

de la solution provenant de la réaction par décharge électrique décrite sous 1.3. (système $\text{PH}_3 + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3$), dans 5 ml d'une solution 0,1M d'acide aminé. On chauffe cette solution 70 h à 70°, à pH 6,5–8. Une prise aliquote est analysée sur l'analyseur automatique d'acides aminés. Dans le cas de la glycine on obtient un pic de diglycine correspondant à une rendement de 0,2%, dans le cas de l'alanine, le pic de dialanine correspond à un rendement de 0,14%.

Une partie de ce travail a été réalisée grâce à un Senior Research Associateship accordé à l'auteur par la *U.S. National Academy of Sciences*, Washington, D.C., et tenu à la *National Aeronautics and Space Administration*, Ames Research Center, Moffett Field, California.

L'auteur remercie également la «*Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie*», ainsi que la Maison *F. Hoffmann-La Roche & Cie* (Bâle, Suisse).

Il est redevable à *Fritz Woeller*, B. Sc., d'avoir pris de nombreux spectres de RMN. et d'avoir effectué de nombreuses réactions par décharge électrique. Sa reconnaissance va également au Dr *H. Holland*, professeur de géochimie à l'Université de Princeton (Princeton, New-Jersey), pour de nombreuses discussions concernant les possibilités d'existence de phosphine sur la terre primitive.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *A. R. Stiles, F. F. Rust & W. E. Vaughan*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3282 (1952); *M. M. Rauhut, H. A. Currier, A. M. Semsel & V. P. Wystrach*, J. org. Chemistry **26**, 5138 (1961); *S. A. Buckler & M. Epstein*, Tetrahedron **18**, 1211 (1962).
- [2] *L. Maier*, Helv. **51**, 1608 (1968).
- [3] *I. N. Bushmakina & A. V. Frost*, Z. prikl. Khim. **6**, 607 (1933).
- [4] *S. L. Miller*, Biochim. biophysica Acta **23**, 480 (1957); *G. Ponnampereuma, F. Woeller, J. Flores, M. Romiez & W. Allen*, «Advances in Chemistry Series» **80**, American Chemical Society, Washington D.C. 1969.
- [5] *B. Mason*, «Meteorites», p. 159, John Wiley & Sons, Inc., New York N.Y. 1962.
- [6] *J. Rabinowitz, F. Woeller, J. Flores & R. Krebsbach*, Nature **224**, 796 (1969).
- [7] *J. Rabinowitz*, Helv. **52**, 2663 (1969).
- [8] *D. E. Kochland*, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4103 (1951); *G. Di Sabato & W. P. Jencks*, *ibid.* **83**, 4393 (1961).
- [9] *E. Cherbuliez & J. Rabinowitz*, Helv. **41**, 1168 (1958).
- [10] *M. M. Crutchfield, C. H. Duncan, J. H. Letcher, V. Mark & J. R. Van Wazer*, «Topics in Phosphorus Chemistry», volume 5, Interscience, New-York 1967.

6. Synthese des «Thyrotropin-releasing» Hormons (TRH) (Schaf und verwandter Peptide

von **D. Gillessen¹⁾**, **A. M. Felix²⁾**, **W. Lergler¹⁾** und **R. O. Studer¹⁾**)

(24. XI. 69)

Summary. The syntheses of seven tripeptide isomers containing L-histidine, L-proline and L-glutamic acid residues, the same as found in the natural thyrotropin-releasing hormone (TRH), are reported. In addition L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-proline and its amide as well as N^α-acetyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-proline are described. Whereas eight peptides are inactive and L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-proline shows a slight TRH activity, L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-proline-amide has the full biological activity of the isolated thyrotropin-releasing hormone and, at the present state of knowledge, seems to be identical with it.

Die Existenz eines Faktors in hypothalamischen Extrakten, welcher die Sekretion von Thyrotropin (TSH) aus der Hypophyse stimuliert (thyrotropin-releasing hormone

¹⁾ Chemische Forschungsabteilung der *F. Hoffmann-La Roche & Co., AG*, Basel.

²⁾ Chemical Research Department *Hoffmann-La Roche Inc.*, Nutley, New Jersey.

TRH oder auch thyrotropin-releasing factor TRF) ist in verschiedenen Laboratorien gefunden und bestätigt worden (s. Zusammenfassungen: [1]). In einer Reihe von Arbeiten berichteten *Guillemin* und Mitarbeiter [2] [3] über die Reinigung und Charakterisierung des TRH aus Hypothalami von Schafen, sowie *Schally* und Mitarbeiter aus Hypothalami von Rindern [4] und Schweinen [5] [6]. Da in den hochgereinigten Präparaten aus Hypothalamus-Extrakten, sowohl von Schafen [3] als auch von Schweinen [6] nach Hydrolyse die Aminosäuren Histidin, Prolin und Glutaminsäure in äquimolaren Mengen nachgewiesen werden konnten, wurde für das die Thyrotropin-Sekretion stimulierende Hormon TRH eine polypeptidartige Struktur angenommen. Das Molekulargewicht wurde in der Grössenordnung eines Octapeptides [7] oder kleiner vermutet. Die Aktivität wird durch proteolytische Fermente wie Trypsin, Pepsin, Pronase, Carboxypeptidase und Leucinaminopeptidase nicht verändert [8]; jedoch wird sie durch Inkubation mit Serum zerstört [6] [9]. Eine freie N-terminale Amino-Gruppe konnte nicht nachgewiesen werden [1] [3] [6] [10] [11].

Da nur sehr kleine Mengen des hochgereinigten Hormons (1 mg aus ca. 300 000 Hypothalami von Schafen) [3] für die Strukturaufklärung vorliegen, wurden als Modells-substanzen die folgenden Tripeptide mit den Aminosäuren Histidin, Prolin und Glutaminsäure synthetisiert³⁾:

L-Histidyl-L-prolyl-L-glutaminsäure	(I)
L-Histidyl-L-glutamyl-L-prolin	(II)
L-Prolyl-L-histidyl-L-glutaminsäure	(III)
L-Prolyl-L-glutamyl-L-histidin	(IV)
L-Glutamyl-L-prolyl-L-histidin	(V)
L-Glutamyl-L-histidyl-L-prolin	(VI)
L-Histidyl-L- γ -glutamyl-L-prolin	(VII)
N ^{α} -Acetyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin	(VIII)
L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolin	(IX)
L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolin-amid	(X)

Von diesen 10 Peptiden zeigten die Substanzen IX und X eine TRH-Wirkung *in vitro* und *in vivo* [11] [12] [13]. L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolin-amid (X) besitzt die volle biologische Aktivität des aus Hypothalami von Schafen isolierten TRH und ist dünnschichtchromatographisch mit ihm identisch [14]. Zudem konnte gezeigt werden, dass das beschriebene TRH ein Massenspektrum aufweist, das mit demjenigen von L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolin-amid vereinbar ist [14].

In einer nach Abschluss dieser Arbeiten erschienenen Publikation von *Schally* und Mitarbeitern [15] über das die Thyrotropin-Sekretion fördernde Hormon aus Schweinehypothalami wird in einem Addendum erwähnt, dass dem Peptidteil, der nur ca. 32% des Trockengewichtes ausmacht, die Sequenz L-Glutamyl-L-histidyl-L-prolin zukommt. In einer gemeinsamen Kurzmitteilung [16] berichten *Folkers* und Mitarbeiter und *Schally* und Mitarbeiter über die Umsetzung eines nur zu 80% reinen, inaktiven Tripeptides L-Glutamyl-L-histidyl-L-prolin mit methanolischer Salzsäure und nachfolgender Behandlung mit methanolischem Ammoniak. Das Reaktionsgemisch erwies

³⁾ Wir danken den Herren Prof. *R. Guillemin*, Dr. *T. F. Dunn* und Dr. *R. Burgus*, Department of Physiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A., für ihre Anregungen zu dieser Arbeit, sowie für die enge Zusammenarbeit während der Durchführung.

sich als TRH-aktiv, jedoch konnten quantitative Aussagen infolge der Unreinheit sowohl des Ausgangs- als auch des Endproduktes nicht gemacht werden. Trotzdem wird die Vermutung ausgesprochen, dass der im Gemisch gefundenen TRH-Aktivität ebenfalls das bereits von *Guillemin* und Mitarbeitern [12] beschriebene L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolin-amid zugrunde liegen könnte^{3a)}.

In dieser Arbeit wird über die Synthese von TRH und verwandten Peptiden berichtet, während über die Identität mit dem isolierten Hormon und über die biologischen Resultate anderweitig publiziert wurde [11] [12] [13].

Experimenteller Teil⁴⁾

1. L-Histidyl-L-prolyl-L-glutaminsäure (I). – 1.1. *Boc-L-prolyl-L-glutaminsäure-dibenzylester (XI)*. Eine Lösung von 2,15 g (10 mMol) Boc-L-prolin [18] in 50 ml Methylenchlorid wird bei 0° mit 1,39 ml (10 mMol) Triäthylamin und 0,96 ml (10 mMol) Chlorameisensäure-äthylester versetzt und 30 Min. bei 0° gerührt. Gleichzeitig werden 3,65 g (10 mMol) L-Glutaminsäure-dibenzylester-hydrochlorid [19] in 50 ml Methylenchlorid suspendiert, bei 0° mit 1,39 ml (10 mMol) Triäthylamin versetzt und 5 Min. bei 0° gerührt. Die beiden Mischungen werden vereinigt, 2 Std. bei 0° gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und 2 M Zitronensäure gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingedampft: 5,0 g (95% d.Th.) XI als Öl. $[\alpha]_D^{25} = -52,9^\circ$ ($c = 2,1$ Methanol).

C₂₉H₃₆N₂O₇ (524,61) Ber. C 66,39 H 6,92 N 5,34% Gef. C 66,08 H 6,93 N 5,31%

1.2. *Z-L-histidyl-L-prolyl-L-glutaminsäure-dibenzylester (XII)*. – 2,7 g (5,2 mMol) Boc-L-prolyl-L-glutaminsäure-dibenzylester (XI) werden mit 25 ml Trifluoressigsäure übergossen und 1 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird eingedampft und der Rückstand in Essigester gelöst. Darauf wird mit 50-proz. K₂CO₃-Lösung bei 0° gewaschen und die vereinigten K₂CO₃-Lösungen werden wieder mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterlösungen werden über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Zum Filtrat wird bei 0° Z-L-histidin-azid [20] [hergestellt aus 1,55 g (5,2 mMol) Z-L-histidin-hydrazid] in 20 ml eiskaltem Essigester gegeben. Die Lösung wird über Nacht bei 0° gerührt und anschliessend mit Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird mit Petroläther trituriert, filtriert und getrocknet: 2,5 g (69%) XII. $[\alpha]_D^{25} = -49,2^\circ$ ($c = 2,0$ Methanol).

C₃₈H₄₁N₅O₈ (695,77) Ber. C 65,60 H 5,94 N 10,07% Gef. C 65,62 H 6,22 N 9,83%

1.3. *L-Histidyl-L-prolyl-L-glutaminsäure-acetat (I)*. 2,4 g (3,45 mMol) Z-L-histidyl-L-prolyl-L-glutaminsäure-dibenzylester (XII), gelöst in 50 ml Methanol und 1 ml Eisessig, werden über 5-proz. Pd/BaSO₄ hydriert. Nach Filtration durch Celit und Eindampfen wird der ölige Rückstand

^{3a)} *Zusatz bei der Korrektur:* Nach Einreichung dieser Arbeit wurde uns eine weitere Kurzmitteilung von *Schally* und Mitarb. [16a] zugänglich. Diese liefert jedoch gegenüber der erwähnten Kurzmitteilung [15] wenig neues Material. Interessant erscheint uns lediglich die Tatsache, dass die Autoren im Gegensatz zu uns bei der Massenspektrometrie von L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolin-amid keinen Molekelion-Pik erhalten (Direkte Probeneinführung bei 290°).

⁴⁾ Die Smp. wurden auf einem *Kofler*-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Drehungen wurden mit einem Polarimeter 141 der Firma *Perkin-Elmer* bestimmt, Fehlergrenze $\pm 1^\circ$. Die trägerfreien Hochspannungselektrophoresen wurden auf einer Elphor-VaP-Apparatur der Firma *Bender & Hobein*, München (Deutschland) durchgeführt. Zur Bestimmung des relativen Aminosäurenverhältnisses wurden die Substanzen in 6 N HCl unter Vakuum bei 110° während 24 Std. hydrolysiert und nach *Spackman, Stein & Moore* [17] an einer *Beckman*-Unichrom-Apparatur analysiert. Der jeweilige Wert für Glutaminsäure wurde gleich 1,00 gesetzt.

Die freien *Peptide* wurden als Acetate isoliert. Die z. T. hygroscopischen Endprodukte verloren beim Trocknen zur Mikroanalyse teilweise die Essigsäure. Die Drehungen wurden an den lyophilisierten Peptiden direkt bestimmt.

Die *Abkürzungen* folgen den Vorschlägen des V. Europ. Peptidsymposiums, Pergamon Press, Oxford 1963. Z = Benzyloxycarbonyl, Boc = *t*-Butyloxycarbonyl.

in Wasser gelöst, die Lösung mit Äther extrahiert und die wässrige Phase eingedampft. Der ölige Rückstand wird in Wasser gelöst, zur Trockene eingedampft, erneut in Wasser gelöst, durch Norit filtriert und lyophilisiert: 0,95 g (63%) I, Smp. 102° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = -59,1^\circ$ ($c = 2,2$ Wasser).

$C_{16}H_{23}N_5O_6, C_2H_4O_2$ (441,44) Ber. C 48,97 H 6,17 N 15,87% Gef. C 48,88 H 6,00 N 16,38%

Aminosäureanalyse⁴): Glu:His:Pro (1,00:1,12:1,02).

2. L-Histidyl-L-glutamyl-L-prolin (II). – 2.1. *Boc-(γ -benzyl)-L-glutamyl-L-prolin-benzylester (XIII)*. 3,4 g (10 mMol) Boc-L-glutaminsäure- γ -benzylester [21] in 50 ml Methylenchlorid werden bei 0° mit 1,39 ml (10 mMol) Triäthylamin und 0,96 ml (10 mMol) Chlorameisensäure-äthylester 30 Min. gerührt. Gleichzeitig werden 2,4 g (10 mMol) L-Prolin-benzylester-hydrochlorid [22] in 50 ml Methylenchlorid suspendiert und bei 0° mit 1,39 ml (10 mMol) Triäthylamin 5 Min. gerührt. Die Lösungen werden vereinigt, 2 Std. bei 0° und über Nacht bei 25° gerührt. Darauf wird die Mischung mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung und 2 M Zitronensäure gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und eingedampft: 4,6 g (88%) Öl. $[\alpha]_D^{25} = -13,0^\circ$ ($c = 2,2$ Methanol).

$C_{29}H_{36}N_2O_7$ (524,59) Ber. C 66,39 H 6,92 N 5,34% Gef. C 65,55 H 7,14 N 5,19%

2.2. *Z-L-histidyl-(γ -benzyl)-L-glutamyl-L-prolin-benzylester (XIV)*. 1,36 g (2,6 mMol) Boc-(γ -benzyl)-L-glutamyl-L-prolin-benzylester (XIII) werden mit 25 ml Trifluoressigsäure übergossen und 1 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird zur Trockene verdampft und der Rückstand in Essigester gelöst. Dann wird mit 50-proz. K_2CO_3 -Lösung bei 0° gewaschen und die vereinigten K_2CO_3 -Lösungen werden wieder mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterlösungen werden über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Zum Filtrat wird bei 0° Z-L-histidin-azid [20] [hergestellt aus 0,77 g (2,6 mMol) Z-L-histidin-hydrazid] in 20 ml eiskaltem Essigester gegeben. Die Lösung wird über Nacht bei 0° gerührt und anschliessend mit Wasser, gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird mit Petroläther verrieben, filtriert und getrocknet. Ausbeute 0,80 g (44%). $[\alpha]_D^{25} = -60,1^\circ$ ($c = 2,18$ Methanol).

$C_{38}H_{41}N_5O_8$ (695,77) Ber. C 65,60 H 5,94 N 10,07% Gef. C 65,29 H 6,24 N 9,93%

2.3. *L-Histidyl-L-glutamyl-L-prolin-acetat (II)*. 0,7 g (1 mMol) Z-L-histidyl-(γ -benzyl)-L-glutamyl-L-prolin-benzylester (XIV) wird in 50 ml Methanol und 1 ml Eisessig gelöst und über 5-proz. Pd/BaSO₄ hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird durch Celit und Norit filtriert, zur Trockene verdampft und das resultierende Öl zweimal aus Wasser lyophilisiert. Zum Schluss wird nochmals in Wasser aufgenommen, durch Norit filtriert und lyophilisiert: 0,36 g (82%), Smp. 78° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = -65,2^\circ$ ($c = 1,9$ Wasser).

$C_{16}H_{23}N_5O_6, C_2H_4O_2$ (441,44) Ber. C 48,97 H 6,17 N 15,87% Gef. C 48,42 H 5,75 N 15,88%

Aminosäureanalyse⁴): Glu:His:Pro (1,00:1,06:1,18).

3. L-Prolyl-L-histidyl-L-glutaminsäure (III). – 3.1. *Z-L-prolyl-L-histidin-methylester (XV)*. 7,2 g (29 mMol) Z-L-prolin [23] werden in 70 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst, bei –25° mit 4,0 ml (29 mMol) Triäthylamin und 3,8 ml (29 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester versetzt und 8 Min. bei ca. –20° gerührt. Diese Reaktionslösung wird mit einer auf –20° gekühlten Lösung von 5,4 g (32 mMol) L-Histidin-methylester [24] in 15 ml abs. Tetrahydrofuran versetzt, 1 Std. unterhalb 0° gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Salz wird abgenutzt, das Filtrat im Vakuum eingedampft; der ölige Rückstand wird in Essigester aufgenommen und mit 0,2 N HCl, gesättigt mit NaCl, extrahiert. Die HCl-Lösung wird bei –5° mit 2 N NaOH auf pH 10 eingestellt und mehrere Male mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte werden nach Waschen mit 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung, gesättigter NaCl-Lösung, 0,5 M Borsäure und gesättigter NaCl-Lösung über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingedampft: 7,4 g (64%) farbloser Schaum. $[\alpha]_D^{25} = -39,9^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{20}H_{24}N_4O_5$ (400,44) Ber. C 59,99 H 6,04 N 13,99% Gef. C 59,72 H 6,15 N 13,84%

Diese Substanz wird auch durch Umsetzung von Z-L-prolin-N-hydroxysuccinimidester [25] mit L-Histidin-methylester und analoger Aufarbeitung erhalten.

3.2. *Z-L-prolyl-L-histidin-hydrazid (XVI)*. 8,0 g (20 mMol) Z-L-prolyl-L-histidin-methylester (XV) werden in 40 ml Methanol gelöst, mit 2 ml Hydrazinhydrat versetzt und 5 Std. unter Rückfluss erhitzt. Darauf wird zur Trockene verdampft, der Rückstand in 30 ml Äthanol gelöst und in

300 ml Äther gefällt. Nach Stehen über Nacht bei 2° wird abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet: 7,1 g (89%), Smp. 153–154°. $[\alpha]_D^{25} = -62,9^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{19}H_{24}N_6O_4$ (400,43) Ber. C 56,99 H 6,04 N 20,99% Gef. C 57,01 H 6,04 N 20,86%

3.3. *Z-L-prolyl-L-histidyl-L-glutaminsäure-dibenzylester (XVII)*. 4,0 g (10 mMol) *Z-L-prolyl-L-histidin-hydrazid* (XVI) werden in einer Mischung aus 50 ml Tetrahydrofuran, 40 ml Dimethylformamid und 20 ml 2,5N HCl/Tetrahydrofuran gelöst, bei –20° mit 2 ml Isoamylnitrit versetzt und 30 Min. bei ca. –20° gerührt. Bei –30° werden 6,95 ml (50 mMol) Triäthylamin zugetropft und eine auf –30° gekühlte Lösung von 3,9 g (12 mMol) *L-Glutaminsäure-dibenzylester* [26] in 30 ml Tetrahydrofuran zugesetzt. Die Reaktionslösung wird 30 Min. unterhalb –20°, weitere 30 Min. unterhalb 0° gerührt und über Nacht bei 2° aufbewahrt. Das Salz wird abgenutscht, das Filtrat im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung, gesättigter NaCl-Lösung, 0,5M Borsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Das resultierende Öl wird an 130 g Kieselgel chromatographiert⁵⁾. Das geschützte Tripeptid wird mit Methanol/Chloroform (1:9) eluiert. Ausbeute 5,4 g (78%) farbloser Schaum. $[\alpha]_D^{25} = -50,8^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{38}H_{41}N_5O_8$, 0,75 CH_3OH (719,80) Ber. C 64,66 H 6,16 N 9,73% Gef. C 64,29 H 5,96 N 9,96%

3.4. *L-Prolyl-L-histidyl-L-glutaminsäure-acetat (III)*. 2,1 g (3 mMol) *Z-L-prolyl-L-histidyl-L-glutaminsäure-dibenzylester* (XVII) werden in 50 ml Eisessig gelöst und unter Zusatz von Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert. Der Rückstand wird durch trägerfreie Hochspannungselektrophorese⁴⁾ in Pyridinacetat-Puffer pH 6,0 gereinigt. Ausbeute 0,72 g (48%). $[\alpha]_D^{25} = -22,8^\circ$ ($c = 1,95$ -proz. Eisessig).

$C_{16}H_{23}N_5O_6$, 0,25 $C_2H_4O_2$ (396,39) Ber. C 49,99 H 6,10 N 17,67% Gef. C 50,39 H 6,24 N 17,63%

Aminosäureanalyse⁴⁾: Glu:His:Pro (1,00:0,86:0,96).

4. *L-Prolyl-L-glutamyl-L-histidin (IV)*. –4.1. *Boc-L-prolyl-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin-methylester (XVIII)*. 4,9 g (10 mMol) *Z-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin-methylester* [27] werden in 50 ml Eisessig gelöst und über Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert und eingedampft. Der ölige Rückstand wird mehrmals mit Äther trituriert, getrocknet und in 20 ml Acetonitril gelöst. Diese Lösung wird mit 3,12 g (10 mMol) *Boc-L-prolin-N-hydroxysuccinimidester* [28] versetzt und bei 0° mit Triäthylamin auf pH 8,5 eingestellt. Die Reaktionslösung wird 1 Std. bei 0° gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Essigester gelöst, mit 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung, gesättigter NaCl-Lösung, 0,5M Borsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und eingengt. Das resultierende Öl wird in Chloroform gelöst und an 100 g Kieselgel chromatographiert⁵⁾. Das Tripeptid wird mit Methanol/Chloroform (5:95) eluiert: 3,5 g (63%) farbloser Schaum. $[\alpha]_D^{25} = -46,7^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{26}H_{41}N_5O_8$ (551,63) Ber. C 56,61 H 7,49 N 12,70% Gef. C 56,82 H 7,36 N 12,23%

4.2. *Boc-L-prolyl-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin (XIX)*. 1,9 g (3,4 mMol) *Boc-L-prolyl-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin-methylester* (XVIII) werden in 10 ml Methanol gelöst, mit 4,25 ml 1N NaOH versetzt und 2½ Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird bei –5° mit 4,25 ml 1N HCl versetzt und bei 20° Badtemperatur zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird in 10 ml einer 20-proz. Lösung von Methanol in Chloroform gelöst, filtriert und an 50 g Kieselgel chromatographiert⁵⁾. Die Tripeptidsäure wird mit Methanol/Chloroform (2:3) eluiert: 1,35 g (73%) farbloser Schaum. $[\alpha]_D^{25} = -26,0^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{26}H_{39}N_5O_8$ (537,60) Ber. C 55,85 H 7,31 N 13,03% Gef. C 56,40 H 7,12 N 12,80%

4.3. *L-Prolyl-L-glutamyl-L-histidin-acetat (IV)*. 1,0 g (1,85 mMol) *Boc-L-prolyl-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin* (XIX) wird in 10 ml Trifluoressigsäure suspendiert und 1 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Darauf wird in 350 ml Äther gefällt, dekantiert, mehrmals durch Dekantation mit Äther gewaschen, abgenutscht und getrocknet. Der Rückstand wird durch trägerfreie Hochspan-

⁵⁾ Bei der Chromatographie wurden die Kieselgelsäulen in Chloroform bzw. einer Mischung aus Methanol/Chloroform entsprechend der Substanzlösung bereitet und nach Aufbringung der Substanzen mit Chloroform und Mischungen aus Methanol/Chloroform mit je nach den Erfordernissen steigenden Methanolkonzentrationen eluiert.

nungselektrophorese⁴) in einem Pyridinacetat-Puffer pH 4,4 gereinigt: 0,30 g (32%). $[\alpha]_D^{25} = -14,8^\circ$ ($c = 1,95$ -proz. Essigsäure).

$C_{16}H_{23}N_5O_8$ (381,38) Ber. C 50,39 H 6,08 N 18,36% Gef. C 50,32 H 6,00 N 18,15%

Aminosäureanalyse⁴): Glu:His:Pro (1,00:0,98:0,98).

5. L-Glutamyl-L-prolyl-L-histidin (V). – 5.1. *Z-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-prolyl-L-histidin-methylester (XX)*. 3,4 g (10 mMol) *Z*-L-glutaminsäure- γ -t-butylester [27] werden in 20 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst, bei -15° mit 1,39 ml (10 mMol) Triäthylamin und 1,3 ml (10 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester versetzt und 15 Min. bei dieser Temperatur gerührt. Es wird auf -40° gekühlt und eine auf -40° vorgekühlte Lösung der Aminkomponente zugesetzt. Diese Aminkomponentenlösung wird bereitet, indem man 3,4 g (10 mMol) L-Prolyl-L-histidin-methylester-dihydrochlorid (hergestellt durch Hydrierung von *Z*-L-prolyl-L-histidin-methylester (XV) in Methanol unter Zusatz von 2 Äquiv. HCl/Methanol) in einer Mischung aus 20 ml Tetrahydrofuran, 15 ml Dimethylformamid und 10 ml Dimethylsulfoxid löst und bei -35° mit 2,8 ml (20 mMol) Triäthylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wird 1 Std. unterhalb -5° und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Essigester gelöst, mit 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung, gesättigter NaCl-Lösung, 0,5M Borsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und eingengt: 4,0 g (68%) farbloser Schaum. Eine Analysenprobe wird an Kieselgel chromatographiert⁵). $[\alpha]_D^{25} = -40,7^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{29}H_{39}N_5O_8$ (585,64) Ber. C 59,47 H 6,71 N 11,96% Gef. C 59,75 H 6,63 N 11,90%

5.2. *Z-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-prolyl-L-histidin (XXI)*. 2,34 g (4 mMol) *Z-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-prolyl-L-histidin-methylester (XX)* werden in 7,5 ml Methanol gelöst, mit 5 ml 1N NaOH versetzt, $1\frac{1}{2}$ Std. gerührt und bei 20° Badtemperatur im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Wasser gelöst und mit Essigester extrahiert. Die wässrige Phase wird bei 0° mit 5,5 ml 1N HCl versetzt und mit Essigester in mehreren Portionen extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte werden mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingengt: 1,8 g (79%) farbloser Schaum. $[\alpha]_D^{25} = +2,6^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{28}H_{37}N_5O_8$ (571,60) Ber. C 58,83 H 6,52 N 12,25% Gef. C 59,39 H 6,47 N 11,86%

5.3. *L-Glutamyl-L-prolyl-L-histidin-acetat (V)*. 1,6 g (2,8 mMol) *Z-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-prolyl-L-histidin (XXI)* werden in 15 ml Trifluoressigsäure gelöst, mit 10 ml 4N HBr/Eisessig versetzt und 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Darauf wird in 800 ml Äther gefällt, dekantiert, mehrmals durch Dekantation mit Äther gewaschen, abgenutscht und getrocknet. Der Rückstand wird aus Methanol/Äther umgefällt und durch trägerfreie Hochspannungselektrophorese⁴) in einem Pyridinacetat-Puffer pH 6,0 gereinigt. Ausbeute 0,72 g (51%); $[\alpha]_D^{25} = +17,0^\circ$ ($c = 1,95$ -proz. Essigsäure).

$C_{16}H_{23}N_5O_6$ (381,38) Ber. C 50,39 H 6,08 N 18,36% Gef. C 50,58 H 5,66 N 17,77%

Aminosäureanalyse⁴): Glu:His:Pro (1,00:0,96:0,99).

6. L-Glutamyl-L-histidyl-L-prolin (VI). – 6.1. *Z-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin-methylester (XXII)*. 14,7 g (30 mMol) *Z-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin-hydrazid* [27] werden in einer Mischung aus 50 ml Tetrahydrofuran und 30 ml Dimethylformamid gelöst, bei -20° mit 60 ml 2,5N HCl/Tetrahydrofuran und mit 6 ml Isoamylnitrit versetzt und 30 Min. bei ca. -20° gerührt. Dann wird bei -30° durch portionsweise Zugabe von 20,85 ml (150 mMol) Triäthylamin neutralisiert und eine auf -30° gekühlte Lösung von 5,0 g (39 mMol) L-Prolin-methylester [29] in 10 ml Tetrahydrofuran zugegeben. Die Mischung wird 30 Min. unterhalb -20° , weitere 30 Min. unterhalb 0° gerührt und über Nacht bei 2° aufbewahrt. Das Salz wird abgenutscht, das Filtrat im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Essigester gelöst, mit 0,5M Borsäure, gesättigter NaCl-Lösung, 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und eingengt. Der kristalline Rückstand wird aus Essigester/Äthanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute 15,0 g (85%), Smp. 165–166°. $[\alpha]_D^{25} = -56,8^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{29}H_{39}O_8N_5$ (585,64) Ber. C 59,47 H 6,71 N 11,96% Gef. C 59,48 H 6,73 N 11,90%

Diese Substanz wird auch nach der klassischen Azidsynthese-Methode analog zu Schwyzler [27] erhalten.

6.2. *Z-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin (XXIII)*. 17,5 g (30 mMol) *Z-(γ -t-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin-methylester (XXII)* werden in 75 ml Methanol gelöst, mit 45 ml 1N

NaOH versetzt und 2 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird bei 20° Badtemperatur im Vakuum abgedampft, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und nach Zusatz von NaCl mit Essigester extrahiert. Die wässrige Phase wird bei –5° mit 22,5 ml 2N HCl versetzt und mehrmals mit Methylacetat extrahiert. Die vereinigten Methylacetatextrakte werden mit Wasser gewaschen, über Molekularsieb getrocknet und eingedampft: 13,5 g (78%) gelbstichiger Schaum. $[\alpha]_D^{25} = -33,3^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{28}H_{37}N_5O_8$ (571,60) Ber. C 58,83 H 6,52 N 12,25% Gef. C 58,52 H 6,54 N 11,78%

6.3. *L-Glutamyl-L-histidyl-L-prolin-acetat* (VI). 13,5 g (23,6 mMol) *Z-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin* (XXIII) werden in 75 ml Trifluoressigsäure gelöst, mit 60 ml 4N HBr/Eisessig versetzt und 1 Std. gerührt. Es wird in ca. 4 l Äther gefällt, abdekantiert, mehrmals durch Dekantation mit Äther gewaschen, abgenutscht und getrocknet. Der Rückstand wird aus Methanol/Äther umgefällt und durch trägerfreie Hochspannungselektrophorese⁴⁾ zunächst in 0,5N Essigsäure pH 2,5 und anschliessend in einem Pyridinacetat-Puffer pH 6,0 gereinigt. Ausbeute 4,9 g (41%). $[\alpha]_D^{25} = -18,4^\circ$ ($c = 1,95$ -proz. Essigsäure).

$C_{16}H_{23}N_5O_6$ (381,38) Ber. C 50,39 H 6,08 N 18,36% Gef. C 50,71 H 5,62 N 17,80%

Aminosäureanalyse⁴⁾: Glu:His:Pro (1,00:0,98:1,00).

7. **L-Histidyl-L-γ-glutamyl-L-prolin** (VII). – 7.1. *Boc-(α-benzyl)-L-glutamyl-L-prolin-benzylester-hemihydrat* (XXIV). 2,5 g (7,4 mMol) Boc-L-glutaminsäure-α-benzylester [21] werden analog dem Boc-L-glutaminsäure-γ-benzylester mit L-Prolin-benzylester umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute 3,7 g (70%) Öl. $[\alpha]_D^{25} = -62,7^\circ$ ($c = 2,1$ Methanol).

$C_{20}H_{36}N_2O_7, \frac{1}{2}H_2O$ (533,62) Ber. C 65,29 H 6,99 N 5,25% Gef. C 65,27 H 6,75 N 5,33%

7.2. *Z-L-histidyl-(α-benzyl)-L-glutamyl-L-prolin-benzylester* (XXV). 1,36 g (2,6 mMol) Boc-(α-benzyl)-L-glutamyl-L-prolin-benzylester-hemihydrat (XXIV) werden auf gleiche Weise mit Trifluoressigsäure gespalten und mit *Z-L-histidinazid* [20] umgesetzt wie der entsprechende Boc-(γ-benzyl)-L-glutamyl-L-prolin-benzylester (XIII). Ausbeute 1,3 g (71%). $[\alpha]_D^{25} = -56,2^\circ$ ($c = 2,7$ Methanol).

$C_{38}H_{41}N_5O_8$ (695,77) Ber. C 65,60 H 5,94 N 10,07% Gef. C 65,11 H 5,56 N 9,53%

7.3. *L-Histidyl-L-γ-glutamyl-L-prolin-acetat* (VII). 1,0 g (1,44 mMol) *Z-L-histidyl-(α-benzyl)-L-glutamyl-L-prolin-benzylester* (XXV) wird in 50 ml Methanol und 1 ml Eisessig gelöst und über Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird durch Celit filtriert, zur Trockene verdampft und der ölige Rückstand noch dreimal mit Wasser abgedampft. Darauf wird in Wasser gelöst, durch Norit filtriert und lyophilisiert: 0,32 g (50%), Smp. 180° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = -46,9^\circ$ ($c = 2,1$ Wasser).

$C_{16}H_{23}N_5O_6, C_2H_4O_2$ (441,44) Ber. C 48,97 H 6,17 N 15,86% Gef. C 48,81 H 6,03 N 15,43%

8. **N^α-Acetyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin** (VIII). – 8.1. *N^α-Acetyl-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin-methylester* (XXVI). 4,0 g (6,85 mMol) *Z-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin-methylester* (XXII) werden in 50 ml Methanol gelöst und über Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert und zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird in 8 ml Dimethylformamid gelöst, mit 2,5 g (12,7 mMol) Essigsäure-*p*-nitrophenylester [30] versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in einer 1-proz. Lösung von Methanol in Chloroform gelöst und an 130 g Kieselgel chromatographiert⁵⁾. Das Tripeptid wird mit Methanol/Chloroform (1:4) eluiert, und nach Verdampfen des Lösungsmittels als Öl, das bald erstarrte, isoliert. Ausbeute 3,0 g (89%); $[\alpha]_D^{25} = -62,8^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{23}H_{35}N_5O_7, CH_3OH$ (525,60) Ber. C 54,84 H 7,48 N 13,32% Gef. C 54,74 H 7,47 N 13,46%

8.2. *N^α-Acetyl-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin* (XXVII). 2,7 g (5,5 mMol) *N^α-Acetyl-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin-methylester* (XXVI) werden in 10 ml Methanol gelöst, mit 6,6 ml 1N NaOH versetzt und 2½ Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird bei 0° mit 6,8 ml 1N HCl versetzt und bei 20° Badtemperatur zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird in einer 20-proz. Lösung von Methanol in Chloroform gelöst, filtriert und an 50 g Kieselgel chromatographiert⁵⁾. Die Tripeptidsäure wird mit Methanol/Chloroform (2:3) eluiert: 2,0 g (76%) farbloser Schaum. $[\alpha]_D^{25} = -39,7^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{22}H_{33}N_5O_7$ (479,52) Ber. C 55,10 H 6,94 N 14,61% Gef. C 55,06 H 6,73 N 14,69%

8.3. *N*^α-Acetyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin-acetat (VIII). 1,8 g (3,76 mMol) *N*^α-Acetyl-(*γ*-*t*-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin (XXVII) werden in 10 ml 2*N* HCl suspendiert und 12 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Lösung wird mit 100 ml Wasser verdünnt, lyophilisiert und das Tripeptid durch trägerfreie Hochspannungselektrophorese⁴) in Pyridinacetat-Puffer pH 4,4 gereinigt. Ausbeute 0,95 g (52%); $[\alpha]_D^{25} = -44,6^\circ$ ($c = 1,95$ -proz. Essigsäure).

$C_{18}H_{25}N_5O_7$ (423,42) Ber. C 51,06 H 5,95 N 16,54% Gef. C 51,53 H 5,87 N 16,52%

Aminosäureanalyse⁴): Glu:His:Pro (1,00:0,98:0,91).

9.1. *Z*-L-pyroglutamyl-L-histidin-methylester (XXVIII). 5,2 g (20 mMol) *Z*-L-pyroglutaminsäure [31] werden in 20 ml Acetonitril gelöst, mit einer Lösung von 3,38 g (20 mMol) L-Histidin-methylester [24] in 10 ml Acetonitril vereinigt und auf -10° gekühlt. Der entstehende Niederschlag wird durch Zugabe von wenig Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 4,12 g (20 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid wird 1 Std. bei -10° gerührt und anschliessend wird die Lösung über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Der entstandene Dicyclohexylharnstoff wird abgenutscht, das Filtrat abgedampft und der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen. Die Lösung wird mit 0,5*M* Borsäure, 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird aus Methanol/Äther kristallisiert: 3,4 g (41%), Smp. 144° . $[\alpha]_D^{25} = -23,7^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{20}H_{22}N_4O_6$ (414,41) Ber. C 57,96 H 5,35 N 13,52% Gef. C 57,64 H 4,95 N 13,35%

9.2. L-pyroglutamyl-L-histidin-methylester (XXIX). 13,6 g (33 mMol) *Z*-L-pyroglutamyl-L-histidin-methylester (XXVIII) werden in 200 ml Methanol gelöst und über Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abgenutscht und zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird aus Methanol/Äther kristallisiert: 6,3 g (68%), Smp. $199-201^\circ$. $[\alpha]_D^{25} = -4,3^\circ$ ($c = 1$ Methanol).

$C_{12}H_{16}N_4O_4$ (280,28) Ber. C 51,42 H 5,75 N 19,99% Gef. C 51,39 H 5,79 N 19,67%

9.3. L-pyroglutamyl-L-histidin-hydrazid (XXX). Eine auf -10° gekühlte Lösung von 2,8 g (10 mMol) L-pyroglutamyl-L-histidin-methylester (XXIX) in 20 ml Methanol wird mit 2 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach Stehen über Nacht im Eiskasten wird der entstandene kristalline Niederschlag abgenutscht, mit Methanol und Äther gewaschen, getrocknet und aus Wasser/Äthanol umkristallisiert: 2,5 g (89%) Hydrazid. Smp. $245-247^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -14,7^\circ$ ($c = 1$ Wasser).

$C_{11}H_{16}N_6O_3$ (280,29) Ber. C 47,13 H 5,75 N 29,99% Gef. C 47,35 H 5,89 N 29,82%

9.4. L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolin-acetat (IX). – 9.4.1. *Durch Synthese aus XXX*. 8,4 g (30 mMol) L-pyroglutamyl-L-histidin-hydrazid (XXX) werden bei 0° in einer Mischung aus 140 ml Dimethylformamid, 105 ml Dimethylsulfoxid und 72 ml 2,5*N* HCl/Tetrahydrofuran gelöst. Nach Kühlen auf -20° werden 5,5 ml Isoamylnitrit zugegeben, 30 Min. bei -20° gerührt und anschliessend bei -25° durch portionsweise Zugabe von 25 ml (180 mMol) Triäthylamin neutralisiert. Zu dieser Mischung wird eine auf -20° vorgekühlte Lösung von 7,5 g (37 mMol) L-Prolin-benzylester [22] in 10 ml Dimethylformamid gegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 Min. bei -20° und weitere 30 Min. unterhalb 0° gerührt und über Nacht bei 2° aufbewahrt. Das Salz wird abgenutscht, das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mehrmals mit Äther durch Dekantation gewaschen, in ca. 150 ml Isopropanol durch Erhitzen gelöst, auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum zur Trockene verdampft. Dieser Rückstand wird in 200 ml Methanol gelöst und über Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abgenutscht und eingedampft. Der Rückstand wird zunächst durch Gegenstromverteilung im System *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) über 686 Stufen ($K = 0,11$), und anschliessend durch trägerfreie Hochspannungselektrophorese⁴) in Pyridinacetat-Puffer pH 6,0 gereinigt. Ausbeute 7,2 g (57%); $[\alpha]_D^{25} = -45,1^\circ$ ($c = 1,95$ -proz. Essigsäure).

$C_{16}H_{21}N_5O_5, \frac{1}{2}C_2H_4O_2$ (393,39) Ber. C 51,90 H 5,89 N 17,80% Gef. C 51,72 H 5,97 N 18,29%

Aminosäureanalyse⁴): Glu:His:Pro (1,00:0,96:1,01).

9.4.2. *Aus VI durch Behandlung mit Essigsäureanhydrid*. 320 mg L-Glutamyl-L-histidyl-L-prolin (VI) wurden in je 5 ml Eisessig und Essigsäureanhydrid suspendiert, 6 Std. verschlossen bei Raumtemperatur gerührt, mit Wasser verdünnt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 10 ml Pyridinacetat-Puffer pH 4,4 gelöst und durch die kontinuierliche, trägerfreie Hochspannungselektrophorese aufgetrennt⁴). Die Analyse und Aufarbeitung der 48 Fraktionen ergab in den Frak-

tionen 24–28 reines L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolin als Hauptkomponente (130 mg) und in den Fraktionen 19–22 N^α-Acetyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-prolin (< 1%). Beide Verbindungen erwiesen sich als identisch mit den entsprechenden Syntheseprodukten IX bzw. VIII.

10. L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolin-acetat (X). – 2,8 g (10 mMol) L-Pyroglutamyl-L-histidin-hydrazid (XXX) werden bei 0° in einer Mischung aus 42 ml Dimethylformamid, 35 ml Dimethylsulfoxid und 24 ml 2,5N HCl/Tetrahydrofuran gelöst, bei –20° mit 1,9 ml Isoamylnitrit versetzt und 30 Min. bei ca. –20° gerührt. Bei –25° werden 8,35 ml (60 mMol) Triäthylamin zugetropft und eine auf –25° gekühlte Lösung von L-Prolin-amid (hergestellt durch Hydrierung von 3,0 g (12 mMol) Z-L-prolin-amid [32]) in einer Mischung aus 3 ml Dimethylformamid und 3 ml Dimethylsulfoxid zugesetzt. Die Reaktionsmischung wird 30 Min. unterhalb –20° und weitere 30 Min. unterhalb 0° gerührt und über Nacht bei 2° aufbewahrt. Das Salz wird abgutscht, das Filtrat im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 50 ml Methanol gelöst und in einer Mischung aus 400 ml Tetrahydrofuran und 400 ml Äther gefällt. Es wird abfiltriert und nochmals aus Methanol/Tetrahydrofuran/Äther umgefällt. Der Rückstand wird getrocknet und durch Gegenstromverteilung im System n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) über 1374 Stufen (*K* = ca. 0,13), und anschliessend durch trägerfreie Hochspannungselektrophorese⁴⁾ in Pyridinacetat-Puffer pH 6,0 gereinigt. Ausbeute 1,2 g (28%); $[\alpha]_D^{25} = -44,8^\circ$ (*c* = 1,95-proz. Essigsäure).

C₁₆H₂₂N₆O₄ · C₂H₄O₂ (422,43) Ber. C 51,18 H 6,20 N 19,89% Gef. C 51,12 H 6,52 N 20,31% Aminosäureanalyse⁴⁾: Glu:His:Pro:NH₂ (1,00:0,91:0,96:0,99).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Guillemin, Recent Progr. Hormone Res. 20, 89 (1964); A. V. Schally, A. Arimura, C. Y. Bowers, A. J. Kastin, S. Sawano & T. W. Redding, *ibid.* 24, 497 (1968).
- [2] R. Guillemin, E. Yamazaki, M. Justiz & E. Sakiz, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 255, 1018 (1962); M. Justiz, E. Yamazaki, A. Bévault, E. Sakiz & R. Guillemin, *ibid.* 256, 2925 (1963); R. Guillemin, E. Sakiz & D. N. Ward, *ibid.* 258, 6567 (1964); R. Guillemin, R. Burgus, E. Sakiz & D. N. Ward, *ibid.* 262, 2278 (1966).
- [3] R. Burgus & R. Guillemin, Proc. NIH Conference on Hypothalamic Hypophysiotropic Hormones, Tucson, Arizona, Jan. 1969, im Druck (Williams & Wilkins, Publ., Baltimore 1969).
- [4] A. V. Schally, C. Y. Bowers & T. W. Redding, Proc. Soc. expt. Biol. Med. 121, 718 (1966).
- [5] A. V. Schally, C. Y. Bowers, A. Kuroshima, Y. Ishida, T. W. Redding & A. J. Kastin, Proc. XXIII. Internat. Congress of Physiology Sciences, Tokyo 1965, Excerpta Medica Acta Internat. Congress, Series 87, 183 (1965); A. V. Schally, C. Y. Bowers & T. W. Redding, Endocrinology 78, 726 (1966); A. V. Schally, T. W. Redding, J. F. Barrett & C. Y. Bowers, Fed. Proc. 25, 348 (1966).
- [6] A. V. Schally, C. Y. Bowers, T. W. Redding & J. F. Barrett, Biochem. biophysic. Res. Commun. 25, 165 (1966).
- [7] R. Guillemin, E. Sakiz & D. N. Ward, Proc. Soc. expt. Biol. Med. 118, 1132 (1965).
- [8] R. Burgus, D. N. Ward, E. Sakiz & R. Guillemin, C. r. hebd., Séances Acad. Sci. (Paris) 262, 2643 (1966).
- [9] C. Y. Bowers, T. W. Redding & W. H. Hawley, 48th Endocrine Society Meeting, S. 48 (1966); R. Guillemin, Annu. Rev. Physiol. 29, 313 (1967).
- [10] R. Burgus, R. N. Stilwell, J. A. McCloskey, D. N. Ward, E. Sakiz & R. Guillemin, Physiologist 19, 149 (1966); R. Burgus & R. Guillemin, Fed. Proc. 26, 255 (1967).
- [11] R. Burgus, T. F. Dunn, D. N. Ward, W. Vale, M. Amoss & R. Guillemin, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 268, 2116 (1969).
- [12] R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio, W. Vale & R. Guillemin, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 269, 226 (1969).
- [13] R. Burgus, T. F. Dunn, D. M. Desiderio, D. N. Ward, W. Vale, R. Guillemin, A. M. Felix, D. Gillessen & R. O. Studer, Endocrinology 86, März 1970, im Druck.
- [14] R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio & R. Guillemin, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 269, 1870 1969.
- [15] A. V. Schally, T. W. Redding, C. Y. Bowers & J. F. Barrett, J. biol. Chemistry 244, 4077 (1969),

- [16] *K. Folkers, F. Enzmann, J. Boler, C. Y. Bowers & A. V. Schally*, Biochem. biophysic. Res. Commun. **37**, 123 (1969).
- [16a] *J. Boler, F. Enzmann, K. Folkers, C. Y. Bowers & A. V. Schally*, Biochem. biophysic. Res. Commun. **37**, 705 (1969).
- [17] *D. H. Spackman, W. H. Stein & S. Moore*, Analyt. Chemistry **30**, 1190 (1956).
- [18] *G. W. Anderson & A. C. McGregor*, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6180 (1957).
- [19] *H. Sachs & E. Brand*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4610 (1953).
- [20] *R. Holley & E. Sondheimer*, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1326 (1954).
- [21] *E. Schröder & E. Klieger*, Liebigs Ann. Chem. **673**, 196 (1964).
- [22] *R. E. Neuman & E. L. Smith*, J. biol. Chemistry **193**, 97 (1951).
- [23] *A. Berger, J. Kurtz & E. Katchalsky*, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5552 (1954).
- [24] *E. Fischer & L. H. Cone*, Liebigs Ann. Chem. **363**, 107 (1908).
- [25] *G. W. Anderson, J. E. Zimmerman & F. M. Callahan*, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3039 (1963).
- [26] *E. Taschner & C. Wasielewski*, Liebigs Ann. Chem. **640**, 139 (1961).
- [27] *R. Schwyzer & H. Kappeler*, Helv. **44**, 1991 (1961).
- [28] *G. W. Anderson, J. E. Zimmerman & F. M. Callahan*, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964).
- [29] *B. F. Erlanger, H. Sachs & E. Brand*, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1806 (1954).
- [30] *R. Schwyzer, A. Costopanagiotis & P. Sieber*, Helv. **46**, 870 (1963).
- [31] *H. Gibian & E. Klieger*, Liebigs Ann. Chem. **640**, 145 (1961).
- [32] *D. Hamer & J. P. Greenstein*, J. biol. Chemistry **193**, 81 (1951).

7. Allgemeine Basenkatalyse der Azokupplung von *o*-Diazophenolen

19. Mitteilung zur Kenntnis der Azokupplungsreaktion [1]

von **C. Jermini, S. Koller** und **H. Zollinger**

Technisch-Chemisches Laboratorium, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

(29. XI. 69)

Summary. – 1. The kinetics and the mechanism of the diazo coupling reaction of 2-diazophenol-4-sulphonic acid with 1-naphthol-2-sulphonic acid have been investigated at 0°C and ionic strength $I = 0.45$.

2. The pK_a -value of the hydroxyl group in 2-diazophenol-4-sulphonic acid has been determined: $pK_a = -0.04 \pm 0.10$. It is the diazonium-phenolate anion which actually enters into the diazo coupling reaction.

3. The reaction is subject to general base catalysis. It is shown that no intermediate is enriched during the reaction at pH 11.3–11.6 which proceeds by a two-step mechanism with a steady state intermediate.

1. Problemstellung. – Es ist bekannt, dass Azokupplungen mit *o*-Diazophenolen als elektrophile Komponente durch Basen katalysiert werden [2]. Die mechanistische Ursache dieser Basenkatalyse ist bis jetzt noch nicht abgeklärt worden. Es kommen dafür vor allem folgende zwei Möglichkeiten in Frage:

1. Vor längerer Zeit konnten wir zeigen [3], dass Azokupplungen dann allgemein basenkatalysiert sind und einen kinetischen Wasserstoff-Isotopeneffekt aufweisen, wenn das Zwischenprodukt I im Mechanismus (1)–(2) sterisch gehindert ist. Dadurch wird einerseits die Annäherung des Protonakzeptors B in der Stufe (2) erschwert; andererseits wird die Dissoziation des Zwischenproduktes in die Edukte (Rückreaktion