

Prom. Nr. 3616

**Über die Kondensation
von Glycinaethylester und anderen
 α -Aminocarbonsäureestern**

Von der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH
zur Erlangung
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften
genehmigte

PROMOTIONSARBEIT

vorgelegt von
HANS VON WERRA
dipl. Ing.-Chem. ETH
von Leuk-Stadt (Kt. Wallis)

Referent: Herr Prof. Dr. H. Hopff
Korreferent: Herr Prof. Dr. H.-G. Elias

Juris-Verlag Zürich
1964

Leer - Vide - Empty

Für Doris

Leer - Vide - Empty

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-G. Elias in der Zeit von Juli 1961 bis Oktober 1964 am technisch-chemischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. H.-G. Elias

danke ich recht herzlich für die ideelle Unterstützung und die vielen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Leer - Vide - Empty

I N H A L T S U E B E R S I C H T

	Seite
1 E I N L E I T U N G U N D P R O B L E M - S T E L L U N G	10
2 O R I E N T I E R E N D E U N T E R S U C H U N G E N	14
2.1 Modellsubstanzen	14
2.2 Papierchromatographische Untersuchung definierter Oligomerer	15
2.3 Zeitlicher Ablauf der Kondensation	18
2.4 Einfluss des Katalysatortyps	23
2.5 Einfluss der Estergruppe	27
2.6 Kondensation von Peptidestern	28
2.7 Kondensationen anderer α -Aminocarbonsäureester	29
2.8 Kondensation von α -Aminocarbonsäureestern in Lösung	33
2.9 Cokondensationen	38
3 E N T W I C K L U N G A N A L Y T I S C H E R M E - T H O D E N	40
3.1 Quantitative Bestimmung des 2,5-Dioxopiperazins	40
3.1.1 Infrarot-Spektroskopie	41
3.1.2 Sublimation	44
3.2 Infrarot-Spektroskopie	46
3.3 Untersuchungen zur Aufarbeitung der Kondensations- produkte	47
3.3.1 Stabilität des Kondensates	47
3.3.2 Fraktionierungsversuche	49
3.3.2.1 Chromatographie	49
3.3.2.2 Gelfiltration	49
3.3.2.3 Papierelektrophorese	49
3.3.2.4 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln	50
3.3.2.5 Trennschema	51
3.4 Untersuchung der Fraktionen	52
3.4.1 Gesamtkondensat G	52
3.4.2 Wasserlösliche Fraktion W	54

	Seite
3.4.3 Eisessiglösliche Fraktion E	55
3.4.4 Wasser- und eisessigunlösliche Fraktion R	57
4 O P T I M I E R U N G	61
4.1 Optimierung der Monomersynthese	61
4.2 Gesamtausbeute	63
4.3 2,5-Dioxopiperazin	68
4.4 Wasserlöslicher Anteil W	71
4.5 Essigsäurelöslicher Anteil E	74
4.6 Wasser- und eisessigunlösliche Fraktion R	74
5 V E R B I N D U N G E N M I T Z I N N T E T R A - C H L O R I D	80
5.1 Zinntetrachlorid und Glycinäthylester	80
5.2 Zinntetrachlorid und Aethanol	85
5.3 Zinntetrachlorid und 2,5-Dioxopiperazin	86
6 D I S K U S S I O N	87
6.1 Ausbeute und Polymerisationsgrad	87
6.2 Reaktionsablauf	89
6.3 Schlussfolgerungen	98
7 E X P E R I M E N T E L L E D U R C H F U E H R U N G	100
7.1 Präparative Arbeiten	100
7.1.1 Hydrochloride der α -Aminocarbonsäureester bzw. Peptidester	100
7.1.2 Freie α -Aminocarbonsäureester	101
7.1.2.1 Neutralisation mit Natronlauge, Kali- lauge, Bariumoxid oder Ammoniumhy- droxid	101
7.1.2.2 Neutralisation mit Ammoniakgas in Chloroform	101
7.1.3 2,5-Dioxopiperazin	102
7.1.4 Kondensation der α -Aminocarbonsäureester	104
7.1.4.1 Kondensation in Masse	104
7.1.4.2 Kondensation in Lösungsmitteln	104

	Seite
7.1.5 Bestimmung der Kondensatausbeute	105
7.1.6 Fraktionierung der Kondensate	105
7.1.7 Lösungsmittel für die Papierchromatographie	105
7.1.8 Komplexe mit Zinntetrachlorid	106
7.1.8.1 Reinigung des Zinntetrachlorids	106
7.1.8.2 Zinntetrachlorid-Aethylalkohol-Komplex	106
7.1.8.3 Zinntetrachlorid-Glycinäthylester-Komplex	106
7.1.8.4 Zinntetrachlorid-2,5-Dioxopiperazin-Komplex	107
7.1.9 Bleitetrachlorid	107
7.2 Chemisch-analytische Methoden	108
7.2.1 Totalhydrolysen	108
7.2.1.1 Bei Normaldruck	108
7.2.1.2 Im Bombenrohr	108
7.2.2 Papierchromatographie	109
7.2.3 Dünnschichtchromatographie	109
7.2.4 Titration der Aminogruppe	111
7.2.5 Titration der Carbonsäuregruppe	112
7.2.6 Bestimmung der Aethoxylgruppe	112
7.2.7 Sublimation des 2,5-Dioxopiperazins	112
7.2.8 Gravimetrische Bestimmung des Zinngehaltes	112
7.3 Physikalische Verfahren	113
7.3.1 Debye-Scherrer-Aufnahmen	113
7.3.2 IR-Spektroskopie	113
8 Z U S A M M E N F A S S U N G	114
9 L I T E R A T U R	115

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Polymere mit Peptidbindungen (Nylon-2 und Derivate) werden in der Regel nach zwei verschiedenen Verfahrenstypen aufgebaut. Nach dem ersten Verfahren werden die Peptide schrittweise synthetisiert, indem die eine der beiden reaktiven Gruppen (Carboxyl- oder Amino-Gruppe) durch Schutzgruppen blockiert wird und die jeweils freie andere reaktive Gruppe mit der entsprechenden Gruppe eines anderen α -Aminocarbonsäuremoleküls umgesetzt wird. Dieses Verfahren kann auch Di-, Tri- oder Oligopeptide als Bauelemente verwenden. Es liefert in gut übersehbarer Reaktion Peptide genau bekannter Sequenz. Das mit wachsender Kettenlänge immer kostbarer werdende Material dient also für jeden Arbeitsgang als Ausgangssubstanz für einen weiteren Kupplungsprozess, der keineswegs quantitativ verläuft. Der dadurch verursachte Materialverlust wird immer schwerer tragbar und der Zeitaufwand ist gross.

Im Gegensatz zu diesem Kondensationsverfahren arbeitet der zweite Verfahrenstyp mit dem Mittel der Polymerisation. Am bekanntesten ist die Polymerisation der Leuchsanhydride. Nach dieser Methode werden entweder Unipolymere oder statistische Copolymere synthetisiert. Anders als beim ersten Verfahren werden hier relativ hohe Molekulargewichte erhalten. Eine technische Verwendung solcher Polypeptide erscheint möglich, hauptsächlich für synthetische Fasern.

Die Polymerisation der Leuchsanhydride stellt zwar eine elegante Methode dar, ihre technische Anwendung setzt aber eine relativ umständliche Monomersynthese, peinlich genaue Einhaltung der Reaktionsbedingungen und ausserordentliche Reinheit der Anhydride voraus. Aussichtsreicher erscheint daher die Verwendung einfacherer Monomere. Als solche Ausgangsmomere bieten sich die Ester der α -Aminocarbonsäuren an, deren Polykondensation zu Unipolymeren oder statistischen Copolymeren prinzipiell möglich sein sollte.

Die thermische Kondensation solcher α -Aminocarbonsäureester zu Oligo- und Polypeptiden ist schon lange versucht worden. Glycinmethyl- und -äthylester lassen sich in Masse zu Oligopeptiden kondensieren (1-4). Kennzeichnend sind hohe Reaktionstemperaturen und -zeiten bei kleiner Peptidausbeute und gleichzeitig grosser Bildungstendenz des 2,5-Dioxopiperazins. Beim Stehenlassen von Glycinäthylester bei 20° C entsteht so nach vier Tagen zu 100 % 2,5-Dioxopiperazin, bei - 20° C immer noch 35 % 2,5-Dioxopiperazin (15). Der Glycin-t-butylester ist nach den gleichen Autoren beständiger, doch entstehen bei 20° C nach einem Jahr immer noch 25 % 2,5-Dioxopiperazin.

Auch der Tetraglycinester kann entgegen älteren Angaben (4) zu höhermolekularen Produkten umgesetzt werden, allerdings erst nach 200 Stunden (5,6). Bei der Polykondensation der Glycinmethylester unter Drucken von 4500 Atmosphären werden zwar höhere Molekulargewichte um 4000 erhalten, die Ausbeuten an Polyglycin betragen aber nur ca. 11 % bei 50° C und ca. 19 % bei 130° C.

Eine weitere Reihe von Arbeiten beschäftigt sich mit dem Problem, ob durch geeignete Zusatzstoffe reaktivere Zwischenverbindungen gebildet werden können. Beim Zusatz von Kohlendioxid zu Glycinäthylester und Oligoglycinäthylester bilden sich Carbamate, die dann in niedermolekulare Polypeptide übergehen (8-10). Beim Behandeln von DL-Leucineestern mit Natriumsand im Molverhältnis 1:1 bilden sich ebenfalls Polypeptide (11). Aus Glycinäthylester entsteht mit Dimethyldichlorsilan, Methyltrichlorsilan und Siliciumtetrachlorid neben Dimethyldiäthoxisilan, Monomethyltriäthoxisilan und Orthokieselsäureäthylester auch Polyglycin (12). Bei allen diesen Experimenten wurden etwa gleichmolare Mengen an α -Aminocarbonsäuren und Zusatzstoffen verwendet.

Katalysierte Peptidsynthesen wurden unseres Wissens nur von Brockmann und Musso (13) versucht^{*)}. Nach diesen Autoren können die

*) Nach Abschluss des Manuskriptes dieser Arbeit erschien eine Ver-
(Fortsetzung S. 12)

Methylester des Glycins und DL-Alanins und anderer α -Aminocarbonsäuren und von deren Oligopeptiden in Gegenwart von Natriumäthylat, Natriumamid und anderen Protonenfängern zu Polypeptiden umgesetzt werden. Es schien daher interessant zu untersuchen, ob auch andere Verbindungsklassen die Kondensation von α -Aminocarbonsäureestern zu beschleunigen vermögen. Die katalysierte Peptidbildung sollte zudem bei tieferen Temperaturen ablaufen können und folglich Racemisierungen zurückzudrängen vermögen. Ausserdem sollte die als Parallel- oder Folgereaktion auftretende Bildung von 2,5-Dioxopiperazin hinten-an gehalten werden. Untersuchungen über katalysierte Peptidsynthesen sollten daher nicht nur eine Möglichkeit zum rascheren Aufbau von oligomeren und hochmolekularen Polypeptiden bieten, sie können auch als Modellreaktionen zum Einsatz von Katalysatoren bei der Synthese von Peptiden definierter Sequenz dienen.

Es wurde daher geprüft, welche Verbindungsklassen die Kondensation von α -Aminocarbonsäureestern zu katalysieren vermögen. Anlass dazu gab folgende Beobachtung (43):

Fügt man zu ca. 10 g (0,1 Mol) Glycinäthylester etwa 260 mg (0,001 Mol) Zinntetrachlorid, so tritt augenblicklich eine heftige Reaktion ein. Die Temperatur steigt um etwa 10 - 20^o und die Reaktionsmischung verfestigt sich zusehends. Das feste Produkt ist biuretpositiv, weist nur etwa 10 % 2,5-Dioxopiperazin auf und löst sich nur noch schwer in Dichloressigsäure, m-Kresol und 90 %iger Ameisensäure. Papierchromatographisch lassen sich einige wandernde, ninhydrinpositive Flecken, sowie ein starker, ebenfalls ninhydrinpositiver Flecken auf der Startlinie nachweisen. Bei der Reaktion müssen also Oligo- bis Polypeptide entstanden sein.

Es wurde daher die katalysierte Kondensation von α -Aminocarbonsäureestern untersucht. Die überwiegende Zahl der Experimente wurde

öffentlichung von M.E. Carter und O.K. Carlson (48), in der die mit Aluminiumisopropylat und/oder Aluminiummonochlorid-diisopropylat katalysierte Kondensation von Glycinäthylester untersucht wird.

dabei am Glycinäthylester ausgeführt. In weiteren Versuchen wurde die Bildungstendenz des Polyglycins und der Nebenprodukte als Funktion der Reaktionsbedingungen studiert. Zusätzliche Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Mechanismus der Katalysatorwirkung.

2 O R I E N T I E R E N D E U N T E R S U C H U N G E N

2.1 Modellsubstanzen

Als Modellsubstanz der Vorversuche wurde Glycinäthylester gewählt. Glycin, weil es die einfachste α -Aminocarbonsäure darstellt, und der Aethylester, weil dieser gegen Autokondensation beständiger als der Methylester (14) ist. Noch beständiger sind die Ester höherer Alkohole wie Butyl- oder Amylalkohol (14). Da aber auch noch die Bildung des 2,5-Dioxopiperazins bei der Polykondensation untersucht werden sollte und dieses sich aus Glycinäthylester viel rascher und mit grösserer Ausbeute bildet als z.B. aus Glycin-t-butylester (15), eignet sich Glycinäthylester vorzüglich als Modellsubstanz.

Die verwendeten Modellsubstanzen Glycin, Triglycin, Tetraglycin und Glycinäthylester-Hydrochlorid wurden von der Firma Fluka, Buchs SG, bezogen. Sämtliche übrigen Ausgangsverbindungen wurden nach Literaturvorschriften synthetisiert, ausgenommen der bislang unbekannte und in dieser Arbeit erstmals hergestellte Glycinlaurylester.

Diglycin-Hydrochlorid-Monohydrat und Diglycinäthylester-Hydrochlorid wurden durch Hydrolyse von 2,5-Dioxopiperazin in Wasser bzw. durch Aethanolyse in Alkohol gewonnen (49,50). Das 2,5-Dioxopiperazin selbst wurde durch Dimerisierung von Glycinäthylester-Hydrochlorid hergestellt (51). Das freie Diglycin wurde durch Behandeln des Diglycin-Hydrochlorids mit einem Anionenaustauscher Amberlite IR - 45 erhalten. Die Methyl- und Aethylester-Hydrochloride der Glycinpeptide wurden nach bekannten Veresterungsmethoden (52) im entsprechenden absoluten Alkohol durch Behandeln mit Chlorwasserstoff dargestellt. Ähnlich wurden die Propyl-, Isopropyl- und Butylester-Hydrochloride erhalten (53).

Zur Darstellung des Hydrochlorids des Laurylesters war diese Methode jedoch wegen des hohen Schmelzpunktes des Laurylalkohols nicht geeignet. Es wurde daher in Benzol als Lösungsmittel gearbeitet, in dem Laurylalkohol löslich ist. Die Reaktionspartner Glycin

bzw. Diglycin sind jedoch beide ausserordentlich schlecht benzollöslich. Um diese Reaktionsteilnehmer wenigstens teilweise in Lösung zu bringen, wurde mit Wasser gesättigtes Benzol verwendet. Glycin bzw. Diglycin wurden in dieser Benzol-Wasser-Laurylalkohol-Mischung suspendiert, wobei sie sich teilweise lösten. Darauf wurde auf Siedehitze erwärmt und vier Stunden Chlorwasserstoff eingeleitet. Nach dieser Reaktionszeit konnten die Hydrochloride isoliert werden. Die freien Ester wurden durch Behandeln der Hydrochloride mit Alkali gewonnen (53-60) (vgl. auch Abschnitt 4.1).

2.2 Papierchromatographische Untersuchung definierter Oligomerer

Zur orientierenden Untersuchung der verschiedenen Wirksamkeit von Katalysatoren für die Polykondensation von α -Aminocarbonsäureestern erscheinen papierchromatographische Untersuchungen besonders geeignet. Bei derartigen Polykondensationen ist zu erwarten, dass mit zunehmender Reaktionszeit Verbindungen mit immer mehr Grundbausteinen pro Molekül entstehen. Die Anzahl der nach einer bestimmten Reaktionszeit in einem Papierchromatogramm nachweisbaren Flecken ist daher ein Mass für die Katalysatorwirksamkeit. Durch die R_f -Werte lassen sich ferner einige Verbindungen identifizieren.

Bei der Polykondensation von beispielsweise Glycinäthylester können einerseits die höhermolekularen Oligomeren wie Glycylglycinäthylester, Diglycylglycinäthylester usw. entstehen, andererseits bei bestimmten Katalysatorklassen auch durch Umesterung die Verbindungen der Reihe Glycin, Glycylglycin, Diglycylglycin usw., sowie die entsprechenden Hydrochloride. Zur Abkürzung werden die Stammkörper nachstehend mit Glycin, Diglycin, Triglycin usw. bezeichnet.

Von diesen vier homologen Reihen wurde daher die papierchromatographische Wanderung in drei verschiedenen Laufmitteln

- I n-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5 (v/v) (16)
II n-Butanol : Pyridin : Wasser = 65 : 35 : 65 (v/v) (17)
III Phenol : Wasser = 75 : 25 (v/v) (22)

auf Whatmann Nr. 1 bei Zimmertemperatur ermittelt. Die R_f -Werte wurden teilweise auf L-Leucin standardisiert, das auf jedem Bogen links und rechts mitlief. Für L-Leucin wurden als Mittelwerte für je 15 Messungen für die einzelnen Laufmittel die R_f -Werte 0,49 (I), 0,49 (II) und 0,80 (III) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Mitaufgenommen wurden die vereinzelt Literaturwerte. Dabei wurde der Rest $\text{-NH-CH}_2\text{-CO-}$ mit Gly bezeichnet; Glycin also mit H-(Gly)-OH , Glycinäthylester mit $\text{H-(Gly)-OC}_2\text{H}_5$, Glycinäthylester-Hydrochlorid mit $\text{H-(Gly)-OC}_2\text{H}_5 \cdot \text{HCl}$, Diglycylglycin mit $\text{H-(Gly)}_3\text{-OH}$ usw.

Nach Tabelle 1 stimmen die R_f -Werte der Homologen der Reihe $\text{H-(Gly)}_n\text{-OH}$ für die Laufmittel I und III recht gut mit den Literaturwerten überein. Für die Reihe $\text{H-(Gly)}_n\text{OC}_2\text{H}_5$ im Laufmittel II werden dagegen sehr viel niedrigere Werte gefunden, als in der Literatur für dieses Laufmittel berichtet wurde. Der Grund ist unklar.

Die meisten der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden an Kondensationsprodukten durchgeführt, welche mit Zinntetrachlorid als Katalysator hergestellt worden waren. Bei den entstehenden Reaktionsprodukten wurden in keinem Falle freie Carboxylgruppen gefunden (vgl. weiter unten). Von besonderem Interesse ist daher die Trennbarkeit innerhalb der Reihen $\text{H-(Gly)}_n\text{-OC}_2\text{H}_5$ und $\text{H-(Gly)}_n\text{-OC}_2\text{H}_5 \cdot \text{HCl}$.

Die Tabelle 1 zeigt nun, dass das Laufmittel II für die Trennung beider Reihen viel zu wenig empfindlich ist. Für die Auftrennung innerhalb jeder einzelnen Reihe ist zweifellos das Laufmittel III das geeignetste. Leider fällt jedoch der Wert für $\text{H-(Gly)}_3\text{-OC}_2\text{H}_5$ mit 0,75 sehr nahe zum Wert des Hydrochlorids des entsprechenden Dimeren $\text{H-(Gly)}_2\text{-OC}_2\text{H}_5 \cdot \text{HCl}$ (0,77).

Alle weiteren papierchromatographischen Untersuchungen wurden daher mit dem Laufmittel I ausgeführt, das eine klare Trennung der

Tabelle 1

R_f -Werte von Glycinderivaten

Substanz	$R_f \cdot 100$ in Laufmittel Nr.					
	I		II		III	
	diese Arbeit	Lit. (16)	diese Arbeit	Lit. (17)	diese Arbeit	Lit. (22)
H-(Gly)-OH	17	17,9	14		42	41
H-(Gly) ₂ -OH	18	17,8	12		46	47
H-(Gly) ₃ -OH	16	15,2	14		52	55
H-(Gly) ₄ -OH		11,8				
H-(Gly) ₅ -OH		8,5				
H-(Gly)-OH·HCl	41		31		21	
H-(Gly) ₂ -OH·HCl	43		36		34	
H-(Gly) ₃ -OH·HCl	45		36		39	
H-(Gly) ₄ -OH·HCl						
H-(Gly)-OC ₂ H ₅	25		10		38	
H-(Gly) ₂ -OC ₂ H ₅	21		9	49	48	
H-(Gly) ₃ -OC ₂ H ₅	18		15	40	75	
H-(Gly) ₄ -OC ₂ H ₅	9		11	34	63	
H-(Gly)-OC ₂ H ₅ ·HCl	39		32		71	
H-(Gly) ₂ -OC ₂ H ₅ ·HCl	31		31		77	
H-(Gly) ₃ -OC ₂ H ₅ ·HCl	32		34		89	
H-(Gly) ₄ -OC ₂ H ₅ ·HCl	35		30		88	
H-(Gly)-OCH ₃ ·HCl	20		36		56	
H-(Gly)-OC ₂ H ₅ ·HCl	40		35		72	
H-(Gly)-OC ₃ H ₇ ·HCl(n)	-		75		83	
H-(Gly)-OC ₄ H ₉ ·HCl(n)	53		79		80	
H-(Gly)-OC ₃ H ₇ ·HCl(i)	47		18		40	
H-(Gly)-OC ₁₂ H ₂₅ ·HCl	73		-		-	
H-(Gly) ₂ -OC ₁₂ H ₂₅ ·HCl	67		-		-	
H-(Gly)-OC ₁₂ H ₂₅	43					
H-(Gly) ₂ OC ₁₂ H ₂₅	35		-		-	

beiden homologen Reihen erlaubt. Dieser Vorteil musste jedoch mit dem Nachteil erkaufte werden, dass sich die Homologen der Reihe $H-(Gly)_n-OC_2H_5 \cdot HCl$ mit diesem Laufmittel nicht mehr gut trennen lassen.

2.3 Zeitlicher Ablauf der Kondensation

Besonders einfache Verhältnisse wurden bei der Kondensation von Glycinlaurylester erhalten. 11,8 g (48 mMol) Ester wurden auf 80° C erhitzt und mit 65 mg (0,5 mMol) Zinntetrachlorid versetzt. Die Katalysatorkonzentration entsprach 1 Mol%. Die sofort einsetzende, heftige Reaktion wurde durch papierchromatographische Untersuchungen (Laufmittel I) an zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben verfolgt. Die Tabelle 2 gibt die erhaltenen R_f -Werte wieder.

Tabelle 2

R_f -Werte bei der Kondensation des Glycinlaurylesters bei 80° C
(nicht standardisiert)

Zeit (Min.)	R_f -Werte . 100			
5	-	40	52	-
15	-	40	52	-
30	-	40	52	71
60	-	40	52	71
120	15	40	52	71

Kurz nach der Zugabe des Katalysators erscheinen zwei Flecken, von denen der eine ($R_f = 0,40$) dem Glycinlaurylester zugeschrieben werden kann. Zwischen 15 und 30 Minuten tritt ein weiterer Fleck mit $R_f = 0,71$ auf, der dem Glycinlaurylester-Hydrochlorid entspricht. In der Reaktionsmasse konnten Chlorionen nachgewiesen werden. Es

wird das Zinntetrachlorid somit entweder mit der Aminogruppe des Esters oder aber mit der Hydroxylgruppe des freigesetzten Laurylalkohols reagiert haben, wobei in beiden Fällen Chlorwasserstoff gebildet wird. Auffällig ist dabei, dass die Reaktion erst vergleichsweise spät einsetzt.

Bei der nach 120 Minuten entnommenen Probe lässt sich noch ein weiterer Flecken mit $R_f = 0,15$ nachweisen. Wird daher Zinntetrachlorid als Katalysator verwendet, so müssen als Nachweis einer erfolgreichen Polykondensation im Papierchromatogramm vier Flecken, zusätzlich des Fleckens auf der Startlinie erscheinen. Der mit dem R_f -Wert 0,52 auftretende Flecken dürfte einem Komplex aus Zinntetrachlorid und Glycinlaurylester entsprechen, wie er im Abschnitt 5.1 für den Glycinäthylester beschrieben wird.

Genau das gleiche Verhalten lässt sich bei der Kondensation von 4,5 g (44 mMol) Glycinäthylester mit 1/12 ml (0,9 mMol) Zinntetrachlorid nachweisen, was einer Konzentration von 2 Mol-Prozent entspricht. Der Ester wurde in einer Stickstoffatmosphäre innert 10 Minuten auf die Reaktionstemperaturen von 0, 20, 40 bzw. 80° C gebracht und sodann das Zinntetrachlorid unter Rühren zugegeben. Die erste Probe wurde nach 30 Minuten entnommen, danach weitere nach 45, 60, 75, 105, 135 und 155 Minuten Reaktionszeit. In der Tabelle 3 sind die erhaltenen R_f -Werte zusammengestellt.

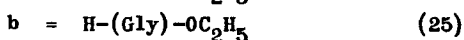
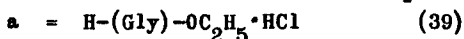
Nach dreissig Minuten beobachtet man bei allen Reaktionstemperaturen je zwei Flecken, welche dem Glycinäthylester und dem Glycinäthylester-Hydrochlorid zugeordnet werden können. Der dem Diglycinäthylester entsprechende Flecken tritt nach 60 Minuten (bei 40 und 80° C) bzw. nach 105 Minuten (bei 20 und 0° C) auf. Der Triglycinäthylester wird bei 80° C nach einer Stunde beobachtet und bei den drei tieferen Temperaturen erst nach 105 Minuten. Die Bildung des Tetraglycinäthylesters ist schliesslich nach 105 Minuten bei 20, 40 und 80° C und nach 135 Minuten bei 0° C nachzuweisen. Schliesslich erscheint nach je 105 Minuten (40 und 80° C) bzw. 155 Minuten

Tabelle 3

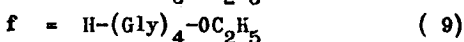
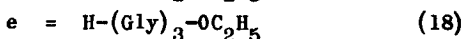
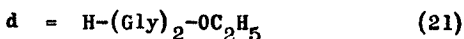
R_f -Werte bei der Kondensation von Glycinäthylester mit Zinntetrachlorid bei einer Katalysatorkonzentration von 2 Mol-Prozent (R_f -Werte nicht auf L-Leucin standardisiert)

Zeit (Min.)	$R_f \cdot 100$						Beobachtungen	
	a	b	c	d	e	f		
0°C	30	36	29				klare Flüssigkeit	
	45	36	29				" "	
	60	36	29				" "	
	75	36	29				" "	
	105	36	29	20	15		" "	
	135	36	29	20	15		opaleszierende Flüssigkeit	
	155	36	29	24	20		" "	
20°C	30	36	29				gelbliche Flüssigkeit	
	45	36	29				" "	
	60	36	29				" "	
	75	36	29				opaleszierende Flüssigkeit	
	105	36	29	20	15	10	" "	
	135	36	29	20	15	10	" "	
	155	36	29	24	20	15	10	" "
40°C	30	36	29				opaleszierende Flüssigkeit	
	45	36	29				trübe Flüssigkeit	
	60	36	29	20			" "	
	75	36	29	20			" "	
	105	36	29	24	20	15	10	" "
	135	36	29	24	20	15	10	" "
	155	36	29	24	20	15	10	" "
80°C	30	36	29				trübe Flüssigkeit	
	45	36	29				weisse Flüssigkeit	
	60	36	29	20	15		weisser Brei	
	105	36	29	24	20	15	10	weiche feste Masse
	135	36	29	24	20	15	10	" " "
	155	36	29	24	20	15	10	" " "

Zuordnung: (in Klammern: standardisierte R_f -Werte $\cdot 100$)



c = keine Zuordnung möglich



(0 und 20° C) ein weiterer Flecken mit dem R_f -Wert 0,24, der nicht zugeordnet werden konnte. Diese Versuche zeigen somit, dass die Bildung der Oligomeren erst geraume Zeit nach der Bildung des Hydrochlorids einsetzt. Die in gleichen Zeiträumen gebildeten Mengen der Oligomeren sind natürlich je nach Reaktionstemperatur verschieden. So ist die Reaktionsmasse beim erstmaligen Auftreten des Diglycinäthylesters bei 0° C (105 Minuten) noch eine klare Flüssigkeit, bei 20° C (105 Minuten) eine opaleszierende, viskose Flüssigkeit, bei 40° C (60 Minuten) viskos und trüb und bei 80° C (60 Minuten) bereits ein weisser Brei.

Der Vergleich der Kondensationen von Glycinäthylester, Diglycinäthylester und Triglycinäthylester bei 20° C mit Zinntetrachlorid zeigt über den beobachteten Zeitraum (Probeentnahme nach 15, 30, 60, 120 und 1440 Minuten) kein prinzipiell verschiedenes Bild. Die Kondensationen der beiden Peptidoligomeren sind jedoch interessant hinsichtlich der konkurrierenden Einflüsse von Kondensation und Aethanolyse. Bei diesen Versuchen wurde kein Vakuum angelegt, der bei einer eintretenden Kondensation abgespaltene Aethylalkohol blieb also im Reaktionsgemisch. Die Tabelle 4 gibt die beobachteten R_f -Werte mit den entsprechenden Zuordnungen wieder.

Beim Triglycinäthylester beobachtet man schon nach 15 Minuten nicht nur das noch nicht umgesetzte Ausgangsprodukt, sondern auch das dazugehörige Hydrochlorid. Gleichzeitig treten aber auch Spaltprodukte des Triglycinäthylesters auf, nämlich Diglycinäthylester und Glycinäthylester. Nach etwas längerer Reaktionszeit, nämlich nach 120 Minuten, vereinigen sich aber die beiden Flecken zu einem einzigen, dessen R_f -Wert sich dem des Diesters annähert. Ein weiterer Flecken mit $R_f = 0,36$ kann dem Tetraglycinäthylesterhydrochlorid zugeordnet werden. Die Flecken mit den R_f -Werten 0,59 und 0,12 bleiben unidentifiziert.

Beim Diglycinäthylester erhält man über die gesamte Versuchszeit die Flecken, die der Ausgangsverbindung bzw. dem zugehörigen

Tabelle 4

Vergleich der R_f -Werte bei Kondensationen von Glycin-, Diglycin- und Triglycinäthylester mit Zinntetrachlorid bei 20° C. Kat. Konz.: 2 Mol-% für H-(Gly)-OC₂H₅, 3,9 Mol-% für H-(Gly)₂-OC₂H₅ und 2,7 für H-(Gly)₃-OC₂H₅ nicht standardisiert.

Gruppe	Zuordnung	$R_f \cdot 100$ der Kondensationsprodukte der Äthylester von																		
		H-(Gly)-					H-(Gly) ₂ -					H-(Gly) ₃ -								
		15'	30'	60'	120'	1440'	15'	30'	60'	120'	1440'	15'	30'	60'	120'	1440'				
I											88	88	88							
II						74	74	74	74	75										
III		55	66								59		59				59	59		
IV			47								51		48							
V	a	40	38		36	34					41	38				39	39	39	40	41
VI	c															36	36	36	36	36
VII	h, j	30	28	31	29	28				30	30	30	30	30		32	32	31	31	33
VIII	b	23			21	20	22									25	25	24	23	22
	d					19				19	16	21	21		20	20	21			
	e	16	18	17	15	15										16	16	16		16
																12	12	12	12	12
IX	f				10	9				9										
X	g									5	5	5								

Zuordnung: a = H-(Gly)-OC₂H₅·HCl (39) f = H-(Gly)₄-OC₂H₅ (9)
 b = H-(Gly)-OC₂H₅ (25) g = höherer Ester (?)
 c = H-(Gly)₄-OC₂H₅·HCl (35) h = H-(Gly)₂-OC₂H₅·HCl (31)
 d = H-(Gly)₂-OC₂H₅ (21) j = H-(Gly)₃-OC₂H₅·HCl (32)
 e = H-(Gly)₃-OC₂H₅ (18)

Hydrochlorid entsprechen. Gleich zu Versuchsbeginn beobachtet man ferner einen dem Tetraglycinäthylester zuschreibbaren Flecken, sowie einen weiteren mit $R_f = 0,05$, der wahrscheinlich einem höheren Homologen zuzuordnen ist. Diese beiden Flecken verschwinden mit zunehmender Zeit. Nach 60 und 120 Minuten tritt ferner der Fleck des

Glycinäthylester-Hydrochlorids auf, der aber ebenfalls nach 24 Stunden nicht mehr vorhanden ist.

Nachdem nun gezeigt wurde, dass es möglich ist, Glycin- und Glycinpeptidester durch Zinntetrachlorid zu kondensieren, drängt sich die Frage auf, ob auch noch andere Substanzen diese katalysierende Wirkung besitzen.

2.4 Einfluss des Katalysatortyps

Ausser Zinntetrachlorid als Katalysator wurde zunächst eine Reihe weiterer Halogenverbindungen der Elemente der IV. Gruppe des Periodensystems untersucht. Im allgemeinen wurden je 5 g Glycinäthylester vorgegeben und nach Einstellung der gewünschten Versuchstemperatur (0, 20, 40 und 80° C) der Katalysator in einer Konzentration von ca. 1 Mol-Prozent unter starkem Rühren zugegeben. Nach einem anfänglichen Temperaturanstieg war nach fünf Minuten wieder die Versuchstemperatur erreicht. Nach je 5, 10, 15, 30, 60 und 120 Minuten wurden Proben entnommen und papierchromatographisch (Laufmittel I, Anfärben mit einer 0,1 %igen Ninhydrinlösung in n-Butanol) untersucht. Bereits feste Reaktionsmassen wurden in Dichloressigsäure, Ameisensäure oder 60 %iger Lithiumbromidlösung auf das Papier aufgetragen. Die Entfernung des abgespaltenen Alkohols wurde somit nicht forciert.

Die Anzahl der auftretenden Flecken ohne Berücksichtigung des Fleckes an der Startlinie als Funktion des Katalysatortyps, der Temperatur und der Reaktionszeit ist für einige der untersuchten Verbindungen in Tabelle 5 wiedergegeben. Die Tabelle enthält ausserdem die Ergebnisse der Prüfung der Wirksamkeit von Halogeniden der Elemente der V. Gruppe, ausserdem von Aminin, Natriumalkoholaten, Car-

Tabelle 5

Anzahl papierchromatographisch nachweisbarer Flecken als Mass für die Katalysatorwirksamkeit
 ((-) nicht geprüft, (m) mehrere, schlecht auszählbare Flecken)

Katalysator	Temperatur und Zeit (Minuten)																							
	0°C						20°C						40°C						80°C					
	5	10	15	30	60	120	5	10	15	30	60	120	5	10	15	30	60	120	5	10	15	30	60	120
SiCl ₄	-	-	6	6	-	-	-	5	4	5	-	-	m	m	m	m	m	m	-	-	-	8	-	-
SiBr ₄	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	m	m	m	m	m	m
SnCl ₄	6	7	5	7	-	-	5	5	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	6	6	-	-
SnJ ₄	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-
PbCl ₄	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-	7	7	7	7	7	7	-	-	8	8	-	9
PCl ₃	3	3	4	6	-	-	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	-	-	5	5	-	-
PBr ₃	4	4	3	4	3	3	5	5	4	4	6	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
PCl ₅	7	7	8	8	8	7	5	6	9	8	8	8	9	6	11	9	8	11	7	7	9	8	8	8
PBr ₅	2	3	5	3	4	2	2	4	-	10	9	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SbCl ₃	4	6	5	5	5	6	3	5	5	5	5	5	2	7	5	6	6	6	-	-	-	-	-	-
BiCl ₃	6	6	7	8	7	6	8	6	5	6	6	7	5	7	7	7	8	7	5	5	6	5	5	5
SOCl ₂	3	5	4	2	-	-	3	5	4	4	-	-	5	5	5	6	-	-	2	3	3	3	-	-
SO ₂ Cl ₂	5	5	4	4	3	-	2	-	-	-	-	-	2	3	4	4	-	-	5	6	5	6	-	-
AlF ₃	8	5	8	8	6	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-
AlCl ₃	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-
NaCl	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	3	4	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
Na ₂ SO ₃	-	-	-	4	4	4	-	-	-	4	4	4	2	6	3	4	5	-	-	-	-	-	-	-
n-C ₅ H ₁₁ NH ₂	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5	5	1	1	1	1	1	1	2	2	4	3	3	3
(C ₂ H ₅) ₂ NH ₂	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	4	4	4	4	4	4	m	m	m	m	m	m
(C ₂ H ₅) ₃ N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	2	2	2	2	-	4
Pyridin	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2	2
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	2	2	5	5	-	6	-	-	-	-	-	-	-	5	7	9	-	1
CH ₃ COOH	5	6	7	6	-	10	5	6	7	7	-	12	4	4	8	14	-	15	4	5	-	10	-	6
(CH ₃) ₃ C-COOH	3	3	3	3	-	10	6	6	6	6	-	9	3	4	5	7	-	6	2	4	7	7	-	3
CH ₃ ONa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	4	-	-	5	5	-	-
C ₂ H ₅ ONa	1	5	4	5	-	6	1	1	1	3	-	7	1	2	2	5	-	10	3	4	5	5	-	5
C ₃ H ₇ ONa	2	2	2	4	-	6	2	3	2	2	-	5	2	2	2	2	-	m	-	-	-	-	-	-
i-C ₄ H ₉ ONa	1	4	3	5	-	3	-	-	-	-	-	-	3	2	4	6	-	5	2	3	6	7	-	8

bonsäuren sowie einigen anderen Substanzen.

Die Durchsicht der Werte zeigt ein überraschend vielfältiges Bild. So ist bei einer Reihe von Verbindungen bei gegebener Temperatur über die gesamte Beobachtungszeit die Anzahl der Flecken konstant (z.B. drei Flecken bei Siliciumbromid bei 0° C, zwei Flecken bei Zinntetraiodid bei 0, 20 und 40° C oder sieben Flecken beim Bleitetrachlorid bei 40° C). Bei anderen Katalysatoren und Temperaturen steigt die Anzahl der Flecken mit zunehmender Zeit an (z.B. beim n-Butylamin bei 20° C von 4 auf 9, bei der Salicylsäure von 1 auf 9 bei 80° C). Bei einer dritten Gruppe von Katalysatoren geht schliesslich die Anzahl der Flecken durch ein zeitliches Maximum (Phosphorpentabromid bei 20° C von 2 über 10 nach 4, Wasser bei 80° C von 5 über 9 auf 1).

Die Durchsicht der R_f -Werte zeigt überdies, dass eine gleich grosse Fleckenzahl nicht gleiche R_f -Werte bei den verschiedenen Katalysatoren bedeutet. In Tabelle 6 sind die R_f -Werte für die mit einer Anzahl Katalysatoren erhaltenen Reaktionsprodukte zusammengestellt, die im Papierchromatogramm über die gesamte Versuchszeit jeweils nur zwei Flecken lieferten. Der Tabelle 6 ist folgendes zu entnehmen: verwendet man Triäthylamin als Katalysator, so erhält man bei einer Versuchstemperatur von 0° C zwei Flecken mit R_f -Werten von 0,48 und 0,31. Von diesen ist der letztere Wert vermutlich dem Monomeren $H-(Gly)-OC_2H_5$ zuzuordnen (standardisiert: 0,25). Der gleiche Katalysator ergibt bei 20° und 40° C zwar ebenfalls nur zwei Flecken jedoch mit den völlig verschiedenen R_f -Werten von 0,59 und 0,22 bzw. 0,20. Bei einer Versuchstemperatur von 80° C werden dann wieder die gleichen R_f -Werte wie bei 0° C erhalten.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für Pyridin bzw. Zinntetraiodid. Auch hier erhält man bei den Versuchstemperaturen von 20° bzw. 40° C andere R_f -Werte als bei 0° bzw. 80° C. Ausserdem sind die R_f -Werte von Katalysator zu Katalysator verschieden.

Diese Befunde lassen darauf schliessen, dass die Katalysatoren Anlagerungsverbindungen mit dem Monomeren bilden, die dann natürlich

Tabelle 6

R_f -Werte der Verbindungen einiger Reaktionsmischungen mit je zwei Flecken im Papierchromatogramm

Katalysator	Temp. °C	100 · R_f						
$(C_2H_5)_3N$	0	-	-	-	48	-	31	-
	20	-	-	59	-	-	-	22
	40	-	-	59	-	-	-	20
	80	-	-	-	46	-	31	-
C_6H_5N	0	-	-	-	48	-	26	-
	20	-	-	57	-	37	-	-
	80	-	-	-	43	-	29	-
SnI_4	0	-	-	60	44	-	-	-
	20	96	72	-	-	-	-	-
	40	96	72	-	-	-	-	-

zum Auftreten von Flecken mit verschiedenen R_f -Werten führen müssen. Die Konkurrenz von Bildungsgeschwindigkeit (kinetischer Effekt) und Stabilität (thermodynamischer Effekt) dieser Produkte könnte dann erklären, warum die R_f -Werte der erwähnten Beispiele bei 0° C und bei 80° C identisch sind, während bei 20° und 40° C andere R_f -Werte auftreten.

Da Bildungsgeschwindigkeit und Stabilität solcher Komplexe natürlich von Substanz zu Substanz stark verschieden sind, erklärt sich auch die zeitliche Abhängigkeit der Anzahl Flecken, für die Konstanz, Zunahme oder Durchlaufen eines Maximums gefunden wurden (vgl. weiter oben).

Auch diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass nur das Auftreten vieler Flecken (mindestens drei) im Papierchromatogramm ein Hinweis für eine erfolgreiche Katalysatorwirkung ist. Ausserdem laufen offenbar viele Konkurrenzreaktionen nebeneinander ab, so dass ein optimales Resultat in bezug auf die Peptidbildung nur bei einer ganz bestimmten Katalysatorkonzentration, einer bestimmten Temperatur und innerhalb eines bestimmten Zeitintervalles zu erwarten ist.

2.5 Einfluss der Estergruppe

Wie bereits in den vorhergehenden Abschnitten und besonders am Glycinlaurylester gezeigt wurde, können die Alkylester des Glycins katalytisch zu Peptiden kondensiert werden. Der Einfluss der Estergruppe auf die Kondensation wurde mit Zinntetrachlorid als Katalysator untersucht. Der Fleck auf der Startlinie wurde dabei nicht mitgezählt.

Tabelle 7

Anzahl papierchromatographisch nachweisbarer Flecken als Mass für die Wirksamkeit des Zinntetrachlorids als Katalysator für die Kondensation verschiedener Glycinerester bei 80° C und einer Katalysatorkonzentration von 1 Mol-Prozent für verschiedene Reaktionszeiten.

Ester	Anzahl Flecken bei einer Reaktionszeit (Minuten) von				
	5	15	30	60	120
H-(Gly)-OC ₂ H ₅ *)	-	-	2	4	6
H-(Gly)-OC ₃ H ₇ (n)	3	4	5	5	4
H-(Gly)-OC ₃ H ₇ (i)	3	4	-	6	2
H-(Gly)-OC ₄ H ₉ (n)	4	5	6	5	3
H-(Gly)-OC ₄ H ₉ (i)	3	5	4	4	3
H-(Gly)-OC ₁₂ H ₂₅	2	2	3	3	4

*) Katalysatorkonzentration: 2 Mol-Prozent

Mit zunehmender Zeit nimmt die Anzahl der papierchromatographisch nachweisbaren Flecken zu. Beim Propyl-, Isopropyl-, Butyl- und Isobutylester gehen die Werte bei der Reaktionszeit von einer Stunde durch ein Maximum, während die Zahl der Flecken beim Aethyl- und Laurylester im Beobachtungsbereich von zwei Stunden noch weiter ansteigt.

Aus diesen Versuchen ersieht man, dass im Prinzip alle untersuchten Ester katalytisch kondensiert werden können. Die Ergebnisse

unterscheiden sich nicht wesentlich von dem bereits in den vorhergehenden Abschnitten Beschriebenen.

Die Frage, ob sich auch andere Katalysatoren bei der Kondensation höherer Glycinester als wirksam erweisen, wird durch die in Tabelle 8 zusammengefassten Ergebnisse beantwortet. Diese Tabelle enthält die Anzahl der Flecken im Papierchromatogramm für verschiedene höhere Glycinester bei einer Kondensationstemperatur von 80° C mit verschiedenen Katalysatoren (1 Mol-Prozent) für eine Reaktionszeit von einer Stunde.

Tabelle 8

Anzahl der papierchromatographisch nachweisbaren Flecken als Mass für die Katalysatorwirksamkeit für verschiedene Glycinester mit verschiedenen Katalysatoren bei einer Kondensationstemperatur von 80° C, einer Reaktionszeit von 60 Minuten und einer Katalysatorkonzentration von einem Mol-Prozent.

(-): nicht untersucht

Katalysator	Anzahl Flecken bei verschiedenen Glycinestern			
	Propyl-	Isopropyl-	Butyl-	Isobutyl-
Siliciumtetrachlorid	-	4	-	-
Phosphortrichlorid	-	-	4	4
Phosphoroxychlorid	-	-	4	-
Thionylchlorid	-	-	-	5
Essigsäure	5	-	-	-
Trimethylelessigsäure	5	5	-	-
Tosylchlorid	-	6	4	-

2.6 Kondensation von Peptidestern

Die Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der Kondensation von Peptidestern (Tabelle 4) unter dem Gesichtspunkt der Wirksamkeit des Katalysators zusammen. Es sind hier die Anzahl der ninhydrinpositiven

Flecken im Papierchromatogramm als Funktion der Reaktionszeit zusammengestellt, die bei der Kondensation von Glycinpeptidäthylester bei Zimmertemperatur mit Zinntetrachlorid als Katalysator beobachtet wurden.

Tabelle 9

Anzahl papierchromatographisch nachweisbarer Flecken als Mass für die Katalysatorwirksamkeit des Zinntetrachlorids bei der Kondensation verschiedener Glycinpeptidäthylester bei 20° C und einer Katalysatorkonzentration von 2 Mol-Prozent für H-(Gly)-OC₂H₅, 3,9 Mol-Prozent für H-(Gly)₂-OC₂H₅, 2,7 Mol-Prozent für H-(Gly)₃-OC₂H₅ und für verschiedene Reaktionszeiten.

Ester	Kat. Konz. Mol-%	Anzahl Flecken bei einer Reaktionszeit von (Minuten)				
		15	30	60	120	1440
H-(Gly)-OC ₂ H ₅	2,0	5	5	3	5	6
H-(Gly) ₂ -OC ₂ H ₅	3,9	4	4	9	5	5
H-(Gly) ₃ -OC ₂ H ₅	2,7	6	7	7	6	7

Die Anzahl der Flecken liegt im allgemeinen höher als bei den entsprechenden Versuchen mit Monoglycin. Daraus kann gefolgert werden, dass neben neuen Kondensationsprodukten auch noch Spaltprodukte der Glycinpeptide entstehen, wie es bereits in Abschnitt 2.3 diskutiert wurde.

2.7 Kondensationen anderer α-Aminocarbonsäureester

In einer weiteren Versuchsserie wurde untersucht, ob die Substitution am α-C-Atom der α-Aminocarbonsäure einen Einfluss auf die katalysierte Kondensation hat. Von den bekannten α-Aminocarbonsäuren wurden folgende ausgewählt: D,L-Alanin und L-Leucin als Vertreter der Säuren mit einem aliphatischen Rest und L-Phenylalanin

und L-Tyrosin als solche mit einem Phenyl- resp. Phenolrest am α -C-Atom. Schliesslich wurde noch D,L-Asparaginsäure als saure α -Aminocarbonsäure gewählt.

Von sämtlichen Säuren wurde nach der bereits erwähnten Methode mit Chlorwasserstoff in absolutem Alkohol der Aethylester hergestellt. Bei der D,L-Asparaginsäure handelte es sich entsprechend um den Diäthylester. Diese Ester wurden bei Temperaturen zwischen 20 und 200° C und mit Katalysatorkonzentrationen zwischen 0,85 und 15,3 Mol-Prozent kondensiert. Die Tabelle 10 fasst die Ergebnisse dieser Kondensationen zusammen. Sie enthält die Anzahl der papierchromatographisch nachweisbaren Flecken als Mass für die Wirksamkeit des Katalysators Zinntetrachlorid für Reaktionszeiten zwischen 5 und 60 Minuten.

Tabelle 10

Anzahl papierchromatographisch nachweisbarer Flecken als Mass für die Wirksamkeit des Katalysators (Zinntetrachlorid) bei der Kondensation verschiedener α -Aminocarbonsäureester bei verschiedenen Reaktions-temperaturen und Katalysatorkonzentrationen.

Ester	Kond. Temp. °C	Kat. Konz. Mol-%	Anzahl Flecken bei einer Reaktionszeit (Minuten) von					
			5	10	15	20	30	60
DL-Ala-OC ₂ H ₅	20	0,85	4	3	3	5	4	-
DL-Asp-OC ₂ H ₅	80	4,2	3	-	3	-	3	3
L-Leu-OC ₂ H ₅	110	2,7	-	4	-	-	3	6
L-Tyr-OC ₂ H ₅	120	15,3	m	m	m	m	m	m
L-Phe-OC ₂ H ₅	200	2,0	-	-	3	-	3	2

Diese Reaktionen wurden nur über eine Stunde verfolgt. Da die Fleckenzahl bei diesen Verbindungen für kurze Reaktionszeiten im Mittel eher höher liegt als beim Glycinäthylester, darf von der Wirksamkeit des Zinntetrachlorids als Katalysator auch bei diesen α -Aminocarbonsäureestern gesprochen werden.

Die Wirksamkeit einiger anderer Katalysatoren wurde noch bei D,L-Alanin und L-Tyrosin geprüft. Die Ergebnisse der Kondensation des D,L-Alaninäthylesters mit verschiedenen Katalysatoren sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Es wurde bei einer Reaktionstemperatur von 95° C gearbeitet; die Katalysatorkonzentration betrug 1 Mol-Prozent.

Tabelle 11

Anzahl papierchromatographisch nachweisbarer Flecken als Mass für die Wirksamkeit der Katalysatoren bei der Kondensation von DL-Alaninäthylester bei einer Reaktionstemperatur von 95° C und einer Katalysatorkonzentration von 1 Mol-Prozent für Reaktionszeiten zwischen 5 und 120 Minuten.

Katalysator	Anzahl Flecken bei einer Reaktionszeit (Minuten) von				
	5	15	30	60	120
Phosphoroxychlorid	3	3	3	3	3
Toxylchlorid	3	3	4	5	5
Phosphortrichlorid	3	3	3	3	3
Eisessig	4	6	6	7	7
Trimethylelessigsre	2	2	2	2	2

Betrachtet man die Tabelle 11, so sieht man, dass beim Phosphoroxychlorid, beim Phosphortrichlorid und bei der Trimethylelessigsäure die Anzahl der Flecken sofort nach Beginn der Kondensation über den ganzen Beobachtungszeitraum konstant bleibt. Für Phosphortrichlorid und Phosphortribromid wurde dies auch beim Glycinäthylester beobachtet, während dort die Trimethylelessigsäure eine deutliche Zunahme der Fleckenzahl zeigte. Das Verhalten von Toxylchlorid und Eisessig beim DL-Alaninäthylester (Ansteigen der Fleckenzahl mit der Zeit) entspricht der Beobachtung beim Glycinäthylester.

Schliesslich wurden noch einige Substanzen als Katalysatoren für die Kondensation von L-Tyrosinäthylester eingesetzt, wobei die

Katalysatorkonzentration etwas höher gewählt wurde. Die Reaktionstemperatur betrug 120° C. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 zusammengestellt.

Tabelle 12

Anzahl papierchromatographisch nachweisbarer Flecken als Mass für die Wirksamkeit der Katalysatoren bei der Kondensation von L-Tyrosinäthylester bei einer Reaktionstemperatur von 120° C und verschiedenen Katalysatorkonzentrationen.

Katalysator	Anzahl Flecken bei einer Reaktionszeit (Minuten) von					Kat. Konz. Mol-%
	5	15	30	60	120	
Tosylchlorid	m	m	m	m	m	3,7
Benzoylchlorid	8	8	5	6	3	4,7
Phosphortrichlorid	1	4	3	2	2	4,8

m = mehrere, schwer auszählbare Flecken

Auffallend ist die hohe Fleckenzahl am Anfang der Reaktion beim Benzoylchlorid, während beim Phosphortrichlorid nach einer Viertelstunde das Maximum erreicht ist. Diese Versuche zeigen, dass auch andere Aminosäureester mehr oder weniger gut katalytisch kondensiert werden können. Die Wirksamkeit eines bestimmten Katalysators ist jedoch je nach Aminosäureester verschieden.

Die Zuordnung der einzelnen Flecken anhand der R_f -Werte wurde unterlassen, da es sich um orientierende Versuche handelte und keine Modellsubstanzen zum Vergleich vorlagen. Es sollte nur gezeigt werden, dass ausser Glycinester auch andere α -Aminocarbonsäureester diese Kondensation eingehen können.

2.8 Kondensation von α -Aminocarbonsäureestern in Lösung

Die in den Abschnitten 2.3 - 2.7 beschriebenen Kondensationen wurden in Masse ausgeführt. Da die entstandenen Verbindungen in ihren Monomeren mindestens zum Teil unlöslich sind, wird ihr Polykondensationsgrad vermutlich niedrig sein. Es wurden daher einige Versuchsreihen zur Kondensation in Lösung ausgeführt.

Vorerst wurde wieder auf die Modellsubstanz, den Glycinäthylester, zurückgegriffen. Dieser wurde in Lösungsmitteln, welche als gute Löser für Polyglycin bekannt waren (98 %ige Ameisensäure, Dichloressigsäure und m-Kresol) durch Zinntetrachlorid kondensiert. Ferner wurden aber auch ausgesprochene Nichtlöser wie Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, n-Heptan und Cyclohexan verwendet.

Von allen Lösungsmitteln wurde eine 20 %ige Lösung (w/v) von Glycinäthylester hergestellt. Die Kondensationen wurden sämtlich bei 20° C ausgeführt. Die Katalysatorkonzentration betrug 1 Mol-Prozent.

Drei Minuten nach Katalysatorzugabe fielen aus folgenden Lösungsmitteln feste Substanzen aus: Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Cyclohexan, n-Heptan und Tetrahydrofuran. Diese Substanzen wurden nicht weiter untersucht.

In der Tabelle 13 sind die papierchromatographisch nachweisbaren Flecken der verschiedenen Kondensatlösungen als Mass für die Katalysatorwirksamkeit zusammengestellt. In der ersten Zeile nach der Angabe des Lösungsmittels sind die Fleckenzahlen der katalysierten Reaktionen zusammengestellt, in der zweiten Zeile stehen darunter die Blindwerte ohne Katalysator (mit Stern*).

Bei einer Reihe Lösungsmittel ist die Anzahl der Flecken bei den Reaktionsprodukten der unkatalysierten Reaktion geringer als bei der katalysierten (Tetrahydrofuran, Chloroform, n-Heptan, Ameisensäure und m-Kresol), während sie beim Dimethylformamid in beiden Fällen gleich gross ist und bei einer Reihe anderer Lösungsmittel (Cy-

Tabelle 13

Anzahl der papierchromatographisch nachweisbaren Flecken als Mass für die Wirksamkeit des Katalysators Zinntetrachlorid bei den Kondensationen in verschiedenen Lösungsmitteln. Katalysatorkonzentration 1 Mol-Prozent, Reaktionstemperatur 20° C. Die Anzahl Flecken ist als Funktion der Zeit aufgetragen.

Lösungsmittel	Anzahl Flecken nach einer Reaktionszeit (Minuten) von					
	5	15	30	60	120	1440
Dimethylformamid	2 2*	2 2*	2 2*	2 2*	2 2*	2 2*
Tetrahydrofuran	2 1*	2 1*	2 1*	2 1*	2 1*	2 1*
N-Methyl-2-pyrrolidon	4 -*	2 -*	2 -*	2 -*	2 -*	- -*
Chloroform	4 1*	4 1*	4 1*	4 1*	- 1*	2 1*
n-Heptan	5 3*	7 3*	4 3*	6 3*	9 3*	- 3*
Ameisensäure	7 4*	7 4*	6 4*	4 4*	5 4*	4 4*
Cyclohexan	3 3*	3 4*	3 2*	3 4*	3 1*	3 -*
Tetrachlorkohlenstoff	3 3*	3 6*	3 5*	1 5*	4 2*	1 -*
m-Kresol	3 3*	4 2*	2 3*	3 2*	6 2*	2 1*
Dichloressigsäure	4 3*	- 7*	4 7*	3 3*	6 3*	2 -*

*) Blindwerte ohne Katalysator

clohexan, Tetrachlorkohlenstoff, Dichloressigsäure) kein eindeutiger Entscheid getroffen werden kann.

Die Anzahl der Flecken allein gestattet jedoch keine sichere Aussage über die relative Wirksamkeit des Katalysators (vgl. auch Abschnitt 2.4). Bei der Verwendung von Dimethylformamid treten bei-

spielsweise mit und ohne Katalysator je zwei Flecken im Papierchromatogramm auf. Die R_f -Werte der Produkte des Blindversuches betragen jedoch 0,26 und 0,86, während die des katalysierten Versuches solche von 0,50 und 0,88 aufweisen. Der Wert von 0,26 dürfte dem Monomeren zuzuordnen sein. Der bei beiden Versuchen auftretende Wert von 0,86 bzw. 0,88 könnte einer Additionsverbindung von Monomer und Lösungsmittel entsprechen, während der R_f -Wert von 0,50 einer Verbindung von Zinntetrachlorid und Glycinäthylester zugeschrieben werden kann. Diese Verbindung wird im Abschnitt 5.1 noch genauer beschrieben. Zwischen Lösungsmittel und Glycinäthylester bzw. dessen Kondensationsprodukten kann es in gewissen Fällen zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen, wie z.B. bei der Verwendung von Ameisensäure als Lösungsmittel. Die R_f -Werte der Reaktionsprodukte dieser Versuche sind in Tabelle 14 zusammengestellt. Bei der Deutung ist zu beachten, dass die Werte nicht auf L-Leucin standardisiert wurden und daher Abweichungen gegenüber den Eichwerten aufweisen können.

Bei der Reaktion beobachtet man sowohl bei der katalysierten als auch bei der unkatalysierten Probe jeweils Flecken, die dem Diglycinäthylester ($R_f = 0,20/0,22$ gegen Sollwert von 0,21) zugeschrieben werden können. Ein dem monomeren Glycinäthylester entsprechender R_f -Wert von 0,25 tritt dagegen überhaupt nicht auf. Statt dessen erscheint bei der katalysierten Probe bereits nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten ein R_f -Wert von 0,17, der dem Glycin oder dem Triglycin (0,18) zugeschrieben werden kann. Zwischen dem Glycinäthylester und der Ameisensäure muss daher eine Umesterung aufgetreten sein. Auffällig ist dagegen das Auftreten von Flecken mit den R_f -Werten von 0,28/0,30, 0,37/0,39 bzw. 0,42/0,44, die bei beiden Proben auftreten. Da die Werte bei der mit Zinntetrachlorid katalysierten Probe etwa denen der Hydrochloride entsprechen ($\text{H-(Gly)}_2\text{-OC}_2\text{H}_5\cdot\text{HCl}$, $\text{H-(Gly)-OC}_2\text{H}_5\cdot\text{HCl}$ und $\text{H-(Gly)-OH}\cdot\text{HCl}$ bzw. $\text{H-(Gly)}_2\text{-OH}\cdot\text{HCl}$), könnte es sich bei der unkatalysierten Probe um die den Salzen mit HCOOH entsprechenden Flecken handeln.

Tabelle 14

R_f -Werte der Lösungskondensation von Glycinäthylester in Ameisensäure bei 20° C mit einer Katalysatorkonzentration von 1 Mol-Prozent als Funktion der Zeit.

Zuordnung: a = Glycin
 b = Diglycinäthylester
 c = Diglycinäthylester-Hydrochlorid
 d = Glycinäthylester-Hydrochlorid
 e = Glycin-Hydrochlorid und Diglycin-Hydrochlorid

Reaktionszeit (min)	$R_f \cdot 100$ -Werte									
	a	b	c	d	e	f	g	h	j	
5	17	20	28	39	44	-	58	-	68	
	-	22*	30*	37*	42*	-	-	-	-	
15	17	20	28	39	44	-	58	-	68	
	-	22*	30*	37*	42*	-	-	-	-	
30	17	20	28	38	44	-	58	-	-	
	-	22*	30*	37*	42*	-	-	-	-	
60	-	20	28	39	-	49	-	-	-	
	-	22*	30*	37*	42*	-	-	-	-	
120	17	-	-	39	-	52	-	62	66	
	-	22*	30*	37*	42*	-	-	-	-	
1440	17	-	-	-	43	52	-	-	66	
	-	22*	30*	37*	42*	-	-	-	-	

*) R_f -Werte der Blindproben

Mit wachsender Reaktionszeit beginnen die Flecke mit $R_f = 0,20$, $0,28$ und $0,39$ beim katalysierten Reaktionsprodukt zu verschwinden, und es treten neue Substanzen auf mit R_f -Werten von $0,49$, $0,52$ und $0,62$, während die Werte der Blindproben konstant bleiben. Setzt man der Ameisensäurelösung viel Wasser zu, so fällt eine weisse Substanz aus, welche nur schwach ninhydrinpositiv ist und im Papierchromatogramm einen starken Flecken auf der Startlinie zurücklässt.

Die Kondensation lässt sich somit auch in Lösungsmitteln durchführen. Allerdings ist bei der Wahl des Lösungsmittels darauf zu ach-

ten, dass es weder mit dem Ester noch mit dem Katalysator reagiert. In dieser Arbeit wurden diese Aspekte nicht mehr weiter untersucht. Es genügte vorerst zu wissen, dass die Kondensationen in Lösungsmitteln realisierbar sind. Dieser Befund wurde noch durch zwei weitere Versuche belegt. Eine 10 %ige (w/v) Lösung von Glutaminsäure- γ -äthylester in Chloroform und eine andere in m-Kresol wurden je mit 0,72 Mol-Prozent Zinntetrachlorid bei 20° C kondensiert. In beiden Lösungen wurden drei Flecken papierchromatographisch nachgewiesen. Im Chloroform war kurz nach der Zugabe des Katalysators eine weisse Masse ausgefallen.

Schliesslich wurden noch drei 10 %ige (w/v) Lösungen von L-Phenylalaninäthylester in Eisessig, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid hergestellt. Die Kondensationstemperatur betrug 40° C und die Katalysatorkonzentration 6,8 Mol-Prozent. Die Tabelle 15 enthält die Anzahl ninhydrinpositiver Flecken im Papierchromatogramm als Funktion der Reaktionszeit bei verschiedenen Lösungsmitteln.

Tabelle 15

Anzahl papierchromatographisch nachweisbarer Flecken als Mass für die Wirksamkeit des Katalysators (Zinntetrachlorid) bei der Lösungskondensation von L-Phenylalaninäthylester in drei Lösungsmitteln bei 40° C mit einer Katalysatorkonzentration von 6,8 Mol-Prozent als Funktion der Zeit

Lösungsmittel	Anzahl Flecken nach einer Reaktionszeit (Minuten) von					
	5	15	30	60	120	1440
Eisessig	5	3	4	-	5	5
Dimethylsulfoxid	3	5	3	3	6	3
Dimethylformamid	5	4	4	2	2	2

Für dieses Monomere scheint die Lösungskondensation geeigneter als die bereits besprochene Kondensation in Masse. Sofort nach Beginn der Reaktion treten in allen Lösungsmitteln einige Flecken auf,

welche durch ein Maximum gehen und nach 24 Stunden einen kleineren Endwert erreichen als kurz nach Beginn der Reaktion.

2.9 Cokondensationen

In orientierenden Versuchen wurde die katalysierte Cokondensation an solchen Aminocarbonsäureestern geprüft, die sich analytisch leicht nebeneinander nachweisen lassen. Als Modellsbstanzten wurden Glycinäthylester, L-Phenylalaninäthylester und L-Tyrosinäthylester gewählt.

1,1 g (5,7 mMol) L-Phenylalaninäthylester wurden in 4 g (39 mMol) Glycinäthylester gelöst und auf 80° C erwärmt. Dann wurden 7,1 Mol-Prozent Zinntetrachlorid, bezogen auf die gesamte Menge Ester, zugegeben. Die Kondensation wurde papierchromatographisch überwacht.

In Tabelle 16 werden die R_f -Werte der Kondensation von Glycinäthylester und jene der Kondensation von L-Phenylalaninäthylester mit den R_f -Werten der Cokondensation bei 15, 30 und 60 Minuten verglichen.

Tabelle 16

R_f -Werte der Kondensate von Glycinäthylester, L-Phenylalaninäthylester und des Cokondensationsproduktes aus diesen beiden Estern für Reaktionszeiten von 15, 30 und 60 Minuten.

Reaktionszeit (min)	Kondensate aus	$R_f \cdot 100$ -Werte						
15	H-Gly-OC ₂ H ₅	36	29					
	Cokond.	40	31	23	11		5	
	H-Phe-OC ₂ H ₅	44	30			8		
30	H-Gly-OC ₂ H ₅	36	29					
	Cokond.	40	28		11	10	6	4
	H-Phe-OC ₂ H ₅	40		25	19			
60	H-Gly-OC ₂ H ₅	36	29		20			
	Cokond.	48			12	8		4
	H-Phe-OC ₂ H ₅	45		25				

Nach 15 Minuten treten im Cokondensat bereits drei neue Substanzen auf ($R_f = 0,23, 0,11, 0,05$), nach dreissig Minuten sind es bereits vier ($R_f = 0,11, 0,10, 0,06, 0,04$), und nach einer Stunde entsprechen die R_f -Werte des Cokondensates überhaupt nicht mehr jenen der Unipolykondensate. Es treten also neue Produkte auf, die bei der Unikondensation nicht nachweisbar sind; Cokondensationsprodukte.

Aehnliche Verhältnisse konnten bei einem Gemisch von L-Tyrosin-äthylester und Glycinäthylester beobachtet werden.

3 ENTWICKLUNG ANALYTISCHER METHODEN

Die orientierenden Versuche zur katalysierten Kondensation von α -Aminocarbonsäureestern zeigten, dass die Kondensation dieser Verbindungen bereits bei Raumtemperatur überraschend schnell und einfach gelingt, wenn geeignete Katalysatoren verwendet werden. Bei diesen qualitativen Untersuchungen blieb jedoch offen, wie gross die Peptid-Ausbeute ist und in welchem Umfange Nebenprodukte auftreten. Ferner war die Konstitution der Kondensationsprodukte zu prüfen.

Als wichtigstes und unerwünschtes Nebenprodukt ist 2,5-Dioxopiperazin, das cyclische Dimere des Glycins, zu erwarten. Es wurde deshalb eine Schnellmethode zur Bestimmung dieser Verbindung entwickelt (Abschnitt 3.1). Weiterhin wurde das Verhalten des Monomeren und der Reaktionsprodukte gegenüber verschiedenen Aufarbeitungsverfahren geprüft (Abschnitt 3.3), um Anhaltspunkte dafür zu bekommen, ob die erhaltenen Analysenwerte wirklich der Zusammensetzung des Reaktionsproduktes entsprechen oder ob durch Aufarbeitungs- und Analyseverfahren deren Konstitution verändert wird.

3.1 Quantitative Bestimmung des 2,5-Dioxopiperazins

In der Literatur wurden zwei Methoden zur Bestimmung des 2,5-Dioxopiperazins vorgeschlagen. In einer Arbeit von Frankel und Kacchalski (4) wird bemerkt, dass das Dioxopiperazin (DOP) quantitativ als Pikrat gefällt werden kann. Die angekündigte Arbeitsvorschrift ist jedoch nie erschienen. Sluyterman und Labruyère (21) lösen das 2,5-Dioxopiperazin mit Aethylalkohol aus den Reaktionsmischungen heraus und gewinnen dann das DOP durch fraktionierte Kristallisation mit einer Reproduzierbarkeit von $\pm 2\%$.

Beide Methoden wurden nachgearbeitet. Die Fällung des DOP als Pikrat erwies sich als ungeeignet, da auch die α -Aminocarbonsäuren und deren Derivate Pikrate bilden. Die Trennung der verschiedenen Pikrate gelang nicht. Offenbar ist darin der Grund zu suchen, dass die angekündigte Vorschrift von Frankel und Katchalski (4) nie erschienen ist.

Die Methode der Extraktion des DOP mit Aethylalkohol mit anschließender Kristallisation erwies sich als ausserordentlich zeitraubend und damit für die erforderlichen Reihen-Untersuchungen als nicht geeignet. Es wurde daher versucht, quantitative Bestimmungsmethoden des DOP über infrarotspektroskopische Messungen und über ein Sublimationsverfahren zu entwickeln.

3.1.1 Infrarot-Spektroskopie

Um geeignete Leitbanden zu finden, wurden die Infrarot-Spektren eines dioxopiperazinfreien Polykondensates (Kondensationstemperatur 20° C, 1,7 Mol-Prozent Zinntetrachlorid als Katalysator, dreimal mit Wasser ausgewaschen und getrocknet) sowie des 2,5-Dioxopiperazins in Kaliumbromid aufgenommen. Die gefundenen Wellenzahlen sind in Tabelle 17 zusammen mit den Angaben der Literatur zusammengestellt.

Um im IR-Bereich reproduzierbare Absorptionssignale zu erhalten, sollten nur Banden mit Durchlässigkeiten zwischen 25 - 70 % ausgewertet werden, da sonst die Fehler um Grössenordnungen zunehmen. Aus Tabelle 17 geht hervor, dass die Banden bei 3080, 1250 und 898 cm^{-1} des Polykondensates sich mit jenen des 2,5-Dioxopiperazins bei 3060, 1249 und 913 cm^{-1} nahezu überdecken und deshalb nicht als Vergleichssignale in Frage kommen. Weiter werden die Banden bei 3300 cm^{-1} und zwischen 1630 - 1700 durch das Kaliumbromidspektrum gestört. Von den noch verbleibenden Banden sind beim Polykondensat diejenigen bei 1420, 1282 und 1027 cm^{-1} und beim 2,5-Dioxopiperazin die bei

Tabelle 17

Absorptionssignale von Polyglycin II und 2,5-Dioxopiperazin im Vergleich mit Literaturwerten.

Es bedeuten: st = starkes Signal
 m = mittleres Signal
 s = schwaches Signal

Wellenzahlen (cm^{-1}) beim			
Polyglycin		2,5-Dioxopiperazin	
Lit. (23-27)	diese Arbeit	Lit. (22)	diese Arbeit
3290	3240 st	3180	3160 st
3095	3080 m	3060	3023 s
		1718 st	1718 st
		1696 st	1692 st
		1680 st	1680 st
1648	1640 st		
1630	1635 s		
1562	1560 st		
1558	1550 st		
		1528 m	1523 s
			1472 s
			1445 s
1418	1420 m		
		1340 s	1342 s
1284	1282 m		
1256	1250 m	1249 m	1251 m
		1072 s	1073 s
1026	1027 st		
		994 m	994 m
902	898 s	914 s	913 s
		842	835 m
		818	806 m

1072, 835 und 806 cm^{-1} geeignet, da ihre Durchlässigkeiten zwischen 30 und 65 % liegen.

Die Brauchbarkeit dieser Signale für die quantitative Analyse von DOP wurde an künstlichen Mischungen des oben erwähnten Poly-

glycins mit 1, 2, 4, 9, 16, 26 und 32 % 2,5-Dioxopiperazin geprüft. Die erhaltenen Wellenzahlen S (cm^{-1}) und Flächen F (willkürliche Einheiten) sind in Tabelle 18 zusammengestellt.

Tabelle 18

Wellenzahlen S und Bandenflächen F für eine Reihe von Mischungen von 2,5-Dioxopiperazin mit Polyglycin für verschiedene Absorptionsbanden bei konstanter Probeneinwaage von 1,7 mg.

cm^{-1}	% 2,5-Dioxopiperazin in der Mischung													
	1		2		4		9		16		26		32	
	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F
1420	1425	33	1425	32	1423	35	1425	39	1418	37	1414	41	1417	50
1282	1284	20	1284	19	1282	17	1284	23	1285	23	1285	15	1287	20
1072	-		-		-		-		-		-		-	
1027	1031	170	1030	169	1029	202	1030	150	1032	185	1032	167	1033	140
835	-		-		-		846	1	850	10	850	9	852	13
806	-		-		-		-		836	6	836	5	836	4

Alle Signale mit Ausnahme desjenigen bei 1420 cm^{-1} werden mit steigender Konzentration an 2,5-Dioxopiperazin hypsochrom verschoben. Die typische Bande des 2,5-Dioxopiperazins bei 1072 cm^{-1} tritt überhaupt nicht auf, die übrigen charakteristischen 2,5-Dioxopiperazinbanden (835 bzw. 806 cm^{-1}) erst oberhalb von Gehalten von 9 % DOP. Die Stärke der entsprechenden Signale zeigt jedoch keinen eindeutigen Zusammenhang mit der Konzentration. Die Infrarot-Spektroskopie ist daher als Methode zur quantitativen Bestimmung des 2,5-Dioxopiperazins nicht geeignet.

3.1.2 Sublimation

Das Sublimationsverhalten von reinem 2,5-Dioxopiperazin wurde bei verschiedenen Temperaturen im Hochvakuum von 0,01 mm Hg geprüft. Die Versuchszeit betrug jeweils 2 Stunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengestellt.

Tabelle 19

Sublimationsverhalten von reinem 2,5-Dioxopiperazin

Sublimations- temperatur °C	2,5-Dioxopiperazin		
	Einwaage g	Auswaage g	Ausbeute %
130	0,0102	0,0084	85
155	0,0097	0,0090	93
185	0,0083	0,0083	100
195	0,0032	0,0033	103
200	0,0077	0,0077	100
220	0,0047	0,0047	100

Aus Tabelle 19 geht hervor, dass bei Temperaturen zwischen 185 und 220° C das eingesetzte DOP quantitativ wiedergefunden wird. Damit das Verfahren jedoch analytisch verwendet werden kann, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

- 1) Nur 2,5-Dioxopiperazin darf sublimieren.
- 2) Bei der Sublimation darf aus dem Reaktionsgemisch, speziell aus den Peptiden und dem Monomeren, kein DOP entstehen.
- 3) Das DOP darf unter den Sublimationsbedingungen nicht polymerisieren oder sich sonst umsetzen.

Zur Prüfung dieser Punkte wurde ein Gemisch aus je einem Gramm Glycin, Diglycin und Triglycin hergestellt, das in einem Mörser in-nig vermischt wurde. Diese Mischung wurde dann mit soviel DOP ver-

setzt, dass dessen Gewichtsanteil ca. 30 % betrug. Die Versuchsdaten der Sublimation bei 0,01 mm Hg sind in Tabelle 20 zusammengestellt.

Tabelle 20

Einfluss von Temperatur und Versuchszeit auf die Sublimation von 2,5-Dioxopiperazin aus einem Gemisch mit Glycin, Diglycin und Triglycin.

Temp. °C	Zeit h	Gemisch Einwaage g	2,5-Dioxopiperazin		
			Einwaage g	Auswaage g	Auswaage %
180	2	0,0771	0,0092	0,0091	99
200	2	0,0684	0,0062	0,0103	166
220	2	0,0472	0,0062	0,0076	123
250	2	0,1002	0,0123	0,0141	115
180	3	0,0917	0,0114	0,0114	100
180	4	0,0732	0,0099	0,0098	99
180	6	0,0872	0,0089	0,0089	100

Aus der Tabelle 20 ist zu entnehmen, dass bei einer Versuchstemperatur von 180° C die eingesetzten Mengen DOP unabhängig von der Versuchszeit quantitativ wiedergefunden werden. Eine Zersetzung des DOP findet daher bei dieser Temperatur nicht statt. Bei höheren Temperaturen sind die Auswaagen an DOP jedoch stets höher als die Einwaagen. Ein Teil der Beisubstanz (Glycin, Diglycin und/oder Triglycin) muss sich daher in DOP umgewandelt haben. Nach diesen Versuchen darf also eine Sublimationstemperatur von 180° C nicht überschritten werden.

Die Ergebnisse werden durch Sublimationsversuche an Mischungen von DOP mit Polyglycin bestätigt. Dieses Polyglycin wurde aus einem Polykondensat durch viermaliges Auswaschen mit heissem Wasser hergestellt und erwies sich bei einem Sublimationsversuch bei 180° C als DOP-frei. Der Einfluss der Sublimationsbedingungen wurde sodann an bekannten Mischungen dieses Polyglycins mit DOP geprüft (Tabelle 21).

Tabelle 21

Einfluss der Sublimationsbedingungen auf die Sublimation von 2,5-Dioxopiperazin aus dessen Gemisch mit Polyglycin.

Temp. °C	Zeit h	2,5-Dioxopiperazin		
		Einwaage g	Auswaage g	Auswaage %
180	2	0,0137	0,0137	100
180	2	0,0097	0,0099	102
180	2	0,0106	0,0106	100
180	2	0,0084	0,0084	100
180	4	0,0127	0,0125	99
180	6	0,0064	0,0065	101
200	2	0,0112	0,0114	102
220	2	0,0097	0,0118	122
250	2	0,0432	0,0497	115

Auch hier wird bei einer Sublimationstemperatur von 180° C das 2,5-Dioxopiperazin quantitativ wiedergefunden. Bei Temperaturen über 220° C steigt jedoch die sublimierte Menge an 2,5-Dioxopiperazin auf über 100 %, was auf einen Abbau des Polyglycins deutet. Das Sublimat ist ninhydrinnegativ; Peptidester und Peptidesterhydrochloride sublimieren also nicht.

3.2 Infrarot-Spektroskopie

Während die Infrarot-Spektroskopie offenbar nicht für die quantitative Bestimmung von 2,5-Dioxopiperazin in den Kondensationsprodukten geeignet ist, kann sie doch zur qualitativen Analyse auf einzelne Komponenten dienen.

M. Tsuboi (30) untersuchte Glycin und Glycin-Hydrochlorid, sowie verschiedene deuterierte Glycinabkömmlinge. R. Schwyzer, B. Iselin, W. Rittel und P. Sieber (22) synthetisierten cyclische Glycin-oligomere und beschreiben die Bandenzuordnungen für 2,5-Dioxopiperazin, cyclisches Tetraglycin und cyclisches Hexaglycin. Eine Vielzahl von Autoren untersuchte die Spektren von Glycinpeptiden (22 - 27 und 30 - 33). Für Oligomere von niederem Molekulargewicht ist die Bande bei 1690 cm^{-1} (23) typisch. Das Gebiet zwischen 1100 und 1300 cm^{-1} ist nicht reproduzierbar (24).

3.3 Untersuchungen zur Aufarbeitung der Kondensationsprodukte

Aus der Vielfalt der α -Aminocarbonsäureester und der Katalysatoren wurden für die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Untersuchungen Glycinäthylester und Zinntetrachlorid ausgewählt. Zur Charakterisierung der Kondensationsprodukte bzw. der Eigenschaften als Funktion der Kondensationsbedingungen wurde zunächst das Verhalten der Kondensationsprodukte gegenüber verschiedenen denkbaren Aufbereitungsmethoden untersucht.

3.3.1 Stabilität des Kondensates

Verschiedene Beobachtungen bei den orientierenden Versuchen legten nahe, dass die Kondensate nach der Aufbereitung nicht völlig stabil sind. Auf eine solche Instabilität deutete das Auftreten neuer und Verschwinden alter Flecken im Papierchromatogramm. Um die Verhältnisse abzuklären, wurden 13 g Glycinäthylester (128 mMol) mit 1 g ($3,85 \text{ mMol}$) Zinntetrachlorid 60 Stunden bei 20° C kondensiert, das im Hochvakuum bei 40° C getrocknete Kondensat fein gepulvert und anschliessend in 50 ml absolutem Alkohol suspendiert. Im Zeitraum

zwischen 3 und 29 Tagen wurden Proben entnommen und papierchromatographisch untersucht. Die erhaltenen R_f -Werte sind in Tabelle 22 zusammengestellt.

Tabelle 22

R_f -Werte eines Kondensationsproduktes aus Glycinäthylester und Zinn-tetrachlorid. Reaktionstemperatur 20° C, Katalysatorkonzentration 3 Mol-Prozent. Die Probe wurde in Aethanol gelagert und zu den angegebenen Zeiten papierchromatographisch untersucht.

Zuordnung: a = höhere Glycinderivate

b = höhere Glycinderivate

c = H-(Gly)₄-OC₂H₅

d = H-(Gly)₂-OC₂H₅

e = H-(Gly)-OC₂H₅

f = H-(Gly)₂-OC₂H₅·HCl

g = H-(Gly)₂₋₃OC₂H₅·HCl

h = H-(Gly)-OC₂H₅·HCl

l = Verbindungen von SnCl₄ und H-(Gly)-OC₂H₅

Probe Nr.	Zeit Tage	100·R _f																
		a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m					
1	3	11	16				28	35		44	49	54						
2	6	12	16	19			26	33	39		47	51						
3	9	5	11	17			30			42	47	51	55	59				
4	12		18		24	30		38		46								
5	15	13		20		29		38		46	51		57	65				
6	22		18			27		37		47	51		56	63	69	75	83	98
7	29					29	35	40	42	43	46	49	mehrere					

Aus der Tabelle geht hervor, dass die den höheren Glycinoligomeren entsprechenden Flecken mit zunehmender Suspensionszeit verschwinden. Dagegen treten neue, nicht zuzuordnende Flecken mit R_f -Werten zwischen 0,55 und 0,98 auf.

3.3.2 Fraktionierungsversuche

Für die Untersuchung der Kondensationsprodukte wäre es vorteilhaft gewesen, wenn diese durch geeignete Methoden in die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden könnten. Die Möglichkeit solcher Trennungen wurde bei folgenden Verfahren studiert:

3.3.2.1 Chromatographie

Die quantitative Auftrennung einer polymerhomologen Reihe von Polypeptiden bis zum Polymerisationsgrad 15 gelang erstmals im Jahre 1962 beim Polylysin (28). Dabei kann sogar noch erwartet werden, dass sich diese Reihe wegen der stark polaren Amino-Seitengruppe besonders gut auftrennen lässt. Die Reihe der Polyglycine dürfte sich erheblich schwieriger trennen lassen. Auf Versuche zur quantitativen chromatographischen Auftrennung wurde daher verzichtet.

3.3.2.2 Gelfiltration

Versuche zur Auftrennung des Kondensationsproduktes durch Gelfiltration (Sephadex 25 grob, 72 Stunden in 1n Essigsäure gequollen, thermostatisierte Chromatographiekolonnen, Durchmesser : Höhe = 1:20) waren sämtliche negativ.

3.3.2.3 Papierelektrophorese

Eine grössere Versuchsreihe wurde mit Glycin, Diglycin und Triglycin als Modellsubstanzen unter Variation von Laufmittel (1n, 2n, 3n, 4n und 5n Essigsäure, $\text{HCOOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O} = 13(25\%):29:958$ und $\text{Pyridin}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O} = 10:100:890$. Der pH-Bereich betrug 2,41 - 1,16) und Spannung (0,6-1,5-2,3-4,3-5,7 und 11,4 V/cm) unternommen. Es gelang tatsächlich, diese drei Verbindungen in 1n Essigsäure als Elektrolyt bei 11,4 Volt/cm zu trennen. Leider liessen sich jedoch auf diesem Wege die Kondensate nicht auftrennen. Der Grund dürfte darin

liegen, dass das Gemisch hauptsächlich aus Peptidestern und deren Hydrochloriden bestand, die sich im elektrischen Feld nahezu homogen verhalten. Es wurde deshalb versucht, das Kondensat durch Behandeln mit geeigneten Lösungsmitteln in charakteristische Fraktionen aufzutrennen.

3.3.2.4 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

49 g (475 mMol) Glycinäthylester wurden mit 1,2 g (4,6 mMol) Zinntetrachlorid bei 20° C in Masse 24 Stunden kondensiert und anschliessend über Nacht bei 40° C am Hochvakuum von 0,01 mm Hg getrocknet. Von diesem Kondensat wurden je 2 g in einem Soxhlet 24 Stunden extrahiert. Die Gewichtsbilanzen sind in Tabelle 23 zusammengestellt.

Tabelle 23

Gewichtsbilanz der Extraktion eines Glycinäthylesterkondensates mit verschiedenen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	Siedepunkt des LM °C	Extraktions- rückstand g	Extrakt	
			gefasst g	nicht gefasst g
Chloroform	61	1,31	0,68	0,01
Methylcyclohexan	100,8	1,89	0	0,11
Methylenchlorid	40	1,71	0,15	0,14
Tetrachlorkohlenstoff	77	1,72	0	0,25
Pyridin	115	1,62	0,16	0,22
Essigester	77	1,85	-	0,15
o-Xylol	144	1,85	0	0,15
Glykol	197	1,08	0	0,92

Der Versuch zeigt, dass diese Lösungsmittel mit Ausnahme von Chloroform nicht zur Extraktion verwendet werden können, teils, weil

durch sie nichts extrahiert wird, teils, weil grosse Verluste auftreten.

3.3.2.5 Trennschema

Wie in den vorhergehenden Abschnitten nachgewiesen wurde, besteht das Reaktionsprodukt nach den papierchromatographischen und infrarotspektroskopischen Untersuchungen aus dem Ausgangsprodukt Glycinäthylester, nieder- und höhermolekularen Peptidestern, den Hydrochloriden des Glycinäthylesters und der Peptidester sowie aus dem 2,5-Dioxopiperazin. Denkbar sind ferner das Auftreten von Glycin und Peptiden, von Additions- und Substitutionsverbindungen des Zinntetrachlorides sowie von Spaltprodukten des Glycinäthylesters und der Peptidester.

Es wurde daher das Gesamtkondensat G mit Wasser (20facher Ueberschuss) dreimal je $\frac{1}{2}$ Stunde (bei 20° C) extrahiert und so eine wasserlösliche Fraktion W gewonnen. Der verbleibende wasserunlösliche Teil wurde dreimal je $\frac{1}{2}$ Stunde bei 20° C mit kaltem Eisessig behandelt, wobei eine eisessiglösliche Fraktion E anfiel. Der verbleibende wasser- und eisessigunlösliche Anteil wurde mit R bezeichnet. Gesamtkondensat G, wasserlösliche Fraktion W, eisessiglösliche Fraktion E und unlöslicher Rückstand R wurden sodann auf die in ihnen enthaltenen Komponenten untersucht (Abschnitt 3.4).

Diese Behandlung veränderte das ursprüngliche Kondensat nicht, wie aus papierchromatographischen Untersuchungen eindeutig hervorging.

3.4 Untersuchung der Fraktionen

3.4.1 Gesamtkondensat G

Die Prüfung des Kondensationsproduktes auf die Anwesenheit von Carboxylgruppen und von Spaltprodukten des Glycinesters bzw. der Peptidester wurde am Gesamtkondensat vorgenommen.

Aus den IR-Spektren von Gesamtkondensaten, die unter den folgenden Bedingungen hergestellt worden waren:

0,07 Mol-%	SnCl ₄	20°C	und 24	Stunden	Kondensationsdauer
0,1	"	20°C	" 24	"	"
0,18	"	20°C	" 24	"	"
0,22	"	20°C	" 24	"	"
0,27	"	20°C	" 24	"	"
3,50	"	80°C	" 2	"	"
4,0 Mol-%	SnCl ₄	40°C	und 2,5	Stunden	Kondensationsdauer

liessen sich folgende Informationen entnehmen:

Uebereinstimmend wurden bei allen Proben die für Peptide charakteristische Bande bei 1026 cm⁻¹, die bei 1075 cm⁻¹ auftretende Bande des 2,5 Dioxopiperazins (nur bei Konzentrationen oberhalb 9 % (vgl. Abschnitt 3.1.1)) und die bei 1740 cm⁻¹ liegende, für Ester typische Bande gefunden. Die für niedermolekulare Oligomere charakteristische Bande bei 1690 cm⁻¹ wurde vom KBr überdeckt. In keinem Fall traten die Banden für andere cyclische Peptide als 2,5-Dioxopiperazin auf (Abwesenheit der Banden bei 1095 - 1108 cm⁻¹). Ebenfalls abwesend waren die für eine freie Carbonylgruppe bei 1610 cm⁻¹ und 1415 cm⁻¹ zu erwartenden Signale. Der letztere Befund wird durch die direkte Prüfung des wasserunlöslichen Anteils einer Reihe von insgesamt 8 Proben auf freie Carboxylgruppen bestätigt. Die Proben waren mit SnCl₄-Konzentration zwischen 0,6 und 4 Mol-% bei Temperaturen zwischen 0 und 80°C je 24 Stunden kondensiert worden. Je 500 mg wurden dann dreimal mit 10 ml Wasser gewaschen, getrocknet, in m-Kresol gelöst

und mit 0,1n alkoholischer Kalilauge gegen Phenolphthalein titriert. In keinem Fall konnten Carboxylgruppen nachgewiesen werden. Damit ist ausgeschlossen, dass für die Katalysatorwirksamkeit Wasser verantwortlich ist.

Der Erfolg der mit Zinntetrachlorid katalysierten Peptidbildung ist überhaupt nur wenig von einem etwaigen Wassergehalt abhängig, wie Tabelle 24 für Kondensationen mit verschiedenen hohen Wasserzusätzen zeigt. Bis herauf zu Wasserzusätzen von etwa 9 % wird noch eine Vielzahl ninhydrinpositiver Flecken gefunden. Erst bei Zusatz von ca. 17 % Wasser, bezogen auf Glycinäthylester, ist keine Kondensation des Glycinesters mehr nachweisbar.

Tabelle 24

R_f -Werte der ninhydrinpositiven Flecken bei der mit 1 Mol-Prozent Zinntetrachlorid (bezogen auf Glycinäthylester) katalysierten Kondensation von Glycinäthylester-Wasser-Gemischen. (40° C, Reaktionszeit: 24 h).

Vol-% Wasser bezogen auf Glycinäthyl- ester/Wasser	$R_f \cdot 100$									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
0	-	66	56	48	-	38	30	26	20	-
2,44	-	67	56	48	-	-	30	26	-	16
4,77	80	-	56	48	43	-	30	-	-	16
9,09	80	-	-	48	-	-	30	-	-	16
16,66	-	-	-	-	-	-	-	24	-	-
29,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Es erschien ferner denkbar, dass der Glycinäthylester und dessen Polymere unter den in dieser Arbeit verwendeten Kondensationsbedingungen in andere Bruchstücke fragmentiert würden. Nach Sluyterman und Veenedaal (5) entstehen z.B. aus dem Tetraglycinmethylester nach 200 Stunden bei 100° C N-Methylglycin (Sarkosin), N,N-Dimethylglycin und

andere Produkte, während beim Triglycinmethylester keine derartige Spaltung beobachtet wurde. Bei noch höheren Temperaturen (373°C) zerfällt dann Glycin in Wasser quantitativ in Ammoniak, Kohlendioxid, Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin usw. (44).

Unter unseren Kondensationsbedingungen entsteht ebenfalls der Tetraglycinester. Ausserdem lag die höchste angewandte Kondensations-temperatur von 80°C nur wenig unter der von Sluyterman und Veenendaal verwendeten Temperatur von 100°C . Es wurde daher ein bei 80°C mit 3 Mol-Prozent Zinntetrachlorid (Kondensationsdauer 2 Stunden) hergestelltes Gesamtkondensat der Totalhydrolyse unterworfen (vgl. Abschnitt 7.2.1), indem es über Nacht bei Normaldruck mit 6n Salzsäure gekocht wurde. Im Papierchromatogramm des Filtrates erschienen 3 ninhydrinpositive Flecken mit den auf L-Leucin standardisierten R_f -Werten von 0,19 (Glycin), 0,35 (Glycinhydrochlorid) und 0,59 (unbekannt). Die geschätzten Intensitäten verhielten sich wie 90 : 2 : 8, was wegen der verschiedenen Farbtintensitäten der Ninhydrinprodukte von Glycin und Glycinhydrochlorid trotz grossen Ueberschusses an Salzsäure verständlich ist. Das gleiche Kondensat wurde darauf unter verschärften Bedingungen 24 Stunden in 6n Salzsäure im Bombenrohr hydrolysiert. Im Papierchromatogramm erschien jetzt nur noch ein einziger Flecken mit $R_f = 0,36$, der dem Glycinhydrochlorid entsprach. Unter den Bedingungen der Kondensation treten also keine unerwünschten Fragmentierungen in grösserem Ausmass auf.

3.4.2 Wasserlösliche Fraktion W

Nach infrarotspektroskopischen Untersuchungen enthalten die wasserlöslichen Fraktionen Glycin- und Peptidäthylester, deren Hydrochloride sowie 2,5-Dioxopiperazin. Carboxylgruppen sind nicht vorhanden, wie die Abwesenheit der Banden bei 1610 und 1415 cm^{-1} beweist.

Papierchromatographische Untersuchungen an den wasserlöslichen Fraktionen einer Vielzahl von Kondensationsprodukten (Tabelle 25) gaben weitere Aufschlüsse über die Komponenten. Wie man der Tabelle entnimmt, liegen sämtliche Flecken zwischen $R_f = 0,08 - 0,41$. Eine Ausnahme bilden nur die Fraktionen aus den bei 0°C mit 0,6 bzw. 1,7 Mol-Prozent Zinntetrachlorid hergestellten Kondensaten, bei denen noch je ein zusätzlicher Fleck mit $R_f = 0,48$ bzw. 0,49 gefunden wurde. Alle übrigen Flecken lassen sich der Reihe von Glycinäthylester bis Tetraglycinäthylester bzw. deren Hydrochloride zuordnen. Ein ninhydrinpositiver Startfleck wurde nicht gefunden. Höhere Peptide scheinen demnach nicht vorhanden zu sein. Mit dieser Schlussfolgerung stimmt überein, dass sich die für die wässrigen Fraktionen berechneten Polykondensationsgrade durchwegs um 4 bewegen (vgl. Tabelle 30 im Abschnitt 4.2).

3.4.3 Eisessiglösliche Fraktion E

Die eisessiglöslichen Fraktionen wurden infrarotspektroskopisch untersucht. Nach diesen Messungen bestehen die Fraktionen überwiegend aus Peptidestern. Sie enthalten jedoch keine Hydrochloride mehr (Abwesenheit der Banden bei 1740 cm^{-1}). Kleinere Ringe sind ebenfalls nicht nachweisbar, doch wurde in einigen Fällen noch 2,5-Dioxopiperazin gefunden. Aminosäuren sind ebenfalls abwesend (keine Banden bei 1610 bzw. 1415 cm^{-1}). Dieser Befund zeigt gleichzeitig, dass unter den Bedingungen der Extraktion mit Eisessig keine Umesterung der Peptidester eintritt.

Die durch Titration der Aminoendgruppen und der Bestimmung der Aethoxylgruppen berechneten Äquivalentgewichte der eisessiglöslichen Fraktionen sind in Tabelle 26 zusammengestellt.

Die erhaltenen Äquivalentgewichte sind praktisch unabhängig von der Katalysatorkonzentration und der Reaktionstemperatur, wie

Tabelle 25

Papierchromatographische Untersuchung der wasserlöslichen Fraktionen

Zuordnung: b = H-(Gly)-OC₂H₅·HCl f = H-(Gly)₂-OC₂H₅
 c = H-(Gly)₄-OC₂H₅·HCl g = H-(Gly)₃-OC₂H₅
 d = H-(Gly)₂-OC₂H₅·HCl h = H-(Gly)₄-OC₂H₅
 e = H-(Gly)-OC₂H₅ j = höhere Glycinester

Kondensationsbedingungen		100·R _f									
Kat. Konz. Mol-%	Temp. °C	a	b	c	d	e	f	g	h	j	
0,6	0	49	37								
1,7	0	48	37								
3,0	0		38		32	26	21	15			
3,5	0		39	35		28	22	19	14	12	
5,8	0		37		32	26	22	17	13		
0	20		41			26	20		12		
0,07	20		38		31	26		19	14	12	8
0,10	20		38		33	28	21		15	12	8
0,18	20		39		34	24				11	
0,23	20		39		33	28	21		16	12	8
0,27	20		38		32	28	20		15	12	8
0,70	20		39		33		23			11	
3,40	20		37			28	22		16		
4,50	20			36		27		18			
1,69	40		38		30		23	17			
1,80	40		39		32		24	16		11	8
3,1	40		39		33	27		18			
3,5	40		38		33	27	23	18			
5,2	40		39		32		23	16			
1,67	80		38		30		22	15	10		
2,30	80		39		29			18	13		
3,10	80		39		27			17	12		
4,00	80				32		24	17	12		

Tabelle 26

Zahlenmittel des Äquivalentgewichtes der eisessiglöslichen Fraktionen, bestimmt durch die Titrations der Aminogruppe in Eisessig mit 0,01n Perchlorsäure.

0°C		20°C		40°C		80°C	
Kat.Konz. Mol-%	M _{NH₂}	Kat.Konz. Mol-%	M _{NH₂}	Kat.Konz. Mol-%	M _{NH₂}	Kat.Konz. Mol-%	M _{NH₂}
0,6	1400	0,07	370	1,7	800	1,7	310
1,7	540	0,10	330	1,8	430	2,3	350
3,0	580	0,18	160	3,1	570	3,0	360
3,5	530	0,22	400	3,5	530	4,0	790
5,8	670	0,27	-	5,2	310		
		0,70	370				
		3,40	680				
		4,50	600				

es beim angewendeten Fraktionierschema erwartet werden kann. Die Polykondensationsgrade liegen im allgemeinen zwischen 5 und 10.

3.4.4 Wasser- und eisessigunlösliche Fraktion R

Der wasser- und eisessigunlösliche Rückstand sollte die höhermolekularen Peptidester enthalten. Erwartungsgemäss wird nach den infrarotspektroskopischen Untersuchungen auch kein Hydrochlorid mehr gefunden, ebenfalls keine freien Carboxylgruppen. Ueberraschend ist jedoch, dass trotz der Extraktion mit Wasser und Eisessig auch in der Fraktion R gelegentlich noch 2,5-Dioxopiperazin gefunden wird. Andere Ringe sind jedoch nicht nachweisbar.

Auf den höhermolekularen Charakter der Fraktion R deuten ausser der Unlöslichkeit in Wasser und Eisessig auch die verhältnismässig

hohen Aequivalentgewichte (vgl. Tabelle 30 im Abschnitt 4.2). Für ein höhermolekulares Produkt sprechen ferner die IR-Messungen an von 2,5-Dioxopiperazin befreiten Fraktionen R. Die gefundenen Banden sind in Tabelle 27 mit den Literaturangaben (34) für Polyglycin I und Polyglycin II verglichen. Beim Polyglycin I sind die Peptidachsen zweizählig; die Struktur entspricht ungefähr der β -Struktur der Peptide. Polyglycin II kann keiner bekannten Polypeptidstruktur zugeordnet werden. Hier liegen die dreizähligen Peptidachsen parallel; durch die Wasserstoffbrücken entsteht eine hexagonal dichteste Kugelpackung. Polyglycin I lässt sich daher verspinnen, Polyglycin II nicht. Bei Temperaturen von etwa 140° C geht Polyglycin II in Polyglycin I über (45).

Aus Tabelle 27 geht hervor, dass die bei der Fraktion R gefundenen Banden genau dem Polyglycin II der Literatur entsprechen. Der Befund ist insofern verständlich, als die Polykondensationstemperaturen unterhalb der Umwandlungstemperatur von 140° C lagen. Es muss aber überraschen, dass unter den Synthesebedingungen nicht etwa ein amorphes Material entsteht, sondern doch offenbar eine recht geordnete Struktur.

Die hohe Kristallinität der Fraktion R wird auch durch Pulverdiagramm-Aufnahmen mit der Debye-Scherrer-Kamera belegt. Abbildung 1 zeigt die Aufnahme der Fraktion R sowie die Vergleichsaufnahmen für Glycin, Glycinäthylesterhydrochlorid, 2,5-Dioxopiperazin und den Komplex $C_2H_5O-SnCl_3 \cdot C_2H_5OH$. Aus dem Vergleich geht hervor, dass bei der Fraktion R ganz andere Netzebenenverhältnisse auftreten als bei den anderen Produkten.

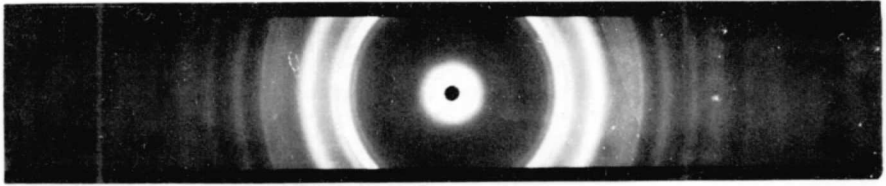
Die Grösse des Molekulargewichtes geht aus den Aequivalentgewichts-Bestimmungen über die Aethoxylendgruppen hervor. Nach diesen in Tabelle 30 (Abschnitt 4.2) wiedergegebenen Daten liegen die Molekulargewichte der Fraktionen R zwischen 600 und 2500 und die Polymerisationsgrade damit zwischen 10 und 40.

Tabelle 27

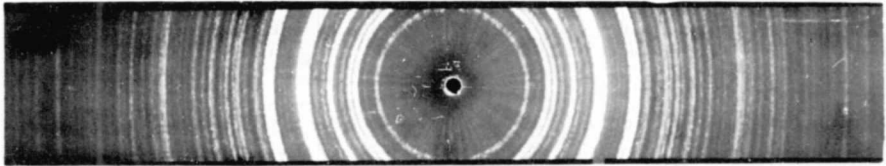
Vergleich der bei der Fraktion R gefundenen IR-Banden (cm^{-1}) mit denen der Literatur für Polyglycin I und Polyglycin II.

Poly-glycin I	Poly-glycin II	diese Arbeit	Zuordnung	Literatur
4375	-	-	CH ₂	33
4300	-	-	CH ₂ stretch	33
3300	3290	3240	NH-stretch	31,33
-	3095	3080		
3124	-	-	antiparal.	31
2950	-	-		31,33
2700	-	-		31
1690	-	-		23,27
1650	-	1640		7
1632	1648	1635	C=O	23,24,32,27
1630	1648	1635	C=O	23,26,27
-	1630	-	Helix	25
1588	-	-		31
1562	1562	1560		27
-	1558	1550	NH-def.	23,26
1540	-	-	antiparal.	31,25
1530	-	-	C=O	26
1521	-	-	NH-def.	23,32,27
-	1520	-	Helix	25
1462	-	-	C-H def.	24,31
1434	1418	1420	C-H def.	23
1380 *)	-	-		31
1300 *)	-	-		31
-	1284 *)	1282		31,27
-	1256 *)	1250		27
1236 *)	-	-		27,31
1015	1026	1027	Peptid	31,23,24,26,27
910	-	-		31
-	902	898		27
818	-	-		27
-	-	-		25
217	-	-		25

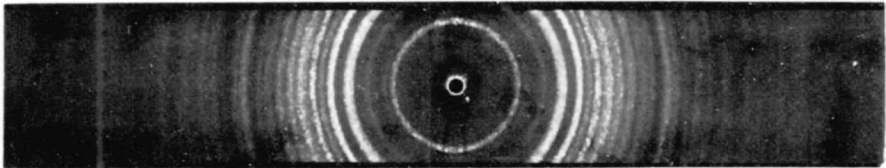
*) nicht reproduzierbar (24)



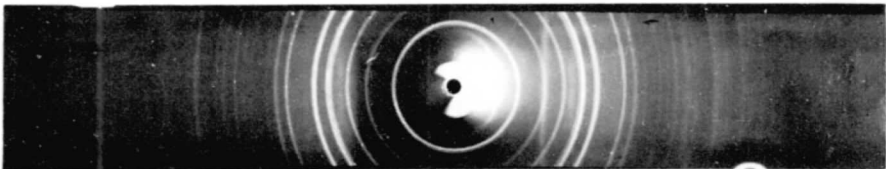
Polyglycinäthylester



Glycin



Glycinäthylester-Hydrochlorid



2,5-Dioxopiperazin

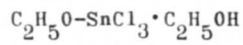
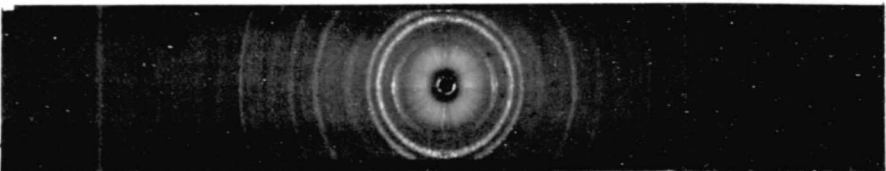


Abbildung 1

Debye-Scherrer-Aufnahmen

4 O P T I M I E R U N G

4.1 Optimierung der Monomersynthese

Die Gewinnung des Glycinäthylesters gelingt nur über das Hydrochlorid. Der einzige rationelle Weg ist:

Glycin \longrightarrow Glycinäthylester-Hydrochlorid \longrightarrow Glycinäthylester.

Im Gegensatz zu den gewöhnlichen Carbonsäureestern der organischen Chemie ist nämlich Glycinäthylester wegen seiner Aminogruppe noch ziemlich gut wasserlöslich. Ferner wird der Ester in Anwesenheit von Wasser in das 2,5-Dioxopiperazin umgewandelt (15). Die Aufbereitung wird daher durch diese beiden Effekte erschwert. Um den freien Ester zu erhalten, muss das Hydrochlorid des Glycinäthylesters durch Neutralisation in ein Salz umgewandelt werden.

In der Literatur ist die Neutralisation mit Natronlauge (54) und das Ausschütteln des Esters mit Aether beschrieben. Die anfänglich schlechten Ausbeuten des Esters konnten durch Aussalzen verbessert werden. Wie aus der Tabelle 28 hervorgeht, waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend. Die Methode wurde geändert und nunmehr zur Neutralisation Kalilauge, Ammoniumhydroxid und Bariumoxid (51) verwendet. Die Ausbeuten waren jedoch noch schlechter als bei der Verwendung von Natronlauge.

Es wurde nun vom Wasser, welches nur als gutes Lösungsmittel für die nach der Neutralisation entstandenen Salze verwendet worden war, Abstand genommen. Viel bessere Ausbeuten wurden bereits bei der Neutralisation des Hydrochlorids mit Natriummethylat erhalten (56). Diese Methode ist schon wesentlich zweckmässiger. Das anfallende Kochsalz ist in Methanol unlöslich und lässt sich abfiltrieren. Das Lösungsmittel wird dann bei tiefer Temperatur im Vakuum abdestilliert, wodurch die Autokondensation des Esters verringert werden kann. Allerdings muss zum Gelingen der Synthese Natriummethylat in genau äquimolaren Mengen eingesetzt werden. Bei einem Überschuss an Base

Tabelle 28

Ausbeuten bei der Gewinnung von Glycinäthylester aus dem Hydrochlorid mit verschiedenen Basen bei einer Neutralisationstemperatur von 0° C.

Base	Aufnehmen des Esters in	Ausbeute %
KOH/H ₂ O	Aether	11
NH ₄ OH/H ₂ O	Aether	32
Ba(OH) ₂ /H ₂ O	Aether	51
NaOH/H ₂ O	Aether	60
CH ₃ ONa/CH ₃ OH	Destillation	75-92
NH ₃ /CHCl ₃	Destillation	98

geht ein Teil des in Methanol schwerlöslichen Glycinäthylester-Hydrochlorids bei der Entfernung des Kochsalzes verloren, wodurch die Ausbeute vermindert wird. Liegt hingegen Natriummethylat im Ueberschuss vor, so wird die Ausbeute durch die katalysierte Kondensation herabgesetzt (es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Natriummethylat ein Katalysator für die Kondensation von α -Aminocarbonsäureestern ist). Es ist somit notwendig, vor jeder Reaktion den Gehalt der methanolischen Lösung an Natriummethylat durch Titration genau zu bestimmen. Auf diese Weise werden nahezu quantitative Umsätze erhalten.

Um den Vorteil des nichtwässrigen Lösungsmittels mit dem einer nicht die Glycinäthylester-Kondensation katalysierenden Base zu verbinden, wurde die Methode von Anderson und Callahan (15) leicht modifiziert. Die Autoren verwendeten als Base eine Lösung von Ammoniakgas in Aether. Da Aether noch beträchtliche Mengen Wasser aufnehmen kann und das Monomere wasserfrei sein sollte, wurde der Aether durch das von der Synthese her bereits trockene Chloroform ersetzt. Bei diesem Vorgehen ist ein Einstellen der genauen stöchiometrischen Neutralisationsbedingungen nicht mehr nötig, da Ammoniak die Kata-

lyse bei den gewählten Arbeitsbedingungen (0° C) nicht einleitet.

Das nach der Neutralisation entstandene Ammoniumchlorid löst sich nicht in Chloroform und kann nach der Reaktion mit einem Filtrierhilfsmittel einfach abgetrennt werden. Der freie Ester wird dann durch Destillation vom Lösungsmittel Chloroform isoliert. Die Ausbeute ist quantitativ. Wie erst viel später festgestellt wurde, war auch diese Methode in der Literatur schon beschrieben (59).

4.2 Gesamtausbeute

Aus den papierchromatographischen Untersuchungen (Abschnitt 2.3) ging hervor, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen neben der Kondensation eine Aethanolyse einherläuft. Durch die Aethanolyse kann sowohl die Ausbeute an Gesamtkondensat als auch dessen Polymerisationsgrad herabgesetzt werden. Sie könnte verhindert werden, wenn der bei der Kondensation abgespaltene Alkohol laufend aus der Reaktionsmischung entfernt würde. Dieser Weg ist jedoch nicht gangbar, da beim Anlegen eines Vakuums Monomer (Glycinäthylester: $K_p = 148^{\circ}$ C) und Abspaltungsprodukt gemeinsam entfernt werden.

Es wurde daher geprüft, wie sich die Aethanolyse auf den zeitlichen Verlauf der Kondensation auswirkt. In Abbildung 2 ist die Ausbeute an Gesamtkondensat (Aufarbeitung vgl. Abschnitt 7.1.4.1) als Funktion der Zeit für einen bei 0° C mit 2,1 Mol-Prozent Zinn-tetrachlorid durchgeführten Versuch aufgetragen. Die Ausbeute steigt demnach zuerst stark an, durchläuft dann nach etwa 250 Minuten ein Maximum bei etwa 83 % und fällt zuerst rasch, dann schwächer ab. Offenbar wird bei längeren Zeiten die Aethanolyse durch die Schwer- bzw. Unlöslichkeit der inzwischen entstandenen höhermolekularen Kondensationsprodukte erschwert.

Ein ähnliches Bild zeigt ein bei 80° C mit 1 Mol-Prozent Zinn-tetrachlorid durchgeführter Versuch. Auch hier durchläuft die Aus-

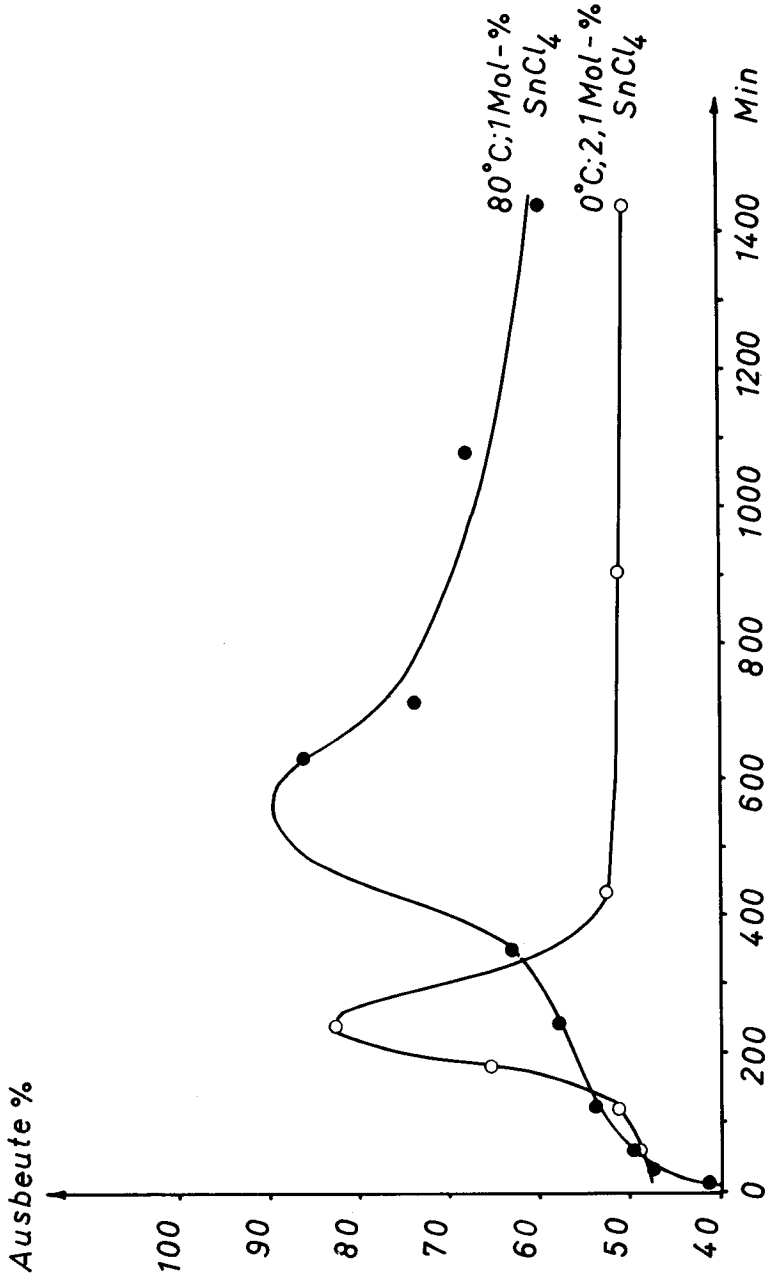


Abbildung 2

Ausbeute an Gesamtkondensat als Funktion der Zeit (vgl. Text).

beute zunächst ein Maximum, das aber bei ca. 90 % Umsatz und 550 Minuten liegt.

Nach etwa 24 Stunden nimmt die Ausbeute nur noch sehr langsam mit der Zeit ab. Für die vergleichenden Untersuchungen zum Einfluss von Katalysatorkonzentration und Temperatur auf Umsatz, Peptid- und Dioxopiperazinausbeute sowie Polymerisationsgrad wurden daher sämtliche Versuche unter Pseudogleichgewichtsbedingungen durchgeführt, d.h. die Proben erst nach 24 Stunden entnommen.

Die unter diesen Bedingungen nach 24 Stunden Versuchsdauer erhaltenen Ausbeuten an Gesamtkondensat sind in Tabelle 29 als Funktion von Katalysatorkonzentration und Temperatur wiedergegeben und in Abbildung 3 entsprechend graphisch aufgetragen. Aus der Abbildung entnimmt man, dass die Ausbeute unter diesen Bedingungen mit zunehmender Katalysatorkonzentration zuerst zunimmt und dann je nach Temperatur bei Katalysatorkonzentrationen zwischen ca. 3,5 und 5 Mol-Prozent durch ein schwaches Maximum läuft. Die auf eine Katalysatorkonzentration von 0 extrapolierte Ausbeute liegt bei etwa 50 %; sie ist innerhalb der Messgenauigkeit praktisch nicht temperaturabhängig. Die maximal erreichbaren Kondensatausbeuten betragen etwa 90 %.

Die für das Gesamtkondensat aus Aethoxyl-Bestimmungen berechneten Polymerisationsgrade sind in Tabelle 30 zusammen mit denen der anderen Fraktionen zusammengestellt. Dabei wurde der Polymerisationsgrad \bar{P} über

$$(1) \quad \bar{P} = \frac{M_{\text{äthoxy}} - 46}{57}$$

berechnet, wobei $M_{\text{äthoxy}}$ das über die Aethoxylbestimmung ermittelte Äquivalentgewicht ist. Das Äquivalentgewicht der Aethoxylendgruppe beträgt 46, das des Grundbausteins $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 57. Mit aufgenommen wurde der aus den Konzentrationen W von Rückstand R, eisessig-löslicher Fraktion E, wasserlöslicher Fraktion W und Gesamtkondensat G sowie deren Polymerisationsgraden berechnete Polymerisationsgrad P_W des wasserlöslichen Anteils. Dieser konnte wegen der feh-

Tabelle 29

Ausbeuten an Gesamtkondensat und 2,5-Dioxopiperazin nach 24 Stunden.

Mol-% SnCl ₄	Gesamtkondensat in Gew% bei				2,5-Dioxopiperazin in Gew% bei			
	0°C	20°C	40°C	80°C	0°C	20°C	40°C	80°C
0,07		50,6/47,2				3,4/4,3		
0,10		45,1				3,6		
0,18		55,0				3,7	0,43	
0,23		56,6				4,4		
0,27		55,2				3,9		
0,60	50,0				1,90			0,35
0,70		58,8				2,5		
0,96		59,8					1,3	
1,69	55,2		68,0	67,6	1,62	0,71	2,9/2,2	2,0
1,80			68,0				2,2	
2,30				72,5	0,21			
3,00	67,1	71,2			2,60	3,41	4,2	3,7
3,10			85,0	81,2			5,4	3,8
3,40		80,0				2,64		
3,50	72,3				4,16	3,3	4,3	4,1
4,00				78,5				4,3
4,50		73,5				3,9		
5,20			90,0				6,4	
5,80	80,4				8,70			

lenden Aufbereitungsmethode nicht direkt bestimmt werden.

Die Abhängigkeit des Polymerisationsgrades des Gesamtkondensates von der Molkonzentration des Zinntetrachlorids (Kondensationsdauer 24 Stunden) ist in Abbildung 4 wiedergegeben. Bei allen vier untersuchten Temperaturen nimmt der Polykondensationsgrad mit der Zunahme der Katalysatorkonzentration ab. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu dem der Ausbeute, die mit steigender Zinntetrachlorid-Konzentration zunimmt.

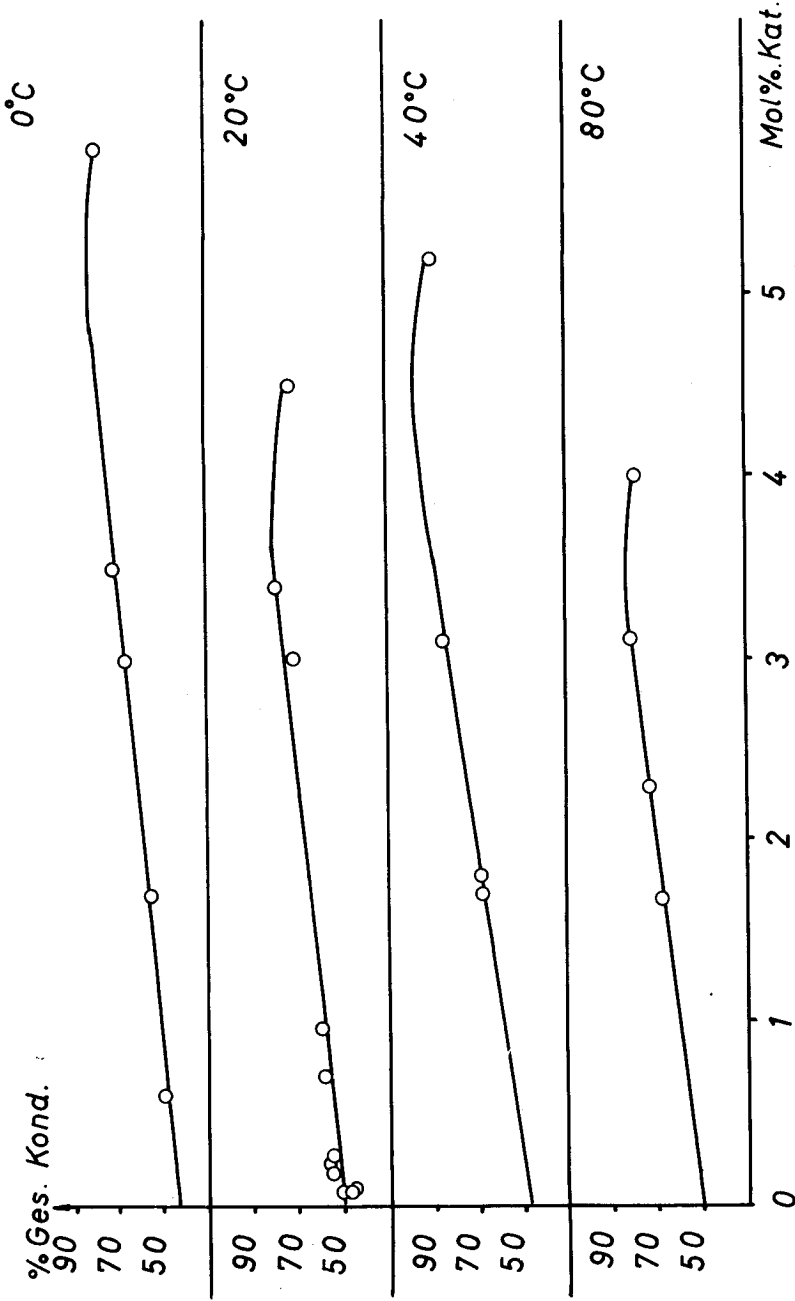


Abbildung 3

Ansbete des Gesamtkondensates als Funktion der Katalysatorkonzentration bei verschiedenen Temperaturen und einer Versuchszeit von 24 Stunden.

Tabelle 30

Polykondensationsgrade der verschiedenen Fraktionen bei Kondensations-
temperaturen von 0°, 20°, 40° und 80° C.

Konz. SnCl ₄ Mol-%	Temperatur °C																
	0				20				40				80				
	W	G	E	R	W	G	E	R	W	G	E	R	W	G	E	R	
0,07					5,8		8,4										
0,07					6		11										
0,10					5,9		8,7										
0,18					6,5		18										
0,23					5,7		8										
0,27					6,4		8,3										
0,60	3,6	5,6	3,5	15													21
0,70					5,7												
1,70	5,6	6,5	9,3	13					4,2	5,3	11	10,4		6,5	8,8		
1,80									4,8	5,6	11	10					
2,30				52										4,5	5,4	9,4	10
3,00	3,6	4	17	38													
3,10									4,0	4,5	13	13		4,9	5,5	9,3	9,0
3,40					4,2	4,5	16	16									
3,50		4	9,7						4,2	4,7	13	9,2		6,1			
4,00														4,2	4,8	15	14,3
4,50					3,9	4,1	16	28									
5,20														4,4	37		
5,80	3,2	4	49	∞													

4.3 2,5-Dioxopiperazin

Die Variation des Gehaltes an 2,5-Dioxopiperazin mit Katalysatorkonzentration und Temperatur wurde bereits in Tabelle 29 zusammengestellt. Man entnimmt ihr, dass der Gehalt des Kondensates an 2,5-Dioxopiperazin durchwegs gering ist und im Mittel etwa 2 - 3 % beträgt.

Abbildung 5 stellt die Verhältnisse graphisch dar. Man entnimmt ihr, dass bei den bei 0° C ausgeführten Kondensationen der Gehalt

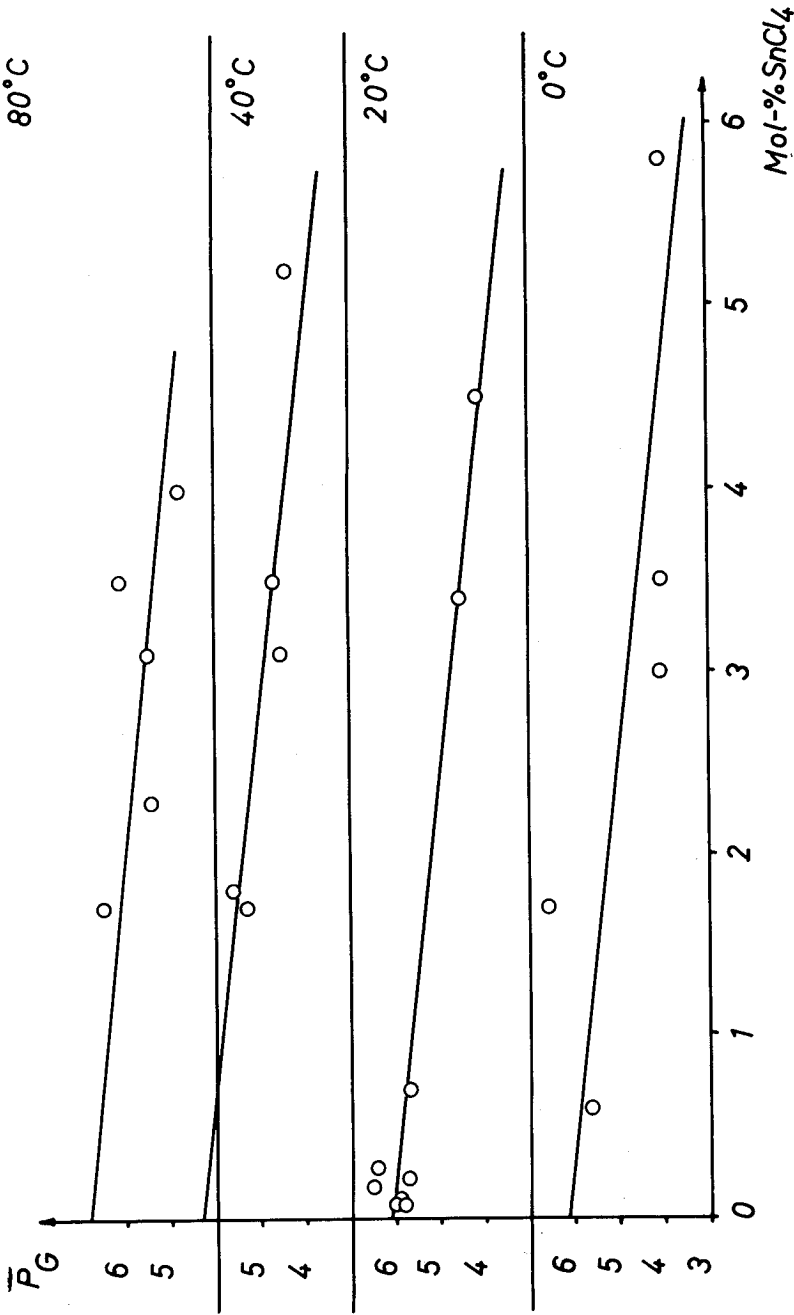


Abbildung 4

Abhängigkeit des Polymerisationsgrades \bar{P}_G des Gesamtkondensates von der Reaktionstemperatur und der Katalysatorkonzentration bei einer Kondensationszeit von 24 Stunden.

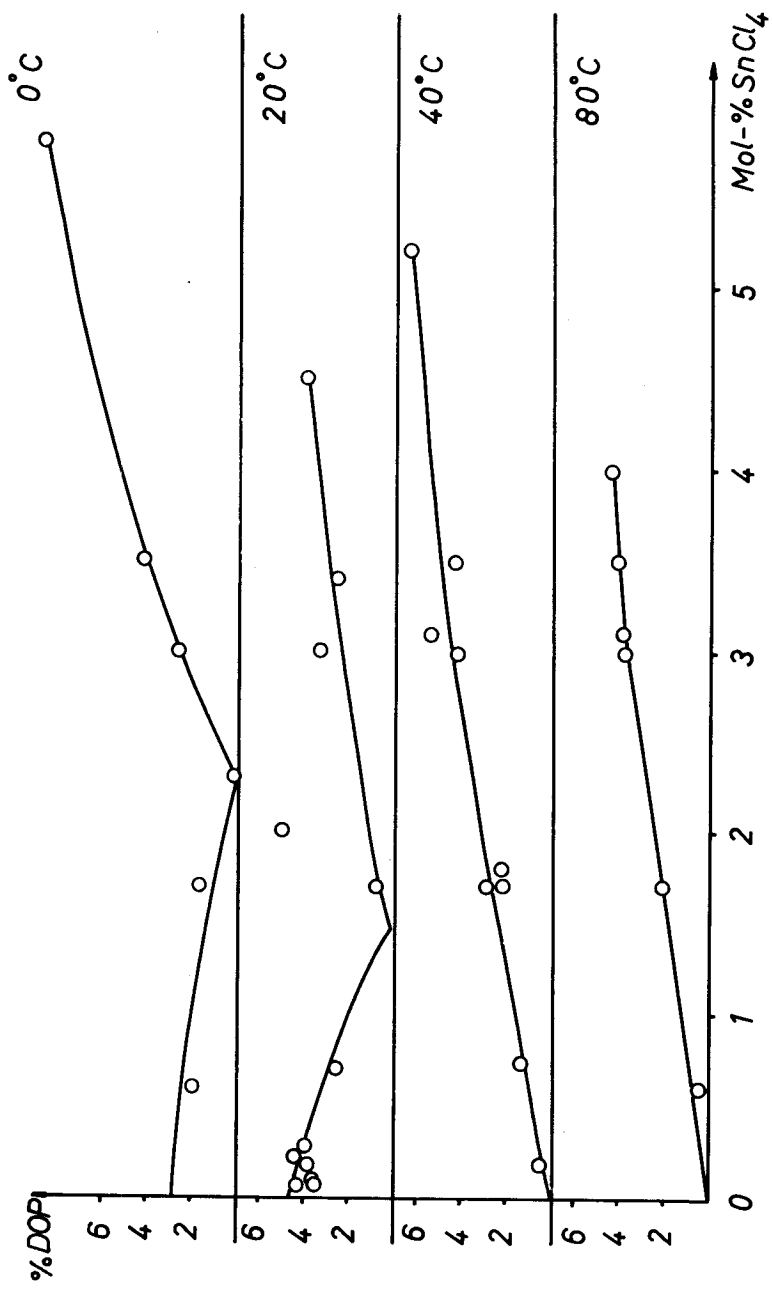


Abbildung 5

Abhängigkeit des 2,5-Dioxopiperazinegehaltes von Katalysatorkonzentration und Temperatur.

an DOP mit zunehmender Katalysatorkonzentration zunächst sinkt und nach einem Minimum von etwa 0 % DOP bei einer Zinntetrachlorid-Konzentration von ca. 2,3 Mol-Prozent wieder mit zunehmender Katalysatorkonzentration ansteigt. Bei einer Kondensationstemperatur von 20° C ist das Minimum der DOP-Produktion zu einer geringeren Katalysatorkonzentration, 1,5 Mol-Prozent, verschoben. Bei noch höheren Kondensationstemperaturen (40 und 80° C) tritt das Minimum nicht mehr auf und der Gehalt an 2,5-Dioxopiperazin steigt mit zunehmender Katalysatorkonzentration an.

4.4 Wasserlöslicher Anteil W

Die Anteile der wasserlöslichen Fraktionen am Gesamtkondensat zusammen mit den in den Abschnitten 4.5 und 4.6 besprochenen Anteilen der eisessiglöslichen und unlöslichen Fraktionen sind in Tabelle 31 zusammengestellt. Die Abhängigkeit der wasserlöslichen Anteile von Katalysatorkonzentration und Temperatur ist in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

Aus den Werten für eine Kondensationstemperatur von 20° C geht hervor, dass bei Abwesenheit von Zinntetrachlorid der Anteil der wasserlöslichen Fraktion am Gesamtkondensat sehr hoch ist und ca. 96 % beträgt. Mit steigenden Katalysatorkonzentrationen sinkt dann der Anteil der wasserlöslichen Fraktion ab, durchläuft bei einer Katalysatorkonzentration von 0,6 Mol-Prozent Zinntetrachlorid ein Minimum von 73 % wasserlöslichen Anteilen und steigt dann linear mit zunehmender Katalysatorkonzentration weiter an. Bei den Kondensationstemperaturen von 0, 40 und 80° C wurden nur die wasserlöslichen Anteile bei Katalysatorkonzentrationen von 1,5 Mol-Prozent und grösser bestimmt. Bei diesen Temperaturen steigt der wasserlösliche Anteil mit der Katalysatorkonzentration an.

Tabelle 31

Fraktionen (in Gewichts-Prozent) des Gesamtkondensates nach 24 Stunden bei Temperaturen von 0°, 20°, 40° und 80° C.

Konz. SnCl ₄	Temperatur °C											
	0			20			40			80		
Mol-%	W	E	R	W	E	R	W	E	R	W	E	R
0				96,3								
0,07				80,7/76,1								
0,10				84,2								
0,18				80,6								
0,22				80,7								
0,27				77,2								
0,60	79,4	10,9	9,7									
0,70				74,3	7,7	18,0						
1,69	72,2	8,7	19,1				65,1	18,0	16,9	62,8	8,0	29,2
1,80							74,1	7,8	18,1			
2,00				72,0								
2,30										71,4	6,8	21,8
3,00	87,3	6,2	6,5									
3,10							84,5	6,5	9,0	75,0	5,6	19,4
3,40				91,6	2,6	5,8						
3,50	89,1	9,5	1,4				81,1	10,9	8,0	80,2	6,6	13,2
4,00							93,6	4,5	1,9	83,0	8,0	9,0
4,50				92,8	5,3	1,9						
5,20							84,3	2,1	13,6			
5,80	81,8	3,5	14,7									

Die Katalysatorabhängigkeit des wasserlöslichen Anteils ist leicht verständlich. Nach den in Abschnitt 3.4.2 wiedergegebenen Versuchen besteht der wasserlösliche Anteil aus dem Monomeren, dessen Hydrochlorid, 2,5-Dioxopiperazin und den Hydrochloriden der niedermolekularen Peptidester. Bei kleinen Katalysatorkonzentrationen muss die Bildungsgeschwindigkeit der Peptide geringer als bei höheren sein. Unter den angewendeten Pseudogleichgewichtsbedingungen muss daher der Anteil an höhermolekularen Peptiden am Gesamtkondensat klein und der wasserlösliche Anteil folglich gross sein. Dafür spricht auch, dass der auf eine Katalysatorkonzentration 0 extrapolierte Anteil wasserlöslicher Substanzen (Ordinatenabschnitt in

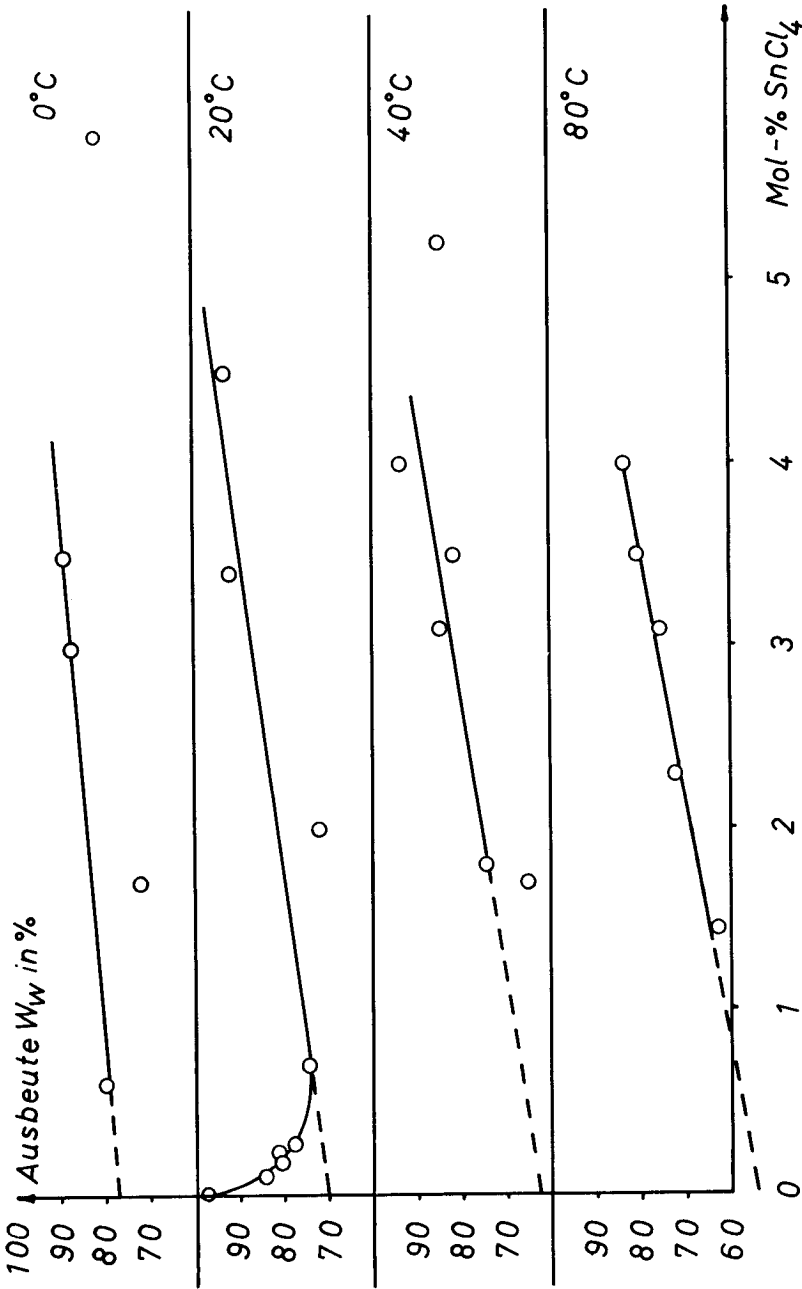


Abbildung 6

Abhängigkeit der wasserlöslichen Anteile W_w von Reaktionstemperatur und Katalysatorkonzentration bei einer Kondensationszeit von 24 Stunden.

Abbildung 6) mit zunehmender Temperatur geringer wird (77 - 70 - 62 - 54 % bei 0 - 20 - 40 - 80° C).

Bei hoher Katalysatorkonzentration tritt dagegen die in Abschnitt 5 diskutierte Reaktion zwischen Zinntetrachlorid bzw. dessen Komplexen und dem aus der Kondensation stammenden Alkohol auf. Der dadurch entstehende Chlorwasserstoff bildet mit dem Glycinester bzw. den Peptidestern Hydrochloride. Diese sind in der Reaktionsmischung unlöslich, fallen aus und sind daher nur schwierig oder nicht mehr zur weiteren Kondensation befähigt.

4.5 Essigsäurelöslicher Anteil E

Nach Abschnitt 3.4.3 besteht der eisessiglösliche Anteil überwiegend aus Peptidestern.

Er nimmt nach Abbildung 7 bei Temperaturen zwischen 0 und 40° C mit zunehmender Katalysatorkonzentration ab. Bei einer Kondensationstemperatur von 80° C ist er dagegen konstant und beträgt über den gesamten Konzentrationsbereich des Katalysators ca. 7 %.

Der Polymerisationsgrad nimmt bei allen Temperaturen mit steigender Katalysatorkonzentration nur langsam zu, zumindest bis zu Katalysatorkonzentrationen von 4,5 Mol-Prozent (Tabelle 30). Ob bei höheren Katalysatorkonzentrationen der Polykondensationsgrad stark ansteigt, muss offen bleiben (vgl. Abbildung 8).

4.6 Wasser- und eisessigunlösliche Fraktion R

Diese Fraktion besteht aus den Peptidestern mit höherem Molekulargewicht. Wie Abbildung 9 zeigt, nimmt der Anteil des Unlöslichen am Gesamtkondensat bei allen Kondensationstemperaturen mit zunehmender Katalysatortemperatur ab. Der Effekt ist also umgekehrt als bei

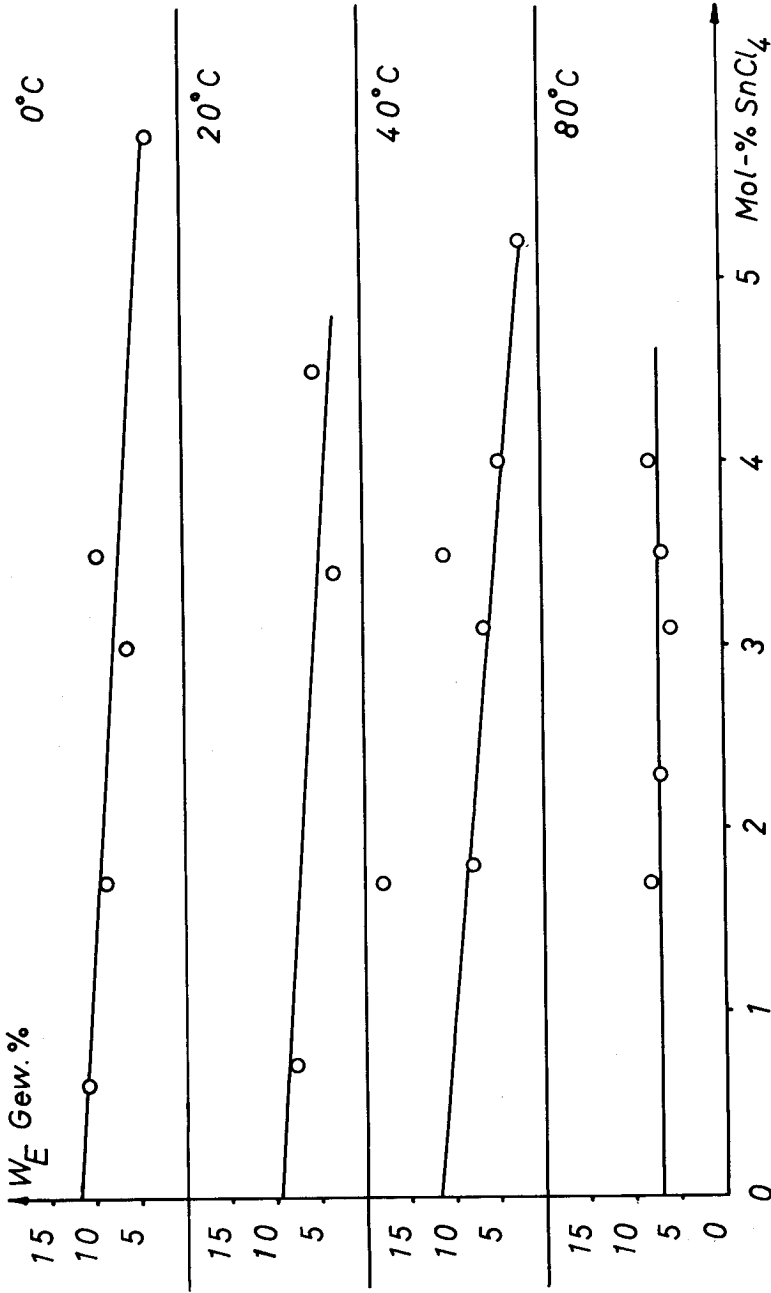


Abbildung 7

Abhängigkeit des Gewichtanteils der eisessiglöslichen Fraktion E von Reaktionstemperatur und Katalysatorkonzentration bei einer Reaktionsdauer von 24 Stunden.

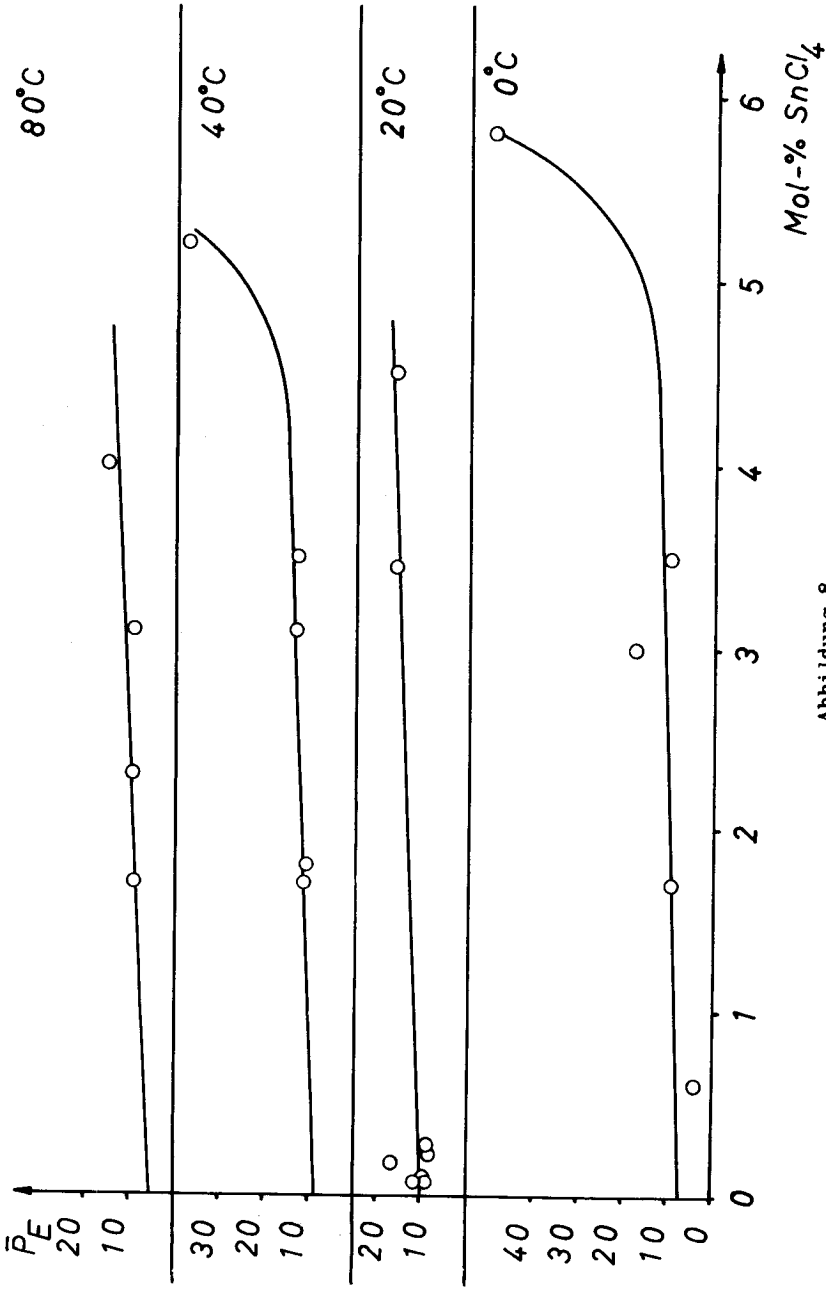


Abbildung 8

Abhängigkeit des Polymerisationsgrades \bar{P}_E der Eisessigfraktion von Katalysatorkonzentration und Reaktionstemperatur bei einer Kondensationszeit von 24 Stunden.

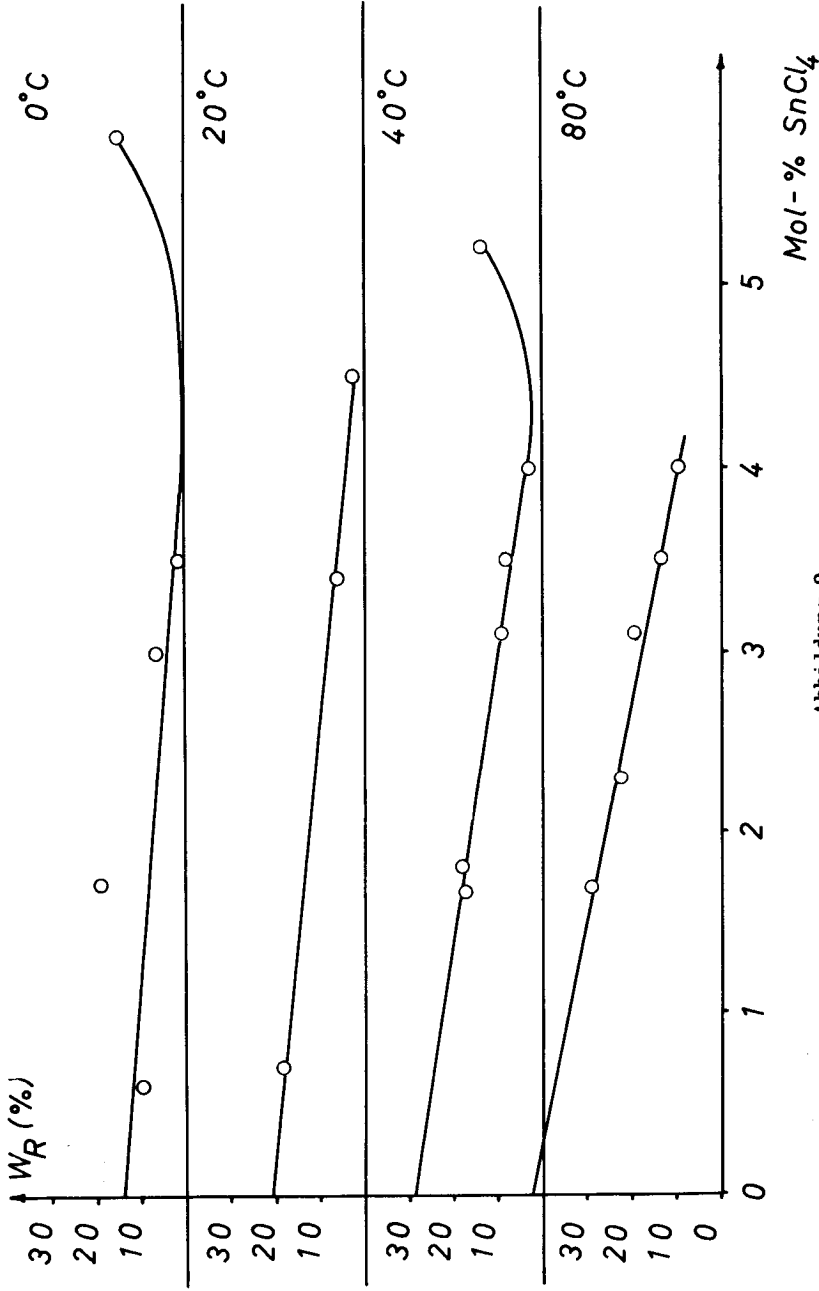


Abbildung 9

Abhängigkeit der Ausbeute der wasser- und eisessigunlöslichen Fraktion R von Katalysatorkonzentration und Reaktionstemperatur bei einer Versuchszeit von 24 Stunden.

den wasserlöslichen Anteilen. Mit zunehmender Temperatur steigt jedoch der Anteil an der unlöslichen Fraktion. Für die Bildung von Polypeptiden sind also höhere Temperaturen vorteilhafter.

Die Polymerisationsgrade liegen zwischen 10 und 40. Die Abhängigkeit der Polymerisationsgrade von Katalysatorkonzentration und Temperatur (Abbildung 10) ist nicht eindeutig. Es hat den Anschein, als ob bei jeder Temperatur bei einer bestimmten Katalysatorkonzentration ein Minimum des Polymerisationsgrades existiert, das jedoch nicht mit dem Minimum der Ausbeute zusammenfällt.

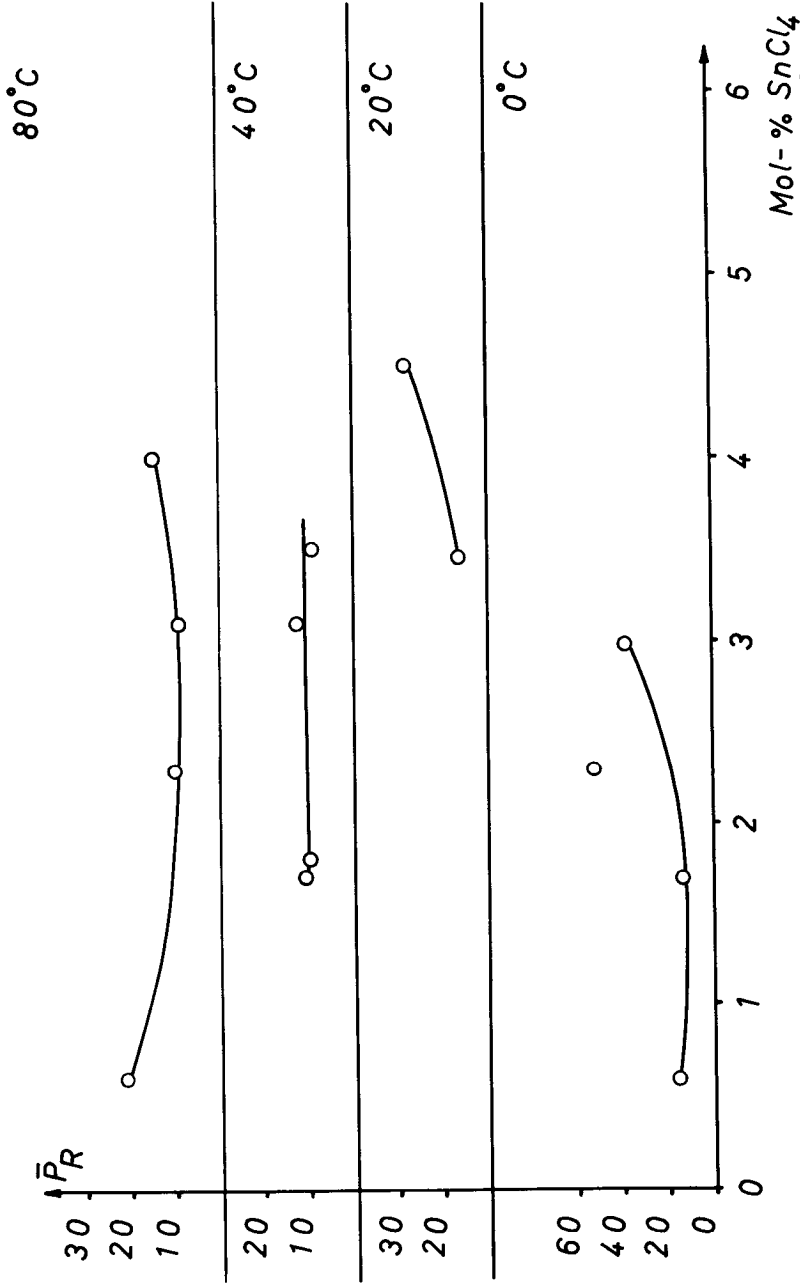


Abbildung 10

Abhängigkeit des Polymerisationsgrades \bar{P} des wasser- und eisessigunlöslichen Rückstandes R von Katalysatorkonzentration und Reaktionstemperatur bei einer Versuchszeit von 24 Stunden.

5 VERBINDUNGEN MIT
ZINNTETRACHLORID

Die katalytische Wirksamkeit des Zinntetrachlorides bei der Kondensation von Glycinäthylester und anderen α -Aminocarbonsäureestern dürfte in erster Linie darauf beruhen, dass Zinntetrachlorid und Monomer eine unter den Versuchsbedingungen (Ueberschuss an Monomer) instabile Zwischenverbindung eingehen. Derartige Verbindungen des Zinns können auch bei anderen Reaktionsteilnehmern vermutet werden. Die Aufklärung der Struktur der Zwischenverbindungen versprach, Anhaltspunkte für den Reaktionsmechanismus zu liefern.

5.1 Zinntetrachlorid und Glycinäthylester

Glycinäthylester bildet in benzolischer Lösung mit Zinntetrachlorid eine Verbindung vom Typ $\text{SnCl}_4 \cdot 2 \text{H-Gly-OC}_2\text{H}_5$ (20). Das Produkt soll eine gelbliche, glasartige Masse darstellen, die sich schon unter der Mutterlauge beim Stehen trübt, "zweifellos unter Mithilfe von Wasserdampf". Aus der glasartigen Masse sollen Kristalle von Glycinäthylesterhydrochlorid herauswachsen, "wodurch nach und nach alles zu einem weissen Pulver zerfällt".

Diese Angaben lassen drei Punkte offen. Einmal ist unklar, ob sich die Verbindung auch unter trockenem Benzol bildet, sodann, ob sie auch unter trockenem Benzol zerfällt und schliesslich, welche funktionelle Gruppe mit dem Zinntetrachlorid reagiert.

Die Nacharbeitung ergab für feuchtes Benzol die gleichen Verhältnisse, wie sie von Fichter und Reichart (20) angegeben worden waren. Beim Arbeiten im trockenen Benzol bildete sich jedoch keine "glasartige Masse", sondern ein homogenes weisses Pulver, dessen Zinnanalyse auf eine Verbindung $\text{SnCl}_4 \cdot 2 \text{H-Gly-OC}_2\text{H}_5$ hinweist.

Das Infrarot-Spektrum (Tabelle 32) gestattete die Zuordnung der Signale und gab damit Aufschlüsse über den Bau des Komplexes. Aus der Tabelle geht hervor, dass die beim Glycinäthylester auftretenden Vibrations- und Beugeschwingungen der NH_2 -Gruppe bei den Reaktionsprodukten aus Zinntetrachlorid und Glycinäthylester sowohl im trockenen als auch im feuchten Benzol verschwinden (1120 cm^{-1}). Die symmetrische Streckschwingung im Skelett (862 cm^{-1}) bleibt aber bestehen. Für die Signale der Estergruppe (1743 cm^{-1}) sind dagegen keine derartigen starken Effekte nachweisbar. An der Aminogruppe muss daher eine Reaktion mit sehr schweren Substituenten eingetreten sein. Die deutliche Verstärkung der CH_2 -Banden bei $2920/2850 \text{ cm}^{-1}$ lässt sich ebenfalls verstehen, da einmal die Zahl der CH_2 -Gruppen im Molekül gegenüber dem reinen Glycinäthylester um 100 % zugenommen hat und zum anderen der Einfluss der Aminogruppen vermindert wurde. Der Komplex wird daher wahrscheinlich die in Abbildung 11 dargestellte Struktur aufweisen.

Die papierchromatographische Untersuchung des Komplexes im Laufmittel I ergab Aufschlüsse über dessen Reaktionsfähigkeit (Tabelle 33). Bei der Deutung ist zu beachten, dass das Laufmittel aus Butanol, Eisessig und Wasser besteht.

Bringt man das in trockenem Benzol hergestellte Reaktionsprodukt sofort in das Laufmittel, so erscheinen ein Fleck auf der Startlinie ($R_f = 0$) und vier weitere Flecken mit den R_f -Werten 0,14, 0,22, 0,31 und 0,42. Von diesen Flecken lässt sich derjenige mit 0,42 eindeutig dem Glycinhydrochlorid bzw. dem Diglycinhydrochlorid zuordnen. Der Flecken mit $R_f = 0,14$ könnte dem Glycin (Eichwert 0,17) zuzuordnen sein, eventuell aber auch dem Diglycin oder dem Triglycinäthylester (je 0,18). Sicher abwesend ist dagegen der Flecken für das Glycinäthylesterhydrochlorid (0,39). Von den vier möglichen Derivaten mit dem Diglycinrest könnte eventuell das Diglycin anwesend sein (vgl. vorhergehenden Abschnitt) und das Diglycinhydrochlorid. Vorhanden sind ferner die Flecken für den Diglycinester

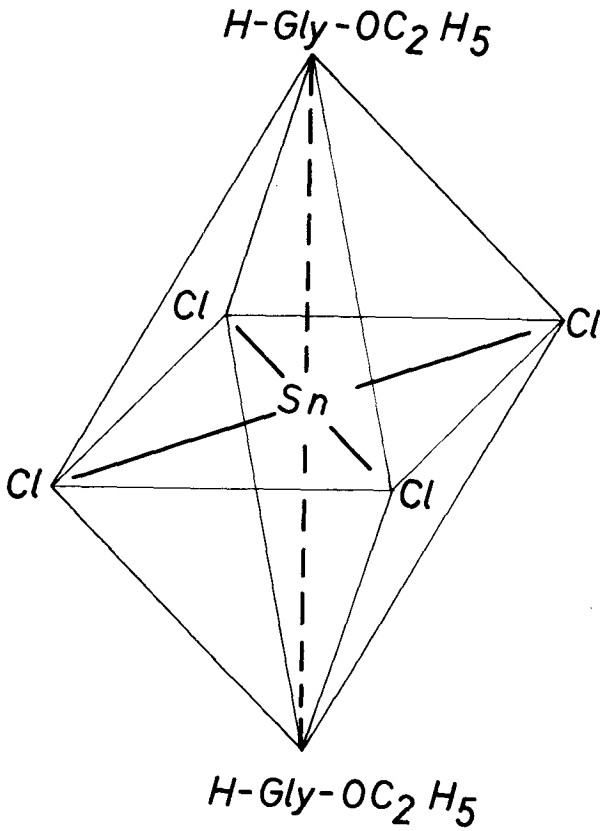


Abbildung 11
Struktur des $\text{SnCl}_4 \cdot 2 \text{H-Gly-OC}_2\text{H}_5$ -Komplexes

Tabelle 32

Auftreten und Zuordnung der Infrarotbanden beim Reaktionsprodukt aus Zinntetrachlorid und Glycinäthylester.

H-Gly-OC ₂ H ₅	Reaktion in abs. Benzol	Reaktion in feucht. Benzol	Zuordnung
3400 m	-	-	NH-stretch
-	3180 s	3200 - 2800 verschmiert	
2990 m	2920 st		CH ₂
2940 s	2850 m		
1743 st	1737 m	1740 m	Ester C=O
1620 s	-	-	NH
1377 s	1381 m	1380 ss	CH ₂
1352 s	1356 ss	1357 s	
1210 st	1237 s 1213 st	1250 - 15	Ester
1120 s	-	-	-NH ₂ rock
1026 st	1067 ss	1036 s	C-C-N ass.stretch
862 m	862 ss	860 m	C-C-N sym.stretch

Legende: st = starke Absorption
m = mittlere Absorption
s = schwache Absorption
ss = sehr schwache Absorption

(0,22) und das Diglycinesterhydrochlorid (0,31). Die übrigen Flecken entsprechen höhermolekularen Produkten.

Die aus Zinntetrachlorid mit Glycinäthylester bei der Umsetzung in trockenem Benzol erhaltene Reaktionsmasse muss also in Kontakt mit dem Laufmittel, d.h. mit dem darin enthaltenen Wasser, sich unter Bildung von Glycin, Glycinhydrochlorid und weiteren Produkten zersetzen, wobei Kondensationen der Glycinderivate auftreten können. Bringt man dagegen Glycinäthylester und Laufmittel zusammen, so findet man neben dem unveränderten Monomeren nur 2,5-Dioxopiperazin.

Tabelle 33

Verhalten des Reaktionsproduktes aus Zinntetrachlorid und Glycin-
äthylester.

Zuordnung: a = vergl. Text

b = $\text{H-(Gly)-OH}\cdot\text{HCl}$ / $\text{H-(Gly)}_2\text{-OH}\cdot\text{HCl}$

c = $\text{H-(Gly)-OC}_2\text{H}_5\cdot\text{HCl}$

d = $\text{H-(Gly)}_2\text{-OC}_2\text{H}_5\cdot\text{HCl}$ / $\text{H-(Gly)}_3\text{-OC}_2\text{H}_5\cdot\text{HCl}$

e = $\text{H-(Gly)}_2\text{-OC}_2\text{H}_5$

f = $\text{H-(Gly)}_3\text{-OC}_2\text{H}_5$ / H-(Gly)-OH / $\text{H-(Gly)}_2\text{-OH}$

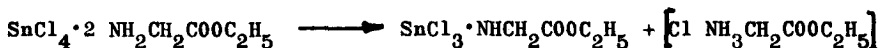
g = höhere Glieder

Probe	100.R _f						
	a	b	c	d	e	f	g
<u>trockenes Benzol</u>							
Reaktionsprodukt	-	42	-	31	22	14	0
Reaktionsprodukt 6 Stunden in Benzol gelagert	51	-	39	-	-	-	-
Reaktionsprodukt in HCOOH gelöst	50	-	38	-	-	-	-
<u>feuchtes Benzol</u>							
Reaktionsprodukt	-	42	-	-	-	-	-
Reaktionsprodukt in HCOOH gelöst	53	-	38	-	-	-	-

Lässt man aber den Glycinester sechs Stunden unter dem Laufmittel stehen, so bilden sich Glycin, Glycin-Hydrochlorid, Glycinäthylester und weitere Reaktionsprodukte.

Durch die Komplexbildung ist also die Estergruppe des Glycin-äthylesters stark aktiviert und daher leicht zur Verseifung und Amidbildung anzuregen. Auf eine solche Verseifung deutet auch das Papierchromatogramm der in feuchtem Benzol hergestellten Reaktionsmasse. Hier wird nur ein einziger Fleck mit $R_f = 0,42$ gefunden, der den Hydrochloriden von Glycin oder Diglycin zugeordnet werden kann.

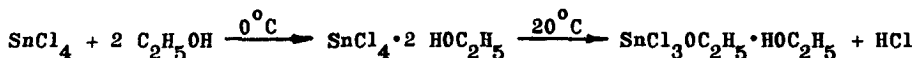
Suspendiert man dagegen das Reaktionsprodukt in reiner Ameisensäure, so treten unabhängig von der Herstellung in trockenem oder feuchtem Benzol stets zwei Flecken mit gleichen R_f -Werten auf. Einer davon entspricht dem Glycinäthylesterhydrochlorid. Dieses kann nur nach



entstanden sein, wobei die Möglichkeit weiterer Substitution und Bildung polynuklearer Komplexe offenbleiben muss. Der zweite Fleck wird daher einer Substitutionsverbindung des Zinntetrachlorides, möglicherweise dessen Additionsverbindung mit HCOOH , zuzuordnen sein. Interessanterweise treten die gleichen beiden Flecken im Papierchromatogramm auch dann auf, wenn man das in trockenem Benzol hergestellte Reaktionsprodukt 6 Stunden sich selbst überlässt. Die den höheren Oligomeren des Glycins bzw. deren Derivaten entsprechenden Flecken sind jedoch bei einer 6 Stunden alten Reaktionsmasse verschwunden.

5.2 Zinntetrachlorid und Aethanol

Bei der Kondensation des Glycinäthylesters wird Aethanol frei. Der Alkohol kann nach Pfeiffer (39,40) bei Temperaturen um 0°C ein Additionsprodukt bilden, während bereits bei 20°C eine Substitution des Zinntetrachlorids eintritt:

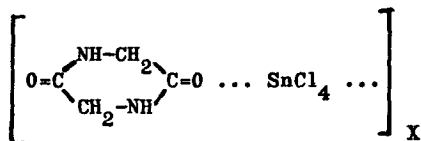


Es muss zunächst offenbleiben, ob und in welchem Ausmass das Additionsprodukt bzw. das Substitutionsprodukt die Kondensation zu beschleunigen vermag (vgl. Abschnitt 6). Der bei der Substitution frei werdende Chlorwasserstoff wird sofort mit dem Glycinäthylester bzw. den Peptidestern die entsprechenden Hydrochloride bilden.

5.3 Zinntetrachlorid und 2,5-Dioxopiperazin

Es ist bereits seit langem bekannt, dass Amide mit Zinntetrachlorid Komplexe bilden können (41,42). Die Struktur dieser Komplexe blieb jedoch offen. Im Prinzip kann die Anlagerung des Zinntetrachlorids entweder an die NH- oder an die CO-Gruppe stattfinden. Beim Harnstoff folgt aus infrarotspektroskopischen Versuchen, dass die Anlagerung des Zinntetrachlorids an der CO-Gruppe, die des Zinntetrabromids dagegen an der NH-Gruppe erfolgt (46). Beiden Harnstoffkomplexen kommt jedoch die Formulierung $\text{SnX}_4 \cdot 2 (\text{NH}_2)_2\text{CO}$ zu.

Die Komplexe von Zinntetrachlorid und 2,5-Dioxopiperazin wurden in unserem Laboratorium von F. Wachter untersucht (47). Nach seinen Messungen bildet sich ein Komplex, bei dem auf ein Molekül Zinntetrachlorid ein Molekül Dioxopiperazin entfällt. Es muss offenbleiben, ob dies ein 1:1 Komplex ist oder ein kettenartiger Komplex, der schematisch etwa



formuliert werden könnte. Die Koordination erfolgt nach den IR-Messungen eindeutig über den Carbonylsauerstoff.

6 DISKUSSION

Den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit bildete das Problem, ob durch eine katalysierte Kondensation von α -Aminocarbonsäureestern Oligo- und Polypeptide in vergleichsweise hohen Ausbeuten bei verhältnismässig niedrigen Reaktionstemperaturen synthetisiert werden können, ohne dass gleichzeitig grössere Mengen an Nebenprodukten durch Cyclisierungs- oder Fragmentierungs-Reaktionen auftreten. Die in dieser Arbeit erhaltenen Befunde werden im Abschnitt 6.1 diskutiert. Die im Abschnitt 6.2 behandelte Frage nach dem wahrscheinlichen Reaktionsablauf erlaubt schliesslich Hinweise auf verbesserte Synthesen (Abschnitt 6.3).

6.1 Ausbeute und Polymerisationsgrad

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit können eine ganze Reihe Katalysatoren mit Erfolg zur Kondensation von α -Aminocarbonsäureestern auch bei niedrigen Temperaturen (untersuchter Bereich 0 - 80° C) eingesetzt werden. Die genauer untersuchte Kondensation von Glycinäthylester mit Zinntetrachlorid als Katalysator ergab dabei, dass die Ausbeute an Gesamtkondensat auch bei sehr niedrigen Katalysatorkonzentrationen praktisch unabhängig von der Kondensationstemperatur bei etwa 50 % liegt. Die Ausbeute ist verglichen mit den thermischen Kondensationen, bei denen Werte von 80 % bei 130° C nach 200 Stunden angegeben werden, als gut zu bezeichnen. In der gleichen Grössenordnung (35 %) liegen übrigens auch die nach Abschluss dieser Arbeit berichteten Ausbeuten bei der Kondensation mit Hilfe von Aluminiumisopropylat (48), bei der allerdings die Kondensationstemperaturen zwischen 100 und 160° C und damit viel höher lagen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen der letztgenannten

Arbeit und den hier berichteten besteht übrigens darin, dass durch die hier verwendeten Kondensationsbedingungen der nicht zu Kondensaten umgesetzte Anteil praktisch nur aus dem nicht umgesetzten Glycinäthylester besteht. Unter den Bedingungen der Kondensation mit Aluminiumisopropylat entstehen dagegen noch schwürzliche Massen, die somit in der Bilanz als Totalverlust erscheinen.

Der Polymerisationsgrad des Gesamtkondensates ist allerdings nicht sehr hoch. Er bewegt sich bei kleinen Katalysatorkonzentrationen zwischen etwa 6 und 7 und nimmt mit zunehmender Katalysatorkonzentration ab. Bei einer Katalysatorkonzentration von 5 Mol-Prozent Zinntetrachlorid beträgt er etwa 4.

Wichtiger als die Abhängigkeit von Ausbeute und Polymerisationsgrad des Gesamtkondensates von Katalysatorkonzentration und Temperatur sind jedoch Ausbeute und Polymerisationsgrad der Fraktion R. Während nämlich das Gesamtkondensat noch den Grossteil der Oligomeren sowie die relativ kleine Menge an 2,5-Dioxopiperazin enthält, besteht die Fraktion R nur noch aus den verhältnismässig hochmolekularen Anteilen. Ihre Ausbeute ist aber bei kleinen Katalysatorkonzentrationen bei tiefen Temperaturen recht gering. Bei einer Kondensationstemperatur von 0° C wird z.B. bei einer Katalysatorkonzentration von 0,5 Mol-Prozent Zinntetrachlorid nur eine Ausbeute an der Fraktion R von etwa 10 % gefunden. Im Gegensatz zur Ausbeute an Gesamtkondensat, die etwa unabhängig von der Kondensationstemperatur ist, steigt jedoch die Ausbeute an der Fraktion R mit der Temperatur stark an und erreicht bei der gleichen Katalysatorkonzentration von 0,5 Mol-Prozent bei 80° C bereits fast 40 %. Die Ausbeute an niedrigen Oligomeren geht also mit steigender Temperatur stark zurück. Da sich bei vergleichbarer Katalysatorkonzentration die Ausbeute an 2,5-Dioxopiperazin bei den verschiedenen Temperaturen praktisch nicht ändert, nehmen also die Anteile an den niedrigmolekularen Oligomeren (den wasser- und essigsäurelöslichen Fraktionen) mit zunehmender Temperatur stark ab.

Diese Untersuchungen wurden jedoch unter Pseudogleichgewichtsbedingungen durchgeführt. Geht man zu kürzeren Reaktionszeiten über, so können die Ausbeuten an Gesamtkondensat über 90 % betragen. Das Durchlaufen eines zeitlichen Maximums der Gesamtausbeute ist zweifellos auf die einsetzende Aethanolyse zurückzuführen, wie das Verschwinden der höheren Peptidester mit zunehmender Reaktionszeit zeigt (vgl. Tabelle 4). In welchem Ausmass sich dadurch der Kondensationsgrad mit der Zeit ändert, muss vorläufig offenbleiben.

Bemerkenswert ist schliesslich der ausserordentlich geringe Anteil an 2,5-Dioxopiperazin. Während für die thermischen Kondensationen sehr hohe bis vollständige Umsätze des Glycinesters zu DOP berichtet werden, liegen bei den hier berichteten Versuchen die Anteile an DOP am Gesamtkondensat nie über ca. 5 - 6 %. Es muss jedoch ausdrücklich betont werden, dass diese Aussage nur für die bei einer Reaktionszeit von 24 Stunden erhaltenen Produkte gilt. Der niedrige Gehalt der Gesamtkondensate an DOP ist umso beachtenswerter, als nach Brockmann und Musso (29) die Anwesenheit hydroxylgruppenhaltiger Lösungsmittel die Bildung von DOP fördern soll. Da bei der Kondensation von Glycinäthylester Aethanol frei wird und im System bleibt, hätte man eventuell eine hohe Ausbeute an DOP erwarten können.

6.2 Reaktionsablauf

Als Reaktionsprodukte treten bei der mit Zinntetrachlorid katalysierten Kondensation neben den Peptidestern noch deren Hydrochloride sowie 2,5-Dioxopiperazin auf. Damit erhebt sich die Frage, ob die Hydrochloride und das DOP einfache Nebenprodukte der Reaktion sind oder ob sie aber in das Reaktionsgeschehen eingreifen. Zur Lösung dieses Problems ist entscheidend, ob und mit welcher Geschwindigkeit DOP und Hydrochloride von der eigentlich katalytisch wirkenden Substanz angegriffen werden.

Zinntetrachlorid bildet nun mit Glycinäthylester einen Komplex. Unter den Reaktionsbedingungen (Ueberschuss an Glycinäthylester) ist zu erwarten, dass der grösste Teil des Zinntetrachlorides, wenn nicht alles, als Komplex vorliegt. Die Reaktion wird daher vermutlich über diesen Komplex ablaufen. Dass dieser Komplex der eigentliche Katalysator ist, lässt sich leicht wie folgt zeigen:

Fügt man zu Glycinäthylester bei 20° C 1 Mol-Prozent des Komplexes ($\text{SnCl}_4 \cdot 2 \text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$), so beobachtet man bereits nach einer Stunde ein dickes Gel. Wie Tabelle 34 zeigt, ist nach papierchromatographischen Untersuchungen bereits nach 60 Minuten kein freier Glycinäthylester mehr nachweisbar. Im gleichen Zeitraum entstehen auch die Dimeren und Trimeren des Glycins, während das Tetramer erst nach 120 Minuten nachweisbar ist.

Tabelle 34

R_f -Werte der ninhydrinpositiven Flecken bei der Kondensation mit dem Zinntetrachlorid-Komplex.

$R_f \cdot 100$ bei einer Kondensationszeit von Minuten				Zuordnung (Eichwerte in Klammern)	
30	60	120	240		
-	-	10	10	H-(Gly) ₄ -OEt	(9)
18	17	17	17	H-(Gly) ₃ -OEt	(18)
-	21	21	21	H-(Gly) ₂ -OEt	(21)
27	-	-	-	H-(Gly)-OEt	(25)
-	31	31	31	H-(Gly) ₂₋₃ -OEt·HCl	(31)
38	36	36	37	H-(Gly)-OEt·HCl	(39)
47	-	-	-	?	
66	-	-	-	?	

Bei der Verwendung von Zinntetrachlorid anstelle des Komplexes entsteht dagegen nicht ein dickes Gel, sondern nur eine gelbliche Flüssigkeit (Tabelle 3). Da sich nun aber der Komplex aus Zinntetrachlorid und Glycinäthylester beim Zusammengeben in Benzol praktisch

sofort bildet, muss beim Zusammengeben der beiden Komponenten im Ueberschuss Glycinäthylester ein Komplex anderer Bauart als in Benzol entstehen, der sich nur langsam in den eigentlich katalytisch wirkenden Komplex umlagert. Welcher Art diese beiden Komplexe sind, muss zunächst offenbleiben.

Zinntetrachlorid kann aber auch mit Aethanol reagieren, wobei nach Pfeiffer bei Temperaturen über 20° C eine Substitution eintritt. Setzt man diesen Komplex in einer Menge von 1 Mol-Prozent dem Glycinäthylester zu, so beobachtet man, dass sich der Komplex im Monomeren nicht löst. Entsprechend liegt nach einer Stunde Reaktionszeit immer noch eine klare Flüssigkeit vor. Die R_f -Werte ändern sich in der Zeit von 30 Minuten bis 2 Stunden nicht und betragen 0,25 (Glycinäthylester), 0,38 (Glycinäthylesterhydrochlorid) und 0,44 (?). Verbindungen des Zinntetrachlorids mit Alkohol sind daher nicht katalytisch wirksam. Ob und in welchem Umfang Zinnkomplexe aus drei Komponenten (Zinntetrachlorid, Glycinäthylester und Aethanol) wirksam sind, muss offenbleiben.

Bei der Umlagerung des Zinntetrachlorid-Glycinäthylester-Additionskomplexes in einen etwaigen Substitutionskomplex und bei der entsprechenden Umlagerung des Zinntetrachlorid-Aethanol-Komplexes wird in beiden Fällen Chlorwasserstoff frei. Die Salzsäure wird aber sofort mit den im Ueberschuss vorliegenden Aminendgruppen die entsprechenden Hydrochloride bilden. Im Prinzip können die Hydrochloride in die Kondensation eingreifen und sie beschleunigen.

Es wurden daher bei 80° C die Kondensationsgeschwindigkeiten bei Zusatz von 1 Mol-Prozent Zinntetrachlorid, 0,5 Mol-Prozent Glycinäthylester-Hydrochlorid und ohne Zusatz verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 zusammengestellt und in Abbildung 12 graphisch aufgetragen. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Gesamtausbeute bei der mit Zinntetrachlorid katalysierten Kondensation in den ersten 40 Minuten stark bis auf etwa 50 % ansteigt. In der gleichen Zeit beträgt aber der Umsatz bei den Kondensationen mit Zusatz von Glycin-

äthylester-Hydrochlorid bzw. ohne Zusatz nur je 3 - 4 %. Die Hydrochloride sind daher nicht als die eigentlichen Katalysatoren zu betrachten.

Tabelle 35

Ausbeute und Gehalt an 2,5-Dioxopiperazin (DOP) als Funktion der Zeit bei 80° C ohne sowie mit Zusatz von 0,5 Mol-Prozent Glycinäthylester-Hydrochlorid bzw. 1 Mol-Prozent Zinntetrachlorid.

Zeit (min)	Ausbeute (%)			Gehalt an DOP (%)		
	ohne Zusatz	+Hydro- chlorid	+SnCl ₄	ohne Zusatz	+Hydro- chlorid	+SnCl ₄
10		1,4			17,3	
15	1,25		41,2	7,3		3,7
20		1,9			8,4	
30	3,3	2,3/1,9	47,7	7,8	1,7/1,6	4,8
60	7,3	3,8/2,6	49,6	2,9	0,9/0,4	2,3
120	10,5	4,6/5,0	53,6	2,7	0,4/0,5	2,4
240	12,2	13,8/11,2	57,7	2,5	1,0/0,3	1,8
345			63,1			2,2
435				2,5		
510		55,5			0,54	
720		59,5			0,42	
1080		62,5			0,72	
1140		61,6			1,2	
1440	44,7	64,7	60,1	2,4		0,3

2,5-Dioxopiperazin kann durch eine Parallel- oder eine Folge-reaktion entstehen:

Parallelreaktion



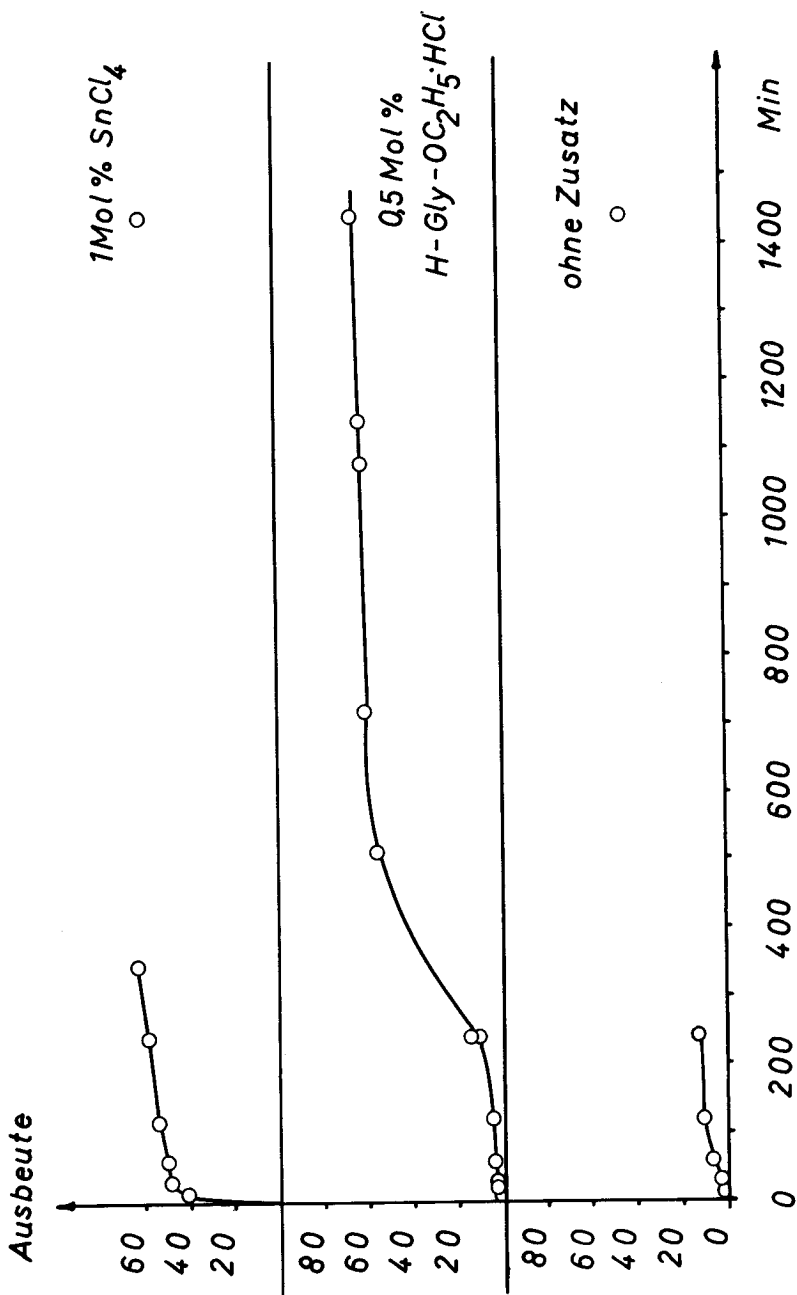
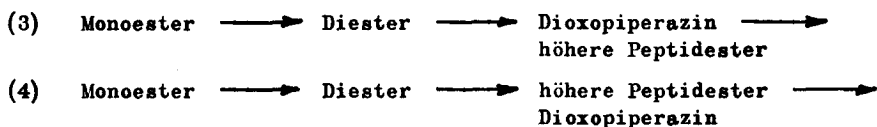


Abbildung 12
Zeitabhängigkeit der Kondensatausbeute bei verschiedenen Zusätzen
bei 80° C.

Folgereaktion



Von diesen Reaktionsfolgen erscheint die unter Gleichung (4) unwahrscheinlich, weil sie eine Depolymerisation voraussetzt. Eine derartige Reaktion ist aber bei der Unlöslichkeit der höheren Peptidester und bei den niedrigen Kondensationstemperaturen unwahrscheinlich.

Möglich erscheint dagegen eine Polymerisation des 2,5-Dioxopiperazins. Nach Meggy (57) kann DOP bei Temperaturen zwischen 60 und 180° C unter Zusatz von Wasser zu Polyglycin umgesetzt werden. Bei 40° C wurde jedoch auch nach 2 Jahren keine Spur Polymer gefunden. Die Polyreaktion wurde durch Zusatz von Diglycin beschleunigt. Für die Bildung von Polyglycin ist nach Meggy die Anwesenheit festen Glycins erforderlich. Es wurde daher geprüft, ob unter den Reaktionsbedingungen dieser Arbeit 2,5-Dioxopiperazin polymerisiert werden kann.

Versetzt man 0,4 ‰ - 2 ‰ige Lösungen von 2,5-Dioxopiperazin in Benzol oder m-Kresol bei 20° C mit 1 - 4 Mol-Prozent Zinntetrachlorid, so beobachtet man visuell keine Reaktion. Zinntetrachlorid bewirkt also keine katalytische Polymerisation des DOP.

Damit ist jedoch noch nicht ausgeschlossen, dass das DOP unter den Reaktionsbedingungen zu linearen Peptiden umgesetzt wird. Nach Abbildung 5 ist die DOP-Bildung praktisch null, wenn man die Kondensation des Glycinäthylesters unter Zusatz von 2,1 Mol-Prozent Zinntetrachlorid bei 0° C 24 Stunden durchführt. Setzt man jedoch einem derartigen Ansatz zu Beginn 20 Mol-Prozent DOP (bezogen auf den Glycinäthylester) zu, so werden nach 24 Stunden nur noch 8,2 ‰ DOP wiedergefunden. Unter den Kondensationsbedingungen wird also DOP angegriffen, sei es unter Reaktion zu höheren Peptiden, sei es unter Äthanololyse zu Glycin- und Diglycinäthylester. Dass dabei eine Poly-

reaktion auftreten muss, zeigt jedoch folgender Versuch:

Eine gesättigte Lösung von 10 g (90 mMol) DOP in 500 ml Kresol wurden mit 1 g (3,8 mMol) Zinntetrachlorid und 1,8 g Glycinäthylester (3,8 mMol) bei 20° C kondensiert und nach 1, 2 und 3 Stunden Proben entnommen und papierchromatographisch untersucht. Sämtliche Proben zeigten sehr viele, schwer auszählbare Flecken.

Um weitere Aufschlüsse über die Rolle des DOP zu erhalten, wurde die Bildung des DOP bei einer Kondensationstemperatur von 80° C bei Zusatz von 1 Mol-Prozent Zinntetrachlorid, 0,5 Mol-Prozent Glycinäthylesterhydrochlorid bzw. ohne Zusatz verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 36 zusammengestellt und in Abbildung 13 aufgetragen.

Man entnimmt der Abbildung, dass bei allen drei Versuchen die Ausbeute an DOP durch ein zeitliches Maximum läuft. Sowohl beim Versuch ohne Zusatz als auch bei dem mit Zusatz von Zinntetrachlorid wird dieses Maximum bei etwa 30 Minuten durchlaufen. Beim Versuch ohne Zusatz ist aber zu diesem Zeitpunkt die Ausbeute an DOP mit 7,5 %*) deutlich höher als die beim Versuch mit Zinntetrachlorid von ca. 5 %. Das Zinntetrachlorid muss also auf der Diester-Stufe die Reaktion zum Trimeren gegenüber der Cyclisierung begünstigen.

Setzt man jedoch Glycinäthylesterhydrochlorid zu, so wird erstens das zeitliche Maximum der DOP-Bildung zu kleineren Zeiten (10 Minuten gegenüber 30 Minuten) und zweitens die DOP-Ausbeute zu grösseren Werten (17,5 gegen 5 - 7,5 %) verschoben. Das Hydrochlorid scheint damit verantwortlich für die DOP-Bildung zu sein.

Damit ergibt sich folgendes Bild für den Reaktionsablauf. Sofort nach Zugabe von Zinntetrachlorid zum Glycinäthylester bildet

*) Die niedrige DOP-Ausbeute steht im Gegensatz zu den Befunden von Anderson und Callahan (15), nach denen aus Glycinäthylester bei viertägigem Stehenlassen bei 20° C zu 100 % DOP, bei -20° C zu 35 % DOP entstehen soll. Da somit die Bildungsgeschwindigkeit des DOP mit der Temperatur zunimmt, wäre für die in dieser Arbeit bei 80° C durchgeführten Versuche schon nach einem Tag ein 100 %iger Umsatz zum DOP zu erwarten. Möglicherweise ist die von Anderson und Callahan angegebene relativ grosse Bildungsgeschwindigkeit des DOP durch eine nicht genügende Reinheit ihres Glycinesters bedingt.

Tabelle 36

Anteile der wasser- und eisessigunlöslichen Fraktion R als Funktion der Zeit bei 80° C bei verschiedenen Zusätzen zum Glycinäthylester.

Zeit (min)	Anteil in %		
	ohne Zusatz	+ 0,5 Mol-Prozent H-Gly-OC ₂ H ₅ ·HCl	+ 1 Mol-Prozent SnCl ₄
15	18,6		44,0
30			39,8
60			55,7
120	20,8		
240	18,7	44,1	49,6
345			48,7
360		50,5	
720		53,8	
1080		48,2	
1140		44,9	
1440	39,1	37,7	

sich ein Komplex aus diesen beiden Verbindungen. In diesem Komplex liegt der Glycinäthylester aktiviert vor und ist daher besonders befähigt, mit einem weiteren Molekül Glycinäthylester zum Dimeren zu reagieren. Durch die Gegenwart dieses Komplexes wird aber auch die Weiterkondensation des Dimeren zum Trimeren gegenüber der Cyclisierung begünstigt. Sie wird aber nicht völlig ausgeschlossen. Das entstandene DOP wird seinerseits durch den Komplex in Gegenwart des Glycinäthylesters bzw. Hydrochlorides polymerisiert.

Die Wirksamkeit des Zinntetrachlorides, sei es in reiner Form, sei es in Form seines Komplexes mit Glycinäthylester wird mit zunehmender Zeit jedoch durch das Auftreten des Aethanols herabgesetzt. Aethanol kann mit dem Zinntetrachlorid, seinen Additions- bzw. Substitutionskomplexen zu den Alkoholaten abreagieren. Die Alkoholate

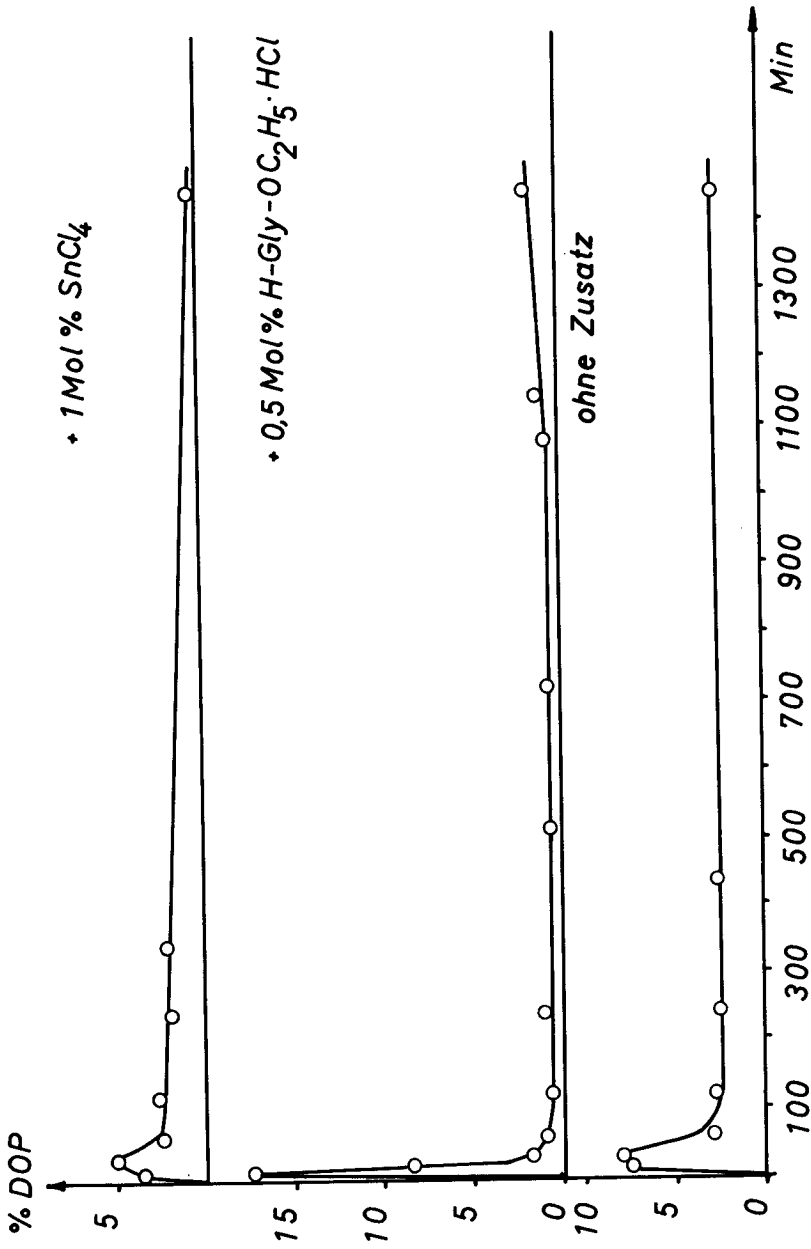


Abbildung 13
Zeitabhängigkeit des Gehaltes an 2,5-Dioxopiperazin bei verschiedenen Zusätzen.

sind aber unlöslich in der Reaktionsmasse und können daher schon aus diesem Grunde nicht mehr in das Reaktionsgeschehen eingreifen.

Die in geringer Menge gebildeten Hydrochloride des Monomeren und der Peptidester sind ebenfalls unlöslich und daher nicht oder nur schwierig zur weiteren Kondensation befähigt. Schliesslich greift bei längeren Versuchszeiten der abgespaltene Aethylalkohol unter Spaltung der Amidbindungen ebenfalls in die Reaktion ein.

6.3 Schlussfolgerungen

Eine verbesserte Synthese muss sowohl höhere Polymerausbeuten als auch höhere Molekulargewichte erzielen. Es muss daher vor allem die Aethanolyse zurückgedrängt werden. Da die Entfernung des abgespaltene Aethanols aus der Reaktionsmasse wegen der gleichzeitigen Entfernung des Glycinäthylesters nicht durch einfache Abdestillation möglich ist, kann man beispielsweise daran denken, vom entsprechenden Laurylester auszugehen. Der freigesetzte Laurylalkohol fällt aus und kann leicht durch Extraktion vom Polyglycin getrennt werden. Da dieses Verfahren jedoch zusätzlich eine Lösungsmittlextraktion einschliesslich der entsprechenden Aufbereitung erfordert, wird es zweckmässig sein, von einem Vorkondensat auszugehen.

Das grösste Hindernis für eine verbesserte Synthese stellt die Unlöslichkeit des Polyglycins in den Oligomeren und Monomeren dar. Da der Schmelzpunkt höher als der Zersetzungspunkt liegt, ist eine Schmelzkondensation nicht möglich. Eine Lösungskondensation begegnet der Schwierigkeit, dass alle brauchbaren Lösungsmittel (Dichloressigsäure, Ameisensäure, m-Kresol) selbst die Peptidsynthese und folglich auch die Rückreaktion katalysieren. Es bleibt also der Versuch, noch besser katalysierend wirkende Substanzen für die Kondensation in Masse zu finden. Eine solche Substanz liegt im Komplex aus Glycinäthylester und Zinntetrachlorid vor. Dabei ist zu beachten, dass

unter den Bedingungen der Langzeitkondensation (24 Stunden) das Produkt aus Ausbeute und Polymerisationsgrad bei gegebener Temperatur unabhängig von der Katalysatorkonzentration ist, aber mit zunehmender Reaktionstemperatur langsam ansteigt (vgl. Tabelle 37). Eine wesentliche Verbesserung von Ausbeute und Polymerisationsgrad ist daher unter Pseudogleichgewichtsbedingungen nicht zu erwarten. Wichtiger dürfte es sein, für jede Kombination Katalysatortyp/Katalysatorkonzentration/Temperatur den optimalen Zeitpunkt für das Abstoppen der Reaktion zu finden. Durch ein derartiges Vorgehen könnten auch die Nebenprodukte des Katalysators zurückgedrängt werden. Für die Suche nach der besten Katalysatorwirksamkeit wäre eine Ermittlung der Komplexbildungstendenz wahrscheinlich nützlich.

Tabelle 37

Aenderung des Produktes aus Ausbeute und Polymerisationsgrad bei Langzeitkondensationen von 24 Stunden Dauer (nach Daten der Tabellen 29 und 30).

Temp. °C	Katalysator-Konzentration		Produkt aus Ausbeute (%) und Polymerisationsgrad des Gesamtkondensats
	Anzahl	Bereich Mol-Prozent SnCl ₄	
0	5	0,60-5,80	300 ± 17
20	8	0,07-4,50	324 ± 12
40	4	1,69-5,20	380 ± 7
80	4	1,69-4,00	414 ± 17

Schliesslich scheint es aussichtsreich, statt von Glycinäthylester ausgehend mit Kondensationsreaktionen zu arbeiten, die direkte Polymerisation des 2,5-Dioxopiperazins zu versuchen. Dadurch würden die bei der Kondensation auftretenden Probleme in eleganter Weise umgangen.

7 EXPERIMENTELLE DURCHFUEHRUNG

7.1 Präparative Arbeiten

7.1.1 Hydrochloride der α -Aminocarbonsäureester bzw. Peptidester

0,1 Mol α -Aminocarbonsäure oder Glycinpeptid wurden bei Zimmertemperatur in 10 Mol des entsprechenden Alkohols suspendiert und darauf Chlorwasserstoff eingeleitet. Die Reaktionsmischung wurde bis zum Sieden erhitzt. Nach einer Stunde stellte die Reaktionsmischung eine klare Lösung dar. Diese wurde noch drei Stunden weiter gekocht. Darauf wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingedampft und das Esterhydrochlorid kristallisieren gelassen. Die Versuchsdaten der hergestellten Substanzen sind in der Tabelle 38 zusammengefasst.

Diglycinäthylester-Hydrochlorid

10 g (0,088 Mol) fein pulverisiertes 2,5-Dioxopiperazin wurden in 270 ml absolutem Alkohol suspendiert und unter Rühren und Kühlen im Eisbad Chlorwasserstoff, welcher der Bombe entnommen und mit konz. Schwefelsäure getrocknet wurde, bis zur Sättigung eingeleitet. Dann wurde unter Schütteln auf dem Wasserbade rasch zum Sieden erhitzt, heiss filtriert und auskristallisieren gelassen.

15,2 g Rohprodukt wurden aus absolutem Alkohol umkristallisiert. Ausbeute: 13,0 g (0,066 Mol) Diglycinäthylester-Hydrochlorid oder 75 % der Theorie. Literatur: ca. 80 % (51).
Schmelzpunkt: 179 - 181° C, Literatur: 182° C (51).

Glycinlaurylester-Hydrochlorid

7,5 g (0,1 Mol) Glycin wurden mit 40 g (0,25 Mol) Laurylalkohol in 160 g feuchtem Benzol aufgeschlämmt. Diese Mischung wurde auf 80° C erhitzt und darauf während vier Stunden mit Chlorwasserstoff beschickt. Nach dieser Zeit war alles Glycin in Lösung gegangen. Die-

se Lösung wurde über Nacht stehen gelassen. Darauf wurde sie mit wenig Wasser ausgeschüttelt, die Benzolfraktion eingeeengt und nochmals ausgeschüttelt. Aus dem Wasser kristallisierten schöne Nadeln, welche zweimal aus Methanol umkristallisiert wurden. Schmelzpunkt: 146° C. Ausbeute: 10,3 g Glycinlaurylesterhydrochlorid oder 36,8 % der Theorie.

Der freie Ester wurde mit Ammoniak in Chloroform neutralisiert, wie es in Abschnitt 7.1.2.2 beschrieben wurde.

7.1.2 Freie α -Aminocarbonsäureester

7.1.2.1 Neutralisation mit Natronlauge, Kalilauge, Bariumoxid oder Ammoniumhydroxid

0,1 Mol Esterhydrochlorid wurden in sehr wenig Wasser bei 0° C gelöst. Der gekühlten Lösung wurden 150 ml Aether überschichtet. Darauf wurde langsam 33 %ige Natronlauge zugegeben, bis die wässrige Lösung deutlich alkalisch war. An Stelle von Natronlauge wurde bisweilen auch 20 %ige Kalilauge, 25 %ige Ammoniumhydroxidlösung oder festes Bariumoxid verwendet. Es wurde streng darauf geachtet, dass die Temperatur $+ 5^{\circ}$ C nicht überstieg. Dann wurde die wässrige Schicht mit soviel Sikkon versetzt, bis diese ein dicker Brei war. Dieser wurde dann dreimal mit 150 ml Aether ausgeschüttelt. Die Aetherfraktionen wurden gesammelt und über Sikkon getrocknet. Darauf wurde das Lösungsmittel bei 20° C im Vakuum und der zurückgebliebene Ester im Wasserstrahlvakuum abdestilliert. Die Versuchsdaten aller hergestellten Ester sind ebenfalls in der Tabelle 38 zusammengestellt.

7.1.2.2 Neutralisation mit Ammoniakgas in Chloroform

0,1 Mol Esterhydrochlorid wurden unter Rühren in 200 ml Chloroform von 0° C suspendiert. In einem zweiten Gefäß wurden 150 ml 3 %ige Ammoniaklösung in Chloroform auf 0° C gekühlt. Die kalte Lösung wur-

de der Reaktionsmischung in einer Viertelstunde zugegeben. Dann wurde noch eine weitere Viertelstunde gerührt. Die Temperatur durfte + 3° C nicht übersteigen.

Dann wurden 4 g Cellit oder Aktivkohle als Filtrierhilfsmittel zugegeben und das entstandene Kochsalz von der Chloroformlösung getrennt. Diese wurde bei 20° C am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingedampft und der zurückbleibende Ester im Wasserstrahlvakuum destilliert.

7.1.3 2,5-Dioxopiperazin

80 g (0,67 Mol) Glycinäthylester-Hydrochlorid wurden in 60 ml Wasser gegeben, wobei es sich teilweise löste, und die Mischung im Eisbad auf + 3° C gekühlt. Unter Rühren wurden 80 ml Triäthylamin beigegeben und dafür gesorgt, dass die Temperatur zwischen 3 und 7° C blieb. Das noch ungelöste Glycinäthylester-Hydrochlorid ging dabei vollständig in Lösung. Die Lösung wurde darauf 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, wobei ein Teil des gebildeten 2,5-Dioxopiperazins auskristallisierte. Hernach wurde drei Stunden im Eisbad gekühlt, das ausgeschiedene 2,5-Dioxopiperazin abfiltriert und zuerst mit 75 ml Wasser und dann mit 40 ml Aethylalkohol gewaschen. Das Produkt war genügend rein und wurde getrocknet. Ausbeute: 16,4 g oder 52,1 % der Theorie, Literatur: 49 - 54 % (54). Schmelzpunkt: 260° C zers., Literatur: 278° C zers. (54).

7.1.4 Kondensation der α -Aminocarbonsäureester

7.1.4.1 Kondensation in Masse

Alle Kondensationen der flüssigen α -Aminocarbonsäureester wurden in einem Dreihalskolben mit Rührer, Rückflusskühler und Thermometer durchgeführt. Die Apparatur war mit einem Heiz- resp. Kühlbad versehen. Es wurde immer unter einer Stickstoffatmosphäre gearbeitet. Der Katalysator wurde erst zugegeben, als die Reaktionstemperatur sich im Monomeren eingestellt hatte. Dies war in der Regel für Proben von ca. 5 Gramm nach 5 Minuten der Fall. Der freiwerdende Alkohol wurde nicht entfernt. Die Katalysatoren wurden ohne Lösungsmittel direkt zugegeben, wobei die flüssigen nach Durchstossen eines Plastikverschlusses mit einer Injektionspritze dosiert wurden. Die Kondensationszeit betrug in der Regel 24 Stunden. Nach dieser Zeit wurde die Probe im Hochvakuum bei 95^o C getrocknet.

7.1.4.2 Kondensation in Lösungsmitteln

Alle Reaktionen wurden in der unter 7.1.4.1 beschriebenen Apparatur durchgeführt. Zuerst wurde das Lösungsmittel vorgegeben, dann wurde das Monomere eingeführt. Hernach wurde die Reaktionstemperatur eingestellt und schliesslich der Katalysator zugegeben. Bei allen Lösungsmittelversuchen wurden parallel Blindproben ohne Katalysator angesetzt. Die Kondensate wurden durch Destillation des Lösungsmittels (Dauer ca. 5 Minuten) oder durch Ausfällen gewonnen. Nach beendeter Reaktion wurden die Kondensate am Hochvakuum bei 95^o C getrocknet. Dann wurde die Probe gleichmässig pulverisiert und gelagert.

7.1.5 Bestimmung der Kondensatausbeute

Eine Kondensatprobe wurde der Reaktionsmasse entnommen und gewogen. Darauf wurden die flüchtigen Reaktionspartner innert 10 Minuten im Hochvakuum bei 90° C abgesaugt. Die trockene Probe wurde darauf wieder ausgewogen. Der Gewichtsunterschied ergab die Kondensationsausbeute. In der Kühlfalle wurde nur Monomeres und Alkohol gefunden.

7.1.6 Fraktionierung der Kondensate

2 g des Gesamtkondensats wurden bei Raumtemperatur in 50 ml Wasser aufgeschwemmt. Die Suspension wurde während 10 Minuten kräftig durchgeschüttelt und darauf in einer Zentrifuge bei 3000 U/Minute während fünf Minuten zentrifugiert. Die überstehende klare Flüssigkeit wurde dekantiert und der Rückstand nochmals zweimal mit je 50 ml dest. Wasser ausgezogen. Der wasserunlösliche Rückstand wurde bei 40° C über Calciumchlorid im Hochvakuum getrocknet.

Die Behandlung mit Eisessig wurde genau wie diejenige mit Wasser durchgeführt. Getrocknet wurde hier jedoch bei 80° C.

7.1.7 Lösungsmittel für die Papierchromatographie

Diese Lösungsmittel wurden alle bis zur Brechungsindexreinheit destilliert. Von den betreffenden Laufmitteln wurden immer 10 Liter gleichzeitig hergestellt. Damit das Laufmittel vor dem Gebrauch im Gleichgewicht stand, wurden die Mischungen erst nach fünfzehntägigem Stehen verwendet.

Die Ninhydrinlösung, eine 0,1 %ige Lösung in n-Butanol, wurde jeden Tag frisch hergestellt.

7.1.8 Komplexe mit Zinntetrachlorid

7.1.8.1 Reinigung des Zinntetrachlorids

100 g Zinntetrachlorid wurden während drei Stunden über 200 g Phosphorpentoxid gekocht und anschliessend unter absoluter Stickstoffatmosphäre bei Normaldruck destilliert. Siedepunkt: 110 - 112° C (61).

7.1.8.2 Zinntetrachlorid-Aethylalkohol-Komplex

In 100 ml absoluten, auf 0° C gekühlten Aethylalkohol wurden unter dem Stickstoffstrom in einer Dry Box 2,6 g (0,1 Mol) Zinntetrachlorid gegeben. Eine heftige Reaktion trat ein, und es bildete sich ein Festkörper im Lösungsmittel. Dieser wurde immer noch in der Box abfiltriert und getrocknet. Das trockene, weisse Pulver war an der Luft beständig und wurde für Debye-Scherrer-Aufnahmen verwendet.

7.1.8.3 Zinntetrachlorid-Glycinäthylester-Komplex

In absolutem Benzol

In 100 ml absolutem Benzol (destilliert über Na und mit Molekularsieben behandelt) wurden 10 g (0,1 Mol) Glycinäthylester gelöst. In einem zweiten Kolben wurden 26 g (0,1 Mol) Zinntetrachlorid in Benzol gelöst. Beide Lösungen wurden auf 0° C gekühlt und dann zusammengegeben. Sofort fiel ein weisses Pulver aus, welches papierchromatographisch, IR-spektroskopisch und gravimetrisch auf Zinn hin analysiert wurde.

Analyse: Sn ber. 25,80 % gef. 25,15 %.

In feuchtem Benzol

200 ml Benzol wurden mit dest. Wasser ausgeschüttelt und dann abgetrennt.

100 ml dieses feuchten Benzols wurden mit 10 g (0,1 Mol) Glycinäthylester versetzt. In einem zweiten Kolben wurden 26 g (0,1 Mol)

Zinntetrachlorid mit 100 ml absolutem Benzol vermischt. Die auf 0° C gekühlten Lösungen wurden zusammengegeben, worauf ein glasiger, gallertartiger Körper ausfiel. Dieser wurde wie oben beschrieben analysiert.

7.1.8.4 Zinntetrachlorid-2,5-Dioxopiperazin-Komplex

2,3 g 2,5-Dioxopiperazin (0,02 Mol) wurden in der Dry Box in einer Reibschale fein verrieben und unter ständigem Rühren 10 g (0,038 Mol) Zinntetrachlorid zugegeben. Das Gemisch wurde während zwei Stunden gelegentlich gerührt und hierauf 50 ml Chloroform zugegeben. Es wurde mit einer Glasfilternutsche abgesaugt und mit Chloroform gewaschen, um das überschüssige Halogenid zu entfernen. Das weiße pulverige Kristallisat wurde im Vakuumexsiccator drei Tage getrocknet und darauf analysiert.

Smp.: 65° C.

Berechnet für	Cl gef.	Cl ber.
$\text{SnCl}_4(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2\text{N}_2)$	37,6 %	37,9 %

7.1.9 Bleitetrachlorid

(aus Bleidichlorid über Pyridinkomplex (18))

In einem Literkolben wurden 20 g (0,07 Mol) Bleidichlorid mit 400 ml konz. Salzsäure aufgeschwemmt. Darauf wurde ein lebhafter Chlorgasstrom durch die Lösung geleitet. Bei häufigem Umschütteln löste sich das Bleidichlorid nach drei Stunden. Darauf wurde die Lösung mit Eis/Wasser auf 0° C gekühlt. Das Dipyridinohexachloroplumbat wurde dann mit sieben Gramm Pyridin (0,05 Mol) gefällt. Zum Filtrat des entstandenen Niederschlags wurden noch einmal 3 g (0,02 Mol) Pyridin gegeben. Das hellgelbe Präparat wurde abgesogen, mit 50 ml Pyridin ausgewaschen und dann bei 50° C getrocknet. Anschliessend wurden 600 g konz. Schwefelsäure auf -10° C gekühlt und im Verlaufe

von 10 Minuten vorsichtig 20 g (0,03 Mol) Dipyridinhexachloroplumbat unter langsamem Rühren eingetragen. Darauf wurde die Mischung vorsichtig auf 0° C erwärmt und eine Stunde bei dieser Temperatur belassen. Die Schwefelsäure war durch einen feinen Niederschlag schwach getrübt, und auf dem Boden des Gefäßes hatte sich eine klare Flüssigkeit abgetrennt. Die Säure wurde darauf dekantiert und das Öl mit 50 ml vorgekühlter Schwefelsäure in einem trockenen Scheidetrichter kurz durchgeschüttelt und unter frischer, kalter Schwefelsäure aufbewahrt.

Ausbeute: 6 g Bleitetrachlorid oder 66 % der Theorie.

7.2 Chemisch-analytische Methoden

7.2.1 Totalhydrolysen

7.2.1.1 Bei Normaldruck

50 mg Kondensat wurden in einem 250 ml Rundkolben mit Schliff mit 50 ml 6n Salzsäure überschichtet. Diese Suspension wurde 20 Stunden gekocht und anschliessend die dunkel gewordene Suspension filtriert. Ein schwarzer Rückstand von 3 mg wurde verworfen. Aus der Lösung wurden Proben für die Papierchromatogramme entnommen.

7.2.1.2 Im Bombenrohr

10 mg Kondensat wurden mit 10 ml 6n Salzsäure in ein Bombenrohr gegeben. Die Suspension wurde mit flüssiger Luft vorsichtig eingefroren und dann am Hochvakuum evakuiert. Darauf wurde die Probe im Hochvakuum wieder aufgetaut und noch einmal eingefroren. Die frei gewordene Luft wurde wieder abgepumpt. Nach dem dritten Einfrieren wurde die Ampulle unter Hochvakuum abgeschmolzen und wieder aufgetaut. Diese evakuierte Suspension wurde dann während 20 Stunden im

Bombenofen auf 140° C erhitzt. Darnach wurde die Ampulle geöffnet und der Inhalt filtriert. Der Rückstand von 1 mg wurde verworfen. Von der Lösung wurden Papierchromatogramme gemacht.

7.2.2 Papierchromatographie

Sämtliche papierchromatographischen Untersuchungen wurden auf der Papiersorte Whatmann Nr. 1 ausgeführt. Es wurde ausschliesslich die absteigende Methode in mit Laufmittel gesättigten Kammern angewendet. Die drei auf Seite 16 angegebenen Laufmittel wurden je nach Bedarf verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden entweder in Masse oder gelöst in Eisessig, 98 %iger Ameisensäure, Dichloressigsäure oder in 60 %iger Lithiumbromidlösung aufgetragen. Die Chromatogramme wurden durchschnittlich mit 10 - 40 μ g der zu untersuchenden Substanz beschickt. Nach der Entwicklung wurden die Papiere an der Luft getrocknet. Darauf wurden sie mit einer 0,1 %igen Ninhydrinlösung in n-Butanol besprüht und wieder an der Luft trocknen gelassen. Die trockenen Chromatogramme wurden darauf drei Minuten auf 140° C erwärmt. Darauf wurden die R_f -Werte der Flecken bestimmt (es wurde der Schwerpunkt des Fleckens als Bezugspunkt gewählt) und auf die standardisierten L-Leucin- R_f -Werte umgerechnet.

7.2.3 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie stellt die Weiterentwicklung der Papierchromatographie dar und hat gegenüber dieser den grossen Vorteil des geringen Zeitaufwandes. In dieser Arbeit betrug die Laufzeit der Papierchromatogramme bis zu 40 Stunden, während die Dünnschichtchromatographie die Trennung der gleichen Substanzen in nur vier Stunden erledigte. Allerdings ist die Reproduzierbarkeit

der R_f -Werte sehr schlecht, auch wenn Testsubstanzen bekannter R_f -Werte mitlaufen (19). Die Dünnschichtchromatographie wurde deshalb in dieser Arbeit immer dann verwendet, wenn rasch eine Auskunft über einen Versuch notwendig war. Speziell wurde sie für die Untersuchung der Reinheit und Identität der Ausgangssubstanzen und Monomeren benutzt.

30 g Kieselgel G wurden in 60 ml Wasser in einem Mörser vorsichtig während einer Minute verrührt, so dass keine Brocken in der Suspension mehr vorhanden waren. Dann wurde die Mischung eine Minute lang stehen gelassen, ins Streichgerät gegeben und auf die Glasplatten gestrichen. Diese Menge genügt für fünf Platten 20 x 20 cm. Die Platten wurden über Nacht an der Luft getrocknet und dann an der Luft gelagert. Die Sorptionsschichten enthalten so eine für die Chromatographie von Aminosäuren und ihren Derivaten günstige Feuchtigkeit.

Die aufgetragenen Substanzmengen betragen ca. 2 - 5 μ g. Es wurden die gleichen Lösungsmittel wie bei der Papierchromatographie verwendet, wenn die Probe nicht in Masse aufgetragen wurde. Die beiden verwendeten Fliessmittel waren wie folgt zusammengesetzt:

Fliessmittel I: n-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5 (16)

Fliessmittel IV: n-Butanol : Pyridin : Wasser = 65 : 35 : 65 (17)

Es wurde mit der aufsteigenden Technik in mit Laufmittel gesättigten Wannen gearbeitet. Die Versuche wurden alle bei Zimmertemperatur durchgeführt. Auch hier wurde L-Leucin als Referenz verwendet. Die Bezugs- R_f -Werte wurden aus 15 unabhängigen Messungen ermittelt und betragen für Fliessmittel I 0,35 und für Fliessmittel IV 0,37. Die entwickelten Platten wurden mit einer 0,1 %igen Ninhydrinlösung in n-Butanol besprüht. Die Platten wurden darauf eine Minute auf 140° C im Trockenkasten erhitzt und dann ausgewertet.

7.2.4 Titration der Aminogruppe

Die Aminoendgruppen der Kondensationsprodukte lassen sich in Eisessig als Lösungsmittel mit Perchlorsäure titrieren (11). Die Methode ist ausgearbeitet, doch musste noch geklärt werden, ob das bei der Kondensation auftretende 2,5-Dioxopiperazin das Titrationssystem stört. Die Tabelle 39 enthält die Resultate der Probetitrationen. Es wurden Lösungen von Glycin, Diglycin und Triglycin in Eisessig hergestellt. Einmal wurde den Lösungen 5g 2,5-Dioxopiperazin zugesetzt und einmal nicht. Ca. 500 mg Kondensat wurden in Eisessig und mit 0,01n Perchlorsäure in Eisessig potentiometrisch titriert.

Tabelle 39

Ueberprüfung der Titration der Aminogruppe in Eisessig gegen α -Naphthylbenzoin und potentiometrisch mit und ohne Zusatz von 2,5-Dioxopiperazin.

Verbindung	vorgegeben mMol/250 ml	gegen α -Naphthylb.		potentiometr.	
		gefunden mMol/250 ml	Differenz %	gefunden mMol/250 ml	Differenz %
H-(Gly)-OH	6,463	6,380	-1,3	6,398	-1,0
H-(Gly) ₂ -OH	3,596	3,522	-2,0	3,518	+2,1
H-(Gly) ₃ -OH	2,319	2,374	-2,3	2,355	-0,8
H-(Gly) ₂ -OH ^{*)}	3,628	3,670	+1,4	3,629	0

*) = Zusatz von 5 g Dioxopiperazin

Aus der vierten und sechsten Spalte der Tabelle 39 sieht man, dass die Genauigkeit der Methode + 2 % beträgt und vor allem, dass selbst ein Zusatz von 5 g 2,5-Dioxopiperazin nicht stört. Die Abweichungen vom Sollwert sind bei der Zugabe von 2,5-Dioxopiperazin nicht grösser als beim reinen Lösungsmittel.

7.2.5 Titration der Carbonsäuregruppe

Ca. 500 mg Kondensat wurden in m-Kresol gelöst und mit 0,1n alkoholischer Kalilauge gegen Phenolphthalein titriert. Auf je fünf Titrationen wurde eine Blindprobe für m-Kresol gemacht und bei der Berechnung berücksichtigt.

7.2.6 Bestimmung der Aethoxylgruppe

Die Aethoxylgruppe wurde mikroanalytisch nach der von Pregl modifizierten Methode von Zeisel bestimmt.

Ca. 3 mg Kondensat wurden mit Jodwasserstoffsäure versetzt und das entstandene Alkyljodid anschliessend mit Brom oxydiert, darauf wurde das freigesetzte Jod mit 0,01n Natriumthiosulfatlösung titriert.

7.2.7 Sublimation des 2,5-Dioxopiperazins

Ca. 50 mg Kondensat (genau gewogen) werden bei 180° C im Hochvakuum von ca. 0,01 mm Hg sublimiert. Nach zwei Stunden wird das Sublimat (= 2,5-Dioxopiperazin) sofort nach dem Entfernen des Vakuums gewogen.

7.2.8 Gravimetrische Bestimmung des Zinngehaltes

Der Zinngehalt der Kondensate wurde gravimetrisch als SnO₂ bestimmt.

Ca. 3 mg Kondensat wurden im Sauerstoffstrom bei 1000° C total oxydiert. Der Rückstand, reines Zinn-IV-oxid, wurde ausgewogen und mit Hilfe der Einwaage der Zinngehalt des Kondensats bestimmt (20).

7.3 Physikalische Verfahren

7.3.1 Debye-Scherrer-Aufnahmen

Die Röntgenpulverdiagramme wurden in einer Vakuum-Debye-Scherrer-Kamera aufgenommen, die auf einer Apparatur der Firma R. Seifert & Co., Hamburg, Typ Iso-Debyeflex III a montiert war.

Ca. 1 mg Substanz wurden in einem Quarzröhrchen bestrahlt. Die Blendenöffnung betrug 0,6 mm und der Primärstrahlfänger hatte einen Durchmesser von 2,5 mm. Es wurde mit einer Spannung von 40 kV und einem Strom von 23 mA gearbeitet. Der Film, Typ Texo SH, wurde 90 Minuten belichtet und darauf mit einem Agfa OP Röntgenentwickler entwickelt. Als Fixierbad wurde eine Lösung von saurem Röntgenfixiersalz verwendet. Entwicklungszeit: 12 Minuten, Fixierzeit: mindestens 20 Minuten, Wässerung: 2 Stunden.

7.3.2 IR-Spektroskopie

Alle IR-Spektren wurden auf dem Infrarot-Spektrophotometer Mod. 21 der Firma Perkin-Elmer aufgenommen. Bei flüssigen Substanzen (Monomere, Ester etc.) wurden die Spektren in Substanz aufgenommen. Die festen Verbindungen wurden je nach Möglichkeit entweder als Suspension in Nujol oder in einem KBr-Pressling verarbeitet.

8 ZUSAMMENFASSUNG

1. Die katalysierte Kondensation verschiedener Glycinester sowie der Aethylester einiger anderer α -Aminocarbonsäuren wurde untersucht. Es wurden auch die katalysierten Cokondensationen von L-Tyrosinäthylester bzw. L-Phenylalaninäthylester mit Glycinäthylester durchgeführt.
2. Zur Gewinnung von Glycinlaurylester wurde eine einfache Synthese entworfen.
3. Mit Hilfe der Papierchromatographie wurden die R_f -Werte folgender homologen Reihen ermittelt: die aliphatischen Glycinester, die aliphatischen Glycinester-Hydrochloride, Glycinpeptide, Glycinpeptidäthylester und Glycinpeptidäthylester-Hydrochlorid.
4. Für die quantitative Bestimmung des 2,5-Dioxopiperazins wurde eine Analysenmethode entwickelt.
5. Der hochmolekulare Anteil der Kondensate des Glycinäthylesters entspricht der Struktur von Polyglycin II. Im Kondensat konnten ausser 2,5-Dioxopiperazin in kleinen Mengen keine Ringe nachgewiesen werden.
6. Der Komplex aus Zinntetrachlorid und Glycinäthylester wurde untersucht.
7. Es wurde ein möglicher Reaktionsmechanismus für die Kondensation diskutiert.

9 L I T E R A T U R

- (1) Th. Curtius, Ber. deutsch. chem. Ges. 37, 1284 (1904)
- (2) E. Pascu und J. Wilson, J. org. Chemistry 7, 117 (1942)
- (3) M. Frankel und E. Katchalski, Nature 144, 330 (1939)
- (4) M. Frankel und E. Katchalski, J. Amer. chem. Soc. 64, 2264 (1942)
- (5) L.A.A. Sluyterman und H.J. Veenendaal, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 71, 137 (1952)
- (6) L.A.A. Sluyterman und M. Hooistra, ibid, 71, 277 (1952)
- (7) A.M. Polakova, L.F. Wereschagin, A.A. Sakkarova und E.C. Tambovceva, Izvest. Akad. Nauk. USSR, Otdel. Khim. Nauk 1954 142
- (8) K.T. Poroshin, Yu.I. Khurgin und T.D. Kozarenko, Doklady Nauk SSSR 124 105 (1959)
- (9) Yu.I. Khurgin, K.T. Poroshin und T.D. Kozarenko, Izvest. Akad. Nauk SSSR Otdel. Khim. Nauk 1959 941
- (10) T.D. Kozarenko, K.T. Poroshin und M.G. Kuz'mina, Izvest. Akad. Nauk SSSR Otdel. Khim. Nauk 1959 1663
- (11) M. Brenner und H.R. Rickenbacher, Helv. 43, 2152 (1960)
- (12) L. Birkofer und A. Ritter, Liebigs Ann. Chem. 612, 22 (1958)
- (13) H. Brockmann und M. Musso, Naturwiss. 40, 533 (1953)
DRP 954 419 (1956)
- (14) A. Vollmar und S. Dunn, J. org. Chemistry 25, 387 (1960)
- (15) G.W. Anderson und F.H. Callahan, J. Amer. chem. Soc. 82, 3339 (1960)
- (16) A.M. Katz, W.J. Dreyer und D.B. Anfinsen, J. biol. Chemistry 234, 2897 (1959)
- (17) H.N. Rydon und P.W.G. Smith, J. chem. Soc. 1955, 2542
- (18) W. Biltz und E. Meinecke, Z. anorg. Chem. 131, 1 (1923)
- (19) E. Stahl, Angew. Chem. 73, 646 (1961)
- (20) F. Fichter und F. Reinhart, Helv. 7, 1078 (1924)
- (21) L.A.A. Sluyterman und B. Labruyère, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 73, 347 (1954)
- (22) R. Schwyzer, B. Iselin, W. Rittel und P. Sieber, Helv. 39, 872 (1956)
- (23) A. Elliott und B.R. Malcolm, Trans. Farad. Soc. 52, 528 (1956)
- (24) A. Elliott, Proc. Roy. Soc. London A 226 408 (1954)

- (25) T. Migazawa, Bull. Chem. Soc. Japan 34, 691 (1961)
- (26) A. Elliott und B.R. Malcolm, Farad. Soc. Discuss. Maidenheall
(1956)
- (27) J. Oro und C.L. Guidry, Arch. Biochem. Biophys. 93, 166 (1961)
- (28) J.W. Stewart und M.A. Stahmann, J. Chrom. 9, 233 (1962)
- (29) H. Brockmann und H. Musso, Ber. deutsch. chem. Ges. 87, 581 (1954)
- (30) M. Tsuboi, Spectrochim. Acta 12, 253 (1958)
- (31) C.D. Hurd, L. Bauer und K. Klotz, J. Amer. chem. Soc. 75, 624
(1953)
- (32) A. Elliott, Proc. Roy. Soc. London A 226, 408 (1954)
- (33) A. Elliott, Brit. J. Appl. Phys. 5, 377 (1954)
- (34) C.H. Bamford, L. Brown, E.M. Cant und A. Elliott, Nature 176,
396 (1955)
- (35) F.H.C. Crick und A. Rick, Nature 176, 780 (1955)
- (36) M.F. Lappert, J. chem. Soc. 1961, 817
- (37) E. Fischer und S. Speiser, Ber. deutsch. chem. Ges. 28, 3252 (1895)
- (38) H.W. Thomson, Discuss. Farad. Soc. 9, 233 (1950)
- (39) P. Pfeiffer, Z. anorg. Chem. 87, 240 (1914)
- (40) P. Pfeiffer, Org. Molekülverbindungen 395 (1927)
- (41) A. Rosenheim und R. Schnabel, Ber. deutsch. chem. Ges. 38,
2780 (1905)
- (42) P. Pfeiffer, Liebigs Ann. Chem. 376, 285 (1910)
- (43) H.G. Elias und L. Providoli, unveröffentlicht
L. Providoli, Diplomarbeit, Techn. Chem. Lab. ETH (1961)
- (44) K. Heyns, W. Walter und H.F. Grützmacher, J. Polymer Sci. 30,
573 (1958)
- (45) A.B. Meggy und J. Sikorski, Nature 177, 326 (1956)
- (46) D.S. Bystrov, Opitka i Spektr. 9, 460 (1960)
Chem. Abstr. 55, 13055d (1961)
- (47) H.G. Elias und A. Wachter, unveröffentlicht
- (48) M.E. Carter und O.K. Carlson, J. Polymer Sci. A2, 1493 (1964)
- (49) H.F. Schott, J.B. Larkin, L.B. Rockland und M.S. Dunn, J. org.
Chemistry 12, 490 (1947)
- (50) E. Abderhalden und S. Suzuki, Z. physiol. Chem. 223, 43 (1934)
- (51) E. Fischer und E. Fourneau, Ber. deutsch. chem. Ges. 34, 2868
(1901)

- (52) Th. Curtius und F. Göbel, J. pr. Chem. (2) 37, 160 (1888)
- (53) E. Abderhalden und S. Suzuki, Z. physiol. Chem. 176, 102 (1928)
- (54) E. Fischer, Ber. deutsch. chem. Ges. 34, 436 (1901)
- (55) B. Foremann, Biochem. J. 13, 382 (1919)
- (56) E. Fischer, Ber. deutsch. chem. Ges. 39, 2927 (1906)
- (57) A.B. Meggy, J. chem. Soc. 1956, 1444
- (58) H. Adkins und H.R. Billica, J. Amer. chem. Soc. 70, 3123 (1948)
- (59) G. Hillmann, Z. Naturforsch. 1, 682 (1946)
- (60) R.W. Chambers und F.H. Carpenter, J. Amer. chem.Soc. 77, 1524
(1955)
- (61) J. Hildenbrand und J. Carter, J. Amer. chem. Soc. 54, 3593 (1932)
- (62) F. Röhmann, Ber. deutsch. chem. Ges. 30, 1979 (1897)
- (63) E. Fischer, ibid. 36, 2984 (1903)
- (64) W. Grossmann und H. Dyckerhoff, Z. physiol. Chem. 175, 33 (1927)

L E B E N S L A U F

Am 22. August 1933 wurde ich, Hans v. Werra, als Sohn des Ignaz v. Werra und seiner Ehefrau Cäcilia, geb. de Boer, in Den Haag, Holland, geboren.

Von 1939 bis 1947 besuchte ich Volksschulen in Den Haag (NL), Leuk-Stadt (VS), Fribourg und Luzern. Anschliessend besuchte ich bis 1953 die Realschule in Luzern.

Von 1953 bis 1955 arbeitete ich in der Firma Hoffmann-La Roche in Basel als Laborgehilfe.

Im Herbst 1956 bestand ich die Aufnahmeprüfung an der Eidgenössischen Technischen Hochschule. Gleich darauf nahm ich das Studium an der Abteilung für Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule auf, welches ich im Sommersemester 1961 mit dem Diplom eines Ingenieurchemikers abschloss.

Seit dem Juli 1961 arbeitete ich unter der Leitung von Prof. Dr. H.-G. Elias an der vorliegenden Promotionsarbeit.

Zürich-Wollishofen, den 13. Oktober 1964.