

und mit Natriumpikratlösung gefällt. Das ölige Pikrat kristallisierte über Nacht im Eisschränk, wurde dann abgetrennt, mit schwach ammoniakalischem Wasser gewaschen und getrocknet (53 mg). Es zeigte nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton/Wasser (+ einer Spur NH_3) den unscharfen Smp. 190–192°.

Das quantitative Differenzspektrum von diesem Pikrat und Tetramethylammoniumpikrat in abs. Methanol ergab ein typisches Indolinspektrum: λ max: 252 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,94$); 308 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,52$); λ min: 227 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,33$); 283 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,27$).

Eine Probe des Pikrats wurde am Amberlite IRA 400 (Cl^\ominus Form, mit verd. NaHCO_3 -Lösung gewaschen) in das Chlorid umgewandelt (Aceton/Wasser). Im Papierchromatogramm (C-Gemisch) beobachtete man im wesentlichen einen Fleck, der auf Grund des Rf-Wertes und der Farb- und Verblässungsreaktion der Verbindung VI entsprach.

Zusammenfassung

Das Calebassen-Alkaloid C-Fluorocurarin (C-Curarin III), welches auch als Spaltprodukt des C-Curarins I und des C-Calebassins bekannt ist, wurde in bezug auf seine Konstitution eingehend untersucht. Es erwies sich als ein α, β -ungesättigter Aldehyd, dessen Aldehydgruppe an ein α -Methylen-indolin-System angeschlossen ist und mit diesem die chromophore Gruppe bildet. Eine für C-Fluorocurarin wahrscheinliche Konstitutionsformel wird vorgeschlagen und diskutiert.

Zürich, Chemisches Institut der Universität

139. Synthese hochwirksamer Dekapeptide mit der Aminosäuresequenz des Val⁵-Hypertensins I (L-Asparagyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin und L-Asparaginyll-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin)

von **R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker,
W. Rittel und H. Zuber**

(6. VI. 58)

Aus Rinderserum, welches mit Kaninchenrenin behandelt worden war, konnte PEART ein Polypeptid isolieren, welches an der mit Urethan narkotisierten und mit Pentapyrrolidinium-tartrat behandelten Ratte stark und kurzdauernd den Blutdruck erhöht¹). Die Verbindung ist nach den vortrefflichen Untersuchungen von ELLIOTT & PEART²) ein Dekapeptid mit der Aminosäuresequenz H · Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-His-Leu · OH (L_{10}). Sie unterscheidet sich vom Hypertensin I aus Pferdeserum³) dadurch, dass an 5. Stelle (vom Aminende gezählt) der Aminosäurerest des Valins anstelle des Isoleucinrestes eingebaut ist.

¹) W. S. PEART, *Biochem. J.* **59**, 300 (1955); **62**, 520 (1956).

²) D. F. ELLIOTT & W. S. PEART, *Nature* **177**, 528 (1956).

³) L. T. SKEGGS, K. E. LENTZ, J. R. KAHN, N. P. SHUMWAY & K. R. WOODS, *J. exper. Med.* **104**, 193 (1956).

Wie schon vorläufig mitgeteilt, hatten wir bereits im Sommer 1956 hochaktives Material mit der Aminosäurereihenfolge des Val⁵-Hypertensins I hergestellt⁴). Seither haben wir die Synthese mehrmals wiederholt und verbessert. In diesem Bericht soll der bisher beste Syntheseweg eingehend beschrieben werden.

Er geht aus von 4 Dipeptidderivaten (Formelschema 1): Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin-methylester (B 3-4)⁵), Carbobenzoxy-L-valyl-L-histidin-methylester (B 5-6), Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (B 7-8⁵) und Carbobenzoxy-L-histidyl-L-leucin-methylester (B 9 bis 10)⁶). Durch alkalische Verseifung wurden aus B 3-4 und B 7-8 Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin (C 3-4)⁷) und Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanin (C 7-8) hergestellt. Nach der Carbodiimid-Methode⁸) wurden diese Verbindungen mit den durch katalytische Hydrierung gewonnenen Dipeptidestern L-Valyl-L-histidin-methylester (C 5-6) und L-Histidyl-L-leucin-methylester (C 9-10) zu den Tetrapeptid-Derivaten Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin-methylester (D 3-6) und Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester (D 7-10) kondensiert.

Das erste Tetrapeptid-Derivat, D 3-6, wurde noch auf einem andern Wege hergestellt (Formelschema 2): Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin (C 3-4) wurde mit L-Valin-methylester zum Tripeptid-Derivat Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valin-methylester (I) nach der Carbodiimid-Methode⁸) kondensiert; Verseifung mit Alkali ergab Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valin (II), welches durch Kondensation mit L-Histidin-methylester ebenfalls D 3-6, identisch mit der aus den Dipeptid-Derivaten C 3-4 und C 5-6 erhaltenen Verbindung, lieferte.

Zur näheren Charakterisierung wurde ein Teil dieser Verbindungen in die (durchwegs kristallisierten) freien Peptide übergeführt. Dabei wurden die Carbobenzoxyderivate der freien Carbonsäuren mittels HBr in Eisessig oder katalytische Hydrierung von der Schutzgruppe befreit (Formelschema 3). Auf diese Weise wurden in guten Ausbeuten L-Valyl-L-tyrosin (III), L-Valyl-L-histidin (IV), L-Valyl-L-tyrosyl-L-valin (V), L-Valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin (VI) und L-Prolyl-L-phenylalanin (VII) erhalten.

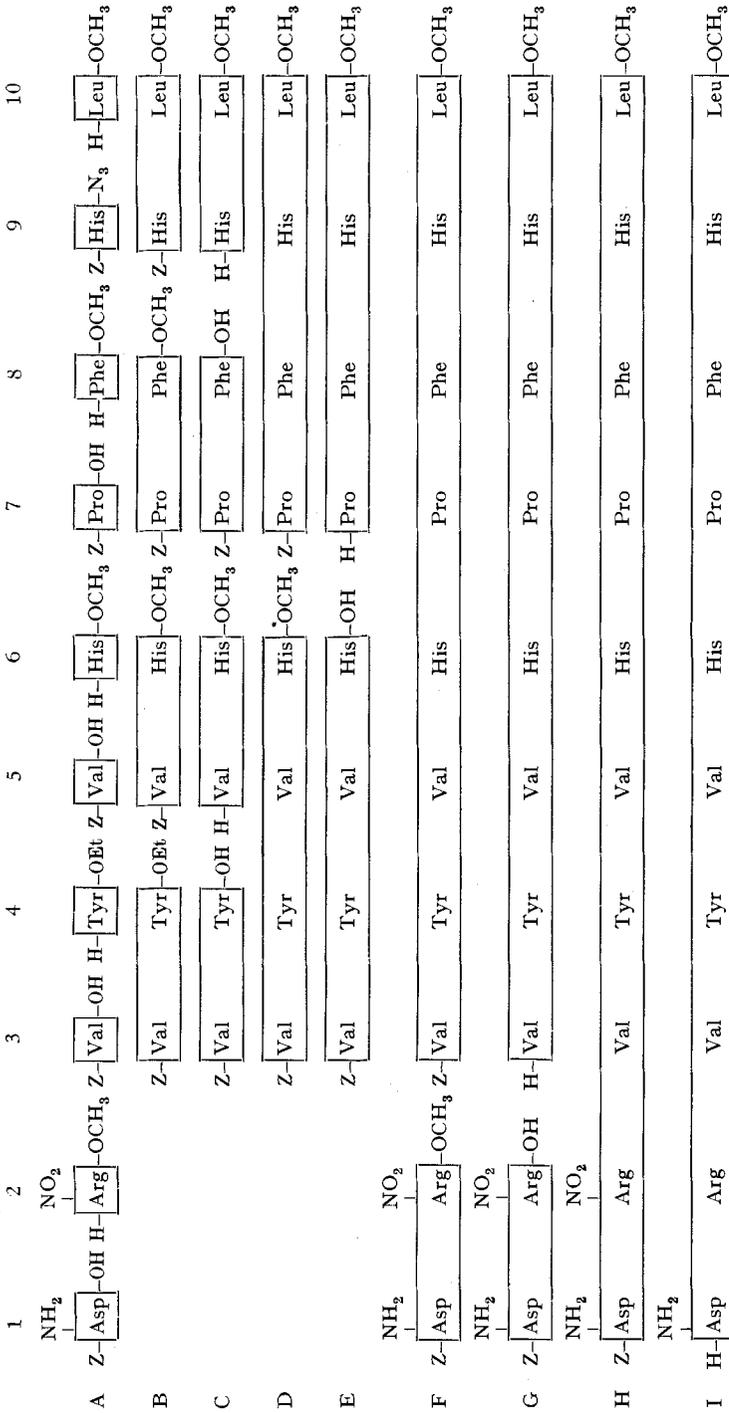
⁴) R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Chimia* **10**, 265 (1956); R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *ibid.* **11**, 335 (1957). — Inzwischen haben D. F. ELLIOTT & D. W. RUSSELL, *Biochem. J.* **66**, 49p (1957), mittels aktivierter Ester die N-Carbobenzoxyderivate folgender Peptidsequenzen hergestellt: β -Benzyl-L- α -asparagyl-L-arginin, β -Benzyl-L- α -asparagyl-L-arginyl-L-histidin und L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin.

⁵) W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 614 (1957).

⁶) R. W. HOLLEY & E. SONDHEIMER, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 1326 (1954).

⁷) Dieses Dipeptidderivat wurde auch durch Verseifung des Äthylesters (Z · Val-Tyr · OC₂H₅) erhalten, welcher seinerseits aus Carbobenzoxy-L-valin-p-nitrophenylester und L-Tyrosin-äthylester gewonnen worden war. Eine weitere Variante bestand in der Kondensation von Carbobenzoxy-L-valin-p-nitrophenylester mit O-Benzoyl-L-tyrosin-äthylester und Verseifung des erhaltenen Carbobenzoxy-L-valyl-L-(O-benzoyl)-tyrosin-äthylesters (siehe im experimentellen Teil).

⁸) J. C. SHEEHAN & G. D. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955); J. C. SHEEHAN & J. J. HLAŤKA, *J. org. Chemistry* **21**, 439 (1956).



Formelschema 1

Z = Carbenzoxy-(C₆H₅-CH₂-O-CO-). Die Gesamtausbeute an I 1-10, berechnet auf C 3-4 oder C 5-6, beträgt gut 15%, d. h. 10 g Carbenzoxy-L-valyl-L-tyrosin liefern etwa 4,8 g L-Asparaginyll-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester.

Nach Verseifung bzw. Hydrierung der beiden Tetrapeptid-Derivate D 3–6 und D 7–10 wurden Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin (E 3–6; kristallisiert) und L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester (E 7–10) erhalten. Kondensation der beiden Stücke ergab Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester (F 3–10), welcher durch katalytische Hydrierung in den Oktapeptidester G 3–10 übergeführt wurde (Formelschema 1).

Kondensation mit dem Dipeptidderivat Carbobenzoxy-L-asparaginyll-L-nitroarginin ergab endlich das geschützte Dekapeptid H 1–10, welches durch katalytische Hydrierung von den Carbobenzoxy- und Nitro-Gruppen befreit wurde. L-Asparaginyll-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester (I 1–10) konnte alkalisch verseift werden, wobei zur Hauptsache das Dekapeptidamid IX neben wenig der Dekapeptiddicarbonsäure VIII (Formelschema 4) entstand. Saure Verseifung mit konzentrierter Salzsäure bei 37°⁹⁾ ergab ein Gemisch von VIII und IX, bei dem die Dicarbonsäure überwog. Die Trennung der Verbindungen gelang durch multiplikative Verteilung. Ihre chemische Einheitlichkeit und Struktur ergab sich aus multiplikativer Verteilung, Papierchromatographie, Elementaranalyse, Aminosäureanalyse und Bestimmung der –CONH₂-Gruppe. Die festen, amorphen Verbindungen wurden als Acetate isoliert und enthielten gebundenes Wasser. Durch scharfes Trocknen verloren sie dieses zum Teil und wurden sehr hygroskopisch (nicht aber zerfliesslich); an der Luft wurden die höhern Hydrate zurückgebildet.

Die blutdrucksteigernde Wirkung von VIII und IX an der nierenlosen Ratte¹⁰⁾ ist gleich wie diejenige der aktivsten Oktapeptide (10–20 mal Noradrenalin¹¹⁾). Daraus schliessen wir auf eine hohe strukturelle und konfigurationelle Reinheit unserer Dekapeptide.

Wie erwartet, unterscheiden sich VIII und IX durch ihre isoelektrischen Punkte (7,4 und 7,9).

Experimenteller Teil¹²⁾

B 5-6, Carbobenzoxy-L-valyl-L-histidin-methylester: Eine Lösung von 25,1 g (0,1 Mol) Carbobenzoxy-L-valin¹³⁾ und 16,7 g (0,1 Mol) L-Histidin-methylester¹⁴⁾ in 100 ml Ace-

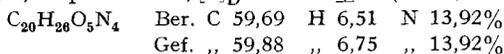
⁹⁾ Die Methode wurde von R. B. MERRIFIELD & D. W. WOOLLEY, J. Amer. chem. Soc. **78**, 4646 (1956), bei der Synthese von Strepogenin-Peptiden angewandt.

¹⁰⁾ Private Mitteilung der Herren Dres. GROSS und TURRIAN von unserer biologischen Abteilung. Für die Testierung möchten wir auch hier unsern besten Dank aussprechen.

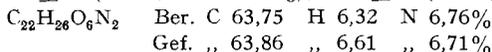
¹¹⁾ Vgl. R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, Helv. **41**, 1287 (1958).

¹²⁾ Wenn nicht besonders angegeben, wurden die Präparate zur Analyse 15 Std. bei 80° und 10⁻² Torr getrocknet. Zur papierchromatographischen Reinheitsprüfung wurden die Carbobenzoxyderivate von Peptiden auf die folgende einfache Weise decarbenzoxyliert: 1 mg Substanz wird im Glühröhrchen mit ca. 0,05 ml konz. Salzsäure übergossen und nach dem Zuschmelzen während 1 Std. bei 40° gehalten. Der Röhrcheninhalt wird sodann im Hochvakuum bei Zimmertemperatur zur Trockene eingedampft, in Methanol-Wasser gelöst und in der gewünschten Menge (ca. 30–300 γ , je nach Molekelgrösse) auf das Papier gebracht. Bei dieser Reaktion werden gleichzeitig anwesende Estergruppen quantitativ verseift, während Hydrolyse von Peptidbindungen nicht oder nur in äusserst

tonitril wird bei ca. 10° mit 26,1 g 1-Cyclohexyl-3-morpholinyläthyl-carbodiimid⁸⁾ versetzt und bei Zimmertemperatur stengelassen. Nach ca. 1 Std. beginnt die Abscheidung eines gelatinösen Produktes, das nach 15 Std. abfiltriert und mit Acetonitril gewaschen wird: 30,8 g (77%); Smp. 152–156°. Aus Aceton-Äther und Methanol-Essigester-Petroläther umkristallisiert, Smp. 165–166°; $[\alpha]_D^{23} = -22^\circ \pm 2^\circ$ (c = 2,04 in Äthanol).

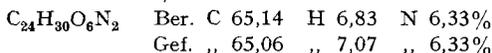


C 3–4, Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin: 70,7 g (0,16 Mol) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin-methylester⁵⁾ werden in 300 ml Methanol gelöst und unter Rühren innert 15 Min. bei ca. 10° mit 400 ml 1-n. Natronlauge versetzt. Die klare Lösung wird 2 Std. bei Zimmertemperatur stengelassen, dann i. V. von Methanol befreit und von wenig festem Material filtriert. Beim Ansäuern des Filtrats mit verdünnter HCl scheidet sich das Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin kristallin aus: 64 g (97%); Smp. 161–163°; $[\alpha]_D^{23} = +26^\circ \pm 1^\circ$ (c = 4,01 in Pyridin); $+16^\circ \pm 1^\circ$ (c = 3,13 in Eisessig); $+2^\circ \pm 1^\circ$ (c = 4,08 in Äthanol).



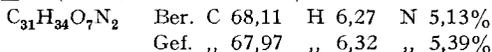
546 mg (0,001 Mol) Carbobenzoxy-L-valyl-O-benzoyl-L-tyrosin-äthylester werden in 20 ml heissem Methanol gelöst. Die Lösung wird rasch gekühlt und sofort mit 4 ml 1-n. Natronlauge versetzt. Nach 2 Std. wird wie oben beschrieben aufgearbeitet, wobei 380 mg (97%) kristallines Material, Smp. 161–163°, erhalten werden, das mit dem oben beschriebenen Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin identisch ist.

Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin-äthylester: 1,12 g (0,003 Mol) Carbobenzoxy-L-valin-p-nitrophenylester¹⁵⁾ und 0,63 g (0,003 Mol) L-Tyrosin-äthylester¹⁶⁾ werden in 3 ml Tetrahydrofuran gelöst und die Lösung wird 48 Std. bei Zimmertemperatur stengelassen. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wird das Reaktionsprodukt in Essigester aufgenommen und die Essigesterlösung mit 2-n. Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Bei Zugabe von Äther scheiden sich 0,90 g (67%) fester Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin-äthylester ab, Smp. nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther 145–147°; $[\alpha]_D^{23} = +34^\circ \pm 1^\circ$ (c = 4,03 in Chloroform).



Die Verseifung analog wie bei dem Methylester liefert Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin.

Carbobenzoxy-L-valyl-O-benzoyl-L-tyrosin-äthylester: 372 mg (0,001 Mol) Carbobenzoxy-L-valin-p-nitrophenylester¹⁵⁾ werden in 1 ml Essigester gelöst und mit 1 ml einer Lösung enthaltend 0,0013 Mol O-Benzoyl-L-tyrosin-äthylester¹⁷⁾ (frisch aus dem Hydrochlorid bereitet) in Essigester versetzt. Beim Stehen der Lösung bei Zimmertemperatur beginnt sich das Reaktionsprodukt als festes Material auszuscheiden. Nach 22 Std. wird abfiltriert (466 mg); das Filtrat wird nach Waschen mit 2-n. Salzsäure, 2-n. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser eingedampft und liefert beim Versetzen mit Äther weitere 56 mg Substanz; total 522 mg (95%). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther schmilzt der N-Carbobenzoxy-L-valyl-O-benzoyl-L-tyrosin-äthylester bei 173 bis 175°; $[\alpha]_D^{23} = +34^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,51 in Chloroform).



geringem Maßstabe eintritt. Säureamidgruppen (z. B. in Asparaginyln-peptiden) werden teilweise hydrolysiert.

¹³⁾ R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* **42**, 99 (1948).

¹⁴⁾ J. P. GREENSTEIN & F. W. KLEMPERER, *J. biol. Chemistry* **128**, 245 (1939), als Öl; R. F. FISCHER & R. R. WHETSTONE, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5076 (1954), als krist. Verbindung; R. B. MERRIFIELD & D. W. WOOLLEY, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 4646 (1956).

¹⁵⁾ B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 373 (1957).

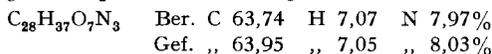
¹⁶⁾ E. FISCHER, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **34**, 433 (1901).

¹⁷⁾ C. R. HARRINGTON & R. V. PITT, *Biochem. J.* **38**, 417 (1944).

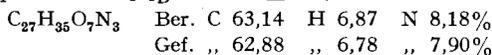
*L-Valin-methylester*¹⁸⁾: Die Veresterung erfolgte mit SOCl_2 in Methanol¹⁹⁾ nach dem von BOISSONNAS²⁰⁾ für das ebenfalls schwer veresterbare L-Isoleucin angegebenen Verfahren: 11,7 g (0,1 Mol) L-Valin werden in eine auf -10° gekühlte Lösung von 13,1 g (0,11 Mol) Thionylchlorid in 30 ml abs. Methanol eingetragen, langsam auf Zimmertemperatur erwärmt, 3 Std. auf 50° erhitzt und darauf nochmals mit 3,6 g (0,03 Mol) SOCl_2 behandelt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum und mehrmaligem Waschen des Rückstandes mit wenig Aceton werden 14,4 g (86%) L-Valin-methylesterhydrochlorid, Smp. $160\text{--}163^\circ$ erhalten; Smp. nach dem Umkristallisieren aus Methanol-Äther $166\text{--}168^\circ$; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +16^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,12$ in H_2O). E. L. SMITH¹⁸⁾ gibt Smp. $167,5$ bis 168° und $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +15,5^\circ$ ($c = 2$ in H_2O) an.

Der freie Ester (Sdp. $80^\circ/40$ Torr) wird durch Zugabe von Ammoniak zur wässrigen Lösung des Hydrochlorids und Extraktion mit Äther in fast quantitativer Ausbeute gewonnen.

Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valin-methylester (I): Eine Lösung von 53,8 g (0,13 Mol) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin und 17,0 g (0,13 Mol) L-Valin-methylester (frisch aus dem Hydrochlorid bereitet) wird unter Köhlen mit 30 g (0,15 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 4 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das ausgeschiedene feste Material, bestehend aus einem Gemisch des Tripeptid-Derivats und Dicyclohexylharnstoff, wird abfiltriert, mit Tetrahydrofuran extrahiert, die ungelöste Harnstoffverbindung abfiltriert, das Filtrat im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit Äther versetzt, wobei 42,1 g gelatineartiges Material vom Smp. $177\text{--}179^\circ$ erhalten werden. Die ursprüngliche Reaktionslösung wird ebenfalls im Vakuum eingedampft, der Rückstand in viel Essigester aufgenommen und die Essigester-Lösung mit 2-n. Salzsäure, 2-n. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Nach Zugabe von Äther zum Rückstand lassen sich weitere 13,3 g Material, Smp. 170 bis 172° , isolieren. Ausbeute total 55,4 g (81%). Umkristallisation aus Aceton-Äther ergibt 51,4 g (75%) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valin-methylester, Smp. $177\text{--}179^\circ$; $[\alpha]_{\text{D}} = -24^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,08$ in Eisessig); aus Aceton allein kristallisiert die Verbindung mit Smp. $194\text{--}196^\circ$ und gleicher spezifischer Drehung.



Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valin (II): Eine Lösung von 47,5 g (0,09 Mol) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valin-methylester in 350 ml Methanol wird bei ca. 10° unter Rühren mit 250 ml 1-n. Natronlauge versetzt und 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Methanol wird darauf im Vakuum abdestilliert und die wässrige, schwach trübe Lösung filtriert, auf 0° gekühlt und mit Salzsäure angesäuert. Das ausgeschiedene feste Material wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen, in feuchtem Zustande in 1 l 0,5-n. Natriumhydrogencarbonat gelöst, von ca. 0,8 g unlöslichem Material abfiltriert und wiederum durch Zugabe von überschüssiger Salzsäure gefällt und mit Wasser gewaschen. Die getrocknete Substanz schmilzt bei $218\text{--}220^\circ$. Ausbeute 37,1 g (80%). Umkristallisation aus Äthanol-Wasser ergibt 32,1 g (70%) reines Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valin, Smp. $222\text{--}224^\circ$; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -26^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,16$ in Äthanol).



D 3-6, Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin-methylester: a) 8,05 g Carbobenzoxy-L-valyl-L-histidin-methylester werden in 80 ml Methanol und 20 ml 2-n. HCl (in Methanol) gelöst und nach Zugabe von 500 mg Palladiumkohle (10% Pd) bis zur Sättigung hydriert. Die Wasserstoffaufnahme beträgt 430 ml in 3 Std. Es wird vom Katalysator abfiltriert, zur Neutralisation mit einer Lösung von 920 mg Natrium in 15 ml Methanol

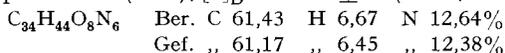
¹⁸⁾ E. L. SMITH, H. D. SPACKMANN & W. J. POLGLASE, J. biol. Chemistry **199**, 801 (1952).

¹⁹⁾ M. BRENNER & W. HUBER, Helv. **36**, 1109 (1953).

²⁰⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, Helv. **38**, 1491 (1955).

versetzt und im Vakuum bei ca. 30° Badtemp. stark eingeengt. Zum zähölgigen Rückstand gibt man noch zweimal je 30 ml Acetonitril und dampft erneut ein. Schliesslich wird in Acetonitril aufgenommen und vom gebildeten Natriumchlorid abfiltriert (2,32 g).

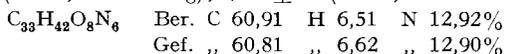
Zum Filtrat, enthaltend den freien L-Valyl-L-histidin-methylester, wird eine Lösung von 8,64 g Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin und 5,3 g 1-Cyclohexyl-3-morpholinyläthyl-carbodiimid⁸⁾ in 100 ml Acetonitril gegeben. Nach anfänglichem Rühren wird die zu einer Gallerte erstarrende Mischung über Nacht bei 20° stehengelassen. Zuletzt wird filtriert, mit Acetonitril gewaschen und getrocknet. Zur Reinigung kocht man das Rohprodukt kurz mit 300 ml Methanol auf (wobei das Tetrapeptid als gallertige Suspension ungelöst bleibt), kühlt ab und filtriert. Nach Aufarbeitung sämtlicher Mutterlaugen erhält man insgesamt 8,7 g (65% d. Th.) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin-methylester als Pulver vom Smp. 228–230° (Zers.); $[\alpha]_D = -31^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,05$ in Eisessig).



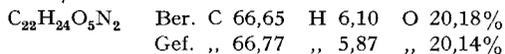
Im System Methanol-Wasser-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (8:2:5:5) über 48 Stufen zeigt die Verbindung ($K = 1,51$) in den Elementen 25–36 eine der theoretischen entsprechende Gewichtsverteilung.

b) Eine Lösung von 28,22 g (0,055 Mol) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valin und 10,14 g (0,06 Mol) L-Histidin-methylester im 300 ml Tetrahydro-furan wird bei ca. 10° mit einer Lösung von 14,22 g (0,06 Mol) 1-Cyclohexyl-3-morpholinyläthyl-carbodiimid in 100 ml Acetonitril versetzt. Das Gemisch wird 15 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen, wobei sich das Reaktionsprodukt in fester Form abscheidet. Dieses wird abfiltriert (16,0 g, Smp. 213–216°) und aus der Mutterlauge wird nach Einengen eine weitere Fraktion isoliert (6,35 g; Smp. 207–210°). Die vereinigte Substanz (22,35 g entspr. 61%) wird wie unter a) aus Methanol umgelöst und ergibt 18,5 g (50%) des Tetrapeptid-Derivats vom Smp. 225–228; $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,02$ in Eisessig). Verseifung ergibt kristallisiertes Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin.

E 3–6, Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin: 6,1 g Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin-methylester werden in 25 ml Methanol und 35 ml 1-n. Natronlauge suspendiert und 15 Min. bei 20° gerührt (vollständige Auflösung). Nach weiteren 2 Std. bei Zimmertemperatur wird zur Entfernung des Methanols im Vakuum bei 25° bis zur Hälfte eingedampft und dann mit 50 ml Wasser und 35 ml 1-n. Salzsäure versetzt. Die gallertige Fällung wird unter starkem Rühren kurz auf 90° erwärmt, mit Eis gekühlt, filtriert, gewaschen und getrocknet. Man erhält so 4,55 g (76%) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin als amorphes Pulver vom Smp. ca. 228° (Zers.), welches aus Dimethylformamid-Äther in Form feiner Nadeln kristallisiert, Smp. 236–238° (Zers.). $[\alpha]_D = -10^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,1$ in Eisessig); $+2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,03$ in Dimethylformamid).



C 7–8, Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanin: 1,8 g Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester⁵⁾ werden in 5 ml Methanol mit 4,4 ml 1-n. NaOH 1 $\frac{1}{4}$ Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen, dann mit 25 ml Wasser versetzt und die Lösung zweimal mit Essigester extrahiert. Aus der wässrigen Phase scheidet sich beim Ansäuern mit verd. HCl das Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanin als Öl ab, welches in Essigester aufgenommen wird. Nach dem Waschen und Trocknen hinterlässt die organische Phase 1,4 g farblosen Schaum. Dieser wird aus Aceton-Petroläther und Aceton-Äther kristallisiert: 1,3 g (82%); Smp. 126–127°; $[\alpha]_D^{20} = -49^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,46$ in abs. CHCl₃). Zur Analyse Trocknen 2 Std. bei 100°/10⁻² Torr.



Durch katalytische Hydrierung wurde L-Prolyl-L-phenylalanin²¹⁾ hergestellt. Smp. 238°; $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,027$ in 20-proz. HCl); in n-BuOH:AcOH:H₂O (100:10,

²¹⁾ Dieses Dipeptid wurde inzwischen mit gleichen physikalischen Eigenschaften von H. SCHWARZ, F. M. BUMPUS & I. H. PAGE, J. Amer. chem. Soc. **79**, 5697 (1957), beschrieben.

mit H₂O gesättigt), EtOH:n-BuOH:H₂O:NHET₃ (10:10:5:2) und EtOH:n-BuOH:H₂O (10:10:5) zeigte die Verbindung auf WHATMAN Nr. 1 die Rf-Werte 0,70, 0,75 und 0,80.

C 9-10, L-Histidyl-L-leucin-methylester: 5,8 g Carbobenzoxy-L-histidyl-L-leucin-methylester (Smp. 116–120°)⁸⁾ werden in 30 ml Methanol und 22 ml 1,5-n. HCl (in Methanol) gelöst und nach Zugabe von 0,5 g Palladiumkohle (10% Pd) bei Normaldruck hydriert. Die Aufnahme beträgt 313 ml Wasserstoff in 16 Std. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen des Filtrates im Vakuum erhält man eine farblose, zähflüssige Masse, die in 50 ml Wasser gelöst wird. Unter Eiskühlung wird durch Zugabe von gesättigter Kaliumcarbonatlösung das pH auf 9 eingestellt und die freigesetzte Base isoliert durch zweimalige Extraktion mit je 100 ml n.-Butanol, Waschen und Eindampfen im Vakuum bei 40° Badtemperatur. Man erhält 4,1 g einer honigartigen, wasserlöslichen Masse, die sofort weiterverarbeitet wird.

D 7-10, Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester: 4,1 g roher L-Histidyl-L-leucin-methylester werden in 25 ml absolutem Essigester gelöst, dazu werden unter Eiskühlung 3,16 g Dicyclohexyl-carbodiimid und eine Lösung von 5,52 g Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanin in 50 ml absolutem Acetonitril gegeben. Man lässt über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Zuletzt wird der gebildete Dicyclohexyl-harnstoff abfiltriert (3,2 g, Smp. 228°) und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Das amorphe Pulver wird in Essigester gelöst, mit 1-n. Salzsäure, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Man erhält 8,6 g Rohmaterial, das durch Verteilung über 60 Stufen im System Methanol-Wasser-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff 4:1:2:3 weiter gereinigt wird. Aus den Röhrchen 9 bis 21 werden 5,6 g (61%) Tetrapeptid-Derivat isoliert. (G = 0,34). Die Substanz kann aus Aceton-Wasser in Nadeln kristallisiert werden. Smp. 185–187°; $[\alpha]_D = -60^\circ \pm 4^\circ$ (c = 1,04 in Methanol).

$C_{35}H_{44}O_7N_6$	Ber. C 63,62	H 6,71	N 12,72%
	Gef. „ 63,80	„ 6,49	„ 12,77%

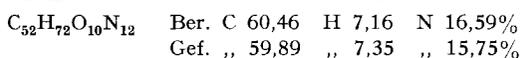
E 7-10, L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester: 4,52 g Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester werden in 27 ml 1,53-n. HBr in Eisessig gelöst. Nach 90 Min. bei 40° wird im Vakuum bei 40° Badtemp. soweit wie möglich eingengt, der Rückstand unter Zugabe von Äther zu einem Pulver zerrieben, abfiltriert und getrocknet. Man erhält so 4,9 g eines gelblichen Dihydrobromides, das in wenig Wasser gelöst wird. Durch Zugabe von gesätt. Kaliumcarbonatlösung wird auf pH 9 eingestellt, mit n.-Butanol zweimal extrahiert, gewaschen und eingedampft. Der so erhaltene Tetrapeptidester (3,5 g) wird direkt weiterverarbeitet.

F 3-10, Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester: Die Lösung von 1,1 g L-Prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester in 7 ml frisch dest. Dimethylformamid wird mit 1,36 g Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin und 515 mg Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und die Suspension bei Zimmertemp. gerührt. Die anfänglich noch ungelösten Teile gehen bald in Lösung, währenddem sich gleichzeitig kristalliner Dicyclohexyl-harnstoff auszuscheiden beginnt. Nach 20 Std. bei 20° werden die Kristalle abfiltriert, mit wenig Dimethylformamid nachgewaschen und das Filtrat im Hochvakuum bei 30° eingedampft. Der zäh-ölige Rückstand wird mit Wasser zu einem Pulver zerrieben, bei 0° filtriert, gewaschen und im Hochvakuum bei 50° getrocknet. Man erhält 2,5 g eines Rohproduktes, das zur Reinigung im System Methanol-Wasser-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (15:5:11:9) über 54 Stufen verteilt wird. Nach nochmaliger Verteilung der unreinen Fraktionen erhält man insgesamt 1,24 g (51%) Carbobenzoxy-oktapeptid-methylester, der im genannten Lösungsmittelsystem ein K von 0,44 aufweist und unscharf bei ca. 150–170° schmilzt. $[\alpha]_D = -73^\circ \pm 4^\circ$ (c = 1,01 in Äthanol).

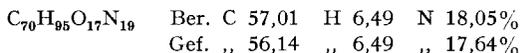
$C_{80}H_{78}O_{12}N_{12}$	Ber. C 62,16	H 6,78	N 14,50	OCH ₃ 2,67%
	Gef. „ 60,45	„ 6,83	„ 14,24	„ 2,60%

G 3-10, L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester: 1,16 g Carbobenzoxy-oktapeptid-methylester werden in 5,2 ml 1,53-n. HBr in

Eisessig gelöst und 100 Min. bei 40° stehengelassen. Zuletzt dampft man das Lösungsmittel im Hochvakuum ab, zerreibt den zähen Rückstand mit Äther zu einem Pulver, filtriert ab und trocknet bei 45°. Man erhält 1,35 g Hydrobromid, das in 20 ml Wasser gelöst wird. Unter Eiskühlung wird gesätt. Kaliumcarbonatlösung bis pH 9 zugegeben und der dabei ausfallende freie Oktapeptid-methylester mit n-Butanol extrahiert. Man erhält nach Eindampfen des gewaschenen Butanol-Extraktes 1,03 g eines weissen Pulvers, das zur Weiterverarbeitung genügend rein ist. Bei der CRAIG-Verteilung im System Methanol-Wasser-Chloroform-Benzol (73:27:82:18) über 60 Stufen erhält man neben sehr wenig verseiftem Material (K = 5,9) den Oktapeptid-methylester als einheitliche Verbindung; $K = 0,40$, $[\alpha]_D = -70^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,16$ in CH_3OH).



H 1-10, Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester: 985 mg (0,96 mMol) Oktapeptid-methylester und 655 mg (3,16 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid werden in 8 ml frisch dest. Dimethylformamid gelöst. In diese Lösung werden unter Rühren portionenweise 1345 mg (2,88 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginin (Smp. 136-141°) in fester Form eingetragen. Aus der zunächst gebildeten klaren Lösung beginnt sich bald krist. Dicyclohexyl-harnstoff auszuscheiden. Nach 20stündigem Stehenlassen bei Zimmertemp. wird filtriert, mit wenig Methanol nachgewaschen und das Filtrat im Hochvakuum bei 30° eingedampft. Der Rückstand wird mit 30 ml Essigester zerrieben und filtriert, noch zweimal mit je 25 ml Aceton aufgekocht, kalt abfiltriert und zuletzt getrocknet. Die so gewonnenen 1,29 g Rohprodukt werden im System Methanol-Wasser-Chloroform-Tetra-chlorkohlenstoff (15,5:16:4) über 60 Stufen verteilt. Aus dem vereinigten Inhalt der Röhrchen 16-28 werden 995 mg (70% bezogen auf Oktapeptidester) reiner Carbobenzoxy-nitro-dekapeptid-methylester gewonnen, $K = 0,58$. Smp. ca. 180-195° (Zers.). $[\alpha]_D = -55^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,65$ in 0,01-n. HCl in Methanol).



I 1-10, L-Asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester: 822 mg Carbobenzoxy-nitro-dekapeptid-methylester werden in 15 ml Methanol und 5 ml 1,4-n. HCl in Methanol gelöst und nach Zugabe von 250 mg Katalysator (10% Pd auf Kohle) bei 35° hydriert. Nach 10 Std. ist die Reaktion beendet; die Volumendifferenz beträgt, ohne Korrektur für das nicht absorbierte CO_2 , 66,4 ml. Nach Abfiltrieren und Eindampfen zur Trockne erhält man 817 mg eines Gemisches von Dekapeptid-methylester-tetrahydrochlorid und Ammoniumchlorid als weisses Pulver (berechnet 834 mg). Es wird direkt zur Verseifung weiterverwendet.

Saure Verseifung von L-Asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucin-methylester: 815 mg Methylester-tetrahydrochlorid (+ NH_4Cl) werden in 5 ml konz. Salzsäure (37% HCl) gelöst und 90 Min. bei 40° gehalten. Zuletzt wird bei 35° im Hochvakuum zur Trockne eingedampft, fein pulverisiert und 15 Std. über KOH stehengelassen. Man erhält 805 mg eines schwach bräunlichen Pulvers, das zur Freisetzung der Base an schwach basischem Ionenaustauscher (MERCK Nr. II) zerlegt wird: Das in 1 ml Wasser und 1 ml Methanol gelöste Hydrolysat wird langsam durch eine Austauschersäule (Länge 15 cm, Durchmesser 11 mm, in Methanol-Wasser 1:1) filtriert und mit Methanol-Wasser 1:1 nachgespült. Das auf Abwesenheit von Chloridionen geprüfte Eluat (ca. 45 ml) wird im Vakuum auf die Hälfte eingedampft und dann im Hochvakuum lyophilisiert. Man erhält das freie Peptid (667 mg) als farbloses, in Wasser und Methanol schlecht lösliches Pulver (löslich im Gemisch von Wasser und Methanol). Auf feuchtem Universal-Indikatorpapier reagiert es basisch, pH ca. 8. Zur Auftrennung werden 1,88 g freies Peptid über 210 Stufen verteilt im System n-Butanol/0,4-m. Ammoniumacetatlösung, pH 7,0, mit Phasenvolumen je 25 ml. Am Ende werden die Lagen der Maxima mit PAULY-Tupfproben auf Papier festgestellt:

		Rohr Nr.	K
VIII	Max.	93	0,8
IX	Max.	150	2,5
Verunreinigungen (Methylester I 1–10) .	Max.	189	8,8

Die vereinigten Röhrencheninhalte werden eingedampft (50° Badtemp.) und aus dem Rückstand das Ammoniumacetat im Hochvakuum bei 40° wegsublimiert.

Röhrenchen	Gewicht	
79–116	563 mg	VIII
117–137	113 mg	VIII + IX
138–170	575 mg	IX

Die Verbindungen liegen als Acetate vor. Zur Analyse werden sie nach dem Trocknen durch offenes Stehenlassen mit der Luftfeuchtigkeit äquilibriert.

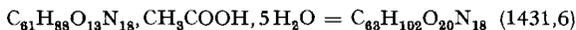
VIII (*Frakt. 79–116*): Amorphes, leicht wasserlösliches Pulver; aus der Lösung durch gesätt. NaCl-Lösung fällbar. Löslich in 2-n. NaOH und Na₂CO₃. Smp. sehr unscharf, > 220° (Zers.). $[\alpha]_D = -67,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,69$ in H₂O).



Ber. C 52,82 H 7,11 O 23,45 N 16,62 NH₃(—CONH₂) 0,00% Äq.-Gew. 477,5
Gef. „ 52,55 „ 7,21 „ 23,26 „ 15,86 „ 0,05²²⁾% „ 424²³⁾

Papierchromatographie auf WHATMAN-Papier Nr. 3 absteigend, mit den Systemen: sek.-Butanol-3% Ammoniak, 120:44 (I); tert.-Amylalkohol, 100 ml, Triäthylamin, 0,8 ml, Diäthylbarbitursäure, 1,8 g, Wasser, 50 ml und Isopropanol, 40 ml (II); sek.-Butanol-Isopropanol-Wasser-Phosphatpuffer (1,5-m., pH = 8), 35:35:25:10 (III). Entwicklung mit Ninhydrin und PAULY-Reagens. Die Verbindung verhielt sich einheitlich und zeigte folgende Rf-Werte: I: 0,26; II: 0,28; III: 0,54.

IX (*Frakt. 138–170*): Amorphes, leicht wasserlös. Pulver, durch NaCl fällbar. Löslich in 2-n. NaOH, schwer löslich in 2-n. Na₂CO₃. Smp. wie VIII. $[\alpha]_D = -68^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,67$ in H₂O).



Ber. C 52,85 H 7,18 O 22,35 N 17,61 1 NH₃(—CONH₂) 1,19% Äq.-Gew. 715,8
Gef. „ 53,03 „ 7,14 „ 21,90 „ 16,81 „ 1,13²²⁾% „ 659²³⁾

Papierchromatographie wie oben: einheitliche Verbindung mit Rf-Werten von 0,34 (I), 0,40 (II) und 0,62 (III).

Bestimmung des isoelektrischen Punktes von VIII und IX durch Zonenelektrophorese auf Filtrierpapier²⁴⁾: In einer kleinen Elektrophoreseapparatur (LKB, Stockholm) wurden die elektrophoretischen Beweglichkeiten (u) bei verschiedenen pH bestimmt. Die Elektrophorese wurde auf kleinen Pherogrammstreifen (SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 B, 40 × 410 mm) bei Zimmertemperatur (24–26°) durchgeführt. Spannung 130 V, Versuchszeit 495 bzw. 465 Min. Die Puffer ($\mu = 0,1$) wurden alle aus monovalenten Salzen bereitet: Acetatpuffer, pH 4,14/5,0/6,0. Tris-(oxymethyl)-amino-methan, pH 7,2/9,2. Diäthylbarbitursäure, pH 8,4. Die Hypertensin-Zonen wurden auf dem Papier mit PAULY-Reagens sichtbar gemacht.

Die Elektrosmose wurde vergleichsweise durch Auftragen einer elektrisch neutralen Substanz (Glucose) bestimmt und die beobachteten Beweglichkeiten entsprechend korrigiert. Die beobachteten elektrophoretischen Beweglichkeiten entsprechen möglicherweise nicht den wirklichen Beweglichkeiten, da das verwendete System sehr komplex ist.

²²⁾ Mikrobestimmung nach CONWAY.

²³⁾ Elektrometrische Titration mit Natronlauge.

²⁴⁾ Vgl. J. D. RAACKE & C. H. LI, J. biol. Chemistry **215**, 277 (1955).

Die elektrophoretischen Beweglichkeiten u wurden nach folgender Formel berechnet:

$$u = (d_{\text{beob.}} - d_{\text{osm.}}) / F \cdot t \quad \text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1}$$

$d_{\text{beob.}}$ = Wanderungsweg der Substanz (cm)

$d_{\text{osm.}}$ = Wanderungsweg der neutralen Substanz durch Osmose (cm)

F = Feldstärke $V/l = 130/39 \text{ Vcm}^{-1}$

t = Zeit (sec)

Tabelle 1. *Elektrophoretische Beweglichkeiten bei verschiedenen pH-Werten*

Puffer ($\mu = 0,1$)	pH	$F \cdot t \cdot 10^{-5}$ (Volt · sec/ cm)	$d_{\text{osm.}}$ (cm)	$d_{\text{beob.}}$ VIII (cm)	$d_{\text{beob.}}$ IX (cm)	$u (\cdot 10^6)$ VIII	$u (\cdot 10^6)$ IX
Acetat-	4,14	0,98	3,3	6,0	7,5	2,7	4,2
	5,0	0,98	3,5	6,0	7,5	2,5	4,0
	6,0	0,98	3,7	5,6	7,0	1,9	3,3
Tris-(oxymethyl)- amino-methan	7,2	0,98	1,0	1,4	2,1	0,4	1,1
	9,2	0,92	0,4	-2,6	-1,0	-3,2	-1,5
Diäthylbarbitur- säure	8,4	0,98	1,5	-0,6	0,7	-2,1	-0,7

Der graphisch ermittelte isoelektrische Punkt liegt für VIII bei pH 7,4
und für IX bei pH 7,9.

Bestimmung der Molverhältnisse der Aminosäuren in den Dekapeptiden VIII und IX mittels der Ninhydrin-Kupferkomplexmethode²⁵): In einer vereinfachten Arbeitsweise wurden je $10 \mu\text{l}$ bzw. $20 \mu\text{l}$ des Peptidhydrolysats (es wurden je 2 mg Peptid hydrolysiert; Volumen $0,1 \text{ ml}$) auf einen Chromatographiepapierstreifen (SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 B) aufgetragen, und die Aminosäuren mittels der zweidimensionalen Methode: Hochspannungselektrophorese (pH 1,9/2000 V/75 Min.) und Papierchromatographie (n-Butanol:Eisessig:Wasser = 4:1:5) aufgetrennt. Die Papierbogen wurden mit Ninhydrin entwickelt und anschliessend mit alkohol. Kupfernitratlösung besprüht. Die rot gefärbten Flecken wurden mit Methanol eluiert und der Ninhydrin-Kupfer-Komplex bei $504 \text{ m}\mu$ im COLEMAN-Spektrophotometer ausgemessen. Mit jedem Peptidhydrolysat wurden 3 Bestimmungen durchgeführt und ein mittlerer Wert für das Molverhältnis errechnet. Als Vergleichslösung diente ein Aminosäuregemisch mit den entsprechenden Aminosäuren in dem zu erwartenden Molverhältnis. Auch bei der Vergleichslösung wurde nach 3 Bestimmungen ein Mittelwert errechnet. Wegen mangelhafter Auftrennung wurden Arg und His zusammen vermessen. Prolin wurde nicht bestimmt.

Arg + His: Val: Leu: Phe: Tyr: Asp

Ber. 3,0 : 2,0 : 1,0 : 1,0 : 1,0 : 1,0

Gef. (VIII) 3,06:1,80:1,07:1,00:1,01:0,94 (je $\pm 10\%$)

„ (IX) 2,94:1,81:1,09:0,98:0,92:1,07 „

Freie Peptide III–VI (Formelschema 3): Papierchromatographische Systeme:

1. EtOH-n-BuOH-H₂O-NH(C₂H₅)₂ 10:10:5:2.
2. n-BuOH-Aceton-H₂O-NH(C₂H₅)₂ 10:10:5:2.
3. n-BuOH-AcOH-H₂O (10:1 ges. m. H₂O).
4. sek. BuOH-3% NH₃ (120:144).

²⁵) F. G. FISCHER & H. DÖRFEL, *Biochem. Z.* **324**, 544 (1953); TH. WIELAND & E. KAWERAU, *Nature* **168**, 77 (1951); F. H. BODE, H. J. HÜBENER, H. BRÜCKNER & K. HOERES, *Naturwissenschaften* **39**, 524 (1952).

L-Valyl-L-tyrosin (III): 8,28 g (0,02 Mol) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin wurden in 38 ml einer 1,6-n. Lösung von HBr (0,06 Mol) in Eisessig suspendiert. Das Ausgangsmaterial ging innert 10 Min. in Lösung und nach 2 Std. war die CO₂-Entwicklung beendet. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum vollständig eingedampft und der anfänglich ölige Rückstand mehrmals mit Äther verrieben. Das feste Hydrobromid wurde zur Überführung in das freie Dipeptid in 30 ml Methanol gelöst und mit der berechneten Menge einer Lösung von Ammoniak in Methanol versetzt; dabei schied sich das Dipeptid spontan in Form feiner Nadeln aus, 5,94 g (86%); Smp. 249–252°. Nach Umkristallisieren aus Wasser-Methanol schmolz die Substanz bei 251–253°; sie enthielt 2 Mol. Methanol, das sich durch Erhitzen auf über 100° entfernen liess; $[\alpha]_D^{25} = +49 \pm 1^\circ$ (c = 4,18 in H₂O); Rf-Werte in Syst. 1) 0,73; 2) 0,61; 3) 0,50; 4) 0,65. Zur Analyse wurde 15 Std. bei 23° getrocknet.

$C_{14}H_{20}O_4N_2 \cdot 2CH_3OH$ (344,40)	Ber. C 55,80	H 8,20	N 8,13	(O)CH ₃ 8,74%
	Gef. „ 55,39	„ 8,12	„ 7,84	„ 8,79%

Bei der hydrierenden Abspaltung der Carbobenzoxygruppe aus Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin (in Methanol mit Palladiumkohle als Katalysator) wurde das identische Dipeptid mit 2 CH₃OH in einer Ausbeute von 57% erhalten.

Carbobenzoxy-L-valyl-L-histidin-hydrochlorid: Eine Lösung von 10 g (0,025 Mol) Carbobenzoxy-L-valyl-L-histidin-methylester in 50 ml Methanol wurde mit 30 ml 1-n. Natronlauge versetzt und 90 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das organische Lösungsmittel wurde darauf im Vakuum abgedampft und die alkalische wässrige Lösung zur Entfernung von wenig Nebenprodukten mit Essigester extrahiert. Beim Ansäuern mit 10 ml konz. Salzsäure bei 0° schied sich das kristalline Carbobenzoxy-dipeptid-hydrochlorid aus, das nach 1 Std. abfiltriert und mit eiskaltem Wasser gewaschen wurde; 5,74 g (54%); Smp. 121–123°. Nach Umkristallisieren aus Wasser Smp. 122–125°; $[\alpha]_D^{25} = -23 \pm 1^\circ$ (c = 4,17 in H₂O). Zur Analyse wurde aus viel Aceton umkristallisiert; Smp. unverändert.

$C_{19}H_{24}O_5N_4 \cdot HCl$	Ber. N 13,19	Cl 8,34%	
(424,90)	Gef. „ 12,93	„ 8,37%	

L-Valyl-L-histidin (IV): 4,25 g (0,01 Mol) Carbobenzoxy-L-valyl-L-histidin-hydrochlorid wurden in 25 ml einer 1,6-n. Lösung von HBr (0,04 Mol) in Eisessig gelöst und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Beendigung der CO₂-Entwicklung (2¹/₂ Std.) wurde die Lösung im Vakuum vollständig eingedampft und der Rückstand mehrmals mit Äther verrieben. Das feste Hydrobromid des Dipeptids wurde in 20 ml Wasser gelöst, durch eine mit 45 g feuchtem Amberlit IR-4 B (basische Form) beschickte Säule passiert und mit 50 ml Wasser nachgewaschen. Das im Vakuum zur Trockene eingedampfte Eluat ergab beim Verreiben mit Methanol 2,42 g (95%) kristallines Dipeptid vom Smp. 205 bis 207°. Nach Umkristallisieren aus Wasser-Methanol Smp. 206–208°; $[\alpha]_D^{25} = +46 \pm 1^\circ$ (c = 4,15 in H₂O); Rf-Werte in Syst. 1) 0,52; 2) 0,38; 3) 0,11; 4) 0,35. Zur Analyse wurde 6 Std. bei 80° getrocknet.

$C_{11}H_{18}O_3N_4$	Ber. C 51,95	H 7,14	N 22,03%
(254,29)	Gef. „ 51,90	„ 7,30	„ 22,04%

L-Valyl-L-tyrosyl-L-valin (V): 5,13 g (0,01 Mol) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valin wurden in der oben beschriebenen Weise durch Zugabe von 3 Äquivalenten HBr in Eisessig decarbobenzoxyliert. Das rohe Hydrobromid des Tripeptids wurde in 20 ml Wasser gelöst, mit 40 g Amberlit IR-4 B behandelt und das teilweise in der Säule kristallisierte freie Tripeptid mit viel heissem Wasser eluiert. Die vereinigten Eluate ergaben beim Einengen im Vakuum 2,86 g (75%) kristalline Substanz. Einmaliges Umkristallisieren aus Wasser lieferte 2,50 g (66%) reines Tripeptid, das in Methanol besser und in Äthanol etwa gleich gut löslich ist wie in Wasser; Smp. 210–212°; $[\alpha]_D^{25} = +24 \pm 1^\circ$ (c = 3,33 in 0,1-n. HCl); Rf-Werte in Syst. 3) 0,64; 4) 0,72. Zur Analyse 5 Std. bei 80° getrocknet.

$C_{19}H_{29}O_5N_3$ (379,45)	Ber. N 11,07%	Gef. N 11,04%
-------------------------------	---------------	---------------

L-Valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin (VI): 1,04 g (1,6 mMol) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidin wurden mit 2 ml Eisessig zu einer einheitlichen Paste verrieben und mit 5 ml einer 1,6-n. Lösung von HBr in Eisessig versetzt. Das Ausgangsmaterial ging innert 15 Min. in Lösung; nach 1 Std. begann sich das Hydrobromid des Tetrapeptids als Öl auszuschcheiden. Das Gemisch wurde eine weitere Std. mechanisch geschüttelt, darauf im Vakuum vollständig eingedampft und der Rückstand mit Äther verrieben. Zur Überführung in das freie Tetrapeptid wurde das Hydrobromid in der oben beschriebenen Weise mit Amberlit IR-4 B behandelt. Bei Zugabe von Methanol zum Rückstand des eingedampften Eluats kristallisierte das Tetrapeptid-monohydrat in Form von feinen Nadeln. Es wurde zur Reinigung in Methanol suspendiert, durch Zugabe einer Lösung von NH_3 in Methanol gelöst, filtriert und durch kurzes Erhitzen vom NH_3 befreit, wobei sich das Peptid beim Kühlen kristallin abschied; 0,67 g (81%); Smp. 220–224° (Zers.). Nach nochmaligem Umkristallisieren Smp. 227–229° (Zers.); $[\alpha]_D^{24} = -6^\circ \pm 2^\circ$ (c = 2,45 in H_2O); Rf-Werte in Syst. 1) 0,72; 2) 0,62; 3) 0,21; 4) 0,65. Zur Analyse wurde 5 Std. bei 80° getrocknet.

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{N}_6, \text{H}_2\text{O}$	Ber. C 56,16	H 7,16	N 15,71%
(534,60)	Gef. „ 56,16	„ 7,28	„ 15,82%

Die Verbrennungsanalysen und die Mikro-CONWAY-Bestimmungen verdanken wir den Herren Dres. GYSEL und PADOWETZ.

SUMMARY

The preliminarily published synthesis⁴⁾ of decapeptides with the amino acid sequence of Val⁵-hypertensin I has been repeated several times. The products showed a high hypertensive activity, comparable with that of the corresponding octapeptides [Val⁵-hypertensin II and Val⁵-hypertensin II-Asp-β-amide¹²⁾]. The synthesis yielding the purest intermediates and products is described in this paper. The high chemical purity of the synthetic Val⁵-hypertensin I and Val⁵-hypertensin I-Asp-β-amide was ascertained by counter-current distribution, paper chromatography, elemental analysis, and determination of amino acids after hydrolysis. The free, crystalline peptides H · Val-Tyr · OH (L-L), H · Val-His · OH (L-L), H · Val-Tyr-Val · OH (I₃), H · Val-Tyr-Val-His · OH (L₄) and H · Pro-Phe · OH (L-L) were prepared from intermediates of the synthesis.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung