiert, ist gemäß dem Hammond Postulat<sup>174</sup> davon auszugehen, dass der Übergangszustand diesem sehr ähnlich ist. Weil es sich bei diesem Übergangszustand um ein Oxanionen-Addukt handelt, ist eine klar negative Aktivierungsentropie zu erwarten. Die experimentellen Daten entsprechen somit den theoretischen Erwartungen.

Für die Aktivierungsenthalpie ist mit 15,4 kJ/mol in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] im Vergleich zu 5,7 kJ/mol in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die größere Differenz zu beobachten. Die Werte sind hingegen in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] größer. Gegeben durch die sehr geringen Werte für  $\Delta S^\ddagger$  wird die freie Aktivierungsenthalpie in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] hauptsächlich durch den

entropischen Term bestimmt. Obwohl für die *N*-terminale Reaktion mit 15,8 kJ/mol eine deutlich geringerer  $\Delta H^\ddagger$ -Wert als für die Seitenkettenreaktion bestimmt wurde, wird diese Differenz von der Aktivierungsentropie überkompensiert und eine Seitenkettenreaktion bevorzugt. In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] hingegen sind die Abweichungen in  $\Delta S^\ddagger$  gering, dadurch wird  $\Delta G^\ddagger$  wesentlich von  $\Delta H^\ddagger$  definiert. Diese hier beschriebene Differenz in den Aktivierungsparameter erklärt auch die unter 5.2.9 beschriebene Temperaturabhängigkeit der Pentapeptidacylierung in IFs. Während in [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] eine Temperaturenniedrigung von 30 °C auf 4 °C zur Folge hatte, dass sich bei verschiedenen Acylakzeptoren die *re*-Werte verbesserten, war in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] das Gegenteil zu beobachten. Betrachtet man nun die Aktivierungsparameter, so ist festzustellen, dass sich für das [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die Differenzen der  $\Delta G^\ddagger$ -Werte der Seitenkette und des *N*-Terminus bei einer Temperaturenniedrigung leicht vergrößern. Im [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ist durch den starken entropischen Term eine wesentlich größere Temperaturabhängigkeit<sup>175</sup> zu beobachten. Sie führt dazu, dass bei einer Herabsenkung der Temperatur um 26 °C die  $\Delta\Delta G^\ddagger$ -Werte geringer werden. Bei 30 °C ergibt sich ein  $\Delta\Delta G^\ddagger$  von 6,7 kJ/mol, bei 4 °C sind es hingegen nur 4,8 kJ/mol. Die kinetische Bevorzugung der Seitenkette reduziert sich bei sinkender Temperatur, wodurch sich die geringere Regioselektivität bei 4 °C im Vergleich zu 30 °C erklären lässt.

Der Sachverhalt, dass IFs teilweise drastischen Einfluss auf die Aktivierungsparameter von Reaktionen nehmen können, ist aus der Literatur bekannt. Anhand der Reaktion von Methyl-*p*-nitrobenzensulfonat mit anionischen Nucleophilen in molekularen Lösungsmitteln und IFs wurde der Lösungsmiteleinfluss auf die Aktivierungsparameter dieser Umsetzung untersucht<sup>176</sup>. Die Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  war auch in diesem Beispiel stark vom verwendeten Lösungsmittel abhängig. Von IF zu IF waren Änderung bis zu einem Faktor von sechs zu finden, ebenso wurde  $\Delta G^\ddagger$  beeinflusst. Ein weiteres Beispiel ist die Umlagerung von 3-Benzoyl-5-phenyl-1,2,4-oxadiazol zu 4-Benzoylamino-2,5-diphenyl-1,2,3-triazol durch eine intramolekulare S<sub>N</sub>2-Reaktion. Die Aktivierungsparameter dieser Reaktion unterschieden sich stark wenn sie in Acetonitril<sup>177</sup> oder in [BMIM][BF<sub>4</sub>]<sup>178</sup> ermittelt wurden. Eine DFT-Untersuchung dieser Reaktion konnte zeigen, dass schon die Interaktion von einem IF-Ionenpaar mit dem Oxadiazol die freie Aktivierungsenthalpie im Vergleich zum Vakuum um 27% absenken kann<sup>179</sup>. Dies wird wesentlich durch eine Erhöhung von  $\Delta S^\ddagger$  um 50%

verursacht. Die deutlichen Unterschiede in  $\Delta S^\ddagger$ , die für die Peptidacylierungsreaktion in IFs gefunden wurden, sind also keine Einzelfälle.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die experimentell gefundenen Regioselektivitäten in den durch Eyring-Auftragung ermittelten Aktivierungsparametern gut wieder finden lassen. Es ist sogar möglich die bisher nicht verständliche Temperaturabhängigkeit der Peptidacylierungsreaktion zu verstehen. Die Beeinflussung des Übergangszustandes ist demnach ein weiterer Parameter zu Erklärung des regioselektivitätsinduzierende Effektes der IFs.

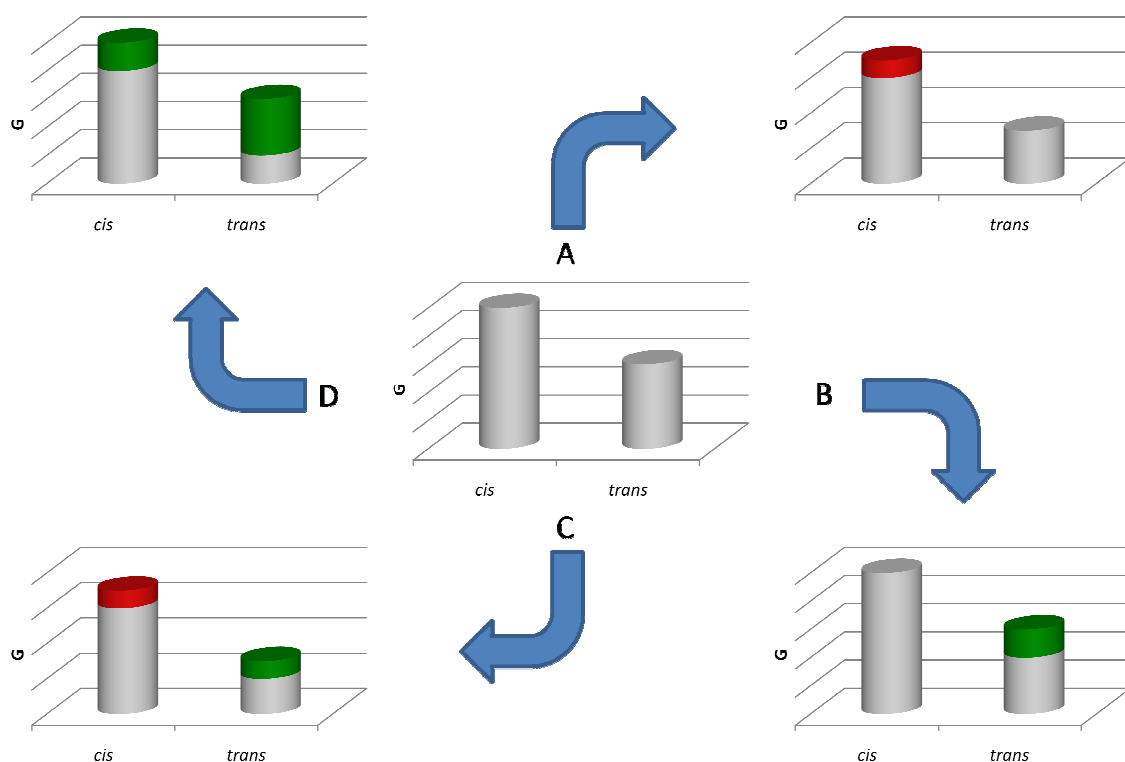
### 6.2.3 *cis/trans*-Verhältnis von Peptidylprolylbindungen in ionischen Flüssigkeiten

In den Abschnitten 6.1.5 und 6.1.6 wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine direkte Interaktion zwischen IF und Peptid ursächlich für die beobachtete, gesteigerte Regioselektivität in Peptidacylierungsreaktionen sein könnte. Notwendig für die Überprüfung dieser These ist es daher eine derartige Wechselwirkung nachzuweisen. Hierfür wurden Peptidylprolylbindungen als Sondensystem verwendet. Das *cis/trans*-Verhältnis der Konformere prolinhaltiger Peptide ist neben anderen Faktoren wie der Temperatur oder der Peptidsequenz von dem die Peptidylprolylbindung umgebenden Medium abhängig<sup>180</sup>. Unter ansonst konstanten Bedingungen lässt sich somit das *cis/trans*-Verhältnis der Peptidylprolylbindungen zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Peptid und Medium nutzen.

Untersuchungen an sechs verschiedenen Tetrapeptiden der Sequenz Suc-A-Xaa-PF-pNA zeigten, dass IFs einen signifikanten Einfluss auf das *cis/trans*-Verhältnis haben. Der *cis*-Gehalt wurde in nahezu allen Fällen im Vergleich zu einem wässrigen Puffersystem deutlich gesenkt. Die IFs verringerten folglich den Anteil des thermodynamisch ungünstigen *cis*-Konformers. Die Differenz der  $\Delta G$ -Werte im Vergleich zum wässrigen System lag bei bis zu 4,1 kJ/mol. Aufgrund der Größe dieser Werte kann von einer signifikanten Wechselwirkung zwischen Peptid und IF ausgegangen werden. In der Literatur finden sich weder Daten über die Auswirkungen von IFs auf die Konformation von Peptiden noch über deren Einfluss auf das *cis/trans*-Gleichgewicht von Peptidylprolylbindungen im Speziellen. Die durchgeführten Untersuchungen sind daher die Ersten, die den Einfluss von IFs auf das *cis/trans*-Verhältnis von Konformeren prolinhaltiger Peptide beschreiben. Darüber hinaus ist durch die Verwendung von Peptidylprolylbindungen als

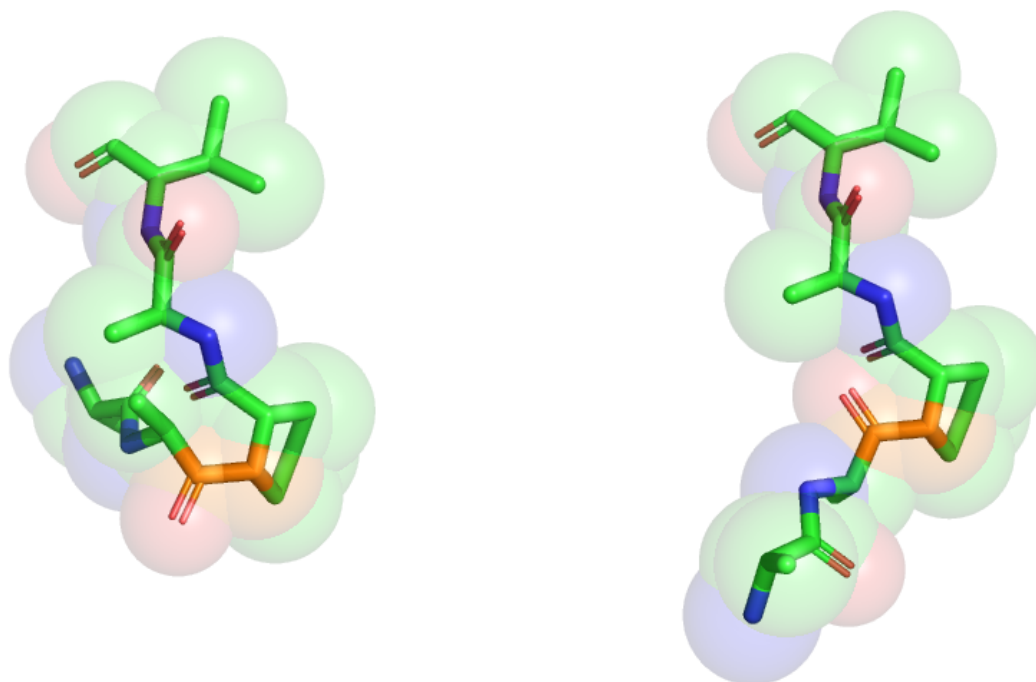
Sondensystem erstmalig ein direkter Nachweis von Peptid-IF-Interaktionen gelungen.

Fraglich ist, was der Auslöser für die gefundene Verringerung des *cis*-Anteils im Gleichgewicht ist. Prinzipiell ergeben sich vier in Abbildung 6.8 dargestellte Möglichkeiten, wie IFs Einfluss auf das *cis/trans*-Verhältnis nehmen könnten. Zum einen könnte die Interaktion mit dem IF dazu führen, dass sich die freie Enthalpie des *cis*-Konformers erhöht (A). Weiterhin könnte auch der G-Wert der *trans*-Form sich verringern (B) oder die freie Enthalpie des *cis*-Peptides wächst an während G der *trans*-Spezies sich absenkt (C). Die vierte Möglichkeit wäre sowohl eine Absenkung der freien Enthalpie der *cis*- als auch der *trans*-Form, wobei die Verringerung der Energie der *cis*-Spezies geringer wäre. Alle vier Varianten würden zu einer Vergrößerung von  $\Delta G$  führen und somit das Gleichgewicht auf die Seite des *trans*-Konformers verschieben.



**Abbildung 6.8** Mögliche Ursachen für die erhöhte Differenz der freien Enthalpie des *cis/trans*-Gleichgewichtes von Peptidylprolylbindungen in IFs, A: G des *cis*-Konformers erhöht sich, B: G des *trans*-Konformers erniedrigt sich, C: G des *cis*-Konformers erhöht sich und G des *trans*-Konformers senkt sich ab, D: G des *cis*- als auch des *trans*-Konformers senken sich ab.

In Abschnitt 6.1.6 wurde angesichts der Tatsache, dass eine Verkürzung der Seitenkette zu einer bevorzugten Acylierung des *N*-Terminus führt, die Hypothese aufgestellt, dass IFs das Peptidrückgrat ummanteln. Diese Vorstellung könnte auch die Reduzierung des *cis*-Gehaltes von Prolylbindungen in IFs erklären helfen. Schließlich würde eine derartige Umhüllung den sterischen Anspruch des Peptides erhöhen. Durch die *cis*-Stellung der Doppelbindung kommen sich der C- und der *N*-terminale Rest des Peptides sehr nahe (siehe Abbildung 6.9, aus Gründen der Übersichtlichkeit für das Peptid H-AAPAV-OH dargestellt). Das *cis*-Konformer wäre somit durch die Ummantelung noch stärker sterisch gehindert als es durch die ungünstige Substituentenanordnung ohnehin schon der Fall ist. Die Folge dieser Erhöhung der freien Enthalpie der *cis*-Form wäre, dass mehr von der energetisch günstigeren *trans*-Spezies im IF vorliegend. Diese Hypothese würde mit den erhaltenen Ergebnissen übereinstimmen.



**Abbildung 6.9** Das prolinhaltige Peptid H-AAPAV-OH in seiner sterisch anspruchsvolleren *cis*-Form (links) und in seiner energetisch günstigeren *trans* Form (rechts)

Weiterhin ist die Oberfläche des Peptides in *cis*-Form geringer als in *trans*-Form. Folglich können weniger IF-Moleküle mit dem Peptid interagieren, wenn es in der *cis*-Form vorliegt. Diese Verringerung der Anzahl der Interaktionspartner könnte ebenso wie der gesteigerte sterische Anspruch zu der Bevorzugung der *trans*-Spezies beitragen.

Berechnet man die Standardabweichung der  $\Delta\Delta G_{\text{HEPES}}$ -Werte eines Peptides in verschiedenen IFs, so erhält man Werte zwischen 117 und 341 J/mol. Die Abweichung der freien Enthalpie verschiedener Peptide in einem IF führt zu Werten zwischen 824 und 1265 J/mol. Die Sequenz beeinflusst also stärker als das IF wie stark die Interaktion ist. Dies steht im Widerspruch zu den bei den Acylierungsstudien gemachten Beobachtungen. Bei denen ergab sich, dass der Einfluss der IFs auf die Regioselektivität größer war als der der Peptidsequenz. Weiterhin ist festzustellen, dass die beiden IFs [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] mit allen untersuchten Tetrapeptiden sehr ähnliche  $\Delta\Delta G_{\text{HEPES}}$ -Werte zeigten, sie sind eindeutig von den Untersuchten die IFs mit dem ähnlichsten Einfluss auf das *cis/trans*-Verhältnis von Peptidylprolylbindungen. In den Acylierungsstudien hingegen waren gerade dimethylphosphat- bzw. diethylphosphathaltige IFs diejenigen, welche die größten Differenzen in den *re*-Werten erzeugten. Dieses lässt annehmen, dass kein direkter Zusammenhang zwischen dem Betrag der Differenzen der freien Enthalpien der *cis/trans*-Konformere und der Regioselektivität von Acylierungsreaktionen existiert. In den Experimenten mit C2-methylierten IFs wurde festgestellt, dass die IF-Kationen mit Peptiden wechselwirken. Wurde durch Methylierung der C2-Position des Imidazolium-Kations eine potentielle Peptid-IF-Interaktionsstelle entfernt, so ging die Regioselektivität zurück, unabhängig ob N<sup>α</sup>- oder N<sup>ε</sup>-Acylierung mehrheitlich auftrat. Diese kationenvermittelte Interaktion ist somit notwendig für eine regioselektivitätsinduzierende Wirkung, gibt aber keine Anhaltspunkte, ob N<sup>α</sup>- oder N<sup>ε</sup>-Modifizierung auftritt. Möglicherweise ist diese für die regioselektivitätsinduzierende Wirkung von IFs notwendige Peptid-IF-Interaktion die durch *cis/trans*-Isomerisierung beobachtete. Für die Verifizierung dieser These wäre die Bestimmung des *cis/trans*-Gleichgewichtes der Peptidylprolylbindung in C2-methylierten IFs notwendig. Dies war aber nicht möglich, da diese IFs bei Raumtemperatur fest sind und daher kein Lösungsmittelsprungexperiment aus reinem IF durchgeführt werden konnte.

Die Tatsache, dass Lösungsmittel Einfluss auf das *cis/trans*-Gleichgewicht von Peptidylprolylbindungen nehmen können, ist ein aus der Literatur bekannter Sachverhalt<sup>154</sup>. Für das Tetrapeptid Suc-AAPF-pNA wurde in Wasser, THF und TFE ein *cis*-Gehalt von 10% bestimmt. Nach Zugabe von LiCl erhöhte sich dieser in THF auf 40% und in TFE auf 70%<sup>155</sup>. Die molekulare Ursache für diese signifikante



Veränderung konnte noch nicht bestimmt werden. Am Beispiel des Cyclosporin A konnte jedoch durch NMR-Untersuchungen gezeigt werden, dass Interaktionen zwischen LiCl und dem Peptidrückgrat zu einer deutlichen Strukturänderung des Cyclopeptides führen<sup>181</sup>. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch die Steigerung des *cis*-Anteiles im zuvor genannten Tetrapeptid auf solche eine Wechselwirkung zurückzuführen ist.

Die in molekularen Lösungsmitteln beobachtete drastische Veränderung des *cis/trans*-Gleichgewichtes durch die Zugabe von LiCl konnte in IFs nicht festgestellt werden. In diesen erhöhte sich der *cis*-Gehalt in Abhängigkeit von der untersuchten Sequenz lediglich um maximal 2%. Da die Auslenkung des *cis/trans*-Gleichgewichtes durch IFs nicht sensitiv auf LiCl ist, scheint sie somit über einen anderen Mechanismus zu erfolgen als die bekannte Verschiebung durch LiCl/TFE.

Weiterhin auffällig ist das Verhalten von Glycylprolylbindungen in dialkylphosphathaltigen IFs. Hier erhöht sich im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Peptiden der Anteil des *cis*-Konformers. Nach Zugabe von LiCl führt zu einer leichten Erhöhung des *cis*-Gehaltes wie bei den anderen untersuchten Peptiden auch. Es bleibt unklar was die Ursache für dieses abweichende Verhalten ist. Es macht aber diese IFs interessant für andere Anwendungen, die auf eine Auslenkung des *cis/trans*-Gleichgewichtes wie z.B. die Quantifizierung der Enzymaktivität von Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen angewiesen sind. Gerade bei Glycylprolylbindungen ist es nicht möglich wie bei diesen Untersuchungen ansonsten üblich das Gleichgewicht mit LiCl/TFE auszulenken<sup>182</sup>.

#### 6.2.4 <sup>1</sup>H-HR-NMR-Untersuchung zur Peptid-IF Interaktion

Die Frage, ob eine direkte Interaktion zwischen IFs und Peptiden stattfindet, ist durch die unter 6.2.3 aufgeführten Experimente beantwortet. Wichtig ist es nun weitere Informationen über die Art dieser Interaktion zu gewinnen. Hierfür wurden <sup>1</sup>H-HR-NMR-Studien mit IFs und Peptiden durchgeführt, um den Einfluss von Peptiden auf die <sup>1</sup>H-chemische Verschiebung  $\delta$  von IFs zu untersuchen. Es waren deutliche Änderungen festzustellen, wenn man die <sup>1</sup>H-Spektren von [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] mit und ohne Zugabe von Peptiden miteinander vergleicht. Es ist bemerkenswert, dass ein Peptid mit einer Konzentration von 50 mg/ml, was circa 0,05 mol/l entspricht, die chemische Verschiebung von einer Komponente verändern kann, die eine Konzentration von 4

mol/l aufweist. Das IF ist in einem 80fachen Überschuss eingesetzt und wird trotzdem von dem geringer konzentriertem Peptid signifikant in seiner chemischen Verschiebung verändert. Diese Beobachtung stimmt mit der Feststellung, dass bei der Konzentrationsabhängigkeit des regioselektivitätsinduzierendem IF-Effektes (siehe 6.1.4) auch eine Verstärkung schon großer Überschüsse an IF noch zu einer weiteren Verbesserung der *re*-Werte führten, überein. Ebenso ist nun hier festzustellen, dass ein deutlicher Unterschuss an Peptid das elektronische Verhalten des IFs verändert.

Weiterhin ist interessant, dass die Peptidzugabe zu den IFs bei unterschiedlichen IF zu verschiedenen Effekten führt. Während bei [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] eine Peptidzugabe zu einer Hochfeldverschiebung führte, konnte bei [BMIM][SCN] fast kein Einfluss und bei [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] eine Tieffeldverschiebung festgestellt werden. Dabei war es unerheblich, ob als Peptid H-SAKAY-OH oder H-GAKAY-OH zugegeben wurde. Eine Veränderung der chemischen Verschiebung eines Protons geht einher mit einer Veränderung der Elektronendichte an diesem Zentrum. Bei einer Tieffeldverschiebung wird die Elektronendichte geringer, während sie bei einer Hochfeldverschiebung erhöht wird. Es ist also festzuhalten, dass in dem seitenkettendirektierenden [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die Elektronendichte im Imidazoliumring und besonders am C2-Proton gesenkt ist, während sie im N-terminal direktierenden [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] erhöht ist. Das [BMIM][SCN], welches einen nur geringen Einfluss auf die Regioselektivität hat, zeigt praktisch keine Verschiebung. Dieses diametrale Verhalten bei der Elektronendichte legt eine Verbindung der Elektronendichte und der regioselektivitätsinduzierenden Wirkung von IFs nahe.

Fraglich ist, wie die Peptid-IF-Interaktion zu einer Veränderung der Elektronendichte führen kann. Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptid und dem IF wäre eine mögliche Erklärung. Zur Überprüfung dieser Behauptung müssten auch die NMR-Signale des Peptides untersucht werden. Eventuell ließen sich so die Interaktionsstellen des Peptides identifizieren. Leider konnten diese Untersuchungen noch nicht durchgeführt werden, da die von der Firma Bruker uns zu Verfügung gestellte Messzeit aufgebraucht war und die Messungen mit der NMR-Technik, die in Halle zur Verfügung steht, leider nicht möglich waren.

Interessant ist in diesem Zusammenhang weiterhin, dass sich die IFs, welche nach Peptidzugabe so unterschiedliche Verschiebungen in ihren Kationen zeigen, im

Prinzip sich nur in ihrem Anion unterscheiden. Zwar variiert die Länge der Alkylkette des Kations, aber es konnte in den Acylierungsstudien mit [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] gezeigt werden, dass sich diese IFs sehr stark in ihren Eigenschaften ähnelten. Gleiches gilt auch für [BMIM][SCN] und [EMIM][SCN]. Die Acylierungsdaten von [EMIM][SCN] wurden aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu [BMIM][SCN] in dieser Arbeit nicht vorgestellt. Der Hauptunterschied liegt in den Anionen der IFs. Die chemischen Verschiebungen dieser werden durch die Peptidzugabe aber kaum verändert, während sich die chemische Verschiebung der strukturell sehr ähnlichen Kationen durch Peptidzugabe stark beeinflusst wird. Die Anionen scheinen daher das unterschiedliche Verhalten der Kationen zu bestimmen.

Von der Beeinflussung der chemischen Verschiebung sind nicht alle Protonen der IFs gleichermaßen betroffen. Die Veränderung der Alkylprotonen der Kationen und der Anionen sind nur marginal verschoben. Deutlich hingegen fällt die Änderung bei den aromatischen Protonen des Imidazoliumringes aus. Besonders stark verschiebt sich dabei das C2-Proton. Dies ist von besonderer Wichtigkeit, da in den Experimenten mit C2-methylierten IFs (siehe 6.1.5) gezeigt werden konnte, dass dieses Proton von hoher Bedeutung für die Entwicklung des Regioselektivitätseffektes ist. Genau dieses Proton, dessen Verlust zu einer drastischen Reduktion der Regioselektivität in dialkylphosphathaltigen IFs führte, zeigt also deutliche Interaktionen mit Peptiden. Dieser Sachverhalt verknüpft Peptid-IF-Interaktionen direkt mit der regioselektivitätsinduzierenden Wirkung in Acylierungsreaktionen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass imidazoliumbasierte IFs, wenn sie eine N<sup>α</sup>-Acylierung von Peptiden bevorzugen durch Wechselwirkung mit einem Peptid erhöhte Elektronendichte im Imidazoliumring, besonders am C2-Proton zeigen, während N<sup>ε</sup>-präferierende IFs zu einer Absenkung der Elektronendichte bei Peptidinteraktion neigen.

### ***6.3 Hypothese zur regioselektivitätsinduzierenden Wirkung von ionischen Flüssigkeiten in Peptidacylierungsreaktionen***

Da gezeigt werden konnte, dass der IF-Effekt unabhängig von der Peptidsequenz bei Peptiden mit mindestens fünf Aminosäuren (siehe 6.1.2) aber nicht bei Lysinamid (siehe 6.1.6) auftrat, scheint die Existenz eines Peptidrückgrates für den Effekt

notwendig zu sein. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IFs mit Peptiden interagieren (siehe 6.2.3) und dass diese Interaktion über den Imidazolium-Ring, im Besonderen über das C2-Proton, verläuft (siehe 6.2.4). Dieses C2-Proton ist für die Regioselektivität von entscheidender Bedeutung, ist es durch eine Methylfunktion ersetzt, so reduziert sich der *re*-Wert von Acylierungsreaktionen dramatisch (siehe 6.1.5). Zusammengenommen ist daher von einer Wechselwirkung des Peptidrückgrates mit dem Imidazoliumring des IF-Kations auszugehen.

Diese Interaktion hat, je nachdem ob ein  $N^{\alpha}$ - oder ein  $N^{\epsilon}$ -präferierendes IFs verwendet wird, elektronendonierenden oder abstrahierenden Charakter. Letztgenanntes wird über das Anion entschieden (siehe 6.2.4). Als Konsequenz wird die nicht-präferierte Funktion kinetisch gehemmt (siehe 6.2.2) und deren  $pK_a$  zu höheren Werten verschoben (siehe 6.2.1). Diese Hemmung und die  $pK_a$ -Wertverschiebung führen zu der beobachteten regioselektivitätsinduzierenden Wirkung von IFs bei Peptidacylierungsreaktionen.

Es muss betont werden, dass es sich bei der vorgestellten Hypothese um ein Modell handelt, welches sich aus den vorgestellten Daten ergibt. Weitere Untersuchungen um dieses zu bestätigen oder falsifizieren sind notwendig. Die Synthese von dialkylphosphathaltigen IFs mit einer veränderten Elektronendichte im Ring wäre zur Überprüfung der Behauptung, dass Elektronendichte und Regioselektivität miteinander verknüpft sind, sinnvoll. Weiterhin wäre eine genauere Evaluierung der Peptid-IF-Interaktion mittels NMR anzuraten. Dieses stellt eine anspruchsvolle Aufgabe dar, weil IFs aufgrund ihrer hohen Ionenstärke schwierig mit NMR zu vermessen sind. Weiterhin ähneln sie aufgrund ihrer hohen Viskosität in ihrem Verhalten Festkörper. Daher werden Methoden wie *magic angle spinning* NMR für diese Messungen notwendig sein, die uns im Moment an der Universität Halle nicht zu Verfügung stehen.

## 7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von IFs auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen untersucht. Anhand der Acylierung von zwei Pentapeptidbibliotheken, ergänzt durch zwei längere Modellpeptide und drei verschiedene Acyldonoren, konnte gezeigt werden, dass die Regioselektivität hauptsächlich von dem Lösungsmittel abhängt. Werden IFs benutzt, so ist steuerbar, ob  $N^\alpha$ - oder  $N^\epsilon$ -Selektivität auftritt. In [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wird der *N*-Terminus bevorzugt acyliert und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] wird die Seitenkette präferiert. Obwohl sich diese IFs in ihrem Kation gleichen, unterscheiden sie sich signifikant in ihren *re*-Werten. Folglich hat das Anion entscheidenden Einfluss auf die Regioselektivität. Andere IFs wie [BMIM][SCN] zeigten ein ausgeglichenes Regioselektivitätsverhalten, welches dem im rein wässrigen System ähnelt. Dieses wird neben dem IF aber auch von anderen Faktoren beeinflusst. Die Peptidsequenz, die Natur des Acyldonors, der pH-Wert, die Länge der Seitenkette und die Temperatur haben Auswirkungen auf die Regioselektivität. Im Vergleich zum IF-Effekt sind diese aber gering. Weiterhin ist festzuhalten, dass auch bei Peptiden, die mehrere Lysine trugen, die dirigierende Wirkung auftrat. Wurde hingegen als Acylakzeptor das Aminosäureamid Lys-NH<sub>2</sub> verwendet, so konnte keine Dirigierung durch IFs beobachtet werden. Für die Beeinflussung der Regioselektivität durch IFs scheint folglich ein Peptidrückgrat im Acylakzeptor notwendig zu sein. Zusammenfassend kann daher von einem generellen regioselektivitätsinduzierendem Effekt von IFs bei Acylierungsreaktionen von Peptiden gesprochen werden. Wie experimentell gezeigt werden konnte, ist dieser eindeutig abhängig von der Konzentration des als Lösungsmittel eingesetzten IFs.

Zur Erklärung dieses regioselektivitätsinduzierenden IF-Effektes wurden physikochemische Untersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass IFs die  $pK_a$ -Werte von peptidischen Aminofunktionen im Vergleich zu den Werten in Wasser erhöhen. Stellt man die  $pK_a$ -Werte in den dirigierenden IFs nebeneinander, so ist jeweils die in dem entsprechenden IF präferierte Aminofunktion weniger stark verschoben. Dielektrische Messungen zeigten, dass die Dielektrizitätskonstante nicht die Ursache der  $pK_a$ -Verschiebung sein kann. Weiterhin wurde auch der Übergangszustand der Acylierungsreaktion durch IFs beeinflusst. Die Aktivierungsparameter der  $N^\alpha$ - und der  $N^\epsilon$ -Aminofunktion zeigen, dass in

[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und in [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] die jeweils präferierte Funktionalität kinetisch bevorzugt ist. Darüber hinaus konnte unter Verwendung von Peptidylprolylbindungen erstmalig eine direkte Wechselwirkung von Peptiden und IFs nachgewiesen werden. NMR-Untersuchungen belegten, dass Interaktionen zwischen dem IF-Kation und dem Peptid stattfinden, welche bei dem *N*-terminal dirigierenden [MMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] zu einer Erhöhung und bei dem seitenkettenbevorzugenden [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] zu einer Absenkung der Elektronendichte im Imidazoliumring des Kation führen. Besonders deutlich war diese Beeinflussung der Elektronendichte an dem C2-Proton des Imidazoliumringes. Wurden Acylierungsreaktion in IFs wie [EMMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] und [MMMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] durchgeführt, welche an dieser C2-Position methyliert waren, so verringerte sich die Regioselektivität deutlich. Eine Wechselwirkung zwischen Peptid und dem aromatischen Ring des Imidazolium-Kations scheint somit ursächlich für das prinzipielle Auftreten des beobachteten regioselektivitätsinduzierenden Effekt von IFs in Peptidacylierungsreaktionen zu sein. Das Anion hingegen scheint zu definieren, ob *N*<sup>α</sup>- oder *N*<sup>ε</sup>-Acylierung bevorzugt ist.

## 8. Literaturverzeichnis

- (1) Gabriel, S. *Ber.* **1888**, *21*, 2665-2669.
- (2) Gabriel, S.; Weiner, J. *Ber.* **1888**, *21*, 2669-2679.
- (3) Walden, P. *Bull. Acad. Impér. Sci St. Pétersbourg* **1914**, *8*, 405-422.
- (4) Tokuda, H.; Tsuzuki, S.; Susan, M. A. B. H.; Hayamizu, K.; Watanabe, M. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 19593-19600.
- (5) Graenacher, C. US Pat., 1934; Vol. 1943176.
- (6) Hurley, F. H.; Wier, T. P. *Journal of the Electrochemical Society* **1951**, *98*, 203-206.
- (7) Hurley, F. H.; Wier, T. P. *Journal of the Electrochemical Society* **1951**, *98*, 207-212.
- (8) Chum, H. L.; Koch, V. R.; Miller, L. L.; Osteryoung, R. A. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, *97*, 3264-3265.
- (9) Gale, R. J.; Gilbert, B.; Osteryoung, R. A. *Inorganic Chemistry* **1978**, *17*, 2728-2729.
- (10) Nardi, J. C.; Hussey, C. L.; King, L. A.; Force, U. A., Ed. US Pat., 1978; Vol. 4,122,245.
- (11) Wilkes, J. S.; L., H. C. "Selection of Cations for Ambient Temperature Chloroaluminate Molten Salts Using MNDO Molecular orbital Calculations," Frank J. Seiler Research Laboratory, 1982.
- (12) Wallach, O. *Ber. Chem. Dtsche. Ges.* **1884**, *16*, 535.
- (13) Wilkes, J. S.; Levisky, J. A.; Wilson, R. A.; Hussey, C. L. *Inorganic Chemistry* **1982**, *21*, 1263-1264.
- (14) Wilkes, J. S.; Zaworotko, M. J. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1992**, 965-967.
- (15) Cooper, E. I.; O'Sullivan, J. M. Eighth International Molten Salts Symposium, Pennington, New Jersey, 1992; p 386-396.
- (16) Bonhote, P.; Dias, A. P.; Papageorgiou, N.; Kalyanasundaram, K.; Gratzel, M. *Inorganic Chemistry* **1996**, *35*, 1168-1178.
- (17) Seddon, K. R. The International George Papatheodorou Symposium: Proceedings, Patras, 1999; p 131-1385.
- (18) Seddon, K. R. *Kinet. Katal.* **1996**, *37*, 743-748.
- (19) Seddon, K. R. *J. Chem Technol. Biotechnol* **1997**, *68*, 351-356.
- (20) McFarlane, D. R.; Sun, J.; Golding, J.; Meakin, P.; Forsyth, M. *Electrochimica Acta* **2000**, *45*, 1271-1278.
- (21) Lopez-Martin, I.; Burello, E.; Davey, P. N.; Seddon, K. R.; Rothenberg, G. *Chemphyschem* **2007**, *8*, 690-5.
- (22) Abdulsada, A. K.; Greenway, A. M.; Hitchcock, P. B.; Mohammed, T. J.; Seddon, K. R.; Zora, J. A. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1986**, 1753-1754.
- (23) Holbrey, J. D.; Seddon, K. R. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1999**, 2133-2139.
- (24) Gordon, C. M.; Holbrey, J. D.; Kennedy, A. R.; Seddon, K. R. *J. Mater. Chem* **1998**, *8*, 2627-2636.
- (25) *Pollution Prevention Act of 1990; 42 U.S.C.* **1990**, Sections 13101-13109.
- (26) Anastas, P.; Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, 1998.
- (27) Huddleston, J. G.; Willauer, H. D.; Swatoski, R. P.; Visser, A. E.; Rogers, R. D. *Chemical Communications* **1998**, 1765-1766.
- (28) Freemantle, M. *Chem. Eng. News* **1998**, *76*, 32-37.
- (29) Davis, J. H.; Forrester, K. J. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 1621-1622.

- (30) Wierzbicki, A.; Davis, J. H. Proceedings of the Symposium on Advances in solvent Selection and Substitution for Extraktions, New York, 2000.
- (31) Lau, R. M.; van Rantwijk, F.; Seddon, K. R.; Sheldon, R. A. *Organic Letters* **2000**, *2*, 4189-4191.
- (32) Erbedinger, M.; Mesiano, A. J.; Russell, A. J. *Biotechnology Progress* **2000**, *16*, 1129-1131.
- (33) Cull, S. G.; Holbrey, J. D.; Vargas-Mora, V.; Seddon, K. R.; Lye, G. J. *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, *69*, 227-233.
- (34) Fukumoto, K.; Yoshizawa, M.; Ohno, H. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 2398-2399.
- (35) Earle, M. J.; Esperanca, J. M. S. S.; Gilea, M. A.; Lopes, J. N. C.; Rebelo, L. P. N.; Magee, J. W.; Seddon, K. R.; Widegren, J. A. *Nature* **2006**, *439*, 831-834.
- (36) Wasserscheid, P. *Nature* **2006**, *439*, 797-797.
- (37) Smiglak, M.; Reichert, W. M.; Holbrey, J. D.; Wilkes, J. S.; Sun, L. Y.; Thrasher, J. S.; Kirichenko, K.; Singh, S.; Katritzky, A. R.; Rogers, R. D. *Chemical Communications* **2006**, 2554-2556.
- (38) Deetlefs, M.; Seddon, K. R. *Chimica Oggi-Chemistry Today* **2006**, *24*, 16-+.
- (39) Latala, A.; Stepnowski, P.; Nedzi, M.; Mroziak, W. *Aquatic Toxicology* **2005**, *73*, 91-98.
- (40) Bernot, R. J.; Brueseke, M. A.; Evans-White, M. A.; Lamberti, G. A. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, *24*, 87-92.
- (41) Wells, A. S.; Coombe, V. T. *Organic Process Research & Development* **2006**, *10*, 794-798.
- (42) Kulacki, K. J.; Lamberti, G. A. *Green Chemistry* **2008**, *10*, 104-110.
- (43) Matsumoto, M.; Mochiduki, K.; Fukunishi, K.; Kondo, K. *Separation and Purification Technology* **2004**, *40*, 97-101.
- (44) Docherty, K. M.; Kulpa, C. F. *Green Chemistry* **2005**, *7*, 185-189.
- (45) Ganske, F.; Bornscheuer, U. T. *Biotechnol Lett* **2006**, *28*, 465-469.
- (46) Stock, F.; Hoffmann, J.; Ranke, J.; Stormann, R.; Ondruschka, B.; Jastorff, B. *Green Chemistry* **2004**, *6*, 286-290.
- (47) Skladanowski, A. C.; Stepnowski, P.; Kleszczynski, K.; Dmochowska, B. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2005**, *19*, 291-296.
- (48) Swatloski, R. P.; Holbrey, J. D.; Memon, S. B.; Caldwell, G. A.; Caldwell, K. A.; Rogers, R. D. *Chemical Communications* **2004**, 668-669.
- (49) Bernot, R. J.; Kennedy, E. E.; Lamberti, G. A. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, *24*, 1759-1765.
- (50) Pretti, C.; Chiappe, C.; Pieraccini, D.; Gregori, M.; Abramo, F.; Monni, G.; Intorre, L. *Green Chemistry* **2006**, *8*, 238-240.
- (51) Ranke, J.; Muller, A.; Bottin-Weber, U.; Stock, F.; Stolte, S.; Arning, J.; Stormann, R.; Jastorff, B. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2007**, *67*, 430-438.
- (52) Romero, A.; Santos, A.; Tojo, J.; Rodriguez, A. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, *151*, 268-273.
- (53) Samori, C.; Pasteris, A.; Galletti, P.; Tagliavini, E. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2007**, *26*, 2379-2382.
- (54) Imperato, G.; Konig, B.; Chiappe, C. *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, 1049-1058.
- (55) Armstrong, D. W.; Zhang, L. K.; He, L. F.; Gross, M. L. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 3679-3686.
- (56) Fox, D. M.; Awad, W. H.; Gilman, J. W.; Maupin, P. H.; De Long, H. C.; Trulove, P. C. *Green Chemistry* **2003**, *5*, 724-727.
- (57) Christe, P. O.; Drake, G. *Provisional US Pat.* **2002**, Appl. 60/416,418.



- (58) Jones, C. B.; Haiges, R.; Schroer, T.; Christe, K. O. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 4981-4984.
- (59) Drake, G.; Hawkins, T.; Brand, A.; Hall, L.; Mckay, M.; Vij, A.; Ismail, I. *Propellants Explosives Pyrotechnics* **2003**, *28*, 174-180.
- (60) Dymek, C. J.; Hussey, C. L.; Wilkes, J. S.; Oye, H. A. Joint 6th International Symposium on Molten Salts, Pennington, New Jersey, 1987; p 93-104.
- (61) Oye, H. A.; Jagtoyen, M.; Oksefjell, T.; Wilkes, J. S. *Materials Science Forum* **1991**, 183-190.
- (62) Armstrong, J. P.; Hurst, C.; Jones, R. G.; Licence, P.; Lovelock, K. R. J.; Satterley, C. J.; Villar-Garcia, I. J. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, *9*, 982-990.
- (63) Santos, L. M. N. B. F.; Lopes, J. N. C.; Coutinho, J. A. P.; Esperanca, J. M. S. S.; Gomes, L. R.; Marrucho, I. M.; Rebelo, L. P. N. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 284-285.
- (64) AbdulSada, A. K.; Elaiwi, A. E.; Greenway, A. M.; Seddon, K. R. *European Mass Spectrometry* **1997**, *3*, 245-247.
- (65) Zabet-Moghaddam, M.; Heinzle, E.; Tholey, A. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 141-148.
- (66) Alfassi, Z. B.; Huie, R. E.; Milman, B. L.; Neta, P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 159-164.
- (67) Chen, H.; Zheng, O. Y.; Cooks, R. G. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 3656-3660.
- (68) Neto, B. A. D.; Santos, L. S.; Nachtigall, F. M.; Eberlin, M. N.; Dupont, J. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 7251-7254.
- (69) Leal, J. P.; Esperanca, J. M. S. S.; da Piedade, M. E. M.; Lopes, J. N. C.; Rebelo, L. P. N.; Seddon, K. R. *Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 6176-6182.
- (70) Ballone, P.; Pinilla, C.; Kohanoff, J.; Del Popolo, M. G. *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 4938-4950.
- (71) Katritzky, A. R.; Jain, R.; Lomaka, A.; Petrukhin, R.; Karelson, M.; Visser, A. E.; Rogers, R. D. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **2002**, *42*, 225-231.
- (72) Katritzky, A. R.; Lomaka, A.; Petrukhin, R.; Jain, R.; Karelson, M.; Visser, A. E.; Rogers, R. D. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **2002**, *42*, 71-74.
- (73) Eike, D. M.; Brennecke, J. F.; Maginn, E. J. *Green Chemistry* **2003**, *5*, 323-328.
- (74) Wasserscheid, P.; Welton, T. *Ionic liquids in Synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
- (75) Huddleston, J. G.; Visser, A. E.; Reichert, W. M.; Willauer, H. D.; Broker, G. A.; Rogers, R. D. *Green Chemistry* **2001**, *3*, 156-164.
- (76) Ngo, H. L.; LeCompte, K.; Hargens, L.; McEwen, A. B. *Thermochimica Acta* **2000**, *357*, 97-102.
- (77) Nishikawa, K.; Wang, S. L.; Katayanagi, H.; Hayashi, S.; Hamaguchi, H. O.; Koga, Y.; Tozaki, K. I. *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 4894-4900.
- (78) Phillips, G. W.; Falling, S. N.; Godleski, S. A.; Monnier, J. R. US-pat., 1994; Vol. 5,315,019.
- (79) Holbrey, J. D.; Plechkova, N. V.; Seddon, K. R. *Green Chemistry* **2006**, *8*, 411-414.
- (80) Maase, M.; Massone, K.; Halbritter, K.; Noe, R.; Siegel, W.; Stegmann, V.; Flores, M.; Huttenloch, O.; Becker, M.; BASF, Ed. WO-Pat, 2003; Vol. WO 03/062171.
- (81) Plechkova, N. V.; Seddon, K. R. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 123-150.
- (82) <http://www.corporate.basf.com/de/innovationen/preis/2004/basil.htm?id=V00-.XocLCSgjbcp-p>.
- (83) Baker, J. *European chemical news* **2004**, 18-19.

- (84) Chauvin, Y.; Gaillard, J. F.; Quang, D. V.; Andrews, J. W. *Chemistry & Industry* **1974**, 375-378.
- (85) Olivier-Bourbigou, H.; Hugues, F. *Green Industrial Applications of Ionic Liquids*; Kluwer: Dordrecht, 2002.
- (86) Chauvin, Y.; Hirschauer, A.; Olivier, H. *Journal of Molecular Catalysis* **1994**, 92, 155-165.
- (87) Friedel, C.; Crafts, J. M. *Comptes Rendus des séances de l'académie des sciences* **1877**, 84, 1392-1395.
- (88) Koch, V. R.; Miller, L. L.; Osteryoung, R. A. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, 98, 5277-5284.
- (89) Boon, J. A.; Levisky, J. A.; Pflug, J. L.; Wilkes, J. S. *Journal of Organic Chemistry* **1986**, 51, 480-483.
- (90) Surette, J. K. D.; Green, L.; Singer, R. D. *Chemical Communications* **1996**, 2753-2754.
- (91) Adams, C. J.; Earle, M. J.; Roberts, G.; Seddon, K. R. *Chemical Communications* **1998**, 2097-2098.
- (92) Zhao, Z. K.; Li, Z. S.; Wang, G. R.; Qiao, W. H.; Cheng, L. B. *Applied Catalysis a-General* **2004**, 262, 69-73.
- (93) Zhao, Z. K.; Qiao, W. H.; Li, Z. S.; Wang, G. R.; Cheng, L. B. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* **2004**, 222, 207-212.
- (94) Xiao, Y.; Malhotra, S. V. *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, 690, 3609-3613.
- (95) Xiao, Y.; Malhotra, S. V. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* **2005**, 230, 129-133.
- (96) Csihony, S.; Mehdi, H.; Horvath, I. T. *Green Chemistry* **2001**, 3, 307-309.
- (97) Heck, R. F.; Nolley, J. P. *Journal of Organic Chemistry* **1972**, 37, 2320-&.
- (98) Deshmukh, R. R.; Rajagopal, R.; Srinivasan, K. V. *Chemical Communications* **2001**, 1544-1545.
- (99) Bohm, V. P. W.; Herrmann, W. A. *Chemistry-a European Journal* **2000**, 6, 1017-1025.
- (100) Li, S. H.; Lin, Y. J.; Xie, H. B.; Zhang, S. B.; Xu, J. N. *Organic Letters* **2006**, 8, 391-394.
- (101) Xu, L. J.; Chen, W. P.; Xiao, J. L. *Organometallics* **2000**, 19, 1123-1127.
- (102) Handy, S. T.; Okello, M. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 8395-8397.
- (103) Hyder, Z.; Mo, J.; Xiao, J. L. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, 348, 1699-1704.
- (104) Mo, J.; Xu, L. J.; Xiao, J. L. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 751-760.
- (105) Beletskaya, I. P.; Cheprakov, A. V. *Chemical Reviews* **2000**, 100, 3009-3066.
- (106) Liu, Z.; Xu, D.; Tang, W.; Xu, L.; Mo, J.; Xiao, J. *Tetrahedron Letters* **2008**, 49, 2756-2760.
- (107) Amatore, C.; Godin, B.; Jutand, A.; Lemaitre, F. *Organometallics* **2007**, 26, 1757-1761.
- (108) Amatore, C.; Godin, B.; Jutand, A.; Lemaitre, F. *Chemistry-a European Journal* **2007**, 13, 2002-2011.
- (109) Diels, O.; Alder, K. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie* **1928**, 460, 98-122.
- (110) Olivier, H.; Hirschauer, A. French Pat., 1996.
- (111) Howarth, J.; Hanlon, K.; Fayne, D.; McCormac, P. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, 3097-3100.
- (112) Sun, H.; Zhang, D. J.; Ma, C.; Liu, C. B. *International Journal of Quantum Chemistry* **2007**, 107, 1875-1885.
- (113) Kumar, A.; Pawar, S. S. *Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72, 8111-8114.

- (114) Shin, Y. J.; Yeom, C. E.; Kim, M. J.; Kim, B. M. *Synlett* **2008**, 89-93.
- (115) Earle, M. J.; Katdare, S. P.; Seddon, K. R. *Organic Letters* **2004**, 6, 707-710.
- (116) Pakulski, Z. *Synthesis-Stuttgart* **2003**, 2074-2078.
- (117) Sasaki, K.; Matsumura, S.; Toshima, K. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 7043-7047.
- (118) Sasaki, K.; Nagai, H.; Matsumura, S.; Toshima, K. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 5605-5608.
- (119) Yamada, C.; Sasaki, K.; Matsumura, S.; Toshima, K. *Tetrahedron Letters* **2007**, 48, 4223-4227.
- (120) Park, T. J.; Weiwer, M.; Yuan, X. J.; Baytas, S. N.; Munoz, E. M.; Murugesan, S.; Linhardt, R. J. *Carbohydrate Research* **2007**, 342, 614-620.
- (121) Vallette, H.; Ferron, L.; Coquerel, G.; Guillen, F.; Plaquevent, J. C. *Arkivoc* **2006**, 200-211.
- (122) Vallette, H.; Ferron, L.; Coquerel, G.; Gaumont, A. C.; Plaquevent, J. C. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 1617-1619.
- (123) Mincheva, Z.; Bonnette, F.; Lavastre, O. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2007**, 72, 417-434.
- (124) Bonnette, F.; Mincheva, Z.; Lavastre, O. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2006**, 9, 229-232.
- (125) Zaks, A.; Klibanov, A. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, 82, 3192-3196.
- (126) Bordusa, F. *Chemical Reviews* **2002**, 102, 4817-4867.
- (127) van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Chemical Reviews* **2007**, 107, 2757-2785.
- (128) Magnuson, D. K.; Bodley, J. W.; Evans, D. F. *Journal of Solution Chemistry* **1984**, 13, 583-587.
- (129) Bordusa, F.; Ullmann, D.; Elsner, C.; Jakubke, H. D. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1997**, 36, 2473-2475.
- (130) Wehofsky, N.; Wespe, C.; Cerovsky, V.; Pech, A.; Hoess, E.; Rudolph, R.; Bordusa, F. *Chembiochem* **2008**, 9, 1493-1499.
- (131) Merrifield, R. B. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 2149-&.
- (132) Gutte, B.; Merrifield, R. B. *Journal of Biological Chemistry* **1971**, 246, 1922-&.
- (133) Woo, D. D. L.; Clarklewis, I.; Chait, B. T.; Kent, S. B. H. *Protein Engineering* **1989**, 3, 29-37.
- (134) Henkel, B.; Zhang, L. S.; Bayer, E. *Liebigs Annalen-Recueil* **1997**, 2161-2168.
- (135) Bodanszky, M.; Ondetti, M. A. *Peptide Synthesis*; Interscience: New York, London, Sydney, 1966.
- (136) Atherton, E.; Sheppard, R. C. *Solid-Phase Synthesis - A Practical Approach*; Oxford University Press: Oxford, 1989.
- (137) Trost, B. M. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1995**, 34, 259-281.
- (138) Schnolzer, M.; Kent, S. B. H. *Science* **1992**, 256, 221-225.
- (139) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clarklewis, I.; Kent, S. B. H. *Science* **1994**, 266, 776-779.
- (140) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Organic Letters* **2000**, 2, 2141-2143.
- (141) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Organic Letters* **2000**, 2, 1939-1941.
- (142) Yem, A. W.; Zurchernecky, H. A.; Richard, K. A.; Staite, N. D.; Heinrikson, R. L.; Deibel, M. R. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, 264, 17691-17697.
- (143) Liu, H. J.; Cho, B. Y.; Krull, I. S.; Cohen, S. A. *Journal of Chromatography A* **2001**, 927, 77-89.
- (144) Kurtenbach, E.; Verjovskialmeida, S. *Journal of Biological Chemistry* **1985**, 260, 9636-9641.
- (145) Michalet, X.; Weiss, S.; Jager, M. *Chemical Reviews* **2006**, 106, 1785-1813.
- (146) Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C. *Biomedica Biochimica Acta* **1984**, 43, 1101-1111.

- (147) Schechter, I.; Berger, A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1967**, *27*, 157-162.
- (148) Alder, R. W.; Allen, P. R.; Williams, S. J. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1995**, 1267-1268.
- (149) Choi, D. S.; Kim, D. H.; Shin, U. S.; Deshmukh, R. R.; Lee, S. G.; Song, C. E. *Chemical Communications* **2007**, 3467-3469.
- (150) Fujisawa, T.; Fukuda, M.; Terazima, M.; Kimura, Y. *J Phys Chem A* **2006**, *110*, 6164-6172.
- (151) Gottwald, W.; Wachter, G. *IR-Spektroskopie für Anwender*; WILEY-VCH: Weinheim, Berlin, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 1997.
- (152) Kremer, F.; Schönhals, A. *Broadband dielectric spectroscopy*; Springer: Berlin Heidelberg, 2002.
- (153) Eyring, H. *Journal of chemical Physics* **1935**, *3*, 107.
- (154) Kofron, J. L.; Kuzmic, P.; Kishore, V.; Colonbonilla, E.; Rich, D. H. *Biochemistry* **1991**, *30*, 6127-6134.
- (155) Kofron, J. L.; Kuzmic, P.; Kishore, V.; Gemmecker, G.; Fesik, S. W.; Rich, D. H. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 2670-2675.
- (156) Fischer, G.; Aumuller, T. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **2003**, *148*, 105-150.
- (157) Cocchi, M.; Johansson, E. *Quantitative Structure-Activity Relationships* **1993**, *12*, 1-8.
- (158) Cruciani, G.; Baroni, M.; Carosati, E.; Clementi, M.; Valigi, R.; Clementi, S. *Journal of Chemometrics* **2004**, *18*, 146-155.
- (159) Hellberg, S.; Sjostrom, M.; Skagerberg, B.; Wold, S. *Journal of Medicinal Chemistry* **1987**, *30*, 1126-1135.
- (160) Ullmann, D., Doktorarbeit, Universität Leipzig, 1994.
- (161) Grahn, S. D., Universität Leipzig, 1998.
- (162) Headley, A. D.; Kotti, S. R. S. S.; Nam, J.; Li, K. Y. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2005**, *18*, 1018-1022.
- (163) Singh, T.; Kumar, A. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *318*, 263-268.
- (164) Singh, T.; Kumar, A. *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 7843-7851.
- (165) Ludley, P.; Karodia, N. *Arkivoc* **2002**, 172-175.
- (166) Ludley, P.; Karodia, N. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 2011-2014.
- (167) Henderson, L. J. *American Journal of Physiology* **1908**, *21*, 173-179.
- (168) Debye, P.; Hückel, E. *Physikalische Zeitschrift* **1923**, *24*, 185-206.
- (169) *The Collected Papers of Peter J. W. Debye*; Interscience Publisher: New York, 1954.
- (170) Sangoro, J. R.; Serghei, A.; Naumov, S.; Galvosas, P.; Karger, J.; Wespe, C.; Bordusa, F.; Kremer, F. *Physical Review E* **2008**, *77*, -.
- (171) Sangoro, J.; Iacob, C.; Serghei, A.; Naumov, S.; Galvosas, P.; Karger, J.; Wespe, C.; Bordusa, F.; Stoppa, A.; Hunger, J.; Buchner, R.; Kremer, F. *Journal of Chemical Physics* **2008**, *128*, -.
- (172) Gresser, M. J.; Jencks, W. P. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 6970-6980.
- (173) Menger, F. M.; Smith, J. H. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94*, 3824-&.
- (174) Hammond, G. S. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77*, 334-338.
- (175) Atkins, P. W. *Physikalische Chemie*; VCH: Weinheim, 1. Auflage, 1987, S. 229.
- (176) Crowhurst, L.; Falcone, R.; Lancaster, N. L.; Llopis-Mestre, V.; Welton, T. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 8847-8853.
- (177) Bottoni, A.; Frenna, V.; Lanza, C. Z.; Macaluso, G.; Spinelli, D. *Journal of Physical Chemistry A* **2004**, *108*, 1731-1740.

- (178) D'Anna, F.; Frenna, V.; Noto, R.; Pace, V.; Spinelli, D. *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 2828-2831.
- (179) Bessac, F.; Maseras, F. *Journal of Computational Chemistry* **2008**, *29*, 892-899.
- (180) Fischer, G. *Chemical Society Reviews* **2000**, *29*, 119-127.
- (181) Kock, M.; Kessler, H.; Seebach, D.; Thaler, A. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 2676-2686.
- (182) Zoldak, G.; Aumüller, T. *Veröffentlichung in Bearbeitung*.

## Danksagung

Ich möchte *Professor Dr. Frank Bordusa* für die Überlassung dieses interessanten und herausfordernden Themas und für die fortwährende Unterstützung meiner Arbeit danken.

*Professor Dr. Gunter Fischer* möchte ich für die Möglichkeit danken in den Räumlichkeiten der Max-Planckforschungstelle für Enzymologie der Proteinfaltung forschen zu dürfen und für die Bereitstellung der Ausrüstung des Institutes.

*Dr. Carmen Mrestani-Klaus* gilt mein Dank für viele NMR-Spektren und die Diskussion über diese.

Bei *Dr. Angelika Schierhorn* und *Christina Gershing* möchte ich mich für die Aufnahme von vielen MS-Spektren bedanken.

*Andreas Pech*, *Dr. Günther Jahreis* und *Dr. Bianca Hartrodt* danke ich für ihren Einsatz bei der Festphasenpeptidsynthese.

*Steffanie Kaufmann* möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung gerade in der Endphase meiner Arbeit danken.

*Dr. Sandra Liebscher*, *Dr. Tobias Aumüller* und *Christoph Meyer* gilt mein Dank für ihre fortwährende Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während meiner Arbeit.

Bei *Ilona Kunze*, *Karin Jentsch* und *Birgit Hökelmann* möchte ich mich für ihren dauerhaften Kampf gegen einen zu niedrigen Blutzuckerspiegel und für ihre praktischen Tipps und Hilfestellungen gerade zu Beginn meiner Arbeit danken.

Insgesamt möchte ich mich bei allen hier noch nicht genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bordusa und der MPF für die freundliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

## Publikationsverzeichnis

- (1) Wespe, C., Rennert, R., Beck-Sickinger, A.G., Neundorff I. Developing novel hCT derived cell-penetrating peptides with improved metabolic stability. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* **2006**, 1758, 347-354
- (2) Sangoro, J.R., Iacob, C., Serghei, A., Naumov, S., Galvosas, P., Karger, J., Wespe, C., Bordusa, F., Stoppa, A., Hunger, J., Buchner, R., Kremer, F. Electrical conductivity and translational diffusion in the 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid – article number 214509. *Journal of Chemical Physics* **2008**, 128, 14509-14512
- (3) Wehofsky, N., Wespe, C., Cerovsky, V., Pech, A., Hoess, E., Rudolph, R., Bordusa, F. Ionic liquids and proteases: A clean alliance for semisynthesis. *Chembiochem* **2008**, 9, 1493-1499
- (4) Sangoro, J.R., Serghei, A., Naumov, S., Galvosas, P., Karger, J., Wespe, C., Bordusa, F., Kremer, F. Charge transport in imidazolium-based ionic liquids - article number 051202. *Physical Review E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids & Related Interdisciplinary Topics* **2008**, 77, 1202
- (5) Wespe, C., Schierhorn, A., Mrestani-Klaus, F., Bordusa, F. Impact of ionic liquids on peptide acylation reactions. *Journal of Peptide Science* **2008**, 14, 57-58
- (6) Wespe, C., Schierhorn, A., Mrestani-Klaus, C., Kremer, F., Bordusa, F. Influence of ionic liquids on the regioselectivity of peptide acylation reactions. *Angewandte Chemie*, eingereicht

## Lebenslauf

Name: Christian Wespe  
 Geburtsdatum: 26.01.1980  
 Geburtsort: Wolfenbüttel  
 Nationalität: deutsch  
 Familienstand: ledig, keine Kinder

---

Gymnasium im Schloss, Wolfenbüttel

10/1999-09/2004 Chemiestudium an der Universität Leipzig

02/2004-09/2004 Anfertigung einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Professor Beck-Sickinger an der Universität Leipzig mit dem Thema: „Synthese von potentiell Metabolismustabilisierten humanen Calcitonin Analoga“

09/2004-09/2008 Dissertation unter Anleitung von Professor Dr. Frank Bordusa zum Thema: „Einfluss von ionischen Flüssigkeiten auf die Regioselektivität von Peptidacylierungsreaktionen“  
 2004-2005 an der Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“  
 2005-2008 an der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Naturstoffbiochemie

Halle (Saale), den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 (Christian Wespe)



## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfsmittel angefertigt sowie andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet habe. Ich habe den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche gekennzeichnet. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachte Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Dissertation eingereicht.

Halle (Saale), den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Christian Wespe)

## Anhang

<b>Analytik der dargestellten Verbindungen .....</b>	<b>I</b>
<b>MS-Fragmentierung von acylierten Peptiden.....</b>	<b>VI</b>
<b>Ergebnisse der Peptidacylierungsreaktionen .....</b>	<b>XIV</b>

### *Analytik der dargestellten Verbindungen*

#### **H-Gly-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (508): 509 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 1,34-1,38 (m, 6H, Ala<sup>2</sup>-CH<sub>3</sub>, Ala<sup>4</sup>-CH<sub>3</sub>), 1,60-1,66 (m, 4H, Lys<sup>3</sup>-C<sup>β</sup>-H<sub>B</sub>, Lys<sup>3</sup>-C<sup>γ</sup>-H<sub>A/B</sub>, Lys<sup>3</sup>-C<sup>δ</sup>-H<sub>B</sub>), 1,67-1,74 (m, 2H, Lys<sup>3</sup>-C<sup>β</sup>-H<sub>A</sub>, Lys<sup>3</sup>-C<sup>δ</sup>-H<sub>A</sub>), 2,88-2,98 (m, 3H, Tyr<sup>5</sup>-C<sup>β</sup>-H<sub>B</sub>, Lys<sup>3</sup>-C<sup>ε</sup>-H<sub>A/B</sub>), 3,04-3,08 (dd, 1H, Tyr<sup>5</sup>-C<sup>β</sup>-H<sub>A</sub>), 3,53 (s, 2H, Gly<sup>1</sup>-CH<sub>2</sub>), 4,24-4,35 (m, 4H, Ala<sup>2</sup>-C<sup>α</sup>-H, Lys<sup>3</sup>-C<sup>α</sup>-H, Ala<sup>4</sup>-C<sup>α</sup>-H, Tyr<sup>5</sup>-C<sup>α</sup>-H), 6,80-6,82 (d, 2H, Tyr<sup>5</sup>-C<sup>2,6</sup>-H), 7,08-7,10 (d, 2H, Tyr<sup>5</sup>-C<sup>3,5</sup>-H), Reinheit: >99% (NMR).

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 μm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,98 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Ser-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> (538): 539 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 1,31-1,33 (d, 3H, Ala<sup>4</sup>-CH<sub>3</sub>), 1,38-1,40 (d, 3H, Ala<sup>2</sup>-CH<sub>3</sub>), 1,60-1,76 (m, 4H, Lys<sup>3</sup>-C<sup>β</sup>-H<sub>B</sub>, Lys<sup>3</sup>-C<sup>γ</sup>-H<sub>A/B</sub>, Lys<sup>3</sup>-C<sup>δ</sup>-H<sub>B</sub>), 2,88-2,98 (m, 3H, Tyr<sup>5</sup>-C<sup>β</sup>-H<sub>B</sub>, Lys<sup>3</sup>-C<sup>ε</sup>-H<sub>A/B</sub>), 3,08-3,12 (dd, 1H, Tyr<sup>5</sup>-C<sup>β</sup>-H<sub>A</sub>), 3,95-4,03 (m, 2H, Ser<sup>1</sup>-C<sup>β</sup>-H<sub>A/B</sub>), 4,13-4,14 (m, 1H, Ser<sup>1</sup>-C<sup>α</sup>-H), 4,20-4,25 (m, 1H, Lys<sup>3</sup>-C<sup>α</sup>-H), 4,28-4,31 (m, 1H, Ala<sup>4</sup>-C<sup>α</sup>-H), 4,36-4,39 (m, 1H, Ala<sup>2</sup>-C<sup>α</sup>-H), 4,49-4,52 (m, 1H, Tyr<sup>5</sup>-C<sup>α</sup>-H), 6,82-6,84 (d, 2H, Tyr<sup>5</sup>-C<sup>2,6</sup>-H), 7,11-7,13 (d, 2H, Tyr<sup>5</sup>-C<sup>3,5</sup>-H), 7,92-7,92 (d, 1H, Tyr<sup>5</sup>-NH), 8,26-8,31 (m, 2H, Lys<sup>3</sup>-NH, Ala<sup>4</sup>-NH), 8,67-8,68 (d, 1H, Ala<sup>2</sup>-NH) Reinheit: >99% (NMR).

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 μm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 1,04 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Leu-Ile-Val-Asp-Ala-Val-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>76</sub>H<sub>125</sub>N<sub>17</sub>O<sub>22</sub> (1628): 1629 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 μm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 20% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 1,24 min, Reinheit: >99,5% UPLC,

#### **H-Val-Val-Phe-Ser-Ala-Pro-Val-Leu-Glu-Pro-Thr-Gly-Pro-Leu-His-Thr-Gln-Phe-Gly-Tyr-His-Ile-Ile-Lys-Val-Leu-Tyr-Arg-Asn-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>157</sub>H<sub>239</sub>N<sub>39</sub>O<sub>39</sub> (3391): 3296 [M<sub>av</sub>+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 25% B – 45% B 3 min), Wellenlänge: 220nm: tr: 1,36 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Ala-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (522): 523 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: tr: 0,95 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Glu-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> (580): 581 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: tr: 0,98 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Phe-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (598): 599 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: tr: 1,03 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-His-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (588): 589 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: tr: 1,05 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Ile-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (564): 565 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: tr: 0,96 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Leu-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (564): 565 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: tr: 0,98 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Met-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>1</sub> (582): 583 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: tr: 0,92 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Pro-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (548): 549 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: tr: 1,01 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**H-Gln-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub> (579): 580 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,91 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**H-Arg-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>N<sub>9</sub>O<sub>7</sub> (607): 608 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,89 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**H-Ser-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (538): 539 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,91 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**H-Thr-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> (552): 553 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,93 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**H-Val-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (550): 551 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,96 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**H-Trp-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>32</sub>H<sub>43</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub> (637): 638 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 1,07 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**H-Tyr-Ala-Lys-Ala-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> (614): 615 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 1,02 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**H-Val-Glu-Lys-Glu-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub> (666): 667 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,94 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**H-Val-Phe-Lys-Phe-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>38</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (702): 703 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 1,08 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Gly-Lys-Gly-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (522): 523 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,94 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-His-Lys-His-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>10</sub>O<sub>7</sub> (682): 683 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 1,00 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Ile-Lys-Ile-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (634): 635 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,97 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Leu-Lys-Leu-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (634): 635 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,97 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Met-Lys-Met-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> (670): 671 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,92 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Asn-Lys-Asn-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub> (636): 637 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,89 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Pro-Lys-Pro-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (602): 603 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm: t<sub>R</sub>: 0,93 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Gln-Lys-Gln-Tyr-OH**

MS (ESI), *m/z* ber, für C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub> (664): 665 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_{\text{R}}$ : 0,90 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Arg-Lys-Arg-Tyr-OH**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>N<sub>12</sub>O<sub>7</sub> (720): 721 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_{\text{R}}$ : 0,93 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Ser-Lys-Ser-Tyr-OH**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> (582): 583 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_{\text{R}}$ : 0,94 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Thr-Lys-Thr-Tyr-OH**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> (610): 611 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_{\text{R}}$ : 0,95 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Val-Lys-Val-Tyr-OH**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (606): 607 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_{\text{R}}$ : 0,99 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Trp-Lys-Trp-Tyr-OH**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für C<sub>42</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (780): 781 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_{\text{R}}$ : 1,12 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **H-Val-Tyr-Lys-Tyr-Tyr-OH**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für C<sub>38</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> (734): 735 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_{\text{R}}$ : 1,08 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **Suc-AAPF-pNA**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> (624): 625 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_{\text{R}}$ : 1,72 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

#### **Suc-ADPF-pNA**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub> (668): 669 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_{\text{R}}$ : 1,52 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**Suc-AEPPF-pNA**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für  $C_{32}H_{38}N_6O_9$  (682): 683 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu$ m, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_R$ : 1,58 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**Suc-AFPF-pNA**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für  $C_{36}H_{40}N_6O_9$  (700): 701 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu$ m, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_R$ : 1,88 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**Suc-AGPF-pNA**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für  $C_{29}H_{34}N_6O_9$  (610): 611 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu$ m, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_R$ : 1,71 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**Suc-AKPF-pNA**

MS (ESI),  $m/z$  ber, für  $C_{33}H_{43}N_7O_9$  (681): 682 [M+H]<sup>+</sup>.

UPLC (Säule: waters BEH C18, 1,7  $\mu$ m, 2,1 x 50 mm; Eluent: A: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), B: ACN, Gradient: (0,1% TFA; 0% B – 50% B 3,5 min), Wellenlänge: 220nm:  $t_R$ : 1,42 min, Reinheit: >99,5% UPLC.

**MS-Fragmentierung von acylierten Peptiden****ESI-Fragmentierung von biotinylierten GAKAY Produkten**

Biotin-GAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{33}H_{50}N_8O_9$  S<sub>1</sub> (734): 735 [M+H]<sup>+</sup>, b<sub>2</sub>  $m/z$  ber, für  $C_{15}H_{23}N_4O_4S_1$  (355): 355 [M]<sup>+</sup>, y<sub>3</sub>  $m/z$  ber, Für  $C_{18}H_{27}N_4O_5$  (379): 381 [M+2H]<sup>+</sup>,

GAK(Biotin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{33}H_{50}N_8O_9$  S<sub>1</sub> (734): 735 [M+H]<sup>+</sup>, y<sub>3</sub>  $m/z$  ber, Für  $C_{28}H_{41}N_6O_7S_1$  (605): 607 [M+2H]<sup>+</sup>,

**ESI-Fragmentierung von phloretylierten GAKAY Produkten**

Phloretin-GAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{32}H_{44}N_6O_9$  (656): 657 [M+H]<sup>+</sup>, b<sub>2</sub>  $m/z$  ber, für  $C_{14}H_{17}N_2O_4$  (277): 277 [M]<sup>+</sup>, y<sub>3</sub>  $m/z$  ber, Für  $C_{18}H_{27}N_4O_5$  (379): 381 [M+2H]<sup>+</sup>,

GAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{32}H_{44}N_6O_9$  (656): 657 [M+H]<sup>+</sup>, y<sub>3</sub>  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529 [M+2H]<sup>+</sup>,

**ESI-Fragmentierung von foroylierten GAKAY Produkten**

Fur-GAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{28}H_{38}N_6O_9$  (602): 603 [M+H]<sup>+</sup>, b<sub>2</sub>  $m/z$  ber, für  $C_{10}H_{11}N_2O_4$  (223): 223 [M]<sup>+</sup>, y<sub>3</sub>  $m/z$  ber, Für  $C_{18}H_{27}N_4O_5$  (379): 381 [M+2H]<sup>+</sup>,

GAK(Fur)AY  $m/z$  ber, für  $C_{28}H_{38}N_6O_9$  (602): 603 [M+H]<sup>+</sup>, y<sub>3</sub>  $m/z$  ber, Für  $C_{23}H_{29}N_4O_7$  (473): 475 [M+2H]<sup>+</sup>,

**MALDI-Tof-Tof Fragmentierung von biotinylierten LIVDAVLEPVKAAGAY Produkten**

Biotin-LIVDAVLEPVKAAGAY  $m/z$  ber, für  $C_{86}H_{139}N_{19}O_{24}S_1$  (1854): 1855  $[M+H]^+$ , b1  $m/z$  ber, für  $C_{16}H_{26}N_3O_3S_1$  (340): 340  $[M]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{22}H_{37}N_4O_4S_1$  (453): 453  $[M]^+$ , b3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{46}N_5O_5S_1$  (552): 552  $[M]^+$ ,

LIVDAVLEPVK(Biotin)AAGAY  $m/z$  ber, für  $C_{86}H_{139}N_{19}O_{24}S_1$  (1854): 1855  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{12}H_{23}N_2O_2$  (227): 227  $[M]^+$ , b5  $m/z$  ber, für  $C_{24}H_{42}N_5O_8$  (512): 512  $[M]^+$ , y8  $m/z$  ber, für  $C_{46}H_{70}N_{11}O_{12}S_1$  (1001): 1002  $[M+H]^+$ ,

#### **MALDI-Tof-Tof Fragmentierung von biotinylierten**

##### **VVFSAPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLRYN Produkten**

Biotin-VVFSAPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLRYN  $m/z$  ber, für  $C_{178}H_{270}N_{44}O_{45}S_1$  (3778): 3779  $[M_{AV}+H]^+$ , b1  $m/z$  ber, für  $C_{15}H_{24}N_3O_3S_1$  (326): 326  $[M]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{20}H_{33}N_4O_4S_1$  (425): 425  $[M]^+$ , b3  $m/z$  ber, für  $C_{29}H_{42}N_5O_5S_1$  (572): 572  $[M]^+$ , y8  $m/z$  ber, für  $C_{48}H_{83}N_{13}O_{11}$  (1017): 1018  $[M+2H]^+$ ,

VVFSAPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Biotin)VLRYN  $m/z$  ber, für  $C_{178}H_{270}N_{44}O_{45}S_1$  (3778): 3779  $[M_{AV}+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{10}H_{19}N_2O_2$  (199): 199  $[M]^+$ , b3  $m/z$  ber, für  $C_{19}H_{28}N_3O_3$  (346): 346  $[M]^+$ , b5  $m/z$  ber, für  $C_{25}H_{38}N_5O_6$  (504): 504  $[M]^+$ , y6  $m/z$  ber, für  $C_{46}H_{74}N_{13}O_{11}S_1$  (1016): 1018  $[M+2H]^+$ ,

#### **MALDI-Tof-Tof Fragmentierung von biotinylierten**

##### **VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLRYN Produkten**

Biotin-VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLRYN  $m/z$  ber, für  $C_{181}H_{277}N_{45}O_{45}S_1$  (3835): 3836  $[M_{AV}+H]^+$ , b4  $m/z$  ber, für  $C_{31}H_{41}N_4O_7S_1$  (581): 581  $[M]^+$ , y8  $m/z$  ber, für  $C_{48}H_{83}N_{13}O_{11}$  (1017): 1018  $[M+2H]^+$ ,

VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Biotin)VLRYN  $m/z$  ber, für  $C_{181}H_{277}N_{45}O_{45}S_1$  (3835): 3836  $[M_{AV}+H]^+$ , b4  $m/z$  ber, für  $C_{22}H_{33}N_4O_5$  (433): 433  $[M]^+$ , y6  $m/z$  ber, für  $C_{46}H_{74}N_{13}O_{11}S_1$  (1016): 1018  $[M+2H]^+$ ,

VVFSK(Biotin)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLRYN  $m/z$  ber, für  $C_{181}H_{277}N_{45}O_{45}S_1$  (3835): 3836  $[M_{AV}+H]^+$ , b4  $m/z$  ber, für  $C_{22}H_{33}N_4O_5$  (433): 433  $[M]^+$ , y8  $m/z$  ber, für  $C_{48}H_{83}N_{13}O_{11}$  (1017): 1018  $[M+2H]^+$ ,

Biotin-VVFSK(Biotin)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLRYN  $m/z$  ber, für  $C_{191}H_{291}N_{47}O_{47}S_2$  (4061): 4062  $[M_{AV}+H]^+$ , b4  $m/z$  ber, für  $C_{31}H_{41}N_4O_7S_1$  (581): 581  $[M]^+$ , y8  $m/z$  ber, für  $C_{48}H_{83}N_{13}O_{11}$  (1017): 1018  $[M+2H]^+$ ,

Biotin-VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Biotin)VLRYN  $m/z$  ber, für  $C_{191}H_{291}N_{47}O_{47}S_2$  (4061): 4062  $[M_{AV}+H]^+$ , b4  $m/z$  ber, für  $C_{31}H_{41}N_4O_7S_1$  (581): 581  $[M]^+$ , y6  $m/z$  ber, für  $C_{46}H_{74}N_{13}O_{11}S_1$  (1016): 1018  $[M+2H]^+$ ,



VVFSK(Biotin)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Biotin)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>191</sub>H<sub>291</sub>N<sub>47</sub>O<sub>47</sub>S<sub>2</sub> (4061): 4062 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (433): 433 [M]<sup>+</sup>, y6 *m/z* ber, für C<sub>46</sub>H<sub>74</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub>S<sub>1</sub> (1016): 1018 [M+2H]<sup>+</sup>,

Biotin-VVFSK(Biotin)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Biotin)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>201</sub>H<sub>305</sub>N<sub>49</sub>O<sub>49</sub>S<sub>3</sub> (4288): 4289 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>,

#### **MALDI-ToF-ToF Fragmentierung von biotinylierten**

##### **VVFSKPVLEPKGPTGPLHTKFGYHIIKVLYRN Produkten**

Biotin-VVFSKPVLEPKGPTGPLHTKFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>184</sub>H<sub>286</sub>N<sub>46</sub>O<sub>43</sub>S<sub>1</sub> (3863): 3864 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S<sub>1</sub> (581): 581 [M]<sup>+</sup>, y8 *m/z* ber, für C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (1017): 1018 [M+2H]<sup>+</sup>,

#### **MALDI-ToF-ToF Fragmentierung von furoylierten LIVDAVLEPVKAAGAY Produkten**

Fur-LIVDAVLEPVKAAGAY *m/z* ber, für C<sub>81</sub>H<sub>127</sub>N<sub>17</sub>O<sub>24</sub> (1721): 1722 [M+H]<sup>+</sup>, b1 *m/z* ber, für C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>1</sub>O<sub>3</sub> (208): 208 [M]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (321): 321 [M]<sup>+</sup>,

LIVDAVLEPVK(Fur)AAGAY *m/z* ber, für C<sub>81</sub>H<sub>127</sub>N<sub>17</sub>O<sub>24</sub> (1721): 1722 [M+H]<sup>+</sup>, b5 *m/z* ber, für C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (512): 512 [M]<sup>+</sup>, y8 *m/z* ber, für C<sub>41</sub>H<sub>58</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub> (868): 867 [M+1H]<sup>+</sup>,

#### **MALDI-ToF-ToF Fragmentierung von furoylierten VVFSAPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN Produkten**

Fur-VVFSAPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>162</sub>H<sub>241</sub>N<sub>39</sub>O<sub>41</sub> (3388): 3389 [M+H]<sup>+</sup>, b1 *m/z* ber, für C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>1</sub>O<sub>3</sub> (194): 194 [M]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (293): 293 [M]<sup>+</sup>, y12 *m/z* ber, für C<sub>74</sub>H<sub>110</sub>N<sub>19</sub>O<sub>16</sub> (1521): 1523 [M+2H]<sup>+</sup>

VVFSAPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Fur)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>162</sub>H<sub>241</sub>N<sub>39</sub>O<sub>41</sub> (3388): 3389 [M+H]<sup>+</sup>, b1 *m/z* ber, für C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (199): 199 [M]<sup>+</sup>, y11 *m/z* ber, für C<sub>70</sub>H<sub>103</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub> (1467): 1469 (M+2H)<sup>+</sup>,

#### **MALDI-ToF-ToF Fragmentierung von furoylierten VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN Produkten**

Fur-VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>176</sub>H<sub>265</sub>N<sub>43</sub>O<sub>45</sub> (3703): 3704 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (527): 527 [M]<sup>+</sup>, y8 *m/z* ber, für C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (1017): 1018 [M+2H]<sup>+</sup>,

VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Fur)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>176</sub>H<sub>265</sub>N<sub>43</sub>O<sub>45</sub> (3703): 3704 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (433): 433 [M]<sup>+</sup>, y11 *m/z* ber, für C<sub>70</sub>H<sub>103</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub> (1467): 1469 (M+2H)<sup>+</sup>,

VVFSK(Fur)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>176</sub>H<sub>265</sub>N<sub>43</sub>O<sub>45</sub> (3703): 3704 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>,  
b4 *m/z* ber, für C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (433): 433 [M]<sup>+</sup>, y11 *m/z* ber, für C<sub>70</sub>H<sub>103</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub> (1467): 1469 (M+2H)<sup>+</sup>,

Fur-VVFSK(Fur)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>181</sub>H<sub>267</sub>N<sub>43</sub>O<sub>47</sub> (3797): 3798  
[M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (527): 527 [M]<sup>+</sup>, y8 *m/z* ber, für C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (1017): 1018 [M+2H]<sup>+</sup>,

Fur-VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Fur)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>181</sub>H<sub>267</sub>N<sub>43</sub>O<sub>47</sub> (3797): 3798  
[M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (527): 527 [M]<sup>+</sup>, y11 *m/z* ber, für C<sub>70</sub>H<sub>103</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub> (1467): 1469  
(M+2H)<sup>+</sup>,

VVFSK(Fur)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Fur)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>181</sub>H<sub>267</sub>N<sub>43</sub>O<sub>47</sub> (3797): 3798  
[M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (433): 433 [M]<sup>+</sup>, y11 *m/z* ber, für C<sub>70</sub>H<sub>103</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub> (1467): 1469  
(M+2H)<sup>+</sup>,

Fur-VVFSK(Fur)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Fur)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>186</sub>H<sub>269</sub>N<sub>43</sub>O<sub>49</sub> (3891): 3892  
[M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>,

#### **MALDI-ToF-ToF Fragmentierung von furoylierten VVFSKPVLEPKGPTGPLHTKFGYHIIKVLYRN Produkten**

Fur-VVFSKPVLEPKGPTGPLHTKFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>179</sub>H<sub>274</sub>N<sub>44</sub>O<sub>43</sub> (3731): 3732 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>,  
b4 *m/z* ber, für C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (527): 527 [M]<sup>+</sup>, y8 *m/z* ber, für C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (1017): 1018 [M+2H]<sup>+</sup>,

#### **MALDI-ToF-ToF Fragmentierung von phloretylierten LIVDAVLEPVKAAGAY Produkten**

Phloretin-LIVDAVLEPVKAAGAY *m/z* ber, für C<sub>86</sub>H<sub>139</sub>N<sub>19</sub>O<sub>24</sub>S<sub>1</sub> (1777): 1777 [M+H]<sup>+</sup>, b1 *m/z* ber, für  
C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>1</sub>O<sub>3</sub> (262): 262 [M]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (375): 375 [M]<sup>+</sup>, b3 *m/z* ber, für C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (474):  
474 [M]<sup>+</sup>, y12 *m/z* ber, für C<sub>55</sub> H<sub>88</sub> N<sub>13</sub> O<sub>16</sub> (1186): 1188 [M+2H]<sup>+</sup>,

LIVDAVLEPVK(Phloretin)AAGAY *m/z* ber, für C<sub>86</sub>H<sub>139</sub>N<sub>19</sub>O<sub>24</sub>S<sub>1</sub> (1777): 1777 [M+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für  
C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (441): 441 [M]<sup>+</sup>, b5 *m/z* ber, für C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (512): 512 [M]<sup>+</sup>, y10 *m/z* ber, für C<sub>56</sub>H<sub>82</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub>  
(1165): 1166 [M+2H]<sup>+</sup>,

#### **MALDI-ToF-ToF Fragmentierung von phloretylierten VVFSAPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN Produkten**

Phloretin-VVFSAPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>166</sub>H<sub>247</sub>N<sub>39</sub>O<sub>41</sub> (3443): 3444  
[M+H]<sup>+</sup>, b1 *m/z* ber, für C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>1</sub>O<sub>3</sub> (248): 248 [M]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (347): 347 [M]<sup>+</sup>, y12 *m/z*  
ber, für C<sub>74</sub>H<sub>110</sub>N<sub>19</sub>O<sub>16</sub> (1521): 1523 [M+2H]<sup>+</sup>,

VVFSAPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Phloretin)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>166</sub>H<sub>247</sub>N<sub>39</sub>O<sub>41</sub> (3443): 3444  
[M+H]<sup>+</sup>, b1 *m/z* ber, für C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (199): 199 [M]<sup>+</sup>, y11 *m/z* ber, für C<sub>74</sub>H<sub>109</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub> (1521): 1523 (M+2H)<sup>+</sup>,

**MALDI-Tof-Tof Fragmentierung von phloretylierten****VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN Produkten**

Phloretin-VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>180</sub>H<sub>271</sub>N<sub>43</sub>O<sub>45</sub> (3757): 3758 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (581): 581 [M]<sup>+</sup>, y8 *m/z* ber, für C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (1017): 1018 [M+2H]<sup>+</sup>,

VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Phloretin)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>180</sub>H<sub>271</sub>N<sub>43</sub>O<sub>45</sub> (3757): 3758 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (433): 433 [M]<sup>+</sup>, y11 *m/z* ber, für C<sub>74</sub>H<sub>109</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub> (1521): 1523 (M+2H)<sup>+</sup>,

VVFSK(Phloretin)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>180</sub>H<sub>271</sub>N<sub>43</sub>O<sub>45</sub> (3757): 3758 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (433): 433 [M]<sup>+</sup>, y8 *m/z* ber, für C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (1017): 1019 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-VVFSK(Phloretin)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>189</sub>H<sub>279</sub>N<sub>43</sub>O<sub>47</sub> (3905): 3906 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (581): 581 [M]<sup>+</sup>, y8 *m/z* ber, für C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (1017): 1019 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-VVFSKPVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Phloretin)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>189</sub>H<sub>279</sub>N<sub>43</sub>O<sub>47</sub> (3905): 3906 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (581): 581 [M]<sup>+</sup>, y11 *m/z* ber, für C<sub>74</sub>H<sub>109</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub> (1521): 1523 (M+2H)<sup>+</sup>,

VVFSK(Phloretin)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Phloretin)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>189</sub>H<sub>279</sub>N<sub>43</sub>O<sub>47</sub> (3905): 3906 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (433): 433 [M]<sup>+</sup>, y11 *m/z* ber, für C<sub>74</sub>H<sub>109</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub> (1521): 1523 (M+2H)<sup>+</sup>,

Phloretin-VVFSK(Phloretin)PVLEPTGPTGPLHTQFGYHIIK(Phloretin)VLYRN *m/z* ber, für C<sub>198</sub>H<sub>287</sub>N<sub>43</sub>O<sub>49</sub> (4053): 4054 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>,

**MALDI-Tof-Tof Fragmentierung von furoylierten VVFSKPVLEPKGPTGPLHTKFGYHIIKVLYRN Produkten**

Phloretin-VVFSKPVLEPKGPTGPLHTKFGYHIIKVLYRN *m/z* ber, für C<sub>183</sub>H<sub>280</sub>N<sub>44</sub>O<sub>43</sub> (3785): 3786 [M<sub>AV</sub>+H]<sup>+</sup>, b4 *m/z* ber, für C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (581): 581 [M]<sup>+</sup>, y8 *m/z* ber, für C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (1017): 1018 [M+2H]<sup>+</sup>,

**ESI-Fragmentierung von phloretylierten VX<sub>aa</sub>KX<sub>aa</sub>Y Produkten**

Phloretin-VEKEY *m/z* ber, für C<sub>39</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>13</sub> (814): 815 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (377): 377 [M]<sup>+</sup>, y3 *m/z* ber, für C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (437): 439 [M+2H]<sup>+</sup>,

VEK(Phloretin)EY  $m/z$  ber, für  $C_{39}H_{54}N_6O_{13}$  (814): 815  $[M+H]^+$ , y3  $m/z$  ber, für  $C_{29}H_{37}N_4O_9$  (585): 587  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{34}H_{44}N_5O_{12}$  (714): 716  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-VFKFY  $m/z$  ber, für  $C_{47}H_{58}N_6O_9$  (850): 851  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{23}H_{27}N_2O_4$  (395): 395  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{33}H_{40}N_5O_6$  (602): 604  $[M+2H]^+$ ,

VFK(Phloretin)FY  $m/z$  ber, für  $C_{47}H_{58}N_6O_9$  (850): 851  $[M+H]^+$ , c2  $m/z$  ber, für  $C_{14}H_{20}N_3O_2$  (262): 264  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{42}H_{48}N_5O_8$  (750): 752  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-VGKGY  $m/z$  ber, für  $C_{33}H_{46}N_6O_9$  (670): 671  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{16}H_{21}N_2O_4$  (305): 305  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{19}H_{28}N_5O_6$  (422): 424  $[M+2H]^+$ ,

VGK(Phloretin)GY  $m/z$  ber, für  $C_{33}H_{46}N_6O_9$  (670): 671, c2  $m/z$  ber, für  $C_7H_{14}N_3O_2$  (172): 174  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{28}H_{36}N_5O_8$  (570): 572  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-VHKHY  $m/z$  ber, für  $C_{41}H_{54}N_{10}O_9$  (830): 831  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{20}H_{25}N_4O_4$  (385): 385  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{36}N_9O_6$  (582): 584  $[M+2H]^+$ ,

VHK(Phloretin)HKY  $m/z$  ber, für  $C_{41}H_{54}N_{10}O_9$  (830): 831  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{11}H_{17}N_4O_2$  (237): 237  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{36}H_{44}N_9O_8$  (730): 732  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-VIKIY  $m/z$  ber, für  $C_{41}H_{62}N_6O_9$  (782): 783  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{20}H_{29}N_2O_4$  (361): 361  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{44}N_5O_6$  (534): 536  $[M+2H]^+$ ,

VIK(Phloretin)IY  $m/z$  ber, für  $C_{41}H_{62}N_6O_9$  (782): 783  $[M+H]^+$ , a2  $m/z$  ber, für  $C_{10}H_{21}N_2O_1$  (185): 185  $[M]^+$ , y3  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{41}N_4O_7$  (569): 571  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-VLKLY  $m/z$  ber, für  $C_{41}H_{62}N_6O_9$  (782): 783  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{20}H_{29}N_2O_4$  (361): 361  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{28}N_5O_6$  (534): 536  $[M+2H]^+$ ,

VLK(Phloretin)LY  $m/z$  ber, für  $C_{41}H_{62}N_6O_9$  (782): 783  $[M+H]^+$ , a2  $m/z$  ber, für  $C_{10}H_{21}N_2O_1$  (185): 185  $[M]^+$ , y3  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{41}N_4O_7$  (569): 571  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-VMKMY  $m/z$  ber, für  $C_{39}H_{58}N_6O_9S_2$  (818): 819  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{19}H_{27}N_2O_4S_1$  (379): 379  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{25}H_{40}N_5O_6S_2$  (570): 572  $[M+2H]^+$ ,

VMK(Phloretin)MKY  $m/z$  ber, für  $C_{39}H_{58}N_6O_9S_2$  (818): 819  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{10}H_{19}N_2O_2S_1$  (231): 231  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{34}H_{48}N_5O_8S_2$  (718): 720  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-VNKNY  $m/z$  ber, für  $C_{37}H_{52}N_8O_{11}$  (784): 785  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{18}H_{24}N_3O_5$  (362): 362  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{23}H_{34}N_7O_8$  (536): 538  $[M+2H]^+$ ,

VNK(Phloretin)NY  $m/z$  ber, für  $C_{37}H_{52}N_8O_{11}$  (784): 785  $[M+H]^+$ , y3  $m/z$  ber, für  $C_{28}H_{36}N_5O_8$  (570): 572  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{32}H_{42}N_7O_{10}$  (684): 686  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-VPKPY  $m/z$  ber, für  $C_{39}H_{54}N_6O_9$  (750): 751  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{19}H_{25}N_2O_4$  (345): 345  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{25}H_{36}N_5O_6$  (502): 504  $[M+2H]^+$ ,

VPK(Phloretin)PY *m/z* ber, für  $C_{39}H_{54}N_6O_9$  (750): 751 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{10}H_{17}N_2O_2$  (197): 197 [M]<sup>+</sup>, y4 *m/z* ber, für  $C_{34}H_{44}N_5O_8$  (650): 652 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-VQKQY *m/z* ber, für  $C_{39}H_{56}N_8O_{11}$  (812): 813 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{19}H_{27}N_3O_5$  (376): 376 [M]<sup>+</sup>, y3 *m/z* ber, für  $C_{20}H_{30}N_5O_6$  (436): 638 [M+2H]<sup>+</sup>,

VQK(Phloretin)QY *m/z* ber, für für  $C_{39}H_{56}N_8O_{11}$  (812): 813 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{10}H_{18}N_3O_3$  (228): 228 [M]<sup>+</sup>, y3 *m/z* ber, für  $C_{29}H_{38}N_5O_8$  (584): 586 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-VRKRY *m/z* ber, für  $C_{41}H_{64}N_{12}O_9$  (868): 689 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{20}H_{30}N_7O_4$  (404): 404 [M]<sup>+</sup>, y3 *m/z* ber, für  $C_{21}H_{34}N_7O_5$  (464): 466 [M+2H]<sup>+</sup>,

VRK(Phloretin)RY *m/z* ber, für für  $C_{41}H_{64}N_{12}O_9$  (868): 689 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{11}H_{22}N_5O_2$  (256): 256 [M]<sup>+</sup>, y3 *m/z* ber, für  $C_{23}H_{27}N_2O_5$  (612): 614 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-VSKSY *m/z* ber, für  $C_{35}H_{50}N_6O_{11}$  (730): 731 [M+H]<sup>+</sup>, y3 *m/z* ber, für  $C_{18}H_{27}N_4O_6$  (395): 397 [M+2H]<sup>+</sup>, y4 *m/z* ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_8$  (482): 484 [M+2H]<sup>+</sup>,

VSK(Phloretin)SY *m/z* ber, für  $C_{35}H_{50}N_6O_{11}$  (730): 731 [M+H]<sup>+</sup>, y3 *m/z* ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_8$  (543): 545 [M+2H]<sup>+</sup>, y4 *m/z* ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_{10}$  (630): 632 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-VTKTY *m/z* ber, für  $C_{37}H_{54}N_6O_{11}$  (758): 759 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{18}H_{25}N_2O_5$  (349): 349 [M]<sup>+</sup>, y4 *m/z* ber, für  $C_{23}H_{36}N_5O_8$  (510): 512 [M+2H]<sup>+</sup>,

VTK(Phloretin)TY *m/z* ber, für  $C_{37}H_{54}N_6O_{11}$  (758): 759 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_9H_{17}N_2O_3$  (201): 201 [M]<sup>+</sup>, y4 *m/z* ber, für  $C_{32}H_{44}N_5O_{10}$  (658): 660 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-VVKVY *m/z* ber, für  $C_{39}H_{58}N_6O_9$  (754): 755 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{19}H_{27}N_2O_4$  (347): 347 [M]<sup>+</sup>, y4 *m/z* ber, für  $C_{25}H_{40}N_5O_6$  (506): 508 [M+2H]<sup>+</sup>,

VVK(Phloretin)VY *m/z* ber, für  $C_{39}H_{58}N_6O_9$  (754): 755 [M+H]<sup>+</sup>, a2 *m/z* ber, für  $C_9H_{19}N_2O_1$  (171): 171 [M]<sup>+</sup>, y4 *m/z* ber, für  $C_{34}H_{48}N_5O_8$  (654): 656 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-VWKWY *m/z* ber, für  $C_{51}H_{60}N_8O_9$  (928): 929 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{25}H_{28}N_3O_4$  (434): 434 [M]<sup>+</sup>, y4 *m/z* ber, für  $C_{37}H_{42}N_7O_6$  (680): 682 [M+2H]<sup>+</sup>,

VWK(Phloretin)WY *m/z* ber, für  $C_{51}H_{60}N_8O_9$  (928): 929 [M+H]<sup>+</sup>, a2 *m/z* ber, für  $C_{15}H_{20}N_3O_1$  (258): 258 [M]<sup>+</sup>, y3 *m/z* ber, für  $C_{35}H_{40}N_5O_7$  (642): 644 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-VYKYY *m/z* ber, für  $C_{47}H_{58}N_6O_{11}$  (882): 883 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{23}H_{27}N_2O_5$  (411): 411 [M]<sup>+</sup>, y4 *m/z* ber, für  $C_{33}H_{40}N_5O_8$  (634): 636 [M+2H]<sup>+</sup>,

VYK(Phloretin)YY *m/z* ber, für für  $C_{47}H_{58}N_6O_{11}$  (882): 883 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{14}H_{19}N_2O_3$  (263): 263 [M]<sup>+</sup>, y3 *m/z* ber, für  $C_{33}H_{39}N_4O_8$  (619): 621 [M+2H]<sup>+</sup>,

### ESI-Fragmentierung von phloretylierten X<sub>aa</sub>AKAY Produkten

Phloretin-AAKAY *m/z* ber, für  $C_{33}H_{46}N_6O_9$  (670): 671 [M+H]<sup>+</sup>, b2 *m/z* ber, für  $C_{15}H_{19}N_2O_4$  (291): 291 [M]<sup>+</sup>, y4 *m/z* ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452 [M+2H]<sup>+</sup>,

AAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{33}H_{46}N_6O_9$  (670): 671  $[M+H]^+$ , y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-EAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{35}H_{48}N_6O_{11}$  (728): 729  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{17}H_{21}N_2O_6$  (349): 349  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452  $[M+2H]^+$ ,

EAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{35}H_{48}N_6O_{11}$  (728): 729  $[M+H]^+$ , y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-FAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{39}H_{50}N_6O_9$  (746): 747  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452  $[M+2H]^+$ ,

FAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{39}H_{50}N_6O_9$  (746): 747  $[M+H]^+$ , y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-GAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{32}H_{44}N_6O_9$  (656): 657  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{14}H_{17}N_2O_4$  (277): 277  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452  $[M+2H]^+$ ,

GAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{32}H_{44}N_6O_9$  (656): 657  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_5H_9N_2O_2$  (129): 129  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-HAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{36}H_{48}N_8O_9$  (736): 737  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{18}H_{21}N_4O_4$  (357): 357  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452  $[M+2H]^+$ ,

HAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{36}H_{48}N_8O_9$  (736): 737  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_9H_{13}N_4O_2$  (209): 209  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-IAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{36}H_{52}N_6O_9$  (712): 713  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{18}H_{25}N_2O_4$  (333): 333  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452  $[M+2H]^+$ ,

IAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{36}H_{52}N_6O_9$  (712): 713  $[M+H]^+$ , y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-LAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{36}H_{52}N_6O_9$  (712): 713  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{18}H_{25}N_2O_4$  (333): 333  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452  $[M+2H]^+$ ,

LAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{36}H_{52}N_6O_9$  (712): 713  $[M+H]^+$ , y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-MAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{35}H_{50}N_6O_9S_1$  (730): 731  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{17}H_{23}N_2O_4S_1$  (351): 351  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452  $[M+2H]^+$ ,

MAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{35}H_{50}N_6O_9S_1$  (730): 731  $[M+H]^+$ , y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529  $[M+2H]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600  $[M+2H]^+$ ,

Phloretin-PAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{35}H_{48}N_6O_9$  (696): 697  $[M+H]^+$ , b2  $m/z$  ber, für  $C_{17}H_{21}N_2O_4$  (317): 317  $[M]^+$ , y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452  $[M+2H]^+$ ,

PAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{35}H_{48}N_6O_9$  (696): 697 [M+H]<sup>+</sup>, y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529 [M+2H]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-QAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{35}H_{49}N_7O_{10}$  (727): 728 [M+H]<sup>+</sup>, b2  $m/z$  ber, für  $C_{17}H_{22}N_3O_5$  (348): 348 [M]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452 [M+2H]<sup>+</sup>,

QAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{35}H_{49}N_7O_{10}$  (727): 728 [M+H]<sup>+</sup>, b2  $m/z$  ber, für  $C_8H_{14}N_3O_3$  (200): 200 [M]<sup>+</sup>,

Phloretin-RAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{36}H_{53}N_9O_9$  (755): 756 [M+H]<sup>+</sup>, y3  $m/z$  ber, für  $C_{18}H_{27}N_4O_5$  (379): 381 [M+2H]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452 [M+2H]<sup>+</sup>,

RAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{36}H_{53}N_9O_9$  (755): 756 [M+H]<sup>+</sup>, b2  $m/z$  ber, für  $C_9H_{18}N_5O_2$  (228): 228 [M]<sup>+</sup>, y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-SAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{33}H_{46}N_6O_{10}$  (686): 687 [M+H]<sup>+</sup>, b2  $m/z$  ber, für  $C_{15}H_{19}N_2O_5$  (307): 307 [M]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452 [M+2H]<sup>+</sup>,

SAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{33}H_{46}N_6O_{10}$  (686): 687 [M+H]<sup>+</sup>, y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529 [M+2H]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-TAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{34}H_{48}N_6O_{10}$  (700): 701 [M+H]<sup>+</sup>, b2  $m/z$  ber, für  $C_{16}H_{21}N_2O_5$  (321): 321 [M]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452 [M+2H]<sup>+</sup>,

TAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{34}H_{48}N_6O_{10}$  (700): 701 [M+H]<sup>+</sup>, y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529 [M+2H]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-VAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{35}H_{50}N_6O_9$  (698): 699 [M+H]<sup>+</sup>, b2  $m/z$  ber, für  $C_{17}H_{23}N_2O_4$  (319): 319 [M]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452 [M+2H]<sup>+</sup>,

VAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{35}H_{50}N_6O_9$  (698): 699 [M+H]<sup>+</sup>, y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529 [M+2H]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-WAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{41}H_{51}N_7O_9$  (785): 786 [M+H]<sup>+</sup>, b2  $m/z$  ber, für  $C_{23}H_{24}N_3O_4$  (406): 406 [M]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452 [M+2H]<sup>+</sup>,

WAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{41}H_{51}N_7O_9$  (785): 786 [M+H]<sup>+</sup>, y3  $m/z$  ber, für  $C_{27}H_{35}N_4O_7$  (527): 529 [M+2H]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600 [M+2H]<sup>+</sup>,

Phloretin-YAKAY  $m/z$  ber, für  $C_{39}H_{50}N_6O_{10}$  (762): 763 [M+H]<sup>+</sup>, a1  $m/z$  ber, für  $C_{17}H_{18}N_1O_3$  (284): 284 [M]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{21}H_{32}N_5O_6$  (450): 452 [M+2H]<sup>+</sup>,

YAK(Phloretin)AY  $m/z$  ber, für  $C_{39}H_{50}N_6O_{10}$  (762): 763 [M+H]<sup>+</sup>, b2  $m/z$  ber, für  $C_{12}H_{15}N_2O_3$  (235): 235 [M]<sup>+</sup>, y4  $m/z$  ber, für  $C_{30}H_{40}N_5O_8$  (598): 600 [M+2H]<sup>+</sup>,

### **Ergebnisse der Peptidacylierungsreaktionen**

**Tabelle A1.** Biotinylierung von H-GAKAY-OH: *re*-Werte und relative Produktausbeuten

Hauptlösungsmittel	Umsatz [%]	<i>re</i>	<i>N</i> <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>ε</sup> Acylierung [%]
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	40	-0,74	34	5	61
[BMIM][SCN]	63	-0,45	64	24	13
[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	51	0,24	26	42	33
NaCl-Lösung	68	0,46	14	38	48
MOPS-Puffer	70	0,49	14	42	43
[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	49	0,84	4	49	46
[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	48	0,91	3	52	45

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) Hauptlösungsmittel, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Biotin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% (± 2,5%).

**Tabelle A2.** Phloretylierung von H-GAKAY-OH: *re*-Werte und relative Produktausbeuten

Hauptlösungsmittel	Umsatz [%]	<i>re</i>	<i>N</i> <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>ε</sup> Acylierung [%]
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	41	-0,96	49	1	50
[BMIM][SCN]	66	-0,05	48	43	9
[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	56	0,28	19	34	47
NaCl-Lösung	69	0,39	18	41	41
MOPS-Puffer	71	0,42	19	46	35
[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	48	0,88	4	63	33
[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	49	0,88	5	80	15

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) Hauptlösungsmittel, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% (± 2,5%).

**Tabelle A3.** Furoylierung von H-GAKAY-OH: *re*-Werte und relative Produktausbeuten

Hauptlösungsmittel	Umsatz [%]	<i>re</i>	<i>N</i> <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>ε</sup> Acylierung [%]
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	37	-0,89	68	4	28
[BMIM][SCN]	54	-0,23	56	35	9
[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	50	-0,01	30	29	41
NaCl-Lösung	62	0,51	16	50	35
MOPS-Puffer	63	0,50	17	51	33
[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	41	0,64	14	63	24
[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	43	0,76	10	71	19

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) Hauptlösungsmittel, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Fur-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% (± 2,5%).



**Tabelle A4. Acylierung von H-GAKAY-OH in einer [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]/Wasser-Mischung:** IF-Konzentrationabhängigkeit der *re*-Werte und der relativen Produktausbeute

[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]/ Wasser-Mischung	Umsatz [%]	<i>re</i>	N <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> ,N <sup>ε</sup> Acylierung [%]
0/1	71	0,42	19	46	35
1/4	68	0,49	18	52	31
1/1	56	0,59	15	58	27
4/1	51	0,75	10	71	20
1/0	48	0,88	4	63	33

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF-Wasser Mischung, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner 5% (± 2,5%).

**Tabelle A5. Acylierung von H-GAKAY-OH in einer [EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]/Wasser-Mischung:** IF-Konzentrationabhängigkeit der *re*-Werte und der relativen Produktausbeute

[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]/ Wasser-Mischung	Umsatz [%]	<i>re</i>	N <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> ,N <sup>ε</sup> Acylierung [%]
0/1	71	0,42	19	46	35
1/4	65	0,18	21	31	48
1/1	51	-0,12	30	24	46
4/1	43	-0,64	62	14	24
1/0	41	-0,96	49	1	50

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF-Wasser Mischung, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner 5% (± 2,5%).

**Tabelle A6. Acylierung von H-GAKAY-OH in einer [EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]/[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]-Mischung:** IF-Konzentrationabhängigkeit der *re*-Werte und der relativen Produktausbeute

[EMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]/ [EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]- Mischung	Umsatz [%]	<i>re</i>	N <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> ,N <sup>ε</sup> Acylierung [%]
0/1	41	-0,96	49	1	50
1/4	43	-0,66	63	13	24
1/1	46	0,17	29	41	30
4/1	46	0,64	12	55	33
1/0	48	0,88	4	63	33

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF-IF Mischung, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

**Tabelle A7. Biotinylierung von längeren Peptiden:** Umsatz, *re*-Werte und relative Produktausbeuten

IF/Peptide	Umsatz [%]	<i>re</i>	<i>N</i> <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>ε</sup> Acylierung [%]
<i>[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
LIVDAVLEPVKAAGAY	36	0,27	27	47	25
VVFSAPVLEPTGPLHT	24	0,50	20	60	20
QFGYHIIKVLARN					
<i>[BMIM][SCN]</i>					
LIVDAVLEPVKAAGAY	61	0,03	34	36	30
VVFSAPVLEPTGPLHT	58	-0,35	46	22	32
QFGYHIIKVLARN					
<i>[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
LIVDAVLEPVKAAGAY	23	-0,96	67	1	32
VVFSAPVLEPTGPLHT	22	-0,90	92	5	3
QFGYHIIKVLARN					

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) Hauptlösungsmittel, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Biotin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

**Tabelle A8. Furoylierung von längeren Peptiden:** Umsatz, *re*-Werte und relative Produktausbeuten

IF/Peptide	Umsatz [%]	<i>re</i>	<i>N</i> <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>ε</sup> Acylierung [%]
<i>[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
LIVDAVLEPVKAAGAY	37	0,12	38	48	14
VVFSAPVLEPTGPLHT	21	0,12	37	47	15
QFGYHIIKVLARN					
<i>[BMIM][SCN]</i>					
LIVDAVLEPVKAAGAY	55	-0,25	40	24	36
VVFSAPVLEPTGPLHT	49	-0,53	52	16	32
QFGYHIIKVLARN					
<i>[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
LIVDAVLEPVKAAGAY	22,5	-0,52	73	23	4
VVFSAPVLEPTGPLHT	23	-0,98	98	1	1
QFGYHIIKVLARN					

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) Hauptlösungsmittel, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Fur-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

**Tabelle A9. Phloretylierung von längeren Peptiden:** Umsatz, *re*-Werte und relative Produktausbeuten

<i>IF/Peptide</i>	Umsatz [%]	<i>re</i>	<i>N</i> <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>ε</sup> Acylierung [%]
<i>[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
LIVDAVLEPVKAAGAY	33	0,38	27	60	13
VVFSAPVLEPTGPLHT	21	0,49	20	59	21
QFGYHIIKVLRYN					
<i>[BMIM][SCN]</i>					
LIVDAVLEPVKAAGAY	42	0,16	28	39	33
VVFSAPVLEPTGPLHT	48	0,09	29	35	36
QFGYHIIKVLRYN					
<i>[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
LIVDAVLEPVKAAGAY	29	-0,65	78	16	6
VVFSAPVLEPTGPLHT	22	-0,98	95	1	5
QFGYHIIKVLRYN					

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) Hauptlösungsmittel, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% (± 2,5%).

**Tabelle A10. Phloretylierung der H-VX<sub>aa</sub>KX<sub>aa</sub>Y-OH Bibliothek**

<i>IF/Peptid</i>	Umsatz [%]	<i>re</i>	<i>N</i> <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>ε</sup> Acylierung [%]
<i>[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
VEKEY	36	0,02	43	45	12
VFKFY	29	0,08	36	43	21
VGKGY	23	0,07	33	38	29
VHKHY	32	0,14	28	37	35
VIKIY	21	0,50	17	52	30
VLKLY	22	0,42	21	52	26
VMKMY	20	0,37	23	49	28
VNKNY	22	0,04	38	42	20
VPKPY	35	0,60	15	60	25
VQKQY	23	0,36	16	34	51
VRKRY	28	0,50	14	43	43
VSKSY	45	0,23	26	42	32
VTKTY	38	0,36	20	42	38
VVKVY	22	0,51	19	57	24
VWKWY	33	0,22	25	38	37
VYKYY	20	0,51	19	57	24

*[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]*

VEKEY	33	-1,00	94	0	7
VFKFY	28	-0,96	93	2	5
VGKGY	21	-0,96	94	2	4
VHKHY	23	-1,00	95	0	5
VIKIY	24	-0,94	85	2	12
VLKLY	21	-0,95	88	2	10
VMKMY	23	-0,89	77	5	18
VNKNY	21	-0,91	89	4	7
VPKPY	30	-0,97	75	1	24
VQKQY	24	-1,00	57	0	53
VRKRY	25	-1,00	92	0	8
VSKSY	41	-1,00	97	0	3
VTKTY	37	-1,00	91	0	9
VVKVY	20	-0,88	88	6	6
VWKWY	27	-0,86	87	6	7
VYKYY	18	-0,88	88	6	6

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

**Tabelle A11.** Phloretylierung der H-X<sub>aa</sub>AKAY-OH Bibliothek

<i>IF/Peptid</i>	Umsatz [%]	<i>re</i>	N <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> ,N <sup>ε</sup> Acylierung [%]
<i>[EMIM] [Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
AAKAY	42	0,31	24	46	30
EAKAY	51	0,41	18	43	39
FAKAY	21	0,08	27	32	41
GAKAY	48	0,88	4	63	33
HAKAY	43	0,38	25	56	19
IAKAY	32	0,26	28	48	24
LAKAY	34	0,38	18	49	33
MAKAY	23	0,40	22	51	26
PAKAY	37	0,13	39	51	9
QAKAY	54	0,41	24	58	18
RAKAY	51	0,09	30	36	34
SAKAY	38	0,48	16	45	39
TAKAY	39	0,39	24	55	21
VAKAY	47	0,29	29	53	17
WAKAY	28	0,30	29	54	16
YAKAY	47	0,25	25	42	33

[EMIM] [Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

AAKAY	27	-0,91	65	3	32
EAKAY	15	-0,75	56	8	36
FAKAY	27	-0,90	55	3	42
GAKAY	41	-0,96	49	1	50
HAKAY	29	-0,55	75	22	3
IAKAY	15	-1,00	85	0	15
LAKAY	17	-0,62	60	14	26
MAKAY	36	-0,83	74	7	19
PAKAY	17	-1,00	100	0	0
QAKAY	14	-0,40	46	20	34
RAKAY	16	-0,97	78	1	21
SAKAY	18	-0,88	78	5	17
TAKAY	24	-1,00	92	0	8
VAKAY	35	-0,98	97	1	2
WAKAY	16	-0,87	87	6	7
YAKAY	35	-0,46	68	25	7

*H<sub>2</sub>O*

AAKAY	81	-0,16	33	24	43
DAKAY	80	-0,60	48	12	40
EAKAY	82	-0,23	34	22	44
FAKAY	46	-0,51	51	17	32
GAKAY	71	0,42	19	46	35
HAKAY	70	-0,52	65	21	14
IAKAY	83	-0,42	42	17	41
LAKAY	61	-0,26	36	22	42
PAKAY	65	-0,36	35	16	48
QAKAY	55	-0,41	34	13	53
RAKAY	59	0,67	13	65	22
SAKAY	46	-0,65	58	12	30
TAKAY	52	-0,73	65	10	25
VAKAY	52	-0,36	38	17	45
WAKAY	44	-0,50	31	10	59
YAKAY	49	0,65	9	40	51

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

**Tabelle A12. Phloretylierung von H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH in C2-methylierten IFs: Umsatz, *re*-Werte und relative Produktausbeuten**

IF	Umsatz	<i>re</i>	N <sup>ε</sup> -Acylierung	N <sup>α</sup> -Acylierung	N <sup>α</sup> ,N <sup>ε</sup> Acylierung
----	--------	-----------	----------------------------	----------------------------	---

			[%]	[%]	[%]
[MMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	31	0,50	24	73	3
[MMMIM][Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	39	0,29	21	38	40
[EMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	34	-0,75	60	9	31
[EMMIM][Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	37	-0,36	41	19	40

Bedingungen: T=30 °C, pH=8,2, 80% (m/m) IF, 10% (m/m) DMF, 10% (m/m) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

**Tabelle A13. Phloretylierung bei 4 °C: Umsatz, *re*-Werte und relative Produktausbeuten**

IF/Peptid	Umsatz [%]	<i>re</i>	N <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> ,N <sup>ε</sup> Acylierung [%]
<i>[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
GAKAY	23	0,91	3	70	17
LIVDAVLEPVKAAGAY	20	0,57	19	69	12
VVFSAPVLEPTGPLHT	14	0,73	11	71	18
QFGYHIIKVLRYN					
<i>[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
GAKAY	21	-0,63	53	12	35
LIVDAVLEPVKAAGAY	21	-0,45	64	24	12
VVFSAPVLEPTGPLHT	17	-0,32	60	31	9
QFGYHIIKVLRYN					

Bedingungen: T=4 °C, pH=8,2, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

**Tabelle A13. Phloretylierung bei pH 7,5: Umsatz, *re*-Werte und relative Produktausbeuten**

IF/Peptid	Umsatz [%]	<i>re</i>	N <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> -Acylierung [%]	N <sup>α</sup> ,N <sup>ε</sup> Acylierung [%]
<i>[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
GAKAY	10	0,92	3	72	15
LIVDAVLEPVKAAGAY	7	0,56	19	67	14
VVFSAPVLEPTGPLHT	6	0,63	15	67	18
QFGYHIIKVLRYN					
<i>[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
GAKAY	8	-0,54	47	14	39
LIVDAVLEPVKAAGAY	5	-0,30	64	34	2
VVFSAPVLEPTGPLHT	4	-0,60	73	18	9
QFGYHIIKVLRYN					

Bedingungen: T=30 °C, pH=7,5, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% ( $\pm 2,5\%$ ).

**Tabelle A14. Phloretylierung von Peptiden mit verkürzter Lysinseitenkette:** Umsatz, *re*-Werte und relative Produktausbeuten

<i>IF/Peptid</i>	Umsatz [%]	<i>re</i>	<i>N</i> <sup>ε</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> -Acylierung [%]	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>ε</sup> Acylierung [%]
<i>[EMIM][Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
MAKAY	23	0,40	15	67	18
MA-Orn-AY	21	0,49	19	67	14
MA-DAB-AY	19	0,66	3	72	15
<i>[EMIM][Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]</i>					
MAKAY	36	-0,83	74	7	19
MA-Orn-AY	32	-0,59	67	17	16
MA-DAB-AY	33	-0,31	59	31	10

Bedingungen: T=30 °C, pH=7,5, 80% (v/v) IF, 10% (v/v) DMF, 10% (v/v) MOPS-Puffer (c=50 mM), c(Peptid)=c(Phloretin-OSu)=1,6 mM, Fehler waren kleiner als 5% (± 2,5%).