

und vermindertem Druck zur Trockne verdampft und die Eindampfrückstände zur Entfernung von Ammoniumacetat 8 Std. bei 50°/0,01 mm Hg getrocknet. Die Fraktionen 0-6 enthalten insgesamt 30 mg Substanz (Maximum bei Fraktion 1,  $G = 0,051$ ); die Fraktionen 7-30 enthalten keine wägbaren Anteile. Die experimentell gefundene Gewichtsverteilungskurve in den Fraktionen 0-6 stimmt mit der theoretisch berechneten überein. Eine Probe der Substanz aus Fraktion 1 zeigt im oben angegebenen Test von *Peart*<sup>9)</sup> eine fünfmal stärkere Wirksamkeit als Noradrenalin. Das so gereinigte L-Asparaginyll-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin wird als farbloses Pulver erhalten (Acetat?); Smp. (nach Trocknen im Hochvakuum) 195—205<sup>0,19)</sup> (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -44^{\circ} \pm 6^{\circ}$  ( $c = 0,558$  in Wasser). Im Papierchromatogramm zeigt es in den Systemen Äthanol-n-Butanol-H<sub>2</sub>O-Diäthylamin (100:100:50:20), n-Butanol-Aceton-H<sub>2</sub>O-Diäthylamin (100:100:50:20), Äthanol-n-Butanol-H<sub>2</sub>O (100:100:50), n-Butanol-Eisessig-H<sub>2</sub>O (100:10, ges. mit H<sub>2</sub>O) und sek. Butanol-3-proz. NH<sub>3</sub> (120:44) auf *Whatman*-Papier Nr. 1 die Rf-Werte 0,37; 0,31; 0,18; 0,15 und 0,24. Die Flecken zeigen die *Pauly*-Reaktion: auf dem Papier sind keine ninhydrinpositiven Substanzen nachweisbar.

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn D. H. *Gysel* ausgeführt.

#### SUMMARY.

The synthesis of Ileu<sup>5</sup>-hypertensin II-Asp- $\beta$ -amide, L-Asparaginyll-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanine, is described. The highly purified octapeptide is 5 to 10 times as active as noradrenaline on the blood pressure of the rat in the experimental set-up of *Peart*<sup>9)</sup>, and 2 to 4 times as active as Val<sup>5</sup>-hypertensin I, isolated from bovine plasma<sup>3)</sup>.

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

<sup>19)</sup> Auf einem *Fisher-Johns*-Smp.-Apparat bestimmt.

## 82. Die Synthese von Gramacidin S

von R. Schwyzer<sup>1)</sup> und P. Sieber.

(9. III. 57.)

Gramacidin S wird in reiner, kristallisierter Form als Dihydrochlorid aus den Kulturfiltraten von *Bacillus brevis* var. *Gause-Brazhnikova* gewonnen<sup>2)</sup>. Es ist das erste cyclische Peptid-Antibiotikum, dessen Konstitution mit einigermaßen grosser Sicherheit aufgeklärt werden konnte. Nach den Untersuchungen von R. L. M. *Synge*<sup>3)</sup>, F. *Sanger*<sup>4)</sup>,

<sup>1)</sup> Diese Arbeit ist meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P. *Karrer*, in Dankbarkeit gewidmet.

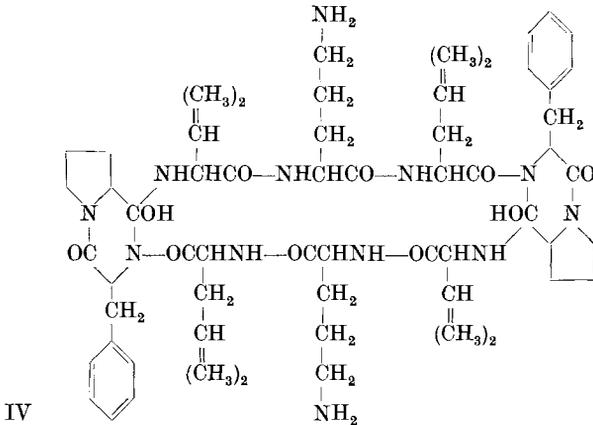
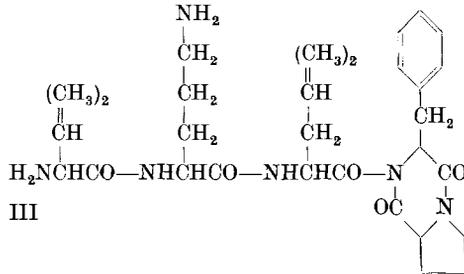
<sup>2)</sup> G. F. *Gause* & M. G. *Brazhnikova*, *Lancet* **247**, 715 (1944).

<sup>3)</sup> *Biochem. J.* **39**, 363 (1945).

<sup>4)</sup> *Biochem. J.* **40**, 261 (1946).



N<sup>6</sup>-tosyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin<sup>10</sup>) beweist die Richtigkeit der von *R. L. M. Synge* und Kollegen abgeleiteten Struktur eines cyclischen Decapeptides und schliesst insbesondere Struktur II oder diejenige eines homodet cyclischen Pentapeptides aus, da unter den angewandten Bedingungen eine Spaltung der Peptidkette recht unwahrscheinlich erscheint.



Eine Synthese wie diejenige des Gramicidin S stellt im Wesentlichen zwei Aufgaben: die erste besteht im Aufbau eines offenkettigen Polypeptides mit der richtigen Reihenfolge der Aminosäuren und mit geeigneten Schutzgruppen, die zweite ist die eigentliche Cyclisierung, die Verknüpfung von Carboxyl- und Amino-Ende des Peptides, worüber erst sehr wenige Erfahrungen vorliegen<sup>11</sup>).

Der Aufbau von Peptiden mit der Aminosäure-Reihenfolge des Gramicidin S war schon lange Gegenstand eingehender Untersuchungen. Von *Harris & Work*<sup>12</sup>) waren die Pentapeptid-Derivate

<sup>10</sup>) *R. Schwyzer & P. Sieber*, *Angew. Chem.* **68**, 518 (1956).

<sup>11</sup>) *R. Schwyzer, B. Iselin, W. Rittel & P. Sieber*, *Helv.* **39**, 872 (1956).

<sup>12</sup>) *J. I. Harris & T. S. Work*, *Nature* **161**, 804 (1948); *Biochem. J.* **46**, 196, 582 (1950).

p-Tos·Val-Orn-Leu-Phe-Pro·OCH<sub>3</sub> (L-L-L-D-L)<sup>13</sup>, p-Tos·Val-Orn-Leu-Phe-Pro·NH<sub>2</sub> (L-L-L-D-L) und H·Val-Orn-Leu-Phe-Pro·OCH<sub>3</sub>, 2HCl (L-L-L-D-L) unter Verwendung von Säureaziden hergestellt worden. Die von diesen Autoren angegebene Reihenfolge der Verknüpfung von Aminosäuren und Peptiden zum Pentapeptid ist von allen nachfolgenden Bearbeitern des Gebietes befolgt worden und geht im Prinzip aus Schema 1, Reaktionsstufen A bis G, hervor. Aus den Aminosäuren Nr. 1–4 wurden zwei Dipeptide (1–2, 3–4) aufgebaut, letzteres wurde mit Aminosäure Nr. 5 zum Tripeptid (3–5) kondensiert, worauf die Verknüpfung des Dipeptides (1–2) mit dem Tripeptid (3–5) erfolgte.

Schumann & Boissonnas<sup>14</sup>) geben an, nach ihrer Methode der gemischten Anhydride unter Verwendung von Phtaloyl als Schutzgruppe (am Valinstickstoff) H·Val-Z·Orn-Leu-Phe-Pro·OH (L-L-L-D-L) erhalten zu haben. Offenbar war aber bereits das Tripeptid-Zwischenprodukt H·Leu-Phe-Pro·OCH<sub>3</sub>, HCl ein Gemisch von Diastereomeren, da die Verbindung nicht kristallisiert werden konnte (vgl. dazu<sup>15</sup>)).

In einer experimentell ausserordentlich sauberen Arbeit haben Erlanger, Sachs & Brand<sup>15</sup>) folgende, stereochemisch anscheinend einheitliche Penta- und Dekapeptid-derivate hergestellt:

V	Z·Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro·OCH <sub>3</sub>	(L-L-L-D-L)
VI	H·Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro·OCH <sub>3</sub> , HCl	(L-L-L-D-L)
VII	H·Val-Orn-Leu-Phe-Pro·OH, 2HCl	(L-L-L-D-L)
VIII	Z·(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro) <sub>2</sub> ·OCH <sub>3</sub>	(L-L-L-D-L) <sub>2</sub>
IX	H·(Val-Orn-Leu-Phe-Pro) <sub>2</sub> ·OH, 3HCl	(L-L-L-D-L) <sub>2</sub>
X	H·(Val-Orn-Leu-Phe-Pro) <sub>2</sub> ·OH, 3HCl	(L-L-L-D-L) <sub>2</sub>

Als eigentliches Ausgangsmaterial für unsere Synthese diente das Pentapeptid-methylester-hydrochlorid VI. Es wurde auf ähnlichem Wege wie von den amerikanischen Autoren, aber unter Verwendung von aktivierten Estern<sup>16</sup>) zur Herstellung der Di- und Tripeptid-Derivate, aufgebaut (Schema 1, Reaktionsstufen A bis H).

Carbobenzoxy-L-leucin-p-nitrophenylester<sup>17</sup>) (A 3) wurde mit D-Phenylalanin-äthylester (A 4) zum Carbobenzoxy-L-leucyl-D-phenylalanin-äthylester (B 3–4) kondensiert. Alkalische Verseifung ergab Carbobenzoxy-L-leucyl-D-phenylalanin (C 3–4)<sup>15</sup>), welches in den

<sup>13</sup>) Um das Ausschreiben der Namen längerer Peptide zu vermeiden, werden an verschiedenen Stellen der vorliegenden Arbeit die von B. F. Erlanger & E. Brand, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3508 (1951), verwendeten, selbstverständlichen Symbole für die Aminosäurereste gebraucht. p-Tos-, Z-, -NP und T- bedeuten den Rest der p-Toluolsulfosäure (CH<sub>3</sub>——SO<sub>2</sub>—), den Carbobenzoxy-Rest (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OCO—), den p-Nitrophenyl-Rest (——NO<sub>2</sub>) und den Triphenylmethyl-Rest ([C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>]<sub>3</sub>C—).

<sup>14</sup>) I. Schumann & R. A. Boissonnas, Helv. **35**, 2237 (1952).

<sup>15</sup>) B. F. Erlanger, H. Sachs & E. Brand, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1806 (1954).

<sup>16</sup>) R. Schwyzer, B. Iselin & M. Feurer, Helv. **38**, 69 (1955), und spätere Arbeiten.

<sup>17</sup>) B. Iselin, W. Rittel, P. Sieber & R. Schwyzer, Helv. **40**, 373 (1957).

kristallisierten Carbobenzoxy-L-leucyl-D-phenylalanin-cyanmethylester (D 3–4) verwandelt wurde. Dieser wurde mit L-Prolin-methylester (D 5) zum Carbobenzoxy-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin-methylester (E 3–5) umgesetzt, welcher nach katalytischer Hydrierung in Methanol-Salzsäure L-Leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin methylesterhydrochlorid (F 3–5) ergab<sup>12)</sup>.

Carbobenzoxy-L-valin-p-nitrophenylester (C 1)<sup>17)</sup> wurde mit N<sup>δ</sup>-Tosyl-L-ornithin-methylester (C 2)<sup>15)</sup> zum Carbobenzoxy-L-valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithin-methylester (D 1–2) kondensiert<sup>18)</sup>. Nach den Angaben der amerikanischen Autoren<sup>15)</sup> wurde daraus *via* Hydrazid (E 1–2) das Säure-azid (F 1–2) hergestellt und mit F 3–5 zum kristallisierten Carbobenzoxy-L-valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin-methylester (G 1–5) umgesetzt, welches durch katalytische Hydrierung L-Valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin-methylesterhydrochlorid (VI, H 1–5) in kristalliner Form ergab<sup>19)</sup>.

Ein Teil dieser Verbindung (H 1–5) wurde mit Triphenylchlormethan in Gegenwart von Triäthylamin trityliert; der Trityl-pentapeptid-methylester (I 1–5) wurde in Dioxan-Methanol-Wasser alkalisch zu Trityl-L-valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin (K 1–5) verseift. Diese Verbindung (K 1–5) wurde mittels 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-äthyl)-carbodiimid<sup>20)</sup> mit dem Pentapeptid-methylester (K 6–10) in ausgezeichneter Ausbeute zum Trityl-decapeptid-methylester, Trityl·(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·OCH<sub>3</sub> (L 1–10), kondensiert. Alkalische Verseifung in Dioxan-Methanol-Wasser lieferte Trityl·(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·OH (L-L-L-D-L)<sub>2</sub> (M 1–10).

Die Konstitution dieses festen, aber nicht kristallisierenden Decapeptid-derivates wurde folgendermassen festgelegt: Mit Eisessig-Trifluoressigsäure-Wasser wurde in der Kälte die Tritylgruppe abgespalten; das freie Ditosyl-decapeptid wurde aus Äthanol-Wasser kristallisiert (Nadeln). Totalhydrolyse mit Eisessig-konz. HCl ergab die Aminosäuren Ornithin, Valin, Prolin, Leucin und Phenylalanin in ungefähr gleicher Menge (Papierchromatogramm mit Benzylalkohol-Wasser). Durch Umsatz mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol in Äthanol-Wasser-Triäthylamin konnte das Dinitrophenyl(DNP)-Derivat, DNP·(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·OH, in gut kristallisiertem Zustande (feine Nadelbüschel) hergestellt werden. Totalhydrolyse ergab DNP-Valin und (neben den andern Aminosäuren Ornithin, Prolin, Leucin und Phenylalanin) noch etwa die Hälfte der aus dem unsubstituierten

<sup>18)</sup> Die ersten Versuche zu dieser Kondensation verdanken wir Herrn Dr. W. Rittel.

<sup>19)</sup> Unser Produkt besass  $[\alpha]_D^{24} = -48^{\circ} \pm 4^{\circ}$  (c = 0,9 in 0,01-n. HCl) in Übereinstimmung mit den Angaben von Erlanger, Sachs & Brand<sup>15)</sup>.

<sup>20)</sup> J. C. Sheehan & J. J. Hlavka, J. org. Chemistry **21**, 439 (1956); die Kondensation gelingt ebensogut mit Dicyclohexylcarbodiimid.

Decapeptid isolierten Menge an Valin. Dieser Befund beweist, dass zwei Valinreste vorhanden sind, wovon einer nicht endständig gebunden ist. Zum Vergleich wurde DNP·Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro·OCH<sub>3</sub> aus H 1-5 hergestellt. Diese Verbindung lieferte nach Totalhydrolyse DNP-Valin, Ornithin, Prolin, Leucin und Phenylalanin, aber kein freies Valin.

Durch Umsatz von Trityl·(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·OH (M 1-10) mit Di-(p-nitrophenyl)-sulfid in Pyridin<sup>17</sup> wurde der Trityl-decapeptid-p-nitrophenylester (N 1-10) erhalten. Seine Reinheit wurde spektroskopisch (Lösen in Äthanol-Wasser-NaOH, Vergleich der Extinktion bei 400 m $\mu$  mit einer Eichkurve, die mittels Carbo-benzoxy-L-leucin-p-nitrophenylester bestimmt worden war) zu ca. 92% bestimmt. Da die Verbindung wohl fest, aber nicht kristallisierbar war, wurde sie ohne weitere Reinigung mit Trifluoressigsäure-Wasser bei -5° von der Tritylgruppe befreit und das entstandene Ditosyl-decapeptid-p-nitrophenylester-trifluoacetat (O 1-10) direkt zum cyclo-(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub> (L-L-L-D-L)<sub>2</sub> (II) cyclisiert. Dies geschah durch Eintropfen einer Lösung des Salzes des Decapeptid-p-nitrophenyl-esters in Dimethylformamid in einen Überschuss von Pyridin bei 55° über eine längere Zeitdauer, um zu grosse Konzentrationen des aktivierten Esters und damit Polymerisationsreaktionen zu vermeiden.

Das Reaktionsprodukt wurde mittels Ionenaustauschern von offenkettigen Peptiden abgetrennt und nach Chromatographie an Aluminiumoxyd aus wässrigem Alkohol als Dihydrat kristallisiert. Die Ausbeuten betragen bis gegen 30%. Wesentlich für eine gute Ausbeute scheint rasches Arbeiten während der Abspaltung der Tritylgruppe aus N 1-10 zu sein, da wässrige Trifluoressigsäure, besonders bei Zimmertemp., auch die aktivierte Estergruppe angreift und p-Nitrophenol freisetzt (nachgewiesen in den Äther-Petroläther-Extrakten des Salzes O 1-10).

Aus dem Cyclo-(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub> (L-L-L-D-L)<sub>2</sub> (II) wurden die beiden p-Toluolsulfosäure-Reste mittels Natrium in flüssigem Ammoniak entfernt. Nach Zusatz von Ammoniumchlorid konnte Cyclo-(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>, 2 HCl (I) isoliert werden und aus Äthanol-verd. HCl, Methanol-verd. HCl und Äthanol-Aceton in kristallisiertem Zustande gewonnen werden.

Reinheitsprüfung der Cyclisierungsprodukte und Feststellung ihrer Identität mit Ditosyl-gramicidin S und Gramicidin-S-dihydrochlorid. Durch Kristallisation allein ist es oft schwierig, reine Peptide zu erhalten; deshalb wurden sowohl das rohe c-(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub> (II) als auch das rohe c-(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>, 2 HCl (I) der multiplikativen Verteilung nach *Craig* unterworfen (Fig. 1 und 2). Das Ditosyl-derivat liess sich auf diese Weise leicht von 10-20% Verunreinigungen abtrennen.

Dem Dihydrochlorid I war eine kleine Menge eines lipophileren Materials beigemischt, immerhin schienen die Fraktionen 10 bis 16 reines Material zu enthalten.

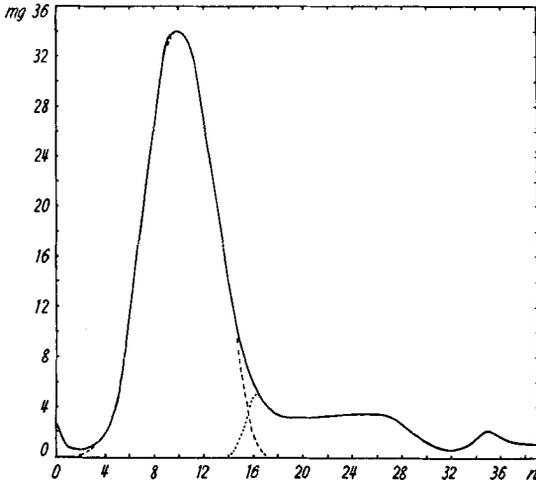


Fig. 1.

Multiplicative Verteilung von Cyclo-(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>  
 (L—L—L—D—L)<sub>2</sub> im System CCl<sub>4</sub>-85-proz. CH<sub>3</sub>OH (1:1); K aus  $r_{\max} = 0,356$ .  
 ————— experimentelle Kurve (Gewicht)  
 - - - - - theoretische Kurve      ··········· Verunreinigung

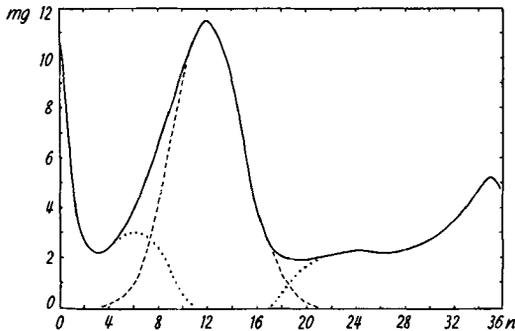


Fig. 2.

Multiplicative Verteilung von Cyclo-(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·2HCl (L—L—L—D—L)<sub>2</sub> im  
 System CHCl<sub>3</sub>—CH<sub>3</sub>OH—0,01-n. HCl (10:7:3), K aus  $r_{\max} = 0,51$ , aus Gewichten be-  
 nachbarter Fraktionen = 0,51.  
 ————— experimentelle Kurve (Gewicht)  
 - - - - - theoretische Kurve      ··········· Verunreinigungen

Die derart gereinigten Produkte wurden auf ihre Identität mit natürlichem Gramacidin-S-dihydrochlorid, bzw. dessen Ditosyl-Derivat geprüft<sup>21)</sup>.

<sup>21)</sup> Herrn Prof. R. L. M. Synge verdanken wir die liebenswürdige Überlassung von zwei Vergleichspräparaten.

Die Analyse von II stimmte, wie diejenige von Ditosyl-gramicidin S (aus dem Naturprodukt hergestellt), auf das Dihydrat von  $c\text{-(Val-p-Tos}\cdot\text{Orn-Leu-Phe-Pro)}_2$  ( $C_{74}H_{104}O_{14}N_{12}S_2, 2 H_2O$ )<sup>22</sup>. Beide Präparate kristallisierten als Stäbchen aus wässrigem Alkohol und schmolzen unter Zersetzung bei 319° (Bräunung bei 305°). Die spezifischen Drehungen in Eisessig waren innerhalb der Fehlergrenze gleich. Die IR.-Spektren waren identisch; allerdings besitzt diese Tatsache wenig Beweiskraft, da das IR.-Spektrum des offenkettigen Ditosyl-decapeptides  $H\cdot(\text{Val-p-Tos}\cdot\text{Orn-Leu-Phe-Pro})_2\cdot OH$  ebenfalls gleich ist (Fig. 3); es ist das die bekannte Erscheinung, dass mit zunehmender Kettenlänge von Peptiden die Einflüsse der Endgruppen auf das Spektrum immer kleiner werden<sup>23</sup>. Die Pulver-Röntgen-Aufnahmen (Fig. 4) bieten vielleicht die beste Gewähr für die tatsächliche Identität des synthetischen Produktes mit Ditosyl-gramicidin S.

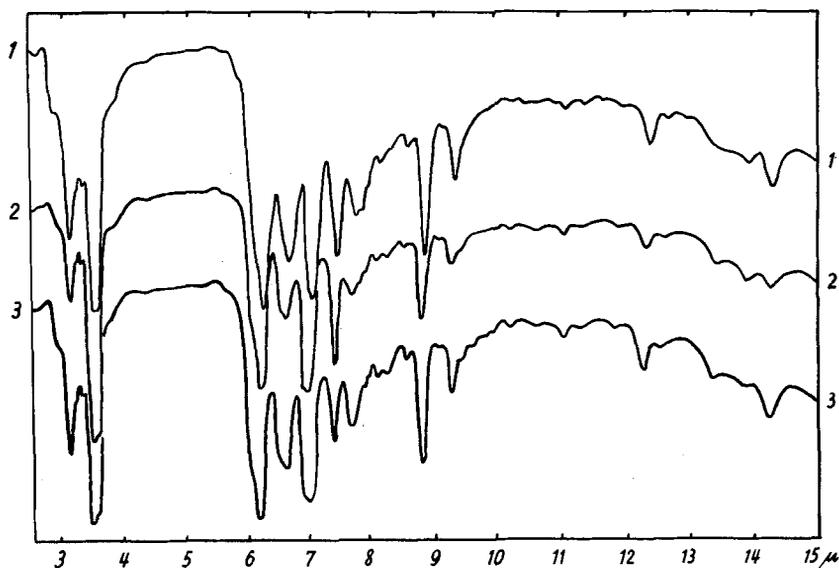


Fig. 3.

IR.-Spektren von  $H\cdot(\text{Val-p-Tos}\cdot\text{Orn-Leu-Phe-Pro})_2\cdot OH$  (L—L—L—D—L)<sub>2</sub> (Kurve 1),  $\text{Cyclo}(\text{Val-p-Tos}\cdot\text{Orn-Leu-Phe-Pro})_2, 2H_2O$  (L—L—L—D—L)<sub>2</sub> (Kurve 2) und von Ditosyl-gramicidin S (aus natürlichem Gramicidin-S-dihydrochlorid) (Kurve 3).

<sup>22</sup>) Bei längerem Trocknen über  $P_2O_5$  (15 Std. bei  $90/10^{-2}$  mm) wird mehr Wasser abgegeben:

$C_{74}H_{104}O_{14}N_{12}S_2, H_2O$	Ber. C 60,55	H 7,28	N 11,45	S 4,37%
	Gef. „ 60,49	„ 7,54	„ 11,63	„ 4,24%

<sup>23</sup>) Vgl. *L. J. Bellamy, The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*, London 1954, Ss. 192—193.

c-(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>, 2 HCl, 3 H<sub>2</sub>O (L-L-L-D-L)<sub>2</sub><sup>24</sup>) konnte im Kristallisationsverhalten von Gramicidin-S-dihydrochlorid nicht

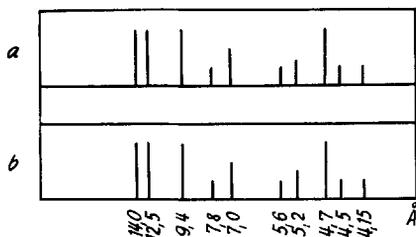


Fig. 4.

Pulver-Röntgen-Aufnahme von a) Ditosyl-gramicidin S (aus natürlichem Gramicidin-S-dihydrochlorid) und b) Cyclo-(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O (L-L-L-D-L)<sub>2</sub>. Aufnahme mit einer Guinier-Kamera, Netzebenenabstände in Å.

unterschieden werden (Fig. 5). In 4 Lösungsmittelgemischen zeigten beide Verbindungen identische (allerdings hohe) Rf-Werte (0,95). Das synthetische Produkt (Smp. 278–279°, Zers.) schmolz um 1° höher als das durch Gegenstromverteilung gereinigte Naturprodukt,

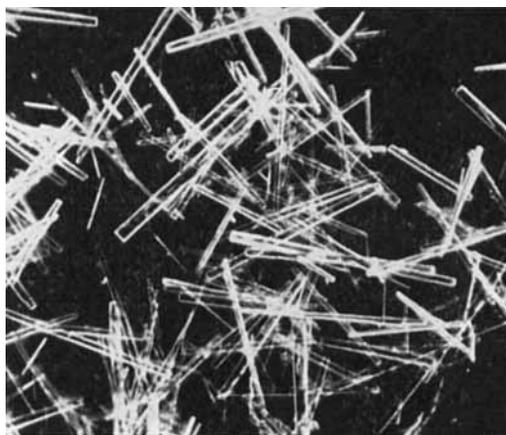


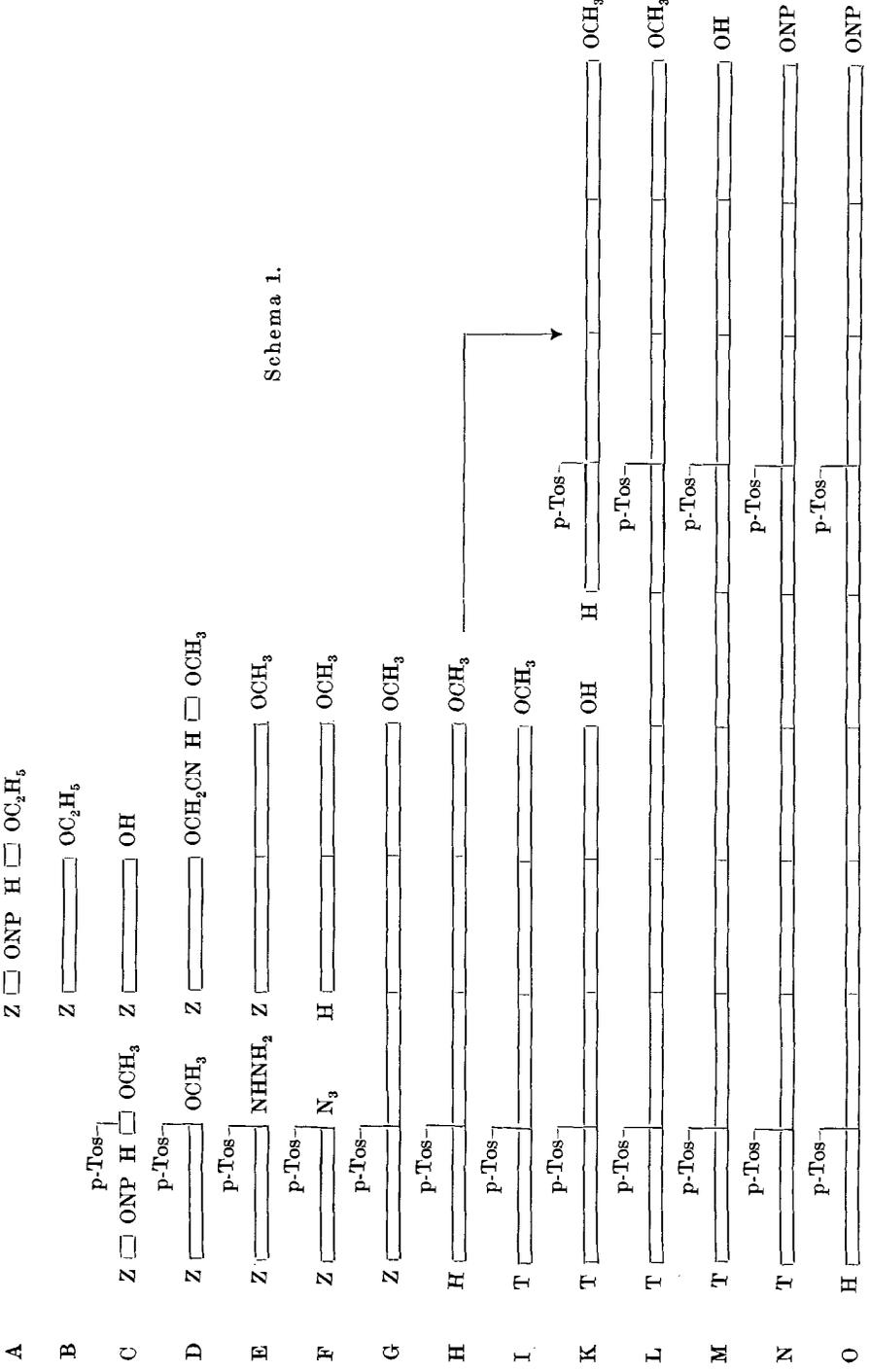
Fig. 5.

welches als Vergleichssubstanz zur Verfügung stand; der Misch-Smp. zeigte keine Depression. Die spezifische Drehung des Naturproduktes fand *Synge*<sup>3</sup>) zu  $-292^\circ$  und  $-295^\circ$  (in 70-proz. Äthanol); für das synthetische Produkt fanden wir  $-289^\circ$  ( $\pm 10^\circ$ ). IR.-Spektren und Pulverdiagramme waren identisch (Fig. 6 und 7). Schliesslich wurden an 19 Stämmen von Mikroorganismen identische antibiotische Wirksamkeiten gefunden<sup>25</sup>).

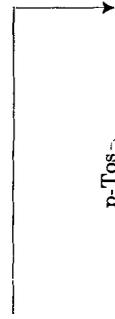
<sup>24</sup>) *Synge*<sup>3</sup>) gibt Analysenwerte an, welche bezüglich C und besser auf C<sub>60</sub>H<sub>92</sub>O<sub>10</sub>N<sub>12</sub>, 2 HCl, H<sub>2</sub>O stimmen.

<sup>25</sup>) Die mikrobiologische Testierung verdanken wir den Herren Dres. *Gross* und *Neipp* von unserer biologischen Abteilung.

10 *L*-Pro  
9 *D*-Phe  
8 *L*-Leu  
7 *L*-Orn  
6 *L*-Val  
5 *L*-Pro  
4 *D*-Phe  
3 *L*-Leu  
2 *L*-Orn  
1 *L*-Val



Schema 1.



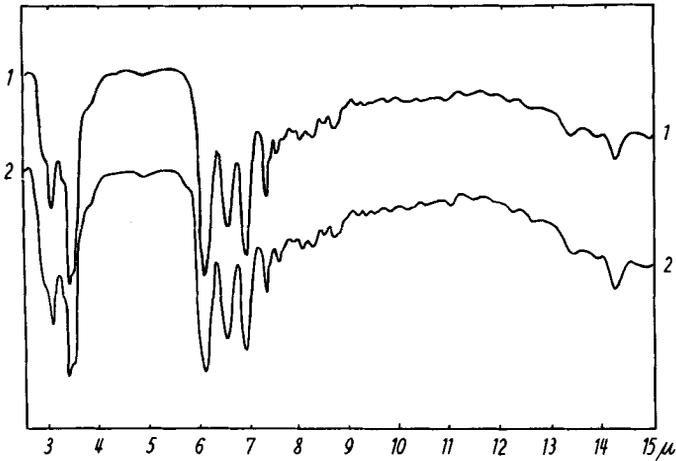


Fig. 6.

IR.-Spektren von Cyclo-(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>, 2 HCl, 3 H<sub>2</sub>O (L—L—L—D—L)<sub>2</sub> (Kurve 1) und von Gramicidin-S-dihydrochlorid (Naturprodukt) (Kurve 2).

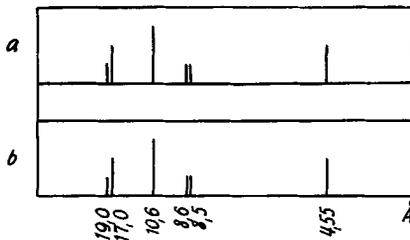


Fig. 7.

Pulver-Röntgen-Aufnahme von a) Gramicidin-S-dihydrochlorid (Naturprodukt) und von b) Cyclo-(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>, 2 HCl (L—L—L—D—L)<sub>2</sub>.

### Experimenteller Teil.

Die Smp. wurden in einer offenen Kapillare in einem Silikonöl-Bad bestimmt und sind nicht korrigiert.

Carbobenzoxy-L-leucyl-D-phenylalanin-äthylester (B 3—4): 9,0 g D-Phenylalanin-äthylester-hydrochlorid und 10,7 ml Triäthylamin wurden in 50 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 15,0 g Carbobenzoxy-L-leucin-p-nitrophenylester<sup>17)</sup> versetzt. Nach 5 Std. (20°) wurde die Lösung auf 400 ml Eiswasser gegossen. Die schmierige Fällung wurde beim Verreiben fest. Sie wurde abgenutscht und mit Wasser, eiskaltem Ammoniak (Wasser: konz. Ammoniak 1:1) und Wasser gewaschen. Trocknung i. V. bei 50°: 15,2 g Kristalle, Smp. 102—105°. Die Verbindung wurde mehrmals aus Benzol-Petroläther umkristallisiert: 14,4 g (84%), Smp. 106°. Die Konstitution ergab sich aus der Verseifung zu Carbobenzoxy-L-leucyl-D-phenylalanin<sup>15)</sup> (Smp. 64—66°, Ausbeute 96%).

Carbobenzoxy-L-leucyl-D-phenylalanin-cyanmethylester (D 3—4): 11,44 g Carbobenzoxy-L-phenylalanin wurden unter Kühlung mit 23 ml Chloracetonitril und 11,5 ml Triäthylamin vermischt und 45 Std. bei Zimmertemp. aufbewahrt. Die Lösung wurde auf 500 ml. 2-n. HCl gegossen und die Fällung verrieben, bis sie fest wurde. Das Rohprodukt wurde abgenutscht und in Äther unter Zusatz von wenig Essigester

gelöst. Die Lösung wurde mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und i. V. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde zweimal aus Benzol-Petroläther umkristallisiert: 11,79 g (94%), Smp. 102—103°. Trocknen  $2\frac{1}{2}$  Std. bei 80° und  $10^{-2}$  mm.

$\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{N}_3$  Ber. C 66,50 H 6,47 O 17,72%  
Gef. „ 66,64 „ 6,42 „ 17,66%

L-Leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin-methylester-hydrochlorid (F 3–5)<sup>12</sup>: 11,18 g Carbobenzoxy-L-leucyl-D-phenylalanin-cyanmethylester (D 3–4), 4,2 g L-Prolin-methylester-hydrochlorid, 6,5 ml Tetrahydro-furan, 8 ml Triäthylamin und 0,2 ml Eisessig wurden vermischt und 67 Std. bei Zimmertemp. aufbewahrt. Zur Verseifung von überschüssigem Cyanmethylester wurde 1 ml Wasser zugegeben und  $\frac{3}{4}$  Std. bei Zimmertemp. belassen. Zugabe von viel Wasser fällte ein Öl, welches in Äther aufgenommen, mit verd. NaOH, verd. HCl und Wasser gewaschen wurde. Nach der Entfernung des Lösungsmittels und Trocknung im Hochvakuum verblieben 11,43 g einer glasigen Substanz. Eine Probe wurde mit 2-n. Natronlauge in der Siedehitze kurz verseift. Nach Ansäuern der Lösung konnte mit Kupferacetat-Benzidin kein HCN nachgewiesen werden: das Produkt enthielt keinen Carbobenzoxy-L-leucyl-D-phenylalanin-cyanmethylester mehr.

Zur Reinigung wurde die Substanz in der 25fachen Menge Benzol gelöst und durch die 10fache Menge Aluminiumoxyd (neutral, 6% Wasser enthaltend) filtriert. Nachwaschen mit der gleichen Menge Benzol und Verdampfen des Filtrates ergab 8,7 g (67%) fast farblose, glasige Substanz.

6,54 g dieser Verbindung wurden in 65 ml Methanol unter Zugabe von 12,5 ml 1-n. HCl gelöst und unter Durchleiten von  $\text{H}_2$  in Gegenwart von 650 mg 10-proz. Palladium-Kohle bis zur Beendigung der  $\text{CO}_2$ -Entwicklung hydriert (8 Std.). Das nach Filtration und Verdampfen des Lösungsmittels verbleibende Reaktionsprodukt wurde aus Äthanol-Äther kristallisiert. 3,8 g (71%), Smp. 240° (Zers.),  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -38^\circ \pm 4^\circ$  ( $c = 0,720$ , Methanol). Smp. und spez. Drehung entsprechen den Angaben von *Harris & Work*<sup>12</sup>.

Carbobenzoxy-L-valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithin-methylester (D 1—2)<sup>15</sup>: 1,32 g Carbobenzoxy-L-valin-p-nitrophenylester<sup>17</sup>, 1,20 g N<sup>δ</sup>-Tosyl-L-ornithin-methylester<sup>15</sup>, 1,3 ml Triäthylamin und 10 Tropfen Eisessig wurden zusammen in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst und 15 Std. bei Zimmertemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Essigester verdünnt und mit Wasser, verd. Kaliumcarbonat-Lösung, 2-n. Salzsäure und Wasser ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde die Essigesterphase i. V. verdampft und der Rückstand aus Aceton-Äther umkristallisiert. 1,26 g (67%), Smp. 144—145°, entsprechend der Angabe von *Erlanger, Sachs & Brand*<sup>15</sup>. Umsatz mit Hydrazinhydrat in Methanol lieferte das Carbobenzoxy-L-valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithin-hydrazid, Smp. 212°<sup>15</sup>.

Trityl-L-valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin-methylester (I 1—5): 100 mg L-Valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin-methylester-hydrochlorid ( $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -48^\circ \pm 4^\circ$ ,  $c = 0,9$  in 0,01-n. HCl), hergestellt aus F 1—2 und F 3—5 über kristallisierten Carbobenzoxy-L-valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin-methylester nach den Angaben von *Erlanger, Sachs & Brand*<sup>15</sup>, wurden in 1,5 ml Chloroform gelöst und mit 100 mg Triphenylchloromethan und 5 Tropfen Triäthylamin versetzt. Nach 5 Std. bei Zimmertemp. wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand mit Äther-Petroläther 1:1 verrieben, um überschüssiges Chlorid und Triphenylcarbinol zu entfernen. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und das kristallisierende Triäthylamin-hydrochlorid mit kalter Weinsäurelösung und Wasser ausgewaschen. Die Essigesterphase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und i. V. eingedampft. Der Rückstand wurde zweimal aus Benzol-Petroläther umgefällt. 124 mg farblose feste Substanz (97%), Smp. 123,5—125,5°. Trocknen 2 Std. bei 90° und  $10^{-2}$  mm.

$\text{C}_{57}\text{H}_{70}\text{O}_8\text{N}_6\text{S}$  Ber. N 8,41 S 3,21% Gef. N 8,35 S 2,96%

Trityl-L-valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin (K 1—5): 0,615 g Trityl-L-valyl-N<sup>δ</sup>-tosyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolinmethylester (I 1—5) wurden in 23 ml Dioxan gelöst und mit 4,5 ml 1-n. NaOH und 4,5 ml Wasser versetzt. Eine dabei entstehende schwache Trübung wurde durch Zugabe von 1,5 ml Methanol aufgelöst und die nunmehr klare Lösung bei 36—38° gehalten. Von Zeit zu Zeit wurde ein Tropfen davon mit 0,5 ml Wasser vermischt; nach 3/4 Std. war die bei dieser Probe entstehende Trübung nur sehr geringfügig. Nach insgesamt 1 Std. wurde das Dioxan i. V. bis zur starken Trübung des Rückstandes abgedampft. Dieser wurde in eine eiskalte Lösung von 0,7 g Zitronensäure in Wasser gegossen und mit Essigester extrahiert. Nach dem Trocknen der Essigesterphase, Verdampfen und Trocknen im Hochvakuum verblieben 0,503 g (83%) einer glasigen Substanz, welche nach der Analyse nur Spuren von Methoxyl enthielt.

Trityl-(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·OCH<sub>3</sub> (L-L-L-D-L)<sub>2</sub> (L 1—10): 500 mg HCl, H·Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro·OCH<sub>3</sub> wurden in 5 ml Essigester und 0,5 ml Triäthylamin gelöst (die in Essigester suspendierte Substanz geht bei Zugabe des Amins in Lösung). Nach 3 Min. wurde das entstandene Triäthylamin-hydrochlorid abfiltriert und mit Essigester gewaschen. Das Filtrat wurde i. V. eingedampft und der hinterbliebene Schaum in 5 ml Essigester aufgenommen. In diese Lösung wurden 580 mg Trityl-Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro·OH (L-L-L-D-L) und 155 mg 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-äthyl)-carbodiimid<sup>20</sup>) eingetragen (die Reaktion wurde auch in Acetonitril als Lösungsmittel unter Verwendung von 1,3-Dicyclohexylcarbodiimid ausgeführt, wobei entstandener Dicyclohexylharnstoff auskristallisierte). Nach 7 Std. bei Zimmertemp. wurde der Ansatz mit Essigester verdünnt und mit 1-n. HCl, verd. Ammoniak und Wasser in der Kälte ausgeschüttelt. Die Essigesterphase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. V. eingedampft. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und aus Benzol-Äther zweimal umgefällt, 835 mg (80%) farblose, feste Substanz, Smp. 140—142° (nach Erweichen bei 135°). Trocknen 5 Std. bei 65° und 10<sup>-2</sup> mm über Blaugel,  $[\alpha]_D^{25} = -67 \pm 3^{\circ}$  (c = 0,7 in Methanol).

C <sub>94</sub> H <sub>122</sub> O <sub>15</sub> N <sub>12</sub> S <sub>2</sub>	Ber. C 65,48	H 7,13	S 3,72	(O)CH <sub>3</sub> 0,88%
	Gef. „ 65,34	„ 6,98	„ 3,42	„ 0,87%

Trityl-(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·OH (L-L-L-D-L)<sub>2</sub> (M 1—10): 800 mg Trityl·(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·OCH<sub>3</sub> wurden in 70 ml Dioxan gelöst, mit 11 ml 0,5-n. NaOH und 3 ml Methanol versetzt und auf 37° erwärmt. 3 Tropfen dieser Lösung ergaben mit 1 ml Wasser eine starke Fällung; nach 1/2 Std. hatte die Tendenz zur Trübungsbildung stark abgenommen und war nach 1 Std. verschwunden. Der Ansatz wurde nach 2 Std. in 900 ml Eiswasser eingegossen und die klare Lösung mit wenig Zitronensäure angesäuert. Nach 2 1/2 Std. bei 0° wurde die abgeschiedene, feste Verbindung abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet: 600 mg (76%) farbloses Pulver, Smp. 133—134° (Sintern bei 120°). Die Analyse ergab nur Spuren von Methoxyl.

100 mg dieser Verbindung wurden zur Bestätigung der Konstitution als Decapeptid-Derivat in 1 ml Eisessig unter Zugabe von 5 Tropfen Trifluoressigsäure und von 5 Tropfen Wasser gelöst. Nach 10 Min. bei Zimmertemp. wurde das ausgeschiedene Triphenylcarbinol abgenutscht und mit Eisessig-Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde verdampft, der Rückstand wurde in 65-proz. Äthanol gelöst und durch eine Säule von schwach basischem Austauschharz (Amberlit IR 4B, mit NH<sub>3</sub> und 65-proz. Äthanol vorbehandelt) filtriert. Das Filtrat hinterliess nach dem Verdampfen 55 mg feste Substanz, die aus 60-proz. Äthanol umkristallisiert wurde (langsam Abkühlen der Lösung in einem mit heissem Wasser gefüllten Dewar-Gefäss). Durch Eindampfen der Mutterlauge und Behandeln mit einer kleineren Menge von 60-proz. Äthanol konnte fast alle Substanz kristallisiert werden. Rosetten mikroskopischer Nadeln, Smp. 184—187° (Zers., Sintern bei 178°). Eine Probe dieses H·(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·OH (L-L-L-D-L)<sub>2</sub> wurde mit Eisessig-konz. HCl (1:1) 20 Std. bei 110° verseift und nach dem Verdampfen des Lösungsmittels papierchromatographisch untersucht (Whatman No. 1, Benzylalkohol-Wasser). Ninhydrin-Behandlung entwickelte Flecken von Ornithin, Valin, Prolin, Leucin und Phenylalanin (Rf-Werte 0,0; 0,28; 0,305; 0,395; 0,421).

6 mg kristallisiertes  $H \cdot (Val-p-Tos \cdot Orn-Leu-Phe-Pro)_2 \cdot OH$  ( $L-L-D-L$ )<sub>2</sub> wurden in 0,5 ml 85-proz. Äthanol gelöst und mit 5 mg 2,4-Dinitro-fluorbenzol und 1 Tropfen Triäthylamin versetzt. Nach  $\frac{1}{2}$  Std. bei Zimmertemp. wurde die Lösung verdampft und der Rückstand mehrmals mit Äther-Petroläther (1:1) verrieben und gewaschen, in Essigester aufgenommen und an 0,5 g Aluminiumoxyd (neutral, mit 6% Wasser) adsorbiert. Die Säule wurde mit Essigester gründlich gewaschen und schliesslich mit Methanol-Pyridin (10:1) eluiert. Die durch Verdampfen des Lösungsmittels gewonnene Substanz wurde endlich in der Oberphase von Benzol-Benzylalkohol-Wasser (9:1:10) gelöst und an eine kleine Säule von Cellulosepulver (*Whatman*) chromatographiert. Die schnell wandernde Bande wurde eluiert und im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit. Die Substanz wurde in 1 ml Äthanol gelöst und bei 70° mit Wasser zur beginnenden Trübung versetzt. Beim langsamen Abkühlen im *Dewar*-Gefäss kristallisierte  $DNP \cdot (Val-p-Tos \cdot Orn-Leu-Phe-Pro)_2 \cdot OH$  ( $L-L-D-L$ )<sub>2</sub> in Form winziger Nadelbüschel, Smp. 229—230° (Zers.). Eine Probe der Substanz wurde mit Benzylalkohol auf *Whatman* No. 1 chromatographiert; es zeigten sich keine Ninhydrin-positive Begleitsubstanzen.

Eine weitere Probe wurde in Eisessig-konz. HCl (1:1) 20 Std. bei 110° verseift. Die Lösung wurde verdampft; der Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit Essigester extrahiert. Der Essigesterextrakt enthielt DNP-Valin (Rf = 0,935 im System n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 auf *Whatman* No. 4). In der wässrigen Phase konnten papierchromatographisch (Benzylalkohol-Wasser; *Whatman* No. 1) Ornithin, Valin, Prolin, Leucin und Phenylalanin nachgewiesen werden. Der Valinfleck war deutlich kleiner als derjenige von Leucin (etwa halb so gross).

20 mg  $H \cdot Val-p-Tos \cdot Orn-Leu-Phe-Pro \cdot OCH_3$  ( $L-L-D-L$ ) wurden zum Vergleich in 1 ml 85-proz. Äthanol mit 20 mg 2,4-Dinitro-fluorbenzol und einigen Tropfen Triäthylamin versetzt. Nach  $\frac{1}{2}$  Std. bei Zimmertemp. wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand mit 1-n. HCl und Äther-Petroläther (1:1) gründlich verrieben. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit dem gleichen Lösungsmittel behandelt, bis die organische Phase farblos blieb. Das gesuchte, in der wässrigen Phase suspendierte Reaktionsprodukt wurde in Essigester aufgenommen und seine Lösung getrocknet und verdampft. Der Rückstand wurde aus abs. Äthanol durch langsames Abkühlen im *Dewar*-Gefäss kristallisiert: gelbe Nadeln von  $DNP \cdot Val-p-Tos \cdot Orn-Leu-Phe-Pro \cdot OCH_3$ , Smp. 191—193°.

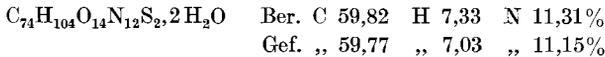
Eine Probe wurde mit Eisessig-konz. HCl (1:1) 20 Std. bei 110° im geschlossenen Rohr verseift. Die gelbe Lösung wurde i. V. verdampft und der Rückstand mit Essigester ausgezogen. Im Essigester befand sich DNP-Valin (Rf = 0,935 im System n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 auf *Whatman* Nr. 4). In der wässrigen Phase wurden Ornithin, Prolin, Leucin und Phenylalanin papierchromatographisch nachgewiesen (Benzylalkohol-Wasser, *Whatman* Nr. 1).

Trityl- $(Val-p-Tos \cdot Orn-Leu-Phe-Pro)_2 \cdot ONP$  ( $L-L-D-L$ )<sub>2</sub> (N 1—10): 540 mg Trityl- $(Val-p-Tos \cdot Orn-Leu-Phe-Pro)_2 \cdot OH$  ( $L-L-D-L$ )<sub>2</sub> (M 1—10) und 500 mg Di-(p-nitrophenyl)-sulfid wurden zusammen in 5 ml Pyridin gelöst. Nach 5 Std. bei Zimmertemp. wurde das Lösungsmittel verdampft, der Rückstand in Essigester gelöst, mit Weinsäure-Lösung und Wasser gewaschen und über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand mehrmals mit Äther-Petroläther (1:1) verrieben, wobei alles freie p-Nitrophenol entfernt wurde. Es hinterblieben 500 mg farblose, feste Substanz.

5,30 mg dieses p-Nitrophenylesters ( $2,90 \cdot 10^{-6}$  Mol bei 100% Reinheit) wurden in 5,0 ml Äthanol gelöst und diese Lösung mit 1-n. NaOH auf 10,0 ml aufgefüllt (erwartete  $c = 2,9 \cdot 10^{-4}$  Mol/l). Die Extinktion dieser Lösung bei 400  $\mu$  wurde im *Beckman*-Spektrophotometer gemessen und mit einer (in diesem Konzentrationsbereich linearen) Eichkurve verglichen, welche mittels Carbobenzoxy-L-leucin-p-nitrophenylester im gleichen Lösungsmittel bestimmt worden war (bei  $c = 1,0, 2,0, 4,0$  und  $6,0 \cdot 10^{-4}$  wurden Extinktionen von 19800, 42900, 82400 und 125000 gefunden). Die gemessene Extinktion (56200) entsprach  $c = 2,66 \cdot 10^{-4}$ -m.; der Gehalt der Probe an p-Nitrophenylester betrug also 92%.

$H \cdot (Val-p-Tos \cdot Orn-Leu-Phe-Pro)_2 \cdot ONP \cdot F_3CCOOH (L-L-L-D-L)_2 (O1-10)$ : 500 mg 92-proz. Trityl-decapeptid-p-nitrophenylester (N 1—10) wurden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst und unter Kühlung auf  $-5$  bis  $0^\circ$  langsam mit 10 ml Wasser versetzt. Nach 15 Min. bei  $-5^\circ$  wurde die kristalline Abscheidung von Triphenylcarbinol abgenutscht und mit wässriger Trifluoressigsäure gewaschen. Das Filtrat wurde bei  $-80^\circ$  eingefroren und im Hochvakuum gegen eine Kühlfalle mit Trockeneis-Aceton verdampft und getrocknet. Der Rückstand wurde gründlich mit Äther verrieben und gewaschen, um Spuren von Triphenylcarbinol und von p-Nitrophenol zu entfernen. Die schwach gelblich gefärbte, körnige Substanz wog 400 mg und wurde ohne weitere Reinigung cyclisiert.

$Cyclo-(Val-p-Tos \cdot Orn-Leu-Phe-Pro)_2 \cdot 2H_2O (L-L-L-D-L)_2 (II)$ : Die Lösung von 390 mg  $H \cdot (Val-p-Tos \cdot Orn-Leu-Phe-Pro)_2 \cdot ONP, F_3CCOOH (O1-10)$  in 10 ml Dimethylformamid und 3 Tropfen Eisessig wurde im Verlaufe von 4 Std. unter Rühren in 75 ml Pyridin bei  $55^\circ$  eingetroppt. Darauf wurde die Lösung noch 1 Std. bei dieser Temp. gehalten. Zur Prüfung, ob die Reaktion beendet sei, wurde eine kleine Probe i. V. verdampft und der Rückstand mit Äther verrieben. Der Ätherextrakt färbte sich mit 1-n. NaOH sofort stark gelb, währenddem der unlösliche Rückstand keine Färbung ergab. Die Hauptmenge wurde nun ebenfalls i. V. verdampft und der Rückstand mit Petroläther-Äther (1:1) und Äther unter Rückfluss extrahiert. Das pulvrige, unlösliche Material wurde in i-Propanol-Methanol-Wasser (1:1:1) gelöst und durch zwei Säulen mit je einem stark basischen und einem stark sauren Ionenaustauscher (Merck I und III, mit demselben Lösungsmittelgemisch vorbehandelt) filtriert. Das Filtrat wurde bei  $45^\circ$  langsam mit Wasser versetzt, die ausfallende, feste, pulvrige Substanz abgenutscht und i. V. getrocknet (170 mg). Für die multiplikative Verteilung (Fig. 1) wurde Substanz dieser Reinheitsstufe verwendet; sie ist etwa 80% rein, entsprechend einer Ausbeute von 41%. Die Reinigung kann auch durch Chromatographie an neutralem Aluminiumoxyd (Aktivität II) aus Benzol-Chloroform (9:1) erfolgen: die Benzol-Chloroform-Eluate wurden verworfen; die Eluate mit Chloroform und mit Essigester enthielten 145 mg fast farblose Substanz, welche aus 65-proz. Äthanol in Form langer Prismen kristallisierte: 92,2 mg (28%), Smp.  $318^\circ$  (Zers.), Braunfärbung ab  $305^\circ$ . Die durch multiplikative Verteilung gereinigte Substanz schmolz bei  $319^\circ$  (Zers.) nach Braunfärbung bei  $305^\circ$ .  $[\alpha]_D^{24} = -188,0$  und  $-186,3^\circ \pm 10^\circ$  ( $c = 0,669$  in Eisessig). Trocknen 2 Std. bei  $110^\circ$  und  $10^{-2}$  mm<sup>22</sup>).



Zum Vergleich wurden 30 mg Gramicidin-S-dihydrochlorid (entsprechend specimen XII OO B von *Synge*<sup>21</sup>) in 5 ml Pyridin gelöst und mit 200 mg p-Toluolsulfochlorid versetzt. Nach 5 Std. bei  $40^\circ$  wurde das Lösungsmittel verdampft, überschüssiges Säurechlorid mit Äther-Petroläther (1:1) ausgewaschen und Salze mit Wasser entfernt. Das pulvrige Produkt wurde gleich wie das synthetische chromatographiert und aus 65-proz. Äthanol kristallisiert: Smp.  $319^\circ$  (Zers.) nach Braunfärbung bei  $305^\circ$ .  $[\alpha]_D^{24} = -182,5^\circ \pm 10^\circ$  ( $c = 0,596$  in Eisessig). Trocknen 2 Std. bei  $110^\circ$  und  $10^{-2}$  mm.



$Cyclo-(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)_2, 2HCl (L-L-L-D-L)_2 (I)$ : 140 mg  $Cyclo-(Val-p-Tos \cdot Orn-Leu-Phe-Pro)_2, 2H_2O (II)$  wurden unter Rühren in ca. 80 ml über Natrium destilliertem flüssigem Ammoniak suspendiert und mit kleinen Natrium-Stücken bis zu bleibender Blaufärbung versetzt (70 mg Na). Das überschüssige Natrium wurde mit Ammoniumchlorid zerstört; mit einem Überschuss dieses Salzes wurde das entstandene Decapeptid in sein Dihydrochlorid übergeführt (ca. 200 mg  $NH_4Cl$ ). Wird zu wenig Ammonchlorid zugegeben, so tritt bei der Aufarbeitung leicht eine Zersetzung unter Bildung dunkler Harze ein. Das Lösungsmittel wurde hierauf abdestilliert, der Rückstand kurz i. V. getrocknet und dann mit 1-n. HCl aufgenommen. Die farblose, kristalline Fällung wurde aus Äthanol-1-n. HCl mehrmals umkristallisiert oder der multiplikativen Verteilung (Figur 2) unterworfen. In beiden Fällen wurden kleine, farblose Prismen (aus Äthanol-wässr. 1-n. HCl) erhalten (Fig. 5), Ausbeute 70—90%, Smp.  $278-279^\circ$  (Zers.) nach Sintern bei  $272^\circ$  (Einführen der Kapillare bei  $250^\circ$ ). Ein Vergleichspräparat von *Synge*, wel-

ches von *L. C. Craig* durch multiplikative Verteilung gereinigt worden war, besass gleiches Verhalten bei der Kristallisation, Smp. 277–278° (Zers.) nach Sintern bei 272°. Die synthetische Verbindung besass  $[\alpha]_D^{24} = -289^{\circ} \pm 10^{\circ}$  ( $c = 0,43$  in 70-proz. Äthanol,  $v/v$ ).

Trocknen 20 Std. bei 90/10<sup>2</sup> mm über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

C <sub>60</sub> H <sub>92</sub> O <sub>10</sub> N <sub>12</sub> , 2 HCl, 3 H <sub>2</sub> O	Ber. C	56,81	H	7,95	N	13,25%	N/C	0,2335
	Gef. „	56,76	„	7,85	„	13,17%	„	0,2320

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

#### SUMMARY.

The synthesis of gramicidin S<sup>10</sup>), a peptide antibiotic from *Bac. brevis*, is described in detail. The decapeptide derivative trityl·(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·OCH<sub>3</sub> (L-L-L-D-L)<sub>2</sub> is converted to the corresponding p-nitrophenyl ester, the trityl group is removed selectively, and the resulting product is cyclised to cyclo-(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O (L-L-L-D-L)<sub>2</sub>. Sodium in liquid ammonia removes the p-toluene-sulfonyl groups, and cyclo-(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub> (L-L-L-D-L)<sub>2</sub> is obtained as dihydrochloride (I). The cyclic products are purified by countercurrent distribution and identified with gramicidin S ditosylate and gramicidin S dihydrochloride<sup>21</sup>) respectively. This proves the structure of gramicidin S as cyclic decapeptide, and constitutes the first synthesis of a naturally occurring cyclic peptide.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel  
Pharmazeutische Abteilung.

### 83. Die Glykoside der Blätter von *Digitalis grandiflora* Mill. (= *Digitalis ambigua* Murr.)

Glykoside und Aglykone, 176. Mitteilung<sup>1)</sup>

von **R. Repič** und **Ch. Tamm**.

(13. III. 57.)

Von den heute etwa 30 bekannten Arten der Gattung *Digitalis*, die zur Familie der Scrophulariaceae gehört, sind die *D. purpurea* L. und *D. lanata* Ehrh. chemisch am eingehendsten untersucht worden. Chemische Angaben liegen aber auch über *D. canariensis* L., *D. cariensis* Boiss., *D. ferruginea* L., *D. leucophaea* Sibth., *D. lutea* L., *D. mariana* Boiss., *D. micrantha* Roth, *D. orientalis* Lam. und *D. thapsi* L. vor<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> 175. Mitteilung: *W. Kreis, Ch. Tamm & T. Reichstein*, Helv. **40**, 593 (1957).

<sup>2)</sup> Nähere Angaben finden sich in der kürzlich erschienenen schönen Übersicht über die herzwirksamen Glykoside der Digitalisarten von *Stoll & Renz*<sup>3)</sup>.