

Kurze Mitteilungen

Bis am 15. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht. Es werden auch Manuskripte aus dem Ausland angenommen. Maximalumfang: 6 Schreibmaschinenseiten (alles inbegriffen)

Problems in Solid State Spectroscopy*

Summary

The spectra of molecular ions in crystals depend on the static field on the site occupied by the ions as well as on the dynamic coupling between similar ions. With the sulphate ion as an example it is shown how symmetry considerations form the basis for an interpretation of the crystal spectra of such ions.

There are at least two reasons why it may be of interest to study the spectra of solids:

1. Most of our knowledge about the structure of inorganic molecular ions originates from X-ray investigations of crystals, and the question then arises whether these structures will also pertain to the ions in aqueous solutions. One way of tackling this problem is to compare the spectra of the ions in solutions with those in crystals.
2. Information about the "stationary states" of ions and molecules is mainly obtained from observations of spectral transitions between them. In atomic spectroscopy the polarization and splitting pattern of the spectral lines in magnetic fields has proved invaluable for that purpose, and the polarization and the splitting pattern of spectral lines from ions in crystals due to the local crystal field may be used in a similar way.

This will be explained in the following.

The spectra of molecular ions in aqueous solutions are usually assumed to be similar to the spectra of the same units in the gaseous state, which presumably is a fair approximation. However, it is known that crystal spectra may be considerably different from these.

For example, the SO_4^{2-} -ion in the gaseous state would be expected to have four fundamental vibrational frequencies. These should all be observable in the Raman spectrum, but only two of them should appear in the infrared spectrum. However, the Raman and infrared spectra of the SO_4^{2-} -ion in crystalline K_2SO_4 exhibit many more lines, respectively absorption bands.

From X-ray investigations of the sulphate ion it appears that it has the symmetry T_d of a regular tetrahedron. All the translations, rotations and vibrations as well as molecular wave functions may be classified according to symmetry species of the point group T_d of which there are only a limited number, in this case five. This gives us a kind of shorthand description of how a vibration behaves when subjected to the symmetry operations which bring the tetrahedron into coincidence with itself e.g. tells us whether a vibration is unchanged or transformed into its opposite etc.

* Presented at the Spring Meeting of the Swiss Chemical Society in Zürich, April 21/22, 1972.

Fundamental vibrational frequencies of the sulphate ion¹

Designation	Symmetry species	Activity	Approximate frequency
ν_1	A_1	Raman	985 cm^{-1}
ν_2	E	Raman	450 cm^{-1}
ν_3	T_2	Raman + I. R.	1085 cm^{-1}
ν_4	T_2	Raman + I. R.	610 cm^{-1}

¹ K. W. F. KOHLRAUSCH, *Ramanspektren*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1943.

Thus, for a SO_4^{2-} -ion, there are only four different fundamental vibrational frequencies because some of the vibrational states are degenerate, i.e. owing to symmetry they have the same frequency or energy.

Let us now introduce our sulphate ion into a crystal on a site of a certain symmetry. If the crystal structure is known from X-ray investigations and there is no disorder in the crystal, then there is a well-defined symmetry at every point in the crystal.

In the "imaginary" gaseous state the SO_4^{2-} -ions do not influence one another, but in the crystal they are subject to an electric field having the symmetry of the site. If either the electric interaction with the ion is negligibly small, or if the site symmetry is T_d as for the free ion, the energy levels can be classified just as before, and the spectral transitions will also be unchanged, so that the molecular spectrum will look like that of the free molecular ion.

With a site symmetry for the SO_4^{2-} -ion as low as C_s in the K_2SO_4 -crystal and with a significant interaction of the ion with the crystal field, there can be no degenerate frequencies. This is because we now have to classify the energy levels of the molecules according to symmetry species of the point group C_s , and here there are no degenerate states. Instead of four vibrational frequencies we should now expect nine. We say that there is a local *static field splitting* of frequencies.

The "site spectrum" of a molecular ion may (in principle at least) be observed when we introduce a small quantity of the ions into a host crystal which is isomorphous with our first crystal, but which, instead of the ion which we consider, is built up of a similar ion of the same volume, shape and charge, but with a different mass. For example, small amounts of K_2SO_4 could be dissolved in a crystal of K_2CrO_4 . Under these conditions it is fair to assume that there will be no interaction between the SO_4^{2-} -ions.

The situation is different in a pure K_2SO_4 -crystal where there are four non-equivalent SO_4^{2-} -ions in the orthorhombic unit cell. Here we can imagine that the different

sulphate ions in the crystal will be coupled in much the same way as we could couple mechanical oscillators. This *dynamic coupling* influences the energy levels. If we go to very strong coupling we may consider the whole crystal as a single molecule. However, due to the periodicity of the crystal structure it suffices to consider only the unit cell which can be defined as the smallest collection of atoms in the crystal that are not related to one another by simple lattice translations. The translational symmetry will ensure that the situation in an arbitrary unit cell will also be the situation in all other unit cells in the bulk crystal at the same time. This means that equivalent atoms (and electrons) have to move in phase*.

The oscillations of the bulk crystal then are the oscillations of the unit cell carried through the crystal in the same phase.

In the approximation of strong coupling in the crystal the unit cell contents thus play the same role as a molecular unit and may be treated analogously to the "free molecule" considered previously.

Thus we now consider the effect of the symmetry operations of the unit cell on its atoms and electrons. These operations form a subgroup of the crystal's space group and may be obtained from the SCHOENFLIES symbol for the latter simply by deleting its right hand upper index, thus with K_2SO_4 as an example:

$$Pnma \equiv D_{2h}^{16} \rightarrow D_{2h}$$

In the present situation the movements in the unit cell are now classified according to symmetry species of the point group D_{2h} . As there are no degenerate symmetry species in this point group, and there now are four SO_4^{--} -ions instead of one, we may expect $4 \times 9 = 36$ distinct vibrational frequencies from the sulphate ions alone.

On the basis of our belief in continuity in nature we must be able to correlate movements and wave functions classified under each of the three point groups with rela-

* Two atoms are called equivalent if one can be obtained from the other by the operation of a lattice translation.

tion to respectively 1. the free molecular ion, 2. the site and 3. the unit cell. Thus states which behave in the same way when subjected to symmetry operations that are common to the three point groups are brought in relation to one another.

From theoretical considerations it will often be possible to give a symmetry description of the molecular states, but what can be observed are the spectral transitions between such states. The task is then to deduce the symmetry of the states involved from the characteristics of the spectral lines. Such characteristics are: 1. Type or activity of the transition (Raman or I.R., electric or magnetic transition etc.), 2. Polarization, 3. Splitting pattern in electric or magnetic fields, 4. Frequency and 5. Intensity.

Decisive for the activity and the polarization are the selection rules, also known from other fields of spectroscopy, e.g. electric dipole transitions from the ground state are allowed to states having the same symmetry as components of the translation.

The splitting pattern may be inferred from the correlation scheme mentioned above. However, the splittings may be beyond resolution and combination bands may obscure the pattern. In order to obtain sharper spectral lines by quenching the low frequency vibrations in the crystal it is advantageous to cool the crystal to low temperatures.

In Odense Mr. P. WAAGE JENSEN has recently taken up Raman spectroscopy on single crystals of compounds with the general formula $Me(I)_3[Me(III)(CN)_6]$ in order to study systematically the vibrations of complex ions of the type $[Me(III)(CN)_6]^{3-}$. It appears that a sharp distinction between "lattice vibrations" and "internal vibrations" i.e. vibrations inside the molecular ions, may be difficult to make.

Also, evidence for the space group of these crystals which, for a long time, has been the subject of dispute may in some cases be obtainable from their Raman and infrared spectra.

CHRISTIAN KNAKKERGÅRD MØLLER
Kemisk Institut, Universitet Odense (Danmark)

Solid Phase Peptide Synthesis on a Benzhydrylamine Resin of LRF (Luteinizing Hormone Releasing Factor) and Analogues Including Antagonists*

MERRIFIELD's solid phase peptide synthesis¹ is now being extensively used for the synthesis of oligopeptides: its success is mainly due to its rapidity, versatility, the availability of new techniques of purification and the reliability obtained through constant improvements brought by varying its different parameters. Efforts have been directed toward the choice of support, the coupling reaction, the N-terminal protecting group, the C-terminal protecting group when the peptide was to be

attached to the resin by its amino end, and the cleavage step: these modifications have been recently reviewed by FELIX and MERRIFIELD².

Our efforts have been directed essentially toward the choice and improvement of the resin using the classical approach of stepwise addition of N-protected amino

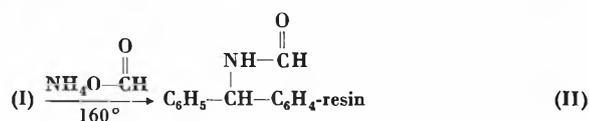
* Presented at the Spring Meeting of the Swiss Chemical Society in Zürich, April 21/22, 1972. Research supported by AID (Contract No. AID/csd 2785), Ford Foundation and Rockefeller Foundation.

acids to the peptide resin and taking advantage of the different solvents³, activating agents, deblocking reagents and cleavage step widely published. PIETTA and MARSHALL⁴ recently reported the synthesis of a benzhydrylamine resin. Its potential appealed to us for two reasons. A) The first residue is attached to the resin by an amide bond, easy and quick to mediate (DCCI, active esters, etc.) as compared to the first esterification step necessary on the chloromethylated resin. Moreover, high substitutions can be obtained and the diketopiperazine formation reported in some cases seems to be avoided. B) HF cleavage yields within an hour (provided HF labile protecting groups are used) the free peptide amide in comparable yields (15 to 40% calculated from the first residue attached to the resin) with respect to those reported for the ammonolysis of MERRIFIELD's chloromethylated resin (the formation observed by BODANSZKY and SHEEHAN⁵ of a methyl ester instead of the expected amide during ammonolysis of a peptide on a chloromethylated resin is very disturbing). The occurrence of failure sequences⁶ on the benzhydrylamine resin is certainly not different than that observed with other resins. We would like, however, to emphasize that only relatively short peptides (up to 10 amino acids) have been synthesized by us and others⁷ using that resin. The chemical reactions involved in its synthesis are the following:

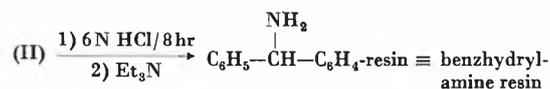
a) FRIEDEL-CRAFTS reaction:



b) LEUKART's reductive amination:



c) Hydrolysis, neutralization



BODANSZKY and SHEEHAN⁵ monitored the replacement of the chlorine in the chloromethylated resin by an acetoxyl group and the saponification of the latter by observing first the appearance and later the disappearance of the carbonyl and carbon-oxygen bonds in the infrared absorption spectrum of the resin in a potassium bromide pellet. Similarly we monitored the LEUKART's reductive amination by observing the appearance of an infrared absorption at 1690 cm^{-1} corresponding to the carbonyl of the formyl group. This is particularly convenient in that we found that the intensity of the band can be used to estimate the extent of the reaction so that the desired substitution can be controlled. The complete

disappearance of that absorption after hydrolysis was observed.

As in any other solid phase peptide synthesis, the choice of the proper protective groups for the synthesis of LRF was of great importance. The *t*-Butyloxycarbonyl (BOC) protective group was used for all the amino groups, whereas benzyl ethers were used for the side chain protection of serine and tyrosine: BOC-im-tosyl-histidine, BOC-NO₂-arginine and carbobenzoxy pyroglutamic acid were also used. All amino acids were of the L-configuration.

Coupling of a residue was generally carried out for 4 hr in CH₂Cl₂ or DMF depending on the solubility of the protected amino acid using a 10-fold excess of BOC reagent and activating reagent dicyclohexyl-carbodiimide (DCCI). The reaction was monitored by a ninhydrin test reported by KAISER *et al.*⁸

The deblocking procedure consisted of a 20 min treatment in TFA/CH₂Cl₂ 1:1 containing 5% 1,2-ethanedithiol, followed by neutralization by Et₃N in DMF. Numerous washes with MeOH and CH₂Cl₂ followed each step.

The HF cleavage from the resin and complete deprotection of the peptide amide takes place very readily at 0°C, however, 1 hour treatment was allowed whenever tyrosine was present⁹. Anisol was added to the dry resin peptide as a scavenger. After the removal of HF, under vacuum, the resin was extracted with 0.1% AcOH. The washings were lyophilized yielding the crude peptide, generally as a powder.

Purification of the analogues to be described consisted of ion exchange chromatography on carboxymethyl cellulose (Whatman CM32, using a step gradient of 0.075 M NH₄OAc) followed by a partition chromatography on Sephadex G-25 F in the system: *n*-Butanol: Acetic acid: Water (4:1:5).

At this stage of purification, if cuts were made to favor purity rather than quantity, the products obtained were homogeneous in 7 TLC systems, and close to unit ratios by amino acid analysis. The specific optical rotation of -51° for LRF, is the same whether the decapeptide was synthesized by classical solution techniques¹⁰,

¹ R. B. MERRIFIELD, *J. Amer. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149.

² M. FELIX and R. B. MERRIFIELD, *J. Amer. Chem. Soc.* 92 (1970) 1385.

³ F. C. WESTALL and A. B. ROBINSON, *J. Org. Chem.* 35 (1970) 2842.

⁴ P. G. PIETTA and G. R. MARSHALL, *Chem. Commun.* 1970, 650.

⁵ M. BODANSZKY and J. T. SHEEHAN, *Chem. & Ind.* 1966, 1597.

⁶ E. BAYER, H. ECKSTEIN, K. HÄGELE, W. A. KÖNIG, W. BRÜNING, H. HAGENMAIER and W. PARR, *J. Amer. Chem. Soc.* 92 (1970) 1735.

⁷ P. RIVAILLE, A. ROBINSON, M. KAMEN and G. MILHAUD, *Helv. Chim. Acta* 54 (1971) 2772.

⁸ E. KAISER, R. L. COLESCOTT, C. D. BOSSINGER and P. I. COOK, *Anal. Biochem.* 34 (1970) 595.

⁹ S. SAKAKIBARA, Y. SHIMONISHI, M. OKADA and Y. KISHIDA, *Peptides*, H. C. BEYERMAN, A. VAN DE LINDE and W. M. VAN DEN BRINK (Editors), Wiley, New York 1967.

¹⁰ R. GEIGER, W. KÖNIG, H. WISSMANN, K. GEISEN and F. ENZMANN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45 (1971) 767.

or by solid phase on a benzhydrylamine resin. In addition to the usual monitoring techniques such as: UV, color reaction, etc., we found that NMR spectroscopy was extremely reliable in identifying and following the compounds throughout the purification stages, and could also be used as a criterion of purity.

Using the benzhydryl amine resin and the procedure described we synthesized many peptides, analogues of both TRF¹¹ and LRF^{12a,b}. Among the former, 3-Me-His²-TRF is the only analogue known to be more active than the natural product, whereas 1-Me-His²-TRF on the other hand is almost inactive¹³. On the basis of these results, 1-Me-His²-LRF and 3-Me-His²-LRF were synthesized; neither of them however, showed such striking properties as the TRF homologue (see Table I). It is possible that the methyl group sterically interferes with the conformation of the natural product, although the electronic properties of the N-3 and N-1 position respectively of the imidazole ring might be relevant to the activity of LRF.

Specific binding of [³H-Pro] labelled TRF to mouse thyrotropic tumor membrane preparations and to intact pituitary cells has been described¹⁴. Good correlations were observed in most cases between biological activity and binding affinity in the series of TRF analogues examined¹⁵. In order to conduct similar studies with LRF and for monitoring its distribution in our biological systems, we synthesized tritiated LRF of high specific radioactivity. For this synthesis [³H-Pro] was chosen for two reasons:

1. It is obtainable at comparatively low cost at high specific radioactivity (30 to 60 Ci/mmmole).
2. It has logistical advantages since proline is the second residue to be coupled on the resin; the substitution could hence be controlled at the first glycine step; after coupling BOC proline to the resin, all unreacted sites could be acetylated, hence, only allowing the chain containing the [³H-proline] to grow to completion. The synthesis was undertaken with .8 Curie of tritiated proline (specific radioactivity: 36 Ci/mmmole); it was protected using *tert.* butyl fluoroformate described by SCHNABEL *et al.*¹⁶ in the presence of magnesium oxide; it is an efficient, quick and mild way of introducing the BOC protecting group. The synthesis and purification was then carried out following the general approach already described, yielding about 1 mg of biologically active material.

LRF and analogues were assayed *in vitro*¹⁷ using 5 day old primary culture of dispersed rat pituitary cells. The LH secreted in response to LRF and related analogues was assayed by specific radioimmunoassay for rat LH.

LRF was assayed *in vivo*¹⁸ for LH releasing activity by i. v. injection of the materials into estrogen-progesterone blocked chronically ovariectomized rats. Plasma LH levels are obtained by solid phase radioimmunoassay for rat LH.

Table I

Peptides	% LRF Potency <i>in vivo</i> ¹⁷ and <i>in vitro</i> ¹⁶
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂ (1)	100
" " " " " " " " -Pro-NH ₂ (2)	11
" " " " " " " " -Arg-NH ₂ (3)	0.01
" " " " " " " " -Leu-NH ₂ (4)	< 0.01
" " " " " " " " -Gly-NH ₂ (5)	< 0.01
" " " " " " " " -Tyr-NH ₂ (6)	< 0.02
" " " " " " " " -Ser-NH ₂ (7)	< 0.01
" " " " " " " " -Trp-NH ₂ (8)	0.1
pGlu-His-NH ₂ (9)	< 0.05
pGlu-NH ₂ (10)	< 0.003
pGlu-1-Me-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	3
pGlu-3-Me-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	6
pGlu-Gly-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	*
pGlu -Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	< 0.001

* This analogue showed a significant response at a dose of 100 µg *in vivo* and at a concentration of 3×10^{-5} M *in vitro*. The slope of the response, however, was not parallel to that exhibited by LRF so that a percentage comparison of activities was not possible.

In an attempt to find the shortest peptide with LRF biological activity we synthesized a series of shorter peptide-amide homologues (see Table I) to LRF where the C-terminal amino acids have been successively eliminated. The table is self-explanatory and clearly shows that removal of two residues substantially reduces the biological activity. It is, however, remarkable to see that the tripeptide pGlu-His-Trp-NH₂ has .1% of LRF biological activity. An explanation of this activity of the tripeptide might be that the tertiary structures of the deca- and tripeptides resemble each other to such an extent that they are both recognized by the LRF receptor. This affirmation is sustained by the observed similarity in the dose-response curves of the two peptides. The relative inactivity of compounds (3) to (7) would then have to be explained on the grounds of steric effects. An even more striking result is the ability of the dipeptide pGlu-His-NH₂ to release LH, although a very high dose is required.

Another series of LRF analogues, in which each residue was successively replaced by glycine, was synthesized¹⁹

- 11 J. RIVIER, W. VALE, M. MONAHAN, N. LING and R. BURGUS, *J. Med. Chem.* 15 (1972) 479.
- 12 a) M. MONAHAN, J. RIVIER, R. BURGUS, M. AMOSS, R. BLACKWELL, W. VALE and R. GUILLEMIN, *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 273 (1971) 508. b) M. MONAHAN, J. RIVIER, W. VALE, R. GUILLEMIN and R. BURGUS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47 (1972) 551.
- 13 W. VALE, J. RIVIER and R. BURGUS, *Endocrinology* 89 (1971) 1485.
- 14 G. GRANT, W. VALE and R. GUILLEMIN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46 (1972) 28.
- 15 G. GRANT, W. VALE and R. GUILLEMIN, *IVth International Congress of Endocrinology (Abstract)*, 1972.
- 16 E. SCHNABEL, H. HERZOG, P. HOFFMANN, E. KLAUDE and I. UGI, *Angew. Chem., internat. Ed.* 7 (1968) 380.
- 17 W. VALE, G. GRANT, M. AMOSS, R. BLACKWELL and R. GUILLEMIN, *Endocrinology*, in press.
- 18 M. AMOSS and R. GUILLEMIN, *Gonadotropins* (E. ROSEMBERG, Editor), Geron-X, Los Altos (California) 1968, Vol. 1, p. 313.
- 19 M. MONAHAN *et al.*, in preparation.

in an effort to define the importance of the various amino acids in biological activity.

One of them, the Gly²-LRF, showed along with a partial agonistic activity (see Table I), an undeniable ability to inhibit LRF in an *in vitro* system^{12b}. Using the culture assay we determined the relative potency of all of the LRF analogues²⁰ and studied their pharmacological interaction with LRF, particularly any analogue's ability to antagonize LRF. In view of the antagonistic activity of Gly²-LRF we synthesized the des-His²-LRF (see Table I). It is relevant that des-His¹-glucagon was found by RODBELL²¹ to be a competitive inhibitor of glucagon. We, indeed, synthesized an antagonist²⁰ almost devoid of agonistic activity.

These two His²-LRF analogues are the first peptides reported to be competitive antagonists of the biological

activity of LRF. The physiological and potential clinical significance of these LRF antagonists is now being investigated.

Acknowledgments

The authors wish to thank R. KAISER for his excellent technical assistance.

JEAN RIVIER, MICHAEL MONAHAN, WYLIE VALE,
GEOFFREY GRANT, MAX AMOSS, RICHARD BLACKWELL,
ROGER GUILLEMIN and ROGER BURGUS

The Salk Institute, La Jolla (California) 92037

²⁰ W. VALE, G. GRANT, J. RIVIER, M. MONAHAN, M. AMOSS, R. BLACKWELL, R. BURGUS and R. GUILLEMIN, *Science*, accepted for publication.

²¹ M. RODBELL, L. BIRNBAUMER, S. POHL and F. SUNBY, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 68 (1971) 909.

Informationstheoretisches Modell der Carcinogenese*

Summary

The effects of chemical and physical agents on genetic material have been explained by the interaction of the cell with its immediate environment. Another possibility of cancerogenesis stems from the thermodynamic- and information theory-based premise that cancerogens must all act on the genom of a cell with the same code.

In animal organisms the 10¹⁰ internal and external receptors and the nerve cells of the central, peripheral and intramural systems are the only means available for the transformation of external stimuli into the organism's own code (RNA, DNA and proteins). By way of the interaction of the epithelial cells (high rate of cell division) and the nerve cells in the adult organism (unable to reproduce) which both originate from the same germ layer, arises after many thousands of cell generations through the "reversible production of code molecules" an "exo-DNA" (phase 1). The combination of these "quasi-virus-DNA" with the DNA of the mother cell (i.e. epithelial cell) would produce a tumor cell which over many generations would develop into an autonomous, host-specific parasitoid organism (phase 2).

Wir haben vor sechs Jahren mit theoretischen Untersuchungen über das Wesen der Information und ihren Zusammenhang mit der Chemie begonnen. Die Ausgangsfrage war, wie molekularprogrammierte Synthesen im organischen Laboratorium aussehen müßten, welche, wie die enzymkatalysierten Synthesen, durch eine hohe Spezifität charakterisiert wären (Auswahlfähigkeit im informationstheoretischen Sinne). Die bisherigen Ergebnisse haben uns inzwischen veranlaßt, den Schwerpunkt unserer Studien ganz auf einige zentrale biologische Probleme zu verlegen. Eines davon betrifft den Krebs. Erste Resultate haben wir bereits 1966 publiziert¹.

Im Zusammenhang mit der Ausnahmestellung des Menschen in bezug auf die Gehirnentwicklung betrachten wir in erster Linie die beim Menschen spontan auftretenden malignen Tumoren, von denen allein 92% Carcinome sind. Ihre Muttergewebe sind Epithel- und

Parenchymgewebe. Ferner gelten unsere Betrachtungen auch der chemischen Cancerogenese der Laboratoriumstiere sowie der neoplastischen Transformation von Zellkulturen. – Als allgemein akzeptierte Krebsursachen stehen die exogenen Faktoren und die Krebsviren zur Diskussion.

Die meisten bisher diskutierten Mechanismen gehen von einer direkten chemischen oder physikalischen Einwirkung auf Kern und Zellorganellen aus. Im Gegensatz dazu lassen wir die exogenen Krebsfaktoren über die 10¹⁰ Sinneszellen (Intero- und Exterorezeptoren des Nervensystems) von der Peripherie her auf den tierischen Organismus einwirken, wobei es auf diese Weise indirekt zu rNS- und dNS-Sequenzänderungen kommen würde. Zelle, Kern, dNS könnten somit direkt durch chemische Reaktion oder über den ganzen Organismus indirekt mit der Umwelt reagieren². Im zweiten Falle würde man auch sagen: der tierische Organismus hat «quasimolekulare» Eigenschaften, d.h. man kann ihn als chemische Verbindung behandeln und das «quasi-chemisch-physikalische» Verhalten dieses «Gigamoleküls» studieren. Von diesem wie vom informationstheoretischen Gesichtspunkt aus kann nämlich ein sinnvoller³ Eingriff in das genetische Steuersystem nur über zwischenmolekulare Wechselwirkungen von der Peripherie her⁴ und nur über einen gemeinsamen Code

* Vorgetragen am 21. April 1972 an der Frühjahrsversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Zürich.

¹ H. SCHALTEGGER, *Chimia* 20 (1966) 197, 237, 389, 23 (1969) 185.

² Die Möglichkeit der indirekten Einwirkung auf die dNS müßte auch bei der Diskussion des Mutationsmechanismus berücksichtigt werden (Abb. 4, oben; siehe auch Fußnote 6).

³ Eine Krebszelle für sich betrachtet ist im biologischen Sinne keine geschädigte Organzelle.

⁴ Jede chemische Reaktion wird durch zwischenmolekulare Wechselwirkungen eingeleitet.

stattfinden, d.h. die verschiedenartigsten Umweltreize müssen einheitlich in Nukleotidsequenzen verwandelt werden können. Für einen mehrzelligen Organismus kann dies nur das Nervensystem zusammen mit seinen Rezeptoren tun.

Wir sind im übrigen aufgrund vieler experimenteller Daten aus den verschiedensten Fachgebieten der Auffassung, daß die Proteine als terminale Codemoleküle in großen Massen in den Nervenzellkörpern lagern und über den elektrischen Code¹ zur Wirkung kommen⁵. Die Ausbildung der synaptischen Verknüpfungen wäre nach unserer Auffassung nur als Primärprozeß der chemischen Informationsspeicherung zu bezeichnen. Ferner fassen wir Peptidhormone, Regulationsstoffe (z.B. Chalone), Enzyme und Membranproteine zum Oberbegriff der mobilen und sessilen *Informations- oder Steuerproteine* zusammen. Sie würden durch elektrische Ableitung der zwischenmolekularen Wechselwirkungsenergie zur Wirkung kommen¹. Ihr Informationsgehalt würde in der molekularen Orbitalmorphologie thermodynamisch stabiler Molekülkonformationen liegen⁵.

Um den Einfluß der Umwelt bei der Krebsentstehung besser zu verstehen, betrachten wir das Tier oder den Menschen nicht für sich allein, sondern sehen in der Umwelt seinen Reaktionspartner. Beide zusammen stellen das Ökosystem dar, dessen Verhalten als Summe vieler stochastischer Prozesse angesehen werden darf.

Wenn man das Einzugsgebiet der Sinnesorgane als individuellen Signalraum eines Lebewesens auffaßt und man die Zahl (Aufenthaltswahrscheinlichkeit) der Umweltreize in diesem Raum als Signaldichte (oder Signalkonzentration) x bezeichnet, so kann man mit einfachen Mitteln der chemischen Thermodynamik die materiellen Vertreter $P_{ök}$ und P_{en} (Proteine) der beiden Steuersysteme Umweltinformation $I_{ök}$ und genetische Infor-

mation I_{en} über reversible Gleichgewichte miteinander in Beziehung bringen (Abb. 1).

P_{ex} wäre das «neu angepaßte» Proteinmuster, welches aus der gegenseitigen Induzierung von P_{en} und $P_{ök}$ entstanden ist. P_{ex} ist das Endglied aus einem fortwährenden intrazellulären Selektionsprozeß⁶. Die der veränderten Umwelt nicht mehr adäquaten (schlechter angepaßten) Proteine ($P_{ök}$, P_{en} und P_{ex}) können mit dem «besseren» P_{ex} nicht mehr konkurrieren und verschwinden durch Abbau⁷.

Für die Änderung der Freien Enthalpie des Signalraumes der Umweltinformation bei Auftreten der Information $I_{ök}$ gelte: $I_{ök} = -\left(\frac{G_2 - G_1}{T}\right) = R \ln \frac{x_1}{x_2}$ mit $\frac{x_1}{x_2}$ als Signaldichteverhältnis⁸. Die Differenzen der Logarithmen der Signaldichten sind unmittelbar mit der Sinneswahrnehmung verknüpft, denn Informationen können nur als Unterschiede empfangen werden (z.B. Licht- und Schallfrequenzen, Intensitäten, Temperaturen, Brechungsindizes, Drücke, Volumina, Konzentrationen, Geschwindigkeiten, Kräfte, Energien usw.).

Die Summe der Einzelvorgänge bei der Umsetzung der täglichen Umweltreize an den materiellen Rezeptorstrukturen über den Reaktionszeitraum von Jahren bis Jahrzehnten würde zum «Quasireaktionsprodukt» «Alter-Mensch-Umwelt-Assoziat» im Falle des gleichmäßigen Informationseinganges *via* Nervenrezeptoren und gegebenenfalls zusätzlich zu Krebs führen, wenn außerdem an bestimmten Rezeptorgruppen massiv Umweltreize umgesetzt würden.

Der Kern unseres Modelles ist nun ein, wie wir glauben, universelles biologisches Informationsübertragungsprinzip, das wir als «reversible Produktion von Codemolekülen» oder «Prinzip der kleinsten Reaktionsinformation» bezeichnen würden. Das Wesentliche daran ist die begründete Annahme der über Nervenrezeptoren elektrisch transformierbaren Umweltinformation in RNS und Proteine und wieder zurück elektrisch von den Proteinen über die Muskel an die Umwelt (Abb. 2). Dabei wird solange Information aufgenommen und wieder abgegeben, bis nach n Informationsumläufen im Uhrzeigersinn des Schemas die Reaktionsinformation gegen Null strebt ($\Delta I \rightarrow 0$). Das ist der Fall, wenn das «Reaktionsprodukt» in sich, d.h. der Organismus als «partielles Reaktionsprodukt» mit seiner engeren Umwelt, im Gleichgewicht steht, das *ganze* System also in Ruhe ist: maximale Entropie («Kannphase» von Lern- und anderen Adaptionsprozessen). Abb. 2 und 3 beziehen sich *nur* auf den Organismus.

Man kann phänomenologisch und thermodynamisch zwei Arten von Information unterscheiden. Ihre Einführung würde unseres Erachtens übersichtliche Verhältnisse schaffen. Wir fassen die Wechselwirkung der Umwelt mit dem Organismus (Aufnahme und Abgabe von Information), also die eigentliche «Informationsübertragung», als «*Reaktionsinformation*» (oder kinetische Information) zusammen⁹. Hingegen wäre die durch den Übertra-

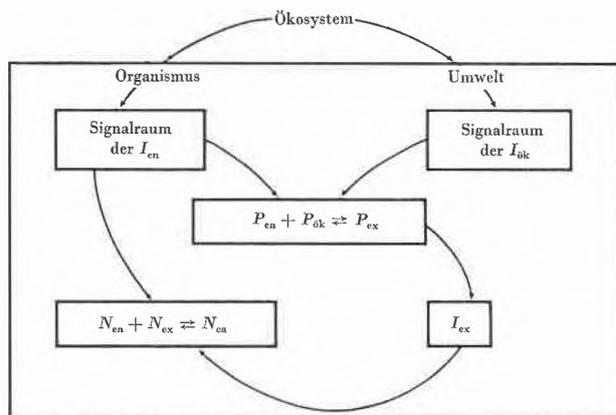


Abb. 1. *Reaktionen biologischer Steuersysteme* (z.B. Krebs). Die Wechselwirkungen zwischen der Umwelt als Steuersystem $I_{ök}$ mit dem genetischen Code als endogenes Steuersystem I_{en} induzieren die Synthese der Informationsproteine $P_{ök}$, P_{en} und P_{ex} . P_{ex} liefert als neues Steuerzentrum I_{ex} (ex-DNS in Abb. 4 bei ④), das mit I_{en} die Synthese der Tumor-DNS (N_{ca}) verursacht (Abb. 4 bei ⑤). Ferner muß gelten: $-\Delta G/T = R \cdot \ln K$ (K , siehe Abb. 1 a)

$$K = \frac{[P_{ex}]}{[P_{en}][P_{ök}]}$$

Abb. 1 a

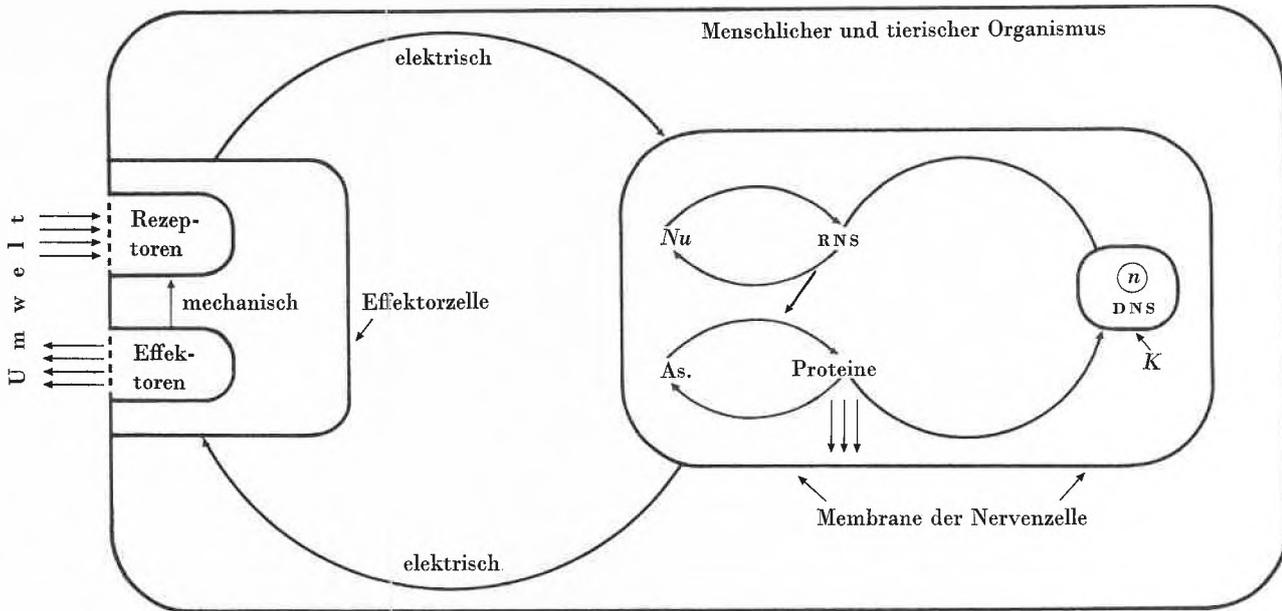


Abb. 2. *Reversibel-irreversible Proteinsynthese* (Prinzip der Steuerung Organismus/ Umwelt). Das Schema stellt den tierischen Organismus mit einer Nerven- und einer Effektorzelle dar (As. = Aminosäuren, Nu = Nucleotide, K = Kern, n = Nucleolus). Die Nervenzelle symbolisiert die Neuronen des ZNS, PNS oder des INS. Die Effektorzelle vereinigt Rezeptor und Effektor in sich (z.B. Muskel- und Epithelzellen). Übertragungsprinzip: chemisch → elektrisch → mechanisch¹

gungsvorgang chemisch gespeicherte Information als «Strukturinformation» (oder potentielle Information) zu bezeichnen⁹. Diese würde materiell durch die Codemoleküle DNS, RNS und Proteine repräsentiert (Abnahme der Entropie des Organismus).

Für die Informationsübertragung von der Umwelt über die Rezeptoren stehen zur Verfügung: das Zentralnervensystem (ZNS), das periphere (PNS) und das intramurale Nervensystem (INS = in den Organwänden lokalisiertes Nervensystem).

Es kommt nun sehr darauf an, welcher Art die eingehende Information, wie groß die Signaldichte und wie die erbliche Anlage des Nervensystems ist. Von diesen drei Parametern scheint letzten Endes die Erfolgssitua-

tion, z.B. der Entscheidung, abzuhängen, ob Lernprozesse in Gang gesetzt werden oder ob ein Carcinom entstehen soll (Abb. 3). Die von der Umweltinformation und der genetischen Information «produzierten» Informationsproteine können daher auf verschiedene Weise zur Wirkung kommen: die Verarbeitung in den Neuronen des Neocortex als Zielorgan führt zu den Denkprozessen – die Übertragung von den Neuronen des ZNS auf die Skelettmuskel steuert die Bewegungssequenz der Arbeitsprozesse.

Diese ersten beiden Gruppen von Übertragungen lassen sich unter bestimmten Bedingungen als *reversible Steuerprozesse* auffassen, weil die Erfolgsorgane aus nicht mehr teilungsfähigen Zellen bestehen (Abb. 3).

Steuerprozesse in nicht mehr teilungsfähigen Zellen: Neuronen, Muskel	Steuerprozesse in teilungsfähigen Zellen: z.B. Epithel- und Parenchymgewebe
Reversible Prozesse	Irreversible Prozesse
Lernprozesse	Altern Krebs
Monotone Signalfolge hoher Wahrscheinlichkeit. Lernphase G/T nimmt zu. Kannphase G/T bleibt gleich. Verlernen G/T nimmt ab.	Beliebige Signalfolge gleicher Wahrscheinlichkeit, statistisch verteilt auf ganzem Organismus
	Monotone Signalfolge hoher Wahrscheinlichkeit. – Bildung exogener DNS (Quasivirus-Phase?) (siehe Abb. 4 (4))

Abb. 3. *Biologische Steuerprozesse*. Lernprozesse und Krebs: hohe Signaldichte an den Rezeptoren würde zur massiven Synthese von Steuerproteinen (Veränderung des Enzymrasters, der Peptidhormone, der Membranproteine) führen

⁵ Wir sind nicht der Meinung, daß – wie vielfach angenommen wird – die Informationsübertragung in Konformationsänderungen von Membranproteinen bestehe. Dies dürfte nur eine Begleiterscheinung eines viel allgemeineren Prinzips¹ sein, das a.a.O. näher begründet wird.

⁶ Intrazelluläre und interzelluläre Selektionsprozesse müßte man beim Mechanismus der Evolution (Entstehung der Arten) ebenfalls diskutieren (siehe auch Fußnote 2).

⁷ Die hohe Signaldichte an den Rezeptoren sorgt für ständige Nachlieferung von neuer $P_{ök}$, Induktion von P_{en} und damit der Bildung von neuer P_{ex} .

⁸ x_1 würde die Signaldichte des Organismus vor der Informationsaufnahme sein und x_2 die Signaldichte der unmittelbaren Umwelt des Organismus, wobei $x_1 < x_2$ ist.

⁹ Erstmals in der Vorlesung des Autors «Kybernetische Chemie» 1971 diskutiert. Die beiden Begriffe Struktur- und Reaktionsinformation (oder potentielle und kinetische Information) wären die informationstheoretisch-thermodynamischen Entsprechungen für das in der Biologie verwendete Begriffspaar «Struktur und Funktion». Erst seit kurzem beginnt man in der Biologie die sehr enge Kopplung oder besser die gegenseitige Bedingung von Struktur und Funktion besonders zu beachten und hervorzuheben.

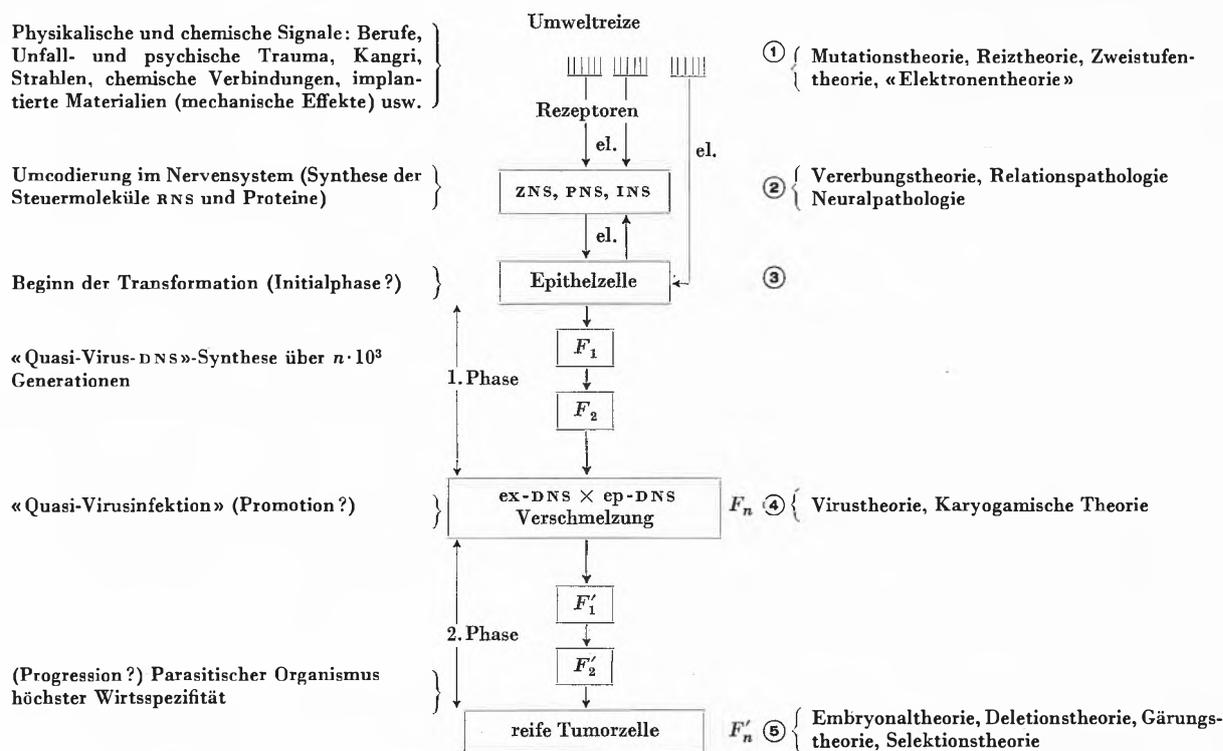


Abb. 4. Mechanismus der Carcinogenese: el. = elektrische Codierung der Umweltreize bzw. der Informationsproteine. – $F_1 \dots F_n$ = Anzahl der Zellteilungen und Entstehung der exogenen DNS. – $F'_1 \dots F'_n$ = nach der Verschmelzung entstandene Generationenfolge bis zur reifen Tumorzelle. – Die Rezeptoren an der Epithelzelle bei ③ bedeuten zweierlei: sie symbolisieren z. B. Rezeptorstellen an der Oberfläche der Auskleidung der Hohlorgane. Es kann sich auch um eine Zelle in Gewebekultur handeln, wobei ihr Membransystem als «zelluläres Nervensystem» arbeitet. Übertragungsprinzip: chemisch \rightarrow elektrisch \rightarrow mechanisch¹

Eine weitere Gruppe der Erfolgsorte sind die *Epithel- und Bindegewebszellen der inneren Organe*¹⁰. Wegen der hohen Teilungsrates der Epithelzellen und der allgegenwärtigen Umweltreize verlaufen alle Prozesse irreversibel. Zu ihnen gehören das Altern und der Krebs.

Die Irreversibilität dieser Prozesse ist begründet in der ständigen Erneuerung der Deckgewebe, z. B. der Magenschleimhaut oder des Bronchialepithels. Aber die neu entstandenen Epithelzellen sind nie mehr dieselben der vorangegangenen Generationen. Wenn man das Krebsalter des Menschen mit 60 Jahren ansetzt, so sind bei einem solchen Menschen 6000 bis 9000 Zellgenerationen vorbeigezogen und die Zellen der 9000sten Generation sind nicht mehr mit den Zellen der ersten Generationen identisch¹¹ (siehe Abb. 4, ③ \rightarrow ④). In ganz analoger Weise verändert sich eine Zellkultur. Wegen des großen Unterschiedes zwischen ihrer natürlichen Umwelt im Organismus und dem Kulturmedium wäre die Umsteuerung schon nach wenigen Generationen beendet¹².

Die einzelnen Stationen (① bis ⑤) des hier zur Diskussion stehenden Modelles haben wir sorgfältig anhand der vielen Fakten und Phänomene aus der Cancerologie geprüft¹³, z. B.:

- Einheitlichkeit des Endresultates trotz der zahlreichen heterogenen Krebsursachen.
- Altersabhängigkeit der Carcinome.

- Gewebe-, Organ- und Tierspezifität.
- Tumor nicht am Applikationsort des chemischen Cancerogens.
- Tumorresistente Tierstämme und Tumorstämme (erbliche Disposition).
- Kein Zusammenhang zwischen chemischem Cancerogen und der Tumorbildung durch Zellkulturen.

¹⁰ Es muß eine ebenso enge Beziehung zwischen Epithelzellen und Nervensystem geben, wie dies für das Muskelgewebe der Fall ist. Der Übergang vom Einzeller zu den Metazoa macht eine solche Einrichtung notwendig. Für diese finden sich auch phylogenetisch viele Hinweise.

¹¹ Jede Art von Umwelt und ihr jeweiliger menschlicher Reaktionspartner erzeugen zusammen ihre spezifische «exo-DNS». Daher dürfte es kaum tumorspezifische Antigene geben, höchstens nach vielen Tierpassagen oder von Virustumoren.

¹² Siehe die in diese Richtung weisenden Fakten und Phänomene, wie sie von R. SCHINDLER beschrieben sind: R. SCHINDLER, *Die tierische Zelle in Zellkultur*, Reihe «Fortschritte der Krebsforschung», Springer, Berlin/Heidelberg 1965.

¹³ R. SÜSS, V. KINZEL, J. D. SCRIBNER, *Krebs, Experimente und Denkmodelle*, Springer, Berlin/Heidelberg/New York 1970. – K.-H. BAUER, *Das Krebsproblem*, Einführung in die allgemeine Geschwulstlehre für Studierende, Ärzte und Naturwissenschaftler, 2. Auflage, Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1963. – D. SCHMÄHL, *Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren*, Editio Cantor KG, Aulendorf in Württemberg 1970. – Prof. Dr. W. DOERR, Prof. Dr. Dr. h. c. F. LINDER und Prof. Dr. G. WAGNER, *Aktuelle Probleme aus dem Gebiet der Cancerologie*, Springer, Berlin/Heidelberg/New York 1966. – F. SCHMIDT, *Krebs, Virus und Induktor*, Akademie-Verlag, Berlin 1960. – E. J. AMBROSE und F. J. C. ROE, *The Biology of Cancer*, van Nostrand, London 1966.

- Summationseffekt der cancerogenen Reize (Irreversibilität).
- Linearität der Dosis/Zeit-Wirkungsbeziehung.
- Entstehung und Verlust neoplastischer Eigenschaften in Zellkulturen.
- Reversible Tumorentstehung und -rückbildung bei regenerationsfähigen Tieren (entwicklungsphysiologische Phänomene).
- Neoplasmen durch Viren (bei Tieren).
- Abhängigkeit der Wirkung chemischer Cancerogene vom Alter der Tiere.
- Verlust der Kontakthemmung.
- Bisher keine allgemein tumorspezifischen Antigene gefunden.
- «Natürlicher Pflanzenkrebs» nur durch Bakterien.

- Keine chemische Cancerogenese bei Pflanzen beobachtet.

Ferner stützt sich das Modell auf eine umfassende Konsultation vieler Fachgebiete.

Die verschiedenen Krebs-hypothesen ergeben eine recht gute Übereinstimmung mit unserem Modell, sie sind also nicht unvereinbar mit ihm, sondern lassen sich als «Teilmechanismen» des hier vorgeschlagenen Modelles auffassen (Abb. 4, rechts).

H. SCHALTEGGER¹⁴

Institut für organische Chemie der Universität, CH-3000 Bern 9

¹⁴ Wir danken der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Universität Bern für die Unterstützung dieser Arbeit.

Präzisierung der Konstitution der Sulfonierungsprodukte von *o*-Toluidin*

Summary

Sulfonation of *o*-toluidine (1) in oleum yields only 2-amino-toluene-4-sulfonic acid (4), while the isomeric 2-aminotoluene-5-sulfonic acid (2) can be prepared solely by baking the acid sulfate salt of 1. Further sulfonation of 4 afforded 2-amino-toluene-4,5-disulfonic acid (6) whose structure was proven by deamination to toluene-3,4-disulfonic acid (8). The latter was independently synthesized from 4-aminotoluene-3-sulfonic acid (7) by successive treatment with potassium ethyl xanthate, hydrolysis and oxidation.

Im Rahmen einer größeren Arbeit wurde es nötig, 2-Amino-toluol-3,5-disulfonsäure 3 in möglichst ökonomischer Weise darzustellen. Die Synthese dieser Verbindung ist in der Literatur durch Sulfonierung von 2-Amino-toluol-5-sulfonsäure 2 beschrieben^{1,2}. Die Literaturangaben über die Synthese von 2 aus *o*-Toluidin 1 widersprechen sich jedoch zum Teil. In zwei älteren Arbeiten wird von einem Gemisch von 2-Amino-toluol-5-sulfonsäure 2 und 2-Amino-toluol-4-sulfonsäure 4 berichtet, welches bei der Einwirkung von Oleum auf 1 bei niedrigen Temperaturen entstehen soll^{3,4}. Mit einer Ausnahme⁵ wird aber sonst die Darstellung von 2 durch Backen des sauren Sulfats von 1 beschrieben⁶. Zur Abklärung der Konstitution der Mono- und Disulfonierungsprodukte von *o*-Toluidin 1 sind daher die in dieser Mitteilung beschriebenen Versuche durchgeführt worden.

Bei der chromatographischen Verfolgung der Sulfonierungsreaktion von *o*-Toluidin 1 in Oleum 20% mittels Dünnschicht- und Papierchromatographie wurde ein erstes Produkt beobachtet, welches den gleichen R_f -Wert zeigte wie die gewünschte 2-Amino-toluol-5-sulfonsäure 2. Auch die Farbnuance des mit nitrosen Gasen diazotierten und dann mit einer 5prozentigen Lösung des Dinatriumsalzes von 2-Hydroxynaphthalin-3,6-disulfonsäure (R-Salz) besprühten Flecks war die gleiche wie

diejenige einer mitchromatographierten Probe von 2. Wurde jedoch die Sulfonierung weitergeführt, so konnte wiederum chromatographisch festgestellt werden, daß aus dem ersten Sulfonierungsprodukt ein zweites entstand, welches nicht mit der gewünschten 2-Amino-toluol-3,5-disulfonsäure 3 identisch war. Das zuerst auftretende Produkt konnte also nicht 2 sein.

Die Vermutung, daß es sich beim beobachteten aus 1 gebildeten Monosubstitutionsprodukt um die zu 2 isomere 2-Amino-toluol-4-sulfonsäure 4 handeln müsse, konnte bestätigt werden, als es gelang, nur das zuerst auftretende Monosulfonierungsprodukt rein zu isolieren. Dazu wurde 1 in Schwefelsäure 100% bei maximal 50° gelöst und dann Oleum 60% zugetropft, was einen Temperaturanstieg auf 75 bis 80° bewirkte. Nachdem kein Edukt mehr dünnschichtchromatographisch nachweisbar war, wurde die Reaktionsmasse auf Eis ausgeladen und das ausgefallene Produkt aufgearbeitet (Ausbeute 77%). Das IR- und das NMR-Spektrum waren identisch mit demjenigen von 4, und auch der Schmelzpunkt des Diäthylammoniumsalzes⁷ war der gleiche wie der des aus

* Eingegangen am 29. April 1972.

¹ R. H. C. NEVILLE und A. WINTHER, *Chem. Ber.* 15 (1882) 2992; H. HASSE, *Liebigs Ann. Chem.* 230 (1885) 287.

² M. S. KISTENEVA und M. S. ROZHDESTVENSKIĪ, *Zhur. Priklad Khim* 22 (1949) 1108-12; *Chem. Abstr.* 45 (1951) 5654g.

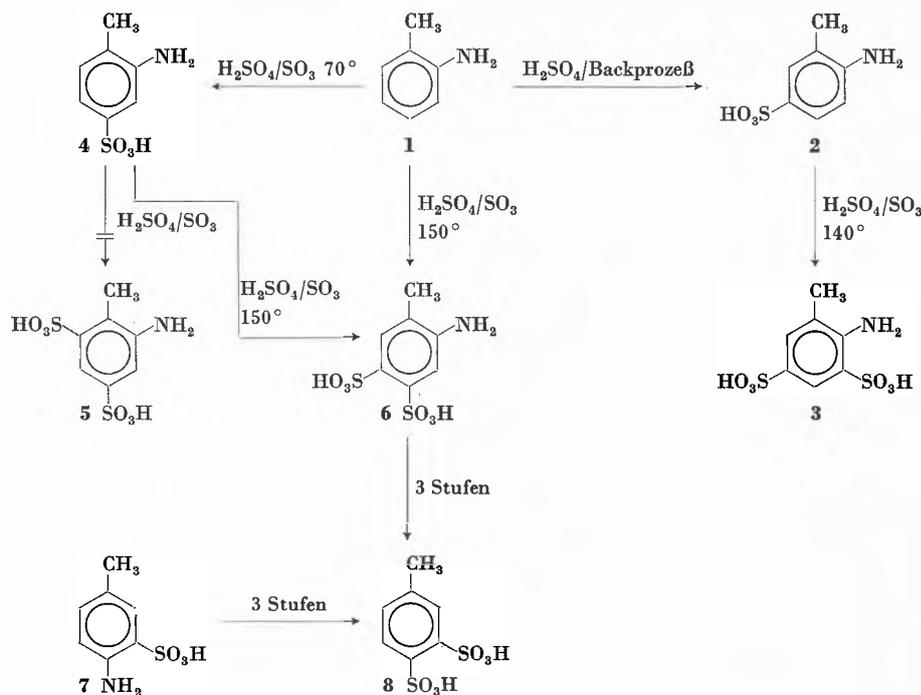
³ A. CLAUS und FR. IMMEL, *Liebigs Ann. Chem.* 265 (1891) 72.

⁴ F. GERVER, *Liebigs Ann. Chem.* 169 (1873) 374.

⁵ M. N. SCHULTZ und H. J. LUCAS, *J. Amer. Chem. Soc.* 49 (1927) 298.

⁶ a) F. A. PAGEL, *Liebigs Ann. Chem.* 176 (1875) 292. b) H. LIMP-RIECHT, *Chem. Ber.* 7 (1874) 1350. c) R. H. C. NEVILLE und A. WINTHER, *Chem. Ber.* 13 (1880) 1941. d) C. F. H. ALLEN und J. A. VAN ALLAN, *Org. Synth.* 27 (1947) 88. e) Z. SKROWACZEWSKA, *Trav. Soc. Sci. Lettres Wroclaw Ser. B* 61 (1953) 5-53; *Chem. Abstr.* 48 (1954) 7569e. f) W. HUBER, *Helv. Chim. Acta* 15 (1932) 1372. g) BIOS *Final Report* 986, 441; 1153, 173.

⁷ S. MORITA und M. SUGAHARA, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.* 72 (1951) 621; *Chem. Abstr.* 46 (1952) 6039h.



4 dargestellten Salzes. Nun wurden auch die Präparationen von M.N. SCHULTZ und H.J. LUCAS⁵ wiederholt und eindeutig festgestellt, daß dabei nicht 2, sondern 4 entstand. 2 kann aus 1 also nur durch Backen des sauren Sulfats dargestellt werden, während 4 bei der Sulfierung von 1 in schwefelsäurer Lösung entsteht⁸.

Wurde jedoch die oben beschriebene Sulfierungsreaktion mit etwas mehr Oleum und bei 140 bis 150° durchgeführt, so wurde – wie oben erwähnt – eine unbekannte wasserlösliche Verbindung erhalten. Eine zweimal umkristallisierte Probe wurde mit Nitritlösung titriert, und auf Grund des Verbrauches mußte auf eine Amino-toluol-disulfonsäure geschlossen werden, was durch die Mikroanalyse bestätigt werden konnte. Das NMR-Spektrum zeigte zwei starke Singulets bei 7,83 δ und 7,48 δ für die aromatischen Protonen, was anzeigte, daß diese Protonen in *p*-Stellung zueinander stehen mußten. Das Singulett der Protonen der Methylgruppe konnte bei 2,20 δ beobachtet werden, worauf angenommen wurde, daß in *o*-Stellung zur Methylgruppe keine Sulfonsäuregruppierung stand. Bei der isolierten Substanz mußte es sich also um 2-Amino-toluol-4,5-disulfonsäure 6 und nicht wie zuerst angenommen um die unbekannte 2-Amino-toluol-4,6-disulfonsäure 5 handeln. Die Synthese von 6 ist ein einziges Mal in der Literatur⁹ beschrieben, und zwar durch Reaktion von 4 mit Chlorsulfonsäure.

Wurde nun versucht, 6 zu entaminieren, so mußte festgestellt werden, daß unterphosphorige Säure¹⁰ oder Formiat¹¹ das aus 6 dargestellte Diazoniumsalz nicht zu einem einheitlichen Produkt reduzierten, während mit Zinnchlorid die 2-Hydrazino-toluol-4,5-disulfonsäure¹² erhalten wurde. Behandlung mit Kupfersulfat führte dann zu Toluol-3,4-disulfonsäure 8¹³. NMR-Spektrum und IR-Spektrum von 8 waren identisch mit denjenigen,

die von einem Vergleichspräparat stammten. Dieses wurde aus 4-Amino-toluol-3-sulfonsäure 7 durch Diazotieren, Versetzen des Diazoniumsalzes mit Kaliumäthylxanthogenat, Hydrolyse des entstandenen Thioesters und Oxidation mit Permanganat erhalten^{9,14}.

Papierchromatographie. Aufsteigende Methode; Fließmittel: 160 Volumenteile Trinatriumcitrat-Lösung 1,45% und 40 Volumenteile Ammoniak 25%; Identifikation: Diazotierung mit nitrosen Gasen und Besprühen mit R-Salz-Lösung 5%.

Dünnschichtchromatographie. Fließmittel: 100 Volumenteile Benzol, 175 Volumenteile Methanol, 88 Volumenteile *n*-Pentanol-1, 40 Volumenteile Toluol, 62 Volumenteile Wasser; Identifikation: UV-Licht 254 nm.

Elementaranalysen. Die Analysen der hier beschriebenen Verbindungen stimmen innerhalb der normalen Fehlergrenzen mit den Bruttoformeln überein.

Diäthylammoniumsalze⁷. Von 2, 4, und 6 können Diäthylammoniumsalze dargestellt werden, während sich von 3 kein solches Derivat isolieren ließ. Zur Herstellung der Salze werden die Säuren in Äthanol suspendiert, mit Diäthylamin versetzt und das entstandene Gemisch am Rückfluß bis zur vollständigen Lösung gekocht. Beim Abkühlen fällt dann das gewünschte Derivat an, welches durch Umkristallisation in Äthanol gereinigt werden kann.

Diäthylammoniumsalz von 2 aus 10 g 2, 10 g Diäthylamin und 90 ml Äthanol. Smp. 165°.

⁸ 2-Amino-toluol-4-sulfonsäure 4 wird meist durch Reduktion der leicht zugänglichen 2-Nitro-toluol-4-sulfonsäure hergestellt. Vgl. H. LIMPRICHT, *Liebigs Ann. Chem.* 221 (1883) 212. C. F. H. ALLEN und G. F. FRANCE, *J. Org. Chem.* 7 (1942) 15.

⁹ W. P. WYNNE und J. BRUCE, *J. Chem. Soc.* 73 (1898) 731.

¹⁰ a) N. KORNBLUM, *Org. Synth. Coll.* 3 (1955) 295. b) L. F. FIESER und M. FIESER, *Reagents for Organic Synthesis*, Wiley, New York 1967, S. 489. c) HOUBEN-WEYL, *Methoden der organischen Chemie*, 4. Auflage, Thieme, Stuttgart 1965, X/3, 131.

¹¹ Vgl. 10 c, X/3, 137.

¹² Vgl. 10 c, X/2, 201.

¹³ Vgl. 10 c, X/2, 498.

¹⁴ P. KLASON, *Chem. Ber.* 20 (1887) 350. DRP 70 296 (1892).

2-Amino-toluol-4-sulfonsäure 4. Zu 240 ml Schwefelsäure 100% werden innert 35 Minuten 107 g (1 Mol) *o*-Toluidin 1 so zugetropft, daß die Temperatur der entstehenden Lösung bei eventueller Außenkühlung 50° nicht überschreitet. Sofort anschließend werden innert 70 Minuten 120 ml Oleum 60% zum Reaktionsgemisch getropft, wobei die Temperatur auf 76° ansteigt. Die Reaktion wird nun mittels entnommener Proben verfolgt, welche diazotiert, auf β -Naphthol gekuppelt und auf der Talksäule chromatographiert werden. Nach 30 bis 40 Minuten ist kein 1 mehr feststellbar, und das Reaktionsgemisch kann vorsichtig auf 1000 g Eis ausgeladen werden. Aus der anfallenden Suspension (Temperatur -5°) kann 4 durch Vakuumfiltration isoliert werden. Das Produkt wird auf der Nutsche mit Eiswasser gewaschen, bis das auslaufende Filtrat pH 3 erreicht hat. Nach der Trocknung bei 80° liegen dann 144,8 g 4 mit einem Nitrittiter von 100% vor, was einer Ausbeute von 77,4% entspricht. NMR-Spektrum in D₂O + NaOD: 7,55 bis 7,42 δ (m, 3H), 4,75 δ (s, 3H), 2,32 δ (s, 3H).

Diäthylammoniumsalz aus 10 g 4, 10 g Diäthylamin und 250 ml Äthanol. Smp. 195°.

2-Amino-toluol-4,5-disulfonsäure 6. Die Synthese von 6 bedingt das gleiche Vorgehen wie das für die Synthese von 4 beschriebene, nur müssen 50 ml Oleum 60% mehr zugegeben und anschließend das Reaktionsgemisch 20 Stunden bei 140° gerührt werden. Man läßt die Temperatur des Kolbeninhalts an-

schließend auf 80° fallen, läßt dann auf 2000 g Eis aus und isoliert das angefallene Produkt mittels Vakuumfiltration. Das gut abgesogene Material wird bei 80° getrocknet, und man erhält so 211,5 g rohes 6 mit einem Nitrittiter von 85,5%, was einer Ausbeute von 67,7% entspricht. Durch zweimalige Umkristallisation einer Probe in viel Wasser kann ein analysenreines Präparat erhalten werden.

NMR-Spektrum in D₂O + NaOD: 7,83 δ (s, 1H), 7,48 δ (s, 1H), 4,72 δ (s, 4H), 2,20 δ (s, 3H).

Wird nach dem Ausladen auf Eis zur 2600 ml umfassenden Suspension 520 g Kochsalz gegeben, so erhält man 344 g rohes Mononatriumsalz von 6 mit einem Nitrittiter von 73,7% (bezogen auf freie Säure), was einer Ausbeute von 95,3% entspricht.

Werden 187 g 4 in 200 ml Schwefelsäure 100% suspendiert, dann analog obigem Vorgehen mit 166 ml Oleum 60% sulfuriert und ausgesalzen, so werden 313,5 g trockenes rohes Mononatriumsalz von 6 mit einem Titer von 75,1% (bezogen auf das Mononatriumsalz) erhalten, was einer Ausbeute von 81,4% entspricht.

Diäthylammoniumsalz aus 10 g 6 (freie Säure), 20 g Diäthylamin, 100 ml Äthanol und 20 ml Wasser. Smp. 203 bis 204°.

ALFRED COURTIN und KURT BRENNEISEN

Farbstoff-Forschung der SANDOZ AG, Basel (Schweiz)

Apparatus for Measuring Phosphorescence Decay Curves*

Summary

A rotating shutter phosphoroscope has been developed. It can easily be attached to a commercial spectrofluorophosphorimeter and allows, in combination with a time-averaging technique, a sensitive measurement of phosphorescence decay curves.

Introduction

Instrumentation for the measurement of phosphorescence spectra and for the determination of phosphorescence decay functions has been summarized by PARKER¹, CALVERT and PITTS², HERCULES³, and GUILBAULT⁴. Most of the described instruments use continuously rotating sector disks^{5,6} or rotating cylinders^{7,8} in order to eliminate scattered light and fluorescence. When measuring phosphorescence decay curves of compounds with low phosphorescence quantum yields or long lifetimes, considerable problems arise due to the low light intensities. The application of modern methods of signal processing is still relatively new in the field of optical spectroscopy. For the determination of phosphorescence decay functions, the method of time-correct summation or time averaging of the individual phosphorescence decay curves is especially well suited. A more refined method using a small computer and data sampling with non uniform intervals has recently been described by KÄNZIG, WILD, and PERONE⁹.

In this paper we describe an attachment to a commercial Aminco-Bowman-Spectrofluorophosphorimeter. It consists of a stepmotor and a triggered stepmotor drive unit. A time-averaging computer controls the phosphoro-

scope shutter function and allows the summing of individual decay curves. The data are stored in the time-averaging computer and may be displayed on an oscilloscope or an *x-y* recorder¹⁰.

For strong phosphorescence signals, where signal averaging does not prove to be necessary, the phosphoroscope can be directly controlled by an oscilloscope.

Description of the Apparatus

Signal averager control. The block diagram of the spectrofluorophosphorimeter/signal averaging computer system is shown in Fig. 1. The phosphorimeter was a modified

* Received Mai 1, 1972.

¹ C. A. PARKER, Phosphorescence and Delayed Fluorescence, *Advances in Photochemistry*, ed. by W. A. NOYES jr., G. S. HAMMOND, and J. N. PITTS jr., Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons, New York 1964.

² J. C. CALVERT and J. N. PITTS, *Photochemistry*, John Wiley & Sons, New York 1966.

³ D. M. HERCULES, *Fluorescence and Phosphorescence Analysis*, Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons, New York 1966.

⁴ G. G. GUILBAULT, *Fluorescence, Theory, Instrumentation, and Practice*, Marcel Dekker, Inc., New York 1967.

⁵ G. R. HAUGEN and R. J. MARCUS, *Appl. Optics* 3 (1964) 1049.

⁶ D. E. THOMAS and K. COLBOW, *Rev. Sci. Instr.* 36 (1965) 1853.

⁷ G. N. LEWIS and M. KASHA, *J. Amer. Chem. Soc.* 66 (1944) 2100.

⁸ American Instrument Co., Inc., Bulletin No. 2334, Silver Spring (Maryland).

⁹ HERBERT KÄNZIG, URS P. WILD, and S. P. PERONE, *Chem. Instrumentation 1972*, in press.

¹⁰ W. A. KUMMER, Thesis, University of Zürich, 1969.

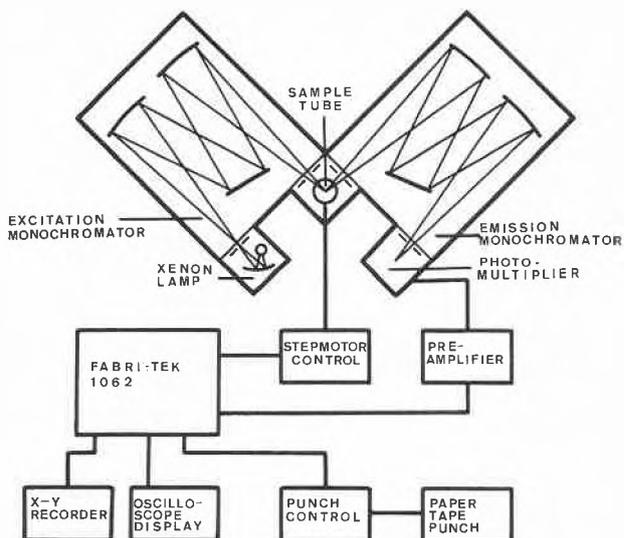


Fig. 1. Block diagram of the phosphorimeter signal averager system

Aminco-Bowman-Spectrofluorometer* Model 4-8202. The excitation source was a 150 W Xenon lamp with a 4-8208 off-Axis Ellipsoidal Mirror Condensing System. The complete sequence of the experiment is controlled by the signal averager Fabri-Tek 1062** with sweep control unit SW-2C and signal digitizer SD-2/2. The sequence of the measurements is shown in Fig.2. The number N of the individual curves to be summed and the dwell time per channel τ ($50 \mu\text{s}$ to 200 ms in 1, 2, 5 steps) is chosen on the signal averager ($N = 2^k$; $0 \leq k \leq 8$). This gives measuring times τ_M ranging from 50 ms to 200 s per single curve when using 1024 channels. Furthermore, the delay time τ_W before each measurement ($\tau_W = \tau_M \cdot 2^s$; $-4 \leq s \leq 4$) can be chosen. During this delay time, the sample tube is irradiated with monochromatic light from the excitation monochromator, the signal averager is in the "wait" mode, and the path to the emission monochromator is blocked by the phosphoroscope. After completion of the delay time, the

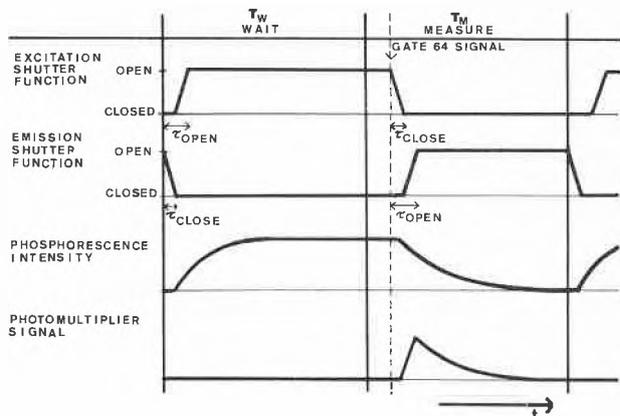


Fig. 2. Sequence of measurements

* American Instrument Co., Inc., Washington (D.C.).
 ** Fabri-Tek Instruments, Inc., Madison (Wisconsin) 53711.

signal averager enters the "measure" mode and digitizes the photomultiplier signal with 10 bit resolution. This value is added to the content of the corresponding channel and stored in the memory. The first 64 channels are used to establish a base line, after which the Fabri-Tek outputs a rectangular shaped signal "gate 64". The stepmotor responds to the positive slope of the "gate 64" signal with a clockwise rotation of the shutter motor by 90° . The exciting light beam is thus interrupted after a time τ_{close} ($= 5 \text{ ms}$), and the light path to the emission monochromator is opened after a time τ_{open} ($= 14 \text{ ms}$). The actual measurement of the phosphorescence decay function then begins. At the end of this measurement, the negative slope of the "gate 64" signal causes a counterclockwise rotation of the shutter motor by 90° and initiates a new delay and excitation period. The alternating clockwise and counterclockwise rotation of the stepmotor provides exactly reproducible conditions for each measurement. In particular, periodic errors arising from mechanical differences between successive shutter openings are eliminated.

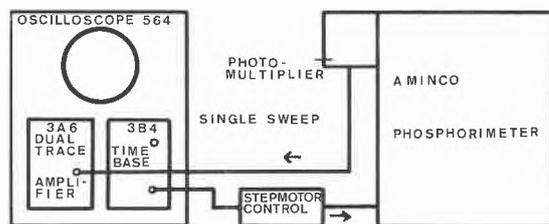


Fig. 3. Block diagram of the phosphorimeter-oscilloscope system

Oscilloscope control. Direct observation of the decay curve on an oscilloscope is easily possible (Fig.3). A storage oscilloscope* Tektronix type 564 with a vertical unit type 3A6 Dual-Trace Amplifier and a horizontal unit type 3B4 Time Base was used. The oscilloscope is operated in the store and single sweep mode. The rising

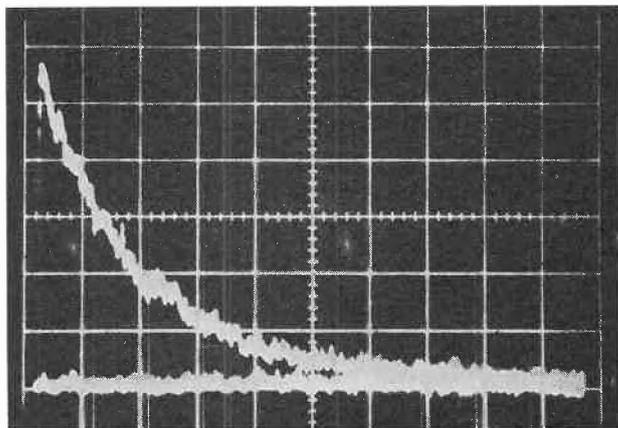


Fig. 4. Phosphorescence decay curve of adenine at 77 K (horizontal axis: 2 s/division)

* Tektronix, Inc., Beaverton (Oregon) 97005.

edge of the gate pulse is used to initiate the shutter rotation, and at the end of this pulse the falling edge restores the shutter to its original position.

Fig.4 shows a typical measurement consisting of a decay curve and a reference base line.

Instrumental

Phosphoroscope. The phosphoroscope (Fig.5) consists of a thin-walled (0.3 mm) rotating aluminium cylinder surrounding the emitting sample. The cylinder, which has two opposite apertures, has a diameter of 34 mm and a height of 52 mm. This gives a moment of inertia of 12 g cm² and guarantees a correct stepmotor* response up to 80 Hz. The stepmotor is driven by a LITTON stepmotor controller block (type LITTON CPPC P/N-52900000-1). A circuit, which can easily be constructed (Fig.6), differentiates the incoming gate-signal and drives the controller block. Clockwise and counterclockwise rotation of the phosphoroscope by single steps can also be obtained by push-button controls.

Photomultiplier unit (Fig.7). A photomultiplier tube type R-213** with a spectral response from 2000 Å to 8000 Å and a low dark current (Equivalent Anode Dark Current input = 5×10^{-9} Lm) was used in this work. High voltage*** (1000 V, 25 mA). The time constant of the system was determined by an RC network and could be varied by adjustments to R (0→100 MΩ) and C (20 pF → 1000 μF).

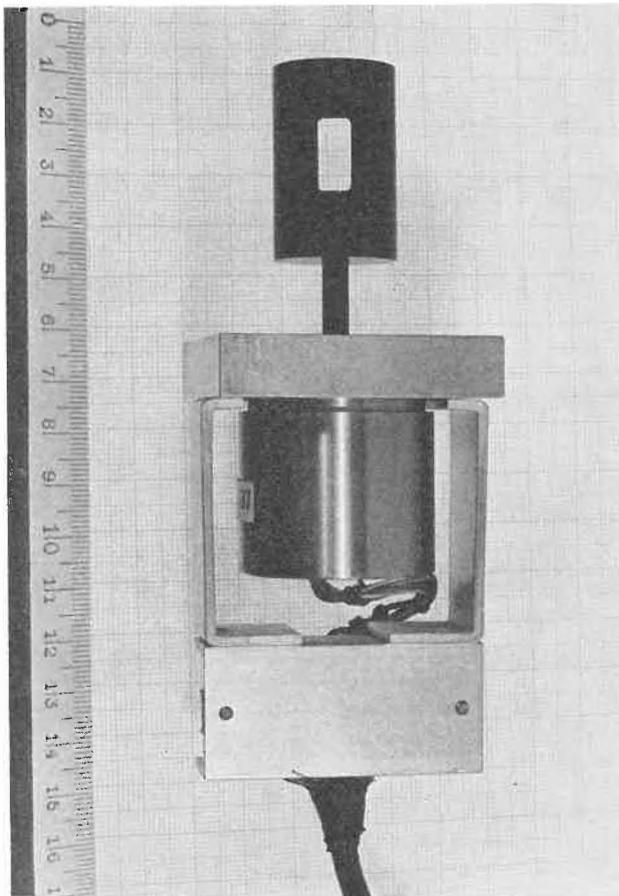


Fig. 5. Phosphoroscope shutter

* Litton MSA-15-A-1, Litton Industries, Drexel Hill (Penns.) 19026.
 ** Hamamatsu TV Co., Ltd., Hamamatsu-City (Japan).
 *** Witmer Elektronik, Erlenbach/Zürich.

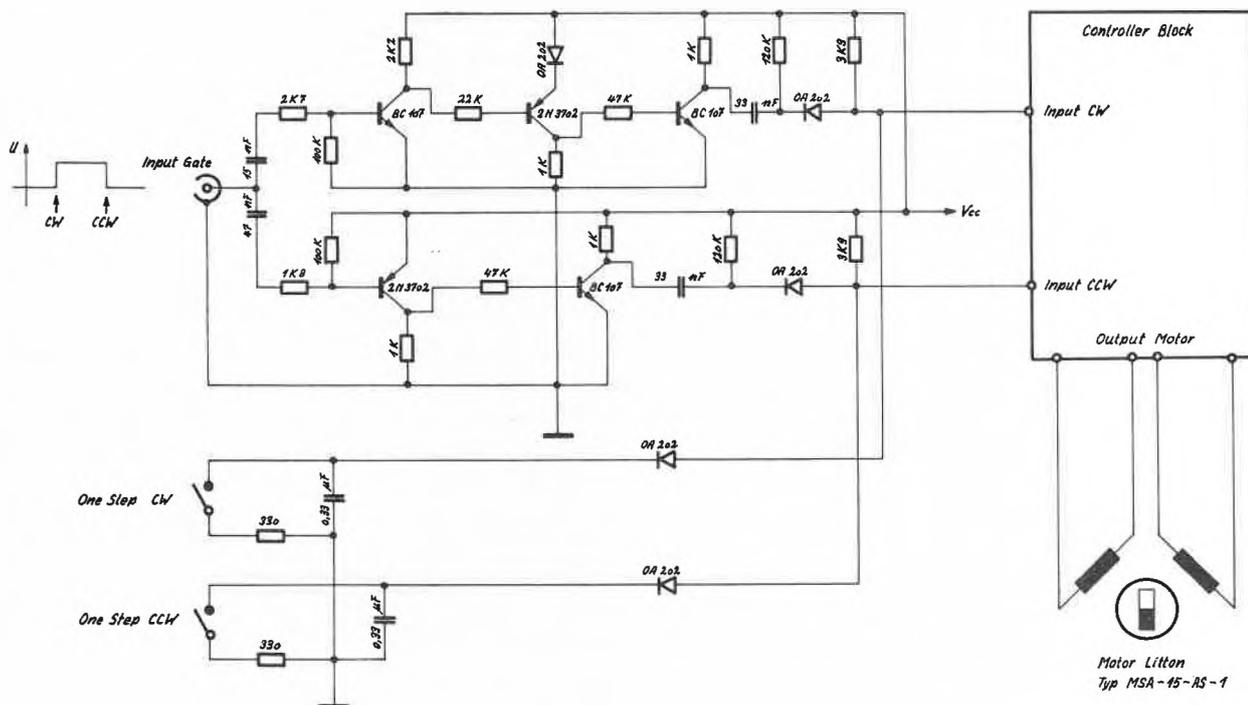


Fig. 6. Stepmotor control unit

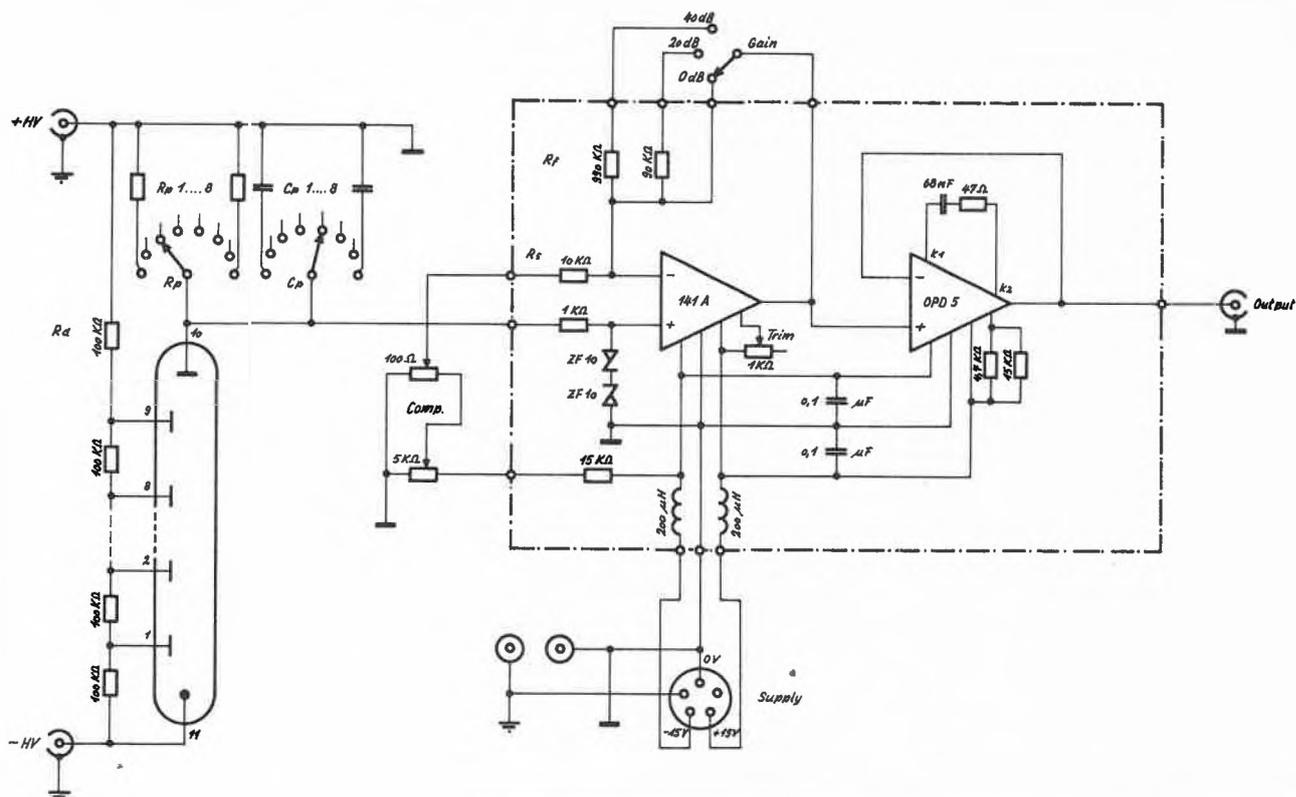


Fig. 7. Photomultiplier unit

Switch position	1	2	3	4	5	6	7	8
R_p (M Ω) 1%	0	1	2.2	4.7	10	22	47	100
C_p (nF) 10%	0.02	1	4.7	10	47	100	470	1000

The circuit consists of two operational amplifier units. The first of these* has a high input impedance and serves as a buffer amplifier. Its input is protected by ZENER diodes and the photomultiplier dark current can be compensated. The device is dc-coupled and the gain can be varied by 0, 20, and 40 dB. The second operational amplifier** is used to give power gain and low output impedance.

Results

The phosphorescence decay curve of a 2×10^{-4} mol dm $^{-3}$ solution of adenine (puriss., Fluka AG, Buchs SG) in an ethylene glycol/H $_2$ O/0.1-n HCl glass of pH = 2 was measured at 77 K. The sample was degassed by multiple freezing-pumping-thawing cycles in high vacuum. It was sealed off in a 1 mm 2 cylindrical quartz tube which was inserted in a home-built metallic DEWAR container filled with liquid nitrogen. Cooling of the sample occurs through heat conduction; no part of the optical light beam passes through liquid nitrogen.

The decay curves using the signal averaging technique are shown in Fig. 8 for 1, 8, and 64 sweeps. The times τ_W and τ_M were both 20 s. After 8 and 64 sweeps the theoretical improvements in signal to noise ratio of $\sqrt{8} = 2.8$

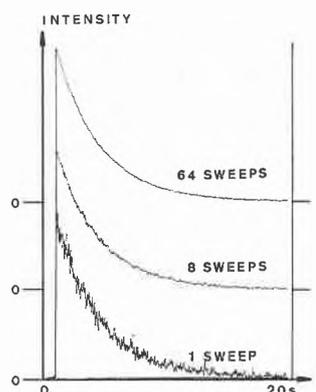


Fig. 8. Phosphorescence decay curves of adenine at 77 K (sweep duration: 20 s)

and $\sqrt{64} = 8$ respectively were observed. By subtracting the base line from the original data and taking the logarithm (operations which can be performed by Fabri-Tek hardware) the curve of Fig. 9 was obtained. This immediately shows that the decay followed a first-order law over 3 lifetimes. The phosphorescence decay time $\tau = 3.5$ s is in good agreement with other published values¹¹.

* 141 A Analog Devices, Inc., Cambridge (Mass.) 02142.

** OPD 5, Philips AG, Eindhoven (Holland).

¹¹ J. W. LONGWORTH, R. O. RABN, and R. G. SHULMAN, *J. Chem. Physics* 45 (1966) 2936.

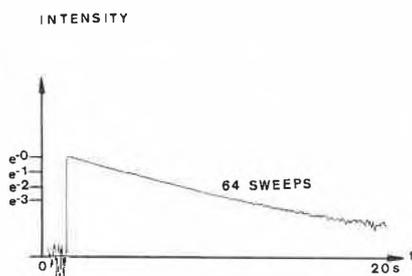


Fig. 9. Phosphorescence decay curve of adenine at 77 K. Logarithmic display (sweep duration: 20 s)

Acknowledgements

We want to thank Prof. Dr. Hs. H. GÜNTARD for his generous support, and Mr. LAMBILLOTTE and Mr. BOSS for the careful construction of the equipment. Financial support from Sandoz AG, Basel, and a postdoctoral fellowship of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to one of us, U.T.K., is gratefully acknowledged.

URSULA T. KREIBICH, WALTER A. KUMMER,
and URS P. WILD

Physical Chemistry Laboratory, Swiss Federal Institute of Technology
CH-8006 Zürich (Switzerland)

Synthese eines Dekapeptids mit der biologischen Aktivität des Schweine-LH-Releasing-Faktors

Summary

A synthesis of a decapeptide with the biological activity of the LH releasing factor is described. By coupling N- and side chain protected amino acids to the glycine resin the peptide resin with the desired amino acid sequence is built up. By cleavage with DMF/NH₃ the following protected peptide is obtained:

Boc-Pyrogly-His (DNF)-Trp-Ser (Bzl)-Tyr (Bzl)-Gly-Leu-Arg-(NO₂)-Pro-Gly-NH₂

After treatment with CH₂Cl₂/TFA, 2-mercaptoethanol and hydrogenation the product is purified on a Sephadex G 25 column. The LH releasing activity is compared with an extract of the *eminentia mediana*.

Im Zusammenhang mit der Aufklärung von Wirkungsmechanismen biologisch aktiver Peptide und systematischen Untersuchungen zur Verbesserung von Peptidsynthesen¹⁻³ möchten wir hier über die Darstellung eines Peptids mit der biologischen Aktivität des kürzlich aufgeklärten Releasing-Faktors⁴⁻⁶ des luteinisierenden Hormons und follikelstimulierenden Hormons berichten, dessen Wirkungen wir in Zusammenarbeit mit den Tübinger Kliniken⁷ untersuchen.

Zur Peptidsynthese werden die folgenden Boc-L-Aminosäuren hergestellt^{2,8}: *Boc-Gly* (Schmp. 93–94°C, Lit. 85–89°C), *Boc-Pro* (Schmp. 133–134°C, $[\alpha]_D^{20} - 64^\circ$ [AcOH]; Lit. 136–137°C, $- 60^\circ$), *Boc-Nitro-Arg* (Schmp. 121–123°C, $[\alpha]_D^{20} - 5^\circ$ [DMF]; Lit. 115–116°C, $- 5,9^\circ$), *Boc-Leu* (Schmp. 82–85°C, $[\alpha]_D^{20} - 27,5^\circ$ [AcOH]; Lit. 74–80°C, $- 24^\circ$), *Boc-O-Benzyl-Tyr* (Schmp. 108–110°C, $[\alpha]_D^{20} 11^\circ$ [AcOH]; Lit. 109–110°C, $[\alpha]_{578}^{18-25} 5,5^\circ$), *Boc-O-Benzyl-Ser* (Schmp. 55–58°C, $[\alpha]_D^{20} 18,8^\circ$ [Äthanol]; Lit.⁹ 56–58°C, $19,8^\circ$). *Boc-Trp* (Schmp. 134–136°C, $[\alpha]_D^{20} - 21^\circ$ [AcOH]; Lit. 136,5 bis 140,5°C, $- 18,2^\circ$), *Boc-Glu* (Schmp. 110–112°C, $[\alpha]_D^{20} - 15^\circ$ [AcOH]; Lit. 110–112°C, $[\alpha]_{578}^{20} - 15,2^\circ$).

Boc-2,4-Dinitrophenyl-His (Schmp. 93°C, $[\alpha]_D^{20} + 52,7^\circ$ [Essigester]; Lit.¹⁰ 94°C, $+ 55,3^\circ$) wird aus His über His-OME · 2HCl, His-OME, Boc-His-OME, Boc-His dargestellt.

Boc-Pyro-Glu (Schmp. 115–116°C, $[\alpha]_D^{20} - 35^\circ$ [AcOH]; Lit.¹¹ 115–116°C, $- 35,3^\circ$) wird aus Glu über Boc-Glu,

Boc-Glu-O, Boc-Pyro-Glu · DCHA dargestellt.

Zur Peptidsynthese wird Boc-Gly mit chlormethyliertem Harz in absolutem Äthanol und Triäthylamin 24 Stunden lang bei 95° verestert. Das Glycinharz hat eine Beladung von 0,35 m Mol Gly/g Harz.

Nach Waschen mit CH₂Cl₂, Abspalten der Boc-Gruppe mit TFA/CH₂Cl₂ (1:1), Waschen mit CH₂Cl₂ (2 ×), C₂H₅OH (1 ×), CH₂Cl₂ (2 ×), Neutralisieren mit CH₂Cl₂/Triäthylamin (1:2), Waschen mit CH₂Cl₂ (1 ×), C₂H₅OH (2 ×) und CH₂Cl₂ (3 ×) werden die oben unterstrichenen Boc-Aminosäuren in der Reihenfolge des Peptides in 50prozentigem Überschuß mit DCC in CH₂Cl₂ an das wachsende Peptid gekuppelt. Die Kupplungsreaktion wird zweimal durchgeführt. Pro geschützte Aminosäure wird die hier skizzierte Reaktion jeweils wiederholt. Die Waschungen und Kupplungen der tryptophanhaltigen Peptidharze werden in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt; die Boc-Gruppe wird von denselben unter Stickstoff bei +10°C entfernt.

¹ W. VOELTER, J. D. YOUNG, M. SHIMIZU, C. Y. LEUNG und E. BENJAMINI, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 352 (1971) 6.

² W. VOELTER, K. ZECH und G. JUNG, *Tetrahedron* [London] 28 (1972) 2649.

³ J. D. YOUNG, W. VOELTER, M. SHIMIZU, C. Y. LEUNG, W. J. PETERSON und E. BENJAMINI, *Peptides*, im Druck.

⁴ A. V. SCHALLY, A. J. KASTIN und A. ARIMURA, *Fertility & Sterility* 22 (1971) 703.

⁵ P. RIVAILLE, A. ROBINSON, M. KAMEN und G. MILHAUD, *Helv. Chim. Acta* 54 (1971) 2772.

⁶ R. GEIGER, W. KÖNIG, H. WISSMANN, K. GEISEN und F. ENZMANN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45 (1971) 767.

⁷ E. GUPTA, K. ZECH und W. VOELTER, in Bearbeitung.

⁸ E. SCHNABEL, *Liebigs Ann. Chem.* 702 (1967) 188.

⁹ V. J. HRUBY und K. W. EHLER, *J. Org. Chem.* 35 (1970) 1690.

¹⁰ F. CHILLEMI und R. B. MERRIFIELD, *Biochemistry* 8 (1969) 4344.

¹¹ E. SCHRÖDER und E. KIEGER, *Liebigs Ann. Chem.* 673 (1964) 196.

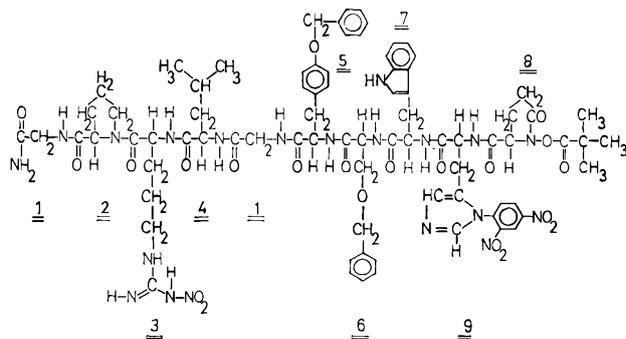


Abb. 1. Struktur des vom Harz durch Ammonolyse gespaltenen Dekapeptids 10

Das Dekapeptid 10 wird durch Ammonolyse¹² vom Harz getrennt und die terminale Boc-Gruppe mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (1 : 1) in Gegenwart von 10% Thioglykolsäure abgespalten. Der 2,4-Dinitrophenylrest wird mit 2-Mercaptoäthanol bei pH 8 vom Histidin entfernt. Zum Abspalten der restlichen Schutzgruppen wird anschließend in Methanol/Eisessig/Wasser mit Pd/H_2 hydriert. Aus Dimethylformamid-Äthanol wird mit Äther-Petroläther gefällt und das Produkt über eine Sephadex G-25-Superfine-Säule gereinigt.

Die LH-Freisetzung aus der Hypophyse wird *in vitro* nach 1 bis 3 Stunden geprüft. LH wird radioimmunologisch bestimmt (Standard-NIAMD-Rat-LH-1). Das Dekapeptid führt ebenso wie der Extrakt aus der *eminentia mediana* zu einer erheblichen Sekretion von LH. Demgegenüber ist ein Extrakt aus dem Cortex unwirksam.

Alle Drehwerte sind mit einem Digitalpolarimeter OLD-5 der Firma Zeiß, Oberkochen, bestimmt. Die $[\alpha]_D$ -Werte sind durch Extrapolieren errechnet.

Abkürzungen: AcOH = Essigsäure, Arg (3) = Arginin, Boc = *t*-Butyl-oxycarbonyl, DCHA = Dicyclohexylamin, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, DMF = Dimethylformamid, Glu (8) = Glutaminsäure, Gly (1) = Glycin, His (9) = Histidin, Leu (4) = Leucin, LH = luteinisierendes Hormon, Pro (2) = Prolin, Ser (6) = Serin, Trp (7) = Tryptophan, Tyr (5) = Tyrosin.

Wir danken der Firma Zeiß für die Möglichkeit zur Messung von Drehwerten.

WOLFGANG VOELTER und KARL ZECH*

* Univ.-Doz. Dr. W. VOELTER und Dipl. Chem. K. ZECH, Chemisches Institut der Universität, 74 Tübingen, Wilhelmstraße 33.

¹² E. BAYER, E. BREITMAIER, G. JUNG und W. PARR, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 352 (1971) 759.