Synthese von 1,3,5-Triazinen aus Aminosäure-Derivaten (III)

Eiichi KUWANO, Eiji TANIGUCHI und Kazuyuki MAEKAWA

Landwirtschaftliche Fakultät, Kyushu Universität

Eingegangen September 19, 1972

Amino acid esters as well as peptideesters reacted directly, without addition of DCC, with dimethylbiguanide to give triazine-derivatives. The yields of the triazine-derivatives were fairly good and the racemization did not occur during the reactions. The carbobenzoxy group of N-end was removed by treatment with 25% HBr at room temp. without decomposition of the triazine-ring formed at the C-terminal.

Wenn Triazin-Derivate von N-geschützten Aminosäuren bzw. Peptiden durch Reaktion mit S-Methyl-guanylisothiuronium-methosulfat, Dimethylbiguanid oder Morpholinobiguanid synthetisiert wurden, war die Ausbeute nicht genügend.^{1, 2)} Die hier beschriebenen Versuche wurden unternommen, um die Carboxy-Gruppe von instabilen Aminosäuren in den Ring einzuschliessen, was bis heute noch nicht gelungen war, und um die Ausbeute zu verbessern.

Die Folge davon ist, dass die Ester der Aminosäuren verhältnismässig leicht bei niedriger Temperatur und unter Abwesenheit von einem Kondensierungsmittel wie DCC

bis zu einem befriedigenden Grade reagieren. Ferner findet wegen der Abwesenheit von DCC keine Razemisierung statt.

Die Esterifizierung von Aminosäuren wurde sowohl nach gewöhnlicher Weise³⁾ als auch mittels aktivierter Ester-Methode durchgeführt, welche durch Verknüpfung mit 1-Hydroxybenzotriazol⁷⁾ oder 3-Hydroxyisoxazol erreicht wurde. Jene Esterifizierungs-Stufe war nicht quantitativ, aber der Ring-Schluss kam mit guter Ausbeute zustande (Fig. 1).

Da die Aminosäuren in wässriger Lösung mit Meerweinschem Reagens⁴⁾ unter milden Bedingungen reagieren und Ester ergeben,^{5, 6)} ist dieser Umweg wahrscheinlich ein geeignetes

FIG. 1. Synthese von Triazin-Derivaten aus Aminosäuren mittels aktivierter Ester-Methode.

Abkürzungen, Bz: Benzoyl-, Ts: Tosyl-, Z-: Carbobenzoxy- Nap-: Naphthyl-
DMGG: Dimethyl-biguanid, DCC: Dicyclohexyl-carbodiimid

Verfahren, um die Carboxylgruppe von komplizierten oder instabilen Aminosäuren in den Triazin-Ring einzuschliessen.

Dieses Verfahren wurde im Gegensatz zu den früher beschriebenen Methoden bei Peptiden mit befriedigender Ausbeute vollzogen.

Die Ergebnisse über Thr, Ser, Gln, Asn, Cys und His wurden hinzugefügt, die früher nicht behandelt werden konnten.

Schliesslich konnte man durch dieses sowie

durch früher beschriebene Verfahren die Carboxylgruppe von Aminosäuren alle in einen Triazin Ring einschliessen. Die Ergebnisse werden in Tafel 1 zusammengestellt.

Die IR-Spektren von erneut gebildeten Triazin-Derivaten von Aminosäuren werden in Fig. 2, 3 gegeben. Dies zeigt die auf den Triazin-Ring zurückführbaren Absorptionen bei 1540 cm^{-1} und 815 cm^{-1} , wie schon früher berichtet wurde.^{1, 2)} Nach Einbau in den

TAFEL I. VERSCHIEDENER EINBAU-WEG DER CARBOXYL-GRUPPEN VON AMINOSÄUREN^{#)}
IN DEN TRIAZIN-RING

NH ₂ -Gruppe	Carboxyl-Gruppe	Abgeleitete Triazin-Derivate	Ref.
Geschützte	freie	Ts-G Ts-A Ts-V Ts-F Ts-P Nap-G	1
		Ts-M Ts-L	2
		Bz-G Bz-A Bz-M Bz-V Bz-F Bz-K Bz-L Bz-P Bz-W	
		Bz-D Bz-E Bz-I S-Benzyl-Bz-C	2
		Ts-G-A Ts-G-P Ts-G-F Ts-G-V Bz-G-G Bz-F-G Bz-K-G	
Freie	Ester	<u>A L V I P M F Y T G</u> β -A H	
Geschützte	Ester	Z-M Z-Y Z-G Z(NO ₂)-R Z-W Z-Q Z-E Z-D	(t)
		Z- β -A Z-P Z-V Z-S Z-N Z-Cys(S)	(o)
		Z-G-G Z-F-A Z-M-A Z-P-G Z-L-S Z-L-A Z-I-W	
		Z-I-Y Z-I-P Z-L-F	

#) Aminosäuren wurden mit einem Schriftzeichen ausgedrückt.⁹⁾

(t) ... wurde nach Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol behandelt.

(o) ... wurde nach Zusatz von 3-Hydroxy-5-methylisoxazol behandelt.

~~~~~ mit guter Ausbeute, ----- ohne Razemisierung.

FIG. 2. IR-Spektren von den aus Methionin erhaltenen s-Triazin-Derivat.

1. Z-Gruppe wurde aus dem Z-Methionin-Derivat mittels HBr entfernt.

2. Wurde durch Ester-Methode dargestellt.

FIG. 3. IR-Spektren von den aus Ala und Thr erhaltenen s-Triazin-Derivat.
3. aus Ala, 4. aus Thr

FIG. 4. UV-Absorptionsspektren von den aus Cbz-Trp, Tyr, Phe und Ala erhaltenen Triazin-Derivaten (Lösungsmittel: MeOH).

1. aus Cbz-Trp ($\epsilon=8,310$), 2. aus Tyr ($\epsilon=4,600$)
3. aus Phe ($\epsilon=3,900$), 4. aus Ala ($\epsilon=3,500$)

Triazin-Ring verschob jede der Aminosäuren ihren Drehsinn um 20° nach links, abgesehen von Triazin-Derivaten des Tyr (20° nach rechts). Die UV-Absorptionsspektren von Triazin-Derivaten von Trp, Tyr, Phe und Ala werden in Fig. 4 gegeben.

Die Carbobenzoxy-Gruppe vom Amino-Ende, die in diesem sowie früheren Berichten

gelegentlich gebraucht wurde, wurde zuletzt leicht Stehenlassen über Nacht mit 25% HBr bei Raumtemp. entfernt.

Über die physiologischen Wirkungen von den erhaltenen Derivaten wird anderswo berichtet werden.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

I. Darstellung von Aminosäureestern und Peptidestern

a) *Methyl-, oder Äthylester.* Aminosäuren wurden in Methanol bzw. Äthanol unter Zusatz von Thionylchlorid esterifiziert.³⁾ Der erhaltene Ester wurde aus demselben Alkohol und Äther umkristallisiert. Ölige Produkte wurden nach Trocknung in einem NaOH-Exsiccator ohne weitere Reinigung gebraucht.

b) *Darstellung der aktiven Ester mittels 1-Hydroxybenzotriazol.*⁷⁾ (i), Z-Met (3.5 m Mol) und 1-Hydroxybenzotriazol (4.4 m Mol) wurden in 30 ml Äthanol aufgelöst, und dazu Dicyclohexylcarbodiimid (3.9 m Mol) zugesetzt. Das Rühren wurde 1 Stunde lang bei 0°, dann 3 Stunden lang bei Raumtemp. fortgesetzt, um Ester von Benzotriazol darzustellen. Der Ester wurde ohne Isolierung unmittelbar zur Reaktion mit DMGG benutzt.

FIG. 5. IR-Spektren von Z-β-Ala-[3-hydroxy-5-methylisoxazolester].
— KBr-Pressling, --- Lösung in CHCl₃

(ii), Z-Glu und Z-Gln standen nach diesem Verfahren zur Verfügung.

c). *Anwendung von 3-Hydroxy-5-methylisoxazol für Darstellung aktiver Ester.* (i), Z-β-Ala(1 m Mol) und 3-Hydroxy-5-methylisoxazol⁽⁸⁾ (1.2 m Mol) wurden in 30 ml Tetrahydrofuran aufgelöst und auf 0° gekühlt. Unter Rühren wurde DCC (1.2 m Mol) zugeetzt. Es wurde 3 Stunden lang bei Raumtemp. gerührt und dann, nachdem Dicyclohexylharnstoff entfernt worden war, auf ein kleines Volumen eingeeengt. Nach Zusatz von 30 ml Äther entstand ein farbloser kristalliner Niederschlag. Der Niederschlag wurde aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 73%.

Ber. C, 59.20% H, 5.30% N, 9.21%

(304) Gef. C, 59.09% H, 5.43% N, 9.20%

Die IR-Spektren von dem aktivierten Ester wurden in Fig. 5 gezeigt. (ii), Z-Ser, Z-P, Z-V und Z-Asn wurden nach diesem Verfahren behandelt.

II. *Darstellung von Triazin-Derivaten aus Aminosäureestern bzw. N-geschützten Peptidestern.*

(A) Aus Aminosäureestern

a-1), Aus Methyl-oder Äthylestern.

Phenylalanin-methylester wird als Beispiel angeführt. Der aus 4 g Phe dargestellte Phe-methylester wurde in 50 ml MeOH aufgelöst und dann mit 10 g DMGG unter Rühren bei 0° versetzt. Nachdem 2 Tage lang bei Raumtemp. gerührt worden war, wurde das abgeschiedene DMGG.HCl Salz filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit CHCl₃ extrahiert. Die CHCl₃-Lösung wurde mit einer geringen Menge Wasser gewaschen, dann mit Na₂SO₄ entwässert, und zur Trocknung eingeeengt. Der Rückstand wurde aus Benzol umkristallisiert. Schmelzpt. 127~8°, Ausbeute 4 g (63% aus Phe).

Ala-Et-Ester, Leu-Et-, Val-Me-, Ile-Et-, Pro-Me, β-Ala-Et-, Met-Me-, Tyr-Et-, Thr-Me- usw. wurden jede für sich auf ähnliche Weise wie Phe ohne vorhergehende N-Blockierung unmittelbar mit DMGG bei 0°-Raumtemp. behandelt.

a-2), Der mit Benzylgruppe SH-geschützten Cys(H) wurde angewendet, um mit DMGG zu kondensieren, während Z-Cys(S) unmittelbar esterifiziert wurde.

b), Aus dem aktiven Ester von 1-Hydroxy-benzotriazol Z-Glu-[1-hydroxybenzotriazol-diester], das aus Z-Glu (3 g) und 1-Hydroxy-benzotriazol (3.4 g) in Gegenwart von DCC (4.8 g) dargestellt wurde, wurde mit DMGG (7 g) in methanolischer Lösung unter Rühren bei 0° versetzt. Nachdem 1 Tag lang bei Raumtemp. gerührt worden war, wurde der abgeschiedene Niederschlag filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit CHCl_3 extrahiert. Die CHCl_3 -Lösung wurde mit einer geringen Wasser gewaschen, dann mit Na_2SO_4 entwässert, und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde aus Äthanol umkristallisiert. Schmelzpt. 118~120°, Ausbeute 3.3 g (66%).

Die Carboxylgruppe von Z-Arg (NO_2), di-Z-Lys und Z-Gln wurde auf ähnliche Weise im Triazin-Ring eingeschlossen.

b-2), Di-Z-Tyr-Ester verlor bei der Kondensation mit DMGG seine Schutz-Gruppe von Phenol-OH.

c), Aus dem aktiven Ester von 3-Hydroxy-5-methylisoxazol

Z-Ser-[3-hydroxy-5-methylisoxazolester], das aus Z-Ser (2.4 g) und 3-Hydroxy-5-methylisoxazol (1 g) in Gegenwart von DCC dargestellt wurde, wurde in 15 ml MeOH aufgelöst und dann mit 3 g DMGG unter Rühren bei 0° versetzt.

Es wurde über Nacht bei Raumtemp. gerührt und dann auf ein kleines Volumen eingengt. Nach Zusatz von etwa 30 ml Wasser entstand ein farbloser Niederschlag. Die Umkristallisierung wurde 2 mal aus Methanol durchgeführt. Schmelzpt. 154~6°, Ausbeute 1 g (30%).

(B). Darstellung von Triazin-Derivaten aus Peptidestern.

Z-Glycylglycinethylester (0.2 g) wurde in 10 ml Äthanol aufgelöst und mit 0.3 g DMGG versetzt. Es wurde 2 Tage lang bei Raumtemp. gerührt und dann im Rotationsverdampfer auf ein kleines Volumen eingengt. Nach Zusatz von 30 ml Wasser entstand ein farbloser Kristall. Die Umkristallisierung wurde aus Methanol durchgeführt. Schmelzpt. 179~180°. Ausbeute 83%.

Andere Peptidester wurden auf ähnliche Weise behandelt. In einigen Fällen wurde zwecks Reinigung Säulen-Chromatographie verwendet. Die dabei erforderten Resultate werden in Tafel 2 zusammengestellt.

III. Dünnschicht-Chromatographie und Reinigung mittels Säulen-Chromatographie.

a) *Kieselgel Chromatographie.* Die methanolische Lösung, ausgehend von 2.4 g Z-Met-Ala-Et-Ester und 2.8 g DMGG, wurde auf eine Kieselgel-Säule (150×28 mm) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 100 ml Benzol, 150 ml Benzol:AcOEt (2:1) und 100 ml desselben (1:1), das Eluat wurde in 5 ml-Fractionen gesammelt. Die letzter Fraction enthielt 600 mg Z-Met-Ala-Triazin-Derivat.

b) *Amberlite IRC-50 Säulen-Chromatographie.* Die methanolische Reaktionslösung ausgehend von 1 g Glycinmethylester und 1 g DMGG, wurde zur Trockne eingedampft. Nach Zusatz von HCl wurde das abgeschiedene DMGG-HCl Salz abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Ammoniak neutralisiert, und auf ein kleines Volumen eingengt, und dann auf eine Amberlite IRC-50 H^+ -Säule (350×40 mm) aufgetragen. Die Elution erfolgte zunächst mit Wasser, dann 1 N wässriger Ammoniaklösung. Die letzte Fraction wurde gesammelt. Sie enthielt 450 mg Gly-Triazin-Derivat.

c) *Dünnschicht-Chromatographie (TLC).*

In TLC wurde Kieselgel als Träger verwendet. Als Lösungsmittel wurde BuOH:AcOH:Wasser=12:3:5 benutzt. Der Nachweis der Flecken erfolgte durch Behandlung mit Jod bzw. Ninhydrin.

IV. Beseitigung N-geschützter Gruppen

a), Zum Z-Ala-Triazin-Derivat (0.3 g) wurde 1 ml 25% HBr Essigsäurelösung zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Raumtemp. über Nacht stehen gelassen. Nach Zusatz von 20 ml Äther entstanden farbloser Kristall. Das Lösungsmittel wurde nun dekantiert, der Kristall mit Äther 3 mal durchgewaschen.

TAFEL II. 1,3,5-TRIAZIN-DERIVATEN AUS AMINOSÄUREESTERN UND PEPTIDESTERN (fortgesetzt)

$\begin{array}{c} \text{N(CH}_3)_2 \\ \\ \text{N} \diagup \text{N} \diagdown \\ \quad \\ \text{R} \quad \text{N} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Reaktion		Schmelzpt. (°C)	λ_{EtOH} max und (ϵ)	[α] _D (Lösungsmittel)	Analysenwert (%)		
	Lösungs- mittel	Dauer	Ausbeute (%)			C	H	Ber. N Gef.
$\text{Z-NH-CH(CH}_2)_3\text{-NH-C(=NH)-NO}_2$	"	"	31	171~3		48.43 48.56	5.83 6.05	31.39 31.31
$\text{Z-NH-CH(CH}_2)_3\text{-S-CH}_3$	"	"	3	190~2		51.92 52.93	5.48 5.94	24.21 23.67
$\text{Z-NH-CH(CH}_2)_3\text{-CONH}_2$	"	"	10	155~7		54.68 54.46	6.17 6.26	26.27 25.88
$\text{Z-NH-CH(CH}_2)_3\text{-C(=N-CH}_2\text{N(CH}_3)_2\text{)-N-CH}_2\text{N(CH}_3)_2$	"	"	66	188~190		53.96 54.16	6.21 6.34	32.98 32.29
$\text{Z-NH-CH(CH}_2)_3\text{-OH}$	"	"	30	154~6		54.20 54.16	6.07 6.07	25.29 25.24
$\text{Z-NH-CH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-}$	EtOH	2 Tag	83	179~180		53.48 53.42	5.85 5.92	27.27 27.38
$\text{Z-NH-CH(CH}_2)_3\text{-CO-NH-CH(CH}_3\text{)-}$ $(\text{CH}_3)_2\text{-S-CH}_3$	"	"	22	120~140		53.81 53.53	6.28 6.50	21.97 21.64
$\text{Z-NH-CH(CH}_2)_3\text{-CO-CH(CH}_3\text{)-}$ $\text{CH}_2\text{-}\phi$	"	"	26	179~182		62.20 61.95	6.26 6.27	21.16 20.93

* Diese Ziffer zeigt die Menge des aus CHCl_3 -Auszug gewonnenen Verbindung.
Ausserdem findet sich die grössere Menge der Verbindung in Wasser löslichem Teil.

Ausbeute 0.2 g (60%). Die Umkristallisierung wurde aus Äthanol und Äther vollgezogen.

$C_7H_{16}N_6Br_2$:

(344) Ber. C 24.42% H 4.65% N 24.42%

Gef. 24.49 4.78 24.22

b), Z-Phe-Triazin-Derivat, Z-Tyr- und Z-Gly-Gly- wurden in ähnlicher Weise wie oben behandelt. Ausbeuten waren je 70, 75 und 30%. Weil das so erhaltene Gly-Gly-Triazin. HBr-Salz im Gegensatz zu anderen Verbindungen hygroskopisch war, wurde es durch Zusatz von 25% NH_4OH freigesetzt. Der dabei ausgeschiedene Niederschlag wurde aus Äthanol umkristallisiert. Schmelzpt. $204 \sim 6^\circ$

Phe-Triazin-Derivat: $C_{13}H_{20}N_6Br_2$ (420)

	C%	H%	N%
Ber.	37.14	4.76	20.00
Gef.	37.29	4.86	19.55

Tyr-Triazin-Derivat: $C_{13}H_{20}ON_6Br_2$ (436)

Ber.	35.78	4.59	19.27
Gef.	36.01	4.83	18.83

Gly-Gly-Triazin-Derivat: $C_8H_{15}ON_7$ (255)

	C%	H%	N%
Ber.	42.67	6.67	43.56
Gef.	42.55	6.53	42.74

LITERATUR

- 1) E. Kuwano, E. Taniguchi und K. Maekawa, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1572 (1971).
- 2) E. Kuwano, E. Taniguchi und K. Maekawa, *ibid.*, **35**, 1759 (1971).
- 3) J. Bello, *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 427 (1956).
- 4) H. Meerwein, *Org. Syn.*, **46**, 113 (1966).
- 5) S. M. Parsons, L. Jao, F. W. Dahlquist, C. I. Borders, T. Groff und J. Racs, *Biochem.*, **8**, 70 (1969).
- 6) O. Yonemitsu, T. Hamada und Y. Kanaoka, *Tetrahedron Letters*, **23**, 1819 (1969).
- 7) K. König und R. Geiger, *Chem. Ber.*, **103**, 78 (1970).
- 8) K. Tomita, M. Nagano, T. Yanai, H. Oka, T. Murakami und N. Sampei, *Ann. Sankyo Res. Lab.*, **22**, 215 (1970).
- 9) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature; *Biochemistry*, **7**, 2703 (1968).