Chem. Ber. **109**, 801 – 804 (1976)

Notiz über die Peptidsynthese mit Triphenylphosphin/ Tetrachlorkohlenstoff als Kondensationsreagenz, II[1]

*Rolf Appel**, *Günter Bäumer* und *Werner Strüver*

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

Eingegangen am 3. Juli 1975

Das Dehydratisierungsreagenz Triphenylphosphin/Tetrahalomethan ist inzwischen von mehreren Arbeitskreisen[2-7] zur Peptidsynthese eingesetzt worden. Wie schon ausgeführt[7], läuft die Reaktion im wesentlichen nach folgender Bruttogleichung ab:

$$Ph_3P + CCl_4 + 2(C_2H_5)_3N + R-NH-CHR-CO_2H + H_2N-CHR-CO_2R \cdot HX \rightarrow$$
$$Ph_3PO + CHCl_3 + [(C_2H_5)_3NH]^+Cl^- + [(C_2H_5)_3NH]^+X^- + R-NH-CHR-CO-NH-CHR-CO_2R$$
$$(X = Cl, Br, TosO)$$

Dabei blieb die optische Reinheit in einigen Fällen erhalten, während in anderen Racemisierung festgestellt wurde. Es erschien uns daher erforderlich, die Peptidknüpfung mit Triphenylphosphin/ Tetrachlorkohlenstoff besonders unter diesem Aspekt weiter zu untersuchen.

Angeregt durch die Untersuchungen von *Wieland* und *Seeliger*[3], die bei der Synthese von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)alanyl-phenylalanyl-prolin-methylester mit Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff eine vollständige Racemisierung des Phenylalanins fanden, führten wir den Anderson-Test[8] durch. Bei diesem Test wird ebenfalls die Racemisierung des Phenylalanins beim Peptidaufbau von der Acylseite her untersucht. Wir fanden hierbei einen Racematanteil von 65 ± 1.5% (siehe Tab. 1), während der strenge Young-Test[9] mit Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff zum Racemat führte.

Die Kopplung eines *N*-Acylpeptids mit einer Aminkomponente scheint folglich mit dieser Methode kritisch zu sein.

Unser Ziel war es nun, die Racemisierung der Acylkomponenten zu unterdrücken. Einen Ansatzpunkt boten unsere Untersuchungen über den Mechanismus der Reaktion[7], bei denen wir eine Aktivierung der Acylkomponenten wahrscheinlich machen konnten.

Eine Aktivierung der Acylkomponenten erfolgt ebenfalls bei der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode[10], bei der die Racemisierung durch Zusätze gesenkt werden kann. Das von *König* und

[1] 30. Mitteil. über die gemeinsame Einwirkung von Phosphinen und Tetrachlorkohlenstoff auf Nucleophile (Nachtrag zur 27. Mitteil.: s. l. c.[7]); 29. Mitteil.: *R. Appel, F. Knoll, W. Michel, W. Morbach, H. D. Wihler* und *H. Veltmann*, Chem. Ber. **109**, 58 (1976).
[2] *S. Yamada* und *Y. Takeuchi*, Tetrahedron Lett. **1971**, 3595.
[3] *Th. Wieland* und *A. Seeliger*, Chem. Ber. **104**, 3992 (1971).
[4] *L. E. Barstow* und *V. J. Hruby*, J. Org. Chem. **36**, (9), 1305 (1971).
[5] *Y. Takeuchi* und *S. Yamada*, Chem. Pharm. Bull. **22**, (4), 832 (1974).
[6] *Y. Takeuchi* und *S. Yamada*, Chem. Pharm. Bull. **22**, (4), 841 (1974).
[7] *R. Appel, G. Bäumer* und *W. Strüver*, Chem. Ber. **108**, 2680 (1975).
[8] *G. W. Anderson* und *F. M. Callahan*, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 2902 (1958).
[9] *M. W. Williams* und *G. T. Young*, J. Chem. Soc. **1963**, 881.
[10] *J. C. Sheehan* und *G. P. Hess*, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

Geiger[11] zu diesem Zweck zugegebene 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol führt hierbei über einen aktivierten Ester **5** (siehe unten) zu optisch reineren Produkten. Eigene Versuche, 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol als Zusatz beim Anderson-Test mit Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff als Kondensationsreagenz einzusetzen, führten zu den in Tab. 1 angegebenen Ergebnissen.

Tab. 1. Anderson-Test

Z-Gly-Phe-OCH_3 (1) Methode	Z-Gly-Phe-Gly-OC_2H_5 (2) Methode	Ausbeute (%)	Racemat (%) 2. Schritt	Gesamt-L-Peptid (%)
1a	2a	88.0	66.5	66.75
	2b	70.0	–	100.0
	2c	54.4	–	100.0
1b	2a	86.5	64.0	68.0
	2b	73.0	–	100.0
	2c	44.0	–	100.0
1c	2a	85.5	65.0	67.5
	2b	81.0	–	100.0
	2c	63.5	–	100.0

Verknüpfungsmethoden: a Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff.
b Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff/1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol.
c Azidmethode[12].

Bei der Durchführung des Anderson-Tests wird das Tripeptid *N*-(Benzyloxycarbonyl)glycyl-phenylalanyl-glycin-äthylester (**2**) vom Acylende her aufgebaut. Im ersten Schritt erfolgt die Peptidknüpfung zum *N*-(Benzyloxycarbonyl)glycyl-phenylalanin-methylester (**1**). Um festzustellen, ob bei diesem Schritt Racemisierung eintritt, wurde dieser a) ohne Zusatz, b) mit Zusatz von 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol, c) nach der Azidmethode durchgeführt. Im zweiten Schritt wird *N*-(Benzyloxycarbonyl)glycyl-phenylalanin (**1a**) mit Glycin-äthylester umgesetzt. Auch dieser Schritt wurde nach allen drei Methoden ausgeführt (2a wie unter 1a, 2b wie unter 1b und 2c wie unter 1c). Nur bei den Kombinationen 1a/2a, 1b/2a, 1c/2a konnte Racemisierung festgestellt werden. Phenylalaninmethylester als Aminkomponente erleidet folglich auch ohne Zusatz keine Racemisierung.

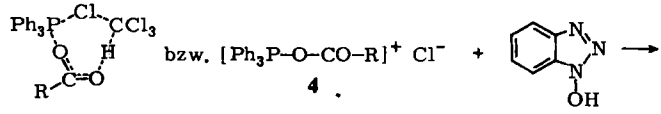
Beim Young-Test senkt der Zusatz von 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol den Racematanteil von 100% auf 39.4%, so daß neben 80.3% L- nur noch 19.7% D-Peptid vorliegen.

Mechanismus der Reaktion

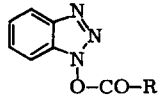
Der bei der Reaktion als Zwischenstufe angenommene aktivierte Komplex **3** bzw. das Acyloxyphosphoniumsalz **4** können mit dem starken Nucleophil 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol zu dem von *König* und *Geiger* gefundenen aktivierten Ester **5** führen.

5 reagiert nach *König* und *Geiger* darauf mit der Aminkomponente zum Peptid. Die eindeutige Wirksamkeit als racemisierungssenkender Zusatz macht den analogen Reaktionsweg auch bei der Kondensation mit Ph_3P/CCl_4 wahrscheinlich. Zur Stützung dieser Annahme wurde der vom *N*-(Benzyloxycarbonyl)phenylalanin abgeleitete Ester **5** mit Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff und Triäthylamin in Acetonitril dargestellt. In Dioxan zeigte der Ester Carbonylschwingungen bei 1715 und 1815 cm^{-1} (Lit.[11] 1715 und 1815 cm^{-1}, in Dioxan).

[11] *W. König* und *R. Geiger*, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).
[12] *Th. Curtius*, Ber. Deut. Chem. Ges. **35**, 3226 (1902).



3 bzw. $[Ph_3P{-}O{-}CO{-}R]^+ Cl^-$ 4 + →



5 + Ph_3PO + $CHCl_3$ + HCl bzw. Ph_3PO + HCl

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 Triäthylamin 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.

N-(Benzyloxycarbonyl)glycyl-phenylalanin (**1a**)

Methode 1a: 2.09 g (10 mmol) *N*-(Benzyloxycarbonyl)glycin, 2.16 g (10 mmol) L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid und 3.15 g (12 mmol) Triphenylphosphin werden in 20 ml absol. Acetonitril vorgelegt. Dazu gibt man 2.8 ml (20 mmol) Triäthylamin und 1.0 ml (10 mmol) Tetrachlorkohlenstoff. Das Gemisch wird bei Raumtemp. über Nacht gerührt. Dann wird i. Vak. eingedampft. Den Rückstand nimmt man in 100 ml Essigester auf und fügt 20 ml Wasser zu. Die Essigesterphase wird dreimal mit je 10 ml 10proz. Citronensäurelösung, dreimal mit je 10 ml 10proz. $NaHCO_3$-Lösung und zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die mit Na_2SO_4 getrocknete Lösung wird eingedampft. Der Rückstand wird in 15 ml Methanol aufgenommen und zur Verseifung mit 15 ml 1 N NaOH versetzt. Nach 2 stdg. Rühren ist die Verseifung, die mit DC verfolgt wird, abgelaufen. Zur Abtrennung von Triphenylphosphinoxid und Triphenylphosphin wird mit Essigester dreimal extrahiert und nach Ansäuern der wäßrigen Phase auf pH 2 – 3 **1a** mit Essigester zweimal extrahiert. Die Essigesterphase wird nach Trocknen mit Na_2SO_4 eingedampft, das anfallende Peptid **1a** über P_2O_5 getrocknet und ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet.

Methode 1b: Bei ansonsten gleichem Verfahren wie unter 1a wird die Reaktion unter Zusatz von 1.62 g (12 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol durchgeführt.

Methode 1c: Die Peptidknüpfung wird von *N*-(Benzyloxycarbonyl)glycin-methylester ausgehend nach der Azidmethode durchgeführt.

N-(Benzyloxycarbonyl)glycyl-phenylalanyl-glycin-äthylester (**2**)

Methode 2a: **1a** wird analog Methode 1a mit Glycin-äthylester-hydrochlorid zu **2** umgesetzt. Das zusammen mit Triphenylphosphinoxid und Triphenylphosphin anfallende **2** wird zweimal mit wenig Äthanol aufgenommen und nach Abziehen des Äthanols über P_2O_5 getrocknet. Aus dem Gesamtgewicht wird die ungefähre Ausbeute an Peptid berechnet und eine, auf Peptid bezogen, 2proz. äthanolische Lösung bei Raumtemp. der Kristallisation überlassen. Die anfallenden Racemate werden mit DC auf Einheitlichkeit untersucht und neben der Bestimmung des Schmelzpunktes

(129 – 133 °C, Lit.[8] 129 – 133 °C) noch durch polarimetrische Messung sichergestellt, daß die nach weiterem Einengen anfallenden Racematfraktionen noch keinen Überschuß an L-Produkt enthalten. Die rein anfallenden Fraktionen des L-Isomeren haben eine spezif. Drehung von $[\alpha]_D^{23} = -12.3 \pm 0.1°$, $c = 2$, C_2H_5OH (Lit.[13] $[\alpha]_D^{23} = -12.4°$, $c = 2$, C_2H_5OH).

Methode 2b: Bei ansonsten gleichem Verfahren wie unter Methode 2a wurde die Reaktion unter Zusatz von 1.62 g (12 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol durchgeführt.

Methode 2c: Die Peptidknüpfung wurde vom Gemisch aus **1**, Triphenylphosphinoxid und Triphenylphosphin (Kombinationen 1a/2c, 1b/2c) bzw. von **1** ausgehend (Kombination 1c/2c) nach der Azidmethode durchgeführt. Aus dem Gemisch fiel in äthanolischer Lösung mit Hydrazinhydrat das entsprechende Hydrazid rein aus und wurde wie üblich weiter umgesetzt.

Young-Test[9]

Methode 3a: *N*-Benzoylleucyl-glycin-äthylester wurde analog Methode 1a im Gemisch mit Triphenylphosphinoxid und Triphenylphosphin erhalten. Das Gemisch wurde an einer Kieselgelsäule (3 × 100 cm) in Essigester chromatographiert. Eine Trennung der optischen Antipoden durch dieses Verfahren konnte ausgeschlossen werden, da im Eluat nur eine Peptidfraktion auftrat. Diese Fraktion wurde vom Lösungsmittel befreit. Die polarimetrische Messung zeigte totale Racemisierung.

Methode 3b: Unter Zusatz von 1.62 g (12 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol wurde wie bei 3a verfahren. Bei einer Peptidausbeute von 89% wurde eine spezif. Drehung von $[\alpha]_D^{20} = -20.6°$ ($c = 3.1$, C_2H_5OH) erhalten. Das reine L-Isomere zeigt $[\alpha]_D^{20} = -34.0°$ ($c = 3.1$, C_2H_5OH)[5]. Daraus errechnet sich ein Racematanteil von 39.4%, so daß neben 80.3% L- nur noch 19.7% D-Isomeres vorliegen.

[13] *Y. V. Mitin* und *O. V. Glinskaya*, Tetrahedron Lett. **1969**, 5267.

[295/75]

© Verlag Chemie, GmbH, D-6940 Weinheim, 1976 – Printed in Germany.

Verantwortlich für den Inhalt: Prof. Dr. Hans Musso, Karlsruhe. Redaktion: Dr. Hermann Zahn, München. Verantwortlich für den Anzeigenteil: H. Both, Verlag Chemie, GmbH (Geschäftsführer Jürgen Kreuzhage und Hans Schermer), D-6940 Weinheim, Pappelallee 3, Postfach 1260/1280 – Telefon (06201)14031, Telex 465516 vchwh d. Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen und dgl. in dieser Zeitschrift berechtigt nicht zu der Annahme, daß solche Namen ohne weiteres von jedermann benutzt werden dürfen. Vielmehr handelt es sich häufig um gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen, auch wenn sie nicht als solche gekennzeichnet sind. – Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in fremde Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieser Zeitschrift darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikrofilm oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. – All rights reserved (including those of translation into foreign languages). No part of this issue may be reproduced in any form – by photoprint, microfilm, or any other means – nor transmitted or translated into a machine language without the permission in writing of the publishers. – Von einzelnen Beiträgen oder Teilen von ihnen dürfen nur einzelne Vervielfältigungsstücke für den persönlichen und sonstigen eigenen Gebrauch hergestellt werden. Jede im Bereich eines gewerblichen Unternehmens hergestellte oder benutzte Kopie dient gewerblichen Zwecken gem. § 54 (2) UrhG und verpflichtet zur Gebührenzahlung an die VG Wissenschaft GmbH, D-6000 Frankfurt/Main 1, Großer Hirschgraben 17/21, von der die einzelnen Zahlungsmodalitäten zu erfragen sind. Die Weitergabe von Vervielfältigungen, gleichgültig zu welchem Zweck sie hergestellt werden, ist eine Urheberrechtsverletzung. – Preis jährlich DM 540.– zuzügl. Versandgebühren; Einzelheft DM 58.– (In diesen Preisen sind 5.5% Mehrwertsteuer enthalten.) Die Bezugsbedingungen für die Mitglieder der Gesellschaft Deutscher Chemiker werden auf Anfrage von der Geschäftsstelle, 6 Frankfurt 90, Carl-Bosch-Haus, Varrentrappstraße 40–42, Postfach 900440, mitgeteilt. – Abbestellungen nur bis spätestens 8 Wochen vor Ablauf des Kalenderjahres, Gerichtsstand und Erfüllungsort Weinheim/Bergstr. – Lieferung erfolgt auf Rechnung und Gefahr des Empfängers.

In der Zeitschrift werden keine Rezensionen veröffentlicht; zur Besprechung eingehende Bücher werden nicht zurückgesandt.

Erscheint monatlich. – Druck: Werk- und Feindruckerei Dr. Alexander Krebs, Hemsbach/Bergstr.