

- [37] K. SCHAFFNER, *Adv. Photochemistry* 4, 81 (1966) [Ed.: W. A. NOYES, JR., G. S. HAMMOND & J. N. PITTS, JR., Interscience, New York]; O. L. CHAPMAN, J. B. SIEJA & W. J. WELSTEAD, JR., *J. Amer. chem. Soc.* 88, 161 (1966); H. E. ZIMMERMAN, R. G. LEWIS, J. J. McCULLOUGH, A. PADWA, S. W. STALEY & M. SEMMELHACK, *ibid.* 88, 1965 (1966).
- [38] D. E. POEL, H. WEHRLI, K. SCHAFFNER & O. JEGER, *Chimia* 20, 110 (1966).
- [39] P. L. JULIAN, E. W. MEYER, W. J. KARPEL & I. R. WALLER, *J. Amer. Soc.* 72, 5145 (1950).
- [40] E. F. ULLMAN & W. A. HENDERSON, JR., *J. Amer. chem. Soc.* 86, 5050 (1964), und frühere Arbeiten; J. M. DUNSTON & P. YATES, *Tetrahedron Letters* 1964, 505; A. PADWA, *ibid.* 1964, 813; H. E. ZIMMERMAN & R. D. SIMKIN, *ibid.* 1964, 1847; A. PADWA & R. HARTMAN, *ibid.* 1966, 2277.
- [41] G. BOZZATO, K. SCHAFFNER & O. JEGER, *Chimia* 20, 114 (1966).
- [42] G. QUINKERT, *Angew. Chem.* 77, 229 (1965); *Angew. Chem. (Internat. Ed.)* 4, 211 (1965).

## 260. Strukturspezifischer Abbau von Polypeptid-Metall-Komplexen

### IV.1) Abbau des Ni<sup>2+</sup>-Polymyxin-B-Komplexes durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>2)</sup>

von H. Ch. Curtius, P. Anders, R. Zell<sup>3)</sup>, H. Sigel und H. Erlenmeyer

(2. IX. 66)

Der Cu<sup>2+</sup>- bzw. Ni<sup>2+</sup>-1:1-Komplex [2] von Polymyxin B wird – wie wir bereits früher gezeigt haben [3] – in schwach alkalischem Milieu durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abgebaut; diese beiden Komplexe katalysieren auch den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zerfall [4].

Beide Reaktionsarten haben gemeinsam, dass für ihren Ablauf die Ausbildung eines ternären Peroxokomplexes Voraussetzung ist [1] [5]. Da nun in der Regel die Koordinationszahl bei Ni<sup>2+</sup> 6 und bei Cu<sup>2+</sup> 4 beträgt, weisen die beiden Metall-Ionen unterschiedliche Möglichkeiten zur Ausbildung des «aktiven» Peroxokomplexes [1] auf; es ist deshalb interessant, die «Bruchstücke» aus dem Ni<sup>2+</sup>-Polymyxin-Abbau<sup>4)</sup> zu untersuchen und mit den bereits bekannten des Abbaus des Cu<sup>2+</sup>-Komplexes [7] zu vergleichen.

1. *Abbau des Ni<sup>2+</sup>-Polymyxin-B-Komplexes*: Die «Bruchstücke» des Polymyxins lassen sich durch Ionenaustauscher-Chromatographie (Tab. 1), Dünnschicht-Chromatographie (Tab. 2) und Hochspannungselektrophorese (Tab. 3) trennen. Die in den Fraktionen enthaltenen Abbau-Peptide wurden totalhydrolysiert und Art bzw. Gehalt der einzelnen Aminosäuren durch STEIN & MOORE-Analyse bestimmt. Die vier am Aufbau des Polymyxin B beteiligten Aminosäuren finden sich in den einzelnen Fraktionen in wechselndem Verhältnis wieder (Tab. 1–3). Die meisten der Aminosäure-Verhältnisse wurden bei zwei oder drei voneinander unabhängigen Trennungsmethoden (bzw. Versuchen) jeweils gleich gefunden.

<sup>1)</sup> III = [1].

<sup>2)</sup> 11. Mitteilung über «Metall-Ionen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>»; 10. Mitteilung = [1].

<sup>3)</sup> Gegenwärtige Adresse: Department of Chemistry, University of Oregon, Eugene, Oregon, USA.

<sup>4)</sup> Ein «gealterter» und ein frisch bereiteter Ni<sup>2+</sup>-Polymyxin-Komplex [6] lieferten nach dem Abbau auf dem Dünnschichtchromatogramm dieselben Flecke.

Bei einem der Ionenaustauscher-Chromatographie-Versuche wurden die Hydrolysenprodukte der Fraktionen durch Gas-Chromatographie noch qualitativ auf das Vorhandensein der Fettsäure MOS<sup>5)</sup> untersucht (Tab. 1).

Tabelle 1. *Ionenaustauscher-Chromatographie (IA)*: Gehalt der IA-Frak-tionen 3 bis 6 an Aminosäuren in  $\mu\text{Mol}$ ; in Klammern die berechnete Zahl der jeweiligen Aminosäuremolekeln im betreffenden Peptid

Versuch Nr.	IA-Fraktion Nr. <sup>a)</sup>	Dab <sup>5)</sup>	Thr	Leu	Phe	MOS <sup>5)</sup> <sup>b)</sup>	Gesamtzahl der Aminosäuren	Peptid
I	3	0,292 (4-5)	0,144 (2)	0,042 (1)	0,032 (1)	-	8-9	D
	4	0,536 (6)	0,098 (2)	0,050 (1)	0,036 (1)	-		
	5	0,580 (2)	0,302 (1)	0,038	0,028	+	3 + MOS	K
	6	0,840 (1 ?)	0,050	0,037	0,022	+	1 + MOS	L
II	3	0,112 (4)	0,060 (2)	0,014 (1)	0,010 (1)		8	D
	4	0,228 (6)	0,060 (2)	0,020 (1)	0,014 (1)		10	B
	5	0,132 (2)	0,062 (1)	0,012	0,008		3 + MOS <sup>26)</sup>	K
	6	+	-	-	-		1 + MOS <sup>26)</sup>	L

<sup>a)</sup> Die nicht untersuchten IA-Frak-tionen waren dünn-schichtchromatographisch uneinheitlich.

<sup>b)</sup> Die Probe auf MOS erfolgte gas-chromatographisch.

Tabelle 2. *Dünn-schicht-Chromatographie (DC)*: Gehalt der DC-Frak-tionen 1 bis 7 an Aminosäuren in  $\mu\text{Mol}$ ; in Klammern die berechnete Zahl der jeweiligen Aminosäuremolekeln im betreffenden Peptid

DC-Fraktion Nr.	Dab <sup>5)</sup>	Thr	Leu	Phe	Gesamtzahl der Aminosäuren	Peptid
1	0,047 (2)	0,031 (1)	0,023 (1)	0,010	4	J
2	0,467 (4-5)	0,219 (2)	0,121 (1)	0,094 (1)		
3	0,291 (6)	0,118 (2)	0,073 (1)	0,055 (1)	10 + MOS <sup>26)</sup>	A
4	0,226 (4)	0,109 (2)	0,070 (1)	0,053 (1)	8	D
5	0,225 (4)	0,086 (1)	0,065 (1)	0,051 (1)	7	E oder F
6	0,150 (3)	0,060 (1)	0,051 (1)	0,037 (1)	6	H
7	0,059 (2)	0,033 (1)	0,029 (1)	0,015 (1)	5	I

<sup>5)</sup> Dab = L- $\alpha$ , $\gamma$ -Diaminobuttersäure; MOS = (+)-6-Methyloctansäure (= Isopelargonsäure); das verwendete Polymyxin war ein Gemisch aus B<sub>1</sub> (Fettsäure: MOS) und B<sub>2</sub> (Fettsäure: 6-Methylheptansäure). Zur Struktur und Synthese von Polymyxin B vgl. [8].

<sup>6)</sup> Das Vorhandensein von MOS wurde in diesen Fällen nicht überprüft.

Tabelle 3. *Hochspannungselektrophorese (HE)*: Gehalt der HE-Fractionen 1 bis 6 an Aminosäuren in  $\mu\text{Mol}$ ; in Klammern die berechnete Zahl der jeweiligen Aminosäuremolekeln im betreffenden Peptid

HE-Fraktion Nr.	Dab <sup>5)</sup>	Thr	Leu	Phe	Gesamtzahl der Aminosäuren	Peptid
1	+	—	—	—	1 + MOS ? <sup>6)</sup>	L
2	0,039 (2)	0,021 (1)	0,008	0,003	3	K
3	0,044 (4)	0,009 (1)	0,007 (1)	0,002	6	G
4	0,096 (6)	0,035 (2)	0,016 (1)	0,009 (1)	10 + MOS ? <sup>6)</sup>	A
5	0,061 (6)	0,022 (2)	0,013 (1)	0,006 (1)	10	B
6	0,061 (4)	0,015 (1)	0,010 (1)	0,008 (1)	7	E oder F

Die in den einzelnen Fraktionen aufgefundenen Aminosäure-Reste sind ohne Zweifel Teile einer zusammenhängenden Kette. Demnach lässt sich – unter der Annahme, dass die Oligopeptide mit einer kleineren Gesamtzahl von Bausteinen aus solchen mit einer höheren Gesamtzahl von Bausteinen hervorgegangen sind – für den Abbau die in der Figur dargestellte Reihenfolge formulieren<sup>7)</sup>.

Vergleicht man die vorgeschlagenen Reaktionsfolgen für den Abbau des  $\text{Cu}^{2+}$ - [7] und des  $\text{Ni}^{2+}$ -Polymyxin-1:1-Komplexes miteinander, so ist die Ähnlichkeit der beiden Reaktionsverläufe augenfällig. Der Hauptunterschied ist wohl in den «Verzweigungen» des Reaktionsablaufes beim  $\text{Ni}^{2+}$ -Polymyxin-Komplex zu sehen (vgl. Figur). Diese grössere Zahl von Reaktionsmöglichkeiten des  $\text{Ni}^{2+}$ -Komplexes hängt wohl mit der bereits erwähnten grösseren Koordinationszahl (KZ) dieses Metall-Ions zusammen.

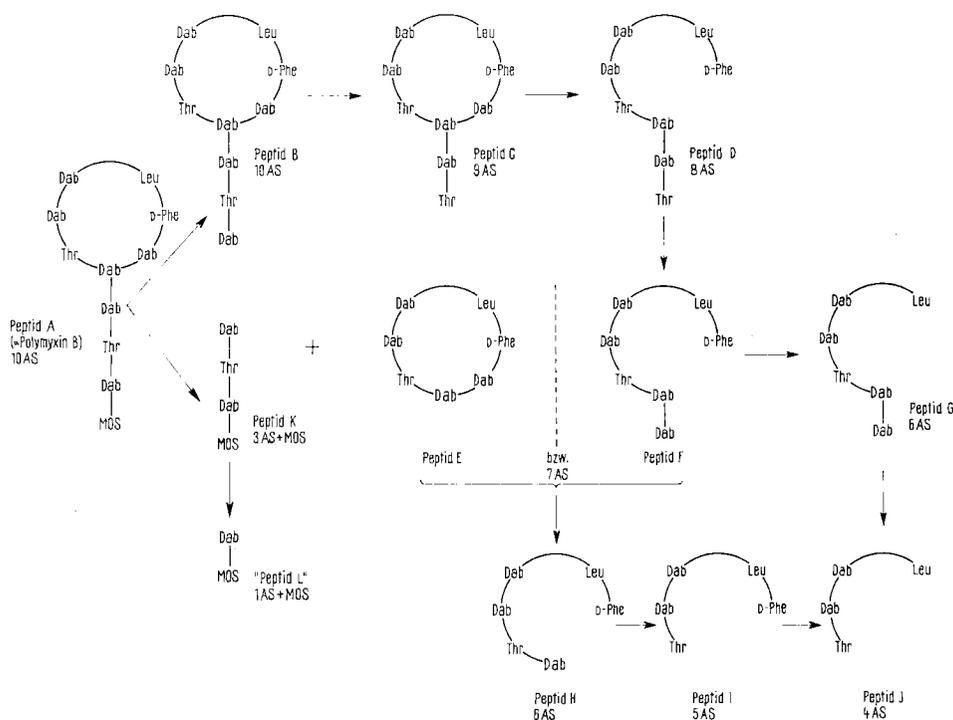
Mit dieser Interpretation stimmen auch die Ergebnisse der vorläufigen Untersuchung [1] des linearen Octapeptides Val<sup>2</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>- $\beta$ -amid [9] überein: es wird in diesem Falle nur der  $\text{Ni}^{2+}$ -Komplex, nicht aber der  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex abgebaut. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass  $\text{Ni}^{2+}$  (KZ = 6) einen «aktiven» ternären Peroxokomplex bilden kann,  $\text{Cu}^{2+}$  (KZ = 4) dagegen nicht [1].

2. *Untersuchung der Aminosäure-«Verluste»*: Um wenigstens eine ungefähre Vorstellung von den «Verlusten» an Aminosäuren während der Reaktion zu erhalten (vgl. exper. Teil), wurden der Reaktionslösung zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und diese – ohne Auftrennung in Fraktionen – nach Totalhydrolyse auf den Gehalt an Threonin, Leucin und D-Phenylalanin mittels STEIN & MOORE-Analyse untersucht.

Der totale Leucingehalt bleibt während der Reaktion unverändert, während der Threoningehalt leicht abnimmt bis auf ca. 90% und vor allem derjenige von D-Phenylalanin bis auf ca. 30% des ursprünglichen abfällt<sup>8)</sup>.

<sup>7)</sup> Hierbei ist nicht berücksichtigt, dass die Peptid-«Bruchstücke» an ihren Enden möglicherweise noch oxydierte «Aminosäure»-Reste tragen, die – nach der Totalhydrolyse – durch die STEIN & MOORE-Analyse nicht erfasst werden, da sie mit Ninhydrin nicht mehr reagieren.

<sup>8)</sup> Bei der Auswertung der gefundenen Analysenwerte (Tab. 1–3) wurde versucht, diese Befunde zu berücksichtigen.

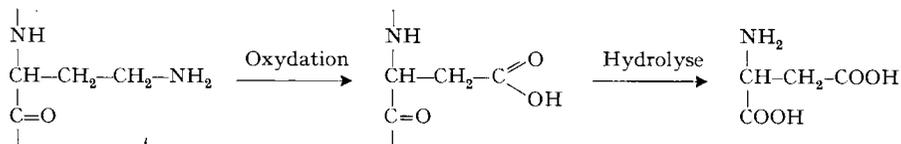


Überblick über die mögliche Reaktionsfolge des Abbaus des Ni<sup>2+</sup>-Polymyxin-B-Komplexes mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tabelle 4. Untersuchung des totalen Aminosäuregehaltes in μMol unter den Versuchsbedingungen des Abbaus (vgl. exper. Teil)

Zeit in Min.	Thr	Leu	Phe	Asp
0	0,105	0,067	0,069	0,002
90	0,098	0,068	0,032	0,008
360	0,087	0,067	0,022	0,024

Interessant ist, dass eine im Polymyxin B nicht enthaltene Aminosäure – nämlich Asparaginsäure – neu auftritt (Tab. 4), und dass deren Gehalt während der Reaktion ständig zunimmt. Die Asparaginsäure entsteht wahrscheinlich durch Oxydation von L-α,γ-Diaminobuttersäure nach folgender Reaktionsgleichung:



Gestützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen von MACHOLAN [10] (vgl. auch [11]), der fand, dass in alkalischem Milieu (2N NaOH) in Gegenwart von Cu<sup>2+</sup> z. B. im Lysin die α-ständige NH<sub>2</sub>-Gruppe – d. h. diejenige, die sich in der Koordinations-sphäre des Cu<sup>2+</sup> befindet (vgl. [5]) – durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxydiert wird, wobei zunächst die entsprechende Ketosäure (α-Keto-ε-aminovaleriansäure) entsteht, die sich anschlies-

send cyclisiert. In unserem Falle würde primär aus der  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ -Gruppe der Dab eine Aldehydgruppe entstehen, die dann zur Carboxylgruppe weiter oxydiert wird.

Ähnlich wie bei den Nucleotiden [5] kann auch hier mit Sicherheit angenommen werden, dass vorwiegend die Gruppen reagieren, die sich in der Koordinationssphäre des Metall-Ions befinden. Erst weitere Versuche werden es jedoch ermöglichen, zwischen den zu diskutierenden Mechanismen<sup>9)</sup> zu unterscheiden.

**Experimentelles.** – a) *Abbau des  $\text{Ni}^{2+}$ -Polymyxin-B-Komplexes:* Eine Lösung von je  $3,7 \cdot 10^{-3}$  mMol Polymyxin B + 5 HCl und  $\text{NiCl}_2$  in 7 ml Wasser wurde mit 2N NaOH auf pH 9,4 gestellt und mit einem 6fachen Überschuss an  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2,22 \cdot 10^{-2}$  mMol) versetzt. Nach 0,5, 1,5 und 2,5 Std. wurde – nach pH-Korrektur auf 9,4 – jeweils nochmals dieselbe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge zugefügt; nach total 6 Std. wurde die Reaktion mittels eines 4fachen EDTA-Überschusses unterbrochen. Es waren noch ca. 5% des gesamten eingesetzten  $\text{H}_2\text{O}_2$  vorhanden. Soweit notwendig wurde die Reaktionslösung – wie in [7] beschrieben – eingeeengt; sodann wurde in Fraktionen aufgetrennt (vgl. Abschnitt b bis d).

Während der Reaktion trat – im Gegensatz zum entsprechenden Abbau des  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexes [7] – kein Niederschlag auf, was wohl auch die bessere Peptid-Ausbeute zur Folge hatte.

b) *Ionenaustauscher-Chromatographie:* wie in [7] beschrieben ausgeführt (Tab. 1).

c) *Dünnschicht-Chromatographie:* Es wurde wie in [7] gearbeitet; lediglich auf das Eluieren der Bruchstück-Peptide aus den Kieselgel-Fractionen wurde verzichtet, und die Totalhydrolyse in Gegenwart des Kieselgels durchgeführt<sup>10)</sup> (Tab. 2).

d) *Hochspannungselektrophorese:* Die Auftrennung des Reaktionsgemisches erfolgte auf SCHLEICHER & SCHÜLL-2043-B-Papier mit einem Ameisensäure-Essigsäure-Puffer (pH 1,9) bei 70 mA und 4000 V. Zur Identifizierung der Peptidbanden wurden schmale Streifen des Elektrophorese-Bogens mit Ninhydrin entwickelt. Die entsprechenden Banden wurden anschliessend mit 1-proz. Essigsäure eluiert; in den Eluatn wurden nach Hydrolyse eines aliquoten Teils die Aminosäuren identifiziert und bestimmt (vgl. Tab. 3).

e) *Aminosäuren-Analysen:* nach STEIN & MOORE [14] wie in [7] beschrieben durchgeführt.

Für die Überlassung von Polymyxin B sowie für wertvolle Anregungen sind wir den Herren Dr. K. VOGLER, Dr. R. O. STUDER und W. LERGIER (HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel) dankbar. Den Herren PD Dr. H. BRINTZINGER und Dr. B. PRIJS danken wir ebenfalls für Anregungen und ihr Interesse an der vorliegenden Arbeit.

#### SUMMARY

The  $\text{Ni}^{2+}$  complex of polymyxin B is decomposed by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The peptide fragments were separated by ion exchange, respectively by thin layer chromatography and by high voltage electrophoresis. The fragments were hydrolyzed and the amino acids determined by the method of STEIN & MOORE. A possible reaction scheme is given and compared with the scheme of the analogous degradation of the  $\text{Cu}^{2+}$  complex [7].

Chemisches Laboratorium  
der Universitäts-Kinderklinik, Zürich, und  
Institut für anorganische Chemie,  
Universität Basel

<sup>9)</sup> Über eine  $\text{Cu}^{2+}$ -beschleunigte Amidspaltung siehe [12] (vgl. auch [13]).

<sup>10)</sup> Die Untersuchung der Dünnschichtchromatographie-Fractionen wurde durch im Kieselgel enthaltene Spuren von Aminosäuren erschwert. Blindprobe: 250 mg Kieselgel S-HR (aus einer frisch geöffneten Originaldose der Firma MACHEREY & NAGEL, Düren) wurden mit 2 ml 6N HCl 20 Std. unter  $\text{N}_2$  bei 100° hydrolysiert und nach STEIN & MOORE untersucht; dabei wurden total ca. 15  $\gamma$  verschiedener Aminosäuren gefunden. Die Aminosäuren wurden möglicherweise durch die im Kieselgel als Bindemittel enthaltene Stärke «eingeschleppt».

## LITERATURVERZEICHNIS

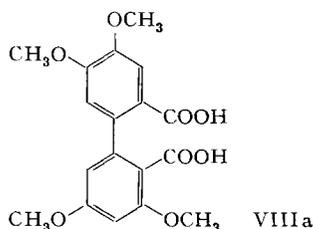
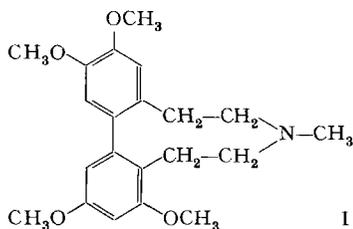
- [1] H. SIGEL & H. CH. CURTIUS, *Experientia* 22, (Heft 15. 10. 66, Nr. 486).  
 [2] H. BRINTZINGER, *Helv.* 44, 744 (1961).  
 [3] H. ERLLENMEYER, H. BRINTZINGER, H. SIGEL & H. CH. CURTIUS, *Experientia* 21, 371 (1965).  
 [4] H. ERLLENMEYER, U. MÜLLER & H. SIGEL, *Helv.* 49, 681 (1966); R. ZELL & H. SIGEL, *Helv.* 49, 870 (1966).  
 [5] H. SIGEL & H. ERLLENMEYER, *Helv.* 49, 1266 (1966).  
 [6] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER, E. BÖHNI & B. FUST, *Helv.* 46, 2823 (1963).  
 [7] H. ERLLENMEYER, H. SIGEL, H. CH. CURTIUS & P. ANDERS, *Helv.* 49, 19 (1966).  
 [8] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER & E. BÖHNI, *Helv.* 48, 1161 (1965).  
 [9] R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* 41, 1287 (1958).  
 [10] L. MACHOLÁN, *Naturwissensch.* 46, 357 (1959).  
 [11] A. N. RADHAKRISHNAN & A. MEISTER, *J. biol. Chemistry* 226, 559 (1957).  
 [12] I. PHOTAKI, S. FALLAB & H. ERLLENMEYER, *Helv.* 39, 1484 (1956).  
 [13] J. NYILASI & P. ORSÓS, *Acta chim. Acad. Scient. hung.* 43, 45 (1965); J. NYILASI, M. BIHARI-VARGA & P. ORSÓS, *ibid.* 47, 291 (1966).  
 [14] S. MOORE & W. H. STEIN, *J. biol. Chemistry* 176, 367 (1948); 211, 907 (1954); S. MOORE, D. H. SPACKMAN & W. H. STEIN, *Analyt. Chemistry* 30, 1185 (1958).

## 261. Eine neue Synthese von 3,5,4',5'-Tetramethoxydiphensäure, einem Abbauprodukt des Alkaloids Protostephanin

von B. Pecherer und A. Brossi

(3. IX. 66)

Für das Alkaloid Protostephanin, einem basischen Inhaltsstoff von *Stephania japonica* MIERS, haben KONDO, TAKEDA *et al.* [1] [2] die ungewöhnliche Struktur I auf Grund klassischer Untersuchungen abgeleitet.



Die Identität eines Abbauproduktes von I mit 3,5,4',5'-Tetramethoxydiphensäure (VIIIa) wurde durch Vergleich mit einem synthetischen Muster erbracht. Da das synthetische Vergleichsmuster nur in geringer Ausbeute erhalten wurde [2] und diese Dicarbonsäure für synthetische Pläne Anreiz hat, suchten wir nach neuen und ergiebigeren Methoden zu ihrer Darstellung. Über eine neue Synthese von VIIIa sei hier berichtet.

Die Synthese von VIIIa wurde ausgehend von Veratralaceton (II) auf dem im Formelschema abgebildeten Weg bewerkstelligt: Kondensation von Veratralaceton mit Malonester ergibt einen Ketodicarbonsäure-ester, der nicht isoliert, sondern durch