

OXYTOCIN-SYNTHESE AN FESTER PHASE

Von

P. PALLAI, K. KOVÁCS UND B. PENKE

Institut für Organische Chemie der Attila-József-Universität, Szeged

(Eingegangen am 1. Juni, 1973)

Zur Untersuchung der Peptidsynthese an fester Phase wurde Oxytocin mit drei verschiedenen Methoden synthetisiert. Es wurde festgestellt, daß reines Oxytocin sich mit ausschließlicher Anwendung von NPS-Aminosäuren nicht herstellen läßt. Infolge von Transpeptidations-Nebenprodukten ist auch der nachträgliche Ausbau der Amidgruppen des Asparagins und Glutamins durch Aminolyse der entsprechenden Ester nicht durchführbar. Zur Kontrolle der Kopplungsreaktion wurde eine neue Hydrolysemethode ausgearbeitet, die die quantitative Bestimmung aller Aminosäuren durch Ionenaustausch-Chromatographie ermöglicht.

Die von MERRIFIELD [1] in 1962 eingeführte Peptidsynthese an fester Phase ist bis heute ein viel diskutiertes Problem der Peptidchemie. Zahlreiche biologisch aktive Peptide wurden mit dieser Methode hergestellt. YAMASHIRO u.a. [2] berichteten in der letzten Zeit über die erfolgreiche Synthese des Human-ACTH. Das Hauptproblem der Peptidsynthese an fester Phase ist die Bildung von Fehlsequenzen mit falscher Aminosäurefolge. Mehrere Forschergruppen beschäftigten sich mit der Beseitigung dieses „Geburtsfehlers“, doch konnte das Problem bis heute nicht vollkommen gelöst werden. Auch in unserem Institute befaßten wir uns seit Jahren mit der Lösung dieses Problems und der Weiterentwicklung der Methode der Peptidsynthese an fester Phase. Als Modellverbindung wurde das Oxytocin gewählt, da es in mancher Hinsicht (wegen der leichten Herstellbarkeit, der enthaltenen trifunktionellen Aminosäuren und der bequemen Meßbarkeit der biologischen Wirkung) für das Studium der Kontrolle der Peptidsynthese-Methoden am besten geeignet erscheint.

Mehrere Synthesen des Oxytocins an fester Phase sind bekannt [3—8]. Die verschiedenen Darstellungsmethoden unterscheiden sich vor allem in der Wahl der angewandten Schutzgruppen, der Reinigungsverfahren und dem Typ der festen Träger. IVES [3] benutzte die leicht herstellbaren NPS-Aminosäuren zur Synthese des Oxytocins, die Seitenketten des Cysteins und Tyrosins mit Benzylgruppen schützend. Mit dieser Schutzgruppenkombination gelang es ihm, Oxytocin von verhältnismäßig guter Aktivität zu synthetisieren, das, entsprechend gereinigt, ein Produkt von voller biologischer Aktivität ergab, obwohl die Ausbeute ziemlich klein war. Infolge der Billigkeit der Nitrophenylsulfenyl-Aminosäuren erschien ihre Anwendung wirtschaftlich gerechtfertigt, deshalb versuchten wir auch das Oxytocin nach der IVESschen Methode herzustellen. Nach unseren Erfahrungen kann das C-terminale Tetrapeptid des Oxytocins mit Verwendung der NPS-Aminosäuren an fester Phase wirklich gut erhalten werden. Da aber die aktivierten Ester des

NSP-Asparagins und NPS-Glutamins rein, kristallin nicht herstellbar sind, ist diese Schutzgruppenkombination zur Synthese des reinen Oxytocins nicht geeignet. Die gesteigerte Säurelabilität der NPS-Schutzgruppe würde zwar sowohl in diesem als auch in anderen Fällen eine schonende Peptidsynthese ermöglichen, doch ist die Anwendung von NPS-Aminosäuren in der Form von DCHA-Salzen mit Nachteilen verbunden, indem während der Befreiung der Salze viel Aminosäure verloren geht. Dabei können bei der Abspaltung der NPS-Schutzgruppe Nebenreaktionen auftreten [9]. Infolge der erwähnten Nachteile erscheint die NPS-Gruppe nach unseren Erfahrungen nur für die Merrifield-Synthese kürzerer Peptidketten geeignet.

Der empfindlichste Punkt der Oxytocin-Synthese an fester Phase ist der Einbau des Asparagins und Glutamins ins Molekül, da in diesen Fällen die Dicyclohexylcarbodiimid-Kondensation infolge der Nitrilbildung [10, 11] nicht anwendbar ist. Durch die Anwendung aktivierter Ester läßt sich diese Nebenreaktion umgehen. Eine weitere, aus der Literatur [12, 13] bekannte Möglichkeit, nämlich der nachträgliche Ausbau der erwähnten Amidgruppen aus entsprechenden ω -Ethern wurde von INUKAI u.A. [8] zur Synthese von Oxytocin verwendet. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß sie die weit wirksamere DCC-Kopplung ermöglicht. Deshalb versuchten wir diese Methode bei der Oxytocin-Synthese zu verwenden, obwohl wir dabei auch mit der Bildung von Isoasparagin und Isoglutamin enthaltenden Sequenzteilen zu rechnen hatten [14, 15]. Das durch Abspaltung des geschützten Oxytocin-Nonapeptids vom Träger erhaltene Produkt erwies sich tatsächlich nicht einheitlich; der größte Teil bestand aus Isoasparaginy- und Isoglutaminyl-Peptiden. Wir zogen zwar ihre Bildung in Betracht, doch rechneten wir auf Grund der Angaben von INUKAI u.A. [8] damit, daß im Falle des Oxytocins die Transpeptidation infolge der ungünstigen sterischen Wirkung [16] nicht bevorzugt sein wird. Das Oxytocin läßt sich von den chemisch sehr ähnlichen, aber biologisch inaktiven Verunreinigungen mit den in der Peptidchemie üblichen Methoden nicht befreien; deren Gegenwart ist aber durch Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese und die niedrige biologische Aktivität des Produktes nachweisbar. Da die Menge der inaktiven Nonapeptide im gereinigten Endprodukt 60% erreicht, ist der erwähnte nachträgliche Ausbau des Asparagins und Glutamins zu empfehlen.

Die Erfahrungen der obigen Versuche benutzend synthetisierten wir das geschützte Oxytocin-Nonapeptid mit der Anwendung von BOC-Aminosäuren und DCC-Kondensation. Das BOC-Glutamin und BOC-Asparagin wurde mit *p*-Nitrophenylester gekoppelt, die Seitenketten des Cysteins und Tyrosins wurden mit Benzylgruppen geschützt. Die Vollständigkeit der Kopplungen wurde durch Titrieren nach DORMAN und gleichzeitige Aminosäuren-Analyse kontrolliert. Letztere Methode hat bekanntlich Nachteile (sie ist verhältnismäßig langsam, ergibt in ihrer ursprünglichen Form infolge der Zersetzung mehrerer Aminosäuren keine genauen Resultate, der Träger begünstigt die Zersetzung der Aminosäuren), dagegen ist sie bei der Bestimmung vieler Aminosäuren (Glycin, Prolin, Leucin, Isoleucin, usw.) sehr zuverlässig und genau. Im Falle der an den Seitenketten geschützten trifunktionellen Aminosäuren werden die Schutzgruppen bei der üblichen Hydrolysemethode gewöhnlich teilweise entfernt; deshalb ist bei der Berechnung der wahren Tyrosin- und Cysteinmenge die während der Hydrolyse unverändert gebliebene Menge der entsprechenden Benzylderivate zu den freien Aminosäuren zu addieren. (O-Benzyl-Tyrosin und S-Benzyl-Cystein werden nämlich während Aminosäureanalyse von der kurzen Säule mit den basischen Aminosäuren vor Histidin eluiert). Das Problem

wird dadurch kompliziert, daß das Tyrosin und sogar das Cystein während der Hydrolyse teilweise zersetzt wird. Die Zersetzung dieser und anderer Aminosäuren kann durch eine von uns ausgearbeitete neue Hydrolysemethode größtenteils vermieden werden, indem statt der Mischung von Salzsäure und Dioxan oder Salzsäure und Essigsäure 3*N* Merkaptoäthansulfonsäure (in 50%-iger Essigsäure gelöst) angewandt wird. Es wurden für alle von uns benützten Aminosäuren die Korrektionsfaktoren berechnet, deren Anwendung die genaue quantitative Bestimmung aller empfindlichen und an Seitenketten geschützten Aminosäuren ermöglicht [17]. Dadurch lassen sich die infolge der vom Träger verursachten und spontanen Zersetzung entstehenden Fehler vermeiden und die Bestimmungsmöglichkeit auf zahlreiche geschützte Aminosäurederivate erweitern. Die Aminosäurenanalyse wurde von uns zu einer für die Kontrolle der Peptidsynthese an fester Phase routinemäßig verwendbaren Methode entwickelt, die sich zwar langsamer, aber in vielen Fällen zuverlässiger als die Dorman-Titration erweist.

Bei den Kopplungsreaktionen, in denen mehr als 5% der Aminogruppen frei bleibt [Glu(NH₂), Asp(NH₂), Ile, Tyr (Bzl)] kann nach unter denselben Bedingungen wiederholter Kopplungsreaktion 3-Nitrophthalsäureanhydrid als Blocker angewandt werden [18]. Die *p*-Nitrophenylester des BOC-Glutamins und Asparagins werden auch bei großem, fünffachem Überschuß und wiederholter Reaktion nur bis zu 75–80% gekoppelt. Deshalb haben wir die Reaktionsgeschwindigkeit der sich bei klassischen Peptidsynthesen [19] durch hohe Reaktionsfähigkeit auszeichnenden Pentafluorphenylester der BOC-Aminosäuren an fester Phase untersucht [20]. Nach unseren Versuchen zeigen die Pentafluorphenylester auch an fester Phase weit größere Reaktionsfähigkeit als die *p*-Nitrophenylester; deshalb haben wir bei späteren Oxytocin-Synthesen zur Kopplung des BOC-Asparagins und Glutamins deren Pentafluorphenylester verwendet.

Die geschützten Nonapeptide wurden vom Träger durch Ammonolyse abgespaltet. Die in Dimethylformamid gelösten Rohprodukte wurden durch Fällung mit Äther bzw. Methanol gereinigt. In einem Falle war es infolge der Verwendung von 3-Nitrophthalsäureanhydrid als Blocker möglich, das geschützte Nonapeptid mittels Ionenaustausches von den Fehlsequenzen zu reinigen [18]. Infolge der sehr schlechten Wasserlöslichkeit des Oxytocin-Nonapeptids versuchten wir die Ionenaustauschchromatographie in Dimethylformamid-Methanol-Gemisch, mit Anwendung der von YOUNG [21] angegebenen Methode, mit einem makroporösen Ionenaustauscher (Amberlyst A-26) durchzuführen. Leider ist der Ionenaustausch unter solchen Bedingungen so langsam, daß wir keine effektive Reinigung erzielen konnten. (Bei anderen, in Wasser oder Methanol besser löslichen Peptiden läßt sich diese Methode erfolgreicher anwenden.) Nach der erwähnten Reinigung wurden die Schutzgruppen von den Nonapeptiden durch Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammonia entfernt, dann das freie Nonapeptid durch Einführung von Luft bei pH=7 oxidiert [22]. Die Oxytocin-Aktivität der Lösung (~70–80 Einheit/ml) war niedriger, als die des mit der klassischen Synthese gewonnenen Produktes, was auf Verunreinigung des Rohproduktes durch Fehlsequenzen hinweist. Nach unserer Meinung ist die Synthese an fester Phase in seiner gegenwärtigen Form ohne jeden besonderen Reinigungsschritt für die Synthese von Oxytocin von etwa 100 Einheit/mg Aktivität geeignet. Auch eine weitere Reinigung ist durchführbar [23].

Für die Unterstützung unserer Forschungen und die Durchführung der biologischen Untersuchungen sind wir der Pharmazeutischen Fabrik GEDEON RICHTER (Budapest) zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Experimentelles

Oxytocin-Synthesen an fester Phase

a) *Versuch mit NPS-Aminosäuren.* NPS-Glycin wurde in der durch MERRIFIELD beschriebenen Weise an chlormethyliertes, 2% Divinylbenzol enthaltendes Polystyrol-Harz gebunden. Die Menge des Glycins wurde durch Aminosäurenanalyse und Stickstoffbestimmung des Harzes zu etwa 0,70–0,80 mMol/g bestimmt. Die Herstellung des Oxytocins wurde mit dem folgenden Synthesesyklus durchgeführt:

Waschen des Peptidträgers (7 g, ~5 mMol) mit CH_2Cl_2 , 5 Min. Schütteln mit 5% Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 , dann 15 Min. mit 0,5N HCl in Essigsäure — CH_2Cl_2 (1:1), um die NPS-Gruppe zu entfernen. Je 3× Waschen mit CH_2Cl_2 , Äthanol und CH_2Cl_2 , 10 Min. Behandeln mit 10% Triäthylamin in CH_2Cl_2 , zur Freisetzung der Aminogruppen. 3×5 Min. Waschen mit CH_2Cl_2 , 10 Min. Äquilibrieren mit der CH_2Cl_2 Lösung der entsprechenden NPS-Aminosäure (15 mMol, 3× Überschuß). Nach Zugabe von 15 ml 1 Mol Dicyclohexylcarbodiimid-Lösung in CH_2Cl_2 , 2 Std. Schütteln. Abschließend je 3× Waschen mit CH_2Cl_2 , Dimethylformamid und CH_2Cl_2 , Kopplungskontrolle durch DORMAN-Titration und Aminosäuren Analyse.

Bei Anwendung von NPS-Aminosäuren ergaben die Kopplungsreaktionen bis zur Synthese des C-terminalen Tetrapeptides ständig Ausbeuten über 95%; so wurde kein Blocker angewendet. Die *p*-Nitrophenylester des NPS-Asparagins und NPS-Glutamins ergaben auch bei 6× Überschuß eine so niedrige Ausbeute (50–60%), daß die Synthese nach dem Einbau des NPS-Glutamins unterbrochen werden mußte, da das eingebaute Glutamin nur 25% der ursprünglichen Menge des C-terminalen Glycins betrug.

b) *Versuch mit BOC-Aminosäuren, mit nachträglichem Ausbau der Amidgruppen des Asparagins und Glutamins.* Die Synthese erfolgte im wesentlichen nach dem unter a) beschriebenen Zyklus. Die erste Beladung des Trägers betrug 0,55 mMol Glycin/g Harz (8 g, etwa 4,5 mMol). Der einzige Unterschied bestand darin, daß die BOC-Schutzgruppen mit 25%-iger Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 in Reaktionszeiten von 30 Min. entfernt wurden. Die Reihenfolge der angewandten Aminosäurederivate war wie folgt: BOC-Leu, BOC-Pro, BOC-Cys (Bzl), BOC-Asp (OMe), BOC-Glu (OMe), BOC-Ile, BOC-Tyr (Bzl) und Z-Cys (Bzl). Die Kopplung von BOC-Ile und BOC-Tyr (Bzl) wurde wiederholt. Auf Grund der Dorman-Titration bzw. der Aminosäurenanalyse wurden die Aminosäuren in folgenden Prozentanteilen in das Molekül eingebaut: (Glycin 100%) Leu 97–98%, Pro 95–96%, Cys 95%, Asp 90–91%, Glu 85–87%, Ile 75–80%, Tyr 75–78%, Cys 65–70%.

c) *Synthese mit BOC-Aminosäuren, mit Anwendung von 3-Nitrophthalsäureanhydrid als Blocker.* Sie Synthese erfolgte im wesentlichen wie unter b) mit folgenden Unterschieden: zum Einbau des BOC-Asparagins und BOC-Glutamins wurden ihre *p*-Nitrophenylester in 6× Überschuß mit 12 Std. Reaktionszeit angewandt und der Kopplungsprozeß in beiden Fällen wiederholt. Die Ergebnisse der Dorman-Titrierung und der Aminosäurenanalyse waren die Folgenden: (Gly=100%) Leu

95—96%, Pro 95—96%, Cys 92—94%, Asp(NH₂) 80—85%, Glu(NH₂) 75—80%, Ile 70—75%, Tyr 65—70%, Cys 65—70%. Nach der Kopplung von BOC-Asparagin, BOC-Glutamin, BOC-Isoleucin und BOC-Tyrosin-Benzyläther wurden die un-reagierten Aminogruppen mit 3-Nitrophthalsäureanhydrid in der folgenden Weise blockiert: nach der Dorman-Titrierung wurde das Polymer mit Dimethylformamid gewaschen, dann mit der Lösung von äquivalenter Menge (5 mMol) 3-Nitrophthalsäureanhydrid in 20 ml Pyridin behandelt. Der Überschuß des Blockers wurde durch waschen mit Triäthylamin in Dimethylformamid entfernt.

Analytische Kontrolle der Kopplungsreaktionen

a) *Mit Dorman-Titration.* Die Vollständigkeit der Kopplungsreaktion wurde mit der Dorman-Methode kontrolliert, jedoch statt Pyridin-Hydrochlorid nach LOSSES Vorschlag [25] Pyridin-Hydrobromid verwendet.

b) *Mit Aminosäuren-Analyse.* Nach der Peptidbindung wurde das Polymer durch gründliches Waschen (s. Synthesesyklus) von den Nebenprodukten und Verunreinigungen befreit, dann ein Muster von etwa 8—10 mg getrocknet. Das Muster wurde in ein Bombenrohr (Pyrex, 80×12 mm) eingemessen und 1 ml 3*N* Merkaptoäthansulfonsäure (in 50%-iger Essigsäure gelöst) zugegeben. Die Lösung wurde auf -70 °C abgekühlt, das Bombenrohr mit dem eingefrorenen Material in Vakuum (~50 µHg) zugeschmolzen; nach 22stündiger Hydrolyse (110±2 °C) das Rohr geöffnet und der Inhalt quantitativ auf ein kleines Glasfilter übertragen, das Polymer abfiltriert, und mit 1,00 ml pH 5,28 Natriumcitrat-Puffer nachgewaschen. Von der erhaltenen 2 ml Lösung wurden Anteile von 0,2 ml zur Aminosäuren-Analyse benützt: (Wir arbeiteten mit einem automatischen Aminosäure-Analysator, Modell HD-1200 E, mit Zweikolumnen-System, mit Chromex KG—50 als Ionenaustauscher.)

Herstellung und Reinigung der Oxytocin-Cyclopeptide

a) *Nach der Peptidsynthese mit Methode b)* wurde das Polymer gründlich getrocknet, in 50 ml abs. Dimethylformamid gequollen und 50 ml mit Ammoniak gesättigtes Methanol zugegeben. Durch die Mischung wurde 2 Stunden lang, bei 0 °C, NH₃ geleitet, dann wurde sie über Nacht stehengelassen. Das Polymer wurde abfiltriert, mit Dimethylformamid nachgewaschen, und die Ammonolyse noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Dimethylformamid-Methanol Lösungen wurden eingedampft, das erhaltene Öl in 20 ml Dimethylformamid gelöst und das geschützte Nonapeptid mit Äther gefällt. Das Rohprodukt (3,2 g, 55% auf das ursprüngliche Glycin bezogen) war noch nicht chromatographisch rein, deshalb wurde es in 15 ml Dimethylformamid gelöst und durch Ausfällen mit 500 ml Methanol gereinigt. Dieser Reinigungsprozeß wurde wiederholt und so 2,0 g (33%) Produkt von etwas unscharfem Schmelzpunkt (215—220 °C) erhalten, dessen Aminosäuren-Analyse (Gly 1,00) Leu 0,98; Pro 0,92; Cys 1,84; Asp 0,97; Glu 0,97; Ile 0,82; Tyr 0,75 ergab.

Analyse: Ber. C₆₅H₈₈O₁₅N₁₂S₂ (1341,51) C 58,30; H 6,70; N 12,53%; Gef. C 57,72; H 6,53; N 12,70%. $[\alpha]_D^{22} = -43,5^\circ$ (c=1, DMF).

Durch Dünnschichtchromatographie (in *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:1, bzw. Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser 60:20:6:11) konnten 4—5 Peptide von einander sehr nahe liegenden R_f-Werten nachgewiesen werden, eines davon ist

auf Grund des R_f -Wertes das gesuchte Oxytocin-Nonapeptid, das durch Säulen-chromatographie weder an Silicagel noch an Sephadex LH-20 (DMF-EtOH Gradient) von den chemisch sehr ähnlichen Verunreinigungen getrennt werden konnte. Die Oxytocin-Aktivität nach Reduktion der Schutzgruppen mit Natrium in flüssigem NH_3 und Oxidation (2 Stunden, $\text{pH}=7$, Luftzuführung) betrug ~ 5 Einheit/mg.

b) Nach der Synthese mit der Methode c) wurde das Nonapeptid mit der unter a) beschriebenen Methode mittels Ammonolyse vom Polymer abgespalten und durch Fällung gereinigt. Nach der Reinigung wurde ein chromatographisch fast reines Produkt mit ziemlich scharfem Schmelzpunkt ($229\text{--}230^\circ\text{C}$) erhalten. Ausbeute 1,00 g (18%).

Anal. Ber. $\text{C}_{65}\text{H}_{88}\text{O}_{15}\text{N}_{12}\text{S}_2$ (1341,51) C 58,30; H 6,70; N 12,53%; Gef. C 57,84; H 7,00; N 12,40%. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -51,5^\circ$ ($c=0,6$ DMF).

Die Aminosäurenanalyse ergibt etwas niedrige Werte für Glutaminsäure und Tyrosin. (Gly=1,00) Leu 0,96; Pro 0,95; Cys 1,75; Asp 0,92; Glu 0,87; Ile 0,92; Tyr 0,65. Von 0,50 g des Materials wurden die Schutzgruppen durch Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak entfernt, dann das freie Nonapeptid durch Luftzuführung bei $\text{pH} 7$ zwei Stunden lang oxidiert. Die Oxytocin-Aktivität der Lösung wurde unmittelbar gemessen, und auf Grund der Konzentration der Lösung (1 mg/ml) 70,8 Einheit/ml gefunden.

Literature

- [1] Merrifield, R. B.: Federation Proc. **21**, 412 (1962).
- [2] Yamashiro, D., C. H. Li: J. Amer. Chem. Soc. **95**, 1310 (1973).
- [3] Ives, D. A.: Can. J. Chem. **46**, 2318 (1968).
- [4] Bayer, E., H. Hagenmaier: Tetrahedron Letters 2037 (1968).
- [5] Bayer, E., H. Hagenmaier: Peptides 1968, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1968) S. 162.
- [6] Manning, M.: J. Amer. Chem. Soc. **90**, 1348 (1968).
- [7] Beyerman, H. C., R. A. In 't Veld: Rec. Trav. Chim. **88**, 1019 (1969).
- [8] Inukai, N. u.A.: Bull. Chem. Soc. Japan **41**, 182 (1968).
- [9] Phocas, I. u.A.: J. Chem. Soc. 1506 (1967).
- [10] Paul, R., A. S. Kende: J. Amer. Chem. Soc. **86**, 741, 4162 (1964).
- [11] Ressler, C.: J. Amer. Chem. Soc. **78**, 5956 (1956).
- [12] Fruton, J. S., M. Bergman: J. Biol. Chem. **127**, 627 (1939).
- [13] Miller, H. K., H. Waelsch: Arch. Biochem. Biophys. **35**, 176 (1952).
- [14] Kovács, J., K. Medzihradzski, V. Bruckner: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. **6**, 183 (1955).
- [15] Hanson, R. W., H. N. Rydon: J. Chem. Soc. 836 (1964).
- [16] Battersby, A. R., J. J. Reynolds: J. Chem. Soc. 524 (1961).
- [17] Kovács, K., R. Ferenczi, B. Penke: Monatshefte, im Druck
- [18] Wieland, T. u.A.: Annalen **727**, 130 (1969).
- [19] Kovács, J., L. Kisfaludy: J. Org. Chem. **35**, 3563 (1970).
- [20] Penke, B., K. Kovács: Peptides 1972, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1973) S. 187.
- [21] Young, G. T.: Chem. Comm. 1057 (1971).
- [22] Du Vigneaud, V., u.A.: J. Amer. Chem. Soc. **75**, 4879 (1953).
- [23] Manning, M. u.A.: J. Chrom. **38**, 396 (1968).
- [24] Losse, G.: Persönliche Mitteilung.

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ОКСИТОЦИНА

П. Паллаи, К. Ковач, Б. Пэнке

С целью изучения синтеза пептидов на твердой фазе нами был синтезирован окситоцин тремя разными методами. Было установлено, что при исключительном применении аминокислот *NPS* нельзя синтезировать чистый окситоцин. Из-за побочных реакций транспептидации так же нельзя решить дополнительное образование группы амида кислот аспарагина и глутамина путём аминолиза соответствующих эфиров. Для проверки реакции присоединения нами был выработан новый метод гидролиза, способствующий точному количественному определению всех аминокислот при помощи анализатора аминокислот.