

SYNTHESE VON 2-METHYLALANIN-PEPTIDEN, DIE pH-ABHÄNGIGKEIT IHRER ^{13}C -NMR-SPEKTREN UND EINE NEUE METHODE ZUR AUSWERTUNG ÜBER CS-DIAGRAMME

DIETER LEIBFRITZ* und ERHARD HAUPT

Fachbereich Chemie der Universität Bremen, NW 2 Leobenerstraße, D-2800 Bremen 33, West Germany

NORBERT DUBISCHAR

Department of Chemistry, University of Toledo, Toledo, Ohio, U.S.A.

HEINRICH LACHMANN

Institut für Physikalische Chemie der Universität Würzburg, D-8700 Würzburg, West Germany

und

RAYMOND OEKONOMOPULOS und GÜNTHER JUNG

Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, D-7400 Tübingen, West Germany

(Received in Germany 17 March 1981)

Zusammenfassung—Die ungewöhnliche Aminosäure 2-Methylalanin (α -Aminoisobuttersäure, Aib) wurde durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie untersucht. Anhand von amino- bzw. carboxylgeschützten Aib-Derivaten und geschützten Oligopeptiden werden die chemischen Verschiebungen der Aib-Kohlenstoffatome bezüglich der benachbarten Gruppen und Aminosäuren diskutiert. Ferner wurde die pH-Abhängigkeit der ^{13}C -NMR-Spektren von Aib, Aib-Ala, Ala-Aib, Aib-Ala-Aib und Aib-Ala-Aib-Ala-Aib untersucht. An diesen Beispielen wird erstmals anhand von sogenannten chemischen Verschiebungsdiagrammen (= CS-Diagramme) eine neue und vorteilhafte Methode zur Auswertung von NMR-Titrationskurven demonstriert.

Abstract—The uncommon amino-acid 2-methylalanine (α -aminoisobutyric acid, Aib) was investigated by ^{13}C -NMR. The chemical shifts of amino- or carboxy-protected derivatives of Aib and of protected oligopeptides are discussed with respect to neighbouring groups and amino acids. The pH-dependence of the ^{13}C -NMR spectra of Aib, Aib-Ala, Ala-Aib, Aib-Ala-Aib and Aib-Ala-Aib-Ala-Aib was studied. Using these examples, a new and advantageous method is demonstrated for the first time for the evaluation of NMR titration curves, which uses so-called chemical shift diagrams (CS diagrams).

Die α -verzweigte, achirale Aminosäure 2-Methylalanin (α -Aminoisobuttersäure, Aib 1a), erweckt aufgrund ihres Vorkommens in den membranmodifizierenden Peptidantibiotika Alamethicin,¹ Suzukacillin^{2,3} und Trichotoxin⁴⁻⁶ größeres Interesse. Ausserdem wurde sie in den Peptidantibiotika Zervamycin und Emerimicin,⁷ Antimoebin,⁸ Chlamydocin,⁹ und Samarosporin¹⁰ gefunden. 2-Methylalanin bewirkt eine Einschränkung der Konformationsfreiheitsgrade in diesen Peptiden¹¹⁻¹⁴ und führt bei Alamethicin und seinen Analoga zur Bevorzugung einer helikalen Konformation.¹⁵⁻¹⁹ So weisen Alamethicin,¹⁵⁻¹⁸ Suzukacillin²⁰ und Trichotoxin^{5,21} einen signifikanten Helixbereich auf, welcher für die Bildung spannungsabhängiger Membranporen²¹⁻²⁵ und die hämolytischen Eigenschaften^{16,21,26} als essentiell angesehen werden muss. Sowohl Sequenzierungen^{6,8,20,21,27-29} als auch Synthesen^{18,19,30-36} von längeren Aib-Peptiden beinhalten grössere Schwierigkeiten. Weitere Literaturangaben über strukturelle Eigenschaften von Aib-Derivaten im Kristall und in Lösung, sowie über Konformationsberechnungen sind in einer neueren Publikation zu finden.³⁷

2-Methylalanin ist bezüglich seiner NMR-Eigenschaften eine interessante Aminosäure.^{17,20,21,23,35} Die beiden α -Methylgruppen liegen in der freien Aminosäure magnetisch äquivalent vor, unterscheiden sich jedoch bei asymmetrischer Umgebung. Da diese Signalaufspaltung

zur Konformationsermittlung der natürlichen Polypeptid-Antibiotika^{5,17,20,21,35,36} und eines synthetischen, membranverändernden und hämolytisch wirksamen Nonadecapeptides^{33,34} herangezogen wird, werden in dieser Arbeit ^{13}C -NMR-Daten von Derivaten und Oligopeptiden des 2-Methylalanins diskutiert. Dabei wird besonders auf Beeinflussung der ^{13}C -NMR-Signale durch unterschiedliche elektronische Umgebungen eingegangen, wie sie sich in der pH-Abhängigkeit des ^{13}C -NMR-Spektrums äussern.

Derivate des 2-Methylalanins

Um zunächst die Bereiche der chemischen Verschiebungen für 2-Methylalanin zu erhalten, wurden verschiedene Derivate dieser Aminosäure synthetisiert. Die Darstellung erfolgte nach bekannten peptidchemischen Methoden. Die ^{13}C -NMR-Messungen zeigen, dass alle Aib- C_α -Signale für die vollgeschützten Derivate in dem engen Bereich von $\delta = 56$ bis 57 liegen (Tabelle 1).

Auch nach Entfernung der Carboxy-Schutzgruppe ändert sich die C_α -Resonanz nur wenig. Dagegen tritt nach Abspaltung der Aminoschutzgruppe bei der Ammonium-Form eine geringe Tieffeldverschiebung auf. Bei der Deprotonierung zur Amino-Form erfolgt trotz der fehlenden positiven Ladung am N-Terminus eine starke Hochfeldverschiebung des C_α -Signals um etwa 2 ppm. Die beiden magnetisch äquivalenten β -Methylgruppen

Tabelle 1. ^{13}C -NMR-Chemische Verschiebung von Aib-Derivaten

Verbindung	Nr.	Solvens	Aib - Signale			Schutzgruppensignale
			CO	C $_{\alpha}$	C $_{\beta}$	
$^+\text{H}_2\text{-Aib-OMe, Cl}^-$	(1a $^+$)	CDCl_3	171.7	57.5	23.9	53.3 (OMe)
H-Aib-OMe	(1b)	CDCl_3	178.3	54.6	27.8	51.9 (OMe)
$^+\text{H}_2\text{-Aib-OEt, Cl}^-$	(1a $^+$)	CDCl_3	171.2	57.5	23.9	62.7 (CH $_2$), 14.0 (CH $_3$) OEt
H-Aib-OEt	(1c)	CDCl_3	177.9	54.6	27.7	60.8 (CH $_2$), 14.2 (CH $_3$) OEt
H-Aib-OBu t	(1d)	CDCl_3	177.4	55.0	27.9	80.5 (C $_{\text{qu}}$), 27.9 (CH $_3$) OBu t
$^+\text{H}_2\text{-Aib-OBzl, Tos}^-$	(1a $^+$)	CD_3OD	172.4	57.7	23.9	136.4, 129.6, 126.9 (Ar), 69.2 (CH $_2$) OBzl
H-Aib-OBzl	(1e)	CDCl_3	177.6	54.7	27.7	136.5, 128.6, 127.9 (Ar), 66.4 (CH $_2$) OBzl
For-Aib-OH	(2)	CD_3OD	177.4	56.7	25.3	163.1 (CO) For
Ac-Aib-OH	(3a)	CD_3OD	177.2	56.5	25.2	172.7 (CO), 22.6 (CH $_3$) Ac
Boc-Aib-OH	(4a)	CDCl_3	180.0	56.3	25.3	155.6 (CO), 80.7/80.2 (C $_{\text{q}}$), 28.3 (CH $_3$) Boc
		CD_3OD	178.5	56.7	25.9	156.9 80.3 28.7
Boc-Aib-O $^-$	(4a $^-$)	$\text{D}_2\text{O (pH 12)}$	182.5	57.5	25.7	156.5 (CO), 80.5 (C $_{\text{q}}$), 28.1 (CH $_3$) Boc
Z-Aib-OH	(5a)	CD_3OD	179.5	56.4	25.2	155.8 (CO); 136.2, 128.6, 128.3 (Ar), 66.9 (CH $_2$) Z
Nps-Aib-OH	(6a)	CDCl_3	182.3	61.9	24.7	142.7, 145.8, 133.7, 125.6, 124.7 (Ar) Nps
Tos-Aib-OH	(7)	CDCl_3	179.8	58.7	25.5	143.4, 139.3, 129.5, 127.0 (Ar), 21.6 (CH $_3$) Tos
Phl-Aib-OH	(8)	CDCl_3	178.6	60.3	24.4	168.3 (CO), 134.2, 131.7, 123.4 (Ar) Phl
Tfa-Aib-OH	(9)	$\text{CDCl}_3/$ $\text{CD}_3\text{OD (1:1)}$	176.5	58.0	24.6	158.2 (CO); ($\text{J } 13\text{C}$, 19F 38.2 Hz) 116.9 (CF $_3$), ($\text{J } 13\text{C}$, 19F 286.3 Hz) Tfa
Ac-Aib-OMe	(3b)	CDCl_3	175.2	56.0	25.0	170.2 (CO), 22.9 (CH $_3$) Ac; 52.3 (OMe)
		CD_3OD	176.2	56.6	25.2	172.2 22.4
Boc-Aib-OMe	(4b)	CDCl_3	175.4	56.2	25.5	154.8 (CO), 79.4 (C $_{\text{q}}$), 28.4 (CH $_3$) Boc; 52.2 (OMe)
Boc-Aib-OEt	(4c)	CDCl_3	174.9	56.2	25.5	154.7 (CO), 79.5 (C $_{\text{qu}}$); 28.4 (CH $_3$) Boc; 61.2 (CH $_2$), 14.2 (CH $_3$) OEt
Boc-Aib-OBzl	(4d)	CDCl_3	174.6	56.1	25.5	154.6 (CO), 79.5 (C $_{\text{q}}$), 28.4 (CH $_3$) Boc; 135.9, 128.5, 128.1 (Ar), 66.9 (CH $_2$)
Boc-Aib-OPcp	(4e)	CD_3OD	170.5	56.7	25.5	154.3 (CO), 80.2 (C $_{\text{qu}}$), 28.3 (CH $_3$) Boc; 144.0, 131.7, 131.2, 127.6 (Ar) Pcp
Z-Aib-OPcp	(5c)	CD_3OD	170.3	57.1	24.4	154.8 (CO), 66.8 (CH $_2$), 136.2, 128.4, 128.0 (Ar) Z, 143.9, 132.1, 131.7, 127.6 (Ar) OPcp
Z-Aib-OBu t	(5e)	CDCl_3	173.9	56.8	25.0	155.1 (CO), 136.9, 128.5, 128.1 (Ar), 66.4 (CH $_2$) Z, 81.4 (C $_{\text{q}}$), 27.8 (CH $_3$) OBu t
OCN-Aib-OMe	(10)	CDCl_3	174.4	61.0	27.9	52.1 (OMe), 126.6 (OCN)
O=C(Aib-OMe) $_2$	(11)	CDCl_3	176.3	55.8	25.7	156.8 (CO), 52.1 (OMe)

verhalten sich, wie erwartet, bei diesem Ammonium/Amino-Übergang stets entgegengesetzt wie der C $_{\alpha}$ -Kohlenstoff und werden von $\delta = 23.9$ im Salz bis $\delta = 27.7$ im freien Amin verschoben. Am Beispiel Ac-Aib-OMe (3b), H-Aib-OMe (1b) und $^+\text{H}_2\text{-Aib-OMe, Cl}^-$ (1b $^+$) lässt sich diese Abhängigkeit gut verfolgen. Die freie Aminogruppe wirkt also stärker abschirmend auf die C $_{\alpha}$ -Kohlenstoffatome als die entsprechende N-Acylaminogruppe. Bei den C $_{\beta}$ - und CO-Atomen von Aib kehrt sich die Reihenfolge um, und die grösste Abschirmung wird bei protonierter Aminogruppe erhalten.

Oligopeptide mit 2-Methylalanin

Die ^{13}C -NMR-spektroskopischen Daten von 2-Methylalanin (Aib) im Peptidverband sind von besonderem Interesse für strukturelle und konformative Untersuchungen. Daher stellten wir einige kleinere Aib-Oligopeptide dar (experimenteller Teil), deren Signallagen (Tabelle 2) direkt zur Zuordnung der Aib-Signale in grösseren Peptiden mit ungeordneter Konformation herangezogen werden können.

Zunächst einmal interessiert die Beeinflussung der beiden Aib-C $_{\beta}$ -Atome durch ein benachbartes Asymmetriezentrum. Es zeigte sich, dass bei manchen Dipeptiden mit C-terminalem Aib, wie Z-L-Val-Aib-OBu t (16) und Boc-L-Leu-Aib-OEt (14) keine Separierung der beiden Methylgruppen erfolgt. Andererseits beobachtet man bei Boc-L-Ala-Aib-OBu t (12) eine Aufspaltung des C $_{\beta}$ -Signals um 0.4 ppm in Chloroform bzw. 0.2 ppm in Methanol. Etwas deutlicher ausgeprägt ist die magnetische Nichtäquivalenz (MNE) bei Boc-L-Pro-Aib-OBzl (13), wo infolge des starren Prolin-Gerüsts eine Signalaufspaltung um 0.6 ppm erfolgt. Die Zuordnung der Aib-C $_{\beta}$ - und Pro-C $_{\gamma}$ -Signale erfolgte durch Off-Resonance Messung.

Bei Dipeptiden mit N-terminalem Aib (Tabelle 2) zeigt die Kombination mit L-Alanin ebenfalls wieder eine MNE von 0.4 ppm beim Z-Aib-L-Ala-OMe (22a) und 0.3 ppm bei Z-Aib-L-Ala-OBu t (22b). Auch die übrigen Dipeptide dieser Gruppe zeigen eine ähnliche Aufspaltung der Aib-C $_{\beta}$ -Signale, Falls Aib C-terminal mit einer chiralen Aminosäure verbunden ist. Ausnahmen

stellen die Verbindungen Tfa-Aib-L-Pro-OMe (28), Pht-Aib-L-Val-OMe (25) und Nps-Aib-Gly-OBu¹ (26) dar; hier war allerdings infolge von geringer Substanzmengen die Auflösung der Spektren ungünstig.

Diese Grössenordnung der Aufspaltung setzt sich bei den Tripeptiden (Tabelle 2) fort. So beobachtet man bei Z-L-Leu-Aib-L-Pro-OMe (32) eine MNE von 0.5 ppm. Diese Werte entsprechen den Aufspaltungen von mehreren Aib-Oligopeptiden, die aufgrund ihres CD-Spektrums keine geordnete Konformation aufweisen. Erst bei Z-L-Val-Aib-Gly-OBu¹ (30) mit $\Delta\delta = 1.5$ ppm und Z-L-Pro-Aib-L-Ala-OMe (29) mit $\Delta\delta = 2.4$ ppm zeigt sich eine Grösse der Aufspaltung, wie sie auch bei Boc-L-Ala-Aib-L-Ala-OMe^{33,38} ($\Delta\delta = 2.4$ ppm, Methanol) beobachtet und dem Vorliegen eines β -Turns zugeschrieben wurde. Eine noch stärkere Aufspaltung wurde kürzlich beim Ac-L-Ala-Aib-L-Ala-OMe ebenfalls in Methanollösung mit $\Delta\delta = 2.6$ ppm festgestellt.³⁹ Die ausgeprägte magnetische Nichtäquivalenz scheint in diesen Fällen ein Indiz für eine starke Einschränkung der Rotationsfreiheitsgrade zu sein, z.B. bei einer Konformation, die durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird.³⁹ Schliesslich sei erwähnt, dass z.B. in Chloroform (Tabelle 1 und 2) starke Konzentrationsabhängigkeiten der ¹³C-NMR-Signale von Aminosäure und Peptidderivaten auftreten können, die man auf intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zurückführen kann.^{40,41}

pH-Abhängigkeit der ¹³C-NMR-Spektren

2-Methylalanin. Die Kohlenstoffatome einer Aminosäure erfahren sehr deutliche Änderungen ihrer chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit vom pH.⁴²⁻⁴⁶ Allen Protein- α -Aminosäuren gemeinsam ist dabei die Hochfeldverschiebung der α - und β -Kohlenstoffatome bei der Protonierung sowohl der Carboxylat- wie der Aminogruppe. 2-Methylalanin weicht insoweit vom üblichen Verhalten ab, als C_α bei der Aminoprotonierung nach tiefem Feld verschoben wird (Abb. 1, Tabelle 3).

Die Signalverschiebungen infolge Protonierung werden mit dem Zusammenwirken von drei verschiedenen Ursachen erklärt:⁴⁷

- uniform linear electric field shifts;
- field gradient linear electric field shifts; und
- second order field contributions;

Fall (a) tritt auf, wenn der Kohlenstoff keine tetraedersymmetrische Umgebung besitzt und die vier Bindungen deutliche Unterschiede in den Polarisierbarkeiten aufweisen, wie dies für CH- bzw. CC-Bindungen der Fall ist.⁴⁸ Deshalb zeigen die Signale der Methyl-, Methylen- und Methinkohlenstoffatome die erwähnte Hochfeldverschiebung bei der Protonierung. Quartäre Kohlenstoffe wie Aib- C_α können symmetriebedingt keine uniform field LEFS erfahren, so dass vornehmlich field gradient LEFS den Ausschlag geben und vorzeichenbedingt zu einer Tieffeldverschiebung führen. Feldgradienteneffekte klingen zwar schnell mit wachsendem Abstand ab (r^{-3}), sind aber gerade deshalb bei C_α und C_β am stärksten wirksam. Entsprechende Verschiebungen durch Protonierung sind schon länger von Amininen bekannt^{42,49} und werden durch CNDO/MO-Rechnungen gut bestätigt.

Bei der Protonierung des Carboxylat-Ions wandert das C_α -Kohlenstoffsignal nicht nach tiefem Feld, wie man vielleicht erwarten könnte. Dies liegt einmal daran, dass das elektrische Feld einer Punktladung (wie im Ammonium-Ion) wesentlich stärker ist als bei einem mesomeren Anion. Ferner hat der Kohlenstoff im Car-

boxylat-Ion den vergleichsweise geringsten Ladungsüberschuss der drei beteiligten Atome. Das C_α -Kohlenstoffsignal sollte daher nach tiefem Feld verschoben werden, und zwar in allen Protein- α -Aminosäuren gleichstark, wenn man von sterischen Faktoren absieht. Die Tieffeldverschiebungen liegen in derselben Grössenordnung wie bei aliphatischen Carbonsäuren.⁵⁰ Die Wasserstoffe an C_α und C_β verhalten sich antagonistisch zu ihren Kohlenstoffatomen aufgrund der erwähnten CH-Polarisierung.⁴⁹

Dipeptide des 2-Methylalanins

Auf der Grundlage der Verhältnisse bei den Aminosäuren werden auch die pH-Abhängigkeiten der ¹³C-NMR-Signale der Dipeptide Ala-Aib und Aib-Ala (Abb. 2) verständlich, denn von Dipeptiden und Tripeptiden weiss man bereits,^{43,45} dass sich beim Übergang vom alkalischen zum zwitterionischen Bereich die *N*-terminale Aminosäure entsprechend der freien Aminosäure verhält und der Rest sich kaum ändert. Wird der pH schliesslich bis zum sauren Bereich erniedrigt, so ändern sich die chemischen Verschiebungen der *C*-terminalen Aminosäure, während die des übrigen Molekülteils sich kaum ändern.

Betrachten wir zuerst wieder die chemischen Verschiebungsänderungen (Tabelle 4) bei der Protonierung der Aminogruppe vom basischen zum neutralen pH-Bereich: Das Carbonyl-Signal (C_0) der *N*-terminalen Aminosäure verschiebt sich dabei um -6 bis -7 ppm nach hohem Feld, Gleichgültig ob Gly, Ala oder Aib am *N*-terminalen Ende sitzt (Ala steht stellvertretend für alle Aminosäuren mit nur einem α -Wasserstoff). Der C_α -Kohlenstoff von Gly wandert -2.5 ppm und von Ala -0.8 ppm nach hohem Feld und in Aib +1.7 ppm nach tiefem Feld aus dem bereits oben angeführten Gründen. Die β -Kohlenstoffe gehen um ungefähr -2.5 ppm in allen Fällen nach höherem Feld. In der *C*-terminalen Aminosäure wird C_0 um 0 bis -0.6 ppm nach hohem Feld, C_α um ≈ 0.7 ppm nach tiefem Feld und C_β um -0.2 ppm nach höherem Feld verschoben. Die geringen Verschiebungsunterschiede der *C*-terminalen Aminosäure sind regelmässig und offensichtlich unabhängig von der individuellen Aminosäure an dieser Stelle.

Bei der Deprotonierung der Carboxylatgruppe vom sauren zum neutralen Bereich treten erwartungsgemäss die stärksten Änderungen im *C*-terminalen Bereich auf. So wird dort C_0 (3 ± 0.3) ppm, C_α um (2.5 ± 0.2) ppm und C_β um ca. 1 ppm nach tiefem Feld verschoben. Diese Werte sind wiederum von der individuellen Aminosäure unabhängig und entsprechen dem Verhalten aliphatischer Carbonsäuren.⁵⁰

Die Kohlenstoffe der *N*-terminalen Aminosäure erfahren erwartungsgemäss nur kleine Verschiebungsunterschiede, bei der Deprotonierung der Carboxylgruppe z.B. wird C_0 nur um 0.1 bis 0.8 ppm nach höherem Feld verschoben. C_α und C_β bleiben praktisch konstant. Die geringe Hochfeldverschiebung von C_0 liegt in der Grössenordnung, wie sie für intra- bzw. intermolekulare Wasserstoffbrücken beobachtet wird.^{51,52} Im Dipeptid-Kation könnte z.B. eine intramolekulare Wasserstoffbrücke gebildet werden von der Peptidcarbonylgruppe (Akzeptor) der *N*-terminalen Aminosäure zur Carboxylgruppe (Donor) der *C*-terminalen Aminosäure.⁵³ Es sind allerdings auch intermolekulare Wasserstoffbrücken in dimeren bzw. oligomeren Strukturen denkbar, wie sie für die hier interessierende α -(tert-Butyloxycarbonyl-amino) isobuttersäure (Boc-Aib-OH,

Tabelle 2. ^{13}C -NMR-Chemische Verschiebungen von geschützten Aib-Peptiden in $[\text{2H}]_1$ -Chloroform-Lösung

Verbindung	Nr.	Aib-Signale			andere AS- und Schutzgruppensignale								
		CO	C $_{\alpha}$	C $_{\beta}$	CO	C $_{\alpha}$	C $_{\beta}$	C $_{\gamma}$	C $_{\delta}$	CH $_3$	CH $_2$	C $_{\epsilon}$	C-Aromat
Boc-L-Ala-Aib-OBu t	(12)	173.4	56.4	24.6/25.0	Ala: 172.4 Boc: 155.9 Bu t :	50.0	18.5			28.3		79.4	
12 (in $[\text{2H}]_1$ -Methanol)		174.3	57.1	24.9/25.1	Ala: 174.3 Boc: 156.9 Bu t :	50.7	18.6			28.6		80.1	
12 (in $[\text{2H}]_1$ -DMSO)		173.0	55.5	24.7	Ala: 172.2 Boc: 155.1 Bu t :	49.5	18.5			28.2		78.1	
Boc-L-Pro-Aib-OBzI	(13)	174.2	56.2	24.6/25.2	Pro: 171.4 Boc: 155.5 OBzI:	60.4	28.0/28.7	24.2/24.6		28.3	67.1	80.4	135.8, 128.4, 128.2
Boc-L-Leu-Aib-OEt	(14)	174.2	56.2	24.8	Leu: 172.2 Boc: 156.0 OEt:	53.9	41.3	24.9	22.9/22.1	28.4		79.9	
										14.1	61.4		
Z-L-Ala-Aib-OBzI	(15a)	174.0	56.4	24.7	Ala: 171.8 Z: 156.1 OBzI:	50.6	18.6						136.1, 128.1, 128.6, 127.4 135.8, 128.1, 128.6, 127.0
Z-L-Val-Aib-OBu t	(16)	173.1	56.8	24.3	Val: 169.9 Z: 156.1 OBu t :	60.2	31.1	19.0/17.7					136.2, 128.2, 127.8
Z-L-Gln-Aib-OBu t	(17)	173.2	56.6	24.7/24.3	Gln: 170.3 Z: 156.2 OBu t :	54.2	28.8	31.6					136.2, 128.5, 127.7, 128.1
Boc-Aib-L-Ala-OBu t	(18)	174.2	56.7	25.9/25.5	Ala: 172.4 Boc: 154.7 Bu t :	48.9	18.6			28.3		80.0	
										28.1		81.8	
Z-Aib-Gly-OMe	(21a)	175.5	56.6	25.3	Gly: 170.7 Z: 155.3 OMe:	41.2							136.4, 128.4, 127.9
										51.9			

Z-Alb-Gly-Obu ^t (21b)	175.0	56.6	25.4	42.2	169.1 155.3	28.1	66.6	81.9	136.5, 128.5, 128.0
					Gly: 169.1 Z: 155.3 Obu ^t :				
Z-Alb-L-Ala-Ome (22a)	174.2	56.9	25.2/25.6	49.5	173.5 155.3	18.1	66.5		136.4, 128.4, 127.9
					Ala: 173.5 Z: 155.3 Ome:				
Z-Alb-L-Ala-Obu ^t (22b)	173.5	56.7	24.4/24.7	50.8	171.7 156.1	18.8	66.8	81.3	136.6, 128.6, 128.0
					Ala: 171.7 Z: 156.1 Obu ^t :				
Z-Alb-L-Pro-Ome (23)	173.1	56.7	25.4/25.7	60.7	172.5 154.7	27.7	66.3	47.8	136.7, 128.4, 127.9
					Pro: 172.5 Z: 154.7 Ome:				
Pro-Alb-L-Leu-Ome (24)	174.7	59.9	25.3/26.0	52.2	173.4	28.4	21.9/21.5		143.3, 129.7, 140.2, 127.1
					Leu: 173.4 Pro: Z: 154.7 Ome:				
Pht-Alb-L-Val-Ome (25)	173.0	57.7	24.9	61.8	172.6 168.7	31.6	52.2		134.3, 132.3, 123.3
					Val: 172.6 Pht: 168.7 Ome:				
Nps-Alb-Gly-Obu ^t (26)	176.2	61.8	25.1	42.4	168.8		27.9	82.1	146.1, 133.7, 125.4 142.5, 124.6
					Gly: 168.8 Nps: Obu ^t :				
Tfa-Alb-Alb-Obu ^t (27)	(1)172.5 (2)173.7	57.7 57.5	23.9 24.2	56.1	156.1	(J _{13C, 19F} = 37.3 Hz)	CF ₃ 115.8 (J _{13C, 19F} = 288.3 Hz)	27.8	
					Tfa: 156.1 Obu ^t :				
Tfa-Alb-L-Pro-Ome (28)	172.9	57.9	22.9	61.4	171.3 156.0	26.0	48.4		
					Pro: 171.3 Tfa: 156.0 Ome:				
Z-L-Pro-Alb-L-Ala-Ome (29)	174.0	57.1	24.2/26.6	61.0	173.5 171.9	29.4 17.5	47.2		136.5, 128.5, 127.6, 127.3
					Pro: 173.5 Ala: 171.9 Z: 155.5 Ome:				
Z-L-Val-Alb-Gly-Obu ^t (30)	175.2	56.6	24.5/26.0	60.6	172.3 169.0	30.8 42.5	19.1/18.9		
					Val: 172.3 Gly: 169.0 Z: 156.2 Obu ^t :				
Z-L-Leu-Alb-L-Pro-Ome (32)	173.1	56.8	23.8/23.3	53.9	172.1 171.4	41.5 27.9	23.0/22.0 48.0		136.6, 128.5, 128.0, 128.2
					Leu: 172.1 Pro: 171.4 Z: 156.4 Ome:				

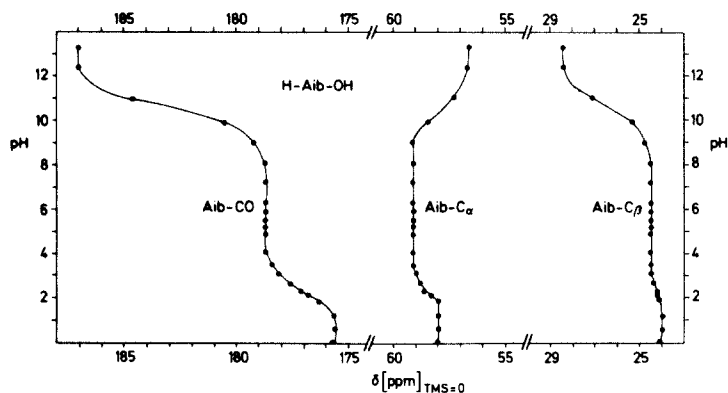


Abb. 1. ^{13}C -NMR-Chemische Verschiebungen als Funktion des pH für 2-Methylalanin in Wasser ($c = 100 \text{ mg/ml}$, 303 K , $\delta(\text{TMS})_{\text{ext}} = 0 \text{ ppm}$).

Tabelle 3. ^{13}C -NMR-Chemische Verschiebungsunterschiede (Δ in ppm) bei pH-Änderungen an Aminosäuren mit sekundärem (Gly), tertiärem (Ala) und quartärem (Aib) C_α -Kohlenstoffatom (-Hochfeldverschiebung; +Tiefeldverschiebung)

	$\text{C}=\text{O}$			C_α			C_β	
	Glycin	$\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{CO}_2\text{H}$	Aib	Glycin	$\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{CO}_2\text{H}$	Aib	$\text{H}_2\text{N}-\text{HCR}-\text{CO}_2\text{H}$	Aib
$\Delta(\delta \text{ Anion} \rightarrow \delta \text{ Zwitterion})$	-6	-9	-7	-3.5	-1.5	+20	-4	-4.0
$\Delta(\delta \text{ Zwitterion} \rightarrow \delta \text{ Kation})$	-3.5	-5.0	-3.5	-1.5	-2	-1.0	-1.0	-1.0

4a) im Kristall³⁷ und in Lösung⁴⁰ festgestellt wurden. Möglich wäre auch eine partielle Amid-CO-Protonierung im sehr stark sauren Bereich.⁴⁵ Völlig unwahrscheinlich ist dagegen die Bildung einer cyclischen Konformation mit einer cis-Peptidbindung,⁵⁴ was zu einer Hochfeldverschiebung des *N*-terminalen Carbonyl-Signals im Zwitterion führen würde (γ -Effekt). Die Umwandlung einer *trans*-Peptidbindung wurde jedoch in der pH-abhängigen Messreihe nicht beobachtet. Ausserdem ist eine *cis*-Anordnung der Peptidbindung in einem Aib-Dipeptid aus sterischen Gründen kaum möglich.

Im Zwitterion muss allerdings eine gewisse Ordnung vorliegen, denn die magnetische Nichtäquivalenz der β -Kohlenstoffatome von Aib ist in Aib-L-Ala und L-Ala-Aib nur im Zwitterion ausgeprägt zu sehen (Abb. 2). Dieser Umstand wird bei Betrachtung der magnetischen Nichtäquivalenz von Aib-Peptiden verständlich (Tabelle 2). Dort wurde angedeutet, dass benachbarte Asymmetriezentren in Aminosäuren nur bei eingeschränkter Rotation zu einer Aufspaltung des C_β -Signals von Aib führen. Diese Rotationsbehinderung ist beim Vorliegen einer leicht fixierten Konformation durch Zwitterionen am ehesten gegeben. Daher tritt hier auch die grösste magnetische Nichtäquivalenz der C_β -Atome auf.

Für die Zuordnung der Signale ist ferner die Beobachtung von Interesse, dass breite Signale der *N*-terminalen Aminosäure und der *C*-terminalen Aminosäure im sauren Bereich auftreten. Dies ist eine Folge des Wasserstoff/Deuterium-Austausches und führt u.a. zu längeren Akkumulationszeiten ungeschützter Peptide in $^2\text{H}_2\text{O}$ im Vergleich zu geschützten Peptiden in organischen Lösungsmitteln.

Tri- und Pentapeptide

Die chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit vom pH werden für die *C*- und *N*-terminalen Aminosäuren $\text{H}^1\text{Aib-L}^2\text{Ala}^3\text{Aib-OH}$ und $\text{H}^1\text{Aib-L}^2\text{Ala-L}^4\text{Ala}^5\text{Aib-OH}$ analog zu den Dipeptiden erhalten (Abb. 3).

Es fällt auf, dass sich bereits im Tripeptid die Signale des mittleren Alanins nur noch unwesentlich ändern; dasselbe gilt auch für die inneren Aminosäuren im Pentapeptid. Umso erstaunlicher ist dann die Beobachtung, dass in beiden Peptiden jeweils die C_α -Signale der *N*-terminalen Aminosäuren bei der Titration der Carboxylfunktion die gleiche Hochfeldverschiebung erfahren, die schon bei den Dipeptiden (Abb. 2) beobachtet wurde. Durch die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen C_α der zweiten Aminosäure und

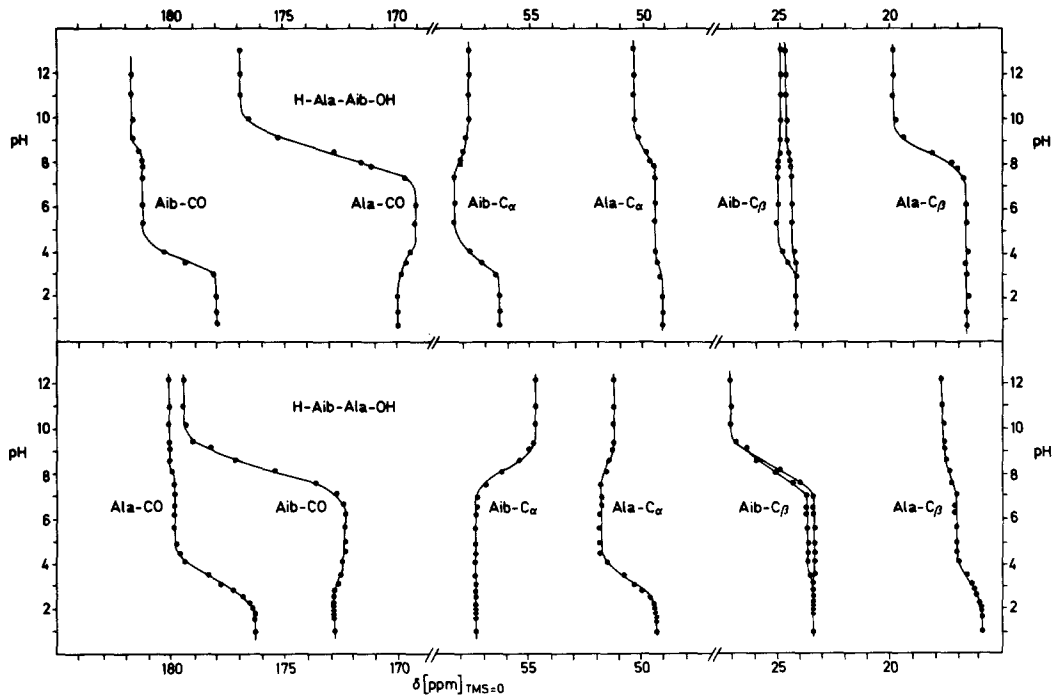


Abb. 2. pH-Abhängigkeit der ¹³C-NMR-chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome der Dipeptide L-Alanyl- α -amino-isobuttersäure und α -Aminoisobutyryl-L-alanin in Wasser ($c = 100 \text{ mg/ml}$, 303 K, $\delta(\text{TMS})_{\text{ext}} = 0 \text{ ppm}$).

Tabelle 4. ¹³C-NMR-Chemische Verschiebungsunterschiede (Δ in ppm) bei pH-Änderung an Dipeptiden

	C=O			C _{α}			C _{β}											
	N-terminal		C-terminal	N-terminal		C-terminal	N-terminal		C-terminal									
	Glycin	NH ₂ -CHR-CO ₂ H ^{a)}	Aib	Glycin	H ₂ N-CHR-CO ₂ H ^{a)}	Aib	Glycin	H ₂ N-CHR-CO ₂ H ^{a)}	Aib									
$\Delta(\delta_{\text{Anion}} - \delta_{\text{Zwitterion}})$	-6.1	-6.4	-7.1	-0.2	-0.6	-0.5	-2.5	-0.8	+1.7	0.2	0.6	0.6	-	-2.7	-2.5	-	-0.2	-0.2
$\Delta(\delta_{\text{Zwitterion}} - \delta_{\text{Kation}})$	0.3	1.0	0.5	-3.3	-2.8	-3.3	-0.1	-0.1	0.0	-2.3	-2.6	-2.0	-	0.1	-0.1	-	-1.4	-3.3

a) Werte über verschiedene Aminosäuren gemittelt; - $\hat{=}$ Hochfeldverschiebung.

COOH der C-terminalen⁵³ lassen sich die Hochfeldverschiebungen erklären, zumal sie für Di- bis Pentapeptid in der ähnlichen Größenordnung von ca. 1 ppm liegen und die Kohlenstoffatome C _{α} und C _{β} davon unbeeinflusst bleiben.

Ferner beobachtet man beim Pentapeptid erstmals eine relativ grosse magnetische Nichtäquivalenz der beiden Methylsignale des mittleren ³Aib, während sie bei der terminalen ¹Aib und ⁵Aib nicht ausgeprägt ist. Im Neutralbereich beträgt die magnetische Nichtäquivalenz 0.8 ppm und lässt sich nur durch eine unterschiedliche

chemische Umgebung der beiden Methylgruppen infolge einer gewissen Ordnungsstruktur im Molekül erklären. Am Modell lässt sich zeigen, dass von beiden Methylgruppen eine mehr im Einflussbereich der C=O-Gruppen liegt, während die andere stärker von den NH-Gruppen der Peptidbindung beeinflusst wird. Damit lässt sich auch die grosse magnetische Nichtäquivalenz der Methylsignale von 4 ppm erklären, wie sie infolge der stark fixierten Konformation in helikalen Aib-Peptiden beobachtet wurde.^{5,17,20,21,35}

Bei den pK-Werten für die Carbonyl- bzw. Amino-

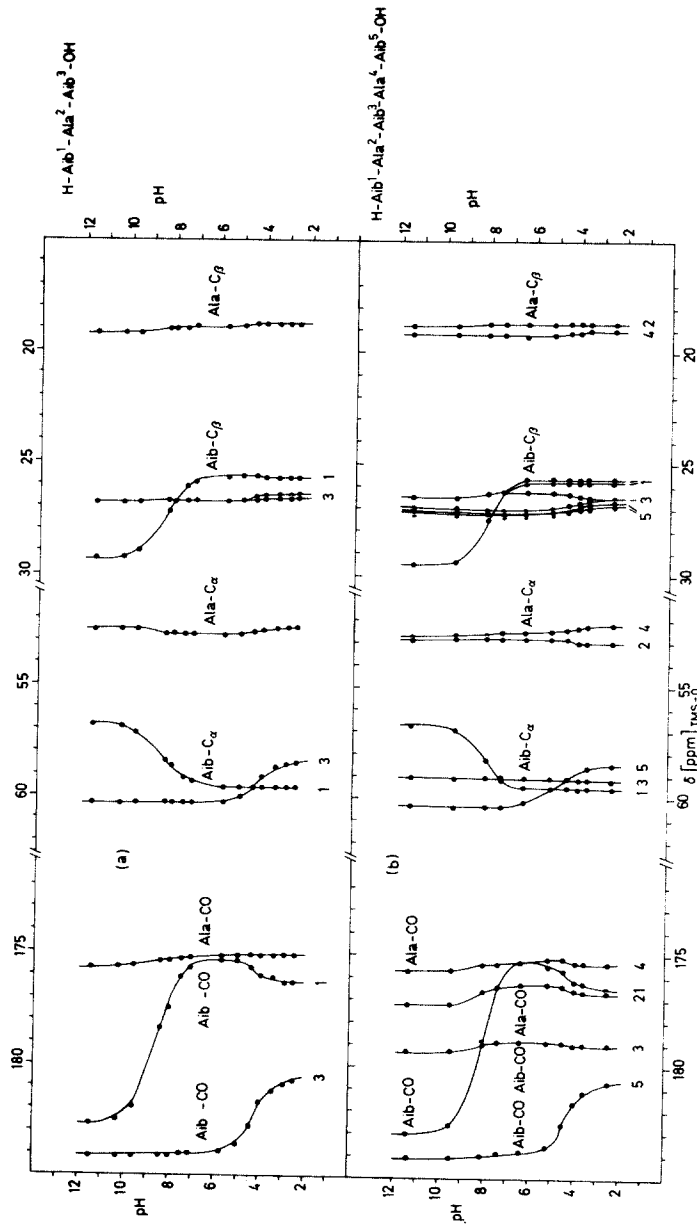


Abb. 3. pH-Abhängigkeit der ^{13}C -NMR-Signale des Tripeptids α -Aminoisobutyryl-L-alanyl- α -aminoisobuttersäure (oben) und des Pentapeptids (α -Aminoisobutyryl-L-alanyl)-2 α -aminobuttersäure (unten) ($c = 200 \text{ mg/ml}$, $^2\text{H}_2\text{O}$, 303 K, $\delta(\text{TMS})_{\text{ext}} = 0 \text{ ppm}$).

funktion innerhalb eines Moleküls erkennt man, dass pK_1 und pK_2 immer stärker zusammenrücken, je länger das Peptid wird (Tabelle 3).

Auswertung von NMR-Titrationkurven durch chemische Verschiebungsdiagramme (CS-Diagramme)

Bei der NMR-Titration unter Variation des pH ist die grösste Fehlerquelle die pH-Messung selbst.⁴⁴ Da wie im vorliegenden Fall meist nur relative Vergleiche interessieren, genügt es, die Messungen unter gleichen Bedingungen durchzuführen. Korrekturen und Extrapolationen bezüglich der Ionenstärke, Konzentration und Temperatur sind nur in speziellen Fällen erforderlich. Somit ist für die vergleichende Diskussion eine pH-freie Darstellung der Messergebnisse interessant, wie man sie in Form der Chemischen Verschiebungs-Diagramme (CS-Diagramme) erhält^{55,56} (Abb. 4 und 5).

Diese Art der graphischen Auswertung entspricht den Extinktions-Diagrammen (E-Diagramme^{57,58}) oder Elliptizitätsdiagrammen (θ -Diagramme⁵⁹) die sich zur Mehrwellenlängen-Analyse von Reaktions- und Titrationssystemen bereits bewährt haben. Hierbei werden jeweils zwei spektrometrische Messreihen bei verschiedenen Wellenlängen miteinander korreliert, während die Zeitachse (bei Kinetiken) oder die pH-Achse (bei Säure-Base-Titrationen) nicht in die Auswertung eingehen.

Bei NMR-Titrationen werden in analoger Weise die Chemischen Verschiebungen von jeweils zwei verschiedenen Atomen gegeneinander aufgetragen (Abb. 6, Chemische Verschiebungs- oder CS-Diagramme), d.h. auch hier geht nur die Ungenauigkeit der Chemischen Verschiebungen (± 0.1 ppm bei der ^{13}C -NMR Spektroskopie) und nicht die pH-bedingten Fehler in die Auswertung ein.

Nach der Theorie sind bei zweistufigen Titrationssystemen ($\text{AH}^2 \rightleftharpoons \text{AH}^- \rightleftharpoons \text{A}^{2-}$) mit Hilfe der CS-Diagramme folgende Aussagen möglich (AH_2 , AH^- und A^{2-} stehen für Kation, Zwitterion und Anion der Aminosäure bzw. des Peptids):

I. Nichtüberlappende Titrationssysteme ($\Delta pK > 2.5-3$, Tabelle 5). Das Titrationssystem kann in zwei einstufige Teilsysteme zerlegt werden. Es gilt (Abb. 6a):

(1) Jedes CS-Diagramm besteht meist aus zwei sich schneidenden Geraden.

(2) Der Schnittpunkt der Geraden gibt die Chemischen Verschiebungen (ppm-Werte) der Intermediärspezies (AH^-) an.

(3) Falls die Titration vollständig durchführbar ist, d.h. das Verhältnis zweier Messparameter δ_i/δ_j konstant und pH-unabhängig wird und damit an einem Titrationsende die reinen Spezies AH_2 und am anderen Ende die reinen

Spezies A^{2-} vorliegen, so bilden die beiden Geradenabschnitte das sogenannte Titrationsdreieck. Die Eckpunkte geben die ppm-Werte von AH_2 , AH^- und A^{2-} an.

(4) Die Steigungen der beiden Geradenabschnitte sind durch folgende Ausdrücke gegeben

$$\Delta\delta_1 = \left| \frac{\delta_i^{\text{AH}^-} - \delta_i^{\text{AH}_2}}{\delta_j^{\text{AH}^-} - \delta_j^{\text{AH}_2}} \right|; \quad \Delta\delta_2 = \left| \frac{\delta_i^{\text{A}^{2-}} - \delta_i^{\text{AH}^-}}{\delta_j^{\text{A}^{2-}} - \delta_j^{\text{AH}^-}} \right|$$

$\delta_{i,j}$ = chem. Verschiebung der Atome i, j

(5) Die Halbierungspunkte jedes Geradenabschnittes entsprechen den beiden pK -Werten. Die zugehörigen pH-Werte sind aus den Titrationskurven zu entnehmen, d.h. die pK -Werte können aus den CS-Diagrammen allein nicht ermittelt werden.

Zur Bestimmung der beiden Geraden genügen jeweils nur wenige Messpunkte bei verschiedenen pH-Werten. Da der pH-Wert nicht bei der Auswertung benutzt wird, reicht eine Grobbestimmung, z.B. mit Indikatorpapier, aus. Eine Ermittlung der beiden Geraden ist auch möglich, wenn grosse Teile der Titration physikalisch nicht durchführbar sind. So ist z.B. Cystin in neutralem Wasser praktisch unlöslich⁶¹ und somit der NMR-Messung nicht zugänglich.

II. Überlappende Titrationssysteme ($\Delta pK < 2.5-3$, z.B. Cystein⁴⁴). Es gilt (Abb. 6b): (vgl. loc. cit.^{56,60}).

(1) Die CS-Diagramme sind im allgemeinen gekrümmt.

(2) Legt man in den Titrationsendpunkten (AH^2 bzw. A^{2-}) Tangenten an die CS-Diagramme, so gibt der Schnittpunkt ebenfalls die ppm-Werte der Intermediärspezies AH^- an.

(3) Die Eckpunkte des so ermittelten Titrationsdreiecks entsprechen den ppm-Werten von AH_2 , AH^- und A^{2-} .

(4) Die Schnittpunkte der beiden Seitenhalbierenden mit dem gekrümmten CS-Diagramm geben die ppm-Werte für beide pK -Werte an.

Auch bei überlappenden Titrationssystemen genügen zur Ermittlung des Titrationsdreiecks relativ wenige Messpunkte (an beiden Titrationsendpunkten und in deren Umgebung). Falls die graphische Bestimmung der Tangenten bei wenigen Titrationspunkten schwierig ist, können geeignete Computerverfahren angewandt werden.⁵⁶ Zur pK -Bestimmung bei überlappenden zweistufigen spektrophotometrischen Titrationen wurde in den letzten Jahren eine Anzahl von graphischen und numerischen Verfahren entwickelt,^{56,60} die unmittelbar auf NMR-Titrationen übertragbar sind. Während für die (absolute) Bestimmung von pK -Werten stets pH-Messungen notwendig sind, kann die Differenz $\Delta pK = pK_2 - pK_1$ bei überlappenden Titrationssystemen direkt aus dem CS-

Tabelle 5. pK -Werte von α -Aminoisobuttersäure (Aib) und Di-bis Pentapeptiden aus den NMR-Titrationen

	pK_1	pK_2	ΔpK
H-Aib-OH	2.3	10.5	8.2
H-Aib-L-Ala-OH	3.1	8.3	5.2
H-L-Ala-Aib-OH	3.6	8.5	5.1
H-L-Ala-Aib-L-Ala-OH	4.3	8.6	4.3
H-L-Ala-(Aib-L-Ala) ₂ -OH	4.4	8.1	3.7

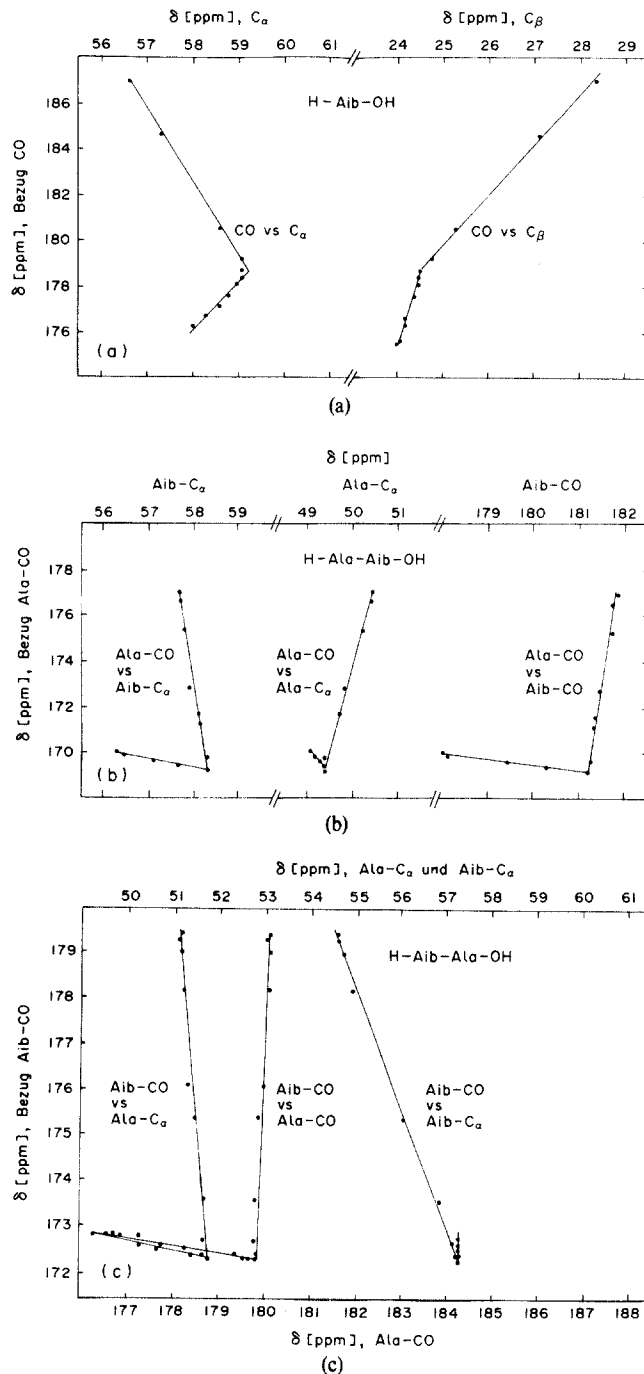


Abb. 4. CS-Diagramme der ^{13}C -NMR-Titration von (a) α -Aminoisobuttersäure, (b) L-Alanyl- α -aminoisobuttersäure, (c) α -Aminoisobutyryl-L-alanin.

Diagramm, d.h. ohne Kenntnis der pH-Messwerte ermittelt werden (sog. relative pK-Wertbestimmung).

Iterative Curve-Fitting-Auswertung von NMR-Titrationskurven

Als universelles Auswertungsverfahren für überlappende und nichtüberlappende Titrationsysteme kann ein nicht-lineares Curve-Fitting-Programm^{56,62} benutzt werden, das für eine Vielzahl von spektrometrischen Techniken anwendbar ist (VIS-UV-Absorption, Fluoreszenz, CD, ORD, NMR, etc.⁵⁵). Bei NMR-spektrometrischen Titrations werden sämtliche ppm(pH)-Messreihen

zugleich ausgewertet, d.h. die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen aller untersuchten Atome wird bei der Auswertung gekoppelt (vergl. Abb. 1-3). Das Programm ermittelt sämtliche pK-Werte von ein- und mehrstufigen Titrationsystemen sowie die ppm-Werte sämtlicher reinen Spezies (im zweistufigen Fall AH_2 , AH^- , A^{2-}), auch wenn diese in reiner Form nicht existieren. Wegen der gegenseitigen Ergänzung der verschiedenen Titrationskurven können grössere Kurvenstücke fehlen. Im Gegensatz zu den oben dargestellten Auswertungen der CS-Diagramme wird nicht notwendig vorausgesetzt, dass das saure bzw. alkalische Ende der Titration experimentell erreichbar ist.

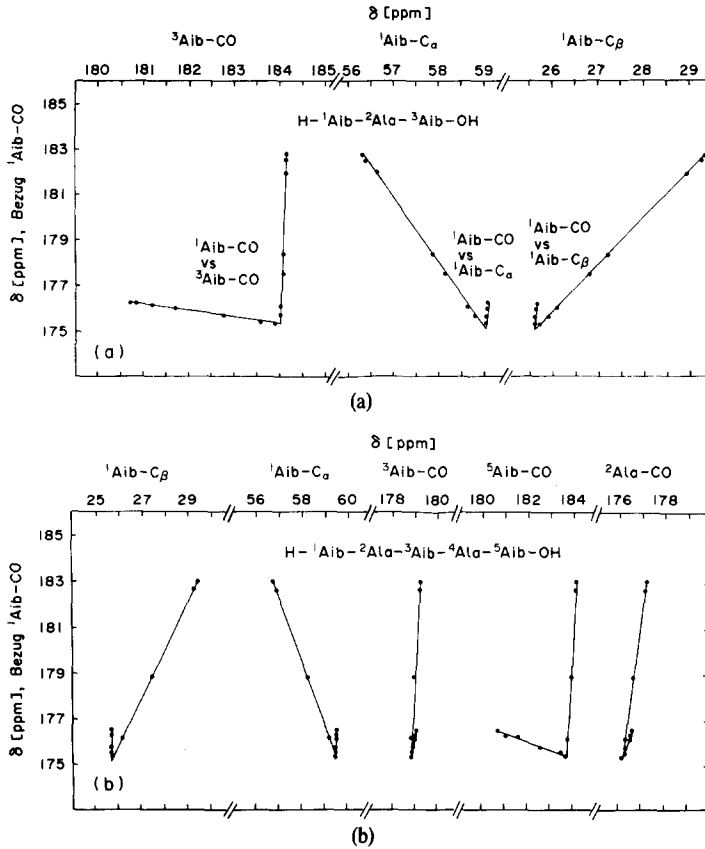


Abb. 5. CS-Diagramme der ¹³C-NMR-Titration von (a) Aib-L-Ala-Aib, (b) Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-Aib.

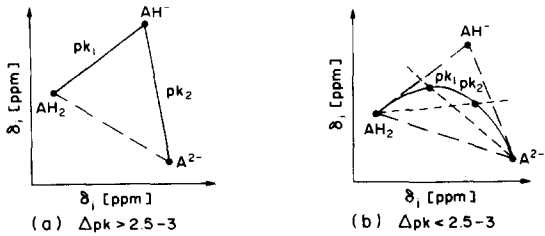


Abb. 6. Schematische Darstellung Chemischer Verschiebungsdiagramme (CS-Diagramme) für nicht überlappende (a) und überlappende Zweistufentitration (b).

EXPERIMENTELLER TEIL

Abkürzungen und Begriffe. Ac = Acetyl; Ac-OBu = Essigsäure-butylester; Aib = α-Aminoisobuttersäure (2-Methylalanin); Boc = tert-Butyloxycarbonyl; Boc-N₃ = Boc-Azid; Bu^t = tert-Butyl; Bzl = Benzyl; EE = Essigester; Et = Ethyl; Et₂O =

Diethylether; EtOH = Ethanol; For = Formyl; H-Np = 4-Nitrophenol; H-Pcp = Pentachlorphenol; Me = Methyl; NMM = N-Methylmorpholin; Nps = o-Nitrophenylsulfenyl; OCN-Aib-OR = N-Carbonyl-α-aminoisobuttersäureester; OC(Aib-OMe)₂ = N,N'-Carbonyl-bis(α-aminoisobuttersäuremethylester); Oxaz = Oxazolidon; Pcp = Pentachlorphenyl; PE = Petrolether (30-50°); Pht = Phthalyl; TEA = Triethylamin; Tfa = Trifluoracetyl; Tfa-Aib-Oxaz = 4,4-Dimethyl-2-trifluormethyl-5-oxazon; TFE = Trifluoressigsäure; THF = Tetrahydrofuran; Tos = p-Toluolsulfonyl; Z = Benzyloxycarbonyl.

MNE = Magnetische Nichtäquivalenz; FT = Fourier Transform; CS (= Chemical Shift)-Diagrams = Chemische Verschiebungs-Diagramme; A (= Absorbance)-Diagrams = Extinktions(E)-Diagramme; θ (= Ellipticity)-Diagrams = Elliptizitäts-Diagramme.

Synthesen. Die Synthesen der Aib-Derivate und Peptide wurden analog zu den in der Literatur^{63,64} beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 (Aib-Derivate) und Tabelle 9 (Aib-Peptide) dargestellt.⁶⁵

Sämtliche Verbindungen wurden mittels Elementaranalyse, IR,

Tabelle 6. Chemische Verschiebungen von Aib und Aib-Peptiden in der Zwitterionen-Form, aus CS-Diagrammen (Abb. 4 und 5) entnommen

	⁺ H ₂ -Aib-O ⁻	⁺ H ₂ -Ala-Aib-O ⁻	⁺ H ₂ -Aib-Ala-O ⁻	⁺ H ₂ -Aib-Ala-Aib-O ⁻	⁺ H ₂ -Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-O ⁻
Aib C _α	59,25	59,3	57,3	59,5 60,3	59,55 59,1 60,1
C _β	24,5	24,5/25,0	23,3/23,5	25,55 26,7	25,7/25,8 26,3/27,0 27,2
CO	178,7	181,2	172,3	175,3 184,0	175,3 178,9 183,8
Ala C _α		49,4	51,75	52,7	52,9 52,5
C _β		16,6	17,1	18,9	18,7 19,2
CO		169,15	179,8	175,2	176,2 175,3

Tabelle 7. ¹H-NMR-Chemische Verschiebungen von α-Aminoisobuttersäure-Derivaten

Verbindungen	Solvens	δ ppm (δ(TMS) = 0 ppm)		andere AS- und Schutzgruppen-Signale
		H _N	H _{CH₃}	
⁺ H ₂ -Aib-OH (<u>1⁺</u>)	D ₂ O, pD 1	4.72	1.57	-
H-Aib-O ⁻ (<u>1⁻</u>)	D ₂ O, pD 14	4.70	1.22	-
Tfa-Aib-OH (<u>9</u>)	CD ₃ OD	4.97	1.54	-
H-Aib-OMe (<u>1b</u>)	-	1.72	1.26	Me: 3.65
H-Aib-OEt (<u>1c</u>)	-	1.68	1.25	Et: CH ₂ 4.10 (q; J=7.0 Hz) CH ₃ 1.21 (t; J=7.0 Hz)
H-Aib-OBu ^t (<u>1d</u>)	-	1.68	1.22	Bu: CH ₃ 1.43
H-Aib-OBzl (<u>1e</u>)	-	1.67	1.27	Bzl: C ₆ H ₅ 7.25, CH ₂ 5.06
Boc-Aib-OBzl (<u>4d</u>)	CD ₃ OD	4.72	1.38	Boc: CH ₃ 1.48 Bzl: C ₆ H ₅ 7.33, CH ₂ 5.12
Z-Aib-OPcp (<u>5c</u>)	CDCl ₃	5.75	1.74	Z: C ₆ H ₅ 7.27, CH ₂ 5.09
Tfa-Aib-Oxaz (<u>9a</u>)	CDCl ₃	-	1.53	-
Z-Aib-Ala-OMe (<u>22a</u>)	CDCl ₃	5.55	1.51	Ala: NH 6.86 (d; J=7.0 Hz) H _α 4.46 (q; J=7.0 Hz) Z: C ₆ H ₅ 7.30, CH ₂ 5.07 Me: 3.70

Tabelle 8. Darstellungsmethoden und Charakterisierungsdaten der 2-Methylalanin-Derivate

Verbindung Summenformel (Molmasse)	Nr.	Darstellungs- methode	Ausb. %	Schmp. bzw. Sdp. °C (Lit.)	R _f (Fließ- mittel)	Analyse (ber.) gef.					
						C	H	N	X		
⁺ H ₂ -Aib-OMe, Cl ⁻ C ₅ H ₁₂ ClNO (153.6)	<u>(1b⁺)</u>	a) HCl/CH ₃ OH, Aib	95	177-183	0.20(A)	39.10	7.87	9.12	Cl 23.08		
		b) SOCl ₂ /CH ₃ OH, Aib	97	179-183	0.51(B)	39.33	7.98	9.27	23.48		
		c) aus <u>1b</u> mit HCl/Et ₂ O		187 (173-175) ⁶⁷	0.23(C)						
H-Aib-OMe C ₅ H ₁₁ NO ₂ (117.1)	<u>(1b)</u>	aus <u>1b⁺</u> mit NH ₃ /CHCl ₃ destilliert	95 (70)	52/33 Torr 136/760 Torr (130-138) ³⁰	0.20(A) 0.51(B) 0.23(C)	51.26 51.01	9.46 9.33	11.96 11.72			
		⁺ H ₂ -Aib-OEt, Cl ⁻ C ₆ H ₁₄ ClNO ₂ (167.6)	<u>(1c⁺)</u>	HCl/C ₂ H ₅ OH	94 (83)	153-158 (155-157) ⁶⁸	0.22(A) 0.56(B) 0.29(C)	42.99 43.08	8.42 8.60	8.35 8.52	Cl 21.15 21.50
		H-Aib-OEt C ₆ H ₁₃ NO ₂ (131.2)			94	55/19 Torr 41/11 Torr (41/11 Torr) ⁶⁹	0.22(A) 0.56(B) 0.29(C)	54.94 54.69	9.99 9.87	10.68 10.45	
H-Aib-OBu ^t x HCl C ₆ H ₁₈ ClNO ₂ (195.7)	<u>(1d⁺)</u>	aus <u>5e</u> mit H ₂ -Pd/C nach Zugabe von HCl	75	155-156 (Zers.) CH ₃ OH/Et ₂ O		49.10 48.96	9.27 9.11	7.16 7.01	Cl 18.12 18.0		
H-Aib-OBu ^t x AcOH C ₂₀ H ₂₁ NO ₄ (219.3)	<u>(1d⁺)</u>	aus <u>5e</u> mit H ₂ -Pd/C in Ggw. von AcOH	73	94 CH ₃ OH/Et ₂ O		54.77 54.49	9.65 9.25	6.39 6.50			
H-Aib-OBu ^t C ₆ H ₁₇ NO ₂ (159.2)	<u>(1d)</u>	aus <u>5e</u> in in CH ₃ OH mit H ₂ -Pd/C; destilliert	75 (81)	4 50/12 Torr (160-163 /760 Torr) ³¹	0.30(A) 0.59(B) 0.40(C)	60.35 60.22	10.76 10.64	8.80 8.67			
⁺ H ₂ -Aib-OBzl, Tos ⁻ C ₁₈ H ₂₃ NO ₃ S (365.4)	<u>(1e⁺)</u>	C ₆ H ₅ CH ₂ OH/TosOH Benzol, Destill.	85 (80)	154-156 (154) ⁷⁰	0.29(A) 0.60(B) 0.41(C)	59.16 59.02	6.34 6.40	3.83 4.06	S 8.77 9.44		

Tabelle 8 (Contd.)

Verbindung Summenformel (Molmasse)	Nr.	Darstellungs- methode	Ausb. % (Lit.)	Schmp. bzw. Sdp. °C (Lit.)	R _F (Fließ- mittel)	Analyse % (ber.) gef.			
						C	H	N	X
H-Aib-OBzl C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ (193.2)	(1e)	aus 1e mit NH ₃ /CHCl ₃ destilliert	95	78/1 Torr 131/18 Torr (131/18 Torr) ⁷⁰	0.29 (A) 0.60 (B) 0.41 (C)	(68.37 68.18	7.82 7.71	7.25 7.35	
For-Aib-OH C ₉ H ₉ NO ₃ (131.1)	(2)	H-Aib-OH in mit Ac ₂ O, 2h, 10°C	75	146-148 (145-147) ^{30, 72)}	-	(45.80 45.46	6.92 7.06	10.68 10.50	
Ac-Aib-OH C ₆ H ₁₁ NO ₃ (145.2)	(3a)	H-Aib-OH in H ₂ O/AcOH NaOH ⁷²⁾	65	196-198 (198-200) ³⁰⁾ (196-198) ⁷²⁾	0.21 (A) 0.64 (B) 0.54 (C)	(49.65 49.82	7.64 7.78	9.65 9.98	
Boc-Aib-OH C ₉ H ₁₇ NO ₄ (203.2)	(4a)	a) Aib; Boc-N ₃ pH-Stat b) 4b und 4c, OH ⁻ c) 4d, H ₂ /Pd-C	45 40-46 95	118 (119) ^{18, 37)} EE/PE	0.82 (A) 0.68 (B) 0.70 (C)	(53.19 53.36	8.43 8.56	6.89 6.78	
Z-Aib-OH C ₁₂ H ₁₅ NO ₄ (273.3)	(5a)	Z-Cl, H-Aib-OH in H ₂ O/Aceton pH 10.9	85 (92) (60)	88-91 (72.5-74.5) ³⁰⁾ (88-89) ⁷³⁾ Et ₂ O/PE	0.63 (A) 0.65 (B) 0.79 (C)	(60.75 60.62	6.37 6.39	5.90 5.72	
Z-Aib-OH x DCHA C ₂₄ H ₃₈ N ₂ O ₄	(5b)	Z-Aib-OH, DCHA in EE/Et ₂ O	75 EtOH	175 EtOH		(68.87 68.77	9.15 9.13	6.69 6.57	
Nps-Aib-OH C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ S (256.3)	(6a)	a) Nps-Cl, H-Aib-OH, 2N NaOH in Dioxan/H ₂ O b) aus 6b	75 (80)	119 EE/PE	0.77 (A) 0.66 (B) 0.72 (C)	(46.87 47.06	4.72 4.70	10.93 11.20	S 12.51) 12.32
Nps-Aib-OH x DCHA C ₂₂ H ₃₅ N ₃ O ₄ S (437.6)	(6b)	Nps-Aib-OH, DCHA in EE	67			(60.38 60.20	8.06 8.22	9.60 9.99	7.33) 7.33
Tos-Aib-OH C ₁₁ H ₁₅ NO ₄ S (257.3)	(7)	TosCl in H ₂ O/Aceton ³⁰⁾	54 (69)	150 (152) ³⁰⁾	0.64 (A) 0.62 (B) 0.66 (C)	(51.35 51.12	5.88 5.87	5.44 5.67	S 12.46) 12.82
Pht-Aib-OH C ₁₂ H ₁₁ NO ₄ (232.2)	(8)	Phthalsäurean- hydrid in der Schmelze ⁷⁴⁾	55 (69)	150 (152) ⁷⁴⁾	0.75 (A) 0.63 (B) 0.70 (C)	(61.80 61.74	4.75 4.85	6.01 6.28)	
Tfa-Aib-OH C ₆ H ₈ F ₃ NO ₃ (199.1)	(9)	(Tfa) ₂ O in TFE	75 (90)	171 (172) ³⁰⁾	0.45 (A) 0.62 (B) 0.76 (C)	(36.19 36.56	4.05 4.14	7.03 7.23	
Tfa-Aib-Oxaz C ₆ H ₆ F ₃ NO ₂ (181.1)	(9a)	Tfa-Aib-OH, SOCl ₂ ⁷⁾ Chinolin, 15 min, 80°C	88	115 (112-116) ³⁰⁾		(39.79 39.75	3.34 3.35	7.73 7.68	
Ac-Aib-OMe C ₇ H ₁₃ NO ₃ (159.2)	(3b)	aus 1b mit Ac ₂ O ⁸⁾	65 (90)	98-100 (100-100.5) ^{8, 75)} MeOH/PE	0.50 (A) 0.67 (B) 0.62 (C)	(52.82 52.93	8.23 8.18	8.80 8.73	
Boc-Aib-OMe C ₁₀ H ₁₀ NO ₄ (217.3)	(4b)	a) H-Aib-OMe, Boc-N ₃ , TEA b) OCN-Aib-OMe, (CH ₃) ₃ COH	40 60	71 Et ₂ O/PE	0.71 (A) 0.76 (B) 0.79 (C)	(55.28 56.06	8.82 9.14	6.45 7.97	
Boc-Aib-OEt C ₁₁ H ₂₁ NO ₄ (231.3)	(4c)	H-Aib-OEt, Boc-N ₃ , TEA	32	41 Et ₂ O/PE	0.73 (A) 0.76 (B)	(57.12 57.04	9.15 9.23	6.06 6.24	
Boc-Aib-OBzl C ₁₆ H ₂₃ NO ₄ (293.4)	(4d)	H-Aib-OBzl/ Boc-N ₃ , TEA	81	77 PE	0.77 (A) 0.79 (B) 0.82 (C)	(65.51 65.39	7.90 7.74	4.77 4.60	

Tabelle 8 (Contd.)

Verbindung Summenformel (Molmasse)	Nr.	Darstellungs- methode	Ausb. %	Schmp. bzw. Sdp. °C (Lit.)	R _F (Fließ- mittel)	Analyse % (ber.) gef.			
						C	H	N	X
Boc-Aib-OPcp	(4e)	Boc-Aib-OH, H-Pcp ⁷⁶⁾	75	140		39.87 36.86	3.54 2.84	3.10 2.84	Cl 39.31 44.83
C ₁₅ H ₁₆ Cl ₅ NO ₄ (451.5)		DCC, in EE		EE/PE					
Z-Aib-OPcp	(5c)	Z-Aib-OH, H-Pcp ⁷⁶⁾	83	109	0.85(A) 0.78(B)	44.52 44.73	2.91 3.71	2.88 3.07	Cl 36.51 36.43
C ₁₃ H ₁₄ Cl ₅ NO ₄ (485.6)		DCC, in EE		EtOH	0.89(C)				
Z-Aib-ONp	(5d)	Z-Aib-OH; H-Np ⁷⁷⁾	76 (88)	Öl Öl ⁷³⁾	0.78(A) 0.74(B)	60.33 60.40	5.06 5.18	7.82 7.68	
C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₆ (358.4)		DCC, in EE			0.88(C)				
Z-Aib-OBu ^t	(5e)	aus 3a mit Isobuten	86 (88)	59 (60-61) ³¹⁾	0.80(A) 0.77(B)	65.51 65.87	7.90 7.85	4.77 4.61	
C ₁₅ H ₂₃ NO ₄ (293.4)		H ₂ SO ₄			0.80(C)				
OCN-Aib-OME	(10)	H-Aib-OME x HCl, COCl ₂	93	3 52/11 Torr	-	50.35 50.15	6.34 6.28	9.79 10.00	
C ₆ H ₉ NO ₃ (143.1)		in Toluol ⁷⁸⁾ , destilliert							
O=C(Aib-OME) ₂	(11)	Nebenprodukt bei Reaktion von Boc-Val-OH mit 10 in Pyridin bei 60°C ⁷⁸⁾	35	144-146	-	50.76 50.70	7.75 7.81	10.76 10.83	
C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅ (260.3)									

Tabelle 9. Darstellungsmethoden und Charakterisierungsdaten von Aib-Peptiden

Peptidderivat Summenformel (Molmasse)	Nr.	Kupplungsbedin- gungen	Ausb. %	Schmp. °C (Lit.)	R _F (Fließmittel)	Analyse (ber.) gef.			
						C	H	N	X
Boc-L-Ala-Aib-OBu ^t	(12)	Boc-L-Ala-OH, H-Aib-OBu ^t	96	82-84	0.69(A) 0.84(B) 0.82(C)	58.16 57.94	9.15 9.04	8.48 8.21	
C ₁₆ H ₃₀ N ₂ O ₅ (330.4)		NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂		EE/PE					
Boc-L-Pro-Aib-OBzl	(13)	Boc-L-Pro-OH, H-Aib-OBzl	74	79	0.74(A) 0.75(B) 0.82(C)	64.60 54.55	7.74 7.72	7.17 7.31	
C ₂₁ H ₃₀ N ₂ O ₅ (390.5)		NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂		EE/PE					
Boc-L-Leu-Aib-OBt	(14)	Boc-L-Leu-OH, H-Aib-OBt	69	131	0.68(A) 0.77(B) 0.81(C)	59.28 59.48	9.36 9.37	8.13 8.39	
C ₁₇ H ₃₂ N ₂ O ₅ (344.5)		NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂		EE/PE					
Z-L-Ala-Aib-OBzl	(15a)	Z-L-Ala-OH, H-Aib-OBzl	71	90	0.69(A) 0.79(B) 0.88(C)	66.32 66.01	6.58 6.61	7.03 7.28	
C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅ (398.5)		NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂							
Z-L-Ala-Aib-OBu ^t	(15b)	Z-L-Ala-OH, H-Aib-OBu ^t	95	93-95	0.65(A) 0.87(B) 0.87(C)	62.62 62.48	7.74 7.72	7.69 7.53	
C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₅ (364.4)		NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂		EE/PE					
Z-L-Val-Aib-OBu ^t	(16)	Z-L-Val-OH, H-Aib-OBu ^t	49	102	0.62(A) 0.80(B) 0.84(C)	64.26 63.60	8.22 8.24	7.14 7.32	
C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₅ (392.5)		NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂		EE/PE					
Z-L-Gln-Aib-OBu ^t	(17)	Z-L-Gln-OH, H-Aib-OBu ^t	54	153-156	0.43(A) 0.58(B) 0.52(C)				
C ₂₁ H ₃₁ N ₃ O ₆ (421.5)		HOBT, DCC in THF		EtOH					
Boc-Aib-L-Ala-OBu ^t	(18)	Boc-Aib-OH, H-L-Ala-OBu ^t x HCl	60	122	0.66(A) 0.84(B) 0.86(C)	58.16 58.24	9.15 9.10	8.48 8.59	
C ₁₆ H ₃₀ N ₂ O ₆ (330.4)		NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂		EE/PE					
Z-Aib-Aib-OBu ^t	(19)	Z-Aib-OH, H-Aib-OBu ^t	63	134	0.72(A) 0.76(B) 0.83(C)	63.47 63.23	7.99 7.73	7.40 7.83	
C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅ (378.5)		TEA, DCC in CH ₂ Cl ₂		EE/PE					

Tabelle 9 (Contd.)

Kupplungsbedingungen	Ausb. %	Schmp. °C (Lit.) umkrist.aus	R_F (Fließmittel)	Analyse (bez) gef.			
				C	H	N	X
20) Z-Aib-OPcp, H-L-Val-OMe x HCl TEA, Imidazol in DMF	85	100-102	0.87 (C)	61.70	7.48	7.99	
		EE/PE		61.65	7.32	7.88	
21a) Z-Aib-OH, H-Gly-OMe x HCl TEA, DCC in CH ₂ Cl ₂	55	68	0.82 (C)	58.43	6.54	9.09	
		ButAc		58.61	6.62	9.29	
21b) Z-Aib-OH, H-Gly-OBu ^t TEA, DCC in CH ₂ Cl ₂	66	107	0.67 (A) 0.77 (B) 0.81 (C)	61.70	7.48	7.99	
		EE/PE		61.37	7.37	7.93	
22a) Z-Aib-OH, H-L-Ala-OMe x HCl NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂	86	68 (68.6-69.9) ⁷³⁾	0.78 (A) 0.77 (B) 0.81 (C)	59.62	6.88	8.69	
		EE/PE		60.15	6.88	8.80	
22b) Z-Aib-OH, H-L-Ala-OBu ^t x HCl NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂	74	104	0.62 (A) 0.81 (B) 0.88 (C)	62.62	7.74	7.69	
		EE/PE		63.39	8.01	7.10	
23) Z-Aib-OH, H-L-Pro-OMe x HCl NMM, DCC in CH ₂ Cl	77	90-92 (95-97) ⁷³⁾	0.89 (A) 0.69 (B) 0.69 (C)	62.05	6.94	8.04	
		EE/PE		61.88	6.86	7.88	
24) Tos-Aib-OH, H-L-Leu-OMe x HCl NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂	69	140-141	0.73 (A) 0.78 (B) 0.80 (C)	56.23	7.34	7.29	8.34
		EE/PE		56.50	7.38	7.41	8.13
25) Pht-Aib-OH, H-L-Val-OMe x HCl NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂	54	84-88	0.77 (A) 0.77 (B) 0.79 (C)				
		EE/PE					
26) Nps-Aib-OH, H-Gly-OBu ^t TEA, DCC in CH ₂ Cl ₂	79	99-105	0.64 (A) 0.75 (B) 0.89 (C)	52.02	6.28	11.37	
		EE/PE		51.92	6.48	11.51	
27) Tfa-Aib-OMe, H-Aib-OBu ^t in Acetonitril	95	114	0.59 (A) 0.79 (B) 0.86 (C)	49.41	6.81	8.23	F16.75)
		Benzol		49.69	6.81	8.45	16.54
28) Tfa-Aib-OMe, H-L-Pro-OMe x HCl in Acetonitril	95	126	0.89 (C)	46.45	5.52	9.03	F18.37)
		EE/PE		46.38	5.49	9.12	18.19
29) Z-L-Pro-OH, H-Aib-Ala-OMe x HBr NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂	55	131	0.49 (A) 0.73 (B) 0.65 (C)	60.13	6.97	10.02)	
		EE/PE		60.04	7.17	9.86	
30) Z-L-Val-OH, H-Aib-Gly-OBu ^t NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂	85	sirupös	0.53 (A) 0.70 (B) 0.76 (C)	61.45	7.85	9.35)	
				61.21	7.73	9.24	
31) Z-L-Val-OH, H-Aib-Aib-OBu ^t NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂	74	94-96	0.49 (A) 0.78 (B) 0.84 (C)	62.87	8.23	8.50)	
		EE/PE		62.69	8.19	8.96	
32) Z-L-Leu-OH, H-Aib-Pro-OMe x HBr NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂	76	132	0.49 (A) 0.78 (B) 0.79 (C)	62.45	7.64	9.10)	
		Ether		62.67	7.59	9.37	
33) Z-Aib-Ala-OH, H-Aib-Ala-OBu ^t NMM, DCC in CH ₂ Cl ₂	86	106	0.52 (A) 0.80 (B) 0.81 (C)	59.98	7.74	10.76)	
		EE/PE		59.77	7.96	10.57	

¹H- und ¹³C-NMR und MS untersucht.^{65,66} Dünnschichtchromatographie: Kieselgel-Fertigplatten 60F₂₅₄ (Merck 5714); Fliessmittel (Angabe in Tabelle 8 und 9 bei R_F): A = Chloroform/Methanol/Eisessig (17 : 2 : 1), B = 1-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (15 : 3 : 12 : 10), C = 1-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1).

Valinbenzylester diente als interner Standard: R_F 0.32 (A), 0.66 (B), 0.54 (C). Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind nicht korrigiert.

Die Peptide H-Aib-L-Ala-OH, H-L-Ala-Aib-OH, H-Aib-L-Ala-Aib-OH und H-Aib-(L-Ala-Aib)₂-OH wurden aus den N-Boc-Peptid-methylestern^{33,66} durch Verseifung des Methylesters und Abspaltung der N-tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe nach den üblichen Methoden erhalten.

NMR-Spektroskopie. ¹³C- und ¹H-NMR-Spektren wurden an den Bruker FT-Spektrometern HX 90 und WH 90 gemessen. Die Spektren wurden je nach Bedarf mit 4–8 k-Datenpunkten und bis zu 8000 Interferogrammen aufgenommen. Die Zuordnung der Signale ist in Tabelle 1 (Aib-Derivate) und Tabelle 2 (Aib-Peptide) angegeben. Beispiele von ¹H-NMR-Daten von Aib-Derivaten sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Titrationskurven wurden mit 10 mm-Röhrchen mit einem 4 mm dicken Innenröhrchen für den ²H₂O-Lock und externen Standard gemessen. Die Lösungen enthielten 100–200 mg Substanz in 2–3 ml nicht gepufferten ²H₂O. Der pH-Wert wurde vor und nach der Messung kontrolliert, wobei keine ¹H/²H-Korrekturen erfolgten.

Gemessen wurde ausgehend von sauren zu alkalischen pH-Werten, die jeweils durch Zugabe von 2 N NaOH eingestellt wurden.

Danksagung—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 76) sowie dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATUR

- ¹P. Meyer und F. Reusser, *Experientia* **23**, 85 (1967).
- ²T. Ooka, Y. Shimojina, T. Akimoto, I. Takeda, S. Senoh und J. Abé, *Agric. Biol. Chem.* **30**, 700 (1966).
- ³T. Ooka und I. Takeda, *Ibid.* **36**, 112 (1972).
- ⁴C. T. Hou, A. Ciegler und C. W. Hesseltine, *Appl. Microbiol.* **23**, 183 (1972).
- ⁵G. Irmscher, G. Bovermann, G. Boheim und G. Jung, *Biochim. Biophys. Acta* **507**, 470 (1978).
- ⁶H. Brückner, W. A. König, M. Greiner und G. Jung, *Angew. Chem.* **91**, 508 (1979); *Ibid.*, Int. Ed. Engl. **18**, 476 (1979).
- ⁷R. C. Pandey, J. C. Cook und K. L. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5205 und 8469 (1977).
- ⁸H. Brückner und G. Jung, *Chromatographia* **13**, 170 und 209 (1980).
- ⁹A. Clossé und R. Huguenin, *Helv. Chim. Acta* **57**, 533 (1974).
- ¹⁰N. Inoue, A. Inoue, A. Rurukawa und N. Kanada, *J. Antibiot.* **29**, 618 (1976).
- ¹¹A. W. Burgess und S. J. Leach, *Biopolymers* **12**, 2691 (1973).
- ¹²M. E. Johnson und T. T. Wu, *J. Theor. Biol.* **60**, 183 (1976).
- ¹³N. Shamala, R. Nagaraj und P. Balaram, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 292 (1977).
- ¹⁴G. D. Smith, W. L. Duax, E. W. Czerwinski, N. E. Kendrik, G. R. Marshall und F. S. Mathews, in *Peptides, Proc. 5th Am. Pept. Symp.* (M. Goodman und J. Meienhofer), S. 277. Wiley, New York (1978).
- ¹⁵A. I. McMullen, D. J. Marlborough und P. M. Bayley, *FEBS Lett.* **16**, 278 (1971).
- ¹⁶G. Jung, N. Dubischar, G. Irmscher, W. Mayr und R. Oekonomopulos, *Chemiker-Zig* **101**, 196 (1977).
- ¹⁷G. Jung, N. Dubischar und D. Leibfritz, *Eur. J. Biochem.* **54**, 395 (1975).
- ¹⁸W. Mayr, R. Oekonomopulos und G. Jung, *Biopolymers* **18**, 425 (1979).
- ¹⁹R. Oekonomopulos und G. Jung, *Ibid.* **19**, 203 (1980).
- ²⁰G. Jung, W. A. König, D. Leibfritz, T. Ooka, K. Janko und G. Boheim, *Biochim. Biophys. Acta* **433**, 164 (1976).
- ²¹G. Jung, H. Brückner, R. Oekonomopulos, G. Boheim, E. Breitmaier und W. A. König, in *Peptides, Proc. 6th Am. Pept. Symp.* (E. Gross und J. Meienhofer), S. 647. Pierce Chemical Company, Rockford (1979).
- ²²P. Müller und D. O. Rudin, *Nature* (London) **217**, 713 (1968).
- ²³G. Boheim, K. Janko, D. Leibfritz, T. Ooka, W. A. König und G. Jung, *Biochim. Biophys. Acta* **433**, 182 (1976).
- ²⁴G. Boheim, G. Irmscher und G. Jung, *Ibid.* **507**, 485 (1978).
- ²⁵G. Boheim, *J. Membr. Biol.* **19**, 277 (1974), und dort zit. Lit.
- ²⁶G. Irmscher und G. Jung, *Eur. J. Biochem.* **80**, 165 (1977).
- ²⁷J. W. Payne, R. Jakes und B. S. Hartley, *Biochem. J.* **117**, 757 (1970).
- ²⁸D. R. Martin und R. J. P. Williams, *Ibid.* **153**, 181 (1976).
- ²⁹Y. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin und J. V. Kozhevnikova, *Obshch. Khim.* **41**, 2085 (1971); *C.A.* **76**, 46502 n (1972).
- ³⁰M. T. Leplawy, D. S. Jones, G. W. Kenner und R. C. Sheppard, *Tetrahedron* **11**, 39 (1960).
- ³¹D. S. Jones, G. W. Kenner, J. Preston und R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc.* 6227 (1965).
- ³²B. F. Gisin, S. Kobayashi, D. G. Davis und J. E. Hall, in *Peptides, Proc. 5th Am. Pept. Symp.* (M. Goodman und J. Meienhofer), S. 215. Wiley, New York (1978).
- ³³R. Oekonomopulos und G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* 1151 (1979).
- ³⁴R. Oekonomopulos und G. Jung, in *Peptides 1978, Proc. 15th Eur. Pept. Symp.* (I. Z. Siemion und G. Kupryszewski), S. 690. Wrocław University Press, Wrocław (1979).
- ³⁵D. Leibfritz, W. Mayr, R. Oekonomopulos und G. Jung, *Tetrahedron* **34**, 2045 (1978).
- ³⁶W. Mayr und G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* 1489 (1980).
- ³⁷W. Mayr, G. Jung und J. Strähle, *Ibid.* 715 (1980).
- ³⁸H. Schmitt, Diplomarbeit, Univ. Tübingen (1979).
- ³⁹H. Brückner, Dissertation, Univ. Tübingen (1979).
- ³⁹G. Jung, H. Brückner, H. Schmitt und R. Oekonomopulos, Publikation in Vorbereitung.
- ⁴⁰M. Branik und H. Kessler, *Chem. Ber.* **108**, 2176 (1975).
- ⁴¹T. Asakura, M. Kamio und A. Nishioka, *Biopolymers* **18**, 467 (1979).
- ⁴²W. J. Horsley und H. Sternlicht, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 3738 (1968).
- ⁴³G. Jung, E. Breitmaier und W. Voelter, *Eur. J. Biochem.* **24**, 438 (1972).
- ⁴⁴L. Flohé, E. Breitmaier, W. A. Günzler, W. Voelter und G. Jung, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1159 (1972).
- ⁴⁵M. Christl und J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 4565 (1972).
- ⁴⁶D. L. Rabenstein und Th. L. Sayer, *J. Magn. Reson.* **24**, 27 (1976).
- ⁴⁷J. G. Batchelor, J. Feeney und G. C. K. Roberts, *Ibid.* **20**, 19 (1975).
- ⁴⁸K. G. Denbigh, *Trans. Faraday Soc.* **36**, 936 (1940).
- ⁴⁹I. Morishima, K. Yoshikawa, K. Okada, T. Yonezawa und K. Goto, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 165 (1975).
- ⁵⁰R. Hagen und J. D. Roberts, *Ibid.* **91**, 4504 (1969).
- ⁵¹J. B. Stothers, *Carbon-13-NMR-Spectroscopy*. Academic Press, New York (1972).
- ⁵²K. Wüthrich, NMR in *Biological Research: Peptides and Proteins*. North-Holland, Amsterdam (1976).
- ⁵³G. Maciel und J. Natterstad, *J. Chem. Phys.* **42**, 2752 (1965).
- ⁵⁴I. Z. Siemion und A. Sucharda-Sobczyk, *Tetrahedron* **26**, 191 (1970).
- ⁵⁵H. Lachmann, *Z. Anal. Chem.* **290**, 117 (1978).
- ⁵⁶H. Lachmann und J. Polster, Spektrometrische Titrationsen, Vieweg Verlag Wiesbaden, 1982 im Druck.
- ⁵⁷H. Mauser, *Z. Naturforsch. B*, **23**, 1021 und 1025 (1968).
- ⁵⁸H. Mauser, *Formale Kinetik*. Bertelsmann Universitätsverlag, Düsseldorf (1974).
- ⁵⁹G. Jung, M. Ottnad, P. Hartter und H. Lachmann, *Angew. Chem.* **87**, 448 (1975); *Ibid.*, Int. Ed. Engl. **14**, 429 (1975).
- ⁶⁰R. Blume, H. Lachmann und J. Polster, *Z. Naturforsch. B*, **30**, 263 (1975).
- ⁶¹J. B. Dalton und C. L. A. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **109**, 241 (1935).
- ⁶²F. Göbber und H. Lachmann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 269 (1978).

- ⁵³J. P. Greenstein und M. Winitz, *Chemistry of the Amino Acids*. Wiley, New York (1961).
- ⁵⁴E. Wünsch in *Methoden der organischen Chemie* (Houben-Weyl-Müller), 4. Aufl., Bd. XI. Thieme, Stuttgart (1974).
- ⁵⁵N. Dubischar, Ph.D. Thesis, University of Toledo (1975).
- ⁵⁶R. Oekonomopulos, Dissertation, Univ. Tübingen (1978).
- ⁵⁷M. Goodman und W. J. McGahren, *Tetrahedron* **23**, 2031 (1967).
- ⁵⁸A. L. Barker und G. S. Skinner, *J. Am. Chem. Soc.* **46**, 403 (1924).
- ⁵⁹N. Zelinsky, A. Annenkov und J. Kulikow, *J. Russ. Phys. Chem. Soc.* **43**, 1091 (1912); (*C.* **1912/1**, 124).
- ⁷⁰N. Izumiya und S. Makisumi, *J. Chem. Soc. Jpn.* **78**, 2031 (1957).
- ⁷¹G. Faust und M. Klepel, *J. Prakt. Chem.* **11**, 133 (1960).
- ⁷²W. Mayr, Dissertation, Univ. Tübingen (1979).
- ⁷³W. J. McGahren und M. Goodman, *Tetrahedron* **23**, 2017 (1967).
- ⁷⁴J. H. Billmann und W. F. Harting, *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 3822 (1952).
- ⁷⁵J. P. Wolf und C. Niemann, *Biochemistry* **2**, 493 (1963).
- ⁷⁶J. Pless und H. Boissonas, *Helv. Chim. Acta* **46**, 1616 (1963).
- ⁷⁷M. Bodanzsky und V. du Vigneaud, *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).
- ⁷⁸S. Goldschmidt und M. Wick, *Liebigs Ann. Chem.* **575**, 217 (1952).