

0.15 mm²). Die bei Spannungen von 10–300 mV ermittelten spezifischen Membrankapazitäten (Tabelle 1) liegen um

Tabelle 1. Spezifische Membrankapazität (C_m) und Dicke (d) des Kohlenwasserstoffbereichs der Doppelschicht-Membranen der Lactosylceramide 4–7 [a].

Verbindung	C_m [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$] [b]	d [nm] [c]
4	0.563 ± 0.072	3.30 ± 0.26
5	0.755 ± 0.073	2.46 ± 0.25
6	0.818 ± 0.092	2.27 ± 0.20
7	0.570 ± 0.038	3.26 ± 0.49

[a] Zur Durchführung der Messungen siehe [9–12], zit. Lit. [b] Mittelwert aus zehn Messungen. [c] Zur Berechnung siehe [11].

den Faktor 1.5 über denen von Phosphatidylcholin-Membranen^[12]. Dies kann an den veränderten dielektrischen Eigenschaften der hydrophilen Kopfgruppen bei den Lactosylceramiden liegen, oder die Doppelschicht ist aufgrund stärkerer Knäuelung und Kinkenbildung des Lipidteils dünner. Die spezifischen Membrankapazitäten steigen innerhalb der C₁₈-Säure-Derivate 4–6 mit der Zahl der *cis*-Doppelbindungen, während umgekehrt die ermittelte Schichtdicke für den Lipidteil, vermutlich bedingt durch Kinkenbildung, sinkt. Die spezifische Membrankapazität des Arachidonsäure-Derivats 7 ist ähnlich groß wie die des Ölsäure-Derivates 4, d. h. die Kettenverlängerung um zwei C-Atome wird in etwa durch drei zusätzliche *cis*-Doppelbindungen kompensiert.

Eingegangen am 6. April 1987 [Z 2180]

- [1] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* 98 (1986) 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 212; R. R. Schmidt in W. Bartmann, K. B. Sharpless (Hrsg.): *Stereochemistry of Organic and Bioorganic Transformations*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1987, S. 169, zit. Lit.
- [2] N. K. Kochetkov, G. P. Smirnova, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 44 (1986) 387, zit. Lit.
- [3] R. R. Schmidt, P. Zimmermann, *Angew. Chem.* 98 (1986) 722; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 725.
- [4] A. K. Akimoto, L. Dorn, H. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem.* 93 (1981) 108; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 90.
- [5] R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Ann. Chem.* 1984, 1343; J. Michel, *Dissertation*, Universität Konstanz 1983.
- [6] R. R. Schmidt, P. Zimmermann, *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 481.
- [7] ¹H-NMR: 1 (250 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 7.42–8.06 (m, 5 H, Bz), 5.85–5.96 (m, 1 H, CH₂–CH=), 5.48–5.65 (m, 2 H, =CH–CH–OBz), 5.35 (d, 1 H, H-4', J = 2.7 Hz), 5.07–5.23 (m, 2 H), 4.89–4.98 (m, 2 H), 4.45–4.53 (m, 3 H), 4.02–4.12 (m, 3 H), 3.79–3.97 (m, 4 H), 3.54–3.65 (m, 2 H), 1.96–2.20 (m, 23 H, 7 Ac, =CH–CH₂), 1.24–1.37 (m, 22 H, 11 CH₂), 0.88 (t, 3 H, CH₃). – 4 (250 MHz, [D₆]Dimethylsulfoxid, TMS): δ = 7.54 (d, 1 H, NH, J = 8.8 Hz), 5.49–5.57 (m, 1 H, =CH–CH₂), 5.30–5.39 (m, 3 H, =CH–CHOH, CH=CH), 5.16 (d, 1 H, OH, J = 3.7 Hz), 5.12 (d, 1 H, OH, J = 3.3 Hz), 4.90 (d, 1 H, OH, J = 5.5 Hz), 4.84 (d, 1 H, OH, J = 3.1 Hz), 4.68 (sehr br, 2 H, 2 OH), 4.58 (m, 2 H, 2 OH), 3.29–4.22 (m, 17 H), 3.02–3.09 (m, 1 H), 1.96–2.06 (m, 8 H, COCH₃, 3 =CH–CH₂), 1.23–1.48 (m, 44 H, 22 CH₂), 0.83–0.91 (2t, 6 H, 2 CH₃). Die Verbindungen 5–7 weisen entsprechende ¹H-NMR-Daten auf. – Die UV-spektroskopisch ermittelten Anteile an Fettsäureestern mit konjugierten Doppelbindungen betragen bei 6 < 1% und bei 7 < 3%.
- [8] Florisil (Magnesiumsilicat), 16–30 mesh, Fluka AG; RP₁₈, Merck.
- [9] P. Läger, *Angew. Chem.* 97 (1985) 939; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 905.
- [10] P. Müller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, *Nature London* 194 (1962) 979.
- [11] P. Läger, W. Lesslauer, E. Marti, J. Richter, *Biochim. Biophys. Acta* 135 (1967) 20.
- [12] R. Benz, O. Fröhlich, P. Läger, M. Montal, *Biochim. Biophys. Acta* 394 (1975) 323; R. Benz, K. Janko, *ibid.* 455 (1976) 721. – In diesen Publikationen werden spezifische Membrankapazitäten von Phospholipiden mitgeteilt.

Strukturaufklärung eines neuen Icosapeptides aus menschlicher Samenflüssigkeit**

Von Klaus Schneider, Josef Reiner und Gerhard Spiteller*

Der nach Chang und Wittmann-Liebold modifizierte Edman-Abbau hat sich zur Strukturaufklärung von Peptiden bestens bewährt^[1]. Einziger Nachteil dieser Methode ist die Unsicherheit bei der Bestimmung des C-Terminus, denn wenn das Peptid bis auf zwei bis drei Reste abgebaut ist, kann bei der Extraktion des Hydantoins ein Teil des Restpeptides verlorengehen. Daher ist zumindest noch eine Aminosäurebestimmung notwendig.

Diese Bestimmung kann wegfallen, wenn das exakte Molekulargewicht des Peptides bekannt ist, das sich durch „weiche Ionisierungsmethoden“ ermitteln läßt^[2]. Allerdings wächst die hierfür erforderliche Probenmenge mit steigendem Molekulargewicht stark an (etwa um den Faktor 10 beim Übergang von Masse 1500 zu Masse 2500). Unserer Erfahrung nach sind die hierfür notwendigen Probenmengen an kleinen unbekannten Peptiden kaum erhältlich.

Zur Untersuchung von Peptiden mit Massen zwischen 2000 und 3000 Dalton, die wir aus biologischem Material gewinnen, wenden wir daher folgende Strategie an: Wir spalten das Peptid tryptisch und chymotryptisch, trennen die Bruchstücke per HPLC (eine möglichst hohe Reinheit der Peptide ist für eine Sequenzierung durch MS essentiell) und bestimmen von diesen Bruchstücken das Molekulargewicht per LSIMS^[3]. Nur in optimalen Fällen – meist dann, wenn das Peptid ein Molekulargewicht < 1000 Dalton hat – ermöglichen im LSIMS auftretende Fragmente eine direkte und sichere Strukturableitung. Von der zur LSIMS-Messung verwendeten Probe (ca. 1 μg) wird nur ein winziger Bruchteil verbraucht. Der Rest der Probe wurde bisher verworfen. Wir fanden nun, daß sich der Probenrest unverändert vom Target eluieren und durch HPLC-Chromatographie von der Matrixsubstanz Glycerin befreien läßt. Ein Teil der Restprobe wird nun mit einem Tropfen CH₃OH/2 N HCl versetzt. Nach 12 h Stehen sind alle COOH- und alle CONH₂-Gruppen in COOCH₃-Gruppen überführt. Eine LSIMS-Aufnahme dieser Probe ergibt die Zahl der ursprünglich vorhandenen COOH- und CONH₂-Gruppen. Der größere Teil der Restprobe wird durch doppelten Edman-Abbau nach Chang und Wittmann-Liebold et al.^[3] sequenziert, wobei jedes abgespaltene Aminosäurefragment sowohl durch Dünnschicht- als auch durch HPLC-Chromatographie (bessere Absicherung!) bestimmt wird. Die wiedergewonnene Probe kann im Bedarfsfall zur Bestimmung des N-Terminus durch Dansylierung verwendet werden, wofür eine LSIMS-Aufnahme des Gesamtpeptides^[4], aber auch eine hydrolytische Spaltung des Peptides und nachfolgende Ermittlung der derivatisierten N-terminalen Aminosäure per HPLC in Frage kommt.

Als Beispiel für die Anwendung des oben skizzierten Verfahrens möge die Sequenzierung eines 20 Aminosäuren umfassenden neuen Peptides dienen, das wir in einer Menge von 300 μg aus menschlicher Samenflüssigkeit iso-

[*] Prof. Dr. G. Spiteller, Dr. K. Schneider, Dr. J. Reiner
Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität
Postfach 10 12 51, D-8580 Bayreuth

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

[***] LSIMS = Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry: Bei diesem Verfahren werden geladene Moleküle durch Beschuß mit Cs⁺ aus einer flüssigen Matrix herausgeschleudert und so der Massenspektrometrie zugänglich gemacht. Ähnlich arbeitet die FAB-Massenspektrometrie, bei der Xe-Atome anstelle von Cs⁺ als Geschosse verwendet werden.

lierten. Eine Molekulargewichtsbestimmung des Gesamtpeptides durch LSIMS gelang uns nicht. Die zur Messung eingesetzte Probenmenge betrug ca. 20 µg.

Um das Peptid massenspektrometrisch analysieren zu können, spalteten wir es daher mit Trypsin und Chymotrypsin. (Carboxamidomethylierung^[5] und Reaktion mit Bromcyan^[6] zur Modifizierung von SH-Gruppen bzw. zur Spaltung der Peptidkette an der Carboxylseite eines Methioninrestes blieben erfolglos.) Bei der tryptischen Verdauung erhielten wir nach Trennung durch RP-HPLC drei Spaltstücke (T1, T2 und T3), während die chymotryptische Verdauung nur zwei Teilstücke (C1 und C2) erbrachte.

Das LSI-Massenspektrum von C1 (Abb. 1) zeigt neben dem ausgeprägten MH^+ -Ion der Masse m/z 805 intensive Spaltstücke, die eine Ableitung der Sequenz bis zum *N*-terminalen Dipeptid der Masse 231 ermöglichen. Für dieses Restpeptid ergeben sich nur zwei Möglichkeiten der Aminosäurezusammensetzung, nämlich 1. Asn-Val oder Val-Asn oder 2. Gly-Arg oder Arg-Gly.

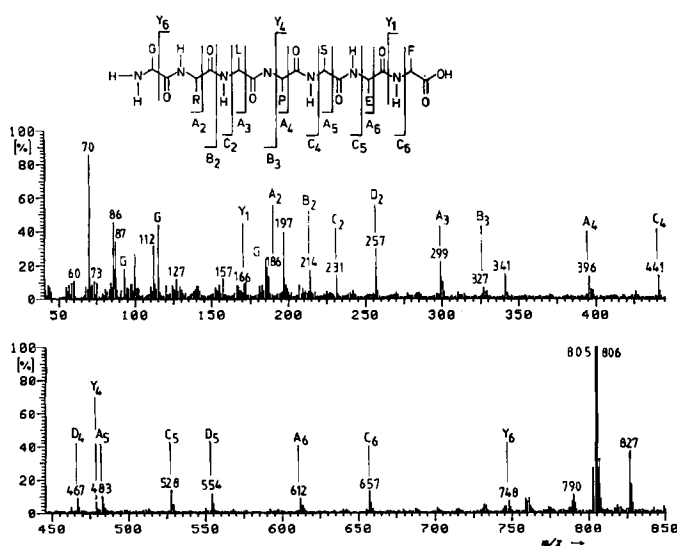


Abb. 1. LSI-Massenspektrum positiver Ionen vom Spaltstück C1: Gly-Arg-Leu-Pro-Ser-Glu-Phe, im Ein-Buchstaben-Code: G-R-L-P-S-E-F; m/z 805 = MH^+ . Die mit „G“ gekennzeichneten Signale stammen von der Matrixsubstanz Glycerin. Die Peptidfragment-Ionen ($A_1 \dots Z_n$) sind nach Roepstorff et al. bezeichnet [7]. Im Schema über dem Spektrum wird der Ein-Buchstaben-Code nur auf die Seitenketten der Aminosäuren angewendet.

Um zwischen den vier Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde das Spaltstück C1 wie oben beschrieben mit einem Tropfen $CH_3OH/2\ N\ HCl$ umgesetzt. Eine LSIMS-Aufnahme des Umsetzungsproduktes (Abb. 2) ergab die Zahl der ursprünglich vorhandenen $COOH$ - und $CONH_2$ -Gruppen aus der Verschiebung des Molekulargewichtes von der Masse 805 zur Masse 833. Daraus leiteten wir das Vorhandensein von zwei Estergruppierungen ab.

Dieser Befund schließt die Endgruppierungen Asn-Val und Val-Asn aus. Um zwischen Gly-Arg und Arg-Gly zu unterscheiden, wurde die Endgruppe mit Dansylchlorid (Dns-Cl)^[8] bestimmt und das entstandene Dns-Glycin durch HPLC nachgewiesen. Durch Umsetzung des Hydrolysats mit Dns-Cl konnte zwischen den beiden möglichen massengleichen Aminosäuren Leucin und Isoleucin (per HPLC) unterschieden werden. Für C1 ergab sich so die Sequenz Gly-Arg-Leu-Pro-Ser-Glu-Phe.

Das LSI-Massenspektrum vom Spaltstück C2 zeigte zwar ein Molekülion der Masse m/z 1412, doch war wegen des Mangels an sequenzspezifischen Ionen eine Sequenzanalyse aus dem Spektrum nicht möglich.

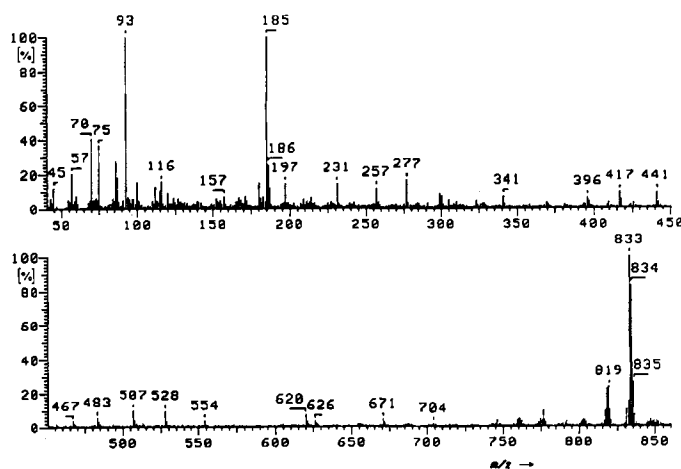


Abb. 2. LSI-Massenspektrum positiver Ionen vom Spaltstück C1, verestert mit $MeOH/2\ N\ HCl$; m/z 833 = MH^+ . Die Ionen m/z 93 und m/z 185 stammen von der Matrixsubstanz Glycerin.

Auch von den tryptischen Bruchstücken T1 und T2 ließen sich nur die Molekulargewichte per LSIMS ermitteln (Abb. 3 und 4). Das Spaltstück T3, von dem durch LSIMS kein Molekülion zu erhalten war, lieferte bei der chymotryptischen Verdauung zwei Sekundärspaltstücke: CT1 ist identisch mit C1; bei CT2 mit der Masse 927 traten im LSI-Massenspektrum (Abb. 5) zwar einige sequenzspezifische Ionen auf, doch waren sie für eine Strukturanalyse zu wenig intensiv. Die Sequenz des Peptides CT2 wurde daher mit Hilfe der manuellen Mikrosequenzierung nach Chang^[9] zu Ser-Gln-Phe-Pro-His-Gly-Ala-Gly-Lys ermittelt, ebenso die des Teilstückes T1 zu Gly-Gln-His-Tyr.

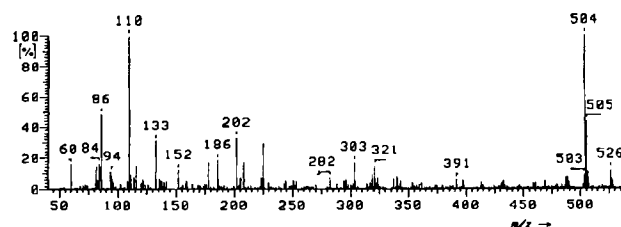


Abb. 3. LSI-Massenspektrum positiver Ionen vom Spaltstück T1: Gly-Gln-His-Tyr; m/z 504 = MH^+ , m/z 526 = MNa^+ ; Glycerin-Untergrund subtrahiert.

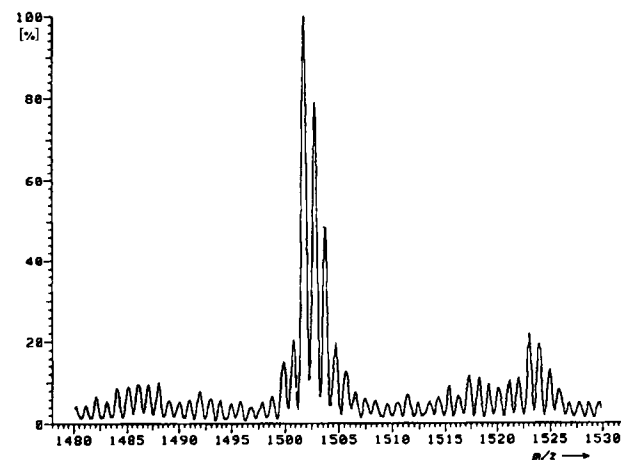


Abb. 4. LSI-Massenspektrum des Molekülionenbereichs vom Spaltstück T3; m/z 1501 = MH^+ ; Leu-Pro-Ser-Glu-Phe-Ser-Gln-Phe-Pro-His-Gly-Ala-Gly-Lys. Die zur Messung eingesetzte Probenmenge betrug ca. 5 µg.

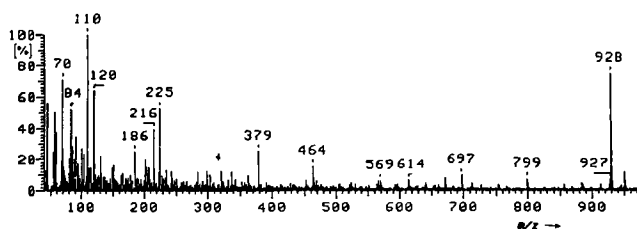
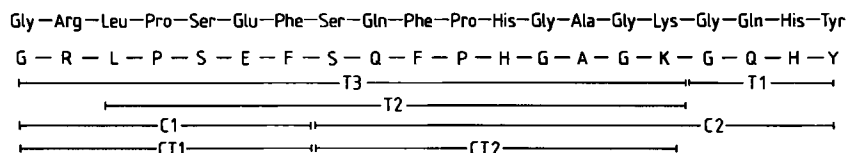


Abb. 5. LSI-Massenspektrum positiver Ionen vom Spaltstück CT2: Ser-Gln-Phe-Pro-His-Gly-Ala-Gly-Lys; m/z 928 = MH^+ ; Glycerin-Untergrund subtrahiert.

Die chymotryptische Verdauung von T2 lieferte ein Teilstück der Masse m/z 591 (CT3) und das bereits bekannte Spaltstück CT2 der Masse m/z 927.

CT3 hat die Sequenz Leu-Pro-Ser-Glu-Phe und somit bis auf das Fehlen des *N*-terminalen Dipeptides Gly-Arg die gleiche Sequenz wie C1 und CT1. Daraus war zu folgern, daß das Bruchstück T3 ein nur unvollständig tryptisch verdautes Peptid ist.



Schema 1. Struktur des neuen Icosaepptides. Bruchstücke siehe Text. Zweite Zeile: Ein-Buchstaben-Code.

Addiert man die Molekulargewichte der chymotryptischen Spaltstücke C1 (Masse 804) und C2 (Masse 1412), so erhält man nach Subtraktion von 18 amu (= Masse von H_2O) für das Peptid ein Molekulargewicht von 2198. Die gleiche Masse erhält man aus den Spaltstücken der tryptischen Verdauung T3 = CT1 (M 804) + CT2 (M 927) und T1 (M 503) nach Subtraktion von 2×18 . Es ergibt sich somit für das Peptid die in Schema 1 gezeigte Struktur. Analoge Strukturen sind bisher unbekannt.

Eingegangen am 23. Februar 1987 [Z 2109]

- [1] C. Y. Yang, E. Pauly, H. Kratzin, N. Hilschmann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348 (1981) 1077; B. Peeters, W. Rombauts, J. Mous, W. Heyns, *Eur. J. Biochem.* 115 (1981) 115.
- [2] M. Barber, R. S. Bordoli, G. V. Garner, D. B. Gordon, R. D. Sedgwick, W. Tetler, A. N. Tyler, *Org. Mass Spectrom.* 16 (1981) 256.
- [3] J.-Y. Chang, D. Brauer, B. Wittmann-Liebold, *FEBS Lett.* 93 (1978) 205; J.-Y. Chang, *Biochim. Biophys. Acta* 578 (1979) 188; J.-Y. Chang, *Biochem. J.* 199 (1981) 557.
- [4] D. Renner, G. Spittler, *Angew. Chem.* 97 (1985) 408; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 408.
- [5] F. R. Gurd, *Methods Enzymol.* 11 (1967) 532.
- [6] E. Gras, B. Wittkop, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1856.
- [7] P. Roepstorff, J. Fohlmann, *Biomed. Mass Spectrom.* 11 (1984) 604.
- [8] W. R. Gray, *Methods Enzymol.* 25 (1972) 121.
- [9] J.-Y. Chang, *Methods Enzymol.* 91 (1983) 455.

Substituierte α -Pyrone als Edukte für die Synthese von 4,4-disubstituierten 1,4-Dihydropyridinen

Von Vratislav Kvita* und Hans-Peter Sauter

Nachdem sich einige 4-Aryl-1,4-dihydropyridine als hochwirksame Calcium-Antagonisten erwiesen haben^[1],

[*] Dr. V. Kvita, H.-P. Sauter
Zentrale Forschungslaboratorien und
Zentrale Funktion Forschung Physik der Ciba-Geigy AG
Rosental, CH-4002 Basel (Schweiz)

wurde in relativ kurzer Zeit eine große Zahl von Derivaten synthetisiert. Die Derivatisierung war jedoch lange Zeit auf die Phenylgruppe und auf C-2 und C-3 des 1,4-Dihydropyridinrings beschränkt. 4,4-Disubstituierte 1,4-Dihydropyridine waren nicht erhältlich.

Erst die Synthese von Goldmann^[2] machte die 4,4-disubstituierten 1,4-Dihydropyridine zugänglich. Aber auch dieser Weg ist nicht allgemein anwendbar. Verbindungen mit den am meisten erwünschten 2- oder 3-Nitrophenylgruppen an C-4 lassen sich nicht mit dieser Methode synthetisieren.

Ausgehend vom α -Pyronderivat erhielten wir jetzt durch eine neue Synthese auch ein 4-Methyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridin, das alle Strukturmerkmale vereinigt, die sich bisher als vorteilhaft erwiesen haben.

Der 3-(3-Nitrophenyl)-2-pentendisäure-diethylester **3a** wurde aus Glutaconsäure-diethylester **1** und 1-Brom-3-nitrobenzol **2a** durch eine Heck-Reaktion^[3] hergestellt, zu **4a** formyliert und anschließend in Anwesenheit einer katalytischen Menge Toluolsulfonsäure in Toluol cyclisiert. Der erhaltene 4-(3-Nitrophenyl)-6-oxopyran-3-carbonsäure-

re-ethylester **5a** reagierte bei Raumtemperatur mit Piperidin unter Abspaltung von CO_2 zu 3-(3-Nitrophenyl)-2-piperidinomethylen-3-butensäure-ethylester **6a**^[4], der mit 3-Aminocrotonsäure-ethylester zu 2,4-Dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäure-diethylester

