

mit Äther, Tetrahydrofuran und Benzol ausgewaschen und über Cellit filtriert. Als Lösungsmittelrückstand blieben nach dem Eindampfen 10.667 g, die sofort kristallisierten. Ausb. 84% d. Th., Schmp. 80–81°, IR-Spektrum:  $C \equiv C$  4.67  $\mu$  (2143/cm).

$C_{20}H_{15}SnCl$  (409.5) Ber. C 58.66 H 3.69 Gef. C 58.62 H 3.63

PETER SCHELLENBERG und JOHANNES ULLRICH \*)

## Synthese weiterer Oligopeptide aus L-Glutaminsäure und Glycin sowie L-Tyrosin

Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn

(Eingegangen am 4. Februar 1959)

Ausgehend von den in der ersten Veröffentlichung<sup>1)</sup> beschriebenen Substanzen wurden Derivate der folgenden Peptide synthetisiert: Glycyl-L-glutaminsäure, Glycyl-glycyl-L-glutaminsäure,  $\gamma$ -L-Glutamyl-glycin,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -L-Glutamyl- $\alpha$ -L-glutamyl-glycin und  $\alpha$ -L-Glutamyl-L-tyrosin. Auch einige freie Peptide konnten erhalten werden. Als interessante Nebenprodukte der Peptidsynthese über gemischte Anhydride mit Kohlensäure-halbestern wurden in zwei Fällen Diacylimide erhalten.

In Fortsetzung der Versuche zum Aufbau von Tripeptiden aus zwei Moll. L-Glutaminsäure und einem Mol. Glycin<sup>1)</sup> wurden neben weiteren Zwischenprodukten einige der möglichen isomeren Tripeptide synthetisiert und zum Teil in kristalliner Form erhalten.

Die Schwierigkeiten, Carbobenzoxy-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester (Nr. 10 der I. Mitteil.<sup>1)</sup>) kristallisiert zu erhalten, klärten sich in unerwarteter Weise auf:

Bei der Kondensation von Cbo-Glycin mit L-Glutaminsäure-diäthylester über das gemischte Anhydrid mit Kohlensäure-äthyl- oder -isobutylester bildete sich neben dem zu erwartenden Cbo-Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester — entgegen den Erfahrungen von WIELAND und Mitarbb.<sup>2,3)</sup> — in gewissem Umfang ein gut kristallisierendes und ziemlich stabiles Diacylimid der Zusammensetzung  $C_{29}H_{35}N_3O_{10}$ ,

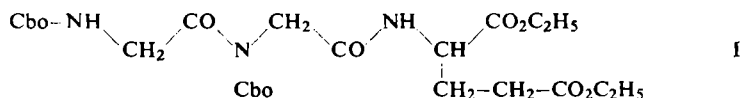
\*) Weitere Einzelheiten in den Dissertationen P. SCHELLENBERG und J. ULLRICH, Univ. Bonn 1958.

<sup>1)</sup> B. HELFERICH, P. SCHELLENBERG und J. ULLRICH, Chem. Ber. **90**, 700 [1957]; [auf S. 707, Nr. 9a., Zeile 1 und 2 sind die Mengenangaben 7.8 g und 7.25 g auszutauschen. — Cbo- $\alpha$ -L-Glutamyl-[ $\gamma$ -methylester]-L-glutaminsäure-diäthylester (Nr. 18. auf S. 710) wurde etwa gleichzeitig mit uns durch Methylierung von Cbo- $\alpha$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure-diäthylester mit Diazomethan gewonnen von D. A. ROWLANDS und G. T. YOUNG, Biochem. J. **65**, 516 [1957]; Schmp. 79–81°; Drehung nicht angegeben].

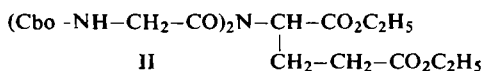
<sup>2)</sup> T. WIELAND und H. MOHR, Liebigs Ann. Chem. **599**, 222 [1956].

<sup>3)</sup> T. WIELAND und B. HEINKE, Liebigs Ann. Chem. **599**, 70 [1956].

welches wir auf Grund seiner Reaktionen für *N*-Cbo-*N*-[Cbo-Glycyl]-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester (I) halten.



Seine katalyt. Hydrierung in chlorwasserstoffhaltigem Äthanol lieferte Glycylglycyl-L-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid<sup>4)</sup>, seine alkalische Hydrolyse ein Gemisch von Cbo-Glycin und Cbo-Glycyl-L-glutaminsäure. Abspaltung nur der endständigen Cbo-Gruppe mit HBr in Eisessig<sup>3)</sup> führte bisher zu nicht unzersetzt isolierbaren, sirupösen Produkten, so daß dieser sicherste Beweis für die Konstitution I noch nicht erbracht ist. Doch macht die sehr gute Ausbeute bei der katalyt. Hydrierung die ebenfalls denkbare Formel II weniger wahrscheinlich<sup>5)</sup>.



Versuche, durch Änderung des Mengenverhältnisses (z. B. 2 Moll. Cbo-Glycin usw. auf 1 Mol. L-Glutaminsäure-diäthylester) oder der Reaktionszeiten höhere Ausbeuten an Diacylimid zu erzielen, blieben bisher erfolglos.

Nach Entfernung des beschriebenen Nebenproduktes ließ sich der Cbo-Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester sicher zur Kristallisation bringen.

Durch Umsetzung von Cbo-Glycin mit L-Glutaminsäure-dibenzylester entstand ebenfalls neben dem bisher nicht kristallisierenden Hauptprodukt in geringer Menge ein Diacylimid C<sub>39</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>, das kristallisiert erhalten werden konnte. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um den I entsprechenden Benzylester; doch wurde die Substanz noch nicht näher untersucht.

Die früher beschriebenen Cbo- $\alpha$ -Glutamyl-tripeptidester (I. Mitteil.<sup>1)</sup> Nr. 19–21) erleiden bei alkalischer Esterverseifung starke Teilisomerisierung, wie sich durch katalyt. Hydrierung der sirupösen Verseifungsprodukte und papierchromatographische Untersuchung der so entstandenen freien Peptide zeigen ließ. Schließlich gelang die Abspaltung aller Schutzgruppen gemeinsam durch vorsichtige Behandlung mit konz. Salzsäure<sup>6)</sup> und führte zu den kristallisierten Tripeptiden  $\alpha$ -L-Glutamylglycyl-L-glutaminsäure und  $\alpha$ -L-Glutamyl- $\alpha$ -L-glutamyl-glycin, welche beide Zink-Komplexsalze liefern.

Wegen der anfänglichen Schwierigkeiten bei der Weiterverarbeitung der Cbo-Verbindungen wurde die Synthese der beiden Tripeptide vorübergehend auch durch Kondensation von Tosyl-L-pyroglutaminsäure<sup>7–9)</sup> mit den entsprechenden Dipeptidestern versucht und lieferte gut kristallisierten Tosyl-L-pyroglutamyl-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester sowie schlecht kristallisierenden Tosyl-L-pyroglutamyl- $\alpha$ -L-glutamyl- $\gamma$ -methylester-glycin-äthylester. Nach Gelingen der oben beschriebenen Schutzgruppenabspaltung mit konz. Salzsäure aus den Cbo-Verbindungen wurde der Weg über die Tosyl-Verbindungen uninteressant.

4) V. PRELOG und P. WIELAND, *Helv. chim. Acta* **29**, 1130 [1946].

5) Vgl. T. WIELAND und H. URBACH, *Liebigs Ann. Chem.* **613**, 84 [1958].

6) R. B. MERRIFIELD und D. W. WOOLLEY, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 4646 [1956].

7) C. R. HARRINGTON und R. C. C. MOGGRIDGE, *J. chem. Soc. [London]* **1940**, 706.

8) J. RUDINGER, *Collect. Czechoslov. chem. Commun.* **19**, 365 [1954].

9) J. M. SWAN und V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 3110 [1954].

Die Synthese der entsprechenden  $\gamma$ -Glutamylpeptide wurde zunächst durch Kondensation von Cbo-L-Glutaminsäure- $\gamma$ -azid<sup>10-12)</sup> mit geeigneten Dipeptidestern vorgenommen; alkalische Esterverseifung der sirupösen Cbo-Tripeptid-ester und anschließende Hydrogenolyse ergaben im Falle der  $\gamma$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure ein einigermaßen reines, wenn auch nicht kristallines Tripeptid; beim  $\gamma$ -L-Glutamyl- $\alpha$ -L-glutamyl-glycin trat in starkem Maße Isomerisierung ein. Saure Verseifung wie bei den  $\alpha$ -Isomeren führte zu weitgehender Spaltung der  $\gamma$ -Glutamylbindung.

Zur Erhöhung der Kristallisationsneigung der Zwischenprodukte zogen wir stärker polare Amino-Schutzgruppen heran:

Kondensation von *Tosyl-L-glutaminsäure- $\gamma$ -azid*<sup>8)</sup> mit *Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester* ergab gut kristallisierenden *Tosyl- $\gamma$ -L-glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester*; bei Verwendung von *Tosyl-L-pyroglytaminsäure*<sup>7-9)</sup> als carboxyl-aktiviertes Ausgangsmaterial entstand in weit höherer Ausbeute ein Rohprodukt von sehr geringer Reinheit, vermutlich infolge des notwendigen langen Erhitzens. Alkalische Esterverseifung der Substanz führte zu Teilisomerisierung, Behandlung mit konz. Salzsäure zu weitgehender Spaltung der  $\gamma$ -Glutamylbindung.

Die aus *Trifluoracetyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ -äthylester- $\gamma$ -chlorid*<sup>13, 14)</sup> mit *Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester* und mit  $\alpha$ -L-Glutamyl- $[\gamma$ -methylester]-glycin-äthylester erhaltenen Kondensationsprodukte kristallisierten spontan und ließen sich durch Umkristallisieren leicht rein gewinnen. Allerdings wurden bei der alkalischen Schutzgruppenabspaltung<sup>14)</sup> beide Tripeptide wieder teilisomerisiert erhalten, vor allem das  $\gamma$ -Glutamyl- $\alpha$ -glutamyl-glycin.

Die Versuche, auch die beiden  $\gamma$ -Glutamyltripeptide sowie weitere Isomere in reinem, möglichst kristallisiertem Zustand zu gewinnen, werden fortgesetzt.

Als Substrat für Fermentspaltungsversuche im Rahmen einer anderen Arbeit wurde Cbo- $\alpha$ -L-Glutamyl-L-tyrosin benötigt. Zur Gewinnung dieser Substanz wurde eine gegenüber der BERGMANNschen<sup>15, 16)</sup> aus Cbo-L-Glutaminsäure-anhydrid und L-Tyrosin-äthylester noch günstigere Synthese gesucht. Besonders gut gelang die Darstellung des Cbo-Dipeptids durch Kondensation von Cbo-L-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester<sup>11, 12)</sup> mit L-Tyrosin-methylester<sup>17)</sup> nach dem Kohlensäure-halbester-Anhydrid-Verfahren und nachfolgende alkalische Verseifung in der üblichen Weise<sup>15, 16)</sup>. Zum Vergleich wurde auch *Tosyl- $\alpha$ -L-glutamyl-L-tyrosin*<sup>8)</sup> auf dem Wege über *Tosyl-L-pyroglytamin-L-tyrosin-methylester* synthetisiert.

Diese Arbeit wurde auf Anregung von Prof. Dr. B. HELFERICH ausgeführt, dem für seine großzügige Unterstützung unser herzlicher Dank gilt. -- Dem WIRTSCHAFTSMINISTERIUM NORDRHEIN-WESTFALEN danken wir für die Bereitstellung von Mitteln.

10) B. HEGEDÜS, *Helv. chim. Acta* **31**, 737 [1948].

11) W. E. HANBY, S. G. WALEY und J. WATSON, *J. chem. Soc.* [London] **1950**, 3239.

12) S. G. WALEY, *J. chem. Soc.* [London] **1955**, 517.

13) F. WEYGAND und M. REIHER, *Chem. Ber.* **88**, 26 [1955].

14) F. WEYGAND und R. GEIGER, *Chem. Ber.* **90**, 634 [1957].

15) M. BERGMANN, L. ZERVAS, L. SALZMANN und H. SCHLEICH, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **224**, 17 [1934].

16) H. ZAHN und K. ZIEGLER, *Liebigs Ann. Chem.* **610**, 132 [1957].

17) E. FISCHER und W. SCHRAUTH, *Liebigs Ann. Chem.* **354**, 34 [1907]; E. FISCHER, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **41**, 855 [1908].

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE<sup>18)</sup>*Derivate von Glycyl-L-glutaminsäure und Glycyl-glycyl-L-glutaminsäure*

1. *N-Cbo-N-[Cbo-Glycyl]-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester (I) und Cbo-Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester*<sup>1,4,19)</sup>

a) Eine Lösung von 21 g (0.1 Mol) *Cbo-Glycin*<sup>20, 21)</sup> und 14 ccm trockenem Triäthylamin in 150 ccm absol. Chloroform wird bei  $-5$  bis  $-10^\circ$  mit 13.2 ccm *Chlorameisensäure-isobutylester* versetzt. Nach 20 Min. wird die entstandene Anhydridlösung unter Rühren in eine bei  $-10^\circ$  frisch bereitete Lösung von 25 g (0.104 Mol) *L-Glutaminsäure-diäthylesterhydrochlorid*<sup>22, 23, 4)</sup> und 14.5 ccm Triäthylamin in 150 ccm absol. Chloroform gegossen, wobei  $\text{CO}_2$  entweicht. Die Lösung wird noch 1 Stde. im Eis/NaCl-Bad weitergerührt und bleibt dann mindestens 10 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Sie wird gewaschen mit je 200 ccm *n* HCl (3mal), Wasser und 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (4- bis 5mal; bei schlechter Phasentrennung wird etwas Äther zugefügt), getrocknet mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und i. Vak. zum Sirup eingedampft (32–34 g), der bei langem Stehenlassen manchmal eine kleine Menge Nadeln abscheidet. Durch Lösen des Sirups in 75 ccm 99-proz. Äthanol, Zugabe von 75 ccm Petroläther und ein- bis mehrtägiges Aufbewahren bei ca.  $-15^\circ$  wird das Diacylimid *I* praktisch vollständig in feinen Nadeln abgeschieden. Es wird mit Äthanol/Petroläther (1:3) und Petroläther gewaschen. Ausb. ca. 5 g (17% des eingesetzten Cbo-Glycins). Die nach mehrfachem Umkristallisieren aus Äthanol/Petroläther (je 50 ccm) analysenreine Substanz schmilzt bei  $112.5-113^\circ$ . Sie löst sich sehr leicht in Dioxan,  $\text{CHCl}_3$  und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , leicht in Aceton, Eisessig, Essigester,  $\text{CCl}_4$  und Pyridin, mäßig in niederen Alkoholen, aromatischen Kohlenwasserstoffen und heißem Wasser, schwer in Äther, praktisch nicht in Paraffinkohlenwasserstoffen.

$\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_{10}$  (585.6) Ber. C 59.48 H 6.02 N 7.18 O 27.32  
Gef. C 59.35 H 6.14 N 7.09 O 27.29

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-14.0^\circ$  ( $c = 2.70$ , in 96-proz. Äthanol).

Aus dem Filtrat von *I* werden durch Eindampfen i. Vak. 26–28 g (66–71% d. Th.) weitgehend reiner, aber noch sirupöser *Cbo-Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester* gewonnen, der durch ein- bis mehrfaches Umfällen aus Essigester/Petroläther und längeres Aufbewahren bei  $-15^\circ$  zur Kristallisation gebracht werden kann. Ausb. 14–16 g (36–41% d. Th.), derbe, speckige Kristallmasse vom Schmp.  $44-48^\circ$ . Durch mehrmaliges (verlustreiches) Umkristallisieren aus reichlich Essigester/Petroläther entstehen dünne Plättchen vom Schmp.  $49-50^\circ$ .

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$  (394.4) Ber. N 7.10 Gef. N 7.03

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-12.0^\circ$  ( $c = 1.93$ , in 96-proz. Äthanol).

b) *Cbo-Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester (Phosphorazo-Methode*<sup>24)</sup>): Die Lösung von 2.4 g (10 mMol) *L-Glutaminsäure-diäthylesterhydrochlorid*<sup>22, 23, 4)</sup> in 20 ccm Pyridin<sup>25)</sup> wird bei  $-10^\circ$  unter Schütteln tropfenweise mit einer vorgekühlten Lösung von 0.44 ccm *Phosphorichlorid* in 5 ccm Pyridin<sup>25)</sup> versetzt. Man beläßt 15 Min. bei Raumtemperatur, trägt

18) Die Schmp. (unkorr.) sind auf dem Cu-Block unter dem Mikroskop bestimmt.

19) K. HOFMANN und M. BERGMANN, J. biol. Chemistry **134**, 225 [1940]; ref. C. **1940** II, 2036.

20) M. BERGMANN und L. ZERVAS, Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1192 [1932].

21) Org. Syntheses, Coll. Vol. III, 168; John Wiley & Sons, New York 1955.

22) E. FISCHER, Ber. dtsh. chem. Ges. **34**, 453 [1901].

23) H. M. CHILES und W. A. NOYES, J. Amer. chem. Soc. **44**, 1802 [1922].

24) S. GOLDSCHMIDT und C. JUTZ, Chem. Ber. **89**, 518 [1956].

25) L. BILEK, J. DERKOSCH, H. MICHL und F. WESSLEY, Mh. Chem. **84**, 727 [1953].

dann 2.1 g (10 mMol) *Cbo-Glycin*<sup>20, 21</sup>) ein, bewahrt die Mischung 4 Tage auf und dampft schließlich i. Vak. zum Sirup ein. Der Rückstand wird mit Wasser und Essigester aufgenommen, die wäßr. Phase gut mit Essigester ausgeschüttelt. Die Extrakte werden mit *n* HCl (2mal), Wasser und 5-proz. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (2- bis 3mal, bis die Waschlösung sich beim Ansäuern nicht mehr trübt) gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der erhaltene Sirup kristallisiert nach mehrmaligem Umfällen aus Essigester/Petroläther beim Aufbewahren bei ca. -15°. Umkristallisieren aus viel Essigester/Petroläther (1:1) führt zu derben Kristallen vom Schmp. 48-50°, leicht löslich in den üblichen Lösungsmitteln außer Wasser, Äther und vor allem Paraffinkohlenwasserstoffen.

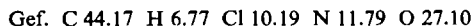
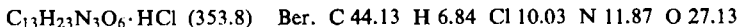


$[\alpha]_D^{25}$ : -11.8° (*c* = 1.86, in 96-proz. Äthanol).

2. *Versuch der Schutzgruppenabspaltung aus dem Diacylimid I*: Eine Lösung von 300 mg (ca. 0.5 mMol) *N-Cbo-N-[Cbo-Glycyl]-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester* (I) in 10 ccm Dioxan bleibt nach Zusatz von 3.5 ccm 0.5 *n* KOH 30 Min. bei Raumtemperatur stehen. Nach Zugabe von 0.5 ccm Eisessig wird sie i. Vak. eingedampft, der Sirup aufgenommen mit Essigester und *n* HCl. Nach Waschen der Esterphase mit *n* HCl und Wasser und Trocknen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird diese i. Vak. eingedampft und der sirupöse Rückstand nach Lösen in 60-proz. Äthanol mit Pd-Mohr als Katalysator 3 Stdn. hydriert. Die papierchromatographische Untersuchung des durch Vakuumindampfen des Filtrats vom Pd erhaltenen hygroskopischen Sirups mit *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5; organ. Phase mobil), absteigend auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 b, angefärbt mit Ninhydrin, ergibt etwa gleiche Mengen *Glycin* und *Glycyl-L-glutaminsäure*<sup>1</sup>).

### 3. *Glycyl-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid*<sup>4</sup>)

a) *Aus dem Diacylimid I*: 903 mg (1.54 mMol) I (1a) werden in 50 ccm absol. Äthanol unter Zusatz von 5 mMol HCl und ca. 0.5 g Pd-Mohr 5 Stdn. hydriert. Beim Vakuumindampfen des Filtrats vom Pd hinterbleiben 540 mg (99 % d. Th.) krist. Rückstand, der recht rein ist. Nach Umkristallisieren aus Äthanol/Petroläther schmilzt das *Ester-hydrochlorid* bei 172 bis 174° (Lit.<sup>4</sup>): 174-174.5°. Manchmal werden statt der Nadeln feine Blättchen erhalten, die sich bei 159-161° unter vorübergehendem Schmelzen in die Nadeln umlagern. Die Substanz löst sich gut in Wasser und heißen Alkoholen, schwer in Essigester, Äther, gar nicht in Paraffinkohlenwasserstoffen.



$[\alpha]_D^{25}$ : -17.0° (*c* = 2.94, in 96-proz. Äthanol) (Lit.<sup>4</sup>):  $[\alpha]_D^{25}$ : -16.5 ± 1.5° (*c* = 1.28, in Feinsprit).

b) *Über die Mono-Cbo-Verbindung*<sup>4</sup>): 4.2 g (20 mMol) *Cbo-Glycin* werden entsprechend 1a) in 25 ccm Chloroform mit 2.8 ccm Triäthylamin und 2.65 ccm *Chlorameisensäure-isobutylester* zum gemischten Anhydrid kondensiert und dieses mit 6.0 g (20.2 mMol) *Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid*<sup>1, 4</sup>) und weiteren 2.8 ccm Triäthylamin in 25 ccm Chloroform umgesetzt, dann die Mischung wie dort aufgearbeitet. Ausb. 7.2 g (80 % d. Th.) roher, sirupöser *Cbo-Glycyl-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester*<sup>4</sup>), der nicht zur Kristallisation gebracht werden kann. Er wird in 100 ccm absol. Äthanol unter Zusatz von 25-30 mMol HCl und ca. 0.5 g Pd-Mohr bis zum Ende der CO<sub>2</sub>-Entwicklung hydriert (5-7 Stdn.). Das heiß vom Pd abgesaugte Filtrat wird i. Vak. auf 50 ccm eingeeengt und warm mit 20-30 ccm Petroläther versetzt. Bei -15° kristallisieren aus der klaren Lösung 3.4 g (48 % d. Th.) *Ester-Salz* vom Schmp. 157-161° (Umwandlung) und 171-173° (endgültiger Schmp.).

$[\alpha]_D^{20}$ : -16.6° (*c* = 3.20, in 96-proz. Äthanol).

4. *N-Cbo-N-[Cbo-Glycyl]-glycyl-L-Glutaminsäure-dibenzylester*: Beim Versuch, Cbo-Glycyl-L-glutaminsäure-dibenzylester entsprechend Vorschrift 1a) aus 2.09 g (10 mMol) *Cbo-Glycin* und 3.65 g *L-Glutaminsäure-dibenzylester-hydrochlorid*<sup>26, 1)</sup> darzustellen, konnte das gewünschte Produkt nicht rein und kristallisiert erhalten werden; doch kristallisierte aus der Lösung des Rohproduktes in wenig Äthanol bei  $-15^{\circ}$  eine kleine Menge einer Substanz, die nach Umkristallisieren aus Äthanol/Petroläther harte Plättchen vom Schmp. 102–103.5° bildete.

$C_{39}H_{39}N_3O_{10}$  (709.7) Ber. C 66.00 H 5.54 N 5.92 Gef. C 66.25 H 5.43 N 6.02  
 $[\alpha]_D^{25}$ :  $-15.3^{\circ}$  ( $c = 1.18$ , in 96-proz. Äthanol).

#### Derivat des $\gamma$ -L-Glutamyl-glycins

5. *Cbo- $\gamma$ -L-Glutamyl-glycin-hydrasid (Hydrazinsalz)*: Eine Mischung von 733 mg (2 mMol) *Cbo- $\gamma$ -L-Glutamyl-glycin-äthylester*<sup>27)</sup>, 2 ccm absol. Äthanol und 0.3 ccm 100-proz. *Hydrazinhydrat* (6 mMol) bleibt 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehen (vgl. 28)). Das darauf durch Zugabe von 25 ccm absol. Äther gefällte Öl kristallisiert im Laufe einiger Tage. Ausb. praktisch quantitativ. (768 mg). Nach Umkristallisieren durch Lösen in einigen Tropfen Wasser, Zugabe von reichlich Äthanol und viel Äther schmilzt das Salz bei 125–128°. Auch der 5fache Ansatz gelingt. Das Produkt gibt im Laufe der Zeit etwas Hydrazin ab, vor allem beim Trocknen.

$C_{15}H_{24}N_6O_6$  (384.4) Ber. C 46.86 H 6.29 N 21.87 O 24.98  
 Gef. C 46.56 H 6.15 N 21.19 O 24.75  
 $[\alpha]_D^{25}$ :  $-2.4^{\circ}$  ( $c = 5.43$ , in Wasser).

#### $\alpha$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure und -Derivate

6.  *$\alpha$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure*: Die Lösung von 4.0 g (7.5 mMol) *Cbo- $\alpha$ -L-Glutamyl- $[\gamma$ -methylester]-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester*<sup>1)</sup> in 20 ccm rauch. Salzsäure ( $d = 1.19$ ) wird 1 Stde. bei 36–38° aufbewahrt (vgl. 1.c.<sup>6)</sup>) und danach bei höchstens 1 Torr und 35° möglichst rasch zum Sirup eingedampft. Dessen Lösung in 25 ccm Wasser wird mit ca. 1.5 ccm Diäthylamin gegen Kongorot neutralisiert und i. Vak. zu einer glasigen Masse eingedampft, die mehrmals mit 99-proz. Äthanol gut durchgerieben und abzentrifugiert wird. Die Lösung des amorphen Rückstandes in 15 ccm Wasser wird bei 60–70° mit 99-proz. Äthanol (ca. 50 ccm, bis zur beginnenden Trübung) versetzt, worauf im Kühlschrank eine voluminöse Masse ausfällt, die abfiltriert und mit Äthanol gewaschen wird. Ausb. 1.0 g (40% d. Th.), Schmp. 152–158° (Zers.). Mehrfaches Umfällen aus 25–30 Tln. Wasser mit 50–70 Tln. absol. Aceton bei 60° führt zu feinen Nadeln vom Schmp. 161–162° (Zers.), die nicht mehr hygroskopisch sind.

$C_{12}H_{19}N_3O_8$  (333.3) Ber. C 43.24 H 5.75 Gef. C 42.89 H 5.62  
 $[\alpha]_D^{25}$ :  $+44.5^{\circ}$  ( $c = 2.90$ , in Wasser).  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+27.2^{\circ}$  ( $c = 2.83$ , in 0.1 *n* HCl).

Bei der papierchromatographischen Prüfung (organ. Phase von *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) und Isopropylalkohol/0.6-proz. wäbr.  $NH_3$  (1:1)) wandert die Substanz einheitlich.

*Zink-Komplexsalz*: 400 mg (1.2 mMol)  *$\alpha$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure* werden bei 80° zu einer Suspension von 180 mg (1.45 mMol)  $ZnCO_3$  in 10 ccm Wasser gegeben, wobei sich

<sup>26)</sup> H. SACHS und E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. 75, 4610 [1953].

<sup>27)</sup> W. J. LE QUESNE und G. T. YOUNG, J. chem. Soc. [London] 1950, 1959.

<sup>28)</sup> M. BERGMANN, L. ZERVAS und J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry 115, 593 [1936]; ref. C. 1937 I, 903.

fast alles  $\text{ZnCO}_3$  auflöst. Nach 1 stdg. Aufbewahren bei  $50^\circ$  und Abkühlen auf  $0^\circ$  wird filtriert und das Zn-Salz mit ca. 50 ccm Methanol ausgefällt, abzentrifugiert, mit frischem Methanol gewaschen und über  $\text{P}_2\text{O}_5$  i. Vak. getrocknet. Ausb. 350 mg (74 % d. Th.). Das farblose, z. T. krist. Material kann ohne nennenswerte Zersetzung bis  $300^\circ$  erhitzt werden. Aus der wäßr. Lösung fällt es auf Zugabe von Alkoholen oder Aceton aus.

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8\text{Zn}$  (396.7) Ber. N 10.60 Zn 16.49 Gef. N 9.34 Zn 18.21

$[\alpha]_D^{20}$ :  $+48.2^\circ$  ( $c = 1.37$ , in Wasser).

7. *Tosyl-L-pyroglutamyl-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester*: 905 mg (3 mMol) *Tosyl-L-pyroglutamylchlorid*<sup>7-9)</sup> werden zusammen mit 1 g (3.4 mMol) *Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid*<sup>4, 1)</sup> in 30 ccm absol. Chloroform gelöst und die Lösung unter Eiskühlung tropfenweise mit 1.0 ccm (7.2 mMol) Triäthylamin versetzt. Man beläßt die Lösung 3 Stdn. bei Raumtemperatur, wäscht mit *n* HCl (3 mal), Wasser und 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (3 mal), trocknet mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und dampft i. Vak. ein. Der Sirup wird in wenig warmem Äthanol aufgenommen und mit reichlich Petroläther ausgefällt. Er kristallisiert im Laufe einiger Stdn. im Kühlschrank. Ausb. 1.38 g (88 % d. Th.). Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus 20 Tln. Äthanol durch Zugabe von 40 Tln. Petroläther entstehen Plättchen vom Schmp.  $136 - 138^\circ$ .

$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$  (525.6) Ber. C 52.67 H 5.95 N 7.86 O 27.42 S 6.10

Gef. C 52.41 H 5.80 N 7.93 O 27.36 S 5.80

$[\alpha]_D^{21}$ :  $37.4^\circ$  ( $c = 1.98$ , in 96-proz. Äthanol).

#### *$\alpha$ -L-Glutamyl- $\alpha$ -L-glutamyl-glycin und -Derivate*

8.  *$\alpha$ -L-Glutamyl- $\alpha$ -L-glutamyl-glycin*: 4.0 g (7.6 mMol) *Cbo-Bis-[ $\alpha$ -L-glutamyl-( $\gamma$ -methyl-ester)]-glycin-äthylester*<sup>1)</sup> werden behandelt, wie unter 6. beschrieben. Das Rohprodukt (nach dem Ausziehen mit Äthanol) ist sehr hygroskopisch und wird daher gleich im Zentrifugenglas über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet. Ausb. 1.3–1.8 g (50–70 % d. Th.) amorphe Kügelchen vom Schmp.  $120 - 125^\circ$  (Zers.). Zur Reinigung wird die klare Lösung des Rohprodukts in 10 ccm Wasser bei  $60^\circ$  mit 99-proz. Äthanol versetzt (40–60 ccm, bis zur Trübung) und das beim Abkühlen ausfallende Öl mit frischem Äthanol angerieben. Nach Zentrifugieren und Trocknen erhält man 1.1–1.5 g (45–55 % d. Th.) körniges Pulver vom Schmp.  $122$  bis  $126^\circ$  (Zers.). Wird ein mehrfach so vorbehandeltes Produkt in 20 Tln. Wasser gelöst und die Lösung bei  $60^\circ$  mit ca. 100 Tln. absol. Äthanol versetzt und sehr langsam abgekühlt, so kristallisieren flache Plättchen oder Nadeln vom Schmp.  $134 - 135^\circ$  (Zers.). Längeres Trocknen bei  $100^\circ$  zersetzt das Tripeptid unter Schmelzen; deshalb wurde es für die Analyse 1 Stde. bei  $78^\circ$  i. Vak. über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet, wobei nur geringer Gewichtsverlust eintrat.

$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_8$  (333.3) Ber. C 43.24 H 5.75 Gef. C 43.53, 41.93 H 6.25, 5.95

$[\alpha]_D^{28}$ :  $+3.4^\circ$  ( $c = 1.75$ , in Wasser).

Bei der papierchromatographischen Prüfung (vgl. 6) wandert die kristallisierte wie die amorphe Substanz einheitlich.

*Zink-Komplexsalz*: Darstellung und Eigenschaften wie bei 6. beschrieben. Ausb. 400 mg (84 % d. Th.). Das umgefällte Produkt kann aus Wasser/Methanol in flachen Plättchen gewonnen werden.

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8\text{Zn}$  (396.7) Ber. N 10.60 Zn 16.49 Gef. N 9.70 Zn 18.64

$[\alpha]_D^{29}$ :  $-3.7^\circ$  ( $c = 1.61$ , in Wasser).

9. *Cbo- $\alpha$ -L-Glutamyl- $[\gamma$ - $\ddot{a}$ thylester]- $\alpha$ -L-glutamyl- $[\gamma$ -methyl-ester]-glycin- $\ddot{a}$ thylester*: 6.2 g (20 mMol) *Cbo-L-Glutaminsäure- $\gamma$ - $\ddot{a}$ thylester*<sup>10,11)</sup> werden entsprechend Vorschrift 1a) mit 5.7 g (20 mMol)  *$\alpha$ -L-Glutamyl- $[\gamma$ -methyl-ester]-glycin- $\ddot{a}$ thylester-hydrochlorid*<sup>1)</sup> kondensiert und das Reaktionsgemisch wie dort aufgearbeitet. Der feste Verdampfungsrückstand wird aus wenig Essigester umkristallisiert und die voluminöse, noch reichlich Essigester enthaltende Masse mit Petroläther gewaschen und lange getrocknet. Ausb. 5.8 g (54 % d. Th.), Schmp. 134–137°. Mehrfaches Umkristallisieren ergibt eine undeutlich krist. Substanz vom Schmp. 135–137°. Sie ist leichtlöslich in Chloroform, Aceton, Dioxan und Eisessig, in der Wärme gut löslich in niederen Alkoholen, CCl<sub>4</sub>, Essigester und aromatischen Kohlenwasserstoffen. Beim Abkühlen fällt sie leicht gallertig aus; sie kristallisiert bedeutend schlechter als der homologe Methyl-methyl- $\ddot{a}$ thyl-ester<sup>1)</sup> und der Triäthylester<sup>24)</sup>.

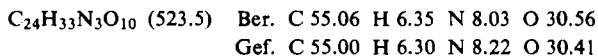


$[\alpha]_D^{25}$ : -20.0° (c = 4.57, in Eisessig).

### *$\gamma$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure und -Derivate*

#### 10. *Cbo- $\gamma$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester*

a) 5.9 g (20 mMol) *Cbo-L-Glutaminsäure- $\gamma$ -hydrazid*<sup>10–12)</sup> werden nach Lösen in 200 ccm Wasser, das mit je 13 ccm Eisessig und rauch. Salzsäure versetzt ist, und Überschichten mit Äther (200 ccm) bei -5° durch Zugabe von 1.8 g NaNO<sub>2</sub> in 25 ccm Wasser ins Azid verwandelt, das sofort ausgeschüttelt wird. Die wäßr. Phase wird noch zweimal ausgeäthert (je 50 ccm) und die vereinigten Ätherextrakte zweimal mit Eiswasser gewaschen und kurz mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet<sup>29)</sup>. Die äther. Azidlösung wird sogleich zu einer vorgekühlten Lösung von 6.5 g (22 mMol) *Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid*<sup>4,1)</sup> und 3.0 ccm Triäthylamin in 100 ccm absol. Chloroform gegeben. Die Mischung bleibt 2–3 Stdn. bei <0° und mindestens 10 Stdn. bei Raumtemperatur stehen, wird i. Vak. auf 150 ccm eingeeengt, mit *n* HCl (zweimal) und Wasser gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. zum Sirup eingedampft. Ausb. ca. 9 g (86 % d. Th.) Rohprodukt, das aus Äthanol/Wasser und Äthanol/Petroläther umgefällt wird, jedoch auch bei langem Aufbewahren im Kühlschrank nicht kristallisiert. Durch gründliches Trocknen wird ein fast farbloses Harz gewonnen (ca. 5.0 g; 48 % d. Th.).



$[\alpha]_D^{25}$ : -12.8° (c = 2.49, in 96-proz. Äthanol).

b) Eine wie oben aus 7.7 g (20 mMol) *Hydrazinsalz des Cbo- $\gamma$ -L-Glutamyl-glycin-hydrazids* (5.) mit 3.5 g NaNO<sub>2</sub> (das Hydrazin verbraucht Nitrit) bereitete Azidlösung wird mit 5.3 g (22 mMol) *L-Glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid*<sup>22,23,4)</sup> umgesetzt, wie unter a) beschrieben. Die Aufarbeitung ergibt 3.5 g (33 % d. Th.) Harz gleicher Beschaffenheit.

11. *Cbo- $\gamma$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure*: 5.0 g (9.5 mMol) *Cbo- $\gamma$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester* (10a)) werden in 50 ccm Dioxan gelöst und 40 ccm *n* NaOH zugesetzt. Die Mischung wird 1 Stde. bei Raumtemperatur gerührt, mit 20 ccm 2*n* HCl neutralisiert und i. Vak. eingedampft. Beim Aufnehmen des Rückstandes mit Äthanol/Essigester (1:1) bleibt NaCl ungelöst, wird abfiltriert und mit dem gleichen Gemisch ausgewaschen. Der durch erneutes Eindampfen i. Vak. erhaltene Sirup wird aus Äthanol (eventuell unter Kohlebehandlung) mit viel Petroläther umgefällt und gut getrocknet. Ausb. 4.0 g (90 % d. Th.)

<sup>29)</sup> Diese Operationen werden zweckmäßig bei Frost im Freien oder in einem Kühlraum vorgenommen.



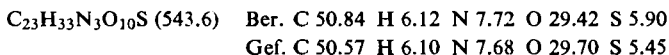
klebriges, etwas hygroskopisches Pulver, das bisher nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte.



$[\alpha]_D^{20}$ :  $-4.6^\circ$  ( $c = 1.96$ , in 96-proz. Äthanol).

#### 12. *Tosyl- $\gamma$ -L-glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester*

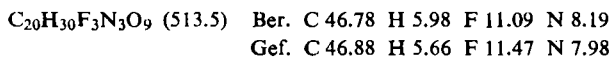
a) 6.3 g (20 mMol) *Tosyl-L-glutaminsäure- $\gamma$ -hydrazid*<sup>8)</sup> werden in 40 ccm *n* HCl gelöst und, wie unter 10a) beschrieben, umgesetzt. Beim Eindampfen i. Vak. werden 5.3 g (49% d. Th.) sirupöses Rohprodukt erhalten, das aus 30 ccm Äthanol durch langsame Zugabe von Petroläther unter Reiben krist. ausgefällt wird. Mehrfaches Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser und Äthanol/Petroläther ergibt 4.4 g (40% d. Th.) feine Plättchen vom Schmp. 130–132°, löslich in den üblichen organ. Lösungsmitteln außer Äther und Paraffinkohlenwasserstoffen, schwerlöslich in Wasser.



$[\alpha]_D^{20}$ :  $+19.2^\circ$  ( $c = 2.24$ , in 96-proz. Äthanol).

b) Man erhitzt 5.7 g (20 mMol) *Tosyl-L-pyroglutaminsäure*<sup>7-9)</sup> zusammen mit 6.5 g (22 mMol) *Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid*<sup>4, 1)</sup> in 40 ccm wasserfreiem Dioxan nach Zusatz von 6 ccm (43–44 mMol) *N*-Äthyl-piperidin oder Triäthylamin 3 Stdn. im sied. Wasserbad, bewahrt die Mischung einige Stdn. im Kühlschrank auf, saugt die rote Lösung vom ausgeschiedenen Amin-hydrochlorid ab und wäscht dieses gut mit Dioxan aus. Der Verdampfungsrückstand des Filtrats wird mit 100 ccm Essigester und 50 ccm *n* HCl aufgenommen, die Esterphase mehrmals mit *n* HCl gewaschen, schließlich das Reaktionsprodukt mit 100 ccm 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert, wobei die Farbe fast völlig im Essigester bleibt; der letzte Rest wird durch Erwärmen mit Kohle beseitigt. Das beim Ansäuern ausfallende Öl wird mit Essigester extrahiert und der mit *n* HCl und Wasser gewaschene und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknete Extrakt i. Vak. zum Sirup eingedampft (ca. 9 g; 83% d. Th.), der wie oben, aber schwieriger und unter großen Substanzverlusten, zur Kristallisation gebracht wird. Nach mehrfachem Umkristallisieren beträgt die Ausbeute an reiner Substanz ca. 3.8 g (35% d. Th.); Schmp. 130–132°.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+18.9^\circ$  ( $c = 1.85$ , in 96-proz. Äthanol).

13. *Trifluoracetyl- $\gamma$ -L-glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure-triäthylester*: 5.8 g (20 mMol) *TFA-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -äthylester- $\gamma$ -chlorid*<sup>13, 14)</sup> (auch nicht sublimiertes Produkt ist verwendbar) löst man zusammen mit 6.5 g (22 mMol) *Glycyl-L-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid*<sup>4, 1)</sup> in ca. 100 ccm absol. Chloroform und läßt unter Eiskühlung und Rühren innerhalb von 10 Min. 6.0 ccm (bei Verwendung von rohem Säurechlorid 8.0 ccm) Triäthylamin zutropfen. Man beläßt einige Stdn. bei Raumtemperatur, wäscht die Lösung mit *n* HCl (3 mal), Wasser und 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3 mal) und trocknet mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ihr Verdampfungsrückstand (9.5 g; 92% d. Th.) kristallisiert im Laufe einiger Stdn. spontan. Durch mehrfachem Umkristallisieren aus Äthanol/Petroläther werden 7.0 g (68% d. Th.) feine Nadeln vom Schmp. 90–92° erhalten. Auch der 2.5fache Ansatz gelingt. Die Substanz ist löslich in den üblichen organischen Lösungsmitteln außer Wasser, Äther und Paraffinkohlenwasserstoffen.



$[\alpha]_D^{20}$ :  $-21.9^\circ$  ( $c = 3.98$ , in 96-proz. Äthanol).

#### 14. *$\gamma$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure*

a) 3.5 g (7.5 mMol) *Cbo- $\gamma$ -L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure* (11.) werden in 50 ccm 60-proz. Äthanol mit ca. 0.5 g Pd-Mohr bis zum Ende der CO<sub>2</sub>-Entwicklung hydriert (5–7 Stdn.).

Der Verdampfungsrückstand des Filtrats vom Pd wird in wenig Wasser gelöst, mit viel Äthanol ausgefällt und mit Äthanol gewaschen. Ausb. ca. 2.0 g (80 % d. Th.) amorphe, kaum hygroskopische Kügelchen vom Schmp. 135–145° (Zers.). Kristallisationsversuche blieben bisher erfolglos.

$C_{12}H_{19}N_3O_8$  (333.3) Ber. C 43.23 H 5.75 N 12.62 Gef. C 42.68 H 5.99 N 12.22  
 $[\alpha]_D^{25}$ :  $-1.1^\circ$  ( $c = 5.68$ , in Wasser).

Bei der papierchromatographischen Prüfung (n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) und Phenol/Wasser (72:28) mit einer Spur KCN) wandert das Peptid fast einheitlich. Es finden sich 2 bis 3 Spuren peptidartiger Verunreinigungen unbekannter Natur.

b) 515 mg (1 mMol) *TFA-γ-L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure triäthylester* (13.) werden in 10 ccm Dioxan mit 4 ccm n KOH 1 Stde. bei Raumtemperatur hydrolysiert und die Lösung nach Zusatz von 3 ccm Eisessig i. Vak. eingedampft. Behandlung des noch essigsäurehaltigen Rückstandes mit reichlich 99-proz. Äthanol ergibt feine Flocken, die ein- oder zweimal aus wenig Wasser mit reichlich Äthanol umgefällt werden. Ausb. ca. 200 mg (60 % d. Th.) amorphe, hygroskopische Kügelchen, deren Hauptbestandteil sich im Papierchromatogramm identisch mit dem nach a) gewonnenen Tripeptid verhält. Unter den ca. 4 Verunreinigungen überwiegt α-Glutamyl-glycyl-glutaminsäure.

*Zink-Komplexsalz*: 333 mg (1 mMol) Tripeptid (14a) werden in 10 ccm Wasser mit 150 mg  $ZnCO_3$  3 Stdn. auf 50° erwärmt. Aus dem Filtrat vom überschüss.  $ZnCO_3$  wird das Salz mit 90 ccm Aceton ausgefällt, nach kurzem Stehenlassen im Kühlschrank abgesaugt und mit Äthanol gewaschen. Ausb. 355 mg (89 % d. Th.) anscheinend amorphes Pulver, das sich, ohne zu schmelzen, oberhalb 200° zersetzt und beim Trocknen Reste Wasser hartnäckig festhält.

$C_{12}H_{17}N_3O_8Zn$  (396.7) Ber. C 36.37 H 4.22 N 10.61 Zn 16.50  
 Gef. C 34.54 H 4.76 N 9.36 Zn 16.72

*Ba-Salz des Zn-Komplexes*: Die wie oben hergestellte frische Lösung des Zn-Salzes wird mit 140 mg Bariumacetat in 5 ccm Wasser versetzt und eine Trübung abfiltriert. Zusatz von 20 ccm Äthanol fällt einen dicken Niederschlag, der aus Wasser/Äthanol umgefällt wird. Ausb. 300 mg (65 % d. Th.) amorphes Pulver, das sich ab 220° zersetzt.

$(C_{12}H_{16}N_3O_8Zn)_2Ba$  (928.7) Ber. C 31.00 H 3.47 N 9.06 Zn 14.15  
 Gef. C 31.79 H 3.79 N 8.53 Zn 15.05

*Kupfer-Komplexsalz*: Darstellung wie beim Zn-Salz, aber mit bas. Kupfercarbonat. Ausb. 340 mg (86 % d. Th.) blaues, amorphes, hygroskopisches Pulver.

$C_{12}H_{17}N_3O_8Cu$  (394.8) Ber. N 10.64 Cu 16.10 Gef. N 9.53 Cu 16.51

*Ba-Salz des Cu-Komplexes*: Darstellung wie beim Zn-Salz. Ausb. 320 mg (69 % d. Th.) blaues, anscheinend amorphes, hygroskopisches Pulver; Zers. ab 210°.

$(C_{12}H_{16}N_3O_8Cu)_2Ba$  (925.0) Ber. C 31.16 H 3.49 N 9.08 Cu 13.74 Ba 14.85  
 Gef. C 30.82 H 3.43 N 8.84 Cu 13.17 Ba 14.20

*Prüfung des Peptids auf Teilracemisierung*: 68 mg (ca. 0.2 mMol) γ-L-Glutamyl-glycyl-L-glutaminsäure (14a) werden in einem zugeschmolzenen Glühröhrchen mit 0.7 ccm rauch. Salzsäure ( $d$  1.19) 8–10 Stdn. auf 110° erhitzt. Das im Freezer (–15°) auskristallisierte Salz wird abgesaugt (Glasritze), mit 0.3 ccm rauch. Salzsäure und ca. 3 ccm absol. Äthanol, schließlich mit Äther gewaschen. Ausb. 64 mg (87 % d. Th.) L-Glutaminsäure-hydrochlorid.

$[\alpha]_D^{25}$ :  $+24.0^\circ$  ( $c = 2.45$ , in Wasser). Das Hydrochlorid der zur Darstellung verwendeten L-Glutaminsäure dreht  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+24.8^\circ$  ( $c = 2.50$ , in Wasser).

*Derivat des  $\gamma$ -L-Glutamyl- $\alpha$ -L-glutamyl-glycins*

15. *Trifluoracetyl- $\gamma$ -L-glutamyl-[ $\alpha$ - $\ddot{a}$ thylester]- $\alpha$ -L-glutamyl-[ $\gamma$ -methylester]-glycin- $\ddot{a}$ thylester*: 5.8 g (20 mMol) *TFA-L-Glutaminsäure- $\alpha$ - $\ddot{a}$ thylester- $\gamma$ -chlorid*<sup>13, 14)</sup> werden entsprechend Vorschrift 13. mit 6.25 g  *$\alpha$ -L-Glutamyl-[ $\gamma$ -methylester]-glycin- $\ddot{a}$ thylester-hydrochlorid*<sup>1)</sup> umgesetzt und die Mischung wie dort aufgearbeitet. Ausb. 9.0 g (90 % d. Th.) Rohprodukt, aus dem durch Umkristallisieren aus Äthanol/Petroläther 8.1 g (81 % d. Th.) Nadeln vom Schmp. 161.5–162.5° entstehen. Löslichkeit ähnlich 13.

$C_{19}H_{28}F_3N_3O_6$  (499.4) Ber. C 45.69 H 5.65 F 11.41 N 8.41  
Gef. C 45.73 H 5.48 F 11.03 N 8.54

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-35.4^\circ$  ( $c = 2.06$ , in 96-proz. Äthanol).

*$\alpha$ -L-Glutamyl-L-tyrosin-Derivate*

16. *Cbo- $\alpha$ -L-Glutamyl-L-tyrosin-dimethylester*: In eine aus 5.9 g (20 mMol) *Cbo-L-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester*<sup>11, 12)</sup>, 2.8 ccm Triäthylamin und 2.7 ccm *Chlorameisensäure-isobutylester* in 100 ccm absol. Chloroform bei  $-10^\circ$  bereitete Anhydridlösung werden nach 20 Min. langem Stehenlassen bei  $-5^\circ$  4.0 g (20.5 mMol) gepulverter *L-Tyrosin-methylester*<sup>17)</sup> eingetragen. Die nach 1 Stdg. Rühren klare Lösung bleibt 1 Stde. bei Raumtemperatur und 3 Stdn. bei  $40-50^\circ$  stehen, wird gewaschen mit *n* HCl (3mal), Wasser und 5-proz.  $NaHCO_3$ -Lösung (3–5 mal, bis die Waschlösung sich beim Ansäuern nicht mehr trübt; bei schlechter Phasentrennung wird Essigester zugegeben) und getrocknet mit  $Na_2SO_4$ . Der durch Eindampfen i. Vak. entstehende krist. Rückstand (8.8 g; 93 % d. Th.) wird aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert. Ausb. ca. 7.0 g (74 % d. Th.) klumpige Aggregate vom Schmp. 109 bis  $111^\circ$ , löslich in Chloroform, Essigester, cyclischen Äthern, Alkali und heißen niederen Alkoholen, schwer löslich in Wasser, kalten Alkoholen, Äther, unlöslich in Paraffinkohlenwasserstoffen. Auch der 5fache Ansatz gelingt.

$C_{24}H_{28}N_2O_8$  (472.5) Ber. C 61.01 H 5.98 N 5.92 O 27.09  
Gef. C 60.80 H 6.15 N 5.86 O 27.05

$[\alpha]_D^{20}$ :  $7.4^\circ$  ( $c = 2.17$ , in 96-proz. Äthanol).

17. *Cbo- $\alpha$ -L-Glutamyl-[ $\gamma$ - $\ddot{a}$ thylester]-L-tyrosin-methylester*: Darstellung wie bei 16. unter Verwendung von 6.2 g (20 mMol) *Cbo-L-Glutaminsäure- $\gamma$ - $\ddot{a}$ thylester*<sup>10, 11)</sup>. Ausb. 9.0 g (93 % d. Th.) Rohprodukt, umkristallisiert aus Äthanol/Äther/Petroläther ca. 6.0 g (62 % d. Th.) klumpige Aggregate vom Schmp.  $122-124^\circ$ . Löslichkeit wie 16.

$C_{25}H_{30}N_2O_8$  (486.5) Ber. C 61.70 H 6.22 N 5.76 O 26.32  
Gef. C 61.69 H 6.46 N 5.76 O 26.32

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-7.3^\circ$  ( $c = 2.19$ , in 96-proz. Äthanol).

18. *Cbo- $\alpha$ -L-Glutamyl-L-tyrosin*<sup>15, 16)</sup>: Die Lösung von 4.7 g *Cbo- $\alpha$ -L-Glutamyl-L-tyrosin-dimethylester* (16.) bzw. 4.9 g *-methylester- $\ddot{a}$ thylester* (17.) (je 10 mMol) in 36 ccm *n* NaOH wird 30 Min. bei Raumtemperatur aufbewahrt, währenddessen unter Behandlung mit Kohle filtriert und mit 25 ccm Wasser (zum Waschen des Filters) verdünnt. Die auf Zugabe von 25 ccm *2n* HCl ausfallende Schmiere kristallisiert bald im Kühlschrank. Ausb. an Rohprodukt, das mit Wasser gewaschen ist, ca. 4.2 g (94 % d. Th.). Es wird aus 200 ccm Wasser umkristallisiert zu ca. 3.0 g (67 % d. Th.) feinen Nadeln vom Schmp.  $181-182^\circ$  (Lit.: 183 bis  $184^{15)}$  und  $185^{16)}$ .

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-17.3^\circ$  ( $c = 1.90$ , in 96-proz. Äthanol) (Lit.<sup>16, 17)</sup>: keine Drehwertangabe).

19. *Tosyl-L-pyroglutamyl-L-tyrosin-methylester*

a) 6.04 g (20 mMol) *Tosyl-L-pyroglutamyl-chlorid*<sup>7-9)</sup> werden zusammen mit 4.0 g (20.5 mMol) *L-Tyrosin-methylester*<sup>17)</sup> bei 0° in 100 ccm absol. Chloroform unter ratenweisem Zusatz von 3.0 ccm Triäthylamin 30 Min. bis zur klaren Lösung gerührt. Die Mischung, aus der das Reaktionsprodukt bald kristallisiert, bleibt 1 Stde. bei Raumtemperatur, 3 Stdn. bei 40–50° und über Nacht im Kühlschrank stehen, wird dann mit je 50 ccm Eiswasser und Petroläther gut durchgerührt und abgesaugt. Die Kristalle werden mit Äther, *n* HCl, Wasser, NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und reichlich Wasser gewaschen. Ausb. 5.9 g (64 % d. Th.) Rohprodukt, das zur Weiterverarbeitung genügend rein ist. Zur Analyse wird eine Probe aus viel Methanol/Wasser umkristallisiert. Schmp. 213–216° (Zers.). Auch der 5fache Ansatz gelingt. Die Substanz ist ziemlich schwer löslich in den üblichen organischen Lösungsmitteln und kristallisiert in langen Nadeln.

C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S (460.5) Ber. C 57.37 H 5.26 N 6.08 O 24.33 S 6.96

Gef. C 57.62 H 5.32 N 5.90 O 24.51 S 6.41

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +31.7° (*c* = 2.18, in 96-proz. Äthanol).

b) 5.7 g (20 mMol) *Tosyl-L-pyroglutaminsäure*<sup>7-9)</sup> werden nach Vorschrift 17. mit 4.0 g *L-Tyrosin-methylester*<sup>17)</sup> kondensiert und die Mischung wie bei 19a) aufgearbeitet. Ausb. 8.4 g (91 % d. Th.) Rohprodukt vom Schmp. 210–214° (Zers.). Auch der 5fache Ansatz gelingt.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +31.2° (*c* = 1.96, in 96-proz. Äthanol).

20. *Tosyl-γ-L-glutamyl-L-tyrosin*<sup>8)</sup>: 4.6 g (10 mMol) *Tosyl-L-pyroglutamyl-L-tyrosin-methylester* (19.) werden in 12 ccm 4*n* NaOH gelöst, die Lösung wird über Kohle filtriert, mit wenig Wasser nachgewaschen und das Filtrat nach insgesamt 30 Min. Verseifungszeit mit 5 ccm rauch. Salzsäure (*d* 1.19) angesäuert, wobei ein beim Stehenlassen oder Impfen kristallisierendes Öl ausfällt. Das mit Wasser gewaschene Rohprodukt wird aus Äthanol/Wasser umkristallisiert zu langen Nadeln vom Schmp. 215–218° (Lit.<sup>8)</sup>: 218–219°). Auch der 10fache Ansatz gelingt.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +42.2° (*c* = 1.21, in 96-proz. Äthanol). (Lit.<sup>8)</sup>: kein Drehwert angegeben).