

In 5 Fällen ($v_2 = 0, 5, 10, 15$ und 20) wurden ausserdem mit Hilfe des modifizierten und erweiterten Programms⁹⁾ die zu den Eigenwerten E_j gehörigen Linearkombinationen

$$\Phi_j(\xi) = \sum_{n=0}^{119} c_{jn} u_n(\xi)$$

bestimmt, auf deren Angabe jedoch aus Platzgründen verzichtet werden muss. Hingegen sind die aus den Koeffizienten c_{jn} nach der Formel (4) berechneten Übergangintegrale Q'_{ij} für die 8 Energieniveaus ($i, j = 0, 1 \dots 7$) in der Tab. II angeführt. Diese Werte für $v_2 = 0$ und $i, j = 0, 1 \dots 5$ stimmen bis auf die Beträge von 10^{-5} mit den Integralen Q_{ij} überein, die früher aus den Eigenfunktionen $\Psi_j(\xi)$ gefunden wurden (vgl. Tab. VI der 3. Mitteilung¹⁾). In den Fig. 3a und 3b ist die Abhängigkeit der Integrale Q'_{ij} von v_2 für Übergänge veranschaulicht, die von den zwei untersten Niveaus ($i = 0$ oder 1) aus erfolgen.

Die vorliegende Arbeit wurde vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS (Projekt Nr. 1918) unterstützt.

SUMMARY

Potential functions of the form $V(\xi) = \xi^6 - v_2 \xi^2$ can be useful in problems involving two symmetrical energy minima. Eigenvalues, eigenvectors (linear combinations) and transition integrals of such one-dimensional sixth power oscillators have been calculated for a set of equidistant values of the parameter v_2 .

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

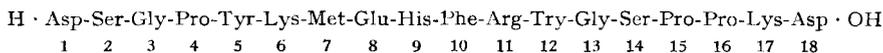
⁹⁾ Das Programm ist mir von Prof. Dr. H. RUTISHAUSER zur Verfügung gestellt worden, dem ich an dieser Stelle bestens danken möchte.

59. Synthese von L-Glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin

von H. Kappeler

(18. I. 61)

Für Versuche zur Synthese des geschützten Octadecapeptides mit der Aminosäuresequenz des β -Melanophoren-stimulierenden Hormons (β -MSH) des Rindes, benötigten wir als Mittelstück das Peptid 8-13¹⁾, wobei anstelle der Glutaminsäure vorerst Glutamin eingebaut wurde:



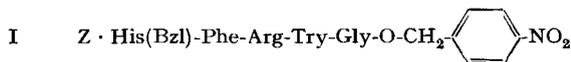
β -MSH²⁾

¹⁾ R. SCHWYZER, H. KAPPELER, B. ISELIN, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **42**, 1702 (1959).

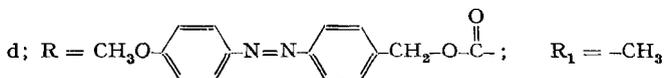
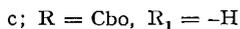
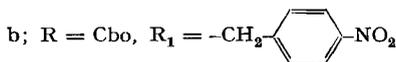
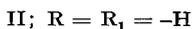
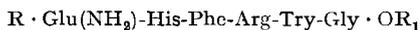
²⁾ I. I. GESCHWIND, C. H. LI & L. BARNAFI, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 1003, 6394 (1957).

Im weiteren verfolgten wir das Ziel, die kleinsten Peptidsequenzen mit MSH-Aktivitäten zu finden³⁾.

Nachdem von verschiedenen Autoren⁴⁾ die Synthese von α -MSH und kleinern Peptidsequenzen davon beschrieben wurden, möchte ich in der vorliegenden Arbeit eine Reihe von (im Laufe der letzten Jahre ausgeführten) Versuchen beschreiben, die



zum geschützten Pentapeptidderivat I und zum geschützten (Derivat II a–d) oder freien Hexapeptidamid II führten (Schemata 2, 3 und 4).



MZ-Phenylalanin⁵⁾ und Arginin-methylester-hydrochlorid wurden in abs. Tetrahydrofuran nach der gemischten Anhydridmethode⁶⁾ zum MZ-Dipeptidester 1B 2–3 kondensiert. Dieser, während 90 Min. mit 2N HBr in Eisessig bei Zimmertemperatur behandelt, ergab 1C 2–3 als Dihydrobromid. N α -Cbo-N(Im)–Bzl-Histidin⁷⁾ liess sich mit dem Monohydrobromid von 1C 2–3 in Dimethylformamid mittels Dicyclohexyl-carbodiimid (DCCI)⁸⁾ in unbefriedigender Ausbeute zu 1D 1–3 kondensieren. Die Verseifung mit einem Überschuss von 1N NaOH führte zum Tripeptidderivat 1E 1–3. Dieses, mit 1E 4–5 mittels DCCI kondensiert, ergab in schlechter Ausbeute den geschützten Pentapeptidester 1F 1–5, so dass auf eine Weiterverfolgung dieses Syntheseweges verzichtet wurde.

Eine Probe 1F 1–5 wurde mit Natrium in flüssigem Ammoniak zum freien Pentapeptid gespalten, das die gleiche MSH-Wirkung⁹⁾, wie das von SCHWYZER & LI³⁾ beschriebene Peptid zeigte (3×10^4 E/g; K. HOFMANN *et al.*, J. Amer. chem. Soc. 82, 3721 (1960), geben $1,4 \times 10^4$ E/g an).

³⁾ R. SCHWYZER & C. H. LI, Nature 182, 1669 (1958)

⁴⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, Helv. 41, 1852 (1958), R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, R. L. HUGUENIN, P. A. JAQUENOUD & E. SANDRIN, Helv. 41, 1867 (1958); ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, Helv. 42, 1257 (1959); K. HOFMANN *et al.*, J. Amer. chem. Soc. 80, 1486 (1958); 80, 6458 (1958); 82, 3715, 3721, 3727, 3732 (1960).

⁵⁾ R. SCHWYZER, P. SIEBER & K. ZATSKÓ, Helv. 41, 491 (1958).

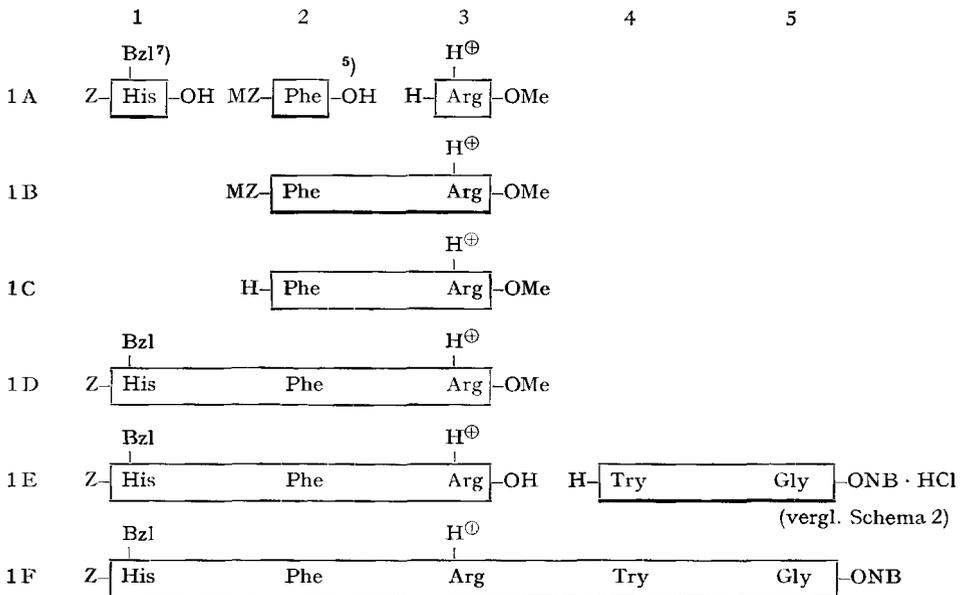
⁶⁾ R. A. BOISSONNAS, Helv. 34, 874 (1951); TH. WIELAND & H. BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1951); J. R. VAUGHAN & R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. 73, 3547, 5553 (1951); 74, 676 (1952).

⁷⁾ A. H. COOK, I. HEILBRON & A. P. MAHANDERAN, J. chem. Soc. 1949, 1061–4; B. G. OVERELL & V. PETROW, *ibid.* 1955, 232.

⁸⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

⁹⁾ Die Prüfung wurde von Prof. C. H. LI und Dr. I. I. GESCHWIND im Hormone Research Lab. der Universität Kalifornien (Berkeley, Calif.) ausgeführt, wofür ich ihnen nochmals bestens danken möchte.

Schema 1: Aufbauprinzip des geschützten Pentapeptidesters I



Abkürzungen: Bzl- = Benzyl-; -ONB = p-Nitrobenzyl-
 MZ- = p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-
 Z- = Carbobenzoxy-

- Dick unterstrichene Formeln bedeuten kristalline Verbindungen.
- 1D 1-3 bedeutet: 1. Schema; Formelgruppe D; Aminosäuren 1-3.

Bei diesem Syntheseweg wurde versucht, ω -protonisiertes Arginin¹⁰⁾ anstelle von ω -Nitroarginin in das Peptid einzubauen, da die katalytische Hydrierung der ω -Nitrogruppe bei grössern Peptiden oft langsam und uneinheitlich verläuft. Ebenso sollte auch geprüft werden, ob die Verwendung von N(Im)-Benzyl-histidin⁷⁾ für den Aufbau von Histidinpeptiden Vorteile bietet, was jedoch nicht der Fall war. Gewisse Vorteile (im Falle des Benzyl-histidins die Herabsetzung der Acylierbarkeit des Imidazolringes) mussten durch die Anwendung der oft mit schlechten Ausbeuten verlaufenden Spaltung mit Natrium in flüssigem Ammoniak erkaufte werden.

Die 3 folgenden Schemata (2, 3 und 4) beschreiben die Synthesewege für das Hexapeptid II und seine Derivate IIa-d.

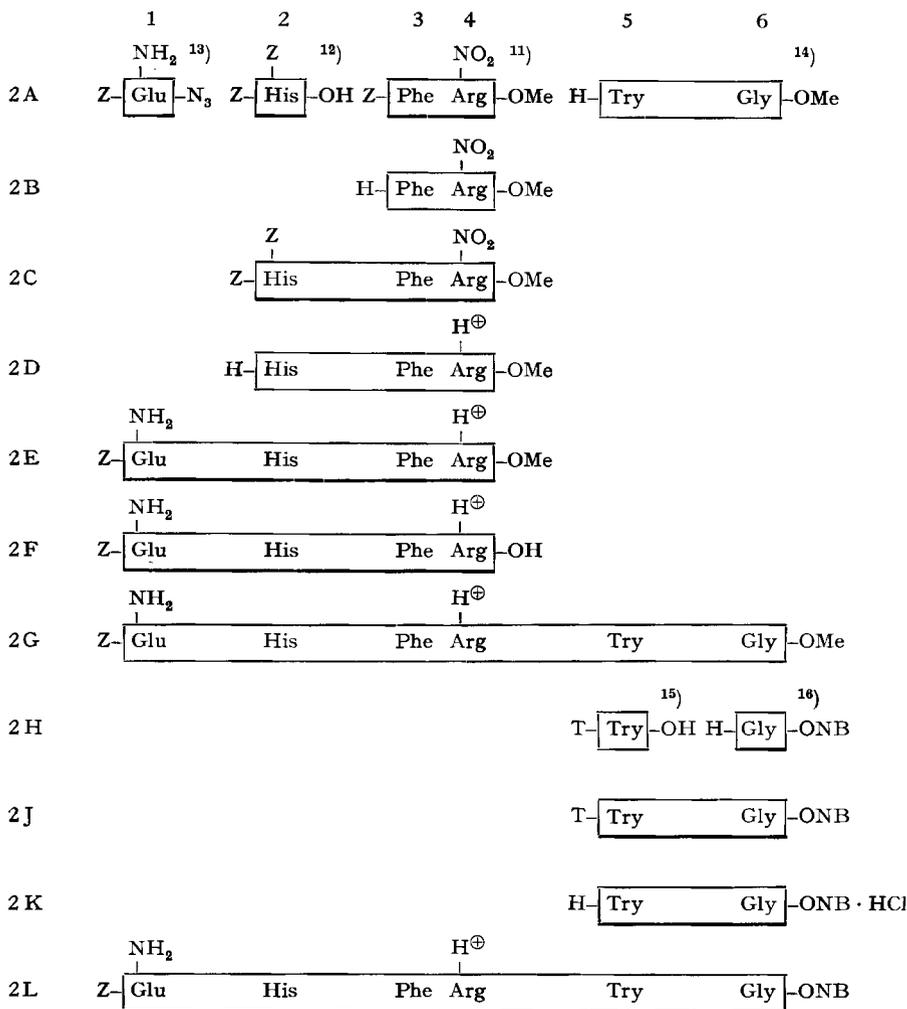
Der Dipeptidester 2B 3-4 wurde mit Dicarbobenzoxy-histidin¹²⁾ 2A 2, mittels DCCI⁸⁾ in Dimethylformamid in 70% Ausbeute zum Dicarbobenzoxy-dipeptidester 2C 2-4 kondensiert. Nachfolgende Hydrierung in Methanol unter Zusatz von Salzsäure und in Gegenwart von 10-proz. Pd-Kohle-Katalysator lieferte in guter Ausbeute das papierchromatographisch einheitliche Trihydrochlorid von 2D 2-4. Die Chlorionen wurden mittels Amberlite 1R-4B gegen Acetationen ausgetauscht, und das resultierende Acetat von 2D 2-4 mit Carbobenzoxyglutaminylazid¹³⁾ in Dimethylformamid in guter Ausbeute zum 2E 1-4 gekuppelt. Die Verseifung mit 1N Natron-

¹⁰⁾ Vgl. D. T. GISH & F. H. CARPENTER, J. Amer. chem. Soc. 75, 5872 (1953).

¹²⁾ A. PATCHORNIK, A. BERGER & E. KATCHALSKI, J. Amer. chem. Soc. 79, 6416 (1957); S. AKABORI, K. OKAWA & F. SAKIYAMA, Nature 181, 772 (1958).

¹³⁾ E. SONDEHEIMER & R. W. HOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 76, 2816 (1954).

Schema 2: 1. Aufbauprinzip der geschützten Hexapeptid-Derivate IIa und IIb, verseifbar zu IIc.



Abkürzungen: Z- = Carbobenzoxy-; T- = Trityl-; -ONB = p-Nitrobenzyl-

¹¹⁾ K. HOFMANN, W. D. PECKHAM & A. RHEINER, J. Amer. chem. Soc. 78, 238 (1956).

¹⁴⁾ Durch saure kat. Hydrierung der entsprechenden Carbobenzoxy-Verbindung erhalten. Diese Verbindung wurde in der Zwischenzeit auch von K. HOFMANN *et al.*, J. Amer. chem. Soc. 80, 1486 (1958), beschrieben.

¹⁵⁾ Gleiches Verfahren wie von G. AMIARD, R. HEYMÈS & L. VELLUZ, Bull. Soc. chim. France 1955, 1464, für die Herstellung von N^α-Trityl-DL-Tryptophan angeben. N^α-Trityl-L-tryptophan-methylester, krist. Smp. 156–157° (aus Methanol); [α]_D²⁵ = +45° ± 1° (c = 1,075 in Methanol). N^α-Trityl-L-tryptophan (amorph), Smp. 110–120°; [α]_D²⁵ = +29° ± 1° (c = 1,397 in Methanol). Die Spaltung des Trityl-L-tryptophans mit Mineralsäure ergab L-Tryptophan, [α]_D = -31° ± 1° (c = 1,008 in Wasser).

¹⁶⁾ Von Dr. B. ISELIN hergestellt.

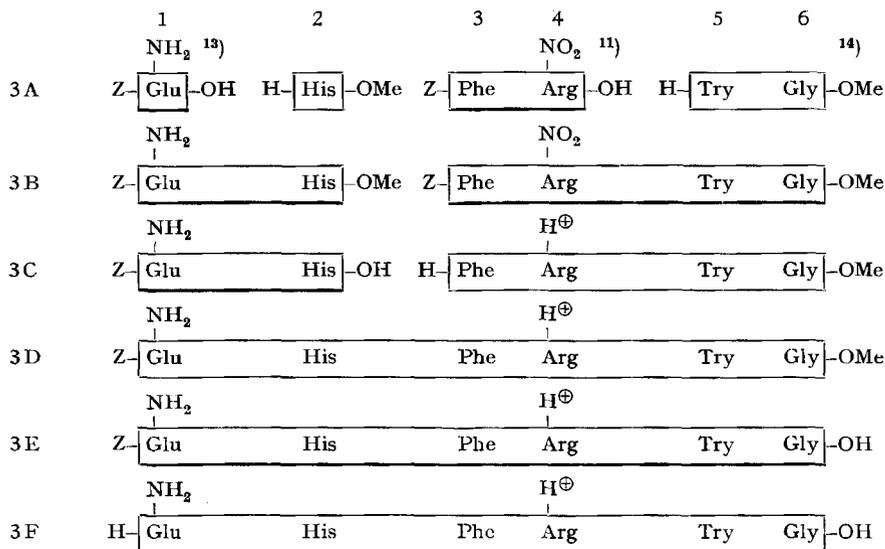
lauge in 60-proz. Äthanol ergab in 75% Ausbeute 2F 1-4, das sehr hygroskopisch ist und nach dem Stehen an der Luft Kristallwasser enthält.

2F 1-4 wurde mit 2K 5-6 im Gemisch Dimethylformamid/Diäthylphosphit mittels DCCI⁸⁾ zu 2L 1-6 kondensiert und dieses durch Gegenstromverteilung zwischen n-Butanol und 1-proz. Essigsäure über 70 Stufen verteilt (K = 1).

2F 1-4, unter den gleichen Bedingungen mit 2A 5-6 kondensiert, ergab 2G 1-6. 2L 1-6 und 2G 1-6 lassen sich mit 1N NaOH zu 3E 1-6 verseifen.

Da die Kondensationen von 2F 1-4 mit 2A 5-6 bzw. 2K 5-6 in unbefriedigender Weise verliefen, und die Reinigung der geschützten Hexapeptidester verlustreich war, wurde versucht, durch ein anderes Aufbauprinzip diese Mängel zu beheben.

Schema 3: 2. Aufbauprinzip der geschützten Hexapeptid-Derivate IIa und IIc, sowie des freien Hexapeptidamids II



Bei diesem Aufbauprinzip wurde zuerst das Tetrapeptidderivat 3B 3-6 synthetisiert und das Arginin in Form von ω-Nitroarginin bis auf diese Peptidgrösse beibehalten.

Das Carbobenzoxydipeptid¹¹⁾ 3A 3-4 wurde mit dem Dipeptidester¹⁴⁾ 3A 5-6 im Gemisch Dimethylformamid/Acetonitril mittels DCCI⁸⁾ in guter Ausbeute zum Cbo-tetrapeptidester 3B 3-6 kondensiert. Die katalytische Hydrierung mit Pd-Kohle-Katalysator in Gegenwart von HCl ergab 3C 3-6 als Dihydrochlorid. Das bei der Hydrierung der Nitrogruppe gebildete Ammoniumchlorid störte die weitere Kondensation mit 3C 1-2 mittels DCCI⁸⁾ nicht. 3D 1-6 ist mit 2G 1-6 identisch und wurde ohne Gegenstromverteilung papierchromatographisch rein erhalten. Die hydrogenolytische Spaltung von 3E 1-6 in neutralem Milieu (75-proz. Methanol) führte zum freien Hexapeptid 3F 1-6. Das Hexapeptid ist äusserst labil gegenüber basischen und schwach sauren Reagentien. Diese bewirken in den meisten Fällen Ringschluss am Glutamin zur Pyrrolidonverbindung (Ninhydrin-negativ).

Papierchromatographische Analyse, Hochspannungselektrophorese, Abbau mit Leucinaminopeptidase und quant. Aminosäurebestimmung nach MOORE, SPACKMANN & STEIN¹⁷⁾ zeigten, dass es sich um das (auch optisch) reine Hexapeptid 3F 1-6 handelt.

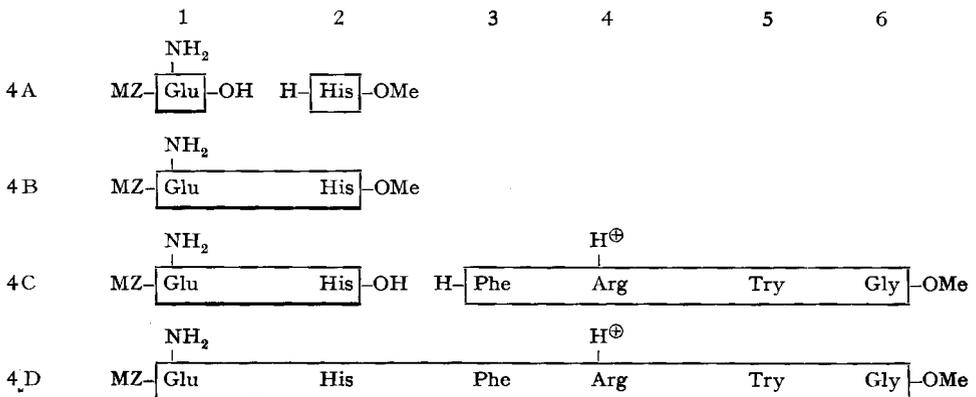
¹⁷⁾ S. MOORE, D. H. SPACKMAN & W. H. STEIN, *Analyt. Chemistry* 30, 1185, 1190 (1958); die Analysen wurden in freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. M. BRENNER und Dr. R. WEBER, Org. chemische Anstalt der Universität Basel, ausgeführt und ausgewertet; dafür möchte ich auch an dieser Stelle bestens danken.

Das Hexapeptid *3F 1-6* zeigte in der isolierten Froschhaut ungefähr die gleiche MSH-Wirkung⁹⁾ (2×10^5 E/g) wie das Heptapeptid¹⁸⁾ H · Met-Glu(NH₂)-His-Phe-Arg-Try-Gly · OH ($2,8 \times 10^5$ E/g).

M. P. DE GARILHE¹⁹⁾ konnte nach der Methode von SAFFRAN & SCHALLY²⁰⁾ zeigen, dass das Hexapeptid *3F 1-6* gegenüber dem Heptapeptid¹⁸⁾ keine nennenswerte CRF-Aktivität²¹⁾ besitzt.

Auf einem dritten Syntheseweg (4. Schema) wurde versucht, den geschützten Hexapeptidester IID mit einer farbigen Aminoschutzgruppe⁵⁾ zu erhalten, um auch diese Möglichkeit für den Aufbau von grösseren, MSH-ähnlichen Peptiden abzuklären.

Schema 4: 3. Aufbauprinzip des geschützten Hexapeptid-Derivates IID



Abkürzungen: MZ- = p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-

Dieser Weg unterscheidet sich gegenüber dem vorhergehenden nur dadurch, dass anstelle von Z-Glutamin die entsprechende MZ-Verbindung verwendet wurde, wobei ein kristallisiertes Derivat des Hexapeptidesters (*4D 1-6*) erhalten wurde.

Experimenteller Teil

Smp. sind in der Kapillare bestimmt und nicht korrigiert. Sie sind jedoch stark abhängig von den Trocknungsbedingungen der betr. Substanz. Folgende Lösungsmittel wurden bei der papierchromatographischen Analyse verwendet (Zahlen ohne weitere Angaben bedeuten Volumina in ml):

System 43 = tert. Amylalkohol: Isopropylalkohol: Wasser = 100:40:55.

System 45 = sec. Butanol: 3% Ammoniak = 100:44.

System 50 = tert. Amylalkohol: Isopropylalkohol: Triäthylamin: Veronal: Wasser = 100:40:0,8:1,8 g:50.

System 52 = n-Butanol: Essigsäure: H₂O = 100:10: ges. mit H₂O ~ 30 ml.

System 54 = sec. Butanol: Isopropylalkohol: Monochloressigsäure: Wasser = 70:10:3 g:40.

System 56 = sec. Butanol: Isopropylalkohol: 5% Veronal-Na: Wasser = 100:15:10:60.

System 59 = Methyläthylketon: Pyridin: Wasser = 60:15:25.

¹⁸⁾ H. KAPPELER & R. SCHWYZER, *Experientia* 16, 415 (1960); *Helv.* 43, 1454 (1960).

¹⁹⁾ M. P. DE GARILHE, C. GROS, J. PORATH & E. B. LINDNER, *Experientia* 16, 414 (1960); für die Ausführung möchte ich auch an dieser Stelle bestens danken.

²⁰⁾ M. SAFFRAN, A. V. SCHALLY & B. G. BENFEY, *Endocrinology* 57, 399 (1957).

²¹⁾ CRF = Corticotropin Releasing Factor, vgl. ¹⁹⁾.

Rf 43 z. B. bedeutet den Rf-Wert im System 43 auf WHATMAN-Papier Nr. 3 (dieses wurde durchwegs verwendet).

K ist der Verteilungskoeffizient (durch multiplikative Verteilung bestimmt).

Die Analysenpräparate wurden durchschnittlich 10 Std. bei 60° im Hochvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Viele Substanzen erwiesen sich als ausserordentlich hygroskopisch. Sie wurden 1 Tag bis zur Gewichtskonstanz an der Luft stehengelassen.

N-Trityl-*L*-tryptophyl-glycin-*p*-nitrobenzylester. (2J 5-6). 1,84 g (8,75 mMol) Glycin-*p*-nitrobenzylester¹⁸⁾ in 10 ml frisch destilliertem Acetonitril gibt man zur Lösung von 4,3 g (9,6 mMol) *N*^α-Trityl-tryptophan¹⁵⁾ in 10 ml Acetonitril, kühlt auf 0° und rührt mit einem Magnetrührer. Hierauf versetzt man mit der ebenfalls vorgekühlten Lösung von 2 g (9,7 mMol) *N,N'*-Dicyclohexyl-carbodiimid in 8 ml Acetonitril. Dabei scheidet sich momentan der gebildete *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff neben dem (gallertigen) *N*-Trityl-dipeptidester (2J 5-6) aus. Man lässt 4 Std. bei 0° reagieren, dampft anschliessend das Lösungsmittel im Vakuum ab und zerreibt den Verdampfungsrückstand (zur Entfernung des nicht umgesetzten Carbodimids) mit viel Petroläther. Durch wiederholtes Extrahieren des Reaktionsproduktes mit eiskaltem Methylenchlorid und Methylenchlorid-Äther-Gemisch trennt man 1,7 g *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff ab. Die Methylenchlorid-Äther-Extrakte dampft man auf ein kleines Volumen ein und fällt den Trityl-dipeptidester mit viel tiefsiedendem Petroläther aus. Durch Umkristallisieren aus 85 ml 95-proz. Äthanol erhält man 5,3 g *N*-Trityl-*L*-tryptophyl-glycin-*p*-nitrobenzylester als feine Nadeln; Smp. 169–70°. Die Mutterlauge dampft man zur Trockene ein, nimmt dem Verdampfungsrückstand in Chloroform auf und wäscht mit eiskalter Zitronensäurelösung, 1mal mit eiskalter 1*N* Salzsäure, 1*N* Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zum Schluss mit Wasser neutral. Nach dem Trocknen der Chloroformextrakte über Natriumsulfat und Verdampfen im Vakuum erhält man 1,3 g schaumiges Produkt, das aus 95-proz. Äthanol kristallisiert noch weitere 500 mg Trityldipeptidester vom Smp. 165–167 liefert. Totalausbeute 4 g (74%). Das Analysenpräparat, noch einmal aus 95-proz. Äthanol kristallisiert, schmilzt bei 170–171° [α]_D²⁰ = -10° ± 1° (*c* = 0,95 in Methanol).

C₃₈H₃₄O₈N₈ (638,69) Ber. C 73,37 H 5,37 O 12,53% Gef. C 73,05 H 5,58 O 12,82%

N-Carbobenzoxy-*L*-tryptophyl-glycin-benzylester. 1 g (3 mMol) Carbobenzoxy-*L*-tryptophan²²⁾ in 20 ml trockenem Essigester wird mit der Lösung von 660 mg (4 mMol) Glycinbenzylester²³⁾ in 5 ml Essigester vereinigt. Die Lösung wird auf 0° gekühlt und mit 650 mg (3,15 mMol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 15 Min. beginnt die Abscheidung von *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff. Man lässt 16 Std. bei 0° reagieren, filtriert vom Dicyclohexylharnstoff ab, wäscht die Essigester-Lösung im Scheidetrichter mit 1*N* Salzsäure, 1,4*N* Ammoniumhydroxyd-Lösung und mit Wasser neutral. Die über Natriumsulfat getrocknete Essigester-Lösung dampft man im Vakuum auf ein kleines Volumen ein, versetzt mit tiefsiedendem Petroläther bis zur bleibenden Trübung und lässt bei 0° stehen. Der Carbobenzoxy-dipeptid-benzylester scheidet sich dabei als gallertiges Produkt ab. Durch Zugabe von mehr Petroläther und intensives Kratzen – unter öfterem Aufwärmen auf 40° – erhält man ein fein mikrokristallines Pulver: 950 mg (66% d. Th.), Smp. 117–118°. [α]_D²⁵ = -19° ± 1° (*c* = 0,950 in Methanol).

C₂₈H₂₇O₅N₃ (485,52) Ber. C 69,26 H 5,61 N 8,86% Gef. C 69,15 H 5,75 N 9,13%

p-(*p'*-Methoxy-phenylazo)-benzylloxycarbonyl-*L*-tryptophyl-glycin-benzylester. 950 mg (2 mMol) MZ-Tryptophan⁵⁾ werden unter gelindem Erwärmen in 20 ml abs. Essigester gelöst, wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit der Lösung von 500 mg (3 mMol) Glycin-benzylester²³⁾ in 5 ml abs. Essigester vereinigt. Dazu gibt man 500 mg (2,1 mMol) 1-Cyclohexyl-3-morpholinyl-äthyl-carbodiimid²⁴⁾ in 2 ml Essigester und lässt 16 Std. bei Zimmertemperatur reagieren. Die Essigesterlösung wäscht man mit 0,5*N* Salzsäure, 1*N* Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit Wasser neutral. Die getrocknete Essigesterlösung dampft man auf ein kleines Volumen ein und fällt den MZ-Dipeptidester mit viel Petroläther aus. Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhält man 1,2 g Rohprodukt, das noch mit Ausgangsmaterial verunreinigt ist. Einmaliges Umkristallisieren aus 30 ml heissem Acetonitril ergibt 610 mg reines Produkt, Smp. 152–153°; die Aufarbei-

²²⁾ E. L. SMITH, J. biol. Chemistry 175, 39 (1948).

²³⁾ H. K. MILLER & H. WÄLSCH; J. Amer. chem. Soc. 74, 1092 (1952).

²⁴⁾ J. C. SHEEHAN & J. J. HLAVKA, J. org. Chemistry 21, 439 (1956).

tung der Mutterlauge ergibt weitere 170 mg MZ-Dipeptidester, Gesamtausbeute 770 mg (63%); Smp. 152–153°. UV.-Absorptionsspektrum in Methanol: Maxima bei 220 m μ (ϵ = 38000) und 348 m μ (ϵ = 20800).

C₃₆H₃₈O₆N₅ (619,65) Ber. C 67,90 H 5,64 N 11,60% Gef. C 67,84 H 5,37 N 11,30%

L-Tryptophyl-glycin-p-nitrobenzylester-hydrochlorid. (2K 5–6). 1,7 g (2,65 mMol) N-Trityl-tryptophyl-glycin-p-nitrobenzylester (2J 5–6) werden in 10 ml Eisessig mit 1,45 ml 2N Salzsäure 5 Min. im Wasserbad von 50° detriptyliert. Anschliessend dampft man das Lösungsmittel bei 30° im Vakuum ab und trocknet den Rückstand 2 Std. im Hochvakuum bei 45°. Das Triphenylcarbinol löst man mit viel Äther aus dem kristallinen HCl-Salz des L-Tryptophyl-glycin-p-nitrobenzylesters. Ausbeute: 1,15 g (100%); Smp. 150–153°.

C₂₀H₂₁O₅N₄Cl (432,51) Ber. N 12,95 Cl 8,19% Gef. N 12,77 Cl 8,21%

p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginin-methylester-hydrochlorid. (1B 2–3). Zu einer Lösung von 8,66 g (20 mMol) MZ-Phenylalanin²⁵⁾ in 150 ml absolutem Tetrahydrofuran gibt man bei –10° 2,8 ml (20 mMol) Triäthylamin und nach 10 Min. bei der gleichen Temperatur 2,0 ml (20 mMol) Chlorameisensäure-äthylester. Nach weiteren 15 Min. versetzt man mit der gekühlten Lösung von Arginin-methylester-hydrochlorid, hergestellt aus 5,8 g (22 mMol) Arginin-methylester-dihydrochlorid und 3,06 ml (22 mMol) Triäthylamin in 30 ml Dimethylformamid. Man lässt 30 Min. bei –10° und 1 Std. bei Zimmertemperatur reagieren, filtriert vom Triäthylamin-hydrochlorid ab (5,2 g) und verdampft das Lösungsmittel bei 50° im Vakuum. Zum Rückstand gibt man viel Äther, dekantiert ab, trocknet das ölige Produkt im Vakuum und verreibt es mit viel Wasser. Dabei erstarrt die rohe MZ-Verbindung. Die wässrige Phase wird abzentrifugiert, der Rückstand 2mal mit je 50 ml frischem Wasser durchgeknetet und lyophilisiert: 11,7 g.

Diese bringt man, in 70 ml 95-proz. Äthanol gelöst, auf eine 23 cm lange Aluminiumoxydsäule (\varnothing 5 cm) und eluiert mit viel 95-proz. Alkohol. Neben einer kleinen Vorfraktion (110 mg) kristallisieren 5,05 g MZ-Dipeptidester-hydrochlorid aus der alkoholischen Lösung aus, Smp. 185–186°. Aus der Mutterlauge gewinnt man noch weitere 3,36 g; Smp. 184–185°; Gesamtausbeute 8,41 g (66%).

Das Sulfat, Smp. 145–146°, lässt sich durch Zugabe von verd. Schwefelsäure 1:1 zu einer alkoholischen Lösung von MZ-Phenylalanyl-argininmethylester-hydrochlorid quantitativ erhalten.

C₃₁H₃₇O₆N₇ · 1/2 H₂SO₄ Ber. C 57,04 H 5,87 N 15,02 S 2,46%
(652,73) Gef. „ 57,06 „ 6,15 „ 15,26 „ 2,52%

N α -Carbobenzoxy-N(Im)-benzyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginin-methylester-carbonat. (1D 1–3). Zu 5,32 g (14 mMol) N α -Carbobenzoxy-N(Im)-benzyl-histidin⁷⁾ in 110 ml Dimethylformamid gibt man bei 15° die Lösung von 3,02 g (14,7 mMol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 5 ml Dimethylformamid. Gleichzeitig werden 7,7 g (15,4 mMol) Phenylalanyl-arginin-methylester-dihydrobromid²⁵⁾ in 20 ml Dimethylformamid mit 2,15 ml (15,4 mMol) Triäthylamin ins Monohydrobromid übergeführt, auf 0° abgekühlt und zur N α -Carbobenzoxy-N(Im)-benzyl-histidin-Lösung gegeben. Nach 20stündigem Stehen wird der Dicyclohexylharnstoff (2,27 g entspr. 74%) abfiltriert, das Filtrat mit 0,6 ml Eisessig versetzt und nach 15 Min. auf ein kleines Volumen eingedampft, nochmals vom auskristallisierten Salz befreit und dann vollständig zur Trockne eingedampft. Den amorphen Rückstand behandelt man mit viel Äther und trocknet den Rückstand anschliessend 4 Std. bei 50°.

Das pulverige Rohprodukt wird 3mal mit je 40 ml und einmal mit 30 ml 0,5N Ammoniumhydroxydlösung in der Kälte zerrieben, die überstehende Flüssigkeit jeweils gut abzentrifugiert und mit 100 ml Butanol/Chloroform 1:1 versetzt. Mit zwei mal 20 ml 2N Salzsäure stellt man kongosauer und wäscht anschliessend zuerst mit 2N Natriumhydrogencarbonat und dann mit Wasser neutral. Die getrockneten Extraktionslösungen werden im Vakuum zur Trockne eingedampft, der Verdampfungsrückstand in 135 ml 0,25N Salzsäure aufgelöst, filtriert und unter Eiskühlung mit 2N Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 7–8 gestellt.

Den abgeschiedenen Carbobenzoxy-tripeptidester (1D 1–3) nimmt man wieder im Gemisch Butanol/Chloroform 1:1 auf, wäscht mit Wasser neutral, trocknet über Natriumsulfat und dampft

²⁵⁾ Durch HBr-Spaltung von MZ-Phe-Arg-OCH₃-HCl 1B 2–3 gewonnen.

je 100 ml Äther – zur Entfernung der Verunreinigungen – und anschliessend mit je 200 ml, 100 ml und 50 ml eines Gemisches von *n*-Butanol-Chloroform 1:9. Die Chloroform-Butanol-Extrakte werden noch 2mal mit je 10 ml halbgesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und zum Schluss mit Magnesiumsulfat getrocknet. Im Vakuum dampft man das Lösungsmittel bei 40–45° ab und fällt den freien Dipeptidester mit viel Äther aus. Man filtriert durch eine feine Glasnutsche ab, wäscht mit viel Äther nach und trocknet den Rückstand bei 40° im Hochvakuum. Ausbeute: 16 g amorpher *L*-Phenylalanin-nitro-*L*-arginin-methylester (71%).

N α , *N*(*Im*)-Dicarbobenzyloxy-*L*-histidyl-*L*-phenylalanyl-nitro-*L*-arginin-methylester. (2C 2–4). 16 g (42 mMol) *L*-Phenylalanyl-nitro-*L*-arginin-methylester (2B 3–4) in 50 ml Acetonitril werden auf –10° gekühlt und mit der ebenfalls vorgekühlten Lösung von 19,2 g Dicarbobenzyloxy-*L*-histidin¹²) (42 mMol) in 140 ml Acetonitril vereinigt, wobei sich wieder ein Teil der gelösten Substanzen ausscheidet. Nach der Zugabe von 10 ml Dimethylformamid und anschliessendem kräftigem Durchschütteln tritt wieder klare Lösung ein. Hierauf trägt man die vorgekühlte Lösung von 9,7 g Dicyclohexyl-carbodiimid (47 mMol) in 45 ml Acetonitril ein und lässt bei 0° reagieren. Nach kurzer Zeit beginnt die Abscheidung von Dicyclohexylharnstoff neben Dicarbobenzyloxy-dipeptidester. Das Reaktionsgemisch wird mit 100 ml Acetonitril/Dimethylformamid 9:1 verdünnt und über Nacht bei 0° stengelassen. Das kompakte, gallertige, z. T. kristalline Reaktionsgemisch zerreibt man gut mit weiteren 100 ml Acetonitril, filtriert durch eine Glasfritte G-2 und wäscht noch 2 weitere Male mit 50 ml Acetonitril gut nach.

Zur Mutterlauge gibt man 0,5 ml Eisessig, lässt 15 Min. reagieren und verdampft anschliessend zur Trockne. Als Rückstand bleibt wenig mit Ausgangsmaterial verunreinigtes Produkt, das nicht weiter aufgearbeitet wurde. Den feuchten Nutschenrückstand extrahiert man mit total 60 ml Dimethylformamid und trennt auf diese Weise 9,3 g unlöslichen Dicyclohexylharnstoff (98%), Smp. 226–228°, ab. Die Dimethylformamidlösung dampft man bei 40° im Hochvakuum zur Trockene ein und gewinnt 26,7 g rohes 2C 2–4. Nach einmaligem Umkristallisieren aus 100 ml Methanol erhält man 23,1 g (70%) Dicarbobenzyloxy-tripeptidester. Das Analysenpräparat kristallisiert mit 1 Mol Kristallmethanol, Smp. 125–128°. $[\alpha]_D^{25} = -19^\circ \pm 1,5^\circ$ ($c = 0,9787$ in Methanol).

$C_{98}H_{47}O_{11}N_9$ (817,88) Ber. C 57,27 H 5,79 O 21,52% Gef. C 57,30 H 5,73 O 21,22%

L-Histidyl-*L*-phenylalanyl-*L*-arginin-methylester-acetat. (2D 2–4). 16,5 g (20 mMol) Dicarbobenzyloxy-*L*-histidyl-*L*-phenylalanyl-nitro-*L*-arginin-methylester werden in 300 ml abs. Methanol unter Zusatz von 4,4 Äquivalenten methanolischer Salzsäure und in Gegenwart von 4 g 10-proz. Palladiumkohle-Katalysator aushydriert. Das gebildete Kohlendioxyd wird in einer zweiten dazwischen geschalteten Hydrierente mit Kalilauge absorbiert. Nach 10 Std. sind 2515 ml Wasserstoff verbraucht (berechnet 2700 ml) und die Wasserstoffaufnahme ist beendet. Die vom Katalysator befreite Lösung dampft man bei 40° im Vakuum ein, löst den Rückstand in 20 ml Wasser und lässt die Lösung langsam durch eine Ionenaustauschersäule von 120 ml Amberlite IR-4B (Acetatform) laufen. Man wäscht mit Wasser (360 ml) so lange nach, bis die Eluate nicht mehr Ninhydrin-positiv reagieren.

Die wässrige Lösung wird bei 40° im Vakuum zur Trockene verdampft und der gut getrocknete Rückstand mit abs. Äther aus der Methanollösung ausgefällt. Ausbeute: 13,1 g amorphes Tripeptidester-monoacetat. Trocknen 15 Std. bei 80° und 10⁻² Torr. über P₂O₅.

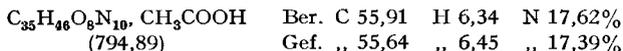
$C_{24}H_{36}O_6N_8$ (532,59) Ber. –OCH₃ 2,82 CH₃COOH 2,82% Gef. –OCH₃ 2,91 CH₃COOH 2,81%

Im Papierchromatogramm zeigt der Tripeptidester in den Systemen 56 und 59 nur *einen* Ninhydrin-, PAULY- und SAKAGUCHI-positiven Fleck, Rf-Werte: 56/0,60; 59/0,80.

N-Carbobenzyloxy-*L*-glutaminyll-*L*-histidyl-*L*-phenylalanyl-*L*-arginin-methylester-acetat. (2E 1–4). 13,1 g (22 mMol) *L*-Histidyl-*L*-phenylalanyl-*L*-arginin-methylester-acetat werden in 60 ml Dimethylformamid auf –10° gekühlt und portionenweise mit 6,1 g Carbobenzyloxy-*L*-glutaminyllazid¹³) (20 mMol) versetzt. Dabei geht das Azid sofort in Lösung. Man lässt 2 Tage bei 0° reagieren und fällt anschliessend den rohen Carbobenzyloxy-tetrapeptidester mit 1 l Essigester aus. Den gallertigen Niederschlag filtriert man ab und wäscht mit viel Essigester und Äther.

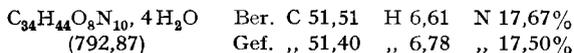
Einmaliges Kristallisieren aus Methanol/Essigester liefert 11,3 g papierchromatographisch reinen Carbobenzyloxy-tetrapeptid-methylester, Smp. 162–165° (Sintern bei 155°). Das Analysenpräparat schmilzt nach einer weiteren Kristallisation aus dem gleichen Lösungsmittelgemisch bei 169–71°. $[\alpha]_D^{25} = -22,1^\circ \pm 0,8^\circ$ ($c = 1,039$ in Eisessig); $= -39,7^\circ \pm 1,3^\circ$ ($c = 0,982$ in Metha-

mol). $K = 5,9$. (Methanol:Wasser:Chloroform:Tetrachlorkohlenstoff = 8:2:5:5); Rf-Werte: 54/0,59; 56/0,82; 59/0,85.



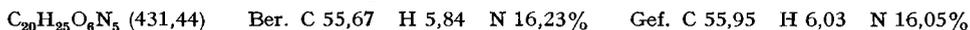
N-Carbobenzoxy-L-glutaminyll-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginin-hydrat. (2F 1-4). 2,5 g (3,1 mMol) Carbobenzoxy-tetrapeptidester-acetat 2E 1-4 werden in 80 ml 60-proz. Äthanol unter Erwärmen gelöst und bei Zimmertemperatur mit 6,5 ml 1N Natronlauge verseift. Nach 10 Min. trübt sich die Lösung und es beginnt sich gallertige Substanz abzuscheiden. Das pH beträgt während der 60minütigen Verseifung 11,5. Die mit 6,5 ml 1N Salzsäure neutralisierte Lösung wird bei 40° zur Trockene eingedampft. Den gallertigen Rückstand nimmt man in 50 ml heissem Wasser auf, filtriert durch Watte, engt auf 20 ml ein und lässt 16 Std. bei 0° stehen. Die gallertige Ausfällung wird durch eine Glasfritte G-2 filtriert, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxyd im Vakuum getrocknet. Ausbeute 1,65 g (75%). Smp. 167-169°.

Das Analysenpräparat, aus Wasser umkristallisiert, zeigt nach dem Trocknen im Hochvakuum und anschliessendem Stehenlassen an der Luft den Gehalt von 4 Kristallwasser, Smp. 159-160°. $K = 0,16$ (n-Butanol: 1% AcOH 1:1); $[\alpha]_D^{25} = -33,6 \pm 1,3^\circ$ ($c = 0,923$ in 1N Salzsäure). Rf-Werte: 43/0,47; 54/0,60; 56/0,65.



Eine Probe des reinen 2F 1-4, mit 2N Bromwasserstoff in Eisessig decarbobenzoxyliert, lässt sich mit Leucinaminopeptidase unter den Standardbedingungen quantitativ in die 4 Aminosäuren aufspalten.

N-Carbobenzoxy-L-glutaminyll-L-histidin-methylester. (3B 1-2). - a) Mit Dicyclohexylcarbodiimid. 15,1 g (54 mMol) Carbobenzoxy-L-glutamin¹⁹ werden im Gemisch von 18 ml Dimethylformamid und 81 ml Acetonitril gelöst, auf 0° gekühlt und mit der ebenfalls vorgekühlten Lösung von 9,81 g Histidin-methylester (58 mMol) in 9 ml Dimethylformamid und 36 ml Acetonitril versetzt. Dabei scheidet sich wieder ein Teil der gelösten Substanz ab. Durch Zugabe von weiteren 20 ml Dimethylformamid erhält man eine klare Lösung. Dazu gibt man 12,2 g (59 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 13 ml Dimethylformamid und lässt 16 Std. bei 0° reagieren. Dabei scheidet sich der Carbobenzoxy-dipeptidester neben dem Harnstoff als gallertiger Niederschlag ab. Die gallertige, z. T. kristalline Abscheidung wird abfiltriert, gut mit Acetonitril gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Gemisch von Carbobenzoxy-dipeptidester und Dicyclohexylharnstoff schlämmt man in 35 ml 2N Salzsäure auf, nutschts vom unlöslichen Harnstoff ab und wäscht noch mit 11 ml 2N Salzsäure nach. Die salzsaure Lösung wird mit der berechneten Menge 1N Natronlauge neutralisiert; dabei scheidet sich der Carbobenzoxy-dipeptidester als dicke Gallerte aus, so dass mit weiteren 150 ml Wasser verdünnt werden muss. Das gallertige Produkt wird mit der Mutterlauge gut durchgeknetet und durch eine G-2-Glasfritte filtriert. Zur vollständigen Neutralisation vereinigt man den Filtrückstand nochmals mit der alkalisch reagierenden Mutterlauge und knetet wiederum gut durch (pH der Mutterlauge = 8). Nach dem Trocknen erhält man 14,5 g geschützten Dipeptidester (63%), Smp. 167-169°. Zur Analyse wird aus Wasser umkristallisiert, Smp. 171-174°; $[\alpha]_D^{25} = -32,4 \pm 0,6^\circ$ ($c = 1,17$ in 1N Salzsäure).



Aus der Mutterlauge lassen sich noch weitere 2,4 g papierchromatographisch reiner Carbobenzoxy-dipeptidester, Smp. 158°, gewinnen, Rf 56 = 0,85. Die Halogenprobe ist aber bei dieser Fraktion positiv.

b) Mit *N,N'*-Carbonyl-diimidazol²⁰. 140 mg (0,5 mMol) Carbobenzoxy-L-glutamin (über Phosphorpentoxyd getrocknet) werden in 1,5 ml frisch destilliertem Dimethylformamid gelöst und unter Feuchtigkeitsausschluss mit 97 mg (0,6 mMol) Carbonyl-diimidazol versetzt. Sobald die Kohlendioxydentwicklung aufgehört hat, gibt man die Lösung von 85 mg Histidin-methylester (0,5 mMol) in 1 ml Dimethylformamid dazu und lässt über Nacht bei 0° reagieren.

Der geschützte Dipeptidester wird mit viel Äther ausgefällt. Die Ausbeute beträgt nach dem

²⁰ G. W. ANDERSON & R. PAUL, J. Amer. chem. Soc. 80, 4423 (1958); H. A. STAAB, Angew. Chem. 71, 194 (1959).

Trocknen 190 mg (88%) Carbobenzoxy-L-glutaminyll-L-histidin-methylester. Smp. 170–173° (Zers.); $[\alpha]_D^{25} = -32,2^\circ \pm 1,1^\circ$ ($c = 1,025$ in 1N Salzsäure).

N-Carbobenzoxy-L-glutaminyll-L-histidin. (3C 1–2). 5,9 g Carbobenzoxy-L-glutaminyll-L-histidin-methylester werden in einem Gemisch von 42 ml Methanol und 28 ml Wasser unter Erwärmen gelöst, wieder auf Raumtemperatur gekühlt und mit 35,5 ml 0,45N Bariumhydroxydlösung versetzt. Nach 5 Min. beginnt sich das Bariumsalz als dicker weisser Niederschlag abzuschleiden. Man verdünnt mit weiteren 140 ml Wasser, rührt mit einem Magnetrührer und lässt total 45 Min. verseifen. Mit der berechneten Menge 1N Schwefelsäure (15 ml) stellt man die Lösung neutral, filtriert vom Bariumsulfat ab und dampft die Lösung zur Trockne ein. Den glasigen Rückstand nimmt man in wenig Dimethylformamid auf, filtriert die Lösung nochmals durch eine Glasfritte G-4 und fällt hierauf das Carbobenzoxydipeptid mit viel Essigester aus. Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhält man 5,72 g amorphes, papierchromatographisch reines Carbobenzoxydipeptid. Kristallisation aus Methanol ergibt 5,1 g Carbobenzoxy-L-glutaminyll-L-histidin, Smp. 196–197° (Smp. unverändert bei wiederholter Kristallisation aus 95-proz. Äthanol). $[\alpha]_D^{25} = -21,4^\circ \pm 0,3^\circ$ ($c = 5,154$ in 1N Salzsäure). $K = 4,6$ (Methanol:Wasser:Tetrachlorkohlenstoff:Chloroform = 8:2:5:5); Rf-Werte: 54/0,75; 56/0,65.

$C_{19}H_{23}O_6N_5$ (417,41) Ber. C 54,67 H 5,55 N 16,78% Gef. C 54,43 H 5,51 N 16,64%

p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-L-glutamin (MZ-L-Glutamin). (4A 1). 11,7 g (51 mMol) L-Glutamin-hydrobromid²⁷⁾ werden in 75 ml Wasser gelöst, mit 200 ml Aceton verdünnt und in die Lösung 5 g Magnesiumoxyd (20% Überschuss) eingetragen. Anschliessend gibt man bei 0° 17 g *p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonylchlorid* (56 mMol) während 1 Std. in kleinen Portionen dazu, verdünnt mit 200 ml Wasser und rührt weitere 90 Min. bei Zimmertemperatur. Das Reaktionsgemisch stellt man mit 2N Salzsäure kongosauer, lässt 2 Std. bei Zimmertemperatur stehen, zentrifugiert den gallertigen Rückstand ab und trocknet ihn bei 50° im Vakuum. Rohprodukt aus 500 ml 95-proz. Methanol kristallisiert: 13,48 g, Smp. 183–184°. Aus der Mutterlauge lassen sich noch weitere 2,56 g, Smp. 183–184° isolieren. Gesamtausbeute 16,04 g (76,3%). Das Ultraviolett-Spektrum zeigt λ_{max} 237 m μ ($\epsilon = 13100$) und λ_{max} 349 m μ ($\epsilon = 26000$).

$C_{20}H_{22}O_6N_4$ Ber. C 57,96 H 5,35 N 13,52 – OCH₃ 3,62%
(414,41) Gef. „ 57,98 „ 5,64 „ 13,50 „ 3,51%

p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-histidin-methylester. (4B 1–2). 2,86 g MZ-Glutamin (6,9 mMol) löst man in 10 ml Dimethylformamid und gibt die Lösung von 1,3 g L-Histidin-methylester (7,8 mMol) in 15 ml Dimethylformamid dazu, kühlt auf 0° ab und versetzt mit 1,6 g (7,8 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 3 ml Dimethylformamid. Man lässt über Nacht bei 0° reagieren, filtriert vom Harnstoff ab, zersetzt das nicht umgesetzte Carbodiimid mit 3 Tropfen Eisessig und dampft das Lösungsmittel im Vakuum zur Trockne ein. Den Rückstand zerreibt man mit viel Essigester und lässt 2 Tage bei 0° stehen, filtriert und trocknet das orangefarbene Produkt bei 40° im Vakuum. Ausbeute 2,8 g. Zur Reinigung löst man 2,5 g Rohprodukt in 10 ml mit Wasser gesättigtem sek. Butanol und filtriert durch eine Aluminiumoxydsäule. Eluat: 2,3 g reiner MZ-Dipeptidester 4B 1–2; das nicht umgesetzte MZ-L-Glutamin bleibt am Anfang der Aluminiumoxyd-Säule haften. Krist. aus 90-proz. Äthanol; Smp. 167–169°. Das Analysenpräparat schmilzt nach einer weiteren Kristallisation aus dem gleichen Lösungsmittel bei 168–169°.

Das Ultraviolett-Spektrum zeigt: λ_{max} 237 m μ ($\epsilon = 12700$), λ_{max} 348 m μ ($\epsilon = 21200$) und λ_{max} 435 m μ ($\epsilon = 2000$).

$C_{27}H_{31}O_7N_7$ (565,60) Ber. C 57,34 H 5,52 N 17,34% Gef. C 57,13 H 5,67 N 17,23%

p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-histidin. (4B 1–2). 1,13 g (2 mMol) MZ-Dipeptidester 4B 1–2 löst man in 30 ml 60-proz. Dioxan und verseift während 60 Min. mit 2,4 ml 1N Natronlauge. Unter Kühlung gibt man 30 ml 10-proz. Essigsäure zu und dampft das Lösungsmittel im Vakuum ab. Den gallertigen Rückstand trocknet man bei 50° im Vakuum und verreibt ihn mit 100 ml Wasser. Durch Zentrifugieren trennt man ihn von der Mutterlauge ab, wäscht ihn noch gut mit Wasser nach und lyophilisiert: 750 mg (68%). Zur Entfernung anhaftender Verunreinigungen wäscht man das MZ-Dipeptid mit 50-proz. Methanol und zum Schluss

²⁷⁾ Durch Decarbobenzoxylierung der entsprechenden Carbobenzoxyverbindung gewonnen.

mit viel Äther. Es bleiben 670 mg, Smp. 207–208°. Das Analysenpräparat schmilzt nach zweimaligem Kristallisieren aus 75-proz. Dioxan bei 214–215°.

$C_{26}H_{40}O_7N_7$ (551,57) Ber. C 56,62 H 5,30 N 17,77% Gef. C 56,38 H 5,41 N 17,55%

N-Carbobenzoxy-*L*-phenylalanyl-nitro-*L*-arginyl-*L*-tryptophyl-glycin-methylester. (3B 3–6). 8 g (16 mMol) Carbobenzoxy-*L*-phenylalanyl-nitro-*L*-arginin¹¹) werden im Gemisch von 8 ml Dimethylformamid und 45 ml Acetonitril unter Erwärmen gelöst, dann auf 0° gekühlt und mit der vorgekühlten Lösung von 5,71 g (20 mMol) *L*-Tryptophyl-glycin-methylester¹⁴) in 4,5 ml Dimethylformamid und 18 ml Acetonitril versetzt. Man verdünnt mit 45 ml Acetonitril und rührt während 15 Min. weiter. Bei 0° werden 4,1 g (20 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 9 ml Acetonitril eingetragen und 24 Std. bei dieser Temperatur stehengelassen. Der abgeschiedene Harnstoff (3,22 g) wird abfiltriert, die Lösung mit 0,5 ml Eisessig versetzt und nach 15 Min. zur Trockene verdampft. Den öligen Rückstand löst man in Essigester, filtriert vom abgeschiedenen Harnstoff ab und wäscht die organischen Phasen 3mal mit 1N Salzsäure, 2mal mit Wasser, dann 3mal mit 1N Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zum Schluss mit Wasser neutral. Beim Waschen mit Natriumhydrogencarbonat scheiden sich 1,45 g gallertiges Material ab. Der Schmelzpunkt ist identisch mit demjenigen des Carbobenzoxy-tetrapeptidesters 3B 3–6.

Die Essigesterphasen werden über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne verdampft. Nach einmaligem Umkristallisieren aus viel Essigester erhält man 7,97 g geschützten Tetrapeptidester, Smp. 126–130°. Totalausbeute 9,42 g (78%). Das Analysenpräparat schmilzt nach einer weiteren Kristallisation aus Essigester bei 130–133°. $[\alpha]_D^{25} = -18,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,336$ in Methanol). $K = 1,2$ (Methanol: Wasser: Tetrachlorkohlenstoff: Chloroform = 8:2:5:5).

$C_{37}H_{49}O_9N_9$ (757,82) Ber. C 58,64 H 5,72 N 16,64% Gef. C 58,57 H 6,00 N 16,45%

Der Carbobenzoxy-tetrapeptidester, aus verschiedenen Lösungsmitteln kristallisiert, zeigt verschiedene Smp.; aus Methanol Smp. 136–140°.

L-Phenylalanyl-*L*-arginyl-*L*-tryptophyl-glycin-methylester-dihydrochlorid. (3C 3–6). 7 g (9,2 mMol Carbobenzoxy-tetrapeptidester 3B 3–6) werden in 180 ml Äthanol unter Zusatz von 5 Äq. methanolischer Salzsäure und in Gegenwart von 2 g 10-proz. Palladiumkohle-Katalysator bis zur Sättigung hydriert. Das gebildete Kohlendioxyd wird in einer zweiten dazwischen geschalteten Hydrierente mit Kalialauge absorbiert. Nach 12 Std. ist die Wasserstoffaufnahme beendet. Total werden 997 ml Wasserstoff verbraucht (ber. 1035 ml). Man filtriert vom Katalysator ab und dampft zur Trockne ein. Den Verdampfungsrückstand nimmt man in 15 ml absolutem Methanol auf und fällt das Produkt wieder mit viel abs. Äther aus: 6,68 g rohes Dihydrochlorid 3C 3–6, Rf-Werte: 54/0,65; 50/0,80.

Das Produkt enthält noch Ammoniumchlorid, ist aber genügend rein und wird direkt zur Umsetzung zum Carbobenzoxy-hexapeptidester 3D 1–6 verwendet.

N-Carbobenzoxy-*L*-glutaminyl-*L*-histidyl-*L*-phenylalanyl-*L*-arginyl-*L*-tryptophyl-glycin-nitrobenzylester, HCl, 2H₂O. (2L 1–6). 2,0 g (2,5 mMol) Carbobenzoxy-*L*-glutaminyl-*L*-histidyl-*L*-phenylalanyl-*L*-arginin, 4H₂O (2F 1–4) werden unter Erhitzen in 45 ml Dimethylformamid gelöst, wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit 1,93 g (4,5 mMol) *L*-Tryptophyl-glycin-nitrobenzylester-hydrochlorid (2K 5–6) versetzt. Das Gemisch rührt man mit einem Magnetrührer während 50 Min.; dabei löst sich der grösste Teil der Suspension. Anschliessend kühlt man im Eisbad auf 0° ab, gibt die vorgekühlte Lösung von 620 mg Dicyclohexyl-carbodiimid (3 mMol) in 5 ml Dimethylformamid zu und lässt 3 Tage bei 0° reagieren. Die Reaktionslösung befreit man dann vom Harnstoff (370 mg; 66%), versetzt mit 3 Tropfen Eisessig und dampft im Hochvakuum auf ein kleines Volumen ein. Das rohe Reaktionsprodukt fällt man mit viel Essigester aus, filtriert und trocknet es im Hochvakuum über Phosphorpenoxyd. Rohausbeute 3,1 g. Zur Abtrennung der Ausgangsstoffe verteilt man das Rohprodukt zwischen *n*-Butanol und 1-proz. Essigsäure über 30 Stufen. Die Fraktionen 0–8 (730 mg) sind zur Hauptsache Carbobenzoxy-tetrapeptid, während sich in den Elementen 10–26 neben dem Carbobenzoxy-hexapeptid-nitrobenzylester auch noch *L*-Tryptophyl-glycin-nitrobenzylester befindet. Zur weiteren Reinigung werden die Fraktionen 10–26 nochmals zwischen *n*-Butanol und 1-proz. Essigsäure über 40 Stufen verteilt und die Fraktionen 16–19, 20–23, 24–27 und 28–31 vereinigt. Die Fraktionen 12–15 enthalten noch wenig Carbobenzoxy-tetrapeptid, während die übrigen im Papierchromatogramm nur Carbobenzoxy-hexapeptid-nitrobenzylester anzeigen.

Die Ausbeute der vereinigten Fraktionen ist 1,4 g (50%). *K* der analytisch reinen Verbindung ist 1 (n-BuOH/1-proz. AcOH), $[\alpha]_D^{25} = -27,3^\circ \pm 1,4^\circ$ ($c = 1,064$ in Dimethylformamid). Rf-Werte 43/0,48; 54/0,70; 56/0,75. Das Analysenpräparat wird 10 Std. bei 80° im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet und anschliessend 1 Tag an der Luft stehengelassen.

$C_{54}H_{62}O_{12}N_{14}$, HCl, 2 H ₂ O (1171,70)	Ber. C 55,30 H 5,76 N 16,74 Cl 3,03% Gef. „ 55,02 „ 5,80 „ 16,72 „ 2,94%
---	---

N-Carbobenzoxy-L-glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-hydrochlorid. (2G 1–6, 3D 1–6). a) *Aus Cbo-Glu(NH₂)-His-Phe-Arg · OH + H · Try-Gly · OCH₃ · HCl*. 5 g (6,25 mMol) Carbobenzoxy-tetrapeptid 2F 1–4 werden in einem Gemisch von 70 ml Dimethylformamid und 15 ml Diäthylphosphit unter Erwärmen gelöst; die Lösung kühlt man wieder auf Zimmertemperatur ab und versetzt hierauf mit 3,7 g (12 mMol) L-Tryptophyl-glycin-methylester-hydrochlorid¹⁴). Anschliessend rührt man 3 Std. bei Zimmertemperatur und lässt über Nacht bei 0° stehen. Zur gekühlten Lösung gibt man 1,85 g (9 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 10 ml Dimethylformamid und lässt 77 Std. bei 0° und 6 Std. bei Zimmertemperatur reagieren. Den abgeschiedenen Harnstoff filtriert man ab (780 mg; 56%), versetzt das Filtrat mit 0,1 ml Eisessig, dampft das Dimethylformamid auf wenige ml ein und fällt mit viel Essigester aus. Nach dem Filtrieren und Trocknen im Hochvakuum erhält man 8,3 g Gemisch von Carbobenzoxy-hexapeptidester und Ausgangsmaterial.

Das gesamte Rohprodukt wird zwischen n-Butanol und 1-proz. Essigsäure in einer CRAIG-Apparatur mit 100 ml Phasenvolumen verteilt.

Die Fraktionen 11–35 reagieren positiv auf PAULY-Reagens und 15–35 zeigen positive EHRlich-Reaktion. Die Elemente 11–14 und 15–16 enthalten zur Hauptsache Carbobenzoxy-tetrapeptid neben wenig Carbobenzoxy-hexapeptidester, während die Fraktionen 19–35 reinen geschützten Hexapeptidester enthalten.

Die Phasen der Fraktionen 19–35 werden vereinigt, zur Trockne eingedampft und das Produkt einmal aus Dimethylformamid-Essigester ausgefällt. Die Ausbeute an amorphem, papierchromatographisch einheitlichem Carbobenzoxy-hexapeptidester-hydrochlorid ist 3,8 g. $[\alpha]_D^{25} = -16,4^\circ \pm 0,3^\circ$ ($c = 0,793$ in Pyridin); $[\alpha]_D^{25} = -21,8^\circ \pm 0,8^\circ$ ($c = 1,008$ in DMF). Rf-Werte: 43/0,72; 54/0,69; 56/0,85.

b) *Aus Cbo-Glu(NH₂)-His · OH + H · Phe-Arg-Try-Gly-OCH₃, HCl*. 680 mg (0,95 mMol) L-Phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-dihydrochlorid (3C 3–6), das noch Ammoniumchlorid von der katalytischen Hydrierung des Cbo-tetrapeptidesters 2F 1–4 enthält, löst man in 4,5 ml Dimethylformamid, kühlt im Eisbad und gibt 0,139 ml Triäthylamin (1 mMol) dazu. Nach 20 Min. beginnt die Abscheidung von Triäthylamin-hydrochlorid. Man lässt 50 Min. reagieren, filtriert anschliessend vom abgeschiedenen Salz ab und gibt die auf 0° gekühlte Lösung von 630 mg (1,5 mMol) Carbobenzoxy-L-glutaminyl-L-histidin (3C 1–2) in 3,5 ml Dimethylformamid zu. Nach weiteren 30 Min. versetzt man mit dem Dicyclohexyl-carbodiimid (310 mg in 1 ml Dimethylformamid = 1,5 mMol). Nach 3tägigem Stehen bei +3° filtriert man vom Harnstoff ab (260 mg) und fällt anschliessend mit viel Essigester aus.

Man erhält 1,1 g noch mit Ausgangsmaterial verunreinigtes Produkt. Zur Entfernung der Ausgangsmaterialien behandelt man das Rohprodukt 1mal mit 5 ml, 4mal mit 2 ml 1N Salzsäure und zum Schluss 2mal mit 2 ml Wasser. Das über Phosphorpentoxyd getrocknete Produkt wiegt 600 mg entspr. 60% der Theorie. Der Carbobenzoxy-hexapeptidester fällt dabei als amorphes Dihydrochlorid an und ist leicht rosa gefärbt. Zur Analyse fällt man noch einmal aus Dimethylformamid/Essigester um, trocknet 10 Std. bei 80° im Hochvakuum über P₂O₅ und lässt das Präparat 1 Tag an der Luft stehen. $[\alpha]_D^{25} = -15,5^\circ \pm 1,7^\circ$ ($c = 0,961$ in Pyridin); $[\alpha]_D^{25} = -22,0^\circ \pm 0,9^\circ$ ($c = 0,996$ in DMF).

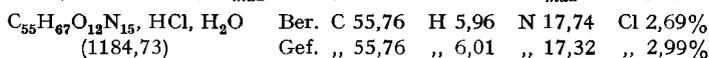
$C_{48}H_{58}O_{10}N_{13}$, 2 HCl, 3 H ₂ O (1105,08)	Ber. C 52,17 H 6,11 N 16,48 Cl 6,42% Gef. „ 51,96 „ 5,79 „ 16,23 „ 6,01%
---	---

In den Systemen 43, 54 und 56 zeigt die Verbindung nur einen PAULY- und EHRlich-positiven Fleck und die gleichen Rf-Werte wie das unter a) beschriebene Produkt. In diesem Fall ist eine Verteilung nach CRAIG nicht notwendig.

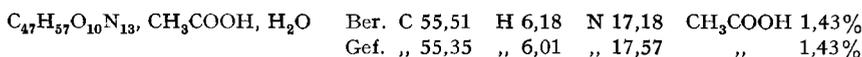
p-(*p*'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-hydrochlorid. (4D 1–6). 470 mg (0,85 mMol) *p*-(*p*'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-histidin (4C 1–2) in 14 ml Dimethylformamid werden mit

der Lösung von 510 mg (0,84 mMol) L-Phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylesterhydrochlorid (3C 3-6) in 2 ml Dimethylformamid vereinigt, auf 0° gekühlt und mit 210 mg (1 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 2 ml Dimethylformamid versetzt. Nach 3tägigem Stehen bei 0° lässt man Zimmertemperatur annehmen, filtriert vom Harnstoff ab, zersetzt das nicht umgesetzte Carbodiimid mit 0,1 ml Eisessig und dampft auf ein kleines Flüssigkeitsvolumen ein. Mit viel Essigester fällt man das Rohprodukt aus: 760 mg.

Zur Reinigung löst man 500 mg Substanz in 10 ml 75-proz. Dioxan und filtriert durch eine Aluminiumoxydsäule (8 g). Am oberen Ende bleibt die Verunreinigung als orange-rote Zone haften. Die eluierten 420 mg werden zwischen n-Butanol und 1-proz. Essigsäure über 30 Stufen verteilt. Die Hauptmenge des MZ-Hexapeptidesters befindet sich in den Elementen 8-19 ($K = 0,88$). Die Fraktionen 10-18 werden vereinigt und nochmals zwischen sek. Butanol und 1-proz. Essigsäure über 40 Stufen verteilt. Die Fraktionen 11-19 werden aus 95-proz. Methanol umkristallisiert. Man erhält 180 mg p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylesterhydrochlorid, Smp. 202-203°. Aus 95-proz. Äthanol umkristallisiert, Smp. 204-205°. UV.-Absorptionsspektrum: λ_{max} 284 m μ ($\epsilon = 9800$), λ_{max} 290 m μ ($\epsilon = 10000$), λ_{max} 349 m μ ($\epsilon = 21200$) und λ_{max} 435 m μ ($\epsilon = 2000$).



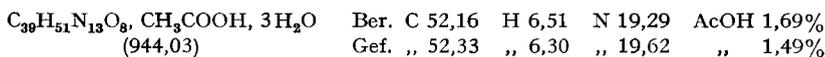
N-Carbobenzoxy-L-glutaminyll-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-acetat. (3E 1-6). 450 mg (0,39 mMol) Carbobenzoxy-hexapeptid-nitrobenzylester werden in 10 ml 50-proz. Dioxan gelöst und 45 Min. mit 0,5N Natronlauge verseift. Die Natronlauge gibt man portionenweise zu, so dass das pH der Lösung immer zwischen 10,5 und 11 ist. Nach der Zugabe der ersten 3 ml 0,5N Natronlauge beginnt die Abscheidung von gallertiger Substanz. Zur Verdünnung der Lösung werden nochmals 10 ml 50-proz. Dioxan zugegeben. Es werden total 7 ml 0,5N Natronlauge verbraucht. Zum Schluss verdünnt man mit Wasser, neutralisiert mit 1N Salzsäure und stellt die Lösung mit Eisessig auf pH 5,5. Man filtriert das gallertige Produkt ab, wäscht mit eiskaltem Wasser nach und trocknet den Filtrerrückstand im Vakuum über Kaliumhydroxyd und Phosphorpenoxyd. Das trockene Produkt wiegt 200 mg, Smp. (199°) 203-205°. Zur Analyse wird noch einmal aus 50-proz. Methanol umkristallisiert, Smp. 206°. $[\alpha]_D^{25} = -15,9^\circ \pm 1,1^\circ$ ($c = 0,9444$ in AcOH).



Aus der Mutterlauge lassen sich noch weitere 150 mg Carbobenzoxy-hexapeptid isolieren, Smp. 155-163°. Diese Fraktion liegt aber, im Gegensatz zur Fraktion vom Smp. 203-205°, nur teilweise als Acetat vor, was eindeutig aus den Acetylbestimmungen hervorgeht.

Im Papierchromatogramm zeigen die beiden Fraktionen die gleichen Rf-Werte: 43/0,45; 54/0,55; 56/0,62.

L-Glutaminyll-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-acetat. (3F 1-6). 1,23 g (1,2 mMol) 3E 1-6²⁸⁾ werden in 150 ml 75-proz. Methanol in Gegenwart von 400 mg Palladiumkohle-Katalysator hydrogenolytisch gespalten. Die vom Katalysator befreite Lösung wird im Vakuum bei 40° zur Trockene eingedampft. Den Verdampfungsrückstand (900 mg) löst man in 3,5 ml Wasser unter Zusatz von 0,5 ml 1N HCl und lässt die Lösung durch eine Säule von 15 ml Amberlite IR-4B (Acetatform) laufen. Anschliessend eluiert man mit 30 ml Wasser und lyophilisiert. (Ausbeute: 700 mg). Zur Analyse löst man eine Probe nochmals in viel Wasser, filtriert durch Celit und lyophilisiert. Anschliessend wird noch 8 Std. bei 60° über P₂O₅ im Vakuum getrocknet und dann 1 Tag an der Luft äquilibriert. $[\alpha]_D^{25} = -23,6^\circ \pm 1,8^\circ$ ($c = 0,466$ in 1N HCl), Rf-Werte: 45/0,47; 43/0,35.



Die quant. Aminosäurebestimmung¹⁷⁾ (Totalhydrolyse mit konz. HCl) ergibt die folgende Aminosäurezusammensetzung: Glu¹, His¹, Phe¹, Arg¹, Gly¹, NH₃^{1,2} (Tryptophan wird bei der Hydrolyse zerstört).

²⁸⁾ Rohprodukt.

Mit Leucinaminopeptidase wird das Hexapeptid vollständig in die Aminosäuren gespalten.

Die Hochspannungselektrophorese bei 3000 Volt, pH 1,9, ergibt nur 1 Band, das sich sowohl mit PAULY-Reagens und mit Ninhydrin als auch mit SAKAGUCHI-Reagens anfärben lässt. Der zurückgelegte Weg beträgt nach 60 Min. 15 cm.

Herrn Prof. Dr. R. SCHWYZER möchte ich für seine Anregungen und Unterstützung während dieser Arbeit recht herzlich danken, ebenso meinen Kollegen für anregende Diskussionen. Herrn H. R. KELLER danke ich für seine wertvolle Mitarbeit, Herrn Dr. W. PADOWETZ für die analytischen Daten und Herrn E. VON ARX für die Ausführung der Papierchromatographie.

SUMMARY

The synthesis of the pentapeptide derivative N^α-Cbo-N(Im)-Bzl-His-Phe-Arg-Try-Gly-ONB and the synthesis of the hexapeptide H · Glu(NH₂)-His-Phe-Arg-Try-Gly · OH (acetate) comprising the sequence of six amino acid residues common to ACTH and α- and β-MSH along various pathways is described in detail. This compound shows a very weak MSH-activity (2×10^5 U/g)³.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung.

60. Die Alkaloide von *Buphane disticha* (L.f.) HERB.

2. Mitteilung über Amaryllidaceen-Alkaloide¹⁾

von H. Hauth und D. Stauffacher

(18. I. 61)

Buphane disticha (*Buphane toxicaria* (L.f.) HERB., *Haemanthus toxicarius* THUMB.), auch Cape poison bulb oder Gifbol genannt, gilt als einer der giftigsten Vertreter aus der Familie der Amaryllidaceen. Die Eingeborenen Südafrikas verwenden die Zwiebeln zur Herstellung von Pfeilgift, das besonders zur Jagd von Wild dient, das für Nahrungszwecke bestimmt ist.

An früheren Beobachtungen über die biologische Wirkung der Alkaloide aus *Buphane disticha* finden sich in der Literatur die folgenden Angaben: JURITZ²⁾ (1903–1911): stark toxisch für Mäuse, Brucin-ähnliche Wirkung. TUTIN³⁾ (1911): Hyoscin-ähnliche Wirkung, Krampfgift. LEWIN⁴⁾ (1912): Lähmung des Atemzentrums, narkotische Wirkung ähnlich Atropin, am Menschen: Mydriase, lachrymator. Wirkung.

Von der besonders in Afrika verbreiteten Amaryllidaceen-Gattung *Buphane* wurden bisher sowohl *Buphane disticha* (L.f.) HERB. als auch *B. fischeri* BAKER untersucht. Während aus *B. fischeri* die Alkaloide *Lycorin*, *Buphanamin*, *Buphanidrin*, *Buphanisin*, *Ambellin* und *Crinin* (auch *Crinidin* genannt) isoliert werden

¹⁾ 1. Mitteilung über Amaryllidaceen-Alkaloide: J. RENZ, D. STAUFFACHER & E. SEEBECK, Helv. 38, 1209 (1955).

²⁾ C. F. JURITZ, South African J. Sci. 8, 92 (1911).

³⁾ F. TUTIN, J. chem. Soc. 99, 1240 (1911); Arch. exp. Path. Pharm. 69, 314 (1912).

⁴⁾ L. LEWIN, Arch. exp. Path. Pharm. 68, 333 (1912).