

Untersuchung natürlicher Vitamin-A- und -A₂-Konzentrate mit Vorteil verwenden lassen wird, so insbesondere bei der weiteren Untersuchung des Sehpurpurs verschiedener Lebewesen.

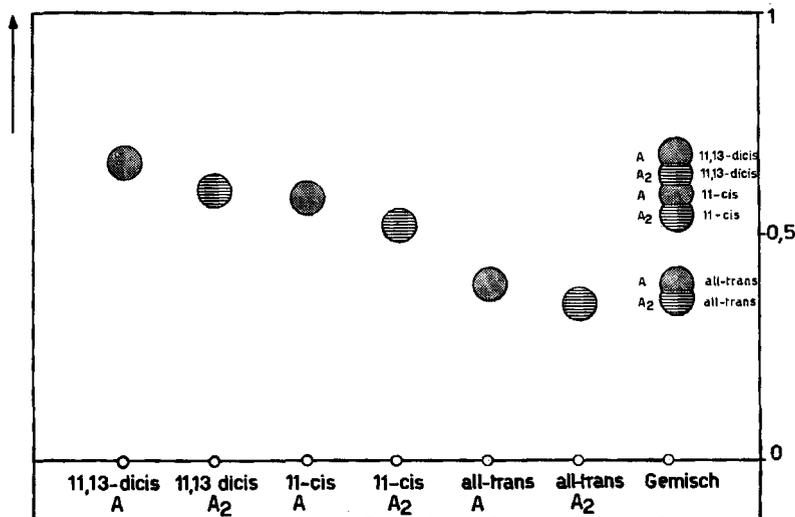


Fig. 7. Dünnschichtchromatographie der gehinderten Vitamin-A- und -A₂-Verbindungen (Laufmittel: Petroläther (40–45°):Methylheptenon 11:2)

Dem Vorsteher des physikalischen Institutes der Universität Basel, Herrn Prof. P. HUBER, möchten wir für die Überlassung der hochauflösenden Kernresonanzapparatur für die Kernresonanzmessungen bestens danken.

SUMMARY

The physical properties of 6 vitamin A₂ isomers are reported and compared with those of the corresponding vitamin A isomers.

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

66. Synthese des Bradykininanalogen mit umgekehrter Aminosäuresequenz

von K. Vogler, P. Lanz und W. Lergier

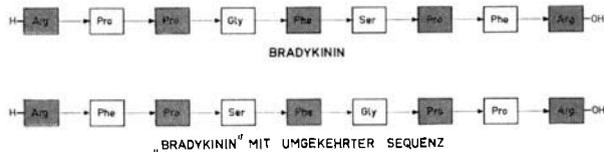
(12. I. 62)

Im folgenden soll über die Synthese eines chemischen Analogons des Bradykinins¹⁾ berichtet werden, in dem die umgekehrte Aminosäuresequenz gegenüber dem Naturprodukt vorliegt. Da in der konventionellen Schreibweise²⁾ die Orientierung der

¹⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN & P. A. JAQUENOUD, *Helv.* **43**, 1349 (1960); D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS & E. W. HORTON, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **3**, 87 (1960).

²⁾ International Union of Pure and Applied Chemistry Appendix B to Information Bulletin Nr. 12.

Peptidbindung immer im Sinne von $-\text{CONH}-$ (\rightarrow) angegeben wird, d. h. das Aminoende links, das Carboxylende rechts geschrieben wird, kann unser neues Syntheseprodukt als Nonapeptid mit der Sequenz des Bradykinins aufgefasst werden, wenn es im umgekehrten Sinne von rechts nach links gelesen wird (s. Fig.).



Das Besondere an dieser Struktur liegt nun nicht darin, dass rechts und links vertauscht ist. Vielmehr existiert im Bradykinin eine gewisse Symmetrie des Aufbaus, die es mit sich bringt, dass fünf Aminosäuren, die in obiger Fig. besonders hervorgehoben sind, alternierend in beiden Strukturen übereinstimmen. Diese Übereinstimmung betrifft vor allem auch die endständigen Argininreste, die dem Naturprodukt einen besondern Charakter verleihen. Wir fanden es der Mühe wert, dieses Analogon zu synthetisieren und biologisch prüfen zu lassen, da unseres Wissens ein derartiges Experiment bei einem Polypeptid-Wirkstoff noch nicht unternommen worden ist.

Unser Aufbauschema gliedert sich in die Synthese von drei Tripeptiden, die vom Aminoende her nacheinander zum Nonapeptid verknüpft werden. Als Peptid-Kupplungsreagens verwendeten wir durchwegs Dicyclohexyl-carbodiimid³⁾. Besonders günstig bei der Verknüpfung unserer drei Tripeptide ist der Umstand, dass an den Carboxylenden der Sequenzen Arg-Phe-Pro und Ser-Phe-Gly je eine zur Vermeidung der partiellen Racemisierung günstige Aminosäure⁴⁾ liegt, nämlich Prolin und Glycin.

$\text{N}^\alpha\text{-Z-N}^\omega$ -Nitro-L-arginyl-L-phenylalanyl-L-prolin-methylester (I) erhielten wir aus dem bereits beschriebenen $\text{N}^\alpha\text{-Z-N}^\omega$ -Nitro-L-arginyl-L-phenylalanin⁵⁾ und L-Prolin-methylester⁶⁾ in kristalliner Form. Der ϵ -Wert bei λ_{max} 268 $\text{m}\mu$ in Feinsprit wurde zu 16400 gemessen, während an reinem Nitroarginin als Modells substanz ein Wert von 15200 und an Nitroguanidin⁷⁾ bei λ_{max} 15300 gefunden wurde. Die Verseifung zur Tripeptidsäure II gelingt in methanolischer Natronlauge bei Raumtemperatur.

Die Synthese des zweiten Tripeptides Ser-Phe-Gly wird vom Carboxylende her in Angriff genommen. Zu diesem Zwecke wird der Dipeptidester III aus den Komponenten Z-L-Phenylalanin⁸⁾ und Glycin-methylester-hydrochlorid⁹⁾ in Acetonitril ge-

³⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

⁴⁾ ROBERT SCHWYZER, XVII. Int. Kongress für reine und angewandte Chemie, Bd. 2, 130 (1957).

⁵⁾ K. HOFMANN, A. RHEINER & W. D. PECKHAM, J. Amer. chem. Soc. 75, 6083 (1953).

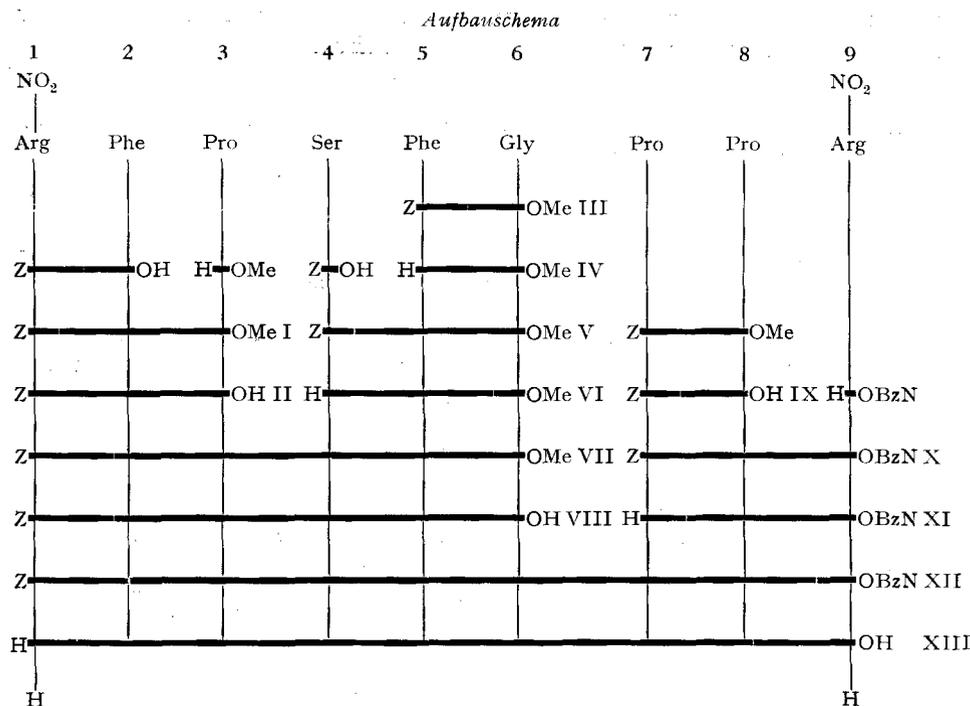
⁶⁾ ING. SCHUMANN & R. A. BOISSONNAS, Helv. 35, 2237 (1952). — Die freie Esterbase wurde nach HILLMANN, Z. Naturforsch. 7, 682 (1946), hergestellt.

⁷⁾ W. A. SCHROEDER *et al.*, Analyt. Chemistry 23, 1740 (1951). Der ϵ -Wert von I enthält noch einen bei 268 $\text{m}\mu$ nicht genau bestimmbarer Anteil des Carbobenzyloxy- und Phenylalanin-Restes, vgl. Fussnote 10, so dass die Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert unter Berücksichtigung dieser Korrektur besser wird.

⁸⁾ W. GRASSMANN & E. WÜNSCH, Chem. Ber. 91, 462 (1958); E. P. GROMERS & J. F. AHRENS, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 78, 558 (1959).

⁹⁾ T. CURTIUS & J. GÖBEL, J. prakt. Chem. [2] 37, 159.

wonnen. Hier ist die Übereinstimmung im ϵ -Wert bei λ_{max} 257 $m\mu$ mit dem berechneten Wert¹⁰⁾ sehr gut; dies trifft auch für die Derivate V, VI und IX zu (vgl. Experimenteller Teil). Die Decarbobenzoylierung zu IV gelingt mit HBr/Eisessig. Dieses Zwischenprodukt wird ohne weitere Reinigung zum kristallisierten, analysenreinen Z-Tripeptidester V verarbeitet und daraus durch katalytische Hydrierung mit Pd das kristalline Derivat VI erhalten.



Alle Aminosäuren haben durchwegs die L-Konfiguration; Z = Benzyloxycarbonyl;
OBzN = *p*-Nitrobenzyl.

Aus II und VI wird weiter in Dimethylformamid/Acetonitril das geschützte Hexapeptid VII bereitet und daraus durch alkalische Esterverseifung die geschützte Hexapeptidsäure VIII gewonnen.

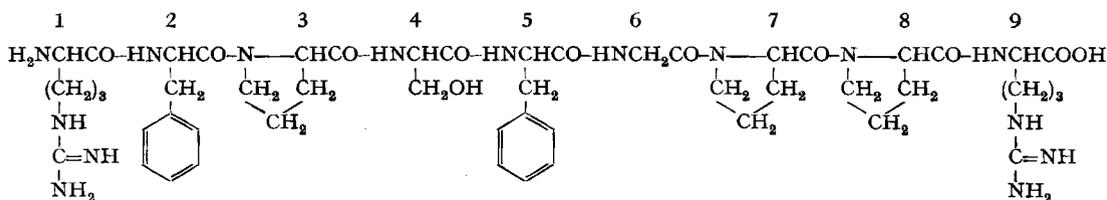
Das dritte Tripeptid Pro-Pro-Arg wird wieder vom Aminoende her bereitet, und zwar wird aus dem bekannten Z-L-Prolin¹¹⁾ und L-Prolin-methylester⁶⁾ in einem Arbeitsgang die analysenreine Dipeptidsäure IX erhalten. Letztere lässt sich mit N^ω-Nitro-L-arginin-*p*-nitrobenzylester¹²⁾ zum geschützten Tripeptidester X kuppeln, aus welchem mittels HBr/Eisessig nach BOISSONNAS XI als Rohprodukt resultiert. Durch die Kondensation der Hexapeptidsäure VIII mit XI gelingt schliesslich die Herstellung des geschützten Nonapeptids XII, das ohne besondere Reinigung zum freien Nonapeptid-trihydrochlorid hydriert wird (XIII).

¹⁰⁾ K. VOGLER, J. WÜRSCH, R. O. STUDER & P. LANZ, *Chimia* 14, 379 (1960).

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

¹²⁾ H. SCHWARZ & K. ARAKAWA, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 5691 (1959).

Das Syntheseendprodukt wurde durch multiplikative Verteilung über 400 Stufen im System n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 8:2:1:9 (Vol.-Verhältnisse) gereinigt, die Hauptfraktion davon aus Äthanol/Essigester umgefällt und in Form eines farblosen Lyophilisates als Hexahydrat mit $[\alpha]_D^{25} = -98,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,35$ in Wasser) gewonnen. Es verhält sich papierchromatographisch in drei Systemen und papierelektrophoretisch einheitlich und wurde überdies durch Totalhydrolyse und Bestimmung der Aminosäuren sowie durch Totalanalyse charakterisiert. Der enzymatische Abbau mit Chymotrypsin und Carboxypeptidase ist im Studium.



XIII «Bradykinin» mit umgekehrter Aminosäure-Sequenz

Die biologische Prüfung unseres Nonapeptids verdanken wir Herrn Dr. W. HAEFELY. Bis zu einer Konzentration von 10^{-5} wurde am isolierten Meerschweinchen-Ileum keinerlei Bradykininaktivität gefunden.

Experimenteller Teil ¹³⁾

N α -Z-N ω -Nitro-L-arginyl-L-phenylalanyl-L-prolin-methylester (I). 15,4 g (0,03 Mol) *N α -Z-(NO₂)-L-Arg-L-Phe-OH*⁵⁾, 3,9 g (0,03 Mol) *L-Pro-OCH₃*⁶⁾ und 6,21 g (0,03 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid werden in 45 ml Dimethylformamid bei -10° umgesetzt und 16 Std. bei 0° aufbewahrt. Man nutschts vom Dicyclohexylharnstoff ab und rührt das Filtrat in 500 ml 5-proz. NaCl-Lösung aus. Nach 2 Std. wird die überstehende Mutterlauge abdekantiert und der Rückstand in Essigester je 2mal mit 1N NH_4OH und 5-proz. NaCl-Lösung gewaschen. Die Essigesterlösung wird über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum bei 50° eingedampft und der Rückstand aus Essigester/Petroläther gefällt. Nach Umkristallisieren aus Essigester erhält man 14 g des geschützten Tripeptidesters (76%), Smp. $118-121^\circ$. Zur Analyse wurde aus Essigester umkristallisiert. Smp. $123-126^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -28,2^\circ$, ϵ bei 268 $m\mu = 16450$ (2 mg % in Feinsprit)?).

$\text{C}_{99}\text{H}_{97}\text{O}_8\text{N}_7$ (611,64) Ber. C 56,98 H 6,10 N 16,03% Gef. C 56,68 H 6,18 N 16,26%

N α -Z-N ω -Nitro-L-arginyl-L-phenylalanyl-L-prolin (II). 12,2 g (0,02 Mol) Tripeptidester I werden in 120 ml Methanol mit 22 ml (22 mMol) 1N NaOH 16 Std. bei 20° verseift. Die Lösung wird im Vakuum bei 35° auf 40 ml eingedampft und unter Eiskühlung mit konz. Salzsäure angesäuert. Man extrahiert mit Essigester, wäscht mit Wasser, schüttelt mehrmals mit 3N NH_4OH aus, stellt die wässrige Lösung mit konz. Salzsäure auf pH 2, extrahiert erneut mit Essigester und wäscht mit Wasser. Die über Natriumsulfat getrocknete Lösung wird im Vakuum bei 45° zur Trockne verdampft und der Rückstand aus Alkohol/Äther gefällt. Nach 2 Std. wird abnutschts, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 8 g (66%). Durch Aufarbeitung des Neutralteiles werden 2 g unverseifter Tripeptidester I zurückerhalten. Zur Analyse wurde die Tripeptidsäure aus Alkohol/Äther umgefällt. $[\alpha]_D^{20} = -30,2^\circ$. Die Substanz enthält 1,35% H_2O (Titration nach K. FISCHER).

$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{O}_8\text{N}_7$ (597,62) Ber. C 56,27 H 5,90 N 16,41%
(wasserfreie Subst.) Gef. „ 56,11 „ 5,81 „ 16,56%

Z-L-Phenylalanyl-glycin-methylester (III). 12,5 g (0,1 Mol) pulverisiertes Glycin-methylesterhydrochlorid⁹⁾ werden in einer Mischung von 100 ml Acetonitril und 14 ml (0,1 Mol) Triäthylamin

¹³⁾ Die Smp. sind korrigiert. Fehler $\pm 2^\circ$. Die Drehungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Dimethylformamid bei $c = 2$ bestimmt.

während 15 Min. kräftig geschüttelt, dann mit einer Lösung von 29,9 g Z-L-Phe-OH⁸) in 100 ml Acetonitril und bei -10° mit 20,7 g (0,1 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Nach 16stdg. Stehen bei 0° werden der Dicyclohexylharnstoff und das Triäthylamin-hydrochlorid abgenutscht und das Filtrat im Vakuum bei 45° eingedampft. Man löst den Rückstand in viel Essigester, wäscht mit 1N HCl, H₂O, 1N NH₄OH und H₂O, trocknet über Natriumsulfat und dampft im Vakuum ein. Es wird aus Essigester/Äther kristallisiert. Ausbeute nach Aufarbeiten der Mutterlauge 31,2 g (84%), Smp. 120–121°. Zur Analyse wurde aus Essigester umkristallisiert. Smp. 122–123°, $[\alpha]_D^{20} = -23,6^{\circ}$, ϵ bei 257 m $\mu = 397$ (60 mg % Feinsprit), ber. 395¹⁰).

C₃₀H₂₂O₅N₂ (370,39) Ber. C 64,85 H 5,99 N 7,56% Gef. C 65,11 H 6,20 N 7,64%

L-Phenylalanyl-glycin-methylester (IV). 27,8 g (0,075 Mol) Dipeptidester III werden mit 85 ml Bromwasserstoff/Eisessig (33-proz.) 1 Std. bei 20° unter CaCl₂-Verschluss geschüttelt und dann im Vakuum 15 Min. entgast. Die Lösung wird mit 600 ml Äther und 150 ml Eiswasser extrahiert und die wässrige Phase noch 2mal mit Äther gewaschen. Man versetzt die wässrige Lösung mit Eis, überschichtet mit Essigester, stellt mit konz. Ammoniak alkalisch, extrahiert mit Essigester, wäscht mit Wasser und trocknet über Natriumsulfat. Der Essigester wird im Vakuum bei 45° abdestilliert und der Sirup im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute 19,6 g (83%) Honig. Der Ester wird sofort zum Tripeptid V umgesetzt.

Z-L-Seryl-L-phenylalanyl-glycin-methylester (V). 11,9 g (0,05 Mol) Z-L-Ser-OH¹⁴), 11,8 g (0,05 Mol) Dipeptidester IV und 10,3 g (0,05 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid werden in 140 ml Acetonitril und 60 ml Dimethylformamid bei -10° umgesetzt und 16 Std. bei 0° aufbewahrt. Der Dicyclohexylharnstoff wird abgenutscht, das Acetonitril im Vakuum bei 50° abdestilliert, das Konzentrat in eiskalter 1N HCl ausgerührt, der Niederschlag abgenutscht, mit 1N NH₄OH und Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute 18 g (79%), Smp. 142–146°. Zur Analyse wurde aus Alkohol umkristallisiert. Smp. 147–148°, $[\alpha]_D^{20} = -8,8^{\circ}$, ϵ bei 257 m $\mu = 388$ (60 mg% in Feinsprit), ber. 395¹⁰).

C₂₃H₂₇O₇N₃ (457,47) Ber. C 60,38 H 5,95 N 9,26% Gef. C 60,17 H 5,85 N 9,16%

L-Seryl-L-phenylalanyl-glycin-methylester (VI). 13,7 g (0,03 Mol) Tripeptidester V werden in 70 ml Eisessig und 200 ml Methanol gelöst, mit 1,5 g Pd-Kohle (ENGELHARDT) versetzt und im Wasserstoffstrom mittels eines Vibromischers bis zur negativen CO₂-Reaktion hydriert. Der Katalysator wird abgenutscht, das Filtrat im Vakuum bei 50° eingedampft und der Rückstand noch 2mal mit frischem Methanol abgedampft. Das Harz kristallisiert beim Anreiben unter Äther. Die Kristalle werden in Essigester verrieben, mit Petroläther versetzt und abgenutscht. Ausbeute 9,5 g (98%), Smp. 118–120°. Zur Analyse wurde aus Alkohol/Äther umkristallisiert. Smp. 124–126°, $[\alpha]_D^{20} = +1^{\circ}$, ϵ bei 257 m $\mu = 193$ (60 mg % in Feinsprit), ber. 187¹⁰).

C₁₅H₂₁O₅N₃ (323,34) Ber. C 55,72 H 6,55 N 13,00% Gef. C 55,22 H 6,47 N 12,82%

N α -Z-N ω -Nitro-L-arginyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-phenylalanyl-glycin-methylester (VII). 6 g (0,01 Mol) Tripeptidsäure II, 3,3 g (0,01 Mol) Tripeptidester VI und 2,1 g (0,01 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid werden in 40 ml Dimethylformamid/Acetonitril 1:1 bei -10° umgesetzt und 16 Std. bei 0° belassen. Nach Abnutschen des Dicyclohexylharnstoffes wird das Acetonitril im Vakuum bei 45° abdestilliert, die verbliebene Lösung in Chloroform aufgenommen, mit 1N HCl, H₂O, 1N NH₄OH und 30-proz. NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Chloroform wird im Vakuum bis auf ca. 20 ml abgedampft und diese Lösung unter starkem Rühren in 500 ml Äther hineinfltriert. Man nutsch den Niederschlag ab, wäscht mit Äther und Petroläther und trocknet im Vakuum bei 60° . Ausbeute 4,6 g (52%). Zur Analyse wurde nochmals wie oben aus Chloroform/Äther umgefällt. $[\alpha]_D^{20} = -18,7^{\circ}$, ϵ bei 268 m $\mu = 16450$ (3 mg % in Feinsprit)⁷).

C₄₃H₅₄O₁₂N₁₀ (902,94) Ber. C 57,19 H 6,03 N 15,51% Gef. C 56,91 H 6,02 N 15,25%

N α -Z-N ω -Nitro-L-arginyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-phenylalanyl-glycin (VIII). 2,7 g (3 mMol) Hexapeptidester VII werden in 30 ml Methanol mit 4,2 ml (4,2 mMol) 1N Natronlauge während 16 Std. bei 20° verseift. Die Lösung wird im Vakuum bei 30° bis auf ca. 10 ml eingedampft, mit 40 ml Wasser verdünnt, filtriert und mit 3N Salzsäure auf pH 3 gestellt. Nach Abnutschen des Niederschlages und Waschen mit Wasser wird im Vakuum bei 60° getrocknet und

¹⁴) J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry 146, 463 (1942).

dann aus Methanol/Äther umgefällt. Ausbeute 2,2 g (81%). Zur Analyse wurde aus Methanol/Äther umgefällt. $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$, ϵ bei 268 $m\mu = 16430$ (3 mg % Feinsprit⁷).

$C_{42}H_{52}O_{12}N_{10}$ (902,94) Ber. C 56,74 H 5,90 N 15,76% Gef. C 56,44 H 6,24 N 15,55%

Z-L-Prolyl-L-prolin (IX). 24,9 g (0,1 Mol) *Z-L-Pro*¹¹, 12,9 g (0,1 Mol) *L-Pro-OCH₃*⁸) und 20,7 g (0,1 Mol) Dicyclohexyl-Carbodiimid werden in 120 ml Acetonitril bei -10° umgesetzt und 16 Std. bei 0° aufbewahrt. Der Dicyclohexylharnstoff wird abgenutscht, das Filtrat im Vakuum bei 45° eingedampft und das Öl in möglichst wenig Essigester aufgenommen. Durch Abkühlen und anschließendes Abnutschen lässt sich eine weitere Menge Dicyclohexylharnstoff abtrennen. Das Filtrat wird nun mit Essigester verdünnt und mit 1N HCl gewaschen. Hierbei kristallisiert wiederum Dicyclohexylharnstoff aus. Er wird abgenutscht, das Filtrat mit H_2O , 1N NH_4OH und 10-proz. NaCl-Lösung gewaschen. Man trocknet über Natriumsulfat und dampft im Vakuum bei 50° bis zur Gewichtskonstanz ein. Ausbeute 27,5 g Öl. Dieses wird ohne weitere Reinigung in 200 ml Methanol mit 38 ml 4N Natronlauge während 6 Std. bei 20° verseift. Man dampft die Verseifungslösung im Vakuum bei 35° auf $1/3$ des ursprünglichen Volumens ein, nutscht von einer weiteren Menge Dicyclohexylharnstoff ab, stellt unter Eiskühlung mit 3N HCl auf ein pH von 2,5 und lässt 1 Std. bei 0° stehen. Der Niederschlag wird abgenutscht, in 1N NaOH digeriert, von einer Spur Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat in eiskalter 1N Salzsäure ausgerührt. Nach 1 Std. wird abgenutscht, mit Wasser gewaschen, im Vakuum bei 70° getrocknet und aus siedendem Alkohol umkristallisiert. Ausbeute nach Aufarbeiten der Mutterlauge 18,5 g (53%), Smp. 186–188°. Zur Analyse wurde aus Alkohol umkristallisiert. Smp. 190–192°, $[\alpha]_D^{20} = -82,5^\circ$, ϵ bei 258 $m\mu = 202$ (80 mg % in Feinsprit), ber. 208¹⁰).

$C_{18}H_{22}O_5N_2$ (346,37) Ber. C 62,41 H 6,40 N 8,09% Gef. C 62,32 H 6,32 N 8,16%

Z-L-Prolyl-L-prolyl-N^ω-nitro-L-arginin-p-nitrobenzylester (X). 17,3 g (0,05 Mol) Dipeptidsäure IX und 17,8 g (0,05 Mol) Nitro-L-arginin-p-nitrobenzylester¹²) werden unter Erwärmen in 100 ml Dimethylformamid/Acetonitril 1:1 gelöst, bei -5° mit 10,4 g (0,05 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 20 Std. bei 0° aufbewahrt. Der Dicyclohexylharnstoff wird abgenutscht und das Filtrat im Vakuum bei 50° auf die Hälfte eingedampft. Man verdünnt mit 500 ml Essigester, wäscht je 2mal mit Wasser, 1N HCl, 10-proz. NaCl-Lösung, 1N NH_4OH und 10-proz. NaCl-Lösung und trocknet über Natriumsulfat. Der Essigester wird im Vakuum bei 50° abdestilliert, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und unter starkem Rühren in viel Äther hineinfiltriert. Es entsteht ein weißer, pulveriger Niederschlag, der nach dem Abnutschen im Vakuum bei 50° getrocknet wird. Ausbeute 26,9 g. Zur Analyse wurde aus Essigester/Äther umgefällt. $[\alpha]_D^{20} = -103,5^\circ$, ϵ bei 268 $m\mu = 26850$ (1 mg% in Eisessig).

$C_{31}H_{38}O_{10}N_8$ (682,68) Ber. C 54,54 H 5,61 N 16,42% Gef. C 54,14 H 5,66 N 16,58%

L-Prolyl-L-prolyl-N^ω-nitro-L-arginin-p-nitrobenzylester (XI). 6,83 g (0,01 Mol) Tripeptidester X werden in 25 ml Eisessig unter leichtem Erwärmen gelöst, abgekühlt, mit 25 ml HBr/Eisessig (33-proz.) versetzt und nach 1 Std. mit abs. Äther ausgefällt. Das Hydrobromid wird 2mal mit frischem Äther verrieben, in Eiswasser aufgenommen und mehrmals mit Äther extrahiert. Unter Eiszusatz stellt man die wässrige Lösung mit konz. Ammoniak alkalisch und extrahiert mit Chloroform. Die Chloroformlösung wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bei 50° eingedampft. Der Rückstand wird 2mal aus Chloroform/Äther umgefällt und getrocknet. Ausbeute 5,3 g (96%).

N^α-Z-N^ω-Nitro-L-arginyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-prolyl-L-prolyl-N^ω-nitro-L-arginin-p-nitrobenzylester XII. 3,62 g (4 mMol) Hexapeptidsäure VIII und 2,2 g (4 mMol) Tripeptidester XI (Rohprodukt) setzt man in 30 ml Dimethylformamid bei -10° wie üblich mit 828 mg (4 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid um und lässt 24 Std. bei 0° stehen. Die Lösung wird im Hochvakuum bei 45° auf ca. 10 ml eingedampft, abgekühlt und der Dicyclohexylharnstoff abgenutscht. Man fällt das Filtrat in 40 ml eiskalter 0,1N Salzsäure aus, nutscht ab, löst in wenig Dimethylformamid, fällt die Lösung in 40 ml eiskaltem 0,1N Ammoniak aus, nutscht wieder ab, wäscht mit Wasser und trocknet im Vakuum bei 45° . Die Substanz wird aus Dimethylformamid/Äther umgefällt, abgenutscht, mit Äther und Petroläther gewaschen und dann getrocknet. Ausbeute 2,8 g Rohprodukt, das nicht mehr weiter gereinigt wurde.

L-Arginyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-prolyl-L-arginin XIII. 2,8 g geschütztes Nonapeptid XII (Rohprodukt) werden in 120 ml Eisessig gelöst, mit 50 ml Wasser und 4 ml 1N Salzsäure und mit 2 g Pd-Kohle 5% (ENGELHARDT) während 8 Std. im H_2 -

Strom unter Verwendung eines Vibromischers hydriert. Der Katalysator wird abgenutscht und das Filtrat im Hochvakuum bei 35° eingedampft. Man löst den Rückstand in 30 ml Wasser, filtriert und verdampft nochmals in gleicher Weise bei 35°. Die Substanz wird in wenig Methanol gelöst, filtriert, in abs. Äther ausgerührt, abgenutscht, mit abs. Äther gewaschen und im Vakuum bei 30° getrocknet. Ausbeute 2,1 g Rohprodukt.

Reinigung des Endproduktes. – a) *Multiplikative Verteilung:* 2,1 g Rohprodukt (aus der Hydrierung von 2,8 g geschütztem Nonapeptidester) wurden multiplikativ über 400 Stufen im System n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 8:2:1:9 (Vol.-Verhältnisse) verteilt. Die Verteilung wurde spektrophotometrisch mit FOLIN-DENIS-Reagens¹⁵⁾ und mittels der quantitativen SAKAGUCHI-Reaktion nach ALBANESE *et al.*¹⁶⁾ verfolgt. Die Hauptfraktion mit einem Verteilungskoeffizient $K = 0,22$ wurde bei Raumtemperatur im Hochvakuum eingedampft und anschliessend lyophilisiert; es resultierten ca. 650 mg eines farblosen Pulvers.

b) *Umfällen:* 450 mg der obigen Fraktion wurden je 1mal aus abs. Äthanol und abs. Äthanol/Essigester umgefällt, in 0,1N HCl gelöst und bis zur Entfernung der überschüssigen Salzsäure lyophilisiert. Man erhielt 180 mg analysenreines Nonapeptid-Trihydrochlorid in Form eines weissen, feinkörnigen Pulvers als Hexahydrat. Aus den vereinigten Mutterlaugen konnten noch 80 mg Substanz gewonnen werden.

	$[\alpha]_D^{25} = -98,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,35$ in H_2O)											
$C_{50}H_{88}O_{17}N_{15}Cl_3$	Ber. C	47,00	H	6,94	N	16,45	O	21,29	Cl	8,33	H_2O	8,46%
(Trihydrochlorid-	Gef. „	46,78	„	6,77	„	16,34	„	20,94	„	8,59	„	8,55%
Hexahydrat)												1277,69

Das Wasser wurde durch Titration nach K. FISCHER sowie durch Gewichtsverlust bestimmt.

Das Nonapeptid verhält sich chromatographisch sowohl auf Papier wie auf der Dünnschichtplatte einheitlich, $R_f = 0,50$ (n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24). Mit den Laufmitteln n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1, n-Butanol/Ammoniak 0,25% und Äthanol/Wasser 4:1 können keine Verunreinigungen abgetrennt werden.

Bei der Hochspannungs-Papierlektrophorese beträgt die Laufstrecke bei pH 2,5 ca. 100 mm und bei pH 6,5 ca. 30 mm. Verunreinigungen werden keine beobachtet.

Die experimentellen Bedingungen für die Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie und für die Papierlektrophorese sind bereits früher beschrieben worden¹⁷⁾.

Zur Totalhydrolyse und Bestimmung der Aminosäure-Verhältnisse wurden 2 mg in 1 ml 5,7N HCl gelöst (Pyrex-Bombenröhrchen) und eingefroren. Das Röhrchen wurde evakuiert, mit N_2 begast, zugeschmolzen und 24 Std. auf 110° erhitzt. Nach Entfernung der Salzsäure löste man das Hydrolysat in 0,1 ml Wasser.

Die Aminosäuren wurden mittels kombinierter Hochspannungs-Papierlektrophorese/Papierchromatographie unter folgenden Bedingungen aufgetrennt: 1. *Dimension:* Elektrophorese: pH 1,9, 50 Vcm⁻¹, 45 Min. – 2. *Dimension:* Papierchromatographie: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1; 14 Std., absteigend; Papier: SCHLEICHER & SCHÜLL Nr. 2043b, gewaschen. Die Auswertung erfolgte nach Elution der Ninhydrin-Cu-Komplexe spektrophotometrisch gegen Vergleichsmischungen nach Angaben von F. G. FISCHER, H. DÖRFEL¹⁸⁾ und K. RÖWE *et al.*¹⁹⁾. Das Pro wurde separat nach TROLL & LINDSLEY bestimmt²⁰⁾.

Für das Nonapeptid	Ber. Arg	2,0	Phe	2,0	Pro	3,0	Ser	1,0	Gly	1,0
	Gef. „	2,1	„	1,9	„	2,4 ²¹⁾	„	0,8	„	0,9

Die Mikroanalysen verdanken wir Herrn Dr. A. DIRSCHERL aus unserer mikroanalytischen Abteilung.

¹⁵⁾ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARN & ROSE J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 (1951).

¹⁶⁾ A. A. ALBANESE & J. E. FRANKSTON, *J. biol. Chemistry* **159**, 185 (1945).

¹⁷⁾ K. VOGLER, R. O. STUDER, W. LERGIER & P. LANZ, *Helv.* **43**, 1751 (1960).

¹⁸⁾ F. G. FISCHER & H. DÖRFEL, *Biochem. Z.* **324**, 544 (1953).

¹⁹⁾ K. RÖWE, E. FERBER & H. FISCHER, *Z. physiol. Chem.* **373**, 174 (1958).

²⁰⁾ W. TROLL & J. LINDSLEY, *J. biol. Chemistry* **215**, 655 (1955).

²¹⁾ Über den gefundenen Prolinwert vgl. K. VOGLER, R. O. STUDER & W. LERGIER, *Helv.* **44**, 1495 (1961).

SUMMARY

The nonapeptide H-Arg-Phe-Pro-Ser-Phe-Gly-Pro-Pro-Arg-OH with the reversed amino acid sequence of bradykinin has been synthesized according to the scheme outlined above. This peptide exerted no bradykinin activity at concentrations up to 10^{-5} .

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

67. Lösungsmittelleffekte in kernmagnetischen Protonenresonanzspektren von substituierten Benzolen

von P. Diehl

(15. I. 62)

1. *Einleitung.* Es ist bekannt, dass Protonenresonanzspektren von gewissen aromatischen Molekeln stark konzentrations- und lösungsmittelabhängig sind, so z. B. verschiebt sich die Resonanz der Benzolprotonen bei «unendlicher» Verdünnung in Hexan um 0,34 ppm¹⁾ nach höherem Feld. Eine derartige Verschiebung kann durch die diamagnetische Anisotropie des Benzolrings, die sich bei fortschreitender Verdünnung immer weniger auswirkt, erklärt werden. Dagegen zeigen verschiedene Messungen von chemischen Verschiebungen aliphatischer Molekeln in aromatischen Lösungsmitteln²⁾ das Vorhandensein von spezifischen zwischenmolekularen Wechselwirkungen.

Eine erste systematische Untersuchung von Lösungsmittelleffekten in substituierten Benzolen wurde von SCHÄFER & SCHNEIDER³⁾ durchgeführt. Das Resultat war das folgende: In *p*-disubstituierten Benzolen werden die Ringprotonen allgemein im Lösungsmittel Aceton nach tieferem Feld, in Benzol nach höherem Feld verschoben. Dabei ist die Verschiebung von Protonen in *m*-Stellung zu polaren Substituenten grösser als in *o*-Stellung. Eine Erklärung dieser Resultate wurde sowohl in sterischen Effekten als auch in bevorzugter H-Brückenbindung in *m*-Stellung gesucht. Allgemein war es den Verfassern nicht möglich, die Lösungsmittelleffekte der individuellen Substituenten zu trennen, da sie sich auf *p*-disubstituierte Benzole mit verschiedenen Substituenten beschränkten.

Im Gegensatz zu den eher qualitativen Erklärungen der Substituenteneffekte in substituierten Benzolen³⁾ stellte BUCKINGHAM⁴⁾ eine elektrostatische Theorie auf, die quantitative Voraussagen ermöglicht. Der Inhalt seiner Theorie ist kurz zusammengefasst der folgende: Wenn eine polare Molekel in einem Medium gelöst wird, polarisiert sie ihre Umgebung; es entsteht nach ONSAGER⁵⁾ ein elektrisches Reaktions-

¹⁾ J. R. ZIMMERMANN & M. R. FOSTER, J. phys. Chemistry 67, 282 (1957).

²⁾ A. A. BOTHNER-BY & R. E. GLICK, J. chem. Physics 26, 1651 (1957); L. W. REEVES & W. G. SCHNEIDER, Canad. J. Chemistry 35, 251 (1957).

³⁾ T. SCHÄFER & W. G. SCHNEIDER, J. chem. Physics 32, 1218 (1960).

⁴⁾ A. D. BUCKINGHAM, Canad. J. Chemistry 38, 300 (1960).

⁵⁾ L. ONSAGER, J. Amer. chem. Soc. 58, 1486 (1936).