

- [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 Ni²⁺-Polymyxin-B-Komplexes durch H₂O₂²⁾

von H. Ch. Curtius, P. Anders, R. Zell³⁾, H. Sigel und H. Erlenmeyer

(2. IX. 66)

Der Cu²⁺- bzw. Ni²⁺-1:1-Komplex [2] von Polymyxin B wird – wie wir bereits früher gezeigt haben [3] – in schwach alkalischem Milieu durch H₂O₂ abgebaut; diese beiden Komplexe katalysieren auch den H₂O₂-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 Ni²⁺ 6 und bei Cu²⁺ 4 beträgt, weisen die beiden Metall-Ionen unterschiedliche Möglichkeiten zur Ausbildung des «aktiven» Peroxokomplexes [1] auf; es ist deshalb interessant, die «Bruchstücke» aus dem Ni²⁺-Polymyxin-Abbau⁴⁾ zu untersuchen und mit den bereits bekannten des Abbaus des Cu²⁺-Komplexes [7] zu vergleichen.

1. *Abbau des Ni²⁺-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.

¹⁾ III = [1].

²⁾ 11. Mitteilung über «Metall-Ionen und H₂O₂»; 10. Mitteilung = [1].

³⁾ Gegenwärtige Adresse: Department of Chemistry, University of Oregon, Eugene, Oregon, USA.

⁴⁾ Ein «gealterter» und ein frisch bereiteter Ni²⁺-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 MOS⁵⁾ untersucht (Tab. 1).

Tabelle 1. *Ionenaustauscher-Chromatographie (IA)*: Gehalt der IA-Fraktionen 3 bis 6 an Aminosäuren in μMol ; in Klammern die berechnete Zahl der jeweiligen Aminosäuremolekeln im betreffenden Peptid

Versuch Nr.	IA-Fraktion Nr. ^{a)}	Dab ⁵⁾	Thr	Leu	Phe	MOS ⁵⁾ ^{b)}	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 ²⁶⁾	K
	6	+	-	-	-		1 + MOS ²⁶⁾	L

^{a)} Die nicht untersuchten IA-Fraktionen waren dünn-schichtchromatographisch uneinheitlich.

^{b)} Die Probe auf MOS erfolgte gas-chromatographisch.

Tabelle 2. *Dünn-schicht-Chromatographie (DC)*: Gehalt der DC-Fraktionen 1 bis 7 an Aminosäuren in μMol ; in Klammern die berechnete Zahl der jeweiligen Aminosäuremolekeln im betreffenden Peptid

DC-Fraktion Nr.	Dab ⁵⁾	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 ²⁶⁾	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

⁵⁾ Dab = L- α , γ -Diaminobuttersäure; MOS = (+)-6-Methyloctansäure (= Isopelargonsäure); das verwendete Polymyxin war ein Gemisch aus B₁ (Fettsäure: MOS) und B₂ (Fettsäure: 6-Methylheptansäure). Zur Struktur und Synthese von Polymyxin B vgl. [8].

⁶⁾ Das Vorhandensein von MOS wurde in diesen Fällen nicht überprüft.

Tabelle 3. *Hochspannungselektrophorese (HE)*: Gehalt der HE-Fractionen 1 bis 6 an Aminosäuren in μMol ; in Klammern die berechnete Zahl der jeweiligen Aminosäuremolekeln im betreffenden Peptid

HE-Fraktion Nr.	Dab ⁵⁾	Thr	Leu	Phe	Gesamtzahl der Aminosäuren	Peptid
1	+	—	—	—	1 + MOS ⁷⁾	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 ⁷⁾	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 formulieren⁷⁾.

Vergleicht man die vorgeschlagenen Reaktionsfolgen für den Abbau des Cu^{2+} - [7] und des 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 Ni^{2+} -Polymyxin-Komplex zu sehen (vgl. Figur). Diese grössere Zahl von Reaktionsmöglichkeiten des Ni^{2+} -Komplexes hängt wohl mit der bereits erwähnten grösseren Koordinationszahl (KZ) dieses Metall-Ions zusammen.

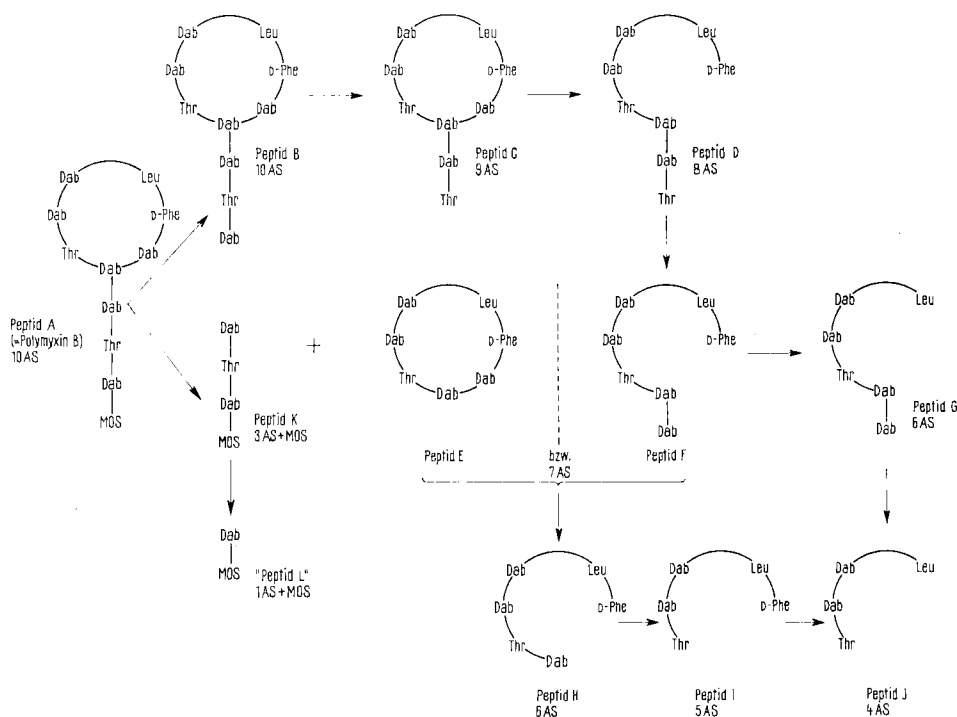
Mit dieser Interpretation stimmen auch die Ergebnisse der vorläufigen Untersuchung [1] des linearen Octapeptides Val²-Angiotensin II-Asp¹- β -amid [9] überein: es wird in diesem Falle nur der Ni^{2+} -Komplex, nicht aber der Cu^{2+} -Komplex abgebaut. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass Ni^{2+} (KZ = 6) einen «aktiven» ternären Peroxokomplex bilden kann, 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 abfällt⁸⁾.

⁷⁾ 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.

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

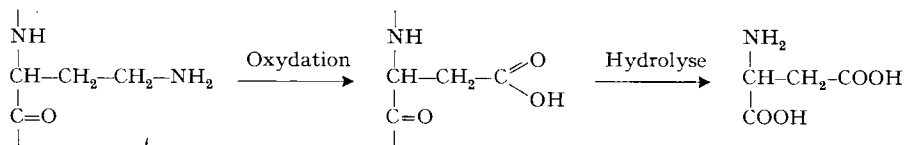


Überblick über die mögliche Reaktionsfolge des Abbaus des Ni²⁺-Polymyxin-B-Komplexes mittels H₂O₂

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 Cu²⁺ z. B. im Lysin die α-ständige NH₂-Gruppe – d. h. diejenige, die sich in der Koordinations-sphäre des Cu²⁺ befindet (vgl. [5]) – durch H₂O₂ oxydiert wird, wobei zunächst die entsprechende Ketosäure (α-Keto-ε-aminovaleriansäure) entsteht, die sich anschlies-

send cyclisiert. In unserem Falle würde primär aus der CH_2NH_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 Mechanismen⁹⁾ zu unterscheiden.

Experimentelles. – a) *Abbau des Ni^{2+} -Polymyxin-B-Komplexes:* Eine Lösung von je $3,7 \cdot 10^{-3}$ mMol Polymyxin B + 5 HCl und NiCl_2 in 7 ml Wasser wurde mit 2N NaOH auf pH 9,4 gestellt und mit einem 6fachen Überschuss an H_2O_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 H_2O_2 -Menge zugefügt; nach total 6 Std. wurde die Reaktion mittels eines 4fachen EDTA-Überschusses unterbrochen. Es waren noch ca. 5% des gesamten eingesetzten H_2O_2 vorhanden. Soweit notwendig wurde die Reaktionslösung – wie in [7] beschrieben – eingengt; sodann wurde in Fraktionen aufgetrennt (vgl. Abschnitt b bis d).

Während der Reaktion trat – im Gegensatz zum entsprechenden Abbau des 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 durchgeführt¹⁰⁾ (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 Eluaten 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 Ni^{2+} complex of polymyxin B is decomposed by H_2O_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 Cu^{2+} complex [7].

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

⁹⁾ Über eine Cu^{2+} -beschleunigte Amidspaltung siehe [12] (vgl. auch [13]).

¹⁰⁾ 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 N_2 bei 100° hydrolysiert und nach STEIN & MOORE untersucht; dabei wurden total ca. 15 γ verschiedener Aminosäuren gefunden. Die Aminosäuren wurden möglicherweise durch die im Kieselgel als Bindemittel enthaltene Stärke «eingeschleppt».

LITERATURVERZEICHNIS

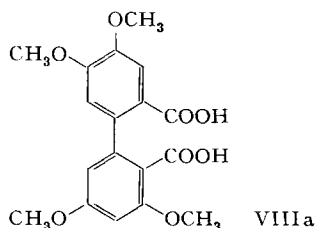
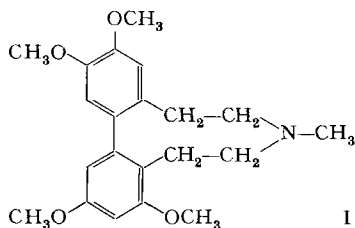
- [1] H. SIGEL & H. CH. CURTIUS, *Experientia* 22, (Heft 15. 10. 66, Nr. 486).
 [2] H. BRINTZINGER, *Helv.* 44, 744 (1961).
 [3] H. ERLLENMEYER, H. BRINTZINGER, H. SIGEL & H. CH. CURTIUS, *Experientia* 21, 371 (1965).
 [4] H. ERLLENMEYER, U. MÜLLER & H. SIGEL, *Helv.* 49, 681 (1966); R. ZELL & H. SIGEL, *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