

FRIEDRICH CRAMER, EKKEHARD SCHEIFFELE
und ARNULF VOLLMAR

Zur Chemie der „energiereichen Phosphate“, XVI¹⁾

**Die Synthese der Argininphosphorsäure und die Reaktion von
Isoureidophosphonaten mit Aminen**

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

(Eingegangen am 4. Dezember 1961)

Argininphosphorsäure (I) läßt sich durch Phosphorylierung von α -Cbo-Argininestern mit Bis-[4-nitro-benzyl]-phosphorsäure-chlorid und anschließende Hydrogenolyse der schützenden Gruppen in 55-proz. Ausbeute (bezogen auf *N*-Cbo-Arginin) darstellen. Eine zweite Methode, nach der Ornithin in alkalisch-wäßriger Lösung mit Isoureidophosphonat (VII) umgesetzt wird, liefert eine 75-proz. Ausbeute an Argininphosphorsäure (I). Diese Reaktion ist allgemein zur Darstellung von Guanididophosphonaten geeignet; so entsteht Glykocyaminphosphorsäure in 65-proz. Ausbeute. Ebenso lassen sich die entsprechenden *O*-Benzyl-guanididophosphonate (XI) durch Reaktion von *O*-Benzyl-cyanamidophosphonat (X), *O*-Benzyl-[*O*-methyl-isoureido]-phosphonat (IXa) bzw. *O*-Benzyl-[*S*-methyl-isothioureido]-phosphonat (IXb) mit Aminen darstellen.

Argininphosphorsäure (I) (*N*-Phospho-arginin),



das Phosphagen vieler Avertebraten, läßt sich aus Krebscheren als amorphes Bariumsalz isolieren^{2,3)}. Syntheserversuche führten bisher nicht zu der gewünschten Verbindung^{4,5)}.

In der Reihe unserer Untersuchungen über *N*-Phospho-guanidine (Synthese von *N*-Phospho-*N'*-alkyl-guanidinen^{6,7)}, von Kreatin- und Glykocyamidophosphorsäure⁸⁾) versuchten wir zu dieser zum Studium des Stoffwechsels im Muskel wichtigen Verbindung⁹⁾ zu gelangen. Die Synthese läßt sich auf zwei Wegen durchführen, einmal auf konventionelle Weise, ausgehend von Arginin, durch direkte Phosphorylierung und zum anderen durch Umsetzung von Ornithin mit *O*-Methyl-isoureidophosphonat¹⁰⁾.

1) XV. Mittell.: F. CRAMER und H. NEUNHOEFFER, Chem. Ber. **95**, 1664 [1962], vorstehend.

2) O. MEYERHOF und K. LOHMANN, Biochem. Z. **196**, 22 [1928].

3) A. H. ENNOR, J. F. MORRISON und H. ROSENBERG, Biochem. J. **62**, 358 [1956].

4) A. H. ENNOR und J. F. MORRISON, Physiol. Rev. **38**, 631 [1958].

5) E. BAMANN, L. F. SANCHEZ und H. TRAPMANN, Chem. Ber. **88**, 1850 [1955].

6) F. CRAMER und A. VOLLMAR, Chem. Ber. **91**, 911 [1958].

7) F. CRAMER und A. VOLLMAR, Chem. Ber. **91**, 919 [1958].

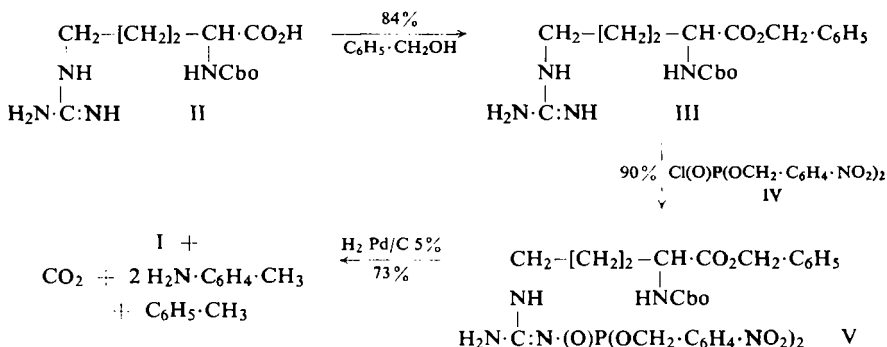
8) F. CRAMER und A. VOLLMAR, Chem. Ber. **92**, 392 [1959].

9) P. E. EGLETON und G. P. EGLETON, Biochem. J. **21**, 190 [1927].

10) Vorläuf. Mittell.: F. CRAMER, A. VOLLMAR und E. SCHEIFFELE, Angew. Chem. **72**, 211 [1960].

1. PHOSPHORYLIERUNG VON ARGININ

Nach L. ZERVAS¹¹⁾ aus L-Arginin-hydrochlorid dargestelltes *N*^α-Carbobenzoxy-arginin (II) wurde mit Benzylalkohol in Benzol unter Zusatz von Benzolsulfonsäure nach der allgemeinen Methode zur Darstellung von Aminosäure-benzylestern in das benzolsulfonsaure Salz des *N*^α-Carbobenzoxy-arginin-benzylesters (III) übergeführt. Nachdem Versuche zur Einführung des Phosphatrests mit Diphenyl- und Dibenzylphosphorsäurechlorid in Benzol zu keinem Ergebnis geführt hatten, setzten wir die wäßrige Suspension des benzolsulfonsauren Salzes von III mit Bis-[*p*-nitro-benzyl]-phosphorsäurechlorid (IV)¹²⁻¹⁴⁾ um. Auch dieses Reaktionsprodukt (V) war nicht kristallin. Jedoch gelang es, den oftmals mit Natriumhydrogencarbonat- und Kaliumhydrogensulfatlösung gewaschenen Sirup mit Palladium/Kohle in methanolischer Lösung zu hydrieren. Nach Aufnahme von etwa 9 Äquivv. Wasserstoff fielen farblose Kristalle aus, die aus wäßriger Lösung mit Aceton umgefällt werden konnten.



Das Papierchromatogramm zeigte nach Besprühen mit HANES-ISHERWOOD-Reagenz¹⁵⁾ neben wenig Orthophosphat (R_F 0.15 n-Propanol/ NH_3 /Wasser = 6:3:1, absteigend) einen Fleck mit R_F 0.18 (6:3:1), nach Besprühen mit Ninhydrinlösung neben Arginin (R_F 0.37) ebenfalls den Fleck mit R_F 0.18. Die gleichen Flecken (R_F 0.37 und 0.18) erhielten wir nach Besprühen mit alkohol. Salzsäure (Hydrolyse der P-N-Bindung) mit α -Naphthol und Diacetyllösung (VOGES-PROSKAUER-Reagenz auf Guanidine¹⁶⁾). Wurde die Substanz 7 Min. in 1*n* HCl auf 100° erhitzt, so zeigte anschließend das Chromatogramm nur noch Orthophosphat und Arginin.

Die im Hydriergefäß ausgefallene Substanz war also Argininphosphorsäure (I), verunreinigt durch Argininiumphosphat, das während der Hydrierung durch Hydrolyse entstanden war. Beim Aufbewahren nahm der Salzanteil zu. Der Versuch, unter Zusatz von Triäthylamin, Cyclohexylamin oder Bariumhydroxyd zu hydrieren, wobei dann direkt ein stabiles Salz der Argininphosphorsäure entstehen würde, mißlang.

11) L. ZERVAS, M. WINITZ und J. P. GREENSTEIN, J. org. Chemistry **22**, 1515 [1957].

12) G. FÖLSCH, Acta chem. scand. **10**, 686 [1956].

13) L. ZERVAS und I. DILARIS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 5354 [1955].

14) Übersicht über die präparat. Methoden: F. CRAMER, Angew. Chem. **72**, 236 [1960].

15) C. S. HANES und F. A. ISHERWOOD, Nature [London] **164**, 1107 [1949].

16) H. TUPPY und G. BODO, Mh. Chem. **85**, 1024 [1954].

I wurde über das Bariumsalz gereinigt; dieses ist in Wasser leicht, in 60-proz. Äthanol schwer löslich. Nach zweimaligem Umfällen war die Verbindung chromatographisch rein und entsprach der Formel $\text{Ba}(\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{P})_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$.

MEYERHOF und LOHMANN²⁾ hatten bei ihrer Isolierung aus Krebschieren das Bariumsalz in folgender Zusammensetzung erhalten: $\text{Ba}(\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{P})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. ENNOR, MORRISON und ROSENBERG³⁾ erhielten bei ihrer verbesserten Aufarbeitung wohl durch Absorption von CO_2 ein Bariumsalz der Zusammensetzung: $\text{BaC}_6\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{P} \cdot \text{H}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. G. E. HOBSON und K. R. REES¹⁷⁾ hatten 1955 verschiedene Tierextrakte papierchromatographisch auf ihren Phosphorgehalt untersucht und den R_F -Wert für Argininphosphorsäure im n-Propanol/Ammoniak/Wasser-Gemisch (6 : 3 : 1) absteigend mit 0.37 bzw. 0.39 angegeben. Für Arginin fanden sie 0.40. Auch wir konnten in diesem Fließmittel für Arginin R_F -Werte von 0.36—0.40 beobachten, wo hingegen unserer Argininphosphorsäure, wie erwähnt, der R_F -Wert 0.18 zukam. Wir glauben, daß die beiden Autoren sich von der Tatsache irreleiten ließen, daß Arginin selbst (wie verschiedene andere Aminosäuren und Amine) schwach auf das von ihnen verwendete Phosphatreagens¹⁵⁾ anspricht und ihnen so das Vorhandensein von Argininphosphorsäure vortäuschte. Im übrigen ist es höchst unwahrscheinlich, daß Arginin und Argininphosphorsäure so wenig im R_F -Wert auseinanderliegen. Glykocamin und Glykocaminphosphorsäure z. B. haben R_F -Werte von 0.38 und 0.19 in diesem Laufmittel.

2. UMSETZUNG VON ORNITHIN UND ISOUREIDOPHOSPHONAT

Die Anlagerung eines Cyanamids, S-Alkyl-isothioharnstoffs¹⁸⁾ oder O-Alkyl-isoharnstoffs¹⁹⁾ an eine Aminogruppe ist lange bekannt. Auf diese Weise gelang die Darstellung von α -Guanidino-carbonsäuren¹⁹⁻²¹⁾ und guanidierten Proteinen^{20, 22-24)}. J. P. GREENSTEIN guanidierte mit O-Methyl-isoharnstoff selektiv die ϵ -Aminogruppe im Lysin zum Homoarginin²⁵⁾, F. TURBA und K. SCHUSTER stellten aus Ornithin Arginin dar, wobei sie die α -Aminogruppe mit Cu^{II} schützten²⁶⁾. Bei manchen Untersuchungen wurden N-substituierte Iso- und Isothioharnstoffe verwendet^{27-29, 24)}. Kürzlich ist Lombricin durch Guanidierung mit O-Methylisoharnstoff dargestellt worden³⁰⁾.

In früheren Mitteilungen^{7,8)} haben wir gezeigt, daß auch phosphorylierte Cyanamid- bzw. Iso(thio)harnstoff-Reste die gleichen Reaktionen eingehen, d. h. zu phosphorylierten Guanidinen führen. Besonders glatt setzt sich [O-Methyl-isoureido]-phosphonsäure mit Aminogruppen um¹⁰⁾. Die gleiche Reaktion wurde inzwischen zu einer Darstellung von Phospho-lombricin benutzt³¹⁾.

17) Biochem. J. **61**, 549 [1954].

18) B. RATHKE, Ber. dtsh. chem. Gcs. **17**, 297 [1884].

19) J. KAPFHAMMER und H. MÜLLER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **225**, 1 [1934].

20) E. SCHÜTTE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **279**, 52 [1943].

21) M. MOURGUE, Bull. Soc. chim. France **1948**, 181.

22) W. L. HUGHES JR., H. A. SAROFF und A. L. CARNEY, J. Amer. chem. Soc. **71**, 2476 [1949].

23) J. ROCHE, M. MOURGUE und R. BARET, Bull. Soc. Chim. biol. **36**, 85 [1954].

24) F. MICHEEL und A. HEESING, Liebigs Ann. Chem. **604**, 34 [1957].

25) J. org. Chemistry **2**, 480 [1938].

26) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **283**, 27 [1948].

27) S. BIRTWELL, E. HAWORTH, F. L. ROSE, G. SWAIN und C. H. VASEY, J. chem. Soc. [London] **1946**, 491.

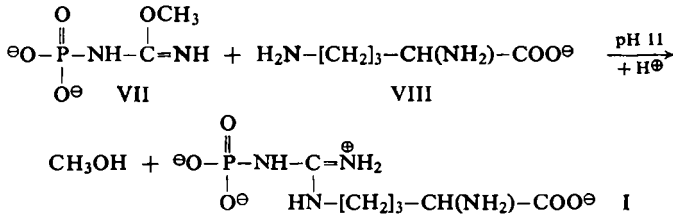
28) R. DE B. ASHWORTH, A. F. CROWTHER, F. H. S. CURD und F. L. ROSE, J. chem. Soc. [London] **1948**, 581.

29) F. MICHEEL und W. BERLENBACH, Chem. Ber. **85**, 189 [1952].

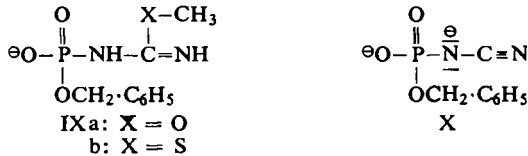
30) I. M. BEATTY und D. I. MAGRATH, J. Amer. chem. Soc. **82**, 4983 [1960].

31) I. M. BEATTY, A. H. ENNOR und D. I. MAGRATH, Nature [London] **188**, 1026 [1960].

Die Bildung von Guanididophosphonaten aus Iso(thio)ureidophosphonaten bzw. Cyanamidophosphonaten und Aminen haben wir am Beispiel des *O*-Benzyl-[*O*-methyl-isoureido]-phosphonates (IXa)¹⁴⁾, des *O*-Benzyl-[*S*-methyl-isothioureido]-

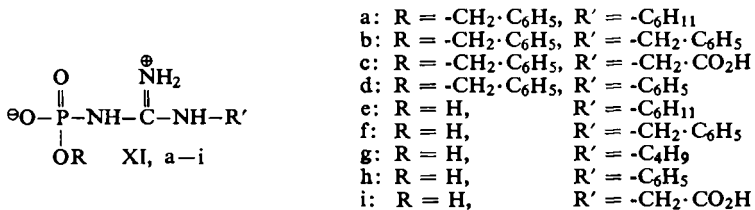


phosphonates (IXb), des Natrium-*O*-benzyl-cyanamidophosphonates (X) sowie des [*O*-Methyl-isoureido]-phosphonats (VII) untersucht. Als Aminkomponente wurden verschiedene primäre aliphatische und aromatische Amine sowie Aminosäuren eingesetzt.



IXa konnten wir durch hydrogenolytische Mono-Debenzylierung aus der Dibenzylverbindung⁷⁾, IXb durch anionische Mono-Debenzylierung mit Pyridiniumchlorid³²⁾ ebenfalls aus der entsprechenden Dibenzylverbindung⁷⁾ darstellen. X entsteht als Dinatriumsalz beim Schütteln von IXb mit Quecksilberoxyd und Natriumcarbonat in Wasser. VII wird durch vollständige Hydrogenolyse aus der Dibenzylverbindung gewonnen⁷⁾.

Die Reaktionen wurden papierchromatographisch verfolgt; die Identität der Reaktionsprodukte bewiesen wir zum Teil durch papierchromatographischen Vergleich mit den auf anderem Wege dargestellten Verbindungen. So wurde z. B. XIa nach fünf verschiedenen Methoden synthetisiert. Da hierbei die Phosphorylierung der Alkylguanidine nach Debenzylierung die gleichen Produkte liefert wie die Guanidinbildung aus Phospho-iso(thio)harnstoffen, ist bewiesen, daß die Phosphorylierung an einem der unsubstituierten N-Atome der Guanidinverbindung stattfindet. Dies war von D. I. MAGRATH³¹⁾ in Frage gestellt worden.



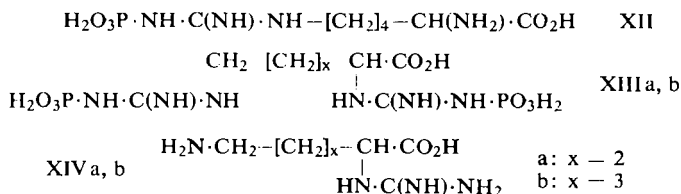
IXa reagiert in wäßriger Acetonitrillösung mit primären aliphatischen Aminen bei 50° in 1–3 Tagen glatt zu den entsprechenden Guanidinderivaten. XIa entsteht in 80-proz. Ausbeute. Glycin wird in Gegenwart einer Base (Triäthylamin) durch IXa

³²⁾ DR. K. STUDNIARSKI, unveröffentlichte Versuche, Darmstadt 1959.

zu 70% in Glykocyaminphosphorsäure-monobenzylester (XIc) übergeführt. Analog verläuft die Reaktion von IXb mit Aminen, die Ausbeuten sind etwas besser, mit Glycin geht die Reaktion zu XIc hier quantitativ.

X wird als Dinatriumsalz mit den Hydrochloriden der Amine in Äthanol zur Reaktion gebracht. Die primären aliphatischen Amine gehen die Umsetzung etwas langsamer ein, sehr gut reagiert Anilin-hydrochlorid zu *N'*-Monobenzylphospho-*N*-phenylguanidin (XI d); Glycin wird in 70-proz. Ausbeute zu XIc umgesetzt.

VII reagiert bei pH 10–11 in Wasser bei 50° sehr gut mit primären aliphatischen Aminen, schlechter mit Anilin unter Bildung der unveresterten Guanidinphosphorsäuren XI, e–h. Glycin liefert mit VII bei pH 11 nach 16 Stunden bei 50° in 65-proz. Ausbeute Glykocyaminphosphorsäure (XIi). Ornithin wurde als an der α -Aminogruppe geschütztes Kupfer(II)-ornithiniumchlorid eingesetzt, was bewirkt, daß die phosphorylierte Guanidinogruppe ausschließlich aus der δ -Aminogruppe entsteht. Aus dem Kupferkomplex kann dann die Argininphosphorsäure nach³³⁾ isoliert werden. Analog verläuft die Reaktion bei Lysin als Aminkomponente; hier entsteht Homoargininphosphorsäure (XII).



Setzt man das ungeschützte Ornithin in die Reaktion ein, so wird neben der gewünschten Argininphosphorsäure (I) in geringer Menge eine Verbindung gebildet, bei der beide Aminogruppen des Ornithins in phosphorylierte Guanidinogruppen umgewandelt sind: *N* ^{α} .*N* ^{δ} -Bis-[*N*-phospho-guanyl]-ornithin (XIII a). Analog verläuft die Reaktion mit Lysin ohne Cu^{II} teilweise zu *N* ^{α} .*N* ^{ϵ} -Bis-[*N*-phospho-guanyl]-lysin (XIII b). Dagegen erfolgt keine Reaktion an der α -Aminogruppe des Ornithins bzw. Lysins allein; es konnte papierchromatographisch kein Isoarginin bzw. Isohomoarginin nach Hydrolyse der P–N-Bindung in den Produkten nachgewiesen werden. Die hierzu benötigten Vergleichssubstanzen, Isoarginin (XIV a)³³⁾ bzw. Isohomoarginin (XIV b), haben wir durch Guanidierung von *N* ^{δ} -Cbo-Ornithin³⁴⁾ bzw. *N* ^{ϵ} -Cbo-Lysin³⁵⁾ mit *O*-Methyl-isoharnstoff-sulfat³⁶⁾ und anschließende Hydrogenolyse der Cbo-Gruppe dargestellt und als Pikrate isoliert. Ebenfalls zum papierchromatographischen Vergleich haben wir die erwarteten Hydrolyseprodukte von XIII a und b, *N* ^{α} .*N* ^{δ} -Diguanyl-ornithin und *N* ^{α} .*N* ^{ϵ} -Diguanyl-lysin, durch Umsetzung von *O*-Methyl-isoharnstoff-sulfat mit Arginin bzw. Homoarginin dargestellt.

O.*O'*-Dibenzyl-iso(thio)ureidophosphonate reagieren mit Aminen unter den oben angewandten Bedingungen nicht und bestätigen so den früher beobachteten²⁵⁾ Einfluß des Acylrestes. *O*.*O'*-Di-benzyl(bzw. -Diphenyl)-cyanamidophosphonate reagie-

³³⁾ E. ABDERHALDEN und H. SICKEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **180**, 75 [1929].

³⁴⁾ J. I. HARRIS und T. S. WORK, Biochem. J. **46**, 582 [1950].

³⁵⁾ G. FÖLSCH und K. SERCK-HAUSSEN, Acta chem. scand. **13**, 1243 [1959].

³⁶⁾ J. BELLO, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **18**, 448 [1955].

ren bei 70–110° nur mit Aminen, deren Basizität etwa zwischen der des Anilins und der von Aminosäureestern liegt^{7,8)}, während *O*-Monobenzyl-cyanamidophosphonat(X), wie beschrieben, schon bei 50° auch mit den stark basischen aliphatischen Aminen reagiert.

Der Einfluß des Acylrestes am Isoharnstoff auf dessen Reaktivität und die Abhängigkeit der Reaktion zum Guanidin von der Basenstärke des reagierenden Amins wird gegenwärtig von uns systematisch untersucht.

Die Arbeit wurde von der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, Bad Godesberg, vom BUNDESMINISTERIUM FÜR ATOMKERNENERGIE, Bad Godesberg, und vom VERBAND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE, Chemiefonds, Düsseldorf, durch Sachbeihilfen unterstützt. Der BADISCHEN ANILIN- & SODA-FABRIK, Ludwigshafen, und der DEGUSSA, Frankfurt a. M., danken wir für Chemikalien.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

A. Papierchromatographie

Papier: SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 b, ausgewaschen.

Lösungen: Propanol-(1)/konz. Ammoniak/Wasser (6:3:1): System I³⁷⁾

Propanol-(2)/konz. Ammoniak/Wasser (8:1:1): System II

O-Methyl-isoharnstoff und *N*-Phospho-*O*-methyl-isoharnstoff setzen sich mit dem Ammoniak der Laufmittel um und bilden auf dem Papier teilweise Guanidin bzw. Guanidinphosphorsäure. Deshalb versuchten wir, die konz. Ammoniak- durch 25-proz. wäßrige Triäthylamin-Lösung zu ersetzen:

Propanol-(1)/25-proz. Triäthylamin/Wasser (6:3:1): System III

Propanol-(2)/25-proz. Triäthylamin/Wasser (8:1:1): System IV

Da sich die Systeme III und IV ebenfalls zur Papierchromatographie fast aller unserer Verbindungen als sehr gut brauchbar erwiesen, war es möglich, unsere Reaktion in vier verschiedenen Systemen papierchromatographisch zu verfolgen. Auch Ornithin, Arginin und Glycin, sowie *N*^δ-Cbo-Ornithin und *N*^α-Cbo-Arginin sind gut zu unterscheiden. Wir entwickelten mit Hanes-Isherwood-Reagens¹⁵⁾ zum Nachweis des Phosphatrestes und einen parallel gelaufenen Streifen mit 5-proz. Salzsäure in Methanol und anschließend mit α -Naphthol/Diacetyl-Reagens zum Nachweis des Guanidinrestes¹⁶⁾. Argininphosphorsäure wurde zusätzlich mit Ninhydrin nachgewiesen.

B. Argininphosphorsäure (I) (Weg I)

1. *N*^α-Carbobenzoxy-arginin-benzylester, benzolsulfonsaures Salz (III): 7.0 g (0.0228 Mol) *N*^α-Cbo-Arginin (II)¹¹⁾ wurden mit 3.6 g Benzolsulfonsäure (0.023 Mol) und 50 ccm Benzylalkohol in 300 ccm trockenem Benzol 3 Stdn. unter Rückfluß mit Wasserabscheider gekocht. Ein Teil des Lösungsmittels wurde abdestilliert und das Produkt durch langsame Zugabe von Petroläther ausgefällt. Schmp. 137° (aus viel Wasser), Ausb. 10.6 g (84% d. Th.).

$C_{21}H_{26}N_4O_4 \cdot C_6H_6O_3S$ (556.7) Ber. C 58.25 H 5.79 N 9.94 S 5.77

Gef. C 58.11 H 5.60 N 9.79 S 5.40

2. *N*^ω-[Bis-*p*-nitrobenzyl-phospho]-*N*^α-carbobenzoxy-arginin-benzylester (V): Die Suspension von 8.31 g III (0.015 Mol) in 40 ccm Wasser wurde zu 5.9 g Bis-*p*-nitrobenzyl-phosphorsäurechlorid (IV) (0.015 Mol), gelöst in 40 ccm Chloroform, gegeben. Unter Eiskühlung und

³⁷⁾ P. C. CALDWELL, Biochem. J. **55**, 458 [1953].

Tabelle der R_F -Werte

Verbindung	R_F -Werte im System			
	I	II	III	IV
Ornithin	0.39		0.36	
Arginin	0.37		0.33	
Glycin	0.40			
Glykocyamin	0.38		0.37	
Lysin	0.44		0.36	
Homoarginin (N^{ϵ} -Guanyl-lysin)	0.41		0.34	
Isoarginin (N^{α} -Guanyl-ornithin)	0.32		0.27	
Isohomoarginin (N^{α} -Guanyl-lysin)	0.38		0.34	
N^{α} -Guanyl-arginin	0.23		0.17	
N^{α} . N^{ϵ} -Diguanyl-lysin	0.26		0.20	
N^{δ} -Cbo-Ornithin	0.81		0.83	
N^{ϵ} -Cbo-Lysin	0.82		0.84	
N^{δ} -Cbo- N^{α} -Guanyl-ornithin	0.79		0.80	
N^{ϵ} -Cbo- N^{α} -Guanyl-lysin	0.80		0.80	
N^{α} -Cbo-Arginin				
Butylguanidin	0.72			
Benzylguanidin	0.78			
Cyclohexylguanidin	0.79			
N -Dibenzylphospho-				
N' -cyclohexyl-guanidin	0.94	0.86		
N' -benzyl-guanidin	0.94	0.86		
N' -butyl-guanidin	0.94	0.86		
S -methyl-isothioharnstoff	0.92	0.85		0.89
S -äthyl-isothioharnstoff		0.85		
O -methyl-isoharnstoff		0.88		
guanidin	0.91	0.85		
N -Monobenzylphospho-				
N' -cyclohexyl-guanidin	0.91	0.83	0.91	
N' -phenyl-guanidin	0.86			
N' -benzyl-guanidin	0.88	0.73	0.90	
N -Monobenzylphospho-				
S -methyl-isothioharnstoff	0.80	0.56	0.87	0.65
S -äthyl-isothioharnstoff	0.82	0.64		
O -methyl-isoharnstoff	0.79	0.55	0.81	0.66
cyanamid	0.57	0.20	0.72	0.56
glykocyamin	0.63	0.26	0.80	0.50
N -Phospho- O -methyl-isoharnstoff			0.44	
N -Cyclohexyl-guanidinphosphorsäure	0.55		0.70	
N -Benzyl-guanidinphosphorsäure	0.50		0.64	
N -Butyl-guanidinphosphorsäure	0.51			
Guanidinphosphorsäure	0.24			
Glykocyaminphosphorsäure	0.19			
Argininphosphorsäure	0.18			
Homoargininphosphorsäure	0.20			
N^{α} . $N^{\delta}(\epsilon)$ -Bis-[N -phospho-guanyl]-				
-ornithin	0.06			
-lysin	0.08			
S -Methyl-isothioharnstoff			0.68	
O -Methyl-isoharnstoff			0.64	
Dicyandiamid			0.63	

intensivem Rühren ließ man während 1 Stde. 1.2 g NaOH (0.03 Mol) in 10 ccm Wasser zutropfen und rührte noch 2 Stdn. bei Raumtemperatur. Dann wurde die wäßrige Phase abgetrennt, die organische Phase mit Wasser, Kaliumhydrogensulfatlösung, Wasser, Natrium-

hydrogencarbonatlösung und wieder mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen. Es hinterblieb eine zähe Masse, die im Kühlschrank glasartig erstarrte, aber nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. R_F 0.89 (6:3:1). Ausb. 10.1 g (90% d. Th.).

$C_{35}H_{37}N_6O_{11}P$ (748.7) Ber. C 56.15 H 4.98 N 11.22 P 4.14
Gef. C 55.46 H 4.93 N 10.77 P 3.99

3. *Argininphosphorsäure (I)*: Die Lösung von 7.5 g *V* (0.01 Mol) in 100 ccm Methanol nahm in Gegenwart von 300 mg Palladium/Kohle (5-proz.)³⁸⁾ in 30 Stdn. 2.1 l H_2 auf (wegen CO_2 -Abgabe wurde die H_2 -Atmosphäre im Hydriergefäß dreimal erneuert). Die kristallin ausgefallene Argininphosphorsäure filtrierte man zusammen mit dem Katalysator ab (Rohausb. 1.85 g, 73% d. Th.). Zur Abtrennung vom Katalysator wurde in 60 ccm Wasser gelöst, schnell filtriert und sofort Aceton zugegeben. *Argininphosphorsäure* fiel in kleinen farblosen Kristallen aus. Schmp. 175–180°.

$C_6H_{15}N_4O_5P$ (254.2) Ber. C 28.35 H 5.95 N 22.04 P 12.18
Gef. C 29.43 H 6.61 N 20.21 P 10.09

4. *Bariumsalz der Argininphosphorsäure*: Die wäbr. Lösung von *I* wurde mit Bariumhydroxyd auf pH 9 gebracht, mit etwas mehr als dem gleichen Vol. Äthanol versetzt und der Niederschlag abzentrifugiert. Nach dreimaligem Umfällen aus Wasser/Äthanol war das amorphe Salz chromatographisch rein; R_F 0.18 (6:3:1).

$BaC_{12}H_{28}N_8O_{10}P_2 \cdot 3 H_2O$ (697.8) Ber. C 20.66 H 4.91 N 16.06 P 8.87 Ba 19.68
Gef. C 21.74 H 4.78 N 15.45 P 8.48 Ba 19.79

Die KARL-FISCHER-Titration wies auf 3 H_2O pro Mol. hin.

5. *N^ω-[Mono-p-nitrobenzyl-phospho]-N^α-carbobenzoxy-arginin-benzylester*: Die wie bei Nr. 3 durchgeführte Hydrierung von 3.75 g *V* in 50 ccm Methanol wurde nach Aufnahme von 300 ccm *Wasserstoff* abgebrochen. Das wie bei Nr. 3 erhaltene Hydrierungsprodukt löste sich in heißem Methanol und fiel beim Erkalten wieder aus. Ausb. 1.8 g, Schmp. 180° (aus Methanol).

$C_{28}H_{32}N_5O_9P$ (613.7) Ber. C 54.81 H 5.26 N 11.42 P 5.05
Gef. C 54.54 H 5.10 N 11.14 P 4.88

C. Umsetzung von *O*-Methyl-isoharnstoff, *Iso*(thio)ureido-phosphonaten und Phosphocyanamid mit Amininen und Aminosäuren (Weg 2)

1. *O*-Benzyl-[*O*-methyl-isoureido]-phosphonat (*N*-Monobenzylphospho-*O*-methyl-isoharnstoff) (*IXa*): Die Lösung von 10.2 g *O*.*O'*-Dibenzyl-[*O*-methyl-isoureido]-phosphonat⁷⁾ (0.03 Mol) in 150 ccm Methanol wurden nach Aufnahme von 700 ccm *Wasserstoff* (ber. 672 ccm) vom Katalysator³⁸⁾ abfiltriert. Nach Abdunsten des Lösungsmittels i. Vak. enthielt der krist. Rückstand neben *IXa* eine Spur VII, nach Umkristallisieren aus Methanol/Äther war die Substanz chromatographisch rein. Ausb. 6.4 g (87% d. Th.), Schmp. 150°, R_F 0.79 (6:3:1).

$C_9H_{13}N_2O_4P$ (244.2) Ber. C 44.26 H 5.37 N 11.47 P 12.69
Gef. C 43.95 H 5.08 N 11.92 P 12.60

2. *O*-Benzyl-[*S*-methyl-isothioureido]-phosphonat (*N*-Monobenzylphospho-*S*-methyl-isothioharnstoff) (*IXb*): 3.5 g *N*-Dibenzylphospho-*S*-methyl-isothioharnstoff⁷⁾ (0.01 Mol) und 1.75 g Pyridiniumchlorid (0.015 Mol) wurden in 6 ccm Aceton und 2.5 ccm Chloroform unter gelindem Erwärmen gelöst und 5 Tage bei 20° gehalten. Das Produkt fiel aus und nach Ab-

³⁸⁾ Sämtliche hier beschriebenen Hydrierungen wurden mit diesem Katalysator ausgeführt.

filtrieren und Zugabe von etwas Aceton konnte eine zweite Fraktion gewonnen werden. Ausb. 1.9 g (73% d. Th.), Schmp. 152° (aus Methanol/Äther), R_F 0.80 (6:3:1).

$C_9H_{13}N_2O_3PS$ (260.3) Ber. C 41.53 H 5.03 N 10.78 P 11.91
Gef. C 41.61 H 4.81 N 10.87 P 12.50

3. *O-Benzyl-cyanamido-phosphonat* (*N-Monobenzylphospho-cyanamid*) (*Dinatriumsalz*) (*X*): 2.6 g *IXb* (0.01 Mol) wurden mit 1.16 g Natriumcarbonat (0.011 Mol) und 2.5 g Quecksilber(II)-oxyd in 40 ccm Wasser 16 Stdn. bei 20° im Dunkeln geschüttelt. Dabei entwickelte sich lebhaft CO_2 . Das Filtrat vom ausgeschiedenen Mercaptid und überschüss. Quecksilber(II)-oxyd enthielt, wie das Papierchromatogramm zeigte, nur Verb. X. Nach Eindampfen der Lösung i. Vak. bei 40° zog man den krist. Rückstand dreimal mit heißem Äthanol aus, engte die Extrakte ein und brachte krist. X mit Äther zur Ausscheidung, Ausb. 1.9 g (74% d. Th.) (aus Methanol/Äther). R_F 0.57 (6:3:1), IR-Spektrum: starke Bande bei 2160/cm.

$Na_2C_8H_7N_2O_3P$ (256.1) Ber. C 37.52 H 2.76 N 10.94 P 12.10
Gef. C 36.47 H 3.13 N 10.77 P 12.13

4. *O-Benzyl-[N'-cyclohexyl-guanidido-(N)]-phosphonat* (*N-Monobenzylphospho-N'-cyclohexyl-guanidin*) (*XIa*)

a) 2.0 g *N-Dibenzylphospho-N'-cyclohexyl-guanidin*⁷⁾ (0.005 Mol) in 10 ccm Aceton wurden zu 1.2 g Pyridiniumchlorid (0.01 Mol) in 4 ccm Methylcellosolve gegeben. Nach 24 Stdn. bei 20° waren 1.2 g *XIa* ausgefallen. Farblose, sehr schwer lösliche Kristalle, Schmp. 245°, Ausb. 77% d. Th., R_F 0.91 (6:3:1), R_F 0.83 (8:1:1).

$C_{14}H_{22}N_3O_3P$ (311.3) Ber. C 54.01 H 7.14 N 13.50 P 9.96
Gef. C 54.28 H 7.41 N 13.24 P 10.02

b) 2.0 g der *Dibenzylverbindung* (0.005 Mol), gelöst in 30 ccm Methanol, hatten nach 20 Min. 115 ccm *Wasserstoff* aufgenommen. Das Filtrat vom Katalysator³⁸⁾ wurde mit Äther gefällt, die Fällung aus 50-proz. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 1.3 g *XIa* (84% d. Th.).

c) 244 mg *IXa* (0.001 Mol) wurden mit 198 mg *Cyclohexylamin* (0.002 Mol) in 4 ccm Acetonitril und 1 ccm Wasser unter leichtem Erwärmen gelöst und 3 Tage bei 50° gehalten. Der entstandene krist. Niederschlag wurde abgesaugt und aus dem Filtrat durch Zugabe von Aceton eine zweite Fraktion gewonnen. Ausb. 250 mg (80% d. Th.) *XIa*.

d) 260 mg *IXb* (0.001 Mol) wurden wie unter c) eingesetzt. Das entstandene Mercaptan wurde mit Quecksilber(II)-oxyd aufgefangen. Nach 5tägigem Aufbewahren bei 50° wurden 230 mg *XIa* (74% d. Th.) erhalten.

e) 256 mg X (0.001 Mol) und 271 mg *Cyclohexylammoniumchlorid* (0.002 Mol) wurden in 9 ccm absol. Äthanol gelöst, wobei Natriumchlorid ausfiel. Die Lösung wurde 3 Tage bei 50° gehalten. Nach dem Papierchromatogramm war bis dahin etwa zu 95% *XIa* entstanden. Aus dem Filtrat vom Natriumchlorid fielen durch Zugabe von Äther 190 mg *XIa*, aus der Mutterlauge wurden weitere 60 mg gewonnen. Ausb. 240 mg (aus 50-proz. Äthanol) (77% d. Th.).

5. *O-Benzyl-[N'-benzyl-guanidido-(N)]-phosphonat* (*N-Monobenzylphospho-N'-benzyl-guanidin*) (*XIb*): Alle 5 Darstellungsmethoden von *XIa* (4a–e) waren hier anwendbar. Die Reaktionen verliefen zum Teil mit besseren Ausbeuten (bis 90% d. Th.); bei der Aufarbeitung ist zu beachten, daß *XIb* in Äthanol ziemlich gut löslich ist, deshalb muß vor Ausfällen mit Äther auf ein kleines Volumen eingengt werden. Schmp. 161°, R_F 0.88 (6:3:1).

$C_{15}H_{18}N_3O_3P$ (319.3) Ber. C 56.42 H 5.69 N 13.16 P 9.70
Gef. C 56.35 H 5.77 N 13.09 P 9.30

6. *O-Benzyl-[N'-phenyl-guanidido-(N)]-phosphonat* (*N-Monobenzylphospho-N'-phenyl-guanidin*) (*XIc*) entstand aus *IXa* bzw. *IXb* mit *Anilin* in Gegenwart von Triäthylamin bei 50°

innerhalb von 6 Tagen nur in etwa 50-proz. Ausbeute, quantitativ dagegen innerhalb von 24 Stdn. aus 256 mg *X* (0.001 Mol) mit 259 mg *Aniliniumchlorid* (0.002 Mol) in 5 ccm absol. Äthanol bei 50°. R_F 0.86.

7. *O-Benzyl-glykocyamidophosphonat (Monobenzylphospho-glykocyamin) (XIc)*

a) 256 mg *X* (0.001 Mol) wurden mit 150 mg *Glycin* (0.002 Mol) in einer Mischung von 8 ccm Äthanol und 3.5 ccm Wasser gelöst und 4 Tage bei 50° gehalten. Auf dem Papierchromatogramm konnten etwa 80% *XIc* und 20% *X* nachgewiesen werden. Zugabe von Aceton fällte aus der Lösung einen Niederschlag aus, der nur aus *XIc* und *Glycin* bestand. *XIc* löste sich in heißem Methanol und konnte so abgetrennt werden. Umkristallisiert aus Methanol/Äther: Schmp. 198° (Zers.), R_F 0.63 (6:3:1). Die Hydrolyse in 1*n* HCl (7 Min. bei 110°) lieferte *Glykocyamin*, *Monobenzylphosphorsäure* und etwas *Orthophosphat*. Ausb. 200 mg (70% d. Th.).

b) 260 mg *IXb* (0.001 Mol) mit 158 mg *Glycin* (0.0021 Mol) und 212 mg *Triäthylamin* (0.0021 Mol) wurden in einer Mischung von 4 ccm Acetonitril und 2 ccm Wasser gelöst. Nach 2 Tagen bei 50° war in der Lösung neben *Glycin* nur noch *XIc* nachzuweisen. Hydrolyse führte wie unter a) zu *Glykocyamin*.

8. *Cyclohexyl-guanidiniumchlorid*: Die mit 19.8 g *Cyclohexylamin* (0.2 Mol) versetzte Lösung von 22.1 g *O-Methyl-isoharnstoff-hydrochlorid*³⁹⁾ (0.2 Mol) in 60 ccm Wasser wurde 8 Tage bei 50° gehalten. Nach dem Abkühlen und Anreiben kristallisierten 14.6 g *Cyclohexylguanidiniumchlorid* aus (72% d. Th.). Schmp. 225° (aus wenig Wasser) (Lit.⁴⁰⁾: 223°, R_F 0.79 (6:3:1).

9. *Benzyl-guanidiniumsulfat*: Die mit 10.7 g *Benzylamin* (0.1 Mol) versetzte Lösung von 12.3 g *O-Methyl-isoharnstoff-sulfat* (0.05 Mol) in 30 ccm Wasser wurde 8 Tage bei 50° gehalten. Es kristallisierten 16.6 g *Benzyl-guanidiniumsulfat* aus (82% d. Th.). Schmp. 201° (aus Methanol), R_F 0.78 (6:3:1).

$C_{16}H_{24}N_6O_4S$ (396.5) Ber. C 48.47 H 6.10 N 21.20 Gef. C 48.74 H 5.93 N 21.28

10. *Glykocyamin*: 11.05 g *O-Methyl-isoharnstoff-hydrochlorid* (0.1 Mol) wurden in 50.5 ccm 2*n* NaOH unter Eiskühlung gelöst und dazu 8.25 g *Glycin* (0.11 Mol), in 18 ccm Wasser von 80° gelöst, heiß zugegeben. Nach dem Abkühlen konnten 8.7 g *Glykocyamin* (75% d. Th., bezogen auf *Isoharnstoff*) abfiltriert werden. Schmp. 284° (Zers.) (aus Wasser), R_F 0.38 (6:3:1)⁴¹⁾.

11. *O,O'-Dibenzyl-[N'-benzyl-guanidido-(N)]-phosphonat (N-Dibenzylphospho-N'-benzyl-guanidin)*: 9.3 g *Benzylguanidiniumchlorid* (0.05 Mol) wurden mit 13.1 g *Dibenzylphosphit* entspr. 6. umgesetzt. Nach Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther hinterblieben 13.2 g *N-Dibenzylphospho-N'-benzyl-guanidin* (65% d. Th.), Schmp. 58°.

$C_{22}H_{24}N_3O_3P$ (409.4) Ber. C 64.54 H 5.91 N 10.26 P 7.56
Gef. C 64.78 H 5.53 N 10.15 P 7.53

12. *N'-Benzyl-guanidido-(N)-phosphonat (N-Phospho-N'-benzyl-guanidin) (XIIf)*

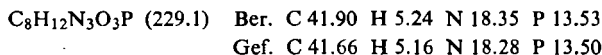
a) 4.09 g *N-Dibenzylphospho-N'-benzyl-guanidin* (0.01 Mol), in 40 ccm Methanol gelöst, nahmen in 10 Stdn. 480 ccm *Wasserstoff* auf. Das Filtrat vom Katalysator³⁸⁾ hinterließ nach Abdunsten i. Vak. einen krist. Rückstand, der sich in Wasser schlecht löste. Die Löslichkeit

³⁹⁾ *Org. Syntheses* 34, 67 [1954].

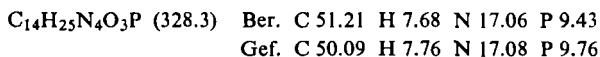
⁴⁰⁾ A. D. AINLEY, F. H. S. CURD und F. H. ROSE, *J. chem. Soc. [London]* 1949, 98.

⁴¹⁾ *Org. Syntheses* 22, 59 [1942].

in kaltem Wasser wurde durch wenig Aceton erhöht, durch mehr Aceton wurde *XIf* wieder kristallin ausgeschieden. Ausb. 1.9 g (83% d. Th.), Schmp. 158°, R_F 0.50 (6:3:1).



b) Das *Cyclohexylammoniumsalz* von *XIf* (12. a) wurde durch Zusatz von 0.99 g *Cyclohexylamin* (0.01 Mol) zum Hydrieransatz erhalten. Nach 14 Stdn. war in der Hydrierbirne ein krist. Niederschlag ausgefallen, 450 ccm *Wasserstoff* waren aufgenommen; es wurde filtriert, der Niederschlag in wenig Wasser gelöst, vom Katalysator abgetrennt, die wäbr. Lösung mit dem Filtrat des Birneninhalts vereinigt und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Der krist. Rückstand wurde aus Wasser/Aceton umkristallisiert. Ausb. 2.7 g (84% d. Th.), Schmp. 180° (Zers.), R_F 0.50 (6:3:1).

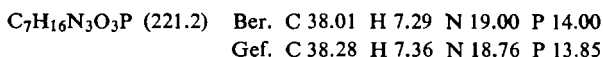


c) 0.154 g [*O-Methyl-isoureido*]-phosphonat (VII)⁷⁾ (0.001 Mol) und 0.321 g *Benzylamin* (0.003 Mol) wurden in 3 ccm Wasser 3 Tage bei 50° gehalten. Die Lösung enthielt dann, wie das Papierchromatogramm zeigte, neben wenig Orthophosphat nur die gewünschte Guanidinverbindung *XIf*. R_F 0.50 (6:3:1). Nachweis mit Phosphatreagens und α -Naphthol/Diacetyl.

d) 0.154 g VII (0.001 Mol) und 0.214 g *Benzylamin* (0.002 Mol) wurden mit 1 *n* NaOH auf pH 11.0 gebracht. Nach 5 Tagen war der pH der Lösung 11.6. Das Papierchromatogramm zeigte neben wenig Ausgangssubstanz und Orthophosphat ungefähr 80% Endprodukt. Bei einem Ansatz ohne Überschuß *Benzylamin* war nach 5 Tagen bei 50° das Verhältnis Ausgangssubstanz zur gewünschten Guanidinverbindung 1:2. Die Isolierung als Natriumsalz ist möglich.

13. [*N'-Cyclohexyl-guanidido-(N)*]-phosphonat (*N-Phospho-N'-cyclohexyl-guanidin*) (*XIe*)

a) 4.01 g *N-Dibenzylphospho-N'-cyclohexyl-guanidin*⁶⁾ (0.01 Mol) wurden in 40 ccm Methanol gelöst und wie bei 12. a) verfahren. Der Rückstand löste sich hier besser in Wasser und konnte mit Aceton wieder ausgefällt werden. Nach Umkristallisieren Schmp. 164°, R_F 0.55 (6:3:1), Ausb. 1.7 g (76% d. Th.).



b) Die mit 0.99 g *Cyclohexylamin* (0.01 Mol) versetzte Suspension von VII (0.001 Mol) in 5 ccm Äthanol wurde 5 Tage bei 50° gehalten. Neben wenig Orthophosphat war nur die Guanidinverbindung mit R_F 0.55 entstanden.

c) Das Lösungsgemisch von 0.154 g VII (0.001 Mol) und 0.198 g (0.002 Mol) *Cyclohexylamin* in Wasser wurde mit 1 *n* NaOH auf pH 11.5 gebracht. Nach 5 Tagen bei 50° war, wie das Papierchromatogramm zeigte, *XIe* in ungefähr 80-proz. Ausbeute entstanden. Daneben war noch Ausgangsprodukt vorhanden, aber kein Orthophosphat.

14. [*N'-n-Butyl-guanidido-(N)*]-phosphonat (*N-Phospho-N'-n-butyl-guanidin*) (*XIf*)

a) Aus *N-Dibenzylphospho-N'-butyl-guanidin*⁶⁾.

b) Aus VII mit *Butylamin* analog 12. c). R_F 0.51 (6:3:1).

15. *Glykocyaminphosphorsäure* (*XIi*)^{2,8)}: 1.54 g VII (0.01 Mol) wurden mit 0.75 g *Glycin* (0.01 Mol) in wenig Wasser unter Zusatz von NaOH gelöst und mit 2 *n* NaOH auf pH 11 gebracht. Nach 40 Stdn. bei 50° war auf dem Papierchromatogramm neben viel *XIi* nur noch sehr wenig *Glycin* zu sehen. Nach Zugabe des gleichen Volumens Äthanol kristallisierten 1.7 g chromatographisch reines *XIi* aus, R_F 0.19 (6:3:1). Ausb. 1.7 g (65% d. Th.). Die Hydrolyse lieferte Orthophosphat und *Glykocyamin*.



16. *Argininphosphorsäure (I) und $N^{\alpha}.N^{\delta}$ -Bis-[N-phospho-guanyl]-ornithin (XIIIa)*: 1.54 g VII (0.01 Mol) wurden mit 3.37 g *L-Ornithiniumchlorid* (0.02 Mol) in wenig Wasser suspendiert und mit 2*n* NaOH auf pH 10.2 gebracht. Das Lösungsvolumen betrug dann 30 ccm. Nach 20 Stdn. bei 40° war auf dem Papierchromatogramm nur noch sehr wenig VII zu sehen. Es war zu etwa 80% I entstanden, R_F 0.18 (6:3:1), daneben etwa 10% XIIIa, R_F 0.06 (6:3:1). Die Lösung wurde nun mit 2*n* Essigsäure auf pH 7.5 gebracht, mit 5 g Bariumacetat versetzt, geringe Mengen Bariumphosphat abfiltriert und zum Filtrat das gleiche Vol. Äthanol gegeben. Es fiel ein schmieriger Niederschlag aus, der alles XIIIa und einen großen Teil I enthielt. Nach Umfällen aus Wasser mit Äthanol bei pH 8 wurde die Substanz fest: 2.2 g, die durch fraktioniertes Umfällen aus Wasser/Äthanol in 1.29 g I und 0.20 g XIIIa (Bariumsalze) zerlegt wurden (die Niederschläge wurden meist abzentrifugiert und mit wäbr., dann absol. Äthanol und schließlich mit Äther gewaschen). Aus dem Filtrat des Niederschlags konnte durch Zugabe von weiterem Äthanol nochmals 0.77 g fast reines I gefällt werden, das nach Umfällen aus Wasser/Äthanol 0.50 g chromatographisch reines I als Bariumsalz lieferte. Die Rohausb. betrug also 2.97 g I, bezogen auf VII etwa 85% d. Th.

Die Hydrolyse der Produkte mit 1*n* HCl 7 Min. bei 100° führte bei I zu Arginin und Orthophosphat, aus XIIIa entstand Orthophosphat und reines N^{α} -Guanyl-arginin. Isoarginin war nicht nachzuweisen (papierchromatograph. Vergleich mit synthet. Probe). I chromatographisch rein, Vergleich mit B. 4.

XIIIa $Ba_2C_7H_{14}N_6O_8P_2 \cdot 2 H_2O$ (682.9) Ber. C 12.30 H 2.80 N 12.29 P 9.06
Gef. C 12.38 H 2.44 N 12.28 P 8.49

17. *Homoargininphosphorsäure (XII) und $N^{\alpha}.N^{\epsilon}$ -Bis-[N-phospho-guanyl]-lysin (XIIIb)*: 770 mg VII (0.005 Mol) und 1.82 g *L-Lysiniumchlorid* (Lösungsvolumen 25 ccm) wurden in Wasser mit 2*n* NaOH auf pH 10.2 gebracht. Die Lösung wurde 20 Stdn. bei 50° gehalten. Es war praktisch kein VII mehr nachzuweisen, neben den Produkten XII und XIIIb, R_F 0.20 bzw. 0.08 (6:3:1), war nur etwas Orthophosphat entstanden. Die Lösung wurde mit 2*n* Essigsäure auf pH 7.5 gebracht, 2.5 g Bariumacetat zugegeben und filtriert. Nun wurde das Filtrat mit etwas mehr als dem gleichen Volumen Äthanol versetzt, der schmierige Niederschlag abzentrifugiert und wie unter 16. gewaschen. Er wurde nach Behandeln mit Äther fest; es waren 1.43 g, in denen neben einer Spur Lysin nur XII und XIIIb enthalten waren. Die Rohausb. war auch hier etwa 80% d. Th. Die Trennung erfolgte wie oben durch fraktioniertes Umfällen aus Wasser/Äthanol und Zentrifugieren der Niederschläge, die meist schmierig ausfielen, aber nach Waschen mit Äthanol bzw. Äther fest wurden.

Es wurden 600 mg XII als Bariumsalz erhalten. R_F 0.20 (6:3:1), chromatographisch rein. Nach 7 Min. langer Einwirkung von 1*n* HCl bei 100° war vollständige Hydrolyse in Homoarginin (R_F 0.41) und Orthophosphat eingetreten, Isohomoarginin war nicht nachzuweisen.

60 mg XIIIb konnten als Bariumsalz isoliert werden, chromatographisch rein, R_F 0.08 (6:3:1). Die Hydrolyse führte zu $N^{\alpha}.N^{\epsilon}$ -Diguanyl-lysin und Orthophosphat.

18. *Argininphosphorsäure-Cu^{II}-Salz*: 1.68 g *L-Ornithiniumchlorid* (0.01 Mol) wurden mit 3 g basischem *Cu^{II}-Carbonat* in 10 ccm Wasser 1 Stde. gekocht, die blaue Lösung des Kupferornithiniumchlorids filtriert, mit 0.77 g VII (0.005 Mol) versetzt, mit 2*n* NaOH auf pH 11 gebracht und 4 Tage bei 40° gehalten. Nach Entfernung des Kupfers aus einer Probe bei pH 6.5 mit H_2S^3) oder Thioacetamid, war papierchromatographisch nur noch sehr wenig VII nachzuweisen, außer I war etwas Orthophosphat gebildet worden, aber kein XIIIa. Die Isolierung von I aus dem Kupferkomplex hat ENNOR³⁾ beschrieben.

19. *Homoargininphosphorsäure-Cu^{II}-Salz*: 1.82 g *L-Lysiniumchlorid* (0.01 Mol) wurden analog 18. eingesetzt. Reaktionsverlauf und Aufarbeitung waren völlig analog; XIIIb entstand ebenfalls nicht.

20. *N*^δ-Carbobenzoxy-*N*^α-guanyl-ornithin: 2.66 g *N*^δ-Cbo-*L*-Ornithin (0.01 Mol)³⁴⁾ wurden mit 3.8 g *O*-Methyl-isoharnstoff-sulfat (0.015 Mol)³⁶⁾, 4.7 g Ba(OH)₂·8 H₂O (0.015 Mol) und 2.5 g Triäthylamin in 40 ccm Wasser 6 Tage bei 50° gerührt. Das Papierchromatogramm zeigte dann Produkt (*R*_F 0.79) und Ausgangsverbindung (*R*_F 0.81) im Verhältnis 1:1, während der Isoharnstoff fast völlig umgesetzt war. Der Reaktionsansatz wurde nun 1 Tag im Kühlschrank aufbewahrt, wobei das Produkt ausfiel, so daß es nach dem Filtrieren mit heißem Äthanol aus dem Bariumsulfat-Niederschlag eluiert werden konnte. Die Substanz kristallisierte beim Abkühlen aus, Ätherzugabe vervollständigte die Abscheidung. Schmp. 174° (aus Äthanol/Äther), *R*_F 0.79 (6:3:1), Ausb. 1.35 g (44% d. Th.).

C₁₄H₂₀N₄O₄ (308.3) Ber. C 54.50 H 6.54 N 18.17 Gef. C 54.19 H 6.63 N 17.99

21. *N*^ε-Carbobenzoxy-*N*^α-guanyl-lysin: 2.8 g *N*^ε-Cbo-lysin³⁵⁾ (0.01 Mol) wurden analog 20. umgesetzt. Ausb. 1.25 g (39% d. Th.), Schmp. 179–180°. *R*_F 0.80 (6:3:1).

C₁₅H₂₂N₄O₄ (322.4) Ber. C 55.89 H 6.88 N 17.38 Gef. C 55.29 H 6.74 N 17.73

22. Isoarginin (*N*^α-Guanyl-ornithin) (*XIV a*): 308 mg *N*^δ-Cbo-*N*^α-Guanyl-ornithin nahmen in 30 ccm Methanol + 3 ccm Wasser 25 ccm Wasserstoff auf³⁸⁾. Die Lösung wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und mit 700 mg wäbr. Pikrinsäurelösung versetzt. Das ausgefallene Pikrat des Isoarginins wurde aus Methanol/Benzol umkristallisiert. Schmp. 191° (Zers.), *R*_F 0.35 (6:3:1).

23. Isohomoarginin (*N*^α-Guanyl-lysin) (*XIV b*): 322 mg *N*^ε-Cbo-*N*^α-Guanyl-lysin wurden wie unter 22. behandelt. Pikrat, Schmp. 201° (Zers.), *R*_F 0.38 (6:3:1).

24. *N*^α-Guanyl-arginin (*N*^α.*N*^δ-Diguanyl-ornithin): 210 mg Argininiumchlorid (0.001 Mol) wurden mit 492 mg *O*-Methyl-isoharnstoff-sulfat (0.002 Mol) und 631 mg Ba(OH)₂·8 H₂O (0.002 Mol) in 10 ccm Wasser 1 Tag bei Raumtemperatur gerührt. Es entstand in etwa 70-proz. Ausb. *N*^α-Guanyl-arginin, *R*_F 0.23 (6:3:1).

25. *N*^α.*N*^ε-Diguanyl-lysin: Durch analoge Guanidierung von *L*-Lysiniumchlorid konnte neben Homoarginin *N*^α.*N*^ε-Diguanyl-lysin erhalten und auf dem Papierchromatogramm nachgewiesen werden; *R*_F 0.26 (6:3:1).