

Das Hellebrigenin aus Präp. b+c zeigte Smp. 159–168° (tief schmelzende Form),  $[\alpha]_D^{25} = +17,2^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,1$  in An). Nach Mischprobe, Pch und Farbreaktionen identisch mit authentischem Material. Das daraus bereitete O-Acetylderivat gab aus An-Ae farblose, zu Büscheln vereinigte Blättchen, Smp. 220–240°. Mischprobe, Pch und Farbreaktionen wie oben.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Das getrocknete Paratoidensekret von *Bufo regularis* REUSS aus Erythrea und aus SW-Afrika wurde auf Bufadienolide untersucht, wobei nur bei der letztgenannten Probe sicher bewiesen werden konnte, dass sie von *B. regularis* stammt. Hauptgenin war in beiden Fällen Hellebrigenin (3,5 bzw. 0,5 %). Daneben wurde viel Bufotalinin (1 bzw. 0,5 %) und Resibufogenin (1 bzw. 0,3 %) gefunden. Das Material aus Erythrea gab jeweils die höheren Ausbeuten. Die in kleinen Mengen daneben papierchromatographisch nachgewiesenen Stoffe waren in den zwei Proben teilweise verschieden.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

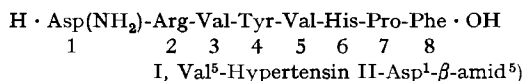
### 75. Die sterische Einheitlichkeit des synthetischen Val<sup>5</sup>-Hypertensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amids<sup>1)</sup>

von B. Riniker und R. Schwyzer

(18. II. 61)

Vor etwas mehr als zwei Jahren wurde die erste Synthese der im Titel erwähnten Verbindung I aus unserem Arbeitskreise veröffentlicht<sup>2)</sup>. Vorläufige Versuche mit enzymatischen Methoden hatten ergeben, dass das Octapeptid weitgehend optisch einheitlich ist, d. h. alle Aminosäurereste in der natürlichen L-Konfiguration enthält<sup>3)</sup>.

Inzwischen hatten wir Gelegenheit, die Verbindung nach derselben Vorschrift in grösserem Maßstabe herzustellen<sup>4)</sup>. Auch in diesem Produkte liessen sich auf enzymatischem Wege keine Reste von D-Aminosäuren nachweisen.



<sup>1)</sup> Diese Arbeit ist u. a. auch als Studie im Rahmen des Programmes der Kommission für Proteine (Vorsitzender: Prof. Dr. K. BAILEY, Cambridge) der Biochemischen Sektion der IUPAC zur Abklärung der Frage, ob sich käufliches Val<sup>5</sup>-Hypertensin II-β-amid zur Reinheitsprüfung von proteolytischen Enzymen eignet, gedacht.

<sup>2)</sup> R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* 41, 1287 (1958).

<sup>3)</sup> R. SCHWYZER, *Records of Chemical Progress* 20, 147 (1959); R. SCHWYZER & H. TURRIAN, *Vitamins and Hormones*, Vol. XVIII, 237 (1960), Academic Press Inc., New York.

<sup>4)</sup> In Zusammenarbeit mit den Herren Drs. E. TAGMANN, A. F. BURI und M. FEURER in unserer Firma. Val<sup>5</sup>-Hypertensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid ist der Wirkstoff des Präparates Hypertensin CIBA®.

<sup>5)</sup> Abgekürzte Peptidformeln im wesentlichen nach E. BRAND & J. T. EDSALL, *Ann. Rev. Biochemistry* 16, 223 (1947); gross geschriebene Symbole bedeuten die natürliche (L-)Form, klein geschriebene die unnatürliche (D-).

Der Aufbau des Octapeptides aus vier Dipeptidderivaten machte jedoch die Entstehung von Diastereomeren durch partielle Racemisierung wahrscheinlich. Solche Produkte müssten Reste von D-Aminosäuren in den Stellungen 2, 4 und 6 enthalten (I), da bei der Kondensation von Peptidderivaten mit freier Carboxylgruppe die C-endständigen Aminosäurereste ihre Konfiguration besonders leicht ändern<sup>6)</sup>.

Während der Synthese werden die entstandenen Diastereomeren aber offenbar im Laufe der Reinigungsoperationen auf den verschiedenen Stufen des Verfahrens entfernt. Nur in einem Falle, nämlich bei der Synthese des Hexapeptidderivates, Z·Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH<sub>3</sub><sup>7)</sup>, aus Z·Val-Tyr·OH und H·Val-His-Pro-Phe·OCH<sub>3</sub> konnten grössere Mengen (ca. 30%) des stereoisomeren Produktes, Z·Val-tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH<sub>3</sub><sup>4)</sup>, gefasst werden. Dieses ist (nach Abspaltung der Carboxy- und Methyl-ester-Gruppen) im Papierchromatogramm neben dem diastereomeren, «alles L»-Hexapeptid leicht nachweisbar. Die papierchromatographische Auftrennung höherer, diastereomerer Peptide, die sich nur in der Konfiguration an einem C-Atom unterscheiden, hielten wir bisher für eher unwahrscheinlich; in diesem Falle wird sie wohl dadurch begünstigt, dass die Isomerie am Tyrosinrest liegt. Es ist nämlich bekannt, dass sich bei Aminosäuren mit hydroxyliertem Phenylkern auf papyrographischem Wege sogar Racematspaltungen ausführen lassen<sup>8)</sup>, was auf eine besondere Affinität solcher Aminosäurereste zur Cellulose schliessen lässt.

Die Entstehung wesentlicher Mengen von Z·Val-tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH<sub>3</sub> bestätigt wiederum die besondere Neigung des Dipeptidderivates, Z·Val-Tyr·OH, zur partiellen Racemisierung, worauf wir bereits hingewiesen haben<sup>9)</sup>. Diese Neigung kommt natürlich besonders zur Auswirkung, wenn die Amidbildung infolge sterischer Hinderung der Aminokomponente wie im vorliegenden Falle ( $\beta$ -Verzweigung am H·Val- des Tetrapeptidrestes) langsam erfolgt.

Im folgenden seien unsere diesbezüglichen enzymatischen Versuche ausführlich beschrieben.

**Enzymatische Spaltung des Octapeptides.** – Zur Konstitutionsaufklärung von Ileu<sup>5</sup>-Hypertensin I und Ileu<sup>5</sup>-Hypertensin II<sup>10)</sup> sowie von Val<sup>5</sup>-Hypertensin I<sup>11)</sup> wurde der enzymatische Abbau mit Hypertensin-Umwandlungsenzym (Ileu<sup>5</sup>-Hypertensin I  $\rightarrow$  Ileu<sup>5</sup>-Hypertensin II)<sup>12)</sup>, Carboxypeptidase, Chymotrypsin, Trypsin und Leucinaminopeptidase herbeigezogen<sup>13)</sup>14). Für unsere Zwecke haben wir neben den

<sup>6)</sup> N. A. SMART, G. T. YOUNG & M. W. WILLIAMS, J. chem. Soc. 1960, 3902; vgl. auch <sup>8)</sup>.

<sup>7)</sup> Z- bedeutet Carbobenzoxy-.

<sup>8)</sup> C. E. DALGLIESH, J. chem. Soc. 1952, 3940.

<sup>9)</sup> B. ISELIN & R. SCHWYZER, Helv. 43, 1760 (1960).

<sup>10)</sup> L. T. SKEGGS, W. H. MARSH, J. R. KAHN & N. P. SHUMWAY, J. exptl. Medicine 100, 363 (1954); 102, 435 (1955); L. T. SKEGGS, J. R. KAHN & N. P. SHUMWAY, *ibid.* 103, 301 (1956); L. T. SKEGGS, K. LENTZ, J. R. KAHN, N. P. SHUMWAY & K. R. WOODS, *ibid.* 104, 193 (1956); K. E. LENTZ, L. T. SKEGGS, K. R. WOODS, J. R. KAHN & N. P. SHUMWAY, *ibid.* 104, 183 (1956).

<sup>11)</sup> D. F. ELLIOTT & W. S. PEART, Nature 177, 527 (1956); Biochem. J. 65, 246 (1957).

<sup>12)</sup> L. T. SKEGGS, W. H. MARSH, J. R. KAHN & N. P. SHUMWAY, J. exptl. Medicine 99, 275 (1954).

<sup>13)</sup> Zusammenfassung bei R. SCHWYZER & H. TURRIAN, Vitamins and Hormones, Vol. XVIII, 237 (1960), Academic Press Inc., New York; vgl. auch <sup>19)</sup>.

<sup>14)</sup> Vgl. das Übersichtsreferat von H. ZUBER: «Die Verwendung enzymatischer Reaktionen für die Reinheitsprüfung und Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen», Chimia 14, 405 (1960).

letzten vier der erwähnten Enzyme noch Pepsin<sup>14)</sup> und Subtilisin<sup>14)</sup> untersucht. Die entstehenden Peptide bzw. Aminosäuren wurden mit authentischen Materialien papierchromatographisch verglichen (Tab. S. 9a gibt Auskunft über Rf-Werte und Farbreaktionen der verschiedenen Verbindungen), wobei durch Sichtvergleich semi-quantitative Auswertung möglich war. Die auf das Papier aufgetragenen Mengen Hydrolysat waren immer so gross, dass unabgebaute Produkte in Konzentrationen von 1%, bezogen auf ursprüngliches Substrat, noch hätten erkannt werden können.

Die Spaltung mit *Trypsin* erfolgte wie erwartet quantitativ zwischen den Aminosäureresten Arg<sup>2</sup> und Val<sup>3</sup>, was darauf hinweist, dass Arg<sup>2</sup> die L-Konfiguration hat und dass wahrscheinlich auch Val<sup>3</sup> in der natürlichen Form vorliegt – obwohl u. W. keine oder nur wenige systematische Untersuchungen über den Einfluss der Konfiguration auf der Aminosäureseite der zu spaltenden Peptid-Bindung vorliegen<sup>14)</sup>.

*Chymotrypsin* spaltet quantitativ die Tyr<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Bindung, was wiederum für die optische Einheitlichkeit (L) der beiden Peptidreste, insbesondere aber des Tyr<sup>4</sup> spricht.

*Pepsin* wirkt, im Gegensatz zu Trypsin und Chymotrypsin, nur sehr langsam ein, wobei die Bindung Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup> quantitativ gespalten wird (daneben werden auch andere Bindungen schwach angegriffen). Die 3-4-Bindung scheint also ebenfalls zwischen Resten von L-Aminosäuren zu liegen.

*Subtilisin* wirkt auf verschiedene Bindungen verschieden schnell ein, wobei es sich wie ein Gemisch von (allerdings sehr langsam wirkendem) Trypsin und Chymotrypsin verhält. Die Halbwertszeit der Spaltung der Tyr<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Bindung liegt in der Grössenordnung 7 Min., diejenige der Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Bindung in der Grössenordnung 20 Std. (unter den beschriebenen Bedingungen).

*Carboxypeptidase* entfernt sehr schnell und quantitativ (in ca. 2 Min.) die C-endständige Aminosäure L-Phenylalanin vom Pro<sup>7</sup>, wie dies auch bei den Naturstoffen beobachtet worden war<sup>10)11)</sup>. Dieser Befund spricht nicht nur für die L-Konfiguration des Phe<sup>8</sup>, sondern auch für die des Pro<sup>7</sup><sup>15)</sup>.

*Leucinaminopeptidase* baute nach ELLIOTT & PEART<sup>11)</sup> das natürliche Val<sup>5</sup>-Hypertensin I (Decapeptid) vollständig zu den Aminosäuren ab, was nach allgemeiner Auffassung als Beweis für die «alles L»-Konfiguration angesehen werden kann. Sehr wahrscheinlich war die verwendete Leucinaminopeptidase noch mit anderen Enzymen (Prolidase?) verunreinigt, da reine Leucinaminopeptidase eine X-Pro-Bindung (X = Rest einer L-Aminosäure) nicht zu spalten vermag<sup>14)16)</sup>. Unser Präparat<sup>17)</sup> war offenbar frei von prolidaseartigen Verunreinigungen, da nur die Aminosäurereste 1 bis 5 freigesetzt wurden, allerdings quantitativ. Das Tripeptid H·His-Pro-Phe·OH blieb unangegriffen.

<sup>15)</sup> Nach S. J. FU, S. M. BIRNBAUM & J. P. GREENSTEIN, J. Amer. chem. Soc. 76, 6054 (1954), wird Z·Ala-Phe·OH etwa 2–300mal schneller von Carboxypeptidase gespalten als Z·ala-Phe·OH.

<sup>16)</sup> E. L. SMITH, Advances Enzymol. 12, 196 (1951); E. L. SMITH & D. H. SPACKMAN, J. biol. Chemistry 212, 271 (1955).

<sup>17)</sup> Das Enzym wurde nach den Angaben von R. L. HILL, D. H. SPACKMAN, D. M. BROWN & E. L. SMITH (Biochemical Preparations, Vol. 6, 35 (1958), J. Wiley & Sons, New York) von Herrn Dr. W. RITTEL aus Schweinsnieren hergestellt. Die Vorschrift wurde bis und mit der Acetonfällung gefolgt; die Lösung enthielt 1,2 mg Protein-N pro ml und eine spezifische Aktivität von C<sub>1</sub> = 15.

Diese Versuche beweisen die L-Konfiguration für alle Aminosäurereste ausser His<sup>6</sup>. Da eine Spaltung der His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Bindung mit unseren Enzympräparaten nicht möglich war, mussten wir folgenden Weg beschreiten.

**Totalhydrolyse des Tetrapeptides H·Val-His-Pro-Phe·OH und Oxydation der Aminosäuren mit L-Aminosäureoxydase.** – Val<sup>6</sup>-Hypertensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid wurde mit Chymotrypsin abgebaut und die entstandenen Tetrapeptide, H·Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg-Val-Tyr·OH und H·Val-His-Pro-Phe·OH, durch multiplikative Verteilung voneinander getrennt. Das histidinhaltige Peptid wurde in seiner Gesamtheit isoliert und der Totalhydrolyse mit konstant siedender HCl unterworfen. Es zeigte sich, dass dabei ein Dipeptid, H·Val-His·OH, entsteht, welches, wohl infolge sterischer Hinderung der Val-Carbonylgruppe, innert 24 Std. bei 105° nur unvollständig hydrolysiert wird (dasselbe gilt für das bei der Totalhydrolyse des Octapeptides entstehende H·Val-Tyr·OH<sup>18</sup>). Vollkommen ist die Hydrolyse erst in 64 Std. bei 105° oder in 24 Std. bei 115°. Unter diesen verschärften Bedingungen tritt aber, wie an einem künstlichen Aminosäuregemisch gezeigt werden konnte, eine gewisse Racemisierung ein, die sich im besonderen Falle des Histidins auf etwa 8–10% D-Form beläuft (beim Tyrosin ist sie etwas weniger stark ausgeprägt).

Der nachfolgende Abbau mit L-Aminosäureoxydase erfolgt besonders rasch beim L-Phenylalanin, was papierchromatographisch leicht demonstriert werden kann. Et was weniger schnell wird L-Histidin abgebaut, viel langsamer das L-Valin; L-Prolin und D-Aminosäuren werden nicht angegriffen<sup>19</sup>). Aus L-Histidin entsteht Imidazolylessigsäure, die mit PAULY-Reagens sehr schön nachgewiesen werden kann.

Wie im experimentellen Teil (8c) gezeigt wird (vgl. auch Fig. 1), ist in den Hydrolysaten des Tetrapeptides nicht mehr D-Histidin enthalten als in den Kontrollen. Diese Menge ist also durch Racemisierung während der Hydrolyse entstanden und alles im Peptid enthaltene Histidin gehört der L-Reihe an.

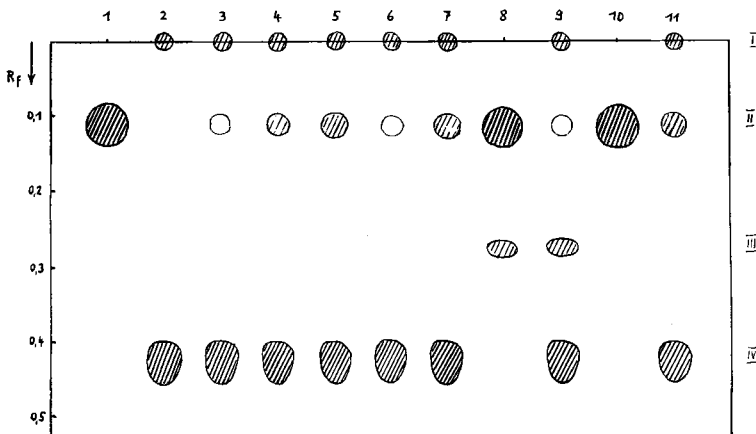


Fig. 1. Versuch 7, Inkubation der Lösungen A bis H mit L-Aminosäureoxydase

Je 0,01 ml Inkubationslösung auf WHATMAN-Papier Nr. 1 aufgetropft und im System 87 absteigend chromatographiert. Anfärbung mit PAULY-Reagens. I = Enzym ( $R_f = 0$ ), II = Histidin ( $R_f = 0,11$ ), III = H·Val-His·OH ( $R_f = 0,27$ ), IV = Imidazolylessigsäure ( $R_f = 0,41$ ).

<sup>18</sup>) R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* 39, 351 (1945).

<sup>19</sup>) E. A. ZELLER, A. MARITZ & B. ISELIN, *Helv.* 28, 1615 (1945).

Nr.	Lösung	Inkubation mit Oxydase	% Histidin <sup>22)</sup>	Nr.	Lösung	Inkubation mit Oxydase	% Histidin <sup>22)</sup>
1	C	—	100	7	H	+	8
2	C	+	0	8	A	—	75
3	D	+	2	9	A	+	2
4	E	+	5	10	B	—	100
5	F	+	10	11	B	+	8
6	G	+	2				

**Isolierung und Identifizierung von H·Val-tyr-Val-His-Pro-Phe·OH.** — Da durch Umfällen und durch multiplikative Verteilung sich wohl das «alles L»-Hexapeptid in reiner, «geschützter» Form gewinnen liess<sup>2)</sup>, das in den Mutterlaugen anfallende (vorläufig noch hypothetische) Isomere mit D-Tyrosin aber auf diese Weise nicht rein zu bekommen war, musste ein anderer Weg beschritten werden. Dieser war gegeben durch die Möglichkeit, das «alles L»-Isomere (nach Abspaltung der Schutzgruppen) durch Chymotrypsin in H·Val-Tyr·OH und H·Val-His-Pro-Phe·OH zu

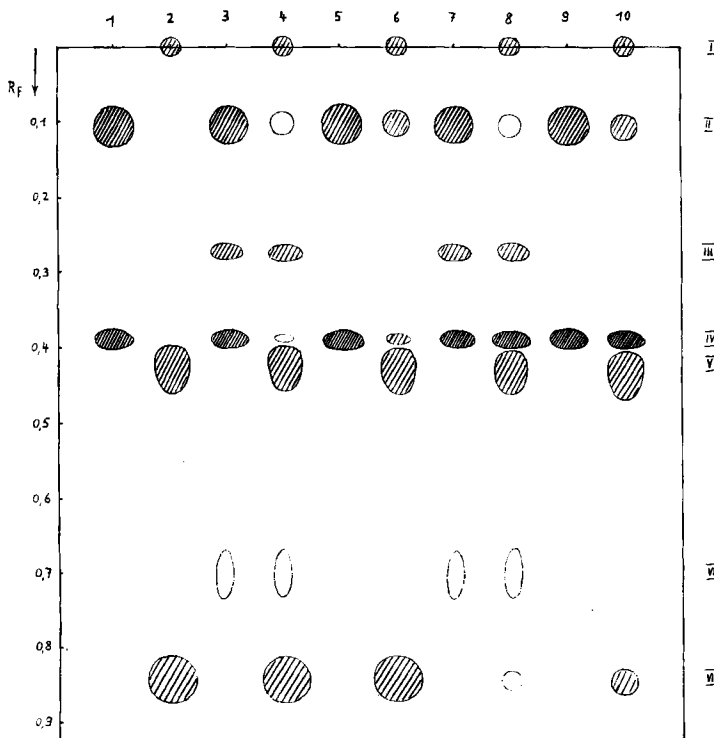


Fig. 2. Versuch 8, Inkubation der Lösungen A bis E mit L-Aminosäure-Oxydase

Je 0,01 ml Inkubationslösung auf WHATMAN-Papier Nr. 1 aufgetropft und im System 87 absteigend chromatographiert. Anfärbung mit PAULY-Reagens. I = Enzym ( $R_f = 0$ ), II = Histidin ( $R_f = 0,11$ ), III = H·Val-His·OH ( $R_f = 0,27$ ), IV = Tyrosin ( $R_f = 0,39$ ), V = Imidazolylelessigsäure ( $R_f = 0,41$ ), VI = H·Val-Tyr·OH ( $R_f = 0,71$ ), VII = p-Hydroxyphenyl-essigsäure ( $R_f = 0,84$ ).

spalten, wodurch die Reinigung des verbleibenden L-D-L-L-L-Isomeren mittels multiplikativer Verteilung erleichtert würde. Tatsächlich wurde auf diese Weise ein Peptid erhalten, in dessen Totalhydrolysat die Aminosäuren Valin, Tyrosin, Histidin, Prolin und Phenylalanin durch Vergleich mit einem synthetischen Aminosäuregemisch im Verhältnis 2:1:1:1:1 nachgewiesen werden konnten: es handelt sich also tatsächlich um ein isomeres Hexapeptid. Die Unmöglichkeit seiner Spaltung mittels Chymotrypsin weist schon auf das Vorliegen von D-Tyrosin hin; dieser Befund wurde ergänzt durch das Ergebnis der Inkubation des Totalhydrolysats mit L-Aminosäureoxydase, indem sich alle Aminosäuren ausser L-Prolin (dessen L-Konfiguration durch den Syntheseweg gesichert erscheint) und D-Tyrosin quantitativ abbauen liessen (Fig. 2). Dadurch ist die Konstitution des Nebenproduktes als H·Val-tyr-Val-His-Pro-Phe·OH<sup>5)</sup> gesichert. Bei der Totalhydrolyse mussten wieder die verschärften Bedingungen angewandt werden, da H·Val-tyr·OH relativ stabil ist.

Nr.	Lösung	Inkubation mit Oxydase	% Tyrosin <sup>22)</sup>	% Histidin <sup>21)</sup>
1	E	–	100	100
2	E	+	0	0
3	C	–	85	85
4	C	+	2	3
5	D	–	100	100
6	D	+	6	10
7	A	–	85	85
8	A	+	83	3
9	B	–	100	100
10	B	+	94	10

#### Experimenteller Teil<sup>5)7)</sup>

Als Ausgangsmaterial diente reines Val<sup>5</sup>-Hypertensin II-Asp<sup>1</sup>- $\beta$ -amid («Octapeptid») mit einem Peptidgehalt von 83%. Der Rest bestand aus Essigsäure (10,2%, entsprechend 2,1 Mol) und Wasser (6,4%, entsprechend 4,4 Mol).

Die Papierchromatogramme wurden absteigend auf WHATMAN-Papier Nr. 1 oder 3 ausgeführt. Es wurden folgende Lösungsmittelsysteme verwendet (Zahlenangaben bedeuten ml, wenn nicht anders angegeben):

Nr. 49 (sec.-Butanol)-Isopropanol-Diäthylbarbitursäure-Triäthylamin-Wasser  
100:10:1,8 g:0,8:60

Nr. 54 (sec.-Butanol)-Isopropanol-Monochloressigsäure-Wasser 70:10:3 g:40

Nr. 56 (sec.-Butanol)-Isopropanol-Veronalnatrium 5-proz.-Wasser 100:15:10:60

Nr. 87 Isopropanol-Ameisensäure-Wasser 40:2:10

Die Identifikation der verschiedenen Verbindungen erfolgte durch Mitchromatographieren bekannter, synthetischer Peptide, sowie anhand von Farbreaktionen (Ninhydrin, PAULY, SAKAGUCHI, FOLIN-CIOCALTEAU). Die inkubierten Lösungen wurden direkt auf das Papier aufgetropft. Bei den untereinander zu vergleichenden Proben wurde darauf geachtet, dass überall dieselbe Salzkonzentration (Puffer usw.) vorhanden war.

1. *Trypsin*: Enzym: Substrat = 1:50. 2 mg Octapeptid wurden in 0,2 ml 0,05 M Trispuffer<sup>20)</sup>, pH 8,6, gelöst, nach Zugabe von 0,016 ml einer Lösung von 0,25% krist. Trypsin (WORTHINGTON) im gleichen Puffer verschlossen und während 15 Min. bei 38° inkubiert. Zur Inaktivierung des

<sup>20)</sup> Trispuffer bedeutet Puffer aus Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan und HCl.

<sup>21)</sup> Vorhandenes Histidin (und, in Fig. 2, Tyrosin) nach visuellem Vergleich der PAULY-Reaktion; relative Genauigkeit  $\pm 20\%$  (der geschätzten Menge).

Enzyms erhitzte man zum Schluss 5 Min. auf 100°. Das Octapeptid wurde quantitativ zu H·Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg·OH und H·Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH gespalten.

Bei längerer Einwirkung des Enzyms (24 Std., unter Zusatz eines Tröpfchens Toluol) wurde das Hexapeptid in Spuren zu 2 nicht näher untersuchten Bruchstücken weiter abgebaut.

Papierchromatogramme für diesen und die nachfolgenden Enzymversuche siehe Tabelle.

2. *Chymotrypsin*: Enzym: Substrat = 1:50. 2 mg Octapeptid wurden in 0,2 ml 0,05 M Trispuffer<sup>20)</sup>, pH 8,6, gelöst und nach Zugabe von 0,016 ml einer Lösung von 0,25% krist. Chymotrypsin (WORTHINGTON) im gleichen Puffer 15 Min. bei 38° inkubiert. Zuletzt erhitzte man 5 Min. auf 100°. Das Octapeptid wurde quantitativ zu H·Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg-Val-Tyr·OH und H·Val-His-Pro-Phe·OH gespalten.

Bei 24-stdg. Inkubation mit Chymotrypsin waren beide Tetrapeptide vollkommen stabil.

3. *Pepsin*: Enzym: Substrat = 1:5. 2 mg Octapeptid wurden in 0,18 ml 0,02 N Salzsäure gelöst und nach Zugabe von 0,016 ml einer Lösung von 2,5% krist. Pepsin (Nutritional Biochemicals Corp.) in 0,02 N Salzsäure 24 Std. bei 38° inkubiert (pH ca. 1,5). Zuletzt fügte man 0,02 ml 1 N Trispuffer<sup>20)</sup>, pH 8, zu. Die Spaltung erfolgte quantitativ zu H·Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg-Val·OH und H·Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH. Gleichzeitig wurde letzteres Pentapeptid zu ca. 10% zu zwei nicht identifizierten Peptiden weiter abgebaut.

Einwirkung von Pepsin bei pH 3,8 in 0,06 M Natriumcitratpuffer ergab die gleichen Resultate.

4. *Subtilisin*: Enzym: Substrat = 1:100. 2 mg Octapeptid wurden in 0,2 ml 0,1 M Trispuffer<sup>20)</sup>, pH 8, gelöst und nach Zugabe von 0,01 ml Subtilisin 0,2-proz.<sup>22)</sup> im gleichen Puffer während verschiedener Zeiten bei 38° inkubiert. Zum Schluss wurde jeweils 5 Min. auf 100° erhitzt. Nach 7 Min. waren ca. 50% Octapeptid zu H·Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg-Val-Tyr·OH und H·Val-His-Pro-Phe·OH gespalten. Nach 1 Std. war diese Spaltung quantitativ; gleichzeitig wurden geringe Mengen des ersten Tetrapeptides weiter abgebaut zu H·Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg·OH und H·Val-Tyr·OH. Nach 20 Std. waren ca. 50% H·Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg-Val-Tyr·OH zu H·Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg·OH und H·Val-Tyr·OH gespalten, währenddem H·Val-His-Pro-Phe·OH nicht weiter angegriffen wurde.

5. *Carboxypeptidase*: Enzym: Substrat = 1:50. Herstellung der Enzymlösung, ca. 0,25-proz.: 0,1 ml einer 1,5-proz. Suspension von Carboxypeptidase in Wasser (MANN Research Laboratories) wurde mit 0,5 ml 0,1 M Trispuffer<sup>20)</sup>, pH 8, verdünnt und dazu vorsichtig 0,2 N Natronlauge gegeben, bis gerade klare Auflösung eintrat. Dazu gab man sofort wieder die der Natronlauge entsprechende Menge 0,2 N Salzsäure wobei eine Trübung ausfiel (pH ca. 8).

2 mg Octapeptid wurden in 0,2 ml 0,1 M Trispuffer<sup>20)</sup>, pH 8, 0,1% Natriumchlorid enthaltend, gelöst und mit 0,016 ml der obigen Carboxypeptidaselösung versetzt. Nach Inkubation während 15 Min. bei 37° wurde 4 Min. auf 100° erhitzt. Das Octapeptid wurde dabei quantitativ zum Heptapeptid H·Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro·OH und L-Phenylalanin gespalten. Das Heptapeptid ist gegen weitere Hydrolyse mit Carboxypeptidase vollkommen stabil.

6. *Leucinaminopeptidase*: Das Enzym<sup>17)</sup> wurde vor Gebrauch mit Diisopropyl-fluorphosphat behandelt, dialysiert und wie folgt aktiviert: 1 ml Lösung wurde mit 1 ml 0,5 M Trispuffer<sup>20)</sup>, pH 8,5, und 0,5 ml 0,02 M Magnesiumchloridlösung 4 Std. bei 37° inkubiert und dann mit Wasser auf 5 ml aufgefüllt.

2 mg Octapeptid wurden in 0,2 ml obiger Enzymlösung gelöst, nach Zugabe eines Tröpfchens Toluol verschlossen und während 27 Std. bei 37° inkubiert. Es trat dabei quantitative Spaltung zu L-Asparagin, L-Arginin, L-Valin (2 Mol), L-Tyrosin und dem Tripeptid H·His-Pro-Phe·OH ein, welches letzteres mit Leucinaminopeptidase nicht weiter abgebaut werden kann.

7. *Bestimmung der optischen Reinheit von His<sup>6</sup>* – a) *Isolierung von H·Val-His-Pro-Phe·OH aus dem Octapeptid*: Die Lösung von 500 mg Octapeptid in 25 ml 0,1 M Ammoniumacetatpuffer, pH 9, wurde mit 0,3 ml 0,25-proz. Chymotrypsinlösung versetzt und 1 Std. bei 37° inkubiert. Zuletzt engte man im Vakuum auf ca. 4 ml ein und lyophilisierte diese Lösung. Nach Absublimieren des Ammoniumacetates bei 40° im Hochvakuum erhielt man 560 mg amorphes, hygroskopisches Pulver, bestehend aus einem äquimolaren Gemisch von H·Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg-Val-Tyr·OH und H·Val-His-Pro-Phe·OH.

<sup>22)</sup> In verdankenswerter Weise von Herrn Prof. Dr. G. BRAUNITZER, München, überlassen (Präparat von Prof. S. AKABORI, Osaka).

Zur Auftrennung wurden obige 560 mg zwischen n-Butanol und 0,1M Ammoniumacetat-lösung über 90 Stufen mit je 10 ml Phasenvolumen verteilt. Aus Röhrchen 1–6 (Max. bei Nr. 4,  $K = 0,05$ ) isolierte man durch Eindampfen und Wegsublimieren des Puffers im Hochvakuum 281 mg reines  $H \cdot Asp(NH_2) \cdot Arg \cdot Val \cdot Tyr \cdot OH$  als stark hygroskopisches Pulver. Die gesamte Menge des  $H \cdot Val \cdot His \cdot Pro \cdot Phe \cdot OH$  war in den Röhrchen 10–23 (Max. bei Nr. 16–17;  $K = 0,23$ ) enthalten. Man erhielt bei der Aufarbeitung dieser Fraktionen insgesamt 229 mg papierchromatographisch reines Tetrapeptid als weisses, hygroskopisches Pulver.

b) *Totalhydrolyse von  $H \cdot Val \cdot His \cdot Pro \cdot Phe \cdot OH$* : Je 5 mg Tetrapeptid wurden in Glasröhrchen in 1 ml analyt. reiner, halbkonzentrierter Salzsäure gelöst, mit Stickstoff kurz gespült, in Kohlendioxid-Aceton-Mischung gefroren und im Hochvakuum eingeschmolzen. Nach der Hydrolyse bei 105° während 16 bzw. 64 Std. wurde der Inhalt der Röhrchen im Hochvakuum zur Trockne eingeeengt, in 0,47 ml 0,2M Trispuffer<sup>20</sup>), pH 7,5, aufgenommen und mit 0,03 ml 1N Lithiumhydroxyd das pH auf 7,5 zurückkorrigiert.

Bei der Papierchromatographie zeigte es sich, dass nach 16-stdg. Erhitzen noch ca. 25% Dipeptid  $H \cdot Val \cdot His \cdot OH$  vorhanden war (*Lösung A*); nach 64 Std. waren sämtliche Peptidbindungen gespalten (*Lösung B*).

Zum Vergleich wurden noch folgende, mit A und B äquimolare Lösungen hergestellt:

*Lösung C*: 1,17 mg L-Valin, 1,55 mg L-Histidin, 1,15 mg L-Prolin und 1,65 mg L-Phenylalanin in 3 Tropfen 2N HCl gelöst, zur Trockne eingeeengt und in 0,47 ml Puffer und 0,03 ml Lithiumhydroxyd gelöst (s. oben).

*Lösung D*: analog Lösung C, jedoch 98% L-Histidin und 2% D-Histidin.

*Lösung E*: analog Lösung C, jedoch 95% L-Histidin und 5% D-Histidin.

*Lösung F*: analog Lösung C, jedoch 90% L-Histidin und 10% D-Histidin.

*Lösung G*: gleiche Substanzen wie Lösung C, jedoch mit 1 ml halbkonzentrierter Salzsäure 16 Std. auf 105° erhitzt, zur Trockne eingeeengt und in 0,47 ml Puffer und 0,03 ml Lithiumhydroxyd aufgenommen.

*Lösung H*: analog Lösung G, jedoch 64 Std. auf 105° erhitzt.

c) *Inkubation mit L-Aminosäureoxydase aus Schlangengift*: 5 mg Schlangengift (L-Amino-acid Oxidase, MANN Research Laboratories, New York) wurden in 0,5 ml 0,2M Trispuffer<sup>20</sup>), pH 7,5, gelöst. Von den obigen Lösungen A bis H wurden je 0,15 ml in einem 21 ml fassenden Glasröhrchen mit Magnetrührerchen und Gummistopfen mit 0,05 ml dieser Enzymlösung versetzt, ein Tröpfchen Toluol zugefügt, das Röhrchen mit Sauerstoff gespült und sofort verschlossen. Nach 24-stdg. Erwärmen auf 37° unter langsamem Rühren mit Magnet wurden die so erhaltenen Lösungen direkt auf das Papier aufgetropft. Die Resultate sind aus Fig. 1 ersichtlich.

Neben der PAULY-Reaktion diente die Ninhydrinfärbung der Papierchromatogramme zur zusätzlichen Abklärung des Verhaltens von Valin, Prolin und Phenylalanin während der Inkubation mit L-Aminosäureoxydase.

L-Valin wurde unter den gewählten Bedingungen nur ungefähr zur Hälfte abgebaut, während L-Prolin überhaupt nicht angegriffen wurde. L-Phenylalanin erwies sich als die am raschesten abgebaute Aminosäure. Bei den 64-Std.-Hydrolysaten waren auch hier einige Prozent D-Form entstanden, die jedoch nicht quantitativ bestimmt wurden.

8. *Struktur des Hexapeptid-Nebenproduktes* – a) *Isolierung des Nebenproduktes*: Es lag ein Gemisch von  $Z \cdot Val \cdot Tyr \cdot Val \cdot His \cdot Pro \cdot Phe \cdot OCH_3$  (ca. 40%) und dessen Nebenprodukt (ca. 60%) vor, das durch Umfällen aus Lösungsmittelgemischen nur sehr schwer zu trennen war. Die Reinigung des Nebenproduktes erfolgte deshalb durch Hydrolyse der Schutzgruppen mit konz. Salzsäure, nachfolgende Spaltung von  $H \cdot Val \cdot Tyr \cdot Val \cdot His \cdot Pro \cdot Phe \cdot OH$  zu  $H \cdot Val \cdot Tyr \cdot OH$  und  $H \cdot Val \cdot His \cdot Pro \cdot Phe \cdot OH$  mittels Chymotrypsin, und Abtrennung des gegen Chymotrypsin stabilen Nebenproduktes aus dem so erhaltenen Peptidgemisch mit Hilfe der Gegenstromverteilung.

210 mg Carbobenzoxy-methylester wurden mit 10 ml konz. Salzsäure während 30 Min. auf 50° erwärmt und dann im Hochvakuum zur Trockne eingeeengt. Man erhielt 187 mg Hydrochlorid, das in 70-proz. Methanol gelöst und mittels Filtration durch eine mit Essigsäure vorbehandelte Säule von schwach basischem Ionenaustauscher (МЕРСК II) in das Acetat umgewandelt wurde. Die so erhaltene amorphe Substanz (186 mg) zeigte im Papierchromatogramm auf WHATMAN Nr. 1 mit Ninhydrin- und PAULY-Anfärbung je 2 Flecke:

$H \cdot Val \cdot Tyr \cdot Val \cdot His \cdot Pro \cdot Phe \cdot OH$	Rf 54 = 0,66; Rf 56 = 0,67
Nebenprodukt	Rf 54 = 0,77; Rf 56 = 0,87.



180 mg dieses Gemisches wurden in 15 ml 0,05M wässrigem Ammoniumacetat gelöst und mit 1N Ammoniak das pH auf 8 eingestellt. Nach Zugabe von 18 mg Chymotrypsin, gelöst in 1 ml 0,05M Ammoniumacetat, liess man 5 Std. bei 38° stehen und dampfte dann zur Trockne ein. Der Puffer wurde bei 40° im Hochvakuum wegsublimiert, wobei man 214 mg eines amorphen, leicht hygroskopischen Pulvers erhielt. Das Papierchromatogramm zeigte an Stelle von H·Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH 2 neue Flecke:

H·Val-Tyr·OH Rf 54 = 0,70; Rf 56 = 0,49

H·Val-His-Pro-Phe·OH Rf 54 = 0,60; Rf 56 = 0,61,

währenddem das Nebenprodukt nicht verändert wurde.

Das Material wurde nun zwischen n-Butanol und 0,1M Ammoniumacetat über 80 Stufen mit je 10 ml Phasenvolumen verteilt. Aus Röhrchen 61 bis 68 (Max. bei Nr. 65;  $K = 4,2$ ) isolierte man durch Eindampfen und Wegsublimieren des Ammoniumacetats im Hochvakuum insgesamt 98 mg reines «Nebenprodukt» als Acetat.

b) *Totalhydrolyse: Lösung A:* 5,0 mg «Nebenprodukt» wurden, wie bei Versuch 7b beschrieben, mit 1 ml halbkonzentrierter Salzsäure eingeschmolzen und 8 Std. auf 115° erhitzt. Zuletzt dampfte man im Hochvakuum zur Trockne ein, löste in 0,47 ml 0,2M Trispuffer<sup>20)</sup> vom pH 7,5 und neutralisierte durch Zugabe von 0,03 ml 1N Lithiumhydroxyd.

*Lösung B:* Hydrolyse während 24 Std. bei 115°, sonst analog A.

*Lösung C:* Analog A, mit 5,0 mg reinem H·Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH<sub>3</sub><sup>2)</sup> an Stelle des Nebenproduktes.

*Lösung D:* Analog B, mit 5,0 mg reinem H·Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH<sub>3</sub><sup>2)</sup> an Stelle des Nebenproduktes.

*Lösung E:* (Vergleichslösung) 1,54 mg L-Valin, 1,19 mg L-Tyrosin, 1,02 mg L-Histidin, 0,76 mg L-Prolin und 1,09 mg L-Phenylalanin wurden in 3 Tropfen 2N Salzsäure gelöst, zur Trockne eingengt und wieder in 0,47 ml Puffer und 0,03 ml Lithiumhydroxyd gelöst.

Die beiden Lösungen A und B ergaben im Papierchromatogramm ein mit C und D übereinstimmendes Bild: Während nach 8 Std. bei 115° (A und C) noch je ca. 10–20% der beiden schwer hydrolysierbaren Dipeptide H·Val-Tyr·OH und H·Val-His·OH vorhanden waren, bestanden die Hydrolysate B und D aus dem Gemisch von Valin, Tyrosin, Histidin, Prolin und Phenylalanin im Verhältnis 2:1:1:1:1.

c) *Abbau mit L-Aminosäureoxydase:* Die Inkubation der Lösungen A bis E erfolgte analog zum Versuch 7c. Die Resultate für Tyrosin und Histidin sind in Fig. 2 dargestellt. (PAULY-Ent-

Tabelle. Rf-Werte (WHATMAN Nr. 3) und Farbreaktionen zu den Versuchen 1) bis 6)

N = Ninhydrin, P = PAULY, S = SAKAGUCHI, F = FOLIN-CIOCALTEAU)

Verbindung	Rf 49	Rf 54	Farbreaktionen
H·Asp(NH <sub>2</sub> )·OH . . . . .	0,27	0,24	N
H·Arg·OH . . . . .	0,32	0,28	N, S
H·Val·OH . . . . .	0,50	0,62	N
H·Tyr·OH . . . . .	0,51	0,58	N, P, F
H·His·OH . . . . .	0,32	0,24	N, P
H·Pro·OH . . . . .	0,42	0,41	N
H·Phe·OH . . . . .	0,65	0,69	N
H·Asp(NH <sub>2</sub> )-Arg·OH . . . . .	0,25	0,21	N, S
H·Val-Tyr·OH . . . . .	0,64	0,77	N, P, F
H·Asp(NH <sub>2</sub> )-Arg-Val·OH . . . . .	0,35	0,46	N, S
H·His-Pro-Phe·OH . . . . .	0,65	0,62	N, P
H·Asp(NH <sub>2</sub> )-Arg-Val-Tyr·OH . . . . .	0,51	0,58	N, P, S, F
H·Val-His-Pro-Phe·OH . . . . .	0,69	0,68	N, P
H·Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH . . . . .	0,77	0,72	N, P, F
H·Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH . . . . .	0,82	0,75	N, P, F
H·Asp(NH <sub>2</sub> )-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro·OH . . . . .	0,53	0,46	N, P, S, F
H·Asp(NH <sub>2</sub> )-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH . . . . .	0,66	0,61	N, P, S, F

wicklung). Aus den hier nicht wiedergegebenen Chromatogrammen mit Ninhydrin-Entwicklung ging weiter hervor, dass das Hexapeptid und dessen Nebenprodukt bezüglich der Konfiguration von Valin und Phenylalanin identisch waren (L-Formen). Zur quantitativen Oxydation des L-Valins war allerdings bei sonst gleichen Bedingungen eine 3 mal stärkere Enzymkonzentration notwendig.

Die Papierchromatogramme wurden unter der Leitung von Herrn Dr. R. NEHER und von Herrn von ARX in unseren Papierchromatographischen Laboratorien ausgeführt.

#### SUMMARY

The enzymatic degradation of synthetic Val<sup>6</sup>-Hypertensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amide with trypsin, chymotrypsin, pepsin, subtilisin, carboxypeptidase and leucineaminopeptidase is described, proving the optical purity of all amino-acid residues (L-configuration) except His<sup>6</sup>. The configuration of this amino-acid has been confirmed by its quantitative destruction with L-amino-acid oxidase in hydrolysates.

During the synthesis of the hexapeptide intermediate carbobenzoxy·Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH<sub>3</sub><sup>2)5</sup>) a considerable amount of the isomeric carbobenzoxy·Val-tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH<sub>3</sub><sup>5</sup>) is formed (which is eliminated in the process of purification). The structure of this compound has been proved by isolating the corresponding free hexapeptide, demonstrating its indigestibility by chymotrypsin, and by treating the total hydrolysate with L-amino-acid oxidase.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel  
Pharmazeutische Abteilung

## 76. Synthetische Analoge des Hypertensins

### I. Einleitung

von R. Schwyzer

(18. II. 61)

*A. Wirkstoff-Rezeptor-Beziehung.* Die medizinische Erforschung von Krankheitsursachen und von Wirkungen der Pharmaka verschiebt ihre Akzente in neuerer Zeit immer mehr von Organ und Zelle auf molekulare Mechanismen. Offenbar spielen für die biologischen Effekte der verschiedenen Wirkstoffe (Toxine, Hormone, Pharmazeutika usw.) spezifische oder zufällig geeignete Rezeptoren des betrachteten Organismus eine entscheidende Rolle. Eine wesentliche Vertiefung unseres Verständnisses der Beziehung zwischen Konstitution und Wirkung wird von der genauen Kenntnis der Chemie und Stereochemie der Rezeptorbereiche erwartet. Davon sind wir aber z. Z. noch weit entfernt.

Eine Methode, um Einblicke in diese Verhältnisse zu bekommen, ist die chemische Variation biologisch wirksamer Molekeln<sup>1)</sup> und die genaue Beobachtung der

<sup>1)</sup> R. SCHWYZER, *Chimia* 12, 53 (1958); *Record of Chemical Progress* 20, 147 (1959); in «Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels», S. 152, Pergamon Press, London 1960; R. SCHWYZER & H. TURRIAN in «Vitamins and Hormones», Vol. XVIII, 237 (1960), Harris, Ingle & Thimann, Ed., Acad. Press Inc., New York.