

Zur Konformation geschützter Aminosäuren, III¹⁾

NMR- und IR-Untersuchungen von Boc-L- α -Aminosäuren

Michael Branik und Horst Kessler*

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M., Laboratorium Niederrad,
D-6000 Frankfurt a. M. 70, Theodor-Stern-Kai 7

Eingegangen am 4. Dezember 1974

Das Auftreten von *Z,E*-Isomeren in Boc-L- α -Aminosäuren (Gly, Ala, Val, Leu, Phe, Ser, Sar) in CDCl₃ wurde durch temperaturabhängige ¹H- und ¹³C-NMR- sowie IR-Spektroskopie untersucht. Die thermodynamische Stabilität der *Z*-Form wird durch intramolekulare (Bildung eines 7-Ringes) und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindung gedeutet. Die Enthalpie- und Entropie-differenzen zwischen den *Z*- und *E*-Konformeren der einzelnen Aminosäuren werden diskutiert.

Conformation of Protected Amino Acids, III¹⁾

N. M. R. and I. R. Investigations of Boc-L- α -Amino Acids

Z,E-Isomerism of Boc-L- α -amino acids (Gly, Ala, Val, Leu, Phe, Ser, Sar) was studied by means of ¹H and ¹³C n. m. r. spectroscopy as well as by means of i. r. spectroscopy at various temperatures in CDCl₃. The special stabilization of the *Z*-conformation is explained by intramolecular (forming seven-membered rings) and intermolecular hydrogen bonds. The differences in enthalpy and entropy between the *Z*- and *E*-conformation of the particular amino acids are discussed.

Die temperatur- und lösungsmittelabhängigen NMR-Spektren von Boc-Glycin wurden durch ein *Z,E*-Gleichgewicht zwischen den Rotameren der Urethanbindung gedeutet, wobei es sich als wesentlich erwies, daß das *Z*-Konformere durch intramolekulare Cyclisierung stabilisiert wird²⁾. In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir die Konformationen weiterer geschützter α -Aminosäuren (Tab. 1) in CDCl₃ durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie und IR-Spektroskopie bei verschiedenen Temperaturen. Das für die Peptidchemie interessante Lösungsmittel H₂O erwies sich für die Messungen leider als ungeeignet, weil sich die Boc-Aminosäuren schon bei Raumtemperatur darin zersetzen.

1. ¹H-NMR-Spektren

a) Chemische Verschiebung

Sämtliche vermessenen Boc- α -Aminosäuren zeigen das schon bei Boc-Gly beobachtete^{2,3)} Phänomen der *Z,E*-Isomerie, das sich in den ¹H-NMR-Spektren am deutlichsten an der Verdoppelung der NH-Signale beim Abkühlen zu erkennen gibt (Tab. 1). Das

¹⁾ II. Mitteil.: H. Kessler und M. Molter, *Angew. Chem.* **85**, 1059 (1973); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **12**, 1011 (1973).

²⁾ M. Branik und H. Kessler, *Tetrahedron* **30**, 781 (1974).

³⁾ J. L. Dimicoli und M. Ptak, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 2013.

Tab. 1. $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Boc-L- α -Aminosäuren (90 MHz, 0.2 M in CDCl_3 bei -30°C)

Boc-Aminosäure	NH		Chemische Verschiebungen δ (ppm)						Kopplungs- konstante (Hz)		Isomeren- verhältnis	
	Z	E	α -CH	β -CH	γ -CH	δ -CH	CO_2H	Z	E	P_Z	P_E	
-Gly	1.47	5.15	3.95	—	—	—	12.5	4.1	5.5	89	11	
-Ala	1.47	5.17	4.24	1.49	—	—	13.1	5.5	7.0	86	14	
-Val	1.47	5.19	4.24	2.18	1.0	—	10.8	8.0	9.0	49	51	
-Leu	1.47	4.95	4.25	1.63	1.63	0.96	12.4	9.0	8.0	75	25	
-Phe	Z 1.12 E 1.42	4.95	4.48	3.18	7.23	—	13.2	8.7	a)	90	10	
-Ser ^{b)}	1.47	6.1	4.04	4.04	—	—	e)	a)	a)	49	51	
-Sar ^{d)}	1.44	—	3.95	NCH_3 2.8	—	—	10.9	—	—	50	50	
-Aib	1.48	5.29	—	Z 1.48 E 1.52	—	—	12.7	—	—	56	44	

a) Kopplungskonstanten sind wegen der Breite der Signale nicht bestimmbar.

b) Bei 0°C .c) Das OH-Signal tauscht mit dem CO_2H -Signal aus, beide sind bei dieser Temperatur nicht beobachtbar.d) Bei 12°C , $\Delta\nu_{\text{CH}_3} = 7.0\text{ Hz}$, $\Delta\nu_{\text{Boc}} = 3.5\text{ Hz}$.

e) Nicht-korrigierte Werte.

Signal der *tert*-Butylgruppe des Boc-Substituenten spaltet lediglich bei Boc-Phe in zwei Singulets auf. Die α -, β - und evtl. vorhandenen γ -Protonen-Signale wurden nicht analysiert. Von Interesse sind insbesondere die chemischen Verschiebungen der NH-Protonen und die $^3J_{\text{C}_\alpha\text{H-NH}}$ -Kopplungskonstanten. Die Zuordnung der NH-Signale zur *Z*- bzw. *E*-Konformation erfolgte in Anlehnung an bereits früher²⁾ beschriebene Argumente und wird durch die Gesamtheit der Ergebnisse erhärtet.

Die chemische Verschiebung der NH-Bande für die *E*-Konformation ist weitgehend unabhängig von der Temperatur und Struktur⁴⁾. Dagegen verschiebt sich die *Z*-NH-Bande beim Abkühlen stark zu tiefem Feld (Abb. 1). Die Verschiebung ist durch eine Wasserstoffbrückenbindung des *Z*-NH-Protons erklärbar. Voraussetzung hierfür ist die Steigerung der NH-Acidität durch die intramolekulare Wasserstoffbrücke des Carboxylwasserstoffes mit dem Urethan-Carbonylsauerstoff²⁾.

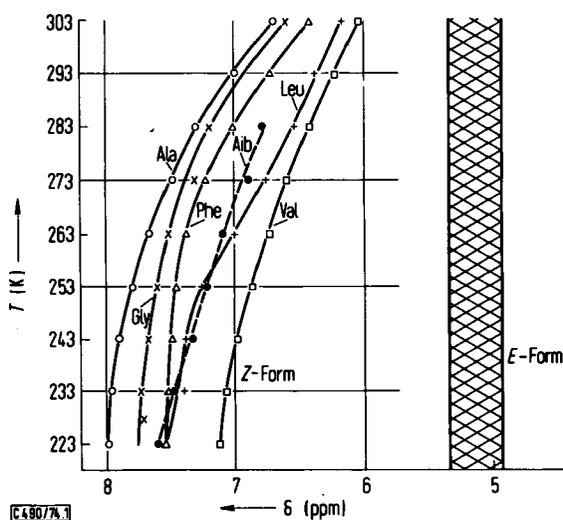
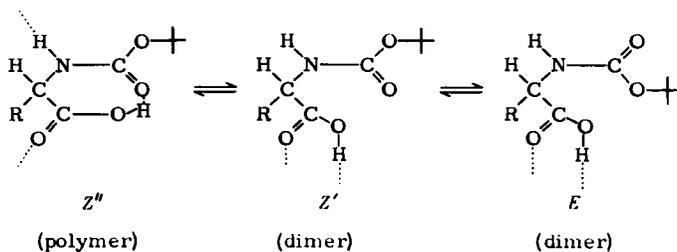


Abb. 1. Temperaturabhängigkeit der $^1\text{H-NMR}$ -chemischen Verschiebungen der NH-Signale in Boc-L- α -Aminosäuren (Solvens CDCl_3)

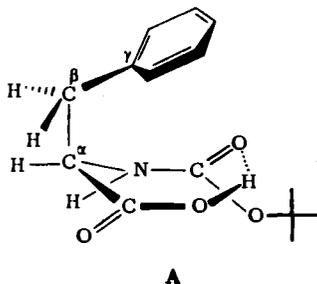


Während die *Z*-NH-Signale für die geschützten Aminosäuren Leu, Val und Aib auch bei tiefen Temperaturen noch einen starken Temperaturgang zeigen, erkennt man, daß die entsprechenden Signale für Gly, Ala und Phe einen Grenzwert ($\delta_{\text{Z}''}^{\text{Gly}} = 7.9$ ppm,

⁴⁾ Eine Ausnahme bildet lediglich Serin, dessen *E*-NH-Bande bei tieferem Feld liegt.

$\delta_{Z''}^{\text{Ala}} = 8.0$ ppm, $\delta_{Z''}^{\text{Phe}} = 7.6$ ppm) bei der tiefsten gemessenen Temperatur (-50°C) erreichen (Abb. 1). Diese Grenzwerte sollten der chemischen Verschiebung der cyclischen Z'' -Konformation entsprechen. Leu, Val und Aib wären demnach auch bei -50°C nur zum Teil cyclisiert. Dies folgt auch aus der quantitativen Auswertung der Populationsänderungen mit der Temperatur (s. u.).

Interessant ist auch die im Vergleich zu $\delta_{Z''}^{\text{Ala}}$ beobachtete Hochfeldverschiebung des Wertes $\delta_{Z''}^{\text{Phe}}$ für das NH-Signal, die man durch den Einfluß der diamagnetischen Anisotropie des Phenylringes interpretieren kann. Hiermit steht auch die Hochfeldverschiebung des Signals der Z -*tert*-Butylgruppe in Boc-Phe, die zu der oben erwähnten Aufspaltung des *tert*-Butylsignals führt, in Übereinstimmung. Man kann daher annehmen, daß der Phenylring in der Konformation Z'' senkrecht auf der Ebene steht, die von den C-Atomen α , β und γ gebildet wird. Eine ähnliche Konformation wurde bereits früher in Phenylalanin-Dipeptiden postuliert⁵⁾. Die Konformation des Phenylringes wird offenbar durch intramolekulare Wechselwirkung des Phenylringes mit der Urethan-Carbonylgruppe in der Weise A bevorzugt sein. Intermolekulare Wechselwirkung von Aromaten mit Dipolen (z. B. Amid-Carbonyl-Gruppen) sind hinlänglich bekannt^{6, 7)}. Die für die bevorzugte Konformation A notwendige pseudoaxiale Präferenz^{8, 9)} des Benzylsubstituenten wird durch die $^3J_{\text{C}_\alpha\text{H-NH}}$ -Kopplungskonstante bestätigt (s. u.). Die $\text{C}_\alpha\text{H-CH}_2$ -Kopplungen (Auswertung des ABX-Spektrums im H/D-ausgetauschten Boc-Phe bei -20°C) betragen $J_{\text{AX}} = 5$ Hz und $J_{\text{BX}} = 10$ Hz. Für das Modell der Konformation A erhält man aus den Interplanarwinkeln Kopplungen ähnlicher Größenordnung.



b) Signalintensität

Ähnlich wie bei Boc-Gly²⁾ ändert sich das Intensitätsverhältnis der Z - und E -Isomeren beträchtlich mit der Temperatur: bei tiefen Temperaturen dominiert die Z -, bei hohen die E -Konformation (Abb. 2).

⁵⁾ V. F. Bystrov, S. L. Portnova, T. A. Balashova, V. I. Tsetlin, V. T. Ivanov, P. V. Kostetzky und Yu. A. Ovchinnikov, Tetrahedron Lett. **1969**, 5283.

⁶⁾ P. Laszlo, Progr. NMR-Spectrosc. **3**, 231 (1967).

⁷⁾ J. Ronayne und D. H. Williams, Ann. Rev. NMR-Spectrosc. **2**, 83 (1969).

⁸⁾ In der cyclischen C_7 -Konformation der Dipeptide, die der hier vorgeschlagenen Z'' -Konformation entspricht, unterscheidet man eine pseudoaxiale und eine pseudoäquatoriale Lage des C_α -Substituenten⁹⁾.

^{9a)} V. F. Bystrov, S. L. Portnova, V. I. Tsetlin, V. T. Ivanov und Yu. A. Ovchinnikov, Tetrahedron **25**, 493 (1969). — ^{9b)} E. S. Efremov, Khim. Prir. Soedin. **9**, 322 (1973) [C. A. **79**, 105 530g (1973)].

Die Temperaturabhängigkeit läßt sich zur Gewinnung der thermodynamischen Parameter des *E,Z*-Gleichgewichtes heranziehen.

Es gilt:

$$K_{E,Z''} = \frac{p_Z}{p_E} \quad \text{und} \quad \Delta H_{E,Z''}^0 - T \Delta S_{E,Z''}^0 = -RT \ln K_{E,Z''}$$

Die so erhaltenen Werte sind in Tab. 2 aufgeführt.

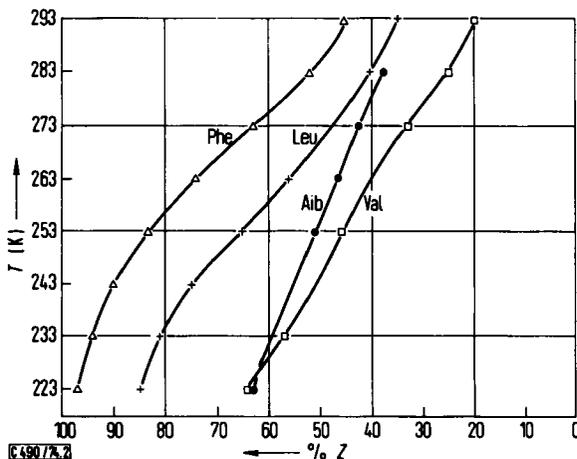


Abb. 2. Abhängigkeit der Gleichgewichtslage der *Z,E*-Rotameren in Boc-L- α -Aminosäuren von der Temperatur (Solvens CDCl_3 , die Kurven für Gly und Ala sind nicht mit eingezeichnet, weil sie mit derjenigen von Phe praktisch zusammenfallen)

Tab. 2. Thermodynamische Werte für das *Z,E*-Gleichgewicht von Boc-L- α -Aminosäuren in CDCl_3 ^{a)}

Boc-Aminosäure	aus p_E/p_Z		aus δ_{NH}^Z	
	$\Delta H_{E,Z''}^0$ (kcal/mol)	$\Delta S_{E,Z''}^0$ (Clausius)	$\Delta H_{E,Z''}^0$ (kcal/mol)	$\Delta S_{E,Z''}^0$ (Clausius)
-Gly	-7.0	-25	-7.2	-24
-Ala	-6.5	-23	-7.2	-24
-Val	-3.5	-14	-2.5	-9
-Leu	-4.5	-17	-3.9	-14
-Phe	-6.9	-24	-7.1	-23
-Aib	-3.2	-13	-3.1	-10

^{a)} Die Fehler betragen für die ΔH^0 - und ΔS^0 -Werte $\pm 13\%$. Sie ergeben sich im wesentlichen aus den Ungenauigkeiten bei der Integration.

Die Stabilisierung der *Z*-Konformation erfolgt durch Cyclisierung zur *Z''*-Form, deren NH-Signal wegen der nun ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindung¹⁰⁾ stark nach tiefem Feld verschoben ist. Aus der Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung des *Z*-NH-Signals ist somit die Lage des Gleichgewichtes $Z'' \rightleftharpoons Z'$ abzulesen.

¹⁰⁾ Urethan-NH-Protonen sind im allgemeinen nicht acide genug, um Wasserstoffbrücken zu bilden⁹⁾.

Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der chemischen Verschiebung des Z''- und Z'-NH-Signals in der jeweiligen Aminosäure. Die chemische Verschiebung des NH-Signals in der Z'-Form wurde durch die beobachtete Verschiebung des NH-Signals in der E-Form angenähert (in Boc-Gly-OCH₃, das zu etwa 10% in der E-Form vorliegt, findet man keine Aufspaltung der NH-Signale¹¹). Die chemische Verschiebung des Z''-NH-Signals in den geschützten Aminosäuren Gly, Ala und Phe wurde durch den beobachteten Grenzwert der Z-NH-Signale bei der tiefen Temperatur ermittelt. Da ein solcher Grenzwert bei Val, Leu und Aib nicht erreicht wird (s. Abb. 1), setzen wir $\delta_{Z''}^{\text{Val}} = \delta_{Z''}^{\text{Leu}} = \delta_{Z''}^{\text{Aib}} = \delta_{Z''}^{\text{Ala}}$. Unter diesen Voraussetzungen gilt:

$$K_{Z',Z''} = \frac{\delta_{Z''} - \delta_Z}{\delta_Z - \delta_{Z'}}$$

δ_Z = beobachtete chemische Verschiebung des Z-NH-Signals

Man erhält so die Werte in Tab. 2. Die gute Übereinstimmung der aus den Intensitätsverhältnissen und aus den chemischen Verschiebungen ermittelten thermodynamischen Daten zeigt, daß die Veränderung der Intensitätsverhältnisse ursächlich mit der Ausbildung von Wasserstoffbrücken der NH-Protonen zusammenhängt, wie es nach dem von uns postulierten Modell gefordert werden kann. Die Cyclisierung der Z'-Konformation liefert offenbar bei Boc-Gly, -Ala und -Phe eine Energie $\Delta H_{Z',Z''}^0 = -7$ kcal/mol. Die Z''-Konformation bildet pro Molekül zwei Wasserstoffbrücken aus: die intramolekulare COOH zu Urethan-Carbonyl-Brücke und die intermolekulare Urethan-NH zu Carboxyl-CO-Brücke. Demgegenüber bilden die E- und Z'-Konformation nur die Brücke der Carbonsäure-Dimeren. Insgesamt ist daher die Energieabgabe bei der Cyclisierung verständlich, wenn man berücksichtigt, daß eine Wasserstoffbrücke bis zu 8 kcal/mol liefert¹¹. Bemerkenswert ist die stark negative Entropie bei Bildung der Z''-Konformation. Eine Cyclisierung allein kann nicht die Ursache dieser Größe sein, da durch Cyclisierung nur bis ca. -10 Clausius verbraucht werden^{9,12}. Die Polymerisierung, die eine erhöhte „Ordnung“ verlangt, wird also durch die Entropie-Werte belegt. Bei Boc-Val, Boc-Leu und Boc-Aib ist ΔH^0 und ΔS^0 deutlich kleiner. Die Bildung der cyclischen Form wird offenbar sterisch durch den großen Alkylsubstituenten gehindert. Besonders deutlich prägt sich die sterische Hinderung der beiden Methylgruppen bei Boc-Aib aus.

c) Kopplungskonstante

Zusätzliche Informationen erhält man durch die Auswertung der $^3J_{C,H-NH}$ -Kopplungskonstante, die als Maß für den Interplanarwinkel der C-H- und N-H-Bindungen an der C-N-Bindung gelten kann^{5,9,13-15}. Problematisch ist hier allerdings, daß im allgemeinen mehrere Konformationen mit unterschiedlichem Gewicht zur beobachteten Kopplungskonstante beitragen. In solchen Fällen werden theoretisch berechnete Kopp-

¹¹ A. Johansson, P. Kollman, S. Rothenberg und J. McKelvey, J. Amer. Chem. Soc. **96**, 3794 (1974), und dort zitierte Literatur.

¹² S. N. Vinogradov und R. H. Linnell, Hydrogen Bonding, V. Nostrand Reinhold Company, New York 1971.

¹³ V. N. Solkan und V. F. Bystrov, Tetrahedron Lett. **1973**, 2261.

¹⁴ V. F. Bystrov, V. T. Ivanov, S. L. Portnova, T. A. Balashova und Yu. A. Ovchinnikov, Tetrahedron **29**, 873 (1973).

¹⁵ M. Barfield und H. L. Gearhart, J. Amer. Chem. Soc. **95**, 641 (1973).

lungskonstanten mit den experimentellen Werten (unter Berücksichtigung der vorhandenen Konformationsgleichgewichte) verglichen, oder aus den Kopplungskonstanten werden die Gleichgewichte errechnet⁹⁾.

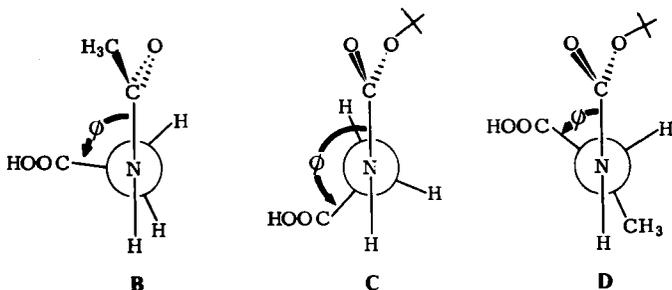
Für die gestreckte *E*-Konformation sind daher eindeutige Aussagen über die bevorzugte Konformation an der N–C_α-Bindung *allein auf der Basis der Kopplungskonstanten* nicht möglich.

Bei der Auswertung der C_αH-NH-Kopplung müssen die beobachteten Kopplungskonstanten durch den Elektronegativitätsfaktor der Substituenten am C_α-Atom korrigiert werden^{9, 14, 16)}. Bei Auswertung der von *Bystrov* bestimmten Winkelabhängigkeit von ³J_{C_αH-NH ist hierbei für ein Peptidfragment die folgende Gleichung zu verwenden¹⁴⁾:}

$$J_{\text{cor}} = J_{\text{obs}} \cdot 1.09$$

Für Glycin wurde der Korrekturfaktor 1.04 verwendet¹⁴⁾. Im folgenden benutzen wir, falls nicht besonders vermerkt, die korrigierten Kopplungskonstanten.

Bei Boc-Gly beträgt die Kopplung 6.0 Hz. Theoretische Berechnungen von CH₃CO-Gly-OMe ergaben in der gestreckten Anordnung zwei bevorzugte Konformationen mit $\Phi = -80^\circ$ und $+80^\circ$ ^{17, 20)}, woraus Interplanarwinkel Θ_1 und Θ_2 von 20° und 140° resultieren (Konformation **B**). Die daraus folgende mittlere Kopplungskonstante von ca. 8 Hz ist deutlich größer als der von uns in Boc-Gly beobachtete Wert von 6.0 Hz. Letzterem entspricht ein Winkel $\Phi = 130^\circ$ und 250° ²¹⁾ ($\Theta_1 = 70^\circ$ und $\Theta_2 = 190^\circ$, Konformation **C**). Vergleicht man die Acetylgruppe in **B** (*Z*-Konformation an der Peptidbindung) mit der Boc-Gruppe in **C** (*E*-Konformation an der Urethanbindung), so zeigt sich, daß die räumliche Anforderung der letzteren größer ist, was zwangsläufig zu größeren Φ -Winkeln führt.



Die Kopplungskonstante für Boc-Ala beträgt ³J_{C_αH-NH = 8.3 Hz. Nach theoretischen Berechnungen von CH₃CO-Ala-OMe dominiert die gestreckte Konformation $\Phi = 80^\circ$ ²⁰⁾, der eine theoretische Kopplungskonstante von ³J_{C_αH-NH = 8 Hz¹⁴⁾ entspricht. Diese Berechnung steht somit in guter Übereinstimmung mit Konformation **D** für Boc-Ala. Bei Valin sind die Werte: $\Phi_{\text{theor.}} = -100^\circ$; ³J_{theor.} = 10 Hz, und der gemessene Wert für *E*-Boc-Val beträgt ³J = 9.9 Hz.}}}

¹⁶⁾ G. N. Ramachandran, R. Chandrasekaran und K. D. Kopple, *Biopolymers* **10**, 2112 (1971).

¹⁷⁾ Die in Lit.-Zitat²⁰⁾ verwendete alte Definition¹⁸⁾ der Winkel wurde nach den Vorschlägen der IUPAC-Nomenklatur¹⁹⁾ umgerechnet: $\Phi_{\text{IUPAC}} = \Phi_{\text{alt}} - 180^\circ$.

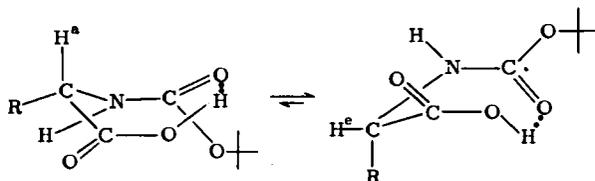
¹⁸⁾ J. T. Edsall, P. J. Flory, J. C. Kendrew, A. M. Liquori, G. Nemethy, G. N. Ramachandran und H. A. Scheraga, *J. Biol. Chem.* **241**, 1004 (1966).

¹⁹⁾ IUPAC-IUB-Commission, *Biochemistry* **9**, 3471 (1970).

²⁰⁾ E. M. Popov, G. M. Lipkind, V. Z. Pletnev und S. F. Archipova, *Khim. Prir. Soedin.* **7**, 164 (1971) [*C. A. 75*, 49 535 v (1971)].

²¹⁾ Aus Symmetriegründen sind die beiden Winkel 130° und 250° als Spiegelbilder gleich populiert.

In der cyclischen Z'' -Konformation unterscheidet man die quasi-äquatoriale Stellung e und die quasi-axiale Stellung a . Die daraus folgende Kopplungskonstante $J = 1/2(J_a + J_e) = 1/2(0.6 + 7.8)$ Hz haben wir für Glycin in unserer früheren Mitteilung²⁾ bereits besprochen. Für alle anderen Z -Boc- α -Aminosäuren sind die Kopplungskonstanten deutlich größer als für Glycin ($^3J_{C,H-NH}$ in Boc- α -Aminosäuren (in Hz): Gly = 4.1, Ala = 6.0, Val = 8.7, Leu = 8.7, Phe = 9.3). Der Substituent am α -C-Atom steht also bevorzugt in quasi-axialer Position. Die Z'' -Konformation ist der C_7 -Konformation von Dipeptiden äquivalent. Im Gegensatz zu älteren IR-spektroskopischen Arbeiten²²⁾ wird auch für Acetyldipeptide neuerdings eine axiale Präferenz des Substituenten angenommen^{8, 9, 23)}.



d) Z,E -Isomerisierung

Die freie Aktivierungsenthalpie der Z,E -Isomerisierung an der Urethanbindung für Boc-Gly und Boc-Sar wurde bereits früher bestimmt. Sie beträgt ca. 15–16 kcal/mol²⁾. Die temperaturabhängigen ^{13}C -NMR-Spektren (s. u.) der hier beschriebenen Boc- α -Aminosäuren liefern für die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger die gleichen Ergebnisse. Die NH-Signale im Protonenspektrum eignen sich wegen der großen Linienbreiten und der starken Temperaturabhängigkeit nicht für eine Linienformanalyse. Die Aufspaltung des *tert*-Butylsignals im Protonenspektrum von Boc-Phe erlaubt eine kinetische Auswertung. Die Linienformanalyse erwies sich aber wegen der nicht linearen Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen (die extrapolierte Aufspaltung der Signale ohne Austausch nähert sich schon knapp oberhalb der Koaleszenz dem Wert Null) als problematisch, weil der für die Auswertung verfügbare Temperaturbereich zu klein war. Wir erhielten nur bei Benutzung eines relativ kleinen, unterhalb der Koaleszenz liegenden Temperaturbereiches (273–286 K), in dem die Bestimmung der chemischen Verschiebungen der E - und Z -Signale ohne Austausch noch mit kleinen Fehlern behaftet ist, eine gute Linearität. Die Aktivierungsparameter betragen für die Umwandlung der E -Form in die Z -Form von Boc-Phe:

$$\Delta H^\ddagger = (14.1 \pm 2.5) \text{ kcal/mol}, \Delta G_{298}^\ddagger = 16.0 \text{ kcal/mol}, \Delta S^\ddagger = (-6.2 \pm 9) \text{ Clausius.}$$

Zur Fehlerbestimmung siehe experimentellen Teil.

Der entgegengesetzte Prozeß unterscheidet sich durch die entsprechenden ΔH^0 -, ΔG^0 - und ΔS^0 -Werte (Tab. 2). Es ergibt sich daraus, daß die Aktivierungsentropie klein ist, wie man es für eine intramolekulare Rotation erwarten kann²⁴⁾. Auffallend ist, daß alle Signale des Z -Isomeren beim Abkühlen stärker verbreitern als diejenigen des E -Isomeren. Dies betrachten wir als weiteren Hinweis auf die intermolekulare Assoziation. Damit können

²²⁾ M. Tsuboi, T. Shimanouchi und S. Mizushima, J. Amer. Chem. Soc. **81**, 1406 (1959).

²³⁾ L. C. Martinelli, I. L. Honigberg und L. A. Sternson, Tetrahedron **29**, 1671 (1973).

²⁴⁾ H. Kessler, Angew. Chem. **82**, 237 (1970); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **9**, 219 (1970); T. H. Siddall und W. E. Stewart, Chem. Rev. **70**, 517 (1970).

wir bis auf die NMR-spektroskopisch nicht meßbare Barriere der Z',Z'' -Isomerisierung das Energieprofil aufstellen (s. Abb. 3).

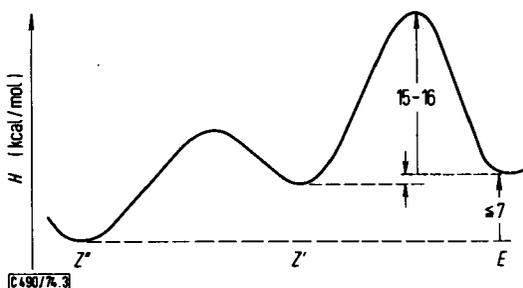


Abb. 3. Energieprofil für die Isomerisierung von Boc-L- α -Aminosäuren

Es gilt:

$$\Delta H_{E,Z'}^0 = \Delta H_{E,Z''}^0 - \Delta H_{Z',Z''}^0$$

Insgesamt folgt aus den Werten der Tab. 2, daß der Enthalpieunterschied zwischen der E - und der Z' -Konformation klein ist und im Rahmen des Auswertungsfehlers liegt.

2. ^{13}C -NMR-Spektren

Die ^{13}C -NMR-Spektren der Boc- α -Aminosäuren sind ebenso wie die ^1H -NMR-Spektren temperaturabhängig. Tieftemperaturaufspaltungen infolge Z,E -Isomerie werden an allen Kohlenstoffen, außer den Methylsignalen der Boc-Gruppe, gefunden. Lediglich in Phenylalanin spaltet auch dieses Signal auf (s. u.). Als repräsentative Daten sind in der Tab. 3 die chemischen Verschiebungen bei 273 K aufgeführt.

Die Zuordnung der Signale ist durch den Vergleich mit den Spektren von α -Aminosäuren und Peptiden²⁵⁾ zweifelsfrei möglich. Die Werte bei 40°C entsprechen denjenigen, die bereits bei früheren Messungen in DMSO gefunden wurden²⁶⁾. Die Signalzuordnung der Isomeren erfolgte durch die temperaturabhängige Intensitätsänderung in Anlehnung an die ^1H -NMR-Spektren. Im allgemeinen beobachtet man, daß die Signale von Urethan-CO-Gruppe, quartärem Kohlenstoff, der Boc-Gruppe und dem C_α -Kohlenstoff für die Z -Konformation um ca. 1–2 ppm bei tieferem Feld liegen, als die für die E -Konformation. Das Signal der Carboxylgruppe liegt dagegen in der Z -Form bei höherem Feld. Das würde mit der obigen Annahme der cyclischen Z'' -Konformation im Einklang stehen. Durch die Wasserstoffbrücke zum Urethan-Carbonyl-Sauerstoff wird das Urethansystem positioniert und alle benachbarten C-Atome nach tiefem Feld verschoben. Für die Carboxylgruppe ist die Interpretation dagegen nicht so eindeutig, da die Wasserstoffbrücke des Carboxyldimeren bei der Cyclisierung durch andere Wasserstoffbrücken ersetzt wird (s. o.) und deren Einfluß auf die ^{13}C -chemischen Verschiebungen bisher nicht in klarer

²⁵⁾ ^{25a)} J. B. Stothers, Carbon-13 NMR Spectroscopy, S. 479, Academic Press, New York und London 1972. — ^{25b)} L. F. Johnson und W. C. Jankowski, Carbon-13 NMR Spectra, S. 36 und 204, John Wiley & Sons, London, New York 1972.

²⁶⁾ W. Voelter, G. Jung, E. Breitmeier und E. Bayer, Z. Naturforsch. **26B**, 213 (1971).

²⁷⁾ W. A. Thomas und M. K. Williams, J. C. S. Chem. Commun. **1972**, 993.

Tab. 3. ^{13}C -Chemische Verschiebungen δ (ppm von internem TMS) von Boc-L- α -Aminosäuren in CDCl_3 bei 273 K

Boc-Aminosäure	R ^{a)}	C ¹		C ²		C ³		C ⁴		C ^{α}		C ^{β}		C ^{γ}		Sonstige	Konzentration ^{b)} (M)	
		E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z			
-Gly	H ^{b)}	28.2	80.3	81.8	156.2	157.5	174.7	173.9	42.0	43.3								1.9
-Ala	C ^{β} H ₃	28.2	80.1	81.5	155.5	157.2	177.9	176.8	49.0	50.0	18.5	18.9						1.4
-Val	C ^{β} H-C ^{γ} H ₃	28.2	80.1	81.8	156.0	157.5	177.0	176.3	58.1	59.8	31.2 ^{c)}		17.3 ^{d)}	19.1				0.92
-Leu	C ^{β} H ₂ -C ^{γ} H-C ^{δ} H ₃	28.2	80.1	81.8	155.7	157.3	178.7	177.4	51.9	52.8	41.3	42.2	24.4	24.7	E 22.9	Z 22.9 ^{e)}	E 21.5	Z 22.0
-Phe	C ^{β} H ₂ -C ₆ H ₅	E 28.1 Z 27.7	80.1	81.2	155.2	156.9	176.5	175.3	37.6	40.0								1.1
-Sar	H R' = CH ₃	28.2	80.7		155.9	156.5	174.4		49.9	50.7							R' = 35.6	1.7
-Aib ^{f)}	R,R'' = CH ₃ R' = H	28.2	79.8	82.0	154.7	156.8	180.3 ^{g)}		55.8	56.2	25.1	25.5						

^{a)} R' = H und R'' = H, wenn nicht anders vermerkt.

^{b)} Siehe I. c. 2).

^{c)} Spaltet bei 253 K auf: E = 30.9, Z = 31.6.

^{d)} Spaltet bei weiterem Abkühlen durch Z,E-Isomerie auf, eine ähnliche Aufspaltung in 3 C ^{β} -Signale wurde in cyclo-Val-Pro beobachtet ²⁷⁾.

^{e)} C ^{β}

^{f)} Bei 263 K.

^{g)} Spaltet bei 243 K auf: E = 180.4, Z = 179.9.

^{h)} Es wurde keine Konzentrationsabhängigkeit der chemischen Verschiebung im Bereich 0.35 – 1.9 M beobachtet.

Weise interpretierbar ist²⁸⁾. Ein auffallendes Phänomen von Boc-Phe ist die Hochfeldverschiebung der *tert*-Butylgruppe in der *Z*-Form um ca. 0.5 ppm im Vergleich zu den *tert*-Butylsignalen der anderen Boc- α -Aminosäuren. Dies gilt sowohl für das Signal des quartären C-Atoms (81.2 ppm gegenüber 81.8 ppm) als auch für die Methylgruppe (27.7 ppm gegenüber 28.2 ppm). Diesen Effekt führen wir auf die Anisotropiewirkung des Phenylringes in Konformation A zurück, die auch im Protonenspektrum gefunden wird. Die Wirkung von Anisotropieeffekten im ^{13}C -NMR-Spektrum war längere Zeit umstritten; neuerdings sind jedoch Beispiele gefunden, in denen diese eindeutig nachgewiesen wurden und deren Größenordnung entsprechend der Protonenverschiebung vorhersagbar ist²⁹⁾.

3. IR-Messungen

Die IR-Spektren in CDCl_3 -Lösung zeigen ebenso wie die NMR-Spektren eine starke Temperaturabhängigkeit, die auf Änderung des *E,Z*-Isomerengleichgewichtes zurückgeführt werden kann. Als Beispiel ist in Abb. 4 das Spektrum von Boc-Gly bei der gleichen Konzentration, wie sie auch für die Aufnahme der NMR-Spektren benutzt wurde, abgebildet.

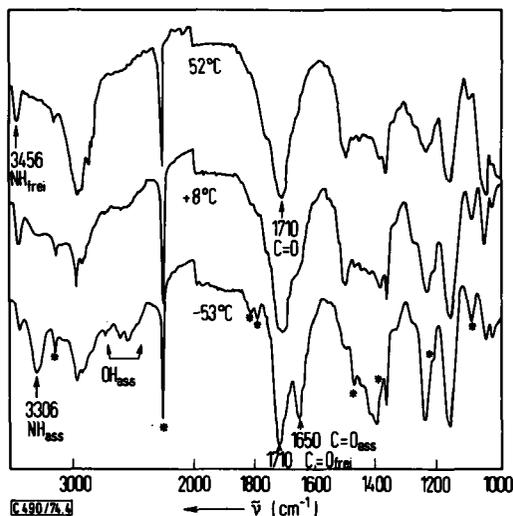


Abb. 4. IR-Spektrum von Boc-Gly (0.2 M in CDCl_3) bei verschiedenen Temperaturen (oben 325 K, Mitte 281 K, unten 220 K); starke Solvensbanden sind mit einem Sternchen bezeichnet

Man erkennt unter anderem deutliche Veränderungen in den Bereichen der NH-Valenzschwingungen, der Oberschwingungen bei wasserstoffbrücken-gebundenen Carboxyl-OH-Gruppen, der Carbonyl-Schwingungen und im Fingerprint-Bereich³⁰⁾.

Die Valenzschwingungen für nicht-wasserstoffbrücken-gebundene NH-Gruppen liegen im Bereich um 3450 cm^{-1} , diejenigen für wasserstoffbrücken-gebundene bei 3300 cm^{-1} ³¹⁾.

²⁸⁾ Siehe S. 499 in l. c.^{25a)}

²⁹⁾ R. du Vernet und V. Boekelheide, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 71, 2961 (1974).

³⁰⁾ L. J. Bellamy, The Infrared Spectra of Complex Molecules, Wiley, New York 1958.

³¹⁾ S. Mizushima, T. Shimanouchi, M. Tsuboi und T. Arakawa, J. Amer. Chem. Soc. 79, 5357 (1957); M. Marraud und J. Néel, C. R. Acad. Sci. Ser. C 278, 1015 (1974).

Die bei hohen Temperaturen dominierende Bande bei 3456 cm^{-1} kann daher dem *E*-Isomeren, dessen Urethan-NH bekanntlich⁹⁾ nicht assoziiert, zugeordnet werden. Die breitere Bande bei 3306 cm^{-1} ist dem bei tiefen Temperaturen begünstigten *Z*-Isomeren zuzuordnen. Somit zeigt sich auch im IR-Spektrum, daß das Urethan-NH-Proton im *Z*-Konformer intermolekular assoziiert ist. Die Cyclisierung und Stabilisierung der *Z*-Konformation hängt also von der Assoziation ab, wie es aus den thermodynamischen Daten hervorgeht.

Die daraus folgende Konzentrationsabhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung und Assoziation konnten wir in dem Konzentrationsbereich von 0.7 M bis 0.02 M CDCl_3 -Lösung weder IR- (bei 219 K) noch NMR-spektroskopisch (bei 243 K) nachweisen. Wir nehmen daher an, daß das *Z*-Konformere schon bei diesen Konzentrationen überwiegend assoziiert ist.

Die anderen untersuchten Boc- α -Aminosäuren zeigen für die hier diskutierten Banden praktisch das gleiche Verhalten (s. Tab. 4). An den relativen Intensitäten der NH-Schwingungen kann man das schon aus den NMR-Spektren bestimmte Isomerenverhältnis wiederfinden.

Tab. 4. Die IR-Schwingungsfrequenzen der Boc-L- α -Aminosäuren ca. 0.2 M in CDCl_3 bei verschiedenen Temperaturen (in cm^{-1})

Boc-Aminosäure	323 K ^{a)}			223 K ^{a)}			
	Z-NH	E-NH	C=O ^{b)}	Z-NH	E-NH	Carbonyl	Urethan
-Gly	3300	3445	1710	3300	3445	1715	1650
-Ala	3300	3435	1710	3300	3430	1715	1640
-Val	3300	3440	1705	3300	3430	1705	1635
-Leu	3300	3435	1705	3300	3435	1705	1638
-Phe	3300	3440	1705	3300	—	1710	1635
-Sar	—	—	1680 ^{c)}	—	—	1710	1660

^{a)} Die Temperaturen wurden um $\pm 50^\circ\text{C}$ eingestellt und exakt gemessen. Die für die jeweilige Aminosäure gemessene Temperatur schwankt um $\pm 3^\circ\text{C}$ um den Wert von $+50^\circ\text{C}$ bzw. -50°C .

^{b)} Urethan- und Carboxylschwingungen (s. Text).

^{c)} Breit.

Die OH-Gruppe ist in allen Formen assoziiert; freies OH ist um 3600 cm^{-1} nicht zu sehen. Bei tiefer Temperatur beobachten wir ein Heraustreten der Oberschwingungen für wasserstoffbrücken-gebundenes Carboxyl-OH ($2500\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$)³²⁾ für das cyclische *Z*-Isomere. Deutlich ist auch die Veränderung im Carbonylbereich. Im Hochtemperaturspektrum sind Carboxyl- und Urethan-CO-Bande um 1710 cm^{-1} nicht getrennt. Der charakteristische Bereich für Carbamate, die nicht H-Brücken gebunden sind, beträgt $1690\text{--}1730$ ³²⁾. Durch die Ausbildung der Wasserstoffbrücke in der *Z*-Konformation wird die Urethan-Carbonyl-Schwingung zu 1650 cm^{-1} verschoben³³⁾.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für Sachbeihilfen. Herrn Prof. Dr. G. Jung und M. Sc. N. Dubischar danken wir für Zurverfügungstellung des Boc-Aib. Dem Rechenzentrum der Universität Frankfurt/Main danken wir für die Rechenzeit.

³²⁾ M. Oki und H. Nakanishi, Bull. Chem. Soc. Japan **44**, 3148 (1971).

³³⁾ C. M. Deber, Macromolecules **7**, 47 (1974).

Experimenteller Teil

Die Boc-Derivate der Aminosäuren wurden nach der Methode von *Schnabel*³⁴⁾ hergestellt. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden am Bruker HX90-Spektrometer gemessen. Alle chemischen Verschiebungen sind auf internes TMS bezogen. Die Temperatur wurde bei ¹H-NMR-Spektren aus dem Linienabstand der Signale einer internen Methanolkapillare³⁵⁾ bestimmt. Für die Linienformanalyse wurde die chemische Verschiebung ohne Austausch von der tiefsten gemessenen Temperatur (−53 °C) in 10 °C-Schritten bestimmt und auf die höheren Temperaturen extrapoliert. Das gleiche gilt auch für das Populationsverhältnis, das aus den auf 2 Hz/cm gedehnten Spektren durch elektronische Integration und durch Ausplanimetrieren bestimmt wurde. Die Linienbreiten ohne Austausch wurden aus Messungen in größerem Abstand von der Koaleszenztemperatur bestimmt und auf den Austauschbereich extrapoliert. Für die Linienformanalysen wurden die auf 2 Hz/cm gedehnten Spektren mit den vom Computer gezeichneten Spektren verglichen. Die Linienformanalyse wurde mit dem CLATUX-Programm von *Binsch*³⁶⁾ an der Univac 1108 Anlage der Universität Frankfurt/Main berechnet. Als Fehler haben wir nicht die Standardabweichung angegeben, die bekanntlich zu viel zu kleinen Fehlern führt. Bei jeder zur Auswertung gelangten Temperatur wurden aus den vom Computer berechneten Spektren die maximal möglichen Fehler des τ -Wertes ermittelt und die Geraden größter und kleinster Steigung im Arrhenius-Diagramm als Grenzwert eingezeichnet³⁷⁾.

Die ¹³C-NMR-Spektren wurden unter ¹H-Breitbandentkopplung in 10-mm-Meßzellen in PFT-Verfahren bei einer Meßfrequenz von 22.63 MHz in 4K-Speicherpunkte aufgenommen. Hier wurde die Temperatur an der Temperatur-Regel-Einheit B-ST 100/700 der Firma Bruker (Karlsruhe) abgelesen. Zur Kontrolle wurden einige Temperaturen durch ein Thermometer in der Probe bei sonst gleichen Meßbedingungen geeicht.

Die IR-Spektren wurden am Perkin-Elmer 527 IR-Spektrometer gemessen, in 0.1-mm-Küvetten mit AgCl-Fenstern (Firma Specac, Oriol-Optik, Darmstadt). CDCl₃ wurde als Lösungsmittel angewendet, dessen IR-Spektrum temperaturunabhängig und bekannt ist. Die Messungen erfolgten ohne Kompensation mit dem reinen Lösungsmittel.

³⁴⁾ E. Schnabel, *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188 (1967).

³⁵⁾ A. L. van Geet, *Anal. Chem.* **42**, 679 (1970).

³⁶⁾ G. Binsch, *Top. Stereochem.* **3**, 97 (1968).

³⁷⁾ A. Jaeschke, E. Muensch, H. G. Schmid, H. Friebolin und A. Mannschreck, *J. Mol. Spectrosc.* **31**, 14 (1969).