

105. Synthesen zyklischer Polypeptide. c-Tetraglycyl und c-Hexaglycyl. Über aktivierte Ester VII¹⁾

von R. Schwyzer, B. Iselin, W. Rittel und P. Sieber.

(14. III. 56.)

Die Zahl bekannter, biologisch hochaktiver Naturstoffe mit der Struktur zyklischer Polypeptide hat sich in den letzten Jahren stark vergrössert. Diese Verbindungsklasse lässt sich zweckmässig in zwei Gruppen unterteilen, welche sich chemisch prinzipiell voneinander unterscheiden. Die erste Gruppe umfasst Verbindungen wie z. B. Gramicidin S²⁾, Tyrocidin A³⁾, Tyrocidin B⁴⁾ und Bacitracin A⁵⁾ und ist durch ausschliesslich peptidartige Verknüpfung von Aminosäuren zum Ring gekennzeichnet. Zur zweiten Gruppe gehören Stoffe wie Mutterkornalkaloide⁶⁾, Ocytocin⁷⁾, Vasopressin⁸⁾, Phalloidin⁹⁾, Valinomycin¹⁰⁾ und Actinomycin C₃¹¹⁾, bei denen die Ringbausteine nicht nur peptidartig, sondern auch auf andere Weise miteinander verbunden sind (z. B. mit Disulfid- oder Ester-Bindungen). Die Verbindungen der ersten Gruppe können als homodete (gleichartig verknüpfte) Cyclopolypeptide, die der zweiten Gruppe als heterodete (ungleichartig verknüpfte) Cyclopolypeptide bezeichnet werden¹²⁾.

Mit zunehmender Kenntnis natürlicher Cyclopolypeptide steigt auch das Bedürfnis nach entsprechenden, verallgemeinerungsfähigen synthetischen Methoden. Besonders auf dem Gebiete der homodeten

¹⁾ Auszugsweise der Chemischen Gesellschaft zu Heidelberg (29. 11. 1955) und der Schweiz. Chemischen Gesellschaft (26. 2. 1956) vorgetragen. VI. Mitt. Helv. **39**, 57 (1956).

²⁾ R. Conden, A. Gordon, A. J. P. Martin & R. L. M. Synge, Biochem. J. **41**, 596 (1947).

³⁾ A. Paladini & L. C. Craig, J. Amer. chem. Soc. **76**, 688 (1954).

⁴⁾ T. P. King & L. C. Craig, J. Amer. chem. Soc. **77**, 6627 (1955).

⁵⁾ Vgl. J. R. Weisiger, W. Hausmann & L. C. Craig, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3123 (1955); I. M. Lockhart, E. P. Abraham & G. G. F. Newton, Biochem. J. **61**, 534 (1955).

⁶⁾ A. Stoll, A. Hofmann & Th. Petrzilka, Helv. **34**, 1545 (1951).

⁷⁾ V. du Vigneaud, Ch. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts & P. G. Katsoyannis, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3115 (1954); Schreibweise: E. Bricas & Cl. Fromageot, Advances in Protein Chemistry **8**, 1 (1953).

⁸⁾ V. du Vigneaud, D. T. Gish & P. G. Katsoyannis, J. Amer. chem. Soc. **76**, 4751 (1954).

⁹⁾ Th. Wieland & W. Schön, Liebigs Ann. Chem. **593**, 157 (1955).

¹⁰⁾ H. Brockmann, Angew. Chem. **67**, 751 (1955).

¹¹⁾ H. Brockmann, Angew. Chem. **68**, 66 (1956).

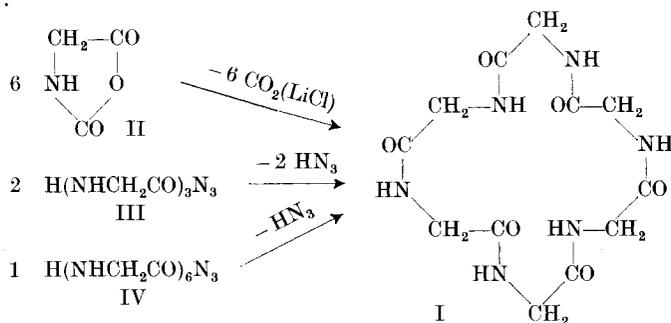
¹²⁾ Gebildet aus den griechischen Adv. *ὁμοίως* (gleichartig, in gleicher Weise) und *ἑτέροως* (ungleichartig) einerseits und dem Verbaladjektiv *δετός* (gebunden, verknüpft, von *δέω*, ich knüpfe, binde) andererseits. Englisch am besten durch homo- und heterodetisch wiederzugeben (von der oft üblichen Adjektiv-Form auf *-ικός*, entspr. deutsch homo- und heterodetisch).

Cyclopolypeptide ist noch ein spürbarer Mangel vorhanden. Das Problem besteht in seiner einfachsten Form darin, Amin-Ende und Carboxyl-Ende eines und desselben Polypeptides miteinander zu kondensieren. Dazu muss eine der beiden Gruppen in genügend reaktionsfähige Form gebracht werden, die andere muss frei vorliegen oder zumindest während der Reaktion von schützenden Substituenten befreit werden können.

Bisher sind fünf homodete Cyclopolypeptide synthetisch hergestellt worden. Zwei davon, die Cyclotripeptide *c*-Leucyl-glycyl-glycyl (D)¹³ und *c*-Phenylalanyl-glycyl-glycyl¹⁴, wurden nur als amorphe Produkte gefasst, und die Identität, mindestens der ersten Verbindung, erscheint fraglich. Das erste kristallisierte Cyclotripeptid *c*-Glycyl-alanyl-phenylalanyl erhielten *H. Brockmann, H. Tummes & F.-A. v. Metzsch*¹⁵ als Nebenprodukt bei der Polykondensation von Glycyl-DL-alanyl-DL-phenylalanin-methylester in Methanol-Ammoniak. Das Molekulargewicht der sehr schwerlöslichen Verbindung entsprach der Formulierung als Cyclotripeptid, dagegen wurde die Stereochemie nicht näher untersucht¹⁶).

Eindeutig identifizierte, kristallisierte Cyclopolypeptide erhielten erst *D. G. H. Ballard, C. H. Bamford & F. J. Weymouth*¹⁷ und *G. W. Kenner & J. M. Turner*¹⁸. *c*-Hexaglycyl (I) wurde zuerst als Nebenprodukt der (mit LiCl katalysierten) Polykondensation von *N*-Carboxyglycinanhydrid (II)¹⁷ und später ebenfalls durch Kondensation von Triglycin-azid (III)¹⁹ und von Hexaglycin-azid (IV)²⁰ in sehr verdünnt wässriger Lösung erhalten (Schema 1). Besonders elegant und eindeutig verlief die Synthese von

Schema 1.



c-Glycyl-leucyl-glycyl-leucyl-glycyl (L, L) (V)¹⁸. Aus dem *p*-Nitro-thiophenylester des *N*-Carbobenzyloxy-glycyl-leucyl-glycyl-leucyl-glycyls (VI) wurde mittels Bromwasserstoffsäure in Eisessig²¹ der Carbobenzyloxyrest abgespalten und der erhaltene Thioester

¹³) *R. A. Boissonnas & I. Schumann*, *Helv.* **35**, 2229 (1952).

¹⁴) *M. Winitz & J. S. Fruton*, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 3041 (1953).

¹⁵) *Natw.* **41**, 37 (1954).

¹⁶) Handelt es sich tatsächlich um ein Cyclotripeptid, so dürfte aus sterischen Gründen ein LL-DD-Racemat vorliegen (ohne DL-LD), wo in derselben Molekel nur Aminosäuren gleicher Konfiguration enthalten sind, vgl. ¹⁸), ²⁰).

¹⁷) *Proc. Roy. Soc. (London) A* **227**, 155 (1954—1955).

¹⁸) *Chemistry and Ind.* **1955**, 602.

¹⁹) *J. C. Sheehan & W. L. Richardson*, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 6329 (1954); **77**, 6391 (1955).

²⁰) *D. G. H. Ballard, C. H. Bamford & F. J. Weymouth*, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 6368 (1955).

²¹) *R. Schwyzer*, *Helv.* **37**, 647 (1954).

ist bei allen drei Verbindungen (infolge der H-Brücken?) aufgespalten; ihr Schwerpunkt liegt beim *c*-Hexaglycyl (1663 cm^{-1}) und beim *c*-Tetraglycyl (1669 cm^{-1}) im Bereiche ungespannter Lactame und etwas längerwellig als beim Diketopiperazin (1596 cm^{-1}). Die Amid-II-Absorption ist beim *c*-Tetra- und *c*-Hexaglycyl recht intensiv und ebenfalls aufgespalten (1565—1524 cm^{-1}).

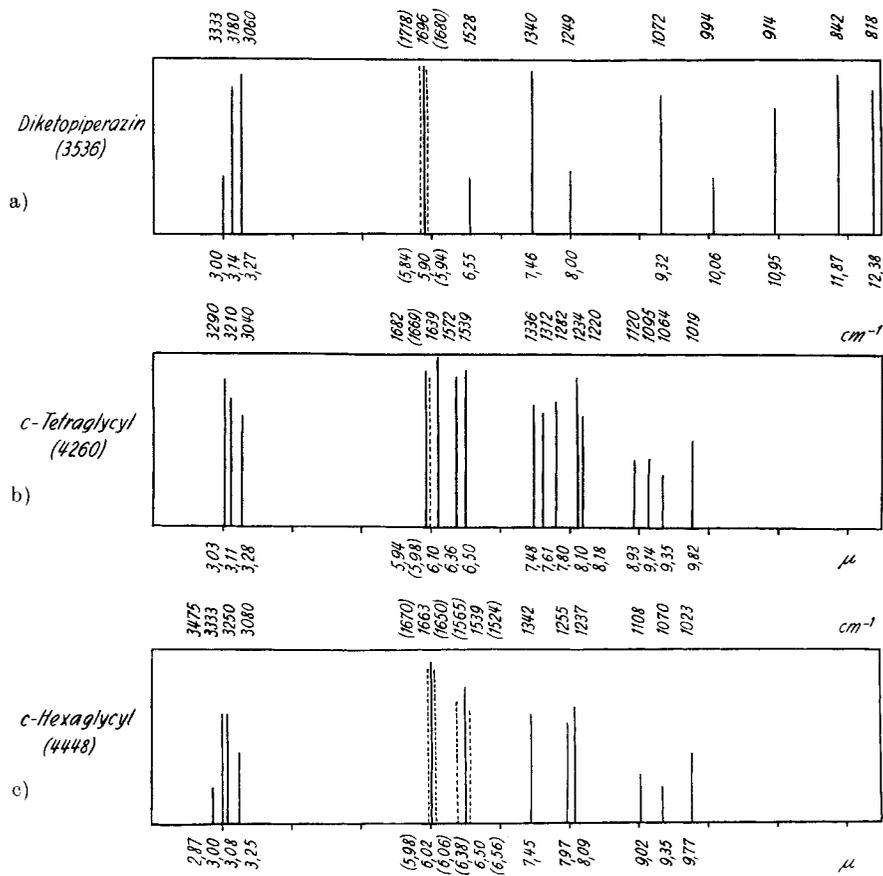
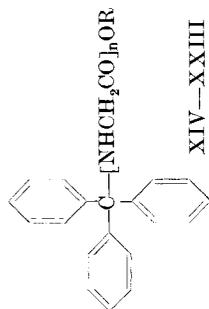


Fig. 2.

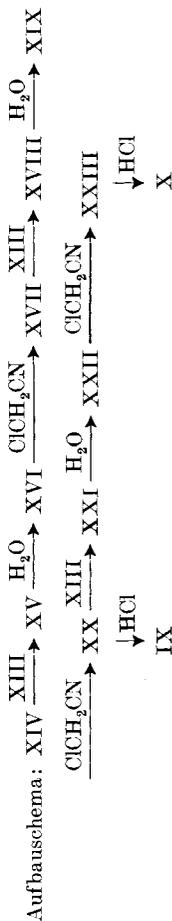
Die Ausgangsmaterialien Triglycin-cyanmethylester-hydrochlorid (IX) und Tetraglycin-cyanmethylester hydrochlorid (X) wurden aus *N*-Trityl-glycin-cyanmethylester (XIV) und Glycin-äthylester (XIII) nach der Cyanmethylester-Methode in der in Tab. 1 angegebenen Weise aufgebaut. Das Reaktionsprodukt dieser beiden Verbindungen, Trityl-diglycin-äthylester (XV), wurde nach einer bekannten Vorschrift verseift²⁵ und die Säure XVI zum Trityl-diglycin-cyanmethylester (XVII) umgesetzt. Durch Wiederholung der Reaktionsfolge wurden Trityl-triglycin-äthylester (XVIII), Trityl-triglycin (XIX) und

²⁵) G. Amiard, R. Heymès & L. Velluz, Bull. Soc. chim. France 1955, 191.

Tabelle 1.



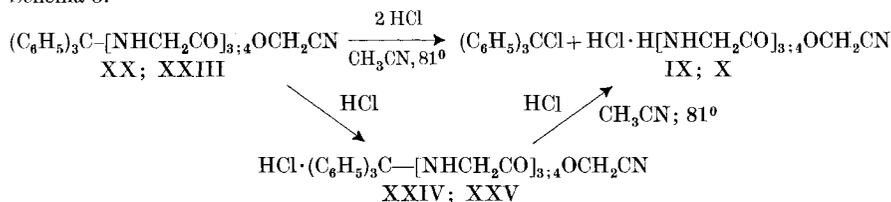
Nr.	n	R	Smp. °C	Krist. aus	Trocknen 2 h/10 ⁻³ mm bei	Berechnet %			Gefunden %		
						C	H	N	C	H	N
IX	3	-CH ₂ CN	159--160		110°	36,30	4,95	21,17	36,49	4,99	21,12
X	4	-CH ₂ CN	155,5--156,5		80°	37,33	5,01	21,77	37,53	5,07	21,69
XIV	1	-CH ₂ CN	90,5--91	MeOH	40°	77,50	5,66	7,86	77,25	5,55	7,71
XV ²⁵⁾	2	-C ₂ H ₅	159								
XVI ²⁵⁾	2	-H	168	Aceton-Äther							
XVII	2	-CH ₂ CN	157,5	Benzol	180°	72,62	5,61	10,16	72,52	5,62	10,33
XVIII	3	-C ₂ H ₅	185,5--186°	Äthanol	110°	70,57	6,36	9,14	70,63	6,36	9,04
XIX	3	H	115 und 205 (Zers.)								
XX	3	-CH ₂ CN	135,5--136°	Aceton-Äther	50°	68,92	5,57	11,91	68,93	5,67	12,12
XXI	4	-C ₂ H ₅	180,5° (Zers.)	Methanol-H ₂ O	100°	67,42	6,24	0:15,49	67,44	6,47	0:15,52
XXII	4	-H									
XXIII	4	-CH ₂ CN	172,5--173,5	Methanol	80°	66,02	5,54	13,28	66,13	5,58	13,29



Trityl-triglycin-cyanmethylester (XX) aufgebaut. Eine zweite Wiederholung ergab *via* Trityl-tetraglycin-äthylester (XXI) und Trityl-tetraglycin (XXII) den Trityl-tetraglycin-cyanmethylester (XXIII).

Die Abspaltung des Tritylrestes (aus XX und XXIII) wurde in siedendem Acetonitril mit etwas mehr als der berechneten Menge HCl vorgenommen (Schema 5). In weniger polaren Lösungsmitteln, wie z. B. Aceton und bei rascher Zugabe der Salzsäure bei Zimmertemperatur kristallisierten statt der gesuchten Reaktionsprodukte (IX) und (X) die Hydrochloride der Triphenylmethyl-derivate XXIV und XXV.

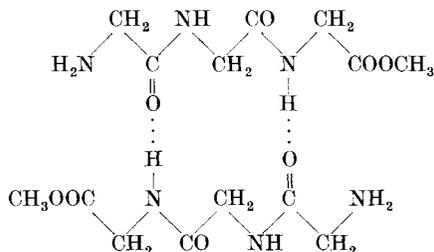
Schema 5.



Tetraglycyl-thioglykolsäure-hydrobromid (XI) wurde aus N-Carbobenzyloxy-tetraglycin²⁶⁾ analog Triglycyl-thioglykolsäure-hydrobromid (VIII)²¹⁾ hergestellt; auf die Reindarstellung der hygroskopischen Verbindung wurde verzichtet.

Interessant ist die bevorzugte Entstehung von *c*-Hexaglycyl aus aktivierten Derivaten des Triglycins an Stelle des immer noch unbekanntes *c*-Triglycyls. Schon *E. Fischer*²⁷⁾ hat den leicht erfolgenden Übergang von Triglycin-methylester in Hexaglycin-methylester unter Abspaltung von Methanol beobachtet. Niedrige Aktivierungsenergie ($\Delta E^\ddagger = 5,5$ Kal/Mol) und Aktivierungsentropie ($\Delta S^\ddagger = -63$ Clausius) der Reaktion in methanolischer Lösung haben zur Postulierung eines reaktionsfähigen Assoziates aus 2 Molekeln Triglycin-methylester geführt (Schema 6)²⁸⁾:

Schema 6.



Da die Reaktion kein *c*-Hexaglycyl ergibt, sondern nach „einseitiger“ Aminolyse stehen bleibt, muss angenommen werden, dass

²⁶⁾ *M. Bergmann, L. Zervas & J. S. Fruton, J. biol. Chemistry* **111**, 225 (1935).

²⁷⁾ *Ber. deutsch. chem. Ges.* **39**, 471 (1906).

²⁸⁾ *P. S. Rees, D. P. Tong & C. F. Young, J. chem. Soc.* **1954**, 662.

der entstandene Hexaglycin-methylester sofort in einen Zustand übergeht, in welchem die weitere Ringschlussreaktion verhindert ist. In Übereinstimmung damit liess sich nach eigenen Beobachtungen Triglycin-methylester-hydrochlorid in Pyridin nicht zu c-Hexaglycyl umsetzen; ebenso scheint Hexaglycin-methylester nicht zu zyklisieren²⁹⁾, während ein stärker aktiviertes Derivat, Hexaglycin-azid, leicht in c-Hexaglycyl übergeführt werden konnte²⁰⁾. Ob für diese Sachlage eine besondere Unstabilität des c-Triglycyls mit zwangsläufig 3-cis-Amidbindungen³⁰⁾ neben den erwähnten kinetischen Einflüssen massgebend ist, lässt sich zur Zeit nicht entscheiden. Die Befunde von *Brockmann*¹⁵⁾ über die Bildung des c-Tripeptides c-Glycyl-alanyl-phenylalanyl sowie von *Winitz & Fruton*¹⁴⁾ über das amorphe c-Phenylalanyl-glycyl-glycyl legen die Vermutung nahe, die Reaktionsweise der Triglycinderivate bilde eine Ausnahme.

Eine ähnliche Ausnahmestellung scheinen die Derivate des Triglycins auch in der Reihe der höheren Glycinpeptide einzunehmen, da Tetraglycin-methylester im Unterschied zu Triglycin-methylester auch unter verschärften Bedingungen bekanntlich nicht mit sich selbst kondensiert, sondern schliesslich in anderer Weise³¹⁾ reagiert; bei der Zyklisierung von Tetraglycin-cyanmethylester und von Tetraglycylthioglykolsäure entsteht demgemäss c-Tetraglycyl und nicht c-Octaglycyl. Modelle des c-Tetraglycyls lassen sich nicht nur mit cis-Amidbindungen aufbauen, sondern mit bis zu vier trans-Amidbindungen. In diesem letzten Falle könnte die Molekel in der gefalteten Form mit intramolekularen Wasserstoffbrücken vorliegen, ähnlich wie für Gramicidin S postuliert³²⁾ (siehe Fig. 3).

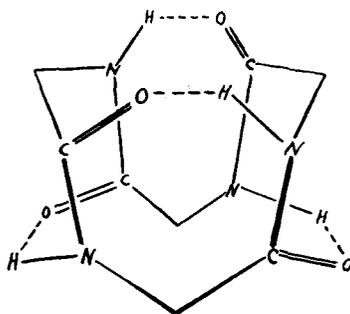


Fig. 3.

trans-Konformation von c-Tetraglycyl

²⁹⁾ *E. Pacsu*, *Nature* **144**, 551 (1939).

³⁰⁾ *L. Pauling & R. B. Corey*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (New York)* **38**, 86 (1952); *J. T. Edward*, *Research* **85**, 38 (1955).

³¹⁾ Bildung von N-Methyl- und N-Dimethyl-glycyl-triglycin: *L. A. Ae. Sluyterman & H. J. Veenendaal*, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **71**, 137 (1952); vgl. auch *H. Brockmann & H. Musso*, *Chem. Ber.* **87**, 581 (1954); *H. N. Rydon & P. W. G. Smith*, *J. chem. Soc.* **1955**, 2542.

³²⁾ *N. B. Abbott & E. J. Ambrose*, *Proc. Roy. Soc. (London)* **219** A, 17 (1955).

Experimenteller Teil.

Carbobenzoxy-tetraglycin-methylester: 3,2 g Diglycyl-glycin-methylesterhydrochlorid³³) und 3,7 g Carbobenzoxy-glycin-cyanmethylester³⁴) wurden in 50 ml absolutes Tetrahydro-furan unter Röhren eingetragen und mit 5 ml Triäthylamin und 10 Tropfen Eisessig versetzt. Nach 24 Std. bei Zimmertemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert. 4,2 g (80%) farblose Kristalle, Smp. 214,5°. Trocknen 2 Std. bei 110°/10⁻³ mm Hg.

$C_{17}H_{22}O_7N_4$	Ber. C 51,77	H 5,62	N 14,21%
	Gef. ,, 51,89	,, 5,80	,, 14,33%

Carbobenzoxy-tetraglycin: 2,8 g Carbobenzoxy-tetraglycin-methylester wurden in ein Gemisch von 20 ml Methanol, 12 ml Wasser und 8,4 ml 1-n. NaOH eingetragen und bei Zimmertemperatur gerührt. Nach 10 Min. hatte sich der Ester fast vollständig gelöst und der pH-Wert der Lösung war auf 8,5 gesunken. Nach insgesamt 15 Min. wurde die Lösung filtriert und im Vakuum vom Methanol befreit. Mit 15 ml 1-n. HCl wurde die Säure in kristallisierter Form gefällt und anschliessend mit Wasser, Aceton und Äther gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum über festem NaOH wog die kristallisierte, farblose Substanz 1,94 g (74%).

Carbobenzoxy-tetraglycyl-thioglykolsäure: 250 mg Carbobenzoxy-tetraglycin wurden in 5 ml Dimethylformamid unter Zugabe von 80 mg Triäthylamin gelöst. Bei -10° wurden 80 mg Chlorameisensäure-äthylester zugegeben; nach 10 Min. wurde die Lösung in ein Gemisch von 200 mg Triäthylamin und 100 mg Thioglykolsäure in 2 ml Dimethylformamid einfiltriert. Nach ½ Std. bei Zimmertemperatur wurde die klare Lösung in 100 ml 2-n. HCl eingegossen, wobei das farblose Reaktionsprodukt in Form kleiner Blättchen auskristallisierte. Aus Eisessig kristallisierte die Carbobenzoxy-tetraglycyl-thioglykolsäure als farblose Körner, die eine „verzögerte“ Reaktion mit Nitroprussidnatrium in Ammoniak zeigten. 160 mg (54%) analysenreine Substanz. Trocknen 2 Std. bei 110°/10⁻³ mm Hg.

$C_{18}H_{22}O_8N_4S$	Ber. C 47,57	H 4,88	N 12,33%
	Gef. ,, 47,75	,, 4,75	,, 12,31%

Trityl-glycin-cyanmethylester (XIV): 50 g Trityl-glycin²⁵) wurden bei 0° mit einer Mischung von 69 ml Triäthylamin und 43 ml Chloracetonitril übergossen und unter Umrühren gelöst. Nun wurde die Lösung auf 40° erwärmt und durch zeitweilige Kühlung dafür gesorgt, dass die Temperatur infolge der Reaktionswärme nicht über 45° stieg. Nach 40 Min. war die Umsetzung fast fertig und das breiige Reaktionsgemisch wurde weitere 2 Std. auf 45° erwärmt. Der aktivierte Ester wurde in Essigester aufgenommen und mit Wasser, mit Zitronensäurelösung, mit Natriumhydrogencarbonatlösung und mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde der Essigester im Vakuum abdestilliert und der Rückstand aus 150 ml Äther durch Zugabe von 150 ml Petroläther umkristallisiert. 54,5 g prismatische, schwere Kristalle (98%).

Trityl-diglycin-äthylester (XV)²⁵): 20 g Trityl-glycin-cyanmethylester, 20 ml Triäthylamin, 6 Tropfen Eisessig und 20 g Glycinäthylester-hydrochlorid wurden in 80 ml Tetrahydro-furan eingetragen und ½ Std. auf 60° erwärmt. Die Mischung wurde in 500 ml Wasser eingegossen, das Reaktionsprodukt abgenutscht, gründlich mit Wasser gewaschen und über NaOH im Vakuum getrocknet. 22,3 g farblose Kristalle (99%).

Trityl-diglycin (XVI)²⁵): Trityl-diglycin-äthylester wurde nach den Angaben von *Amiard, Heymès & Velluz*²⁵) verseift. Ausbeute quantitativ.

Trityl-diglycin-cyanmethylester (XVII): 31,9 g Trityl-diglycin wurden mit 18 ml Triäthylamin und 13 g Chloracetonitril, wie für Trityl-glycin-cyanmethylester beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet, 34 g verfilzte Kristallnadeln (96%).

Trityl-triglycin-äthylester (XVIII): 24,8 g Trityl-diglycin-cyanmethylester, 12,6 g Glycin-äthylester-hydrochlorid, 20 ml Triäthylamin und 0,4 ml Eisessig wurden in

³³) *E. Fischer*, Ber. deutsch. chem. Ges. **39**, 453 (1906).

³⁴) *R. Schwyzer, M. Feurer, B. Iselin & H. Kägi*, Helv. **38**, 80 (1955).

75 ml Tetrahydro-furan miteinander zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet wie bei der Darstellung von Trityl-diglycin-äthylester beschrieben. 24,7 g farblose Kristallnadeln (90%).

Trityl-triglycin (XIX): 22,7 g Trityl-triglycin-äthylester wurden in 200 ml Methanol aufgeschlämmt und mit 30 ml 2-n. NaOH versetzt. Nach 1 $\frac{1}{4}$ Std. war eine klare Lösung entstanden, welche mit Wasser verdünnt und im Vakuum von Methanol befreit wurde. Die Säure wurde mit 4,5 ml Eisessig ausgefällt, abgenutscht und gründlich mit Wasser gewaschen. 20,6 g farblose Kristalle (97%); die Verbindung schmilzt bei 114–115°, wird bei ca. 138° wieder fest und schmilzt endgültig u. Zers. bei 205°.

Trityl-triglycin-cyanmethylester (XX): 5,4 g Trityl-triglycin wurden wie für Trityl-glycin beschrieben mit 3,5 ml Triäthylamin und 2,84 g Chloracetonitril umgesetzt. 4,92 g (84%) farblose Kristalle.

Triglycin-cyanmethylester-hydrochlorid (IX): 5,07 g Trityl-triglycin-cyanmethylester wurden in 30 ml siedendem Acetonitril gelöst und in der Siedehitze mit 28 ml 1,2-n. HCl in Essigester versetzt. Sofort begann die Kristallisation des Reaktionsproduktes. Nach 15 Min. wurde dieses abgenutscht und mit Essigester und Äther gewaschen. 2,75 g (96%) farblose, analysenreine Kristalle.

Trityl-tetraglycin-äthylester (XXI): 9,5 g Trityl-triglycin-cyanmethylester, 5 g Glycin-äthylester-hydrochlorid, 7 ml Triäthylamin und 0,1 ml Eisessig wurden 2 $\frac{3}{4}$ Std. in 40 ml Tetrahydro-furan auf 60° erhitzt. Dann wurde so viel Wasser zugegeben, dass eine klare Lösung entstand, und diese zur Verseifung noch unumgesetzten Cyanmethylesters 1 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Reaktionsgemisch wurde langsam in 250 ml Wasser eingegossen, wobei der Trityl-tetraglycin-äthylester auskristallisierte. 8,4 g (79%; unter Berücksichtigung von 1,17 g Trityl-triglycin, welche durch Ansäuern aus der Mutterlauge zurückgewonnen wurden: 92%).

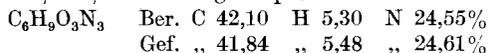
Trityl-tetraglycin (XXII): 8,4 g Trityl-tetraglycin-äthylester wurden in 50 ml Dioxan aufgeschlämmt und mit 10 ml 2-n. NaOH versetzt, worauf sofort eine klare Lösung entstand. Diese wurde 1 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt, mit etwas Wasser verdünnt und i. V. von Dioxan befreit. Die verdünnte, wässrige Lösung wurde mit Essigsäure angesäuert und das kristallisierte Trityl-tetraglycin gesammelt, 7,66 g (96%).

Trityl-tetraglycin-cyanmethylester (XXIII): 2,0 g Trityl-tetraglycin, 1,13 ml Triäthylamin und 0,93 g Chloracetonitril wurden zusammen 4 $\frac{1}{2}$ Std. auf 57–58° erwärmt. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde der Rückstand aus Essigester-Äther umkristallisiert, 1,7 g (79%).

Tetraglycin-cyanmethylester-hydrochlorid (X): 1,27 g Trityl-tetraglycin-cyanmethylester wurden in 5 ml warmem Acetonitril gelöst und langsam in 3,5 ml siedendes 2,08-n. HCl in Essigester eingetrofft. Zum Schluss wurde mit 3 ml Acetonitril nachgespült und die Mischung 15 Min. gekocht. Zuerst schied sich ein Harz aus, welches alsbald kristallisierte. 0,76 g farblose analysenreine Kristalle (98%).

c-Hexaglycyl (I): a) 1,5 g Triglycyl-thioglykolsäure-hydrobromid²¹) wurden in 15 ml Dimethylformamid gelöst, mit 1 Tropfen Eisessig versetzt und die Lösung während 10 Std. in 400 ml Pyridin (Rühren, 60°) eingetrofft. Dazu hat sich untenstehende einfache Apparatur (Fig. 4) bestens bewährt. Die Lösung befindet sich in einer Pipette mit Ausflussrohr von ca. 1 mm lichter Weite. Die Austropfgeschwindigkeit wird durch Einlassen von Luft durch das Nadelventil via Niveaurohr reguliert.

Nach einiger Zeit begann das Reaktionsprodukt auszukristallisieren (neben amorphen Anteilen). Die Reaktionsmischung wurde nach Beendigung des Eintropfens noch 1 Std. weiter erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde abgenutscht, mit Pyridin, Aceton und Äther gewaschen und getrocknet. Es wurde in ca. 30 ml siedendem Wasser gelöst und von unlöslichen Bestandteilen filtriert. Mittels zwei kleinen Kolonnen eines Anionenaustauschers (Merck III, OH-Form, 1 g) und eines Kationenaustauschers (Merck I, H⁺-Form, 1 g) wurden saure und basische Begleitstoffe entfernt. Aus dem klaren Filtrat kristallisieren nach Einengen auf ein kleines Volumen 515 mg millimeterlange, schmale Prismen (69%). Trocknen 2 Std./110°/10⁻³ mm Hg. Smp. > 300° u. Zers.



Nach IR.-Spektrum (Nujol) identisch mit der sub b) erhaltenen Verbindung.

b) Durch Eintropfen einer Lösung von 200 mg Triglycin-cyanmethylester-hydrochlorid (IX) in 4 ml Dimethylformamid (+ 2 Tropfen Eisessig) unter Rühren in 40 ml heisses Pyridin (95°) während 5 Std. und weiterer Aufarbeitung wie sub a) beschrieben, wurden 47 mg analysenreine Substanz erhalten. IR.-Spektrum vgl. Fig. 2.

$C_6H_9O_3N_3$	Ber. C	42,10	H	5,30	N	24,55%
	Gef. „	41,87	„	5,57	„	24,49%

Partielle Verseifung einer kleinen Probe mit $n/15$ LiOH 1 Std. bei 100°¹⁷⁾, Neutralisation mit 0,1-n. HCl und Papierchromatographie (aufsteigend) mit Phenol-Wasser (75:25) ergab Flecken von Glycin + Diglycin, Tri-, Tetra-, Penta- und Hexaglycin (Rf-Werte: 0,41; 0,47; 0,54; 0,61; 0,65). Molekulargewicht: Gef. 322, Ber. 342.

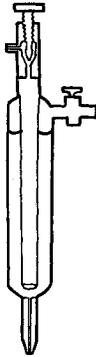


Fig. 4.

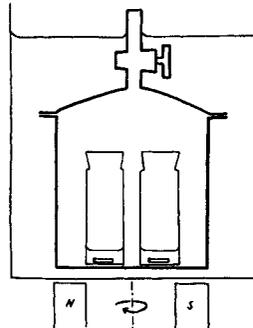


Fig. 5.

Beim Ersatz des Pyridins durch andere basische Kondensationsmittel unter sonst gleichen Bedingungen wurden folgende Resultate erzielt: Tributylamin 23% c-Hexaglycyl; Collidin 5% c-Hexaglycyl + viel höher polymere Substanz; Essigester-Triäthylamin (siedend) 5% c-Hexaglycyl + viel höher polymere Substanz; Dimethylformamid + schwach basischer Anionenaustauscher „Merck II“ 14% c-Hexaglycyl + viel höher polymere Substanz.

c-Tetraglycyl (XII): a) Eine Lösung von 510 mg Tetraglycin-cyanmethylester-hydrochlorid (X) in 10 ml Dimethylformamid + 5 Tropfen Eisessig wurde in 5 Std. unter Rühren in 100 ml Pyridin bei 95° eingetropt und das Reaktionsgemisch weitere 12 Std. erhitzt. Das Pyridin wurde i. V. verdampft, der Rückstand mit siedendem Wasser ausgezogen und die Lösung durch eine Glassinternutsche und je 1 g Ionenaustauscher „Merck I und III“ filtriert. Nach Einengen kristallisierten 45 mg (12,5%) c-Tetraglycyl (Fig. 1). Trocknen 4 Std./100°/10⁻³ mm Hg.

$C_8H_{12}O_4N_4$	Ber. C	42,10	H	5,30	N	24,55%
	Gef. „	42,22	„	5,52	„	24,85%

Molekulargewichtsbestimmung: 4,11 mg c-Tetraglycyl und 2,63 mg Diketopiperazin wurden je in ein kleines Präparatengläschen, das zur Wägung mit einem Polyäthylen-Stopfen verschlossen werden konnte und einen kleinen Rührer (Eisendraht in Glas) enthielt, eingewogen. Die Substanzen wurden in reiner Trifluoressigsäure gelöst (je ca. 0,5 ml) und die Einstellung des Gleichgewichtes in einem kleinen Vakuumexsikkator (∅ 5 cm) unter magnetischem Rühren im Thermostatbad bei 25° vorgenommen (s. Fig. 5). Der Konzentrationsausgleich war gewöhnlich nach 15—24 Std. erreicht. Durch Wägen der verschlossenen Gläschen wurde die Konzentration der Diketopiperazininlösung bestimmt (Einwaage E_1 , Lösungsgewicht L_1 , und Molgewicht M_1) und daraus und aus dem Gewicht der c-Tetraglycyl-Lösung (Einwaage E_2 , Lösungsgewicht L_2) das Molekulargewicht (M_2) bestimmt.

$$M_2 = L_1 \cdot M_1 \cdot E_2 / E_1 \cdot L_2.$$

8 Bestimmungen ergaben als Mittelwert $226,8 \pm 19$ (ber. 228,2). Nach Verdampfen des Lösungsmittels konnte das c-Tetraglycyl durch Kristallisation aus Wasser unverändert zurückgewonnen werden.

Partielle Verseifung mit $n/15$ LiOH ergab Glycin + Diglycin, Triglycin und viel Tetraglycin (Papierchromatographie, Phenol-Wasser 75:25, Rf-Werte 0,41; 0,47; 0,55).

b) 360 mg N-Carbobenzyloxy-tetraglycyl-thioglykolsäure wurden in 5 ml Eisessig-HBr (ca. 1-n.) gelöst und 1 Std. bei $30-40^{\circ}$ aufbewahrt. Nach Beendigung der CO_2 -Entwicklung wurde das Lösungsmittel i. V. verdampft, der Rückstand mit Äther gewaschen und kurz bei 60° i. V. getrocknet. Er wurde in 8 ml Dimethylformamid gelöst, filtriert und während 4 Std. unter Rühren in 100 ml Pyridin + 0,1 ml Eisessig bei 95° eingetroppt. Zum Schluss wurde noch 1 Std. weiter erhitzt. Aufarbeitung wie sub a): 23 mg (12,7%) kristallisierte Substanz, identisch mit dem sub a) erhaltenen c-Tetraglycyl (IR.).

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn Dr. H. Gysel durchgeführt. Die IR.-Spektren verdanken wir den Herren Drs. E. Ganz und H. Labhart in unseren physikalischen Laboratorien.

SUMMARY.

Naturally occurring cyclo-polypeptides may be subdivided into two groups, according to whether the rings contain only peptide linkages or not. The adjectives homodetic and heterodetic are proposed to differentiate these two types of cyclo-polypeptides.

c-Tetraglycyl has been prepared for the first time using activated O- and S-esters of tetraglycin. This synthesis, as well as the synthesis of c-hexaglycyl, demonstrates the special usefulness of the cyanomethyl ester method for the cyclisation of peptides.

Forschungslaboratorien der *CIBA-Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.

106. Zur Mikrotitration organischer Verbindungen.

Teil IV: Mikrobürette konstanter Ausflussgeschwindigkeit für automatische Titrationsanlagen

von W. Simon.

(14. III. 56.)

Die zunehmende Wichtigkeit der Mikrotitration in der qualitativen und quantitativen organischen Analyse¹⁾ hat zur Folge, dass ein Bedürfnis zur weitgehenden Automatisierung des Titrationsprozesses besteht. In der vorliegenden Arbeit soll über eine Bürette berichtet

¹⁾ T. V. Parke & W. W. Davis, *Anal. Chemistry* **26**, 642 (1954); J. A. Riddick, *ibid.* **26**, 77 (1954).