

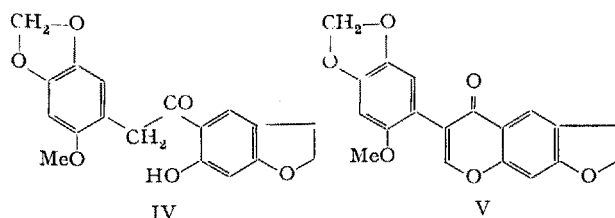
dihydrobenzo[b]furan⁴ with 2-methoxy-4,5-methylenedioxybenzyl cyanide⁵ yielded 6-hydroxy-5-(2-methoxy-4,5-methylenedioxyphenylacetyl)-2,3-dihydrobenzo[b]furan (IV, m.p. 153°~154°, IR 1650 cm⁻¹ (Nujol) (CO), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ); 239 (4.21), 284 (4.14), 330 (3.70). Found: C, 65.67; H, 4.95. C₁₈H₁₆O₆ requires: C, 65.85; H, 4.91%). Treatment of (IV) with ethyl orthoformate-pyridine-piperidine⁶ gave the dihydrocompound (V, m.p. 247°~248°, IR 1644 cm⁻¹ (Nujol) (γ -pyrone), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ); 241₁ (4.22), 251₁ (4.19), 310 (4.23). Found: C, 67.38; H, 4.47. C₁₉H₁₄O₆ requires: C, 67.45; H, 4.17%). On dehydrogenation with N-bromosuccinimide (V) afforded dehydroneotenone (III, m.p. 234°~235°, IR 1644, 1626, 1589, 1544, 1508 cm⁻¹ (Nujol), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ); 238 (4.59), 309 (4.20). Found: C, 68.00; H, 3.84. C₁₉H₁₂O₆ requires: C, 67.85; H, 3.60%) (lit., m.p. 240°~241°², m.p. 242° (correct)⁷, lit.², IR 1658, 1629, 1592, 1549, 1506 cm⁻¹ (chloroform solution),

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ); 239 (4.61), 308 (4.10)). (III) was readily converted into 6-hydroxy-5-(2-methoxy-4,5-methylenedioxyphenylacetyl)benzo[b]furan (m.p. 161°~162°) (lit.² m.p. 162°~163°) by alkaline hydrolysis, thus establishing the structure of (III).

Zusammenfassung. Aus 6-Hydroxy-5-(2-methoxy-4,5-methylenedioxyphenylacetyl)-2,3-dihydrobenzo[b]furan (IV) wurde nach VENKATARAMAN Dihydrofurano-isoflavin (V) hergestellt und zu Dehydroneotenon (III) dehydriert.

K. FUKUI and M. NAKAYAMA

Department of Chemistry, Faculty of Science,
University of Hiroshima (Japan), July 8, 1964.



⁴ J. S. H. DAVIES, P. A. MCCREA, W. L. NORRIS, and G. R. RAMAGE, *J. chem. Soc.* 1950, 3206.

⁵ K. FUKUI and M. NAKAYAMA, *J. chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sec. (Nippon Kagaku Zasshi)* 84, 606 (1963). - H. SUGINOME, *Tetrahedron Letters* No. 19, 16 (1960). - C. A. ANIRUDHAN and W. B. WHALLEY, *J. chem. Soc.* 1963, 6049.

⁶ V. R. SATHE and K. VENKATARAMAN, *Currant Sci. (India)* 18, 378 (1949).

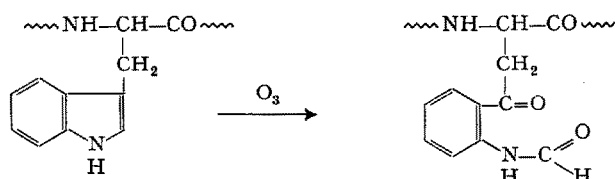
⁷ L. B. NORTON and R. HANSBERRY, *J. Am. chem. Soc.* 67, 1609 (1945).

Inattivazione della gramicidina dovuta alla conversione triptofano \rightarrow N'-Formilchinurenina

La gramicidina, isolata in forma cristallina da colture di *Bacillus brevis*, è costituita da una miscela di peptidi caratterizzati da un elevato contenuto in triptofano, dalla mancanza di residui N- e C-terminali, dalla notevole solubilità in alcool e dalla presenza di aminoacidi della serie D¹.

La composizione e la struttura primaria della frazione A, che costituisce la parte più cospicua della miscela peptidica (79%)², sono state recentemente determinate³.

Con ricerche sistematiche sull'ozonizzazione di peptidi e proteine⁴ è stato messo a punto un metodo per la modifica selettiva dei residui del triptofano a residui di N'-formilchinurenina, senza rottura di legami peptidici, come illustrato nello schema.



Alcune proteine biologicamente attive, hanno sopportato tale modifica conservando completamente la loro attività⁵.

L'elevato contenuto in triptofano (40.2%) della gramicidina e l'alta resa di conversione triptofano-N'-formil-

chinurenina, ottenuta con la sua ozonizzazione⁶ permettono di effettuare larghe e selettive variazioni sequenziali nei suoi peptidi costituenti, fornendo un'ottima occasione per lo studio di relazioni tra struttura ed attività biologica. Quest'ultima si esplica, come è noto, attraverso un'inibizione della crescita di numerosi organismi Gram positivi ed un effetto litico sui globuli rossi del sangue.

La gramicidina (N.B.C.) è stata ossidata in presenza di resorcinolo nelle condizioni già descritte⁶; nel prodotto finale di ossidazione la scomparsa del triptofano era completa.

La graduale conversione del triptofano ad N'-formilchinurenina è stata seguita per via spettrofotometrica a 315 m μ , come riportato in Figura 1.

Dalla soluzione di gramicidina in corso di ossidazione, sono stati opportunamente prelevati vari campioni, per le prove di attività antibatterica ed emolitica e per l'analisi del contenuto di chinurenina.

¹ G. BISERTE e M. DAUTREVAUX, *Exp. Ann. Bioch. Med.* 23s, 107 (1961).

² K. OKUDA, C. LIN e S. WINNICKT, *Nature* 195, 1067 (1962).

³ R. SARGES e B. WITKOP, *J. Am. chem. Soc.* 86, 1861 (1964).

⁴ A. PREVIERO, E. SCOFFONE, C. A. BENASSI e P. PAJETTA, *Gazz. chim. Ital.* 93, 849 (1963).

⁵ A. PREVIERO, M. A. COLETTI e L. GALZIGNA, *B.B. Res. Comm.* 16, 195 (1964).

⁶ A. PREVIERO e E. BORDIGNON, *Gazz. chim. ital.* 94, 630 (1964).

L'attività antibatterica è stata determinata con il metodo di SCHALES e SUTHON⁷ su *Streptococcus* (Gruppo D, Shingfield) e quella emolitica con il metodo di DIMICK⁸ su globuli rossi umani. La determinazione della chinurenina (Tabella) è stata eseguita su analizzatore automatico di aminoacidi secondo SPACKMAN et al.⁹.

D.O. a 315 m μ della gramicidina modificata sciolta in etanolo (mg 0.11/cm ³)	Chinurenina %
0.250	28.4
0.500	56.5
0.760	89.3

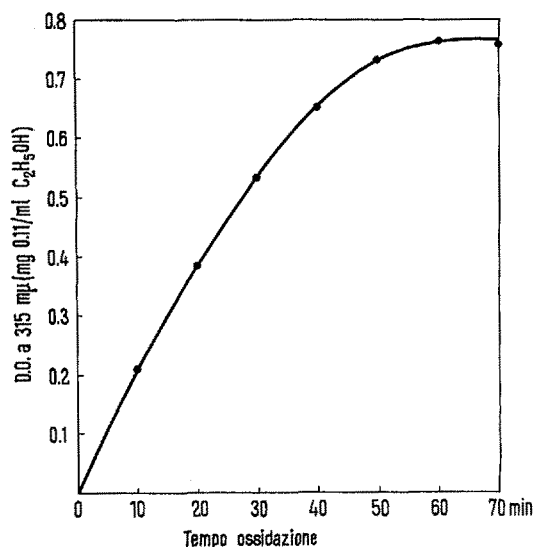


Fig. 1. Formazione di N'-formilchinurenina seguita spettrofotometricamente durante la ozonizzazione selettiva della gramicidina.

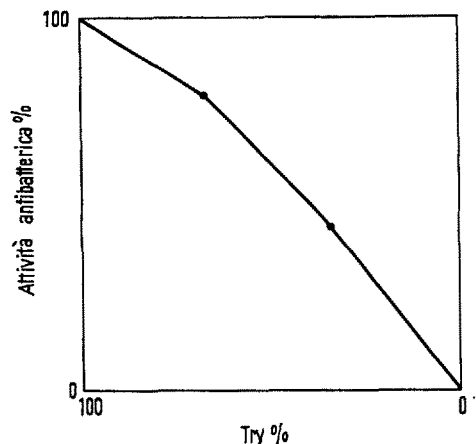


Fig. 2. Attività antibatterica della gramicidina in funzione della graduale conversione triptofano-N'-formilchinurenina.

I dati riportati in Figura 2 e Figura 3 mostrano che la completa sostituzione del triptofano con N'-formilchinurenina porta alla soppressione sia dell'attività antibatterica che dell'attività emolitica.

Poiché le attività antibatterica ed emolitica sono funzioni pressoché lineari del contenuto in triptofano (Figure 2 e 3) possiamo affermare che l'integrità dei nuclei indolici, in tutti i peptidi costituenti la gramicidina, è necessaria per il mantenimento delle sue funzioni biologiche.

I nostri dati sono in accordo con i risultati ottenuti nel trattamento della gramicidina con vari agenti che provocano diminuzione di proprietà batteriostatiche ed emolitiche¹⁰. La soppressione dell'attività biologica connessa con la scomparsa dei residui del triptofano è stata ottenuta anche mediante irradiazione della gramicidina a 2400-3000 Å¹¹ senza che per altro venisse chiarita la natura dei prodotti derivati dal triptofano scomparso.

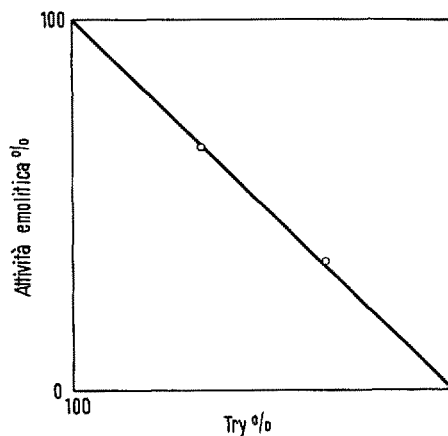


Fig. 3. Attività emolitica della gramicidina in funzione della graduale conversione triptofano-N'-formilchinurenina.

Summary. Treatment of gramicidin with ozone in formic acid leads to a tryptophan-N'-formylkynurenine conversion. Such a conversion causes a decrease of both bacteriostatic and haemolytic activities.

L. GALZIGNA, A. PREVIERO,
A. REGGIANI, e M. A. COLETTI

Istituto di Medicina del Lavoro dell'Università di Padova (Italia), il 10 luglio 1964.

⁷ O. SCHALES e A. M. SUTHON, Arch. Biochem. 11, 397 (1946).

⁸ K. P. DIMICK, J. biol. Chem. 146, 387 (1943).

⁹ D. H. SPACKMANN, W. H. STEIN e S. MOORE, Analyt. Chem. 30, 1190 (1957).

¹⁰ O. SCHALES e G. E. MANN, J. biol. Chem. 153, 357 (1947).

¹¹ R. SETLOW e B. DOYLE, Biochim. biophys. Acta 24, 27 (1957).