

Das Adsorbat verhält sich somit in beiden Grenzfällen einem *Faraday*'schen Depolarisatorsystem analog, ohne dass die für die Adsorbatbildung typischen Zusammenhänge zwischen Aktivität und Stoffumsatz im zeitlichen Verlauf des Nettostromtransienten zum Ausdruck kommen.

Wenn hingegen K über alle Grenzen wächst, geht (31) in die mit dem reversiblen Ansatz (26) gleichbedeutende Gleichung

$$M - B (dy/dt) * 1 - (dy/dt) * (\pi t)^{-1/2} = 0,$$

mit der Lösung (27) und dem Nettostrom (28) über.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *E. Schmidt*, *Helv.* 52, 2245 (1969).
- [2] *G. Charlot, P. Delahay & H. A. Laitinen*; *J. electroanal. Chemistry* 1, 425 (1960).
- [3] *C. R. Christensen & F. C. Anson*, *Analyt. Chemistry* 35, 205 (1963), 36, 495 (1964); *A. T. Hubbard & F. C. Anson*, *ibid.* 36, 165 (1964), *J. electroanal. Chemistry* 9, 163 (1965); *E. Schmidt & H. R. Gygax*, *Chimia* 16, 165 (1962).
- [4] *E. Schmidt & H. R. Gygax*, *J. electroanal. Chemistry* 12, 300 (1966).
- [5] *G. Doetsch*, «Theorie und Anwendung der Laplace-Transformation», S. 361, Springer-Verlag, Berlin 1937.
- [6] *G. Doetsch*. «Tabellen zur Laplace-Transformation», Springer-Verlag, Berlin 1947; vgl. auch Lit. [5], S. 140.
- [7] Lit. [5], S. 307.
- [8] *P. Delahay & J. Trachtenberg*, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 2355 (1957).
- [9] *E. Traenkler*, *Frequenz* 8, 334 (1954).
- [10] *H. S. Carslaw & J. C. Jaeger*, «Conduction of Heat in Solids», S. 485 ff., Clarendon Press, Oxford 1959.
- [11] *A. Rius, S. Polo & J. Llopis*, *Anales real Soc. Espanola Fis. Quim.* 45, 1029 (1949).
- [12] *P. Delahay*, «New Instrumental Methods in Electrochemistry», Interscience, New York 1954.
- [13] Lit. [10], S. 307.
- [14] *H. Margenau & G. M. Murphy*, «Mathematics of Physics and Chemistry», S. 520 ff., Van Nostrand Co., New York 1962.
- [15] *K. Krummen*, Dissertation, Bern 1969.

2. S,S'-Bis-cyclo-glycyl-L-hemicystyl-glycyl-glycyl-L-prolyl, ein künstliches, bicyclisches Peptid mit Kationenspezifität¹⁾

15. Mitteilung über homodet cyclische Polypeptide [1]

von **R. Schwyzer, Aung Tun-Kyi, M. Caviezel** und **(z.T.) P. Moser²⁾**

Laboratorium für Molekularbiologie chemischer Richtung der Eidg. Techn. Hochschule Zürich

(28. X. 69)

Summary. Using only amino acids occurring in proteins it should, in principle, be possible to synthesize peptide molecules capable of complexing metal cations. The approach described in this contribution is to build cages of oxygen atoms that could contain A-cations of specific diameter (in a manner similar to nigericin, nonactin, valinomycin. and other antibiotics) by binding together

¹⁾ Diese Arbeit wurde vom *Schweizerischen Nationalfonds* (Projekte Nr. 3426 und 4883) sowie aus Mitteln des *Otto-Nägeli-Preises* (1964) und eines Beitrages der *CIBA Aktiengesellschaft* mitfinanziert.

²⁾ Gegenwärtige Adresse von *P. M.*: *J. R. Geigy A. G.*, Basel.

face-to-face and in the correct distance from one another two homodetic cyclic peptide rings. Using a link that may be formed and broken in a reversible manner (for example oxidative formation on the outside of the cell membrane and reductive cleavage on the inside), one should even be in a position to construct a model for active, energy-coupled transport of cations across the cell membrane.

An example of this type of synthetic products is the bicyclic peptide S, S'-bis-cyclo-glycyl-L-hemicystyl-glycyl-glycyl-L-prolyl. This compound, the first to contain two homodetic peptide rings bound together, was prepared by stepwise synthesis from the C-terminal of the S-protected pentapeptide active ester, glycyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycyl-glycyl-L-proline-*p*-nitrophenyl ester, using active esters of protected amino acids, followed by cyclization of this intermediate, cleavage of the diphenylmethyl protecting group, and final oxidation of the thiol group to the disulfide function. EMF-Measurements on membranes by *Simon* and *Pioda* according to the method of *Stefanac & Simon* [4] revealed cation specificity in the order: $K^+ > Na^+ > Li^+ > Ca^{++}$. Optical rotatory dispersion shows that there is a conformational transition during complexation. Circular dichroism points to a 75–90° dihedral angle and right-handed helicity of the disulfide bond. On this basis the models shown in Fig. 6 were constructed as hypothetical representations of the potassium complexes with cages of eight or of ten oxygen atoms.

1. Problemstellung. – Die Wirkung etlicher Antibiotica mit Depsipeptid-, Polyester- und Polyäther-Struktur (z. B. Valinomycin, Nonactin, Nigericin u. a. m.) scheint auf ihrer Fähigkeit zu beruhen, mit Kationen der Alkalimetalle spezifische Komplexe zu bilden und damit die Durchlässigkeit von Membranen für solche Ionen gegenüber der physiologischen Norm zu verändern [2]. Die spezifische Komplexbildung konnte durch direkte Messung von Gleichgewichtskonstanten [3], EMF.-Messungen an Membranen, welche aus einer Lösung des Antibioticums in einem hydrophoben Träger bestanden [4], und Leitfähigkeitsmessungen an künstlichen Phospholipidmembranen in Gegenwart der Antibiotica [5] nachgewiesen werden. Kristallographische Untersuchungen [6] [7] und Untersuchungen mit Kernresonanz-Spektroskopie [8] ergaben, dass das Alkalimetall-Ion jeweils im Innern eines Käfigs sitzt, wo es von mehreren Sauerstoffatomen (z. B. 6 oder 8 in oktaedrischer oder kubischer Anordnung) umgeben ist. Beim Eintritt in den Komplex verliert das Zentralatom seine Hydrathülle und die Liganden-Molekel ändert in einzelnen Fällen ihre Konformation [6] [8], um die günstigste Koordinationsschale zu liefern. Die fertigen Komplexe besitzen hydrophobe Hüllen, was ihre Löslichkeit in den lipophilen Membranen erklären mag.

Um den Zusammenhang der erwähnten, mehr pharmakologischen Befunde mit der Physiologie herzustellen, kann man sich fragen, ob nicht auch einfache Peptide aus gewöhnlichen, in Proteinen vorkommenden Aminosäuren solche Komplexe bilden könnten. Wäre dies der Fall, so dürfte man spekulieren, dass ähnliche (nicht notwendigerweise identische) Peptid- und Proteinstrukturen von der Zelle zur Lösung gewisser Probleme des Ionentransports herangezogen werden.

2. Mögliche Lösung mittels Cyclopeptiden. – Eine sehr einfache Möglichkeit, geeignete Käfige aus (Keto-) Sauerstoffatomen um ein Zentral-Ion herum aufzubauen, bietet die Kombination zweier kleiner, cyclischer Peptide nach Figur 1 A. Diese Anordnung entstünde aus andern, in Lösung realisierten Konformeren (Figur 1 B) bei der Komplexbildung. Zwar erscheint diese Situation in der abgebildeten, bimolekularen Form als energetisch sehr ungünstig, doch könnte sie durch covalente Verknüpfung der beiden Ringe an einer oder mehreren Stellen – wenigstens in bezug auf den Entropieterm – wesentlich verbessert werden. Reversible Bildung einer solchen Verknüpfung an der Aussenfläche der Zellmembran und deren Zerfall an der Innenfläche (z. B.

durch Oxydation-Reduktion) ergäbe ein naives Modell für aktiven, energieverknüpften Ionentransport.

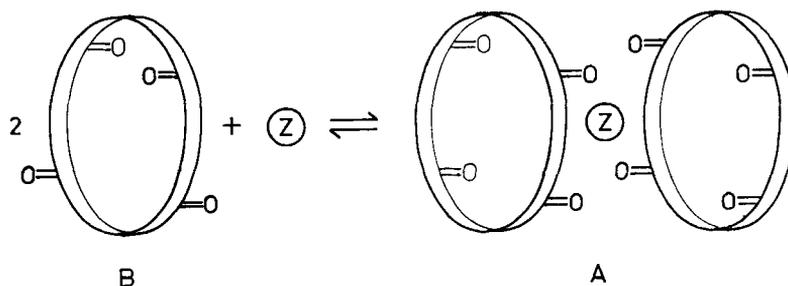


Fig. 1. Schematische Darstellung der Reaktion eines Zentralkations Z mit zwei Cyclopeptidmolekeln als Liganden

Die Bänder stellen die Peptidringe dar; die Peptidbindungen (*trans*) liegen in der Bandfläche; die Richtung der C=O-Bindungen ist schematisch angegeben. In Figur 1 B ist eine Anordnung dargestellt, die bezüglich der Dipol-Dipol-Interaktion der Peptidbindungen energetisch günstig ist; in 1 A ist die parallele Ausrichtung wegen der starken positiven Ladungsdichte auf Z als energetisch günstig angenommen. Die Anordnung in 1 B ähnelt derjenigen in einer Faltblattstruktur [1], die Anordnung in 1 A mehr derjenigen in einer α -Helix, was für die CD- und ORD-Charakteristik von Bedeutung sein dürfte (siehe Text, Abschnitt 4b).

3. S,S'-Bis-cyclo-glycyl-L-hemicystyl-glycyl-glycyl-L-prolyl. – Ein erstes System der beschriebenen Art (zwei miteinander verbundene, homodete Ringe, deren Verknüpfungsstelle reversibel auflösbar ist) haben wir im bicyclischen Peptid S,S'-Bis-cyclo-glycyl-L-hemicystyl-glycyl-glycyl-L-prolyl (**9**) gefunden. Diese neuartige Verbindung (es sind bisher keine solche verbundene Ringsysteme bekannt geworden) haben wir nach dem Schema S. 18 und Tab. 1 hergestellt. Das sehr schwer lösliche Peptid löst sich in Gegenwart von Kalium-, Natrium- und Lithium-Salzen leicht in Wasser. Vorläufige Versuche von SIMON & PLODA [9] mit Hilfe von künstlichen Membranen [4] ergaben eine Ionenspezifität in der Reihenfolge: $K^+ > Na^+ > Li^+ > Ca^{++}$. Veränderung der Spektren der optischen Rotationsdispersion und des Circular dichroismus während der Titration mit Alkalisalzen weisen auf eine Konformationsänderung beim Übergang zum Komplex hin (Figur 2; wahrscheinlich erfährt die Menge der in Lösung vorliegenden Topomeren, $\{T_P^{b,s}\}$ [10], eine Populationsverschiebung zugunsten solcher Topomere, welche zur Komplexbildung befähigt sind). Nach diesen vorläufigen Versuchen (Figur 3) sind die Komplexbildungskonstanten recht klein und liegen für KCl in wässriger Lösung wahrscheinlich in der Grössenordnung von 0,1 l/Mol. Die Versuche lassen weder eindeutig erkennen, ob neben einem 1:1-Komplex auch solche mit anderer Stöchiometrie vorhanden sind, noch feststellen, inwiefern kooperative Effekte beim Konformationsübergang eine Rolle spielen. Über diese Fragen soll mit verfeinerten Experimenten zuverlässigere Auskunft gesucht werden.

Aus der positiven Bande im Spektrum des Circular dichroismus bei 264 nm (nach Korrektur wahrscheinlich bei 250 nm, Figur 4) kann man in Analogie zu andern Verbindungen [11], Figur 5, schliessen, dass in der Population der in Lösung vorliegenden Konformeren solche mit «rechtsgängiger» helikaler Chiralität um die Disulfidbindung

Tabelle 1. Charakteristische Eigenschaften neuer Verbindungen

Nr.	Verbindung	Smp. °C (unkorr.) Krist. aus	[α] _D ²⁵ ± 0,5°C g/100 ml Lösungsm.	Zusammen- setzung	Mol.-Gew. ber. [gef.]	Analyse % berechnet/gefunden		
						C	H	N
1	Boc·Gly-Pro·OH	142-143° Benzol-Petr.-äther	- 79,68 2,51 MeOH	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₅	272,176	52,89 52,81	7,39 7,56	10,28 10,31
2	Boc·Gly-Gly-Pro·OH	124-128° Benzol-Petr.-äther	- 59,61 2,085 MeOH	C ₁₄ H ₂₃ N ₃ O ₆	329,368	51,11 51,14	7,05 7,35	12,72 12,24
3	Boc·Cys(Dpm)·OH	96-97° Äther-Petr.-äther	- 14,83 1,96 MeOH	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₄ S	387,482	65,10 64,88	6,50 6,70	3,62 3,64
4	Boc·Cys(Dpm)·OSu	112-112,5° Isopropanol	- 36,02 2,47 MeOH	C ₂₅ H ₂₈ N ₂ O ₄ S	484,571	61,97 61,96	5,82 5,87	5,78 5,87
5	Boc·Cys(Dpm)-Gly-Gly-Pro·OH	111-113° Aceton-Äther		C ₃₀ H ₃₈ N ₄ O ₇ S	589,719	60,18 60,22	6,40 6,53	9,36 9,29
6	Boc·Gly-Cys(Dpm)-Gly-Gly-Pro·OH	127-129° Benzol-Diiso- propyläther	- 43,2 2,5 MeOH	C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₈ S	655,754	58,61 58,85	6,30 6,39	10,68 10,57
7	Boc·Gly-Cys(Dpm)-Gly-Gly-Pro·ONp	122-124° Essigester		C ₃₈ H ₄₄ N ₆ O ₁₀ S	776,873	58,75 58,65	5,71 5,51	10,82 11,02
8	Gly-Cys(Dpm)-Gly-Gly-Pro	270,2-270,8° ^{a)} 65% EtOH-H ₂ O		C ₂₇ H ₃₁ N ₅ O ₅ S	537,637 [482/542]	60,32 60,11	5,81 6,06	13,03 12,84
9	Gly-Cys-Gly-Gly-Pro Gly-Cys-Gly-Gly-Pro	290,2-290,7° ^{a)} CH ₃ COOH oder 65% EtOH-H ₂ O		C ₂₈ H ₄₀ N ₁₀ O ₁₀ S ₂ 1/2 H ₂ O [683/675]	740,816 + 9,002	44,85 44,78	5,51 5,60	18,68 18,36
				C ₂₈ H ₄₀ N ₁₀ O ₁₀ S ₂ ^{b)}	740,816	45,40 45,30	5,44 5,32	18,91 -

a) Schmelzpunktapparat Mettler FP2; b) 15 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

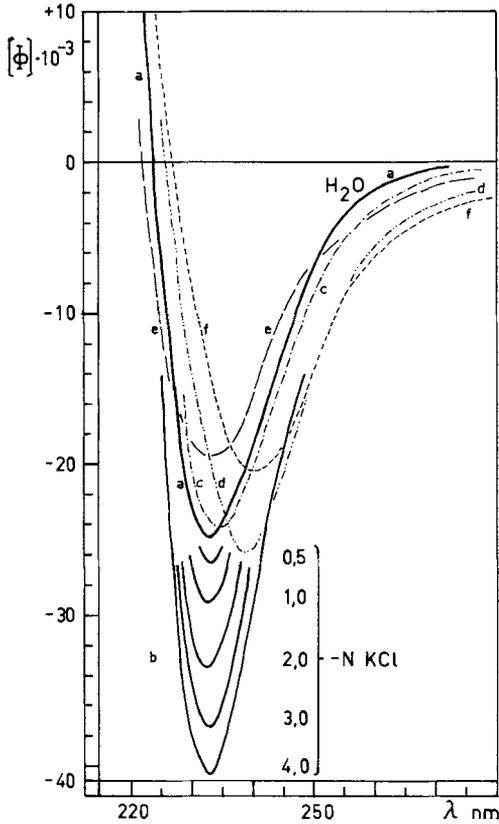


Fig. 2. Optische Rotationsdispersion von **9** unterhalb 280 nm in verschiedenen Lösungsmitteln (Konzentrationen zw. 2 und $4 \cdot 10^{-4}$ M)

a) in H_2O ; b) in KCl-Lösungen verschiedener Normalität (0,5 bis 4,0N wie angegeben); c) in Propylenglykol- H_2O 20:80 v:v; d) in Propylenglykol- H_2O 65:35 v:v; e) Äthanol- H_2O 65:35 v:v, 6M an Harnstoff; f) in Tri-fluoräthanol

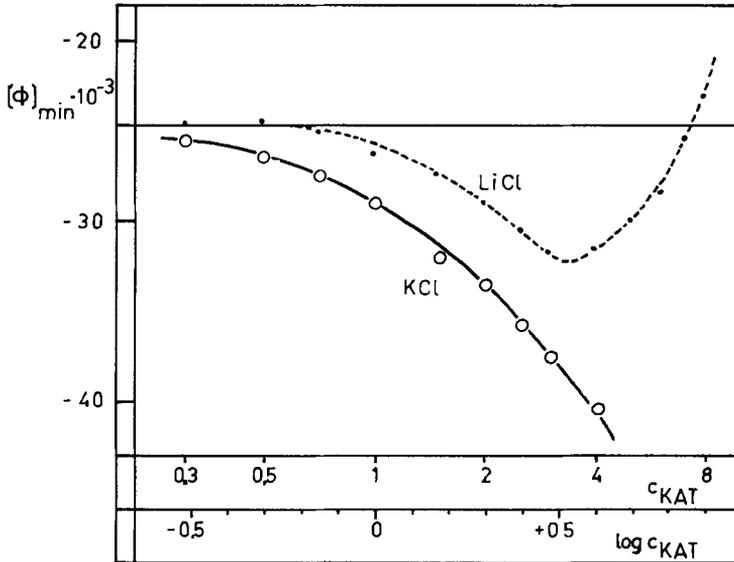


Fig. 3. Abhängigkeit des Rotationsdispersions-Minimums von der Salzkonzentration

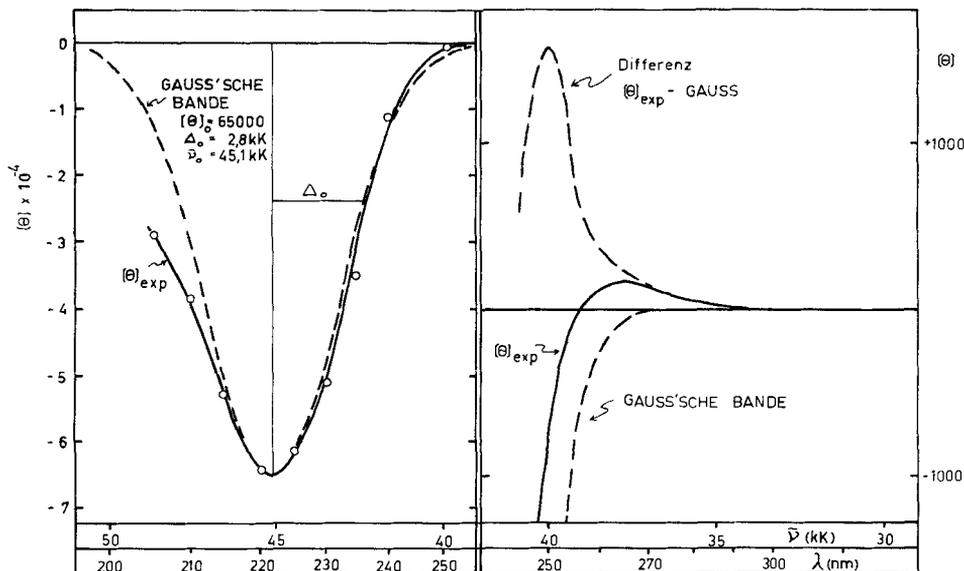


Fig. 4. Circulardichroismus von 9 in Trifluoräthanol

Kurzwelliger Teil mit eingezeichneter, berechneter Gauss-Kurve (siehe Text). Langwelliger Teil (Disulfid-Beitrag) mit Differenzspektrum

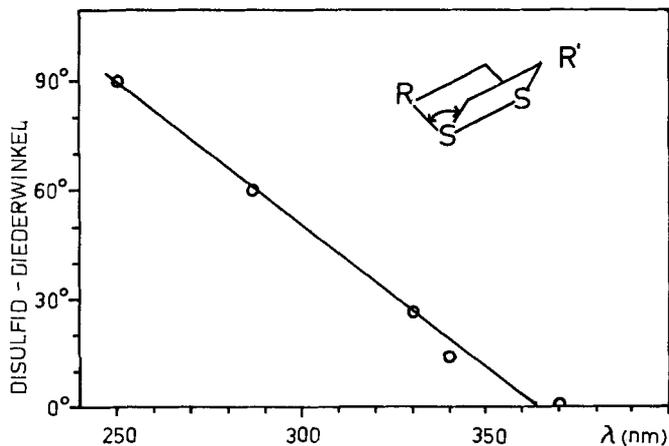


Fig. 5. Abhängigkeit von λ_{max} des CD.-Beitrages der Disulfidgruppe vom Diederwinkel

Anhand der bei Beecham, Loder & Russell [17] zusammengestellten Daten aus verschiedenen Literaturquellen. Positive Werte der molaren Elliptizität entsprechen rechtsgängiger helicaler Anordnung der Substituenten an der Disulfidgruppe und umgekehrt.

nach kürzeren Wellen und grösserer Elliptizität verschobenes Maximum der positiven Bande, die sehr wahrscheinlich von der Disulfid-Absorption herrührt, auf: $[\Theta]_{diff}^0 = +1300$, $\lambda_{max} = 250$ nm.

b) Lösungsmittelabhängigkeit der optischen Rotationsdispersion; Beeinflussung durch Kationen (Figuren 2 und 3): Die molare Drehung, $[\Phi]_{exp}$ [12], von Lösungen in Propy-

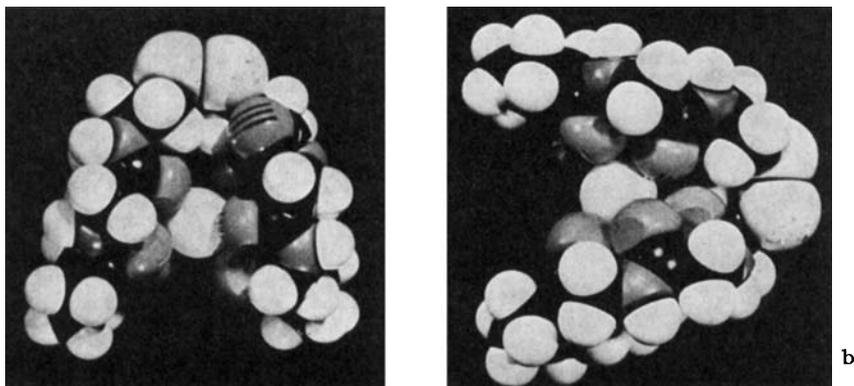


Fig. 6. Kalottenmodelle möglicher Kaliumkomplexe von 9

Das Zentralkation ist bei a von acht, bei b von zehn Sauerstoffatomen umgeben. Alle Peptidbindungen befinden sich in der *trans*-Anordnung. Der Disulfid-Diederwinkel beträgt $80\text{--}90^\circ$; rechtshelicale Anordnung der β -C-Atome der Cysteinreste.

lenglykol-Wasser-(65:35 *v:v*) weist ein schwaches Maximum (+390) bei etwa 400 nm und ein Minimum (–26000) bei 239 nm auf. Die Null-Durchgänge befinden sich bei 226 und 320 nm. Erhöhung des Wassergehaltes ergibt eine für $n \rightarrow \pi^*$ Übergänge der Peptidchromophore typische Blauverschiebung des Minimums. In Wasser liegt es bei 233 nm, also am selben Orte wie bei helicalen Polyaminosäuren. Erwartungsgemäss liegt das Minimum von Lösungen in wasserfreiem 2,2,2-Trifluoräthanol rotverschoben bei 240–241 nm.

Wie Wasser bewirkt auch Harnstoff (6M in 65-proz. Äthanol-Wasser) eine Blauverschiebung des Minimums auf 233 nm. Von einer «denaturierenden» Wirkung ist ausser einer Verringerung der molaren Drehung auf -19500° und einer Verbreiterung der Bande nichts zu merken. Insbesondere ist das Spektrum oberhalb 320 nm gegenüber demjenigen in 65-proz. Propylenglykol fast unverändert.

Kaliumchlorid, bis 4,0N in Wasser, wirkt sich in zunehmender Vertiefung des Minimums (bis -40800°) aus. Es könnte dies die Folge der Parallelausrichtung der Keto-Dipole der *trans*-Peptidbindungen sein, wodurch eine grosse Ähnlichkeit zur Anordnung in der α -Helix entstände (der Peptidring wäre als eine Windung einer Helix mit der Steigung Null zu betrachten, vgl. Fig. 1). Das wäre ein weiteres Indiz für die Richtigkeit der hier vorgeschlagenen Modelle.

Die molare Drehung beim Minimum ändert sich mit der analytischen Kaliumkonzentration (s. Fig. 3). Die Kurve sieht wie der Anfang (ca. 20%) einer Titrationskurve aus, konnte aber wegen der beschränkten Löslichkeit von KCl nicht weiter verfolgt werden.

Die «Titrations-Kurve» mit Lithiumchlorid sieht anfänglich fast gleich aus (aber, wie übrigens mit NaCl, nach rechts verschoben, entsprechend einer kleineren Komplexbildungskonstante; für gleiche Effekte werden etwa doppelt so hohe Konzentrationen an LiCl benötigt). Oberhalb einer Lithiumkonzentration von etwa 3N nimmt die molare Drehung aber plötzlich stark ab. Es dürfte dies ein spezifischer Effekt des

Lithium-Kationen sein, wie er bereits eingehend bei Polyaminosäuren, die Glycin und Prolin enthalten, beschrieben wurde ([13], Ausbildung von *cis*-Peptidbindungen?).

6. Synthese. – Ausgehend von freiem Prolin⁴⁾ wurde durch stufenweise Synthese unter Verwendung von aktiven Estern geschützter Aminosäuren (Nitrophenylester oder N-Hydroxysuccinimidester; α -Aminogruppen mit *t*-Butoxycarbonyl- geschützt) das kristallisierte Pentapeptid-Derivat **6**, N ^{α} -*t*-Butoxycarbonylglycyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycyl-glycyl-L-prolin, in guter Ausbeute (56,5% über alle Stufen) hergestellt. Dieses hat man in den ebenfalls kristallisierten *p*-Nitrophenylester **7** übergeführt, aus welchem man nach selektiver Abspaltung der *t*-Butoxycarbonylgruppe nach der üblichen Zyklisierungsmethode [14] das geschützte Cyclopeptid **8** in 62,5% Gesamtausbeute gewann.

Erhitzen mit Trifluoressigsäure entfernte die Schutzgruppe vom Schwefel des Cysteinrestes. Die Verknüpfung der beiden Thiol-Reste hat man durch Oxydation mit 1,2-Dijodäthan nach Weygand & Zumach [15] vorgenommen. Das sehr schwerlösliche Disulfid **9** (Löslichkeit in Wasser ca. $2-3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) kann am besten aus Eisessig umkristallisiert werden.

Das Molekulargewicht wurde auf den Stufen des geschützten Cyclopentapeptids **8** und des Biscyclopeptids **9** mittels Kryoskopie in Dimethylsulfoxid [16] und Dampfdruckosmometrie in *o*-Chlorphenol bestimmt. Die etwas geringe Genauigkeit genügte, um das Vorliegen von Produkten einer eventuellen Verdoppelungsreaktion auszuschliessen (s. Tabelle 1). Wie wir in späteren Arbeiten ausführen werden, sind sowohl sterische Hinderung durch den grossen S-Diphenylmethyl-L-cysteyl-Rest als auch die grosse Reaktionsfähigkeit der Aminogruppe des N-terminalen Glycinrestes für das fast vollkommene Ausbleiben einer Verdoppelung zum Cyclodecapeptid verantwortlich.

Experimenteller Teil

1. *t*-Butoxycarbonylglycyl-L-prolin (**1**): 2,664 g (9 Millimole) *t*-Butoxycarbonyl-glycin-*p*-nitrophenylester [17] wurden in eine Lösung von 1,140 g (9,9 Millimole) L-Prolin in 6 ml Pyridin und 1,4 ml Triäthylamin eingetragen. Nach Stehen über Nacht bei Zimmertemperatur wurde das Lösungsmittel bei 40° im Vakuum verdampft, der Rückstand in 40 ml Äther und 30 ml Wasser aufgenommen, und die Mischung mit CO₂ gesättigt und geschüttelt. Die wässrige Phase wurde abgetrennt, noch dreimal nacheinander (unter Zugabe von Äther und Sättigung mit CO₂) gleich behandelt und darauf im Vakuum bei 40° eingedampft. Der ölige Rückstand wurde in 200 ml Essigester aufgenommen, einmal mit 5 ml 0,1N HCl und dreimal mit je 10 ml gesättigter Kochsalzlösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Essigesters im Vakuum wurde der farblose, ölige Rückstand durch Zugabe von Äther kristallisiert erhalten und aus Benzol-Petroläther umkristallisiert; 2,1 g farblose, dünne, längliche Platten.

2. *t*-Butoxycarbonylglycyl-glycyl-L-prolin (**2**): Um die *t*-Butoxycarbonylgruppe zu entfernen, wurde die Verbindung **1** in einige ml ungefähr 2,5N HCl in Essigester (trocken!) eingetragen. Nach einer halben Std. Stehen bei Zimmertemperatur wurde das ausgeschiedene Peptid-hydrochlorid abfiltriert, mehrmals mit absolutem Äther gewaschen und über NaOH-Plätzchen im Vakuum getrocknet. Ausbeute an Glycyl-L-prolin-hydrochlorid quantitativ.

0,728 g (3,5 Millimole) Glycyl-L-prolin-hydrochlorid wurden in 6 ml Pyridin und 0,49 ml (3,5 Millimole) Triäthylamin mit 0,964 g (3,2 Millimole) *t*-Butoxycarbonyl-glycin-*p*-nitrophenylester [18] umgesetzt. Aufarbeitung wie im 1. Beispiel: Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther; 0,90 g farbloses, hygroscopisches, amorphes oder mikrokristallines Pulver.

⁴⁾ Zur Vermeidung der Bildung von *cyclo*-Glycyl-prolyl auf der Stufe **1** \rightarrow **2**, welche bei Verwendung eines Esters spontan eintritt.

3. *N-t-Butoxycarbonyl-(S-diphenylmethyl)-L-cystein (3)*⁵: Eine Suspension von 2,87 g (10 Millimole) *S*-Benzhydryl-*L*-cystein [19] in einer Mischung von 50 ml Dioxan und 20 ml Wasser wurde mit 1,56 g (11 Millimole) *t*-Butoxycarbonyl-azid versetzt. Unter starkem Rühren bei Zimmertemperatur wurde 2*N* Natronlauge mit Hilfe eines modifizierten Autotitrators⁶) derart zugegeben, dass der pH-Wert immer 9,6 betrug (allgemeine Methode vgl. *Schnabel* [20]). Nach üblicher Aufarbeitung und Umkristallisation aus Äther-Petroläther erhielt man 3,16 g grosse, lange, farblose Kristallnadeln.

4. *N-t-Butoxycarbonyl-(S-diphenylmethyl)-L-cystein-N-hydroxysuccinimid (4)*: 11,62 g (30 Millimole) *N-t*-Butoxycarbonyl-*S*-benzhydryl-*L*-cystein (**3**) und 3,45 g (30 Millimole) *N*-Hydroxysuccinimid löste man in 50 ml absolutem Dimethoxyäthan. Die Lösung wurde auf 0° gekühlt und unter Rühren mit 6,81 g (33 Millimole) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt (allgemeine Methode von *Anderson et al.* [21]). Man filtrierte nach 20 Std. bei 0° den Dicyclohexylharnstoff ab und verdampfte die Lösung im Vakuum. Der Rückstand ergab aus Isopropanol umkristallisiert 10 g (70% d. Th.) farbloser Kristallnadel-Büschel.

5. *N-t-Butoxycarbonyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycyl-glycyl-L-prolin (5)*: 5,823 g (21,89 Millimole) Glycyl-glycyl-*L*-prolinhydrochlorid (aus **2** nach der allgemeinen Methode des Beispiels 2 erhalten), in 20 ml Dimethylformamid suspendiert, wurden mit 3,07 ml (21,9 Millimole) Triäthylamin behandelt. Unter Rühren versetzte man die Mischung mit 10,608 g (21,89 Millimole) *N-t*-Butoxycarbonyl-*S*-benzhydryl-*L*-cystein-hydroxysuccinimid-ester (**4**). Nach 15 Std. bei Zimmertemperatur filtrierte man vom ausgeschiedenen Triäthylamin-hydrochlorid ab, verdünnte mit viel Essigester, schüttelte bei 0° dreimal mit 0,1*N* HCl aus, wusch mit Wasser neutral und trocknete mit konzentrierter Kochsalzlösung und mit Natriumsulfat. Nach Eindampfen im Vakuum kristallisierte man den Rückstand aus Aceton-Äther um: 11,9 g farbloses, amorphes Pulver.

Selektive Entfernung der t-Butoxycarbonylgruppe aus 5: Man liess eine Lösung von 2,160 g (3,6 Millimole) *N-t*-Butoxycarbonyl-*S*-benzhydryl-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolin (**5**) in 60 ml Ameisensäure 2½ Std. bei Zimmertemperatur stehen (allgemeine Methode von *Halpern & Nitecki* [22]). Nach Entfernen der Ameisensäure im Vakuum im Bad von weniger als 30° wurde der Rückstand beim mehrmaligen Verreiben mit Äther fest. Aus Methanol (mit sehr wenig Äther) erhielt man 1,884 g (96%) *S*-Benzhydryl-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolin-formiat als farbloses, amorphes Pulver vom Smp. 164–171° (Zers.). Dünnschichtchromatographie auf Silicagel mit *n*-Butanol: Essig: Wasser-(100:15:35 *v*), ergab bei der Entwicklung mit Ninhydrin oder mit Jod-Dampf nur einen einzigen Fleck.

Das Hydrochlorid des *S*-Benzhydryl-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolins wurde durch viel Äther aus der Lösung gefällt, die man durch Behandeln des *N-t*-Butoxycarbonyl-Derivats während ½ Std. bei Zimmertemperatur mit einer trockenen, etwa 2,5*N* Lösung von HCl in Essigester erhielt.

Sowohl das Formiat als auch das Hydrochlorid wurden für die weitere Synthese verwendet.

6. *N-t-Butoxycarbonyl-glycyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycyl-glycyl-L-prolin (6)*: 6,874 g (12,83 Millimole) *S*-Benzhydryl-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolin-hydrochlorid wurden in 15 ml Dimethylformamid bei Zimmertemperatur gelöst. Nach Zusatz von 1,80 ml (12,8 Millimole) Triäthylamin und (darauf) von 3,51 g (12,9 Millimole) *t*-Butoxycarbonyl-glycin-hydroxysuccinimidester [21] liess man über Nacht bei Zimmertemperatur stehen; Aufarbeitung analog Beispiel 5. Nach Verreiben mit Äther und mit Petroläther und Ausfällen aus Benzol-Diisopropyläther: 7,35 g (85%) farbloses, amorphes Pulver.

Aus 8,305 g (15,24 Millimole) *S*-Benzhydryl-*L*-cysteinyl-glycyl-glycyl-*L*-prolin-formiat erhielt man durch analogen Umsatz mit 2,13 ml (15,2 Millimole) Triäthylamin und 4,145 g (15,24 Millimole) *t*-Butoxycarbonyl-glycin-hydroxysuccinimidester 8,9 g (90%) **6**.

7. *N-t-Butoxycarbonyl-glycyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycyl-glycyl-L-prolin-p-nitrophenylester (7)*: 2,864 g (4,37 Millimole) *N-t*-Butoxycarbonyl-glycyl-(*S*-diphenylmethyl)-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolin (**6**) und 0,667 g (4,8 Millimole) *p*-Nitrophenol wurden in 25 ml Dimethoxyäthan ge-

⁵) Nach Abschluss unserer Versuche wurde die Herstellung dieser Verbindung von *Zahn & Hamnerström* veröffentlicht [18]. Diese Autoren erhielten einen um 4,5° höheren Smp., aber eine wesentlich kleinere Drehung von nur $[\alpha]_D = -6,6^\circ$ ($c = 1$ in Äthanol), obschon ihre Vorschrift zur Einführung der *t*-Butoxycarbonylgruppe mit unserer fast identisch ist.

⁶) Fa. *Radiometer AB*, Kopenhagen.

löst, auf 0° gekühlt und mit einer Lösung von 0,99 g (4,8 Millimole) Dicyclohexylcarbodiimid im gleichen Lösungsmittel versetzt. Nach 15 Std. bei 0° und 4 Std. bei Zimmertemperatur hat man den Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Den öligen Rückstand kristallisierte man aus Essigester: 2,492 g (73%) farblose Büschel dünner Nadeln. Dünnschichtchromatographie auf Silicagel mit Chloroform: Methanol: Eisessig (95:5:3 v) ergab, mit Jod-Dampf entwickelt, einen einzigen Fleck.

Selektive Abspaltung der t-Butoxycarbonylgruppe aus 7: 3,8 g (4,9 Millimole) des geschützten Pentapeptid-*p*-nitrophenylesters **7** hat man, fein verrieben, in 70 ml ca. 2,5 N HCl in Essigester eingetragen und 40 Min. bei Zimmertemperatur reagieren lassen. Die nach wenigen Minuten beginnende Ausscheidung von N-Glycyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycyl-glycyl-L-prolin-*p*-nitrophenylesterhydrochlorid wurde am Ende der Reaktionszeit durch Zugabe von viel Äther vervollständigt. Das Produkt hat man abfiltriert, mit Äther gewaschen und über NaOH-Plätzchen im Vakuum getrocknet: 3,224 g (92%).

8. *cyclo-Glycyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycyl-glycyl-L-prolyl (8):* Die Lösung von 0,733 g Glycyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycyl-glycyl-L-prolin-*p*-nitrophenylesterhydrochlorid in 10 ml Dimethylformamid hat man im Verlaufe von 4 Std. in 200 ml Pyridin bei 60° eingetropfelt (allgemeine Methode von Schwyzer *et al.* [14]). Nach 2 Std. bei 60° wurde die Lösung im Vakuum vom Pyridin befreit. Den Rückstand hat man in 200 ml Chloroform aufgenommen und nacheinander mit 0,1 N HCl (4mal), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5mal) und Wasser (öfters) ausgeschüttelt. Nach Trocknen mit Natriumsulfat und Verdampfen eines grossen Teils des Chloroforms begann das Produkt sich langsam auszuschleiden. Nach 15 Std. wurde es abfiltriert; durch Zugabe von Äther zur Mutterlauge wurde noch eine kleine Portion erhalten. Das Rohprodukt hat man in wenig Chloroform suspendiert und dann, auf dem Wasserbade, durch Zugabe von Äthanol gerade gelöst. Aus der klaren Lösung kristallisierte das Cyclopeptid nach Zusatz von 3 Volumina Äthanol beim Stehen über Nacht bei Zimmertemperatur aus: 378 mg farblose, lange, dünne Nadeln. Dünnschichtchromatographie an Silicagel mit Chloroform: Methanol (4:1 v) oder *n*-Butanol: Eisessig: Pyridin: Wasser (4:1:1:2 v [23]) ergab einen einzigen, ninhydrinnegativen, mit Jod-Dampf und *Reindel-Hoppe*-Reagens [24] reagierenden Fleck. **8** kann auch aus 65-proz. Äthanol Wasser kristallisiert werden.

9. *S,S'-Bis-cyclo-glycyl-L-hemicystyl-glycyl-glycyl-L-prolyl (9):* Eine Lösung von 1,075 g (2 Millimole) *cyclo*-Glycyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycyl-glycyl-L-prolyl und 200 mg Phenol in 35 ml Trifluoressigsäure wurde $\frac{3}{4}$ Std. unter Rückfluss erhitzt (allgemeine Methode von Zervas & Photaki [25]) und dann im Vakuum eingedampft. Durch Behandlung mit Äther wurde der ölige Rückstand fest. Die Lösung dieses Produktes in 200 ml Äthanol hat man mit Wasserstoff durchströmt und mit 0,56 ml (4 Millimole) Triäthylamin und 0,422 g (1,5 Millimole) frisch umkristallisiertem 1,2-Dijodäthan (in einigen ml Äthanol gelöst) versetzt (allgemeine Methode von Weygand & Zumach [15]). Nach 15 Std. Stehen bei Zimmertemperatur wurde der farblose Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und aus Äthanol-Wasser (65-proz.) umkristallisiert: 0,444 g (60%) farbloser, feiner Nadeln. Dünnschichtchromatographie an Silicagel mit *n*-Butanol: Eisessig: Wasser (100:15:35 v) und Entwickeln mit Jod-Dampf ergab einen einzigen, ninhydrinnegativen Fleck.

10. *Molekulargewichtsbestimmungen.* – a) *Dampfdruckosmometrie:* Die Messungen wurden mit der Knauer-Messbrücke und -Osmometerzusatz⁷⁾ und *o*-Chlorphenol als Lösungsmittel bei 61° ausgeführt; minimale Anheizzeit 1,5 Std. Nach 24 Std. Vorwärmung wurde das Gerät geeicht: Auftragen eines Tropfens *o*-Chlorphenol auf den rechten Thermistor, sodann eines Tropfens auf den linken. Der Tropfen rechts wurde abgewaschen und durch einen neuen ersetzt (Anordnung des Auftragens wichtig). Nun wurde der Skalawert am Messinstrument jede Minute abgelesen. Nach 6 Min. wurde mit dem Wendepotentiometer auf Null abgeglichen; Wiederholung bis Nullpunkt stabil (Tropfengrösse wichtig). Nun wurden nacheinander verschiedene Konzentrationen von Benzil (Molekulargewicht 210,23) in *o*-Chlorphenol gemessen, wobei mit der niedrigsten Konzentration begonnen und jeweils 5–10 Messungen vorgenommen wurden. Nach 6 Min. war jeweils das Minimum des Skalenwertes erreicht. Ergebnisse (nach Ausmittlung; Empfindlichkeit = 128): 0,025 M; 0,05 M; 0,075 M; 0,10 M Benzil; 23,5; 47,0; 65,2; 85,0 Skalenteile.

Resultate der analog ausgeführten Messungen mit unseren Cyclopeptiden s. Tab. 2.

⁷⁾ Fa. H. Knauer, Wissenschaftl. Gerätebau, Davoser Strasse 2B, 1 Berlin 33, Deutschland.

Tabelle 2. Dampfdruckosmometrisch bestimmte Molekulargewichte

Peptid	Einwaage	Skalateile	Molarität	Molgewicht	
	mg/ml		gefunden	gefunden	berechnet
8	9,25	17,2	0,01825	507	537,64
	21,3	43,9	0,0468	456	
9	2,05	3,0	0,0030	683	740,82
	20,24	28,0	0,0300	675	

b) *Kryoskopie*: Für unsere Zwecke erwies sich das *Knauer*-Kryoskopie-Zusatzgerät wegen seiner zu kleinen Kühlleistung als ungeeignet. Daher wurde mit einem Kryostat, einer Umwälzpumpe und einem Vibromischer ein externer Aufbau gemacht. Die Messzelle, ein spitzes Zentrifugenglas, wurde am Vibromischer befestigt. Gemessen wurde mit einem Platin-Widerstandsfühler von *Minco*⁸⁾, der einen linearen Temperatur/Widerstands-Verlauf aufwies. Als Kühlaggregat verwendete man das Gerät von *Kontron*⁹⁾. Temperaturschwankungen zwischen Ein- und Ausschalten der Regelung wurden zu $\pm 0,1^\circ$ ermittelt, bei einer Temperatur von $+12^\circ$. Der Thermistor wurde in der Buchse I der Messbrücke (*Knauer*) angeschlossen. Am Schreiber Ausgang schlossen wir einen *Hitachi* QPD 53-Schreiber an, der bei einer Empfindlichkeit von 0,1 V auf den Skala-Ausschlag abgeglichen wurde. Der Empfindlichkeitsdrehknopf an der Messbrücke wurde auf 50% eingestellt.

Geeicht haben wir nach 24-stündiger Einlaufzeit. Wir haben Versuche mit *o*-Chlorphenol, Eisessig und Dimethylsulfoxid gemacht, wobei sich letzteres [16] als am günstigsten erwies. Man gab 0,7 ml Dimethylsulfoxid in die Messzelle und unterkühlte bis zum Skalawert 90. Durch kurzes Vibrieren wurde die Kristallisation ausgelöst, und die Temperatur stieg an. Beim Maximum der Temperatur wurde mit dem Wendepotentiometer auf 0 Skalateile abgeglichen. Dies wurde so oft wiederholt, bis der Nullpunkt stabil war. Nun hat man 3 Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen von Benzoxycarbonyl-phenylalanyl-prolin (Mol.-Gew. 396,44) gemessen. Der Vorgang war gleich wie bei der Eichung, nur dass bei höherer Konzentration die Kristallisation erst bei einer Unterkühlung von über 100 Skalateilen ausgelöst werden konnte und bei niedriger Konzentration die Kristallisation oft spontan unter 100 Skalateilen eintrat, was offenbar einen Einfluss auf die Messergebnisse (erreichtes Temperaturmaximum) hatte. Im Bereich der Messungen war diese Abhängigkeit von der Konzentration linear (Auftragen der Messergebnisse bei jeder der drei Konzentrationen gegen die Unterkühlung). Aus jeder Messreihe wurde das Temperaturmaximum bei einer Unterkühlung von 100 Skalateilen graphisch bestimmt und auf die Eichkurve übertragen.

Bei 100 Skalateilen Unterkühlung und einer Empfindlichkeits-Einstellung von 128 ergab sich für *Z*·Phe-Pro·OH:

0,025 M 14,5 Skalenteile, 0,050 M 32,25 Skalenteile, 0,100 M 59,2 Skalenteile.

Die Messungen mit den Cyclopeptiden wurden genau gleich ausgeführt und ergaben für *cyclo*-Glycyl-(*S*-diphenylmethyl)-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolin (**8**) bei 10,3 mg/ml 11,7 Skalateile, was einer Molarität von 0,0190 und einem Molekulargewicht von 542 entspricht (ber. 537,6). Bei **9** verhinderte die schlechte Löslichkeit eine genügend genaue Molekulargewichtsbestimmung nach dieser Methode.

Fräulein Dr. *Pioda* und Herrn Prof. *Simon* [9] verdanken wir orientierende Versuche über die Kationenspezifität. Den Herren Dr. *Padowetz* (*CIBA Aktiengesellschaft*) und *H. Frohofer*, Org.-Chemisches Institut der Universität Zürich, verdanken wir die Elementaranalysen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *R. Schwyzer & U. Ludescher*, *Helv.* 52, 2033 (1969), 14. Mitt.
- [2] *B. C. Pressmann, E. J. Harris, W. S. Jagger & J. H. Johnson*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 58, 1949 (1967); *H. A. Lardy, S. N. Graven & O. S. Estrada*, *Fed. Proc.* 26, 1355 (1967).
- [3] *H. K. Wipf, L. A. R. Pioda, Z. Stefanac & W. Simon*, *Helv.* 51, 377 (1968).
- [4] *Z. Stefanac & W. Simon*, *Chimia* 20, 436 (1966); *Microchem. J.* 12, 125 (1967).

⁸⁾ Fa. *Telemeter Electronic AG.*, Gerechtigkeitsgasse 25, 8027 Zürich.

⁹⁾ Fa. *Kontron*, Hardstrasse 235, 8031 Zürich.

- [5] *A. D. Bangham, M. M. Standish & J. C. Watkins*, J. mol. Biol. *13*, 238 (1965); *P. Mueller & D. D. Rudin*, Biochem. biophys. Res. Comm. *26*, 398 (1967); *T. E. Andrioli, M. Tieffenberg & D. C. Tosteson*, J. gen. Physiology *60*, 2527 (1967); *A. A. Lev & E. P. Bushinsky*, Cytology (USSR) *9*, 102 (1967).
- [6] *B. T. Kilbourn, J. D. Dunitz, L. A. R. Pioda & W. Simon*, J. mol. Biol. *30*, 559 (1967).
- [7] *A. Agtarap, J. W. Chamberlin, M. Pinkerton & L. K. Steinrauf*, J. Amer. Chem. Soc. *89*, 5737 (1967); *L. K. Steinrauf, M. Pinkerton & J. W. Chamberlin*, Biochem. biophys. Res. Comm. *33*, 29 (1968); *M. Pinkerton, L. K. Steinrauf & P. Dawkins*, Biochem. biophys. Res. Comm. *35*, 512 (1969).
- [8] *V. T. Ivanov, I. A. Laine, N. D. Abdulaev, L. B. Senyavina, E. M. Popov, Yu. A. Ovchinnikov & M. M. Shemyakin*, Biochem. biophys. Res. Comm. *34*, 803 (1969).
- [9] Persönliche Mitteilung von Herrn Prof. Dr. *W. Simon*, Laboratorium für Organische Chemie der ETH, Zürich.
- [10] *R. Schwyzer*, Proceedings of the 4th International Pharmacology Meeting, Basel, Juli 1969, im Druck; *D. A. Deranleau & R. Schwyzer*, Biochemistry, im Druck.
- [11] *A. F. Beecham, J. W. Loder & G. B. Russell*, Tetrahedron Letters *15*, 1785 (1968).
- [12] *Pierre Crabbé*, «Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry», Holden-Day, San Francisco 1965.
- [13] *J. Kurtz & W. F. Harrington*, J. Mol. Biol. *17*, 440 (1966).
- [14] *R. Schwyzer, B. Iselin, W. Rittel & P. Sieber*, Helv. *39*, 872 (1956).
- [15] *F. Weygand & G. Zumach*, Z. Naturforschg. *17b*, 807 (1962).
- [16] *R. Schwyzer & P. Sieber*, Helv. *41*, 2190 (1958).
- [17] *E. Sandrin & R. A. Boissonnas*, Helv. *46*, 1637 (1963).
- [18] *H. Zahn & K. Hammerström*, Chem. Ber. *102*, 1048 (1969).
- [19] *R. G. Hiskey & J. B. Adams, Jr.*, J. org. Chemistry *30*, 1340 (1965); vgl. [25].
- [20] *E. Schnabel*, Liebigs Ann. Chem. *702*, 188 (1967).
- [21] *G. W. Anderson, J. E. Zimmermann & F. M. Callahan*, J. Amer. chem. Soc. *86*, 1839 (1964).
- [22] *B. Halpern & E. D. Nitecki*, Tetrahedron Letters *31*, 3031 (1967).
- [23] *M. Waki & N. Izumiya*, J. Amer. chem. Soc. *89*, 1278 (1967).
- [24] *C. G. Greig & D. H. Leaback*, Nature *188*, 310 (1960).
- [25] *L. Zervas & I. Photaki*, J. Amer. chem. Soc. *84*, 3887 (1962).

3. Inhaltstoffe der Wurzeln von *Margaretta rosea* Oliv.¹⁾

Glykoside und Aglykone, 323. Mitteilung²⁾

von **D. Sierp, W. Stöcklin** und **T. Reichstein**

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(29. X. 69)

Summary. The roots of *Margaretta rosea* Oliv., subsp. *rosea* Bullock contain cardenolides mixed with *Kedde* negative ester glycosides. 6 Cardenolides were identified by paper chromatography (PC) and thin layer chromatography (TLC). Three of them were free aglycones (uzarigenin (1), corotoxigenin (3) and coroglaucigenin (5)), the other three their corresponding 6-deoxy- β -D-allopyranosides (ascleposide (2), gofruside (4) and frugoside (6)). Only two cardenolides (1 and 5) were isolated in crystalline form. The behaviour of the more polar portion of the glycoside mixture shows that D-glucoside derivatives of at least 5 of the 6 cardenolides mentioned were also present.

The *Kedde* negative glycosides were a complicated mixture containing mainly 2,6-dideoxy-sugars linked to esterified polyhydroxy-pregnanes. After mild acid hydrolysis cymarose, oleandrose

¹⁾ Auszug aus Diss. *D. Sierp*, Basel 1967.

²⁾ 322. Mitt.: *Elber et al.* [1].