

Table I. Conversion of labelled GHBA, glutamic acid, and pyruvic acid to GABA

Compound incubated ^b	Isolated compounds (cpm/ μ mole) ^a		
	Glutamic acid	GABA	GABA/glutamic acid
GHBA-1-C ¹⁴ 4 μ c, 5.4 μ moles	1,764	10,988	6.2
Glutamic acid-U-C ¹⁴ 2 μ c, 0.02 μ mole	165,305	32,345	0.2
Pyruvic acid-2-C ¹⁴ 2 μ c, 0.32 μ mole	109,305	77,656	0.7

^a Values are averages of triplicate runs. ^b Brain homogenates were prepared by grinding 1 part of male Sprague-Dawley rat brain in 2 parts of 0.1 M, pH 7.4 phosphate buffer. Incubation was carried out for 1 h in a Dubnoff metabolic shaker at 37°C. The incubation mixture consisted of 2 ml of homogenate, 2 mg of glucose, and labelled substrate in a final volume of 3.1 ml. Labelled GHBA was separated from amino acids by passing the deproteinized reaction mixture through a Dowex-50 column (3 $\times$ 1.3 cm) and rinsing the column with 300 μ moles of unlabelled GHBA and 20 ml of water before eluting the amino acids.

Table II. Comparison of brain glucose level

Compound injected	Time of sacrifice	Glucose level μ g/g brain ^a
Saline	immediately	91 $\pm$ 39
GHBA (500 mg/kg)	75 min	198 $\pm$ 49
GHBA	approx. 2 h	145 $\pm$ 34
GHBA + insulin ^b	approx. 2 h	77 $\pm$ 20

^a Values are averages from 5 rat brains each. ^b Insulin was injected i.p. 75 min after GHBA administration. The rats were killed approx. 2 h after GHBA injection.

sulted in less radioactivity being incorporated into GABA when labelled glutamic or pyruvic acid was the substrate whereas no such decrease in the radioactivity of GABA was observed when GHBA was the labelled substrate. These data indicate that GHBA is converted directly to GABA by the brain homogenate without going through glutamic acid. The implication of this finding to the phenomenon of GHBA-induced sleep is not clear at present.

In another series of experiments, we were unable to obtain data to confirm the speculation of LABORIT¹ that GHBA oriented the metabolism of glucose-6-phosphate toward the hexose monophosphate shunt pathway. The role, if any, of glucose in the induction of sleep by GHBA is obscure. LABORIT reported that supplementing a sub-threshold dose of GHBA with insulin induced sleep in the rat. In our experiments, insulin (0.5 mg/kg, i.p.) given to rats during GHBA-induced (500 mg/kg, i.p.) sleep prolonged the sleeping time from approximately 2 h to 2.5 to 3 h. However, the glucose level in the brain bore no direct relationship to the state of sleep since as shown in Table II, the glucose level was elevated after GHBA administration and the level was brought down to the control level when GHBA and insulin were administered, although in both cases the animals were asleep. The hyperglycemic action of GHBA had been reported by FLEMING and LACOURT^{5,6}.

Zusammenfassung. Nachweis der enzymatischen Umwandlung von γ -Hydroxyl-Buttersäure in γ -Amino-Buttersäure im Gehirn.

CH. MITOMA and SUSANNA E. NEUBAUER

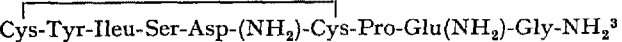
Life Sciences Division, Stanford Research Institute, Menlo Park (California 94025, USA), 24 July 1967.

⁵ M. C. FLEMING and S. LACOURT, *Biochem. Pharmac.* **14**, 1907 (1965).

⁶ This investigation was supported by Public Health Service grant No. 5-SOI-FR-05522-04.

Über Peptidsynthesen, XLIV. Synthese von Ser⁴-Glu(NH₂)⁸-Oxytocin (Glumitocin)¹

Von ACHER et al.² wurde über die Isolierung eines Oxytocin-Analogen, des Glumitocin aus den Hypophysen von Knorpelfischen (*Raia clavata*) berichtet und die Struktur



vorgeschlagen. Wir haben dieses Nonapeptid synthetisiert (vgl. Reaktionsschema). Nach den analytischen Daten (Papierchromatographie, Elektrophorese und Aminosäureanalyse) sowie seiner oxytocischen Wirksamkeit erwies sich dieses synthetische Präparat mit dem natürlichen Hormon als identisch⁴.

Die Synthese verlief über folgende Zwischenstufen: H-Gly-NH₂ · HBr⁵ (aus Z-Gly-OH und Ammoniak in Chloroform nach der Anhydrid-Methode und Behandlung mit HBr/Eisessig) wurde nach Freisetzen mit Triäthylamin mit Z-Glu(NH₂)-OCP⁶ in DMF kondensiert. Das erhaltene Z-Glu(NH₂)-Gly-NH₂ [Ausbeute: 81%; Schmp.

198–199° (wässriges Äthanol); [α]_D²⁵ = –16,2° (c = 0,5; 50%iges wässriges Äthanol); C₁₅H₂₀N₄O₈ (336,3); Ber. C 53,57, H 5,99, N 16,66; Gef. C 53,76, H 6,00, N 16,70] wurde in 50%igem wässrigem Äthanol über Pd-Mohr hy-

¹ Über Peptidsynthesen XLIII. Mitteilung, E. KLIEGER, *Experientia* **23**, 620 (1967).

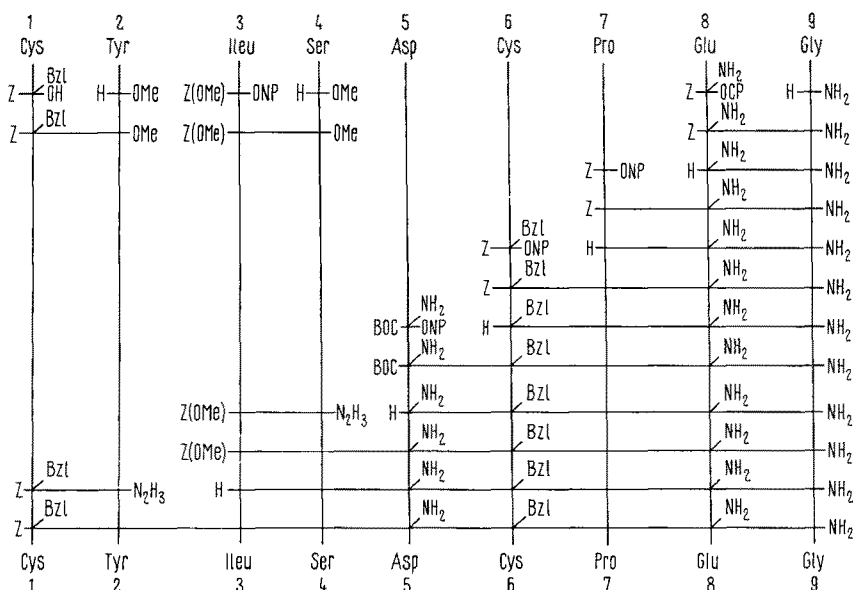
² R. ACHER, J. CHAUVET, M. T. CHAUVET und D. CREPY, *Biochim. biophys. Acta* **107**, 393 (1965).

³ Alle Aminosäuren, mit Ausnahme von Glycin, haben L-Konfiguration. Abkürzungen nach dem «Report of the Committee on Nomenclature» in *Peptides* (Proc. 5th European Symposium, Oxford 1962, Pergamon Press 1963), p. 261.

⁴ Die diesbezüglichen Untersuchungen wurden von Prof. R. ACHER, Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Paris durchgeführt, dem wir bestens dafür danken.

⁵ M. BODANSZKY, M. A. ONDETTI, C. A. BIRKHIMER und P. L. THOMAS, *J. Am. chem. Soc.* **86**, 4452 (1964).

⁶ J. PLESS und R. A. BOISSONNAS, *Helv. chim. Acta* **46**, 1609 (1963).



driert und das H-Glu(NH₂)-Gly-NH₂ [Ausbeute: 100%; nach Digerieren mit Äthanol Schmp. 138–141°; $[\alpha]_D^{25} = -10,6^\circ$ ($c = 0,5$, DMF); C₇H₁₄N₄O₃ (202,2); Ber. C 41,58, H 6,98, N 27,71; Gef. C 41,79, H 7,00, N 27,25] mit Z-Pro-ONP⁷ zum Z-Pro-Glu(NH₂)-Gly-NH₂ [Ausbeute: 72%; Schmp. 217–218° (Äthanol); $[\alpha]_D^{25} = -40,1^\circ$ ($c = 1$, DMF); C₂₆H₂₇N₅O₆ (433,5); Ber. C 55,41, H 6,28, N 16,16; Gef. C 55,74, H 6,39, N 16,00] umgesetzt. Das durch anschließende Hydrogenolyse in 50%igem wässrigem Äthanol gewonnene H-Pro-Glu(NH₂)-Gly-NH₂ [Ausbeute: 90%; Schmp. 156–157° (Äthanol); $[\alpha]_D^{25} = -26,4^\circ$ ($c = 0,5$, DMF); C₁₂H₂₁N₃O₄ (299,3); Ber. C 48,15, H 7,07, O 21,38; Gef. C 48,38, H 7,23, O 21,31] wurde mit Z-Cys(Bzl)-ONP zum Z-Cys(Bzl)-Pro-Glu(NH₂)-Gly-NH₂ [Ausbeute: 93%; Schmp. 212–213°; $[\alpha]_D^{25} = -39,1^\circ$ ($c = 0,5$, DMF); C₃₀H₃₈N₆O₇S (626,7); Ber. C 57,49, H 6,11, N 13,41, S 5,12; Gef. C 57,28, H 6,16, N 13,26, S 5,21] verlängert. Nach Decarboxylierung mit HBr/Eisessig und Behandlung mit Amberlite® IRA 410 konnte mit BOC-Asp(NH₂)-ONP⁸ das BOC-Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Glu(NH₂)-Gly-NH₂ [Ausbeute: 87%; Schmp. 209 bis 210°; $[\alpha]_D^{25} = -44,0^\circ$ ($c = 0,5$, DMF); C₃₁H₃₆N₈O₉S (706,8); Ber. C 52,67, H 6,56, N 15,85, S 4,54; Gef. C 52,60, H 6,51, N 15,98, S 4,61] erhalten werden. Abspaltung der Butyloxycarbonylgruppe mit Trifluoressigsäure und Umsetzung mit Z(OMe)-Ileu-Ser-NHNH₂ [aus Z(OMe)-Ileu-ONP⁹ und H-Ser-OMe und Hydrazinolyse: Ausbeute: 85%; Schmp. 219–220° (wässriges Äthanol); $[\alpha]_D^{25} = -22,2^\circ$ ($c = 0,5$, Eisessig); C₁₈H₂₈N₄O₆ (396,4); Ber. C 54,53, H 7,12, N 14,13; Gef. C 54,65, H 7,28, N 13,87] lieferte Z(OMe)-Ileu-Ser-Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Glu(NH₂)-Gly-NH₂ [Ausbeute: 67%; Schmp. 221 bis 222°; $[\alpha]_D^{25} = -20,0^\circ$ ($c = 0,5$, DMF); C₄₄H₆₂O₁₃N₁₀S (971,1); Ber. C 54,41, H 6,43, N 14,43; Gef. C 54,49, H 6,43, N 14,28]. Dieses Heptapeptidderivat wurde mit Trifluoressigsäure/Anisol¹⁰ H-Ileu-Ser-Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Glu(NH₂)-Gly-NH₂. Trifluoressigsäure [Ausbeute: 100%; $[\alpha]_D^{25} = -7,6^\circ$ ($c = 0,5$, DMF); C₃₅H₅₄N₁₀O₁₀S · CF₃COOH (921,0); Ber. N 15,21, S 3,48; Gef. N 14,91, S 3,41] aus dem mit Z-Cys(Bzl)-Tyr-N₃¹¹ schliesslich das vollgeschützte Ser⁴-Glu(NH₂)-Oxytocin erhalten wurde [Ausbeute: 59%; Schmp. 232–233°; $[\alpha]_D^{25} = -29,2^\circ$ ($c = 0,5$, DMF); C₆₂H₈₀N₁₂O₁₅S₂ (1297,5); C 57,39, H 6,22, N 12,96; Gef. C 57,40, H 6,29, N 12,86. Aminosäureanalyse (Hydro-

lyse 24 h, 105°): Asp_{1,00}, Ser_{0,79}, Glu_{0,96}, Pro_{0,92}, Gly_{0,90}, Cys_{1,55}, Ileu_{0,91}, Tyr_{0,71}, NH_{33,10}]. Nach Abspalten sämtlicher Schutzgruppen mit Natrium in flüssigem Ammoniak, Oxydation mit Luft bei pH 6,5 präparativer trägerfreier Elektrophorese¹² und Gefrier Trocknung konnte das Ser⁴-Glu(NH₂)-Oxytocin [C₁₄H₆₀N₁₂O₁₃S₂ · 2 CH₃COOH · 3 H₂O (1155,3); Ber. C 45,74, H 6,46, N 14,55; gef. C 45,46, H 5,87, N 14,58; Aminosäureanalyse (Hydrolyse 48 h, 105°): Asp_{1,03}, Ser_{0,82}, Glu_{1,00}, Pro_{0,79}, Gly_{0,92}, Cys_{1,53}, Ileu_{1,00}, Tyr_{0,66}, NH_{33,22}] in elektrophoretisch und papierchromatographisch einheitlicher Form isoliert werden¹³. Am isolierten Rattenuterus¹⁴ konnte eine oxytocische Aktivität von $7,8 \pm 0,6$ IE/ μ Mol gegenüber $8,1 \pm 1,4$ IE/ μ Mol beim natürlichen Hormon^{2,4} ermittelt werden.

Summary. Ser⁴-Glu(NH₂)-Oxytocin has been synthesized. The identity of the synthetic compound with the neurohypophyseal hormone (Glumitocin) recently isolated from species of cartilaginous is demonstrated.

E. KIEGER

Hauptlaboratorium der Schering AG., 1 Berlin 65 (Deutschland), 9. Oktober 1967.

⁷ M. GOODMAN und K. C. STUEBEN, J. Am. chem. Soc. 81, 3980 (1959).

⁸ E. SCHRÖDER und E. KIEGER, Justus Liebigs Annln Chem. 673, 208 (1964).

⁹ E. KIEGER und E. SCHRÖDER, Tetrahedron Lett. 1965, 2067.

¹⁰ F. WEYGAND und K. HUNGER, Chem. Ber. 95, 1 (1962).

¹¹ C. W. ROBERTS, J. Am. chem. Soc. 76, 6203 (1954).

¹² J. BARROILLIER, E. WATZKE und H. GIBIAN, Z. Naturf. 13b, 754 (1958); E. SCHRÖDER und S. MATTHES, J. Chromat. 17, 189 (1965).

¹³ Für die Durchführung der präparativen Arbeiten danken wir Frl. I. BAGANZ und Herrn P. NOWACK, für die Aminosäureanalysen Herrn G. KLOSS und für die Elektrophoresen Herrn S. MATTHES.

¹⁴ P. HOLTON, Br. J. Pharmac. 3, 328 (1948).