

Die Verbindung (1) wurde durch vollständige Elementaranalyse, kryoskopische Molekulargewichtsbestimmung (in Benzol; gef.: 294, ber.: 300) sowie $^1\text{H-NMR}$ -, Massen-, IR- und UV-Spektren charakterisiert.

$^1\text{H-NMR}$ (60 MHz; 10-proz. CCl_4 -Lösung; TMS int.): Singulett bei $\delta(\text{CH}_3\text{As}) = -106$ Hz; Massen-Spektrum (16 eV)^[3]: m/e = 300, Molekül-Ion (100); 285, $\text{CH}_3\text{As}_2\text{N}_4\text{S}_2$ (92); 136, CH_3AsNS (8). Die relative Intensität ist für keines der zusätzlichen Bruchstücke > 1. IR (kapillarer Film zwischen KBr-Platten): Die Banden bei 1043, 1066 und 1190 cm^{-1} ordnen wir versuchsweise dem NSN-System zu. UV (in Hexan): λ_{\max} (nm) 242 ($\epsilon = 15400$), 302 (2300), 405 (419).

Arbeitsvorschrift:

Zu 7,0 g (34 mmol) N,N' -Bis(trimethylsilyl)schwefeldimid^[4] in 50 ml Äther unter N_2 tropft man bei Raumtemperatur unter raschem Rühren 5,5 g (34 mmol) Methyldichlorarsan. Die zunächst gelbe Lösung verfärbt sich mit fortschreitender Umsetzung orange, gleichzeitig bildet sich wenig gelber Niederschlag. Nach Filtration über eine G 3-Fritte werden Lösungsmittel und Trimethylchlorsilan im Wasserstrahlvakuum abgezogen. Der Rückstand wird im Ölumpenvakuum fraktionierend destilliert. Ausbeute 3,9 g (76%).

Eingegangen am 1. Juni 1971 [Z 498]

[1] Vgl. O. J. Scherer, J. Organometal. Chem. Rev. A 3 (1968), 281.

[2] (1) ist im Gegensatz zu S_4N_4 und S_4N_2 nicht explosiv.

[3] Herrn Dipl.-Chem. N. Pelz danken wir für die Messung.

[4] O. J. Scherer u. R. Wies, Z. Naturforsch. 25 b, 1486 (1970); dort zit. Lit.

Eine neue Methode zur Synthese von Polypeptiden

Von Manfred Mutter, Hanspaul Hagenmaier und Ernst Bayer^[*]

Durch die Anwendung unlöslicher, polymerer Träger ist die Peptidsynthese vereinfacht worden, da die löslichen, überschüssigen Reagentien durch Filtration entfernt werden können^[1]. Die Kupplungsreaktionen verlaufen jedoch meist nicht vollständig, und so können Fehlsequenzen entstehen, die sich vom gewünschten Endprodukt schwer oder nicht mehr trennen lassen^[2, 3]. Außerdem erlaubt die Synthese am unlöslichen Träger weniger Variationen von Lösungsmittel, Schutzgruppen und Kupplungsmethoden als die Peptidsynthese in Lösung. Auch durch Verwendung von festen Trägern mit geordneter Oberfläche („Bürstenträgern“)^[4, 5] oder von unvernetzten Polystyrolen^[6–8] konnte man diese Schwierigkeiten nicht völlig umgehen.

Wir haben jetzt ein Verfahren ausgearbeitet, das sowohl in homogener Phase arbeitet als auch eine sichere und einfache Abtrennung der Reagentien von der wachsenden Peptidkette gestattet. Dabei wird an die C-terminale Aminosäure eine löslichmachende makromolekulare Schutzgruppe gebunden, die während der gesamten Synthese dort verbleibt. Es lassen sich polymere Schutzgruppen auswählen, die das Molekül in den gewünschten Lösungsmitteln löslich machen. Besonders bewährt haben sich z. B. Polyäthylenglykol-Reste, die an die erste Aminosäure esterartig gebunden werden. Sowohl die erste Aminosäure als auch die folgenden Aminosäuren können in homogener Lösung gekuppelt werden.

[*] Dipl.-Chem. M. Mutter, Doz. Dr. H. Hagenmaier und Prof. Dr. E. Bayer
Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität
74 Tübingen, Wilhelmstraße 33

Der entscheidende zweite Schritt des Verfahrens, die Abtrennung der niedermolekularen Reagentien von der durch die Schutzgruppe von vornherein hochmolekularen, wachsenden Peptidkette, geschieht nun durch Ultrafiltration (Membranfiltration), die in ihrer modernen Ausführung^[9] schnelle Trennungen ermöglicht.

Die Synthesemethode bietet folgende Vorteile und Möglichkeiten: Durchführung der Synthese und Abtrennen der überschüssigen Reagentien in homogener Phase ohne die zeitraubenden Trennungen der „klassischen“ Peptidsynthese und die vielfältigen Waschvorgänge der Festkörpermethode; Steigerung der Ausbeute gegenüber dem Arbeiten in heterogener Phase; Anwendung aller bekannten Schutzgruppen und Kupplungsmethoden; vielfältige Variationsmöglichkeiten der polymeren Schutzgruppe bezüglich Molekulargewicht und Löslichkeitseigenschaften; Möglichkeiten der Abtrennung von Rumpfsequenzen bei jedem schlecht verlaufenden Kupplungsschritt; vereinfachte Umsatzkontrolle in aliquoten Anteilen (besonders geeignet sind ^{19}F -Kernresonanz^[10] und Radioaktivitätsmessungen); Möglichkeit der Wiederholung eines Kupplungsschrittes nach einer beliebigen anderen Methode bei unbefriedigenden Ausbeuten; Möglichkeit der Konzentration größerer, mit der makromolekularen Schutzgruppe versehener Peptide^[11]; Möglichkeit der Automatisierung einschließlich der Umsatzkontrolle.

Das Verfahren wird am Beispiel zweier Synthesen des Tetrapeptids H-Ile-Ala-Val-Gly-OH erläutert.

1. Synthese mit *tert*-butyloxycarbonyl-geschützten Aminosäuren nach der Anhydridmethode^[1, 2]:

Veresterung mit dem löslichen Träger: Als lösliches Polymer wurde Polyäthylenglykol (Mol.-Gew. 20000) verwendet. Die Veresterung wird mit BOC-geschütztem Glycin und 1,1'-Carbonyldiimidazol als Kupplungsreagens durchgeführt^[1, 3].

Synthesekreislauf: a) Darstellung des gemischten Anhydrids aus Isobutylchlorformiat und BOC-geschützter Aminosäure unter Zusatz von *N*-Methylmorpholin^[12]. b) Zugabe des gemischten Anhydrids in dreifachem Überschuss zur Aminokomponente (Polymerpeptid). c) Nach der Kupplung: Abspaltung der Schutzgruppe durch 4 N HCl in Dioxan. d) Abdestillieren des Lösungsmittels und Aufnehmen in Wasser. e) Ultrafiltration der überschüssigen Komponenten und Abdestillieren des Wassers.

Umsatztest: Während der Kupplung werden dem Reaktionsgemisch aliquote Anteile entnommen und nach der Ninhydrinmethode^[14] analysiert. Die Kupplungsschritte hatten Ausbeuten über 98%. Auch die bei der Festkörpersynthese nur mit ca. 80% verlaufende Kupplung von Alanin an Valin gelang mit über 95-proz. Ausbeute.

Abspaltung vom Träger und Isolierung: Das Tetrapeptid wird in homogener Phase mit 0,05 N NaOH^[15] abgespalten und durch Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex X-50 isoliert.

Ultrafiltration: Die Substanz wird in ca. 50 ml Wasser gelöst (ca. 2-proz. Lösung) und diafiltriert^[16]. Das Ultrafiltrat wird mit Ninhydrin solange auf Aminosäuren getestet, bis keine Reaktion mehr eintritt. Bisher wurden keine gegen organische Lösungsmittel beständigen Membranen benutzt^[16].

2. Synthese in wässriger Lösung mit benzyloxycarbonyl-geschützten Aminosäuren und einem wasserlöslichen Carbodiimid:

Veresterung mit Polyäthylenglykol wie bei der Anhydridmethode.

Synthesezyklus: a) Die Aminokomponente wird in wenig Wasser gelöst und mit einer Z-geschützten Aminosäure gekuppelt. Als Kupplungskomponente dient das wasserlösliche Carbodiimid *N*-[2-(Cyclohexyliminomethylenamino)äthyl]-*N*-methylmorpholinium-*p*-toluolsulfonat^[17]. Kupplungskomponente und Z-Aminosäure werden in dreifachem Überschuß angewandt. b) Nach der Kupplung wird zur wäßrigen Lösung das gleiche Volumen Methanol gegeben und die Schutzgruppe durch Hydrierung (Pd/Aktivkohle) entfernt. c) Ultrafiltration sowie Abspaltung und Isolierung des Tetrapeptids werden wie bei der Anhydridmethode durchgeführt.

Prinzipiell vereinigt das neue Verfahren die Vorteile der Merrifield'schen Festkörpersynthese und der „klassischen“ Peptidsynthese. Der Einfluß makromolekularer C-terminaler Schutzgruppen auf die Löslichkeit und die Kupplung eröffnet über diese Methoden hinausgehende präparative Möglichkeiten.

Eingegangen am 17. September 1970 [Z 489]
Auf Wunsch der Autoren erst jetzt veröffentlicht

- [1] R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963).
- [2] E. Bayer, H. Eckstein, K. Häggele, W. A. König, W. Brüning, H. Hagenmaier u. W. Parr, J. Amer. Chem. Soc. 92, 1735 (1970).
- [3] E. Bayer in B. Weinstein: Peptides, Chemistry and Biochemistry. Dekker, New York 1970, S. 99.
- [4] E. Bayer et al. in E. Scuffone: Peptides 1969. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, im Druck.
- [5] E. Bayer, G. Jung, I. Halasz u. H. Sebastian, Tetrahedron Lett. 1970, 4503.
- [6] B. Green u. L. R. Garson, J. Chem. Soc. 1969, 401.
- [7] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov u. A. A. Kiryushkin, Tetrahedron Lett. 1965, 2323.
- [8] A. A. Kiryushkin, Yu. A. Ovchinnikov, I. V. Kozhevnikova u. M. M. Shemyakin in: Proc. European 8th Peptide Symp. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1967, S. 100.
- [9] H. Determann, Arch. Pharm. 303, 117 (1970).
- [10] E. Bayer, P. Hunziker u. R. E. Sievers, Nature 223, 179 (1969).
- [11] K. Schröder u. E. Lübke: The Peptides. Vol. II. Academic Press, New York 1966.
- [12] M. A. Tilak, Tetrahedron Lett. 1970, 849.
- [13] H. A. Staab, Angew. Chem. 71, 194 (1959).
- [14] S. Moore, D. H. Spackman u. W. H. Stein, Anal. Chem. 30, 1185 (1958).
- [15] M. A. Tilak u. C. S. Hollinden, Tetrahedron Lett. 1968, 1297.
- [16] UM-2-Filter der Firma AMICON, Mol.-Gew.-Grenze 1000. Siehe dazu: Ultrafiltration with Diaflo Membranes. Selbstverlag AMICON N. V., Oosterhout, Holland.
- [17] D. G. Knorre u. T. N. Shubina, J. Gen. Chem. UdSSR 36, 671 (1966).

Darstellung von *N,N,N',N'-Tetraamino-piperazinium-Salzen*^{[**][1]}

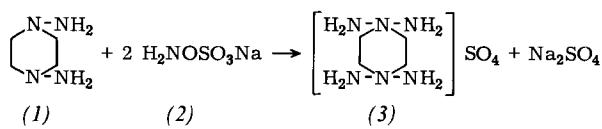
Von Karl-Heinz Linke und Ralf Turley^[*]

Während die onium-Salze des Triazans, $\text{N}_3\text{H}_6\text{X}$, außerordentlich instabil sind^[2], weisen Triazanium-Salze mit organischen Substituenten eine relativ hohe Stabilität auf^[3–5]. Durch erschöpfende Aminierung von *N,N'*-Diamino-piperazin (1) mit dem Natriumsalz der Hydroxylamido-*O*-schwefelsäure (2) gelang uns die Darstellung

[*] Prof. Dr. K.-H. Linke und Dipl.-Chem. R. Turley
Institut für Anorganische Chemie der Universität
5 Köln, Zülpicher Straße 47

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

von *N,N,N',N'-Tetraamino-piperaziniumsulfat* (3). Dies ist die erste Synthese eines Bis(triazanium)-Salzes.



Durch Umsetzung von (3) mit Bariumchlorid und Bariumazid in wäßrigem Medium konnte das Chlorid (4) bzw. das Azid (5) dargestellt werden.

Die Salze (3), (4) und (5) sind farblos und kristallin: (3), $\text{Fp}=144^\circ\text{C}$ (Zers.); (4), $\text{Fp}=156^\circ\text{C}$ (Zers.); (5), $\text{Fp}=128^\circ\text{C}$ (Zers.). Sie sind in allen gängigen organischen Lösungsmitteln sehr schlecht, in warmem Wasser mäßig löslich. In Substanz und in neutraler, wäßriger Lösung sind sie unbegrenzt haltbar.

Zur Charakterisierung der Verbindungen dienten IR-Spektren (s. Tabelle) sowie Elementaranalysen. Der Beweis für die angegebene Struktur des Kations wird durch den Reaktionsweg erbracht, da das Aminierungsreagens stets am Stickstoffatom mit der größten Basizität angreift. Außerdem fehlen in den IR-Spektren $\equiv\overset{\oplus}{\text{NH}}-\equiv\overset{\oplus}{\text{NH}_2}$ - oder $\equiv\overset{\oplus}{\text{NH}_3}-$ -Banden, die zwischen 2200 und 2700 cm^{-1} zu erwarten wären^[4], falls eine der drei weiteren, theoretisch möglichen Strukturen für die Triazan-Gruppen vorläge:

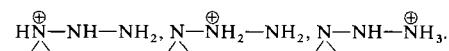


Tabelle. Stärkste IR-Banden der Kationen in den Salzen (3), (4) und (5).

Schwingung	(3)	IR (cm^{-1}) (4)	(5)
$\nu_{as} \text{ NH}_2$	3230	3205	3230
$\nu_s \text{ NH}_2$	3110	3110	3110
$\delta \text{ NH}_1$	1630, 1610	1635, 1595	1630, 1610
$\gamma \text{ NH}_2$	1150	1150	1150
$\nu \text{ NN}$	910	910	910
$\nu \text{ NNH}_2$	715	730	730

N,N,N',N'-Tetraamino-piperaziniumsulfat (3)

Zu einer 80°C warmen Lösung von 5.8 g (0.05 mol) (1) in 300 ml Wasser wird innerhalb 10 min unter starkem Rühren aus einem vorgekühlten Tropftrichter eine eiskalte, wäßrige Lösung von (2) getropft, die durch vorsichtiges Neutralisieren von 11.3 g (0.1 mol) Hydroxylamido-*O*-schwefelsäure und 4.0 g (0.1 mol) Natriumhydroxid in je 50 ml Wasser bei 0°C erhalten wird. Unter vermindertem Druck wird auf 80 ml eingeengt. Der kristalline Niederschlag wird abfiltriert und mit 20 ml eiskaltem Wasser gewaschen; Ausbeute 4.5 g (37%). Bei weiterem Einengen der Mutterlauge erhält man durch Natriumsulfat verunreinigtes (3).

[1] 32. Mitteilung zur Chemie des Hydrazins und seiner Derivate. – 31. Mitteilung: K.-H. Linke u. D. Skupin, Z. Naturforsch., im Druck.

[2] K.-H. Linke u. R. Turley, Z. Anorg. Allg. Chem. 377, 139 (1970).

[3] R. Gösl, Angew. Chem. 74, 470 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 405 (1962).

[4] K. Urvary u. H. H. Sisler, Inorg. Chem. 7, 698 (1968).

[5] K. Urvary, H. H. Sisler u. P. Kitzmantel, Monatsh. Chem. 100, 401 (1969).

[6] R. Gösl u. A. Meuwissen, Chem. Ber. 92, 2521 (1959).