

Modelluntersuchungen zur biologischen Aktivierung der Einkohlenstoff-Einheiten, III¹⁾

Synthese und Eigenschaften phosphorylierter Modelle der Tetrahydrofolsäure

von Carl Kutzbach²⁾ und Lothar Jaenicke

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Köln

Eingegangen am 5. August 1965

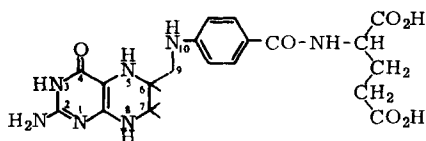
Bei der Umsetzung von *N,N'*-Diaryl-äthylendiaminen mit Phosphoroxychlorid und anderen Phosphorylierungsmitteln mit mindestens zwei aktiven Funktionen entstehen cyclische Diamidophosphate (*N,N'*-disubstituierte 1.3.2-Diazaphospholidine). Es wurden Salze, freie Säuren und Ester dieses Typs dargestellt. Die Salze sind in alkalischer Lösung stabil, in saurer werden sie zu Amin und anorganischem Phosphat hydrolysiert. Im Gegensatz zu den Fünfring-Diesterphosphaten (1.3.2-Dioxaphospholanen) ist dabei eine ringoffene Zwischenstufe nicht nachweisbar. Die Hydrolysekonstanten bei pH 3, 4 und 5 in verschiedenen Puffern wurden gemessen. — Die Spaltung der Verbindungen wird durch 0.1–1 *m* Formiat erheblich beschleunigt. Dabei entstehen in bis zu 70-proz. Ausbeute *N*-Formyl-*N,N'*-diaryl-äthylendiamine. Auch nichtcyclische Amidophosphate von Anilin und Methylanilin mit noch einer weiteren Amid- oder Ester-Funktion werden unter den gleichen Bedingungen formyliert. — Die Annahme eines *N*-Phosphats der Tetrahydrofolsäure als Zwischenstufe der enzymatischen Bildung von 10-Formyl-tetrahydrofolsäure ist also vom chemischen Standpunkt sinnvoll.

5.6.7.8-Tetrahydro-folsäure^{2a)} wirkt im Stoffwechsel bekanntlich als Coenzym der Übertragung von Einkohlenstoffkörpern¹⁾. C₁-Einheiten auf der Oxydationsstufe einer Methyl-, Hydroxymethyl- und Formyl-Gruppe werden durch die Bindung an den Cofaktor zur Übertragung aktiviert und können auch, an den Cofaktor gebunden, ineinander umgewandelt werden. Die chemische Strukturaufklärung der entsprechenden Wirkform ergab, daß die aktivierte Gruppe stets an die N-Atome 5 oder 10 bzw. an beide (überbrückend) gebunden ist. Die Äthylendiamingruppierung an C-6 und C-9 stellt demnach das Wirkzentrum des Co-

¹⁾ II. Mitteilung: E. Brode und L. Jaenicke, *Biochem. Z.* **332**, 259 (1960); letzte Zusammenfassungen: L. Jaenicke und C. Kutzbach, in L. Zechmeister, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Bd. XXI, S. 184, Springer-Verlag, Wien 1963; S. H. Mudd and G. L. Cantoni, in M. Florkin und E. H. Stoltz, *Comprehensive Biochemistry*, Bd. 15, S. 1, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1964.

²⁾ Aus der Dissertation C. Kutzbach, Univ. Köln 1965; siehe auch L. Jaenicke und E. Brode, *Liebigs Ann. Chem.* **624**, 120 (1959).

^{2a)} Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat; ADP = Adenosindiphosphat; E = Enzym; FH₄ = 5.6.7.8-Tetrahydro-folsäure; P = anorganisches Phosphat.



5,6,7,8-Tetrahydro-folsäure

faktors dar. Diese Auffassung wurde durch die Synthese von *N,N'*-Diaryl-äthylendiaminen bestätigt, deren chemische Reaktionen einige interessante Parallelen zu den Eigenschaften des Cofaktors zeigen ^{2,3)}.

Eine andere Folat-abhängige Reaktion, deren Mechanismus aber noch nicht vollständig geklärt ist, ist die Aktivierung der Ameisensäure nach folgender Gleichung:



Das die Reaktion katalysierende Enzym, die Formyl-FH₄-Ligase (ADP) (E.C.6.3.4.3) wurde bisher aus der Leber von Taube⁴⁾, Schaf⁵⁾ und Huhn⁶⁾ sowie aus *Micrococcus aerogenes*⁷⁾ und Erythrozyten⁸⁾ angereichert und aus *Clostridium cylindrosporium* kristallin gewonnen⁹⁾. Die kinetische Untersuchung der Reaktion mit dem kristallisierten Enzym gab keinen Hinweis für das Auftreten einer Zwischenstufe mit neuen kovalenten Bindungen und führte zur Formulierung eines „konzertierten Mechanismus“¹⁰⁾, in dem alle drei Substrate in *einem* Schritt in die drei Produkte umgewandelt werden.

Dagegen wurden die Ergebnisse ähnlicher Versuche mit den Enzympräparaten aus *Micrococcus aerogenes* und Taubenleber unter Annahme eines enzymgebundenen FH₄-Phosphats als Zwischenstufe und dem folgenden Ablauf der Gesamtreaktion gedeutet¹¹⁻¹³⁾:



Es ließ sich aber weder eine phosphorylierte Folatverbindung abfangen, noch gelang es, ein enzymatisch aktives FH₄-Phosphat zu synthetisieren; alle Phosphorylierungsversuche an Tetrahydrofolsäure ergaben bisher nur undefinierte Zersetzungsprodukte.

Für die Struktur des postulierten Zwischenproduktes wurde von *Huennekens* und Mitarbeitern¹¹⁾ eine N-10-Phosphoryl-Verbindung, von *Jaenicke* und *Brode*¹³⁾ auf Grund kinetischer Untersuchungen der enzymatischen Reaktion ein cyclisches N-5—N-10-Diamidophosphat vorgeschlagen. Bei diesem Stand des Problems schienen uns nun Modellreaktionen

³⁾ E. Brode und L. Jaenicke¹¹⁾.

⁴⁾ L. Jaenicke und E. Brode, Biochem. Z. **334**, 108 (1961).

⁵⁾ E. Brode und L. Jaenicke, Biochem. Z. **334**, 328 (1961).

⁶⁾ C. Kutzbach, Dissertation Univ. Köln 1965.

⁷⁾ H. R. Whiteley, M. J. Osborn und F. M. Huennekens, J. biol. Chemistry **234**, 1538 (1959).

⁸⁾ J. R. Bertino, B. Simmons und D. M. Donohue, J. biol. Chemistry **237**, 1314 (1962).

⁹⁾ J. C. Rabinowitz und W. E. Pricer jr., J. biol. Chemistry **237**, 2898 (1962).

¹⁰⁾ R. H. Himes und J. C. Rabinowitz, J. biol. Chemistry **237**, 2915 (1962).

¹¹⁾ H. R. Whiteley und F. M. Huennekens, J. biol. Chemistry **237**, 1290 (1962).

¹²⁾ L. Jaenicke, E. Brode und B. Rücker, Biochem. Z. **334**, 342 (1961).

¹³⁾ E. Brode und L. Jaenicke, Liebigs Ann. Chem. **647**, 174 (1961).

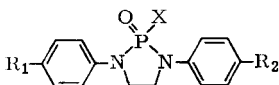
geeignet, zum mindesten um festzustellen, ob derartige Phosphate existenzfähig sind und die geforderten chemischen Eigenschaften haben.

Die vorliegende Arbeit behandelt die Synthese cyclischer Diamidophosphate von Diaryläthylendiaminen und einige ihrer Eigenschaften, insbesondere ihre Spaltung mit Formiat in wäbrigem Milieu zu *N*-Formyl-*N,N'*-diaryl-äthylendiaminen.

Ergebnisse

Ausgangsmaterialien für die Phosphorylierungen waren *N,N'*-Diphenyl-äthylendiamin und *N,N'*-Bis-[4-methoxycarbonyl-phenyl]-äthylendiamin²⁾ sowie *N*-[4-Chlorphenyl]-*N'*-[4-methoxy-phenyl]-äthylendiamin. Die Verbindungen setzen sich mit überschüssigem Phosphoroxchlorid nahezu quantitativ zu cyclischen Diamidophosphorsäurechloriden um, die bei alkalischer Hydrolyse auch noch das letzte Chloratom austauschen. Aus diesen Lösungen können die cyclischen Diamidophosphorsäuren durch Ansäuern ausgefällt werden. Die dargestellten Verbindungen sind in Tabelle 1 mit einigen Eigenschaften aufgeführt. Die UV-Spektren unterscheiden sich nur wenig von denen der unsubstituierten Amine. Wie bei allen aromatischen Aminen mit elektronenanziehenden Substituenten im Phenylkern findet man das Maximum ein wenig nach kürzeren Wellenlängen verschoben; die Extinktion ist dagegen erhöht. In den IR-Spektren findet man zusätzlich zu den nur wenig veränderten Banden des Amins die P—O-Valenzschwingung im Bereich 1270—1280 cm⁻¹ und eine schwächere Bande bei 710—740 cm⁻¹, die vermutlich einer P—N-Valenzschwingung zukommt¹⁴⁾.

Tabelle 1. Cyclische Diamidophosphate der Formel



Nr.	Verbindung	Schmp.	UV-Spektrum	
			$\lambda_{\max}$	$\varepsilon \times 10^{-3} \text{ (l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$
1	$R_1 = R_2 = H; X = Cl$	174.5°	240 m μ	29.8 (Äthanol)
2	$R_1 = R_2 = H; X = OH$	240—245°	247	31.2 (pH 7)
3	$R_1 = Cl; R_2 = OCH_3; X = Cl$	180—183°	246	33.4 (Methanol)
4	$R_1 = Cl; R_2 = OCH_3; X = OH$	225—227°	252	31.2 (pH 7)
5	$R_1 = R_2 = CO_2CH_3; X = Cl$	240—242°	280	38.4 (Methanol)
6	$R_1 = R_2 = CO_2H; X = OH$	350°	289	31.8 (pH 7)

Daß in den freien Säuren die cyclische Struktur noch erhalten ist, ergibt sich neben der Elementaranalyse auch aus der Möglichkeit, den gleichen Diamidophosphorsäurebenzylester einmal aus dem Chlorid und Benzylalkohol, zum anderen aus dem Silber-

¹⁴⁾ L. J. Bellamy, Ultrarotspektrum und chemische Konstitution, D. Steinkopff, Darmstadt 1955, S. 236.

salz der freien Säure und Benzylbromid darzustellen. Für die kinetischen Untersuchungen wurden aus den freien Säuren die wasser- und alkohollöslichen Ammoniumsalze dargestellt. Alkali- und Erdalkali-Salze sind ebenfalls löslich.

Die Verbindungen enthalten den 1.3.2-Diazaphospholidin-Ring, von dem Derivate aus Äthylendiamin bzw. *o*-Phenylendiamin und Phenylphosphorsäuredichlorid¹⁵⁾ bzw. aus Dimethyläthylendiamin und Phosphortrichlorid¹⁶⁾ bereits bekannt sind. Eine ionisierende Verbindung ist bisher noch nicht beschrieben.

Wie schon die Darstellung der freien Säuren aus dem Diamidochlorid zeigt, ist der Ring in alkalischer Lösung stabil; in starker Säure fallen die Diamidophosphorsäuren aus. Im mittleren pH-Bereich wurde die Hydrolyse in verschiedenen Puffern kinetisch verfolgt; die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die papierchromatographische Analyse hydrolysierender Ansätze zeigte immer nur die Ausgangsverbindungen und anorganisches Phosphat. Ein Monoamidophosphat als Zwischenstufe der Hydrolyse wäre in den benutzten Solventien mit Sicherheit gefunden worden. Daraus ist zu schließen, daß die zweite Stufe der Hydrolyse in Amin und Phosphat schneller verläuft als die Ringöffnung, so daß sich die Zwischenstufe nicht in nachweisbarer Konzentration bildet. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu dem cyclischer Fünfring-Diesterphosphate¹⁷⁾, z. B. den Nucleosid-2',3'-cyclophosphaten, deren Ringspannung eine rasche Öffnung des Ringes und Anreicherung der Monoesterphosphate verursacht. Die Fünfring-Diamidophosphate sind demnach offenbar weniger gespannt als die analogen Sauerstoffverbindungen. Andererseits scheint der unsubstituierte zweite Stickstoff des Monoamidophosphats der Diaryläthylendiamine diese Verbindungen besonders instabil zu machen.

Jedenfalls gelang es uns nicht, mit den üblichen Methoden zur Phosphorylierung von Aminen eine derartige Verbindung zu gewinnen. Die bei diesen Versuchen als Zwischenstufe dargestellten Monoamidodiesterphosphate von Dianilinoäthan mit Benzyl-, Phenyl- und β -Cyanoäthyl-Schutzgruppen ließen sich weder hydrogenolytisch noch alkalisch in die gewünschte Verbindung überführen: Stets wurde zugleich mit dem Ester auch die P—N-Bindung gespalten, soweit nicht daneben in geringer Ausbeute (bis zu 5 %) Ringschluß zu den stabilen cyclischen Diamidophosphaten auftrat⁶⁾.

Die Hydrolyse der cyclischen Diamidophosphate wurde meist durch die Geschwindigkeit der Freisetzung von anorganischem Phosphat gemessen; sie kann aber auch spektrophotometrisch verfolgt werden, da die Extinktion des Cyclophosphats bei 250 m μ erheblich höher ist als die der freien Amine. Dieses Verfahren wurde zur Messung der Hydrolyse in phosphathaltigen Puffern benutzt.

In fast allen untersuchten Fällen folgt die Hydrolyse einem Zeitgesetz erster Ordnung, nur bei den schnellsten Zerfällen (in 1 *m* Formiatpuffer pH 3) ist die Kinetik

¹⁵⁾ W. Autenrieth und E. Bölli, Ber. dtsch. chem. Ges. **58**, 2144 (1925).

¹⁶⁾ O. J. Scherer und M. Schmidt, Angew. Chem. **76**, 787 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. **3**, 702 (1964).

¹⁷⁾ P. C. Haake und F. H. Westheimer, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1102 (1961).

nicht mit einer ganzzahligen Ordnung erfaßbar. Wie Tabelle 2 zeigt, beschleunigt Formiatpuffer — in geringerem Maße auch Acetatpuffer — die Hydrolyse. Phosphat (bis 1 *m*) in 0.1 *m* Acetatpuffer (pH 4) hat keinen zusätzlichen Einfluß.

Tabelle 2. Hydrolyse und Formolyse von cyclischen Diamidophosphaten

pH	Puffer	Diamidophosphorsäure 2			Diamidophosphorsäure 4		
		$k \cdot 10^{-3}$ (Min. ⁻¹)	$t_{1/2}$ (Min.)	Formyl- amin	$k \cdot 10^{-3}$ (Min. ⁻¹)	$t_{1/2}$ (Min.)	Formyl- amin
3.0	0.1 <i>m</i> Phthalat	21.9	31.5	—	36	19.5	—
	0.1 <i>m</i> Formiat	59	11.7	7%	29	23	7%
	1.0 <i>m</i> Formiat	77	9	52	115	6	44
4.0	0.1 <i>m</i> Phthalat	3.7	188	—	4.3	155	—
	0.1 <i>m</i> Formiat	6.5	107	13	12	59	11
	1.0 <i>m</i> Formiat	12.8	54	75	23	30	60
	0.1 <i>m</i> Acetat + 1.0 <i>m</i> Phosphat	5.2	135	—	—	—	—
5.0	0.1 <i>m</i> Phthalat	0.65	1070	—	0.95	730	—
	0.1 <i>m</i> Formiat	0.77	900	15	1.4	490	11
	1.0 <i>m</i> Formiat	2.1	330	70	3.7	185	55
6.0	1.0 <i>m</i> Formiat in Citrat/Phosphat	—	—	70	—	—	—
7.0	1.0 <i>m</i> Formiat in Citrat/Phosphat	—	—	50	—	—	—

Bei der Hydrolyse in Formiatpuffer wird *N*-Formyl-*N,N'*-diaryl-äthylendiamin neben unsubstituiertem Amin gebildet. Die Bildung der Formylverbindung läßt sich leicht verfolgen, indem man die Proben ansäuert und nach 60 Min. die Absorption des gebildeten Diarylimidazolium-Ions²⁾ bei 315 m μ mißt. Die bei vollständiger Hydrolyse maximal erreichten Ausbeuten an Formylamin sind in Tabelle 2 ebenfalls vermerkt. Bei der dünn-schichtchromatographischen Analyse der Reaktionsprodukte der Hydrolyse in Acetatpuffer wurde dagegen nur das unsubstituierte Amin gefunden.

Abbildung 1 zeigt die Hydrolysekurven für das *N,N'*-Diphenyl-*N,N'*-cyclophosphat 2 in verschiedenen Puffern (pH 4.0) und die Kinetik der Entstehung des formylierten Amins. Diese ist der jeweils noch vorhandenen Menge an unhydrolysiertem Cyclophosphat proportional. Demgemäß ist die Halbwertszeit der Formylamin-Bildung gleich der Halbwertszeit der Hydrolyse (s. Abb. 1). Setzt man die erreichte maximale Ausbeute = 100%, ergibt sich daraus ein Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung (Abb. 2).

Eine genaue Analyse der Meßwerte zeigt jedoch, daß der zugrundeliegende Mechanismus sowohl der Hydrolyse als auch der Formolyse mit den bisher gewonnenen Daten noch nicht vollständig beschrieben werden kann. Die Hydrolyse in Phthalatpuffer ist der H⁺-Ionenkonzentration nicht direkt proportional: Es liegt also keine einfache Protonenkatalyse vor, vielmehr spricht die pH-Abhängigkeit dafür, daß der Zerfall der undissoziierten Form der Cyclophosphorsäure im untersuchten pH-Bereich den wesentlichen, aber nicht alleinigen Beitrag leistet. Im Gegensatz zu den Monoamidophosphaten ist die monodissoziierte Form der Diamidophosphate stabil, sonst müßte auch im alkalischen Medium Zerfall eintreten.

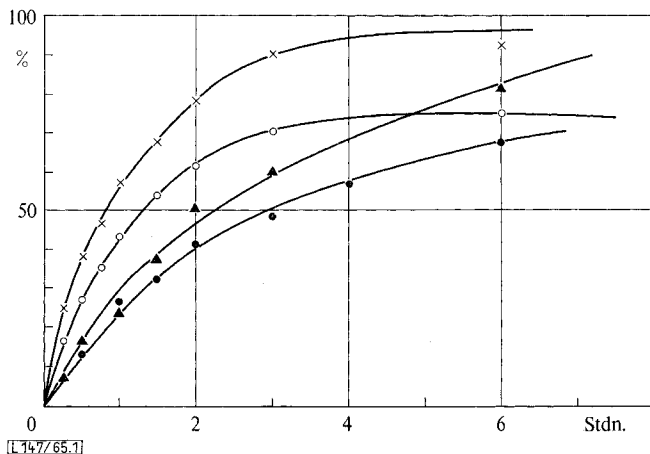


Abbildung 1. Hydrolyse und Formolyse von *N,N'*-Diphenyl-äthylendiamido-phosphorsäure (2) in verschiedenen Puffern: ● Hydrolyse in 0.1 *M* Phthalat (pH 4.0), ▲ Hydrolyse in 0.1 *M* Acetat (pH 4.0), × Hydrolyse in 1.0 *M* Formiat (pH 4.0), ○ Bildung von *N*-Formyl-*N,N'*-diphenyl-äthylendiamin in 1.0 *M* Formiat (pH 4.0)

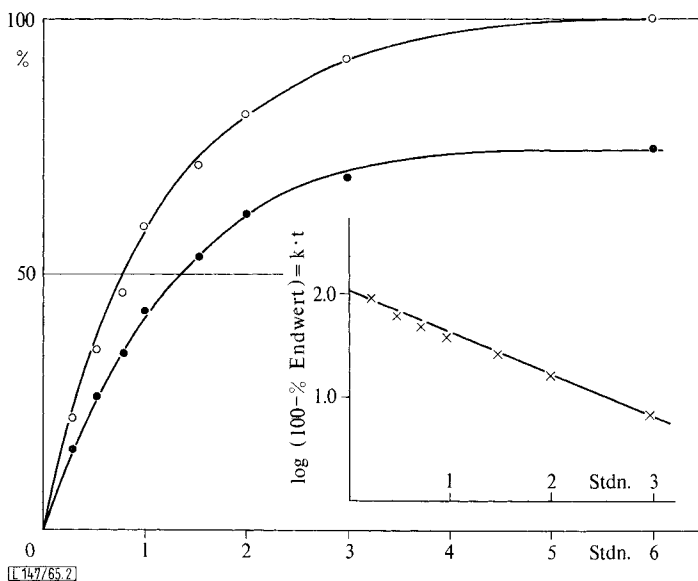
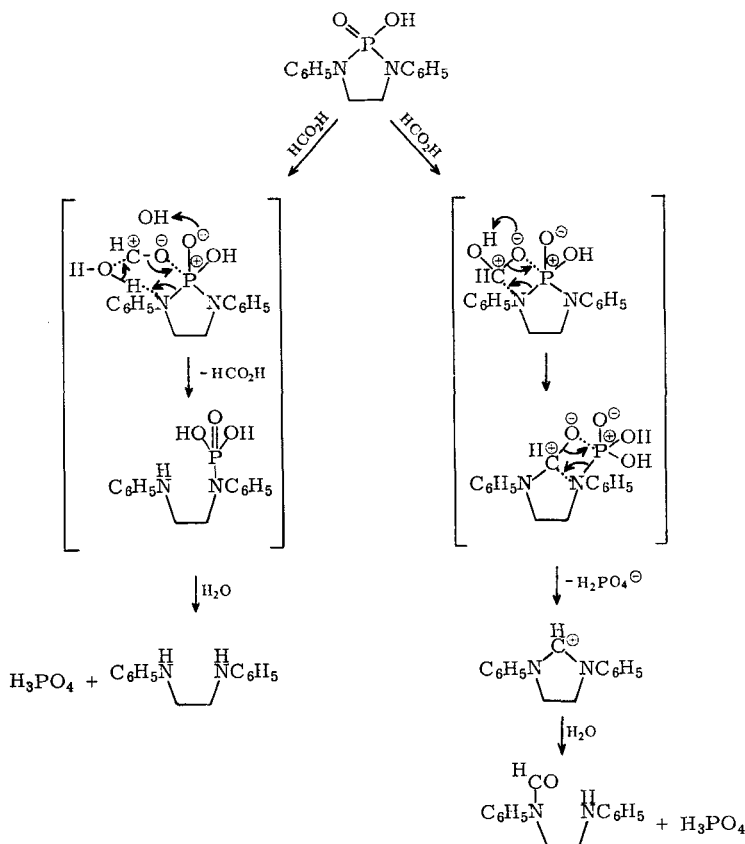


Abbildung 2. Hydrolyse von *N,N'*-Diphenyl-äthylendiamido-phosphorsäure in 1.0 *M* Formiat (pH 4.0); Bildung von *N*-Formyl-*N,N'*-diphenyl-äthylendiamin und Ermittlung von *k*:
○ % Ausbeute, ● % Endwert

Aufgrund seines beschleunigenden Einflusses muß das Formiat in den ersten Schritt der Hydrolyse, also in die Ringöffnungsreaktion, eingreifen. Den Mechanismus kann man sich wie folgt vorstellen:



Der viergliedrige Übergangszustand hat Ähnlichkeit mit dem der Carbonylolefinierung¹⁸⁾. Grundlage der Reaktion ist hier wie dort die Komplexbindung einer Carbonylfunktion an ein P-Atom unter Erweiterung der d-Schale.

Der Reaktionsablauf zeigt ferner Analogie zur Synthese von Formamidinen aus Dimethylformamid, Amin und Phosphoroxchlorid¹⁹⁾. Die Resonanzstabilisierung des Primärproduktes erlaubt hier die Aktivierung des Formiats bereits durch das weniger aktive Phosphorsäureamid. Eine interessante Parallele ist ferner die von *Schmir* und *Zioudrou*²⁰⁾ beschriebene

¹⁸⁾ U. Schöllkopf, Angew. Chem. **71**, 260 (1959).

¹⁹⁾ Vgl. H. Bredereck, R. Gompper, K. Klemm und H. Rempfer, Chem. Ber. **92**, 837 (1959).

²⁰⁾ G. L. Schmir und Ch. Zioudrou, Biochemistry **2**, 1305 (1963).

Beteiligung einer β -ständigen Acylaminogruppe an der Hydrolyse von Phosphatestern. Durch Ringschluß entstehen dabei Oxazoline. Es wäre interessant zu wissen, ob bei dieser Reaktion der Ringsauerstoff (wie die Autoren annehmen) aus der Acylgruppe oder (wie es eine Analogie zu unserem System erfordern würde) aus der Estergruppe stammt.

Das flache Maximum der Ausbeute an formyliertem Amin bei pH 4.0 spricht dafür, daß in der Formylierungsreaktion undissoziierte Ameisensäure der wirksame Partner ist. Offenbar führen aber bei der Formolyse der Cyclophosphate nicht alle Angriffe der Ameisensäure zur Bildung des formyliertenamins. Wie Tabelle 2 zeigt, bringt 0.1 *m* Formiat bereits eine erhebliche Beschleunigung der Hydrolyse, jedoch nur eine geringe Ausbeute an Formylamin, die erst bei 1 *m* Formiat 50% übersteigt. Für die Einwirkung des Formiats muß also noch ein zweiter Vorgang angenommen werden, der nur eine Beschleunigung der Hydrolyse bewirkt; das obige Formelschema enthält einen Vorschlag, der den Beobachtungen genügt. Mit steigender Formiatkonzentration verschiebt sich das Verhältnis der beiden Mechanismen zugunsten höherer Ausbeuten an Formylamin, sei es infolge zurückgedrängter Dissoziation der Ameisensäure oder durch erhöhte Ionenstärke. Die beschleunigende Wirkung des Acetats muß ähnlich interpretiert werden.

Die Formylierungsreaktion des Cyclophosphats enthält als mögliche, rasch durchlaufende Zwischenstufe ein *N*-Formyl-*N'*-phosphoryl-*N,N'*-diaryl-äthylendiamin. Versuche zur Synthese dieser Verbindung durch Phosphorylierung von Formyl-dianilinoäthan mit POCl_3 ergaben ein Produkt, das nur papierchromatographisch gereinigt werden konnte. Eine Analyse des Eluats ergab das geforderte Verhältnis Formyl-dianilinoäthan zu Phosphat = 1 : 1. Unterhalb pH 10 zerfällt die Lösung sehr rasch unter Abscheidung des Formylamins.

Die Sonderstellung des Formiats in der Formamidbildung aus den Amidophosphaten ist auf das wäßrige System beschränkt. In unpolaren Lösungsmitteln, etwa unter den Bedingungen der Peptidsynthese mit *N*-phosphorylierten Aminosäuren²¹⁾, geben auch Essigsäure und Benzoesäure mit der Cyclophosphorsäure ein Monoacetyl- bzw. Monobenzoyl-Derivat des Dianilinoäthans. Die Reaktion verläuft auch in siedendem Toluol sehr langsam und ist zu etwa 50% von einer einfachen Spaltung begleitet. Neben dem unsubstituierten Amin findet man aber nur Monosubstitutionsprodukte: Es findet keine Disubstitution statt. Da die cyclischen Phosphorsäuren leicht zugänglich sind, könnte es aussichtsreich sein, die Darstellung der durch direkte Acylierung nur als Nebenprodukt der disubstituierten Verbindungen erhältlichen Monoacyl-diaryl-äthylendiamine auf diesem Wege auszuarbeiten.

Andererseits ist die Formylierung von Amidophosphaten in wäßrigem Formiatt-puffer nicht auf die cyclischen Verbindungen beschränkt. Auch andere Amidophosphorsäuren mit einer weiteren Amido- oder Estergruppe, wie Dianilinophosphorsäure, Anilinophosphorsäurephenylester und Methylanilino-phosphorsäure-amid werden in 1 *m* Formiat (pH 4) zu etwa 50% formyliert.

In der enzymatischen Reaktion werden die phosphorylierten Modellverbindungen nicht umgesetzt. Sie hemmen aber die Formylierung der Tetrahydrofolsäure etwas stärker als die unphosphorylierten Modelle⁶⁾.

21) St. Goldschmidt und F. Obermeier, Liebigs Ann. Chem. **588**, 24 (1954).

Diskussion

Modellreaktionen können zeigen, ob ein aus kinetischen Versuchen postulierter Ablauf einer enzymatischen Reaktion vom chemischen Standpunkt aus vertretbar ist. In diesem Sinne wurde der früher¹³⁾ für die Formylase aus Taubenleber postulierte Mechanismus bestätigt. Das cyclische Diamidophosphat hat die Eigenschaften einer aktiven Zwischenstufe, die mit Formiat zu einem Monoformyl-amin reagieren kann. Bei dieser Reaktion entsteht wahrscheinlich zuerst die sehr instabile *N*-Formyl-*N'*-phosphoryl-Verbindung, bei deren Zerfall die Formylgruppe vorübergehend den Imidazolinium-Ring schließt. Es darf angenommen werden, daß die Formolyse eines cyclischen Phosphats der Tetrahydrofolsäure in der gleichen Richtung erfolgt wie die Öffnung des Imidazolinium-Ringes der Anhydroformyl-FH₄. Dann entsteht im ersten Schritt 5-Formyl-10-phosphoryl-FH₄, die als eine weitere Zwischenstufe der enzymatischen Reaktion postuliert wurde, weil bei der Einwirkung von Arsenat 5-Formyl-FH₄ aus den Inkubationen isoliert werden konnte¹³⁾. Der weitere Zerfall dieser Verbindung würde zu 5.10-Methinyl-FH₄ führen, die bekanntlich den Ring ausschließlich zu 10-Formyl-FH₄, dem Produkt der Formylase-Reaktion öffnet.

Es ist aber nicht einmal unbedingt notwendig, ein cyclisches Phosphat für die enzymatische Formylierungsreaktion zu postulieren. Die Versuche mit Dianilinoäthan und Anilin haben gezeigt, daß diese Amine schon durch 1 *m* Formiat bei pH 4 in geringem Maß formyliert werden. Wenn nun zusätzlich — z. B. in einem FH₄-10-phosphat — eine Phosphatgruppe in sterisch günstiger Stellung steht, wird das N-Atom 5 leicht mit dem aktivierten Formiat reagieren. Es entsteht dann wiederum die 5-Formyl-10-phosphoryl-Verbindung, die sich, wie diskutiert, nach einem innermolekularen Mechanismus praktisch irreversibel in die 10-Formyl-Verbindung umwandelt. Durch diesen zweiten Schritt kann die Gesamtreaktion auch dann befriedigend ablaufen, wenn das Gleichgewicht des ersten Formylierungsschrittes ungünstig liegt. Ein solcher Reaktionsablauf deutet sowohl die ¹⁸O-Versuche¹⁰⁾ als auch das Auftreten von 5-Formyl-FH₄ bei der Arsenolyse.

Es sei betont, daß es sich bei diesen beiden Mechanismen stets um eine Aktivierung des Formiat-Carboxyls, nicht des phosphorylierten Aminstickstoffes handelt, dessen Reaktivität für nucleophile Substitutionen ja im Gegenteil durch die Phosphorylierung erheblich vermindert wird. Bei den Modellen kommt aber das aktivierte Formiat nur dadurch in die für eine Substitution erforderliche Nähe des N-Atoms, daß die Aktivierung durch das *N*-Phosphat stattfindet. Das Enzym kann diesen räumlichen Effekt auch auf seine spezifische Weise erreichen, ist also folglich auf eine derartige Zwischenstufe der Reaktion nicht angewiesen.

Wir danken dem *Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung* und dem *Verband der Chemischen Industrie* für die Unterstützung der Arbeit durch Sachmittel und Spenden.

Beschreibung der Versuche

Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Heiztisch gemessen und sind unkorrigiert. *Infrarot-Spektren* wurden in KBr mit dem Infracord 337 Gitterspektrophotometer zwischen 4.000–1.200 und 1.333–400 cm^{-1} aufgenommen. — *UV-Spektren* wurden im Spektralphotometer PMQ II bzw. Spectronic 505 gemessen.

Nicht wasserlösliche Substanzen wurden stets gegen Vergleichssubstanzen an Schichten von Kieselgel G in den folgenden Solventien *chromatographiert*: A. Chloroform:Cyclohexan:Triäthylamin = 3:6:1; B. Chloroform:Cyclohexan = 9:1; C. Chloroform:Methyläthylketon = 8:1. Amine und viele Aminderivate wurden durch Besprühen mit einer 5-proz. Lösung *Kaliumbichromat* in 10 *n* H_2SO_4 sichtbar gemacht, wobei charakteristische Färbungen zwischen gelb, rot und braun auftreten. So nicht anfärbbare Verbindungen zeigten sich durch Fluoreszenzlöschung nach Besprühen mit einer 1-proz. Lösung von *Rhodamin B* als dunkle Flecken unter der UV-Lampe²²⁾.

Die *Papierchromatographie* von Estern und Amiden der Phosphorsäure erfolgte auf Papier Schleicher & Schüll 2043 b (ausgewaschen) in den folgenden Solventien: I. Isopropanol:konz. Ammoniak:Wasser = 6:3:1; II. n-Propanol:konz. Ammoniak:Wasser = 6:3:1; III. n-Propanol:konz. Ammoniak:Wasser = 8:1:1; IV. Isopropanol:Methyläthylketon:Wasser:konz. Ammoniak = 30:30:38:2. — Es wurde aufsteigend mit einer Laufstrecke von 20–25 cm chromatographiert. — Derivate aromatischer Amine wurden durch ihre UV-Absorption erkannt. Phosphathaltige Verbindungen wurden mit Molybdat-Reagenz sichtbar gemacht²⁴⁾. Die R_F -Werte der wichtigsten in dieser Arbeit erwähnten Phosphate sind im Solvens II: Pyrophosphat $R_F = 0.08$; anorg. Phosphat $R_F = 0.17$; Anilino-phosphat $R_F = 0.41$; 2: $R_F = 0.85$; 4: $R_F = 0.92$; 6: $R_F = 0.35$.

C-, H- und N-Bestimmungen wurden im mikroanalytischen Laboratorium des Instituts für Organische Chemie der Univ. München und durch das Mikroanalytische Laboratorium Ilse Beetz, vorm. Dr. A. Schoeller, Kronach/Ofr., ausgeführt.

Bestimmung von anorganischem Phosphat (Modifizierung der von Gomori²³⁾ angegebenen Methode): 1 ccm einer bis zu 0.3 μM Phosphat enthaltenden Probe werden mit 0.2 ccm einer 2.5-proz. Lösung von *Ammoniummolybdat* in 2.5 *n* H_2SO_4 und 0.1 ccm einer 1-proz. Lösung von *Metol* in 3-proz. NaHSO_3 -Lösung vermischt. Nach 20 Min. bei Raumtemperatur wird die Molybdänblau-Färbung in Halbmikroküvetten mit 1 cm Lichtweg bei 720 $\text{m}\mu$ gegen eine Vergleichsprobe ohne Phosphat gemessen und mit Hilfe einer Eichgeraden ausgewertet. 0.3 μM geben eine Extinktion von ungefähr 1.00. Zur Bestimmung von freiem Phosphat neben säurelabilem Amidophosphat wurde dieses Verfahren in der folgenden Weise abgewandelt: Die Probe wird auf 0° gekühlt und mit 2 ccm der Molybdat-Lösung und 3 ccm Isobutanol/Benzol (1:1) versetzt und 30 Sek. geschüttelt. Nach Trennung der Phasen werden 2 ccm der organischen Phase mit 1 ccm Wasser und 0.2 ccm *Metol*-Reduktor-Lösung 10 Sek. extrahiert. Die in der wäßrigen Phase entwickelte Blaufärbung wird wie oben nach 20 Min. photometriert.

²²⁾ Chromatographie, E. Merck AG, Darmstadt o. J.

²³⁾ G. Gomori, J. Lab. clin. Med. 27, 955 (1942) [C. A. 36, 3208 (1942)].

²⁴⁾ F. Cramer, Papierchromatographie, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. 1958.

Bestimmung des Phosphatgehaltes fester organischer Verbindungen: Die Substanz wurde im Reagensglas mit einigen Tropfen konz. *Perchlorsäure* bei ca. 200° verascht. Nach Abkühlen wurden 5 ccm Wasser zugesetzt und zur Hydrolyse von Pyrophosphaten 10 Min. in einem siedenden Wasserbad gehalten. Dann wurde in einem Meßkolben auf 50 ccm aufgefüllt und in dieser Verdünnung anorganisches Phosphat, wie oben angegeben, bestimmt.

Substanzen

N,N'-Diphenyl-äthylendiamin^{*)}, dessen *N*-Formyl- und *N,N'*-Di-formyl-Derivat sowie *N,N'*-Bis-[4-methoxycarbonyl-phenyl]-äthylendiamin wurden im wesentlichen nach Lit.²⁾ dargestellt. Die Ausbeute an *N*-Formyl-*N,N'*-diphenyl-äthylendiamin konnte durch Verwendung 40-proz. statt 98-proz. Ameisensäure bis auf 70% gesteigert werden. *N*-Acetyl- und *N,N'*-Diacetyl-*N,N'*-diphenyl-äthylendiamin wurden zu Vergleichszwecken nach Lit.²⁵⁾ dargestellt.

N-[4-Chlor-phenyl]-*N'*-[4-methoxy-phenyl]-äthylendiamin. ··· 15 g (0.074 Mol) *Chloressigsäure*-[4-chlor-anilid]²⁶⁾ werden mit 75 g (0.61 Mol) *p*-Anisidin in 100 ccm Dioxan 5 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Beim Erkalten kristallisieren 27 g *Hydrochlorid* (Schmp. 187–200°). Man löst in wenig Methanol, alkalisiert mit Kalilauge und fällt durch Zusatz von Wasser *N*-[4-Methoxy-phenyl]-glycin-[4-chlor-anilid] als leicht braune Plättchen aus. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus Methanol/Wasser 14.8 g (69%), Schmp. 114–115°.

$C_{15}H_{16}ClN_2O_2$ (289.8) Ber. N 9.65 OCH_3 10.6 Gef. N 9.7 OCH_3 10.2

Zur Reduktion des voranstehenden Amids zum Amin²⁷⁾ werden 14.5 g in absol. Tetrahydrofuran unter Feuchtigkeitsausschluß und Rühren in eine Suspension von 5.6 g $LiAlH_4$ in absol. Tetrahydrofuran (400 ccm) eingetropft. Danach wird gekocht, bis eine entnommene Probe kein Ausgangsmaterial mehr enthält (ca. 5 Stdn., Dünnschichtchromatogramm). Anschließend wird überschüssiges $LiAlH_4$ durch die ber. Menge Natronlauge und Wasser unter Eiskühlung zersetzt. Man saugt vom Aluminiumhydroxid ab und wäscht mit warmem Tetrahydrofuran nach. Es wird eingengt, der ölige Rückstand in 50 ccm Methanol aufgenommen und das *Hydrochlorid* mit 100 ccm konz. Salzsäure gefällt und abgenutscht. Man setzt das Diaryldiamin mit Kalilauge frei und nimmt in Chloroform auf. Nach dem Trocknen über $MgSO_4$ wird i. Vak. abgedampft und der Rückstand aus CCl_4 /Cyclohexan umkristallisiert. 10.5 g (78%); Schmp. 88–91°.

$C_{15}H_{17}ClN_2O$ (275.8) Ber. N 10.15 OCH_3 11.2 Gef. N 10.38 OCH_3 11.47

N,N'-Diphenyl-äthylendiamido-phosphorsäurechlorid (1.3-Diphenyl-2-chlor-1.3.2-diazaphospholidin-2-oxid, 1). ··· 15 g *N,N'*-Diphenyl-äthylendiamin (Dianilinoäthan) werden mit 20 ccm $POCl_3$ (Überschuß) in 20 ccm Xylol unter Rückfluß erhitzt, bis sich das anfangs ausgefallene Amin-hydrochlorid unter HCl-Entwicklung umgesetzt hat (ca. 3 Stdn.). Sodann wird Xylol + überschüssiges $POCl_3$ i. Vak. abdestilliert und der feste Rückstand in warmem Benzol gelöst. Beim Abkühlen fällt das Produkt aus; durch Zusatz von Petroläther wird eine weitere Fraktion

*) Im folgenden auch kurz als *Dianilinoäthan* bezeichnet.

²⁵⁾ C. A. Bischoff und O. Nastvogel, Ber. deutsch. chem. Ges. **22**, 1783 (1889).

²⁶⁾ Dargestellt nach A. J. Hill und E. B. Kelsey, J. Amer. chem. Soc. **44**, 2357 (1922).

²⁷⁾ Es wurde nach R. Schröter, in Houben-Weyl-Müller, Methoden der organischen Chemie, 4. Aufl., Bd. 11/1, S. 341, G. Thieme-Verlag, Stuttgart 1957, verfahren.

gewonnen. 17.2 g (82 %) Nadeln, Schmp. 171—174°. Ein Teil wurde durch Umkristallisieren aus Benzol gereinigt: Schmp. 174.5°.

$C_{14}H_{14}ClN_2OP$ (292.7) Ber. N 9.57 P 10.6

Gef. 9.35 11.4 Mol.-Gew. 275 (nach Rast)

N,N'-Diphenyl-äthylendiamido-phosphorsäure (2). — 5 g Chlorid **1** werden mit 30 ccm 2*n* Natronlauge und 30 ccm Aceton als Lösungsvermittler 2 Stdn. unter Rückfluß hydrolysiert. Anschließend wird am Rotationsverdampfer auf ca. 20 ccm eingeeengt und 2mal ausgeäthert. Durch tropfenweise Zugabe von Eisessig unter Rühren wird anschließend die Säure in feinen Kristallen ausgefällt. Man nutsch ab, wäscht mit Alkohol und Äther und trocknet. 4.3 g (90 %); Schmp. 240—245° (Zers.). Nach Umkristallisieren aus wasserhaltigem Dimethylformamid unterhalb 120°: Blättchen, Schmp. 240—245°.

$C_{14}H_{15}N_2O_2P$ (274.2) Ber. N 10.2 P 11.3 Gef. N 10.2 P 10.9

Ammoniumsalz: Durch Zugabe von Dioxan zu einer konz. Lösung von 6.5 g **2** in *Ammoniak*; umkristallisierbar aus Dioxan/Wasser. 7.0 g nach Trocknen über $CaCl_2$ bei 14 Torr (beim Trocknen über P_2O_5 bei 130°/0.2 Torr tritt Zersetzung ein). Schmp. 245° (Zers.). Nach der Analyse kristallisiert das Salz mit $1/2$ Mol. Dioxan. Das Präparat ist wasserfrei (Karl-Fischer-Titration).

$C_{14}H_{18}N_3O_2P \cdot 1/2 C_4H_8O_2$ (335.4) Ber. C 57.15 H 6.61 N 12.53 P 9.24

Gef. 57.44 6.60 12.47 9.43

57.09 6.53 12.65 9.86

Cyclohexylammoniumsalz: Durch Zugabe eines Überschusses von *Cyclohexylamin* zur Lösung von 100 mg **2** in heißem Dimethylformamid und Abkühlen: 120 mg feine Nadelchen vom Schmp. 232—235° (Zers.).

$C_{20}H_{28}N_3O_2P$ (373.4) Ber. N 11.25 P 8.3 Gef. N 11.43 P 8.18

Benzylester: a) 300 mg (ca. 1 mMol) **1** werden mit einer Lösung von *Natriumbenzylat* [aus 110 mg (ca. 1 mMol) Benzylalkohol und 25 mg Natrium] in 5 ccm Aceton 1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Es wird vom Natriumchlorid abgefiltert und mit Wasser gefällt. Nach Umkristallisieren aus Methylenchlorid/Petroläther 150 mg (40 %) vom Schmp. 137—138°.

$C_{21}H_{21}N_2O_2P$ (364.4) Ber. N 7.7 Gef. N 7.42

b) 2.0 g *Ammoniumsalz* von **2** werden in Methanol gelöst und bis zur vollständigen Fällung mit wäßr. *Silbernitrat*-Lösung versetzt. Das *Silbersalz* von **2** wird abgenutscht und im Dunklen über $CaCl_2$ getrocknet: 1.8 g hellgelbe Nadeln, die sich auch im Dunklen langsam schwarz färben. 1.1 g (ca. 3 mMol) davon werden nach *Cramer*²⁸⁾ mit 500 mg (0.35 ccm, 3 mMol) *Benzylbromid* in 200 ccm absol. Acetonitril 12 Stdn. im Dunklen unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wird filtriert, zur Trockne gebracht, der Rückstand mit etwas Äther digeriert und der ätherunlösliche Teil aus Methylenchlorid/Petroläther umkristallisiert. 300 mg (27 %); Schmp. 136—138°; keine Schmelzpunktsdepression mit der nach a) gewonnenen Verbindung.

N-[4-Chlor-phenyl]-*N'*-[4-methoxy-phenyl]-äthylendiamido-phosphorsäure (4). — 5.5 g *N*-[4-Chlor-phenyl]-*N'*-[4-methoxy-phenyl]-äthylendiamin werden mit 6 ccm $POCl_3$ in 40 ccm

²⁸⁾ F. Cramer und H. Hettler, Chem. Ber. **91**, 1181 (1958).

Xylol 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Analog der Vorschrift auf S. 36 fallen 6.4 g (90%) Diamidophosphorsäurechlorid **3** an, feine Nadeln vom Schmp. 170–178°. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/Petroläther Schmp. 180–183°. 2.0 g des Rohproduktes werden mit je 15 ccm Aceton und 2*n* NaOH 2 Stdn. unter Rückfluß hydrolysiert. Nach Ausfällen mit Alkohol und 10*n* H₂SO₄ 1.7 g (90%) freie Säure **4** vom Schmp. 225–227°.

C₁₅H₁₆ClN₂O₃P (338.7) Ber. P 9.26 Gef. P 9.0, 9.27

Ammoniumsalz: Durch Auflösen in Ammoniak, Eindampfen im Rotationsverdampfer bis zur Trockne und Umkristallisieren aus Dioxan/Wasser; Schmp. 190–215°.

C₁₅H₁₉ClN₃O₃P·1/2 C₄H₈O₂ (399.8) Ber. N 10.5 P 7.75 Gef. N 10.00 P 7.76, 7.16

N,N'-Bis-[4-carboxy-phenyl]-äthylendiamido-phosphorsäure (**6**). – 6 g *N,N'*-Bis-[4-methoxy-carbonyl-phenyl]-äthylendiamin werden mit 6 ccm POCl₃ in 40 ccm Xylol unter Rückfluß erhitzt, bis kein HCl-Gas mehr entweicht. Nach Umkristallisieren des Rohproduktes aus Chloroform 4.2 g (57%) Diamidophosphorsäurechlorid **5**, Nadeln vom Schmp. 240–242°.

C₁₈H₁₈ClN₂O₅P (408.8) Ber. N 6.85 P 7.57 Gef. N 7.03 P 7.20

1.9 g Chlorid werden mit 40 ccm 2.5*n* KOH 18 Stdn. unter Rückfluß erhitzt, wobei alles in Lösung geht. Dabei werden gleichzeitig mit der P–Cl-Bindung die beiden Ester-Bindungen hydrolysiert. Durch Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure wird **6** ausgefällt. 1.6 g (95%); Schmp. 350° (Gelbfärbung ab ca. 210°).

Weitere Umsetzungen

Phosphorylierung von *N*-Formyl-*N,N'*-diphenyl-äthylendiamin: Man löst 2.4 g (0.01 Mol) *N*-Formyl-*N,N'*-diphenyl-äthylendiamin in 10 ccm Chloroform + 10 ccm Triäthylamin und tropft bei –50° unter Rühren 1.36 ccm (0.015 Mol) POCl₃ hinzu. Sodann wird unter Feuchtigkeitsschluß zuerst bei Raumtemperatur und dann bei 30° je 2 Stdn. weitergerührt. Triäthylamin und Chloroform werden anschließend i. Vak. möglichst weit abgedampft, der dunkle Rückstand vorsichtig in 20 ccm 5*n* KOH + 20 ccm Aceton + Eis eingetragen und 1 Stde. gerührt. Nach Abziehen von Aceton und Triäthylamin im Rotationsverdampfer scheidet sich nicht umgesetztes Amin ab, das durch Ausäthern abgetrennt wird (1.3 g). Die stark alkalische, wäßr. Lösung (45 ccm) trübt sich bei 0° langsam. (Die Trübung wird dünn-schichtchromatographisch als Mischung aus Formyl-dianilinoäthan und freiem Dianilinoäthan identifiziert. In der phosphorylierten Verbindung ist also offenbar auch die Formylgruppe labilisiert.) Bringt man Proben der wäßr. Lösung auf pH < 10, so erfolgt die Abscheidung der Amine in wenigen Minuten vollständig; papierchromatographisch ist dann nur noch anorganisches Phosphat in der Lösung nachweisbar.

Ein Drittel der Lösung wird mit 5 ccm konz. Ammoniak und 100 ccm absol. Äthanol in der Kälte versetzt und dadurch der größte Teil des anorganischen Phosphats und Chlorids gefällt. Eine Probe des Überstandes zeigt bei Papierchromatographie neben anorganischem Phosphat und einigen organischen Phosphaten mit höheren *R_F*-Werten im Solvens I eine starke Zone bei *R_F* = 0.45, die organisch gebundenes Phosphat enthält und nach Besprühen mit Säure stark fluoresziert. Aus einem Chromatogramm wurde diese Zone mit halbkonz. Ammoniak, dem einige Tropfen 2*n* NaOH zugesetzt waren, eluiert und ihr UV-Spektrum gegen ein Blindeluat gemessen: Maximum bei 243 mμ, das nach Ansäuern innerhalb weniger Minuten

in das Spektrum des *N,N'*-Diphenyl-imidazoliniumchlorids (Produkt aus Formyl-dianilinoäthan und HCl) übergeht (Maximum bei 313 m μ , Verhältnis $E_{313}/E_{245} = 8.5$). Unter der Voraussetzung vollständiger Elution der Zone wurde errechnet, daß 12% des eingesetzten Formylamins in die mit $R_F = 0.45$ laufende *N*-Formyl-*N'*-phosphoryl-Verbindung umgewandelt worden waren. Aus einem weiteren Chromatogramm im Solvens II bei 4° wurde die (hier mit $R_F = 0.62$ laufende) Zone mit 0.1 *n* HCl eluiert. Im Eluat wurde die Absorption bei 313 m μ und anorganischem Phosphat bestimmt. Aus je 2 unabhängigen Bestimmungen ergab sich ein Verhältnis von 0.206 μ M/ccm *N*-Formyl-dianilinoäthan und 0.185 μ M/ccm Phosphat.

Chromatographische Analyse der Hydrolyseprodukte: Das Ammoniumsalz der *N,N'*-Diphenyl-äthylendiamido-phosphorsäure (**2**) (25 μ M/ccm) in 0.1 *m* Phthalat-/1 *m* Acetat- bzw. 1 *m* Formiat-Puffer (pH 4) wurde im Thermostaten bei 50° inkubiert. Nach 1, 3 und 8 Stdn. wurden Proben entnommen und die Hydrolyse durch Zusatz von Ammoniak abgestoppt. Die Proben wurden dann im Solvens II papierchromatographiert: Alle zeigten nur anorganisches Phosphat ($R_F = 0.15$) in steigender und das Ausgangsmaterial ($R_F = 0.85$) in abnehmender Menge, kein weiteres Phosphat. — Nach 12 Stdn. wurde der Rest der Lösung stark alkalisch gemacht und ausgeäthert. Die Extrakte wurden im Solvens I dünn-schichtchromatographiert. Mit Hilfe der Vergleichssubstanzen wurde in dem Formiat-gepufferten Ansatz *Dianilinoäthan* und *N*-Formyl-dianilinoäthan identifiziert, der Phthalatpuffer- und der Acetatpuffer-Ansatz zeigte nur das unsubstituierte Amin.

„Formolyse“ des cyclischen Diamidophosphates: 335 mg (1 mMol) des Ammoniumsalzes von **2** wurden in 10 ccm Wasser gelöst und dann 10 ccm 2 *m* Formiat-Lösung zugesetzt; anschließend wurde pH 7 eingestellt. Die Mischung wurde 12 Stdn. bei 80° gehalten, dann stark alkalisch gemacht und das ausfallende Amin ausgeäthert. Die Ätherphase wurde im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, der Rückstand in heißer, verdünnter Salzsäure aufgenommen. Beim Abkühlen fiel *N,N'*-Diphenyl-imidazoliniumchlorid aus: Ausbeute 53 mg (20%).

Umsetzung des cyclischen Diamidophosphates mit organischen Säuren nach Goldschmidt²¹): Je 274 mg (1 mMol) **2** wurden einmal mit 244 mg (2 mMol) Benzoesäure, zum anderen mit 120 mg (2 mMol) Eisessig in 5 ccm Toluol 5 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Das Ausgangsmaterial ging nicht vollständig in Lösung. Toluol wurde abgezogen und der Rückstand mit verd. Ammoniak aufgenommen und Ungelöstes mit Äther extrahiert. Die wäßrige Phase gab im Papierchromatogramm Phosphatreaktion bei den R_F -Werten von anorganischem Phosphat und Ausgangsmaterial. In der äther. Phase wurden durch Dünnschichtchromatographie im Solvens II mit Hilfe von Vergleichssubstanzen *Dianilinoäthan* und *N*-Benzoyl-dianilinoäthan bzw. *N*-Acetyl-dianilinoäthan nachgewiesen. Die acylierten Amine wurden durch Elution der entsprechenden Zonen in kleiner Menge rein gewonnen und durch Mischschmelzpunkte identifiziert. Die Ausbeuten (geschätzt) betrugen ca. 40% für die Benzoyl- und ca. 30% für die Acetyl-Verbindung.

Die benzylierten Derivate des *Dianilinoäthans* wurden wie folgt dargestellt: 2.1 g *Dianilinoäthan* werden mit 2 g (Überschuß) Benzoylchlorid in 30 ccm Toluol 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Das abgeschiedene Hydrochlorid wird abgenutscht, das Filtrat mit verd. Natronlauge mehrmals ausgeschüttelt, getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Der feste Rückstand gibt, aus Benzol umkristallisiert, 1.5 g (72%) der *N,N'*-Dibenzoyl-Verbin-

dung, Nadeln vom Schmp. 193–196°. Zur Gewinnung des *Mono-Substitutionsproduktes* werden in gleicher Weise 2.1 g (0.01 Mol) Dianilinoäthan mit 700 mg (0.005 Mol) Benzoylchlorid umgesetzt. Das Filtrat zeigt im Dünnschichtchromatogramm (Solvens III) neben Ausgangsmaterial und der Dibenzoyl-Verbindung eine weitere mit dazwischenliegendem R_F . Durch Trennung des Gemisches an einer Kieselgel-Säule mit Chloroform als Eluens wurde diese ausfraktioniert und aus Petroläther umkristallisiert. 180 mg (6%) Nadeln vom Schmp. 127–128°.

$C_{21}H_{20}N_2O$ (316.4) Ber. N 8.86 Gef. N 8.96

Umsetzung nichtcyclischer Amidophosphate mit Formiat: Für diese Versuche wurden nach Lit.²⁹⁾ bzw. Lit.³⁰⁾ synthetisiert: *Phosphorsäure-monoamid-monomethylanilid* vom Schmp. 137° (Lit.²⁹⁾ 125°); $R_F = 0.80$ (Solvens IV); *Phosphorsäure-dianilid* vom Schmp. 170–180° (Lit.²⁹⁾ 213°, $R_F = 0.95$ (Solvens IV); *Phosphorsäure-phenylester-anilid* vom Schmp. 128 bis 130° (Lit.²⁹⁾ 137°, $R_F = 0.92$ (Solvens IV); *Anilinphosphorsäure* vom Schmp. ab 220° (Lit.³⁰⁾ 276–277°, Zers.). Das Produkt zeigte im Papierchromatogramm im Solvens IV eine Verunreinigung durch anorganisches Phosphat, jedoch nur ein UV-absorbierendes Phosphat mit $R_F = 0.45$). — Je 50 mg der *disubstituierten Phosphorsäuren* und 20 mg der *Anilinphosphorsäure* wurden in möglichst wenig verd. Ammoniak gelöst, die Lösung mit verd. Salzsäure neutralisiert und mit je 5 ccm 1 *m* Formiatpuffer pH 4.0 versetzt. Die Proben wurden 20 Stdn. im Thermostaten bei 50° inkubiert. Vergleichsansätze enthielten Anilin und Methylanilin im gleichen Puffer. Die papierchromatographische Analyse zeigte, daß alle Proben nach Ablauf dieser Zeit vollständig hydrolysiert waren. Durch Zusatz von Kalilauge wurden die gebildeten Amine abgeschieden, ausgeäthert und mit Formanilid und *N*-Methyl-formanilid als Vergleichssubstanzen in Dünnschicht im Solvens C (s. S. 35) chromatographiert. Die Anfärbung erfolgte mit dem Chromschwefelsäurereagenz; *N*-Methyl-formanilid färbt sich erst ca. 30 Min. nach dem Besprühen langsam an. R_F -Werte: Formanilid 0.4; Anilin und *N*-Methyl-formanilid 0.5; *N*-Methyl-anilin 0.5. *Ergebnis:* Phosphorsäure-dianilid und Phosphorsäure-phenylester-anilid bildeten schätzungsweise jeweils 40% Formanilid; Anilinphosphorsäure und freies Anilin aber nur Spuren. Aus Phosphorsäure-monoamid-methylanilid hatten sich ca. 40–50% *N*-Methyl-formanilid gebildet; freies Methylanilin wird nicht formyliert.

Kinetische Untersuchungen

Hydrolyse der cyclischen Diamidophosphate (vgl. Tabelle 2): Die benötigten Puffer wurden doppelt konzentriert angesetzt. Je 10 ccm Puffer wurden mit 8 ccm Wasser verdünnt und im Thermostaten auf 50° erwärmt. Zur Zeit $t = 0$ wurden zu jeder Probe 2 ccm (— 8 μ Mol) einer neutralen auf 50° vorgewärmten Lösung *Cyclophosphat* gegeben. Zu den aus Abb. 1 ersichtlichen Zeiten wurden Proben von 1 ccm entnommen, im Eisbad abgekühlt und anorganisches Phosphat bestimmt. Die gefundenen Meßwerte wurden in % Hydrolyse umgerechnet und in ein Diagramm ($1 - \log \%_t$) gegen t aufgetragen; die dabei gefundenen Geraden bestätigten ein Zeitgesetz 1. Ordnung. Aus ihnen wurden die Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Hydrolyse ermittelt.

²⁹⁾ A. Michaelis, Liebigs Ann. Chem. **326**, 253 (1903).

³⁰⁾ H. G. Cook, J. D. Ilett, B. C. Saunders, G. J. Stacey, H. G. Watson, I. G. E. Wilding und S. J. Woodcock, J. chem. Soc. [London] **1949**, 2921.

Bildung von N-Formyl-dianilinoäthan bei der Hydrolyse in Formiatpuffer: Hierzu wurden aus den zur Messung der Hydrolyse angesetzten Proben aliquote Anteile von 0.6 ccm entnommen und in einer 1-cm-Küvette mit 2.3 ccm Wasser und 0.1 ccm konz. HCl gemischt. Dabei bilden sich aus den *N*-Formyl-*N,N'*-diaryl-äthylendiaminen die entsprechenden Imidazolium-Salze. Nach 60 Min. wurde die UV-Absorption im Maximum (313 m μ für die unsubstituierte Verbindung und 320 m μ für das 4-*Chlor-4'-methoxy*-Derivat) bestimmt und mit Hilfe der molaren Extinktionskonstanten (16.5×10^3 bzw. 20.0×10^3 l $\cdot$ mol $^{-1}$ ·cm $^{-1}$) die gebildeten Konzentrationen (*C*) errechnet. Daraus ergaben sich die Ausbeuten, bezogen auf eingesetztes Cyclophosphat, nach

$$\% = 1250 \cdot C \text{ (}\mu\text{M/ccm)}$$

In Vergleichsansätzen wurde Dianilinoäthan mit den gleichen Puffern inkubiert; es zeigte sich nach Ansäuern nur ein geringfügiger unspezifischer Anstieg der Absorption bei 313 m μ .

Für die Untersuchung des *Einflusses von Phosphat auf die Hydrolysegeschwindigkeit* wurde eine spektrophotometrische Methode benutzt. Sie beruht auf der Extinktionsdifferenz bei 250 m μ zwischen dem unsubstituierten Cyclophosphat ($\epsilon = 31.2 \times 10^3$) und Dianilinoäthan bei pH 4.0 ($\epsilon = 12.0 \times 10^3$). Das bis zur Zeit *t* gebildete Dianilinoäthan bzw. hydrolysierte Cyclophosphat errechnet sich demnach aus

$$C_t = \frac{E_t - E_o}{-19.2 \cdot 10^3}$$

Nach dieser Methode wurde die Hydrolyse mit den folgenden Puffern pH 4.0 untersucht: 0.1 *m* Acetat, 0.1 *m* Phosphat in 0.1 *m* Acetat, 1 *m* Phosphat in 0.1 *m* Acetat. Je 19 ccm dieser Puffer wurden mit 1 ccm einer 10^{-3} *m* Lösung des Cyclophosphats vermischt, bei 50° im Thermostaten inkubiert und die Hydrolysegeschwindigkeit ermittelt. Ergebnis: Die Hydrolyse verläuft in allen drei Puffern mit der gleichen Halbwertszeit von 120 Min. [147/65]