

Wolfgang Voelter, Karl Zech, Wolf Grimminger, Eberhard Breitmaier
und Günther Jung

Die Anwendung der ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie zur Peptidsynthese-Kontrolle

Aus dem Chemischen Institut der Universität Tübingen, D-7400 Tübingen, Wilhelmstraße 33
(Eingegangen am 5. Juni 1972)

Anhand einer achtstufigen Synthese von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester und einiger Dipeptide wird der vorteilhafte Einsatz der Impuls-Fourier-Transform- ^{13}C -NMR-Spektroskopie zur Syntheseüberwachung in der Peptidchemie gezeigt. Die Resonanzen der Asparaginsäure- und Glycinreste und die Signale einiger wichtiger Peptidschutzgruppen können durch Spektrenvergleich von Derivaten zugeordnet werden.

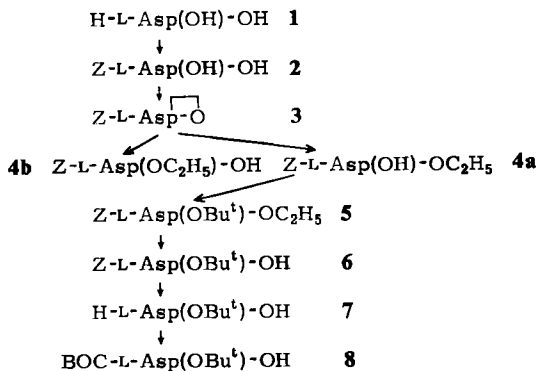
Application of the ^{13}C n.m.r. Spectroscopy to the Control of Peptide Synthesis

The advantage of the pulse Fourier transform ^{13}C n.m.r. spectroscopy for the control of the synthesis of amino acid derivatives and peptide intermediates is shown for the eight step synthesis of *tert*-butyloxycarbonyl aspartic acid β -*tert*-butyl ester and some dipeptides. The resonances of the aspartic acid and glycine residues and the signals of some important protecting groups of peptides can be assigned by comparison of the spectra of derivatives.

Die ^{13}C -Resonanz ist durch die Puls-Fourier-Transform(PFT)-Technik eine Routinemethode der Strukturaufklärung geworden¹⁾. Von uns durchgeführte Synthesen biologisch aktiver Peptide erfordern oft die Darstellung vieler geschützter Aminosäuren und Oligopeptide^{2–7)}. Zur Kontrolle solcher, meist vielstufiger Synthesen kann die ^{13}C -Resonanz zum Teil andere analytische Methoden wertvoll ergänzen, wie im folgenden an einigen typischen Beispielen gezeigt wird.

Ein häufig bei der Festphasentechnik verwendetes Asparaginsäurederivat ist der *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester, der von uns zur Synthese von Teilsequenzen des Secretins⁴⁾, Eledoisins⁶⁾ und Physalaemins⁷⁾ eingesetzt wird. Die Synthese wird nach folgendem Schema durchgeführt⁸⁾.

- 1) E. Breitmaier, G. Jung und W. Voelter, *Angew. Chem.* **83**, 659 (1971); *Angew. Chem. internat. Edit.* **10**, 673 (1971).
- 2) L. Flohé, W. Günzler, G. Jung, E. Schaich und F. Schneider, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **352**, 159 (1971).
- 3) W. Voelter, J. D. Young, M. Shimizu, C. Y. Leung und E. Benjamini, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **352**, 6 (1971).
- 4) G. Jung et al., unveröffentlichte Arbeiten.
- 5) J. D. Young, W. Voelter, M. Shimizu, C. Y. Leung, W. J. Peterson und E. Benjamini, *Peptides*, im Druck.
- 6) W. Voelter, K. Zech, G. Jung und K.-F. Sewing, *Tetrahedron* [London] **28**, 2649 (1972).
- 7) W. Voelter, K. Zech, G. Jung und K.-F. Sewing, *Tetrahedron* [London] **28** (1972), im Druck.
- 8) Abkürzungen nach IUPAC, *Europ. J. Biochem.* **1**, 375 (1967).



Von diesen Verbindungen werden protonenbreitband-entkoppelte 22,628-MHz- ^{13}C -Resonanz-Spektren aufgenommen und die Signale den einzelnen Kohlenstoffatomen durch Spektrenvergleich verschiedener Derivate und unter Berücksichtigung folgender Gesetzmäßigkeiten^{1,9-11)} zugeordnet:

1. Die Resonanzen von Alkan-Kohlenstoffatomen verschieben sich charakteristisch nach tieferem Feld in der Reihe: primär, sekundär, tertiär, quartär. Die Resonanzen von Alkan-Methylgruppen liegen bei -10 bis -30 ppm.

2. Elektronenziehende Gruppen, wie z. B. Stickstoff- und Sauerstoffatome, verursachen bei benachbarten C-Atomen eine drastische Tieffeldverschiebung.

3. Die ^{13}C -Signale der Carboxylgruppen von α -Aminosäuren und Carbonylgruppen von Peptidbindungen liegen zwischen -165 und -185 ppm.

4. Die Carbonylsignale von Schutzgruppen des Urethantyps erscheinen bei wesentlich höherem Feld (≈ 20 ppm) als die in 3. diskutierten Signale.

5. Die Signale aromatischer Kohlenstoffatome liegen von den übrigen Resonanzen gut getrennt bei -110 bis -140 ppm.

Durch ihre eindeutige Information und die relativ schnelle Aufnehmbarkeit von ^{13}C -Spektren kann die PFT- ^{13}C -Kernresonanz die üblichen Methoden (Elementaranalyse, Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, Elektrophorese, Schmelzpunktbestimmung, IR- und UV-Spektroskopie usw.) zumindest bei der Überprüfung von Synthesewenigprodukten oft wesentlich ergänzen. Die Prüfung des Endproduktes auf Einheitlichkeit und Enantiomerenreinheit sollte selbstverständlich mit zusätzlichen Analysemethoden abgesichert werden, da bei der ^{13}C -Resonanz geringe Mengen an Verunreinigungen ($<1\%$) erst nach langer Akkumulationszeit zu beobachten sind. Alle Proben wurden in demselben Lösungsmittel gemessen, um möglichst vergleichbare Bedingungen zu haben.

Beim Übergang von der Asparaginsäure (**1**) zu ihrem Benzyloxycarbonylderivat **2** verschieben sich alle vier Asparaginsäure- ^{13}C -Resonanzen um ≈ 1.5 ppm nach tieferem Feld. Zusätzlich treten die ^{13}C -Signale der Benzyloxycarbonylgruppe auf:

⁹⁾ G. Jung, E. Breitmaier, W. Voelter, T. Keller und C. Tänzer, *Angew. Chem.* **82**, 882 (1970); *Angew. Chem. internat. Edit.* **9**, 894 (1970).

¹⁰⁾ W. Voelter, G. Jung, E. Breitmaier und E. Bayer, *Z. Naturforsch.* **26b**, 213 (1971).

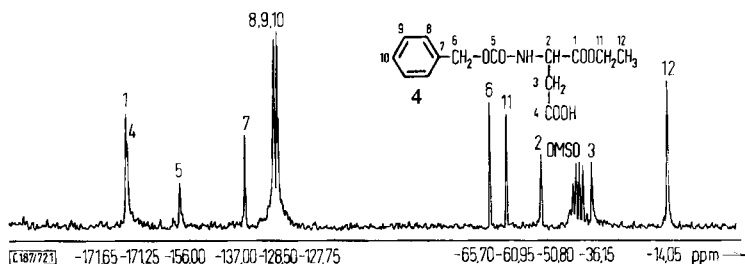
¹¹⁾ G. Jung, E. Breitmaier und W. Voelter, *Europ. J. Biochem.* **24**, 438 (1972).

Tab. ^{13}C -Chemische Verschiebungen von Asparaginsäure- und Glycin- auf Tetramethylsilan

Name		Aminosäuren				Schutzgruppen Z	
		C-1	C-4	C-2	C-3	C=O	CH ₂
H-Asp(OH)-OH	1	-170.35	-171.55	-49.20	-34.85	—	—
Z-Asp(OH)-OH	2	-171.95	-173.05	-50.80	-36.35	-156.20	-65.80
Z-Asp-O	3	-170.10	-172.40	-50.70	-35.00	-156.10	-66.55
Z-Asp(OH)-OC ₂ H ₅	4a	-171.65	-171.25	-50.80	-36.15	-156.00	-65.70
Z-Asp(OBu)-OH	6	-170.75	-174.00	-53.05	—	-155.45	-65.15
H-Asp(OBu)-OH	7	-170.35	—	-50.35	-35.85	—	—
BOC-Asp(OBu)-OH	8	-169.50	-172.85	-50.25	-37.55	—	—
BOC-Asp(OH)-OH	10	-172.50	-173.60	-50.60	-36.70	—	—
H-Gly-OC ₂ H ₅	9	-167.65	—	-39.80	—	—	—
Z-Asp-OC ₂ H ₅	11	-169.80	-171.55	-50.80	-36.80	-155.90	-65.70
Gly-OC ₂ H ₅		-169.50	—	-40.90	—	—	—
Z-Asp-OH	12a	-172.10	-173.40	-50.95	-36.80	-156.20	-65.90
Gly-OC ₂ H ₅		-169.95	—	-41.20	—	—	—
Z-Asp-Gly-OC ₂ H ₅	12b	-172.10	-173.40	-51.70	-36.80	-156.20	-65.90
OH		-169.90	—	-41.20	—	—	—

ein Urethancarbonyl bei -156.2 ppm, dann im Aromatenbereich die Signale des Phenylrestes, die teilweise zusammenfallen, sowie der wegen der Sauerstoffverknüpfung bei relativ tiefem Feld liegende Methylenkohlenstoff.

Der Vergleich von Benzyloxycarbonyl-asparaginsäure **2** mit ihrem inneren Anhydrid **3** läßt keine großen Änderungen der chemischen Verschiebungen erwarten, da der Wasseraustritt keine größeren Ladungsverschiebungen an den Kohlenstoffatomen zur Folge hat. Dasselbe gilt für den Vergleich der Benzyloxycarbonyl-asparaginsäure und ihrem Anhydrid mit dem daraus synthetisierten Benzyloxycarbonyl-asparaginsäure- α -äthylester (**4**).



Abbild. ^1H -Breitband-entkoppeltes PFT- ^{13}C -NMR-Spektrum von Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure- α -äthylester (**4**), 250 mg in 2 cm Hexadeuteriodimethylsulfoxid, 22.63 MHz, 4096 Impulse zu 0.41 Sek. (ppm-Werte bezogen auf TMS ext. = 0)

Derivaten und -Peptiden in Dimethylsulfoxid (ppm-Werte bezogen
extern = 0 ppm)

Z		Schutzgruppen						
C-7	C-(8-10)	BOC C=O	C	CH ₃	OBu ^t C	CH ₃	OC ₂ H ₅ CH ₂	CH ₃
—	—	—	—	—	—	—	—	—
-137.25	-128.70	—	—	—	—	—	—	—
	-127.95							
-136.55	-128.70	—	—	—	—	—	—	—
	-128.15							
-137.00	-128.50	—	—	—	—	—	-60.95	-14.05
	-127.75							
-137.45	-128.35	—	-79.30	-27.85	—	—	—	—
	-127.60							
—	—	—	-82.05	-27.95	—	—	—	—
—	—	-155.25	-78.30	-28.30	-80.25	-27.70	—	—
—	—	-155.80	-78.85	-28.70	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	-61.80	-14.25
-137.00	-128.50	—	—	—	—	—	-60.55	-14.05
	-127.75							
—	—	—	—	—	—	—	-60.85	-14.05
-137.10	-128.10	—	—	—	—	—	—	—
	-128.60							
—	—	—	—	—	—	—	-60.85	-14.35
-137.10	-128.10	—	—	—	—	—	—	—
	-128.60							
—	—	—	—	—	—	—	-60.85	-14.35

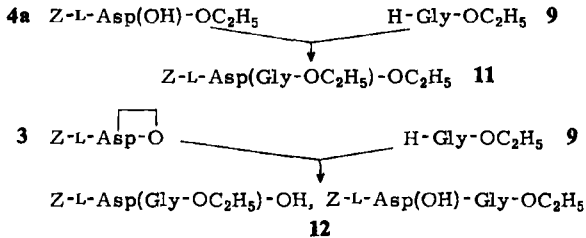
Letzterer wird aber eindeutig durch die bei -60.95 ppm und bei -14.05 ppm auftretenden Signale der Äthylgruppe identifiziert.

Der aus dem α -Äthylester durch Veresterung mit Isobutylen und anschließende Verseifung resultierende β -tert.-Butylester **6** zeigt die Signale der Benzyloxycarbonylgruppe bei nahezu unveränderten ppm-Werten. Die Äthylsignale sind verschwunden. Stattdessen beobachtet man die Resonanzen des tertiären C-Atoms (rel. geringe Intensität, bei -79.3 ppm) sowie der primären C-Atome (größere Intensität, bei -27.85 ppm) der tert.-Butylgruppe.

Die vollständige Hydrierung des Benzyloxycarbonylderivates zeigt sich eindeutig am Fehlen der Phenyl-Resonanzen, sowie der Methylen- und Urethancarbonyl-Resonanz der Benzyloxycarbonylgruppe. Durch den nun vorhandenen dipolaren Charakter des β -tert.-Butylesters **7** der Asparaginsäure treten jetzt wieder chemische Verschiebungen auf, die folgerichtig gut mit den Resonanzen der unsubstituierten Asparaginsäure übereinstimmen.

Die abschließende Einführung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe äußert sich im ¹³C-NMR-Spektrum des Endproduktes **8** am Auftreten zweier zusätzlicher tert.-Butyl-Resonanzen und einer charakteristischen Urethancarbonyl-Resonanz bei -155.25 ppm. Durch Wegfall des dipolaren Charakters erscheinen die beiden Carboxylresonanzen der Asparaginsäure, verglichen mit dem entsprechenden Benzyloxycarbonylderivat, wieder um 3.3 ppm getrennt.

Im folgenden wird die Anwendung der ^{13}C -Kernresonanz bei Peptidsynthesen an den Beispielen folgender Asparaginsäureglycylpeptide demonstriert.



Nach den oben diskutierten Regeln wird die Zuordnung getroffen: Bei tiefstem Feld (-167.65 ppm) liegt die Resonanz der Ester-carbonylgruppe von **9**, bei höchstem Feld das Signal des Methylrestes (-14.25 ppm). Die Resonanz der Methylengruppe des Äthylrestes erscheint bei ähnlichem ppm-Wert (-61.80) wie das entsprechende Signal von **4a**. Die übrigbleibende Resonanz (-39.80) ist somit der Methylengruppe des Glycins zuzuordnen.

Die beim Signalvergleich zwischen Asparaginsäure (**1**) und ihrem Benzyloxycarbonylderivat **2** gefundene Tieffeldverschiebung der Asparaginsäure- ^{13}C -Resonanzen trifft auch für das *N*-tert.-Butyloxycarbonylderivat **10** zu. Die Differenzen betragen $1-2$ ppm. Diese Tieffeldverschiebung dürfte auf den Wegfall des dipolaren Charakters bei **10** zurückzuführen sein. **10** zeigt gegenüber **1** zusätzlich eine Urethancarbonyl-Resonanz bei -155.80 ppm und ferner die Resonanzen eines tertiären und primären Kohlenstoffatoms bei -78.85 bzw. -28.70 ppm.

Durch Vergleich der Spektren von **11** und **2** können die Resonanzen der Kohlenstoffatome der Benzyloxycarbonylgruppe, wie in der Tabelle angegeben, zugeordnet werden (C=O bei -155.90 ppm, CH_2 bei -65.70 ppm und die Kohlenstoffatome des Phenylrestes bei -137.00 , -128.50 und -127.75 ppm). Die Resonanzen der beiden nicht äquivalenten Äthylreste können durch Spektrenvergleich von **11** mit **4a**, **9** und **12** zugeordnet werden; die beiden Methylgruppen verursachen ein intensives Signal bei -14.05 , die beiden CH_2 -Gruppen zeigen getrennte Resonanzen bei -60.85 und -60.55 ppm. Durch einen Vergleich der Resonanzen von **11** mit denen der übrigen hier diskutierten Asparaginsäure- und Glycinderivate können die Signale der Methylenkohlenstoffatome des Asparaginsäurerestes (-36.80 ppm) bzw. Glycinerestes (-40.90 ppm) und die Resonanzen des sekundären C-Atoms (-50.80 ppm) zugeordnet werden. Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist die Zuordnung der Carbonylresonanzen der Carboxylgruppen und Peptidbindungen oft nicht eindeutig möglich, da die Ladungsdichteänderungen am Carbonylkohlenstoff bei Molekülsubstitution noch nicht vorausgesagt werden können.

Durch Spektrenvergleich wird für die drei Carbonylresonanzen von **11** von höherem nach tieferem Feld folgende vorläufige Zuordnung getroffen: Asparaginsäure-äthylester-carbonyl-, Glycinäthylester-carbonyl- und Peptidcarbonyl-Kohlenstoffatom.

Beim Dipeptidgemisch **12** werden analog zu **11** die Resonanzen der Benzyloxycarbonylgruppen, der Äthylreste und der Methylenkohlenstoffatome des Asparaginsäurerestes bzw. Glycinerestes zugeordnet. Bei der derzeitigen Auflösung des Geräts

scheint der Einfluß auf die chemische Verschiebung all dieser Signale durch die α - und β -ständige Peptid-Glycinerstergruppe gleich groß zu sein. Lediglich die Resonanzen der α -C-Atome beider Dipeptide erscheinen bei verschiedenen ppm-Werten. Statt 6 zeigt der Carbonylbereich nur 3 Signale. Vorläufig wird das Signal bei höchstem Feld dem Glycinäthylester-Carbonylkohlenstoff und die beiden bei tieferem Feld liegenden Resonanzen den Carbonylkohlenstoffatomen der Asparaginsäurereste zugeordnet.

Beschreibung der Versuche

Alle Schmp. sind unkorrigiert. Dicyclohexylcarbodiimid, Dicyclohexylamin (beide mit dem Reinheitsgrad „Zur Synthese“) und Asparaginsäure (für biochemische Zwecke), sowie die Lösungsmittel p. a. sind Produkte der Firma E. Merck AG, Darmstadt. Der Chlorameisensäure-benzylester stammt von der EGA-Chemie AG, Steinheim. Zur Dünnschichtchromatographie werden DC-Fertigplatten, Kieselgel F 254, E. Merck AG, Darmstadt, verwendet.

Äthanol wird über Calciumoxid vorgetrocknet, destilliert und das Destillat durch ein Grignardreagens vollständig von Wasser befreit. Dicyclohexylcarbodiimid wird durch Hochvakuumdestillation und Dimethylformamid durch azeotrope Destillation (Dimethylformamid (250 g) : Benzol (30 g) : Wasser (12 g)) unter Ausschluß von Licht gereinigt. Die Drehwertmessungen werden mit einem ZEISS Polarimeter OLD 5 und die gaschromatographischen Trennungen mit einem Varian 1520 Gas-Chromatograph durchgeführt.

Zur Messung der ¹³C-Resonanz wird ein Bruker HFX-90-Multikern-NMR-Spektrometer verwendet (22.63 MHz für ¹³C). Die Impulsinterferogramme werden in einem Fabritek 1074-Rechner (4 K) 1024 bis 4096 mal akkumuliert. Die Pulsbreite beträgt 5 ν Sek., das Pulsintervall 0.4 Sek. Zur Fourier-Transformation wird ein PDP-8-I Rechner (4 K) verwendet. Hexadeuteriodimethylsulfoxid dient zur ²H-Stabilisation und als Lösungsmittel der Proben. Die Konzentration beträgt 100–200 mg/ccm. Die Proben werden auf 30°C temperiert. Die chemischen Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan als externen Standard bezogen. Aus den Adressendifferenzen werden die chemischen Verschiebungen maschinell berechnet.

Bei allen bereits beschriebenen Verbindungen wurde eine befriedigende Übereinstimmung mit den in der Lit. angegebenen physikalischen Konstanten (Schmp.; $[\alpha]$) festgestellt.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester (8)

1. *N*-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure (2): Aus 66.5 g (0.5 Mol) L-Asparaginsäure und 85 g (0.5 Mol) Chlorameisensäure-benzylester wird *N*-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure nach *Wünsch* und *Zwick*¹²⁾ hergestellt: Ausb. 60.8 g (45%); Schmp. 113–114°; $[\alpha]_D^{20}$: 10° (CH₃CO₂H, *c* = 1).

2. *N*-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-anhydrid¹³⁾ (3) wird aus 116 g (0.43 Mol) 2 nach *J. c.*¹³⁾ hergestellt. Ausb. 108 g (98%); Schmp. 108–109°; $[\alpha]_D^{20}$: –39° (CH₃CO₂H, *c* = 1).

3. *N*-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-(α,β)-äthylester¹⁴⁾ (4): 108 g (0.43 Mol) 3 werden in 1 l absol. Äthanol 16 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Hierbei entstehen α - und β -Ester im Verhältnis 1:1. Das überschüss. Äthanol wird abgezogen und der ölige Rückstand in 250 ccm Äther gelöst. Man versetzt hierauf mit 77.5 g (0.43 Mol) Dicyclohexylamin und läßt 2 Tage im Kühlschrank stehen. Dabei fallen die kristallinen Dicyclohexylammoniumsalze des

¹²⁾ E. *Wünsch* und A. *Zwick*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **328**, 235 (1962).

¹³⁾ W. J. *Le Quesne* und G. T. *Young*, J. chem. Soc. [London] **1952**, 24.

¹⁴⁾ E. *Taschner*, A. *Chimiak*, J. F. *Biernat*, C. *Wasielewski* und T. *Sokolowska*, Liebigs Ann. Chem. **663**, 188 (1963).

α - und β -Äthylesters aus. Man filtriert, löst die Kristalle in Äthanol und fällt mit Petroläther (30–50°). Der α -Ester fällt bei Raumtemp. nach 4–6 Stdn. nahezu quantitativ aus und wird abfiltriert. Aus der Mutterlauge scheidet sich nach 12–24 Stdn. bei 0° der β -Ester aus. β -Ester: Schmp. 104–108°; α -Ester: Schmp. 156–159°.

Das Dicyclohexylammoniumsalz des α -Esters wird in 2n H₂SO₄ suspendiert und der freigesetzte Ester in Äther aufgenommen. Die Lösung wird sulfatfrei gewaschen, getrocknet, eingengt und das Produkt aus Äther/Petroläther (30–50°) umkristallisiert. Ausb. 38 g (30%); Schmp. 84°; $[\alpha]_D^{20}$: –14.8° (Äthanol, $c = 2$).

Der α -Ester **4a** läßt sich auch vorteilhaft zur Synthese des dem Glutathion analogen Tripeptids Asparthion verwenden²⁾.

C₁₄H₁₇NO₆ (295.3) Ber. C 56.95 H 5.80 N 4.74 Gef. C 56.74 H 5.65 N 4.85

4. *N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-asparaginsäure- α -äthylester- β -*tert.*-butylester (**5**) wird nach Wünsch und Zwick¹²⁾ aus *N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-asparaginsäure- α -äthylester (38 g) mit Isobutylen/Schwefelsäure hergestellt. Ausb. 36 g (79%); Schmp. 35–37°; $[\alpha]_D^{20}$: –13° (Äthanol, $c = 2$).

5. *N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-asparaginsäure- β -*tert.*-butylester (**6**), Dicyclohexylammoniumsalz¹²⁾: 36 g (0.1 Mol) **5** werden in 300 ccm Dioxan mit 102 ccm 1n NaOH 2 Stdn. gerührt. Anschließend wird auf 0° abgekühlt und mit 1n HCl neutralisiert. Das Dioxan wird am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in wenig Wasser (100 ccm) aufgenommen, mit Äther überschichtet und bei 0° mit 1n HCl auf pH 1.5 angesäuert. Der Äther wird abgetrennt und die wäbr. Phase dreimal mit Äther extrahiert. Aus den vereinigten Ätherlösungen wird der Asparaginsäuremonoester zur Reinigung mittels 0.5 m NaHCO₃ Lösung extrahiert. Die wäbr. Phasen werden bei 0° mit 1n HCl auf pH 1.5 angesäuert und der abgeschiedene Ester in Äther aufgenommen. Die Ätherlösung wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Man gibt 20 g Dicyclohexylamin zu, filtriert nach 2 Tagen das ausgeschiedene Salz ab und wäscht es mit kaltem Äther. Ausb. 43.3 g (85%); Schmp. 122–123°; $[\alpha]_D^{20}$: +18° (CHCl₃, $c = 1$).

C₂₈H₄₄N₂O₆ (504.6) Ber. C 66.64 H 8.79 N 5.56 Gef. C 66.39 H 8.58 N 5.62

6. *L*-Asparaginsäure- β -*tert.*-butylester (**7**)¹²⁾: 43.3 g **6** werden in 300 ccm Äther aufgeschlämmt und durch Zutropfen von 1n H₂SO₄ der Monoester in Freiheit gesetzt. Die Ätherphase wird abgetrennt, mit gesättigter Kochsalzlösung neutral gewaschen und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 200 ccm Methanol gelöst, mit Palladium/Aktivkohle versetzt und 4 Stdn. hydriert. Anschließend wird vom Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen und aus Methanol/Äther umkristallisiert. Ausb. 14.8 g (88%); Schmp. 195° (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: 7.5° (CH₃CO₂H, $c = 1$).

C₈H₁₅NO₄ (189.2) Ber. C 50.77 H 7.99 N 7.39 Gef. C 50.84 H 8.03 N 7.63

7. *N*-*tert.*-Butyloxycarbonyl-*L*-asparaginsäure- β -*tert.*-butylester (**8**): 5.7 g (0.03 Mol) **7** werden nach Schwyzer¹⁵⁾ et al. mit *tert.*-Butyl-azidoformiat zu **8** umgesetzt. Ausb. 8.0 g (92%); Schmp. 57–62°; $[\alpha]_D^{20}$: –20° (DMF, $c = 1$).

Die Reinheit von **8** wird zusätzlich dünnschichtchromatographisch geprüft. Bei zwei Laufmittelsystemen werden folgende R_F -Werte ermittelt: *tert.*-Amylalkohol: Isopropylalkohol: Wasser (10: 4: 5.5) R_F 0.47, *n*-Butanol: Pyridin: Essigsäure: Wasser (3: 2: 0.6: 2.4) R_F 0.74. Die Dünnschichtchromatogramme werden mit Ninhydrin-Sprühreagens und mit Chloroluidin entwickelt.

¹⁵⁾ R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel und H. Zuber, Helv. chim. Acta **46**, 1975 (1963).

Die Enantiomerenreinheit von **8** wird gaschromatographisch geprüft. Säule: 25 m Stahlkapillare, belegt mit *N*-Trifluoracetyl-L-phenylalanyl-L-leucin-cyclohexylester, 0,5 mm Innendurchmesser, Säulentemperatur 130°, Injektortemperatur 180°, Detektortemperatur (FID) 185°, Trägergas N₂ (8 ccm/Min.).

1.1 mg **8** wird mit 0.3 ccm 6*N* HCl 30 Min. bei 100° hydrolysiert, dann wird i. Vak. eingengt und über Kalilauge getrocknet. Hierauf wird mit 1 ccm Trifluoressigsäureanhydrid/Methylenchlorid (4 : 1) versetzt, im Schraubendeckelglas 30 Min. auf 100° erhitzt und die Lösung in das Einlaßsystem des Gaschromatographen eingespritzt. **8** enthält < 1% *D*-Asparaginsäure.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-asparaginsäure (**10**)¹⁶⁾: L-Asparaginsäure wird mit BOC-Azid am Autotitrator bei pH 10.4 30 Stdn. lang umgesetzt. Ausb. 70%; Schmp. 112–114° (Essigester/Petroläther 30–50°); [α]_D²⁰: –6° (Methanol, *c* = 1).

N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(α-äthylester)-β-glycin-äthylester (**11**)

7.7 g (0.055 Mol) Glycinäthylester-hydrochlorid (entspr. **9**¹⁷⁾) werden in 35 ccm Methylenchlorid suspendiert und 5.5 g Triäthylamin (0.055 Mol) unter Rühren zugegeben. Anschließend wird 3 Stdn. mechanisch geschüttelt, vom Triäthylammoniumchlorid abgesaugt und zu dieser Lösung werden 14.8 g (0.05 Mol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-α-äthylester in 25 ccm Methylenchlorid zugegeben. Nach Kühlung auf 0° tropft man 10.3 g (0.05 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ccm Methylenchlorid langsam zu. Das Reaktionsgemisch läßt man 12 Stdn. bei 0° stehen und saugt die Lösung vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab. Diese Lösung wird 3 mal mit je 25 ccm 5proz. Salzsäure bei 0°, einmal mit Wasser, 3 mal mit 5proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und schließlich 2 mal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Ausb. 16.9 g (93%). Nach Umkristallisieren aus Essigester erhält man 7.2 g chromatographisch reines Produkt. Schmp. 89–90°, [α]_D²⁰: –6° (Aceton, *c* = 1).

C₁₈H₂₄N₂O₇ (380.4) Ber. C 56.78 H 6.36 N 7.36 Gef. C 56.84 H 6.45 N 7.47

N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl-α- und -β-glycin-äthylester (**12**)¹³⁾: Zur Lösung von 4.7 g *N*-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure (**2**) in 8 ccm absol. THF gibt man bei 0° 3.9 g Dicyclohexylcarbodiimid in 8 ccm absol. THF. Nach 12stdg. Stehenlassen bei –20° wird die Lösung vom Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das THF am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird in warmem absol. Essigester (20 ccm) aufgenommen und eine Stde. stehengelassen. Der dabei noch ausfallende restliche Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert. Das Filtrat wird zu einer Lösung von 2.8 g (0.027 Mol) Glycinäthylester in 25 ccm absol. Essigester langsam unter Umschütteln zugegeben. Das Gemisch erwärmt sich; es wird über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nun wird die Lösung 3 mal mit je 25 ccm 5proz. Salzsäure bei 0°, dann mit Wasser bis pH 3 gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Essigester wird am Rotationsverdampfer abgezogen; es bleibt ein harziger Rückstand. Ausb. 4.9 g (66%). Das Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel Methanol : Wasser : Benzol : Chloroform 40 : 5 : 40 : 40) zeigt 2 Flecken gleicher Intensität mit *R_F*-Werten von 0.40 und 0.27.

¹⁶⁾ E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 (1967).

¹⁷⁾ C. Harries und M. Weiss, Liebigs Ann. Chem. **327**, 365 (1903).