

gewertet werden, dass es sich beim Droso- und Isodrosopterin tatsächlich um Enantiomere handelt und dass auch das natürliche und synthetische Material strukturell identisch ist.

Den Herren Prof. Dr. *W. v. Philipsborn*, Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich, und Doz. Dr. *J. Jochims*, Fachbereich Chemie der Universität Konstanz, danken wir für die Aufnahme der 100-MHz-Spektren und wertvolle Diskussionen. Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* schulden wir Dank für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Für die Aufnahme der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren standen ein HA 100- und A 60-A-Gerät der Firma *Varian* zur Verfügung.

100-MHz-Spektren in DMSO- d_6 . Durch Lösen von 5 mg Droso- bzw. Isodrosopterin (**1**) in 0,5 ccm DMSO- d_6 wird bei Raumtemp. eine ges. Lösung hergestellt, vom Ungelösten durch Einsaugen in eine mit Watte verschlossene Kapillare abgetrennt, und dann die tiefrote Lösung vermessen.

100-MHz-Spektren in Deuteriotrifluoressigsäure. Etwas Deuteriotrifluoressigsäure wird zunächst entgast, dann werden 7 mg Droso- bzw. Isodrosopterin (**1**) in 0,5 ml gelöst, erneut entgast und nach ca. 30 Min. das erste Spektrum aufgenommen. Das Spektrum von 9 Akkumulationen wurde nach einem Zeitintervall von 2 Std. registriert.

100-MHz-Spektren in 1proz. DCl/D $_2$ O. 5 mg Droso- bzw. Isodrosopterin (**1**) werden mit jeweils 3 ml D $_2$ O 3mal im RV. zur Trockne eingengt und dann schliesslich in 0,5 ml 1proz. DCl/D $_2$ O gelöst und vermessen.

60-MHz-Spektrum in konz. Schwefelsäure. 20 mg Droso-/Isodrosopterin-Gemisch (**1**) werden in 0,5 ml konz. Schwefelsäure bei Raumtemp. gelöst und dann die dunkelgelbbraune Lösung ölgiger Konsistenz möglichst rasch zur Aufnahme gebracht.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *H. Schlobach & W. Pfeleiderer*, *Helv. 55*, 2533 (1972).
- [2] *H. Schlobach & W. Pfeleiderer*, *Helv. 55*, 2518 (1972).
- [3] *H. Schlobach & W. Pfeleiderer*, *Helv. 55*, 2525 (1972).
- [4] *A. Dieffenbacher, R. Mondelli & W. v. Philipsborn*, *Helv. 49*, 1355 (1966).
- [5] *W. v. Philipsborn, H. Stierlin & W. Traber*, *Helv. 46*, 2592 (1963).
- [6] *L. Merlini, W. v. Philipsborn & M. Viscontini*, *Helv. 46*, 2597 (1963).
- [7] *M. Viscontini*, *Helv. 41*, 1299 (1958); *M. Viscontini & E. Möhlmann*, *Helv. 42*, 1679 (1959).

254. The Solution Conformation of *cyclo*-Glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl¹⁾

Communication 22 (*preliminary*) on homodetic cyclic polypeptides [1]

by **R. Schwyzer, Ch. Grathwohl, J. P. Meraldi, A. Tun-Kyi, R. Vogel**
and **K. Wüthrich**

Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidg. Technische Hochschule
CH-8049 Zürich

(30. VIII. 72)

Our last report on this subject [2] had left us with an option for two different solution conformations, III a and III b, for *cyclo*-(-Gly-Pro-Gly) $_2$. We have now been

¹⁾ Note added in proof: *Blout, Deber & Pease* (Harvard University) have independently reached similar conclusions (*E. R. Blout*, personal communication).

able to prove that structure type III b (Fig. 1) is correct for dimethylsulfoxide (DMSO) solutions of this cyclo-hexapeptide between at least 20 and 100°.

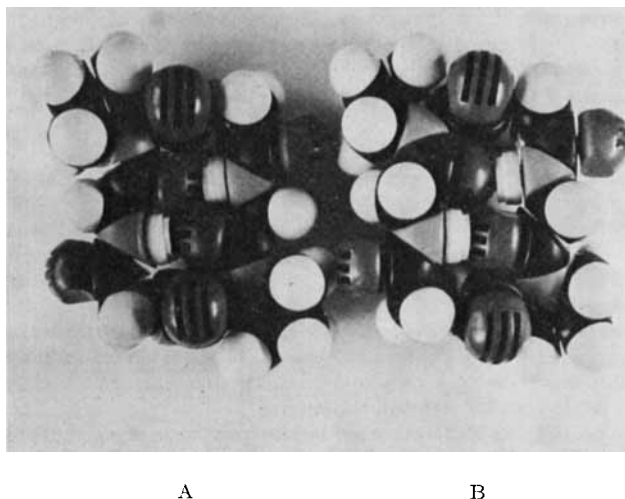


Fig. 1. Molecular models of the type III b [2] structure of cyclo-(Gly¹-Pro²-Gly³-Gly⁴-Pro⁵-Gly⁶-). Model A has $\varphi(1, 4) \simeq 345^\circ$, $\psi(1, 4) \simeq 0^\circ$ (1966 convention [5]). Model B differs from A solely by a Gly^{1,4} α -carbon rotation of $\simeq 30^\circ$ to $\varphi(1, 4) \simeq +15^\circ$ and $\psi(1, 4) \simeq +330^\circ$ (Table 2).

The main piece of evidence is derived from NMR. comparisons (Fig. 2) with a specifically α -carbon deuterated analogue, *cyclo*-[-Gly-Pro-Gly(d_2)-]₂: the *solvent exposed* NH protons belong to glycines No. 3 and 6 (Fig. 1); the glycine No. 1 and 4 protons are those which are shielded from the solvent, most probably through transannular hydrogen bond formation.

¹³C-NMR. reconfirms the C₂ symmetry of the covalent structure and (according to the criteria of *Wüthrich, Tun-Kyi & Schwyzer* [1]) indicates *trans* Gly-Pro bonds as postulated by the model (details to be published separately).

Our earlier assignments by resonance position, deuterium exchange, and solvent dependence of intramolecularly shielded (7.61 ppm) and solvent exposed (8.67 ppm) NH protons have been verified by a temperature dependence study (Fig. 3). The NMR. parameters used for calculating the spectrum of Fig. 2B are listed in Table 1.

An interesting feature of the molecule is its great conformational stability. Even at 100° in DMSO, only the structure type III b with *trans,trans'* proline (nomenclature cf. *Meraldi, Schwyzer, Tun-Kyi & Wüthrich* [1]) is observed. However, the -CH₂-moieties of the Gly residues appear to have gained increased mobility. This follows from the observation that the ABX spectra of the glycylic residues (Table 1) are transformed into A₂X at higher temperatures, and that the sum of the two vicinal spin-spin coupling constants in each glycylic residue varies with temperature.

Table 2 contains the dihedral angle values (φ and ψ) obtained by energy minimization for structure III b. The data agree with the Fig. 1 B conformation which results

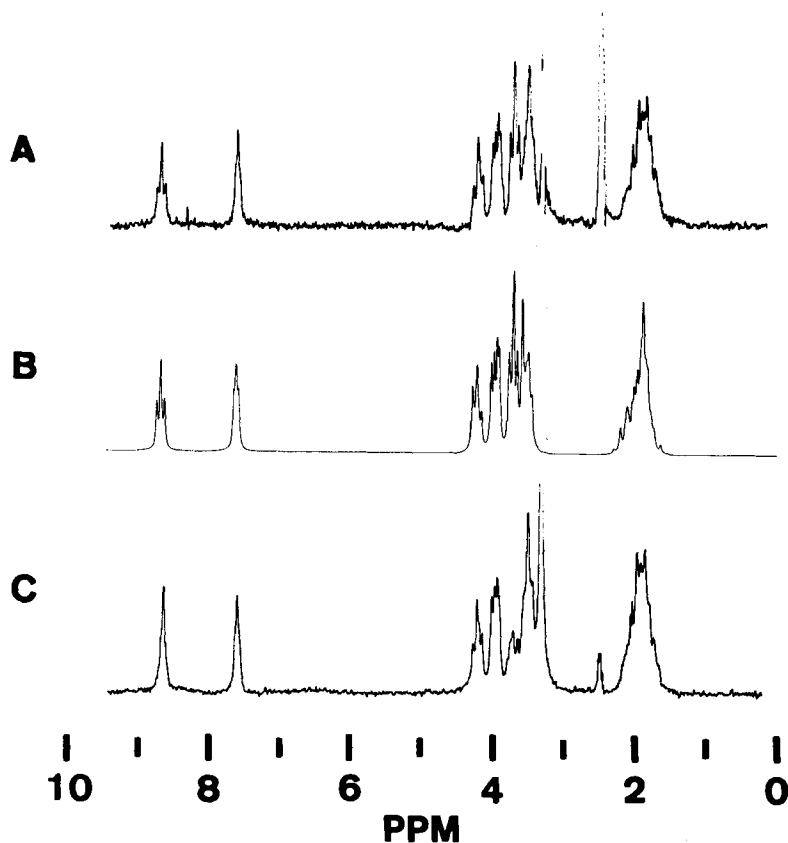


Fig. 2. 100 MHz proton NMR. spectra of cyclo-hexapeptides. Solvent: DMSO- d_6 ; temp. 27°. A: c -(-Gly-Pro-Gly-) $_2$; B: simulation of spectrum A with the parameters of Table 1, line half-width at half-height = 1.5 Hz; C: c -[-Gly-Pro-Gly(d_2)-] $_2$.

Table 1. 1H -NMR. parameters used to compute the spectrum of c -(-Gly-Pro-Gly-) $_2$ in Fig. 1 B. The data for Pro were taken from previous work (Deber, Torchia & Blout [4], cf. Meraldi *et al.* [1]) and then modified so as to obtain an approximate fit with the observed spectrum.

Residue	Type of NMR. spectrum	1H -NMR. parameters (ppm, Hz)	
Gly (1, 4)	ABX	$\delta_A = 3.87$	$J_{AB} = (-)18.5$
		$\delta_B = 4.06$	$J_{AX} = 2.5$
		$\delta_X = 7.61$	$J_{BX} = 4.5$
Gly (3, 6)	ABX	$\delta_A = 3.64$	$J_{AB} = (-)17.5$
		$\delta_B = 3.79$	$J_{AX} = 5.0$
		$\delta_X = 8.67$	$J_{BX} = 6.0$

from 1A by an upward movement of the Gly 1,4 α -carbon atoms (φ more positive and ψ more negative by $\approx 30^\circ$). Energy differences between the two conformers, 1A and 1B, remain to be investigated very carefully.

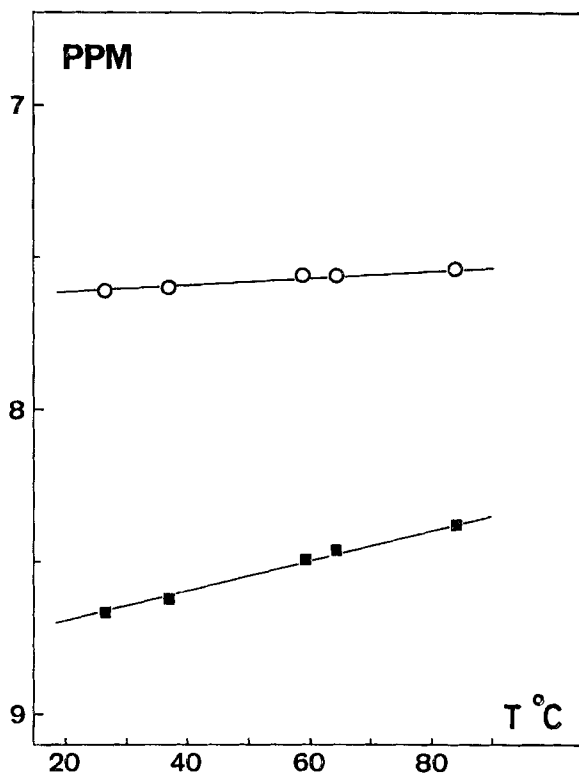


Fig. 3. Temperature dependence of the Fig. 2A peptide proton resonances

Table 2. Conformational parameters calculated for a type IIIb structure (Fig. 1) by energy minimization. (Procedure to be described in a detailed communication.) Values of φ , ψ , ω in degrees according to the 1966 [5] and 1970 [6] conventions.

<i>cyclo</i> -(-Gly ¹ -Pro ² -Gly ³ -Gly ⁴ -Pro ⁵ -Gly ⁶ -)	1966	1970
φ (1, 4)	15	- 165
ψ (1, 4)	330	150
φ (2, 5)	110	- 70
ψ (2, 5)	300	120 (= trans')
φ (3, 6)	280	100
ψ (3, 6)	180	0
$\omega_i = 0^\circ$		

Experiments were carried out with ca. 0.05M peptide solutions in DMSO- d_6 using a Varian XL-100 spectrometer. Resonance assignments are based on the comparison of the spectra (Fig. 2, A and C) and on double resonance experiments. Crystalline *cyclo*-[-Gly-Pro-Gly(d_2)-]₂ was prepared from H·Gly-Pro-Gly(d_2)·OC₆H₄·NO₂(*p*) by the usual doubling cyclization [3]. Identity was shown by thin layer chromatography and NMR.

We thank the Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung for financial aid (grants 3.374.70 and 3.423.10).

REFERENCES

- [1] Communication 15: *R. Schwyzer, Aung Tun-Kyi, M. Caviezel & P. Moser*, *Helv.* **53**, 15 (1970); 16: *K. Wüthrich, J. P. Meraldi, A. Tun-Kyi & R. Schwyzer*, First European Biophysics Congress *E1/20*, p. 93, Verlag der Wiener Medizinischen Akademie 1971; 17: *U. Ludescher & R. Schwyzer*, *Helv.* **54**, 1637 (1971); 18: *B. Donzel, B. Kamber, K. Wüthrich & R. Schwyzer*, *Helv.* **55**, 947 (1972); 19: *J. P. Meraldi, R. Schwyzer, A. Tun-Kyi & K. Wüthrich*, *Helv.* **55**, 1962 (1972); 20: *K. Wüthrich, A. Tun-Kyi & R. Schwyzer*, *FEBS Letters* **25**, 104 (1972); 21: *U. Ludescher & R. Schwyzer*, *Helv.* **55**, 2052 (1972).
- [2] *R. Schwyzer & U. Ludescher*, *Helv.* **52**, 2033 (1969).
- [3] *R. Schwyzer, J. P. Carrión, B. Gorup, H. Nolting & Aung Tun-Kyi*, *Helv.* **47**, 441 (1964).
- [4] *C. M. Deber, D. A. Torchia & E. R. Blout*, *J. Amer. chem. Soc.* **93**, 4893 (1971).
- [5] *J. T. Edsall, P. J. Flory, J. C. Kendrew, A. M. Liquori, G. Némethy, G. N. Ramachandran & H. A. Scheraga*, *J. mol. Biol.* **15**, 309 (1966).
- [6] *IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature*, *J. mol. Biol.* **52**, 1 (1970).

255. Weitere Bufadienolide aus *Ch'an Su*Über Krötengifte, 39. Mitteilung¹⁾von **Niklaus Höriger, Dobrila Živanov, Horst H. A. Linde**
und **Kuno Meyer**

Pharmazeutisches Institut der Universität Basel

(28. VIII. 72)

Summary. From the toad venom *Ch'an Su* the bufadienolides **1**, **4**, **9**, **10**, **12**, **15**, **17**, **20**, **22**, **25** and **18**, the latter as diacetate **19** were isolated and their structure elucidated.

In Fortsetzung unserer Versuche [2], die chloroformlöslichen Bestandteile von *Ch'an Su* aufzutrennen, liess sich eine Reihe weiterer Bufogenine isolieren, die grösstenteils bisher unbekannt waren. Sie wurden durch wiederholte chromatographische Auftrennungen von Mutterlaugenrückständen (ML.) [2] gewonnen, die bei der Kristallisation bereits früher in *Ch'an Su* aufgefundener Bufogenine erhalten worden waren. So konnten aus den ML. von Cinobufagin [3] und Resibufogenin [4] die Substanzen **1** und **4** und aus der ML. von Bufalin [5] Bufotalon (**9**) [6], das bisher nur im Giftsekret von *Bufo formosus Boulenger* aufgefunden worden war [7], gewonnen werden. **10**, **12** und **22** liessen sich aus den polaren u. a. noch Desacetylcinobufotalin [8] enthaltenden Anteilen der ersten säulenchromatographischen Auftrennungen der Chloroformextrakte aus *Ch'an Su* isolieren [2]. **15** sowie **20** wurden aus den ML. von Arenobufagin [9] gewonnen, wobei für die Lokalisierung von **15** im DC. und seine Isolierung das durch Reduktion von **13** mit NaBH₄ erhaltene **15** diente²⁾. Mangels Substanz konnte die Diacetylverbindung **16** nicht aus natürlichem **15** bereitet werden, dagegen durch Acetylierung der ML. von **25** (siehe weiter unten), das man durch Reduktion von rohem **13** erhalten hatte. Das rohe Acetylierungsprodukt gab im DC. 2 Flecke.

¹⁾ 38. Mitt.: s. [1].

²⁾ Da Cinobufaginol (**23**) [10], den dem 19-Oxo-cinobufagin (**27**) [2] entsprechende Alkohol, schon früher in *Ch'an Su* aufgefunden worden war, vermuteten wir, dass die dem 19-Oxo-cinobufotalin (**13**) [2] entsprechende 19-Hydroxyverbindung **15** auch in *Ch'an Su* enthalten sei.