

dene praktische Hinweise und auch für die Überlassung von Vergleichssubstanzen sehr verbunden. Ferner sei auch Herrn A. SCHMID, Frau I. GINSIG-LEUPIN, Frl. B. SUTER und Frl. C. SCHÄER für ihre wertvolle Mithilfe bei der Durchführung der Versuche herzlich gedankt.

SUMMARY

1. Larvae of the wild type of *Drosophila melanogaster* and of two mutants («rosy» and «sepia») were fed with glycine-[2-¹⁴C], formate-[¹⁴C], glucose-[U-¹⁴C], glucose-(1-¹⁴C), glucose-(6-¹⁴C), fructose-[U-¹⁴C] and DL-lactate-[1-¹⁴C]. After the hatching of the flies isoxanthopterine, drosopterine, sepiapterine and uric acid were isolated by paper chromatography and their specific activities were determined. The carbon atoms 8 and 9 of the pyrazine ring were isolated as oxalic acid after degradation of the pterine with chlorine followed by acid hydrolysis (method of WIELAND & TARTTER). The pyrimidine ring is not attacked by this process. This procedure was tested by the degradation of the synthetic isoxanthopterines-[8-¹⁴C] and -[5-¹⁴C].

2. The experiments with glucose-[U-¹⁴C] and glucose-[1-¹⁴C] prove that carbon atoms of the glucose are specifically used to build up the pyrazine ring of the pteridines. They furnish the carbon atoms 8 and 9 of the pteridine skeleton.

3. After feeding glucose-[6-¹⁴C] the drosopterine, a pterine with a 3-carbon side chain, is much more active than isoxanthopterine.

4. These results are in accordance with the hypothesis suggested in a former paper (BRENNER-HOLZACH & LEUTHARDT): The glucose is transformed into ribose (by direct oxydation or through the pentose-phosphate-cycle). The pentose is used to form a purine nucleotide. After elimination of C-8 of the purine ring the ribosyl chain fixed in position 9 of the purine is directly incorporated in the pyrazine ring, the atoms 1 and 2 of ribose furnishing the carbons 8 and 9 of the pteridine nucleus, and the atoms 3, 4 and 5 furnishing the side chain.

5. We suggest that a pterine with side chain is the primary product of pteridine synthesis.

Aus dem Biochemischen Institut
der Universität Zürich

184. Synthese von Dab¹-Dab⁹-Bradykinin

von K. Vogler, R. O. Studer und W. Lergier

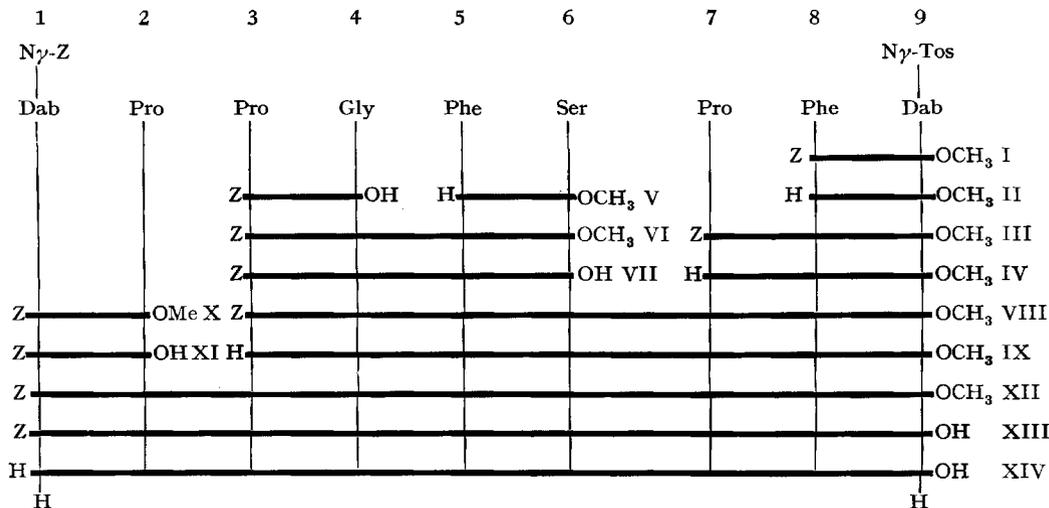
(6. VII. 61)

Bradykinin¹⁾, ein Nonapeptid mit blutdrucksenkenden Eigenschaften, das aus einer Globulinfraktion des Blutplasmas durch die Einwirkung von Enzymen gewonnen wird, erweckte im letzten Jahre das Interesse verschiedener Peptidsynthetiker-Gruppen. Dies liegt darin, dass einmal Bradykinin zu den pharmakologisch

1) M. ROCHA E SILVA, W. T. BERALDO & G. ROSENFELD, Amer. J. Physiol. 156, 261 (1949). – Dab = α, γ -Diaminobuttersäure. – M. ROCHA E SILVA, Biochemistry and Pharmacology of Bradykinin, in M. SCHACHTER, Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels (Pergamon Press, Oxford – London – New York – Paris 1960).

aktivsten Wirkstoffen²⁾ gehört, andererseits seine Konstitutionsaufklärung^{3) 4)} und Synthese⁴⁾ sozusagen gleichzeitig in brillanter Weise durch ELLIOTT und BOISSONNAS verwirklicht werden konnten.

Wir berichten im folgenden über die Synthese eines Analogons des Bradykinins, in dem die zwei endständigen L-Argininreste durch L- α,γ -Diaminobuttersäurereste ersetzt sind. Unser Syntheseweg unterscheidet sich sowohl vom ersten Aufbau des Nonapeptids⁴⁾, das als das Naturprodukt angesprochen wird⁵⁾, als auch von demjenigen eines Oktapeptids⁶⁾, das zuerst als Formel für natürliches Bradykinin vorgeschlagen und dessen Synthese von einzelnen auch publiziert⁷⁾ worden ist.



Aufbau-Schema

Alle Aminosäuren haben durchwegs die L-Konfiguration

Z = Benzylloxycarbonyl; Dab = α,γ -Diaminobutyryl; Tos = Tosyl

Nach unserem *Aufbau-Schema* wird Z-L-Phenylalanin⁸⁾ mit γ -Tos-L- α,γ -diaminobuttersäure-methylester⁹⁾ zum krist. Dipeptid I gekuppelt. Als Peptid-Knüpfungsreaktion verwendeten wir in dieser Arbeit konsequent die Carbodiimid-Methode nach

²⁾ D. F. ELLIOTT, E. W. HORTON & G. P. LEWIS, *J. Physiol.* **150**, 6 P (1960).

³⁾ D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS & E. HORTON, *Biochem. J.* **74**, 15 P (1959); D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS & E. HORTON, *Biochem. biophys. Res. Comm.* **3**, 87 (1960).

⁴⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P. A. JAQUENOUD, H. KONZETT & E. STÜRMER, *Experientia* **16**, 326 (1960); R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN & P. A. JAQUENOUD, *Helv.* **43**, 1349 (1960).

⁵⁾ H. KONZETT & R. A. BOISSONNAS, *Experientia* **16**, 456 (1960).

⁶⁾ D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS & E. HORTON, *Biochem. J.* **76**, 16 P (1960).

⁷⁾ R. SCHWYZER, W. RITTEL, P. SIEBER, H. KAPPELER & H. ZUBER, *Helv.* **43**, 1130 (1960); E. D. NICOLAIDES, H. A. DE WALD, PATRICIA G. SHORLEY & H. O. J. COLLIER, *Nature* **187**, 773 (1960); R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN & P. A. JAQUENOUD, *Helv.* **43**, 1481 (1960).

⁸⁾ W. GRASSMANN & E. WÜNSCH, *Chem. Ber.* **91**, 462 (1958).

⁹⁾ Hergestellt aus dem krist. Sulfat, vgl. K. VOGLER, P. LANZ, W. LERGIER & R. O. STUDER, *Helv.* **43**, 574 (1960).

SHEEHAN & HESS¹⁰). Durch Bromwasserstoff in Eisessig wird aus I das krist. Dipeptid-hydrobromid II erhalten. Kondensation von II mit Z-L-Prolin¹¹) lieferte uns das geschützte Tripeptid III in sehr guter Ausbeute und in kristallinem Zustande, während das mittels HBr/Eisessig decarboxylierte Tripeptid IV direkt als zähflüssiges Öl weiterverarbeitet wurde. Das krist. Dipeptid V wurde durch Hydrogenolyse aus dem von BOISSONNAS *et al.*⁴) bereits beschriebenen Z-L-Phe-L-Ser-OCH₃ bereitet, aus dem durch Kupplung mit dem bekannten Z-L-Pro-Gly-OH¹²) das geschützte Tetrapeptid VI in mässiger Ausbeute, aber in analysenreinem Zustande erhalten werden konnte. Die Esterverseifung zum Rohprodukt VII gelang mit der berechneten Menge Alkali in Methanol bei Zimmertemperatur. Sowohl das Heptapeptid VIII wie auch die aus VIII durch Hydrogenolyse erhaltene Heptapeptid-esterbase IX wurden als Rohprodukte erhalten. Die Konstitution von IX wurde durch UV.-Analyse¹³) der Schutzgruppen erwahrt. Das geschützte Dipeptid X wurde aus N^α-Z-N^γ-Z-L-Diaminobuttersäure¹⁴) und L-Prolin-methylester¹⁵) als Rohprodukt erhalten und durch Esterverseifung in XI übergeführt. Kondensation von XI mit der Heptapeptidbase IX in Acetonitril führte zu einem reinen, aber amorph aussehenden, allseitig geschützten Nonapeptid XII, das durch Esterverseifung mittels Alkali in Methanol in die reine Nonapeptidsäure XIII überging. Schliesslich wurden die Schutzgruppen mittels Na/NH₃ entfernt und das Endprodukt XIV erhalten. Dieses wurde durch 2malige multiplikative Verteilung nach CRAIG¹⁶) im System sek.-Butanol/Wasser/Eisessig 120:160:1 (Volumenverhältnis) über ca. 500 Stufen gereinigt (*K* = 0,27). Anschliessend erfolgte eine Fraktionierung an IRC-50-Ionenaustauscher, wobei die vollständige Entsalzung durch Elution mit 0,25-proz. Essigsäure gelang. Das so gereinigte Produkt wurde noch 2mal mittels abs. Äthanol/Essigester umgefällt und anschliessend im Hochvakuum bei 56° getrocknet. Man erhält auf diese Weise ein analysenreines Nonapeptid-trihydrochlorid als Trihydrat mit einem Drehwert von $[\alpha]_D^{25} = -73,5^\circ$ (*c* = 1,5 in Wasser).

Die Aminosäureanalyse nach STEIN & MOORE¹⁷) ergab nach einer Hydrolysedauer von 14 Std. (6N HCl) stimmende Werte¹⁸) für Dab, Gly, Phe und Ser, für Pro jedoch



Dab¹-Dab⁹-Bradykinin (XIV)

¹⁰) J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

¹¹) A. BURGER, J. KURTZ & E. KATCHALSKI, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5552 (1954); M. ZAORAL, *Chem. Listy* **48**, 1583 (1954).

¹²) H. N. RYDON & P. W. G. SMITH, *J. chem. Soc.* **1956**, 3642.

¹³) K. VOGLER, J. WÜRSCH, R. O. STUDER & P. LANZ, *Chimia* **14**, 379 (1960).

¹⁴) M. ZAORAL, J. RUDINGER & F. ŠORM, *Chem. Listy* **47**, 427 (1953).

¹⁵) ING. SCHUMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **35**, 2237 (1952). – Die freie Esterbase wurde nach HILLMANN, *Z. Naturforsch.* **1**, 682 (1946), hergestellt.

¹⁶) L. C. CRAIG, *Analytic. Chemistry* **22**, 1346 (1950).

¹⁷) ST. MOORE & W. H. STEIN, *J. biol. Chemistry* **192**, 663 (1951); **211**, 893 (1954).

¹⁸) Diese Bestimmungen verdanken wir Herrn Dr. R. WEBER, Org.-Chem. Institut der Universität Basel, der sie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. BRENNER ausgeführt hat.

nur 2,4 Einheiten. Die fehlenden Anteile wurden als NH_3 erfasst. Dies steht in Übereinstimmung zu der Beobachtung von ELLIOTT³⁾, wonach ein Teil des Prolins bei der Totalhydrolyse zerstört wird, jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von BOISSONAS *et al.*⁴⁾ bei ihrem synthetischen Produkt, wo 2,9 Pro-Reste gefunden wurden.

Das enzymatische Verhalten des synthetischen Dab¹-Dab⁹-Bradykinins deckt sich mit den Ergebnissen, die bei Bradykinin selbst⁸⁾ 19) beobachtet wurden. Nach einer Inkubationszeit von ca. 3 Std. wird mit Carboxypeptidase 1 Mol. α, γ -Diaminobuttersäure abgespalten, während das nachfolgende Phenylalanin nur sehr langsam angegriffen wird. Beim Prolin bleibt der Angriff der Carboxypeptidase stehen. Bei der Einwirkung von Chymotrypsin wird wieder nach ca. 1 Std. 1 Mol. α, γ -Diaminobuttersäure frei und der weitere Abbau ist stark verzögert.

Dab¹-Dab⁹-Bradykinin weist am isolierten Rattenuterus in Versuchen, die in unserer medizinischen Forschungsabteilung durch Frl. Dr. A. BESENDORF ausgeführt wurden, bis zu einer Konzentration von 10^{-4} keinerlei Aktivität auf.

Experimenteller Teil²⁰⁾

1) *Z-L-Phenylalanyl-N γ -Tos-L- α, γ -diaminobuttersäure-methylester (I)*. 18 g (0,06 Mol) Z-L-Phe-OH⁸⁾ und 17,3 g (0,06 Mol) H-N γ -Tos-L-Dab-OMe⁹⁾ werden in 200 ml Dioxan/Tetrahydrofuran 1:1 gelöst, bei -10° mit 12,4 g (0,06 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 16 Std. bei 0° aufbewahrt. Man nutschts vom Dicyclohexylharnstoff ab, verdampft das Lösungsmittel im Vakuum bei 45° und kristallisiert den Rückstand aus Essigester/Äther. Ausbeute 29 g (85%). Smp. 135–138°. Zur Analyse wurde aus Essigester umkristallisiert: Smp. 138–139°, $[\alpha]_D^{20} = -26,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$ in Dimethylformamid), ϵ bei $256 \text{ m}\mu = 808$, ber. 847 (Feinsprit, 40,35 mg%).

$\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}_7\text{N}_3\text{S}$ (567,64) Ber. C 61,36 H 5,86 N 7,40% Gef. C 61,50 H 5,95 N 7,43%

2) *L-Phenylalanyl-N γ -Tos-L- α, γ -diaminobuttersäure-methylester-hydrobromid (II)*. 28,3 g (0,05 Mol) Z-L-Phe-N γ -Tos-L-Dab-OCH₃ (I) werden mit 45 ml Bromwasserstoff/Eisessig (35-proz.) $1\frac{1}{2}$ Std. unter CaCl₂-Verschluss geschüttelt. Die Lösung wird 15 Min. im Vakuum entgast, mit abs. Äther ausgefällt, mehrmals mit frischem abs. Äther behandelt und zur Kristallisation bei 0° aufbewahrt. Man verreibt die erstarrte Masse unter abs. Aceton, nutschts ab, wäscht mit abs. Äther und trocknet im Vakuum bei 60° . Ausbeute 23,2 g (90%). Smp. 167–168° (Zers.). Zur Analyse wurde aus Methanol/Aceton/Äther umkristallisiert: Smp. 167–168° (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = +8,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$ in Wasser), ϵ bei $256 \text{ m}\mu = 620$, ber. 639 (Feinsprit, 61,3 mg%).

$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{N}_3\text{SBr}$ (514,43) Ber. C 49,03 H 5,49 N 8,17% Gef. C 48,75 H 5,76 N 7,83%

3) *Z-L-Protyl-L-phenylalanyl-N γ -Tos-L- α, γ -diaminobuttersäure-methylester (III)*. 21,6 g (42 mMol) H-L-Phe-N γ -Tos-L-Dab-OCH₃.HBr (II) werden in 50 ml Wasser gelöst, unter Eiszusatz mit konz. Ammoniak alkalisch gestellt und mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösung wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bei 45° eingedampft. Man löst das Harz in 200 ml Dioxan/Tetrahydrofuran 1:1, versetzt mit 10 g (0,04 Mol) Z-L-Pro-OH¹¹⁾ und bei -10° mit 8,3 g (0,04 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid und lässt 16 Std. bei 0° stehen. Der Dicyclohexylharnstoff wird abgenutscht, das Lösungsmittel im Vakuum bei 45° zum grössten Teil abdestilliert und von einer weiteren Menge Dicyclohexylharnstoff abgenutscht. Das Filtrat rührt man in eiskalter 0,1N Salzsäure aus, nutschts den Niederschlag ab, fällt noch einmal um aus Dimethylformamid/0,1N Ammoniak und Dimethylformamid/5-proz. Natriumchloridlösung und wäscht auf der Nutsche mit viel Wasser und Äther. Es wird im Vakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 24,3 g (90%). Smp. 159–161°. Zur Analyse wurde aus Alkohol/Äther und Methanol/Äther umkristallisiert: Smp. 162–164°, $[\alpha]_D^{20} = -47,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$ in Dimethylformamid), ϵ bei $256 \text{ m}\mu = 818$, ber. 847 (Feinsprit, 49,2 mg%).

$\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{N}_4\text{S}$ (664,75) Ber. C 61,42 H 6,07 N 8,43% Gef. C 60,95 H 6,07 N 8,52%

¹⁹⁾ H. ZUBER & R. JAQUES, *Helv.* 43, 1128 (1960).

²⁰⁾ Die Smp. sind korrigiert.

4) *L-Prolyl-L-phenylalanyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (IV)*. 20 g (0,03 Mol) Z-L-Pro-L-Phe-N γ -Tos-L-Dab-OCH₃ (III) werden mit 20 ml Bromwasserstoff/Eisessig (35-proz.) während 1½ Std. geschüttelt und anschließend 15 Min. im Vakuum entgast. Das Reaktionsprodukt wird mit abs. Äther ausgefällt, der Äther abdekantiert, das Harz in 60 ml Wasser gelöst und mehrmals mit Äther extrahiert. Unter Eiszusatz wird die wässrige Lösung mit konz. Ammoniak alkalisch gemacht, mehrmals mit Essigester extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum bei 45° zur Trockne verdampft und im Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 14 g (87%) glasiges Harz. Es wird ohne weitere Reinigung für den Heptapeptid-methylester VIII eingesetzt.

5) *L-Phenylalanyl-L-seryl-methylester-hydrochlorid (V)*. Man löst 11,2 g (28 mMol) Z-L-Phe-L-Ser-OCH₃⁴) in 200 ml Methanol, setzt 2,4 ml konz. Salzsäure und 2 g Palladium-Kohle (ENGELHARDT) zu und hydriert im Wasserstoffstrom mittels eines Vibromischers bis zur negativen CO₂-Reaktion. Der Katalysator wird abgenutscht, mit Methanol gewaschen und das Filtrat im Vakuum bei 40° bis zur Trockne verdampft. Die dabei beginnende Kristallisation wird durch Zusatz von Äther vervollständigt. Ausbeute 7 g (83%). Smp. 184–185°.

C₁₃H₁₉O₄N₂Cl (302,75) Ber. C 51,57 H 6,32 Cl 11,71% Gef. C 51,63 H 6,46 Cl 11,89%

6) *Z-L-Prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-serin-methylester (VI)*. 7 g (22 mMol) H-L-Phe-L-Ser-OMe, HCl (V) werden in 20 ml Dimethylformamid in der Kälte mit 3,2 ml Triäthylamin geschüttelt und abgenutscht. Im Filtrat löst man 7 g (22 mMol) Z-L-Pro-Gly-OH¹²), fügt 20 ml Tetrahydrofuran und bei –10° 4,6 g (22 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid zu und bewahrt 16 Std. bei 0° auf. Es wird vom Dicyclohexylharnstoff abgenutscht, das Filtrat im Vakuum und Hochvakuum bei 50° zur Trockne verdampft, der Rückstand in Essigester mit 1N Salzsäure, Wasser, 1N Ammoniak und Wasser gewaschen, dann über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bei 45° eingedampft. Der entstandene Schaum wird aus Essigester/Äther ausgefällt. Ausbeute 5 g (41%). Zur Analyse wurde noch einmal aus Essigester/Äther umgefällt: Smp. 107–109°, ϵ bei 256 m μ = 407, ber. 394 (Feinsprit, 61,55 mg%).

C₂₈H₃₄O₈N₄ (554,58) Ber. C 60,69 H 6,18 N 10,10% Gef. C 60,52 H 6,05 N 10,22%

7) *Z-L-Prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-serin (VII)*. 13,9 g (25 mMol) Z-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-OCH₃ (VI) werden in 250 ml Methanol gelöst, mit 27,5 ml 1N Natronlauge versetzt und 16 Std. bei 20° geschüttelt. Das pH der Lösung wird mit 3N Salzsäure auf 6 eingestellt und darauf das Methanol im Vakuum bei 45° auf 1/3 des ursprünglichen Volumens abdestilliert. Man säuert mit konz. Salzsäure an, extrahiert mit Essigester und wäscht mit 5-proz. Natriumchloridlösung. Die Essigesterlösung wird mehrmals mit 1N Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, die wässrigen, alkalischen Lösungen wäscht man mit Essigester, stellt mit konz. Salzsäure kongosauer, extrahiert wieder mit Essigester und wäscht mit 5-proz. Natriumchloridlösung. Die Extraktion mit Natriumhydrogencarbonat, das Ansäuern und Extrahieren mit Essigester wird noch einmal wiederholt, die Essigesterlösung über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bei 45° eingedampft. Der Rückstand wird aus Dioxan/Petroläther 2mal umgefällt und das amorphe Pulver im Vakuum und Hochvakuum bei 45° getrocknet. Ausbeute 10,1 g (74%), ϵ bei 256 m μ = 432, ber. 395 (Feinsprit, 81,13 mg%). Der Untergrund im UV. lässt auf eine Verunreinigung schliessen. Ohne weitere Reinigung wurde diese Substanz für den Heptapeptid-methylester VIII eingesetzt.

8) *Z-L-Prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-prolyl-L-phenylalanyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (VIII)*. 9,7 g (18 mMol) Z-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-OH (VII) und 9,5 g (18 mMol) H-L-Pro-L-Phe-N γ -Tos-L-Dab-OMe (IV, Rohprodukt) werden in 50 ml Dimethylformamid bei –10° mit 3,72 g (18 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 24 Std. bei 0° aufbewahrt. Man nutscht den Dicyclohexylharnstoff ab und destilliert das Dimethylformamid im Hochvakuum bei 45°. Der Rückstand wird in Essigester gelöst, je 3mal mit 1N Salzsäure, 5-proz. Natriumchloridlösung, 1N Ammoniak und 5-proz. Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Man verdampft den Essigester im Vakuum bei 45°, fällt den Rückstand aus Essigester mit Petroläther aus und trocknet im Vakuum und Hochvakuum bei 50°. Ausbeute 15,4 g (81%). Auch diese Substanz weist im UV. den gleichen Untergrund wie das unreine Ausgangsmaterial VII auf. Da bei der nachfolgenden hydrogenolytischen Abspaltung des Benzyl-oxy-carbonylrestes diese Verunreinigung eliminiert werden kann, wurde das erhaltene Rohprodukt nicht weiter gereinigt.

9) *L-Prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-prolyl-L-phenylalanyl-N γ -Tos-L- α,γ -diaminobuttersäure-methylester (IX)*. 6,95 g (6,6 mMol) Z-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-L-Pro-L-Phe-N γ -Tos-L-Dab-OCH₃ (VIII, Rohprodukt) werden in 140 ml Methanol und 0,65 ml konz. Salzsäure gelöst, mit 2 g Palladium-Kohle (ENGELHARDT) versetzt und im Wasserstoffstrom mittels eines Vibromischers hydriert. Bis zur negativen CO₂-Reaktion musste der Katalysator 2mal ersetzt werden. Nach dem Abnutschen wird das Filtrat im Vakuum bei 45° verdampft und der Rückstand 2mal mit frischem Methanol eingedampft. Man löst das Harz in 30 ml Wasser, filtriert, extrahiert 2mal mit Essigester, stellt die wässrige Lösung mit konz. Ammoniak alkalisch, schüttelt sie mehrmals mit Essigester aus und wäscht die Essigesterextrakte mit 5-proz. Natriumchloridlösung. Die über Natriumsulfat getrocknete Essigesterlösung wird im Vakuum bei 45° zur Trockne verdampft und der bläsige Schaum 16 Std. bei 20° im Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 4,5 g (60%), ϵ bei 256 m μ = 808, ber. 826 (Feinsprit, 81 mg%).

10) *N α -Z-N γ -Z-L- α,γ -Diaminobutyryl-L-prolin-methylester (X)*. 15,4 g (0,04 Mol) N α -Z-N γ -Z-L-Dab-OH¹⁴ und 5,17 g (0,04 Mol) H-L-Pro-OCH₃¹⁵ in 50 ml Acetonitril werden bei -10° mit 8,27 g (0,04 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 24 Std. bei 0° aufbewahrt. Nach Abnutschen des Dicyclohexylharnstoffes wird das Filtrat im Vakuum bei 45° eingedampft. Der verbleibende Sirup wird in Essigester gelöst, mit 1N Salzsäure, Wasser, 1N Ammoniak und 5-proz. Natriumchloridlösung neutralgewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum bei 40° eingedampft und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Man erhält 17,5 g (88%) zähflüssiges Öl. Es wurde ohne weitere Reinigung verseift.

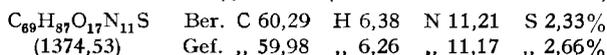
11) *N α -Z-N γ -Z-L- α,γ -Diaminobutyryl-L-prolin (XI)*. 17,5 g (35 mMol) N α -Z-N γ -Z-L-Dab-L-Pro-OCH₃ (XI, Rohprodukt) werden in 175 ml Methanol gelöst, mit 38,5 ml 1N Natronlauge während 2 Std. verseift, mit 1N Salzsäure auf ein pH von 6 eingestellt und im Vakuum bei 40° auf 1/3 des ursprünglichen Volumens eingedampft. Nach Ansäuern mit konz. Salzsäure wird mit Essigester extrahiert und mit Wasser gewaschen. Nun wird die Essigesterlösung mehrmals mit 1N Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgezogen und die wässrigen Lösungen mit Essigester gewaschen. Die vereinigten wässrigen Lösungen werden mit konz. Salzsäure kongosauer gestellt, mit Essigester extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die Extraktion mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung, das Ansäuern und die Extraktion mit Essigester wird noch einmal wiederholt. Die Essigesterlösung wird nach Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum bei 45° eingedampft und das verbleibende Harz im Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 12,4 g (73%). Es wird in diesem Zustand für den Nonapeptid-methylester XII eingesetzt.

12) *N α -Z-N γ -Z-L- α,γ -Diaminobutyryl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-prolyl-L-phenylalanyl-N γ -Tos-L- α,γ -diaminobuttersäure-methylester (XII)*. 2,42 g (5 mMol) N α -Z-N γ -Z-L-Dab-L-Pro-OH (XI, Harz) und 4,6 g (5 mMol) H-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-L-Pro-L-Phe-N γ -Tos-L-Dab-OCH₃ (IX) werden in 70 ml Acetonitril bei -5° mit 1,04 g (5 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 16 Std. bei 0° belassen. Nach Abnutschen des Dicyclohexylharnstoffes wird das Filtrat im Vakuum bei 40° zur Trockne verdampft, der Rückstand in Essigester gelöst und mit 1N Salzsäure, Wasser, 1N Ammoniak und 10-proz. Natriumchloridlösung neutralgewaschen. Die über Natriumsulfat getrocknete Essigesterlösung ergibt nach dem Eindampfen einen bläsigen Schaum. Er wird aus Essigester in Äther ausgerührt. Ausbeute 5,3 g (76%). Zur Analyse wurde nochmals in gleicher Weise umgefällt. $[\alpha]_D^{20} = -54,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in Dimethylformamid), ϵ bei 256 m μ = 1247, ber. 1242 (Feinsprit, 60,85 mg%). Die Substanz enthält noch 2,14% Wasser (Titration nach K. FISCHER). Die Elementaranalyse ist auf wasserfreie Substanz umgerechnet.

C ₇₀ H ₈₀ O ₁₇ N ₁₁ S	Ber. C 60,54	H 6,46	N 11,10	S 2,31%
(1388,56)	Gef. „ 60,83	„ 6,35	„ 11,09	„ 2,56%

13) *N α -Z-N γ -Z-L- α,γ -Diaminobutyryl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-prolyl-L-phenylalanyl-N γ -Tos-L- α,γ -diaminobuttersäure (XIII)*. 4,85 g (3,5 mMol) XII werden in 100 ml Methanol mit 5,3 ml 1N Natronlauge während 24 Std. verseift, im Vakuum bei 30° auf ein Volumen von 10 ml eingengt, mit 50 ml Wasser verdünnt und filtriert. Nun wird das Filtrat in eiskalter 0,1N Salzsäure ausgerührt, der Niederschlag nach 1 Std. abgenutscht und mit viel Wasser gewaschen. Es wird nochmals aus Methanol/Wasser umgefällt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 3,9 g (81%), ϵ bei 256 m μ = 1280, ber. 1242 (Feinsprit, 60,5 mg%). Zur Analyse wurde noch einmal aus Methanol/Äther umgefällt. $[\alpha]_D^{20} =$

– 56° ± 1° ($c = 2,1$ in Dimethylformamid), ϵ bei 256 $m\mu = 1270$, ber. 1242 (Feinsprit, 60,85 mg%). Die Substanz enthält noch 1,69% Wasser (Titration nach K. FISCHER).

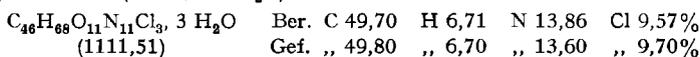


14) *L*- α , γ -Diaminobutyryl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-phenylalanyl-*L*-seryl-*L*-prolyl-*L*-phenylalanyl-*L*- α , γ -diaminobuttersäure (XIV). 5,3 g XIII werden in 200 ml flüssigem Ammoniak mit Natrium reduziert (15 Min., bestehende Blaufärbung), portionenweise mit der dem verbrauchten Natrium äquivalenten Menge Ammoniumchlorid versetzt und danach das Ammoniak verdampft. Nach 1stdg. Entgasen des Rückstandes im Vakuum bei 20° wird mit 20 ml Wasser gelöst, mit 3*N* Salzsäure auf ein pH von 6 eingestellt, filtriert und lyophilisiert.

15) *Reinigung des Endproduktes*. – a) *Gegenstrom-Verteilung*. Das salzhaltige Reduktionsrohprodukt von 5,3 g geschützter Nonapeptidsäure wurde einer multiplikativen Verteilung über 450 Stufen im System sek.-Butanol/Wasser/Eisessig, 120:160:1 (Vol.-Verhältnisse) unterworfen. Die Hauptfraktion mit einer Verteilungszahl von ca. 0,3 wurde nach Eindampfen im Hochvakuum und Gefriertrocknen im gleichen System noch einmal über 500 Stufen verteilt. Die Kontrolle der Verteilung erfolgte spektrophotometrisch mit FOLIN-DENIS-Reagens²¹⁾ und durch Papier- bzw. Dünnschicht-Chromatographie. Die vereinigten Gläscheninhalte mit der Hauptfraktion ($K = 0,27$) wurden im Hochvakuum bei 30° auf das halbe Volumen konzentriert und anschliessend lyophilisiert; es resultierten ca. 2,5 g eines leicht bräunlichen Pulvers.

b) *Ionenaustauscher-Chromatographie*. 400 mg obiger Fraktion wurden als wässrige Lösung mit pH 7 auf eine Säule (15 × 250 mm) mit Amberlite IRC-50 XE 64 gebracht und diese zuerst mit Wasser bis zur Chlorionen-Freiheit gewaschen. Sobald das Eluat wieder ein pH von 6–7 aufwies, wurde mit 500 ml 2,5-proz. Essigsäure und anschliessend mit 200 ml Wasser nachgewaschen, mit 0,1*N* HCl eluiert und sofort lyophilisiert. Ein Teil des Peptides trat bereits mit der 2,5-proz. Essigsäure aus der Säule aus. Dieses Eluat wurde daher nach der Gefriertrocknung ein zweites Mal, wie oben, chromatographiert, jedoch unter Verwendung von 0,25-proz. Essigsäure; dabei blieb die Hauptfraktion des Peptides bis zur Elution mit 0,1*N* HCl am Harz fixiert. Die vereinigten HCl-Eluate ergaben nach der Gefriertrocknung 350 mg einer leicht gelbstichigen Substanz.

c) *Umfällen*. Das Ionenaustauscher-Präparat (350 mg) wurde 2mal aus abs. Äthanol/Essigester umgefällt und 14 Std. im Hochvakuum bei 56° getrocknet. Man erhielt 250 mg analysenreines Nonapeptid (Trihydrochlorid-trihydrat) in Form eines weissen, feinkörnigen und hygroskopischen Pulvers. Aus den vereinigten Mutterlaugen konnten noch 50 mg Substanz gewonnen werden. $[\alpha]_D^{25} = -73,5^\circ$ ($c = 1,5$ in H_2O).



Das Nonapeptid verhält sich sowohl papierchromatographisch wie in der Dünnschichtchromatographie einheitlich, Rf-Wert = 0,56 (n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 [Vol.-Teile]). Bei der Hochspannungs-Papierelektrophorese beträgt die Laufstrecke 12 cm; Verunreinigungen werden keine beobachtet. Die experimentellen Bedingungen für die Papier- bzw.

Resultate der Aminosäureanalyse

Aminosäure	Ber.	Gefunden auf ein Molgewicht von 1111,5			
		14 h	rel. Fehler	24 h	rel. Fehler
Dab	2,0	2,03	± 0,06	1,91	± 0,06
NH ₃	0	0,80	± 0,02	0,78	± 0,02
Ser	1,0	0,87	± 0,01	0,85	± 0,01
Pro	3,0	2,42	± 0,04	2,34	± 0,04
Gly	1,0	0,87	± 0,007	0,87	± 0,007
Phe	2,0	2,08	± 0,03	2,06	± 0,03

²¹⁾ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARN & ROSE J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* 193, 265 (1951).

Dünnschicht-Chromatographie, die Papierelektrophorese und für die Drehungsmessung sind bereits früher beschrieben worden²²⁾.

Die quantitative Ninhydrinbestimmung zur Erfassung der Anzahl der freien Aminogruppen ergab einen Wert von $2,9 \pm 10\%$, in Übereinstimmung mit der Chloranalyse (3 HCl). Die Bestimmungen wurden mit dem für Aminosäure-Analysen viel gebrauchten Ninhydrin-Hydrindanting-Reagens pH 4,7 (s. z. B. BOISSONNAS²³⁾) durchgeführt. Die Erhitzungszeit im kochenden Wasserbad betrug 45 Min. Der Auswertung wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass die N-terminale Dab des Nonapeptides die gleiche Farbausbeute wie die freie Dab gibt. (Der Extinktionskoeffizient für Dab bei 570 m μ beträgt, bezogen auf Leucin, 1,1.)

Die Aminosäureanalyse nach STEIN & MOORE¹⁷⁾ wurde bei 110° in 6N HCl unter O₂-Ausschluss sowohl nach einer Hydrolysedauer von 24 als nach 14 Std. durchgeführt¹⁸⁾, wobei die Resultate (Tabelle) innerhalb der Fehlergrenze blieben. Prolin wurde erwartungsgemäss mit 2,4 Mol zu wenig gefunden, dagegen fand man 0,8 Mol NH₃, das grösstenteils aus der Zersetzung von Pro, Ser und Gly stammen dürfte. Es scheint, dass Pro in den ersten Stunden der Hydrolyse eine Zersetzung erleidet, die dann für den weiteren Verlauf der Verseifung konstant bleibt.

16) *Abbau-Reaktionen.* – a) *Dinitrophenylierung und Hydrolyse des DNP-Peptides.* 2 μ Mol des Nonapeptides wurden nach SANGER²⁴⁾ mit Dinitrofluorbenzol in wässriger, 1-proz. Trimethylaminlösung, unter Zusatz des gleichen Volumens Alkohol, dinitrophenyliert und das extrahierte DNP-Peptid in 5,7N HCl 14 Std. bei 110° hydrolysiert. Die mit sek.-Butanol extrahierten DNP-Aminosäuren wurden dünnschichtchromatographisch in n-Butanol, gesättigt mit 0,1-proz. Amiak, sowie papierchromatographisch nach BLACKBURN & LOWTHER²⁵⁾ identifiziert. Als Hauptkomponente wurde Bis-DNP-Dab gefunden, entsprechend der Konstitution des Nonapeptides, neben sehr wenig γ -DNP-Dab.

b) *Einwirkung von Carboxypeptidase.* 10 μ Mol des Nonapeptides wurden in 0,3 ml Bicarbonatpuffer (pH 8,5) gelöst und 0,2 μ Mol Carboxypeptidase, 3 mal kristallisiert, in Form einer wässrigen Suspension (MANN RESEARCH LAB., New York) beigefügt. Während der Inkubation bei 25° wurden nach 1/2, 1, 3, 5, 9, 24 und 36 Std. aliquote Proben von je 0,05 ml entnommen, mit Ameisensäure sofort angesäuert und im Vakuum über KOH eingedampft. Nach Lösen in 0,1 ml Wasser wurden je 2 μ l im Laufmittel n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 papierchromatographiert. Bereits nach 30 Min. erschien ein deutlicher Dab-Fleck, der rasch stärker wurde; etwa zwischen 3 und 6 Std. wurde ca. 1 Mol Dab freigesetzt (semiquantitative Ermittlung aus der Farbintensität der Flecke). Die Anwesenheit einer zusätzlichen funktionellen Gruppe in der C-terminalen Seitenkette hemmt in der Regel die Hydrolysenrate stark; die relativ rasche Abspaltung von Dab ist wohl darauf zurückzuführen, dass auch die zweitletzte Aminosäure – hier das «günstige» Phe – noch Einfluss auf die Hydrolysenrate hat. Nach 30 Min. ist papierchromatographisch noch kein Phe nachweisbar, nach 1 und 3 Std. sind die Phe-Flecke immer noch sehr schwach und ihre Farbintensität (Ninhydrin) nimmt bis 24 Std. Enzymeinwirkung nur langsam zu. Phe, sonst eine für Carboxypeptidase «günstige» Aminosäure, wird stark verzögert freigesetzt, wenn ihm ein Prolylrest benachbart ist.

Ausser Dab und Phe (C-terminale Sequenz Phe-Dab-OH) werden keine weiteren Aminosäuren freigesetzt; der Abbau stoppt vollständig beim Pro.

c) *Spaltung mit Chymotrypsin.* 2 mg Nonapeptid und 10 mg Chymotrypsin (3mal kristallisiert, MANN RESEARCH LAB., New York) wurden in 0,2 ml pH-8,5-Puffer gelöst. Während der Inkubation (25°) wurden periodisch Proben von 2 μ l direkt auf ein Chromatographie-Papier aufgetragen, wobei jeweils die Enzymwirkung durch kurzes Begasen des feuchten Startflecks mit HCl unterbrochen wurde. Bereits nach 30 Min. Einwirkung erschien auf dem entwickelten Papierchromatogramm freie Dab; zwischen 1 und 3 Std. wurde ca. 1 Mol Dab abgespalten (semiquantitative Ermittlung durch Vergleichsflecke), während die weitere Hydrolyse deutlich langsamer erfolgte, bzw. erst ab ca. 3 Std. Inkubation einsetzte.

Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. A. DIRSCHERL) ausgeführt.

²²⁾ K. VOGLER, R. O. STUDER, W. LERGIER & P. LANZ, *Helv.* **43**, 1751 (1960).

²³⁾ R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **33**, 1975 (1950).

²⁴⁾ F. SANGER, *Biochem. J.* **39**, 507 (1945).

²⁵⁾ S. BLACKBURN & A. G. LOWTHER, *Biochem. J.* **48**, 126 (1951).

SUMMARY

Dab¹-Dab⁹-bradykinin (Dab-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Dab) has been prepared by a new procedure which differs from known syntheses of bradykinin. Against carboxypeptidase and chymotrypsin this synthetic analogue of bradykinin behaves in a way similar to that of the natural hormone, but it does not exhibit any pharmacological activity on the isolated rat uterus.

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

185. Über die Alkaloide von *Pleiocarpa mutica* BENTH.

1. Mitteilung

von **W. G. Kump** und **H. Schmid**

(5. VII. 61)

Das Genus *Pleiocarpa* gehört der Subtribus *Pleiocarpinae* der Familie der Apocynaceen an. Zur selben Subtribus gehören *Picalima nitida* (STAFF) TH. et H. DURAND und das Genus *Hunteria* ROXB. Nach RAYMOND-HAMET¹⁾ enthalten die Wurzeln von *Pleiocarpa tubicina* STAFF Alkaloide; ein wässriger Extrakt dieses Pflanzenmaterials besitzt hypotensive Aktivität. DOUGLAS & KIANG²⁾ berichten, dass Blätter und Samen der mit *P. tubicina* taxonomisch sehr nahe verwandten *P. mutica* BENTH. Alkaloide enthalten. Dasselbe gilt für die Wurzeln dieser Pflanze: Nach TSAO *et al.*³⁾ zeigen wässrige und besonders Essigester-Extrakte des Wurzelmaterials deutliche blutdrucksenkende Aktivität. Über die Isolierung von reinen *Pleiocarpa*-Alkaloiden wurde in der Literatur noch nichts berichtet.

Für unsere eigenen Untersuchungen standen uns Wurzeln von *P. mutica* BENTH., die aus dem Gebiet des ehemaligen belgischen Kongo stammten, zur Verfügung. Das Pflanzenmaterial wurde mit 90-proz., essigsäurehaltigem Methanol ausgezogen und anschliessend der Extrakt in der im experimentellen Teil näher beschriebenen Weise in einen «Neutralteil», eine Fraktion schwacher Basen, eine Fraktion starker Basen, und in Form der Reineckate in eine Fraktion quartärer Basen aufgeteilt. Die «Neutralfraktion» war gewichtsmässig am bedeutendsten; sie enthielt neben Neutralstoffen einen essentiellen Teil der in der Droge vorkommenden Alkaloide. Näher untersucht wurden bisher die «Neutralfraktion» und die Fraktion der «Schwachen Basen». Durch Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxyd und an Kieselgel und, wo notwendig, fraktionierte Kristallisation der Pikrate gelang es, acht Alkaloide in reiner Form zu isolieren. Ihre Namen, Bruttoformeln und wichtigsten Eigenschaften sind in den Tabellen 1, 2 und 3 aufgeführt.

¹⁾ M. RAYMOND-HAMET, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 244, 2991 (1957).

²⁾ A. K. KIANG & B. DOUGLAS, Malayan Pharm. Journ. 6, 138 (1957).

³⁾ D. P. N. TSAO, J. A. ROSECRANS, J. J. DE FEO & H. W. YOUNGKEN, Economy Botany 15, 99 (1961).