

¹³C-NMR-Studien von geschützten Aminosäuren

Von

W. Voelter, St. Fuchs, R. H. Seuffer und K. Zech

Aus dem Chemischen Institut der Universität Tübingen,
Bundesrepublik Deutschland

Mit 10 Abbildungen

(Eingegangen am 27. Mai 1974)

¹³C-NMR Studies of Protected Amino Acids

The ¹³C-NMR spectra of a series of protected amino acids, as frequently used by peptide chemists, are discussed. The signals of the synthetic products are assigned on the basis of known chemical shift rules, spectral comparison and off-resonance spectroscopy. The value of pulse Fourier transform ¹³C-NMR spectroscopy for chemists engaged in peptide synthesis is clearly demonstrated.

Die ¹³C-NMR-Spektroskopie wird seit Entwicklung der Puls-Fourier-Technik^{1, 2} zu einer immer wichtigeren Methode zur Bestimmung der Strukturen organischer Moleküle und Naturstoffe^{3, 4}.

Im Zusammenhang mit der Synthese von Derivaten der Hypothalamus-, „Releasing“-Hormone⁵ benützen wir die ¹³C-NMR-Spektroskopie routinemäßig zur Strukturbestimmung der als Zwischenstufen anfallenden Aminosäure- und Peptidderivate. Da die ¹³C-NMR-Spektren geschützter Aminosäuren in Zukunft auch für andere Peptidgruppen von Bedeutung sein dürften, möchten wir in dieser Mitteilung zusammenfassend über die ¹³C-NMR-spektroskopischen Eigenschaften einiger Dutzend Aminosäurederivate mit verschiedenen, in der Peptidchemie häufig verwendeten, Schutzgruppen berichten. Im experimentellen Teil sind die von uns gewählten Synthesewege und die physikalischen Daten der Aminosäurederivate tabellarisch zusammengestellt.

1. Glycin und Derivate

Die ¹³C-chemischen Verschiebungen der Signale von Glycin wurden bereits im Jahre 1970 von *Horsley et al.*⁶ publiziert. Diese Autoren haben die Verschiebungsparameter durch Vermessen eines Glycins

gewonnen, das statt des natürlichen Gehalts an ^{13}C (1,1%) einen solchen von 15% hatte.

In Tab. 1 sind die ^{13}C -chemischen Verschiebungen von Glycin und drei Glycinderivaten zusammengestellt.

Beim Glycin kann die Signalzuordnung auf Grund allgemeiner ^{13}C -chemischer Verschiebungsregeln^{3, 4, 7, 8} eindeutig getroffen werden. Das Signal des mit elektronenziehenden Sauerstoffatomen verknüpften Kohlenstoffatoms der Carboxylgruppe erscheint bei tiefstem, die CH_2 -Gruppe absorbiert bei höchstem Feld. Die getroffene Zuordnung kann durch das Protonen-, „Off-Resonance“-Spektrum be-

Tabelle 1. ^{13}C -chemische Verschiebungen von Glycin und Derivaten. Die ppm-Werte sind auf $\text{TMS} = 0$ bezogen; Gly-OH wurde in D_2O gemessen, die übrigen Verbindungen in DMSO

Name	Aminosäureteil			Schutzgruppe		
	COOH	CONH ₂	C _α	C=O	C _t	CH ₃
Gly-OH ⁶	— 173,50		— 42,50			
Gly-NH ₂ · HCl		— 168,00	— 40,25			
Boc-Gly-OH	— 172,10		— 42,10	— 156,10	— 78,35	— 28,40
Boc-Gly-NH ₂		— 171,75	— 43,25	— 156,00	— 78,20	— 28,25

stätigt werden: Für das quartäre Kohlenstoffatom wird ein Singulett, für die CH_2 -Gruppe ein Triplett beobachtet.

Die wichtigste Singalzuordnungshilfe für Spektren komplexer Moleküle ist mit Sicherheit der spektrale Vergleich zwischen einfachen Derivaten der Molekülreste und dem Gesamtmolekül. Die Zusammenhänge können am übersichtlichsten durch ^{13}C -NMR-Strichspektren erkannt werden.

Aus Abb. 1 folgt, daß das C-terminale Kohlenstoffatom des Glycins in dem relativ schmalen ppm-Bereich von — 168 bis — 174 absorbiert und der Resonanzbereich des N-terminalen C-Atoms zwischen — 40 und — 44 ppm liegt. Die drei restlichen Signale in den Spektren von Boc-Gly-OH und Boc-Gly-NH₂ müssen durch C-Atome des *t*-Butyloxy-carbonylrestes verursacht werden: Die Kohlenstoffatome der drei Methylgruppen lassen sich NMR-spektroskopisch nicht unterscheiden; ihr gemeinsames Signal liegt bei höchstem Feld und zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Resonanzen durch besonders große Intensität aus. Wie wiederum aus bisher bekannten Verschiebungsregeln folgt, muß das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Boc-Restes von allen C-Atomen der Schutzgruppe bei tiefstem Feld absorbieren (— 156 ppm). Das

noch übrig bleibende Signal der *Boc*-Aminosäuren muß schließlich durch Absorption des quartären Kohlenstoffatoms des *tert*-Butylrestes verursacht werden.

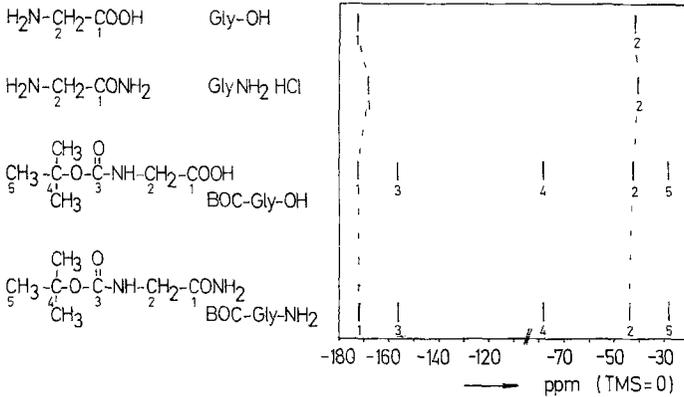


Abb. 1. ¹³C-NMR-Strichspektren von Glycin und Derivaten

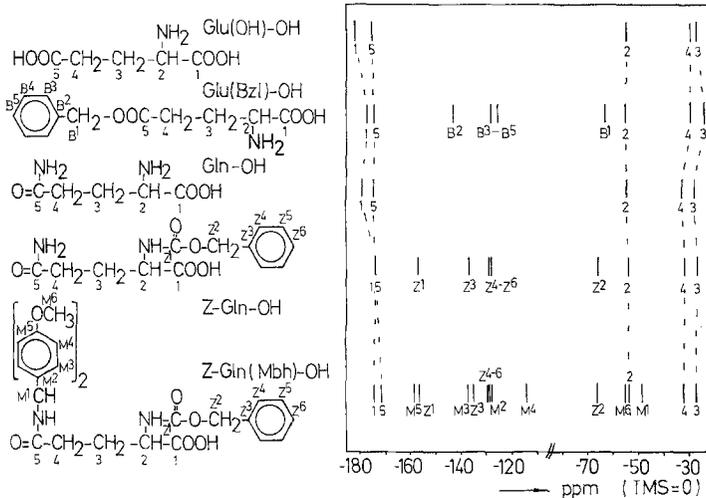


Abb. 2. ¹³C-NMR-Strichspektren von Glu(OH)-OH, Glu(Bzl)-OH, Gln-OH, Z-Gln-OH, Z-Gln(Mbh)-OH

2. Glutaminsäure, Glutamin und Derivate

Auch die ¹³C-chemischen Verschiebungen der Glutaminsäure wurden schon relativ früh publiziert⁶. Die beiden Signale der freien Carboxylgruppen erscheinen bei tiefstem Feld, wobei die Nachbarschaft der —CH(NH₂)-Gruppe gegenüber dem —CH₂-Rest eine Tieffeldwirkung von 6 bis 7 ppm hat. Die Resonanz des mit der Aminogruppe verknüpf-

ten C-Atome ($-55,70$ ppm) ist charakteristisch für α -C-Atome von Aminosäuren und Peptiden^{6, 9, 10}. Die Resonanz von C_γ ist gegenüber der von C_β um mehr als 6 ppm nach tieferem Feld verschoben, da die benachbarte Carboxylgruppe einen stärkeren Elektronenzug ausübt als die nachbarständige $-\text{CH}(\text{NH}_2)$ -Gruppe (ppm-Werte vgl. Tab. 2).

Aus dem Vergleich der Strichspektren von Glu(Bzl)-OH und Gln-OH mit dem Spektrum der Stammverbindung Glutaminsäure (vgl. Abb. 2) können die Signalzuordnungen der Aminosäurederivate eindeutig getroffen werden. Von den aromatischen Kohlenstoffatomen des Benzylrestes kann nur die Resonanz des C-Atoms B^2 ($-142,75$ ppm; vgl. Abb. 2) mit Sicherheit zugeordnet werden. Für die ppm-Werte der entsprechenden Kohlenstoffatome wird im Toluol $-137,7$ ¹¹ und im Benzylalkohol¹² $-141,0$ ppm angegeben.

Die Aromaten-C-Atome des Bzl- und Z-Restes absorbieren bei ähnlichen ppm-Werten; das substituierte C-Atom des Phenylrestes der Z-Gruppe tritt jedoch gegenüber demjenigen des Bzl-Restes bei um ungefähr 5 ppm höherem Feld in Resonanz.

Als Ausgangsprodukt zur Herstellung von Pyroglutaminsäurepeptiden ist in letzter Zeit besonders das Benzyloxycarbonyl-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutamin wichtig geworden¹³.

Die Signale dieses 28 C-Atome enthaltenden Moleküls lassen sich durch spektralen Vergleich mit Analogenen und „Off-Resonance“-Spektroskopie außer den Resonanzen der aromatischen C-Atome eindeutig zuordnen, wie dies Tab. 2 und Abb. 2 zeigen.

Die Signale der beiden Methoxygruppen müssen zusammenfallen; sie unterscheiden sich im Hochfeldbereich durch besonders große Intensität von Nachbarresonanzen deutlich. Außerdem liegen die ppm-Werte der Methoxyresonanzen von Z-Gln(Mbh)-OH ($-55,05$) und von Anisol¹⁴ ($-54,1$) eng beieinander, was für die Richtigkeit der Zuordnung spricht. Durch spektralen Vergleich des Mbh-Restes in Z-Gln(Mbh)-OH mit Anisol¹⁴ kann gefolgert werden, daß die Resonanz bei $-158,30$ ppm im Spektrum der geschützten Aminosäure dem mit der OCH_3 -Gruppe substituierten C-Atom zuzuordnen ist. Das entsprechende C-Atom in Anisol absorbiert bei $-159,8$ ¹⁴ ppm. Ebenso muß das Signal bei $-113,70$ ppm durch Resonanz eines aromatischen C-Atoms des Mbh-Restes verursacht werden. Vergleichsweise liegen die ppm-Werte von C-2 und C-6 in Anisol bei $-113,5$ ppm¹⁴.

Aus zweierlei Gründen ordnen wir die bei $-137,15$ ppm bzw. $-134,95$ ppm liegenden Resonanzen von Z-Gln(Mbh)-OH einem Aromatensignal der Z- bzw. der Mbh-Gruppe zu:

1. auf Grund der Signallage (Vergleich mit dem Spektrum von Z-Gln-OH!) und

Tabelle 2. ^{13}C -chemische Verschiebungen von Glutaminsäure, Glutamin

Name	Aminosäureteil				
	COOH	CONH ₂	C _α	C _β	C _γ
Glu-OH ⁶	— 175,60 — 182,30(α)		— 55,70	— 28,10	— 34,50
Glu(Bzl)-OH	— 177,40(α) — 174,70		— 55,15	— 24,80	— 29,35
Gln-OH ⁹	— 179,50	— 174,45	— 52,20	— 28,30	— 33,00
Z-Gln-OH	— 174,15	— 174,15	— 53,85	— 26,85	— 31,70
<i>Mbh</i> -OH					
Z-Gln(<i>Mbh</i>)-OH	— 173,90	— 170,80	— 53,60	— 27,10	— 31,95
<i>Boc</i> -Gln-OH	— 173,90	— 173,90	— 53,20	— 26,65	— 31,50

* Glu-OH wurde in D₂O gemessen, Gln-OH in D₂O/DCl, Z-Gln(*Mbh*)-OH

2. auf Grund der Signalintensität, die bei der Resonanz bei höherem Feld mehr als doppelt so groß ist (2 Methoxyphenylreste) wie beim Nachbarsignal.

Die noch übrigbleibenden Resonanzen im aromatischen ppm-Bereich können sowohl durch C-Atome des Z- als auch des *Mbh*-Restes verursacht werden. Für eine eindeutige Zuordnung müssen noch mehr Vergleichssubstanzen synthetisiert und vermessen werden.

Unter Berücksichtigung der Diskussion der ^{13}C -NMR-Spektren von Glu-OH (vgl. oben, Tab. 2 und Abb. 2) und *Boc*-Gly-OH (vgl. 1, Tab. 1 und Abb. 1) läßt sich die Signaluordnung von *Boc*-Gln-OH mühelos durchführen (vgl. Abb. 2 und Tab. 2).

3. Arginin und Derivate

Die ^{13}C -NMR-Parameter von Arginin und einigen Derivaten sind in Tab. 3 und den Abb. 3 und 4 zusammengestellt. Die ^{13}C -chemi-

und Derivaten. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen*

C _t	Schutzgruppen						
	Z, Bzl, Mbh			t-Boc			
C=O	CH ₂	C ₆ H ₅	C=O	C ₂	CH ₃	OCH ₃	
		— 63,25	— 142,75(B ²)				
			— 128,30				
			— 126,65				
	— 156,55	— 65,80	— 137,25(Z ³)				
			— 128,70				
			— 128,05				
— 73,80			— 127,75(M ²)				— 55,15
(M ¹)			— 138,45(M ³)				(M ⁶)
			— 113,60(M ⁴)				
			— 158,40(M ⁵)				
— 48,75	— 156,35	— 65,60	— 158,30(M ⁵)				— 55,05
			— 137,15				
			— 134,95				
			— 128,50				
			— 127,75				
			— 113,70				
				— 155,60	— 78,10	— 28,15	

in Dioxan—H₂O, die übrigen Verbindungen in DMSO.

sehen Verschiebungen und Signalzuordnungen der Stammverbindungen sind bereits früher publiziert^{6, 9} worden und dienen als Grundlage der hier getroffenen Zuordnung.

Beim Vergleich von Arg-OH mit dem Methylester zeigt sich, daß sich im Ester das Signal von C-1 nach höherem Feld verschiebt. Diese Hochfeldverschiebung wird allgemein beobachtet; so z. B. erscheint die Resonanz der Carboxylgruppe von Essigsäure bei — 176,9 ppm¹⁵; im Methylester liegt das Signal des entsprechenden Kohlenstoffatoms bei — 170,7 ppm¹⁶.

Der Vergleich der ¹³C-chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome des Guanidylrestes im Arginin und Nitroarginin zeigt, daß die Nitrogruppe einen schwachen, aber deutlichen elektronenziehenden Effekt auf das zentrale C-Atom ausübt.

Die Signale der Boc-Gruppe im Boc-Arg(NO₂)-OH können durch spektrale Vergleiche mit Boc-Gly-OH (vgl. 1) eindeutig zugeordnet werden.

Tabelle 3. ^{13}C -chemische Verschiebungen von Arginin und Derivaten.
in D_2O gemessen, die übrigen

Name	Aminosäureteil					
	COOH bzw. COOR	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{N}- \\ \diagup \\ \text{HN}- \end{array}$	C_α	C_β	C_γ	C_δ
Arg-OH ⁶	— 175,20	— 157,50	— 55,10	— 28,50	— 24,90	— 41,50
Arg-OMe· 2 HCl	— 169,80	— 157,00	— 53,10	— 27,20	— 24,40	— 40,25
Boc-Arg- (NO ₂)-OH	— 174,25	— 159,55	— 53,40	— 28,35	— 25,25	— 40,55
Z-Arg-OH	— 176,20	— 157,65	— 55,65	— 29,90	— 25,35	— 40,55
<i>Tos</i> -Cl						
Z-Arg- (<i>Tos</i>)-OH	— 173,90	— 156,90 — 156,35	— 53,85	— 28,25	— 25,90	— 40,55

Analog lassen sich die Zuordnungen der Resonanzen der Z-Gruppe von Z-Arg-OH (Abb. 4, Tab. 3) durch Vergleich des Spektrums mit dem von Z-Gln-OH treffen.

Voraussetzung für die Zuordnung der Signale im Aromatenbereich von Z-Arg(*Tos*)-OH ist die Kenntnis der Signallagen der C-Atome von Tosylchlorid. Das Spektrum des p-Toluolsulfonsäurechlorides zeigt, wie erwartet, 5 Resonanzen (Abb. 4). Auf Grund allgemein chemischer Verschiebungsregeln^{3, 4} läßt sich das Signal bei höchstem Feld (— 21,25 ppm) der Methylgruppe (*T*⁵) zuordnen. Vergleichsweise liegt die Methylresonanz von Toluol bei — 21,3 ppm¹¹. Da die SO₂Cl-Gruppe einen starken Elektronenzug auf das mit ihr verknüpfte C-Atom ausübt, ordnen wir das Signal bei tiefstem Feld *T*¹ zu (vgl. Abb. 4). Die Nachbar-

Die ppm-Werte sind auf $\text{TMS} = 0$ bezogen; Arg—OH wurde Verbindungen in DMSO

Schutzgruppen					
	<i>Z, Tos</i>			<i>t-Boc</i>	
C=O	CH_2	C_6H_5	C_t	CH_3	$\begin{array}{c} \text{O}-\text{CH}_3 \\ \\ -\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3 \end{array}$
					— 51,70
— 155,80			— 78,35	— 28,40	
— 155,80	— 65,30	— 137,45 (Z^3)			
		— 128,50			
		— 127,65 (Z^{4-6})			
		— 144,45 (T^1)			— 21,25
		— 139,30 (T^4)			
		— 128,80 (T^2)			
		— 126,00 (T^3)			
— 156,90	— 65,70	— 142,00			— 21,05
		— 141,25			
		— 137,15			
		— 129,25			
		— 128,50			
		125,80			
		— 127,85			

resonanz (— 139,30 ppm) liegt bei einem ähnlichen ppm-Wert wie das Signal des substituierten C-Atoms in Toluol (— 137,7 ppm)¹¹ und wird somit T^4 zugeordnet. Die Signale von T^2 und T^3 und ihre entsprechenden Symmetrieanaloga fallen paarweise zusammen und zeichnen sich daher durch besondere Intensität aus. Für eine eindeutige Zuordnung müssen erst weitere Derivate vermessen werden.

Aus Abb. 4 geht hervor, daß sich die ^{13}C -Resonanzen von Z -Arg(*Tos*)-OH durch spektralen Vergleich mit *Tos*-Cl und Z -Arg-OH außer denen im aromatischen Bereich nahezu ausnahmslos zuordnen lassen. Für die 7 im aromatischen ppm-Bereich auftretenden Resonanzen kann die Zuordnung jedoch erst nach Vermessung weiterer Derivate eindeutig getroffen werden.

4. Pyroglutaminsäure und Derivate

Pyroglutaminsäure ist Bestandteil wichtiger Peptidhormone, wie z. B. des Thyreotropin-freisetzenden Hormons (*TRH*) und des luteini-

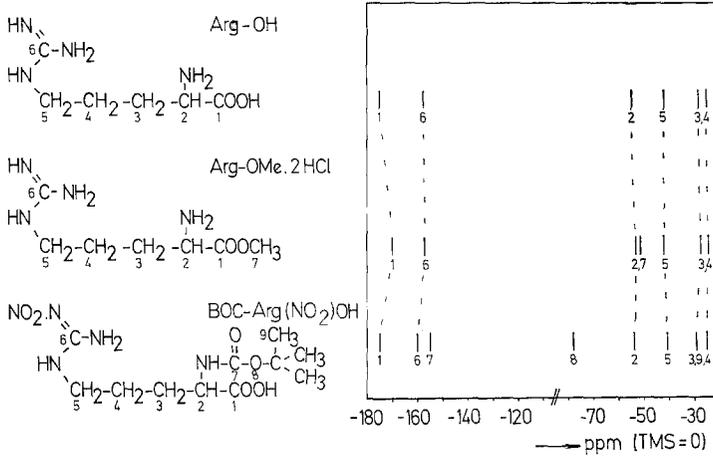


Abb. 3. ¹³C-NMR-Strichspektren von Arginin und Derivaten

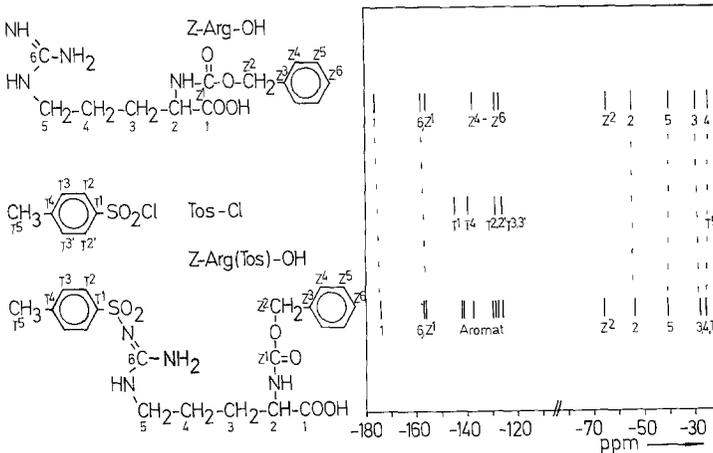


Abb. 4. ¹³C-NMR-Strichspektren von Z-Arg-OH, Tos-Cl und Z-Arg(Tos)-OH

sierende und follikelstimulierende Hormon-freisetzenden Hormons (*LH/FSH-RH*). In diesem Zusammenhang sind in unserer Arbeitsgruppe verschiedene Pyroglutaminsäurederivate synthetisiert wor-

Tabelle 4. ¹³C-chemische Verschiebungen von Pyroglutaminsäure und Derivaten und von 2,4,5-Trichlorphenol. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen; Pyr-OH wurde in H₂O, pH 6,33, gemessen, die übrigen Verbindungen in DMSO

Name	Aminosäureteil						Schutzgruppen			
	COOH bzw. COOR	CO—NH	C _α	C _β	C _γ	C=O	Z bzw. OCP CH ₂	C ₆ H ₅	t-Boc C _t	CH ₃
Pyr-OH HOCP	— 180,20	— 181,20	— 58,35	— 25,35	— 29,65					
								— 153,00 (C—C 1)		
								— 130,55 (C—C ^{2,4,5})		
								— 121,05 (C—C ^{2,4,5})		
								— 119,85 (C—C ^{3,6})		
								— 117,50 (C—C ^{3,6})		
								— 145,65		
								— 131,30		
								— 130,75		
								— 130,00		
								— 125,90		
								— 135,60		
								— 128,50		
								— 128,20		
								— 127,65		
Pyr-OCP	— 170,70	— 177,25	— 54,80	— 24,60	— 28,90					
Z-Pyr-OH	— 173,15	— 173,15	— 58,50	— 21,25	— 30,85	— 150,75	— 67,35			
Boc-Pyr-OH	— 173,15	— 173,15	— 58,60	— 20,95	— 30,95	— 149,10			— 82,10	— 27,50

den^{17, 18}, deren ¹³C-chemische Verschiebungen in Tab. 4 zusammengestellt sind.

Die Signale der Pyroglutaminsäure lassen sich auf Grund ihrer pH-Abhängigkeit¹⁷ und durch Vergleich mit denen der Glutaminsäure eindeutig zuordnen: Am stärksten sind die Signallagen der C-Atome 1, 2 und 3 vom pH abhängig, da sich die Elektronendichte von C-1 beim Abdissoziieren des Protons der Carboxylgruppe am stärksten

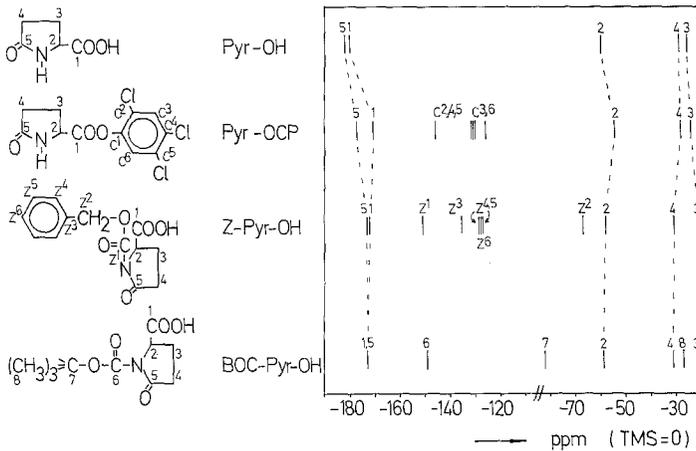


Abb. 5. ¹³C-NMR-Strichspektren von Pyr-OH, Pyr-OCP, Z-Pyr-OH und Boc-Pyr-OH (ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen)

ändert. Durch Vermessen der Pyroglutaminsäure bei verschiedenen pH-Werten lassen sich die eng beieinanderliegenden Signale von C-5 und C-1 bzw. von C-4 und C-3 den entsprechenden C-Atomen zuordnen.

Abb. 5 erleichtert die Signalzuordnung für die Pyroglutaminsäurederivate.

In allen 3 Derivaten der Pyroglutaminsäure von Abb. 5 lassen sich die vom Pyroglutaminsäurerest herrührenden Signale durch Spektrenvergleich mit der Stammverbindung identifizieren. Von den Signalen des OCP-Restes lassen sich die Resonanzen für C—C¹ (— 153,00 ppm) und C—C^{3, 6} (Signale bei — 119,90 und — 117,50 ppm) eindeutig identifizieren. Die eng beieinanderliegenden Signale der Kohlenstoffatome —C², —C⁴ und —C⁵ können jedoch den einzelnen C-Atomen nicht zugeordnet werden. Im Spektrum der Verbindung Z-Pyr-OH sind alle 3 Aromatensignale getrennt. Das Kohlenstoff-

atom $-Z^3$ (vgl. Abb. 5 und 6) tritt bei tiefstem Feld in Resonanz ($-135,60$ ppm). Auf Grund der Signalintensitäten ist die Resonanz bei $-128,20$ ppm $C-Z^6$ (einfache Intensität!) und die Signale bei $-128,50$ bzw. $-127,65$ ppm $C-Z^4, 8$, $C-Z^5, 7$ (jeweils doppelte Intensität!) zuzuordnen (vgl. Abb. 5 und 6).

Die Signale der *Boc*-Gruppe von *Boc*-Pyr-OH lassen sich durch spektralen Vergleich mit *Boc*-Gly-OH eindeutig identifizieren.

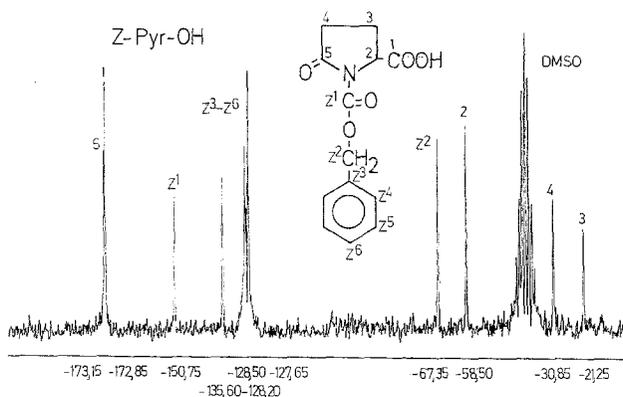


Abb. 6. Puls-Fourier-Transform- ^{13}C -NMR-Spektrum von *Z*-Pyr-OH in DMSO-d_6 (254 mg/1,5 ml); Akkumulation von 4096 Pulsinterferogrammen (ppm-Werte bezogen auf $\text{TMS} = 0$)

5. Prolin und Derivate

Auch der Prolinrest ist ein für die Aktivität essentieller Bestandteil vieler Peptidhormone. Die Signalzuordnung der in Tab. 5 zusammengestellten Prolinderivate gelingt mit Hilfe der für Prolin bekannten Korrelation⁶. Substituiert man das Iminowasserstoffatom des Prolins durch die Acetyl-, *t*-Butyloxycarbonyl- oder Benzylloxycarbonyl-Schutzgruppe, dann werden für die meisten Kohlenstoffatome zwei Resonanzen gefunden, was durch das Vorliegen von *cis/trans*-Isomeren erklärt wird¹⁹⁻²¹. Behinderte Rotation um die $-\text{CO}-\text{NH}$ -Bindung ist Ursache dieser *cis/trans*-Isomerie. Die Zugehörigkeit einer Resonanz zum *cis*- oder *trans*-Isomeren kann meist an der Signalintensität erkannt werden, da die Isomeren selten zu gleichen Teilen vorliegen. Unter der Berücksichtigung der ^{13}C -Signalintensitäten²² und der Ergebnisse von Protonenresonanzuntersuchungen²³ wurden die Resonanzen der *cis/trans*-Isomerenpaare von Tab. 5 zugeordnet.

Tabelle 5. ^{13}C -chemische Verschiebungen von *Protein und Derivaten*. Die ppm-Werte sind auf $\text{TMS} = 0$ bezogen

Name	Aminosäureteil							Schutzgruppen				
	COOH	CONH ₂	C _α	C _β	C _γ	C _δ	C=O	CH ₂	C ₆ H ₅	C _t	<i>t</i> -Boc oder O- <i>t</i> -Bu	CH ₃
Pro-OH ⁶ , *	— 174,60		— 61,60	— 29,70	— 24,40	— 46,50						
Pro-NH ₂ *		— 180,05	— 59,90	— 30,55	— 25,15	— 46,40						
Acetyl-Pro-OH ⁶⁵ , **												
<i>cis</i>	— 173,95		— 59,55	— 30,95	— 22,55	— 45,95	— 168,45					— 22,25
<i>trans</i>	— 173,60		— 58,25	— 29,25	— 24,50	— 47,35	— 168,75					— 22,25
Boc-Pro-OH †												
<i>cis</i>	— 178,35		— 58,80	— 30,75	— 23,50	— 46,20	— 153,95			— 80,25		— 28,25
<i>trans</i>	— 176,60		— 58,80	— 29,35	— 24,15	— 46,70	— 155,35			— 80,25		— 28,25
Boc-Pro-NH ₂ *												
<i>cis</i>	— 178,70		— 60,40	— 31,10	— 23,50	— 46,70	— 155,70				— 81,80	— 27,60
<i>trans</i>	— 178,15		— 60,00	— 30,45	— 23,95	— 47,25	— 155,70				— 81,80	— 27,60
Z-Pro-OH †												
<i>cis</i>	— 176,60		— 58,25	— 30,45	— 23,00	— 46,05	— 154,30	— 66,90	— 135,95			
<i>trans</i>	— 176,20		— 58,80	— 29,25	— 23,85	— 46,60	— 155,05	— 66,90	— 128,05			
												— 127,40
												— 127,10

* In D₂O gemessen.

** In DMSO gemessen.

† In CDCl₃ gemessen.

6. Tyrosin, Histidin und Derivate

Sowohl bei den Tyrosin- als auch den Histidinderivaten gelingt die Signalzuordnung der C-Atome des nichtaromatischen Aminosäurerestes durch Vergleich der Spektren mit dem der entsprechenden Stammverbindung (vgl. Tab. 6 und Abb. 8).

Im Spektrum von *Z*-Tyr(*Bzl*)-OH ist das der Carboxylresonanz (— 173,60 ppm) benachbarte Signalpaar den C-Atomen Z^1 und C-7

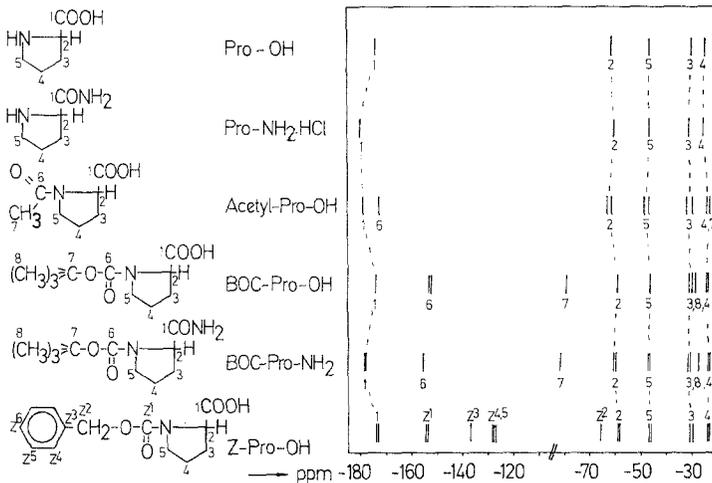


Abb. 7. ^{13}C -NMR-Strichspektren von Prolin und Derivaten (ppm-Werte sind auf *TMS* = 0 bezogen)

zuzuordnen. Die restlichen 17 aromatischen C-Atome absorbieren zwischen — 114,60 und — 137,55 ppm; da in diesem ppm-Bereich nur 5 Signale liegen, müssen etliche dieser C-Atome zusammenfallende chemische Verschiebungen haben. Die beiden CH_2 -Resonanzen der *Bzl*- und *Z*-Gruppe erscheinen bei — 59,25 und — 65,40 (Z^2) ppm.

Analog werden die Zuordnungen für *Boc*-Tyr(*Bzl*)-OH getroffen: Im Aromatenbereich von — 137,35 bis — 114,60 ppm liegen 5 Resonanzen, die durch Absorption von 7 verschiedenartigen C-Atomen entstehen. Für die genaue Signalidentifizierung müssen noch mehr Vergleichssubstanzen vermessen werden. Eindeutig sind durch spektrale Vergleiche die Resonanzen der C-Atome der *Boc*-Gruppe zu identifizieren (vgl. Abb. 8, Tab. 6).

Dies gilt ebenso für die Signale der *Boc*-Gruppe von *Boc*-Tyr(*Bzl*)-*ONP*. Die drei Resonanzen von C-8, C-N¹ und C-7 liegen zwischen — 157,30 und — 155,35 ppm. Die Zuordnung für die restlichen 9 Aro-

Tabelle 6. ^{13}C -chemische Verschiebungen von Tyrosin, Histidin und Derivaten. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen. Tyr-OH wurde in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ gemessen, His-OH in H_2O , pH 7,2, die übrigen Verbindungen in DMSO

Name	Aminosäureteil				Schutzgruppen				
	COOH bzw. COOR	C_α	C_β	Carom.	Z, O-Bzl od. ONP C=O	CH ₂	C_6H_5	C_t	<i>t</i> -Boc od. <i>O</i> - <i>t</i> -Bu CH_3
Tyr-OH 6,9	— 175,00	— 57,30	— 37,50	— 117,50(6) — 130,50(5) — 156,30(7)					
Z-Tyr(Bzl)-OH	— 173,60	— 55,90	— 35,80	? (4) — 156,25 — 137,55 — 130,25 — 128,50 — 127,75 — 114,60	— 157,20	— 69,30(Bzl) — 65,40(Z)			— 156,25 — 137,55 — 130,25 — 128,50 — 127,75 — 114,60
Boc-Tyr(Bzl)-OH	— 173,80	— 55,55	— 35,70	— 155,60 — 137,35 — 130,25 — 127,65 — 125,50 — 114,70	— 157,10	— 69,25			— 155,60 — 78,10 — 28,25 — 137,35 — 130,25 — 127,65 — 125,50 — 114,70 — 164,10 (N ¹) — 139,85 (N ⁴) — 126,35 (N ³) — 115,90 (N ²)

HONP

<i>Boc-Tyr(Bzl)-ONP</i>	— 170,70	— 56,00	— 35,40	— 155,70	— 157,30	— 69,25	— 155,70	— 78,85	— 28,25
	—	—	—	— 155,35	—	—	— 155,35	—	—
	—	—	—	— 145,20	—	—	— 145,20	—	—
	—	—	—	— 137,35	—	—	— 137,35	—	—
	—	—	—	— 130,45	—	—	— 130,45	—	—
	—	—	—	— 129,25	—	—	— 129,25	—	—
	—	—	—	— 128,50	—	—	— 128,50	—	—
	—	—	—	— 127,65	—	—	— 127,65	—	—
	—	—	—	— 125,50	—	—	— 125,50	—	—
	—	—	—	— 122,90	—	—	— 122,90	—	—
	—	—	—	— 114,70	—	—	— 114,70	—	—
	—	— 173,70	— 54,70	— 27,85	— 136,05	—	—	—	—
His-OH	—	—	—	(C-5)	—	—	—	—	
	—	—	—	— 131,50	—	—	—	—	
	—	—	—	(C-2)	—	—	—	—	
	—	—	—	— 116,95	—	—	—	—	
—	—	—	(C-3)	—	—	—	—		

matensignale im Bereich von $-145,20$ bis $-114,70$ ppm kann noch nicht eindeutig getroffen werden.

In Tab. 6 sind außerdem die Daten für Histidin und einige Derivate angegeben. Auf Grund der in der Literatur²⁴ bekannten Zuordnung der Histidinsignale können die Resonanzen des Histidinrestes in His-OMe und Z-His-NHNH₂ eindeutig identifiziert werden. Über die

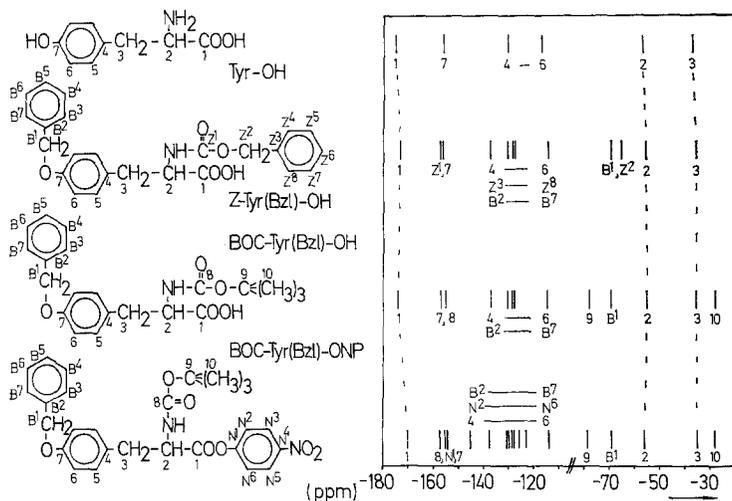
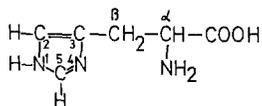


Abb. 8. ¹³C-NMR-Strichspektren von Tyr-OH, Z-Tyr(Bzl)-OH, Boc-Tyr(Bzl)-OH und Boc-Tyr(Bzl)-ONP (ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen)

Signalzuordnungen des Z-Restes sei auf frühere Diskussionen in der vorliegenden Mitteilung verwiesen. Die in Tab. 6 verwendete Nomenklatur der Histidinderivate entnehme man folgender Strukturformel:



7. Tryptophan und Derivate

Die ¹³C-chemischen Verschiebungen von Tryptophan sind bereits in einer früheren Mitteilung⁹ publiziert worden. Allerdings ist die Zuordnung zu dieser Zeit noch nicht möglich gewesen, da die Daten analoger Verbindungen nicht zugänglich waren.

Durch spektralen Vergleich mit anderen Aminosäuren lassen sich die Resonanzen der nicht-,aromatischen“ C-Atome eindeutig zuordnen (vgl. Tab. 7) und durch spektralen Vergleich des Tryptophans

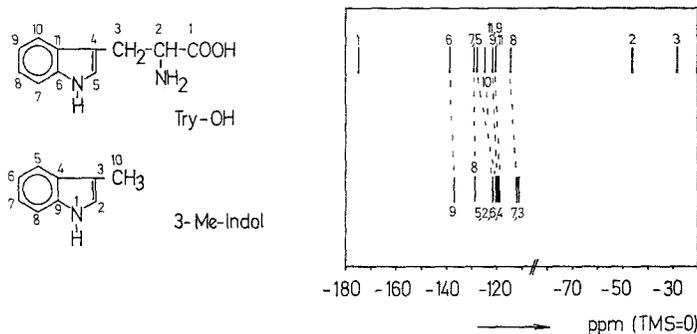


Abb. 9. ¹³C-NMR-Strichspektren von 3-Methylindol²⁵ und Tryptophan

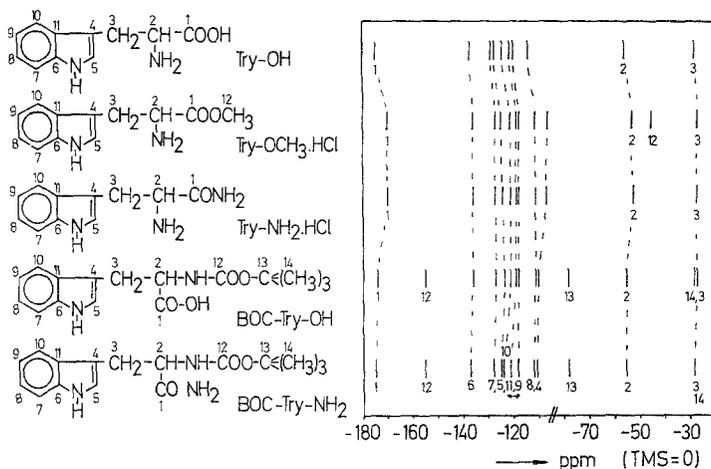


Abb. 10. ¹³C-NMR-Strichspektren von Tryptophan und Derivaten (ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen)

mit 3-Methylindol gelingt die Zuordnung nahezu aller „aromatischen“ C-Atome der Aminosäure.

Diese Signalidentifizierung wird auch den in Abb. 10 und Tab. 7 getroffenen Zuordnungen zugrunde gelegt.

Tabelle 7. ^{13}C -chemische Verschiebungen von *Tryptophan* und *Derivaten*. Die ppm-Werte sind auf $\text{TMS} = 0$ bezogen; Try-OH wurde in D_2O gemessen, die übrigen Verbindungen in DMSO

Name	COOH bzw. COOR	CONH ₂	C _α	C _β	C _{aromat.}	C=O	C _t	CH ₃	OCH ₃	Schutzgruppen	
										<i>t-Boc</i>	
Try-OH ^{6, 9}	—174,70		—56,00	—28,20	—114,25 (C-8)						
					—120,50 (C-9, 11)						
					—121,80 (C-9, 11)						
					—124,50 (C-10)						
					—127,60 (C-5)						
					—128,90 (C-7)						
					—138,60 (C-6)						
					—106,70 (C-4)						
					—111,65 (C-8)						
					—118,05 (C-9, 11)						
Try-OCH ₃ · HCl	—170,15		—53,00	—26,45	—118,55 (C-9, 11)						
					—121,25 (C-10)						
					—125,05 (C-5)						
					—127,00 (C-7)						
					—136,25 (C-6)						
					—107,15 (C-4)						
					—111,45 (C-8)						
					—118,35 (C-9, 11)						
					—118,80 (C-9, 11)						
					—121,05 (C-10)						
Try-NH ₂ · HCl	—170,25		—52,65	—27,10	—124,85 (C-5)						
					—127,20 (C-7)						
					—136,25 (C-6)						
										—45,30	

<i>Boc</i> -Try-OH	--- 174,25	--- 54,80	--- 26,95	--- 110,35 (C-4)	--- 155,60	--- 78,20	--- 28,40
				--- 111,55 (C-8)			
				--- 118,45 (C-9, 11)			
				--- 118,70 (C-9, 11)			
				--- 121,05 (C-10)			
				--- 123,85 (C-5)			
				--- 127,40 (C-7)			
				--- 136,25 (C-6)			
<i>Boc</i> -Try-NH ₂	--- 174,90	--- 55,25	--- 28,40	--- 110,60 (C-4)	--- 155,45	--- 78,20	--- 28,40
				--- 111,45 (C-8)			
				--- 118,45 (C-9, 11)			
				--- 121,05 (C-9, 11)			
				--- 123,95 (C-10)			
				--- 124,30 (C-5)			
				--- 127,65 (C-7)			
				--- 136,25 (C-6)			

Table 8

Ausgangsstoffe	Reaktionsprod., Ausb.	Schmp., gef., °C	Schmp., °C, Lit.	$[\alpha]_D^{20}$ gef. Konz./Solv.	$[\alpha]_D$, Lit. Konz./Solv.
<i>Boc</i> -Gly-NH ₂ + 2 <i>n</i> -HCl/AcOH 1,74 g/0,01 Mol 20 ml	Gly-NH ₂ · HCl ¹⁷ 85%	201—203	203—204 ¹⁷		
<i>Boc</i> -Gly-OH + NH ₃	<i>Boc</i> -Gly-NH ₂ ¹⁷	95			
1,75 g/0,01 Mol 3 ml	88%	93—94	94—95 ³⁵ 85—89 ⁴⁵ 89—90 ⁴⁶		
Gly-OH + <i>Boc</i> -N ₃	<i>Boc</i> -Gly-OH ³⁵ 79%		189 ⁴² 147—148 ⁴³ 174 ⁴⁴	+ 18,4° c = 6,0/AcOH	+ 19,6° c = 6,0/AcOH ⁴² + 12,2° c = 2,9/0,1 <i>n</i> -HCl ⁴³ + 19,5° c = 7,2/AcOH ⁴⁴
7,5 g/0,1 Mol 15,73 g/0,11 Mol					
Gly-OH + <i>Bzl</i> -OH	Glu(<i>Bzl</i>)-OH ⁴² 69%	174	116—118 ³⁵ 114—118 ³⁶	— 2,0° c = 1, EtOH	— 2,9° c = 1, EtOH ³⁵ — 3,0° c = 1,93/EtOH ³⁶ + 5,8° c = 2/EtOH ³⁹
73,5 g/0,5 Mol 500 ml					
Gly-OH + <i>Boc</i> -N ₃	<i>Boc</i> -Gln-OH ³⁵ 75%	113—115	135 ³⁹ 133—135 ³² 134 ⁴⁰	+ 5,8° c = 2/EtOH	— 6,75° c = 2/DMF ⁴¹ + 21,7° c = 2,5/MeOH ³² + 16,1° c = 2,5/H ₂ O ³² + 16,8° c = 2,6/5 <i>n</i> -EtOH ³²
14,6 g/0,1 Mol 16,06 g/0,12 Mol					
Glu(OMe)-OH · HCl ³⁹ + <i>Z</i> -Cl	<i>Z</i> -Gln-OH ³⁹ 62%	132	117—120 ⁴¹	— 6,5° c = 1/DMF + 21° c = 2,5/MeOH	
19,8 g/0,1 Mol 18,81 g/0,11 Mol					
<i>Z</i> -Gln-OH + <i>Mbh</i> -OH	<i>Z</i> -Gln(<i>Mbh</i>)-OH ⁴¹ 90%	103	196 ³² 195 ³³		
26,6 g/0,095 Mol 22,8 g/0,095 Mol	Arg · OMe · 2 HCl ³² 87%	193			
Arg · HCl + SOCl ₂ /MeOH					
10,5 g/0,05 Mol 5,4 ml					

Arg(NO ₂)-OH ³⁴ + Boc-N ₃ 6,3 g/0,02 Mol	3,15 g/0,022 Mol	124--126	123--125 ³⁵ 115--116 ³⁶ 111--114 ³⁷	---5,7° c = 1/ <i>DMF</i>	---5,6° c = 1/ <i>DMF</i> ³⁵ ---5,9 (<i>DMF</i>) ³⁸ ---9,3° c = 2/1 <i>m</i> -HCl ³² ---1,3° c = 2/ <i>MeOH</i> ³³ + 18,4° c = 1,6/ <i>DMF</i> ⁵⁹ + 14,8° c = 2/ <i>DMF</i> ⁶⁰ ---35,3° c = 1/ <i>AcOH</i> ⁶¹
Arg-OH + Z-Cl 17,42 g/0,1 Mol	17,04 g/0,1 Mol	183,5--185	184 ³²	---9,4° c = 2/1 <i>m</i> -HCl	---9,3° c = 2/1 <i>m</i> -HCl ³²
Z-Arg-OH + <i>Tos</i> -Cl 12,5 g/0,04 Mol	19 g/0,1 Mol	79--83	75--83 ³³	---1,2° c = 2/ <i>MeOH</i>	---1,3° c = 2/ <i>MeOH</i> ³³
Pyr-OH + HOCP 12,9 g/0,1 Mol	21,67 g/0,11 Mol	159--162	158--159 ⁵⁹ 161--163 ⁶⁰	+ 14,5° c = 2/ <i>DMF</i>	+ 18,4° c = 1,6/ <i>DMF</i> ⁵⁹ + 14,8° c = 2/ <i>DMF</i> ⁶⁰
Boc-Gln-O ⁶¹ + <i>DCHA</i> 13,7 g/0,06 Mol	14 ml	114	115--116 ⁶¹	... 35,0° c = 1/ <i>AcOH</i>	c = 2/ <i>DMF</i> ⁶⁰ ---35,3° c = 1/ <i>AcOH</i> ⁶¹
Z-Gln-O ⁶⁶ + <i>DCHA</i> 131,5 g/0,5 Mol	98 ml	131--133	134--135 ⁶²	---28,7° c = 1/ <i>MeOH</i>	---29,1° c = 1,01/ <i>MeOH</i> ⁶²
Boc-Pro-NH ₂ ¹⁷ + 1,2 <i>m</i> -HCl/ <i>AcOH</i> 2,15 g/0,01 Mol	20 ml	180	180	---63,0° c = 1/ <i>DMF</i>	---68,4° c = 2/ <i>EtOH</i> ⁵¹ ---70,7° c = 2/ <i>EtOH</i> ⁵²
Fox-Company, USA Boc-Pro-OH + NH ₃ 28,4 g/0,132 Mol	54 ml	97--98		... 44° c = 1/ <i>MeOH</i>	---68,5° c = 1/ <i>AcOH</i> ³⁵ ---44,5°
Pro-OH + <i>Boc</i> -N ₃ 11,51 g/0,1 Mol	15,73 g/0,11 Mol	135	134--136 ³⁵ 136--137 ⁴⁶	---68,0° c = 1/ <i>AcOH</i>	---68,5° c = 1/ <i>AcOH</i> ³⁵ ---44,5°
Pro-OH + Z-Cl 11,5 g/0,1 Mol	17,1 g/0,1 Mol	77	77 ⁵³ 76--77 ⁶³	---60,0° c = 2/ <i>AcOH</i>	c = 1/ <i>Dioxan</i> ³⁵ ---60° (<i>AcOH</i> ⁴⁶) ---60,5° c = 2/ <i>AcOH</i> ⁵³ ---40,6 c = 2/ <i>EtOH</i> ⁵³ ---61,7° c = 5,3/ <i>AcOH</i> ⁶³

Experimenteller Teil

In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen (Symbole für die Strichspektren) verwendet:

<i>Bzl-</i> (<i>B</i>)	Benzyl-
<i>Boc-</i>	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
<i>Mbh-</i> (<i>M</i>)	4,4'-Dimethoxybenzhydryl-
<i>OCP-</i> (<i>C</i>)	2,4,5-Trichlorphenyl-
<i>ONP-</i> (<i>N</i>)	<i>p</i> -Nitrophenyl-
<i>Tos-</i> (<i>T</i>)	<i>p</i> -Toluolsulfonyl-
<i>Z-</i>	Benzyloxycarbonyl-

Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Trichlorphenol und *p*-Toluolsulfochlorid (alle mit dem Reinheitsgrad zur Synthese) werden von der Fa. Merck-Schuchardt bezogen. 4-Nitrophenol, Hydrazinoameisensäure-*tert*-butylester (zur Synthese) und sämtliche Aminosäuren (für biochemische Zwecke) sind Produkte der Fa. Merck, Darmstadt. Die Reinheit der *AS*-Derivate wird durch Dünnschichtchromatographie (*DC*-Fertigplatten, Kieselgel F 254, Merck, Darmstadt) und Drehwert überprüft.

Dichlormethan wird über CaCl_2 getrocknet und über eine Vigreux-Kolonne destilliert, Dicyclohexylcarbodiimid wird durch Hochvakuumdestillation, *DMF* durch azeotrope Destillation [Gemisch *DMF* (250 g) : Benzol (30 g) : Wasser (12 g)] unter Ausschluß von Licht gereinigt. Die Drehwertmessungen werden mit einem Zeiss Polarimeter OLD-5 durchgeführt.

Benzyloxycarbonylchlorid wird nach ²⁶, *Boc*-Azid nach ²⁷⁻²⁹ und Dimethoxybenzhydrol nach ³⁰ und ³¹ hergestellt.

Die ^{13}C -Spektren werden an einem Bruker-HFX-90-Multikernspektrometer (22,63 MHz) aufgenommen. Die Impulsinterferogramme werden in einem Fabritek 1074-Rechner (4 K) 1024- bis 4096mal akkumuliert. Die Fourier-Transformation wird mittels eines Computers PDP-8-I der Fa. Digital durchgeführt. Die Bestimmung der Temperatur wird mit einem eingebauten Thermoelement der Fa. Bruker vorgenommen. Die Arbeitstemperatur beträgt 27 °C. Die Lösungsmittel werden, sofern möglich, zur ^2H -Stabilisation und deren Resonanzen als Standardsignale verwendet. Die Konzentration beträgt 100–200 mg/ml. Die ppm-Werte sind auf *TMS* als externen Standard bezogen. Aus den Adressendifferenzen werden die chemischen Verschiebungen maschinell berechnet.

In Tab. 8 ist eine Übersicht über die Synthesen der vermessenen Verbindungen gegeben.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Literatur

- ¹ R. R. Ernst und W. A. Andersson, Rev. Sci. Instr. **37**, 93 (1966).
- ² R. R. Ernst und J. S. Wangh, Adv. Magnet. Res. **2**, 108 (1966).
- ³ J. B. Stothers, Carbon-13 NMR Spectroscopy. New York: Academic Press. 1972.
- ⁴ E. Breitmaier und W. Voelter, ^{13}C -NMR Spectroscopy, Methods and Applications. Weinheim: Verlag Chemie. 1974.

- ⁵ *D. Gupta* und *W. Voelter* (Hrsg.), *Hypothalamic Hormones*. Verlag Chemie, im Druck.
- ⁶ *W. Horsley*, *H. Sternlicht* und *J. S. Cohen*, *J. Amer. Chem. Soc.* **92**, 680 (1970).
- ⁷ *E. Breitmaier*, *G. Jung* und *W. Voelter*, *Angew. Chem.* **83**, 659 (1971); *Angew. Chem. Internat. Ed.* **10**, 673 (1971).
- ⁸ *W. Bremser*, *Chemiker-Ztg.* **97**, 248 (1973).
- ⁹ *W. Voelter*, *G. Jung*, *E. Breitmaier* und *E. Bayer*, *Z. Naturforsch.* **26 b**, 213 (1971).
- ¹⁰ *R. Deslauriers*, *C. Garrigou-Lagrange*, *A.-M. Bellocq* und *I. C. P. Smith*, *FEBS Letters* **31**, 59 (1973).
- ¹¹ *D. Lauer*, *E. L. Motell*, *D. D. Traficante* und *G. E. Maciel*, *J. Amer. Chem. Soc.* **94**, 5335 (1972).
- ¹² *G. E. Maciel* und *J. J. Natterstad*, *J. Chem. Phys.* **42**, 2427 (1965).
- ¹³ *W. König* und *R. Geiger*, *Chem. Ber.* **105**, 2872 (1972).
- ¹⁴ *P. C. Lauterbur*, *J. Amer. Chem. Soc.* **83**, 1846 (1961).
- ¹⁵ *R. Hagen* und *J. D. Roberts*, *J. Amer. Chem. Soc.* **91**, 4504 (1969).
- ¹⁶ *E. Lippmaa* und *T. Pehk*, *Eesti NSV Tead Akad. Toim Keem Geol.* **17**, 210 (1968).
- ¹⁷ *K. Zech*, Dissertation, Tübingen (1973).
- ¹⁸ *S. Fuchs*, Dissertation, Universität Tübingen (im Druck).
- ¹⁹ *W. A. Thomas* und *M. K. Williams*, *J. Chem. Soc. Commun.* **1972**, 994.
- ²⁰ *R. Deslauriers*, *R. Walter* und *I. C. P. Smith*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 854 (1972).
- ²¹ *W. Voelter* und *O. Oster*, *Chemiker-Ztg.* **96**, 586 (1972).
- ²² *W. Voelter*, *O. Oster* und *K. Zech*, *Angew. Chem.* **86**, 46 (1974); *Angew. Chem. Internat. Ed.* **13**, 131 (1974).
- ²³ *C. M. Deber*, *F. A. Bovey*, *J. P. Carver* und *E. R. Blout*, *J. Amer. Chem. Soc.* **92**, 6191 (1970).
- ²⁴ *G. Jung*, *M. Otnad*, *W. Voelter* und *E. Breitmaier*, *Z. Anal. Chem.* **261**, 328 (1972).
- ²⁵ *R. G. Parker* und *J. D. Roberts*, *J. Org. Chem.* **35**, 996 (1970).
- ²⁶ *J. B. Greenstein* und *M. Winitz*, *Chemistry of the Amino Acids*, Vol. II, S. 890. New York: J. Wiley. 1961.
- ²⁷ *L. A. Carpino* und *A. C. Giza*, *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 955 (1959).
- ²⁸ *R. Schwyzer*, *Helv. Chim. Acta* **46**, 870 (1963).
- ²⁹ *R. Schwyzer* und *P. Sieber*, *Helv. Chim. Acta* **49**, 134 (1966).
- ³⁰ *H. Schnackenberg* und *R. Scholl*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **36**, 655 (1903).
- ³¹ *W. König* und *R. Geiger*, *Chem. Ber.* **103**, 768 (1970).
- ³² *R. A. Boissonas*, *St. Guttmann*, *R. L. Huguenin*, *P. A. Jaquenoud* und *Ed. Sandrin*, *Helv. Chim. Acta* **41**, 1867 (1958).
- ³³ *E. Fischer*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **38**, 4173 (1905).
- ³⁴ *M. Bergmann*, *L. Zervas* und *H. Rinke*, *Z. physiol. Chem.* **224**, 40 (1934).
- ³⁵ *E. Schnabel*, *Ann. Chem.* **702**, 188 (1967).
- ³⁶ *K. Hofmann*, *W. Haas*, *M. J. Smithers*, *R. D. Wells*, *Y. Wolman*, *N. Janaiihara* und *G. Zanetti*, *J. Amer. Chem. Soc.* **87**, 620 (1965).
- ³⁷ *E. Wunsch* und *A. Zwick*, *Chem. Ber.* **97**, 3312 (1964).
- ³⁸ *E. Schnabel* und *C. H. Li*, *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 4576 (1960).
- ³⁹ *R. Boissonas*, *St. Guttmann*, *P. A. Jaquenoud* und *J. P. Waller*, *Helv. Chim. Acta* **38**, 1491 (1955).
- ⁴⁰ *Th. Wieland* und *H. L. Weidenmüller*, *Ann. Chem.* **597**, 111 (1955).
- ⁴¹ *W. König* und *R. Geiger*, *Chem. Ber.* **103**, 2041 (1970).

- ⁴² *St. Guttman* und *R. A. Boissonnas*, *Helv. Chim. Acta* **41**, 1852 (1958).
⁴³ *H. Sachs* und *E. Brand*, *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 4610 (1953).
⁴⁴ *E. R. Blout* und *R. H. Karlson*, *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 944 (1956).
⁴⁵ *F. C. McKay* und *N. F. Albertson*, *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 4688 (1957).
⁴⁶ *G. W. Anderson* und *A. C. McGregor*, *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 6180 (1957).
⁴⁷ *H. C. Beyermann*, *C. A. M. Boers-Bonnekamp* und *H. Massen van den Brick-Zimmermannova*, *Rec. Trav. Chim. Pay-bays* **87**, 257 (1968).
⁴⁸ *H. Zahn*, *W. Dahno* und *B. Gutte*, *Z. Naturforsch.* **21b**, 763 (1966).
⁴⁹ *E. Wünsch*, *G. Fries* und *A. Zwick*, *Chem. Ber.* **91**, 542 (1958).
⁵⁰ *J. S. Moorley*, *J. Chem. Soc.* **1967**, 2410.
⁵¹ *R. W. Chambers* und *F. H. Carpenter*, *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 1522 (1955).
⁵² *D. Hammer* und *J. P. Grennstein*, *J. Biol. Chem.* **193**, 11 (1951).
⁵³ *W. Grassmann* und *E. Wünsch*, *Chem. Ber.* **91**, 462 (1958).
⁵⁴ *N. C. Davis*, *J. Biol. Chem.* **223**, 935 (1956).
⁵⁵ *R. W. Holley* und *E. Sondheimer*, *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 1326 (1954).
⁵⁶ *E. Abderhalden* und *M. Kempe*, *Z. physiol. Chem.* **52**, 207 (1907).
⁵⁷ *R. Schwyzer*, *P. Sieber* und *H. Kappeler*, *Helv. Chim. Acta* **42**, 2622 (1959).
⁵⁸ *E. Schröder*, *Ann. Chem.* **692**, 241 (1966).
⁵⁹ *J. Anderson*, *M. A. Barton*, *P. M. Hardy*, *G. W. Kenner*, *J. Preston* und *R. C. Sheppard*, *J. Chem. Soc. C* **1967**, 108.
⁶⁰ *P. H. Bentley*, *H. Gregory*, *A. H. Laird* und *J. S. Morley*, *J. Chem. Soc.* **1964**, 6130.
⁶¹ *E. Schröder* und *E. Klieger*, *Ann. Chem.* **673**, 196 (1964).
⁶² *H. Gibian* und *E. Klieger*, *Ann. Chem.* **640**, 145 (1961).
⁶³ *A. Berger*, *J. Kurtz* und *E. Katchalski*, *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 5552 (1954).
⁶⁴ *F. Schneider*, *Z. physiol. Chem.* **320**, 82 (1960).
⁶⁵ *O. Oster*, Dissertation, Tübingen, 1973.
⁶⁶ *W. J. Le Quesne* und *G. T. Young*, *J. Chem. Soc.* **1950**, 1954.

Prof. Dr. W. Voelter
Chemisches Institut
Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle
D-7400 Tübingen
Bundesrepublik Deutschland