

Über die Peptidsynthese mit Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff als Kondensationsreagenz¹⁾

Rolf Appel*, Günter Bäumer und Werner Strüver

Anorganisch-Chemisches Institut der Universität Bonn,
D-5300 Bonn, Max-Planck-Straße 1

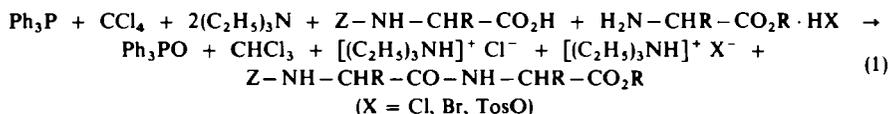
Eingegangen am 6. Februar 1975

Mit dem Dehydratisierungsreagenz Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff lassen sich *N*-geschützte Aminosäuren und Aminosäureester zu Peptiden kondensieren. Das mit hoher Ausbeute arbeitende Verfahren liefert mit *Z*-Aminosäuren racemisierungsfreie Produkte. Ungeschützte funktionelle Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren wie OH und CONH₂ werden nicht angegriffen. Der Reaktionsmechanismus wird diskutiert.

Peptide Synthesis with the System Triphenylphosphine/Carbon Tetrachloride as Condensation Agent¹⁾

The action of the system triphenylphosphine/carbon tetrachloride on *N*-protected amino acids and amino acid esters is well suited for peptide synthesis. The yields in this reaction are high and the products from *Z*-amino acids are, as a rule, free from racemates. Unprotected functional groups in the side chains such as OH and CONH₂ do not react. The reaction mechanism is discussed.

Das von unserem Arbeitskreis mehrfach eingesetzte Dehydratisierungsreagenz Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff²⁻⁶⁾ ist inzwischen von weiteren Arbeitsgruppen⁷⁻¹⁰⁾ auch zur Peptidsynthese herangezogen worden. Parallel und unabhängig zu diesen Untersuchungen haben wir an einer Peptidsynthese mittels Triphenylphosphin/CCl₄ gearbeitet^{11,12)}, die im wesentlichen nach folgender Bruttogleichung abläuft:



¹⁾ 27. Mitteil. über die gemeinsame Einwirkung von Phosphinen und Tetrachlorkohlenstoff auf Nucleophile; 26. Mitteil.: R. Appel und R. Milker, Z. Anorg. Allg. Chem., im Druck.

²⁾ R. Appel, R. Kleinstück und K.-D. Ziehn, Chem. Ber. 104, 1030 (1971).

³⁾ R. Appel, R. Kleinstück und K.-D. Ziehn, Chem. Ber. 104, 1335 (1971).

⁴⁾ R. Appel, R. Kleinstück und K.-D. Ziehn, Chem. Ber. 104, 2025 (1971).

⁵⁾ R. Appel, K. Warning und K.-D. Ziehn, Angew. Chem. 83, 143 (1971); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 10, 132 (1971).

⁶⁾ R. Appel und R. Kleinstück, Chem. Ber. 107, 5 (1974).

⁷⁾ S. Yamada und Y. Takeuchi, Tetrahedron Lett. 39, 3595 (1971).

⁸⁾ Y. Takeuchi und S. Yamada, Chem. Pharm. Bull. 22, (4), 832 (1974).

⁹⁾ Y. Takeuchi und S. Yamada, Chem. Pharm. Bull. 22, (4), 841 (1974).

¹⁰⁾ Th. Wieland und A. Seeliger, Chem. Ber. 104, 3992 (1971).

¹¹⁾ W. Strüver, Diplomarbeit, Univ. Bonn 1972.

¹²⁾ G. Bäumer, Diplomarbeit, Univ. Bonn 1972.

Tab. I. Dipeptide mit den Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Prolin und Phenylalanin.

Dipeptid	Ausb. (%)	Gef.	Schmp. (°C)	Lit.	Gef.	$[\alpha]_D^{20}$	Lit.
Z-Val-Gly-OBzl ^{*)}	90	142–143	—	—	–24.1° (24°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH)	—	—
Z-Gly-Val-OBzl ^{*)}	88	Öl	—	—	—	—	—
Z-Val-Val-OBzl	88	115–116	116 ¹³⁾	—	–44.6° (22.5°C, c = 2, MeOH)	–44.3° (25°C, c = 2, MeOH) ¹³⁾	—
Z-Leu-Gly-OBzl	97	85.5–90	90 ¹⁴⁾	—	–11.6° (20°C, c = 2, DMF)	–11.5° (20°C, c = 2, DMF) ¹⁴⁾	—
Z-Gly-Leu-OBzl	86	Öl	Öl ¹⁵⁾	—	–11.4° (19°C, c = 2.49, CH ₃ CO ₂ C ₂ H ₅)	–11.1° (19°C, c = 2.39, CH ₃ CO ₂ C ₂ H ₅) ¹⁵⁾	—
Bz-Leu-Gly-OC ₂ H ₅	72	145	156.5–157 ¹⁶⁾	—	±0° (20°C, c = 3.1, C ₂ H ₅ OH)	–34.0° (20°C, c = 3.1, C ₂ H ₅ OH) ¹⁶⁾	—
Z-Leu-Leu-OMe	77	93.5–96	97–98.5 ¹⁷⁾	—	–33.8° (22°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH)	–33.8° (22°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH) ¹⁷⁾	—
Z-Pro-Gly-OBzl ^{*)}	80	88–89	—	—	–56.9° (22°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH)	—	—
Z-Gly-Pro-OBzl ^{*)}	86	Öl	—	—	—	—	—
Z-Pro-Pro-OBzl ^{*)}	82	78–80	—	—	–104.6° (20°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH)	—	—
Z-Gly-Ala-OBzl	98	78–79	76–78 ¹⁸⁾	—	–16.5° (20°C, c = 0.47, Aceton)	–13.3° (20°C, c = 0.47, Aceton) ¹⁸⁾	—
Z-Ala-Gly-OBzl	99	111	115–116 ¹⁹⁾	—	–24° (26°C, c = 4.0, MeOH)	–26.5° (26°C, c = 4.0, MeOH) ¹⁹⁾	—
Z-Ala-Ala-OC ₂ H ₅ ^{*)}	94	114	116 ²⁰⁾	—	—	—	—
Z-Phe-Gly-OBzl	96	142	135.5–137.5 ²¹⁾	—	–9.8° (24°C, c = 2.0, Eisessig)	–9.2° (24°C, c = 2, Eisessig) ²¹⁾	—
Z-Gly-Phe-OBzl	99	74	74 ²²⁾	—	–4.7° (25°C, c = 1.0, C ₂ H ₅ OH)	–4.5° (25°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH) ²²⁾	—
Z-Phe-Phe-OBzl	92	159	150–152 ²³⁾	—	+8.9° (25°C, c = 2.0, CHCl ₃)	+8.4° (25°C, c = 1, CHCl ₃) ²³⁾	—

^{*)} Die optische Reinheit des bislang noch nicht beschriebenen Peptids wurde durch Überführen in eine beschriebene Verbindung durch Entfernen von Schutzgruppen nachgewiesen (siehe experimenteller Teil).

¹³⁾ J. P. Greenstein und M. Winitz: Chemistry of the Amino Acids, Vol. 2, S. 1139, John Wiley & Sons, Inc., New York, London 1961.

¹⁴⁾ T. Yamashita, Nippon Kagaku Zasshi **81**, 801 (1960) [C. A. **56**, 537d (1962)].

¹⁵⁾ P. C. Croft, J. H. H. Markes und H. N. Rydon, J. Chem. Soc. **1959**, 3610.

¹⁶⁾ M. W. Williams und G. T. Young, J. Chem. Soc. **1963**, 881.

¹⁷⁾ E. L. Smith, D. H. Spackman und W. J. Polglase, J. Biol. Chem. **199**, 801 (1952).

¹⁸⁾ J. Gante, Chem. Ber. **99**, 1576 (1966).

¹⁹⁾ K. Ogata und S. Ishii, Chem. Pharm. Bull. **15**, 707 (1967).

²⁰⁾ B. F. Erlanger und E. Brand, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 3508 (1951).

²¹⁾ J. Vaughan und J. Eichler, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 5556 (1953).

²²⁾ F. Maschiko und N. Osamu, Chem. Pharm. Bull. **17**, 1937 (1969).

²³⁾ S. Sakakibara und N. Inukai, Bull. Chem. Soc. Japan **38**, 1979 (1965) [C. A. **64**, 5205b (1966)].

Bei Verwendung von Triphenylphosphin konnten *Yamada* und *Takeuchi*⁷⁾ nur geringe Ausbeuten und starke Racemisierung, *Wieland* und *Seeliger*¹⁰⁾ dagegen bei nahezu vollständiger Racemisierung hohe Ausbeuten feststellen.

Wir haben die Reaktionsbedingungen nun soweit ausgearbeitet, daß sich auch mit dem am leichtest zugänglichen Triphenylphosphin hohe Ausbeuten an racemisierungsfreien Peptiden erzielen lassen.

Zunächst wurden Dipeptide von ausschließlich solchen Aminosäuren*¹⁾ dargestellt, deren Seitenketten keine funktionellen Gruppen enthielten. Wir setzten Derivate der Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Prolin und Phenylalanin ein. Die Kondensationen wurden bei Raumtemperatur in absol. Acetonitril mit *N*-geschützten Aminosäuren und den Salzen von Aminosäureestern in Gegenwart von Triphenylphosphin/ CCl_4 und tertiärer Base durchgeführt. Die Abtrennung des Peptids vom Triphenylphosphinoxid erfolgte durch Säulenchromatographie, nachdem die ionischen Produkte vorher ausgewaschen worden waren. Tab. 1 führt die so erhaltenen Dipeptide auf.

Wie Tab. 1 zeigt, konnte Racemisierung lediglich beim $\text{Bz-Leu-Gly-OC}_2\text{H}_5$ festgestellt werden. Hierin stimmen wir mit den Untersuchungen von *Yamada* und *Takeuchi*⁷⁾ überein, die ebenfalls bei diesem für den Young-Test wichtigen Peptid eine Racemisierung fanden. Bei Verwendung der wohl für die Peptidchemie bedeutsamsten Aminoschutzgruppe *Z*(Benzyloxycarbonyl) erhielten wir nach den Reinigungsoperationen in allen Versuchen optisch reine Produkte.

Im Anschluß an diese Untersuchungen prüften wir, ob mit Hilfe des Kondensierungsreagenzes Triphenylphosphin/ CCl_4 auch längere Peptide als Dipeptide dargestellt werden können. Da zunächst nur racemisierungsfreie Peptide mit den Aminosäuren Ala, Val, Leu, Pro und Phe dargestellt worden sind, suchten wir nach einem Peptid, das diese Aminosäuren enthielt. Wir fanden es in dem Hexapeptid *Z-Leu-Ala-Val-Phe-Gly-Pro-OBzl*, das von *Vaughan* und *Eichler*^{21, 24)} mit Hilfe der Methode der gemischten Anhydride dargestellt wurde.

Um die einzelnen Schritte kontrollieren zu können, wurde der Syntheseweg beibehalten, lediglich mit dem Unterschied, daß sämtliche Kondensationsschritte mit Triphenylphosphin/ CCl_4 erfolgten. Die folgende Übersicht zeigt das Reaktionsschema. Die Prozentzahlen in Klammern geben die von *Vaughan* und *Eichler*^{21, 24)} erzielten Ausbeuten an. Tab. 2 gibt die Daten der nach Schema 1 erhaltenen Peptide wieder.

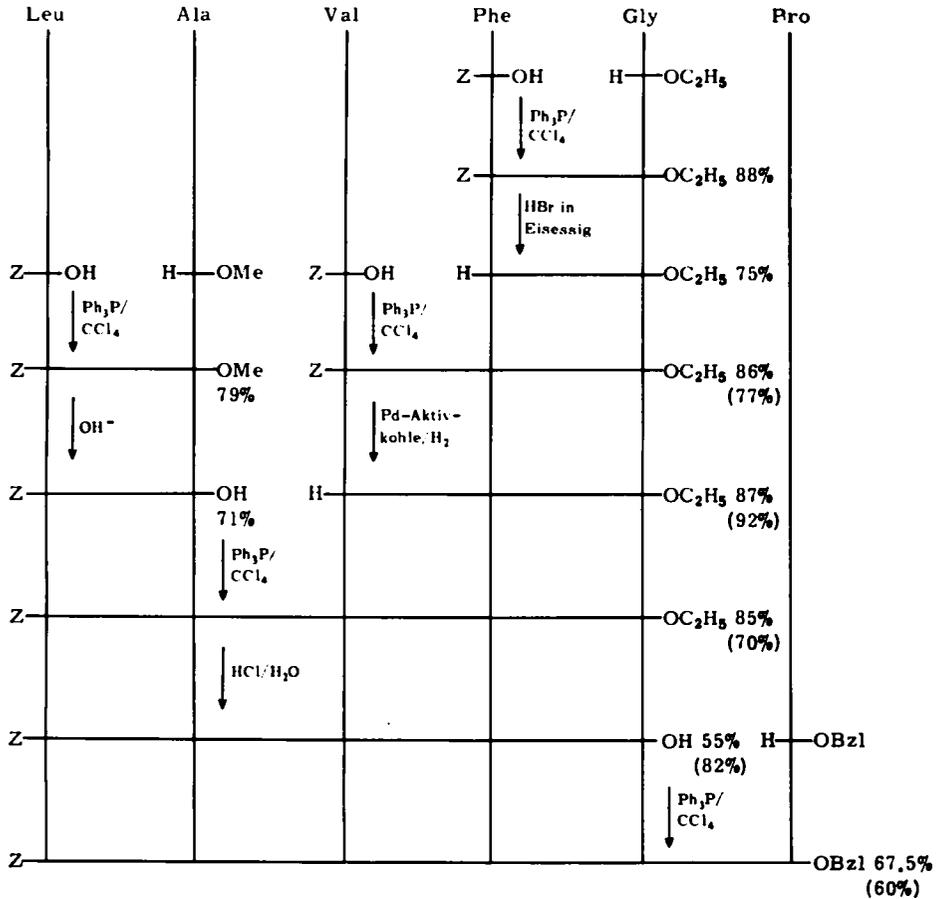
Das von uns dargestellte Hexapeptid zeigte ebenso wie seine Vorstufen gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten. Allerdings kann nach der Erfahrung bei der Synthese von $\text{Bz-Leu-Gly-OC}_2\text{H}_5$ eine Racemisierung beim Fragmentkopplungsschritt zum *Z*-Pentapeptidester nicht ausgeschlossen werden.

Vergleicht man beide Synthesen miteinander, so steht bei der Phosphin/ CCl_4 -Methode der Vorteil einer höheren Ausbeute gegen den Nachteil der Abtrennung des Triphenylphosphinoxids durch Säulenchromatographie. Dieser Nachteil tritt schon vom Tripeptid an in den Hintergrund, da diese in Äthanol im Gegensatz zu Ph_3PO nur schlecht löslich sind, so daß sie durch einfaches Umkristallisieren aus Äthanol rein erhältlich sind.

*¹⁾ Alle in dieser Arbeit eingesetzten optisch aktiven Aminosäurederivate lagen in der L-Form vor.
²⁴⁾ *J. R. Vaughan* und *J. A. Eichler*, *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 2474 (1954).

Von Interesse war weiterhin die Frage, ob Aminosäurederivate mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette mit dem System Triphenylphosphin/ CCl_4 Nebenreaktionen eingehen würden. Denkbar waren Reaktionen, bei denen alkoholische oder phenolische OH-Gruppen, wie sie beispielsweise im Serin, Threonin und Tyrosin vorkommen, in die entsprechenden Chloride übergeführt werden²⁵⁾. Auch die Dehydratisierung einer Amidgruppe, z. B. beim Glutamin war nicht auszuschließen²⁾.

Schema 1



Zur experimentellen Beantwortung dieser Frage wurden Dipeptide mit den Aminosäuren Serin, Threonin, Tyrosin und Glutamin dargestellt. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Wie Tab. 3 zeigt, lassen sich mit Hilfe des Kondensationsreagenzes Triphenylphosphin/ CCl_4 auch Peptide darstellen, die aus Aminosäuren mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette aufgebaut sind, ohne daß diese geschützt werden müssen. Mit dem verwandten System $n\text{-Bu}_3\text{P}/\text{CBr}_4$ wurden bereits zuvor die gleichen Erfahrungen gemacht⁷⁾.

²⁵⁾ Übersichtsartikel: H. Teichmann, Z. Chem. 14, 216 (1974).

Tab. 2. Nach Schema 1 dargestellte Peptide

Peptid	Ausb. (%)	Schmp. (°C)		Lit.	Gef.	[α] _D	Lit.
		Gef.	Lit.				
Z-Leu-Ala-OMe	79	94	95–96 ²⁶⁾	—	–36.2° (21°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH)	–38° (22°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH) ²⁵⁾	—
Z-Phe-Gly-OC ₂ H ₅	88	111	112 ⁷⁾	—	–16.2° (25°C, c = 2, C ₂ H ₅ OH)	–16.7° (20°C, c = 5, C ₂ H ₅ OH) ⁷⁾	—
Z-Val-Phe-Gly-OC ₂ H ₅	86	190	191.5–192 ²¹⁾	—	–21.0° (24°C, c = 2.1, Eisessig)	–22.5° (24°C, c = 2.1, Eisessig) ²¹⁾	—
Z-Leu-Ala-Val-Phe-Gly-OC ₂ H ₅	85	232–235	223–225 ²⁴⁾	—	–39.4° (24°C, c = 2.2, Eisessig)	–43.8° (24°C, c = 2.2, Eisessig) ²⁴⁾	—
Z-Leu-Ala-Val-Phe-Gly-Pro-OBzl	67.5	213–216	210–212 ²⁴⁾	—	–51.2° (22°C, c = 2.2, Eisessig)	–53.5° (22°C, c = 2.1, Eisessig) ²⁴⁾	—

Tab. 3. Dipeptide mit den Aminosäuren Serin, Threonin, Tyrosin und Glutamin

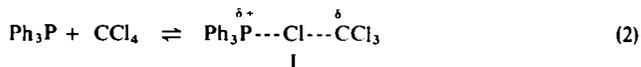
Dipeptid	Ausb. (%)	Schmp. (°C)		Lit.	Gef.	[α] _D	Lit.
		Gef.	Lit.				
Z-Gly-Tyr-OBzl*)	77.5	103–104	—	—	–1.7° (22°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH)	–	—
Z-Phe-Tyr-OC ₂ H ₅	91.5	155–157	159–160 ²⁷⁾	—	–9.4° (24°C, c = 10, C ₂ H ₅ OH)	–9.4° (24°C, c = 10, C ₂ H ₅ OH) ²⁷⁾	—
Z-Ser-Gly-OC ₂ H ₅	74	106–107.5	106–107 ⁷⁾	—	–5.7° (20°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH)	–5.9° (20°C, c = 1, C ₂ H ₅ OH) ⁷⁾	—
Z-Gly-Ser-OMe	89	92–94	94–95 ²⁸⁾	—	+24.8° (27°C, c = 1.2, CHCl ₃)	+25.3° (27°C, c = 1.02, CHCl ₃) ²⁸⁾	—
Z-Ser-Ser-OMe	64	142–143	138–141 ²⁹⁾	—	–3.0° (22°C, c = 1, MeOH)	–3.0 bis –3.5° (22°C, MeOH) ²⁹⁾	—
Z-Thr-Gly-OBzl	94.0	98	102–104 ¹⁹⁾	—	–15.4° (22°C, c = 4.9, MeOH)	–17.1° (22°C, c = 1, MeOH) ¹⁹⁾	—
Z-Gly-Thr-OC ₂ H ₅	95.1	83	82–83.5 ³⁰⁾	—	–1.9° (23°C, c = 5, C ₂ H ₅ OH)	–1.9° (23°C, c = 5, C ₂ H ₅ OH) ³⁰⁾	—
Z-Gln-Gly-OBzl*)	78.5	199	—	—	–1.0° (20°C, c = 1, DMSO)	—	—

*) Die optische Reinheit des bislang noch nicht beschriebenen Peptids wurde durch Überführen in eine beschriebene Verbindung durch Entfernen von Schutzgruppen nachgewiesen (s. experimenteller Teil).

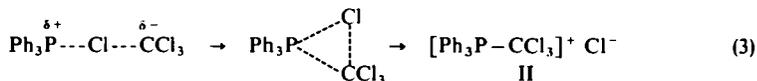
Untersuchungen zum Mechanismus

Die Reaktionen, die im Vierkomponentensystem Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff/Säurekomponente (*N*-geschützte Aminosäure)/Aminkomponente (Aminosäureester) in Betracht gezogen werden müssen, sind sehr vielfältig.

Aus den an anderer Stelle^{31, 32} bereits genannten Gründen nehmen wir an, daß aus Triphenylphosphin und Tetrachlorkohlenstoff zunächst ein reaktiver Charge-Transfer-Komplex entsteht.

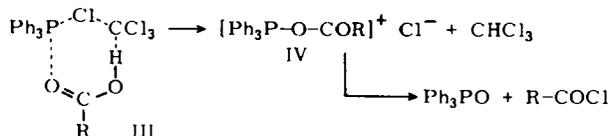


Wird dieser Komplex nicht durch einen nucleophilen Angriff auf das positivierte Phosphoratom (präformierte Phosphoniumstruktur) stabilisiert, so kann das negativierte Kohlenstoffatom (präformiertes Trichlorcarbanion) als inneres Nucleophil wirken. Dabei kommt es über einen pentavalenten Zustand zur Bildung des Triphenyl(trichlormethyl)phosphoniumchlorids, welches kürzlich erstmals dargestellt werden konnte³³.



Als äußere Nucleophile im Vierkomponentensystem können fungieren: 1. die Säurekomponente, 2. die Aminkomponente.

Im Dreikomponentensystem Triphenylphosphin/ CCl_4 /Carbonsäure entsteht neben Triphenylphosphinoxid und Chloroform das Säurechlorid³⁴.



Die Reaktion dürfte in mehreren Schritten verlaufen. Zunächst wird unter Chloroformabspaltung aus dem Übergangskomplex III das Acyloxyphosphoniumsalz IV entstehen, das mehrfach als Zwischenprodukt vorgeschlagen worden ist^{7, 10, 34}.

Es kann sich dann nach Art einer Arbusow-Reaktion zu den thermodynamisch stabilen Produkten Triphenylphosphinoxid und Säurechlorid stabilisieren. Dient ein Amin als Drittkomponente, so bildet sich in glatter Reaktion das Aminophosphoniumchlorid³⁵:



²⁶) W. J. Polglase und E. L. Smith, J. Amer. Chem. Soc. **71**, 3081 (1949).

²⁷) J. R. Vaughan und R. L. Osato, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 676 (1952).

²⁸) R. G. Hiskey, T. Mizoguchi und E. L. Smithwick jr., J. Org. Chem. **32** (1), 97 (1967).

²⁹) S. Yamada, S. Tarashima und M. Wagatsuma, Tetrahedron Lett. **1970**, 1501.

³⁰) S. Sakakibara, K. H. Shin und G. P. Hess, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 4921 (1962).

³¹) R. Appel und K. Warning, Phosphorus **4**, 29 (1974).

³²) R. Appel und K. Warning, Chem. Ber. **108**, 606 (1975).

³³) R. Appel und W. Michel, in Vorbereitung.

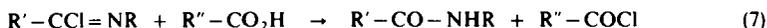
³⁴) J. B. Lee, J. Amer. Chem. Soc. **88**, 3440 (1966).

³⁵) R. Appel, R. Kleinstück, K.-D. Ziehn und F. Knoll, Chem. Ber. **103**, 3631 (1970).

Der Befund, daß die Peptidsynthese mit Triphenylphosphin/ CCl_4 mit hoher Ausbeute verläuft, gibt zunächst noch keinen Hinweis darauf, ob die Säurekomponente oder die Aminokomponente den primären Komplex angreift. Zum einen kann der Aminosäureester nucleophil am positivierten Carbonyl-C-Atom der Strukturen III, IV oder des Säurechlorids unter Peptidbildung reagieren. Zum anderen gibt es eine Reaktionsfolge, die verständlich macht, wie Aminophosphoniumsalze sich zu Peptiden umsetzen könnten. Zbiral und Bauer³⁶⁾ haben gezeigt, daß Iminophosphorane, die in Gegenwart von tertiären Aminen mit den Aminophosphoniumsalzen im Gleichgewicht vorliegen, mit Säurechloriden zu Triphenylphosphinoxid und Imidchloriden reagieren.

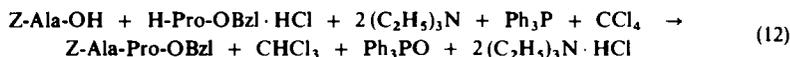
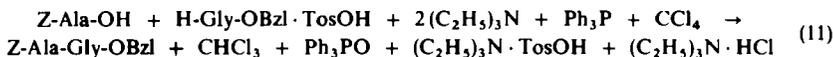
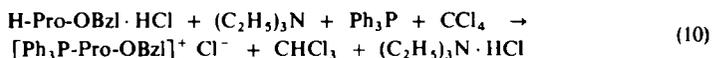
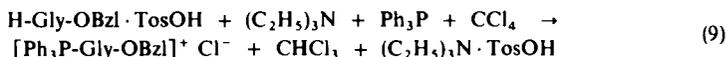
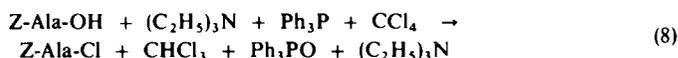


Wie Cramer und Baer³⁷⁾ gezeigt haben, setzen sich Imidchloride mit Carbonsäuren, insbesondere auch mit *N*-geschützten Aminosäuren zu Säurechloriden um, die mit Aminen oder Aminosäureestern zum Amid bzw. Peptid reagieren können.



Das entstandene Säurechlorid kann wieder nach Gl. (6) das Iminophosphoran angreifen. So wäre es möglich, daß wenig gebildetes Säurechlorid die Reaktion zwischen Iminophosphoran und Carbonsäure, die unter den Versuchsbedingungen der Peptidsynthese allein nicht reagieren, katalysiert. Unabhängig vom Reaktionsweg bilden sich also Ph_3PO , CHCl_3 und Peptid, so daß aus den Reaktionsprodukten nicht auf den Mechanismus geschlossen werden kann.

Zur Klärung der komplexen Problematik haben wir kinetische Untersuchungen herangezogen und die durch die Gl. (8–12) beschriebenen Reaktionen mit Hilfe der quantitativen Gaschromatographie verfolgt. Als Lösungsmittel diente Acetonitril bei 20°C.



Nach einem früher von Warning³⁸⁾ ausgearbeiteten Verfahren wurde dazu die Abnahme des CCl_4 und die Zunahme des CHCl_3 in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Das Ergebnis dieser Versuche ist in den Abb. 1 und 2 dargestellt.

³⁶⁾ E. Zbiral und E. Bauer, *Phosphorus* **2**, 35 (1972).

³⁷⁾ F. Cramer und K. Baer, *Chem. Ber.* **93**, 1231 (1960).

³⁸⁾ K. Warning, Dissertation, Univ. Bonn 1974, kurze Erläuterung auch unter Lit.³²⁾.

Aus den Abb. ist ersichtlich, daß sämtliche Reaktionsgeschwindigkeiten von vergleichbarer Größe sind. Auffällig ist, daß, obwohl die Reaktionen mit den Einzelkomponenten von verschiedener Geschwindigkeit sind, die Peptidbildungsrate bei beiden Reaktionen im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich ist. Werden die Reaktionen (8), (9), (11) bei 35°C durchgeführt³⁸⁾, bleibt das Verhältnis ihrer Geschwindigkeiten, verglichen mit den Versuchen bei 20°C , unverändert.

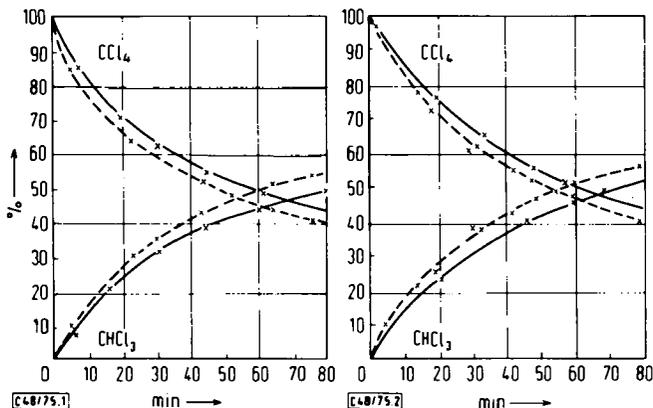


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der CCl_4 -Abnahme bzw. der CHCl_3 -Zunahme der Reaktionen (9)--- und (10)——

Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der CCl_4 -Abnahme bzw. der CHCl_3 -Zunahme der Reaktionen (11), (12)--- und (8)——

Fügt man nach dem Abreagieren des Versuches nach Gl. (8) die Aminkomponente hinzu, so entsteht das Dipeptid in hohen Ausbeuten. Das in Gl. (9) gebildete Aminophosphoniumsalz reagiert mit nachgegebener Carbonsäure auch unter Zusatz von Triphenylphosphin/ CCl_4 /tertiärer Base nur in geringen Ausbeuten zum Peptid. Das nicht mehr deprotonierbare Aminophosphoniumsalz aus Gl. (10) ist gegenüber Carbonsäure und Säurechlorid unter den bei der Peptidsynthese angewandten Bedingungen stabil.

Da bei den Peptidverknüpfungsreaktionen unter gleichzeitigem Einsatz von Amin- und Acylkomponente bislang weder Aminophosphoniumsalze gefunden wurden, noch die Reaktion im größeren Ausmaß über diese Verbindungen abgelaufen sein kann, muß bei der Peptidbildung die P–N-Verknüpfung unterdrückt worden sein.

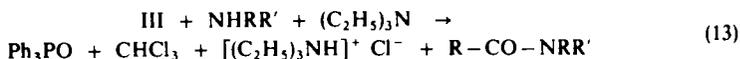
Einen Schlüssel zu diesen Verhältnissen bieten möglicherweise Untersuchungen von Appel und Morbach³⁹⁾. Sie verglichen die Reaktionsgeschwindigkeit der Zweikomponentenreaktion zwischen Triphenylphosphin und CCl_4 mit der Reaktionsrate der Dreikomponentenreaktion $\text{Ph}_3\text{P}/\text{CCl}_4$ /Carbonsäure. Obwohl die Dreikomponentenreaktion langsamer als die Zweikomponentenreaktion verläuft, findet im Dreikomponentensystem zunächst die Umsetzung des aktivierten Komplexes I mit der Carbonsäure statt. Erst nach vollständigem Verbrauch der Carbonsäure setzt die schnellere Umlagerungs-

³⁹⁾ W. Morbach, Diplomarbeit, Univ. Bonn 1974.

reaktion zum Triphenyl(trichlormethyl)phosphoniumchlorid ein. Völlig analoge Verhältnisse wurden bereits früher im Dreikomponentensystem $\text{Ph}_3\text{P}/\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$ beobachtet³³⁾.

Zur Erklärung kann man annehmen, daß die dipolare Struktur des linearen Übergangskomplexes I durch die Solvataion der Carbonsäure stabilisiert wird (III). Diese Stabilisierung zum ternären Komplex III verhindert weitgehend – wenn auch nicht vollständig – einen Zerfall nach Gl. (3). Statt dessen läuft die Reaktion im Sinne des auf S. 2685 skizzierten Zerfallschemas ab.

Aus den bisherigen Experimenten können über die Eigenschaften des ternären Komplexes mehrere Schlüsse gezogen werden. Das Nichtauftreten von Aminophosphonium-Verbindungen bei der Peptidsynthese weist darauf hin, daß die Anlagerung der Carbonsäure an den linearen CT-Komplex I sehr schnell erfolgt. Die weitere Reaktion, die im Dreikomponentensystem schließlich zu den faßbaren Verbindungen Triphenylphosphinoxid, Säurechlorid und Chloroform führt, wird dagegen viel langsamer ablaufen. Die Lebensdauer des ternären Komplexes dürfte so groß sein, daß eine vierte Komponente an ihn herantreten kann. Ist es ein Amin, so greift es mit seinem freiem N-Elektronenpaar nucleophil am positivierten Carbonyl-C-Atom an, und im weiteren Reaktionsverlauf entstehen Ph_3PO , Amid und CHCl_3 . Das zugesetzte tertiäre Amin bindet den freiwerdenden Chlorwasserstoff.



Die Ursache für den im Vergleich zum Zerfall von III schnelleren Verlauf seiner Umsetzung mit dem Amin dürfte in den verschiedenen freien Energien der Reaktionsprodukte zu suchen sein. Durch die Assoziation der Carbonsäure an den dipolaren CT-Komplex I ist seine freie Energie gesenkt worden, so daß bei der Bildung des energiearmen Amids deutlich mehr Energie frei wird als beim Zerfall in das energiereichere Säurechlorid. Zusätzlich wird noch die exotherme Bildung des Triäthylammoniumchlorids zur Bevorzugung der Amidbildung beitragen.

Basenabhängigkeit

Bei der Vierkomponentenreaktion (1) wird tertiäres Amin zugesetzt, das den bei der Reaktion freiwerdenden Chlorwasserstoff binden und die als Salz eingesetzte Aminkomponente freisetzen soll. Eine Untersuchung der Ausbeuten in Abhängigkeit von der Basizität verschiedener tertiärer Stickstoffbasen ergibt eine signifikante Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Basizität der Hilfsbase. Die eingesetzten Basen hatten folgende $\text{p}K_a$ -Werte: Triäthylamin (10.65⁴⁰⁾), *N*-Äthylpiperidin (10.40⁴¹⁾), *N,N*-Dimethylbenzylamin (8.93⁴¹⁾), *N*-Methylmorpholin (7.41⁴²⁾), *N,N*-Dimethylanilin (5.04⁴¹⁾). Diese Werte sind zwar auf das wäßrige System bezogen, dennoch besteht bei tertiären Stickstoffbasen eine sehr gute Korrelation zwischen diesen $\text{p}K_a$ -Werten und ihrer Basizität in organischen Solventien⁴³⁾.

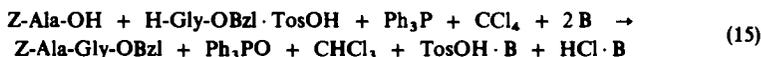
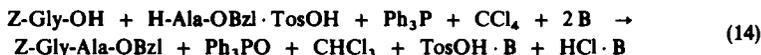
⁴⁰⁾ J. Hanson, Sv. Kem. Tidskr. **67**, 256 (1955).

⁴¹⁾ N. F. Hall und M. R. Sprinkle, J. Amer. Chem. Soc. **54**, 3469 (1932).

⁴²⁾ H. K. Hall jr., J. Phys. Chem. **60**, 63 (1956).

⁴³⁾ H. K. Hall jr., J. Amer. Chem. Soc. **79**, 5441 (1957).

Die Ausbeuten bei den durch die Gl. (14) und (15) beschriebenen Reaktionen wurden nach dreitägiger Reaktionsdauer bei 0°C bestimmt. Nach dieser Zeit waren noch alle Ausgangskomponenten vorhanden, die Peptid-Ausbeute konnte daher aus den Anteilen der noch nicht umgesetzten Aminosäuren ermittelt werden.



Das Ergebnis ist in den Abb. 3 und 4 dargestellt. Hierin sind die Logarithmen der nicht umgesetzten Anteile an Aminosäuren gegen die $\text{p}K_a$ -Werte der eingesetzten Basen aufgetragen.

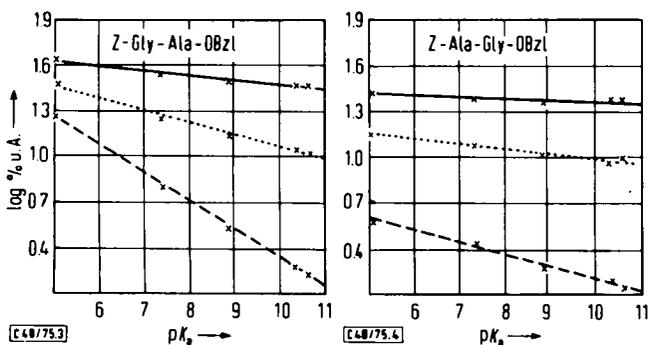
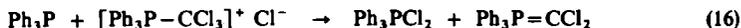


Abb. 3 und 4. Abhängigkeit der Ausbeute von der Stärke der Hilfsbase mit der Phosphinmenge als Parameter mit ——— 0% Überschuß, 10% Überschuß, --- 20% Überschuß. Der Logarithmus der unumgesetzten Anteile der Aminosäurederivate ($\lg \% \text{ u. A.}$) ist gegen den $\text{p}K_a$ -Wert der jeweiligen Hilfsbase aufgetragen

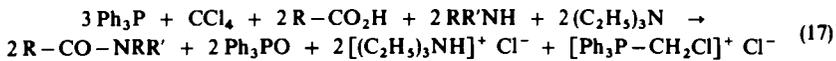
Wie ersichtlich, steigt die Ausbeute bei gleicher Reaktionszeit mit höherer Basenstärke der Hilfsbase an, Aminkomponenten mit geringer sterischer Hinderung reagieren schneller ab. Die Erklärung ist darin zu suchen, daß stärkere Hilfsbasen das Angebot an deprotonierter Aminkomponente erhöhen. Diese wird dann schneller mit dem ternären Übergangskomplex III zum Peptid reagieren können.

Aus den Abb. 3 und 4 geht ferner hervor, daß nicht nur die Basizität der Hilfsbase, sondern auch die Menge des Phosphins für die Höhe der Ausbeute wichtig ist. Dieser Befund wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß nach unseren vorangegangenen Untersuchungen sich ein Teil des linearen aktivierten Komplexes I auch in Gegenwart eines äußeren Nucleophils zum Triphenyl(trichlormethyl)phosphoniumchlorid gemäß Gl. (3) umlagert³²⁾. Dieses reagiert mit weiterem Phosphin zu (Dichlormethylen)triphenylphosphoran und Dichlortriphenylphosphoran (Gl. 16).



Daß das hierbei gebildete Dichlortriphenylphosphoran ebenfalls ein ausgezeichnetes Dehydratisierungsmittel ist und bei allen derartigen Reaktionen mit Triphenylphosphin/ CCl_4 über die Reaktion nach Gl. (16) daran beteiligt ist, haben wir wiederholt nachge-

wiesen und ausführlich diskutiert^{2,4,32}). Die von dieser Nebenreaktion ausgehende Kondensation kann – auf die Peptidsynthese übertragen – in etwa durch die Bruttogleichung (17) beschrieben werden.



Da die Peptidbildung nicht nur nach Gl. (1), sondern zum Teil auch nach Gl. (17) verläuft, erfolgt bei der Umsetzung äquivalenter Mengen Phosphin, Aminosäurederivate und CCl_4 ein Abbruch der Kondensation durch Phosphinmangel. Zur Ausbeutenerhöhung ist es demnach zweckmäßig, einen 20proz. Überschuß von Triphenylphosphin zu verwenden. Bei dieser Menge konnte nach Beendigung der Reaktion stets noch wenig unumgesetztes Ph_3P nachgewiesen werden.

Für die Hilfe beim Erlernen erster Schritte in der Peptidchemie danken wir Herrn Prof. Dr. H. Zahn, Aachen, der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Förderung dieser Arbeit durch eine Sachbeihilfe.

Experimenteller Teil

Die verwendeten Aminosäurederivate sind in dünnschichtchromatographisch einheitlicher Form eingesetzt worden und stimmen in Schmelzpunkt und spezifischem Drehwert mit Literaturangaben überein. – Triphenylphosphin wurde von der BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, bezogen und durch Umkristallisieren aus Petroläther (50–70°C) gereinigt. Acetonitril und die tertiären Amine wurden nach gebräuchlichen Verfahren wasserfrei gemacht. – Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind nicht korrigiert. – Die Drehwerte wurden in einem thermostatisierten 1-dm-Rohr im Polarimeter 141 der Fa. Perkin-Elmer gemessen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift

10 mmol Carboxylkomponente (Z-Aminosäure), 10 mmol Aminkomponente (Salz des Aminosäureesters) und 12 mmol Triphenylphosphin werden in 20 ml absol. Acetonitril vorgelegt. Dazu gibt man 20 mmol Triäthylamin (2,8 ml) und 10 mmol Tetrachlorkohlenstoff (1,0 ml). Das Gemisch wird bei Raumtemp. über Nacht gerührt. Im Anschluß daran wird das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abgezogen. Den Rückstand nimmt man in 100 ml Essigester und 20 ml Wasser auf. Zur Beseitigung von nicht umgesetzten Ausgangsverbindungen und ionischen Nebenprodukten wird nach Trennung der Phasen die Essigesterphase dreimal mit je 10 ml Citronensäurelösung (10proz.), dreimal mit je 10 ml Natriumhydrogencarbonatlösung (10proz.) und zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Das verbliebene Substanzgemisch aus Peptid und Triphenylphosphinoxid wird durch Säulenchromatographie getrennt. Es wird eine Säule 180 × 3 cm mit Kieselgel Woelm 0.063–0.1 mm verwendet. Als Laufmittel dient Essigester. (Die Dipeptide Z-Gly-Ser-OME und Z-Ser-Ser-OME wurden mit Hilfe von Essigester/ $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ (9:1) als Laufmittel vom Phosphinoxid getrennt.) Das Eluat wird mit Hilfe eines automatischen Fraktionensammlers aufgefangen; die Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch untersucht und jeweils einmal aus Essigester/Petroläther (50–70°C) umkristallisiert.

Die Hydrierungen werden in Methanol/Wasser an Palladium-Aktivkohle durchgeführt.

N-(Benzoyloxycarbonyl)valyl-glycin-benzylester:

$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ (398.5) Ber. C 66.30 H 6.58 N 7.04 Gef. C 65.96 H 6.30 N 6.91

Valyl-glycin: Aus Z-Val-Gly-OBzl, Ausb. 83%, Schmp. 257.5–258°C (Wasser/Methanol/Äthanol/Äther) (Lit.⁴⁴) 271–272°C), $[\alpha]_D^{20} = 101.5^\circ$ ($c = 2, \text{H}_2\text{O}$) (Lit.⁴⁵) $[\alpha]_D^{25} = 102 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2, \text{H}_2\text{O}$)).

Glycyl-valin: Aus Z-Gly-Val-OBzl, Ausb. 47%, Schmp. 248–249°C (Wasser/Äthanol) (Lit.⁴⁶) 239–254°C), $[\alpha]_D^{24} = -20.2^\circ$ ($c = 2, \text{H}_2\text{O}$) (Lit.⁴⁷) $[\alpha]_D^{25} = -19.9^\circ$ ($c = 2, \text{H}_2\text{O}$)).

N-(Benzylloxycarbonyl)prolyl-glycin-benzylester:

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ (396.4) Ber. C 66.65 H 6.10 N 7.07 Gef. C 66.65 H 5.94 N 6.80

Prolyl-glycin · H₂O: Aus Z-Pro-Gly-OBzl, Ausb. 94%, Schmp. 230–231°C (Wasser/Äthanol) (Lit.⁴⁸) 236°C), $[\alpha]_D^{20} = -22.6^\circ$ ($c = 2, \text{H}_2\text{O}$) (Lit.⁴⁵) $[\alpha]_D^{25} = -22.5 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2, \text{H}_2\text{O}$)).

Glycyl-prolin: Aus Z-Gly-Pro-OBzl, Ausb. 78%, Schmp. 180°C (Wasser/Äthanol/Äther) (Lit.⁴⁹) 185°C), $[\alpha]_D^{20} = -112.1^\circ$ ($c = 3.9, \text{H}_2\text{O}$) (Lit.⁴⁹) $[\alpha]_D^{20} = -113.8^\circ$ ($c = 3.9, \text{H}_2\text{O}$)).

N-(Benzylloxycarbonyl)prolyl-prolin-benzylester:

$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$ (436.5) Ber. C 68.79 H 6.47 N 6.42 Gef. C 68.81 H 6.39 N 6.44

Prolyl-prolin: Aus Z-Pro-Pro-OBzl, Ausb. 64%, Schmp. 125–127°C (Äthanol/Essigester/Äther) (Lit. 144–145°C⁵⁰, 110–122°C⁵¹), $[\alpha]_D^{24} = -166.3^\circ$ ($c = 0.5, \text{H}_2\text{O}$) (Lit. $[\alpha]_D^{25} = -169^\circ$ ($c = 0.5, \text{H}_2\text{O}$)⁵⁰, $[\alpha]_D^{21} = -160.2^\circ$ ($c = 1, \text{H}_2\text{O}$)⁵¹)).

N-(Benzylloxycarbonyl)alanyl-alanin: Aus Z-Ala-Ala-OC₂H₅, Ausb. 85%, Schmp. 148–150°C (Wasser) (Lit.⁵²) 146–148°C), $[\alpha]_D^{20} = -34.2^\circ$ ($c = 2, \text{CH}_3\text{OH}$)).

Alanyl-alanin: Aus Z-Ala-Ala-OH, Ausb. 87%, $[\alpha]_D^{20} = -20.9^\circ$ ($c = 2, \text{H}_2\text{O}$) (Lit.⁵³) $[\alpha]_D^{25} = -21.2^\circ$ ($c = 2, \text{H}_2\text{O}$)).

N-(Benzylloxycarbonyl)valyl-phenylalanyl-glycin-äthylester: Das Tripeptid Z-Val-Phe-Gly-OC₂H₅ wird aus Z-Val-OH und Phe-Gly-OC₂H₅ · HBr entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift dargestellt. Nach Ablauf der Reaktion wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Den Rückstand nimmt man in 100 ml Essigester und 20 ml Wasser auf. Die Essigesterphase wird abgetrennt und eingedampft. Der hauptsächlich aus Tripeptid und Triphenylphosphinoxid bestehende Rückstand wird aus Äthanol umkristallisiert, wobei reines Peptid erhalten wird.

N-(Benzylloxycarbonyl)leucyl-alanyl-valyl-phenylalanyl-glycin-äthylester: Das Pentapeptid Z-Leu-Ala-Val-Phe-Gly-OC₂H₅ wird aus Z-Leu-Ala-OH und H-Val-Phe-Gly-OC₂H₅ · HBr im 1.7 mmolaren Ansatz in 5 ml Acetonitril dargestellt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand in Essigsäure aufgenommen. Bei Zusatz von Wasser fallen Peptid und Phosphinoxid wieder aus. Durch Umkristallisieren aus 90proz. Äthanol kann das Pentapeptid rein gewonnen werden.

⁴⁴) J. C. Sheehan und D.-D. H. Young, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 1154 (1958).

⁴⁵) W. Graßmann und E. Wunsch, Chem. Ber. **91**, 449 (1958).

⁴⁶) E. Fischer und H. Scheibler, Liebigs Ann. Chem. **363**, 136 (1908).

⁴⁷) K. R. Rao, S. M. Birnbaum, R. B. Kingsley und J. P. Greenstein, J. Biol. Chem. **198**, 507 (1952).

⁴⁸) H. N. Rydon und P. W. G. Smith, J. Chem. Soc. **1956**, 3642.

⁴⁹) M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich und F. Leinert, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **212**, 72 (1932).

⁵⁰) R. Rothe, R. Theyson und K. D. Steffen, Tetrahedron Lett. **1970**, 4063.

⁵¹) N. C. Davis und E. L. Smith, J. Biol. Chem. **200**, 373 (1953).

⁵²) T. A. Lubkova, T. A. Mironow, G. A. Vasil'eva, R. P. Evstigneeva und N. A. Preobrazhenskii, Zh. Obshch. Khim. **38**, 2247 (1968) [C. A. **70**, 38088t (1969)].

⁵³) B. F. Erlanger und E. Brand, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 3508 (1951).

N-(Benzoyloxycarbonyl)leucyl-alanyl-valyl-phenylalanyl-glycyl-prolin-benzylester: Das Hexapeptid Z-Leu-Ala-Val-Phe-Gly-Pro-OBzl wird aus Z-Leu-Ala-Val-Phe-Gly-OH und H-Pro-OBzl · HCl im 0.22 mmolaren Ansatz in 5 ml Acetonitril dargestellt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Wasser, Kaliumhydrogencarbonat-, Citronensäurelösung und wiederum mit Wasser ausgewaschen und aus 90proz. Äthanol umkristallisiert. Das Hexapeptid fällt dabei in reiner Form an.

N-(Benzoyloxycarbonyl)glycyl-tyrosin-benzylester:

$C_{26}H_{26}N_2O_6$ (462.5) Ber. C 67.35 H 5.74 N 5.93 Gef. C 67.52 H 5.67 N 6.06

Glycyl-tyrosin: Aus Z-Gly-Tyr-OBzl, Ausb. 65%, Schmp. $>260^\circ\text{C}$ (Wasser/Äthanol) (Lit. ⁴⁷) $>210^\circ\text{C}$), $[\alpha]_D^{25} = +46.8^\circ$ ($c = 1, \text{H}_2\text{O}$) (Lit. ⁵⁴) $[\alpha]_D^{25} = +44.0^\circ$ ($c = 1, \text{H}_2\text{O}$), $[\alpha]_D^{25} = +42.3^\circ$ ($c = 1, \text{H}_2\text{O} + 1 \text{ Äquiv. HCl}$) (Lit. ⁵⁴) $[\alpha]_D^{25} = +43.5 \pm 1^\circ$ ($c = 1, \text{H}_2\text{O} + 1 \text{ Äquiv. HCl}$).

N-(Benzoyloxycarbonyl)glutaminyl-glycin-benzylester: Das in Essigester schlecht lösliche Peptid konnte aus dem eingengten Reaktionsvolumen nach Auswaschen der ionischen Bestandteile durch Umkristallisieren aus Äthanol/Essigester rein gewonnen werden.

$C_{22}H_{23}N_3O_6$ (427.4) Ber. C 61.81 H 5.90 N 9.83 Gef. C 62.04 H 5.78 N 9.46

Glutaminyl-glycin: Aus Z-Gln-Gly-OBzl, Ausb. 76%, Schmp. $180-181^\circ\text{C}$ (Wasser/Äthanol) (Lit. $170-172^\circ\text{C}$ ⁵⁶), $163-165^\circ\text{C}$ ⁵⁷), $[\alpha]_D^{25} = +79.6^\circ$ ($c = 2.6, \text{H}_2\text{O}$) (Lit. ⁵⁵) $[\alpha]_D^{25} = +76.3^\circ$ ($c = 2.6, \text{H}_2\text{O}$), $[\alpha]_D^{22} = +81.2^\circ$ ($c = 1.7, \text{H}_2\text{O}$) (Lit. ⁵⁶) $[\alpha]_D^{22} = +78^\circ$ ($c = 1.7, \text{H}_2\text{O}$).

Gaschromatographische Bestimmung von Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff

Die molaren Verhältnisse der in den Gl. (8–12) angegebenen Komponenten wurden wie in der allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben gewählt. Als innerer Standard für die GC wurde Benzol zugegeben. Nach Thermostatisieren auf 20°C wurde die Reaktion mit der Zugabe von Tetrachlorkohlenstoff gestartet. Nach 5 min beginnend wurden in 15-min-Intervallen Gaschromatogramme aufgenommen. Durch Vergleich mit einer Standardlösung mit ähnlichen Konzentrationen an Acetonitril, Benzol, Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff wurde der jeweilige Gehalt an Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff aus den Chromatogrammen ermittelt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 1 und 2 niedergelegt.

Basenabhängigkeit

Mit den im theoretischen Teil angegebenen Hilfsbasen wurde neben den der allgemeinen Arbeitsvorschrift entsprechenden molaren Verhältnissen die Reaktion auch noch ohne Phosphinüberschuß und mit nur 10proz. Phosphinüberschuß durchgeführt. Nach 3 d Reaktionszeit bei 0°C wurde durch Zugabe von 1 ml Wasser die Reaktion abgebrochen und das Lösungsmittel abgezogen. Bei der Aufarbeitung nach üblichem Verfahren wurden die anfallenden Waschwasser polarimetrisch vermessen. Zur Kontrolle wurden drei Ansätze noch säulenchromatographisch aufgearbeitet. Die Abweichungen von den aus den Waschlösungen bestimmten Ausbeuten betragen weniger als 1%. Die Ergebnisse der Untersuchung der Basenabhängigkeit sind in den Abb. 3 und 4 zu finden.

⁵⁴) E. Wünsch, G. Fries und A. Zwick, Chem. Ber. **91**, 542 (1958).

⁵⁵) S. Goldschmidt und C. Jutz, Chem. Ber. **89**, 518 (1956).

⁵⁶) E. Sondheimer und R. W. Holley, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 2816 (1954).