

FRIEDRICH CRAMER und HEINZ SCHALLER

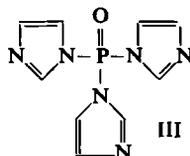
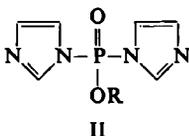
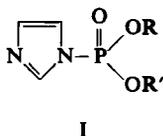
Zur Chemie der „energiereichen Phosphate“, XIII¹⁾**Phosphorylierungsreaktionen mit Diestern der Imidazolylphosphonsäure und Monoestern der Diimidazolylphosphinsäure**

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

(Eingegangen am 18. Oktober 1960)

Die voll veresterten Imidazolide der Phosphorsäure I, II und III sind wirksame Phosphorylierungsmittel. In Diimidazolyl-(1)-phosphinsäureestern (II) können ein oder zwei Imidazolyl-(1)-Reste durch Alkoxy- oder Aminogruppen ersetzt werden. II liefert mit Carbonsäuren Acylimidazole (VI), was zu einer neuen Peptidsynthese benutzt werden kann. Triimidazolyl-(1)-phosphinoxyd (III) ist eine sehr reaktionsfähige Verbindung, die mit Alkoholen Triester, mit Aminen Triamide der Orthophosphorsäure liefert.

Diester der Imidazolyl-(1)-phosphonsäure (I), Monoester der Diimidazolyl-(1)-phosphinsäure (II) und Triimidazolyl-(1)-phosphinoxyd (III) sind aus den entsprechen-



den Säurechloriden und Imidazol leicht zugänglich²⁾. Diese voll veresterten Imidazolylphosphonsäuren sind in zwei Vertretern, dem Diphenyl- und dem Dibenzyl-imidazolylphosphonat (I, R und R' = C₆H₅ bzw. C₇H₇) bereits von J. BADDILEY³⁾ beschrieben worden, der auch ihre phosphorylierenden Eigenschaften erkannt hat. Wir berichten hier im Zusammenhang über die Reaktionen von I, II und III; diese Verbindungen sind im Vergleich zu den Salzen der Imidazolylphosphonsäuren¹⁾ reaktionsfähiger, die Phosphorylierungsreaktionen sind nicht abhängig von der Protonenkonzentration.

1. REAKTION VON I UND II; EINE NEUE PEPTIDSYNTHESE

Die Reaktionen der vollveresterten Imidazolylphosphonate I und II führen meist zu den gleichen Resultaten wie die Umsetzungen der entsprechenden Säurechloride, wir haben daher die Reaktionen z. T. nur chromatographisch verfolgt.

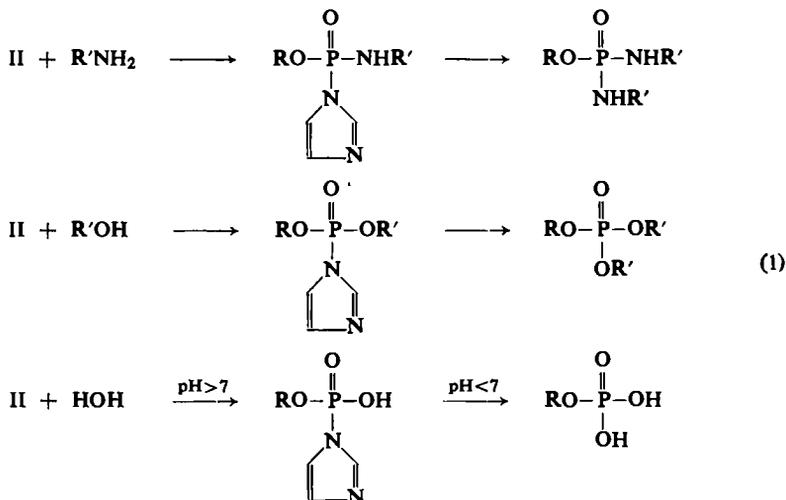
Diesterimidazolylphosphonate wurden bereits von BADDILEY untersucht³⁾, jedoch nicht in Substanz isoliert. Ihre Lösungen geben mit Aminen Phosphorsäure-diesteramide, mit Alkoholen Phosphorsäuretriester und mit Carbonsäuren eine „Aktivierung“ der Carbonsäure.

¹⁾ XII. Mitteil.: H. SCHALLER, H. A. STAAB und F. CRAMER, Chem. Ber. 94, 1621 [1961], vorstehend.

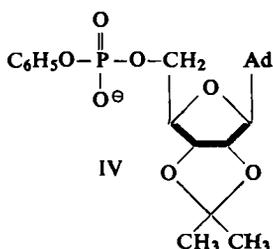
²⁾ F. CRAMER, H. SCHALLER XI. Mitteil., und H. A. STAAB, Chem. Ber. 94, 1612 [1961].

³⁾ J. BADDILEY, J. G. BUCHANAN und R. LETTERS, J. chem. Soc. [London] 1956, 2812.

Monoester-diimidazolylphosphinate (II) sind äußerst hygroskopische Substanzen, die unter Feuchtigkeitszutritt schnell in die Imidazoliumsalze der Monoester-imidazolylphosphonate übergehen. In den Standardreaktionen reagieren sie sehr schnell zum Mono- und anschließend teilweise zum Disubstitutionsprodukt (Gl. 1):



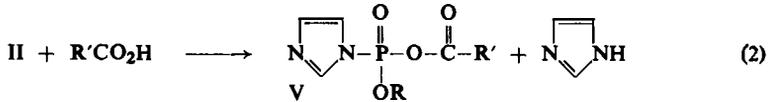
Hydrolyse führt zunächst zum Monoimidazolid, saure Hydrolyse daraus weiter zur Monoesterphosphorsäure. Auch bei Alkoholyse und Aminolyse kann man das Monosubstitutionsprodukt erhalten. Beim Arbeiten mit geringem Überschuß von Alkohol oder Amin und schnell folgender Hydrolyse der zweiten Imidazolidgruppe entsteht das Monosubstitutionsprodukt in 60–90-proz. Ausbeute. Auf diese Weise erhielten wir den Monophenylester IV der Isopropyliden-adenosin-5'-phosphorsäure aus II und Isopropyliden-adenosin.



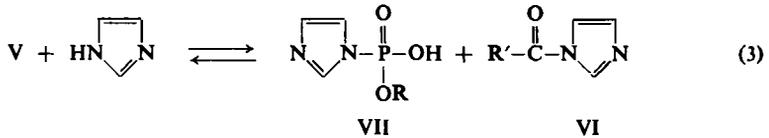
Vorzuziehen ist allerdings in den meisten Fällen die vorherige, partielle Hydrolyse mit einem Mol. Wasser zum Monoimidazolylphosphonat, welches anschließend als Salz der Imidazolylphosphonsäure weiter umgesetzt werden kann.

Die Reaktion von II mit Carbonsäuren⁴⁾, die bei den Monoester-imidazolylphosphonaten nur mit mäßiger Ausbeute verläuft¹⁾, liefert hier eine Verbindung mit aktiver Acylgruppe in hoher Ausbeute. Aus II und Benzoesäure erhielten wir nach anschließender Aminolyse mit Anilin 98% Benzanilid bzw. mit Zimtsäure 75% Zimtanilid.

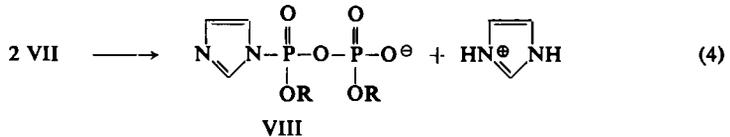
⁴⁾ An diesen Untersuchungen war Frl. Dipl.-Chem. E. EHRHARDT entscheidend beteiligt.



Wahrscheinlich bildet sich primär ein Phosphorsäure-Carbonsäure-Anhydrid V (Gl. 2), doch kann man in der Reaktionslösung auch Carbonsäure-imidazolid (VI) nachweisen (UV-Bande bei 250 m μ). Dies kann nur bei der Spaltung von V durch Imidazol entstanden sein (Gl. 3).

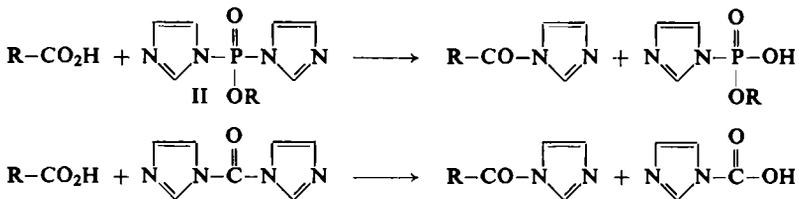


Eine ähnliche Reaktion ist vom Acetylphosphat bekannt⁵⁾. Die freie Imidazolylphosphonsäure VII aus (3) phosphoryliert ein zweites Mol. VII zu einem Imidazolylphosphonat (VIII) (Gl. 4).



Beim Arbeiten in unpolaren Lösungsmitteln fällt VIII als Salz aus und verschiebt damit das Gleichgewicht in Reaktion Gl. (3) ganz nach rechts, die Lösung enthält nur noch Carbonsäure-imidazolid (UV-Spektrum, mit Anilin 93% Anilid).

Man erzielt also mit II („Phosphoryldiimidazol“) das gleiche Ergebnis wie mit Carbonyldiimidazol^{6,7)}.



In beiden Fällen wird die Reaktion dadurch quantitativ, daß sich ein Anhydrid bildet, welches aus dem System ausscheidet: CO₂ als Gas, Diphosphat als Salz.

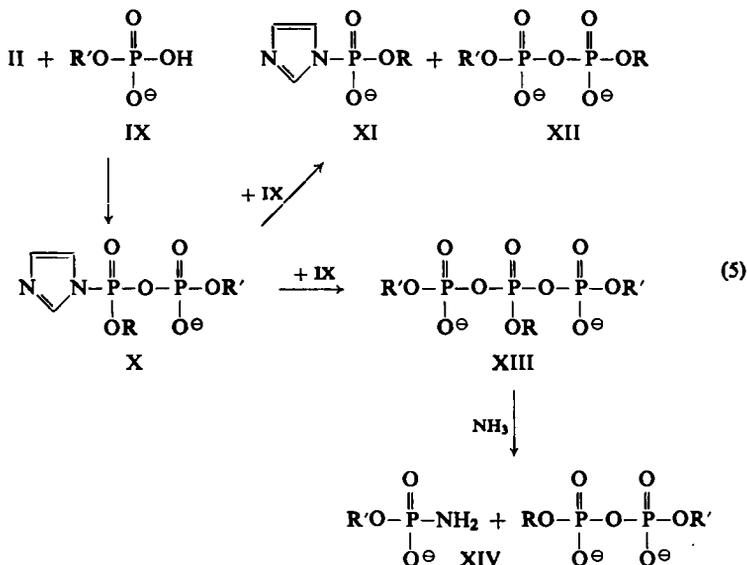
Damit sind die Voraussetzungen für eine Peptidsynthese gegeben. Die Umsetzung von II mit Carbobenzoxy-alanin in Acetonitril und nachfolgende Reaktion mit Alanin in wäßriger Lösung bei pH 8 ergab 85% Carbobenzoxy-alanyl-alanin. Mit der genaueren Untersuchung der neuen Reaktion sind wir z. Z. beschäftigt.

⁵⁾ E. R. STADTMAN und F. H. WHITE, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2022 [1953].

⁶⁾ H. A. STAAB, Angew. Chem. **71**, 164 [1959]; **71**, 194 [1959].

⁷⁾ G. W. ANDERSON und R. PAUL, J. Amer. chem. Soc. **80**, 4423 [1958].

Die Reaktion von II mit Phosphorsäureestern IX führt über X zu Diesterdiphosphaten XII und Triestertriphosphaten XIII auf folgenden Wegen (Gl. 5):

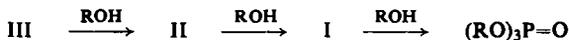


Die Verbindung X kann wie ein Triesterpyrophosphat⁸⁾ auch unter Übertragung der rechten Hälfte reagieren, wobei neben Pyrophosphat (XII) Imidazolylphosphonsäure (XI) entsteht, die ihrerseits zu XII weiterreagiert. Der Nachweis des Triestertriphosphats (XIII, R = Thymyl, R' = Phenyl) im Reaktionsgemisch gelang durch Spaltung mit Ammoniak, was zum Phosphorsäure-monophenylester-amid (XIV, R' = C₆H₅) führte, das chromatographisch nachgewiesen wurde.

2. REAKTION VON TRIIMIDAZOLYLPHOSPHINOXYD (III)

III ist eine sehr hygroskopische Substanz, die an der Luft innerhalb weniger Minuten unter Hydrolyse zerfließt. Daher entsteht bei der Darstellung immer etwas Imidazoliumsalz des Diimidazolylphosphinates. Dieses ist jedoch als Salz in Tetrahydrofuran und Aceton unlöslich und kann von der Triimidazolidlösung leicht abgetrennt werden.

Mit einem Überschuß an *Wasser* reagiert III unter Aufzischen zur Imidazolylphosphonsäure und Orthophosphat. Mit *Aminen* erfolgt exotherme Reaktion. Das Chromatogramm zeigt Di- und Triamid. Mit *Alkoholen* ist die Reaktion stark exotherm und führt bei Alkoholüberschuß zum Di- und Triester. Daneben ist im Chromatogramm anfangs auch das Monoester-imidazolylphosphonat (XI) zu erkennen, welches aus II unter den Bedingungen der Chromatographie durch Hydrolyse entsteht:



⁸⁾ F. CRAMER und R. WITTMANN, Chem. Ber. 94, 322 [1960].

Interessant ist hier die Frage, ob sich durch successive Zugabe verschiedener Alkohole in abgestufter Reaktion Phosphorsäureester mit verschiedenen Substituenten darstellen lassen.

Aus III und Monoesterphosphorsäuren erhält man ein Gemisch von Estern der Di- und Triphosphorsäure, das bisher noch nicht näher charakterisiert wurde.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

A. Reaktion von II, Peptidsynthese

1. *Cyclohexylammoniumsalz des Phosphorsäure-phenylester-cyclohexylamids*: Zu 0.422 g *Phosphorsäure-monophenylester-chlorid* (2 mMol) wurden 10 ccm Acetonitril und anschließend 0.544 g Imidazol (8 mMol) gegeben. Nach Abfiltrieren des ausgeschiedenen Imidazolhydrochlorides unter Feuchtigkeitsausschluß wurden der Lösung 0.198 g *Cyclohexylamin* (2 mMol) zugesetzt und 15 Min. auf 70° erwärmt. Nach Zugabe von 0.036 ccm Wasser (2 mMol) wurde 4 Stdn. auf 60° erwärmt. Eine im Verlauf der Reaktion ausgeschiedene geringe Menge kristallines Produkt wurde abgetrennt: 12 mg, Schmp. > 200°. Zur Lösung wurden 0.198 g *Cyclohexylamin* (2 mMol) gegeben und 12 Stdn. auf 60° erwärmt. Farblose, nadelige Kristalle hatten sich abgeschieden, die abfiltriert und mit Acetonitril gewaschen wurden. Ausb. 0.523 g (74% d. Th.); Schmp. 190–192°. R_F (A) 0.74.

$C_6H_{11}NH_2 \cdot C_{12}H_{18}NO_3P$ (354.4) Ber. N 7.91 P 8.76 Gef. N 8.02 P 8.93

2. *[4-Nitro-benzyl]-phenyl-phosphat*: 500 mg *p-Nitrobenzylalkohol* und 450 mg *O-Monophenyl-diimidazolyl-(1)-phosphinat* wurden 15 Stdn. bei 75° gehalten. Dann wurde in 10 ccm Wasser/Aceton (1:1) gelöst und mit 0.5 ccm *Cyclohexylamin* das Salz gefällt. Ausb. 609 mg (91% d. Th.). Schmp. 182–185°, Misch-Schmp. 184°. R_F (A) 0.70.

3. *2'.3'-Isopropyliden-adenosin-phenylphosphat*: 152 mg *Isopropyliden-adenosin* (0.495 mMol) und 280 mg II ($R = C_6H_5$) wurden in 4 ccm Acetonitril gelöst und 10 Stdn. bei 75° gehalten. Dann wurde eingedampft, mit Wasser aufgenommen, mit Triäthylamin alkalisch gemacht und zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt.

Die Chloroformphase enthielt nur wenig Diester und wurde verworfen. Die Wasserphase wurde mit 0.5 ccm *Cyclohexylamin* und gleichem Volumen Aceton versetzt und vom Diphenylpyrophosphat abfiltriert. Das Filtrat wurde zum Öl eingedampft, angeimpft und mit wenig Aceton digeriert. Ausb. 148 mg (53.5% d. Th.); Schmp. 207–211°, Misch-Schmp. 211°. R_F (A) 0.58.

4. *Benzoylimidazol*⁴⁾: 10 ccm einer äther. Lösung von 1.106 g *O-Thymyl-diimidazolylphosphinat* (3.36 mMol) wurden zu 402 mg *Benzoesäure* (3.30 mMol) gegeben. Einige Sekunden klare Lösung, dann Fällung eines Öls, das über Nacht erstarrt.

a) Ausb. 930 mg (102% d. Th.) *Imidazolyl-phosphonsäure-thymylester* oder Folgeprodukte, Schmp. 70–73°.

$C_{13}H_{17}N_2O_3P$ (280.2) Ber. C 55.71 H 6.11 N 10.00 P 11.05
Gef. C 52.54 H 5.97 N 10.06 P 10.54

100 mg des obigen Kristallisates wurden in 2 ccm Pyridin gelöst, und 70 mg *Phosphorsäure-monophenylester* zugegeben. Nach einem Tag bei Raumtemperatur war nur noch *P¹-Phenyl-P²-thymyl-pyrophosphat* in der Lösung nachzuweisen. Fällung mit *Cyclohexylamin* ergab 162 mg (Ausb. 78% d. Th.).

Erhitzte man 100 mg des obigen Kristallisates mit 0.2 ccm Anilin und 0.5 ccm Aceton und versetzte dann mit Wasser, so war im Chromatogramm kein Benzimidid, nur *Phosphorsäure-thymylester-anilid* (R_F , 0.74–0.79, in Lösungsm. A) nachzuweisen.

b) Das Filtrat wurde i. Vak. eingedampft. Ausb. 582 mg (100% d. Th.) *Benzoylimidazol*; die Substanz enthält keinen Phosphor. Es wurde mit 580 mg Anilin und 3 ccm Aceton versetzt, 5 Min. bei 50° gehalten und dann aufgearbeitet. Ausb. 610 mg (93% d. Th.) Benzanilid, Schmp. 161°, Misch-Schmp. 162°.

Das Filtrat wurde eingedampft, zweimal ausgeäthert und dann zur Trockne eingedampft. 210 mg Rückstand vom Schmp. 78°, aus Benzol umkristallisiert. Ausb. 172 mg (76% d. Th.) Imidazol, Schmp. 88–90°.

5. *P¹.P²-Dithymyl-P¹-imidazolid-diphosphat* (Gl. 4, VII → VIII): 700 mg *Imidazolium-imidazolylphosphonat* (2 mMol) wurden in Zentrifugenröhren in 1 ccm Wasser gelöst und 0.4 ccm konz. Salzsäure (0.25 mMol) unter Eiskühlung zugesetzt. Es schied sich ein Öl ab, das dreimal mit 2 ccm Eiswasser verrührt und zentrifugiert wurde. Dann wurden 10 ccm Äther zugesetzt. Das Öl kristallisierte. Jetzt wurde abfiltriert und mit Äther gewaschen. Ausb. 325 mg (46% d. Th.); Schmp. 79°.



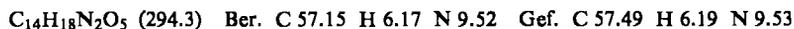
6. *Zimtsäureanilid* (Nachtr. b. d. Korr.): 0.367 g *Diimidazolylphosphinsäure-phenylester* (1.32 mMol), 0.186 g *Zimtsäure* (1.26 mMol) und 0.5 ccm Acetonitril wurden 3 Stdn. auf 70° erwärmt. Dann wurden 0.3 ccm *Anilin* zugesetzt und 2 Stdn. auf 70° erwärmt, das Reaktionsgemisch in Äther/Wasser (60 ccm:40 ccm) aufgenommen, die Ätherphase abgetrennt und die wäbr. Phase noch zweimal mit je 20 ccm Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit 1 n HCl, 2 n NaOH und mit Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und der Äther abgezogen. Zurück blieben 0.268 g Rohprodukt vom Schmp. 145°. Ausb. 95.5% d. Th. (bez. auf eingesetzte Zimtsäure). Umkristallisation aus Methanol/Aceton/Wasser (1:1:2) lieferte 0.212 g *Zimtsäureanilid* vom Schmp. 149° (Lit.: 150°), Ausb. 75.5% d. Th.

7. *Carbobenzoxy-alaninanilid*, *Carbobenzoxy-alanyl-alanin*: 865 mg II (*R* = C₆H₅) (3.15 mMol) und 659 mg *Carbobenzoxy-alanin* (2.99 mMol) wurden mit 2 ccm Acetonitril 12 Stdn. auf 45° erwärmt. Dann wurden bei Raumtemperatur 2 ccm Acetonitril und 200 mg Triäthylamin (2 mMol) — zum Lösen des Öls — zugesetzt. Gesamtmenge 4.847 g.

a) 894 mg (1 ccm) (0.55 mMol) davon wurden zu 0.35 ccm *Anilin* gegeben, 1 Stde. auf 60° erwärmt, und dann mit 10 ccm Wasser gefällt. Ausb. 150 mg (92% d. Th.) *Carbobenzoxy-alaninanilid*, Schmp. 148°.



b) 2 ccm der Imidazolidlösung (1.10 mMol) ließ man einer Lösung von 910 mg *Alanin* (2.1 mMol) in 1 ccm Wasser von pH 8–9 langsam zutropfen. Durch Zutropfen von 3.5 n NaOH wurde gleichzeitig der pH konstant gehalten (Phenolphthalein-Umschlagspunkt). Gesamtdauer: 15 Min. Nach 1 Stde. Nachrühren wurde mit 1 n HCl auf pH 3 angesäuert und die Fällung aus Wasser/Methanol umkristallisiert. Ausb. 272 mg (85% d. Th.) *Carbobenzoxy-alanyl-alanin*, Schmp. 136–140°.



8. *Reaktion von O-Thymyl-diimidazolylphosphinat mit 2 Moll. Phenylphosphat* (Gl. 5 zu XII, XIII und XIV.): 330 mg II (*R* = Thymyl) wurden in 1 ccm Pyridin gelöst und unter Rühren 350 mg *Monophenylphosphat* zugegeben, wobei die Temperatur der Lösung unter 40° gehalten wurde. Nach 1 Stde. bei Raumtemperatur zeigte das Chromatogramm A die gleichen Verbindungen wie nach einem Tag: viel *P¹.P²-Diphenyl-pyrophosphat* (*R_F* 0.48), viel *P¹-Phenyl-P²-thymyl-pyrophosphat* (*R_F* 0.66) und wenig *P¹.P²-Dithymyl-pyrophosphat* vom *R_F* 0.75.

Die Lösung wurde nun mit 2 ccm konz. Ammoniak versetzt und nach 10 Min. bei Raumtemperatur chromatographiert. Gleichzeitig wurde eine Lösung von Imidazolium-phenyl-

imidazolylphosphonat mit konz. Ammoniak versetzt und ebenfalls chromatographiert: Nur die erste Lösung zeigte nach dieser Zeit eine Bildung von *Phosphorsäure-monophenylesteramid*, ca. 5–10% (R_F 0.42), die im Verlauf von 3 Tagen nicht zunahm, während in der Imidazolidlösung immer mehr Amid entstanden war.

B. Reaktionen von Triimidazolylphosphinoxyd

1. *III* + *n*-Butylamin: 125 mg *III* (0.5 mMol) wurden in 1 ccm *n*-Butylamin gelöst, wobei Erwärmung auf 50° eintrat. Das Chromatogramm A zeigte einen Hauptfleck mit R_F 0.90 (*Phosphorsäure-tributylamid*) neben Flecken vom R_F 0.61 und 0.35. Gleiche Produkte waren bei der Umsetzung POCl_3 + *n*-Butylamin entstanden.

2. *III* + *Methanol*: 125 mg *III* (0.5 mMol) wurden in 1 ccm absol. *Methanol* gelöst: der Ansatz kam zum Kochen. Das Chromatogramm wies neben Imidazol vom R_F 0.75 drei Flecken auf: Trimethylphosphat (R_F 0.85), Dimethylphosphat (R_F 0.44) und nach 1 Stde. auch noch *O*-Methylimidazolylphosphonat (R_F 0.57). Nach 2 Tagen bei Raumtemperatur wurde eingedampft und mit Aceton aufgenommen. Es kristallisierte *Dimethylphosphat* (*Imidazoliumsalz*) aus. Ausb. 72 mg (74% d. Th.), Schmp. 122°.

3. *Methylbenzylphosphat*, *O*-Methylimidazolylphosphonat: 4.45 g *Imidazol* (6.45 mMol) wurden in 50 ccm Acetonitril gelöst und 1 ccm = 1.65 g *Phosphoroxytrichlorid* (1.075 mMol) schnell zugesetzt. Die Lösung erwärmte sich auf ca. 50°, Imidazoliumchlorid fiel aus. Nach 1/2 Stde. wurde filtriert und das Filtrat sofort mit 0.4 ccm *Methanol* (10 mMol) versetzt. Die warme Lösung (ca. 35°) wurde 1 Stde. bei Raumtemperatur gerührt. Das Chromatogramm A zeigte viel *O*-Methylimidazolylphosphonat (R_F 0.53) neben *Diimidazolyl-phosphinsäure* (R_F 0.65) und etwas *Dimethylphosphat* (R_F 0.45). Eine Na^{\oplus} -Fällung von 1/10 der Lösung mit 0.2 g NaJ in 1 ccm Aceton ergab 155 mg eines Gemisches der Salze dieser Verbindungen.

Die Restlösung wurde mit 3 ccm Benzylalkohol versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 Tagen zeigte das Chromatogramm A sehr viel *Dibenzylphosphat* (R_F 0.77), neben etwas *Benzylmethylphosphat* (R_F 0.58) und *Dimethylphosphat*. Der Ansatz wurde verworfen.

4. *III* + *Phenylphosphat*: 90 mg *III* (0.36 mMol) wurden in 10 ccm *Pyridin* gelöst und 320 mg *Monophenylphosphat* (1.84 mMol) zugegeben. Die Lösung wurde heiß und blieb zunächst klar. Nach 1 Min. schied sich ein Öl ab, das bei Zugabe von 80 mg Triäthylamin wieder in Lösung ging. Das Chromatogramm A zeigte schon nach 1 Stde. die gleichen Verbindungen wie nach 3 Tagen bei Raumtemperatur: ca. 30% *Diphenylpyrophosphat* (R_F 0.46), *P¹.P³-Diphenyltriphosphat* (R_F 0.24), *Monophenylphosphat* (R_F 0.11).

Die Lösung wurde eingedampft, mit 10 ccm Wasser aufgenommen und 1 ccm Cyclohexylamin zugegeben. Es fiel das *Diphenylpyrophosphat* aus. Ausb. 252 mg (0.49 mMol). Im Filtrat befanden sich neben wenig *Orthophosphat* und *Imidazolidphosphat* ca. 50% *Diphenyltriphosphat* und 30% *Monophenylphosphat*.