

ZUR KONFORMATION GESCHÜTZTER AMINOSÄUREN—I

NMR-UNTERSUCHUNGEN VON t-BOC-GLYCIN

M. BRANIK und H. KESSLER*

Institut für Organische Chemie der Universität, D-6 Frankfurt (M), Theodor Stern Kai 7

(Received in Germany 31 August 1973; Received in the UK for publication 30 October 1973)

Abstract—Z, E-Isomerism of the urethane bond of t-BOC-glycine was observed by ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy at various temperatures in several solvents. The special stabilization of the Z isomer at low temperatures in CDCl_3 has been explained by intra- and intermolecular H-bond forming a 7-membered ring. Thermodynamic data have been determined for the ground state ($\Delta H^\circ = -7 \text{ kcal/mol}$, $\Delta S^\circ = -25 \text{ Clausius}$) as well as for the barrier of interconversion ($\Delta G^\circ = 15.4 \text{ kcal/mole}$ for the deuterated title compound) in CDCl_3 . The equilibrium between the Z and the E conformation is shifted towards the E conformation in more polar solvents (acetonitril-d₃, acetone-d₆, DMSO-d₆), in which cyclization of the Z conformation is not important.

t-BOC-Aminosäuren spielen in der Peptidsynthese eine grosse Rolle. Studien über die Konformationen dieser Verbindungen liegen bisher nur vereinzelt vor.¹⁻³ Wir untersuchten die Konformation von t-BOC-Glycin in verschiedenen Lösungsmitteln mit Hilfe der NMR-Spektroskopie.⁴

Das ^1H -NMR-Spektrum von t-BOC-Glycin in CDCl_3 bei Raumtemperatur zeigt zwei relativ breite Signale unterschiedlicher Intensität für das NH-Proton¹—ein Signal bei $\delta = 6.6 \text{ ppm}$ (Signal Z)** und ein weiteres bei $\delta = 5.2 \text{ ppm}$ (Signal E), während das Signal für die CH_2 -Gruppe als etwas verbreitetes Dublett bei $\delta = 3.95 \text{ ppm}$ und dasjenige der t-Butylgruppe als Singulett bei $\delta = 1.44 \text{ ppm}$ erscheint (Abb. 1).

Die Integration ergibt, dass beide NH-Signale zusammen das richtige Intensitätsverhältnis zur Methylen- bzw. t-Butylgruppe ergeben. Die Verdoppelung des NH-Signals führen wir in Übereinstimmung mit J. L. Dimicoli und M. Ptak³ auf die Rotationshinderung um die Urethan-C-N-Bindung zurück. Im Unterschied zu diesen Autoren sind wir jedoch der Ansicht, dass das Konformerengleichgewicht auf intra- und intermolekulare Effekte zurückzuführen ist und die Zuordnung der Signale umgekehrt sein sollte.

Mit abnehmender Temperatur verschiebt sich vor allem das NH-Signal Z und das Signal des Carboxylprotons nach tiefem Feld (Abb. 1, 2).

Besonders stark hängt auch das Intensitätsverhältnis der beiden NH-Signale von der Temperatur ab (Tabelle 1). Mit abnehmender Temperatur steigt der Anteil von Z auf Kosten von E so stark an, dass bei -50°C über 90% in der Z-

Form vorliegen, während bei $+40^\circ\text{C}$ die E-Form mit ca. 80% überwiegt. Diese starke Verschiebung des Gleichgewichtes drückt sich in den daraus ermittelten thermodynamischen Daten aus: $\Delta H^\circ = -7.0 \pm 1.2 \text{ kcal/mol}$, $\Delta S^\circ = -24.8 \pm 4.2 \text{ Clausius}$.

Oberhalb von 30°C verbreitern sich die NH-Signale so stark, dass man das Hineinwandern des sich verkleinernden Z-NH-Signales in das E-NH-Signal nicht mehr exakt beobachten kann. Allein auf Basis dieser Spektren kann man nicht beweisen, dass es sich hier um ein Koaleszenzphänomen durch chemischen Austausch⁵⁻⁷ handelt. Der chemische Austausch wäre auf die einsetzende CN-Rotation oder den intermolekularen Austausch der NH-Protonen oder auf beide Vorgänge zurückzuführen.

Die Messungen in 1,2-Dideutero-tetrachloräthan ergeben weiteren Aufschluss über die Natur des Prozesses. Das Raumtemperaturspektrum von t-BOC-Glycin in diesem Lösungsmittel entspricht dem Spektrum in CDCl_3 ; der höhere Siedepunkt ermöglicht jedoch ein Erwärmen bis auf 100°C . Das

Tabelle 1. Temperaturabhängigkeit des Z, E-Isomerenverhältnisses von t-BOC-Glycin in CDCl_3 ,*

T [K]	Pz/PE [%]	T [K]	Pz/PE [%]
223	95:5	283	48:52
233	92:8	293	38:62
243	89:11	303	25:75
253	83:17	313	21:79
263	72:28	323	7:93 ^b
273	62:38		

**Zuordnung siehe unten.

*0.22 molar; ^bLinien schon stark verbreitert.

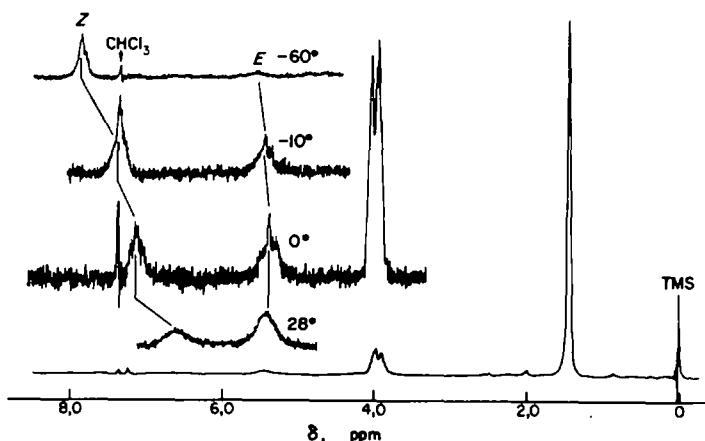


Abb. 1. ^1H -NMR-Spektrum von t-BOC-Glycin in CDCl_3 (60 MHz, ohne COOH-Proton).

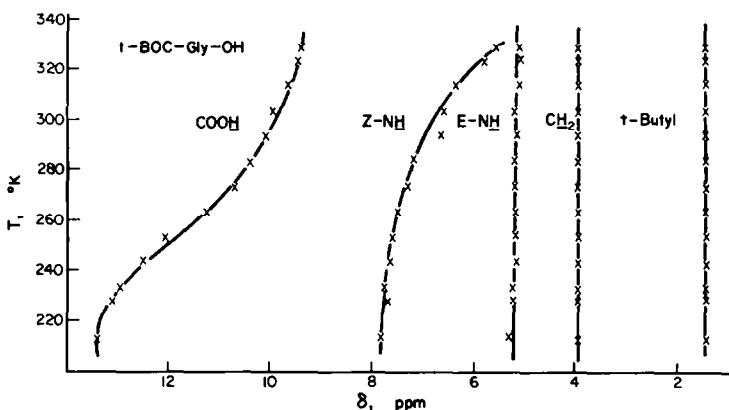


Abb. 2. Chemische Verschiebungen der Protonen von t-BOC-Glycin als Funktion der Temperatur (0-22 molar in CDCl_3 , 90 MHz).

Z-NH-Signal wandert mit steigender Temperatur ebenso wie in CDCl_3 in das E-NH-Signal und das NH-Signal behält dann eine endliche Breite (18 Hz bei 60 MHz). Die $\text{C}_\alpha\text{H-NH}$ -Kopplung ist auch bei 100°C an der Dublettstruktur des CH_2 -Signals noch erkennbar. Das schliesst einen schnellen Austausch der NH-Protonen als Ursache des Temperaturverhaltens aus.

Beim Abkühlen der CDCl_3 -Lösung erhalten die NH-Signale eine Triplett-Struktur. Das Signal der Methyengruppe verändert seine Feinstruktur: bei -7°C (90 MHz) erkennt man beispielsweise deutlich ein verdoppeltes Dublett (Abb. 3.).

Aus dem Intensitätsverhältnis, der Grösse der Aufspaltung und durch Entkopplung der NH-Signale lässt sich beweisen, dass das Z-NH-Signal mit dem Hochfeld- CH_2 -Dublett und das E-NH-Signal mit dem Tieffeld- CH_2 -Dublett koppelt. Die Kopplungskonstanten betragen für das Z-NH-Signal $^3J = 4.0$ Hz, für das E-NH-Signal $^3J = 5.5$ Hz (Deutung s.u.).

Das ^1H -entkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum von t-

BOC-Glycin in CDCl_3 zeigt beim Abkühlen eine Verdoppelung der Signale. Lediglich die Methylgruppen des t-BOC-Substituenten spalten nicht auf (Abb. 4.).

Die temperaturabhängige Änderung des Intensitätsverhältnisses erlaubt durch den Vergleich mit den Protonenspektren eine eindeutige Signalzuordnung zu den Rotameren. Beim Erwärmen über +35°C ist eine Koaleszenz aller verdoppelten C-Signale erkennbar.

Die Kinetik der Rotation um die partielle CN-Doppelbindung wurde im Spektrum des H/D-Dausgetauschten t-BOC-Glycin in CDCl_3 untersucht. Beim Abkühlen unterhalb +14°C spaltet das CH_2 -Signal in zwei durch die $\text{C}_\alpha\text{H-ND}$ -Kopplung etwas verbreiterte Singulets auf, die bei weiterem Abkühlen aufeinander zuwandern. Die auf den Koaleszenzpunkt extrapolierte chemische Verschiebung ohne Austausch ($\Delta\nu$) beträgt 4.5 Hz. Nach dem üblichen Verfahren⁵⁻⁷ erhält man ΔG^\ddagger zu 15.4 kcal/mol. Auf eine Linienformanalyse wurde wegen der geringen Aufspaltung verzichtet. Die

Grösse der Barriere entspricht einer Rotation um die Urethanbindung.⁸⁻¹⁰ Zum Vergleich haben wir die Barriere in t-BOC-Sarcosin anhand der Aufspaltung der t-Butylgruppe und der CH₂-Gruppe in CDCl₃ bestimmt (s. Tabelle 2).

In allen Fällen beobachtet man einen ΔG° -Wert von 15–16 kcal/mol, der in Übereinstimmung mit den Erwartungen einige kcal/mol geringer ist, als der ΔG° -Wert für die Rotation um eine Amidbindung.^{6,8}

Die beiden Rotameren um die Urethanbindung haben verschiedene Möglichkeiten zur Ausbildung inter- und intramolekularer Wasserstoffbrücken. Als Wasserstoffbrücken-Donatoren können die COOH- und die NH-Gruppe in Betracht kommen.

während die Carboxyl- und die Urethan-Carbonyl-Gruppe als Acceptoren dienen können. Damit ergeben sich für jedes Rotamere vier Kombinationen (A-D):

Donator		Acceptor
A	COOH	COOH
B	COOH	Urethan-Carbonyl
C	Urethan-NH	COOH
D	Urethan-NH	Urethan-Carbonyl

Solange die Carboxylgruppe nicht zu einer anderen H-Brückenbildung benötigt wird, haben wir in dem von uns untersuchten Konzentrationsbereich (0-1 bis 1 molar) die übliche Dimerisierung der Carbonsäuren (A) anzunehmen.

Es ist bekannt, dass Urethanbindungen im Gegensatz zu Peptidbindungen nicht zu Wasserstoffbrückenbildung neigen.¹¹ Die Alternative D, die für die E-Konformation ohne Berücksichtigung der Carbonsäuredimerisierung A zu cyclischen Dimeren und für die Z-Konformation zu Polymeren führen sollte, ist nach unserer Meinung daher auszuschliessen.

Eine zur Möglichkeit C analoge Wasserstoffbrücke, die intermolekular zur Bildung eines 5-Ringes führen sollte, wurde von Néel in Dipeptiden diskutiert.¹²

Sie wäre jedoch für beide Rotameren um die Urethanbindung (*Z* und *E*) gleichberechtigt, während wir aus dem NMR-Spektrum nur eine H-Brücke aus der Tieffeldverschiebung eines NH-Signals entnehmen können. Der relativ große Un-

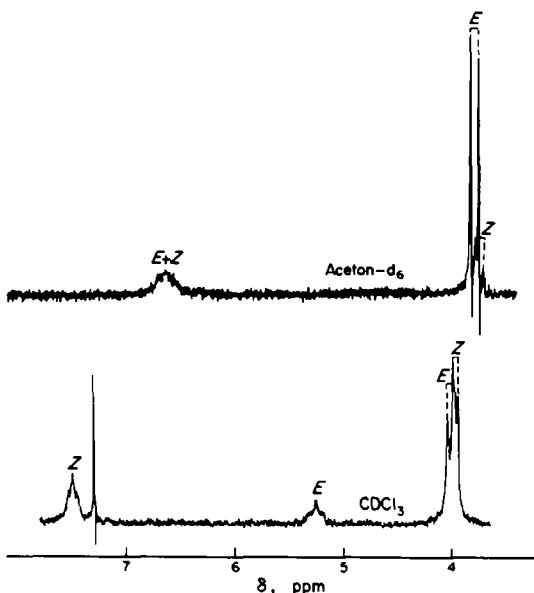


Abb. 3. t-BOC-Glycin in CDCl_3 und CD_3COCD_3 bei -7°C (90 MHz) im Bereich von 3.5 bis 8.0 ppm.

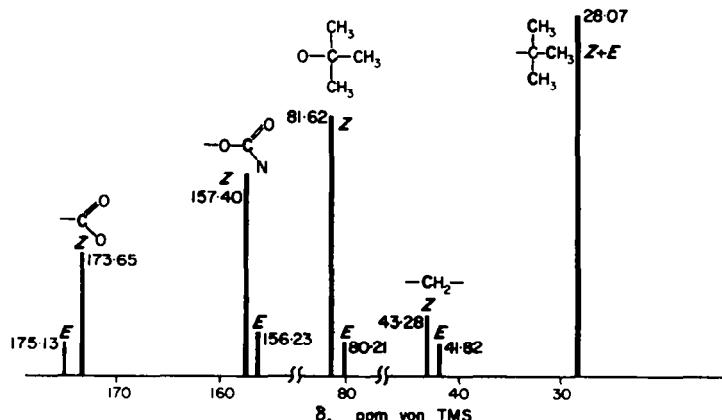
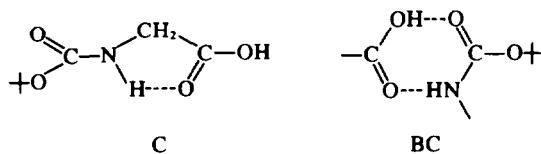


Abb. 4. ^{13}C -FT-NMR-Spektrum von t-BOC-Glycin in CDCl_3 bei -19°C .

Tabelle 2. Rotationsbarrieren um Urethanbindungen in CDCl_3 .

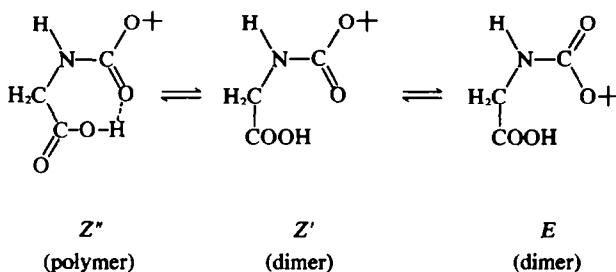
	Signal	$\Delta\nu$ [Hz]	T_c [°C]	ΔG^\ddagger [kcal/Mol]	Literatur
	CH_2	4.5	+14	15.4	diese Arbeit
	$t\text{-Bu}$ CH_2	4.5 7.0	+23 +32	16.0 16.1	diese Arbeit
	CH_2	3.7	+10	14.8	9
	CH_2	16	+5	15.8	10

terschied der chemischen Verschiebung der beiden NH-Signale wäre nach diesem Modell kaum verständlich.

Eine intermolekulare Assoziation BC, in der gleichzeitig zwei H-Brücken gebildet werden, führt zu einer Stabilisierung der E-Konformation.³ Wir nehmen aber an, dass eine cyclische 7 - Ring - Konformation Z" im Z-Rotameren bei tiefer Temperatur vorliegt (Wasserstoffbrücke B).

man für die CH_2 -Gruppe in der cyclischen Z"-Form eine Hochfeldverschiebung gegenüber der E-Form. Damit müsste man auch das Tieffeld-NH-Signal der Z"-Form zuordnen (s.o.). Die Aufspaltung der CH_2 -Signale ist allerdings sehr klein.

2. Die Kopplungskonstante des Tieffeld-NH-Signals beträgt bei -7°C 4.0 Hz. Für die cyclische Konformation berechnet man nach dem Dreiding-



Diese Konformation Z" entspricht der gefalteten Dipeptidenstruktur,^{11,13} lediglich die t-Butyloxymethylgruppe und die OH-Gruppe der Carbonsäure sind variiert.

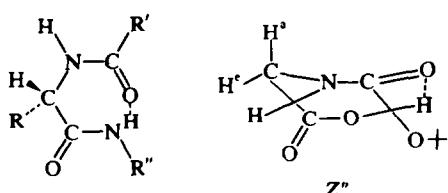
Modell unter Zugrundelegung der für $\text{C}_\alpha\text{H}-\text{NH}$ -Kopplung modifizierten Karpluskurve^{11,15-18}

$$\text{H}^\alpha: \theta = 95^\circ \quad ^3J = 0.6 \text{ Hz}$$

$$\text{H}^\alpha: \theta = 25^\circ \quad ^3J = 7.8 \text{ Hz}$$

Als Mittelwert ergibt sich $^3J = 4.2 \text{ Hz}$, bzw. unter Korrektur für das Glycin $^3J = 4.1 \text{ Hz}$.¹⁶ Dieser Wert liegt nahe bei dem beobachteten, der allerdings nach weiter unten zu besprechenden Argumenten einen Mittelwert von ca 70% cyclischer Form Z" neben ca 30% acyclischer Z'-Form darstellt. Bei der Struktur "BC" erwartet man wegen der nicht wesentlich gehinderten Rotation um die $\text{N}-\text{C}_\alpha$ -Bindung eine eher gemittelte, deutlich grössere Kopplungskonstante.¹¹ Dies zeigt sich beispielsweise bei der gegenüber in Chloroform deutlich grösseren Kopplungskonstante für die Z-Konformation in Aceton-d₆ oder Acetonitril-d₃ (s.u.).

3. Die Energieverhältnisse bei t-BOC- β - und



Für die Annahme der cyclischen Struktur, die zu einer entgegengesetzten Zuordnung der Z,E-Isomeren wie die BC-Struktur³ führt, sprechen folgende Argumente:

1. Bei Zugrundelegung des Paulsenschen Modells der Anisotropie der Amidgruppe¹⁴ erwartet

- γ -Aminocarbonsäuren unterscheiden sich von denjenigen der t-BOC- α -Aminosäuren durch kleinere Entropien.⁹ Dies kann für die Cyclisierung der t-BOC- α -Aminosäuren nach dem Schema $Z' \rightarrow Z''$ erwartet werden; dieser Effekt sollte jedoch bei der Konformation "BC" nicht auftreten.

Bei der Cyclisierung $Z' \rightarrow Z''$, die NMR-spektroskopisch nicht direkt beobachtbar ist, weil dieser Prozess zu schnell verläuft, muss die Energie zur Spaltung der dimeren Carbonsäurestruktur aufgebracht werden.

Andererseits wird in der cyclischen Z'' -Form das NH saurer und die Carbonylgruppe des Säurerestes basischer sein, so dass nun die Möglichkeit zur Polymerisation besteht. Bezogen auf jedes Molekül werden damit zwei H-Brücken in der Z'' -Form, jedoch jeweils nur eine H-Brücke in der *E*- und in der Z' -Form (Carbonsäuredimere) gebildet. Die Polymerisation von Z'' erklärt zwangslässig die stark negative Entropie der Z -Konformation im Vergleich zur *E*-Konformation.

Die hier angeführten Argumente werden durch die Messungen in anderen Lösungsmitteln unterstützt. In Acetonitril, einem polaren, aprotischen Solvens, werden Wasserstoffbrücken ungünstiger. Die $^1\text{H-NMR}$ -Messungen zeigen dementsprechend nur eine geringe Tieffeldverschiebung beider NH-Signale beim Abkühlen und die *E*-Form überwiegt im Gleichgewicht.

Das Z, E -Isomerenverhältnis bei -35°C beträgt in CD_3CN 30:70, in CDCl_3 dagegen 90:10. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch Zugabe steigender Acetonitrilmengen zur Chloroformlösung (Abb. 5). Das Signal für die Z -Konformation in CD_3CN sollte überwiegend der acylischen Z' -Form zukommen (Kopplungskonstante $^3J_{\text{c},\text{H}-\text{NH}} = 6 \text{ Hz}$). Die starke Tieffeldverschiebung des Z -Signals beim Abkühlen in CDCl_3 führen wir demgemäß auf die Cyclisierung $Z' \rightarrow Z''$ und die damit verbundene Assoziation zurück. Unter der vereinfachten Annahme, dass die chemische Verschiebung der acylischen Z' -Form in CDCl_3 und in Acetonitril gleich sind, würde sich damit der Anteil der Z'' -Form aus dem Grad der Tieffeldverschiebung in CDCl_3 bestimmen lassen.

Eine quantitative Abschätzung der Tieffeldverschiebung ($\delta_Z = 7.8 \text{ ppm}$ = Grenzwert bei tiefer Temperatur in CDCl_3) ergibt thermodynamische Werte des Z', Z'' -Gleichgewichtes ($\Delta H^\circ \approx -6 \text{ kcal/mol}$ und $\Delta S^\circ = -23 \text{ Clausius}$), die überraschend gut mit den oben angeführten Daten für das Z, E -Gleichgewicht übereinstimmen. Damit zeigt sich, dass die $Z' \rightarrow Z''$ Cyclisierung den stabilisierenden Faktor für 2 bei tiefer Temperatur darstellt.

In Aceton-d₆ beobachtet man ein ähnliches Verhalten wie in Acetonitril-d₃. Bei successivem Zusatz von Deuteroacetan zur CDCl_3 -Lösung von t-BOC-Glycin bei $+10^\circ\text{C}$ wandern die NH-Signale aufeinander zu. Die Intensität des Z -NH-Signals

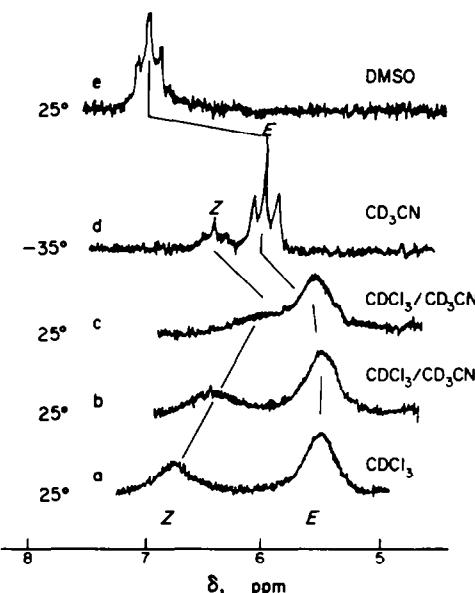


Abb. 5. $^1\text{H-NMR}$ -60 MHz-Spektrum von t-BOC-Glycin im Bereich von 4.5 bis 7.5 ppm gemessen in verschiedenen Lösungsmitteln (in der Reihenfolge a, b, c steigende Menge Acetonitril-d₃).

nimmt dabei ab. In reinem Aceton-d₆ findet man nur ein NH-Signal bei $\delta = 6.25 \text{ ppm}$, das sich beim Abkühlen nach tiefem Feld verschiebt (z.B. $\delta_{\text{NH}} = 7.13 \text{ bei } -90^\circ\text{C}$). Die Koexistenz beider Urethan Rotameren gibt sich durch die Aufspaltung des CH_2 -Dublett zu erkennen (Abb. 3). Eindeutig ist erkennbar, dass die *E*-Konformation überwiegt und dass die Kopplungskonstanten mit $^3J_{\text{c},\text{H}-\text{NH}} = 6.2 \text{ Hz}$ für beide Rotamere gleich sind. Wir schließen daraus, dass in Aceton keine Cyclisierung der Z' - zur Z'' -Konformation erfolgt. Damit wird auch indirekt das oben angeführte Argument 2 für die von uns vorgeschlagene Cyclisierung gestützt.

Aceton ist ein stärkerer H-Brücken-Acceptor als Acetonitril, wodurch sich die größere Tieffeldverschiebung des NH-Signals erklärt. Dieser Trend tritt beim stark basischen Dimethylsulfoxid-d₆ noch mehr in Erscheinung. Wiederum beobachtet man nur ein NH-Signal, das durch Zumischung von $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ zu der CDCl_3 -Lösung als zur *E*-Form gehörig identifiziert wurde. Die Z -Form lässt sich in diesem Lösungsmittel nicht nachweisen. Der hohe Schmelzpunkt des Solvens erlaubt allerdings auch keine Abkühlung unter $+6^\circ\text{C}$. Das NH-Signal ist in Dimethylsulfoxid-d₆ ($\delta = 7.0 \text{ ppm}$ bei Normaltemperatur ca 25°C) noch stärker verschoben als in Aceton-d₆. Dies wird zwangslässig durch die stärkere Wasserstoffbrückenbildung des Substrates mit dem Lösungsmittel erklärt.

Tieftemperatur-IR-Messungen sowie osmometrische Molekulargewichtsbestimmungen sollen weiteren Aufschluss über Assoziationen und Konzentrationseffekte geben.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die t-BOC-Derivate der Aminosäuren wurden nach der Methode von Schnabel²⁰ hergestellt.

Die NMR-Spektren wurden an den Geräten Bruker HX 90 und Varian T 60 gemessen. Die chemischen Verschiebungen sind auf internes TMS bezogen. Die Temperaturen wurden aus dem Linienabstand der Signale einer internen Methanolkapillare bestimmt.²¹

Danksagung—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für Sachbeihilfen. Herrn G. Soti danken wir für die Durchführung der Messungen am Varian-T 60-Gerät.

LITERATUR

- ¹R. Garner und W. B. Watkins, *Chem. Commun.* 386 (1969)
- ²C. M. Deber, F. A. Bovey, J. P. Carver und E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 6191 (1970)
- ³J. L. Dimicoli und M. Ptak, *Tetrahedron Letters* 2013 (1970)
- ⁴M. Branik, Diplomarbeit, Frankfurt (M), 1972; vorgetragen von einem von uns (H.K.) am 12.6.1973 an der Universität Zürich, ref. *Chimia* **27**, 444 (1973)
- ⁵G. Binsch, *Topics in Stereochem.* **3**, 97 (1968)
- ⁶H. Kessler, *Angew. Chem.* **82**, 237 (1970); *Angew. Chem. Internat. Edit.* **9**, 219 (1970)
- ⁷I. O. Sutherland, *Ann. Rep. NMR Spectroscopy* **4**, 71 (1972)
- ⁸T. H. Siddall und W. E. Stewart, *Chem. Rev.* **70**, 517 (1970)
- ⁹E. Lustig, W. R. Benson und N. Duy, *J. Org. Chem.* **32**, 851 (1967)
- ¹⁰C. H. Yoder, A. Komoryia, J. E. Kochanowski und F. H. Suydam, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 6515 (1971)
- ¹¹V. F. Bystrov, S. L. Portnova, V. I. Tsetlin, V. T. Ivanov und Yu. A. Ovchinnikov, *Tetrahedron* **25**, 493 (1969)
- ¹²J. Néel, *Pure a. Appl. Chem.* **31**, 201 (1972)
- ¹³S. Mizushima, T. Shimanouchi, M. Tsuboi und T. Arakawa, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5357 (1957)
- ¹⁴H. Paulsen und K. Todt, *Chem. Ber.* **100**, 3397 (1967)
- ¹⁵V. F. Bystrov, S. L. Portnova, T. A. Balashova, V. I. Tsetlin, V. T. Ivanov, P. V. Kostetzky und Yu. A. Ovchinnikov, *Tetrahedron Letters* 5283 (1969)
- ¹⁶G. N. Ramachandran, R. Chandrasekaran und K. D. Kopple, *Biopolymers* **10**, 2113 (1971)
- ¹⁷V. F. Bystrov, *Uspechi Khimii* **3**, 512 (1972)
- ¹⁸M. Barfield und H. L. Gearhart, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 641 (1973)
- ¹⁹M. Branik und H. Kessler, unveröffentlicht.
- ²⁰E. Schnabel, *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188 (1967)
- ²¹A. L. van Geet, *Analytical Chemistry* **42**, 679 (1970)