

## Die Darstellung isoleucinverwandter L- $\alpha$ -Aminocarbonsäuren

Hans-Jörg Prätorius, Josef Flossdorf\* und Maria-Regina Kula

Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung mbH,  
D-3301 Braunschweig-Stöckheim, Mascheroder Weg 1

Eingegangen am 13. März 1975

Isocyanessigsäure-*tert*-butylester (4) ist ein geeignetes Ausgangsprodukt, aliphatische  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren in wenigen Schritten und guten Ausbeuten darzustellen. Diese Arbeit beschreibt, ausgehend von 4, die Synthese von  $\beta$ -unverzweigten  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren (6), die Darstellung von 3,3-Dialkyl-2-formamido-2-alkensäureestern (7), deren Hydrierung und Verseifung zu  $\beta$ -verzweigten  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren (9), die enzymatische Trennung racemischer Gemische sowie die Trennung diastereomerer Aminosäuren durch Hochspannungspapiererelektrophorese. Die Absolute Konfiguration der reinen Verbindungen wird mitgeteilt.

### Synthesis of L- $\alpha$ -Amino Acids Structurally Related to Isoleucine

*tert*-Butyl isocyanacetate (4) is an appropriate starting material for the synthesis of aliphatic  $\alpha$ -amino acids by a minimum of steps and in good yields. Starting with 4, this paper describes the synthesis of  $\alpha$ -amino acids not branched at the  $\beta$ -carbon atom (6), that of 3,3-dialkyl-2-formamido-2-alkenoic acid esters (7), their hydrogenation and their hydrolysis to  $\beta$ -branched  $\alpha$ -amino acids (9), the enzymatic resolution of racemic mixtures, and the separation of diastereomeric amino acids by means of high-voltage paper electrophoresis. The absolute configurations of the pure amino acids are also reported.

Ein entscheidender Schritt der Proteinbiosynthese ist die Veresterung der freien Aminosäuren mit korrespondierenden tRNA's, die durch aminosäurespezifische Enzyme, die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, katalysiert wird. Wir konnten zeigen<sup>1)</sup>, daß die Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *Escherichia coli* MRE 600 ihr natürliches Substrat L-Isoleucin (1) sowie, wenn auch schwächer, strukturell ähnliche Aminosäuren wie L-Valin (2), L-Norvalin (3) u. a. bindet. In Fortsetzung unserer Untersuchungen zur Topologie der Aminosäureerkennungsregion dieses Enzyms sollten auch höhere Homologe des L-Isoleucins untersucht werden. Keines von ihnen kommt natürlich als Proteinbaustein vor, einige jedoch finden sich, wenn auch zum Teil in nur geringen Mengen, in pflanzlichen Materialien<sup>2, 3, 4)</sup>, wurden chemisch durch Modifizierung von Naturstoffen gewonnen<sup>5-7)</sup> oder auf einem anderen als dem hier zu beschreibenden Weg synthetisiert<sup>8-10)</sup>.

<sup>1)</sup> J. Flossdorf und M.-R. Kula, Eur. J. Biochem. 36, 634 (1973).

<sup>2)</sup> M. Steiner und T. Hartmann, Biochem. Z. 340, 436 (1964).

<sup>3)</sup> L. Fowden und A. Smith, Phytochemistry 7, 809 (1968).

<sup>4)</sup> J. Shoji und R. Sakazaki, J. Antibiot. 23, 519 (1970).

<sup>5)</sup> I. K. Smith und L. Fowden, Phytochemistry 7, 1065 (1968).

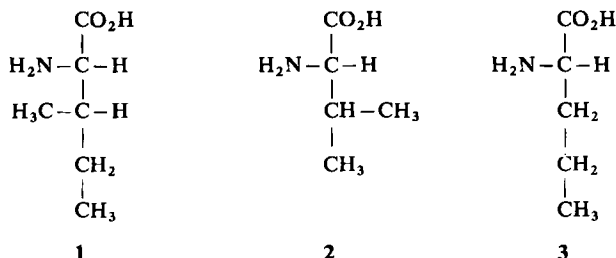
<sup>6)</sup> G. Dardenne, J. Casimir und J. Jadot, Phytochemistry 7, 1401 (1968).

<sup>7)</sup> D. O. Gray und L. Fowden, Biochem. J. 82, 385 (1962).

<sup>8)</sup> K. Okubo und Y. Izumi, Bull. Chem. Soc. Japan 43, 1541 (1970).

<sup>9)</sup> H. Kotake, T. Saito und K. Okubo, Tetrahedron Lett. 16, 2015 (1968).

<sup>10)</sup> K. Eisler, J. Rudinger und F. Sorm, Collect. Czech. Chem. Commun. 31, 4563 (1966).



So wurde 2-Aminoheptansäure aus Sclerotien von *Claviceps purpurea*<sup>2)</sup> und L-2-Amino-4-methylhexansäure aus den Samen von *Aesculus californica*<sup>3)</sup> isoliert. Letztere findet sich darin als Begleiter von L-2-Amino-4-methyl-4-hexensäure bzw. deren  $\gamma$ -Glutamylderivat. Es ist an C-4 vermutlich S-konfiguriert und hätte damit die Struktur der in dieser Arbeit beschriebenen Aminosäure 13<sup>11)</sup>. 14 wurde in einem Peptidantibioticum aus *Streptomyces* nachgewiesen<sup>4)</sup>.

Einen weiteren Zugang zu isoleucinomologen Aminosäuren bietet die Hydrierung natürlich vorkommender ungesättigter bzw. alicyclischer Aminosäuren. Die Hydrierung der eben erwähnten L-2-Amino-4-methyl-4-hexensäure lieferte 13 (bzw. sein Epimeres oder ein Gemisch von beiden)<sup>5)</sup>, die Hydrierung von L-2-Amino-5-methyl-4-hexensäure aus dem Blätterpilz *Leucocortinarium bulbiger* entsprechend 14<sup>6)</sup>. Aus Hypoglycin A wurde ein Gemisch von 10, 13 und 14 (wahrscheinlich zusammen mit dem Epimeren von 13) erhalten<sup>7,13)</sup>.

Die chemische Synthese schließlich führte, sieht man von 10 ab, das als Racemat käuflich ist, zu 11 und 12, die über die Hydantoine<sup>8)</sup>, zu 16, 17<sup>8,9)</sup> und 15<sup>10)</sup>, die über die entsprechenden Imidazole bzw. das Oxazolone mit nachfolgender Hydrierung dargestellt wurden. Über 19 wird unten zu berichten sein.

Die Synthese der in dieser Arbeit beschriebenen Aminosäuren ist prinzipiell nach einer Reihe seit langem bekannter Methoden möglich: Malonester-, Cyanhydrin- und Azlacton-Synthese, Aminierung von  $\alpha$ -Halogen-carbonsäuren, Reduktion von Oximinocarbonsäureestern u. a. Unser Ziel war es,  $\beta$ -verzweigte wie  $\beta$ -unverzweigte Aminosäuren aus einer gemeinsamen, leicht darzustellenden Vorstufe in wenigen Schritten und guten Ausbeuten zu gewinnen. Wir entschieden uns daher für die von Schöllkopf und Mitarbeitern<sup>15-17)</sup> ausgearbeitete Darstellung aus Isocyanessigsäureestern (4).

### Darstellung der L-Aminosäuren

Monoalkylierung von 4 mit primären Alkylhalogeniden in Tetrahydrofuran bei tiefer Temperatur in Gegenwart von Kalium-*tert*-butylat führt zu einem monosubstituierten  $\alpha$ -Alkylester, der sich leicht zur  $\beta$ -unverzweigten  $\alpha$ -Aminosäure (6) verseifen läßt. Dialkylierung wird durch spezielle Wahl der Reaktionsbedingungen weitgehend vermieden. Die Ausbeuten sind von der Natur der Reste R<sup>1</sup> abhängig und sinken mit deren Sperrigkeit, vermutlich aus sterischen Gründen. Mit Neopentylbromid konnte keine Alkylierung mehr beobachtet werden.

<sup>11)</sup> Vgl. dazu l. c.<sup>12)</sup>

<sup>12)</sup> L. Fowden, P. M. Scopes und R. N. Thomas, J. Chem. Soc. C 1971, 833.

<sup>13)</sup> Eine Zusammenfassung findet sich bei l. c.<sup>14)</sup>.

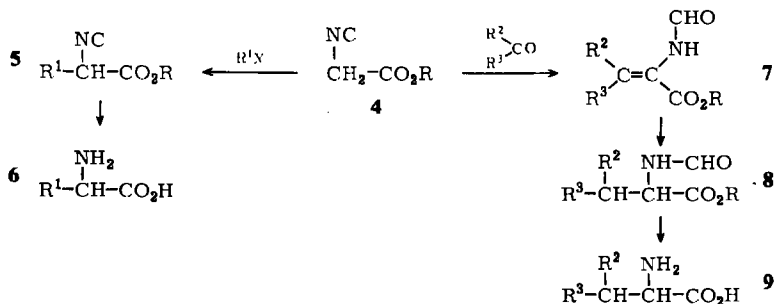
<sup>14)</sup> L. Fowden, Prog. Phytochem. 2, 203 (1970).

<sup>15)</sup> D. Hoppe, Dissertat. Univ. Göttingen 1970.

<sup>16)</sup> U. Schöllkopf, F. Gerhart und R. Schröder, Angew. Chem. 81, 701 (1969); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 8, 672 (1969).

<sup>17)</sup> Vgl. auch die kürzlich erschienene Zusammenfassung<sup>18)</sup>.

<sup>18)</sup> D. Hoppe, Angew. Chem. 86, 878 (1974); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 13, 789 (1974).



Die Kondensation von 4 mit Carbonylverbindungen führt zu Acrylsäureestern, die an der Doppelbindung beim Einsatz von Aldehyden dreifach, im Falle der Ketone sogar vielfach substituiert sind. Sie lassen sich nur schwer hydrieren. Die Hydrierung gelingt in sehr konzentrierten Lösungen von 7 in Eisessig bei hoher Palladium-Aktivkohle-Zugabe. Sie verläuft im Falle der dreifach substituierten Doppelbindung bereits befriedigend in Anwesenheit von Platindioxid in methanolischer Lösung.

Die Synthese der einzigen in dieser Arbeit beschriebenen, in  $\beta$ -Stellung doppelt verzweigten Aminosäure, der 2-Amino-3,3-dimethyl-pentansäure (DL-20) wurde nach Horner und Schwahn<sup>19)</sup> durchgeführt.

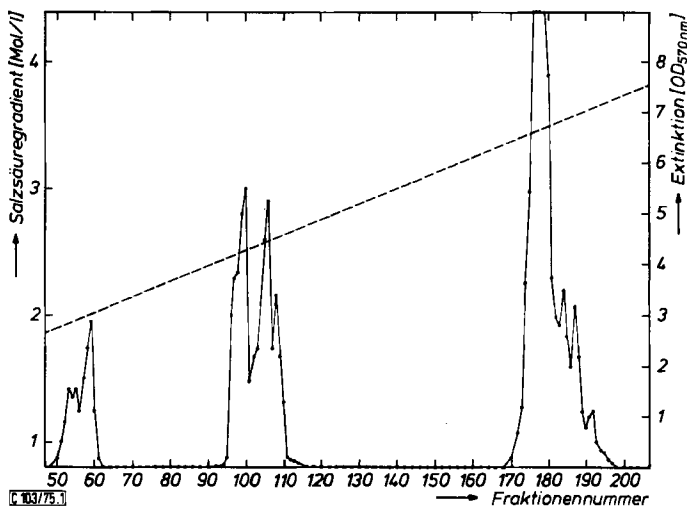
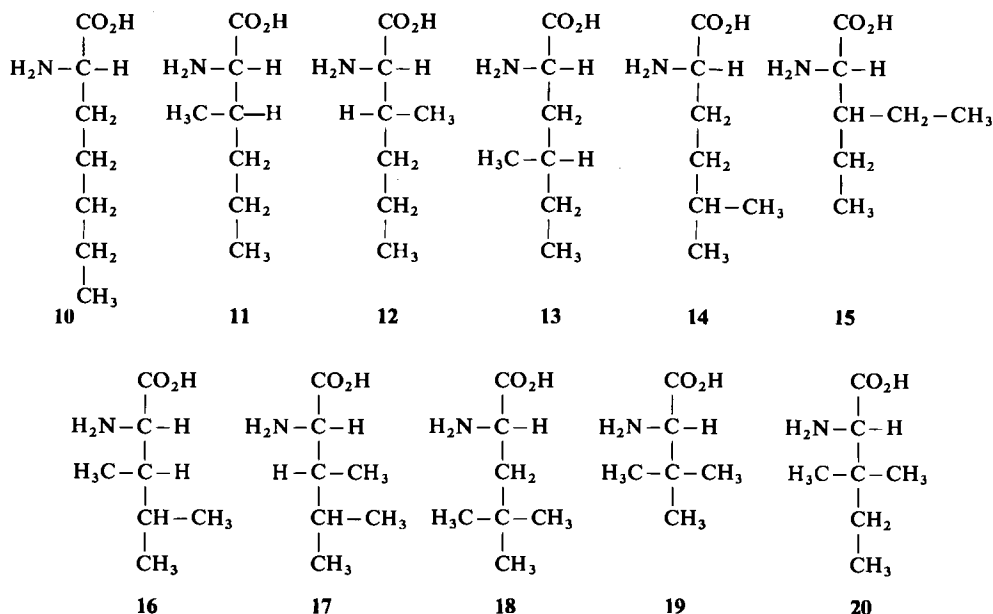


Abb. 1. Säulenchromatographische Reinigung der Aminosäuren am Beispiel der 2-Aminoheptansäure (DL-10).

Austauscher Bio-Rad AG 50 W - X 8 in der  $\text{H}^+$ -Form; Säule  $80 \times 2,5$  cm bei Raumtemp.; linearer Gradient aus je 500 ml 1,3 N HCl und 4,0 N HCl; Elutionsgeschwindigkeit 45 ml/h; Fraktionenwechsel alle 10 min; - - - Salzsäuregradient; ——— optische Dichte im Ninhydrin-test

<sup>19)</sup> L. Horner und H. Schwahn, Liebigs Ann. Chem. 591, 99 (1955).

Alle Aminosäuren wurden durch Ionenaustauschchromatographie mittels Salzsäuregradienten gereinigt. Abb. 1 zeigt am Beispiel der 2-Aminoheptansäure (DL-10), daß mehrere ninhydrinpositive Produkte anfallen, deren erstes als Glycin (aus nicht umgesetztem Ausgangsmaterial 4) identifiziert wurde. Der Peak im Bereich der Fraktionennummer 100 wurde nicht näher untersucht; er fehlt bei der Aufarbeitung der Hydrierungsprodukte der Kondensation von 4 mit Ketonen. Im Bereich der Fraktionsnummern 170 bis 200 wird die gesuchte Aminosäure rein, jedoch als Racemat im Falle  $\beta$ -unverzweigter und als Gemisch aller vier möglichen Stereoisomeren im Falle der  $\beta$ -unsymmetrisch verzweigten Aminosäuren erhalten. Durch diese Chromatographie konnte darauf verzichtet werden, die Zwischenprodukte der Monoalkylierung bzw. der Hydrierung durch Destillation zu reinigen.



### Trennung der Stereoisomeren und Konfigurationsbeweis

Die Racematspaltung wurde nach bekannten enzymatischen Methoden<sup>20)</sup> vorgenommen und beruht auf der strikten Konfigurationsspezifität bestimmter Enzyme. Man erhält aus dem racemischen Gemisch der *N*-Chloracetyl-Verbindungen der Aminosäuren durch Hydrolyse mit *L*-Aminosäureacylase aus Schweinenieren die freie *L*-Aminosäure neben dem unveränderten Acyl-Derivat der *D*-Form, die sich leicht über einen Kationenaustauscher abtrennen läßt.

Diese Methode ist zwar breiter Anwendung fähig, versagt jedoch offensichtlich bei Aminosäuren mit quartärem  $\beta$ -Kohlenstoffatom: die racemischen Gemische der *N*-

<sup>20)</sup> J. P. Greenstein in *Methods in Enzymology*, S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Eds., Bd. 3, S. 554, Academic Press, New York 1957.

Chloracetyl-Derivate sowohl von 2-Amino-3,3-dimethylbuttersäure (*tert*-Leucin, **19**) als auch von 2-Amino-3,3-dimethylpentansäure (**20**) wurden von L-Aminosäureacylase nicht zerlegt.

In der geschilderten Weise wurden erhalten: L-2-Aminoheptansäure (**10**), (4S)-L-2-Amino-4-methylhexansäure (**13**)<sup>21)</sup>, L-2-Amino-5-methylhexansäure (**14**), L-2-Amino-3-äthylpentansäure (**15**) und L-2-Amino-4,4-dimethylpentansäure (**18**). Ihre Isomerenreinheit wurde mit einem kolorimetrischen Test kontrolliert.

Aminosäuren, die am  $\beta$ -Kohlenstoffatom unsymmetrisch verzweigt sind, fallen nach der enzymatischen Racematspaltung als Diastereomeregemische an: 2-Amino-3-methylhexansäure als Gemisch der Diastereomeren **11** (*L-erythro*) und **12** (*L-threo*) im Verhältnis 1:1 unter unseren Reaktionsbedingungen und 2-Amino-3,4-dimethylpentansäure als Gemisch aus **16** (*L-erythro*) und **17** (*L-threo*) im Verhältnis 1:5. Ihre weitere Trennung in die reinen Epimeren erfolgte mit Hilfe der Hochspannungspapiererelektrophorese nach *Michl*<sup>22)</sup> bei niedrigem pH. Die  $R_x$ -Werte für die verschiedenen Epimeren sind, bezogen auf L-Isoleucin (*L-erythro*, **1**), einschließlich dessen C $^{\beta}$ -Epimerem *L-allo*-Isoleucin, in der Tabelle aufgeführt.

Tab. Physikalische Daten der  $\beta$ -verzweigten Aminosäuren

	Konfiguration	$R_x$ -Wert <sup>a)</sup>	Retentionszeit [min] <sup>b)</sup>	$K_d$ [M] <sup>c)</sup>	$[\alpha]_D^{25}$ <sup>d)</sup>
L-Isoleucin ( <b>1</b> )	<i>erythro</i>	1.000	155	$4.4 \cdot 10^{-6}$	+39.5° <sup>e)</sup>
L- <i>allo</i> -Isoleucin	<i>threo</i>	0.940	152	$1.3 \cdot 10^{-3}$	+39.6° <sup>e)</sup>
(3S)-L-2-Amino-3-methylhexansäure ( <b>11</b> )	<i>erythro</i>	0.962	176	$5.0 \cdot 10^{-5}$	+47.6°
(3R)-L-2-Amino-3-methylhexansäure ( <b>12</b> )	<i>threo</i>	0.906	170	$5.9 \cdot 10^{-3}$	+60.2°
(3S)-L-2-Amino-3,4-dimethylpentansäure ( <b>16</b> )	<i>erythro</i>	0.955	176	$4.5 \cdot 10^{-5}$	+15.8°
(3R)-L-2-Amino-3,4-dimethylpentansäure ( <b>17</b> )	<i>threo</i>	0.830	159	$3.8 \cdot 10^{-3}$	+38.4°

<sup>a)</sup> Elektrophoretische Mobilität auf Chromatographiepapier Schleicher & Schüll Nr. 2316 bei 46 V/cm, bezogen auf L-Isoleucin; Puffer: Eisessig + Ameisensäure (8% + 2%) pH 1.9; Dauer der Elektrophorese: 105 min.

<sup>b)</sup> Säule: Bio-Rad Aminex A6 54  $\times$  0.9 cm bei 50°C; Zwei-Puffer-Programm nach l. c.<sup>30)</sup>; Durchlauf: 70 ml/h.

<sup>c)</sup>  $K_d$  = Dissoziationskonstante des binären Komplexes aus Aminosäure und Isoleucyl-tRNA-Synthetase<sup>24, 25)</sup> bei 20°C; Puffer: 0.05 M Kaliumphosphat pH 7.5 mit 0.002 M 1,4-Dithioerythrit.

<sup>d)</sup> Aminosäure in 6 N HCl.

<sup>e)</sup> Aminosäure in 5 N HCl<sup>34)</sup>.

Zwar ist prinzipiell eine Trennung der Diastereomeren auch am Ionenaustauscher möglich, doch erbrachte diese Technik nur für analytische Mengen befriedigende Resultate. Diese und die daraus abgeleiteten Retentionszeiten sind wichtige Hinweise für eine richtige Konfigurationszuordnung der reinen Epimeren.

<sup>21)</sup> Da wir vom Gärungsamylalkohol ausgegangen sind, hat **13** die angegebene Konfiguration. Das C-4-Epimere wurde nicht dargestellt.

<sup>22)</sup> H. Michl, Monatsh. Chem. **82**, 489 (1951).

Der Konfigurationsbeweis wurde für die im Elektropherogramm langsamer wandernde Komponente des Gemisches aus **16** und **17** unmittelbar geführt. Nach Umsetzung mit Natriumnitrit in stark saurer Lösung in Gegenwart von Kaliumbromid wird 2-Brom-3,4-dimethylpentansäure erhalten, die ihrerseits durch katalytische Hydrierung in rechtsdrehende 3,4-Dimethylpentansäure übergeht. Für diese wird *R*-Konfiguration am  $\beta$ -Kohlenstoffatom beschrieben<sup>23)</sup>. Dies beweist *threo*-Konfiguration (**17**) für die langsamere Komponente und bildet die Grundlage für die in der Tabelle getroffene Zuordnung von  $R_x$ -Wert, Retentionszeit, Dissoziationskonstanten und Konfiguration der beiden Diastereomeren **11** und **12**. Wir haben zunächst, analog dem Verhalten von **16** und **17**, dem in der Elektrophorese voranlaufenden Epimeren versuchsweise *erythro*-Konfiguration (**11**) zugesprochen, dem nachfolgenden *threo*-Konfiguration (**12**). Diese Zuordnung findet einerseits eine starke Stütze darin, daß auch im Falle des Epimerenpaares *L*-Isoleucin (**1**) und *L*-*allo*-Isoleucin die *erythro*-Form (**1**) den größeren  $R_x$ -Wert besitzt, andererseits die Retentionszeiten der verschiedenen Aminosäuren auf der Kationenaustauschersäule für die *erythro*-Formen deutlich höher liegen als für die *threo*-Formen. Einen endgültigen Beweis sehen wir darin, daß die entweder als *erythro*-Formen bekannten (**1**), nachgewiesenen (**16**) oder angenommenen Strukturen (**11**) generell stabilere, binäre Komplexe mit Isoleucyl-tRNA-Synthetase bilden als die *threo*-Formen *L*-*allo*-Isoleucin, **17** und **12**. Das genannte Enzym besitzt die Fähigkeit, C-2-Epimere absolut und C-3-Epimere graduell zu unterscheiden, wobei im letzteren Fall die Stabilitätskonstanten der Komplexe immerhin noch um etwa zwei bis drei Zehnerpotenzen verschieden sind (s. Tab.)<sup>24, 25)</sup>. Wir halten deshalb die Zuordnung der *erythro*-Konfiguration **11** zu dem Epimeren der 2-Amino-3-methylhexansäure mit dem höheren  $R_x$ -Wert für erwiesen und haben auf chemische Abbaueversuche in Anlehnung an den Konfigurationsbeweis von **17** im Falle der 2-Amino-3,4-dimethylpentansäure verzichtet.

Herrn Dr. D. Hoppe danken wir für wertvolle Hinweise zur Synthese der Aminosäuren und die Überlassung von  $\beta$ -*tert*-Butyl- $\alpha$ -formamidoacrylsäure-äthylester, Herrn Prof. Dr. H. Brockmann Jr. für die Durchsicht des Manuskripts. Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (BMFT) im Rahmen des Technologie-Programms gefördert.

## Experimenteller Teil

Als Kationenaustauscher für präparative Zwecke wurde AG 50 W – X8, minus 400 mesh,  $H^+$ -Form der Firma Bio-Rad (Richmond, California, USA) verwendet, analytische Trennungen mit dem Aminosäureanalysator BC 200 in Verbindung mit dem Photometer BC 201 (beide Firma Bio-Cal, München) und dem Integrator CRS 100 A (Infotronics, Techmation, Düsseldorf) ausgeführt. Zur elektrophoretischen Trennung wurde eine Elektrophoreseapparatur Modell D der Firma Gilson (Firma Techmation, Düsseldorf) verwendet, das Papier Nr. 2316 stammte von der Firma Schleicher & Schüll (Dassel). – Die optischen Drehungen wurden mit dem Perkin-Elmer Polarimeter 241 (Überlingen), die ORD-Spektren mit dem Spektralpolarimeter Cary 60 bestimmt, die  $^1H$ -NMR-Spektren mit den Kernresonanzspektrometern Varian A 60 und HA 100 ermittelt. –

<sup>23)</sup> F. A. Levene und R. E. Marker, J. Biol. Chem. **111**, 299 (1935).

<sup>24)</sup> J. Flossdorf, H.-J. Prätorius und M.-R. Kula, in Vorbereitung.

<sup>25)</sup> H.-J. Prätorius, Dissertat. Techn. Univ. Braunschweig 1974.

Die Elementaranalysen führte das Mikroanalytische Laboratorium *I. Beller*, 34 Göttingen, Theaterstraße 23, aus. – Alle in dieser Arbeit verwendeten Substanzen sind, wenn nicht anders vermerkt, käuflich und wurden in höchstmöglicher Reinheit eingesetzt, Lösungsmittel bei Bedarf destilliert und getrocknet. Isocyanessigsäure-*tert*-butylester (**4**) wurde nach l. c.<sup>26, 27</sup> dargestellt, (2*S*)-1-Brom-2-methylbutan aus (–)-2-Methyl-1-butanol<sup>28, 29</sup> gewonnen. L-Aminoacylase aus Schweinenieren (EC 3.5.1.14) stammte von der Firma Sigma (St. Louis, Missouri, USA), D-Aminosäureoxidase aus Schweinenieren (EC 1.4.3.3) und Peroxidase aus Meerrettich (EC 1.11.1.7) von der Firma Boehringer (Mannheim).

#### Darstellung $\beta$ -unverzweigter Aminosäuren durch Monoalkylierung von **4**

Zu 4.49 g (40.0 mmol) Kalium-*tert*-butylat in 30 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) tropft man bei –20°C unter Rühren 5.65 g (40.0 mmol) **4**. Man kühlt auf –70°C und tropft 40.0 mmol auf –70°C gekühltes Alkylbromid, gelöst in 10 ml THF, zu. Diese Suspension wird unter Rühren in 50 ml auf ca. 50°C erwärmtes THF eingetropft. Nach etwa 30 min, wenn eine in Wasser gelöste Probe nur noch schwach alkalisch reagiert, wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird mit 25 ml Wasser und 50 ml Äther geschüttelt; die ätherische Phase wird im Scheidetrichter abgetrennt. Nachdem die wäßrige Phase nochmals mit Äther ausgeschüttelt wurde, werden die ätherischen Auszüge vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels bleibt rohes **5**, das durch 30 min Kochen mit 6 N HCl in rohes **6** übergeführt wird. Reinigung erfolgt über AG 50 W – X8 in der H<sup>+</sup>-Form in einer Säule von 2.5 cm Durchmesser und 80 cm Betthöhe mit einem linearen Salzsäuregradienten von 1.3 N bis 4 N bei Raumtemp. (Elutionsgeschwindigkeit 45 ml/h; Fraktionenwechsel alle 10 min). Die einzelnen Fraktionen werden auf Aminosäure getestet, entsprechende Fraktionen vereinigt und eingedampft.

#### Test auf Aminosäure<sup>30)</sup>

2.0 g Ninhydrin sowie 0.15 g Hydrindantin werden in 65 ml peroxidfreiem Äthylglycolmonomethyläther gelöst. Durch diese Lösung wird 10 min lang Stickstoff geleitet. Nach Zugabe von 35 ml 4 N Natriumacetatlösung pH 5.51 und weiterem 5 min. Durchleiten von Stickstoff ist das Reagenz gebrauchsfertig. Es wird kühl und dunkel aufbewahrt.

50  $\mu$ l der auf Aminosäure (oder andere, primäre Aminogruppen enthaltende Verbindungen) zu prüfenden Lösung werden mit 1 ml Wasser verdünnt und mit 500  $\mu$ l des Reagenzes vermischt. Nach 15 min. Erhitzen im Wasserbad auf 100°C und weiterem 15 min. Stehenlassen bei Raumtemp. wird die optische Dichte bei 570 nm bestimmt.

*DL*-2-Aminoheptansäure-hydrochlorid (*DL*-10 · HCl): Aus 6.04 g (40.0 mmol) 1-Brompentan; Ausb. 1.51 g (21%). – <sup>1</sup>H-NMR (Bis(trideuteriomethyl)sulfoxid, TMS):  $\delta$  0.8 – 1.1 ppm (t, 3, CH<sub>3</sub>), 1.1 – 1.4 (m, 6, CH<sub>2</sub>), 1.9 (m, 2,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 3.8 (t, 1,  $\alpha$ -CH), 6 – 9 (breite Absorption, 4, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, CO<sub>2</sub>H). – Retentionszeit auf dem Aminosäureanalysator 206 min; keine sichtbaren, ninhydrinpositiven Verunreinigungen.

C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub> · HCl (181.7) Ber. C 46.28 H 8.32 N 7.71 Gef. C 47.22 H 9.01 N 8.00

(4*S*)-*DL*-2-Amino-4-methylhexansäure-hydrochlorid (*DL*-13 · HCl): Aus 7.55 g (50.0 mmol) (2*S*)-1-Brom-2-methylbutan (es wurde ein Überschuß eingesetzt, da leicht verunreinigt); stark braun

<sup>26)</sup> A. Jones, J. Amer. Chem. Soc. **71**, 645 (1941).

<sup>27)</sup> J. Ugi, U. Fetzer, U. Eholzer, H. Knupfer und K. Offermann, Angew. Chem. **77**, 492 (1965); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **4**, 472 (1965).

<sup>28)</sup> Organikum, 7. Aufl., S. 176, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1967.

<sup>29)</sup> Dieser Alkohol hat *S*-Konfiguration<sup>21)</sup>.

<sup>30)</sup> D. H. Spackman, W. H. Stein und S. Moore, Anal. Chem. **30**, 1190 (1958).

gefärbtes Produkt; Ausb.  $\approx 0.5$  g ( $\approx 7\%$ , bez. auf die Einwaage an 4). —  $^1\text{H-NMR}$  (Bis(trideuteriomethyl)sulfoxid, TMS):  $\delta$  0.6–0.9 ppm (m, 6,  $\text{CH}_3$ ), 1.0–2.1 (m, 2,  $\beta\text{-CH}_2$ , 2,  $\delta\text{-CH}_2$ , 1,  $\gamma\text{-CH}$ ), 3.6 (d, 1,  $\alpha\text{-CH}$ ), 6–9 (breite Absorption, 4,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ). — Retentionszeit auf dem Aminosäureanalysator 187 min; keine sichtbaren, ninhydrinpositiven Verunreinigungen. — Das Hydrochlorid wurde mit Lithiumhydroxid nach l. c.<sup>31)</sup> in die freie Säure DL-13 übergeführt; Ausb.  $\approx 200$  mg ( $\approx 3.4\%$ ).

$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$  (181.7) Ber. C 46.28 H 8.32 N 7.71 Gef. C 45.60 H 8.71 N 7.58

*DL-2-Amino-5-methylhexansäure-hydrochlorid* (DL-14 · HCl): Aus 6.04 g (40.0 mmol) 1-Brom-3-methylbutan; Ausb. 1.13 g (16%). —  $^1\text{H-NMR}$  (Bis(trideuteriomethyl)sulfoxid, TMS):  $\delta$  0.90 ppm (d, 6,  $\text{CH}_3$ ), 1.0–2.0 (m, 5,  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.8 (t, 1,  $\alpha\text{-CH}$ ), 6–9 (breite Absorption, 4,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ). — Retentionszeit auf dem Aminosäureanalysator 178 min; keine sichtbaren, ninhydrinpositiven Verunreinigungen.

$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$  (181.7) Ber. C 46.28 H 8.32 N 7.71 Gef. C 46.24 H 8.95 N 7.69

#### Darstellung $\beta$ -verzweigter Aminosäuren durch Kondensation von 4 mit Aldehyden oder Ketonen und anschließende katalytische Hydrierung

Zu einer Lösung von 4.49 g (40.0 mmol) Kalium-*tert*-butylat in 30 ml wasserfreiem THF tropft man in 10 min bei  $-70^\circ\text{C}$  unter Rühren 5.65 g (40.0 mmol) 4, gelöst in 10 ml THF, und versetzt anschließend mit einer Lösung von 40.0 mmol Aldehyd oder Keton in 10 ml THF. Man entfernt das Kältebad, läßt das Reaktionsgemisch auf Raumtemp. kommen und zieht nach weiterem 30 min. Rühren das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab. Man versetzt mit 100 ml Äther und fügt 30 g Eis und 2.40 g (40.0 mmol) Eisessig zu. Nach dem Schmelzen des Eises wird ausgeäthert und über Natriumsulfat getrocknet. Der Äther wird abgezogen und das zurückbleibende rohe 7 ohne weitere Reinigung hydriert.

*Katalytische Hydrierung*: 7 wird in möglichst wenig Eisessig gelöst, mit  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{2}$  seines Gewichts an 10proz. Palladium auf Aktivkohle versetzt und bei nur wenig mehr als Atmosphärendruck hydriert. Wenn kein Wasserstoff mehr aufgenommen wird (nach ca. 20 h), wird vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeengt und durch 30 min. Kochen mit 6 N HCl unter Rückfluß das freie 9 dargestellt. Reinigung durch Austauschchromatographie wie oben beschrieben.

*DL-2-Amino-3-methylhexansäure-hydrochlorid* (Gemisch aus *racem.* 11 · HCl + *racem.* 12 · HCl): 3.45 g (40.0 mmol) Methyl-*n*-propyl-keton ergaben 6.72 g 7, das mit 2.87 g Pd/C in 13 ml Eisessig bei Raumtemp. während 20 h hydriert wurde; Ausb. 2.68 g (37%). —  $^1\text{H-NMR}$  (Bis(trideuteriomethyl)sulfoxid, TMS):  $\delta$  0.9–1.1 ppm (m, 6,  $\text{CH}_3$ ), 1.2–1.5 (m, 4,  $\text{CH}_2$ , 1,  $\beta\text{-CH}$ ), 4.0 (d, 1,  $\alpha\text{-CH}$ ), 6–9 (breite Absorption, 4,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ). — Retentionszeiten auf dem Aminosäureanalysator 176 min für die *racem.* *erythro*- (11), 170 min für die *racem.* *threo*-Form (12); Mengenverhältnis der Enantiomerenpaare 1 : 1; keine sichtbaren, ninhydrinpositiven Verunreinigungen.

$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$  (181.7) Ber. C 46.28 H 8.32 N 7.71 O 17.61

Gef. C 46.39 H 8.84 N 7.61 O 17.63

*DL-3-Äthyl-2-aminopentansäure-hydrochlorid* (DL-15 · HCl): 3.45 g (40.0 mmol) Diäthylketon ergaben 6.66 g 7, das mit 3.00 g Pd/C in 13 ml Eisessig bei Raumtemp. während 20 h hydriert wurde; Ausb. 4.33 g (60%). —  $^1\text{H-NMR}$  (Bis(trideuteriomethyl)sulfoxid, TMS):  $\delta$  0.9 ppm (t, 6,  $\text{CH}_3$ ), 1.1–1.9 (m, 4,  $\text{CH}_2$ , 1,  $\beta\text{-CH}$ ), 3.8 (d, 1,  $\alpha\text{-CH}$ ), 6–9 (breite Absorption, 4,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ). —

<sup>31)</sup> J. P. Greenstein und M. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, Bd. 2, S. 835, John Wiley, New York 1961.



Retentionszeit auf dem Aminosäureanalysator 168 min; keine sichtbaren, ninhydrinpositiven Verunreinigungen.

$C_7H_{15}NO_2 \cdot HCl$  (181.7) Ber. C 46.28 H 8.32 N 7.71 Gef. C 46.12 H 8.32 N 7.72

*DL-2-Amino-3,4-dimethylpentansäure-hydrochlorid* (Gemisch aus *racem.* 16  $\cdot$  HCl und *racem.* 17  $\cdot$  HCl): 3.45 g (40.0 mmol) Isopropyl-methyl-keton ergaben 6.49 g 7, das mit 1.30 g Pd/C in 13 ml Eisessig bei Raumtemp. während 20 h hydriert wurde; Ausb. 2.35 g (32%). —  $^1H$ -NMR (Bis(trideuteriomethyl)sulfoxid, TMS):  $\delta$  0.9 ppm (m, 9,  $CH_3$ ), 1.8 (m, 2, CH), 3.9 (d, 1,  $\alpha$ -CH), 6–9 (breite Absorption, 4,  $NH_3^+$ ,  $CO_2H$ ). — Retentionszeiten auf dem Aminosäureanalysator 176 min für die *racem. erythro-* (16), 159 min für die *racem. threo-*Form (17); Mengenverhältnis der Enantiomerenpaare *erythro* : *threo* = 1:5; keine sichtbaren, ninhydrinpositiven Verunreinigungen.

$C_7H_{15}NO_2 \cdot HCl$  (181.7) Ber. C 46.28 H 8.32 N 7.71 Gef. C 46.17 H 8.84 N 7.56

*DL-2-Amino-4,4-dimethylpentansäure-hydrochlorid* (DL-18  $\cdot$  HCl): Aus 2.50 g (13.5 mmol)  $\beta$ -tert-Butyl- $\alpha$ -formamidoacrylsäure-äthylester durch Hydrieren in 40 ml wasserfreiem Methanol mit dreimal 500 mg  $PtO_2$  während 96 h; Aufarbeitung wie oben; Ausb. 1.47 g (60%). —  $^1H$ -NMR (Bis(trideuteriomethyl)sulfoxid, TMS):  $\delta$  1.0 ppm (s, 9,  $CH_3$ ), 1.8 (d, 2,  $CH_2$ ), 4.1 (t, 1,  $\alpha$ -CH), 6–9 (breite Absorption, 4,  $NH_3^+$ ,  $CO_2H$ ). — Retentionszeit auf dem Aminosäureanalysator 163 min; keine sichtbaren, ninhydrinpositiven Verunreinigungen.

$C_7H_{15}NO_2 \cdot HCl$  (181.7) Ber. C 46.28 H 8.32 N 7.71 Gef. C 46.15 H 8.98 N 7.73

#### Racemattrennung

182 mg (1.00 mmol) Aminosäure-hydrochlorid werden in 2 ml 1 N NaOH gelöst und unter Eiskühlung und Rühren mit 160 mg (1.42 mmol) Chloracetylchlorid und 0.71 ml 2 N NaOH abwechselnd derart versetzt, daß die Lösung stets alkalisch bleibt (*Schotten-Baumann*). Nach Beendigung der Reaktion wird mit 6 N HCl auf pH 1.7 gebracht. Die ausgefallene *N*-(Chloracetyl)aminosäure wird abfiltriert, mit wenig dest. Wasser gewaschen und in Wasser suspendiert. Man fügt 5 mg (9100 Enzymeinheiten) L-Aminoacylase zu, stellt mit Lithiumhydroxidlösung auf pH 7.4 und beläßt den Ansatz 12 h bei 37°C. Das Protein wird mit Aktivkohle (Norit) abgetrennt, das Reaktionsgemisch auf eine Austauschersäule von 1 cm Durchmesser und 3 cm Bett-höhe gegeben, die mit AG 50 W – X8 in der  $H^+$ -Form gefüllt und zuvor mit Wasser neutral gewaschen worden war. Man eluiert solange mit Wasser, bis das Eluat neutral reagiert, dann wäscht man die L-Aminosäure mit 1.3 N HCl aus. Der Test auf D-Aminosäure ergab einen Gehalt von weniger als 1% (Nachweisempfindlichkeit).

#### Test auf D-Aminosäure

*Reagenz A*: 12 mg Peroxidase aus Meerrettich (entspr. 3000 Enzymeinheiten) werden in 250 ml 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0 gelöst. Dazu werden 2.5 ml einer Lösung von 10 mg *o*-Dianisidin in 1 ml Methanol gegeben. Nach Verdünnen mit weiteren 250 ml Pufferlösung wird 5 min Sauerstoff durch die Lösung geleitet. Sie wird kühl aufbewahrt und ist etwa 2 Wochen beständig.

*Reagenz B*: 200  $\mu$ l einer Suspension von 5 mg D-Aminosäureoxidase in 1 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung (entspr. 20 Enzymeinheiten) werden mit einer 10 mM Kaliumchloridlösung auf 1 ml aufgefüllt. Diese Lösung soll stets frisch bereitet werden.

600  $\mu$ l Reagenz A und 20  $\mu$ l Reagenz B werden mit 200  $\mu$ l der auf D-Aminosäure zu testenden Lösung vermischt und bei 25°C und 440 nm die Änderung der optischen Dichte verfolgt. Zur Eichung werden Racemate von Isoleucin, Norleucin, u. a. eingesetzt. Auf diese Weise ist es möglich, von 1 mM Aminosäurelösungen ausgehend, noch 1% D-Aminosäure neben L-Aminosäure zu erfassen.

*L*-2-Aminoheptansäure (10): 200 mg (1.10 mmol) DL-10 · HCl ergaben 161 mg *N*-Chloracetyl-Derivat, das, in 15 ml Wasser suspendiert, nach Vorschrift mit Acylase behandelt wurde; Ausb. 28 mg (28%, bez. auf DL-10 · HCl) als Hydrochlorid.

ORD-Spektrum, 4.07 mg 10 · HCl in 2 ml Wasser:

$\lambda$	589	500	400	350	300	250 nm
[ $\Phi$ ]	+4.4	8.0	13.4	25.0	42.9	165

*L*-2-Amino-3-methylhexansäure (Gemisch aus 11 und 12): 700 mg (3.85 mmol) Gemisch aus *racem.* 11 · HCl und *racem.* 12 · HCl ergaben 405 mg *N*-Chloracetyl-Derivate, die, in 20 ml Wasser suspendiert, nach Vorschrift mit Acylase behandelt wurden; Ausb. 71 mg (20%, bez. auf das Ausgangsgemisch) als Gemisch der Hydrochloride.

(4*S*)-*L*-2-Amino-4-methylhexansäure (13): 200 mg (1.10 mmol) DL-13 · HCl ergaben 100 mg *N*-Chloracetyl-Derivat, das, in 6 ml Wasser suspendiert, nach Vorschrift mit Acylase behandelt wurde; Ausb. 12 mg (12%, bez. auf DL-13 · HCl) als Hydrochlorid.

ORD-Spektrum, 1.81 mg 13 · HCl in 2 ml Wasser:

$\lambda$	589	500	400	300	290	250 nm
[ $\Phi$ ]	-8.0	-20.0	-24.0	-12.0	0	+170

*L*-2-Amino-5-methylhexansäure (14): 200 mg (1.10 mmol) DL-14 · HCl wurden *N*-chloracetyliert und nach Vorschrift mit Acylase behandelt; Ausb. 15 mg (15%, bez. auf DL-14 · HCl) als Hydrochlorid.

ORD-Spektrum, 5.08 mg 14 · HCl in 2 ml Wasser:

$\lambda$	589	500	400	350	300	250 nm
[ $\Phi$ ]	+14.2	22.8	42.8	67.8	139	514

*L*-3-Äthyl-2-aminopentansäure (15): 200 mg (1.10 mmol) DL-15 · HCl ergaben 132 mg *N*-Chloracetyl-Derivat, das, in 7 ml Wasser suspendiert, nach Vorschrift mit Acylase behandelt wurde; Ausb. 11 mg (11%, bez. auf DL-15 · HCl) als Hydrochlorid.

ORD-Spektrum, 2.35 mg 15 · HCl in 2 ml Wasser:

$\lambda$	589	500	400	350	300	250 nm
[ $\Phi$ ]	+7.7	7.7	23.1	30.8	58.6	247

*L*-2-Amino-3,4-dimethylpentansäure (Gemisch aus 16 und 17): 250 mg (1.38 mmol) Gemisch aus *racem.* 16 · HCl und *racem.* 17 · HCl ergaben 214 mg *N*-Chloracetyl-Derivate, die, in 10 ml Wasser suspendiert, nach Vorschrift mit Acylase behandelt wurden; Ausb. 31 mg (25%, bez. auf das Ausgangsgemisch) als Gemisch der Hydrochloride. Der relativ große Unterschied in den Retentionszeiten der beiden Diastereomeren erlaubte eine wenigstens partielle Trennung auf Austauschersäulen in präparativen Mengen. Das Gemisch der Hydrochloride wurde auf eine Säule von 1.5 cm Durchmesser und 100 cm Bethöhe von AG 50 W - X8 in der H<sup>+</sup>-Form mit einem linearen Gradienten von 1.3 N bis 4.0 N HCl chromatographiert. Die ersten Fraktionen des aminosäurehaltigen Eluats (Kontrolle durch Aminosäureanalysator) enthielten ausschließlich 17; Ausb. 18 mg (70% des gesamten 17) als Hydrochlorid.

*L*-2-Amino-4,4-dimethylpentansäure (18): 200 mg (1.10 mmol) DL-18 · HCl ergaben 140 mg *N*-Chloracetyl-Derivat, das, in 10 ml Wasser suspendiert, nach Vorschrift mit Acylase behandelt wurde; Ausb. 20 mg (20%, bez. auf DL-18 · HCl) als Hydrochlorid.

ORD-Spektrum, 170 mg 18 · HCl in 2 ml Wasser:

$\lambda$	589	500	400	350	300	250 nm
[ $\Phi$ ]	+4.2	4.2	4.2	5.1	21.3	209

### Papierelektrophoretische Trennung epimerer Aminosäuren

3 bis 5 mg des Epimerengemisches werden auf die 40 cm breite Startlinie eines insgesamt 46 cm breiten und 98 cm langen Papierbogens aufgetragen und mit 4500 V (entspr. 46 V/cm) in Gegenwart eines Puffers pH 1.9, bestehend aus 8% Eisessig und 2% Ameisensäure in Wasser, und bei einer maximalen Stromstärke von 300 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Nach etwa 3 h werden die Papiere getrocknet und von ihren Rändern (in Laufrichtung) sowie, parallel zu diesen Rändern gleichmäßig über die Papierbreite verteilt, fünf etwa 1 cm breite Streifen („guide strips“, s. Abb. 2) herausgeschnitten und mit Ninhydrin angefärbt. An Hand der Färbung dieser Streifen konnten Trennung und Lage der Epimeren beurteilt werden. Sie wurden mit 0.1 N Essigsäure eluiert.

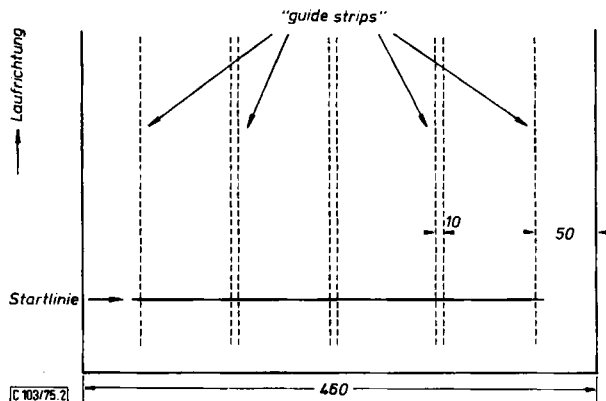


Abb. 2. Papierelektrophoretische Trennung epimerer Aminosäuren  
Papier: Schleier & Schüll Nr. 2316 bei 46 V/cm; Puffer: Eisessig und Ameisensäure (8% + 2% in Wasser) pH 1.9; von den Rändern und parallel zu diesen aus der Papiermitte werden Streifen („guide strips“) herausgeschnitten und mit Ninhydrin angefärbt

(3S)-L-2-Amino-3-methylhexansäure (11): Durch Elektrophorese von dreimal je 4.8 mg Epimerengemisch 11 + 12 (als Hydrochloride) wurden 4.5 mg 11 erhalten, das lt. Aminosäureanalyse mit 4% 12 verunreinigt war.

ORD-Spektrum, 4.00 mg 11 · HCl in 2 ml Wasser, nach Abzug des Anteils von 4% 12:

$\lambda$	589	500	400	350	300	255 nm
[ $\Phi$ ]	0	+17.3	38.1	176	577	2060

(3R)-L-2-Amino-3-methylhexansäure (12): Bei der elektrophoretischen Gewinnung von 11 fielen 3.5 mg 12 als Hydrochlorid an, das lt. Aminosäureanalyse mit 10% 11 verunreinigt war.

ORD-Spektrum, 4.57 mg 12 · HCl in 2 ml Wasser, nach Abzug des Anteils von 10% 11:

$\lambda$	589	500	400	350	300	255 nm
[ $\Phi$ ]	+28.8	43.7	83.1	126	218	548

(3S)-L-2-Amino-3,4-dimethylpentansäure (16): Bei der enzymatischen Gewinnung von 16 + 17-Gemisch waren durch Säulenchromatographie 70% des gesamten Gehalts an 17 abgetrennt worden. Das verbleibende Gemisch der Epimeren (12 mg) wurde elektrophoretisch getrennt; Ausb. an 16 2.8 mg als Hydrochlorid, frei von 17.

ORD-Spektrum, 1.94 mg 16 · HCl in 2 ml Wasser:

$\lambda$	589	500	400	350	300	250 nm
[ $\Phi$ ]	+28.1	41.3	71.2	112	184	478

(3R)-L-2-Amino-3,4-dimethylpentansäure (17): Bei der elektrophoretischen Gewinnung von 16 fielen 6.4 mg 17 als Hydrochlorid an, frei von 16. — IR (als Hydrochlorid, KBr): 3080 (NH), 2960 (CH), 1640, 1530, 1200  $\text{cm}^{-1}$ .

ORD-Spektrum, 1.23 mg 17 · HCl in 2 ml Wasser:

$\lambda$	589	500	400	350	300	250 nm
[ $\Phi$ ]	+58.8	58.8	94.1	153	294	897

#### Bestimmung der Absolutkonfiguration von 17

800 mg 17 · HCl (4.40 mmol) wurden mit 1.57 g (13.2 mmol) Kaliumbromid vermischt und unter Eiskühlung und kräftigem Rühren in 5.86 ml 3 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst<sup>32)</sup>. Dieser Lösung wurden bei 0°C 395 mg (5.73 mmol) Natriumnitrit in kleinen Portionen zugesetzt. Nachdem alles Nitrit zugefügt war, wurde noch 2 h gerührt, dann mehrfach ausgeäthert und die ätherischen Auszüge über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen. Es verblieb die 17 entsprechende  $\alpha$ -Bromcarbonsäure als zähflüssiger Rückstand, der mittels IR und  $^1\text{H-NMR}$  identifiziert wurde. — IR (Kapillarfilm): 2960 (CH), 1720 (CO), 655 (CBr)  $\text{cm}^{-1}$ . —  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.9 ppm (m, 9,  $\text{CH}_3$ ), 2.7 (m, 2, CH), 4.3 (m, 1,  $\alpha$ -CH), 8.1 (s, 1,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).

Die Bromcarbonsäure wurde in 4 ml wasserfreiem Äthanol gelöst und nach Zugabe von 300 mg Platinoxid unter leichtem Überdruck hydriert. Der Katalysator wurde dreimal erneuert. Nach Beendigung der Hydrierung wurde vom Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen. Das zurückbleibende Öl wurde durch  $^1\text{H-NMR}$ , ORD und Elementaranalyse als rechtsdrehende<sup>23)</sup> (3R)-3,4-Dimethylpentansäure identifiziert. —  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  2.0–2.4 (m, 2,  $\text{CH}_2$ ). — ORD-Spektrum: rechtsdrehend im Bereich 600 bis 250 nm in Wasser und Äthanol.

$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2$  (130.2) Ber. C 64.58 H 10.84 Br 0 Gef. C 63.19 H 10.83 Br <0.2

<sup>32)</sup> Die hier verwendete Vorschrift wurde l. c.<sup>33)</sup> entnommen.

<sup>33)</sup> A. Cruel, Dissertat. Techn. Univ. Braunschweig 1973.

<sup>34)</sup> J. P. Greenstein, Adv. Protein Chem. 9, 121 (1954).