

157. Aminoacyl-Einlagerung.

1. Mitteilung.

Definition, Übersicht und Beziehung zur Peptidsynthese

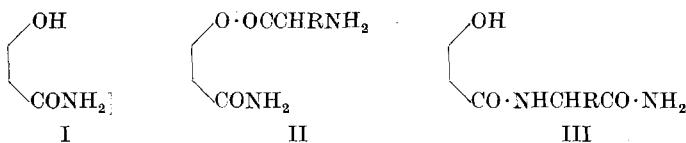
von M. Brenner, J. P. Zimmermann, J. Wehrmüller, P. Quitt,
A. Hartmann, W. Schneider und U. Beglinger.

Herrn Prof. Dr. T. Reichstein zum 60. Geburtstag gewidmet.

(29.V. 57.)

Der Ausdruck Aminoacyl-Einlagerung („AAE“) soll eine Umlagerungsreaktion charakterisieren, welche wir bei O-aminoacylierten Derivaten der Salicylsäure entdeckt haben¹⁾ und nunmehr auch an entsprechenden Abkömmlingen aliphatischer β -Hydroxysäuren durchführen können. Mit der Übertragung der Reaktion in die aliphatische Reihe sind unsere Arbeiten auf diesem Gebiet zu einem ersten Abschluss gelangt. Wir fassen in der vorliegenden Mitteilung die wesentlichsten Resultate zusammen; über zahlreiche weitere Ergebnisse wird demnächst ausführlich berichtet werden.

Verestert man die Hydroxylgruppe eines β -Hydroxysäure-amids I mit einer α -Aminosäure und unterwirft man den resultierenden Aminosäureester II, gegebenenfalls unter Ausschluss von Wasser, der Einwirkung geeigneter basischer Agenzien, so erfolgt eine Umlagerung. Aus II entsteht ein N-(β -Hydroxy-acyl)-aminoacylamid III.

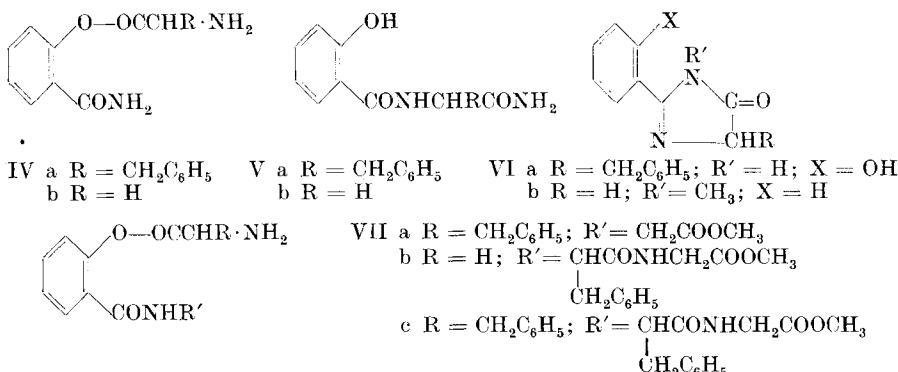


Allgemeiner chemischer Erfahrung zufolge muss der primäre Amidstickstoff von III mit dem primären Amidstickstoff von I bzw. II identisch sein. Der in die Hydroxylgruppe von I eingeführte Aminoacylrest befindet sich also nach der Umlagerung zwischen dem Carbonyl und dem Amidstickstoff von I: Formal hat sich der Aminoacylrest vom β -ständigen Sauerstoff in II gelöst, um 180° gedreht und in die Carbonamidgruppe „eingelagert“. Unsere Bezeichnung „Aminoacyl-Einlagerung“ basiert danach auf dem Ergebnis der Umlagerung. Der Name ist eine zwar unvollkommene, aber kurze und praktisch ausreichende Umschreibung für das Wesen dieser noch unbekannten Reaktionsart. Er umfasst auch ihre bisher aufgefundenen

¹⁾ M. Brenner und Mitarbeiter, Experientia 11, 397 (1955).

Varianten: AAE bei aminoacylierten β -Hydroxysäuren¹⁾²⁾³⁾, aminoacylierten β -Mercaptosäuren^{1)2)a)} und AAE unter Hydroxyphenylimidazolon-Bildung²⁾⁵⁾.

Im Sinne des allgemeinen Schemas II → III erhält man aus dem Perchlorat von O-Phenylalanyl-salicylsäure-amid (IVa) beim Auflösen in 10-proz. wässrigem Hydrogencarbonat, 2-n. wässriger Soda, Ammoniaklösung oder Natronlauge Salicoyl-phenylalanin-amid (Va). Die Umlagerungen sind nach wenigen Minuten beendet. Die Ausbeuten sind durchweg gut (Tab. 1). Ebenso verhält sich die Glycin-Verbindung IVb, wobei aber die Ausbeute an Umlagerungsprodukt Vb in Hydrogencarbonat deutlich schlechter ist. Ferner wird bei dem Natronlauge-Versuch an Stelle von Vb dessen Verseifungsprodukt Salicoyl-glycin erhalten.



Die erwähnte Ausbeuteverschlechterung wird durch eine Nebenreaktion verursacht. Es handelt sich dabei um jene Variante der AAE, die zu Imidazolonen VI führt. Die Imidazolonbildung wird zur Hauptreaktion, wenn die Umlagerung unterhalb pH 8 erfolgt. So erhält man aus dem Perchloration von IVa in Phosphatpuffer (pH 6,9 und 5,9) oder Acetatpuffer (pH 5,0) ausschliesslich 2-(2'-Hydroxyphenyl)-4-benzyl-imidazolon-(5) (VIa)². Die AAE kann auch in wasserfreiem Milieu erfolgen (Tab. 1). Hierbei ist bemerkenswert, dass Basen wie Ammoniak, Diäthylamin und Triäthylamin die Imidazolonbildung nur in Gegenwart hydroxylhaltiger Lösungsmittel vollständig unterdrücken. In flüssigem Ammoniak erhält man aus IVa sogar quantitativ das Imidazolon VIa. Eine Ausnahme macht 2-n. Triäthylamin in Chloroform. Dieses Medium eignet sich ausgezeichnet zur präparativen Gewinnung von offenkettigen Säureamiden V.

²⁾ J. P. Zimmermann, Dissertation Universität Basel, 1952.

2a) *J. P. Zimmermann*, unveröffentlicht.

³⁾ J. Wehrmüller, Dissertation Universität Basel, 1955.

⁴⁾ P. Quitt, Dissertation Universität Basel, 1956.

5) Ob auch im Fall der Imidazolonbildung von AAE zu sprechen sei, ist eine Ermessensfrage. Wir werden bei späterer Gelegenheit darauf zurückkommen.

Tabelle 1.
AAE bei IVa in wässrigem und wasserfreiem Milieu.

Lösungsmittel	% Ausbeute an	
	Salicoyl-phenylalanin-amid	2-(2'-Hydroxyphenyl)-4-benzyl-imidazolon-(5)
10-proz. KHCO_3	93	—
Na_2CO_3 2-n.	94	—
NH_3 2-n.	92	—
NaOH 2-n.	92	—
Phosphatpuffer pH 6,90	—	94
Phosphatpuffer pH 5,95.	—	92
Acetatpuffer pH 5,05	—	93
Diäthylamin 2-n. in Wasser	91	—
Triäthylamin 2-n. in Wasser	89	—
Diäthylamin 2-n. in Methanol	84	—
Triäthylamin 2-n. in Methanol	90	—
Triäthylamin 2-n. in Chloroform	91	—
Diäthylamin 2-n. in Tetrahydro-furan	60*)	30*)
Triäthylamin 2-n. in Tetrahydro-furan	70*)	25*)
NH_3 flüssig, wasserfrei	—	97

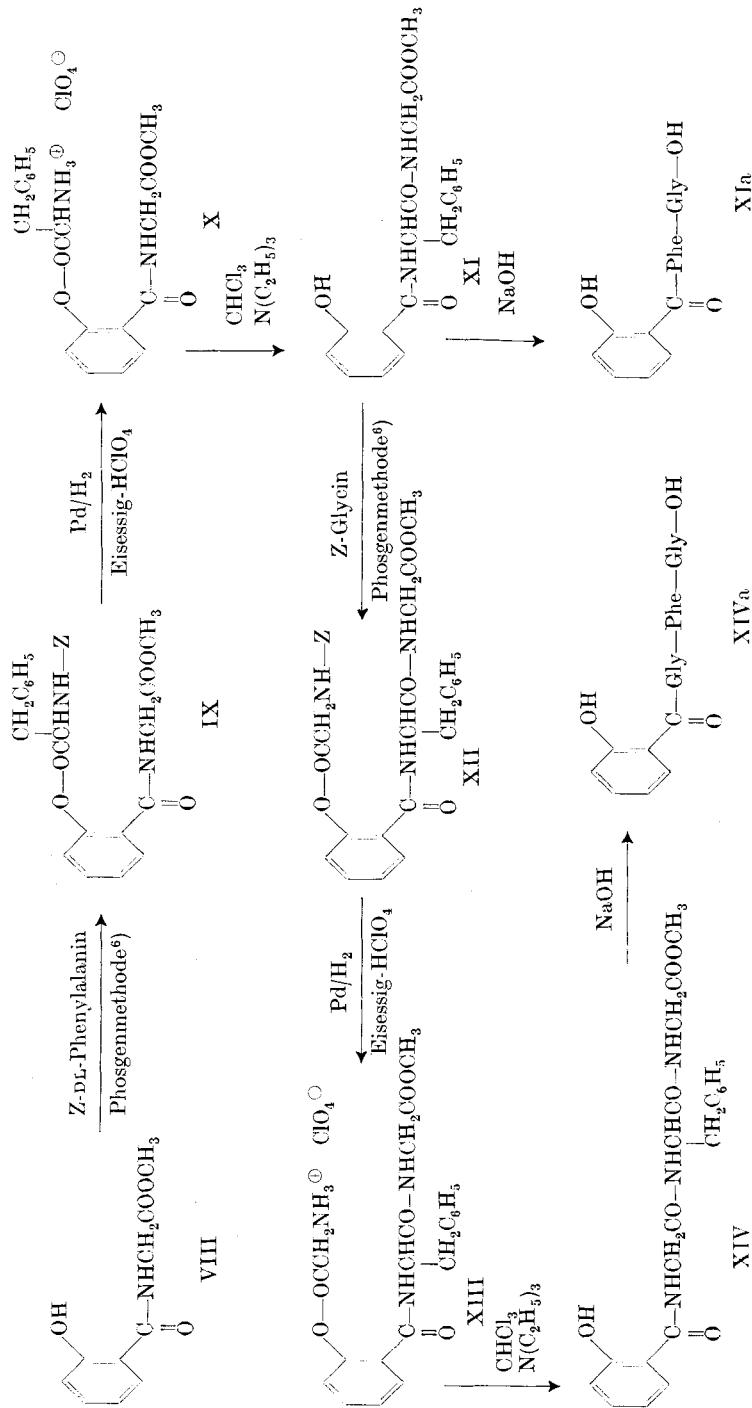
*) Unreine Produkte.

Die Tendenz zur Imidazolonbildung geht zurück, wenn man von IVa zum O-Phenylalanyl-salicoyl-glycin-methylester (VIIa) übergeht. Sie verschwindet fast ganz bei den O-Aminoacyl-salicoyl-dipeptid-Derivaten (VIIb, c⁴)^{2a}).

Im Gegensatz dazu bleibt die Fähigkeit zur AAE erhalten. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt indessen bei den schwereren Molekülen ab. So können Verbindungen vom Typus VIIa, b, c wegen konkurrierender Hydrolyse der Phenylester-Bindung nicht mehr gut in wässrigen Medien umgelagert werden. Hier hat sich jedoch Triäthylamin in Chloroform bewährt. Als Beispiel beschreiben wir im experimentellen Teil die Durchführung der Reaktionsfolge VIII → XIV, Schema 1, Seite 1500⁴). Das verwendete Ausgangsmaterial VIII ist von *J. P. Zimmermann*²) und *J. Wehrmüller*³) aus O-Glycyl-salicylsäure durch eine der eingangs genannten Varianten der Aminoacyl-Einlagerungs-Reaktion erhalten worden¹).

Der im Schema 1 skizzierte Aufbau des Salicoyl-tripeptid-methylesters XIV stellt ein neues Prinzip zum Aufbau von Peptidketten dar. Solche Verbindungen hat man bisher ausschliesslich nach dem Verfahren der „Aminoacyl-Anlagerung“ hergestellt. Letzteres

Schema 1.

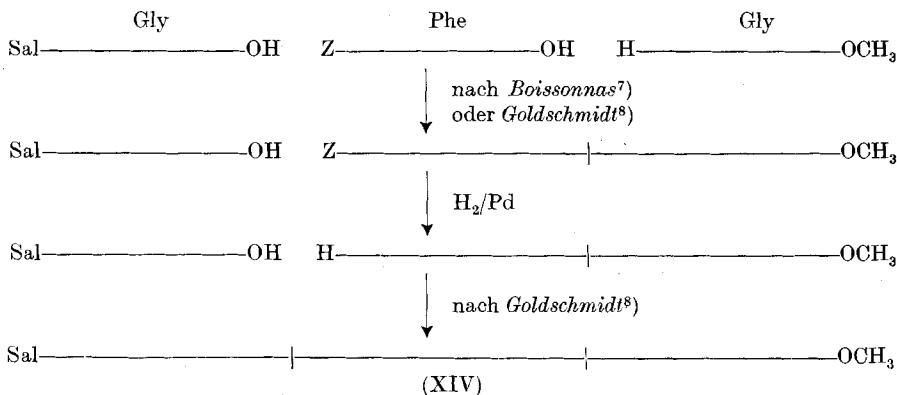
Synthese von XIV nach dem Verfahren der Aminoacyl-Einlagerung ($Z = \text{Carbobenzoxy-}$).

⁶⁾ M. Brenner, J. P. Zimmermann, P. Quitt, W. Schneider & A. Hartmann, Helv. **40**, 604 (1957).

geht auf *Th. Curtius* und *Emil Fischer* zurück. Ein Beispiel hierzu bietet unsere zweite Synthese von XIV, die wir nach dem unten angegebenen „normalen“ Schema 2 durchgeführt haben, um das Einlagerungsprodukt mit authentischem Material zu vergleichen⁴⁾.

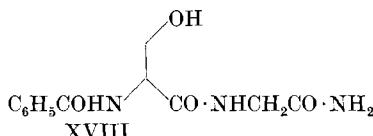
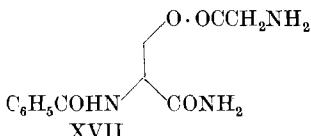
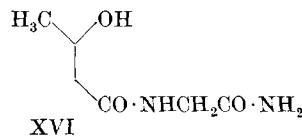
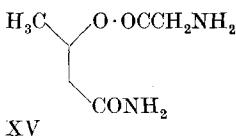
Schema 2.

Synthese von XIV nach dem Verfahren der Aminoacyl-Anlagerung.



Sal bedeutet Salicoyl, ein waagrechter Strich entspricht dem darüber angegebenen Aminosäurerest Glycyl oder Phenylalanyl, der Unterteilungsstrich —————|— stellt eine Peptidbindung dar^{7a)}.

Besonders reizvoll erschien jetzt der Versuch, die Reaktion an einem aliphatischen System durchzuführen. Zum Beispiel muss, falls eine AAE erfolgt, das O-Glycyl- β -hydroxybuttersäure-amid (XV) in β -Hydroxybutyryl-glycin-amid (XVI) verwandelt werden. Entsprechende Experimente unter den in der Salicysäure-Reihe erprobten Bedingungen (Tab. 1) verliefen jedoch ergebnislos. Auch O-Glycyl-N-benzoyl-serin-amid (XVII) gab in wässriger alkalischer Lösung kein N-Benzoyl-seryl-glycin-amid (XVIII)³⁾.



⁷⁾ R. A. Boissonnas, Helv. **34**, 874 (1951).

^{7a)} Vgl. dazu die Darstellungsweisen von R. A. Boissonnas et al., Experientia **12**, 446 (1956), und W. Rittel et al., Helv. **40**, 614 (1957).

⁸⁾ St. Goldschmidt & F. Obermeier, Liebigs Ann. Chem. **588**, 24 (1954).

Es stellte sich die Frage nach der Ursache für diesen Misserfolg. Er konnte energetisch oder kinetisch bedingt sein. Die erste Möglichkeit fiel bei näherem Zusehen kaum in Betracht: Im Verlauf einer AAE (II → III) wird in der Stoffbilanz eine Esterbindung geöffnet und eine Amidbindung geschlossen; da die Umsetzung in basischem Medium erfolgt, sind keine Ionisierungsarbeiten zu leisten. Solche Prozesse verlaufen bei reversibler Führung mit einer Abnahme der freien Energie. ΔF^0_{298} beträgt etwa -6000 cal, wenn die Reaktion intermolekular und die beteiligte Estergruppe aliphatisch ist⁹⁾. Wir wandten uns daher dem Studium des Reaktionsmechanismus zu. Es war zu hoffen, dass ein Verständnis der Einlagerung in der Salicylsäure-Reihe Anhaltspunkte dafür geben würde, unter welchen Bedingungen die Reaktion in der aliphatischen Reihe gegebenenfalls zu führen sei.

*Titherley*¹⁰⁾ hat im Zusammenhang mit Arbeiten über die O-N-Acylwanderung bei Acetyl- und Benzoyl-salicylsäure-amiden die Vermutung ausgesprochen, dass ausser dem O- und dem N-Isomeren **XIX a, b** noch eine tautomere zyklische Form der Acyl-salicylsäure-amide **XIX c** existiere. Studien von *W. Schneider*¹¹⁾ und *J. P. Zimmermann*^{2a)}, über die wir nächstens berichten werden, charakterisieren nun die O-Acyl-salicylsäure-amide **XIX a** als Pseudosäuren¹²⁾. Ihre Lösungen in wässrigem Ammoniak, verdünnter Natronlauge, 2-n. Pyridin/Wasser oder 1-n. Triäthylamin/Methylenchlorid enthalten Anionen, welche sich nach spektroskopischen Befunden vom *Titherley*'schen Tautomeren **XIX c** ableiten und die Konstitution **XIX d**

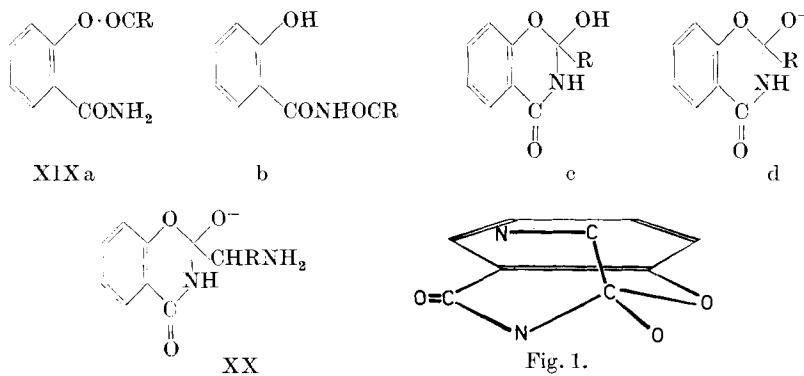


Fig. 1.

⁹⁾ M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister, Helv. **33**, 580 (1950), Fussnote 4 berechnen für ein Beispiel, das noch rund 1000 cal Ionisierungsarbeit erfordert, einen ungefähren Betrag von $\Delta F_{298}^0 = -5000$ cal.

²⁹⁸ 10) *A. W. Titherley & W. L. Hicks*, *J. chem. Soc.* **1905**, 1207; **1909**, 908; **1911**, 866; *A. W. Titherley*, *ibid.* **1910**, 200; *J. McConnan & A. W. Titherley*, *ibid.* **1906**, 1318; *A. W. Titherley & E. C. Hughes*, *ibid.* **1910**, 1368; **1911**, 1493; **1912**, 219.

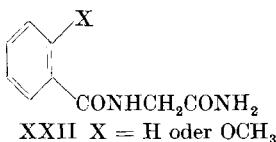
¹¹⁾ W. Schneider, unveröffentlicht.

¹²⁾ A. Hantzsch, Ber. deutsch. chem. Ges. **32**, 575, 3066 (1899); **38**, 998 (1905).

besitzen müssen. Rekombination von XIX d mit einem Proton führt je nach dem Charakter des Acylrestes zum N-Isomeren XIX b (Acylwanderung) oder zurück zum O-Isomeren XIX a; bei längerer Einwirkung wässriger Basen kann auch Hydrolyse der Phenylester-Bindung eintreten.

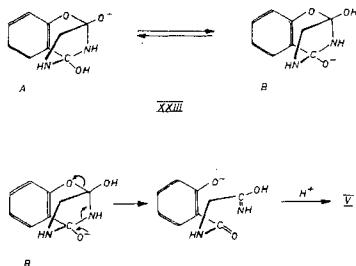
Enthält aber der Acylrest in α -Stellung eine Aminogruppe, wie es z. B. bei IV der Fall ist, so tritt ein neues Moment auf. Man erkennt dies bei räumlicher Betrachtung des entsprechenden Anions XX. Fig. 1 stellt eine vereinfachte perspektivische Seitenansicht von XX dar. Ausser dem Aminostickstoff in Fig. 1 sind alle eingezeichneten Atome in ihrer gegenseitigen räumlichen Lage fixiert. Bei freier Drehbarkeit der C–C-Bindung in der Gruppe  bewegt sich der Aminostickstoff auf einer Kreisbahn. Er gelangt so immer wieder in unmittelbare Nachbarschaft zum Carbonylkohlenstoff der Amidgruppierung.

Es sei jetzt in Erinnerung gerufen, dass die AAE zu offenkettigen Amiden nicht in jedem beliebigen basischen Milieu erfolgt (Tab. 1). Offenkettige Amide ohne Beimengung von Imidazolon entstehen interessanterweise nur in Medien, welche bei O-Acetyl-salicylsäureamid rasche und weitgehende Anionenbildung nach XIX d gewährleisten^{2a)}). Daraus folgt fast zwingend, dass Anionen, welche nach Fig. 1 gebaut sind, beim Übergang von IV in V als Zwischenprodukte auftreten. – Bis zu diesem Punkt stützt sich die Diskussion auf experimentelle Daten. Über den weiteren Verlauf der Reaktion ist vorerst allein bekannt, dass das Endprodukt V entsteht. Grundsätzlich könnte sich aus XX ein Diacylimid XXI a bilden¹³⁾ (O–N-Acylwanderung nach Titherley). Während indessen die Modellsubstanzen XXI b tatsächlich nach XXII umlagern, trifft dies bei dem N-Alkyl-derivat XXI c nicht mehr zu: Letzteres bildet in basischem Milieu im wesentlichen das Imidazolon VI b^{2a)}). Da, wie bereits ausgeführt worden ist, die N-Alkyl-Verbindungen vom Typus VII kaum mehr Imidazolone, sondern vorzugsweise offenkettige Amide geben, halten wir die intermediäre Bildung von Diacylimiden bei der AAE für wenig wahrscheinlich.

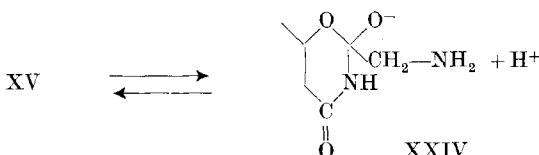


¹³⁾ Th. Wieland, H. U. Lang & D. Liebsch, Liebigs Ann. Chem. **597**, 227 (1955).

Andererseits erscheint es als durchaus möglich, dass der Aminostickstoff von XX aus seiner idealen Stellung heraus (Fig. 1) mit der Carbonylgruppe unter Ausbildung eines neuen Anions XXIII A, B koordiniert. Ladungsverschiebung im B im Sinne einer Stabilisierung würde dann direkt das offenkettige Säureamid V ergeben.



Nach der skizzierten Auffassung ist also der entscheidende Schritt für eine erfolgreiche AAE die Bildung eines zyklischen Anions (z. B. XX). Sie ist bei den Salicylsäure-Derivaten sterisch aussgewöhnlich begünstigt^{2a)}¹¹⁾. Diese Begünstigung fehlt in der aliphatischen Reihe. Ein Anion XXIV aus O-Glycyl- β -hydroxybuttersäure-amid (XV) wird deshalb eine sehr geringe Stabilität besitzen. Der Reaktionsgleichung entsprechend war seine Bildung unter diesen Umständen nur bei



extrem kleiner Konzentration von H⁺ zu erwarten. Unter diesem Gesichtspunkt ist das O-Glycyl- β -oxybuttersäure-amid (XV) während 15 Minuten der Einwirkung von Kalium-tert.-Butylat in tert.-Butanol unterworfen worden. In der Tat entsteht so praktisch quantitativ durch AAE das β -Hydroxybutyryl-glycin-amid (XVI). Arbeiten von *A. Hartmann* und *U. Beglinger*, auf die wir bei späterer Gelegenheit zurückkommen werden, haben mit Acylderivaten des Serins und des Threonins zum selben positiven Ergebnis geführt.

Namentlich diese letzten Ergebnisse eröffnen eine Fülle von neuen praktischen und theoretischen Möglichkeiten. Es ist endgültig dargelegt, dass die Aminoacyl-Anlagerung prinzipiell nicht die einzige Möglichkeit zum Aufbau von Peptiden und Proteinen darstellt. Die AAE repräsentiert einen zweiten, gleichberechtigten und mindestens ebenso interessanten¹⁾ Weg. Dies gilt insbesondere für den Einbau von Aminosäuren, welche in einer Peptidkette unmittelbar oder mittelbar auf der Carbonylseite eines Serin-, Threonin- oder Cystein-Restes¹⁴⁾ stehen.

¹⁴⁾ *J. P. Zimmermann* hat die AAE am S-(Phenylalanyl)-thiosalicoyl-glycinanilid erfolgreich durchgeführt^{2a)}.

Es ist in dieser Beziehung vielleicht kein Zufall, dass alle bisher analysierten Proteine mindestens einen Aminosäurerest mit β -ständiger Hydroxyl- oder Mercaptogruppe enthalten¹⁵⁾. Die β -ständige Hydroxylgruppe ist sogar ein relativ häufiges konstitutives Merkmal der Proteine¹⁶⁾.

Man mag einwenden, die Bedingung eines extrem basischen Mediums, wie sie der Reagenzglasversuch erfordert, sei in einem Organismus nicht erfüllbar. Jene Bedingung fällt aber dahin, sobald die lebende Zelle das zyklische Anion auf irgend eine andere Weise stabilisiert. Ein instruktives Beispiel für den Effekt einer Stabilisierung auf sterischem Wege bietet die AAE in der Salicylsäure-Reihe. Der aromatische Ring fixiert dort die primär reagierenden Zentren (Carbo-phenoxy und Carbonamid) in geeigneter gegenseitiger Lage und erleichtert dadurch die Anionenbildung in solchem Masse, dass die AAE schon zwischen pH 7 und 8 erfolgt¹⁷⁾.

Experimenteller Teil.

Die Smp. sind auf einem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert worden; Fehlergrenze $\pm 2\%$. Wo nichts anderes bemerkt wird, sind die Analysensubstanzen 14 Std. im Hochvakuum über P_2O_5 bei Zimmertemperatur getrocknet worden. Alle Substanzen mit asymmetrischen C-Atomen sind Racemate. Alle O-Acyl-salicylsäure-Verbindungen sind anfänglich $FeCl_3$ -negativ, die Perchlorate der O-Aminoacyl-salicylsäure-Derivate zeigen eine verzögerte $FeCl_3$ -Reaktion, und die Umlagerungsprodukte mit freiem phenolischem Hydroxyl sind $FeCl_3$ -positiv (10-proz. $FeCl_3$ in Wasser, Substanzen in Wasser, Methanol oder Äthanol).

1. AAE bei O-Phenylalanyl-salicylsäure-amid (Va) und O-Glycyl-salicylsäure-amid (Vb). (Bearbeitet von J. P. Zimmermann.)

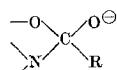
Ausgangsmaterialien und Vergleichssubstanzen.

Perchlorat von O-Phenylalanyl-salicylsäure-amid (Va). Man löst 1,04 g (2,5 mMol) O-(Cbzo-DL-Phenylalanyl)-salicylsäure-amid⁶⁾ in 100 ml abs. Eisessig, gibt 2,75 ml 1-n. Perchlorsäure in abs. Eisessig zu, versetzt die Lösung mit 0,5 g 10-proz. Palladiumkohle¹⁸⁾ und behandelt mit Wasserstoff, bis die CO_2 -Entwicklung aufhört.

¹⁵⁾ Vgl. die Zusammenstellung von Aminosäureanalysen in *H. M. Rauen*, Biochemisches Taschenbuch, Springer 1956, S. 214—231.

¹⁶⁾ *G. R. Tristram* in *Neurath & Bailey*, The Proteins, Vol. I, 229, Academic Press, New York 1953.

¹⁷⁾ Wir werden später an einer Variante der AAE zeigen, dass die Umlagerung sogar in saurem Milieu eintreten kann³⁾. In der Tat ist die eigentliche Voraussetzung für die AAE die Ausbildung eines primären Zwischenproduktes, das den heterozyklischen Ring mit der Orthocarbonsäure-Gruppierung besitzt (XIX c; XXIV und dessen konjugate Säure). Die Anionenbildung erscheint unter diesem Gesichtspunkt lediglich als Mittel zum Zweck: die negative Ladung stabilisiert den heterozyklischen Ring, weil



gegenüber $R'-CONH^{\ominus}$ bevorzugt ist.

¹⁸⁾ *Organic Synthesis* **26**, 78 (1946).

Nach dem Abfiltrieren des Katalysators dampft man die Lösung im Vakuum bei einer Badtemperatur von 40° ein und kristallisiert den Rückstand aus wenig Tetrahydro-furan/Benzol um. Ausbeute 0,85 g (95%). Smp. 163—165° unter Zersetzung.

$C_{16}H_{17}O_7N_2Cl$	Ber. C 49,94	H 4,45	N 7,28%
(384,77)	Gef. , , 50,57	, , 4,54	, , 6,58%

Salicoyl-phenylalanin-amid. a) Aus Salicoyl-phenylalanin. Salicoyl-phenylalanin: Man löst 1,6 g (6,57 mMol) Salicylsäure-hydrazid¹⁹⁾ in 6,6 ml 1-n. Salpetersäure und 10 ml Wasser, kühlt auf 0° und tropft nicht zu schnell 6,6 ml n. Natriumnitrit unter starkem Rühren zu. Das Azid²⁰⁾ fällt kristallin aus. Es wird nach 1/2 Std. abfiltriert, mit viel Eiswasser gewaschen und feucht in eine auf 0° gekühlte Lösung von 3,2 g DL-Phenylalanin in 13,2 ml Natronlauge eingetragen. Man gibt noch 14 ml 1-n. Natronlauge zu und entfernt die Kühlung. Das Azid geht langsam in Lösung. Das alkalische Reaktionsgemisch wird mit Äther extrahiert und hierauf angesäuert, wobei Salicoyl-phenylalanin ausfällt. Man nimmt in Essigester auf, trocknet über Natriumsulfat, dampft ein und erhält 1,7 g (90%) Rohprodukt. Zur Reinigung und Analyse wird aus Alkohol/Wasser umkristallisiert. Nadeln, Smp. 152—153°.

$C_{16}H_{16}O_4N$	Ber. C 67,35	H 5,29	N 4,91%
(285,29)	Gef. , , 67,20	, , 5,25	, , 4,93%

Salicoyl-phenylalanin-methylester: Man löst 5 g (17,5 mMol) Säure in 20 ml abs. Methanol, sättigt bei 0° mit HCl-Gas, lässt über Nacht bei 20° stehen, verdampft im Vakuum und verteilt den ölichen Rückstand zwischen Essigester und Kaliumhydrogencarbonat. Ausbeute 4,4 g (85%). Lange Balken aus Alkohol/Wasser, Smp. 79—80°.

$C_{12}H_{17}O_4N$	Ber. C 68,21	H 5,73	N 4,68%
(299,31)	Gef. , , 68,45	, , 5,48	, , 4,81%

Salicoyl-phenylalanin-amid: Man löst 100 mg Methylester in 10 ml eiskalt-gesättigtem ammoniakalischen Methanol und erwärmt im Rohr 2 Std. auf 100°. Prismen aus Methanol/Wasser, Smp. 163—163,5°.

$C_{16}H_{16}O_3N_2$	Ber. C 67,59	H 5,67	N 9,86%
(284,30)	Gef. , , 67,72	, , 5,50	, , 9,71%

b) Durch Hydrierung von N-Salicoyl- α -aminozimtsäure-amid. Man löst 0,1 g N-Salicoyl- α -aminozimtsäure-amid (Darstellung siehe unten) in 20 ml Alkohol, versetzt mit 0,1 g 10-proz. Palladiumkohle¹⁸⁾ und hydriert bei Normaldruck. Es wird die theoretische Menge Wasserstoff aufgenommen. Prismen aus Methanol/Wasser, Smp. 163 bis 164°; Misch-Smp. mit dem Präparat aus dem Methylester ohne Depression.

Gef. C 67,51	H 5,42	N 9,73%
--------------	--------	---------

Perchlorat von O-Glycyl-salicylsäure-amid (IVb). Man löst 314 mg (1 mMol) O-(Cbzo-glycyl)-salicylsäure-amid⁶⁾ in 5 ml Eisessig, setzt 2 ml 1-n. $HClO_4$ in Eisessig sowie 1,1 ml 1-n. HBr in Eisessig zu, lässt 2 Std. bei 20° stehen und filtriert das auskristallisierte Perchlorat ab. 125 mg, Smp. 204—206°. Die bromid-freie Substanz ist ohne weitere Reinigung analysiert worden.

$C_9H_{11}O_7N_2Cl$	Ber. C 36,68	H 3,76	N 9,51	O 38,02%
(294,62)	Gef. , , 37,87	, , 4,08	, , 8,73	, , 38,60%

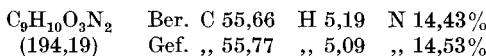
Salicoyl-glycin-amid (Vb). Salicoyl-glycin-methylester: Man löst 2,9 g Salicoyl-glycin²¹⁾ in 100 ml abs. Methanol, sättigt bei 0° mit HCl-Gas, lässt über Nacht bei 20° stehen, verdampft im Vakuum zur Trockne und verteilt den Rückstand zwischen Äther und Kaliumhydrogencarbonat. Nadeln aus sehr wenig Methanol/Wasser oder besser aus Benzol, Smp. 77—78°.

$C_{10}H_{11}O_4N$	Ber. C 57,41	H 5,30	N 6,70%
(209,20)	Gef. , , 57,51	, , 5,18	, , 6,94%

¹⁹⁾²⁰⁾ A. Struve, R. Radenhausen, J. prakt. Chem. **52**, 239, 240 (1895).

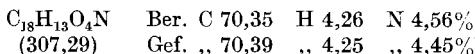
²¹⁾ S. Bondi, Z. physiol. Chem. **52**, 172 (1907).

Salicoyl-glycin-amid: Man löst 0,5 g Methylester in 10 ml eiskalt gesättigtem ammoniakalischen Methanol und erwärmt 3 Std. im Rohr auf 100°. Würfel aus Wasser, Smp. 184—185°, Ausbeute fast quantitativ.

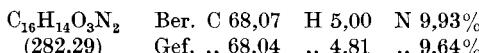


200 mg Amid werden bei $\frac{1}{2}$ ständigem Stehen in 20 ml NaOH weitgehend in NH₃ und Salicoyl-glycin gespalten (Papierchromatogramm, vgl. Abschnitt 2). Durch Verteilung zwischen Hydrogencarbonat und Essigester erhält man 190 mg Salicoyl-glycin (Nadeln aus Wasser, Smp. 160—162°; der Misch-Smp. mit authentischem Salicoyl-glycin vom Smp. 170—171° liegt bei 164—167°), das noch mit etwas Amid verunreinigt ist.

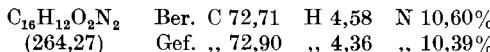
2 - (2'-Hydroxyphenyl) - 4 - benzyl - imidazolon - (5) (VIa). 2 - (2'-Acetoxyphenyl)-4-benzal-oxazolon-(5): Man erwärmt eine Mischung von 1 g (5 mMol) Salicoyl-glycin²¹), 0,53 g (5 mMol) Benzaldehyd, 0,41 g (5 mMol) frisch geschmolzenes Natrium-acetat und 1,5 g (15 mMol) Acetanhydrid 30 Min. auf 100°. Nach 15 Min. resultiert eine klare, orange gefärbte Schmelze. Man lässt erkalten, verreibt die kristalline gelbe Masse mit Alkohol, filtriert und wäscht das Ungelöste mit Alkohol und Wasser nach. Ausbeute 1 g (66%). Gelbe Prismen aus Alkohol, Smp. 144—144,5°.



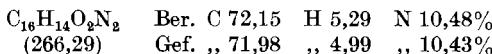
N-Salicoyl- α -aminozimmtsäure-amid: Man erhitzt 1 g (3,2 mMol) 2-(2'-Acetoxyphenyl)-4-benzal-oxazolon-(5) in 60 ml Alkohol zum Sieden und leitet einen schwachen Ammoniakstrom durch die Lösung, die sich langsam gold-gelb färbt. Nach 2 Std. ist die Aufspaltung beendet. Zur Aufarbeitung dampft man die Lösung zur Trockne ein, nimmt den gelben ölichen Rückstand in wenig Alkohol auf und gibt viel Eiswasser zu, so dass die Substanz milchig ausfällt. Nach Stehen über Nacht bei 0° kristallisieren 0,73 g (91%) Rohsubstanz in fast farblosen Balken aus. Zur Reinigung und Analyse kristallisiert man aus Alkohol/Wasser um. Balken vom Smp. 177—178°.



2-(2'-Hydroxyphenyl)-4-benzal-imidazolon-(5) (VIa): In Anlehnung an *E. Erlenmeyer jun.*²²) werden 0,4 g N-Salicoyl- α -aminozimmtsäure-amid in 10 ml 2-n. Natronlauge 1 Std. bei 100° gehalten (Wasserbad). Die Lösung färbt sich langsam orange-rot; sie riecht nach Ammoniak und Benzaldehyd. Man stellt mit 2-n. Salzsäure auf pH 6 und verreibt das harzig ausgefallene Reaktionsprodukt, bis es fest wird. Das so erhaltene Pulver (0,15 g, 40%) wird aus viel Alkohol/wenig Wasser umkristallisiert. Orange-gelbe Balken, Smp. 292—293°. Zur Analyse ist 14 Std. bei 0,01 Torr und 100° über P₂O₅ getrocknet worden.



2-(2'-Hydroxyphenyl)-4-benzyl-imidazolon-(5): Man schwemmt 0,5 g (1,9 mMol) Benzalverbindung in 50 ml Aceton auf, setzt 0,5 g 10-proz. Palladiumkohle¹⁸⁾ zu und hydriert bei Normaldruck. Die Benzalverbindung löst sich langsam auf. Bei Beendigung der Wasserstoffaufnahme (rund 4 mMol, Theorie 3,8 mMol für 1 Doppelbindung) liegt eine fast farblose Lösung vor. Man filtriert, dampft ein und kristallisiert den Rückstand aus Alkohol/Wasser um. Hexagonale Blättchen mit charakteristischem Doppelschmelzpunkt bei 191—193° und 270—285° (Zers.). Zur Analyse ist 14 Std. bei 0,01 Torr und 50° über P₂O₅ getrocknet worden.



²²⁾ *E. Erlenmeyer jun.*, Ber. deutsch. Chem. Ges. **33**, 2036 (1900).

Umlagerungen.

1. O-Phenylalanyl-salicylsäure-amid. a) In wässrigem Milieu (Tab. 1): 0,5 g (1,3 mMol) O-L-Phenylalanyl-salicylsäure-amid-perchlorat werden mit 50 ml Lösungsmittel (Tab. 1) übergossen. Es erfolgt sofortige Auflösung. Man lässt $\frac{1}{2}$ bis 1 Std. bei Zimmertemperatur stehen, wobei sich die Lösung mehr oder weniger trübt, säuert mit 2-n. Salzsäure an (Kongo), extrahiert erschöpfend mit Essigester, trocknet über Natriumsulfat und dampft die Essigesterlösung im Vakuum ein. Zurück bleibt gegebenenfalls Salicoyl-phenylalanin-amid, das man nach einmaligem Umkristallisieren aus heissem Methanol/Wasser durch Vergleich mit authentischem Material identifiziert (Smp. und Misch-Smp.).

Die salzsaure Lösung wird mit 2-n. Sodalösung auf ca. pH 7 eingestellt und erschöpfend mit Essigester extrahiert. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat dampft man den Essigester im Vakuum bei einer Badtemperatur von max. 50° ab. Gegebenenfalls zurückbleibendes 2-(2'-Hydroxyphenyl)-4-benzyl-imidazolon-(5) wird aus Alkohol/Wasser umkristallisiert oder im Hochvakuum bei 140—150° sublimiert und durch Smp. und Misch-Smp. mit authentischem Material identifiziert.

b) In nicht-wässrigem Milieu (Tab. 1): Man verfährt anfänglich wie bei den Umlagerungsversuchen in wässrigem Milieu, verdampft dann aber vor der Aufarbeitung im Vakuum zur Trockne. Der Rückstand wird in 2-n. Salzsäure und Essigester aufgenommen. Die weitere Verarbeitung erfolgt nach den obigen Angaben.

2. O-Glycyl-salicylsäure-amid. Man verfährt wie beim Phenylalanin-Derivat. Aus 150 mg Perchlorat ist die Ausbeute 65% in 10-proz. Hydrogencarbonat, 90% in 2-n. Soda und 99% in 2-n. Natronlauge. Nach Kristallisation aus Wasser schmelzen die Produkte bei 183—185° bzw. 184—185° (Würfel, keine Depression mit Salicoyl-glycin-amid) und bei 161—164° (Nadeln, keine Depression mit Salicoyl-glycin). Die Abspaltung der Amid-Gruppe durch 2-n. Natronlauge ist oben beschrieben worden. Die Reaktionsprodukte aus der Hydrogencarbonat- und Carbonat-Lösung sind rötlich gefärbt. Dies beruht auf Beimengung von Spuren eines rotgefärbten Umwandlungsproduktes von 2-(2'-Hydroxyphenyl)-imidazolon-(5).

2. Aufbau von Salicoyl-glycyl-phenylalanyl-glycin-methylester (XIV). (Bearbeitet von P. Quitt⁴.)

A. Aufbau von XIV aus VIII durch AAE.

Salicoyl-glycin-methylester (VIII): Im vorhergehenden Abschnitt beschrieben.

O-(Cbzo-DL-Phenylalanyl)-salicoyl-glycin-methylester (IX): In ⁶) beschrieben.

Perchlorat von O-Phenylalanyl-salicoyl-glycin-methylester (X). Man löst 1,5 g (3,1 mMol) IX in 50 ml Eisessig, fügt 3,1 ml 1-n. Perchlorsäure in Eisessig und 1 g 10-proz. Palladiumkohle¹⁸) zu und behandelt bei Zimmertemperatur mit Wasserstoff. Nach 30 Min. ist im entweichenden Gas mit Bariumhydroxydösung kein CO₂ mehr nachzuweisen. Die Palladiumkohle wird abfiltriert, mit Eisessig nachgewaschen, und das Filtrat wird im Vakuum bei 40° Badtemperatur eingedampft. Der glässige, farblose Rückstand wird in Tetrahydro-furan aufgenommen und mit der ungefähr dreifachen Menge Benzol versetzt, worauf das Perchlorat nach Anreiben kristallisiert. 1,15 g (80%), Smp. 161—164°. Zur Analyse wird aus Tetrahydro-furan/Benzol umkristallisiert, Smp. 162 bis 165° (Zers.). Weiteres Umkristallisieren führt zum Sinken des Smp.

C ₁₉ H ₂₁ O ₉ N ₂ Cl	Ber. C 49,95 (456,83)	H 4,63 Gef. „ 50,80; 49,22 „	O 31,52% 4,89; 4,40 „
			31,12% „

Salicoyl-phenylalanyl-glycin-methylester (XI). a) In Methanol. 1. Aus isoliertem Perchlorat X: 150 mg (0,33 mMol) Perchlorat X werden in 5 ml Tetrahydro-furan gelöst und zu 15 ml auf —5° gekühlter Triäthylaminlösung (2-n. in abs. Methanol) unter Rühren zugetropft. Anschliessend röhrt man noch 1 Std. bei Zimmertemperatur, dampft dann im Vakuum bei 35° Badtemperatur ein, verteilt den Rückstand zwischen 2-n. Salzsäure und Essigester und wäscht diesen mit 2-n. Salzsäure und Wasser.

Nach Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen im Vakuum erhält man 112 mg kristallinen farblosen Rückstand (92%), der zur Reinigung und Analyse aus Methanol/Wasser umkristallisiert wird. Smp. 165—166°. Zur Analyse wird 2 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{19}H_{20}O_5N_2$	Ber. C 64,03	H 5,66	N 7,86%
(356,37)	Gef. , , 64,04	, , 5,64	, , 7,79%

2. Ohne Isolierung des Perchlorats X: Man löst 490 mg (1 mMol) O-(Cbzo-Phenylalanyl)-salicoyl-glycin-methylester (IX) in 20 ml Eisessig, fügt 1 ml 1-n. Perchlorsäure in Eisessig und 250 mg 10-proz. Palladiumkohle²³⁾ zu und hydrogenolysiert wie oben. Nach beendeter Reaktion wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bei 35—40° Badtemperatur eingedampft, wobei der Rückstand spontan kristallisiert. Dieser wird in 20 ml Tetrahydro-furan gelöst, und die Lösung wird zu 40 ml auf —5° gekühltem 2-n. Triäthylamin in absolutem Methanol unter Röhren zugetropft. Nach 1 Std. arbeitet man wie im vorhergehenden Versuch auf. Man erhält so 300 mg (85%) eines kristallinen Rückstandes, der aus Methanol/Wasser umkristallisiert wird. Smp. 165—166° ohne Depression mit Analysen- und Vergleichspräparat.

b) *In Chloroform*. 1. Aus isoliertem Perchlorat X: Man suspendiert 1,06 g (2,3 mMol) Perchlorat X in 50 ml abs. Chloroform²³⁾ und lässt unter Röhren bei 0° ziemlich rasch 1 ml (7 mMol) Triäthylamin in 10 ml abs. Chloroform zulaufen, wobei Lösung eintritt. Danach wird noch 1 Std. lang ohne Kühlung gerührt. Man wäscht die Chloroformlösung einmal mit 2-n. Salzsäure und zweimal mit Wasser, trocknet mit Natriumsulfat und dampft im Vakuum ein. Es verbleiben 770 mg (94%) kristalliner Rückstand, Smp. 162—165°; umkristallisiert aus Methanol/Wasser, Smp. 165—166°, ohne Depression mit Analysen- und Vergleichspräparat.

2. Ohne Isolierung des Perchlorats X: 490 mg (1 mMol) O-(Cbzo-Phenylalanyl)-salicoyl-glycin-methylester (IX) werden in 20 ml Eisessig gelöst und wie beschrieben hydrogenolysiert. Nach beendeter Reaktion filtriert man von der Palladiumkohle ab, dampft im Vakuum bei 40° Badtemperatur ein und entfernt die letzten Reste Eisessig im Vakuumexsikkator über KOH. Danach setzt man zu dem glasigen Rückstand absolutes Chloroform²³⁾ (ohne dass Lösung eintritt) und fügt bei 0° 0,42 ml (3 mMol) Triäthylamin in 5 ml absolutem Chloroform zu, wobei sofort alles in Lösung geht. Man röhrt noch 30 Min., wobei das Gemisch Zimmertemperatur annimmt. Die Chloroformlösung wird anschliessend einmal mit 2-n. Salzsäure und zweimal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhält 307 mg (87%) kristallinen Rückstand. Smp. 158—165°; umkristallisiert aus Methanol/Wasser, Smp. 165—166°, ohne Depression mit Analysen- und Vergleichspräparat.

O-(Cbzo-Glycyl)-salicoyl-phenylalanyl-glycin-methylester (XII): In e) beschrieben.

Perchlorat von O-Glycyl-salicoyl-phenylalanyl-glycin-methylester (XIII). 725 mg (1,33 mMol) XII werden in einem Gemisch von 25 ml Eisessig und 1,33 ml 1-n. Perchlorsäure in Eisessig gelöst und nach Zugabe von 300 mg 10-proz. Palladiumkohle²³⁾ wie oben hydrogenolysiert. Nach beendeter Reaktion wird von der Kohle abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bei 40° Badtemperatur eingedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Eisessig/Äther in feinen Nadelchen, Smp. 184° (Zers.). Beim Umkristallisieren aus Eisessig/Äther zur Reinigung und Analyse sinkt der Smp. auf 180° (Zers.), bleibt aber stets scharf. Das Analysenpräparat wird 2 Std. im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

$C_{21}H_{24}O_{10}N_3Cl$	Ber. C 49,08	H 4,71	O 31,14%
(513,88)	Gef. , , 49,34	, , 4,79	, , 31,12%

²³⁾ 1 Std. über P_2O_5 unter Rückfluss erhitzt und über P_2O_5 destilliert. Im Dunkeln aufbewahren und vor Gebrauch über KOH stehenlassen, um etwa gebildete Salzsäure zu entfernen.

Salicoyl-glycyl-phenylalanyl-glycin-methylester (XIV). a) In Methanol.

1. Mit 1,1 Mol Triäthylamin: Man trägt 100 mg (0,2 mMol) Perchlorat XIII in eine Lösung von 0,03 ml (0,214 mMol) Triäthylamin in 10 ml abs. Methanol ein und lässt die Lösung bei Zimmertemperatur 20 Std. stehen. Vor dem Entfernen des Methanols im Vakuum gibt man noch 0,5 ml 2-n. Schwefelsäure zu, um die eventuell unbeendete Reaktion abzubrechen. Den Rückstand verteilt man zwischen Essigester und 2-n. Schwefelsäure²⁴⁾, wäscht den Essigester danach mit 2-n. Schwefelsäure, 10-proz. Kaliumhydrogencarbonatlösung und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und dampft im Vakuum ein. Es verbleiben 74 mg öligen Rückstandes, von dem 13 mg (0,031 mMol) in 0,034 ml 2-n. NaOH und 2 ml Aceton verseift werden. Die so entstehenden Säuren lassen sich papierchromatographisch nachweisen (vgl. unten). Es zeigt sich, dass neben dem gesuchten Endprodukt XIV stets ca. 20% des Rückstandes als Salicoyl-phenylalanyl-glycin-methylester (XI) vorhanden ist. Dieser entsteht offenbar durch direkte Alkoholyse des Phenylesters mit Methanol. Ein nachträglicher Zerfall des O-Glycyl-salicoyl-phenylalanyl-glycin-methylesters bei der alkalischen Verseifung kann nicht der Grund sein, da sich kein Glycin in der Verseifungslösung nachweisen lässt.

2. Mit 0,95 Mol Triäthylamin: Man löst 123 mg (0,24 Mol) Perchlorat XIII in 12 ml abs. Methanol, versetzt sofort mit 0,032 ml (0,23 mMol) Triäthylamin und lässt 20 Std. stehen. Aufarbeitung wie oben. Man erhält 94 mg farbloses Öl, aus dem mit Methanol/Wasser eine kristalline Substanz vom Smp. 156—158° erhalten wird, die mit Vergleichs- und Analysenpräparat keine Depression gibt. Hydrolyse des Rohprodukts in NaOH/Aceton und papierchromatographische Analyse zeigt aber eine Beimengung von ca. 20% Salicoyl-phenylalanyl-glycin an.

b) *In Chloroform.* 1. Mit isoliertem Perchlorat XIII: Man suspendiert 400 mg (0,79 mMol) Perchlorat XIII in 10 ml abs. Chloroform²³⁾ und lässt bei 0° 0,33 ml (2,36 mMol) Triäthylamin in 5 ml abs. Chloroform zulaufen. Dann wird 30 Min. gerührt, wobei sich die Reaktionsmischung auf Zimmertemperatur erwärmt. Die Lösung wird einmal mit 2-n. Salzsäure und zweimal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Zurück bleiben 300 mg (92%) farbloser Schaum. Zur Reinigung und Analyse kann aus Chloroform/Äther kristallisiert werden. Smp. 157—158,5°. Die papierchromatographische Analyse der Verseifungsprodukte zeigt nur das gewünschte Tripeptid XIVa an. Zur Analyse wird im Hochvakuum 2 Std. bei 90° getrocknet.

$C_{21}H_{23}O_6N_3$	Ber. C 61,01	H 5,61	O 23,22%
(413,42)	Gef. , ,	61,26 , ,	5,90 , , 23,45%

2. Ohne Isolierung des Perchlorats XIII: Man suspendiert den Verdampfrückstand, der aus einem Ansatz von 725 mg (1,33 mMol) O-(Cbzo-Glycyl)-salicoyl-phenylalanyl-glycin-methylester (XII) durch Hydrogenolyse erhalten wird, nach Entfernung der letzten Spuren Eisessig (Vakuumexsikkator, KOH) in 20 ml abs. Chloroform²³⁾ und versetzt bei 0° mit einer Lösung von 0,56 ml (4 mMol) Triäthylamin in 10 ml abs. Chloroform. Nach Entfernung der Kühlung und Aufwärmung auf Zimmertemperatur wird noch ½ Std. gerührt. Die Lösung wird, nachdem sie einmal mit 2-n. Salzsäure und zweimal mit Wasser gewaschen worden ist, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es verbleiben 490 mg (90%) farbloser Schaum. Kristalle aus Chloroform/Äther, Smp. 157—158,5°, ohne Depression mit Vergleichs- und Analysenpräparat. Nach alkalischer Hydrolyse zeigt ein Papierchromatogramm nur das erwartete Salicoyl-tripeptid XIVa an.

B. Synthese der Vergleichssubstanzen XI, XIa, XIV und XIVa.

Salicoyl-phenylalanyl-glycin-methylester (XI). — N-Salicoyl- α -amino-cinnamoyl-glycin-methylester: Die Mischung von 10 g (32,5 mMol) 2-(2'-Acetoxyphenyl)-4-benzal-oxazolon-(5) (siehe oben) und 11,3 g (90 mMol) Glycin-methylester-hydro-

²⁴⁾ Ev. entstandenes 1-Carbomethoxymethyl-2-(2'-hydroxyphenyl)-4-benzyl-imidazolon-(5) lässt sich eher mit Schwefelsäure als mit Salzsäure extrahieren.

chlorid in 90 ml Methanol wird am Rückfluss innert 10—15 Min. unter Röhren mit 13,4 ml (95 mMol) Triäthylamin versetzt. Der Glycinester wird dabei freigesetzt und geht in Lösung. Nach 45 Min. wird abgekühlt und das Methanol im Vakuum abgedampft, wobei Triäthylamin-hydrochlorid ausfällt. Der Rückstand wird zwischen 2-n. Salzsäure und Essigester verteilt, dann wird der Essigester mit 2-n. Salzsäure und erschöpfend mit 10-proz. Kaliumhydrogencarbonatlösung extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum abgedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Methanol/Wasser. 10 g (87%), Smp. 168—169°, farblose Prismen. Zur Analyse wird im Hochvakuum 2 1/2 Std. bei 85° getrocknet.

$C_{19}H_{18}O_5N_2$ Ber. C 64,40 H 5,12 N 7,91 O 22,57%
(354,35) Gef. „, 64,11 „, 5,12 „, 7,67 „, 22,38%

Hydrierung zu XI: Man löst 1 g (2,82 mMol) Salicoyl- α -aminocinnamoyl-glycin-methylester in 20 ml Eisessig, fügt 200 mg 10-proz. Palladiumkohle¹⁸⁾ zu und hydriert bei Atmosphärendruck. Es wird 1 Mol. Wasserstoff aufgenommen. Nach Abfiltrieren wird der Eisessig im Vakuum entfernt. Der Rückstand, 1 g, Smp. 164—166°, wird zur Reinigung und Analyse aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Smp. 165—166°, farblose prismatische Stäbchen. Das Analysenpräparat wird im Hochvakuum 3 1/2 Std. bei 110° getrocknet.

$C_{19}H_{20}O_5N_2$ Ber. C 64,03 H 5,66 O 22,45%
(356,37) Gef. „, 64,06 „, 5,75 „, 22,59%

Salicoyl-phenylalanyl-glycin (XIa). Man löst 100 mg (0,28 mMol) Methylester XI in 1,2 ml 0,5-n. NaOH (0,6 mMol), lässt 15 Std. bei Zimmertemperatur stehen, säuert mit Salzsäure auf Kongo an und extrahiert mit Essigester, wäscht diesen neutral, trocknet über Natriumsulfat und dampft im Vakuum ein. Man erhält 85 mg (90%) Schaum. Rhomben aus Alkohol/Wasser, Smp. 212—214°. Trocknung des Analysenpräparates erfolgt wie oben.

$C_{18}H_{18}O_5N_2$ Ber. C 63,15 H 5,30 O 23,37%
(342,34) Gef. „, 63,17 „, 5,20 „, 23,46%

Salicoyl-glycyl-phenylalanyl-glycin-methylester (XIV). — 1. Cbzo-Phenylalanyl-glycin-methylester. a) Nach Goldschmidt³⁾: Man löst 2,5 g (20 mMol) Glycin-methylester-hydrochlorid unter Erwärmung in 20 ml Pyridin, kühl auf 0° und lässt bei dieser Temperatur unter Röhren langsam 1,37 g (0,87 ml entspr. 10 mMol) Phosphortrichlorid²⁵⁾ in 10 ml Pyridin zutropfen. Hierbei fällt Pyridin-hydrochlorid aus. Man lässt ohne Kühlung eine halbe Stunde stehen, gibt 6 g (20 mMol) Cbzo-Phenylalanin zu und erhitzt anschliessend 3 Std. auf dem Dampfbad. Dabei fällt ein brauner Schleier von metaphosphoriger Säure aus. Das Pyridin wird im Vakuum entfernt, der Rückstand zwischen 2-n. Salzsäure und Essigester verteilt, dieser mit 2-n. Salzsäure, 10-proz. Kaliumhydrogencarbonatlösung und Wasser vorsichtig gewaschen²⁶⁾, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhält 5,6 g (76%) fast farblosen Rückstand, der zur Reinigung und Analyse aus Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert wird. Farblose Stäbe, Doppel-Smp. 106°/117—118° unter Umwandlung in feine Nadelchen. Zur Analyse wird im Hochvakuum erst 2 Std. bei 80° und dann 14 Std. bei Zimmertemperatur getrocknet.

$C_{20}H_{22}O_5N_2$ Ber. C 64,85 H 5,99 N 7,56%
(370,39) Gef. „, 64,62 „, 5,91 „, 7,66%

b) Nach Boissonnas⁷⁾: 3 g (10 mMol) Cbzo-Phenylalanin werden in 25 ml abs. Dioxan und 1,5 ml (11 mMol) Triäthylamin gelöst. Man fügt bei 0° 1,05 ml (11 mMol) Chlorameisensäure-äthylester zu und lässt 20 Min. bei dieser Temperatur stehen. Nun wird eine auf 10° vorgekühlte Lösung von 1,38 g Glycin-methylester-hydrochlorid in 25 ml Dioxan und 4,8 ml (20 mMol) Tri-n-butylamin zugesetzt und die Mischung ohne Kühlung 2 Std. sich selbst überlassen. Man entfernt das Dioxan im Vakuum und arbeitet wie oben auf.

²⁵⁾ Frisch über Diäthylanilin destilliert.

²⁶⁾ Emulsionbildung!

Der kristalline Rückstand (3 g, 80%) wird aus Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert. Smp. 106°/118°, Misch-Smp. mit dem oben beschriebenen Analysenpräparat ohne Depression.

2. Perchlorat von Phenylalanyl-glycin-methylester. 7 g (19 mMol) Cbz-Phenylalanyl-glycin-methylester werden in 50 ml Eisessig und 19 ml 1-n. Perchlorsäure in Eisessig gelöst. Die Lösung wird mit 3 g 10-proz. Palladiumkohle²⁵⁾ versetzt und hydrolysiert. Nach beendeter Reaktion (2 Std.) wird von der Palladiumkohle abfiltriert, im Vakuum eingedampft, und der Rückstand aus Methanol/Äther umkristallisiert (Ausbeute nahezu quantitativ). Hexagonale, farblose Tafeln, Smp. 185—186°. Das Analysenpräparat wird im Hochvakuum 2 Std. bei 80° getrocknet.

$C_{12}H_{17}O_7N_2Cl$	Ber. C 42,80	H 5,09	N 8,32%
(336,73)	Gef. , , 42,80	, , 5,16	, , 8,49%

3. Salicoyl-tripeptidester XIV. Die Lösung von 1,68 g (5 mMol) Phenylalanyl-glycin-methylester-perchlorat in 10 ml Pyridin wird bei 0° langsam mit 0,22 ml (2,5 mMol) Phosphortrichlorid²⁵⁾ in 5 ml Pyridin versetzt. Die Lösung bleibt dabei klar. Man entfernt die Kühlung, lässt ½ Std. stehen, gibt 1 g (5 mMol) Salicoylglycin²¹⁾ zu und erwärmt 3 Std. auf dem Dampfbad, wobei die Lösung dunkelbraun wird. Das Pyridin wird im Vakuum entfernt und der Rückstand zwischen 2-n. Salzsäure und Essigester verteilt. Man extrahiert diesen vorsichtig²⁶⁾ mit 2-n. Salzsäure, 10-proz. Kaliumhydrogen-carbonatlösung, wäscht mit Wasser und trocknet mit Natriumsulfat. Nach Eindampfen im Vakuum erhält man 1,54 g (74%) kristallinen Rückstand. Platten aus Methanol/Wasser (4:1) oder Aceton/Äther. Smp. 157,5—158,5°. Zur Analyse wird bei 90° 2 Std. im Hochvakuum getrocknet.

$C_{21}H_{23}O_6N_3$	Ber. C 61,01	H 5,61	N 10,17%
(413,42)	Gef. , , 61,17	, , 5,77	, , 10,32%

Salicoyl-glycyl-phenylalanyl-glycin (XIVa). Die Lösung von 413 mg (1 mMol) Salicoyl-glycyl-phenylalanyl-glycin-methylester (XIV) in 6 ml 0,5-n. NaOH wird 16 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Ansäubern auf Kongo wird mit Essigester extrahiert, dieser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der farblose kristalline Rückstand, 330 mg (83%), wird zur Reinigung und Analyse aus Alkohol/Wasser umkristallisiert. Kurze Stäbchen vom Smp. 203—205°. Das Analysenpräparat wird bei 85° 3 Std. im Hochvakuum getrocknet.

$C_{20}H_{21}O_6N_3$	Ber. C 60,14	H 5,30	O 24,04%
(399,39)	Gef. , , 59,88	, , 5,37	, , 24,22%

C. Papierchromatographische Kontrollen.

Zur raschen Untersuchung der Reaktionsprodukte haben wir die von *L. Rutter*²⁷⁾ beschriebene Rundfilter-Papierchromatographie in leicht abgeänderter Ausführung benutzt. Als Gefäß dient eine *Petri*-Schale (Durchmesser 15 cm) mit Deckel, in welche als Behälter für die Flüssigkeit und gleichzeitig als Träger für das Papier (*Whatman* Nr. 1) ein flaches Glasschälchen (Durchmesser 3 cm) mit geschliffenem Rand gestellt wird. Störungen, welche auf die Durchbiegung des sonst ungestützten feuchten Papiers zurückzuführen sind, sind nie beobachtet worden. Laufzeit eines Chromatogramms (Blattdurchmesser 13 cm) je nach Lösungsmittel und Grösse des eingesetzten Doctes 45—120 Min. Bei Lösungsmittelgemischen, welche sich chemisch verändern können (z.B. Butanol/Eisessig/Wasser), wird für jedes Chromatogramm eine neue Mischung hergestellt. Nur so ergeben sich reproduzierbare Chromatogramme.

1. Aminosäuren und Derivate. Lösungsmittel: Collidin²⁸⁾/Wasser und n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5).

Vergleichslösungen: 50 µg Aminosäure pro 10 µl Wasser. Beladung: 10—25 µg.

²⁷⁾ *L. Rutter*, Analyst 75, 37 (1950).

²⁸⁾ *Schweiz. Teerindustrie AG.*, Pratteln.

2. Salicylsäure und Derivate. Hier handelte es sich hauptsächlich um den Nachweis von Salicyl-aminosäuren und Salicyl-peptiden, dann aber auch um Salicylsäurederivate mit verschlossener Carboxylgruppe. Es hat sich gezeigt, dass sich die besten Trennungen erzielen lassen, wenn man die Natriumsalze der Phenole bzw. Säuren in relativ stark alkalischen Lösungsmittelgemischen laufen lässt. Alkalische mobile Phasen sind schon von zahlreichen Autoren verwendet worden. So haben *Parr et al.*²⁹⁾ für Phenole n-Butanol/Pyridin 1:1 mit 2 Teilen gesättigter Natriumchloridlösung benutzt; *Durant*³⁰⁾ schlägt n-Butanol/ges. NaHCO₃-Lösung und *Boscott*³¹⁾ Caprylalkohol/10-proz. KHCO₃ oder mit K₂HPO₄ gepufferte wässrige Pyridin- und Triäthylamin-Gemische vor. Auch zur Chromatographie organischer Säuren dienten bereits verschiedentlich alkalische Systeme, wie z.B. n-Butanol/Ammoniumcarbonatlösung³²⁾, Butanol/Äthanol/Wasser/Ammoniak³³⁾³⁴⁾³⁵⁾, Pyridin/konz. Ammoniak/Wasser und Propanol/konz. Ammoniak/Wasser³⁶⁾ wie auch Isoamylalkohol/Ammoniak/Wasser³⁷⁾.

Für unsere Zwecke erwiesen sich zwei Lösungsmittelgemische als sehr günstig, je nachdem, ob eine rasche Untersuchung auf Rundfiltern genügte oder ob eine grössere Laufstrecke für bessere Trennungen (aufsteigende Methode) erforderlich war:

a) Rundfilter-Methode: Das Papier muss vorbehandelt werden. Zu diesem Zweck legt man die Rundfilter (Durchmesser ca. 13 cm) $\frac{1}{2}$ Min. in eine Lösung von 0,1-n. Natronlauge in Methanol (5 ml 2-n. NaOH und 95 ml Methanol), presst dann zwischen Filterpapier leicht ab und lässt an der Luft trocknen. Im Gegensatz zur Imprägnierung in wässriger Natronlauge besteht hier keinerlei Gefahr, dass das Papier zerreißen könnte. Auch wurden nie Unregelmässigkeiten durch ungleichmässiges Trocknen beobachtet. Auf das trockene Papier tropft man die Vergleichs- und Versuchslösungen (Säuren und Phenole als Natriumsalze³³⁾) in Tropfen von 2 bis 5 μ l auf, wobei die Konzentration von 50 bis 100 μ g pro 10 μ l beträgt (Rf-Werte siehe Tab. 2).

Tabelle 2.
Rf-Werte einiger Salicylsäurederivate.

Derivate	Rf	
	sec-Butanol/ 0,1-n. NaOH	n-Butanol/ Dimethyl- amin/Wasser
Salicylsäure	0,39	0,77
Salicyl-glycin	0,12	0,41
Salicyl-phenylalanin	0,24	0,63
Salicyl-phenylalanyl-glycin	0,20	0,59
Salicyl-glycyl-phenylalanyl-glycin	0,21	0,53
Salicylsäureamid	0,84	—
N-Methyl-salicylsäureamid	0,65	—

²⁹⁾ *R. A. Evans, W. H. Parr & W. C. Evans*, Nature **164**, 674 (1949).

³⁰⁾ *J. A. Durant*, Nature **169**, 1062 (1952).

³¹⁾ *R. J. Boscott*, Biochem. J. **48**, xlvii (1951).

³²⁾ *M. E. Fewster & D. A. Hall*, Nature **168**, 78 (1951).

³³⁾ *K. Freudenberg & G. Gehrke*, Chem. Ber. **84**, 443 (1951).

³⁴⁾ *F. Brown & L. P. Hall*, Nature **166**, 66 (1950); *F. Brown*, Biochem. J. **47**, 598 (1950).

³⁵⁾ *A. G. Long, J. R. Quayle & R. J. Stedman*, J. chem. Soc. **1951**, 2197.

³⁶⁾ *C. S. Hanes & F. A. Isherwood*, Nature **164**, 1107 (1949).

³⁷⁾ *K. Schlägl & A. Siegel*, Mikrochemie **40**, 202 (1953).

³⁸⁾ Kein überschüssiges Alkali, da sonst störende Salzeffekte auftreten!

Nachdem die aufgetragenen Lösungen eingetrocknet sind, wird in der leichteren Phase des Gemisches von 0,1-n. Natronlauge/sec-Butanol (1:1) chromatographiert. Die Laufzeit beträgt ca. 1—1 1/2 Std. Nach erneutem Trocknen wird durch Besprühen mit einer Lösung von 4% FeCl_3 in 0,4-n. Salzsäure entwickelt. Die Salicylsäurederivate erscheinen sofort als violette oder rote Flecken, die am Licht verblassen, im Dunkeln aber wieder erscheinen und recht haltbar sind.

b) Aufsteigende Methode: Für den Nachweis von z.B. Salicoyl-phenylalanyl-glycin nebst Salicoyl-glycyl-phenylalanyl-glycin kann die Rundfiltermethode nicht mehr verwendet werden, da die Trennung ungenügend ist. Hier benützen wir die Methode der aufsteigenden Chromatographie von *Williams & Kirby*³⁹⁾. Das Papier braucht nicht vorbehandelt zu werden. Die aufzutropfenden Substanzmengen sind hier zwei- bis viermal höher als bei der Rundfilter-Chromatographie. Als Lösungsmittel dient die obere Phase des Systems n-Butanol/33-proz. Dimethylaminlösung/Wasser 4:3:2; Laufzeit rund 14 Std. (Höhe der Bogen: 28,5 cm).

Entwickelt wird mit 3-proz. FeCl_3 -Lösung ohne Salzsäurezusatz, wobei die Flecken unmittelbar entstehen. Sie sind im Dunkeln jahrelang haltbar.

3. AAE bei O-Glycyl- β -hydroxybuttersäure-amid (XV). (Bearbeitet von *J. Wehrmüller*³) und *A. Hartmann*.)

Ausgangsmaterial und Vergleichssubstanz.

Salze von O-Glycyl- β -hydroxybuttersäure-amid (XV). — Cbzo-Glycin-anhydrid: Die Vorschrift von *Wieland* und Mitarbeitern⁴⁰⁾ ist etwas abgeändert worden. In die Lösung von 4,2 g (20 mMol) trockenem Cbzo-Glycin und 4,2 ml (30 mMol) abs. Triäthylamin in 200 ml trockenem Essigester wird bei -5° unter Röhren und Ausschluss von Feuchtigkeit langsam getrocknetes (H_2SO_4 konz.) Phosgen geleitet. Sobald nicht mehr alles Phosgen absorbiert wird (Rötung von Lakmus-Papier am Gasableitungsrohr), wird seine Zufuhr unterbrochen. Man lässt noch 15 Min. bei -5° stehen, setzt eiskalte 2-n. Salzsäure zu, trennt ab, extrahiert den Essigester mit kalter 2-n. Salzsäure, kalter 2-n. Sodalösung und Eiswasser, trocknet über Natriumsulfat und dampft bei 40° im Vakuum ein. Längliche, sechseckig abgeschnittene kleine Balken aus Essigester/Petroläther. Ausbeute 35—45%, Smp. 118—119°.

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{N}_2$ (400,38) Ber. C 59,99 H 5,04% Gef. C 60,03 H 5,03%

O-(Cbzo-Glycyl)- β -hydroxybuttersäure-amid: Man löst 1,55 g (3,86 mMol) Cbzo-Glycin-anhydrid in 5 ml abs. Pyridin und giesst die auf 0° abgekühlte Lösung zu einer Lösung von 0,39g (3,8 mMol) DL- β -Hydroxybuttersäure-amid⁴¹⁾ in 5 ml abs. Pyridin von 0° . Nach 40ständigem Stehenlassen im Kühlschrank (3—4°) wird ein wenig Eis zur Lösung gegeben und nach 30 Min. die Mischung bei 35—40° Badtemperatur im Vakuum eingedampft. Der ölige Rückstand (1 g, 90%) wird in 100 ml Essigester und 10 ml 2-n. Salzsäure aufgenommen und der Essigester, nach Abtrennung der wässrigen Phase, zweimal mit 2-n. Salzsäure, dann erschöpfend mit 10-proz. Kaliumhydrogencarbonatlösung und schliesslich einmal mit 10 ml gesättigter Kochsalzlösung extrahiert. Nach Trocknung der Lösung mit Natriumsulfat wird im Vakuum eingedampft. Der ölige Rückstand kristallisiert innert 24 Std. beim Stehen unter Äther/Petroläther durch. Zum Umkristallisieren löst man das Rohprodukt in wenig heissem Essigester, versetzt mit Petroläther bis zur beginnenden Trübung und klärt durch Zusatz von einigen Tropfen Essigester. Durch langsame Kristallisation in einem Bad von 35° erhält man 680 mg (65%) hauchfeine Nadeln in feinen Büscheln. Smp. 78—79°.

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}_2$ (294,30) Ber. C 57,13 H 6,16% Gef. C 57,42 H 6,12%

³⁹⁾ *R. J. Williams & H. Kirby*, Science **107**, 481 (1948).

⁴⁰⁾ *Th. Wieland, W. Kern & R. Sehring*, Liebigs Ann. Chem. **569**, 120 (1950).

⁴¹⁾ *H. Johansson*, Chem. Zentralbl. **1916**, II, 557.

O-Glycyl- β -hydroxybuttersäure-amid-Salze: a) Hydrojodid durch Debenzylierung mit PH_4J : Man löst 100 mg (0,34 mMol) O-(Cbzo-Glycyl)- β -hydroxybuttersäure-amid in 10 ml abs. Eisessig, gibt 100 mg PH_4J dazu und erwärmt die mit einem CaCl_2 -Rohr vor Feuchtigkeit geschützte Lösung 2 Std. auf 60°, wobei eine schwache Gasentwicklung erfolgt. Man gibt nochmals etwa 100 mg PH_4J zu und erwärmt weitere 2 Std. Hierauf wird das Lösungsmittel im Vakuum bei 40° Badtemperatur verdampft und der Rückstand zwischen Wasser und Essigester verteilt. Der durch Eindampfen des Wasser-Auszuges im Vakuum bei 35–40° erhaltene Rückstand kristallisiert beim Stehen über Nacht in dünnen Balken (75 mg, 76%; Roh-Smp. 138–144°). Im Papierchromatogramm erweist er sich als eine einheitliche Verbindung (positive Reaktion mit Ninhydrin und Diazolösung⁴²⁾). Zum Umkristallisieren löst man in 0,5 ml abs. Methanol, versetzt dann in der Kälte mit soviel trockenem Essigester, dass die Lösung eben noch klar bleibt (ca. 2,5 ml), kratzt mit einem Glasstab, lässt 2 Std. bei 20° und anschliessend über Nacht bei –15° stehen. Gerade abgeschnittene Balken, Smp. 143–144,5°. Das Hydrojodid ist leicht löslich in Wasser, Aceton, Methanol, mässig löslich in Isopropanol, unlöslich in Essigester und Äther.

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_2\text{J}$	Ber. C 25,01	H 4,55	N 9,73%
	(288,10)	Gef. , , 25,10	, , 4,58 , , 9,37%

b) Hydrochlorid durch Hydrogenolyse in Gegenwart von HCl : 400 mg (1,36 mMol) O-(Cbzo-Glycyl)- β -hydroxybuttersäure-amid in 30 ml Eisessig werden in Gegenwart von 1,36 ml 1-n. Salzsäure und 60 mg 10-proz. Palladium-Kohle¹⁸⁾ 30–40 Min. mit Wasserstoff behandelt (Zimmertemperatur). Man filtriert, verdampft im Vakuum bei 35° zur Trockne und kristallisiert den Rückstand aus Methanol/Essigester. Das Hydrochlorid wird so in prismatischen Kristallen vom Smp. 140–141° erhalten. Ausbeute 70%. Zur Analyse wird 14 Std. bei 85°/0,01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_2\text{Cl}$	Ber. C 36,65	H 6,66	N 14,25	Cl 18,03%
	(196,64)	Gef. , , 36,98	, , 6,74	, , 14,12 , , 17,88%

β -Hydroxybutyryl-glycin-amid (XVI), nach der Azidmethode.— β -Hydroxybuttersäure-hydrazid: Wir haben die Vorschrift von *Levene & Scheidegger*⁴³⁾ etwas abgeändert. 25 g (0,2 Mol) β -Hydroxybuttersäure-methylester⁴⁴⁾ werden in 15 ml abs. Methanol gelöst und mit 15 g (0,3 Mol) Hydrazinhydrat versetzt. Nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur werden die ausgeschiedenen farblosen Kristalle abgesaugt, mit Methanol gewaschen und aus Äthanol/Äther umkristallisiert. 22 g (90%) farblose Nadeln, Smp. 121–122°; Lit. Smp. 119–120°. Zur Analyse wird 5 Std. bei 60° im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet.

$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_2$	Ber. C 40,66	H 8,53	N 23,71%
	(118,14)	Gef. , , 40,97	, , 8,72 , , 23,42%

β -Hydroxybutyryl-glycin: Zu einer Lösung von 5,9 g (50 mMol) β -Hydroxybuttersäure-hydrazid in 50 ml 1-n. Salzsäure gibt man unter Rühren bei 0° 4,3 g (62,5 mMol) Natriumnitrit in 10 ml Wasser. Man fügt zur resultierenden wässrigen Azidlösung 3,75 g (50 mMol) Glycin in 5 ml Wasser und tropft bei 0° während 60 Min. 50 ml 2-n. Natronlauge ein. Zur Aufarbeitung wird die alkalische Lösung kurz mit n-Butanol geschüttelt, die wässrige Phase mit konz. Salzsäure angesäuert (Kongo) und die ausgefallene Säure mit n-Butanol extrahiert. Nach Waschen mit gesättigter Kochsalzlösung, Trocknen mit Natriumsulfat und Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man 3,2 g (40%) β -Hydroxybutyryl-glycin in Form eines dickflüssigen, schwach gelblichen Öles.

β -Hydroxybutyryl-glycin-amid: 2 g (12,4 mMol) der oben erhaltenen Säure werden mit ätherischer Diazomethanolösung verestert und der nach dem Abdampfen des Lösungs-

⁴²⁾ *H. Zahn, B. Wollemann & O. Waschka, Z. physiol. Chem.* **294**, 100 (1953).

⁴³⁾ *P. A. Levene & J. Scheidegger, J. biol. Chem.* **60**, 179 (1924).

⁴⁴⁾ *E. Fischer & H. Scheibler, Ber. deutsch. chem. Ges.* **42**, 1222 (1909); wir danken der *LONZA Elektrizitätswerke und chemische Fabriken AG.*, Basel, für die freundliche Überlassung des Ausgangsmaterials.

mittels erhaltene ölige Methylester wie gewohnt in das Amid überführt. Der Ammoniak wird am Vakuum verdampft und die methanolische Lösung nach Behandeln mit Tierkohle bis zur beginnenden Kristallisation eingegengt; beim Stehen in der Kälte kristallisieren 0,71 g (38%) Amid in Nadelbüscheln aus, Smp. 108—109°. Durch Zugabe von Äther wird eine zweite Fraktion erhalten: 0,39 g (20%), Smp. 107—108°. Zur Analyse wird aus Äthanol/Äther umkristallisiert und die Substanz 14 Std. bei 50° im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet.

$C_6H_{12}O_3N_2$ Ber. C 44,99 H 7,55 O 29,97%
(160,17) Gef. „, 44,86 „, 7,49 „, 30,05%

Umlagerungsversuche.

a) In 2-n. wässrigem Ammoniak, 2-n. Triäthylamin/Methanol und 2-n. Triäthylamin/Chloroform: Man löst je 100 mg Hydrochlorid von O-Glycyl- β -hydroxybuttersäure-amid in je 10 ml Lösungsmittel und lässt 30—60 Min. bei Zimmertemperatur stehen. Das Reaktionsgemisch enthält nur unverändertes Ausgangsmaterial und wechselnde Mengen von Spaltprodukten (Papierchromatogramm). In Wasser erfolgt der Zerfall sehr langsam: Nach 24 Std. enthält das Reaktionsgemisch noch fast ausschliesslich Ausgangsmaterial.

b) In abs. tert-Butanol mit 1-n. Kalium-tert-butylat: Man suspendiert bei 20° 98 mg (0,5 mMol) O-Glycyl- β -hydroxybuttersäure-amid-hydrochlorid mit einem Vibromischer in 23 ml abs. tert-Butanol, versetzt mit 1,88 ml (4 Äquivalenten) einer 1-n. Lösung von Kalium-tert-butylat in tert-Butanol und nach $\frac{1}{2}$ Std. mit mindestens 4 Äquivalenten feuchtem Ionenaustauscher Amberlite IR-120 (H-Form), mindestens 1 Äquivalent feuchtem Ionenaustauscher Amberlite IRA-400 (OH-Form) und 25 ml Wasser. Sobald der pH-Wert auf 6—7 gesunken ist und Chlor sich nicht mehr nachweisen lässt, wird filtriert und im Vakuum bei 35° zur Trockne verdampft. Der Rückstand (80—90%) besteht aus β -Hydroxybutyryl-glycin-amid und sehr wenig β -Hydroxybuttersäure-amid (Papierchromatographie). Kristallisation aus Äthanol/Äther gibt reines β -Hydroxybutyryl-glycin-amid, Nadeln, Smp. 107—108°. Zur Analyse wird aus Äthanol/Äther umkristallisiert und das Präparat über Nacht bei 60° im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet.

$C_6H_{12}O_3N_2$ Ber. C 44,99 H 7,55 O 29,97%
(160,17) Gef. „, 44,77 „, 7,62 „, 30,29%

Das Umlagerungsprodukt ist gemäss Misch-Smp., Papierchromatogramm und IR-Spektrum mit oben beschriebenem Vergleichspräparat identisch.

Papierchromatographische Kontrolle.

Ausgangsmaterial, Endprodukt und eventuelle Spaltprodukte sind durch aufsteigende Papierchromatographie⁴³⁾ nebeneinander nachweisbar (Höhe der Bogen 28 cm). Als Lösungsmittel dient 70-proz. n-Propylalkohol⁴⁵). Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgt nach der Chlorierungsmethode von *Reindel & Hoppe*⁴⁶); die von den Autoren empfohlene Befeuchtung der Chromatogramme mit Alkohol/Aceton 1:1 hat sich als überflüssig erwiesen. Glycin und O-Glycyl- β -hydroxybuttersäure-amid sind natürlich auch mit Ninhydrin oder mit diazotierter Sulfanilsäure⁴²) nachweisbar. Unter Verwendung von *Whatman* Nr.1-Papier ergeben sich folgende Rf-Werte: β -Hydroxybuttersäure-amid 0,70; β -Hydroxybutyryl-glycin-amid 0,59; O-Glycyl- β -hydroxybuttersäure-amid (Hydrochlorid oder freie Base) 0,45; Glycin-diketopiperazin 0,44; Glycin 0,25. Für orientierende Versuche eignet sich auch die in Abschnitt 2 beschriebene Rundfiltertechnik.

Zur Durchführung dieser Arbeiten standen uns Mittel aus den *Arbeitsbeschaffungskrediten* des Bundes zur Verfügung, für die wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen. Ebenso danken wir der Firma *Sandoz* für die Herrn Dr. *J.P. Zimmermann* gewährte Unterstützung.

⁴⁵⁾ *P. S. Chen & E. Hadorn*, Rev. suisse Zool. **62**, 108 (1955).

⁴⁶⁾ *F. Reindel & W. Hoppe*, Chem. Ber. **87**, 1103 (1954).

Zusammenfassung.

Unter dem Namen Aminoacyl-Einlagerung wird ein neuer Umlagerungstypus beschrieben, welcher von O-aminoacylierten β -Hydroxysäureamiden zu β -Hydroxyacyl-aminosäureamiden führt. Die β -Hydroxysäure kann aliphatisch oder aromatisch sein. Da der Amidstickstoff substituiert sein darf, gestattet die Reaktion den Aufbau von Peptidketten. Peptide schienen bisher nur durch Aminoacyl-Anlagerungs-Reaktionen zugänglich zu sein. Die Aminoacyl-Einlagerungs-Reaktion weist einen prinzipiell neuen Weg.

Folgende Substanzen sind durch Aminoacyl-Einlagerung hergestellt worden: Salicoyl-glycin-amid, Salicoyl-phenylalanin-amid, Salicoyl-phenylalanyl-glycin, Salicoyl-glycyl-phenylalanyl-glycin und β -Hydroxybutyryl-glycin-amid.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

158. Untersuchungen über Organextrakte.

27. Mitteilung¹⁾.

Über die Konzentration des Testosterons in menschlichen Testes

von R. Anliker, M. Perelman²⁾, O. Rohr und L. Ruzicka.

Herrn Prof. Dr. T. Reichstein zum 60. Geburtstag gewidmet.

(3. VI. 57.)

Um einen tieferen Einblick in den Steroid-Stoffwechsel von hormonal aktiven Tumoren zu gewinnen, haben wir solche Geschwülste auf ihren Gehalt an androgen und östrogen wirksamen Hormonen untersucht¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾. In den Fällen¹⁾⁴⁾, bei welchen mit der Entwicklung des Tumors eine deutliche Virilisierung des betroffenen weiblichen Patienten parallel ging, konnte Testosteron in einer Konzentration nachgewiesen werden, die durchaus mit derjenigen in Testesgeweben des Stieres⁶⁾ und des Hengstes⁷⁾ vergleichbar ist (vgl. Tab.). Diese und andere Ergebnisse stützen die Vermutung, dass die Zeichen einer Virilisierung bzw. Feminisierung ihren Grund in „tumoreigenem“ Hormon haben könnten.

¹⁾ 26. Mitt. R. Anliker, O. Rohr & L. Ruzicka, Liebigs Ann. Chem. **603**, 109 (1957).

²⁾ Fellow in Cancer Research of American Cancer Society.

³⁾ M. Marti & H. Heusser, Helv. **37**, 327 (1954).

⁴⁾ R. Anliker, O. Rohr & M. Marti, Helv. **39**, 1100 (1956).

⁵⁾ Dissertation O. Rohr, ETH., Zürich 1956.

⁶⁾ K. David, E. Dingemanse, J. Freud & E. Laqueur, Z. physiol. Chem. **233**, 281 (1935).

⁷⁾ E. Tagmann, V. Prelog & L. Ruzicka, Helv. **29**, 440 (1946).