

- [12] Y. Kitahara, I. Murata, K. Shirahata, S. Katagiri & H. Azumi, Bull. chem. Soc. Japan 38, 780 (1965).
- [13] W. B. Smith & B. A. Shoulders, J. Amer. chem. Soc. 86, 3118 (1964).
- [14] P. A. Straub, D. Meuche & E. Heilbronner, Helv. 49, 517 (1966).
- [15] R. T. Hobgood & J. H. Goldstein, J. Mol. Spectr. 12, 76 (1964).
- [16] O. Sciacovelli & W. von Philipsborn, Org. Magn. Res. 3, 339 (1971).
- [17] K. D. Bartle, D. W. Jones & R. S. Matthews, Rev. Pure & Appl. Chem. 19, 191 (1969).
- [18] W. D. Crow & M. N. Paddon-Row, J. Amer. chem. Soc. 94, 4746 (1972).
- [19] G. B. Savitsky & K. Namikawa, J. phys. Chemistry 68, 1956 (1964).
- [20] R. A. Friedel & H. L. Retcofsky, J. Amer. chem. Soc. 85, 1300 (1963).
- [21] a) D. K. Dalling & D. M. Grant, J. Amer. chem. Soc. 94, 5318 (1972); b) D. M. Grant & B. V. Cheney, *ibid.* 89, 5315 (1967).
- [22] a) G. E. Maciel, J. W. McIver, N. S. Ostlund & J. A. Pople, J. Amer. chem. Soc. 92, 1 (1970); b) C. Juan & H. S. Gutowsky, J. chem. Physics 37, 2198 (1962).
- [23] D. E. Dorman, M. Jautelat & J. D. Roberts, J. org. Chemistry 36, 2757 (1971).
- [24] H. L. Ammon & G. L. Wheeler, Chem. Commun. 1971, 1032.
- [25] G. E. Maciel, J. phys. Chemistry 69, 1947 (1965).
- [26] a) P. C. Lauterbur, Tetrahedron Letters 274 (1961); b) H. Spiessche & W. G. Schneider, *ibid.* 468 (1961).
- [27] G. A. Olah & A. M. White, J. Amer. chem. Soc. 90, 1884 (1968).
- [28] G. Kresze & H. Goetz, Chem. Ber. 90, 2161 (1957).
- [29] H. Schaltegger, M. Neuenschwander & D. Meuche, Helv. 48, 955 (1965).
- [30] R. Kyburz, H. Schaltegger & M. Neuenschwander, Helv. 54, 1037 (1971).
- [31] R. Iseli, Dissertation, Bern (1971).
- [32] K. Hafner, G. Schulz & K. Wagner, Liebigs Ann. Chem. 678, 39 (1964).
- [33] H. Meerwein, W. Florian, N. Schön & G. Stopp, Liebigs Ann. Chem. 641, 1 (1961).
- [34] S. I. Khromov, E. S. Balenkova & E. G. Treshchova, Vestnik Moskov. Univ., Ser. Mat., Mekh., Astron., Fiz. i Khim. 14, 143 (1959); Chem. Abstr. 54, 9798e (1960).

### 83. Isolierung und Aminosäuresequenz von Substanz P aus Pferdedarm

von Rolf Otto Studer, Arnold Trzeciak und William Lergier

Chemische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., 4002 Basel

(24. I. 73)

*Summary.* The isolation and amino acid sequence of substance P from horse intestine is reported. The sequence, H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Lcu-Met-NH<sub>2</sub> is identical with the sequence reported for substance P isolated from bovine hypothalami.

Von Euler und Gaddum [1] hatten 1931 beim Studium der Verteilung von Acetylcholin in Geweben die schon früher gelegentlich mitgeteilte Beobachtung gemacht, dass saure alkoholische Extrakte aus verschiedenen Geweben des Pferdes neben Acetylcholin und Histamin noch eine Substanz enthalten müssen, die ebenfalls den isolierten Kaninchendarm kontrahiert und am atropinisierten Kaninchen kurz-dauernd den Blutdruck senkt. Die Substanz konnte in grösseren Mengen im Darm und im Gehirn des Pferdes nachgewiesen werden. Der getrocknete Extrakt erhielt von den Autoren die Bezeichnung P (= powder), woraus der Name Substanz P (SP) für das aktive Prinzip entstand.

In der Folge wurde Substanz P im Verdauungstrakt verschiedener Säuger [2] und im Gehirn von Menschen, Säugetieren, Vögeln, Reptilien und Fischen nachgewiesen [4–7]. 1953 berichtete *Pernow* [3] über eine Methode zur Herstellung grösserer Mengen roher Substanz P. Ausgehend von dieser Methode gelang es uns 1963 [8], ein biologisch hoch aktives Präparat aus Rinder- und Pferdedarm herzustellen. Gleichzeitig berichteten *Boissonnas et al.* [9] über die Reinigung von Substanz P aus Pferdedarm und *Zuber* [10–11] über die Isolierung aus Rinderhirn. Die hochaktiven Fraktionen zeigten eine starke kontrahierende Wirkung auf die glatte Muskulatur des Intestinaltraktes, sowie eine blutdrucksenkende und salivationsfördernde Wirkung [12]. 1967 fanden *Leeman et al.* [13] in Extrakten von Ratten- und Rinderhypothalami ein Peptid mit speichelfördernder Wirkung. Kurz darauf berichteten *Lembeck et al.* [14], dass ihre Präparate von Substanz P ebenfalls eine speichelfördernde Wirkung besaßen, was sie vermuten liess, dass Substanz P möglicherweise mit dem von *Leeman* beschriebenen Peptid identisch sei. Kürzlich beschrieben *Leeman et al.* die Isolierung [15] und die Aminosäuresequenz [16] von Substanz P aus Rinderhypothalami.

Wir berichten hier über die Isolierung von Substanz P aus Pferdedarm, ausgehend von dem 1963 angereicherten Material [8], und über die Aminosäuresequenz<sup>1) 2)</sup>.

**Material und Methoden.** – 1. *Ausgangsmaterial.* Als Ausgangsmaterial dienten 500 mg Substanz P mit einer spezifischen Aktivität von ca. 10 000 *von-Euler*-Einheiten pro mg. Diese wurde erhalten durch Gegenstromverteilung der Rohfraktion aus Pferdedarm nach *Pernow* [3] im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 600:150:75:675 [8].

2. *Chromatographie an Sephadex G-25 fein.* Das Ausgangsmaterial wurde auf einer Säule (1,5 × 90 cm) von Sephadex G-25 fein chromatographiert. Als Elutionsmittel wurde 0,1M Essigsäure verwendet und Fraktionen zu 2 ml aufgefangen. Die biologische Prüfung der Fraktionen erfolgte am Meerschweinchenileum [8] [12]. Die aktiven Fraktionen 61–75 wurden lyophilisiert und unter den gleichen Bedingungen rechromatographiert. Ausbeute ca. 70 mg.

3. *Chromatographie an CM-Sephadex C-25.* Die Sephadex G-25-Hauptfraktion konnte durch Chromatographie an CM-Sephadex C-25 weiter gereinigt werden. Die Chromatographie erfolgte an einer Säule (2 × 30 cm) mit Hilfe eines linearen Ammoniumformiat-Gradienten [pH 5,5, 0,05 M (350 ml) → 7,5, 0,5 M (350 ml)]. Zur Bildung des Gradienten wurde eine Gradientenmischkammer der Firma *Buchler* verwendet. Das Elutionsvolumen betrug total 700 ml bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 30 ml/Std. Die aktive Hauptfraktion 161–203 (3 ml Fraktionen) wurde lyophilisiert. Ausbeute: 7,6 mg mit einer spezifischen Aktivität von 68 700 *von-Euler*-Einheiten/mg.

4. *Hochspannungs-Papierelektrophorese.* Der letzte Reinigungsschritt erfolgte mit Hilfe der Hochspannungs-Papierelektrophorese bei pH 1,7. Puffer: 37 ml konz. Ameisensäure und 25 ml Eisessig in 1 l Lösung; Bedingungen: 20 Min., 110 V cm<sup>-1</sup>. Es folgte eine Auftrennung in 3 Banden: Bande A: Ninhydrin und *Sakaguchi* positiv, elektrophoretische Beweglichkeit 0,54 bezogen auf Lysin = 1,0; Bande B: gleich anfärbbar wie Bande A, knapp hinter Bande B; Bande C: elektrophoretische Beweglichkeit wie Arginin. Mikropräparative Elutionsversuche zeigten, dass die Hauptmenge der Aktivität sich in der Bande A befand. Bande B war schwach aktiv, Bande C inaktiv.

Der aus der quantitativen Aminosäureanalyse errechnete Peptidgehalt im lyophilisierten Eluat der Bande A betrug 228 µg. Das Material war chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich.

5. *Aminosäureanalyse.* Nach Totalhydrolyse (24 Std., 110°, 6N HCl) wurden die relativen Aminosäureverhältnisse der Bande A nach *Spackman, Stein & Moore* [17] mit einer *Beckmann-*

1) Teilweise vorgetragen am Symposium on Aspects of Peptide and Protein Chemistry, 29. 11. 1971, Cambridge, England.

2) Die Abkürzungen für die Aminosäuren entsprechen den Empfehlungen der «IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature».

Unichrom-Apparatur analysiert. Der Wert für Glutaminsäure wurde gleich 2,0 gesetzt. Die Glycinwerte in Eluaten von Papierchromatogrammen sind schwierig zu korrigieren, da die Papierblindwerte neben Serin und Alanin als Hauptverunreinigung Glycin in stark wechselnden Mengen enthalten. Zur Korrektur der Aminosäure-Zusammensetzung der Bande A wurde deshalb ein Mittelwert aus Eluaten verschiedener Papierproben des gleichen Typs und der gleichen Fläche wie der eluierten Bande A bestimmt.

6. *Molekulargewichtsbestimmung*. Auf eine Molekulargewichtsbestimmung der Endfraktion konnte verzichtet werden, da das Molekulargewicht der biologischen aktiven Fraktionen bereits früher [8] zu  $1650 \pm 250$  bestimmt worden war. Das Verhalten der Aktivität bei der Gelfiltration stimmte mit dieser Grössenordnung überein.

7. *Identifizierung der N-terminalen Aminosäure als 1-Dimethylaminonaphthalin-sulfonylderivat (Dansyl-Derivat)*. Die N-terminale Aminosäure wurde mit Hilfe der *Dansyl*-Methode [18] bestimmt. Eingesetzt wurden ca. 5 nmol Peptid. Die Identifizierung erfolgte dünnschichtchromatographisch wie unter Ziff. 8.

8. *Edman-Abbau*. Mit Hilfe der Kombination *Edman*-Abbau/Dansylierung [19] konnten die ersten 5 Aminosäuren zweifelsfrei ermittelt werden. Zur Durchführung wurden ausschliesslich Reagenzien und Lösungsmittel «Sequanal Grade» von *Pierce Chemical Company* verwendet. Ca. 25 nmol Peptid wurden in 200  $\mu$ l Pyridin/Wasser 1:1 gelöst, mit 100  $\mu$ l einer 5proz. Lösung von Phenylisothiocyanat (PITC) in Pyridin versetzt und unter  $N_2$  1 Std. bei 45° belassen. Es ist vorteilhaft, anschliessend, statt mit organischen Lösungsmitteln zu waschen, den Reagensüberschuss, Lösungsmittel und Nebenprodukte der Kupplungsreaktion im Hochvakuum zu entfernen (die Extraktionsmethoden führen zu Verlusten an Peptidmaterial). Zu diesem Zweck wurde die Probe 30 Min. bei 60° über  $P_2O_5$  und KOH unter Vakuum gestellt. Das getrocknete Phenylthiocarbonylpeptid wurde in 200  $\mu$ l wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst und unter  $N_2$  30 Min. bei 45° inkubiert (unter diesen Bedingungen werden Nebenreaktionen, wie Cyclisierung von N-terminalem Glutamin zu Pyrrolidincarbonsäure, weitgehend unterdrückt). Nach Entfernung der Trifluoressigsäure im Vakuum bei 60° wurde der Rückstand in 150  $\mu$ l Wasser aufgenommen und 3mal mit je 1,5 ml Butylacetat ausgeschüttelt. Diese Extraktionen eliminieren den Diphenylthioharnstoff und teilweise das Anilino-Thiazolinon und die PTH-Aminosäure. Das Restpeptid verbleibt in der wässrigen Phase. 20  $\mu$ l davon wurden für die Dansylierung abgezweigt und die verbleibende Wasserphase – nach Eindampfen im Vakuum – zum nächsten Abbauschritt eingesetzt. (Der zur Dansylierung entnommene aliquote Teil wurde von Stufe zu Stufe erhöht und betrug beim 5. Abbauschritt 75  $\mu$ l wässrige Phase).

Dansylierung und dünnschichtchromatographische Identifizierung: 20  $\mu$ l Peptidlösung wurden mit 40  $\mu$ l 0,2M  $NaHCO_3$ -Lösung und 40  $\mu$ l 0,2proz. Dansylchloridlösung in Aceton 3 Std. bei Raumtemperatur dansyliert [8]. Die Hydrolyse des dansylierten Peptides erfolgte mit 6N HCl bei 110° mit variablen Zeiten von 4–15 Std. Die dünnschichtchromatographische Identifizierung der Dansylaminosäuren gelang mittels der zweidimensionalen Technik auf aktivierten (30 Min., 110°) Kieselgel-Fertigplatten *Merck* unter Verwendung der zwei Laufmittelpaare A/B [20] und I/II [21]:

A) Toluol/Pyridin/Eisessig 150:50:3.5 (v/v);

B) Toluol/2-Chlor-äthanol/25proz. Ammoniak 100:80:6.7;

I) Äthylacetat/2-Propanol/25proz. Ammoniak 90:70:40;

II) Chloroform/Äthylacetat/Methanol/Eisessig 60:100:40:2.

9. *Chymotrypsin-Abbau*. Verwendet wurde TLCK behandeltes  $\alpha$ -Chymotrypsin von *Merck*. Ca. 20 nmol Peptid wurden in 50  $\mu$ l 0,03M Na-phosphatpuffer (pH 8,0) gelöst und mit 20  $\mu$ l Chymotrypsinlösung (2,5  $\mu$ g Enzym in 20  $\mu$ l 0,001 N HCl) versetzt. Das Enzym-Substrat-Gewichtsverhältnis betrug 1:10 und die Inkubation erfolgte 20 Std. bei 37°.

10. *Einwirkung von Carboxypeptidase A*. 10.1. *CPA-Einwirkung auf ein Chymotrypsinat* (s. Ziff. 9). Verwendung fand Di-iso-propylfluorophosphat-behandelte CPA-Suspension von *Merck*, die vor Gebrauch durch Waschen mit Eiswasser von Aminosäurespuren befreit wurde.

Ca. 20 nmol Peptid wurden wie beschrieben mit Chymotrypsin inkubiert und nach Abtrennung des Enzyms durch Ultrafiltration (*Amicon*, Filter UM-10) bei pH 8 und 25° mit 20  $\mu$ l CPA-Suspension inkubiert. Nach 30, 60, 120 und 240 Min. wurden aliquote Proben dünnschichtchroma-

tographisch auf Kieselgel G im Laufmittel Äthanol/Wasser 7:3 untersucht und die Platten mit Ninhydrin entwickelt; «semiquantitative» Auswertung durch visuelle Vergleiche der Farbintensitäten.

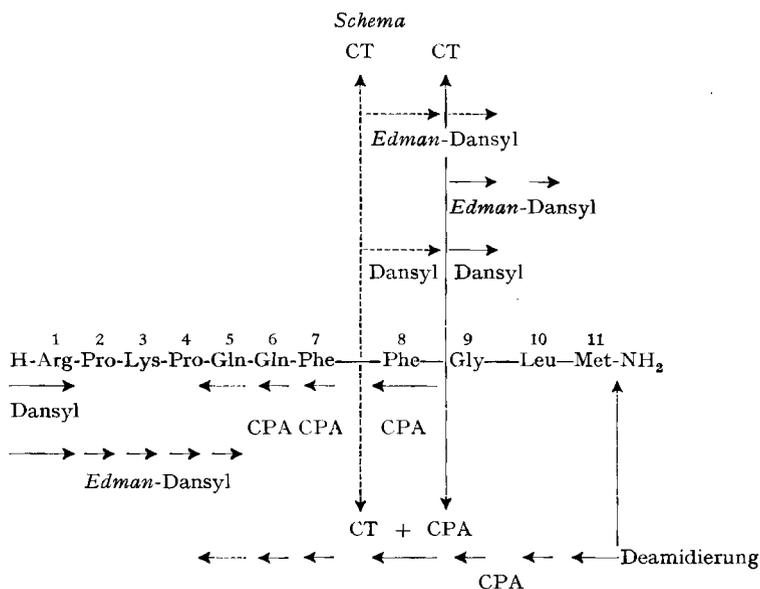
Ein weiteres Chymotrypsinat von ca. 10 nmol Peptid wurde 24 Std. bei pH 8 und 25° mit 20 µl CPA-Suspension inkubiert und (nach Ultrafiltration) quantitativ im *Unichrom*-Aminosäureanalysator untersucht.

10.2. *CPA-Spaltung nach Deblockierung.* Ca. 20 nmol Peptid wurden Bedingungen, die zu Deaminierung führen [16], unterworfen und anschliessend 24 Std. bei pH 8,0 und 40° mit 10 µl CPA-Suspension inkubiert. Das Inkubat wurde papierchromatographisch im System *n*-Butanol-Eisessig/Wasser 4:1:1 aufgetrennt und mit Ninhydrin Cu-Reagens angefärbt. Für kinetische Untersuchungen mit quantitativen Aminosäureanalysen war die Substanzmenge an natürlichem Peptid zu gering.

**Resultate und Diskussion.** - Die mit Hilfe von Papierblindwerten korrigierte Aminosäureanalyse ergab die folgende Zusammensetzung für die aus dem Pherogramm eluierte aktive Hauptbande: Arg (1,0), Glx (2,0), Gly (1,4), Leu (1,2), Lys (1,3), Met (0,7), Phe (1,8) und Pro (1,8). Das aufgrund dieser Aminosäurezusammensetzung berechnete Molekulargewicht von 1340 liegt in der Grösse des früher berichteten Molekulargewichtes von 1650 ± 250 [8] [22].

Die Abbaumethoden und ihre Resultate sind im Schema festgehalten.

Mit Hilfe der Dansyl-Methode wurde Arginin als N-terminale Aminosäure identifiziert. *Edman*-Abbau verbunden mit Dansylierung ergab die Sequenz -Pro-Lys-Pro-Glx-. Dadurch war mit Arginin als N-terminalem Rest das Pentapeptid Arg-Pro-



*Aminosäuresequenz und Methoden.* CT = Chymotrypsin, CPA = Carboxypeptidase A

Lys-Pro-Glx- festgelegt bis auf die Frage, ob Glx als Glutaminsäure oder Glutamin vorlag. Weitere Abbauschritte konnten nicht mehr zweifelsfrei interpretiert werden.

Substanz P wurde von Carboxypeptidase A nicht angegriffen, was auf ein geschütztes C-terminales Ende (Ester, Amid) hinwies. Nach Anwendung von Bedin-

gungen, die zu einer Deblockierung geschützter Carboxylgruppen führen, wurden Methionin, Leucin, Glycin, Phenylalanin und Glutamin freigesetzt.

Die Inkubation mit Chymotrypsin führte zu einer Spaltung des Peptides. Nach Abtrennung des Enzyms durch Ultrafiltration, Dansylierung und Hydrolyse wurde Dansyl-Glycin neben dem vom Aminoende des intakten Peptides stammenden Dansyl-Arginin gefunden. Nach *Edman*-Abbau verbunden mit Dansylierung konnte Dansyl-Leucin neben dem von der zweiten N-terminalen Aminosäure stammenden Dansyl-Prolin nachgewiesen werden. Aus diesen Versuchen ergab sich die Teilsequenz -Gly-Leu-.

Die zeitliche dünn-schichtchromatographische Verfolgung der Einwirkung von Carboxypeptidase A auf das Chymotrypsinat zeigte nach 1 Min. nur einen Phe-Fleck und nach 30 Min. einen starken Phe-Fleck neben einem sehr schwachen Gln-Fleck. Mit zunehmender Inkubationszeit wurde das Glutamin verstärkt, bis im Endzustand – nach visueller Beurteilung – die Ninhydrinfärbung des Phe-Fleckens ungefähr doppelt so stark war wie die des Gln-Fleckens. Da Carboxypeptidase eine Aminosäure, die C-terminal zu einem Prolin steht, nur sehr schwer angreift, muss es sich bei diesem Gln um das zweite aufgrund der Aminosäurezusammensetzung des intakten Peptides vorhandene Glx handeln.

Die bisher beschriebenen Resultate lassen sich mit der Sequenz H-Arg-Pro-Lys-Pro-Glx-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu- erklären. Das aufgrund der Aminosäurezusammensetzung noch fehlende Methionin kann nur C-terminal stehen. Diese Stellung wird noch indirekt bewiesen, dass Cyanbromid [23] zu keiner Spaltung des Peptids führt, und dass bei Einwirkung von Carboxypeptidase auf das «deblockierte» Peptid Methionin sehr rasch freigesetzt wird.

Somit lassen sich alle Befunde mit der Sequenz H-Arg-Pro-Lys-Pro-Glx-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> erklären. Interessant ist, dass das verwendete Chymotrypsin das Peptid zwischen Phe und Gly spaltet und nicht, wie erwartet, zwischen Phe und Phe. Es gibt jedoch analoge Beispiele in der Literatur [24–25].

Experimentelle Befunde weisen darauf hin, dass in kleinem Umfang auch die Bindung Phe-Phe gespalten wird. So konnte im Chymotrypsinat nach dem 1. Abbauschritt mit der *Edman*-Dansyl-Methode etwas Dansyl-Glycin nachgewiesen werden. Kein direkter Beweis liegt vor für die Art der Blockierung der C-terminalen Carboxylgruppe. Ebenso kann in Stellung 5 sowohl ein Glutamin als auch eine Glutaminsäure stehen. Für das Vorliegen eines Amids in beiden Stellungen spricht die Tatsache, dass ein synthetisches Peptid mit der Sequenz H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> mit dem natürlichen chromatographisch und elektro-phoretisch identisch war und sich in allen Abbaueversuchen analog verhielt.

Damit besitzt Substanz P aus Pferdedarm die gleiche Aminosäuresequenz wie die von *Leeman et al.* aus Rinderhypothalami isolierte Substanz P [16]. Zudem fällt die nahe Strukturverwandtschaft mit den beiden Undekapeptiden Physalämin [24], isoliert aus Amphibienhaut, und Eledoisin [26], isoliert aus Speicheldrüsen von Cephalopoden, auf. Aufgrund der sehr ähnlichen pharmakologischen Eigenschaften dieser 4 Substanzen wurde schon vor längerer Zeit auf eine enge chemische Verwandtschaft geschlossen [27–29]. Die Struktur-Aktivitätsbeziehungen einer grossen Reihe von Analoga von Eledoisin und Physalämin [30] liessen erwarten, dass die C-terminale Hexapeptidsequenz von beiden Substanz P Präparaten sich nur sehr wenig von den-

jenigen von Physalamin und Eledoisin unterscheiden würden. Unterschiede waren hingegen im N-terminalen Pentapeptid zu erwarten, da in diesem Teilstück Variationen ohne starke Veränderung der Aktivitäten vorgenommen werden können. Die spezifische Aktivität des reinsten Materials lässt sich dadurch abschätzen, dass man die 228  $\mu\text{g}$  Peptidmaterial aus der Bande A der Hochspannungspapieroelektrophorese den 520000 applizierten von Euler-Einheiten gegenüberstellt<sup>3)</sup>. Daraus errechnet sich eine spezifische Aktivität von 2,27 Millionen von Euler-Einheiten, was in recht guter Übereinstimmung mit der von Leeman [15] für ihr Präparat berechneten spezifischen Aktivität von 2,6 Millionen von Euler-Einheiten steht.

Die meisten bisher durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen wurden mit Präparaten von einer spezifischen Aktivität  $\leq 50000$  von Euler-Einheiten durchgeführt. Dies kann die z.T. widersprüchlichen Angaben in der Literatur erklären. Ferner existieren verschiedene Hinweise, welche die Existenz von mehr als einer Substanz P vermuten lassen [22] [31–33]. Ein Hinweis in dieser Richtung ergab sich auch in unserem letzten Reinigungsschritt, in dem durch die Hochspannungspapieroelektrophorese bei pH 1,7 eine Nebenbande mit einer etwas kleineren elektrischen Mobilität aber praktisch derselben Aminosäurezusammensetzung abgetrennt wurde. Das hier beschriebene, aus Pferdedarm isolierte Präparat besitzt die früher beschriebenen pharmakologischen Eigenschaften [12] und ist mit der von Leeman *et al.* aus Rinderhypothalami isolierten Substanz P identisch.

Wir danken Herrn Dr. W. Haefely, Medizinische Forschungsabteilung F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., für die biologischen Bestimmungen.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] U. S. von Euler & J. H. Gaddum, *J. Physiol. (Lond.)* **72**, 74 (1931).
- [2] B. Pernow, *Acta physiol. scand.* **24**, 97 (1951).
- [3] B. Pernow, *Acta physiol. scand.* **29**, Suppl. 105 (1953).
- [4] U. S. von Euler & E. Oestlund, *Brit. J. Pharmacol.* **11**, 323 (1956).
- [5] K. Grabner, F. Lembeck & K. Neuhold, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **236**, 331 (1959).
- [6] E. Dahlstedt, U. S. von Euler, F. Lishajko & E. Oestlund, *Acta physiol. scand.* **17**, 124 (1959).
- [7] P. Corrales, *Arch. int. Pharmacodyn.* **119**, 435 (1959).
- [8] K. Vogler, W. Haefely, A. Hürlimann, R. O. Studer, W. Lergier, R. Strässle & K. H. Berneis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **104**, 378 (1963).
- [9] R. A. Boissonnas, J. Franz & E. Stürmer, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **104**, 376 (1963).
- [10] H. Zuber, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **104**, 391 (1963).
- [11] H. Zuber & R. Jaques, *Angew. Chem.* **74**, 216 (1962).
- [12] W. Haefely & A. Hürlimann, *Experientia* **18**, 297 (1962).
- [13] S. E. Leeman & R. Hammerschlag, *Endocrinology* **81**, 803 (1967).
- [14] F. Lembeck & K. Starke, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. exp. Pathol.* **259**, 375 (1968).
- [15] M. M. Chang & S. E. Leeman, *J. Biol. Chem.* **245**, 4784 (1970).
- [16] M. M. Chang, S. E. Leeman & H. D. Niall, *Nature New Biology* **232**, 86 (1971).
- [17] D. M. Spackman, W. H. Stein & S. Moore, *Anal. Chem.* **30**, 1190 (1958).
- [18] W. R. Gray & B. S. Hartley, *Biochem. J.* **89**, 379 (1963).
- [19] N. Seiler, *Methods Biochem. Anal.* **18**, 250 (1970).
- [20] J. P. Zanetta, G. Vincendon, P. Mandel & G. Gombos, *J. Chromatogr.* **51**, 441 (1970).

<sup>3)</sup> Oxydiertes Lysinvasopressin wird durch das von uns verwendete Chymotrypsin zwischen Phe und Gln und nicht zwischen Tyr und Phe gespalten. Wir danken Herrn Dr. G. Roncari für die Durchführung dieses Versuches.

- [21] *N. Seiler & H. Wiechmann*, *Experientia* 20, 559 (1964).  
 [22] *H. Meinardi & L. C. Craig*, Hypotensive Peptides, Proc. of the International Symposium, Florence, Italy 1965; Springer Verlag New York Inc., 1966, S. 594.  
 [23] *E. Gross & B. Witkop*, *J. Biol. Chem.* 237, 1856 (1962).  
 [24] *V. Erspamer, A. Anastasi, G. Bertaccini & J. M. Cei*, *Experientia* 20, 489 (1964).  
 [25] *H. Zuber*, *Chimia* 14, 405 (1960).  
 [26] *V. Erspamer & A. Anastasi*, *Experientia* 18, 59 (1962).  
 [27] *G. Zeller, D. Mönkemeier & H. Wiechell*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* 262, 97 (1969).  
 [28] *F. Lembeck & G. Fischer*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* 258, 452 (1967).  
 [29] *G. Bertaccini, J. M. Cei & V. Erspamer*, *Brit. J. Pharmacol.* 25, 380 (1965).  
 [30] *E. Schröder & K. Lübke*, *The Peptides*, Academic Press, New York and London, 1966, Vol. II, S. 127 ff.  
 [31] *G. Zeller*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* 242, 330 (1961).  
 [32] *F. Lembeck & K. Starke*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* 259, 307 (1968).  
 [33] *J. Baldauf & K. Gebhardt*, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* 265, 278 (1969).

## 84. Über eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung, Reinheitsprüfung und Stabilitätsmessung von Calcium-Leucovorin

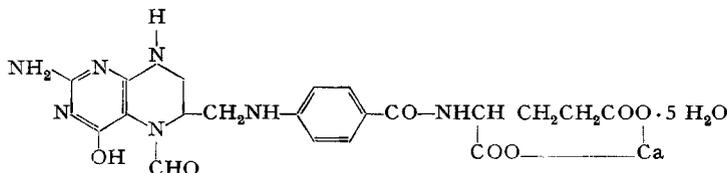
von **Hans Suter, Josef Conti, Menasche Litmanowitsch, Albert Grossmann**  
 und **Alfred Hedinger**

Forschungsinstitut EPROVA Aktiengesellschaft Schaffhausen

(23. III. 72)

*Zusammenfassung.* Die Kombination der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung mit einer spektrophotometrischen Auswertung ergibt eine spezifische quantitative Methode zur Bestimmung von Ca-Leucovorin. Diese Methode ergibt präzise Resultate auch bei Anwesenheit von weiteren Folinaten. Ein speziell gereinigtes Ca-Leucovorin wird als neuer hochaktiver Standard vorgeschlagen.

### 1. Einleitung. -



Ca-Leucovorin, Calcium-folinat, Calciumsalz der 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure

$C_{20}H_{21}CaN_7O_7 \cdot 5H_2O$  Mol.-Gew. 601,6

Die Bedeutung von Ca-Leucovorin als Stoffwechselregulator, insbesondere als Überträger von  $C_1$ -Einheiten, ist erst in den letzten Jahren intensiver erforscht worden [1]. In letzter Zeit ist auch die therapeutische Wirkung von Ca-Leucovorin wiederholt bestätigt worden. Besonderes Interesse fanden die Anwendungen zur Herabsetzung der Toxizität von Folsäureantagonisten bei der Krebsbekämpfung [2] und zur