

SUMMARY

The structure of solanesol has been confirmed by total synthesis starting from *trans*-geranylacetone. By six successive isoprenoid extensions *via* the tertiary acetylene carbinols, partial hydrogenation of the triple bond, transformation into the primary bromide and acetoacetic ester synthesis, the all-*trans*-C₄₈ketone has been obtained. This has been converted into the primary C₄₆bromide by the above procedure and then transformed into solanesol by treatment with potassium acetate and subsequent saponification.

Vitamin K₂₍₄₀₎, ubiquinone(35) and ubiquinone(40) have been prepared by synthesis from the appropriate tertiary isoprenoid alcohols.

Forschungsabteilung der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

216. Synthesen in der Polymyxin-Reihe

4. Mitteilung¹⁾

Synthese des cyclischen Decapeptids 8γ

von K. VOGLER, R. O. STUDER, W. LERGIER und P. LANZ

(20. VIII. 60)

Wie wir in unserer 1. Mitteilung²⁾ dargelegt haben, sind für das Polypeptid-Antibioticum Polymyxin B₁ nach den Abbauergebnissen³⁾ vier mögliche Strukturen vorgeschlagen worden (Fig. 1). Diese unterscheiden sich dadurch, dass der Ring entweder aus 8 oder aus 7 Aminosäuren aufgebaut ist und die Seitenketten sowohl in A wie in B einmal in N^α-, das andere Mal in N^γ-Stellung des Verzweigungsgliedes 1 angebracht sind.

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, diese 4 Möglichkeiten durch Totalsynthese zugänglich zu machen, von denen eine mit natürlichem Polymyxin B₁ identisch sein sollte. Überdies hoffen wir, durch Vergleich dieser vier Isomeren einen interessanten Beitrag zum Problem Konstitution und Wirkung bei cyclischen Polypeptid-Antibiotica beizusteuern.

Um diese vier möglichen Strukturen eindeutig und kurz charakterisieren zu können, möchten wir nicht nur die in Fig. 1 angegebene Bezeichnung vorschlagen, sondern dafür auch gleichzeitig folgende Abkürzungen, die wir von jetzt an gebrauchen werden, einführen:

Ring mit 8 Aminosäuren und α-verknüpfter Seitenkette	8 α
Ring mit 8 Aminosäuren und γ-verknüpfter Seitenkette	8 γ
Ring mit 7 Aminosäuren und α-verknüpfter Seitenkette	7 α
Ring mit 7 Aminosäuren und γ-verknüpfter Seitenkette	7 γ

¹⁾ 3. Mitteilung: K. VOGLER, P. LANZ, W. LERGIER & R. O. STUDER, Helv. 43, 574 (1960). Über die Abkürzungen vgl. 1. Mitteilung²⁾, Fussnote 9. Dab = α,γ-Diaminobuttersäure; Ipel = Isopelargonsäure; Z = Benzyloxycarbonyl.

²⁾ K. VOGLER & P. LANZ, Helv. 43, 270 (1960).

³⁾ W. HAUSMANN, J. Amer. chem. Soc. 78, 3663 (1956); G. BIZERTE & M. DAUTREVAUX, Bull. Soc. Chim. biol. 39, 795 (1957).

Überdies könnten die Isomeren unter Berücksichtigung der vorgeschlagenen Bezifferung im Ringsystem noch wie folgt bezeichnet werden:

- $8\alpha = \text{Dab}^1\text{-N}^\alpha-(1', 2')\text{-Polymyxin}$
- $8\gamma = \text{Dab}^1\text{-N}^\gamma-(1', 2')\text{-Polymyxin}$
- $7\alpha = \text{Dab}^1\text{-N}^\alpha-(1', 2', 3')\text{-Polymyxin}$
- $7\gamma = \text{Dab}^1\text{-N}^\gamma-(1', 2', 3')\text{-Polymyxin}$

Bei den offenkettigen Vorstufen, z. B. denjenigen der Fig. 2, möchten wir vorschlagen, die übliche fortlaufende Bezifferung der Aminosäurereste einer Peptid-Hauptkette vom Amino-Ende her beizubehalten und die Reste in der Peptid-Nebenkette ebenfalls vom Amino-Ende her fortlaufend mit $1', 2', 3', \dots$ usw. zu bezeichnen.

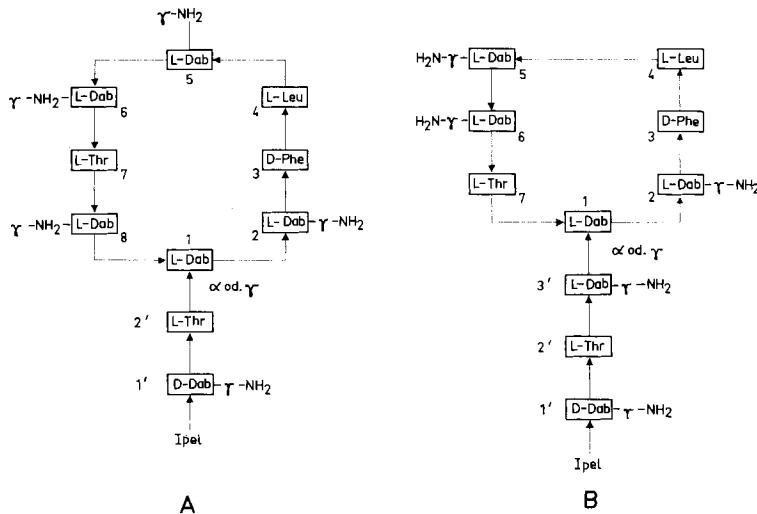


Fig. 1

In der vorliegenden Mitteilung soll von der Synthese einer ersten Möglichkeit, nämlich des cyclischen Decapeptids 8γ , die Rede sein. Wie weiter unten ausgeführt wird, ist unser totalsynthetisches Produkt mit Polymyxin B₁ nicht identisch, was vor allem an Hand der verschiedenen spezifischen Drehung und der geringeren mikrobiologischen Aktivität gegen *Brucella bronchiseptica* ATTC 4617 (10–15% des Naturproduktes) *in vitro* festgestellt wird.

Das für die vorliegende Synthese gebrauchte offene Decapeptid I (Fig. 2) haben wir bereits in unserer 3. Mitteilung¹⁾ beschrieben. Für die Cyclisierung von Oligopeptiden sind verschiedene Methoden⁴⁾ mit Erfolg verwendet worden, vor allem die Aktivierte-Ester-Methode⁵⁾, die die Synthese des ersten cyclischen Polypeptid-Antibioticums Gramicidin S⁶⁾ ermöglicht hat. Wir entschieden uns nach einigen Vorversuchen für die Carbodiimid-Methode, die für Cyclisierungen ebenfalls, z. B. von WIELAND & OHLY⁷⁾, eingesetzt worden ist.

I (Fig. 2) wurde zunächst mit einer Mischung von wasserfreier Trifluoressigsäure und trockenem HCl/Methanol oder mit Dimethylformamid/HCl/Methanol in II

⁴⁾ R. SCHWYZER, Chimia 12, 43 (1958).

⁵⁾ M. BODANSKY, Nature 175, 685 (1955); R. SCHWYZER *et al.*, Helv. 38, 69, 80, 83, 1508 (1955).

⁶⁾ R. SCHWYZER & P. SIEBER, Helv. 40, 624 (1957).

⁷⁾ TH. WIELAND & K. OHLY, Liebigs Ann. Chem. 605, 179 (1957).

übergeführt. II fällt dabei zum grössten Teil aus und wird durch Eindampfen unter verminderterem Druck vom Chlorwasserstoff befreit und durch Umfällen gereinigt.

Bei dieser Reaktion⁸⁾ handelt es sich offenbar um eine durch HCl katalysierte Umacylierung N → O (Methanol als Acceptor), die in der Zuckerreihe schon sehr lange zur Bestimmung von N-Acetyl⁹⁾, allerdings mit p-Toluolsulfonsäure als Katalysator, verwendet wird. Der Formyl-Rest lässt sich im Gegensatz zu Acetyl bereits bei Raumtemperatur umacylieren. Auch hier ist, wie wir fanden, p-Toluolsulfonsäure an Stelle von HCl/Methanol, prinzipiell brauchbar. Bei unserem Gemisch Trifluoressigsäure/HCl/Methanol mag zwar auch eine Veresterung der Trifluoressigsäure nebenherlaufen, die sich durch eine Phasentrennung manifestiert, doch war es möglich, die Aminogruppe in 1-Stellung praktisch vollständig freizulegen, was wir mit der quantitativen Ninhydrinreaktion¹⁰⁾ nachkontrolliert haben.

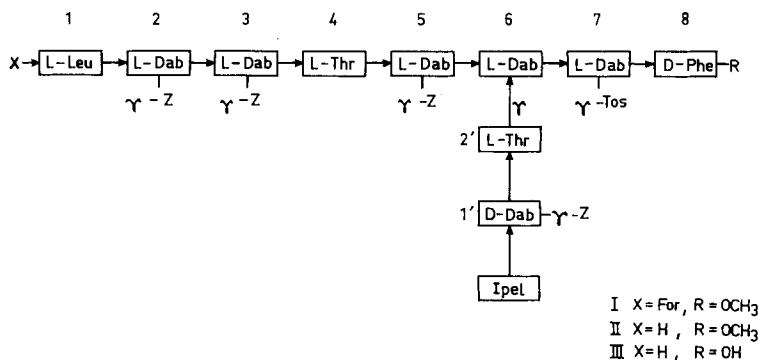


Fig. 2

Die Esterverseifung zu III gelingt in Dimethylsulfoxid mit NaOH bei Zimmertemperatur.

Bei der Cyclisierung von III haben wir anfänglich mit dem 10fachen Überschuss von Carbodiimid gearbeitet, erhielten aber nur eine Ausbeute an rohem Cyclisierungsprodukt, die unter 5% lag. Erst bei Verwendung¹¹⁾ der 300fachen Menge des Reagens stieg die Rohausbeute auf 20%. Dabei wurde das Decapeptid unter Vorgabe des Carbodiimids in Dimethylformamid in grosser Verdünnung umgesetzt. Interessanterweise gelingt die Abtrennung des riesigen Überschusses von Carbodiimid nach seiner Überführung in Dicyclohexylharnstoff auf Grund der Löslichkeitsdifferenz des Cyclisierungsproduktes IV gegenüber ersterem in Dimethylformamid.

Das rohe Cyclisierungsprodukt wurde nach Umfällen direkt mit Na und flüssigem NH₃¹²⁾ seiner Schutzgruppen entledigt (V, Fig. 3) und zur weiteren Reinigung zweimal einer multiplikativen Verteilung im System sek. Butanol/0,1 N HCl¹³⁾ unter-

⁸⁾ S. G. WALEY, Chemistry & Ind. 72, 107 (1953).

⁹⁾ K. FREUDENBERG, Liebigs Ann. Chem. 433, 230 (1932).

¹⁰⁾ Vgl. exper. Teil.

¹¹⁾ Für diesen Hinweis sind wir Herrn Prof. G. W. KENNER, Liverpool, zu Dank verpflichtet.

¹²⁾ V. DU VIGNEAUD & O. K. BEHRENS, J. biol. Chemistry 117, 27 (1937).

¹³⁾ W. HAUSMANN & L. C. CRAIG, J. Amer. chem. Soc. 76, 4892 (1954).

worfen. Dabei beobachtet man eine merkwürdige Instabilität, die das Naturprodukt¹⁴⁾ nicht aufweist. Auch nach schonendem Eindampfen der Cyclisierungsfraktion kann papierchromatographisch eine Nebenfraktion mit wenig kleinerem Rf-Wert festgestellt werden, die vor dem Eindampfen nicht vorhanden ist. Dieses Verhalten spricht neben den Unterschieden, die in Tabelle 1 (Experimenteller Teil) gegenüber Polymyxin B₁ beobachtet wurden, nicht für eine Identität unseres cyclischen Decapeptids 8 γ mit dem Naturprodukt. Durch Umfällen unseres Endproduktes über die freie Base¹⁵⁾ mit NH₃ bei 0° sowie mittels chromatographischer Verfahren gelang

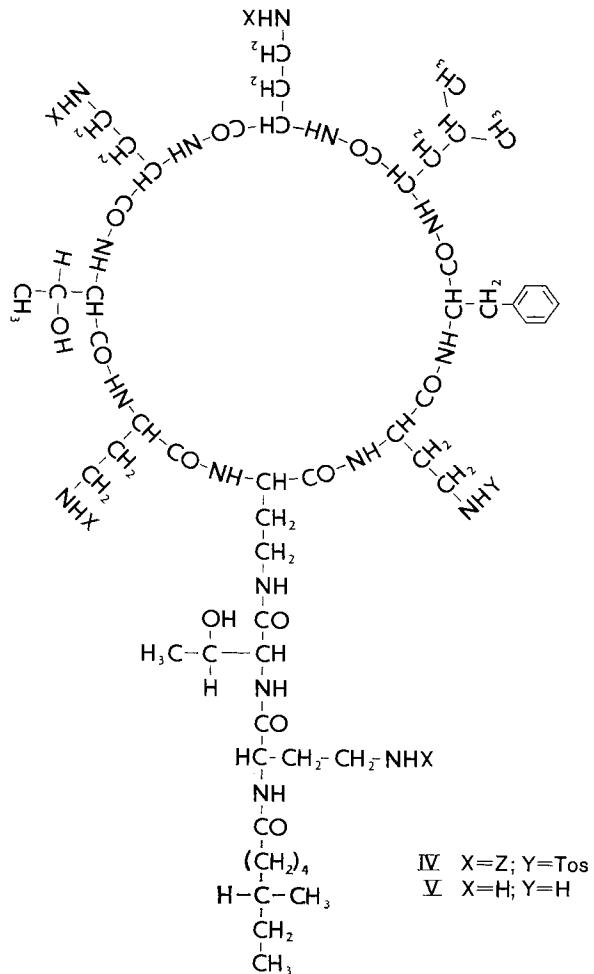


Fig. 3

¹⁴⁾ Polymyxin B₁ wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. L. C. CRAIG in Form einer Mischung von B₁+B₂ zur Verfügung gestellt, aus dem wir durch Gegenstromverteilung die Fraktion B₁ isoliert haben (vgl.¹³)). Wir möchten an dieser Stelle Herrn Dr. CRAIG für sein Entgegenkommen herzlich danken.

¹⁵⁾ J. N. PORTER, R. BROSCARD, G. KRUPKA, P. LITTLE & J. S. ZELLAT, Ann. New York Acad. Sciences, 51, 857 (1949).

es uns schliesslich, eine reine Fraktion in Form eines farblosen Lyophilisates als Pentahydrochlorid zu isolieren.

Für dieses Endprodukt schlagen wir auf Grund unseres Syntheseweges, auf Grund seines verschiedenen chromatographischen Verhaltens gegenüber dem offenen Decapeptid, auf Grund der durch quantitative Ninhydrinanalyse bestimmten 5 Aminogruppen, die durch eine entsprechende Chloranalyse bestätigt werden, sowie auf Grund der Tatsache, dass nach Dinitrophenylierung und Totalhydrolyse kein Dinitrophenyl-leucin mehr gefunden werden kann, die cyclische Struktur V (Fig. 3) vor.

Eine namhafte partielle Racemisierung unseres cyclischen Decapeptids 8 γ halten wir für wenig wahrscheinlich, da auch dessen Drehwert ($[\alpha]_D^{20} = -57,5^\circ$, $c = 0,92\%$ in Wasser) in verschiedenen Cyclisierungsansätzen reproduziert werden konnte. Eine direkte enzymatische Prüfung dieser Frage wäre wohl kaum durchzuführen, da einerseits ein direkter Abbau durch Enzyme auch am Naturprodukt wegen seiner cyclischen Natur nicht verwirklicht werden könnte³⁾ und sowohl im Ring als auch in der Seitenkette je eine D-Aminosäure vorkommen.

Da über die Sekundärstruktur von Polymyxin B₁ und ähnlicher cyclischer Polypeptid-Antibiotica mit Seitenketten¹⁶⁾ nichts bekannt ist und wir heute nicht wissen, ob besondere stereochemische Einzelheiten mit den heutigen synthetischen Mitteln noch erfasst werden können, werden wir am Schlusse der Synthesen, wenn alle 4 Isomeren vergleichend geprüft werden können, auf diese Frage allenfalls zurückkommen.

Experimenteller Teil

1. L-Leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ' -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ' -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Z-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (II).

A. Deformylierung mit 4N methanolischer Sylzsäure in Trifluoressigsäure. 6,2 g Formyl-decapetid-methylester I wurden in 150 ml wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst, bei 0° im Abstand von 15 Min. zweimal mit je 75 ml 14 Tage bei 20° aufbewahrter 4N methanolischer Salzsäure versetzt und diese Mischung 20 Std. bei 20° geschüttelt. Nach 30 Min. bildet sich hierbei eine Trübung, später entstehen 2 Phasen und schliesslich fällt ein Niederschlag aus. Die Mischung wurde nun bei 25° im Wasserstrahlvakuum vom Lösungsmittel befreit und mehrmals mit frischem Methanol abgedampft. Der weisse Trockenrückstand wurde in 20 ml Dimethylformamid gelöst; die Lösung wurde filtriert, bei 0° mit Triäthylamin auf ein pH von 9 eingestellt und die Mischung in 500 ml eiskalte 1N Natriumchloridlösung ausgerührt. Nach 15 Min. wurde die Fällung abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und bei 50° im Wasserstrahl- und Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 4,9 g, Ninhydrinwert entspricht 0,99 NH₂-Gruppen (siehe 5).

B. Deformylierung mit 4N methanolischer Salzsäure in Dimethylsulfoxid. 4,6 g Formyl-decapetid-methylester I wurden unter Erwärmen in 50 ml Dimethylsulfoxid gelöst; die Lösung wurde abgekühlt, mit 50 ml 14 Tage bei 20° aufbewahrter 4N methanolischer Salzsäure versetzt und 30 Min. unter CaCl₂-Verschluss geschüttelt. Im Abstand von je 10 Min. wurde die Lösung anschliessend in 50-ml-Portionen noch insgesamt mit 250 ml 4N methanolischer Salzsäure versetzt. Schon nach kurzer Zeit beginnt sich ein Niederschlag abzuscheiden. Nach 20 Std. wurde die Suspension im Wasserstrahlvakuum bei 25° auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingedampft, bei 0° mit Triäthylamin auf ein pH von 9 eingestellt und in 1,5 l eiskalter 1-proz. Natriumchloridlösung ausgefällt, abgenutscht und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde noch einmal aus Dimethylformamid/1-proz. Natriumchloridlösung umgefällt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen und im Wasserstrahl- und Hochvakuum bei 50° getrocknet. Ausbeute 3,9 g; der Ninhydrinwert entspricht 1,09 Aminogruppen.

¹⁶⁾ Vgl. hingegen die Konformation von Gramicidin S in fester Form aus der RÖNTGEN-Analyse, G. M. J. SCHMIDT, D. C. HODGEKIN & B. M. OUGHTON, Biochem. J. 65, 744 (1957).

2. *L-Leucyl-N^γ-Z-L-α, γ-diaminobutyryl-N^γ-Z-L-α, γ-diaminobutyryl-L-threonyl-N^γ-Z-L-α, γ-diaminobutyryl-N^γ-[N^α-(+)-isopelargonyl-N^γ-Z-D-α, γ-diaminobutyryl-L-threonyl]-L-α, γ-diaminobutyryl-N^γ-Tos-L-α, γ-diaminobutyryl-D-phenylalanin (III) (Verseifung von II).* 7,7 g (4 Millimol) Decapeptid-methylester II wurden in 120 ml Dimethylsulfoxid unter Erwärmung gelöst. Die abgekühlte Lösung wurde mit 6 ml (6 Millimol) 1N Natronlauge versetzt und 20 Std. unter Verschluss bei 20° stehengelassen. Nach Filtration wurde mit Eisessig auf pH 4,7 eingestellt und durch Einröhren in 2 l 1-proz. Natriumchloridlösung gefällt. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit Wasser und Äther gewaschen, im Wasserstrahlvakuum bei 50° getrocknet und aus Dimethylformamid-Äther umgefällt. Ausbeute 5,5 g. Aus der Mikrotitration wurden 1,05 COOH-Gruppen errechnet, Smp. 220–222° (Zers.), 215° Sintern (unkorr.).

Offene Struktur III ohne Schutzgruppen. 400 mg Decapeptid III wurden in 100 ml flüssigem Ammoniak mit 100 mg Natrium reduziert¹²⁾ (20 Min. bestehende Blaufärbung), dann wurde mit 240 mg Ammoniumchlorid versetzt, das Ammoniak verdampft und der Rückstand 1 Std. im Wasserstrahlvakuum bei 25° entgast. Nun wurde in 7 ml Wasser suspendiert, bei 0° mit 6N HCl auf pH 7 gestellt, filtriert und das Filtrat auf eine Säule mit IRC-50 (H-Form) aufgebracht. Letztere wurde mit Wasser chlorionenfrei, dann mit 2,5-proz. Essigsäure bis zu saurer Reaktion des Eluates und schliesslich noch mit Wasser wieder neutral und ninhydrinnegativ gewaschen. Das Peptid wurde nun mit 1N Salzsäure eluiert, die Säule bis zu ninhydrinnegativer Reaktion des Eluates mit 0,05N Salzsäure gewaschen und das salzaure Eluat lyophilisiert. Rf-Wert vgl. Tabelle 1.

3. *Cyclisierung.* 4,8 g (2,5 Millimol) Decapeptid III wurden in 1,3 l Dimethylformamid gelöst. Die filtrierte Lösung wurde bei 20° innerhalb 24 Std. unter Röhren in eine Lösung von 155 g (0,75 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 1,3 l Dimethylformamid getropft. Diese Lösung wurde 72 Std. bei 20° weitergerührt. Dann wurde sie im Hochvakuum bei 40° durch Destillation auf 600 ml konzentriert, das Konzentrat bei –5° mit 160 ml 50-proz. Essigsäure versetzt und nach 20 Std. von Dicyclohexylharnstoff abgenutscht. Nach erneutem Einengen des Filtrates im Hochvakuum bei 40° auf 60 ml wurde die Lösung abgekühlt und nach 1 Std. von einer weiteren Menge Dicyclohexylharnstoff abgenutscht. Das Filtrat wurde mit 1 l Äther/Petroläther 2:1 gefällt. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit Äther gewaschen, nochmals in 15 ml Dimethylformamid aufgenommen, die Lösung 1 Std. bei 0° aufbewahrt, von einer Spur Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und noch einmal mit 500 ml Äther gefällt. Nach dem Abnutschen wurde noch aus Dimethylformamid/Äther umgefällt. Ausbeute 3,3 g.

4. *Entfernung der Schutzgruppen: cycl. Decapeptid 8γ (V).* 3,3 g Rohprodukt aus der Cyclisierung wurden in 500 ml flüssigem Ammoniak mit 1,3 g Natrium reduziert¹²⁾ (20 Min. bestehende Blaufärbung), mit 3 g Ammoniumchlorid versetzt, das Ammoniak verdampft und der Rückstand 1 Std. bei 25° im Wasserstrahlvakuum entgast. Der Rückstand wurde in 50 ml Wasser suspendiert, die Suspension bei 0° mit 6N HCl auf pH 6 eingestellt, von einer Spur Harnstoff abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert. Es verblieben 8 g Rohprodukt, wovon 2 g für die nachfolgend beschriebene Reinigung eingesetzt wurden.

5. *Reinigung des Cyclisierungsproduktes.* Das Rohprodukt (ca. 2 g) wurde einer multiplikativen Verteilung über 400 Stufen im System sek. Butanol/0,1N Salzsäure¹³⁾ unterworfen; dabei wurden die Hauptmengen Salz und offenes Decapeptid abgetrennt (vgl. Fig. 4).

Die Verteilungskurve erhielten wir durch Umsetzen von je 0,2 ml unterer Phase mit FOLIN-DENIS-Reagens und Bestimmung der optischen Dichten bei 750 m μ ¹⁷⁾. Die Verteilung wurde zudem papierchromatographisch kontrolliert (Laufmittel siehe unten). Die vereinigten Gläschenthalte mit der Hauptfraktion ($K = 0,36$ –0,38) wurden im Hochvakuum bei 20° auf das halbe Volumen konzentriert und anschliessend lyophilisiert. Trotz dieser schonenden Aufarbeitung beobachteten wir das Auftreten einer papierchromatographisch wenig langsamer als das Cyclisierungsprodukt wandernden Nebenkomponente; ihr Rf-Wert beträgt im System n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 0,49, während das Cyclisierungsprodukt mit einem Rf von 0,53 läuft. Die Nebenkomponente kann durch erneute Verteilung in sek.-Butanol/0,1N HCl über 800–900 Stufen vollständig abgetrennt werden, erscheint aber wieder nach dem Eindampfen und Gefrier trocknen (Polymyxin B₁ und Polymyxin PFIZER sind bei der gleichen Behandlung stabil

¹²⁾ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & ROSE J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

gegen dieses Lösungsmittelsystem). Eine weitgehende Abtrennung der Nebenkomponente gelang durch folgende Reinigungsoperationen:

a) *Umfällen über die freie Base¹⁵*: Die lyophilisierte Substanz (ca. 180 mg, ca. 20% der Theorie) wurde in 5 ml Wasser gelöst; es wurde nun auf 0° C abgekühlt und bis zur bleibenden Fällung NH₃ eingeleitet; nach 4 Std. Stehen im Kühlschrank wurde mit 5 ml Wasser verdünnt, nochmals kurz NH₃ eingeleitet, sofort zentrifugiert, die Fällung dreimal mit wenig Eiswasser gewaschen, in Wasser suspendiert und lyophilisiert. Nach zweimaligem Wiederholen der Gefriertrocknung wurde die Base in der berechneten Menge 0,1N HCl gelöst und als Hydrochlorid lyophilisiert (ca. 80 mg).

Gegenstrom -Verteilung des Cyclisierungs -Rohproduktes

System sek. Butanol / 0,1N HCl nach 400 Stufen

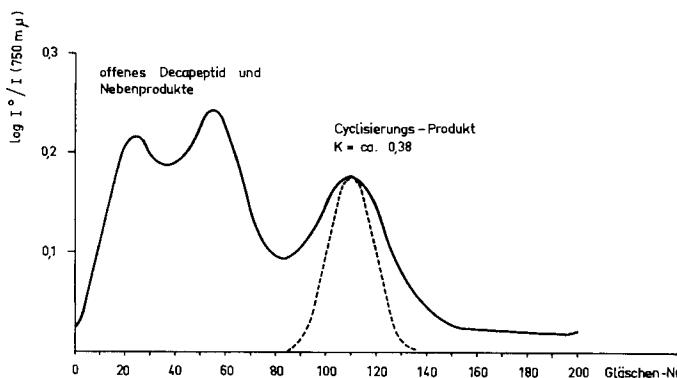


Fig. 4

Gestrichelte Kurve = theoretische GAUSS'sche Verteilungskurve. Nach den Flächenverhältnissen beträgt die Ausbeute an rohem Cyclisierungsprodukt ca. 30%.

Die beträchtliche Mengen Peptidmaterial enthaltende Mutterlauge der Basenfällung wurde mit den Waschwässern vereinigt, lyophilisiert und am Kationenaustauscher Amberlite IRC-50 XE 64 entsalzt; diese Fraktion – in der die beschriebene Nebenkomponente deutlich angereichert ist – diente uns zum Ausprobieren verschiedener säulenchromatographischer Trennmethoden.

b) *Säulenchromatographie*: Als etwa gleichwertige Träger verwendeten wir Cellulosepulver WHATMAN Nr. 1, «standard grade» und Hyflo-Supercel, beide durch gründliches Waschen mit den Entwicklerflüssigkeiten von löslichen Bestandteilen befreit. Eluiert wurde mit n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 und n-Butanol, gesättigt mit 15-proz. Essigsäure, mit einem Durchfluss von 12 ml pro Std. bei einer Säulendiffenzion von 18×250 mm. Die Eluate wurden mit einem Fraktionensammler (Firma HöSLI, Bischofszell) in 1-ml-Fraktionen unterteilt und laufend mittels der Ninhydrinreaktion kontrolliert; die Reinheit der positiven Fraktionen konnte durch Dünnschicht- und Papierchromatographie geprüft werden. Die ersten ninhydrinpositiven Fraktionen enthalten die Hauptmenge des Cyclisierungsproduktes in weitgehend reiner Form und werden direkt lyophilisiert (ca. 50 mg). Zur Entfernung allfälliger letzter Salzverunreinigungen folgt abschließend eine Ionenaustauscher-Chromatographie.

c) *Ionenaustauscher-Chromatographie*: Der schwach saure Kationenaustauscher Amberlite IRC-50 XE 64 gelangt in seiner H-Ionen-Form zur Verwendung. Das Peptid wurde als wässrige Lösung (pH 6–6,5) auf die Säule (15×120 mm) gebracht und diese zuerst mit Wasser bis zur Chlorionen-Freiheit gewaschen (Kontrolle durch pH-Messung und AgNO₃-Reaktion); sobald das Eluat ein pH von ca. 6–7 aufwies, wurde mit 200 ml 2,5-proz. Essigsäure und anschliessend mit gleichviel Wasser nachgewaschen, mit 0,1N HCl eluiert und sofort lyophilisiert (40 mg farbloses, nicht kristallines Pulver). Die Analysenergebnisse dieses Endproduktes, das noch 4,3% Asche enthält, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Analytische Charakterisierung des Endproduktes

Charakterisierung	Cyclisierungsprodukt 8 γ (V)	Polymyxin B ₁	offenes Decapeptid III ohne Schutzgruppen
1. Papierchromatographie	Rf = 0,53	Rf = 0,53	Rf Säure = 0,39 Rf Methylester = 0,43
2. Dünnschichtchromatographie	scharf begrenzter Hauptfleck; geringe, langsamer laufende Verunreinigung	gleich wie Cyclisierungsprodukt 8 γ	gegenüber Cyclisierungsprodukt 8 γ etwa halber Rf-Wert
3. Hochspannungs-Papierelektrophorese	einheitlich; Wanderstrecke ca. 13 cm	wie Cyclisierungsprodukt 8 γ	wie Cyclisierungsprodukt 8 γ
4. Chloranalyse	12,34% Cl	12,65% Cl	—
5. Freie Aminogruppen nach Ninhydrin-Best.	5,1 ± 10%	5,0	—
6. Spezifische Drehung [α] _D ²⁵	−57,5° (c = 0,92, Wasser)	−85,1° (c = 2,33, 75-proz. Äthanol in Wasser) ¹⁸⁾	—
7. Verteilungskoeffizient K	0,37 ± 5%	0,338	0,15 – 0,17
8. IR.-Spektrum	identisch mit Spektrum von Polymyxin B ₁	identisch mit Spektrum des Cyclisierungsproduktes 8 γ	—
9. Totalhydrolyse – Aminosäureverhältnis	Dab Thr Phe Leu 5,99 2,08 0,91 1,00	Dab Thr Phe Leu 6,0 2,0 1,0 1,0	—
10. Dinitrophenylierung und Hydrolyse des DNP-Peptides	kein DNP-Leu	kein DNP-Leu	DNP-Leu nachweisbar
11. Mikrobiologische Aktivität <i>in vitro</i>	ca. 900 E/mg	5200 E/mg	

Erläuterungen zu der Tabelle

1. Die Papierchromatographie wurde auf SCHLEICHER & SCHÜLL-Papier 2043 b mgl, 15 Std. absteigend, bei ca. 25° im Laufmittel n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 durchgeführt. Aufgetragen wurden in der Regel 20 µg in 2 µl. Die Entwicklung erfolgte durch Besprühen mit einer 0,5-proz. alkoholischen Ninhydrinlösung und kurzes Erhitzen auf 100°.

2. Die Herstellung der Kieselgel-Platten und die Arbeitstechnik entsprechen den Originalangaben von STAHL¹⁸⁾. Als Laufmittel diente das gleiche Gemisch wie bei der Papierchromatographie. Die Laufzeit betrug 2–3 Std. und aufgetragen wurden ca. 5 µg in 1 µl.

3. Wir benutzten den Hochspannungs-Pherographen nach WIELAND & PFLEIDERER¹⁹⁾ der Firma L. HORMUTH, Heidelberg. Die Arbeitsbedingungen waren folgende:

Papier	SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 b mgl
Elektrolyt	2N Essigsäure (pH ca. 2,5)
Feldstärke	65 V·cm ^{−1}
Versuchsdauer	40 min
Kammertemperatur	+1 bis +3°.

4. Die Chloranalyse wurde in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung der Herren Drs. H. WALDMANN & A. DIRSCHERL ausgeführt. Der Ascherückstand (4,3%) ist dabei nicht berücksichtigt. C₅₆H₁₀₄O₁₄N₁₆Cl₅ (1406,80).

¹⁸⁾ E. STAHL, Arbeitsvorschrift für Dünnschichtchromatographie, herausgegeben von der Firma C. DESAGA, GMBH, Heidelberg.

¹⁹⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, Angew. Chem. 67, 257 (1955).

5. Zur Ermittlung der Anzahl freier Aminogruppen wurde das für Aminosäure-Bestimmungen viel gebrauchte Ninhydrin-Hydrindantin-Reagens pH 4,7 (s. z. B. R. A. BOISSONNAS²⁰⁾) verwendet; als Vergleichssubstanzen wurden Polymyxin B₁ und Leu mitbestimmt. Dabei wurde in Übereinstimmung der Theorie beobachtet, dass Polymyxin B₁ (5 γ-NH₂-Gruppen) eine gegenüber freiem Leucin 5mal stärkere Farbausbeute ergab.

6. Die Drehungsmessungen wurden in einem photoelektrischen Polarimeter mit Thermostat, das in unserer physiko-chemischen Abteilung durch Dr. F. BURKHARDT entwickelt wurde, aufgenommen. Der Drehwert von Polymyxen B₁ weist im Wasser und 75-proz. Äthanol in Wasser den gleichen Wert auf.

7. Der in der Tabelle angegebene Verteilungskoeffizient K stammt aus den Verteilungen des Cyclisierungs-Rohproduktes und kann daher nicht als Konstante für das weiter gereinigte Endprodukt gelten.

Die Verteilungen wurden in der automatischen 200-stufigen Batterie (je 25 ml obere und untere Phase) nach METZSCH²¹⁾ (Firma H. KÜHN, Göttingen) durchgeführt.

8. Die IR.-Spektren wurden von Dr. L. H. CHOPARD-DIT-JEAN in Kaliumbromid (1 mg Substanz in 300 mg KBr) mit einem Infrarotspektrophotometer Marke PERKIN-ELMER Mod. 21 aufgenommen.

9. Zur Totalhydrolyse wurden 2 mg Cyclisierungsprodukt in 1 ml 5,7N HCl gelöst (Pyrex-Bombenröhren), eingefroren, evakuiert, mit Stickstoff begast, zugeschmolzen und 24 Std. auf 110° erhitzt. Nach Entfernung der Salzsäure löst man das Hydrolysat in 0,1 ml Wasser und trägt 5–10 µl 2,5 cm breit auf die Startlinie eines Chromatographie-Papiers auf, ebenso entsprechende Mengen einer Vergleichslösung, enthaltend Dab/Thr/Phe/Leu im Molverhältnis 6:2:1:1. Chromatographiert wurde über Nacht im Laufmittel n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1. Die Auswertung erfolgte nach Entwickeln mit Ninhydrin-Kupfer-Reagens durch direktes Photometrieren der gefärbten Banden im Densitometer²²⁾.

10. Je 2 µmol Cyclisierungsprodukt bzw. offenes Decapeptid wurden nach SANGER²³⁾ dinitrophenyliert und die DNP-Peptide in 5,7N HCl totalhydrolysiert. Die extrahierten DNP-Aminosäuren wurden dünnenschichtchromatographisch in n-Butanol, gesättigt mit 0,1-proz. Ammoniak, mit Hilfe krist. Reinpräparate von DNP-Leu und γ-DNP-Dab identifiziert.

11. Die Bestimmungen der mikrobiologischen Aktivität wurden in unserer mikrobiologischen Abteilung – unter der Leitung von Prof. B. FUST und Dr. ERIKA BÖHNI – im Plattentest mit *Brucella bronchiseptica* ATCC 4617²⁴⁾ gegen USP-Polymyxin-Standard *in vitro* (7850 E/mg) durchgeführt.

SUMMARY

In order to elucidate the structure of natural polymyxin B₁ the cyclic decapeptide 8 γ (V, Fig. 3, with 8 amino acids in the ring and the side chain attached in γ-position) has been synthesized. This is one of the four possible structures deduced for the natural product by the usual degradation methods. The cyclic decapeptide 8 γ appears not to be identical with polymyxin B₁ in view of its reduced antibacterial activity and different optical rotatory power.

Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

²⁰⁾ R. A. BOISSONNAS, Helv. 33, 1975 (1950).

²¹⁾ F. A. V. METZSCH, Chemie-Ing.-Techn. 25, 66 (1953).

²²⁾ K. RÖWE, E. FERBER & H. FISCHER, Z. physiol. Chem. 313, 174 (1958).

²³⁾ F. SANGER, Biochem. J. 39, 507 (1945).

²⁴⁾ R. G. BENEDICT & F. H. STODOLA, Ann. New York Acad. Sciences, 51, 866 (1949).