

## 54. Verdoppelungserscheinungen beim Ringschluss von Peptiden V. Relative Bedeutung der sterischen Hinderung und der Assoziation über Wasserstoff-Brücken bei Tripeptiden. Spektroskopische Versuche zur Konformationsbestimmung<sup>1)</sup>.

12. Mitteilung über homodet cyclische Polypeptide [1]<sup>2)</sup>

von R. Schwyzer<sup>3)</sup>, J. P. Carrión, B. Gorup, H. Nolting und Aung Tun-Kyi

(21. XII. 63)

### 1. Problemstellung

Die Entstehung cyclischer Hexapeptide bei der Cyclisierung von Tripeptidderivaten kann durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren erklärt werden [2]:

Die *sterische Hinderung* in einem Cyclotripeptid sowie in Übergangszuständen oder Zwischenprodukten der Ringschlussreaktion ist wahrscheinlich gross. Die drei Peptidbindungen müssten die sterisch ungünstige *cis*-Konfiguration einnehmen, wodurch Wasserstoffatome oder Seitenketten an den  $\alpha$ -C-Atomen einander abnormal nahekommen würden. In Cyclohexapeptiden und den entsprechenden Übergangszuständen und Zwischenprodukten, an denen zwei Tripeptidmolekeln teilnehmen, fallen diese hindernden Faktoren weg.

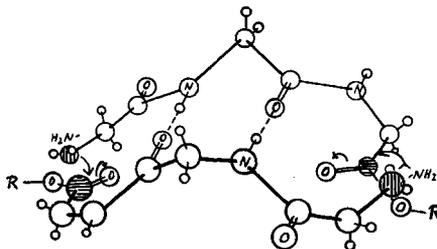


Fig. 1. *Antiparallele Assoziation zweier Molekeln von Diglycyl-glycin-ester* [2]  
Nucleophiler Angriff der Aminostickstoffe (●) auf die Carboxyl-Kohlenstoffatome (●);



Die *antiparallele Aneinanderlagerung* [3] zweier reaktiver Peptidketten (Fig. 1) würde voraussichtlich die Verdoppelungsreaktion bei Peptidderivaten mit einer ungeraden Anzahl von Aminosäureresten besonders begünstigen, weil die Lage der einzelnen Atome in einem solchen, durch *Wasserstoff-Brücken* zusammengehaltenen Assoziat fast genau derjenigen in plausibeln Übergangszuständen für die Bildung des

<sup>1)</sup> Diese Arbeit wurde mit Hilfe von Zuwendungen des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS, Kredit (Nr. 1412), angefangen und mit einem Forschungskredit der CIBA AG in Basel beendet.

<sup>2)</sup> Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 463.

<sup>3)</sup> Adresse vom 1. II. bis 31. XII, 1964: Dept. of Biochemistry, University of Washington, Seattle, Wash., U.S.A.; nachher: Institut für Molekulare Biologie, Eidg. Technische Hochschule, Zürich.

cyclischen Produktes entspricht. Dieser «Assoziationsfaktor» dürfte je nach Verdünnung und Lösungsmittel, in welchem die Cyclisierung vorgenommen wird, verschieden stark in Erscheinung treten und in solchen Medien, welche Wasserstoff-Brücken zwischen den Peptidketten nur wenig beeinträchtigen, am wirksamsten sein. Ähnliche Assoziate (Fig. 2) wurden bereits bei der bevorzugten Reaktion zweier Molekeln Diglycyl-glycin-methylester zu Pentaglycyl-glycin-methylester erworben [4].

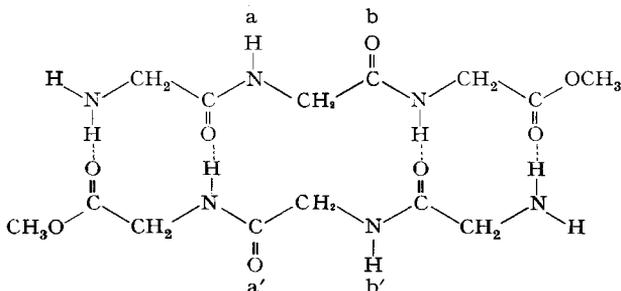


Fig. 2. Antiparallele Assoziation zweier Molekeln von Diglycyl-glycin-methylester nach REES, TONG & YOUNG [4]

Um cyclisiert werden zu können, müssten die eingezeichneten Wasserstoffbrücken gelöst und neue (z. B. zwischen den Atomen a, a' und b, b') geschlagen werden.

Ein weiterer Faktor, der (besonders bei Tetrapeptiden und höhern Peptiden) mitentscheiden kann, ob in einem bestimmten Falle eine einfache Cyclisierung oder eine Verdoppelung eintreten werde, ist der mittlere Abstand der endständigen Amino- und Carboxylgruppen. KENNER und Mitarbeiter [5] wiesen darauf hin, dass gewisse Peptide, bei denen L- und D-Aminosäuren vorkommen, ein kleineres dielektrisches Inkrement (und somit einen kleinern Abstand zwischen  $-NH_3^+$  und  $-COO^-$ ) aufweisen als entsprechende sterisch einheitliche Verbindungen.

Es stellt sich nun das Problem, die relative Bedeutung dieser verschiedenen Faktoren im speziellen Falle der Cyclisierung von Tripeptiden abzuschätzen.

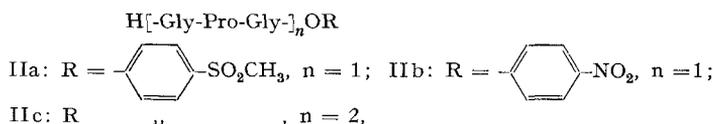
## 2. Synthetische Untersuchungen

Cyclisierungsversuche mit aktivierten Estern von Glycyl-L-prolyl-glycin und von Glycyl-glykolyl-glycin schienen uns zur Lösung des Problems eine Handhabe zu bieten.

Glycyl-L-prolyl-glycin oder seine aktivierten Ester können sich wegen ihrer gewinkelten Struktur (Fig. 3) nicht nach Fig. 1 assoziieren. Die Abwinkelung bewirkt gegenüber einem gestreckten Tripeptid eine Abnahme der C zu N-Distanz zwischen Carboxyl- und Aminogruppe von ca. 10,5 auf etwa 7,8 Å. Dadurch sollte, wie es schon SMITH postuliert hatte [6], die Cyclisierung zum Cyclotripeptid, in unserem Falle Cyclo-glycyl-L-prolyl-glycin wesentlich erleichtert werden<sup>4)</sup>.

<sup>4)</sup> Durch Aufbewahren einer alkoholischen Lösung von Glycyl-DL-prolyl-glycin-äthylester hatte SMITH ein Produkt erhalten, das er als Cyclotripeptid ansprach [6]. Freundlicherweise schickte er uns eine Probe davon sowie eine Kopie des IR.-Spektrums. Vergleich der IR.-Spektren ergab (unter Berücksichtigung kleiner Differenzen, die von der Aufnahme im festen Zustande herrühren mögen) eine fast völlige Übereinstimmung (vgl. Abschnitt 3) mit unserem Produkte. Die DEBYE-SCHERRER-Diagramme waren erwartungsgemäss verschieden, da SMITH vom Racemat, wir von der L-Verbindung ausgegangen waren.

Cyclisierung der aktivierten Tripeptidester IIa und IIb sowie des aktivierten Hexapeptidesters IIc,



ergab in allen Fällen dasselbe kristallisierte Produkt<sup>5)</sup>, welches als das Cyclohexapeptid (IV),  $\square\text{Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly}$ , identifiziert werden konnte (Molekulargewicht kryoskopisch in Dimethylsulfoxid bestimmt [2a] [7]: Ber. 422, Gef. 408; 9,7 mg in 3 ml ergaben eine Schmelzpunktsdepression von 0,034°).

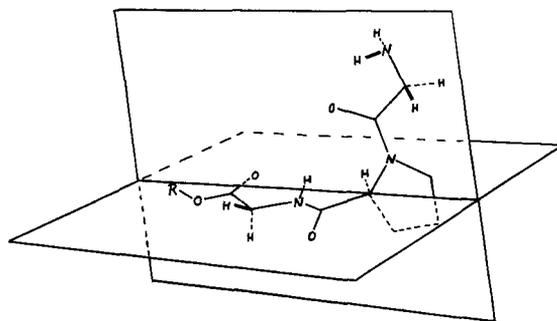
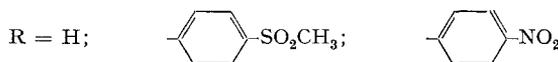
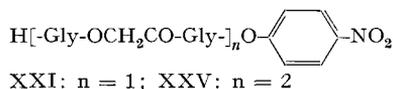


Fig. 3. Modell des Glycyl-L-prolyl-glycins und seiner Ester in sterisch begünstigter Konformation



Auch im Falle des Glycyl-glykolyl-glycins und seiner aktivierten Ester:



kann eine Assoziation zweier Molekeln nicht nach Fig. 1 erfolgen (vgl. aber Abschnitt 5). Die Bildung eines «Cyclo-monodepsi-dipeptides»<sup>6)</sup>,  $\square\text{Gly-OGly-Gly}$ <sup>7)</sup>,

<sup>5)</sup> Identitätsbeweise vgl. Abschnitt 2.1. Von Herrn Dr. J. RUDINGER, Prag, und von Herrn Dr. M. ROTHE, Mainz, erfahren wir, dass sie dasselbe Produkt wie wir erhalten haben. In einer vorläufigen Mitteilung vor der Schweiz. Chem. Ges. in Genf am 27. II. 1960 (B. GORUP & R. SCHWYZER) hatten wir geglaubt, das Cyclotripeptid erhalten zu haben. Dieser Irrtum beruhte auf Löslichkeitsunterschieden und kryoskopischen Unterschieden, welche durch kleine, analytisch nicht erfasste Verunreinigungen verursacht wurden.

<sup>6)</sup> Wir verwenden hier das mit dem Wortteil «Peptid» verbundene Zahlpräfix zur Bezeichnung der Summe der Aminosäurereste; das mit «depsi» verbundene Zahlpräfix soll die Zahl der Hydroxycarbonsäurereste angeben.

<sup>7)</sup> Die Nomenklatur folgt den Vorschlägen des V. Europ. Peptidsymposiums (Pergamon Press, 1963), S. 261). Zusätzlich bedeutet Kleinschreibung des Aminosäure-Symbols das D-, und Großschreibung das L-Isomere (Gly ist symmetrisch). OGLy  $\equiv$  Glykolsäure, HO · CH<sub>2</sub> · COOH;



würde durch den Ersatz von NH durch O kaum erleichtert werden, da die sterischen Erfordernisse etwa gleich sind: insbesondere sind die Resonanzenergien auch ähnlich (24 und 21 kcal/Mol Ester bzw. Amidbindungen [8]), so dass der Übergang *trans* → *cis* energetisch etwa gleichermassen belastet sein dürfte wie bei der Bildung eines Cyclotripeptides aus einem «*trans*»-Tripeptid.

Sowohl aus XXI als auch aus XXV wurde dasselbe Cyclodepsipeptid erhalten, für das wir aus Analogiegründen die Molekulargrösse eines Cyclo-didepsi-tetrapeptides (VII),  $\square$ -Gly-OGly-Gly-Gly-OGly-Gly- $\square$  annehmen<sup>8)</sup> (RÖNTGEN-Diagramm vgl. Tabelle 1).

Aus diesen Experimenten möchten wir schliessen, dass der sterische Faktor (darin inbegriffen die Aktivierungsenergie des Übergangs der *trans*-Peptidbindungen in *cis*-Peptidbindungen) für die Verdoppelungsreaktion bei der Cyclisierung möglicherweise von ausschlaggebender Bedeutung ist. Der «Assoziationsfaktor», jedenfalls nach Fig. 1 scheint nicht nötig zu sein (vgl. aber Abschnitt 5). Dass er aber bei höhern Peptiden, wo sterische Faktoren von kleinerer Bedeutung sein können (z. B. bei der Synthese des Gramacidins S aus zwei identischen Pentapeptideinheiten [10]), trotzdem eine relativ grosse Rolle spielen könnte, darf deshalb nicht ausser acht gelassen werden<sup>9)</sup>.

Die Verkürzung des Abstandes zwischen den Zentren eines Tripeptides, die reagieren sollten, um ca. 25% genügt nicht, um (im Falle des Gly-Pro-Gly) eine intramolekulare Reaktion zu erzwingen. Ebenso genügt dazu nicht die Einführung eines einzigen Winkels, wie er durch den einen Prolinrest bedingt wird (es bleibt uns abzuklären, ob mehrere Prolinreste ein Cyclo-tripeptid ergeben könnten).

2.1. *Synthese von Cyclo-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl (III)*. Dieses cyclische Hexapeptid wurde sowohl aus dem Hexapeptidderivat Ic, *p*-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-*p*-methansulfophenylester, als auch aus einer Reihe verwandter Derivate des Tripeptids Glycyl-L-prolyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-*p*-methansulfophenylester, durch Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppen und Cyclisierung in verdünntem Pyridin nach der von unserem Arbeitskreise entwickelten Methodik [11] als gut kristallisierte Verbindung gewonnen (Schema 1).

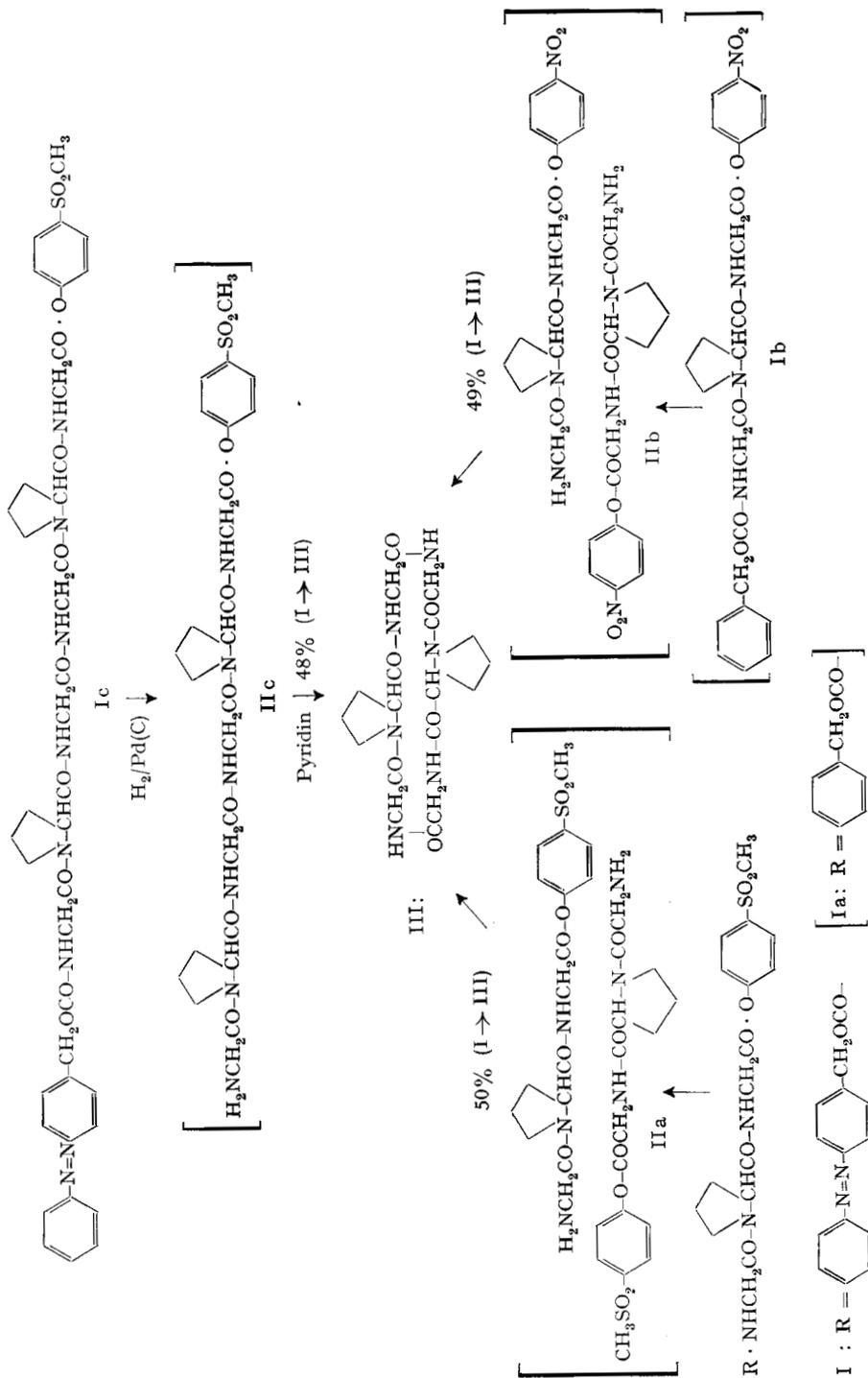
Mittels dünnschichtchromatographischer Untersuchung konnten im rohen Cyclisierungsgemisch der Tripeptidderivate keine Anzeichen eines Cyclotripeptides erhalten werden. Die Identität der verschiedenen Präparate der Cyclohexapeptide wurde durch Vergleich der RÖNTGEN-Pulverdiagramme (Tab. 1) und der IR.-Spektren (Fig. 4) sichergestellt.

Die Ausgangseptide für die Cyclisierungsstufe wurden nach zwei Verfahren hergestellt (Schemata 2 und 3). Auffallend ist die Tatsache, dass die *p*-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-Schutzgruppe [12] (Schema 2) bis auf V alles kristalline Zwischenprodukte liefert, währenddem entsprechende Verbindungen mit der Carbobenzoxy-Schutzgruppe in vielen Fällen nicht kristallisierten (es betrifft dies besonders die wichtigen aktivierten Ester Ia und Ib, Schema 3). Für Einzelheiten sei auf den experimentellen Teil verwiesen.

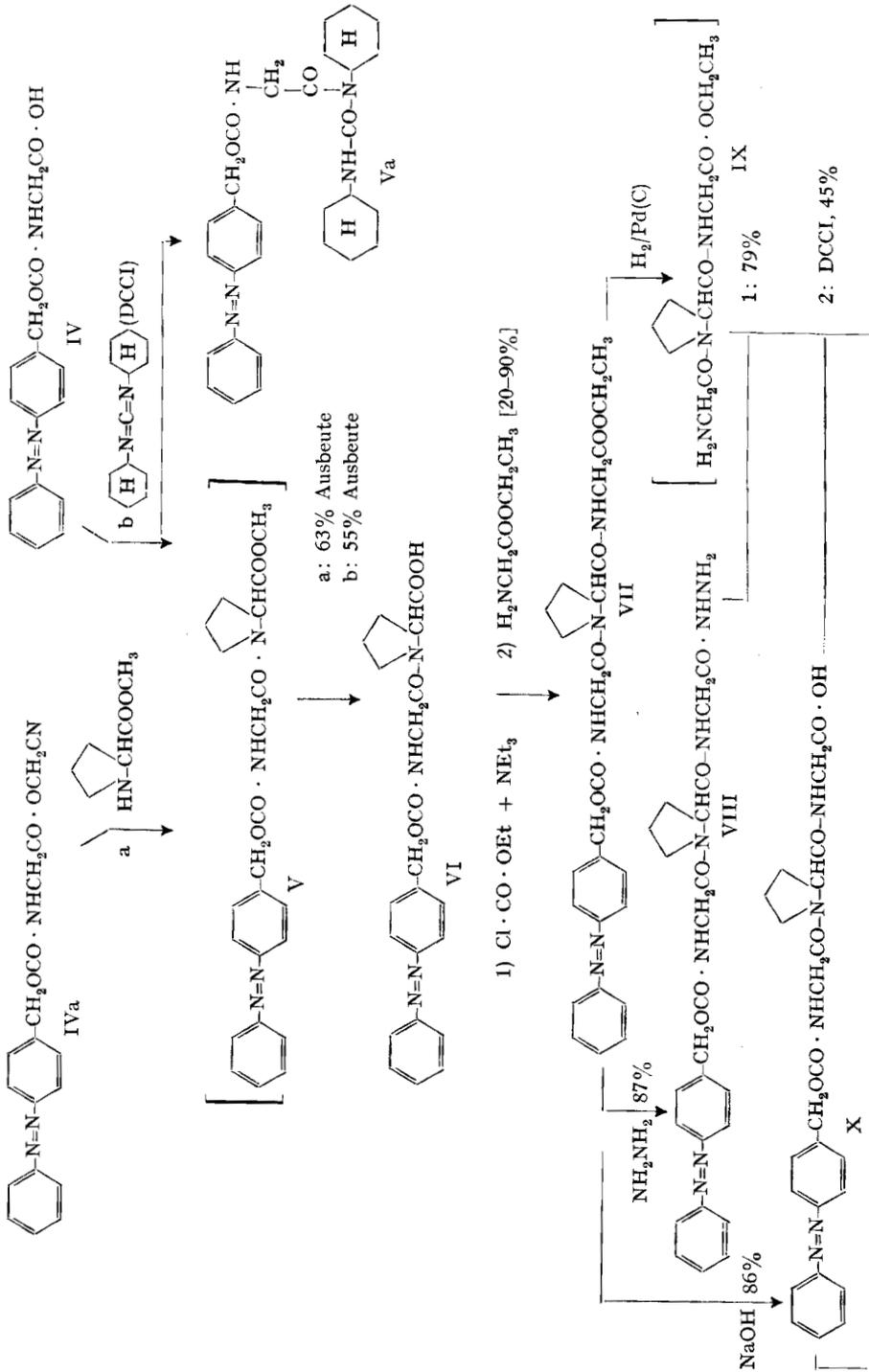
<sup>8)</sup> ANTONOV, VINOGRADOVA, OVCHINNIKOW & SHEMYAKIN [9] haben im Verlaufe ihrer Studien über Cyclo-depsipeptide ebenfalls Verdoppelungsreaktionen beobachtet.

<sup>9)</sup> In diesem Beispiele ist es durchaus möglich, dass die Assoziation über H-Brücken durch Oberflächenkräfte wie «lipophile» Anziehung (z. B. zwischen den Valin-, Leucin, und Phenylalanin-Resten) unterstützt wird.

Schema 1: Cyclisierung verschiedener Peptide zu Cyclo-glycyl-L-prohyl-glycyl-L-prohyl-glycyl (III).  
Klammern bezeichnen nicht kristallin erhaltene Zwischenprodukte.



Schema 2. Synthese von aktivierten Estern von *p*-Phenylazobenzylcarboxyl-L-prolyl-glycin (I, XIII) und von *p*-Phenylazobenzylcarboxyl-L-prolyl-glycin-L-prolyl-glycin (Ic)



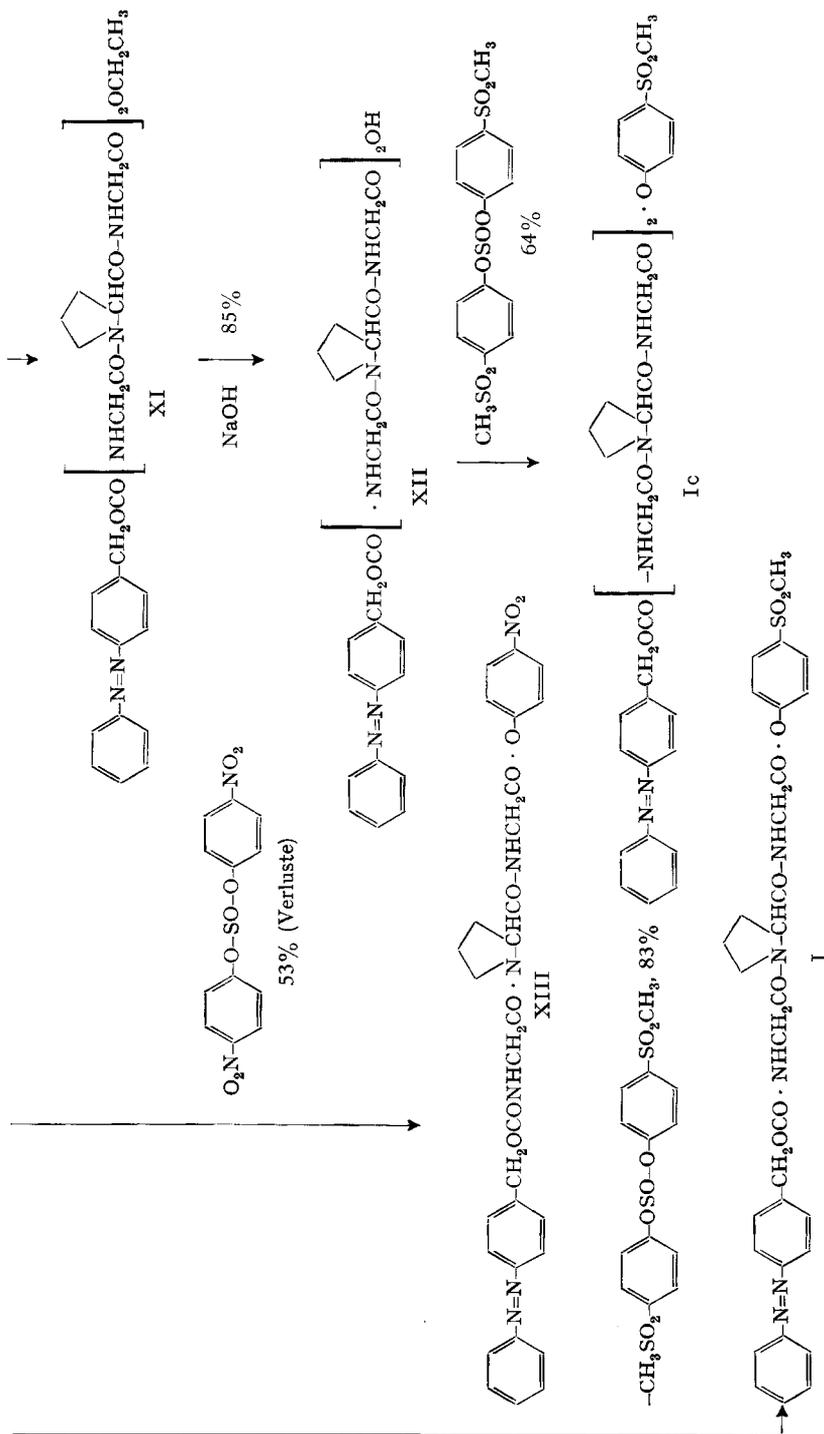


Tabelle 1. Netzebenenabstände in Å  
(Aufnahmen mit GUINIER-Kamera «Nonius», Strahlung: Cu  $K_{\alpha}$ )

Substanz	Aufnahme Nr.	Reflexe:		
		stark	mittel	schwach
[-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly-]		11,5	8,3	4,17
		5,7	7,0	3,9
		5,6	4,75	3,0
	aus Hexapeptid: 2434 (oben)	4,5	4,4	
		4,35	4,09	
	aus Tripeptid: 2434 (unten)	4,25	3,78	
			3,6	
			3,47	
			3,4	
			3,17	
		3,19		
[-Gly-OGly-Gly-Gly-OGly-Gly-]		4,6	7,3	10,5
		4,0	5,3	7,0
	aus «Hexapeptid»: 4501 (unten)	3,9	4,3	2,92
			3,8	2,83
	aus «Tripeptid»: 4501 (oben)		3,75	2,22
			3,48	2,13

2.2. *Synthese von Cyclo-glycyl-glykolyl-glycyl-glycyl-glykolyl-glycin (XXVI)*. Diazoacetyl-glycin-*p*-nitrobenzylester (XVIII) [13] wurde in benzolischer Lösung mit *t*-Butoxycarbonylglycin [14] zu *t*-Butoxycarbonylglycyl-glykolyl-glycin-*p*-nitrobenzylester (XIX) umgesetzt. Aus diesem Produkte lässt sich einerseits mit Säure die *t*-

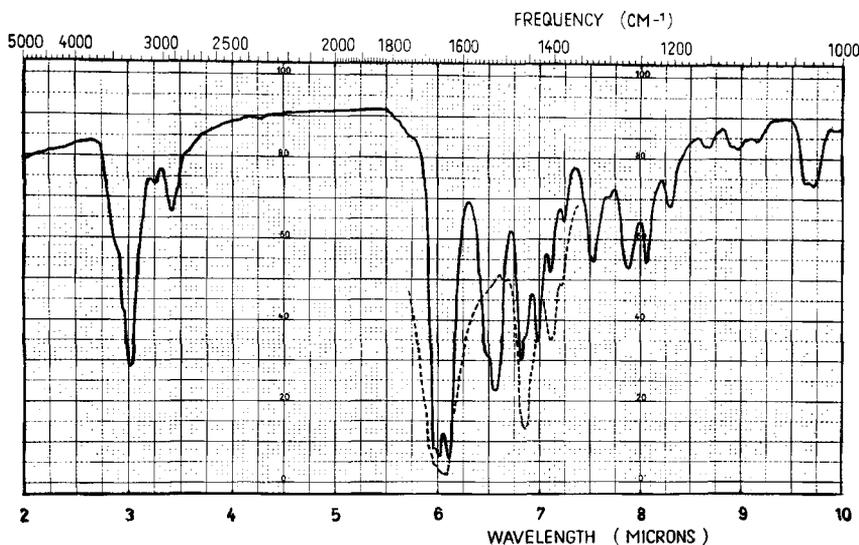
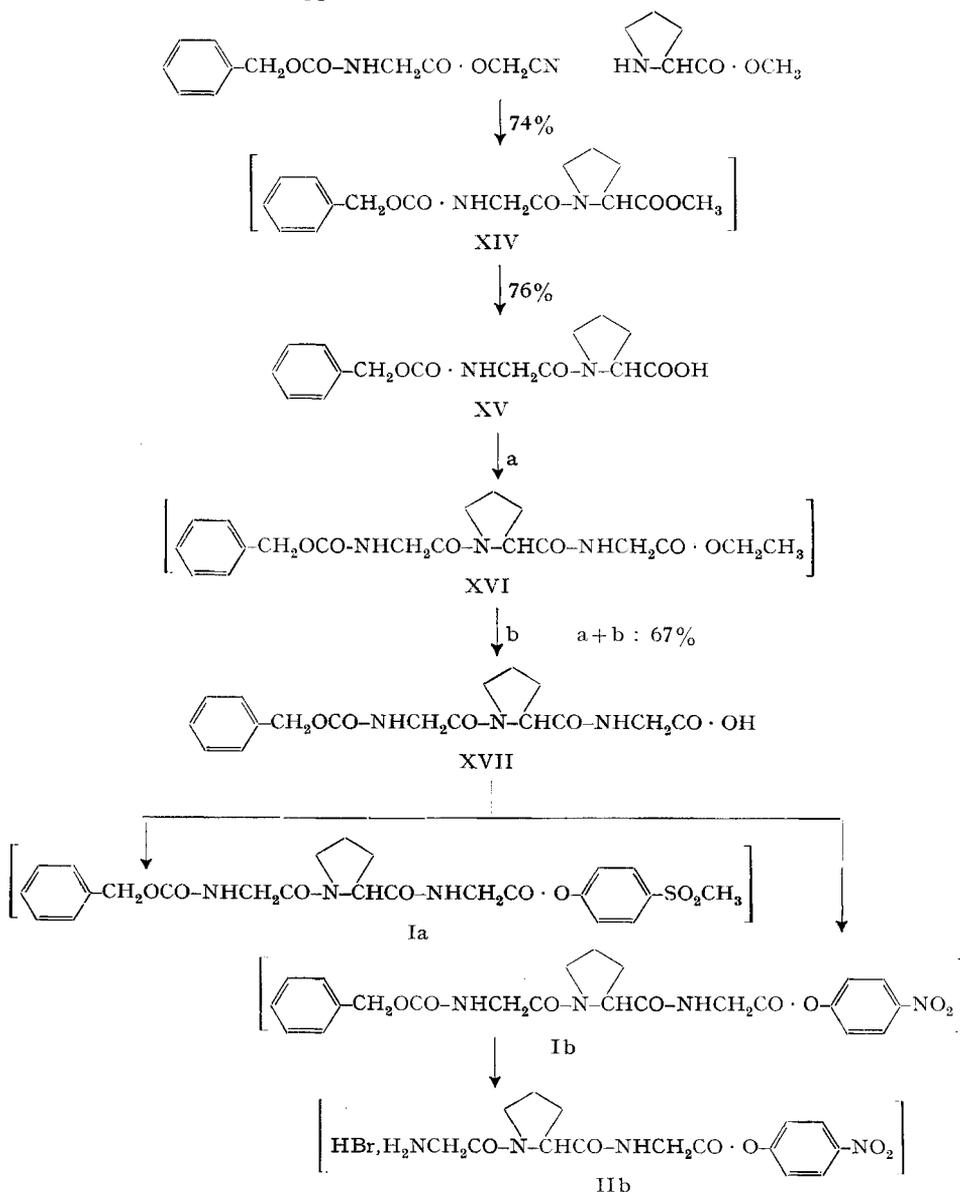


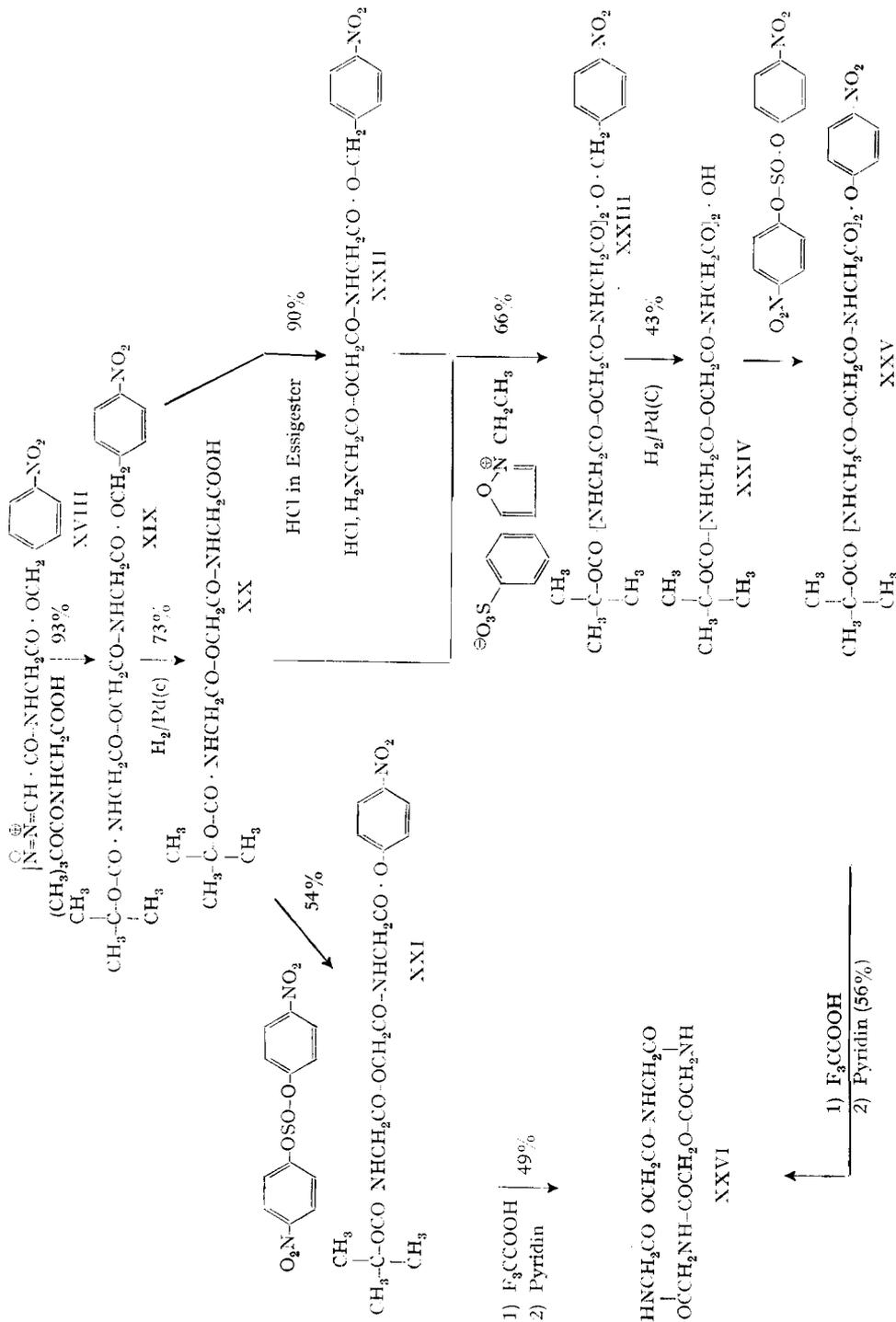
Fig. 4. IR.-Spektren von Cyclo-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl (III) und von Glycyl-L-prolin-anhydrid (XXVII). Kristallisierte Phasen, in KBr. III: —, XXVII: - - -

Schema 3: *Synthese von aktivierten Estern (Ia, Ib) des Carbobenzoxy-glycyl-L-prolyl-glycins*  
 [ ] bedeutet nicht kristallines Produkt



Butoxycarbonylgruppe, andererseits durch Hydrierung die *p*-Nitrobenzylester-Schutzgruppe selektiv entfernen. Die weiteren Umsetzungen bis zu den aktivierten Estern (XXI), *t*-Butoxycarbonylglycyl-glykolyl-glycin-*p*-nitrophenylester, und (XXV), *t*-Butoxycarbonylglycyl-glykolyl-glycyl-glycyl-glykolyl-glycin-*p*-nitrophenylester, sind aus Schema 4 ersichtlich. Sämtliche Produkte konnten kristallisiert werden.

Scheme 4. Synthese von Cyclo-glycyl-glykyl-glycyl-glykyl-glycyl (XXVI)



Die Cyclisierung der aktivierten Ester in Pyridin führte in beiden Fällen zu Cyclo-glycyl-glykoly-glycyl-glycyl-glykoly-glycyl (XXVI). Die Identität der Cyclisierungsprodukte wurde durch Vergleich ihrer RÖNTGEN-Diagramme (vgl. Tabelle 1) und ihrer IR.-Spektren (Fig. 5) bewiesen.

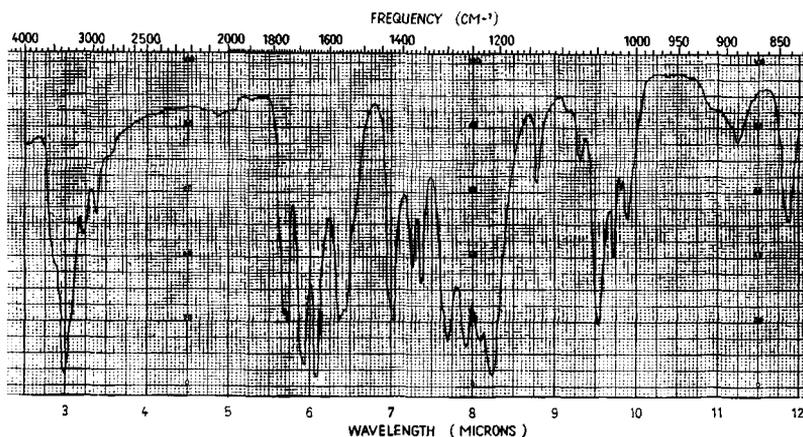
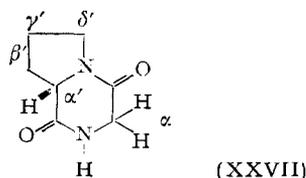


Fig. 5. IR.-Spektrum von Cyclo-glycyl-glykoly-glycyl-glycyl-glykoly-glycyl in der kristallisierten Phase (KBr)

### 3. Infrarot-spektroskopische Untersuchungen

Die Infrarotspektren des Cyclo-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyls (III) und des Glycyl-L-prolin-anhydrids (XXVII), Fig. 4, zeigen im 6,5- $\mu$ -Gebiet (Amid-II-Bande) den wohl auffälligsten Unterschied: das Dioxopiperazinderivat lässt die Amid-II-Bande vermissen, das Cyclohexapeptid weist sie auf (Maximum bei 6,57  $\mu$ , Schultern bei 6,48 und 6,41  $\mu$ ). Das Vorhandensein der Bande wird als Ausdruck der *trans*-Konfiguration der Amid- bzw. Peptidbindungen angesehen [11] [15] [1].



Die Lage der Amid-II-Bande wird (für den festen Zustand) im Bereiche von 6,37 bis 6,60  $\mu$  angegeben [16]; beim Cyclohexapeptid (III) liegt sie also eher am langwelligeren Ende, währenddem sie sich beim Cyclo-depsipeptid (XXVI, Fig. 5) mit 6,36  $\mu$  ganz am kurzwelligeren Ende des Bereiches befindet. Infolge der spärlichen Kenntnisse des zugrundeliegenden Deformations-Schwingungsmodus lässt sich dieser Unterschied zurzeit kaum deuten (zudem handelt es sich um Aufnahmen in der festen Phase, wo sich Gitterkräfte komplizierend auswirken).

Beim Cyclo-depsipeptid (XXVI, Fig. 5) sind deutlich 4 Banden, welche von C=O-Normalschwingungen herrühren, zu erkennen. Zwei davon (5,94 und 6,08  $\mu$ ) dürften den CO-NH-Gruppen, die zwei andern (5,68 und 5,73  $\mu$ ) den -CO-O-Gruppen zuzuschreiben sein. Ob die Lage am kurzwelligeren Ende des für gesättigte Ester und  $\delta$ -

Lactone üblichen Bereiches (5,71 bis 5,77  $\mu$ ) den besondern Verhältnissen der festen Phase, einer leichten Ringspannung, oder aber dem Einflusse der elektronegativen -CO-NH-Gruppen zuzuschreiben ist, kann hier nicht entschieden werden (die entsprechende Bande des Hippursäure-methylesters, in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst, liegt bei 5,71  $\mu$  [17]; daraus wird die Wirkung des zuletzt erwähnten Einflusses deutlich).

In Tabelle 2 wurden die Lagen der wichtigsten IR.-Banden von III und vom Produkte<sup>4)</sup> von SMITH [6] verglichen.

Tabelle 2. Vergleich der Lagen der IR.-Absorptionsbanden des Cyclopeptides<sup>4)</sup> von P.W.G. Smith [6] und unseres III in  $\mu$

(Angaben für sein Produkt, in KBr-Pastille aufgenommen, wurden von Dr. P.W.G. SMITH übermittelt. Sehr schwache Banden sind eingeklammert)

SMITH	III	SMITH	III	SMITH	III	SMITH	III
2,87	2,87	7,09	7,09	6,17	6,12	8,07	8,05
2,93	2,93	--	(7,23)			8,27	8,27
3,03	3,03	7,37	---	6,47	6,48	8,57	8,58
3,26	3,26	7,49	7,52	6,58	6,57	—	8,65
3,43	3,43	(7,65)	(7,67)			8,97	8,97
		7,80	—	6,86	6,83	—	(9,14)
5,97	5,97	7,89	7,87	6,91	6,87	9,61	9,60
6,02	6,02	(7,97)	—	—	6,99	—	9,66
						9,82	(9,81)

#### 4. Kernmagnetische Resonanz (Protonen)<sup>10)</sup>

In den von uns vorgeschlagenen, noch hypothetischen Konformationen (Tertiärstrukturen) einfacher cyclischer Peptide, sind zwei Sorten von Protonen, welche am Stickstoff der Peptidbindung gebunden sind, vorhanden: a) solche, die an intramolekularen Wasserstoffbrücken teilnehmen, und b) solche, die «frei» sind, oder höchstens in intermolekularen, verdünnungsabhängigen Wasserstoffbrücken gebunden sind.

Unter geeigneten Verhältnissen sollten sich die «a-Protonen» von den «b-Protonen» im NMR.-Spektrum unterscheiden lassen, indem die zusätzliche Abschirmung<sup>11)</sup> eine Verschiebung des Signals nach höhern Feldstärken bewirken dürfte (allerdings müssen die Lösungsmiteleinflüsse auf die b-Protonen auch berücksichtigt werden).

Störungen durch quadrupol-induzierte Relaxation des <sup>14</sup>N (Linienverbreiterung) sind (ohne Gegenmassnahmen wie z. B. Einstrahlung eines starken  $\nu$ -Feldes von z. B. 2,9 Megahertz bei 9400 Gauss [19] zu erwarten; allerdings zeigen unsere Spektren (Fig. 6–10) sowie die Beobachtungen von Franconi [20], dass die trigonale Konfiguration des Stickstoffs (ebenso wie die völlig symmetrische tetragonale im Ammoniumion [21]) den elektrischen Feldgradienten um den <sup>14</sup>N-Kern genügend auszugleichen vermag, was relativ scharfe Signale des Amid-Protons zur Folge hat.

Komplikationen sind auch durch Austausch der N-H-Protonen mit dem Lösungsmittel zu erwarten.

Ferner sollten die «a-Protonen» langsamer gegen Deuterium ausgetauscht werden (besonders in neutralen Medien) als die «b-Protonen»<sup>12)</sup>. Dieser Vorgang dürfte auch

<sup>10)</sup> Diese Resultate sind als vorläufig zu betrachten: die Untersuchungen sollen – den äusseren Umständen entsprechend<sup>3)</sup> – sobald als möglich weitergeführt werden.

<sup>11)</sup> Zum Problem Chemische Verschiebung und Wasserstoffbrücken (für den Typus -OH---X), vgl. [18].

<sup>12)</sup> Vgl. dazu Bestimmung des «Helix-Gehaltes» von Polypeptiden mittels Deuteriumaustausch (chemische Analyse des Deuteriumgehaltes) [22] [33].

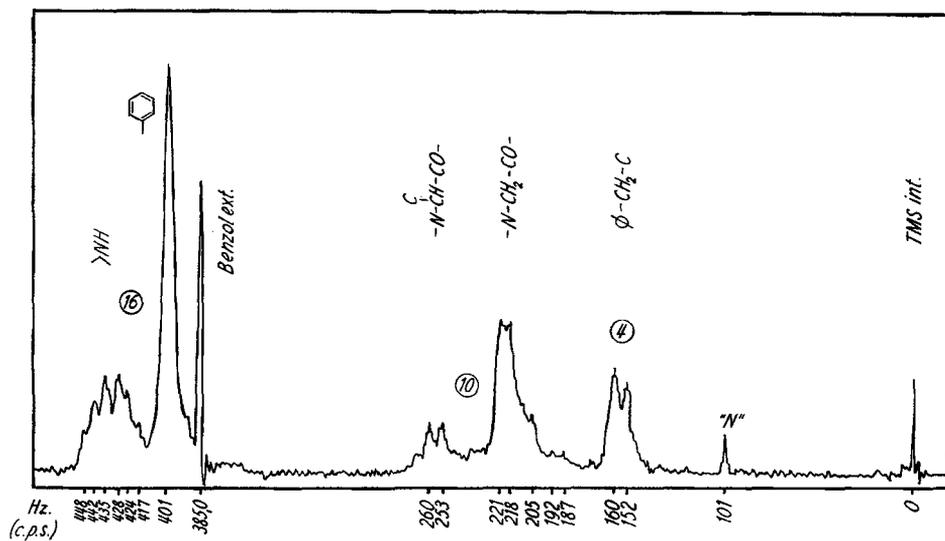


Fig. 6

N.M.R.-Spektrum<sup>13)</sup> von  $\text{[-Gly-phe-Gly-Gly-phe-Gly-]}$  und  $\text{[-Gly-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-]}$   
 0,115 M in  $\text{F}_3\text{CCOOH}$

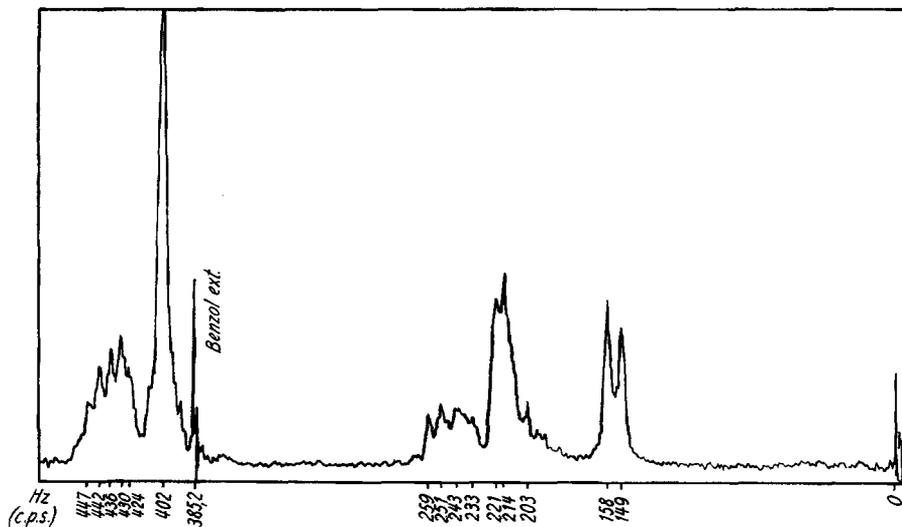


Fig. 7. N.M.R.-Spektrum<sup>13)</sup> von  $\text{[-Gly-phe-Gly-Gly-Phe-Gly-]}$  (D-L), 0,115 M in  $\text{F}_3\text{CCOOH}$

<sup>13)</sup> Die Aufnahmen mit einem modifizierten VARIAN-Instrument, Mod. V-4302, bei 60 Megahertz und einer Feldstärke von 14100 Gauss, die Integration und die tentative Zuteilung der Signale verdanken wir Herrn Dr. R. F. ZÜRCHER (CIBA A.G.). Für alle weitergehenden Interpretationen sind die Autoren verantwortlich. Als interner Standard diente Tetramethylsilan (TMS), als externer Benzol (385 Hz).

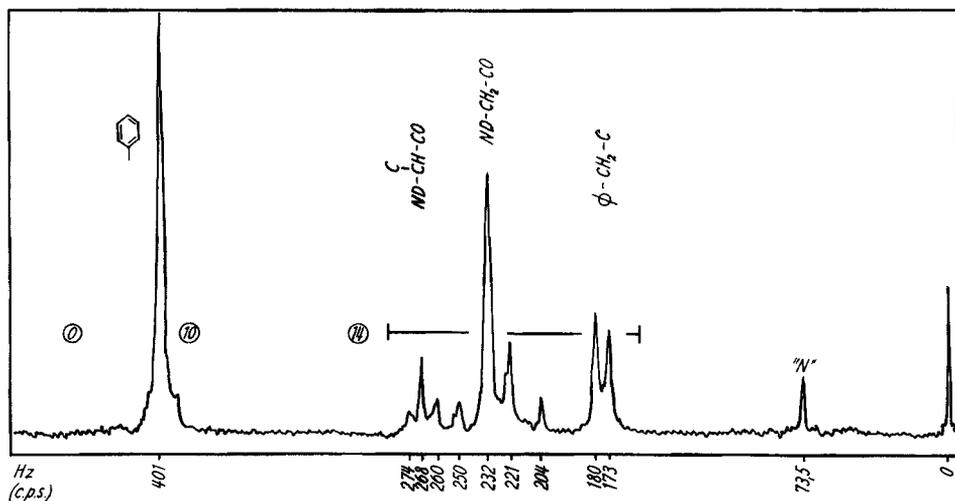


Fig. 8. NMR.-Spektrum<sup>13</sup>) von  $\text{-Gly-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-}$ , 0,14M in  $\text{F}_3\text{CCOOD}$  (scharfes Signal bei 641 Hz =  $\text{F}_3\text{CCOOH}$ ). Die Frequenzangaben sind nicht unbedingt mit jenen der andern Spektren vergleichbar, da hier mit internem Benzolstandard gearbeitet wurde und die Linien nach Phenylprotonen  $\equiv$  401 Hz ausgemessen wurden.

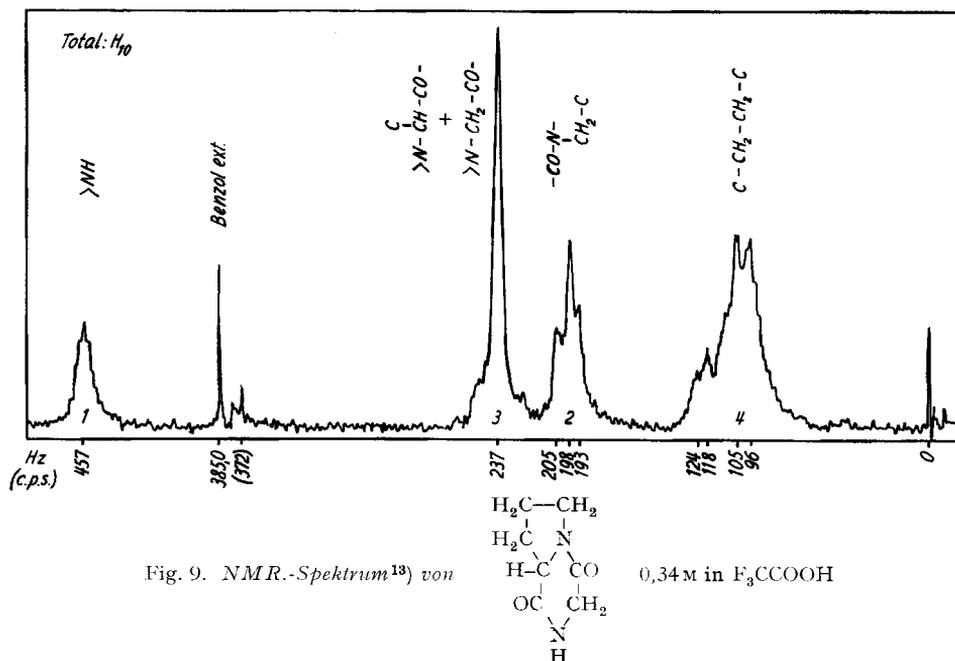


Fig. 9. NMR.-Spektrum<sup>13</sup>) von  $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_2\text{C}-\text{N}$ ,  $\text{H}-\text{C}-\text{CO}$ ,  $\text{OC}-\text{CH}_2$ ,  $\text{H}$  0,34M in  $\text{F}_3\text{CCOOH}$

mit kernmagnetischer Resonanz zu verfolgen sein (Abnahme der Zahl der  $>\text{N}-\text{H}$ -Protonen als Funktion der Austauschzeit).

Die Schwierigkeiten solcher Untersuchungen werden durch die geringe Löslichkeit cyclischer Peptide vergrößert. Geeignete Lösungsmittel müssen erst noch ge-

gefunden werden. Trifluoressigsäure, eines der wenigen geeigneten Lösungsmittel, dürfte allerdings z. T. auch intramolekulare H-Brücken sprengen und die Austauschgeschwindigkeit in unerwünschter Weise beeinflussen. Die hier veröffentlichten Resultate sind deshalb als vorläufig zu betrachten.

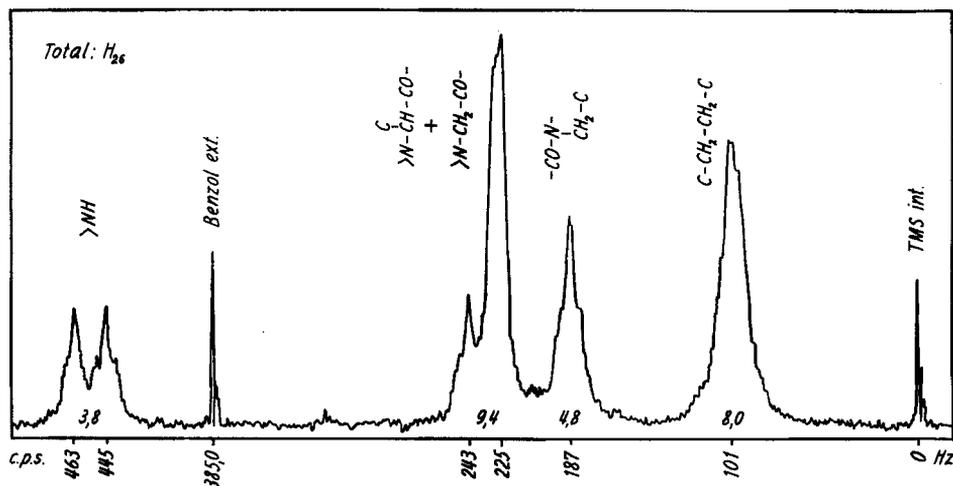


Fig. 10. NMR.-Spektrum<sup>13)</sup> von L-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly, 0,19M in F<sub>3</sub>CCOOH

Die Protonenresonanz-Spektren der beiden enantiomeren Cyclo-glycyl-phenylalanyl-glycyl-glycyl-phenylalanyl-glycyl (L-L) und (D-D) [1], Fig. 6 (in F<sub>3</sub>CCOOH), sind, wie zu erwarten, identisch<sup>13)</sup> («N» bei 101 Hz stammt offensichtlich von einer Verunreinigung). Hier interessiert uns besonders der Bereich der N-H-Signale. Diese sind zu einer relativ breiten Bande mit zwei Gruppen zu je ca. 3 Signalen im Bereiche 417 bis 448 Hz zusammengefasst; z. T. überlagert sich dieser Bereich mit demjenigen der Phenylprotonen (401 Hz). Integration ergab die richtige Summe von NH- und Phenyl-Protonen (16). Das diastereomere Cyclo-glycyl-D-phenylalanyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-glycyl [1], Fig. 7 (in F<sub>3</sub>CCOOH), gibt ein in grossen Zügen ähnliches Spektrum. Im Bereiche der zwei N-CH-CO-Protonen zeigen sich allerdings Unterschiede.

Werden nun die Spektren in Deuterotrifluoressigsäure aufgenommen, so verschwindet die Bande bei 417 bis 448 Hz. Dadurch wird bewiesen, dass diese Bande wirklich von N-H-Protonen herrührt: diese werden gegen D ausgetauscht. Tatsächlich lässt sich auch das Signal des gebildeten F<sub>3</sub>CCOOH (ca. 641 Hz) beobachten (Fig. 8).

Die Deuterierung hebt auch die Kernspin-Wechselwirkung zwischen den α-C-Protonen und NH-Protonen<sup>14)</sup> auf, wodurch eine Vereinfachung des Spektrums erfolgt: die Zweiteilung der -N-CH-CO- und -N-CH<sub>2</sub>-CO-Signale durch =NH ist nun verschwunden. Das -N-CH-CO-Signal zeigt jetzt zur Hauptsache eine Triplet-

<sup>14)</sup> Über Kernspin-Wechselwirkung zwischen N-H und C-Protonen bei N-Benzyl-formamid und N-(α-Phenyläthyl)-formamid vgl. [20].

struktur (Einfluss der Benzyl-CH<sub>2</sub>-Protonen, deren Signal dublettartig ist;  $J = \text{ca. } 7 \text{ Hz}$ ). Aus dem angedeuteten Dublett der -N-CH<sub>2</sub>-CO-Protonen ist nun zur Hauptsache ein einziges Signal geworden: immerhin treten in diesem Bereiche weitere Linien auf, die auf andere, zurzeit nicht gedeutete Einflüsse hinweisen.

Das Spektrum des Glycyl-L-prolin-anhydrids (XXVII, Fig. 9) ist wesentlich einfacher. Im Bereiche der  $\alpha$ -Kohlenstoff-Protonen sticht das einzelne, scharfe Signal bei 237 Hz (wahrscheinlich -N-CH<sub>2</sub>-CO-; die verbreiterte Basis rührt wohl von der Aufspaltung des verdeckten -N-CH-CO-Signals her) heraus. Die Kupplungskonstante zum NH-Proton scheint sehr gering zu sein. Das könnte mit der speziellen räumlichen Lage des N-H-Protons zu den beiden  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>-Protonen im ebenen Diketopiperazinring zu tun haben<sup>15)</sup>, doch muss diese spekulative Feststellung an weiteren Modellen überprüft werden.

Interessanterweise ist das NH-Protonen-Signal (457 Hz) recht scharf (die Verbreiterung dürfte vom Stickstoff und von Kernspin-Wechselwirkung mit  $\alpha$ -CH<sub>2</sub> herühren).

Denselben Aspekt bieten die NH-Protonen-Signale des Glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyls (III), Fig. 10. Breite und Intensität stimmen mit Fig. 9 überein, nur sind jetzt zwei gleich starke Signale vorhanden, die um 18 Hz voneinander getrennt sind (463 und 445 Hz). Ob es sich hier möglicherweise um die gesuchte chemische Verschiebung infolge von zwei intramolekularen H-Brücken handelt (vgl. auch Fig. 11), soll spektroskopisch und anhand weiterer Modelle untersucht werden (in Fig. 6 beträgt die Verschiebung der Schwerpunkte der zwei Bandengruppen gegeneinander ebenfalls ca. 18 Hz).

### 5. Mögliche Konformation

Modelluntersuchungen auf der Basis der *trans*-Konfiguration aller Peptid-Bindungen (aus IR.-Untersuchungen wahrscheinlich) und unter Annahme der grösstmöglichen Anzahl von intramolekularen Wasserstoffbrücken (durch NMR.-Unter-

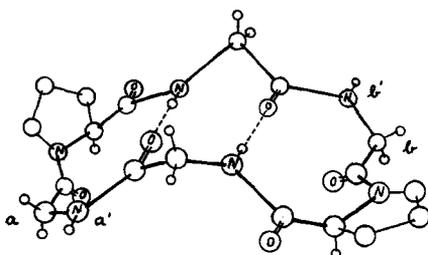


Fig. 11. Mögliche Konformation von Cyclo-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl

(mit allen Peptidbindungen in der *trans*-Konfiguration und mit der maximalen Zahl von intramolekularen H-Brücken). Eine zweite Struktur auf derselben Grundlage hat die Prolinreste um einen Platz im Gegenuhrzeigersinn verschoben (Trimethylenbrücken verbinden Atome  $\alpha$  und  $\alpha'$ , sowie  $\beta$  und  $\beta'$ ).

<sup>15)</sup> Vgl. die Abhängigkeit der Kupplungskonstanten vom Winkel zwischen den Bindungsebenen von Protonen an benachbarten C-Atomen [23].

suchungen angedeutet und im Prinzip bei helicalen Polypeptiden bestätigt) ergeben folgende Konformationen:

a) Für Cyclo-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl die zwei in Fig. 11 angegebenen Möglichkeiten.

b) Für Cyclo-glycyl-glykolyl-glycyl-glycyl-glykolyl-glycyl zwei ähnliche Möglichkeiten, bei denen der Äthersauerstoff den Platz des *tertiären* Stickstoffs in den in Fig. 11 gezeigten Modellen einnimmt (natürlich fehlen die Trimethylen-Brücken).

Wir hatten im Abschnitt 2 darauf hingewiesen, dass H-Brücken-Assoziate nach Fig. 1 auszuschliessen seien. Man kann in den vorliegenden Fällen weitem, eingehenderen Untersuchungen über den Mechanismus das in Fig. 12 gezeigte hypothetische Modell zugrunde legen.

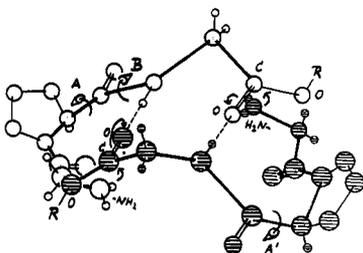


Fig. 12. Assoziation zweier Molekeln von Glycyl-L-prolyl-glycinester während der Cyclisierung (hypothetisch)

Der nucleophile Angriff des Aminostickstoffs auf den Carboxyl-Kohlenstoff wird durch Bindung des Carbonyl-Sauerstoffs (H-Brücke) erleichtert. Bei der Ausbildung der Peptidbindungen (Übergang des Carboxyl-Kohlenstoffs in die tetraedrische und dann, unter Abspaltung von RO<sup>-</sup> und H<sup>+</sup>, in die trigonale, ebene Konfiguration) muss die Molekel sich lediglich um die A- und A'-Bindungen (mit «freier Drehbarkeit») verdrehen; die «starrten» Peptidbindungen, z. B. B, werden nicht betroffen.

### Experimenteller Teil

Die Mikroanalysen und die IR.-Spektren wurden im Mikroanalytischen Laboratorium des Institutes unter der Leitung von Herrn HANS FROHOFER ausgeführt bzw. aufgenommen.

Übliche Aufarbeitung bedeutet Ausschütteln und Waschen im Scheidetrichter (mit den angegebenen Lösungsmitteln).

*IVa*: *p*-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-glycin-cyanmethylester, PZ · Gly · OCH<sub>2</sub>CN: 640 mg (2 mMol) PZ · Gly · OH [14], 0,8 ml (8 mMol) Cyanmethylchlorid und 0,82 ml (6 mMol) Triäthylamin wurden wie üblich<sup>11)</sup> miteinander umgesetzt. Die Aufarbeitung ergab 687 mg (96%) PZ · Gly · OCH<sub>2</sub>CN, Smp. 103–105° (Kristallisation aus Essigester-Petroläther).

C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub> (352,34) Ber. C 61,35 H 4,57% Gef. C 61,17 H 4,96%

*VI*: *p*-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-glycyl-L-prolin, PZ · Gly-Pro · OH. – a) Nach der Cyanmethylester-Methode: 0,589 g (1,7 mMol) PZ · Gly · OCH<sub>2</sub>CN (*IVa*), 0,284 g (2,2 mMol) L-Prolinmethylester-hydrochlorid und 0,56 ml (4,4 mMol) Triäthylamin wurden in einem Gemisch von 5 ml Tetrahydrofuran und 0,008 ml Eisessig gelöst und 72 Std. bei 20°, dann 24 Std. bei 60° gehalten. Zum Schluss wurde ein wenig Wasser zugefügt und die Mischung eine weitere Std. bei 60° gehalten (um überschüssigen Cyanmethylester zu verseifen). Übliche Aufarbeitung (Essigester). Die Neutralteile (V, 0,72 g) wurden mit 10 ml Methanol und 7,7 ml 1N NaOH verseift (1 Std., 20°). Übliche Aufarbeitung auf saure Produkte (verd. NH<sub>3</sub> und Essigester) und Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther: 0,53 g (63% bezogen auf PZ · Gly · OCH<sub>2</sub>CN), Smp. 135–137° (vgl. b).

b) *Mittels Dicyclohexyl-carbodiimid* (Methode vgl. [24]): Unter Eiskühlung wurden 20 ml Essigester, 4,4 g L-Prolin-methylester-hydrochlorid und 3,7 ml Triäthylamin miteinander geschüttelt. Das entstandene Triäthylamin-hydrochlorid wurde abgenutscht; das klare Filtrat wurde mit der Lösung von 3,07 g PZ · Gly · OH in 20 ml Tetrahydrofuran vereinigt und mit 2,6 g Dicyclohexyl-carbodiimid (in 5 ml Tetrahydrofuran) versetzt. Nach 15 Std. bei 20° wurde auf Neutralprodukte aufgearbeitet. Man erhielt, neben 1,5 g Dicyclohexylharnstoff, 1,3 g eines orangefarbenen, kristallinen Materials [Smp. 168–169°; es handelt sich um N'-(*p*-Phenylazo-benzyloxy-carbonyl-glycyl)-N', N''-dicyclohexyl-harnstoff (Va)] und 3,23 g des öligen Esters PZ · Gly-Pro · OCH<sub>3</sub> (V).

Dieser Ester wurde in 30 ml Dioxan gelöst und mit 25 ml 1N NaOH in 5 Std. bei 20° verseift (der Acylharnstoff Va wurde unter analogen Bedingungen nicht angegriffen). Übliche Aufarbeitung auf saure Produkte; Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther: 2,2 g (55%), Smp. 135–137°,  $[\alpha]_D^{25} = -41,4^\circ$  ( $c = 0,325$  in Dimethylformamid).

C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub> (410,42) Ber. C 61,45 H 5,40% Gef. C 61,50 H 5,38%

VII: *p*-Phenylazobenzyloxy-carbonyl-glycyl-L-prolyl-glycin-äthylester, PZ · Gly-Pro-Gly · OEt: 410 mg PZ · Gly-Pro · OH (VI) wurden in 6 ml CHCl<sub>3</sub> gelöst und bei –10° mit 0,14 ml Triäthylamin, dann mit 0,096 ml Chlorameisensäure-äthylester versetzt. Nach 15 Min. bei –10° wurde die Lösung von 140 mg Glycinäthylester-hydrochlorid und 0,14 ml Triäthylamin in 4 ml Chloroform zugegeben und das Ganze 15 Std. bei 20° belassen. Übliche Aufarbeitung auf Neutralteile; Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther: 370 mg (74%), Smp. 130–132°,  $[\alpha]_D^{25} = -60,5^\circ$  ( $c = 0,97$  in Dimethylformamid).

C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub> (495,52) Ber. C 60,60 H 5,90 N 14,13% Gef. C 60,50 H 5,98 N 14,24%

Die Ausbeuten wiesen starke Schwankungen auf (20–91%). Eine Probe des Esters wurde hydriert: H · Gly-Pro-Gly · OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, Rf = 0,51 (Papierchromatographie auf WHATMAN Nr. 1 Papier im System *n*-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4:1:1 (Vol.); Entwicklung mit Ninhydrin). Das Produkt wurde in wenig Methanol gelöst, mit wenig 2N HCl versetzt und mit Äther auskristallisiert: HCl, H · Gly-Pro-Gly · OEt, Smp. 214°;  $[\alpha]_D^{25} = -101 \pm 3^\circ$  ( $c = 0,94$  in H<sub>2</sub>O) ([25]: Smp. 214°;  $[\alpha]_D^{25} = -104^\circ$  ( $c = 1,52$  in H<sub>2</sub>O)).

C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>Cl (293,74) Ber. C 44,97 H 6,86 N 14,31% Gef. C 45,01 H 7,04 N 14,31%

X: *p*-Phenylazobenzyloxy-carbonyl-glycyl-L-prolyl-glycin, PZ · Gly-Pro-Gly · OH: 495 mg PZ · Gly-Pro-Gly · OEt (VII) wurden 4 Std. bei 20° mit einem Gemisch von 14 ml Methanol und 5 ml 1N NaOH behandelt. Übliche Aufarbeitung auf saure Produkte; Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther: 401 mg (86%); Smp. 166–167°;  $[\alpha]_D^{25} = -48,1^\circ$  ( $c = 0,48$  in Dimethylformamid).

C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub> (467,47) Ber. C 59,09 H 5,61% Gef. C 58,92 H 5,56%

Hydrierung ergab ein papierchromatographisch einheitliches Tripeptid, Rf = 0,22 (Bedingungen wie bei VII).

XIII: *p*-Phenylazobenzyloxy-carbonyl-glycyl-L-prolyl-glycin-*p*-nitrophenylester, PZ · Gly-Pro-Gly · ONP: 448 mg (0,96 mMol) PZ · Gly-Pro-Gly · OH (X), 357 mg (1,1 mMol) Di-(*p*-nitrophenyl)-sulfid (verbesserte Herstellungsvorschrift bei [26]) und 3 ml Pyridin wurden vermisch und 15 Std. bei 20° belassen. Nach Verdampfen des Pyridins (12 Torr) wurde der Rückstand in Essigester gelöst und mit kalter 2N HCl, 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O gewaschen. Der ölige Ester (Essigesterschicht) wurde an Silicagel chromatographiert: Elution mit CHCl<sub>3</sub> ergab kristallisierten *p*-Nitrophenylester (XIII). Umkristallisieren aus Chloroform-Petroläther: 300 mg (53%, starke Verluste durch die Behandlung mit NaHCO<sub>3</sub>!); Smp. 179–180°.

C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>N<sub>6</sub> (588,56) Ber. C 59,17 H 4,90 N 14,28% Gef. C 59,34 H 4,92 N 14,05%

Behandlung mit 2N HBr in AcOH ergab vier papierchromatographisch trennbare und mit Ninhydrin nachweisbare Produkte, von denen drei Nitrophenylester sind.

I: *p*-Phenylazobenzyloxy-carbonyl-glycyl-L-prolyl-glycin-*p*-methansulfophenylester, PZ · Gly-Pro-Gly · OMSp<sup>7</sup>: 848 mg (1,8 mMol) PZ · Gly-Pro-Gly · OH (X), 1,06 g (2,7 mMol) Di-(*p*-methansulfophenyl)-sulfid [26] und 7 ml Pyridin wurden vermisch und 24 Std. bei 20° aufbewahrt. Übliche Aufarbeitung (Essigester, NaHCO<sub>3</sub>, HCl) ergab 1,37 g Öl; Kristallisation aus Aceton-Äther: 904 mg (83%); Smp. 125–126°;  $[\alpha]_D^{25} = -71,9^\circ$  ( $c = 0,52$  in Dimethylformamid).

C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>O<sub>8</sub>N<sub>5</sub>S Ber. C 57,96 H 5,03 N 11,26 S 5,16%  
(621,65) Gef. „ 57,76 „ 5,34 „ 10,95 „ 4,77%

Hydrierung ergab ein papierchromatographisch einheitliches Produkt,  $R_f = 0,34$  (Bedingungen wie bei [XI]).

*Hydrierende Cyclisierung von I* wie für  $Z \cdot \text{Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OMSP}$  (Ia) beschrieben ergab  $c\text{-(Gly-Pro-Gly)}_2$  in guter Ausbeute.

$C_{18}H_{26}O_6N_6$  (422,44) Ber. C 51,18 H 6,20 N 19,90% Gef. C 50,98 H 6,25 N 19,75%

VIII: *p-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-glycyl-L-prolyl-glycin-hydrazid*,  $PZ \cdot \text{Gly-Pro-Gly} \cdot \text{NHNH}_2$ : 495 mg  $PZ \cdot \text{Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OEt}$  (VII) wurden mit 10 ml Äthanol und 180 mg Hydrazinhydrat 6 Std. unter Rückfluss gekocht. Beim Abkühlen kristallisierte das Hydrazid aus: 419 mg (87%), Smp. 192–193°,  $[\alpha]_D^{22} = -50,8 + 4^\circ$  ( $c = 0,36$  in Dimethylformamid).

$C_{23}H_{27}O_5N_7$  (481,54) Ber. C 57,36 H 5,65 N 20,37% Gef. C 57,42 H 5,89 N 20,60%

XI: *p-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycin-äthylester*,  $PZ \cdot \text{Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OEt}$ . – 1) Aus  $PZ \cdot \text{Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OEt}$  (VII): 350 mg VII wurden in Methanol unter Zusatz von Pd-auf-Kohle Katalysator (10-proz.) hydriert. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand mit Äther verrieben. Der unlösliche Tripeptidester,  $H \cdot \text{Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OEt}$ , wurde in 50 ml Methanol gelöst und mit der folgendermassen hergestellten Azidlösung vereinigt:

311 mg  $PZ \cdot \text{Gly-Pro-Gly} \cdot \text{NHNH}_2$  (VIII) wurden in einem homogenen Gemisch von je 5 ml Essigester, Eisessig und 2N HCl zum Teil gelöst und bei 0° mit 43,5 mg  $\text{NaNO}_2$  behandelt. Nach  $\frac{1}{2}$  Std. bei 0° (Schütteln) war alles in Lösung gegangen. Nun wurden noch mehr Essigester und 2N HCl zugegeben und die Schichten getrennt. Die organische Phase wurde mit Wasser,  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung usw. gewaschen und mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet.

Das Reaktionsgemisch wurde 3 Tage bei  $-4^\circ$  aufbewahrt und dann bei 12 Torr eingengt. Das schwerlösliche Hexapeptid-Derivat XI kristallisierte aus und wurde aus  $\text{CHCl}_3$ -Petroläther umkristallisiert: 358 mg (79%), Smp. 130–132°,  $[\alpha]_D^{22} = -79,3 \pm 3^\circ$  ( $c = 0,60$  in Dimethylformamid).

$C_{34}H_{42}O_8N_8$  (706,74) Ber. C 57,78 H 5,99 N 15,85% C 57,80 H 6,13 N 15,59%

Hydrierung ergibt ein papierchromatographisch einheitliches Produkt,  $R_f = 0,22$  (Bedingungen wie bei VII).

2) Aus  $PZ \cdot \text{Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OH}$  (X): 468 mg X, 281,6 mg  $H \cdot \text{Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OEt}$  (wie unter 1 beschrieben dargestellt) und 206 mg Dicyclohexyl-carbodiimid wurden in 20 ml Tetrahydrofuran gelöst und 15 Std. bei 0° aufbewahrt. Der Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand mit Essigester verrieben. Das gallertige, in Essigester unlösliche Produkt wurde mit Salzsäure und  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen, getrocknet, in  $\text{CHCl}_3$  gelöst und auf 10 g Silicagel chromatographiert. Die Farbe blieb oben auf der Säule und begann erst mit  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (9:1 Vol.) zu wandern. Das mit diesem Lösungsmittelgemisch gewonnene Eluat ergab 414 mg (58%) Rohprodukt. Umkristallisieren aus Chloroform-Petroläther: 317 mg (45%), Smp. 130–132°; Analyse (vgl. 1) ergab C 57,32 H 6,43 N 15,66%.

XII: *p-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycin*,  $PZ \cdot \text{Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OH}$ : 1,18 g (1,67 mMol)  $PZ \cdot \text{Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OEt}$  (XI) wurden in 60 ml Methanol mit 8,4 ml 1N NaOH 5 Std. bei 20° verseift. Nach Zugabe von viel Wasser (0°) wurde angesäuert. Umkristallisieren des unlöslichen Materials aus Methanol-Äther: 0,97 g (85%), Smp. 219–221° (u. Zers.);  $[\alpha]_D^{22} = -67,0 \pm 3^\circ$  ( $c = 0,51$  in Dimethylformamid).

$C_{32}H_{38}O_9N_8$  (678,69) Ber. C 56,62 H 5,63 N 16,51% Gef. C 56,43 H 5,56 N 16,40%

Hydrierung ergab das papierchromatographisch einheitliche Hexapeptid  $H \cdot \text{Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OH}$ ,  $R_f = 0,086$  (gleiche Bedingungen wie bei [VII]); Hexapeptidester [aus XI] hatte auf demselben Streifen  $R_f = 0,26$ ).

1c: *p-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycin-p-methansulfophenylester*,  $PZ \cdot \text{Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OMSP}$ : 500 mg (0,74 mMol)  $PZ \cdot \text{Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly} \cdot \text{OH}$  (XII), 148 mg (0,95 mMol) *p*-Methansulfophenol und 198 mg (0,96 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid (Carbodiimid zur Herstellung von *p*-Nitrophenylestern: [28]) wurden in 18 ml Dimethylformamid zur Reaktion gebracht (15 Std., 20°). Verdampfen des Lösungsmittels bei 0,01 Torr,

Umfällen des Rückstandes aus Aceton-Essigester: 395 mg (64%), Smp. 124–130° (amorph);  $[\alpha]_D^{22} = -63,7 \pm 2^\circ$  ( $c = 0,84\%$  in Dimethylformamid).

$C_{39}H_{44}O_{11}N_8S$	Ber. C 56,24	H 5,35	N 13,45	S 3,84%
(832,86)	Gef. „ 56,06	„ 5,74	„ 13,23	„ 3,58%

XIV: *Carbobenzoxy-glycyl-L-prolin-methylester*; *Z · Gly-Pro · OMe* [25]: 10,01 g Carbobenzoxy-glycin-cyanmethylester [29], 8,88 g L-Prolin-methylester-hydrochlorid (30% Überschuss), 9 ml Triäthylamin (60% Überschuss)<sup>16)</sup> und 0,3 ml Eisessig wurden in ca. 50 ml Tetrahydrofuran gelöst und 15 Std. bei 20° aufbewahrt. Nun wurde Wasser zugefügt, bis die ausgeschiedenen Salze eben gelöst waren; nach 1 Std. bei 20° (zur Verseifung von nicht umgesetztem aktivierten Ester) wurde der Ansatz mit viel Wasser verdünnt und mit Essigester in der üblichen Weise aufgearbeitet: 9,5 g (74%) neutrales Öl.

XV: *Carbobenzoxy-glycyl-L-prolin*, *Z · Gly-Pro · OH* [25]: 9,5 g Carbobenzoxy-glycyl-L-prolin-methylester (XIV) wurden in ein Gemisch von 30 ml Methanol, 15 ml Dioxan und 12 ml 3 N NaOH eingetragen und 1 Std. bei 20° belassen. Nach Abdampfen des grössten Teils der organischen Lösungsmittel wurde der Rückstand bei 0° mit verd. HCl angesäuert und in der üblichen Weise auf saure, essigesterlösliche Neutralteile aufgearbeitet. Kristallisation aus Methanol-Äther: 699 g (76%), Smp. 154–155°<sup>17)</sup>.

$C_{15}H_{18}O_5N_2$ (306,32)	Ber. C 58,82	H 5,88	N 9,14%	Gef. C 58,98	H 5,94	N 9,09%
-------------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

XVI: *Carbobenzoxy-glycyl-L-prolyl-glycin-äthylester*, *Z · Gly-Pro-Gly · OEt* [30]: 6,12 g (20 mMol) Carbobenzoxy-glycyl-L-prolin (XV) wurden in 100 ml Tetrahydrofuran<sup>18)</sup> gelöst und auf –10° gekühlt. Nach Zugabe von 2,8 ml (20 mMol) Triäthylamin und 1,92 ml (20 mMol) Chlorameisensäure-äthylester wurde der Ansatz unter Rühren 20 Min. bei –12° bis –15° belassen und dann mit 4,2 g (30 mMol) Glycin-äthylester-hydrochlorid, 4,2 ml (30 mMol) Triäthylamin und 30 ml Tetrahydrofuran versetzt. Nach 1½ Std. bei –10° und 15 Std. bei 20° wurden die essigesterlöslichen Neutralteile in der üblichen Weise gewonnen: Öl, welches sofort weiterverarbeitet wurde (Ausbeutebestimmung nach Verseifung zu XVII).

XVII: *Carbobenzoxy-glycyl-L-prolyl-glycin*, *Z · Gly-Pro-Gly · OH* [25a]<sup>19)</sup>: Das oben erhaltene ölige XVI wurde in einem Gemisch von 30 ml Methanol, 15 ml Dioxan und 12 ml 2 N NaOH 1 Std. bei 20° verseift. Nach Verdampfen des grössten Teils der Lösungsmittel wurde angesäuert und auf essigesterlösliche, saure Anteile aufgearbeitet. Kristallisation aus Methanol-Äther: 4,90 g (67%, bezogen auf *Z · Gly-Pro · OH*), Smp. 140–141°<sup>19)</sup>.

$C_{17}H_{21}O_6N_3$ (363,37)	Ber. C 56,20	H 5,78	N 11,57%	Gef. C 56,11	H 5,92	N 11,54%
-------------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

Ib: *Carbobenzoxy-glycyl-L-prolyl-glycin-p-nitrophenylester*, *Z · Gly-Pro-Gly · ONP*: 3,8 g *Z · Gly-Pro-Gly · OH* (XVII) wurden in 25 ml abs. Pyridin gelöst und mit 4,06 g Di-(*p*-nitrophenyl)-sulfid [26] versetzt. Nach 15 Std. bei 20° wurde die braune Lösung bei 12 Torr vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit 1 N HCl und Kochsalzlösung gewaschen: schwach gelb gefärbtes Öl, welches sofort weiterverarbeitet wurde.

IIb: *Glycyl-L-prolyl-glycin-p-nitrophenylester-hydrobromid*, *HBr · H · Gly-Pro-Gly · ONP*: Das oben erhaltene ölige Ib wurde in 20 ml einer 1,9 N-Lösung von HBr in Eisessig versetzt und 1 Std. bei 20° belassen<sup>20)</sup>. Das Lösungsmittel wurde bei 12 Torr verdampft und der Rückstand bei 30°/0,01 Torr getrocknet und dann in wenig Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wurde zur Cyclisierung verwendet.

<sup>16)</sup> Überschüssiges  $NEt_3$  verbessert die Ausbeute.

<sup>17)</sup> Smp. 155° [25].

<sup>18)</sup> Verwendung von Chloroform ergab durchwegs kleinere Ausbeuten (ca. 25% an Verseifungsprodukt XVII).

<sup>19)</sup> Smp. 144–145° [30a]; 136–137° [30b]; 143–144° [25].

<sup>20)</sup> Bei der Verwendung von 4 N HBr in Eisessig tritt offenbar eine Spaltung der Kette ein, da aus dem Cyclisierungsprodukt durch Sublimation bei 0,01 Torr Glycyl-prolin-anhydrid isoliert werden kann: Smp. 198–200°; Gly: Pro = 1:1;

$C_7H_{10}O_2N_2$ (154,17)	Ber. C 54,54	H 6,48	N 18,17%	Gef. C 54,30	H 6,62	N 18,22%
----------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

1a: *Carbobenzoxy-glycyl-L-prolyl-glycin-p-methansulfophenylester*, *Z · Gly-Pro-Gly · OMSP*: 1,09 g (3 mMol) *Z · Gly-Pro-Gly · OH* (XVII) wurden in 8 ml Pyridin gelöst, mit 1,76 g (4,5 mMol) Di-(*p*-methansulfonylphenyl)-sulfid versetzt [27] und 24 Std. bei 20° belassen. Übliche Aufarbeitung mit Essigester, verd. HCl und NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (0°!): gelb gefärbtes Öl, welches sofort weiter verwendet wurde.

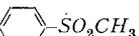
III: *Cyclo-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl*, *c-(-Gly-Pro-Gly)<sub>2</sub>*. – 1) *Aus PZ · Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly · OMSP* (Ic): 1,1 g Ic wurde in 70 ml Methanol gelöst und bei 20° mit 500 mg 10-proz. Pd-Kohle hydriert. Das Hydrierungsprodukt wurde mit Aceton verrieben, wobei eine lösliche (700 mg) und eine unlösliche Fraktion (216 mg) erhalten wurden. Erstere ist mehrheitlich der gesuchte Hexapeptidester, *H · Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly · OMSP* (IIc), *R<sub>f</sub>* = 0,22 (PC; *n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O, 4:1:1 Vol., starke Färbung mit Ninhydrin); die zweite Fraktion ist ausser in Aceton auch in Methanol und Dimethylformamid relativ schwer löslich und besteht z. T. bereits aus dem Cyclisierungsprodukt (plus Hochpolymere?): keine Färbung mit Ninhydrin.

Beide Fraktionen wurden in Dimethylformamid-Essigsäure (30 ml: 10 ml) gelöst und langsam in 400 ml Pyridin eingetroppt (5 Std., 90°). Aufarbeitung wie oben; Kristallisation aus Wasser-Aceton: 267 mg (47,8%) *Cyclo-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl* (III); Zersetzung ab ca. 320°;  $[\alpha]_D^{22} = +49,1 \pm 3^\circ$  (*c* = 0,32 in H<sub>2</sub>O).

C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>N<sub>6</sub> (422,44) Ber. C 51,18 H 6,20 N 19,90% Gef. C 51,26 H 6,47 N 19,82%

2) *Aus HBr*, *H · Gly-Pro-Gly · ONB*: Die oben beschriebene Lösung von IIb wurde im Verlaufe von 3 Std. in ein Gemisch von 200 ml Pyridin und 0,5 ml Eisessig bei 75° getropft. Nach 15 Std. wurde das Pyridin bei 12 Torr verdampft, der Rückstand in Methanol-Wasser (1:1) gelöst und mit sauren und basischen Ionenaustauschern [31] von Begleitprodukten befreit. Nach Verdampfen des Lösungsmittels verblieb eine kristalline, in fast allen organischen Lösungsmitteln schwerlösliche Substanz. Umkristallisation 2mal aus Eisessig-Aceton: 900 mg (49%) Kristallnadeln, Verkohlung ab 320° ohne zu schmelzen.

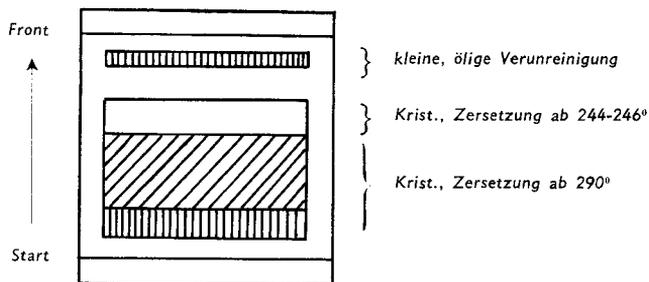
C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>N<sub>6</sub> (422,44) Ber. C 51,18 H 6,20 N 19,90% Gef. C 51,26 H 6,22 N 20,10%

3) *Aus Z · Gly-Pro-Gly · O-**-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> durch neutrale Hydrierung*: Der rohe, ölige *p*-Methansulfophenylester Ia wurde in methanolischer Lösung (30 ml) mit Palladium-Kohle-Katalysator (200 mg; 10% Pd) hydriert, wobei das Cyclisierungsprodukt III sehr rein ausfiel. Umkristallisieren aus Eisessig-Aceton: 280 mg (50%), Verkohlung ab 330°;  $[\alpha]_D^{22} = +51 + 3^\circ$  (*c* = 0,35 in H<sub>2</sub>O).

C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>N<sub>6</sub> (422,44) Ber. C 51,18 H 6,20 N 19,90 Gef. C 51,26 H 6,43 N 19,73

Versuche mit dem entsprechenden PZ-Derivat verliefen analog (siehe oben unter 1).

4) *Aus Z · Gly-Pro-Gly · O-**-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> durch saure Hydrierung und Cyclisierung*: Der rohe, ölige *p*-Methansulfophenylester Ia aus 1,09 g (3 mMol) *Carbobenzoxy-glycyl-L-prolyl-glycin* (XVII) wurde in 30 ml Methanol und 3 ml 0,1N HCl in Gegenwart von 200 mg 10-proz. Pd-Kohle hydriert (3 Std.). Nach Filtration vom Katalysator, Verdampfen des Lösungsmittels und Aufnehmen des Rückstandes (HCl, *H · Gly-Pro-Gly · OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>*; IIa) in Dimethylformamid wurde wie unter 1) cyclisiert. Das Rohprodukt wurde auf Dünnschichtplatten (Silikagel) mit Methanol chromatographiert, wobei sich folgendes Bild ergab (Entwicklung mit J<sub>2</sub>-Dampf):



Beide kristalline Fraktionen sind im IR.-Spektrum miteinander und mit *c*-(-Gly-Pro-Gly)-<sub>2</sub> identisch.

**XIX:** *t*-Butoxycarbonyl-glycyl-glykoly-glycin-*p*-nitrobenzylester, BOC · Gly-OGly-Gly · ONB: 3,89 g (12 mMol) Diazoacetyl-glycin-*p*-nitrobenzylester (XVIII) [13] und 3,21 g über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 50° und 0,01 Torr. getrocknetes *t*-Butoxycarbonyl-glycin [14] wurden in 125 ml frisch absolutiertem Benzol gelöst und 40 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach üblicher Aufarbeitung (Essigester, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O) wurde das mit Kristallen durchsetzte ölige Produkt im System Essigester-Äther (25:75 Vol.) an einer Säule von Silikagel MERCK (Körnchengröße unter 0,08 mm) chromatographiert und aus Essigester-Petroläther kristallisiert: 4,74 g (93%), Smp. 102,5–103,5°.

C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>O<sub>9</sub>N<sub>3</sub> (425,39) Ber. C 50,82 H 5,45 N 9,88% Gef. C 51,00 H 5,47 N 9,60%

**XX:** *t*-Butoxycarbonyl-glycyl-glykoly-glycin, BOC · Gly-OGly-Gly · OH: 2 g BOC · Gly-OGly-Gly · ONB (XIX) wurden mit 200 mg 10-proz. Pd-Kohle in 60 ml *t*-Butanol 21 Std. bei Atmosphärendruck hydriert, wobei nach 5 und 12 Std. noch je 100 mg Katalysator zugefügt wurden. Übliche Aufarbeitung auf saure Produkte (Essigester, NaHCO<sub>3</sub>, Zitronensäure) und Kristallisation aus Essigester-Petroläther ergab 996 mg (73,5%) BOC · Gly-OGly-Gly · OH (XX), Smp. 103–104°.

C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> (290,27) Ber. C 45,51 H 6,25 N 9,65% Gef. C 45,68 H 6,38 N 9,61%

**XXI:** *t*-Butoxycarbonyl-glycyl-glykoly-glycin-*p*-nitrophenylester, BOC · Gly-OGly-Gly · ONP: 300 mg (1,03 mMol) BOC · Gly-OGly-Gly · OH (XX) und 300 mg (1,06 mMol) frisch hergestelltes Di-(*p*-nitrophenyl)-sulfit wurden über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet und in absolutem Pyridin 24 Std. bei 20° zur Reaktion gebracht. Nach üblicher Aufarbeitung wurde aus Essigester-Äther kristallisiert: 230 mg (54%), Smp. 156–158°.

C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>O<sub>9</sub>N<sub>3</sub> (411,36) Ber. C 49,63 H 5,15 N 10,22% Gef. C 49,75 H 5,40 N 10,14%

**XXII:** Glycyl-glykoly-glycin-*p*-nitrobenzylester-hydrochlorid, HCl·H · Gly-OGly-Gly · ONB: 4,466 g BOC · Gly-OGly-Gly · ONB (XIX) wurden in 250 ml ca. 2N HCl in Essigester gelöst und 1½ Std. bei 20° belassen. Das Lösungsmittel wurde bei ca. 12 Torr verdampft und der Rückstand über KOH getrocknet. Kristallisation aus Methanol-Äther: 3,436 g (90,3%), Smp. 148–149° (Zers.).

C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>Cl (361,78) Ber. C 43,15 H 4,45 N 11,61% Gef. C 43,19 H 4,57 N 11,89%

**XXIII:** *t*-Butoxycarbonyl-glycyl-glykoly-glycyl-glycyl-glykoly-glycin-*p*-nitrobenzylester, BOC · Gly-OGly-Gly-Gly-OGly-Gly · ONB: 145 mg (0,5 mMol) BOC · Gly-OGly-Gly · OH (XX), 126,5 mg (0,5 mMol) *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazonium-3'-sulfonat [32] und 0,07 ml (0,5 mMol) Triäthylamin wurden bei 0° in Acetonitril gelöst und 1 Std. bei 0° gerührt. Anschliessend wurden 181 mg (0,5 mMol) HCl·H · Gly-OGly-Gly · ONB (XXII) und 0,07 ml Triäthylamin zugefügt und das Ganze so lange gerührt, bis sich alles gelöst hatte, jedoch nicht weniger als ½ Std. Übliche Aufarbeitung (CHCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O), Kristallisation aus CHCl<sub>3</sub>-Äther: 186 mg (66%), Smp. 127,5–128,5°.

C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>O<sub>13</sub>N<sub>5</sub> (597,53) Ber. C 48,23 H 5,23 N 11,72% Gef. C 48,15 H 5,32 N 11,71%

**XXIV:** *t*-Butoxycarbonyl-glycyl-glykoly-glycyl-glycyl-glykoly-glycin-hydrat, BOC-Gly-OGly-Gly-Gly-OGly-Gly · OH, H<sub>2</sub>O: 300 mg BOC · Gly-OGly-Gly-Gly-OGly-Gly · ONB wurden in 100 ml *t*-Butanol-Wasser (1:1 Vol.) mit 100 mg 10-proz. Pd-Kohle 24 Std. bei Atmosphärendruck und 20° hydriert (Zugabe von weiteren 100 mg Katalysator nach 8 Std.). Die über Celit filtrierte Lösung wurde bei 40°/12 Torr verdampft, der Rückstand in heissem Wasser gelöst, filtriert und wieder verdampft. Er wurde darauf mit CHCl<sub>3</sub> gewaschen und aus Methanol-CCl<sub>4</sub> kristallisiert: 104 mg (43%), Smp. 138–139°.

C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub>N<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (480,43) Ber. C 42,50 H 5,87 N 11,66% Gef. C 42,70 H 5,93 N 11,55%

**XXV:** *t*-Butoxycarbonyl-glycyl-glykoly-glycyl-glycyl-glykoly-glycin-*p*-nitrophenylester, BOC · Gly-OGly-Gly-Gly-OGly-Gly · ONP: 96 mg BOC · Gly-OGly-Gly-Gly-OGly-Gly · OH, H<sub>2</sub>O und 60 mg Di-(*p*-nitrophenyl)-sulfit wurden über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet und in 10 ml Pyridin gelöst. Nach 24 Std. bei 20° wurde das Lösungsmittel verdampft. Der Rückstand wurde bei 0,01 Torr getrocknet und mit Äther verrieben. Das farblose, feste Produkt, Smp. 147–148°, war nicht ganz analysenrein, wurde aber als solches weiter verwendet.

**XXVI:** Cyclo-glycyl-glykoly-glycyl-glycyl-glykoly-glycin, Gly-OGly-Gly-Gly-OGly-Gly. – 1) Aus BOC-Gly-OGly-Gly-Gly-OGly-Gly-ONP: Der oben erhaltene Ester (XXV) wurde 10 Min.

bei 20° in 1 ml Trifluoressigsäure aufbewahrt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in einigen ml Dimethylformamid gelöst, mit wenig Eisessig versetzt und im Laufe von 4 Std. zu ca. 200 ml absolutem Pyridin (55°) getropft. Das Pyridin wurde bei 50°/12 Torr verdampft, der Rückstand bei ca. 0,01 Torr getrocknet und dreimal aus 50-proz. Essigsäure umkristallisiert: 40 mg (56%), Smp. (u. Zers.) 240–315°.

2) Aus BOC · Gly-OGly-Gly · ONP: 200 mg BOC · Gly-OGly-Gly · ONP (XXI) wurden mit 2 ml Trifluoressigsäure, wie oben angegeben, von der BOC-Gruppe befreit und durch Eintropfen der Dimethylformamid-Lösung in Pyridin cyclisiert. Aus 50-proz. Essigsäure kristallisiert: 41 mg (49%) farblose Kristallnadeln, Smp. (u. Zers.) 240–315°. Trocknen 4 Std./0,001 Torr/98°.

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub> (344,28) Ber. C 41,86 H 4,68 N 16,28% Gef. C 41,91 H 4,84 N 15,95%

#### SUMMARY

Various factors inducing the doubling reaction during cyclization of small peptides are reviewed. To test their relative importance, derivatives of the tripeptide, Gly-Pro-Gly, and of the monodepsi-dipeptide, glycyl-glykolyl-glycyl, have been subjected to cyclization: both undergo the doubling reaction to give cyclo-glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl and cyclo-glycyl-glykolyl-glycyl-glycyl-glykolyl-glycyl respectively. The «monomers» of this doubling reaction obviously cannot associate *via* H-bridges according to Fig. 1 during the reaction, an association according to Fig. 12 could, however, be envisaged as working hypothesis. Steric hindrance seems to play an eminent rôle in the cyclization of tripeptides to cyclo-hexapeptides.

IR. data point to *trans*-configuration of the peptide bonds. This, together with the postulation of a maximum number of intramolecular hydrogen bonds, leads to the models of Fig. 11 for probable conformations.

The possibilities of using NMR.-studies (protons) for obtaining insight into H-bonding and conformation are discussed and provisional NMR. data giving leads into this complex problem are presented.

Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 11. Mitt.: R. SCHWYZER & AUNG TUN-KYI, *Helv.* **45**, 859 (1962).
- [2] (a) R. SCHWYZER, CIBA Foundation Symposium on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity, 171–181 (1958); (b) *Record chem. Progress* **20**, 147 (1959); (c) R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **41**, 2186 (1958).
- [3] Vgl. L. PAULING & R. B. COREY, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* **11**, 180 (1954).
- [4] P. S. REES, D. P. TONG & C. F. YOUNG, *J. chem. Soc.* **1954**, 662; Besprechung der Resultate in [11].
- [5] G. W. KENNER, CIBA Foundation Symposium on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity, 181 (1958); G. W. KENNER, P. J. THOMSON & M. J. TURNER, *J. chem. Soc.* **1958**, 4148.
- [6] P. W. G. SMITH, *J. chem. Soc.* **1957**, 3985.
- [7] R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **41**, 2190 (1958).
- [8] L. PAULING, *The Nature of the Chemical Bond*, 2. Auflage, S. 136 ff., Cornell University Press, Ithaca N. Y. 1948.
- [9] V. K. ANTONOV, E. I. VINOGRADOVA, YU. A. OVCHINNIKOV & M. M. SHEMYAKIN, Report, XIX. Congress on Pure and Applied Chemistry, London 1963.
- [10] R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **41**, 2186 (1958).
- [11] R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL & P. SIEBER, *Helv.* **39**, 872 (1956).
- [12] R. SCHWYZER, P. SIEBER & K. ZATSKÓ, *Helv.* **41**, 491 (1958).
- [13] R. SCHWYZER & J. P. CARRIÓN, *Helv.* **43**, 2101 (1960).

- [14] F. C. MCKAY & N. F. ALBERTSON, J. Amer. chem. Soc. *79*, 4686 (1957); G. W. ANDERSON & A. C. MCGREGOR, *ibid.* *79*, 6180 (1957).
- [15] R. HUISGEN, H. BRADE, H. WALZ & I. GLOGGER, Chem. Ber. *90*, 1437 (1957).
- [16] Vgl. z. B. L. J. BELLAMY, *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*, Methuen, London 1959.
- [17] R. SCHWYZER, unpublizierte Versuche.
- [18] I. GRÄNACHER, Helv. phys. Acta *34*, 272 (1961); E. A. ALLAN & L. W. REEVES, J. physical Chemistry *66*, 613 (1962).
- [19] J. N. SCHOOLERY in [21].
- [20] C. FRANCONI, Z. Elektrochem. *65*, 645 (1961).
- [21] J. D. ROBERTS, *Nuclear Magnetic Resonance*, McGraw-Hill, New York N. Y. 1959.
- [22] A. HVIDT & K. LINDERSTRØM-LANG, Biochim. biophys. Acta *14*, 574 (1954) und spätere Arbeiten.
- [23] M. KARPLUS, J. chem. Physics *30*, 11 (1959); C. D. JARDETZKY, J. Amer. chem. Soc. *84*, 62 (1962).
- [24] J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. *77*, 1067 (1955).
- [25] H. N. RYDON & P. W. G. SMITH, J. chem. Soc. *1956*, 3642.
- [26] B. ISELIN & R. SCHWYZER, Helv. *43*, 1760 (1960).
- [27] B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, Helv. *40*, 373 (1957).
- [28] D. F. ELLIOTT & D. W. RUSSELL, Biochem. J. *66*, 49P (1957); M. ROTHE & F. W. KUNITZ, Liebigs Ann. Chem. *609*, 88 (1957).
- [29] R. SCHWYZER, B. ISELIN & M. FEURER, Helv. *38*, 69 (1955).
- [30] a) N. C. DAVIS & E. L. SMITH, J. biol. Chemistry *200*, 373 (1953); b) S. SIMMONDS & J. S. FRUTON, *ibid.* *174*, 705 (1948).
- [31] R. SCHWYZER & P. SIEBER, Helv. *40*, 624 (1957).
- [32] R. B. WOODWARD & R. A. OLOFSON, J. Amer. chem. Soc. *83*, 1007 (1961); R. B. WOODWARD, R. A. OLOFSON & H. MAYER, *ibid.* 1010.
- [33] A. WISNIA & M. SAUNDERS, J. Amer. chem. Soc. *84*, 4235 (1962).

## 55. Flavosemichinon-Metallchelate: Modelle zur Erklärung der «active site» in den mitochondrialen Flavoenzymen

### Zum Verhalten des Riboflavins gegen Metallionen III [1]<sup>1)</sup>

von P. Hemmerich

(19. XII. 63)

In vorangehenden Arbeiten [2] wurde gezeigt, dass in verdünnter wässriger O<sub>2</sub>-freier Lösung keine Wechselwirkung des Isoalloxazin-(Flavin)-Systems, d.h. der prosthetischen Gruppe der Flavoenzyme, mit zweiwertigen Metallionen – ausgenommen Hg<sup>2+</sup> – feststellbar ist. Eine auffallend starke Affinität besteht jedoch beim Ag<sup>+</sup>, welches mit Flavinen intensiv rote 1:1-Chelate oxinat-analoger Struktur auszubilden vermag. Deren Stabilität, welche mit  $\log K_{\text{FlAg}}^{\text{Ag}} \cong 8$  um mindestens fünf Zehnerpotenzen grösser gefunden wurde als diejenige des (nicht mehr messbaren) Cu<sup>II</sup>-Analogen, wurde auf einen Metall-Ligand-Ladungstransfer zurückgeführt, bei welchem ein Elektron aus einem gefüllten  $d_e$ -Orbital des  $d^{10}$ -Ions in das energieärmste  $\pi^*$ -Orbital<sup>2)</sup> des Akzeptorliganden delokalisiert ist.

<sup>1)</sup> Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, Seite 475.

<sup>2)</sup> Zur Elektroaffinität des Flavochinons vgl. KARREMAN [3].