

clus siehe: H. Takemura, T. Shinmyozu, T. Inazu, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1323.

- [11] Auch die α/γ -Selektivität der Protonierung des Triphenylsilyllallyl-Anions läßt sich durch Verwendung von 2,6-Bis(2,6-dimethylphenyl)benzoesäure von 2:1 (Wasser/Essigsäure) auf 1:10 verändern! C. Wangnick, Dissertation, Universität Freiburg, **1991**.
- [12] Zur stereoselektiven Generierung von thermodynamisch instabilen Produkten durch H^+ -Übertragung auf 2,3-disubstituierte Succinsäureanhydrid-2-yl-Radikale siehe: a) B. Giese, J. Meixner, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 2783; b) B. Giese, G. Kretschmar, *Chem. Ber.* **1984**, 117, 3175; c) B. Giese, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 993; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 969. – Zur stereoselektiven Bildung von *cis*-Alkenen bei der H^+ -Übertragung auf 2-substituierte Vinylradikale: c) d) S. Lachhein, Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt, **1982**.
- [13] Experimentelle Details siehe auch [3, 4]. Die Aryl-1,10-phenanthroline **5** und **6** sowie die bimakrocyclischen 1,10-Phenanthroline **7** wurden analog zu [16] synthetisiert. Die Ester **6d–g** wurden über die Dihydroxyverbindung **6h** synthetisiert, die man analog zu 2,9-Bis(2,6-dihydroxyphenyl)-1,10-phenanthrolin [16] synthetisieren kann.
- [14] Die Deprotonierung der Nitronat-Ionen ist bereits nach 2 h abgeschlossen.
- [15] Bei Verwendung einer GC-Säule von Macherey & Nagel (SE 30/50 m) wurde Isomerisierung der Stereoisomere von **2a** beobachtet.
- [16] Concave Reagents 5: U. Lüning, M. Müller, *Chem. Ber.* **1990**, 123, 643.
- [17] Bei Verwendung von deutlich basischeren Puffern (z.B. NaOPh/PhOH) werden die unter kinetischer Kontrolle gebildeten Stereoisomere durch ein Protonierungs-/Deprotonierungsgleichgewicht isomerisiert.
- [18] a) S. Ram, R. E. Ehrenkauf, *Synthesis* **1986**, 133; b) A. G. M. Barrett, C. D. Spilling, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5733.
- [19] F. Y. Rachinskii, N. M. Vinokurova, *Zhur. Obshch. Khim.* **1954**, 24, 272; [*Chem. Abstr.* **1955**, 49, 4553 c].
- [20] D. J. Cram, J. E. McCarty, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 5740.

Struktur der Tunichrome von Tunicaten und deren Rolle bei der Vanadiumanreicherung

Von Ernst Bayer*, Gerhard Schiefer, Dietmar Waidelich, Silvia Scippa und Mario de Vincentiis

Professor Michael Hanack zum 60. Geburtstag gewidmet

Tunicaten (Manteltiere) können in ihren Blutzellen Vanadium auf das millionenfache aus dem Meerwasser anreichern^[1–3]. Obwohl die Vanadiumverbindung der Tunicaten vor über 80 Jahren entdeckt wurde, ist ihre Struktur noch immer nicht aufgeklärt. Gesichert ist nur, daß in *Phallusia mammillata* und *Ascidia nigra* Vanadium überwiegend dreiwertig vorliegt^[4–5]. Neben den vanadiumhaltigen Siegelring- und Kompartimentzellen finden sich weitgehend vanadiumfreie Blutzellen (Maulbeerzellen) in *P. mammillata*^[6] und *A. nigra*^[7]. Nakanishi et al.^[8–11] haben aus den Maulbeerzellen von *A. nigra* in einer sehr aufwendigen und verlustreichen Isolierung Peptide erhalten^[12], die sie Tunichrome nennen. Der Hauptkomponente wurde die Struktur eines Dipeptids aus einem β -(3,4,5-Trihydroxyphenyl)alanin und einem β -(3,4,5-Trihydroxyphenyl)dehydroalanin mit einer C-terminalen 3,4,5-Trihydroxystyrylamideinheit zugeordnet.

Da die Peptide der Blutzellen äußerst instabil und oxidationsempfindlich sind, haben wir eine sehr einfache, schnelle und mit wenig Verlusten verbundene Isolierung für die Peptide aus *P. mammillata* ausgearbeitet. Die Tunichrome lassen sich relativ selektiv aus gefriergetrockneten Zellen mit Methanol extrahieren und durch HPLC an Polystyrolphasen mit Wiederfindungsraten von 80–90% oder durch

Kapillarelektrophorese rein gewinnen oder on-line der Ionenspray-Tandem-Massenspektrometrie zuführen. Die Trennung an Umkehrphasen auf Silicagelbasis ist dagegen sehr verlustreich. Alle Operationen müssen unter Luftausschluß durchgeführt werden.

Abbildung 1 zeigt die HPLC-Trennung des Methanolextrakts. Außer drei Nebenkomponten tritt eine Hauptkomponente auf, die durch Ionenspray-MS, Tandem-MS, 1H - und ^{13}C -NMR- sowie UV/VIS- und IR-Spektroskopie untersucht wurde. Bewährt hat sich auch die Auftrennung des Methanolextrakts durch Kapillarzonenlektrophorese, die ebenfalls eine Hauptkomponente nachweist.

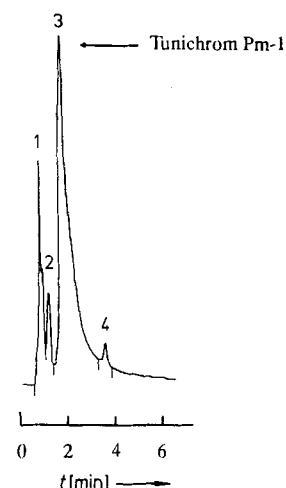


Abb. 1. HPLC des Methanolextrakts von Blutzellen aus *Phallusia mammillata*. Säule: 125 \times 4,6 mm, 5 μ m-Hamilton PRP-1; UV-Detektion bei 210 nm; Elution mit CH_3CN/H_2O (50:50), 1 mL min⁻¹; $p = 36$ bar. Fraktionen: 1 *p*-Aminobenzoesäure, 2 Zuckerderivat, 3 Tunichrom Pm-1, 4 Tunichrom Pm-2 und Pm-3.

Das UV-Spektrum der Hauptkomponente zeigt ein Absorptionsmaximum bei 301 nm und nicht das von Nakanishi et al.^[9–11] bei dem aus *A. nigra* isolierten Tunichrom An-1 gefundene Maximum bei 340 nm. Außerdem hat das Tunichrom aus *P. mammillata* Pm-1 mit $(M + H)^+$ 558,4 eine um 2 Da höhere Molekülmasse als das Tunichrom aus *A. nigra*, wie das Ionenspray-Massenspektrum (IMS) zeigt. Das MS-MS-Spektrum des Molekülpeaks 558 im IMS ergibt das Fragmentierungsschema der Abbildung 2. Tunichrom Pm-1 ist danach das Dipeptid **1** aus zwei β -(3,4,5-Trihydroxyphenyl)alanin(Topa)-Molekülen und einem C-terminal gebundenen 3,4,5-Trihydroxystyrylamin. Es unterscheidet sich von dem Tunichrom aus *A. nigra* An-1 dadurch, daß nur eine Doppelbindung und keine durchgehende Konjugation zwischen zwei Trihydroxyphenylresten vorhanden ist. Dieser Unterschied bewirkt eine drastische Änderung der Konformation und der Komplexbildung mit Vanadium.

Die 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren des freien und des peracetylierten Tunichroms Pm-1 **1** bestätigen die Strukturzuordnung. Zur Bestimmung der Stereochemie der beiden Asymmetriezentren wurde mit 5 N HCl bei 110 °C hydrolysiert und das gebildete 3,4,5-Trihydroxyphenylalanin chromatographisch isoliert und massenspektroskopisch charakterisiert. Die absolute Konfiguration wurde durch den positiven Cotton-Effekt der Carbonylbande bei 215 nm im Circular dichroismus-(CD)-Spektrum als L-Aminosäure bewiesen und durch dünnenschichtchromatographische Enantiomerentrennung an einer Chiralplate (Macherey & Nagel) bestätigt. Die beiden Chiralitätszentren weisen demnach L-Konfiguration auf. Die Stereochemie der Styrylamidgruppe im dritten, dehydrierten

[*] Prof. Dr. E. Bayer, Dr. G. Schiefer, Dipl.-Chem. D. Waidelich
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, W-7400 Tübingen 1
Prof. Dr. S. Scippa, Prof. Dr. M. de Vincentiis
Il Cattedra di Istologia ed Embriologia
Facolta di Scienze Fisiche Matematiche e Naturali
Universita di Napoli
Via Mezzocannone 8, I-80134 Napoli (Italien)

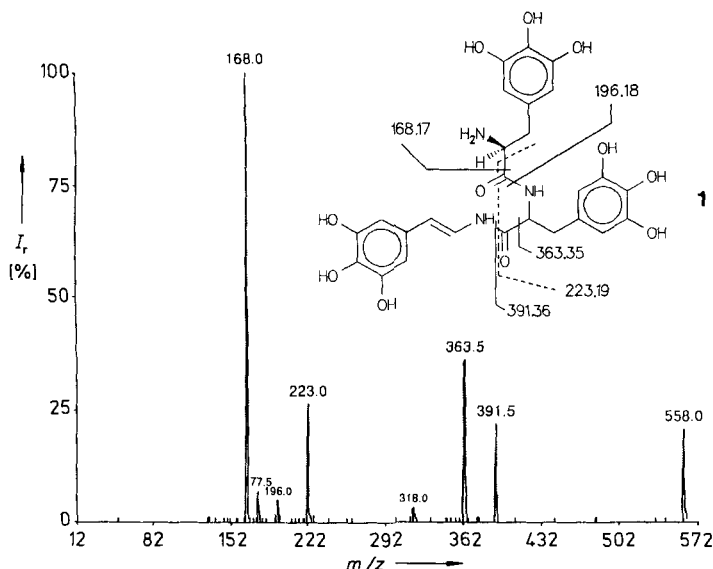


Abb. 2. Tochterionen-Massenspektrum von Molekülpeak 558 im Ionenspray-MS des Methanolextraktes der Blutzellen von *P. mammillata* (SCIEX-Massenspektrometer) sowie – daraus abgeleitet – Struktur und Fragmentierungsschema von Tunichrom Pm-1 1.

und decarboxylierten Topa läßt sich aus den ^1H -NMR-Spektren ableiten. Die Signale der beiden Vinylprotonen bei $\delta = 7.12$ und 6.01 zeigen die für *trans*-Olefine typische Kopplungskonstante von 14.6 Hz . Die Stellung der Substituenten am Phenylring wurde durch ^{13}C - und ^1H -NMR- sowie IR-Spektroskopie bewiesen. Als Vergleich dienten Topa und synthetisches Topa-Tripeptid.

Die Frage, ob in den Blutzellen das Tunichrom komplex gebunden ist, wurde durch Vergleich der Spektren des freien Tunichroms Pm-1 1 in Lösung mit dem CP-MAS- ^{13}C -NMR-Festkörperspektrum der lyophilisierten Blutzellen beantwortet. Wie Tabelle 1 zeigt, stimmt die Lage der wichtigsten Signale überein. Demnach liegt das Tunichrom auch nativ in den Blutzellen als freies, nicht an Vanadium gebundenes Peptid vor.

Tabelle 1. Vergleich der ^{13}C -NMR-Banden von Tunichrom Pm-1 1 in CD_3OD mit denen im CP-MAS- ^{13}C -NMR-Spektrum gefriergetrockneter Zellen.

¹³ C-NMR (CD ₃ OD) δ-Werte	CP-MAS- ¹³ C-NMR	Zuordnung	
168.5	173.3	Amid	CONH
146.2–144.3	145.7	Aren	C-3, C-5
132.3–131.6	131.7		C-1
127.3–124.8			C-4
120.5	120.7	Styrylamid	C-β
113.2	110.4		C-α
108.3–108.1		Aren	C-2, C-6 Topa
104.3	103.5		C-2, C-6 Tosa [a]
55.0	57.3	Aliph	CHNH ₂
53.7			CHNHR
37.2			CH ₂ CHNH ₂
36.8	38.9		CH ₂ CHNHR

[a] Tosa = Trihydroxystyrylamid.

Im Chromatogramm des Methanolextraktes der Blutzellen (Abb. 1) erscheint nach dem Hauptpeak des Tunichroms Pm-1 1 noch ein kleiner Peak. Durch on-line-HPLC-Ionenspray-MS-MS ist Trennung und Strukturzuordnung in einem Schritt möglich. Im ISM kommt neben dem Peak des Tunichroms Pm-1 1 bei 558 und denen der Pm-1-Addukte bei 580 ($M + \text{Na}$) $^+$, 596 ($M + \text{K}$) $^+$ und 638 ($M + \text{H} + \text{SO}_3$) $^+$

ein Peak bei ($M + \text{H}$) $^+ = 542$ vor. Molekülpeak 542 ist um 16 Da gegenüber dem von Tunichrom 1 erniedrigt, entsprechend einer Hydroxygruppe weniger. Das Fragmentierungsmuster des Molekülpeaks 542 in Abbildung 3 zeigt Fragmente, wie sie analog auch bei Tunichrom Pm-1 1 auftreten. Außerdem entstehen paarweise Fragmente, die darauf schließen lassen, daß es sich um zwei isomere Tunichrome Pm-2 und Pm-3 mit der Molekülmasse 542 handelt. Diesen werden die sequenzisomeren Strukturen 2 und 3 (Abb. 3) zugeordnet. In 2 ist *N*-terminal an Stelle eines Trihydroxyphenylalaninrestes ein 3,4-Dihydroxyphenylalanin eingebaut und in 3 an Stelle des Trihydroxystyrylamins C-terminal ein 3,4-Dihydroxystyrylamin.

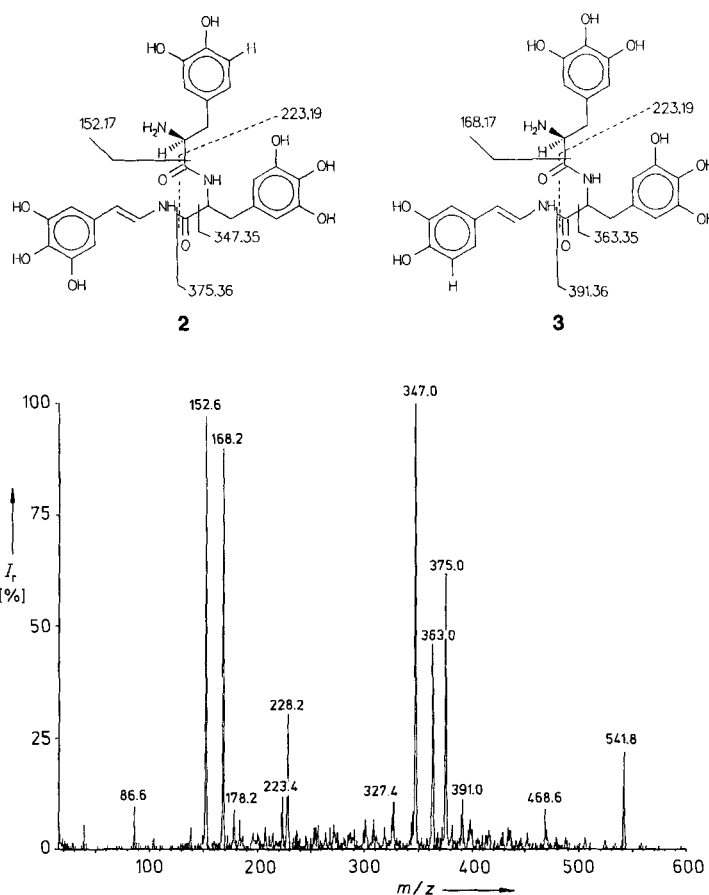


Abb. 3. Tochterionen-Massenspektrum von Molekülpeak 542 im Ionenspray-MS des Methanolextraktes der Blutzellen von *P. mammillata* sowie daraus abgeleitete Strukturen und Fragmentierungsschemata von Tunichrom Pm-2 2 und Pm-3 3.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich, daß die Tunichrome der *P. mammillata* eine niedrigere Oxidationsstufe als die Tunichrome aus *A. nigra* aufweisen. In keinem Fall konnten aus frischen Blutzellen von *P. mammillata* die von Nakanishi et al.^[9–11] beschriebenen Tunichrome nachgewiesen werden. Als Artefakte sind diese Tunichrome jedoch bei intensiver Chromatographie an Silicagelphasen oder bei längeren Reaktionszeiten zur Derivatbildung, z. B. bei vollständiger Methylierung mit Diazomethan, bei uns aufgetreten.

Mit der Ionenspray-Tandem-Massenspektrometrie^[13] der Methanolextrakte steht ein einfaches Verfahren zur Prüfung der Anwesenheit von Tunichromen zur Verfügung. Hiermit wurden die Blutzellen verschiedener Tunicaten auf Anwesenheit von Tunichromen überprüft. Tunichrome wurden von uns nur in der stark Vanadium anreichernden *P. mammillata* gefunden, nicht hingegen in der nur wenig Vanadium anrei-

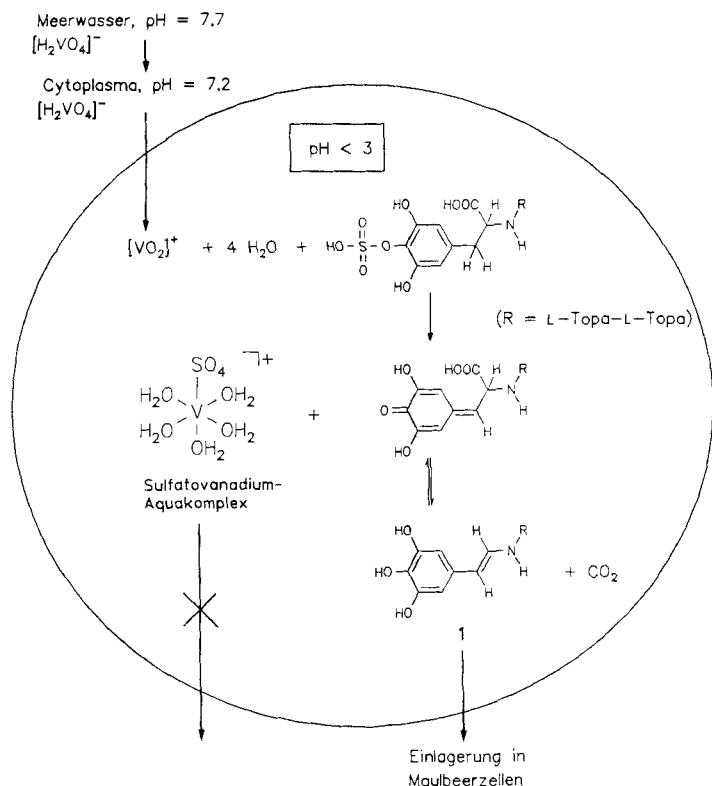


Abb. 4. Schema der Vanadiumanreicherung in Blutzellen von *P. mammillata*.

chernden *Ciona intestinalis* und in den Eisen anreichernden *Halocynthia papillosa* und *Microcosmus sulcatus*. Dies legt nahe, daß die Tunichrome bei der Vanadiumanreicherung beteiligt sind. Der semiquantitative Vergleich des durch HPLC ermittelten Gehalts an Tunichromen in den Blutzellen mit dem Sulfat- und Vanadiumgehalt zeigt, daß die Vanadiumverbindung in den vanadiumhaltigen Blutzellen und Tunichrom in den Maulbeerzellen ungefähr äquimolar vorkommen.

Charakteristisch für Tunichrome ist die Styrylamidstruktur, die biogenetisch aus einem Tripeptid mit drei Trihydroxy-

phenylalaninen durch Decarboxylierung und Dehydrierung gebildet werden dürfte. Es erscheint daher möglich, daß bei der Vanadiumanreicherung in den Blutzellen entsprechend dem Schema in Abbildung 4 zuerst ein Sulfokonjugat dieses Tripeptids ohne Styrylamidstruktur vorliegt. Ein solches Konjugat mit 1 wurde massenspektroskopisch nachgewiesen. Das durch anionische Kanäle die Lipidmembran passierende $[H_2VO_4]^-$ des Meerwassers wird im stark sauren Milieu der Vanadocyten als $[VO_2]^+$ -Ion vorliegen und kann dann nucleophil am Schwefel angreifen unter Reduktion zum dreiwertigen Sulfatovanadium-Aquakomplex. Gleichzeitig wird das Peptid zum Chinon oxidiert, das zum Styrylamid 1 decarboxyliert. Während der positiv geladene Sulfatovanadiumkomplex die anionischen Kanäle nicht mehr passiert, kann das Tunichrom aus den nun vanadiumhaltigen Blutzellen austreten und sich in die Maulbeerzellen einlagern.

Eingegangen am 4. Juni 1991 [Z 4675]

- [1] H. J. Bielig, E. Bayer, L. Califano, L. Wirth, *Pubbl. Stn. Zool. Napoli* **1954**, 25, 26.
- [2] H. J. Bielig, E. Bayer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 580, 135.
- [3] A. L. Dingley, K. Kustin, I. G. Macara, G. C. McLeod, *Biochem. Biophys. Acta* **1981**, 649, 493.
- [4] H. J. Bielig, E. Bayer, *Pubbl. Stn. Zool. Napoli* **1957**, 29, 109.
- [5] S. Lee, K. Kustin, W. E. Robinson, R. B. Frankel, K. Spartalian, *J. Inorg. Biochem.* **1988**, 33, 183.
- [6] S. Scippa, L. Botte, M. de Vincentiis, *Cell Tissue Res.* **1985**, 239, 459.
- [7] E. M. Oltz, S. Pollack, T. Delohery, M. J. Smith, M. Ojika, S. Lee, K. Kustin, K. Nakanishi, *Experientia* **1989**, 45, 186.
- [8] I. G. Macara, G. C. McLeod, K. Kustin, *Biochem. J.* **1979**, 181, 457.
- [9] R. C. Bruening, E. M. Oltz, J. Furukawa, K. Nakanishi, K. Kustin, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 5298.
- [10] E. M. Oltz, R. C. Bruening, M. J. Smith, K. Kustin, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6162.
- [11] R. C. Bruening, E. M. Oltz, J. Furukawa, K. Nakanishi, *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 193.
- [12] K. Kustin, W. E. Robinson, M. J. Smith, *Invertebr. Reprod. Dev.* **1990**, 17, 129. Aus 1000 Tieren *A. nigra* wurde durch Sephadexchromatographie 1 g Tunichromrohprodukt erhalten, aus dem nach einer weiteren dreistufigen Reinigung reines Tunichrom in nur 1.5% Ausbeute erhalten wurde.
- [13] E. Bayer in *Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Research* (Hrsg.: H. Tscheche), de Gruyter, Berlin, **1990**, S. 133.

BUCHBESPRECHUNGEN

Buchbesprechungen werden auf Einladung der Redaktion geschrieben. Vorschläge für zu besprechende Bücher und für Rezensenten sind willkommen. Verlage sollten Buchankündigungen oder (besser) Bücher an folgende Adresse senden: Redaktion Angewandte Chemie, Postfach 101161, W-6940 Weinheim, Bundesrepublik Deutschland. Die Redaktion behält sich bei der Besprechung von Büchern, die unverlangt zur Rezension eingehen, eine Auswahl vor. Nicht rezensierte Bücher werden nicht zurückgesandt.

Lexikon Ökotoxikologie. Von B. Streit. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1991. xx, 731 S., geb. DM 124.00. – ISBN 3-527-28104-5

Die zunehmenden Probleme, die sich aus der allgemeinen Belastung der Umwelt ergeben, und die immer intensivere wissenschaftliche Erforschung der zugrunde liegenden Prozesse haben dazu geführt, daß sich in den letzten Jahrzehnten zwei neue interdisziplinäre Fachgebiete gebildet haben: die ökologische Chemie und die Ökotoxikologie. Es wurde nicht nur eine Reihe neuer Periodica gegründet, um die Flut der Veröffentlichungen über ökochemische und ökotoxikologische Untersuchungen aufnehmen zu können, sondern die beiden Bereiche werden auch in den etablierten Zeitschriften immer stärker berücksichtigt. Inzwischen hat sich jedoch innerhalb dieser beiden Gebiete ein eigener Wortschatz ent-