

79. Synthetische Analoge des Hypertensins

IV. Synthese der kettenhomologen Peptide (*des*-Asp¹)-Val⁵-Hypertensin II, (*des*-Phe⁸)-Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -amid, (*homo*-Tyr^{4'})-Val⁵-Hypertensin II und (*homo*-Tyr^{4'})-Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -amid¹)

von B. Riniker und R. Schwyzer

(18. II. 61)

Über die blutdrucksteigernden Eigenschaften der vier im Titel erwähnten, mit Val⁵-Hypertensin II kettenhomologen Hepta-, bzw. Nonapeptide wurde bereits in der 1. Abhandlung dieser Reihe²⁾ berichtet. Ihre Benennung folgt den bereits für solche Peptide gemachten Vorschlägen³⁾; *des*- bezeichnet den Mindergehalt des Peptides an dem mit dieser Vorsilbe verbundenen Aminosäurerest gegenüber dem Octapeptid; *homo*- soll den Mehrgehalt an dem damit verbundenen Aminosäurerest bezeichnen, wobei die Stellung des neuen Restes durch die mit einem Index versehene Nummer der um einen Platz links (gegen das Aminoende) davon stehenden Aminosäure bezeichnet wird. (Homo-Asp^{1'})-Gly¹, Val⁵-Hypertensin II wäre somit H·Gly-Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH⁴⁾.

Die hier behandelten neuen Peptide sind⁴⁾:

- I: H·Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH
(*des*-Asp¹)-Val⁵-Hypertensin II.
- II: H·Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro·OH
(*des*-Phe⁸)-Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -amid.
- III: H·Asp-Arg-Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH
(*homo*-Tyr^{4'})-Val⁵-Hypertensin II, oder
(*homo*-Tyr^{3'})-Val⁵-Hypertensin II.
- IV: H·Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH
(*homo*-Tyr^{4'})-Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -amid.

Das Heptapeptid I wurde nach Schema 1 aus Carbobenzyloxy-nitro-L-arginin 1A2⁵⁾ und dem Hexapeptid-methylester 1A 3-8⁶⁾ hergestellt. Die Reinigung der Verbindung I (1D 2-8) erfolgte wie üblich durch multiplikative Verteilung.

¹⁾ Abhandlung III: B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* 44, 677 (1961).

²⁾ R. SCHWYZER, *Helv.* 44, 667 (1961).

³⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Chimia* 11, 335 (1957).

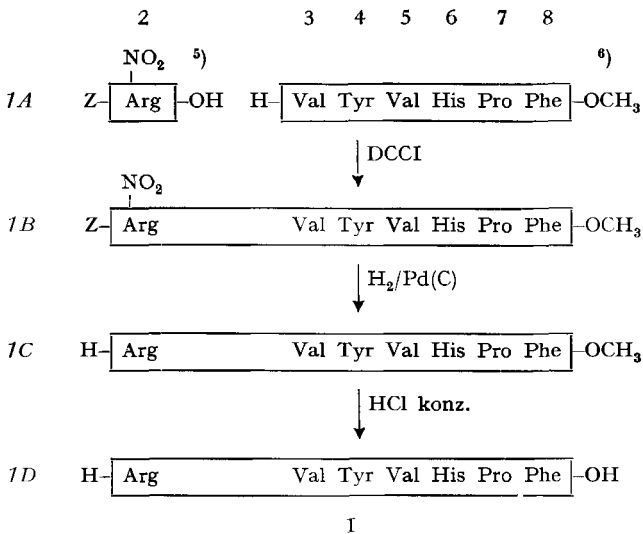
⁴⁾ Die hier verwendeten Abkürzungen lehnen sich an die von E. BRAND & J. T. EDSALL (*Annu. Rev. Biochemistry* 16, 223 [1947]) vorgeschlagenen an. Symbole mit grossen Anfangsbuchstaben bedeuten die natürliche Form (L) des betr. Aminosäurerestes. Substituenten an den funktionellen Gruppen der Seitenketten der Aminosäurereste werden entweder über dem Symbol oder in Klammern, diesem nachfolgend, angegeben. Kristallin erhaltene Peptide und Derivate werden in den Aufbauschemata mit starker Unterlinierung bezeichnet. DCCI = Dicyclohexyl-carbodiimid, Z- = Carbobenzyloxy-.

⁵⁾ H. O. VAN ORDEN & E. L. SMITH, *J. biol. Chemistry* 208, 753 (1954).

⁶⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* 41, 1287 (1958).

Bei der Kondensation $1A \rightarrow 1B$ entstand ein Nebenprodukt, welches erst bei der endgültigen Reinigung von $1D$ 2–8 (I) entfernt wurde.

Das Heptapeptid II, (*des*-Phe⁸)-Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -amid, wurde durch Einwirkung von Carboxypeptidase auf Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -amid hergestellt⁷⁾. Unter ähnlichen Bedingungen wurde seinerzeit das natürliche Ileu⁵-Hypertensin II zu (*des*-Phe⁸)-Ileu⁵-Hypertensin II abgebaut⁸⁾.

Schema 1⁴⁾

Die Synthese des (*homo*-Tyr^{4'})-Val⁵-Hypertensins II (III) und seines Asp¹- β -amids (IV) sind im Schema 2 dargestellt.

Die Kondensationen wurden mit Dicyclohexyl-carbodiimid⁹⁾ ausgeführt ($2A \rightarrow 2B$; $2C \rightarrow 2D$; $2E \rightarrow 2F$), Carbobenzoxy- und Nitro-Gruppen wurden durch katalytische Hydrierung entfernt ($2D \rightarrow 2E$; $2F \rightarrow 2G$); das Tripeptidderivat $2B$ 3–4' wurde mit NaOH verseift; die Verseifung der Methylester-Funktion und der β -Amid-Gruppe (partiell) erfolgte wie üblich durch Behandlung mit konz. HCl bei 40°³⁾).

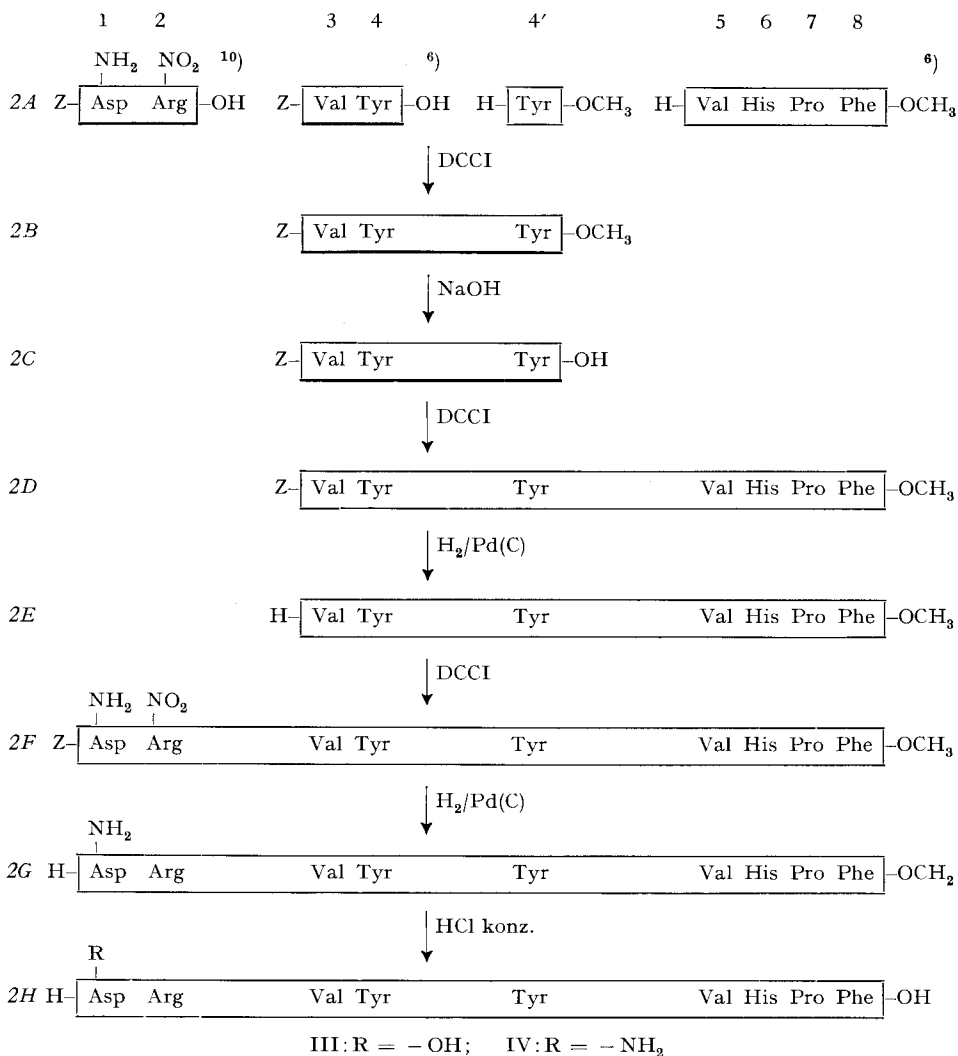
Das Heptapeptid I ($1D$ 2–8) ist relativ stabil gegen hydrolytische Prozesse: beim Aufbewahren einer 1-proz. wässrigen Lösung bei 50° erscheint die Verbindung nach 6 Monaten papierchromatographisch nicht verändert – es sind höchstens Spuren von Abbauprodukten nachzuweisen. Anders verhält es sich mit Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -amid, welches unter gleichen Bedingungen zu 90% Val⁵-Hypertensin II (VI, Schema 3) und 10% Heptapeptid I ergibt. Das Val⁵-Hypertensin II (VI) ist dagegen stabil: nach 6 Monaten bei 50° sind in 1-proz. wässriger Lösung nur Spuren Heptapeptid I nachweisbar. Offenbar ist die Abspaltung des Asp¹-Restes an die Amid-Form gebunden; sie könnte über ein cyclisches Imid (Schema 4) verlaufen, das eine

⁷⁾ B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* 44, 658 (1961); H. ZUBER, *Chimia* 14, 405 (1960).

⁸⁾ K. E. LENTZ, L. T. SKEGGS, K. R. WOODS, J. R. KAHN & N. P. SHUMWAY, *J. exptl. Medicine* 104, 183 (1956).

⁹⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 1067 (1955).

Schema 2⁴⁾



Endprodukt, Aminosuccinimid, würde anschliessend zu Asparaginsäure und Ammoniak gespalten. Beim entsprechenden Vorgang mit Asparaginsäure (Schema 5) müsste eine säureanhydridartige Verbindung als Zwischenprodukt entstehen, deren Weiterreaktion wenigstens aus thermodynamischen Überlegungen überwiegend nach links und nicht nach rechts zu erwarten wäre; im Schema 4 dürfte der Ablauf nach rechts günstiger sein.

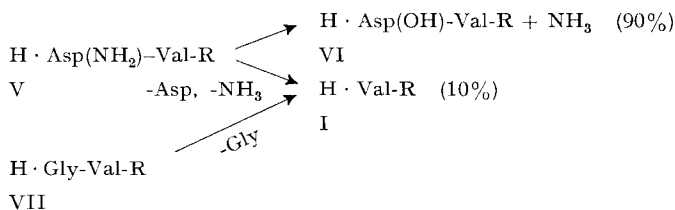
Glycin, von dem allgemein bekannt ist, dass seine Peptidbindungen gegen Hydrolyse relativ unbeständig sind, wird aus Gly¹, Val⁶-Hypertensin II (VII)¹¹ unter glei-

¹⁰⁾ W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* 40, 614 (1957).

¹¹⁾ B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* 44, 677 (1961).

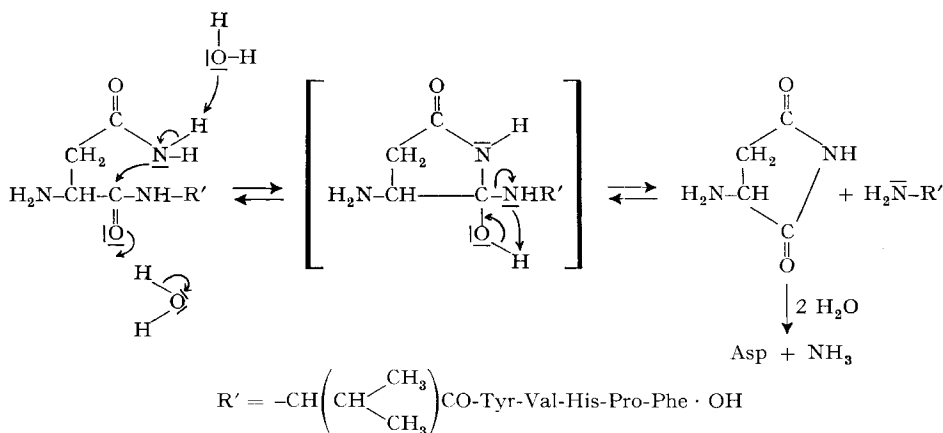
chen Bedingungen etwa gleich schnell abgespalten wie $\text{Asp}(\text{NH}_2)^1$ aus Val^5 -Hypertensin II- Asp^1 - β -amid (V).

Schema 3⁴): Hydrolyse des N-Terminus (H_2O , 50° , 6 Monate)

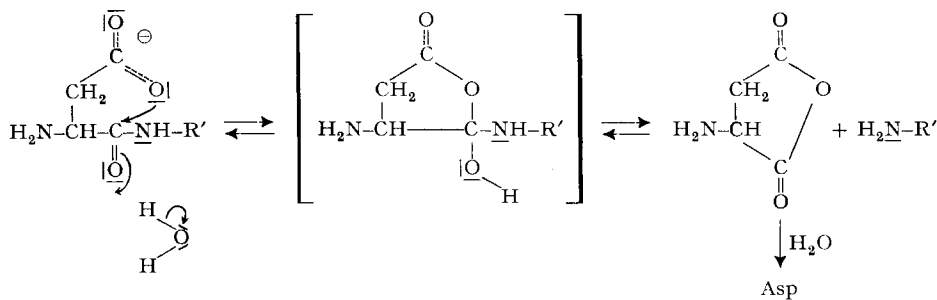


$\text{R} = \text{-Tyr-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OH}$

Schema 4⁴): Hydrolytische Abspaltung von Asparagin



Schema 5⁴)



Experimenteller Teil

Die Analysenpräparate wurden 15 Std. bei 80° und ca. 10^{-2} Torr getrocknet.

Elementaranalysen der Endprodukte (freie Peptide) sind nicht sehr aufschlussreich, da sie als amorphe Substanzen und infolge der Isolierung aus Ammoniumacetat enthaltenden Lösungen wechselnde Mengen von Wasser und Essigsäure enthalten. Es wurde deshalb die Aminosäure-Zusammensetzung des Totalhydrolysates quantitativ bestimmt. Diese Analysen wurden in dankenswerter Weise von den Herren Dr. R. WEBER und Prof. Dr. M. BRENNER, Org.-Chem.

Anstalt der Universität Basel, nach der Methode von MOORE, SPACKMAN & STEIN¹²⁾ ausgeführt. Die hier angegebenen Zahlen bedeuten relative molare Mengen, wobei Histidin = 1 gesetzt wird.

Carboboxyderivate wurden vorgängig der Papierchromatographie mit konz. HCl bei 40° behandelt.

Papierchromatogramme wurden auf WHATMAN Nr. 3 mit folgenden Systemen ausgeführt:

(45) = sek.-Butanol (100 ml), 3% NH₃ in Wasser (44 ml)

(49) = sek.-Butanol (100 ml), Triäthylamin (0,8 ml), Veronal (1,8 g), Wasser (60 ml), Isopropanol (10 ml)

(50) = t-Amylalkohol (100 ml), Triäthylamin (0,8 ml), Veronal (1,8 g), Wasser (50 ml), Isopropanol (40 ml)

(54) = sek.-Butanol (70 ml), Monochloressigsäure (3 ml), Wasser (40 ml), Isopropanol (10 ml)

Z·Arg(NO₂)-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ (1 B 2-8): 775 mg (0,001 Mol) H·Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃⁶⁾ und 565 mg (0,00275 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid wurden in 2 ml Dimethylformamid und 10 ml Acetonitril gelöst; dazu wurde die Lösung von 882 mg (0,0025 Mol) *Z·Arg(NO₂)·OH*⁵⁾ in wenig Dimethylformamid getropft. Es bildete sich rasch eine kristalline Fällung von Dicyclohexylharnstoff. Das Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemp. stehen gelassen. Nach Zugabe von 0,2 ml Eisessig wurde nochmals 1 Std. stehengelassen, dann filtriert und mit wenig Methanol gewaschen. Das Filtrat wurde im Hochvakuum zur Trockne eingedampft, in Butanol gelöst, mit eiskalter Sodalösung und dann mit Wasser neutral gewaschen und zur Trockne eingedampft. Man erhielt 1,6 g eines Rohgemisches, das im System Methanol-Wasser-Chloroform-Benzol (3:1:3:1) über 60 Stufen (Phasenvolumina je 10 ml) verteilt wurde. Der Inhalt der Röhrchen 10 bis 21 ergab nach Eindampfen 900 mg eines amorphen Pulvers, das nach dem Papierchromatogramm (PAULY-Reaktion) ca. 20% eines Nebenproduktes enthält. Dieses Gemisch wurde direkt hydriert. – Nach HCl-Behandlung: Rf (50) = 0,40; Nebenprodukt: Rf (50) = 0,53.

H·Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ (1 C 2-8): 900 mg *Z·Arg(NO₂)-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃* (Reinheit ca. 80%) wurden in 10 ml Methanol und 5 ml 1N Salzsäure (in Methanol) gelöst und nach Zugabe von 300 mg Palladiumkohle (10-proz.) bis zum Stillstand hydriert, unter Absorption des sich bildenden Kohlendioxyds. Die Aufnahme von etwas mehr als der berechneten Menge Wasserstoff war nach 6 Std. beendet. Der Katalysator wurde abfiltriert, das farblose Filtrat eingedampft und im Hochvakuum bei 40° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Man erhielt 890 mg eines weissen, hygroskopischen Pulvers (Gemisch von Heptapeptid-methylester-trihydrochlorid und Ammoniumchlorid), das ohne weitere Reinigung der Hydrolyse unterworfen wurde.

H·Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH (1 D 2-8): 890 mg roher Methylester wurden in 6 ml konz. Salzsäure gelöst und 1 Std. auf 40° erwärmt. Es wurde dann im Hochvakuum bei 40° zur Trockne eingedampft (Dauer ca. 20 Min.), in wenig Wasser gelöst und langsam durch eine Säule (∅ = 12,5 mm, l = 130 mm) von schwach basischem Ionenaustauscher (MERCCK II) in der Acetatform filtriert. Das Eluat wurde lyophilisiert und das dabei erhaltene Rohprodukt (770 mg) im System n-Butanol-Wasser über 100 Stufen verteilt. Aus Röhrchen 6-17 (*r_{max}* = 11, *K* = 0,13) gewann man total 484 mg reines I (*1 D 2-8*). Rf (45) = 0,52; Rf (50) = 0,58; Rf (54) = 0,65. Totalhydrolysat: Arg 1,26; Val 2,05; Tyr 0,95; His 1,00; Pro 1,00; Phe 1,00.

H·Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro·OH (II): 0,05 ml Carboxypeptidase-Suspension (MANN Research Laboratories, New York), enthaltend 15 mg Enzym pro ml, wurde mit 2 ml 0,1 M Tris-Puffer (pH = 8)¹³⁾ vermischt und durch Zugabe von 3 Tropfen 1N Natronlauge in Lösung gebracht. Durch sofortige Zugabe von 3 Tropfen 1N Salzsäure wurde das pH auf den Ausgangswert zurückgestellt, wobei eine feinflockige Trübung ausfiel.

200 mg Val⁶-Hypertensin II-Asp¹-β-amid⁶⁾ wurden in 10 ml Wasser gelöst und mit 2N Ammoniak das pH auf 8,0 gestellt. Nach Zugabe von 2 ml der obigen Carboxypeptidase-Lösung wurde

¹²⁾ S. MOORE, D. H. SPACKMAN & W. H. STEIN, *Analyt. Chemistry* 30, 1185 (1958).

¹³⁾ Tris-Puffer bedeutet Puffer aus Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan und Salzsäure.

2 Std. bei 38° inkubiert. Zum Schluss wurde das Enzym durch Erhitzen auf 100° während 5 Min. deaktiviert und die Lösung lyophilisiert. Kontrolle im Papierchromatogramm ergab, dass das Ausgangsmaterial vollständig zu einem Gemisch von Heptapeptid [R_f (45) = 0,27] und Phenylalanin [R_f (45) = 0,53] abgebaut war. Zur Reinigung wurde das Reaktionsgemisch einer multiplikativen Verteilung über 90 Stufen im System 0,6M Ammoniumacetat (pH = 7,0) – n-Butanol – Methanol (4:3:1), mit Phasenvolumina je 10 ml, unterworfen. Der Inhalt der Röhrrchen 13–27 ($r_{max} = 20$, $K = 0,29$) lieferte beim Eindampfen und Wegsublimieren des Ammoniumacetates (45°, Hochvakuum) 162 mg einer reinen Hauptfraktion. Aus den Röhrrchen 28 und 29 wurden noch 12 mg einer mit wenig Phenylalanin vermischten Fraktion erhalten. R_f (45) = 0,27; R_f (50) = 0,29; R_f (54) = 0,48. $[\alpha]_D = -61^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,06$ in 1N Essigsäure).

Totalhydrolysat: Asp 0,90; Arg 1,01; Val 1,55; Tyr 0,81; His 1,00; Pro 0,99. –CONH₂ nach Conway: NH₃ gef. 1,48%; ber. 1,93%.

Z·Val-Tyr-Tyr·OCH₃ (2B 3–4'): 1,95 g (0,01 Mol) H·Tyr·OCH₃ wurden in 7 ml Methanol und 30 ml Essigester gelöst. Dazu wurden 2,54 g (0,012 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid gegeben und dann im Laufe von 15 Min. unter Rühren 4,32 g (0,01 Mol) Z·Val-Tyr·OH, H₂O¹⁴), gelöst in 25 ml Essigester, getropft. Es wurde über Nacht bei 25° gerührt, vom gebildeten Dicyclohexylharnstoff (2,0 g) abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Beim Erwärmen des Rückstandes mit Essigester entstand eine feinkristalline Fällung von 2B 3–4', die abfiltriert wurde (2,73 g). Aus dem Filtrat erhielt man nach Waschen mit 2N Salzsäure, 2N Soda (eiskalt) und Wasser und nach Kristallisation aus Methanol-Essigester-Petroläther noch weitere Mengen Tripeptid. Die Gesamtausbeute betrug 4,81 g; Smp. 168–170°; $[\alpha]_D = -29,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,12$ in Methanol).

C₃₂H₃₇O₈N₃ Ber. C 64,96 H 6,30 N 7,10% Gef. C 64,43 H 6,08 N 7,24%

Z·Val-Tyr-Tyr·OH (2C 3–4'): Die Lösung von 1,182 g (0,002 Mol) Z·Val-Tyr-Tyr·OCH₃ in 14 ml 0,5N Natronlauge wurde 90 Min. bei 20° stehengelassen. Dann versetzt man langsam unter Rühren mit 8 ml 1N Salzsäure, filtrierte den Niederschlag ab und wusch ihn gut mit Wasser. Nach dem Trocknen erhielt man 1,17 g Z·Val-Tyr-Tyr·OH, H₂O, Smp. 215°, die noch aus Äthanol-Wasser umkristallisiert wurden. Ausbeute 1,05 g; Smp. 217–18° (Entweichen des Kristallwassers unter Sintern bei 185–190°); $[\alpha]_D = -17,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,15$ in Methanol).

C₃₁H₃₆O₈N₃·H₂O Ber. C 62,51 H 6,26 O 24,18% Gef. C 62,45 H 6,22 O 24,02%

Z·Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ (2D 3–8): 596 mg (0,001 Mol) Z·Val-Tyr-Tyr·OH, H₂O und 513 mg (0,001 Mol) H·Val-His-Pro-Phe·OCH₃⁸) wurden in 3 ml Dimethylformamid gelöst, auf 0° gekühlt und mit 290 mg (0,0014 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Es wurde 4 Std. bei 0° und 15 Std. bei 20° gerührt, dann der gebildete Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat im Hochvakuum bei 40° eingedampft. Den klebrigen Rückstand zerrieb man (unter Kühlen auf 0°) mit Essigester zu einem Pulver, das abfiltriert und getrocknet wurde. Man erhielt so 902 mg Rohprodukt, das im System Methanol-Wasser-Chloroform-Benzol (3:1:3:1) über 72 Stufen mit je 10 ml Phasenvolumen verteilt wurde. Aus Röhrrchen 13–24 ($r_{max} = 20$; $K = 0,39$) isolierte man 595 mg Reinprodukt als amorphes Pulver, Smp. ca. 160–170°. Nach HCl-Behandlung: R_f (50) = 0,55; R_f (54) = 0,57. Eine Probe wurde zur Analyse aus Methanol-Essigester-Petroläther umgefällt und 15 Std. bei 100°/0,005 Torr getrocknet. $[\alpha]_D = -57,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,08$ in Methanol).

C₅₇H₈₉O₁₂N₉ Ber. C 63,85 H 6,49 O 17,91 N 11,76%
Gef. „ 62,93 „ 6,59 „ 17,81 „ 11,77%

H·Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ (2E 3–8): 830 mg (0,00077 Mol) Z·Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ wurden in 15 ml Methanol und 1 ml 1,8N methanolischer Salzsäure gelöst und nach Zugabe von 200 mg 10-proz. Pd-Kohle unter Kohlendioxid-Absorption hydriert. Die Reaktion war nach 3 Std. beendet, worauf der Katalysator abfiltriert und das Filtrat i. V. eingedampft und bei 35° im Hochvakuum getrocknet wurde. Das so erhaltene Hydrochlorid (777 mg) löste man in 10 ml Wasser, fügte unter Eiskühlung 2N Sodalösung zu und extrahierte die Fällung

¹⁴) R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINKER, W. RITTEL & H. ZUBER, Helv. 41, 1273 (1958).

mit n-Butanol. Die organische Phase wurde neutral gewaschen und zur Trockne eingedampft, wodurch man 735 mg Heptapeptid-methylester als amorphes, weisses Pulver erhielt. Zur Reinigung wurde es in wenig Methanol gelöst und durch Zugabe von Essigester und Petroläther gefällt. Die so erhaltenen 690 mg erwiesen sich im Papierchromatogramm als einheitlich: Rf (50) = 0,93; Rf (54) = 0,60.

$C_{49}H_{83}O_{10}N_9, H_2O$ Ber. C 61,55 H 6,86 O 18,41 N 13,19%
Gef. „ 60,65 „ 6,89 „ 18,43 „ 13,37%

Z·Asp(NH₂)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ (2F 1–8): 620 mg (0,00066 Mol) H·Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ und 385 mg (0,0019 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid wurden in 4,5 ml Dimethylformamid gelöst, auf 0° gekühlt und 793 mg (0,0017 Mol) *Z·Asp(NH₂)-Arg(NO₂)·OH*⁹ zugefügt. Nach einigen Min. war alles in Lösung, und bald darauf begann sich Dicyclohexylharnstoff auszuscheiden. Es wurde 8 Std. bei 0° und 10 Std. bei 20° gerührt, dann 0,1 ml Eisessig zugefügt, nochmals eine Std. bei 20° gerührt und nach Abkühlen mit Eis der Dicyclohexylharnstoff (350 mg) abfiltriert. Das Filtrat wurde im Hochvakuum eingengt und daraus durch Zugabe von Essigester ein pulveriges Rohprodukt (1,12 g) ausgefällt. Durch mehrmaliges Umfällen aus heissem 85-proz. Methanol und Aufarbeiten der Mutterlaugen erhielt man insgesamt 705 mg Reinprodukt, Smp. 210–215° (Zers.). – Nach HCl-Behandlung: Rf (49) = 0,63 [H·Asp(NH₂)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH]; Rf (49) = 0,56 [H·Asp(OH)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH].

H·Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ (2G 1–8): 450 mg *Z·Asp(NH₂)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃* wurden in 7 ml Methanol und 1,1 ml 1,9*N* methanolischer Salzsäure suspendiert und nach Zugabe von 200 mg 10-proz. Pd-Kohle während 30 Std. hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft, wobei man 438 mg Hydrochlorid als hygroskopisches Pulver erhielt, Rf (49) = 0,80. Es wurde direkt zur Hydrolyse eingesetzt.

III und IV (2H 1–8): 425 mg Methylester-hydrochlorid wurden mit 5 ml konz. Salzsäure im Glasrohr eingeschmolzen und 1 Std. auf 45° erwärmt. Beim Eindampfen im Hochvakuum zur Trockne erhielt man 450 mg Rückstand, der in Wasser gelöst und an einer Säule von schwach basischem Ionenaustauscher in der Acetatform umgesetzt wurde. Das Eluat wurde i. V. bis auf ca. 5 ml konzentriert und zuletzt lyophilisiert. Man erhielt so 275 mg Rohprodukt, das im System n-Butanol – 0,3*M* Ammoniumacetat über 120 Stufen mit je 10 ml Phasenvolumen verteilt wurde. Bestimmung der Maxima durch Tüpfelproben auf Papier mit PAULY-Reagens.

Man erhielt folgende Hauptfraktionen:

Röhrchen 19–32: $r_{max} = 28$; $K = 0,31:58$ mg reines H·Asp-Arg-Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH (III, 2H 1–8). Rf (45) = 0,44; Rf (50) = 0,38; Rf (54) = 0,64. $[\alpha]_D = -41^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,64$ in 1*N* Essigsäure). Totalhydrolysat: Asp 1,00; Arg 0,99; Val 1,96; Tyr 1,75; His 1,00; Pro 0,96; Phe 1,09. –CONH₂ nach CONWAY: NH₃ gef. 0,15%; ber. 0%.

Röhrchen 33–41: 28 mg, Gemisch.

Röhrchen 42–60: $r_{max} = 50$; $K = 0,72$: 113 mg reines H·Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH (IV, 2H 1–8). Rf (45) = 0,48; Rf (50) = 0,48; Rf (54) = 0,62. $[\alpha]_D = -49^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,06$ in 1*N* Essigsäure). Totalhydrolysat: Asp 0,94; Arg 0,97; Val 1,96; Tyr 1,75; His 1,00; Pro 0,98; Phe 1,07. –CONH₂ nach CONWAY: NH₃ gef. 1,30%; ber. 1,42%.

Die Elementaranalysen und Mikro-CONWAY-Bestimmungen verdanken wir Herrn Dr. W. PADOWETZ, die Ausführung der Papierchromatogramme Herrn VON ARX.

SUMMARY

The syntheses of the chain-homologues of hypertensin, H·Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH, H·Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro·OH, and H·Asp(R)-Arg-Val-Tyr-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH (R = –OH and –NH₂), are described in detail. A system for the nomenclature of such analogues is proposed. The relative stability of H·Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH, H·Gly-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH, and

H·Asp(R)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH in aqueous solution at 50° over a period of 6 months is discussed: the heptapeptide and Val⁶-hypertensin II are very stable under these conditions, but the asparaginy¹- and glycyl¹- compounds lose these residues to an extent of about 10%. A possible mechanism explaining the difference in the behaviour of the aspartyl and the asparaginy¹ residues is suggested.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

80. Deuterierung von Azulen

II. Kinetik der Bildung von 1,3-Dideuteroazulen in der Gasphase

von A. van Tets¹⁾ und Hs. H. Günthard

(11. II. 61)

1. Einleitung

In einer früheren Mitteilung²⁾ berichteten wir über die Darstellung von Azulen-d₂-(1,3) und die spektroskopische Charakterisierung dieses Isotops. Bei Versuchen zur Herstellung höher deuterierter Isotope stellten wir fest, dass das 1,3-Dideutero-Isotop auch durch Austausch mit schwerem Wasser in Gasphase entsteht, wobei sich die Kinetik des Austausches messen liess. Da sich hierbei als Zwischenstufe das Azulen-d₁-(1) spektroskopisch nachweisen liess, lässt sich für den Austauschprozess ein einfaches kinetisches Modell angeben. Unter den von uns angewandten Reaktionsbedingungen (grosser Wasserüberschuss) besteht dieses aus zwei konsekutiven Reaktionen 1. Ordnung.

In dieser Arbeit berichten wir über das kinetische Modell des Austausches in Gasphase bei 140° und das als Zwischenstufe auftretende d₁-Isotop. Ferner untersuchten wir den Austausch zwischen Azulen-d₂ und Azulen-d₀, welcher bei 100° in der Schmelze stattfindet und innert Stunden zum Gleichgewicht führt. Dieser Austausch wird durch geringe Mengen Wasser katalysiert und ist deshalb kaum reproduzierbar zu messen.

2. Experimentelles

2.1. *Substanzen.* Das Azulen wurde durch Chromatographie über Alox 1 neutral und anschließende Sublimation im Hochvakuum gereinigt. – Das verwendete *schwere Wasser* wies einen Reinheitsgrad von 99,5% auf.

2.2. Als *Ampullen* für die Austauschreaktion wurden Ampullen aus Pyrexglas benützt, welche auf 97,5 ml Inhalt geeicht wurden. Nach Reinigung mit Chrom-Schwefelsäure wurden sie mindestens eine Stunde mit analytischer 1N Natronlauge gekocht und nach gründlichem Spülen mit destilliertem Wasser zuerst im Ofen und nachher an der Hochvakuumapparatur getrocknet. – Für das Azulen wurden kleine Einfüllgläschen aus gewöhnlichem Glas auf die gleiche Weise gereinigt. In diesen wurde 12,8 mg undeutertes Azulen (0,1 mMol) auf 0,02 mg genau abgewogen und in die Ampulle gebracht. Nach Zugabe von 0,1 ml schwerem Wasser (5 mMol) wurde die Ampulle unter 0,01 Torr evakuiert und abgeschmolzen.

Bei zwei Versuchen wurden 30 g Pyrexglaspulver von mittlerer Korngrösse (0,5 mm) zugegeben, welches vorher mit Aceton und reinem Wasserdampf gereinigt worden war. Dies ent-

¹⁾ Teile der Dissertation von A. VAN TETS, ETH, Zürich.

²⁾ A. BAUDER & Hs. H. GÜNTHARD, *Helv.* 41, 889 (1958).