

*Rf des ptérides synthétisées*

Ptérides	Solvants <sup>a)</sup>					
	1	2	3	4	5	6
III	0,11	0,12	0,12	0,18		0,27
IV	0,65	0,28	0,27		0,39	0,38
VII	0,04	0,04	0,05		0,11	0,13

<sup>a)</sup> N° 1: H<sub>2</sub>O; N° 2: citrate de sodium à 3%; N° 3: chlorure d'ammonium à 3%; N° 4: isopropanol-NH<sub>3</sub> à 1%, 2:1; N° 5: isopropanol-H<sub>2</sub>O, 2:1; N° 6: isopropanol-acétate d'ammonium à 2%, 1:1.

## RÉSUMÉ

Par action de l'hydrate d'hydrazine et du diméthylformamide sur la tétrahydroptéride (II) on obtient l'hydrazone de la formyl-6-dihydro-7,8-ptéride (III), qu'on oxyde ensuite facilement en hydrazone de la formyl-6-ptéride (IV). Un traitement acide transforme par oxydo-réduction cette hydrazone en hydroxyméthyl-6-ptéride (V) isomériquement pure.

Zurich, Institut de chimie organique de l'Université

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] 10<sup>e</sup> Communication: M. VISCONTINI, L. MERLINI, G. NASINI, W. VON PHILIPSBORN & M. PIRAUX, *Helv.* **47**, 2195 (1964).
- [2] W. PFLEIDERER, E. LIEDEK & M. RUKWIED, *Chem. Ber.* **95**, 755 (1962).
- [3] M. VISCONTINI, L. MERLINI & W. VON PHILIPSBORN, *Helv.* **46**, 1181 (1963).
- [4] C. W. WALLER *et al.*, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 4630 (1960).
- [5] H. S. FORREST, C. VAN BAALEN, M. VISCONTINI & M. PIRAUX, *Helv.* **43**, 782 (1960).
- [6] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* **47**, 2087 (1964).
- [7] M. VISCONTINI & M. PIRAUX, *Helv.* **46**, 1537 (1963).

52. Struktur und Synthese von Evolidin<sup>1)</sup>

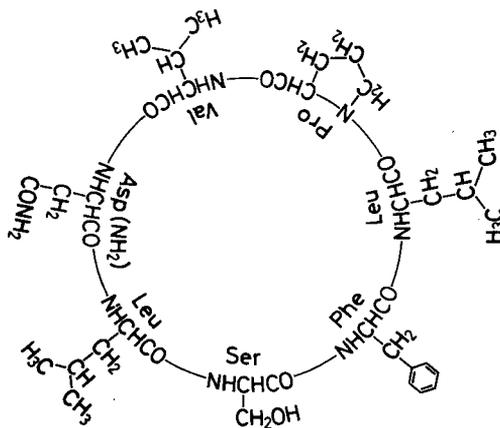
von R. O. Studer und W. Lergier

(5. II. 65)

1952 isolierten HUGHES, NEILL & RITCHIE [1] aus den Blättern von *Evodia xanthoxyloides* eine kristalline Substanz, die sie Evolidin benannten. Die saure Hydrolyse führte zu einem Aminosäuregemisch folgender Zusammensetzung: 1 Valin, 2 Leucin, 1 Prolin, 1 Phenylalanin, 1 Serin und 1 Asparagin, was auf ein Heptapeptid stimmte. Im intakten Peptid konnten keine Endgruppen bestimmt werden, was, zusammen mit weiteren Eigenschaften der Verbindung, zur Annahme einer cyclischen Struktur führte. RÖNTGEN-Untersuchungen von CURTIS [2] ergaben ein Molekulargewicht von  $769 \pm 6$ . Dies steht mit dem für ein cyclisches Heptapeptid dieser Aminosäure-Zusammensetzung berechneten Molekulargewicht von 771 gut im Einklang.

<sup>1)</sup> Die Abkürzungen folgen den Vorschlägen des V. Europ. Peptidsymposiums, Pergamon Press, Oxford 1963. Z- = Benzoyloxycarbonyl, -OBu<sup>t</sup> = *t*-Butylester, PTH = Phenylthiohydantoin, DNP = Dinitrophenyl.

LAW *et al.* [3] isolierten nach Partialhydrolyse mit konz. Salzsäure bei 35° papierchromatographisch eine Reihe von Peptidfragmenten, deren Sequenz mit Hilfe der DNP-Methode von SANGER [4] und mittels EDMAN-Abbau [5] bestimmt werden konnte. Auf Grund der Aminosäuresequenz in fünf isolierten, sich überlappenden Di- und Tripeptiden schlugen LAW *et al.* [3] für Evolidin die folgende Struktur vor (Figur):



Struktur von Evolidin

Die optischen Drehungen der aus einem Totalhydrolysat nach Dinitrophenylierung isolierten Dinitrophenyl-Aminosäuren zeigten, dass alle Aminosäuren die L-Konfiguration aufweisen.

Dieses cyclische Heptapeptid schien uns eine ideale Substanz, um Erfahrungen in der Cyclisierung von Peptiden für unsere Arbeiten über die Polymyxin-Antibiotica [6] zu sammeln. Zunächst besitzt es mit Ausnahme des Serin-Hydroxyls keine weiteren sekundären Funktionen, welche im Laufe der Synthese geschützt werden müssen. Des weitern ist das Endprodukt der Synthese eine gut zu kristallisierende und definierte Substanz. Zudem konnte in Analogie zur Cyclisierung der Polymyxine [6] der Ringschluss zwischen Phenylalanin und Leucin erfolgen, allerdings mit dem Unterschied, dass Phenylalanin im Polymyxin eine D-, im Evolidin dagegen eine L-Konfiguration besitzt. Daher haben wir zuerst durch stufenweisen Aufbau vom Carboxylende her nach der *p*-Nitrophenylester-Methode [7] das geschützte Heptapeptid Z-Leu-Pro-Val-Asp(NH<sub>2</sub>)-Leu-Ser-PheOCH<sub>3</sub> [8] hergestellt und dieses Peptid nach Abspaltung der Schutzgruppen in hoher Verdünnung mit einem Überschuss an Dicyclohexyl-carbodiimid [6] behandelt. Diese Methode, welche in der Polymyxin-Reihe in 5–10% Ausbeute zu reinen cyclischen Produkten führt [6] [9], ergab hier kein Evolidin. Dies kann seine Gründe in Nebenreaktionen des überschüssigen Dicyclohexyl-carbodiimids mit Serin [10] und Asparagin [11] haben. Nachdem auch eine Cyclisierung nach der Azid-Methode [12] nicht zur gewünschten Substanz führte<sup>2)</sup>,

<sup>2)</sup> Zu ähnlichen Resultaten ist auch Hr. Dr. H. NESVADBA durch Cyclisierung eines analogen offenen Heptapeptides gekommen (Privatmitteilung). Eine vorläufige Mitteilung der Synthese des offenen Heptapeptides ist erschienen in [13]. Wir danken Hrn. Dr. H. NESVADBA (Wien) und Hrn. Prof. Dr. G. T. YOUNG für gegenseitigen Austausch der Erfahrungen.

haben wir nach Rücksprache mit LAW<sup>3)</sup> nochmals eine Überprüfung der Struktur durchgeführt.

Da Evolidin von Enzymen nicht angegriffen wird, wurde es einer Partialhydrolyse mit konz. HCl bei 37° über 14 Std. unterworfen<sup>4)</sup>. Durch Gegenstromverteilung liess sich darauf neben andern Fragmenten ein Ninhydrin-positives Bruchstück fassen, das die gleiche Aminosäure-Zusammensetzung besass wie das intakte Evolidin. Durch Dinitrophenylierung und Totalhydrolyse nach SANGER [4] konnte Serin als N-endständige Aminosäure nachgewiesen werden. Der stufenweise Abbau nach EDMAN [5] zeigte in der 1. Stufe insofern Schwierigkeiten, als nach der klassischen Methode Serin nicht eindeutig nachzuweisen war und bereits etwas Phenylalanin festgestellt wurde. Mit Hilfe der modifizierten Methode nach CHERBULIEZ *et al.* [14] konnte aber auch auf diesem Weg Serin eindeutig als N-terminale Aminosäure erfasst werden. Die folgenden Stufen verliefen normal und ergaben nacheinander die Aminosäuren Phenylalanin, Leucin, Prolin und Valin. Der 6. Schritt verlief negativ. Durch Inkubation mit Carboxypeptidase bei 25° wurden praktisch gleichzeitig Leucin und Asparagin freigesetzt; wurde jedoch die Inkubation bei 0° vorgenommen, erschien zuerst Leucin und, deutlich verzögert, Asparagin. Nach Fortsetzung der Inkubation bei 25° konnte nach 24 Std. noch Valin nachgewiesen werden. Durch Hydrazinolyse nach AKABORI *et al.* [15] konnte Leucin als C-terminale Aminosäure bestätigt werden. Auf Grund dieser Resultate kommt dem Heptapeptid die Sequenz H-Ser-Phe-Leu-Pro-Val-Asp(NH<sub>2</sub>)-Leu-OH zu. Es ist aus dem intakten Evolidin durch Ringöffnung an der besonders labilen Leucin-Serin-Bindung [16] entstanden. Die Aminosäuresequenz stimmt mit der von LAW *et al.* [3] auf Grund kleinerer Bruchstücke abgeleiteten überein.

Durch enzymatische Methoden konnte die von LAW *et al.* [3] über die optische Drehung der Dinitrophenyl-Aminosäuren gefundene L-Konfiguration aller Aminosäuren bestätigt werden. Leucin, Valin und Phenylalanin wurden durch Inkubation eines Totalhydrolysates mit L-Aminosäureoxydase vollständig oxydiert. Sie besitzen daher die L-Form. Serin, Asparagin und Prolin dagegen werden unter diesen Bedingungen nicht angegriffen [17]. Da jedoch D-Aminosäureoxydase, die D-Prolin quantitativ oxydiert [18], das Prolin im Hydrolysat vollständig intakt liess, muss auch Prolin die L-Konfiguration besitzen. Carboxypeptidase setzte Asparagin aus dem Heptapeptid und Serin aus einem kleineren isolierten Bruchstück (H-Leu-Ser-Phe-Leu-OH) frei. Sie gehören deshalb ebenfalls zur L-Reihe.

Zum Aufbau des aus der Partialhydrolyse von Evolidin resultierenden Heptapeptides wurde zuerst das geschützte Heptapeptid Z-Ser-Phe-Leu-Pro-Val-Asp(NH<sub>2</sub>)-Leu-OBu<sup>t</sup> hergestellt. Seine Synthese erfolgte durch stufenweise Verlängerung vom Carboxylende her, ausgehend von L-Leucin-*t*-butylester [19], vorwiegend nach der *p*-Nitrophenylester-Methode [7]. Z-Serin wurde über die Azidmethode [12] eingeführt (Aufbauschema).

Entfernung beider Schutzgruppen durch Trifluoressigsäure und anschliessende Hydrierung führte zum freien Heptapeptid, das sich in Chromatogrammen und Ab-

<sup>3)</sup> Wir möchten an dieser Stelle Hrn. Dr. H. D. LAW für wertvolle Diskussionen im Verlaufe dieser Arbeit danken.

<sup>4)</sup> Ein Präparat von natürlichem Evolidin wurde uns in verdankenswerter Weise von Hrn. Prof. A. J. BIRCH (Manchester) überlassen.

1	2	3	4	5	6	7	
Ser	Phe	Leu	Pro	Val	$\begin{matrix} \text{NH}_2 \\   \\ \text{Asp} \end{matrix}$	Leu	
					Z—	$\begin{matrix} \text{ONP} & \text{H} \\   &   \\ \text{[20]} & \text{I} \end{matrix}$	—OBu <sup>t</sup>
					Z—	II	—OBu <sup>t</sup>
				Z—	$\begin{matrix} \text{ONP} & \text{H} \\   &   \\ \text{[21]} \end{matrix}$	III	—OBu <sup>t</sup>
				Z—		IV	—OBu <sup>t</sup>
			Z—	$\begin{matrix} \text{ONP} & \text{H} \\   &   \\ \text{[20]} \end{matrix}$		V	—OBu <sup>t</sup>
			Z—			VI	—OBu <sup>t</sup>
		Z—	$\begin{matrix} \text{ONP} & \text{H} \\   &   \\ \text{[21]} \end{matrix}$			VII	—OBu <sup>t</sup>
		Z—				VIII	—OBu <sup>t</sup>
	Z—	$\begin{matrix} \text{ONP} & \text{H} \\   &   \\ \text{[22]} \end{matrix}$				IX	—OBu <sup>t</sup>
	Z—					X	—OBu <sup>t</sup>
Z—	$\begin{matrix} \text{N}_3 \\   \\ \text{[23]} \end{matrix}$	H—				XI	—OBu <sup>t</sup>
Z—						XII	—OBu <sup>t</sup>
Z—						XIII	—OH
Z—						XIV	—ONP
HBr · H—						XV	—ONP

*Aufbauschema:* Alle Aminosäuren haben L-Konfiguration.

Z = Benzyloxycarbonyl; OBU<sup>t</sup> = *t*-Butylester; ONP = *p*-Nitrophenylester.

bauversuchen als vollkommen identisch mit dem durch Partialhydrolyse von Evolidin entstandenen Heptapeptid erwies. Die Abspaltung der *t*-Butylestergruppe im geschützten Heptapeptid mit Trifluoressigsäure [24] und die Umsetzung der entstandenen Z-Heptapeptidsäure mit Di-(*p*-nitrophenyl)-sulfid [25] führte zum aktivierten Ester. Nach Entfernung der Z-Gruppe durch HBr in Trifluoressigsäure [26] erfolgte die Cyclisierung des aktivierten Heptapeptid-hydrobromids in Pyridin [27]. Die Aufarbeitung des Cyclisierungsgemisches führte zu einer kristallinen Verbindung, welche sich physikalisch-chemisch als identisch mit natürlichem Evolidin erwies (Tabelle 1).

Sowohl beim synthetischen als auch beim natürlichen Evolidin wurde ein Dimorphismus beobachtet. Aus Alkohol kristallisierten beide in leicht hygroskopischen Nadeln, die keine reproduzierbaren RÖNTGEN-Spektren lieferten. Beide Substanzen kristallisierten aus Alkohol/Wasser in Prismen. Die RÖNTGEN-Beugungsdiagramme

Tabelle 1. Vergleich von synthetischem und natürlichem Evolidin

		natürlich	synthetisch
1. $[\alpha]_D^{25}$	(Äthanol)	-129,0° ( $c = 0,45$ )	-128,0° ( $c = 0,34$ )
2. Smp.	(aus Alkohol krist.)	278–280°	279–281°
	(aus Alkohol/Wasser krist.)	283–284°	283–284°
	Misch-Smp.	keine Depression	
3. Dünnschichtchromatogramm			
	Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1	Rf 0,82	Rf 0,82
	Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24	Rf 0,89	Rf 0,89
	Methanol	Rf 0,71	Rf 0,71
4. Molekulargewicht		770	770
5. IR.-Spektrum	C=O-Amid	6,07 $\mu$	6,07 $\mu$
	Amid-II-Bande	6,61 $\mu$	6,62 $\mu$
6. Mikroanalysen		$C_{38}H_{68}O_9N_8$ (770,9)	
		Ber. C 59,20%	Ber. C 59,20%
		„ H 7,58%	„ H 7,58%
		„ N 14,53%	„ N 14,53%
		Gef. C 58,91%	Gef. C 59,12%
		„ H 7,72%	„ H 7,69%
		„ N 14,66%	„ N 14,22%

## Erläuterungen zur Tabelle 1

ad. 1. Die Drehungsmessungen wurden in einem photoelektrischen Polarimeter mit Thermostat, das in unserer physiko-chemischen Abteilung durch Hrn. Dr. F. BURKHARDT entwickelt worden ist, durchgeführt.

ad. 3. Herstellung der Kieselgelplatten und Arbeitstechnik gemäss den Originalangaben von STAHL [28]. Entwicklung der Platten in  $J_2$ -Atmosphäre mit anschliessendem Besprühen mit Stärkelösung.

ad. 4. Die Molekulargewichte wurden von Hrn. Dr. W. VETTER in unserer physikochemischen Abteilung mit einem Massenspektrometer der ASSOCIATED ELECTRICAL INDUSTRIES, MS 9, bestimmt.

ad. 5. Die IR.-Spektren wurden von Hrn. Dr. L. H. CHOPARD-DIT-JEAN in Kaliumbromid (1 mg Substanz in 300 mg KBr) mit einem IR.-Spektrophotometer PERKIN-ELMER, Mod. 21, aufgenommen.

ad. 6. Alle Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung der Herren Dres. H. WALDMANN und A. DIRSCHERL ausgeführt.

dieser beiden Substanzen waren bis auf eine schwache Interferenz des synthetischen Evolidins bei 9,40 Å identisch in bezug auf die Lage der Interferenzen (Tabelle 2).

Die Pulverdiagramme nach DEBYE-SCHERRER wurden mit  $CuK_\alpha$ -Strahlung und einer PHILIPS-PW-1010/1050-RÖNTGEN-Feinstrukturanlage mit Zählrohrgoniometer aufgenommen. In der Tabelle 2 sind die Werte für die sechs grössten Netzebenenabstände angegeben. Die Interferenzen konnten auf Grund der Elementarzellenmessung von natürlichem Evolidin [2] indiziert und die entsprechenden Netzebenenabstände aus den Massen der Elementarzellen berechnet werden. Unsere Werte sind systematisch etwas höher als diejenigen von CURTIS [2], was auf eine verschiedene Eichung der Apparatur zurückzuführen ist.

Tabelle 2. *Netzebenenabstände in Å*

MILLER Indices	von uns gemessen an Evolidin, natürlich und synthetisch	nach CURTIS [2] berechnet
0, 0, 1	11,3 Å	10,9 Å
0, 1, 0	10,3	10,1
1, 0, 0	9,02	8,52
1, 1, 0	8,49	8,12
1, 0, 1	6,91	6,81
0, 1, 1	6,65	6,53

Unsere Werte wurden mit Quarz als Eichmaterial kontrolliert und stimmen auf 1,5%. Die Aufnahmen und Auswertungen verdanken wir Hrn. Dr. C. VON PLANTA aus unserer physikalischen Abteilung.

### Experimenteller Teil

#### A. Versuche zur Bestätigung der chemischen Konstitution des Naturproduktes

1. *Aminosäure-Zusammensetzung.* Ca. 5  $\mu$ Mol natürliches Evolidin wurden, wie früher beschrieben [29], totalhydrolysiert und das Hydrolysat nach Entfernung der Salzsäure in 1 ml Wasser gelöst. Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte durch kombinierte 2-dimensionale Hochspannungs-Papierlektrophorese (pH 2,5, 65 V  $\cdot$  cm<sup>-1</sup>, 45 Min.) und Papierchromatographie (*n*-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1, 16 Std.) von 5–10  $\mu$ l Hydrolysatlösung auf SCHLEICHER und SCHÜLL-Papier 2043 b, gewaschen. Die Pherogramme wurden mit Ninhydrin-Kupfer-Reagens entwickelt [30], die einzelnen Flecke ausgeschnitten, mit je 5 ml Methanol eluiert und bei 504 nm gemessen (BECKMAN B). Die Auswertung gegen eine gleich aufgetrennte und behandelte Vergleichslösung, enthaltend Leu/Ser/Phe/Pro/Val/Asp im Molverhältnis 2:1:1:1:1:1, ergab für alle Hydrolysatkomponenten Übereinstimmung innerhalb der Fehlergrenze ( $\pm$  10%).

Die separate papierchromatographische Prüfung auf Isoleucin im Laufmittel Methyläthylketon/Pyridin/Wasser 70:15:15 fiel negativ aus.

2. *Optische Konfiguration der Aminosäuren.* – a) *Inkubation mit L-Aminosäureoxydase* (Sigma Typ III; hochgereinigtes Pulver aus *Crotalus-adamanteus*-Gift). Ca. 3  $\mu$ Mol natürliches Evolidin wurden unter Normalbedingungen hydrolysiert und das von HCl vollständig befreite Totalhydrolysat in 0,4 ml Trispuffer pH 7,5 [6] gelöst. 0,2 ml dieser Lösung wurden mit 100  $\mu$ g L-Aminosäureoxydase versetzt und unter Sauerstoff 24 Std. bei 37° inkubiert. Die restlichen 0,2 ml Hydrolysatlösung (ohne Enzym) machten als Kontrolle alle Operationen mit. Nach abgeschlossener Inkubation wurden direkt je 2–10  $\mu$ l papierchromatographisch im Laufmittel *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 untersucht (Anfärbung mit Ninhydrinreagens). In der mit L-Aminosäureoxydase inkubierten Hydrolysatprobe wurden Leu, Phe und Val quantitativ oxydiert. Pro, Ser und Asp blieben intakt. (Nach GREENSTEIN [17] und eigenen Modellversuchen werden L-Pro, L-Ser und L-Asp durch L-Aminosäureoxydase nicht angegriffen.)

b) *Inkubation mit D-Aminosäureoxydase* (FLUKA, Rohprodukt). Die Totalhydrolyse wurde wie unter a) beschrieben durchgeführt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls wie bei a), jedoch in einem Pyrophosphatpuffer pH 8,4 nach BENDER & KREBS [31] und mit 500  $\mu$ g Enzym. Zudem wurde parallel eine äquimolare Menge authentisches D-Pro unter den gleichen Bedingungen mit D-Aminosäureoxydase inkubiert. Die D-Pro-Vergleichsprobe wurde dabei quantitativ oxydiert, während das Pro und die übrigen Aminosäuren im Hydrolysat intakt blieben.

c) Dass auch Ser und Asp(NH<sub>2</sub>) in der L-Form vorliegen, ergab sich aus *Versuchen mit Carboxypeptidase* an isolierten Bruchstücken der Partialhydrolyse (vgl. 4, d).

3. *Partialhydrolyse und Isolierung eines offenen Heptapeptides.* 50 mg natürliches Evolidin wurden in 25 ml konz. HCl suspendiert und unter Rühren 14 Std. auf 37° gehalten. Ein unlöslicher Anteil (unverändertes Ausgangsmaterial) wurde abgetrennt, das Filtrat bei 20° im Vakuum eingeengt und sofort 2mal aus Wasser lyophilisiert. Eine eingehende dünnschichtchromatographische Prüfung in verschiedenen Laufmitteln ergab Anhaltspunkte für die Wahl eines geeigneten Lösungsmittelsystems zur Auftrennung des Partialhydrolysates mittels multiplikativer

Verteilung nach CRAIG: Verwendet wurde das Lösungsmittelgemisch *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 600:150:75:675 (*v/v*) in einer vollautomatischen Apparatur mit 5-ml-Elementen. Nach 130 Stufen wurde durch Eindampfen der einzelnen Gläscheninhalte eine Gewichtskurve erstellt. Sie ergab im wesentlichen fünf gut aufgetrennte Maxima. Sämtliche Einzelfractionen wurden dünn-schichtchromatographisch in verschiedenen Laufmitteln untersucht und nur die plattenchromatographisch einheitlichen Gipfel-fractionen zur Sequenzanalyse verwendet.

4. *Struktur der Verteilungsfraction mit  $K = 2,7$ .* – a) *Aminosäurezusammensetzung.* Ca. 500  $\mu\text{g}$  der Fraction mit dem Verteilungskoeffizient  $K = 2,7$  wurden mit 30  $\mu\text{l}$  6N HCl in ein Kapillarröhrchen übergeführt und 24 Std. auf 110° erhitzt. Die papierchromatographische Auftrennung des Totalhydrolysates in den Laufmitteln *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 und Methyläthylketon/Pyridin/Wasser 70:15:15 ergab die Anwesenheit aller Evidin-Aminosäuren im gleichen Mol-verhältnis wie in der mitchromatographierten, künstlichen Vergleichslösung (s. A. 1).

b) *Ermittlung der N-terminalen Aminosäure nach SANGER.* Ca. 800  $\mu\text{g}$  Peptid wurden in 0,2 ml 1-proz. wässrigem Trimethylamin gelöst und mit einer Lösung von 20  $\mu\text{l}$  1-Fluor-2,4-dinitrobenzol in 0,3 ml Äthanol versetzt. Das Gemisch wurde 2 Std. im Dunkeln bei Raumtemperatur und konstantem pH (8–10) gerührt, anschliessend 3mal mit ca. dem gleichen Volumen Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit 20  $\mu\text{l}$  2N HCl versetzt, noch einmal im Vakuum zur Trockne eingedampft und anschliessend das Dinitrophenol durch Sublimation im Hochvakuum bei 60° entfernt. Das DNP-Peptid wurde mit 30  $\mu\text{l}$  6N HCl in ein Kapillarröhrchen übergeführt und 12 Std. bei 105° hydrolysiert. Nach Verdünnen des Hydrolysates mit 0,5 ml Wasser erfolgte die Extraktion der DNP-Aminosäure durch 3maliges Ausschütteln mit je ca. 0,5 ml Äther. Die vereinigten Ätherextrakte wurden 3mal mit je 0,5 ml Wasser gewaschen und durch Aufblasen von  $\text{N}_2$  auf ca. 0,3–0,5 ml konzentriert. Diese Lösung diente zur direkten dünn-schichtchromatographischen Identifizierung der DNP-Aminosäure auf luftgetrockneten Kieselgel-G-Platten. Laufmittel: *n*-Butanol, gesättigt mit 0,25-proz. Ammoniak; Benzol/Pyridin/Eisessig 160:40:4 (*v/v*) [32]; Methylenchlorid/abs. Methanol/Eisessig 190:10:2 (*v/v*). – Auf allen Platten wurden die entsprechenden authentischen DNP-Aminosäuren sowie die möglichen Zersetzungs- und Nebenprodukte DNP-OH und DNP-NH<sub>2</sub> mitchromatographiert. Als einzige N-terminale Aminosäure konnte eindeutig Ser als DNP-Ser identifiziert werden.

c) *EDMANSCHER Abbau* [5]. Die experimentelle Durchführung bis und mit Extraktion der PTH-Aminosäuren erfolgte weitgehend nach der Vorschrift von H. FRAENKEL-CONRAT *et al.* [33]. Eingesetzt wurden ca. 700  $\mu\text{g}$ . Bei der Umsetzung mit Phenylsenföhl wurde der pH-Wert von 8,9 mit Hilfe des Radiometertitrators konstant gehalten (0,01N NaOH). Der Ringschluss und die Abspaltung der PTH-Aminosäure erfolgte immer in 3N HCl während 3 Std. bei Raumtemperatur. Die mit Essigester extrahierten PTH-Aminosäuren wurden dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel G mit Hilfe reiner Vergleichspräparate identifiziert. Die Analysenextrakte wurden jeweils in 0,2 ml abs. Äthanol gelöst und Konzentrationsreihen von 1–6  $\mu\text{l}$  aufgetragen; von den Vergleichspräparaten wurden Mengen von 0,05–0,2  $\mu\text{g}$  mitchromatographiert. Laufmittel:

Methylenchlorid/Essigester 99:1	} Trennung aller Evidin-PTH-Aminosäuren
Benzol/Essigester 80:20	
Chloroform/abs. Methanol 143:7	Differenzierung PTH-Ser/PTH-Phe

Die fertigen Plattenchromatogramme wurden zuerst mit 0,5-proz. Stärkelösung und (nach kurzem Trocknen) mit Jodazid [34] besprüht.

Ergebnisse:

1. Stufe: PTH-Phe (+ + +) Nebenflecke: Spur PTH-Leu und unbekannte Artefakte
2. Stufe: PTH-Phe (+ + + +) Nebenflecke: Spur PTH-Leu
3. Stufe: PTH-Leu (+ + + +) Nebenflecke: Spur PTH-Phe
4. Stufe: PTH-Pro (+ + +) Nebenflecke: keine
5. Stufe: PTH-Val (+ + + +) Nebenflecke: keine
6. Stufe: nicht mehr eindeutig interpretierbar.

Das nach der DNP-Methode eindeutig als N-terminale Aminosäure identifizierte Ser konnte hier nicht erfasst werden. Die unbekanntes Nebenflecke bei der 1. Stufe stellen wahrscheinlich Zersetzungsprodukte des PTH-Ser dar, dessen Labilität bekannt ist [33]. Nach den konventio-

nellen Methoden zur präparativen Darstellung von PTH-Aminosäuren [5] [32] erhält man ebenfalls kein einheitliches, definiertes PTH-Ser. Ein analysenreines, in Lösung ziemlich stabiles PTH-Ser-Vergleichspräparat erhielten wir nach der Vorschrift von CHERBULIEZ *et al.* [14].  $\epsilon_{max}$  268 nm = 14000 (Feinsprit). Smp. 163–164°.

$C_{10}H_{10}O_2N_2S$	Ber. C 54,04	H 4,54	N 12,61	S 14,42%
(222,26)	Gef. „ 54,17	„ 4,47	„ 12,72	„ 14,67%

Durch Übertragung der präparativen Methode von CHERBULIEZ [14] in den analytischen Maßstab konnten wir auch beim Evolidin-Heptapeptid PTH-Ser in der 1. Stufe eindeutig erfassen.

d) *Einwirkung von Carboxypeptidase* (5mal krist., wässrige Suspension, MANN RESEARCH LAB., New York). Ca. 1 mg Peptid wurde in 0,5 ml pH 8-Puffer (0,05M Ammoniumacetat + 0,05M NaHCO<sub>3</sub>) gelöst und mit 10  $\mu$ l Carboxypeptidase-Suspension bei 25° inkubiert. Nach 1, 2, 4, 8 und 24 Std. wurden aliquote Proben von 0,1 ml entnommen, mit Ameisensäure angesäuert, im Vakuum eingedampft, in 0,05 ml Wasser gelöst und je 2  $\mu$ l dünnschichtchromatographisch untersucht (Kieselgel G, *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1). Bereits nach 1 Std. waren<sup>1</sup> gleichzeitig freies Leucin und Asparagin nachweisbar. In der 24-Std.-Probe erschien erstmals freies Valin.

Die Reihenfolge am C-Ende konnte eindeutig durch Inkubation mit Carboxypeptidase bei 0° ermittelt werden: Nach  $\frac{1}{2}$ , 1 und 2 Std. Einwirkung wurde nur Leucin freigesetzt; Asparagin konnte erst nach 4–8 Std. Inkubation bei 0° nachgewiesen werden. Weiterführung der Inkubation bei 25° führte darauf ebenfalls zur Freisetzung von Valin.

e) *Bestimmung der C-terminalen Aminosäure nach AKABORI* [15]. Ca. 1,6 mg wurden in einem Glühröhrchen mit 0,6 ml wasserfreiem Hydrazin (Darstellung nach BRAUNITZER [35]) gelöst, das Röhrchen wurde zugeschmolzen und 4 Std. im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Lösung wurde anschliessend sofort im Vakuum über konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zur Trockne gebracht, der Rückstand in ca. 1 ml Wasser aufgenommen, 1 ml Benzaldehyd zugefügt und 1 Std. gerührt. Gleich anschliessend wurde filtriert, die obere (wässrige) Phase abgetrennt, die untere (Benzaldehyd)-Phase 2mal mit je 0,3 ml Wasser ausgeschüttelt, die vereinigten wässrigen Phasen 3mal mit Äther gewaschen und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,1 ml Wasser gelöst und Proben von 1–3  $\mu$ l zur chromatographischen Identifizierung eingesetzt. Eine analoge Hydrazinolyse wurde parallel mit 1,6 mg des synthetischen Heptapeptides H · Ser-Phe-Leu-Pro-Val-Asp(NH<sub>2</sub>)-Leu · OH durchgeführt. In beiden Fällen wurden äquimolare Mengen freies Leucin (Vergleich der Ninhydrinfärbung,  $\pm$  20%) als einzige C-terminale Aminosäure gefunden.

## B. Synthese<sup>5)</sup>

1. *L-Leucin-t-butylester, HCl (I)*. L-Leucin-t-butylester wurde nach ANDERSON *et al.* [19] dargestellt. 1,87 g (0,01 Mol) des öligen Esters wurden in 100 ml Äther gelöst, auf –20° gekühlt und mit 5 ml 2N HCl/Methanol (0,01 Mol) versetzt, wobei langsam das Hydrochlorid des L-Leucin-t-butylesters auskristallisiert. Es wird abgenutscht, mit Äther gewaschen, getrocknet und aus Methanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute 2 g (90%). Smp. 173°.  $[\alpha]_D^{25} = +11^\circ$ .

$C_{10}H_{22}O_2NCl$  (223,7) Ber. C 53,68 H 9,91 Cl 15,85% Gef. C 53,82 H 10,01 Cl 15,88%

2. *Z-L-Asparaginyll-L-leucin-t-butylester (II)*. 3,87 g (0,01 Mol) Z-L-Asparagin-*p*-nitrophenylester [20] und 2,27 g (0,01 Mol) L-Leucin-t-butylester-hydrochlorid (I) werden zusammen in 20 ml Dimethylformamid gelöst, auf 0° gekühlt und mit 1,4 ml (0,01 Mol) Triäthylamin versetzt. Die Reaktion wird 2 Std. in Eis und anschliessend über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Fällen mit Eiswasser wird abgenutscht, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 4,3 g (80%). Smp. 130–131°.  $[\alpha]_D^{23} = -17,7^\circ$ .

$C_{22}H_{33}O_6N_3$  (435,5) Ber. C 60,67 H 7,64 N 9,65% Gef. C 60,71 H 7,67 N 9,79%

3. *L-Asparaginyll-L-leucin-t-butylester (III)*. 4,85 g (0,011 Mol) Z-L-Asparaginyll-L-leucin-t-butylester (II) werden in 50 ml Methanol gelöst und über Pd/C hydriert. Nach vollständiger

<sup>5)</sup> Die Smp. wurden auf einem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Drehungen wurden in Dimethylformamid bei  $c = 2$  bestimmt; Fehlergrenze  $\pm 2^\circ$ . Für die sorgfältige Mitarbeit danken wir Herrn K. SCHWEIZER.

Hydrierung wird vom Katalysator abgenutscht, zur Trockne verdampft und aus Äther/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 2,9 g (90%). Smp. 75–77°.  $[\alpha]_D^{23} = -26^\circ$ .

$C_{14}H_{27}O_4N_3$  (301,38) Ber. C 55,79 H 9,03 N 13,94% Gef. C 55,80 H 8,96 N 14,00%

4. *Z-L-Valyl-L-asparaginyll-L-leucin-t-butylester* (IV). 2,9 g (0,01 Mol) *L*-Asparaginyll-L-leucin-*t*-butylester (III) werden in 20 ml Dimethylformamid gelöst, in Eis gekühlt und mit einer eiskalten Lösung von 3,7 g (0,01 Mol) *Z-L*-Valin-*p*-nitrophenylester [21] in 20 ml Dimethylformamid versetzt. Die Lösung wird 1 Std. in Eis gerührt und darauf über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird mit Eiswasser gefällt, abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und anschließend aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 4,25 g (80%). Smp. 205–206°.  $[\alpha]_D^{23} = -21,4^\circ$ .

$C_{27}H_{42}O_7N_4$  (534,6) Ber. C 60,65 H 7,92 N 10,48% Gef. C 60,78 H 7,88 N 10,70%

5. *L-Valyl-L-asparaginyll-L-leucin-t-butylester* (V). 34 g (0,064 Mol) *Z-L*-Valyl-L-asparaginyll-L-leucin-*t*-butyl-ester (IV) werden in 500 ml Methanol gelöst und über Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert und zur Trockne verdampft. Die Substanz wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 24,2 g (95%). Smp. 152–154°.  $[\alpha]_D^{24} = -37,5^\circ$ .

$C_{19}H_{36}O_5N_4$  (400,5) Ber. C 56,98 H 9,06 N 13,99% Gef. C 56,55 H 9,03 N 13,75%

6. *Z-L-Prolyll-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin-t-butylester* (VI). 22 g (0,055 Mol) *L*-Valyl-L-asparaginyll-L-leucin-*t*-butyl-ester (V) werden in 100 ml Dimethylformamid gelöst, auf 0° gekühlt und mit einer eiskalten Lösung von 20,2 g (0,055 Mol) *Z-L*-Prolin-*p*-nitrophenylester [20] versetzt. Die Lösung wird 1 Std. bei 0° und 15 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dann wird mit Eiswasser gefällt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird aus Dimethylformamid/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 24,2 g (70%). Smp. 218–219°.  $[\alpha]_D^{23} = -41,2^\circ$ .

$C_{32}H_{49}O_8N_5$  (631,7) Ber. C 60,93 H 7,81 N 11,08% Gef. C 61,14 H 7,96 N 11,02%

7. *L-Prolyll-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin-t-butylester* (VII). 18,9 g (0,03 Mol) *t*-Butylester VI werden in 150 ml Eisessig gelöst und über Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abgenutscht und zur Trockne verdampft. Der ölige Rückstand wird mit Äther verrieben, wobei Erstarrung eintritt. Nach Abnutschen und Waschen mit Äther wird in wenig Methanol gelöst und mit eiskaltem, verdünntem Ammoniak gefällt, abgenutscht, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 12 g (80%). Smp. 198°.  $[\alpha]_D^{24} = -40,6^\circ$ .

$C_{24}H_{43}O_6N_5$  (497,6) Ber. C 57,92 H 8,71 N 14,08% Gef. C 58,11 H 8,88 N 13,92%

8. *Z-L-Leucyl-L-prolyll-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin-t-butylester* (VIII). 5 g (0,01 Mol) *t*-Butylester VII werden in 40 ml Dimethylformamid gelöst, in Eis gekühlt und mit einer eiskalten Lösung von 4 g (0,01 Mol) *Z-L*-Leucin-*p*-nitrophenylester [21] in 10 ml Dimethylformamid versetzt. Die Lösung wird 1 Std. in Eis gerührt und darauf über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Konzentrieren wird in Essigester gelöst, mit eiskalter 5-proz. Zitronensäure, Wasser, 5-proz.  $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Die Substanz wird aus Essigester/Petroläther umgefällt. Ausbeute 5,6 g (75%). Smp. 157–159°.  $[\alpha]_D^{24} = -51,6^\circ$ .

$C_{38}H_{60}O_9N_6$  (744,9) Ber. C 61,27 H 8,12 N 11,28% Gef. C 61,18 H 8,30 N 11,25%

9. *L-Leucyl-L-prolyll-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin-t-butylester* (IX). 7,45 g (0,01 Mol) *t*-Butylester VIII werden in 100 ml Methanol gelöst und über Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert und zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird aus Aceton/Äther/Petroläther umgefällt. Ausbeute 5,5 g (90%). Smp. 110–111°.  $[\alpha]_D^{25} = -53,5^\circ$ .

$C_{30}H_{54}O_7N_6$  (610,8) Ber. C 58,99 H 8,91 N 13,76% Gef. C 59,04 H 8,95 N 13,43%

10. *Z-L-Phenylalanyl-L-leucyl-L-prolyll-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin-t-butylester* (X). 15,5 g (0,022 Mol) *t*-Butylester IX werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst, in Eis gekühlt und mit einer eiskalten Lösung von 9,2 g (0,022 Mol) *Z-L*-Phenylalanin-*p*-nitrophenylester [22] in 50 ml Dimethylformamid vereinigt. Die Lösung wird 2 Std. in Eis und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Versetzen mit Eiswasser wird abgenutscht, mit eiskalter 5-proz. Zitronensäure, Wasser, 5-proz.  $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen und getrocknet. Das Hexapeptid wird aus Methanol/Wasser umgefällt. Ausbeute 19,5 g (80%). Smp. 184–186°.  $[\alpha]_D^{24} = -47,4^\circ$ .

$C_{47}H_{69}O_{10}N_7$  (892,0) Ber. C 63,27 H 7,79 N 10,99% Gef. C 63,04 H 8,03 N 11,18%

11. *L-Phenylalanyl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin-t-butylester (XI)*. 17,8 g (0,02 Mol) *t*-Butylester X werden in 300 ml Methanol gelöst und über Pd/C hydriert. Darauf wird vom Katalysator abfiltriert und zur Trockne verdampft. Die Substanz wird aus Aceton/Äther/Petroläther umgefällt. Ausbeute 13,6 g (90%). Smp. 98–100°.  $[\alpha]_D^{25} = -69,5^\circ$ . Die Substanz hält hartnäckig etwas Aceton zurück.

$C_{39}H_{63}O_8N_7$  (757,9) Ber. C 61,80 H 8,38 N 12,94% Gef. C 61,91 H 8,50 N 12,48%

12. *Z-L-Seryl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin-t-butylester (XII)*. 1 g (0,004 Mol) Z-L-Serin-hydrazid [23] wird in 11 ml Wasser suspendiert, mit 0,85 ml Eisessig und 0,28 ml konz. HCl in Lösung gebracht und bei 0° mit 410 mg Natriumnitrit in 5 ml Wasser versetzt. Nach 5 Min. Rühren wird das Azid mit 50 ml eiskaltem Essigester extrahiert, dieser 2mal mit Eiswasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zu einer eiskalten Lösung von 3 g (0,004 Mol) *L*-Leucyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin-*t*-butylester (XI) in 50 ml Dimethylformamid filtriert. Die Lösung wird darauf über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Nach Abdestillieren des Essigesters wird mit Eiswasser versetzt, der Niederschlag abgenutscht, mit eiskalter 5-proz. Zitronensäure, Wasser, 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen und getrocknet. Das Heptapeptid wird aus Methanol/Wasser umgefällt. Ausbeute 2,4 g (62%). Smp. 189–190°.  $[\alpha]_D^{25} = -45,5^\circ$ .

$C_{30}H_{74}O_{12}N_8$  (979,1) Ber. C 61,33 H 7,62 N 11,44% Gef. C 61,33 H 7,87 N 11,72%

13. *Z-L-Seryl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin (XIII)*. 3,5 g (0,0036 Mol) geschütztes Heptapeptid XII werden mit 7 ml Trifluoressigsäure [24] übergossen und 30 Min. bei Raumtemperatur gerührt, wobei vollständige Lösung eintritt. Darauf wird mit eiskaltem Äther versetzt, der Niederschlag abgenutscht und mit viel Äther gewaschen. Die erhaltene Heptapeptidsäure wird 1mal aus Dimethylformamid/Äther und 1mal aus Dimethylformamid/Wasser umgefällt. Ausbeute 3,3 g (90%). Smp. 185–190°.  $[\alpha]_D^{25} = -47,3^\circ$ .

$C_{46}H_{66}O_{12}N_8$  (923,0) Ber. C 59,85 H 7,21 N 12,14% Gef. C 59,67 H 7,23 N 11,80%

14. *Z-L-Seryl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin-p-nitrophenylester (XIV)*. 3,1 g (0,0034 Mol) Hexapeptidsäure XIII werden in 8 ml Pyridin gelöst, mit 1,9 g (0,0068 Mol) Di-*p*-nitrophenyl-sulfit [25] versetzt und 15 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt, wobei eine feste Masse entsteht. Diese wird mit Äther verrieben, abgenutscht und mit viel Äther gewaschen. Die Substanz wird zur Entfernung von überschüssigem *p*-Nitrophenol verschiedene Male mit Äther/Petroläther 1:1 verrieben und am Schluss aus Dimethylformamid/Äther umgefällt. Ausbeute 3 g. Die Reinheit des Z-Heptapeptid-*p*-nitrophenylesters wurde spektroskopisch [27] zu ca. 70% bestimmt. Er wurde ohne weitere Reinigung direkt weiter eingesetzt.

15. *L-Seryl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucin-p-nitrophenylester, HBr (XV)*. 2,6 g Z-Hexapeptid-*p*-nitrophenylester XIV werden in einem Gemisch von 11 ml Trifluoressigsäure und 0,25 ml Wasser gelöst. Bei 0° wird darauf unter Rühren während 1 Std. HBr-Gas eingeleitet und anschliessend das Hydrobromid durch Zusatz von eiskaltem Äther gefällt. Der Niederschlag wird abgenutscht, mit viel Äther gewaschen und getrocknet. Das leicht hygroscopische Produkt (2,2 g) wird direkt zur Cyclisierung verwendet.

16. *Cyclo-(L-seryl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-valyl-L-asparaginyll-L-leucyl-)* (XVI). Das Hydrobromid XV (2,2 g) wird in 100 ml Dimethylformamid gelöst und innerhalb 4 Std. unter kräftigem Rühren bei 55° in 800 ml Pyridin eingetropf. Die Lösung wird noch 15 Std. bei 55° gehalten und dann zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit Eiswasser versetzt und die feste Masse abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Darauf wird in wenig Äthanol gelöst und stehengelassen, wobei Evolidin langsam auskristallisiert. Es wird abgenutscht und aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Die analytische Charakterisierung dieses Produktes und sein Vergleich mit natürlichem Evolidin sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Ausbeute 280 mg (23%), bezogen auf 70% *p*-Nitrophenylester.

17. *O-Acetyl-evolidin (XVII)*. 60 mg Evolidin (XVI) und 60 mg wasserfreies Natriumacetat werden mit 1,4 ml Acetanhydrid 4 Std. auf dem Dampfbad erhitzt [2]. Darauf wird zur Trockne verdampft, mit wenig Eiswasser versetzt und die anfallende Substanz abgenutscht. Sie wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 40 mg. Smp. 250–252° (Lit. [2]: 248–250°).

$C_{40}H_{60}O_{10}N_8$  (812,9) Ber. C 59,09 H 7,44 N 13,78% Gef. C 59,02 H 7,60 N 13,64%

## SUMMARY

The structure proposed for Evolidine, a cyclic heptapeptide isolated from the leaves of *Evodia xanthoxyloides*, is confirmed by degradation of the natural product and by synthesis.

Chemische Forschungsabteilung der  
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. K. HUGHES, K. G. NEILL & E. RITCHIE, Austral. J. agric. Res. 1952, A5, 401.
- [2] F. W. EASTWOOD, G. K. HUGHES & E. RITCHIE, Austral. J. Chemistry 8, 552 (1955).
- [3] H. D. LAW, I. T. MILLAR, H. D. SPRINGALL & A. J. BIRCH, Proc. chem. Soc. 1958, 198; H. D. LAW, I. T. MILLAR & M. D. SPRINGALL, J. chem. Soc. 1961, 279.
- [4] F. SANGER, Biochem. J. 39, 507 (1945); F. SANGER & E. O. P. THOMPSON, *ibid.* 53, 353 (1953).
- [5] P. EDMAN, Acta chem. scand. 4, 277, 283 (1950).
- [6] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER, Erika BÖHNI & B. FUST, Helv. 46, 2823 (1963).
- [7] M. BODÁNSZKY, Nature 175, 685 (1955).
- [8] R. O. STUDER, unveröffentlichte Versuche.
- [9] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER & ERIKA BÖHNI, Experientia 20, 365 (1964).
- [10] J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, «Chemistry of the Amino Acids», John Wiley & Sons, Inc., London 1961, p. 1048.
- [11] D. T. GISH, P. G. KATSOYANNIS, G. P. HESS & R. J. STEDMAN, J. Amer. chem. Soc. 78, 5954 (1956); C. RESSLER, *ibid.* 78, 5956 (1956); M. BODÁNSZKY & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* 81, 5688 (1959).
- [12] TH. CURTIUS, Ber. deutsch. Chem. Ges. 35, 3226 (1902).
- [13] H. NESVADBA & G. T. YOUNG, Tetrahedron Letters 1963, 361.
- [14] E. CHERBULIEZ, J. MARZALEK & J. RABINOWITZ, Helv. 46, 1445 (1963).
- [15] S. AKABORI, K. OHNO & K. NARITA, Bull. chem. Soc. Japan 25, 214 (1952).
- [16] J. I. HARRIS, R. D. COLE & N. G. PON, Biochem. J. 62, 154 (1956); P. DESNUELLE & A. CASAL, Biochim. biophysica Acta 2, 64 (1948); P. DESNUELLE & G. BONJOUR, *ibid.* 7, 451 (1951); A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN & R. L. M. SYNGE, Biochem. J. 35, 1369 (1941).
- [17] Ref. [10], p. 1785.
- [18] Ref. [10], p. 1782.
- [19] G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, J. Amer. chem. Soc. 82, 3359 (1960).
- [20] M. BODÁNSZKY & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 81, 5688 (1959).
- [21] B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, Helv. 40, 373 (1957).
- [22] M. BODÁNSZKY & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 81, 6072 (1959).
- [23] J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry 146, 463 (1942).
- [24] R. SCHWYZER & W. RITTEL, Helv. 44, 159 (1961).
- [25] B. ISELIN & R. SCHWYZER, Helv. 43, 1760 (1960).
- [26] ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, Helv. 42, 1257 (1959).
- [27] R. SCHWYZER & P. SIEBER, Helv. 40, 624 (1957).
- [28] E. STAHL, «Arbeitsvorschrift für Dünnschichtchromatographie», herausgegeben von der Firma C. DESAGA, GmbH., Heidelberg.
- [29] R. O. STUDER, W. LERGIER & K. VOGLER, Helv. 46, 612 (1963).
- [30] K. RÖWE, E. FERBER & H. FISCHER, Z. physiol. Chem. 313, 174 (1958).
- [31] A. E. BENDER & H. A. KREBS, Biochem. J. 46, 210 (1950).
- [32] M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. PATAKI, Experientia 17, 145 (1961).
- [33] H. FRAENKEL-CONRAT & J. I. HARRIS, J. Amer. chem. Soc. 76, 6058 (1954); «Methods of Biochemical Analysis», Vol. 2, S. 386.
- [34] P. EDMANN & J. SJÖQUIST, Acta chem. scand. 10, 1507 (1956).
- [35] G. BRAUNITZER, Chem. Ber. 88, 2025 (1955).