

Tertiäres Phosphin/Hexachlorethan als Kondensationsreagenz für die Peptidsynthese¹⁾

Rolf Appel* und Lothar Willms

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

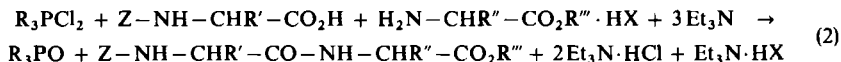
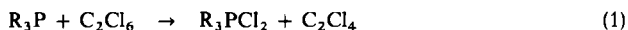
Eingegangen am 27. Januar 1977

Tertiary Phosphines/Hexachloroethane as Condensing Agent in Peptide Synthesis¹⁾

A new method for the convenient preparation of peptides *via* a simultaneous action of tertiary phosphines and hexachloroethane on *N*-protected amino acids and amino acid esters is reported. The procedure is transferred on a Ph₂P-containing resin which can be regenerated easily on treatment with phosgene.

Ein neues Verfahren zur Darstellung von Dichlorphosphoranen beruht auf der Einwirkung von Hexachlorethan auf tertiäre Phosphine nach Gl. (1)²⁾. Es empfiehlt sich besonders dann, wenn die feuchtigkeitsempfindlichen Dichlorphosphorane, die sich ausgezeichnet zur intra- oder intermolekularen Wasserabspaltung eignen^{3,4)}, *in situ* erzeugt und sofort im Dehydratisierungsschritt verbraucht werden. Evtl. überschüssiges C₂Cl₆ und das daraus entstehende Tetrachlorethylen sind inert und reagieren nicht – anders als Cl₂ und Phosgen – mit dem Substrat.

Nachdem das Reagenz erfolgreich bei zahlreichen intramolekularen Dehydratisierungsreaktionen eingesetzt worden ist⁵⁾, haben wir es jetzt auch mit guten Ergebnissen zur Peptid-Synthese (Gl. 2) herangezogen.



Als Phosphinkomponente bewährte sich besonders Triphenylphosphin oder – als polymeranaloge Variante – triphenylphosphinhaltiges Polystyrol^{6–8)}, da bei der letzteren Arbeitsweise ein von Phosphinoxid freies Produkt erhalten wird. Das als Nebenprodukt anfallende Tetrachlorethylen läßt sich durch Abdestillieren im Vakuum leicht entfernen. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

¹⁾ 5. Mittel.: Über Phosphororganische Peptidknüpfungsreagenzien; 4. Mittel.: Siehe Lit.⁸⁾.

²⁾ R. Appel und H. Schöler, Chem. Ber. 110, 2382 (1977).

³⁾ L. Horner, H. Oediger und H. Hoffmann, Liebigs Ann. Chem. 626, 26 (1959).

⁴⁾ L. Horner und H. Oediger, Liebigs Ann. Chem. 627, 142 (1959).

⁵⁾ R. Appel und E. Gabel, in Vorbereitung.

⁶⁾ H. M. Relles und R. W. Schlunz, J. Am. Chem. Soc. 90, 6469 (1974).

⁷⁾ R. Appel, W. Strüver und L. Willms, Tetrahedron Lett. 1976, 905.

⁸⁾ R. Appel und L. Willms, J. Chem. Research (S), 1977, 84; J. Chem. Research (M), 1977, 0901 bis 0914.

Tab. 1. Dipeptide mit den Aminosäuren Glycin, Prolin, Phenylalanin und Tyrosin

Nr.	Peptidderivat	Verknüpfungsmethode (% Ausb.)	Schmp. °C Gef. (Lit.)	Gef.	$[\alpha]_D^{25}$	Lit.
1	Z-Pro-Gly-OBzl	a (97,5)	88 (88-89) ⁹⁾	-57,9° (22°C, c = 2, EtOH)	-56,9°	(22°C, c = 2, EtOH) ⁹⁾
2	Z-Pro-Gly-OBzl	b (96,7)	86-88 (88-89) ⁹⁾	-58,6° (22°C, c = 2, EtOH)	-56,9°	(22°C, c = 2, EtOH) ⁹⁾
3	Z-Pro-Gly-OBzl	c (97,0)	87-88 (88-89) ⁹⁾	-58,6° (22°C, c = 2, EtOH)	-56,9°	(22°C, c = 2, EtOH) ⁹⁾
4	Z-Pro-Gly-OBzl	c (mit COCl ₂ regeneriert) (95,0)	86-88 (88-89) ⁹⁾	-58,4° (22°C, c = 2, EtOH)	-56,9°	(22°C, c = 2, EtOH) ⁹⁾
5	Z-Phe-Tyr-OEt	c (99,0)	153-155 (159-160) ¹⁰⁾	-9,3° (24°C, c = 10, EtOH)	-9,4°	(24°C, c = 10, EtOH) ¹⁰⁾

Verknüpfungsmethode: a Triphenylphosphin/C₂Cl₆
 b lineares Polystyrolidiphenylphosphinharz/C₂Cl₆
 c vernetztes Polystyrolidiphenylphosphinharz (2 Gew.-% DVB)/C₂Cl₆

⁹⁾ R. Appel, G. Bäumer und W. Strüver, Chem. Ber. **108**, 2680 (1975).


¹⁰⁾ J. R. Vaughan und R. L. Osato, J. Am. Chem. Soc. **74**, 676 (1952).

Die polymer gebundenen Phosphinoxid-Gruppierungen lassen sich mit Trichlorsilan reduzieren¹¹⁻¹³⁾ oder gleich mit Phosgen¹⁴⁾ in die polymeranalogen Dichlorphosphorane überführen⁶⁾. Die Harze sind nach ihrer Regenerierung wieder voll verwendungsfähig (vgl. Tab. 1, Nr. 4 bzw. Tab. 2, Nr. 4).

Die Racemisierungstendenz der Acylkomponenten wurde nach den Testmodellen von Young¹⁵⁾ und Anderson¹⁶⁾ untersucht, Ergebnisse s. Tabellen 2 und 3. Danach führt die Anwendung der Phosphin/C₂Cl₆-Methode bei beiden Tests zu weitgehender Racemisierung, durch Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol wird die Racemisierungsrate jedoch stark herabgesetzt.

Andere tertiäre Phosphine wie Tri-n-butylphosphin, Tris(dimethylamino)phosphin oder Trimorpholinophosphin in Kombination mit Hexachlorethan sind weniger zur Peptidverknüpfung geeignet (vgl. Tab. 2, Nr. 5-7). Neben den gewünschten Peptidderivaten entstehen einige nicht-identifizierte Nebenprodukte, welche säulenchromatographisch abgetrennt werden müssen.

Tab. 2. Young-Test (Synthese von Bz-Leu-Gly-OEt aus Bz-L-Leu-OH und HCl·H-Gly-OEt, Hilfsbase Triethylamin)

Nr.	Verknüpfungsmethode	Zusatz 1-HBT*) (Äquiv.)	% Ausb.	% D-Ver- bindung
1	a	—	97.7	47.7
2	a	2	99.3	20.9
3	c	—	93.8	48.3
4	a (mit HSiCl ₃ regeneriert)	—	88.8	47.0
5	n-Bu ₃ P/C ₂ Cl ₆	2	78.1	38.1
6	(Me ₂ N) ₃ P/C ₂ Cl ₆	2	57.3	33.4
7	( N) ₃ P/C ₂ Cl ₆	2	63.5	19.3

*) S. Tab. 3.

Tab. 3. Anderson-Test (Synthese von Z-Gly-Phe-Gly-OEt aus Z-Gly-L-Phe-OH und HCl·H-Gly-OEt, Hilfsbase Triethylamin)

Nr.	Verknüpfungsmethode	Zusatz 1-HBT*) (Äquiv.)	% Ausb.	% D-Verbindung
1	a	—	97.7	44.3
2	a	2	97.0	3.1
3	c	2	96.9	2.4

*) Abkürzung für 1-Hydroxybenzotriazol.

Das neue Verfahren zur Darstellung von Dichlorphosphoranen bewährte sich weiterhin bei der Aktivitätsbestimmung von linearen und vernetzten Polystyrol-Diphenylphosphin-Harzen. Definierte Mengen der Polymeren werden hierzu in Dichlormethan gelöst bzw. suspendiert und mit einem Überschuß an Hexachlorethan versetzt. Das entstehende Tetrachlorethylen wird

¹¹⁾ W. Heitz und R. Michels, Liebigs Ann. Chem. 1973, 227.

¹²⁾ S. L. Regen und D. P. Lee, J. Org. Chem. 40, 1669 (1975).

¹³⁾ K. Horiki, Tetrahedron Lett. 1976, 4103.

¹⁴⁾ BASF A.-G. (Erf. R. Appel und W. Heinzelmann), German Pat. 1192205 (6. Mai 1965) [C. A. 63, 8405 g (1965)].

¹⁵⁾ M. W. Williams und G. T. Young, J. Chem. Soc. 1963, 881.

¹⁶⁾ G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Am. Chem. Soc. 80, 2902 (1958).

mittels quantitativer Gaschromatographie erfaßt und die Anzahl der reaktiven Ph_2P -Gruppierungen des Polymeren in mmol pro Gramm berechnet. Die Leistungsfähigkeit dieser Bestimmungsmethode wurde an Harzen erprobt, welche durch Homopolymerisation von *p*-Vinyltriphenylphosphin¹⁷⁾ oder durch Copolymerisation von *p*-Vinyltriphenylphosphin mit Divinylbenzol^{18, 19)} hergestellt wurden und deren Phosphorgehalt somit bekannt war (vgl. Tab. 4, Nr. 2 und Nr. 3). Die Polymeren Nr. 4 und Nr. 5 wurden nach der Vorschrift von *Relles* und *Schluenz*⁶⁾ durch Bromierung von Polystyrol und anschließende Umsetzung mit Lithiumdiphenylphosphid erhalten. Die gefundenen Aktivitäten dieser Harze liegen um ca. 10% unter den Werten, welche man direkt aus den Bromanalysen der Polymeren vor und nach der Phosphinierung erhält⁸⁾. Diese Differenz ist dadurch zu erklären, daß ein Teil der Phosphengruppen an unzugänglichen Stellen der Polymerketten liegt oder während der Darstellung in inaktive $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})$ -Gruppierungen übergeführt wird.

Tab. 4. Aktivitätsbestimmung von linearen und vernetzten Polystyrol-Diphenylphosphin-Harzen

Nr.	Phosphin-*) komponente	theor. Aktivität (mmol/g)	gef.**) Aktivität (mmol/g)	Aktivität (indirekt aus den Bromanalysen berechnet)
1	a	3.82	3.86	—
2	b	3.47	3.50	—
3	c	3.44	3.51	—
4	d	3.47	2.65	2.94
5	e	3.44	2.90	3.29

*) Phosphinkomponenten:

a Triphenylphosphin

b lineares Phosphinharz (aus $p\text{-H}_2\text{C}=\text{CHC}_6\text{H}_4\text{PPh}_2$)

c vernetztes Phosphinharz (aus $p\text{-H}_2\text{C}=\text{CHC}_6\text{H}_4\text{PPh}_2$, 2 Gew.-% DVB)

d lineares Phosphinharz (durch Phosphinierung von *p*-Brompolystyrol)

e vernetztes Phosphinharz (durch Phosphinierung von *p*-Brompolystyrol, 2 Gew.-% DVB)

***) Jeder Meßwert stellt den Mittelwert von zwei unabhängigen Ansätzen dar.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Förderung dieser Arbeit durch eine Sachbeihilfe, der *Bayer AG*, Leverkusen, für die Überlassung der Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymerisate und der *BASF Aktiengesellschaft*, Ludwigshafen, für die kostenlose Lieferung von Triphenylphosphin.

Experimenteller Teil

Die verwendeten Aminosäurederivate sind in dünn-schichtchromatographisch einheitlicher Form eingesetzt worden und stimmen in Schmelzpunkt und Drehwert mit Literaturangaben überein. — Alle Chemikalien, ausgenommen PPh_3 und die Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymerisate, waren Handelsware. Die Schmelzpunkte wurden auf einem Apparat der Firma Büchi, Flawil/Schweiz bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Drehwerte wurden in einem thermostatisierten 1-dm-Rohr im Polarimeter 141 der Firma Perkin-Elmer gemessen. — Dichlormethan und Triethylamin wurden nach den üblichen Verfahren wasserfrei gemacht.

¹⁷⁾ D. Braun, H. Daimon und G. Becker, Makromol. Chem. **62**, 183 (1963).

¹⁸⁾ F. Camps, J. Castells, J. Font und F. Vela, Tetrahedron Lett. **1971**, 1715.

¹⁹⁾ S. V. McKinley und J. W. Rakshys, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1972**, 134.

Allgemeine Arbeitsvorschrift

Verknüpfungsmethode a: 5 mmol der Carboxylkomponente (*Z*-Aminosäure), 5 mmol der Aminkomponente (Salz des Aminosäureesters), 5,5 mmol Triphenylphosphin und 5,5 mmol Hexachlorethan werden bei 0°C in 20 ml Dichlormethan unter Stickstoffatmosphäre vorgelegt und mit 15 mmol Triethylamin versetzt. Nach 2 h wird das Eisbad entfernt und das Gemisch bei Raumtemp. über Nacht gerührt. Im Anschluß daran wird das Lösungsmittel i. Ölpumpenvak. abgezogen und der Rückstand in 50 ml Essigester und 10 ml Wasser aufgenommen. Nach dem Waschen mit Zitronensäurelösung (10proz.), Natriumhydrogencarbonatlösung (10proz.) und gesättigter Natriumchloridlösung wird das verbliebene Substanzgemisch aus Peptid und Triphenylphosphinoxid durch Säulenchromatographie getrennt (180 × 3 cm Kieselgel Woelm 0.063 – 0.1 mm, Laufmittel Essigester). Der nach dem Eindampfen der Peptidfraktion verbleibende Rückstand wird aus Essigester/Petrolether (50/70°) umkristallisiert.

Verknüpfungsmethode b: Unter Inertgasatmosphäre werden 5 mmol *N*-geschützte Aminosäure, 5 mmol Aminosäureester-Salz, 5,5 mmol lineares Phosphinharz (Aktivität 2.65 mmol/g) und 5,5 mmol Hexachlorethan unter Eiskühlung in 20 ml Dichlormethan gelöst und mit 15 mmol Triethylamin versetzt. Nach zweistündigem Rühren wird das Eisbad entfernt und die Lösung über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Ölpumpenvak. abdestilliert und der Ansatz wie üblich aufgearbeitet⁸⁾.

Verknüpfungsmethode c: 5 mmol *N*-geschützte Aminosäure, 5 mmol Aminosäureester-Salz, 7 mmol vernetztes Phosphinharz (2 Gew.-% DVB, Aktivität 2.90 mmol/g) und 5,5 mmol Hexachlorethan werden unter Stickstoff in 20 ml Dichlormethan suspendiert. Nach Zugabe von 15 mmol Triethylamin wird der Ansatz 2 h bei 0°C, anschließend über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Das Polymere wird abfiltriert und mit Dichlormethan und Methanol intensiv gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Ölpumpenvak. eingedampft und die verbleibende Masse wie üblich aufgearbeitet⁷⁾.

Aktivitätsbestimmung von linearen und vernetzten triphenylphosphinhaltigen Harzen: Etwa 5 mmol der Phosphinkomponente (vgl. Tab. 4) und 7,5 mmol Hexachlorethan werden in einem auf 20°C thermostatisierten Reaktionsgefäß in 10 ml Dichlormethan gelöst bzw. suspendiert. Nach 24stdg. Rühren und Zugabe von 5 mmol Toluol als internem Standard wird der Gehalt an Tetrachlorethylen gaschromatographisch ermittelt (Gerät der Firma Pye, Unicam 104, Trennsäule: 4 m Carbowax 400, 40 ml Helium/min, Trenntemp. 115°C, Wärmeleitfähigkeitsdetektor).

Regenerierung des vernetzten Phosphanharzes (2 Gew.-% DVB) mit Phosgen: 3,46 g (10 mmol) des polymeren Phosphinoxids werden in 100 ml absol. Dichlormethan suspendiert. Nach 30 min. Einleiten von Phosgen wird 2 h bei Raumtemp. gerührt. Das Polymere wird unter Argon abfiltriert und intensiv mit absol. Dichlormethan gewaschen. Nach dem Trocknen kann das Harz erneut zur Peptidverknüpfung eingesetzt werden.

*Peptidsynthese mit *n*-Bu₃P (bzw. (Me₂N)₃P, Trimorpholinophosphin)/C₂Cl₆:* 5 mmol *N*-geschützte Aminosäure, 5 mmol Aminosäureester-Salz, 5,5 mmol Phosphin und 5,5 mmol Hexachlorethan werden bei 0°C in 20 ml Dichlormethan vorgelegt und mit 15 mmol Triethylamin versetzt. Nach 2 h wird das Eisbad entfernt und der Ansatz über Nacht gerührt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt analog zur Verknüpfungsmethode a.