

GÜNTER LOSSE, ALFRED BARTH und WOLFGANG LANGENBECK

Über organische Katalysatoren, LXIII<sup>1)</sup>

## Die katalytische Oxydation des 3.4-Dihydroxy-phenylalanins durch Kupfer- und Eisenchelate

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Halle (Saale)

(Eingegangen am 17. Februar 1961)

Die katalytische Oxydation des D-, L- und des DL-DOPA durch Kupferkomplexe des L-Histidinanhydrids\*), L-Histidins, L-Glutamins sowie durch Kupfer-Proto-porphyrin-Basen-Komplexe und Parahämatine wurde studiert. Das Chelat des Histidinanhydrids beschleunigt die Oxydation des DOPA stärker als freie Kupferionen. Kupfer-Proto-porphyrin-Komplexe mit L-Histidin und L-Histidinanhydrid zeigen eine deutliche stereochemische Spezifität, wobei D-DOPA bis zu 33 % schneller oxydiert wird als die L-Form. Parahämatine von L-Histidin und L-Histidinanhydrid bewirken eine Umkehrung des stereospezifischen Effektes. Aus den Meßergebnissen wurden Rückschlüsse auf die mögliche Bindung des Enzymkupfers in der Tyrosinase sowie auf die Wirkungsweise des Enzyms gezogen.

L(-)-3.4-Dihydroxy-phenylalanin tritt als Stoffwechselformprodukt bei der enzymatischen Oxydation des Tyrosins auf, welche zur Bildung der Melanine<sup>2)</sup> führt. Diese Reaktion wird durch die Tyrosinase, eine kupferhaltige Phenoloxydase katalysiert. Nach D. KERTESZ<sup>3)</sup> stellt die Tyrosinase ein komplexes System dar, bestehend aus einem spezifischen Enzym für *o*-Diphenole, aus einem entsprechenden zweiwertigen Phenol und aus freien Metallionen.

Um Anhaltspunkte über die Natur und Wirkung dieses Enzyms zu erhalten, haben wir die Oxydation des DL-DOPA und seiner Antipoden an Hand einiger Fermentmodelle studiert, wobei besonders ihre stereospezifische Wirksamkeit geprüft wurde.

Die benötigten optischen Antipoden des Dihydroxyphenylalanins wurden durch Racematspaltung des DL-Äthylesters mit Dibenzoyl-D-weinsäure gewonnen<sup>4)</sup>.

### I. L-HISTIDINANHYDRID- UND L-AMINOSÄURE-KUPFER-CHELATE ALS FERMENTMODELLE

Y. SHIBATA und R. TSUCHIDA<sup>5)</sup> konnten schon im Jahre 1929 den Nachweis erbringen, daß die Antipoden des 3.4-Dihydroxy-phenylalanins in Gegenwart optisch

1) LXII. Mittel.: M. AUGUSTIN, J. SCHNEIDER und W. LANGENBECK, J. prakt. Chem., im Druck.

\*) 3.6-Dioxo-2.5-bis-[imidazolyl-(4)-methyl]-piperazin.

2) A. S. RAPER, Biochem. J. 20, 740 [1926]; 21, 91 [1927]; H. S. MASON, J. biol. Chemistry 172, 91 [1948].

3) Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 9, 170 [1952].

4) G. LOSSE und H. JESCHKEIT, Chem. Ber. 90, 1276 [1957]; G. LOSSE, J. prakt. Chem. IV. 7, 145 [1958].

5) Bull. chem. Soc. Japan 4, 142 [1929].

aktiver Kobaltkomplexe verschieden schnell durch Luftsauerstoff oxydiert werden. Das DOPA-oxydierende natürliche Ferment ist ein Kupferprotein<sup>6)</sup>. Es wurde deshalb zunächst der optisch aktive Kupferkomplex des Histidinanhydrids hergestellt und als Katalysatormodell eingesetzt. Lösungen dieser Verbindung haben sich bereits als aktive Katalasemodelle<sup>7)</sup> erwiesen.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, zeigt sich, daß *L-Histidinanhydrid* im Beisein von Kupferionen die Oxydation des DL-DOPA gegenüber freien Kupfer(II)-Ionen gleicher Konzentration um etwa den 1.4-fachen Wert beschleunigt.

Tab. 1. Tyrosinaseaktivität von L-Histidinanhydrid- und L-Aminosäure-Kupfer-Chelaten (Katalysatorkonzentration  $5 \cdot 10^{-7}$  Mol/ccm, Substratkonzentration  $5 \cdot 10^{-5}$  Mol/ccm, pH 7,  $n/5$  Phosphatpuffer)

Chelat	Substrat	O <sub>2</sub> -Verbrauch mm <sup>3</sup> nach 5 Stdn.	Chelat	Substrat	O <sub>2</sub> -Verbrauch mm <sup>3</sup> nach 5 Stdn.
L-Histidin- anhydrid-Cu (2:1)	DL-DOPA	170.97	L-Histidin- Cu (2:1)	DL-DOPA	82.65
L-Histidin- anhydrid-Cu (1:1)	DL-DOPA	200.96	L-Glutamin- Cu (2:1)	DL-DOPA	107.20
L-Histidin- anhydrid-Cu (2:1)	L-DOPA	166.91	L-Glutamin- säure- $\gamma$ - methylester- Cu (2:1)	DL-DOPA	126.86
L-Histidin- anhydrid-Cu (2:1)	D-DOPA	162.91	CuSO <sub>4</sub>	DL-DOPA	130.77
—	—	—	H <sub>2</sub> O	DL-DOPA	15.19

Durch einen Überschuß an Kupferionen wird die Oxydationswirkung des Histidinanhydrid-Komplexes geringfügig erhöht. Die Chelate der Aminosäuren L-Histidin, L-Glutamin und L-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester zeigen dagegen gegenüber freien Kupferionen keine Aktivitätssteigerung. Ebenfalls ließ sich eine stereospezifische Wirkung nicht beobachten.

## II. PROTOPORPHYRIN-EISEN- UND -KUPFER-KOMPLEXE ALS FERMENTMODELLE

Nach früheren Untersuchungen von W. LANGENBECK<sup>8)</sup> zeigen Parahämatine eine deutliche oxydatische Wirkung. Es war daher naheliegend, die Parahämatine des L-Histidins und L-Histidinanhydrids sowie die entsprechenden Kupferkomplexe auch als Oxydationskatalysatoren für DOPA zu untersuchen. Das Histidinanhydrid-Parahämatin konnte aus wäßrigem Medium in Substanz isoliert und damit seine Bildung sichergestellt werden. Um die Parahämatin-Konzentration möglichst hoch zu halten, wurde mit einem beträchtlichen Basenüberschuß gearbeitet.

<sup>6)</sup> F. KUBOWITZ, *Biochem. Z.* **299**, 32 [1938]; **292**, 221 [1937]; H. R. DALTON und J. M. NELSON, *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 2946 [1939].

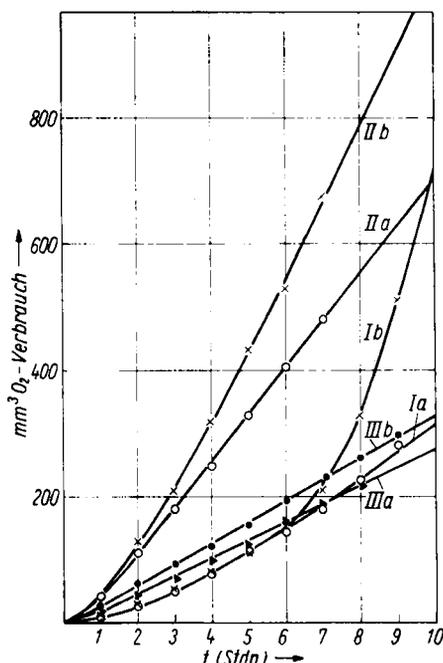
<sup>7)</sup> W. LANGENBECK, H. MIX und W. TITTELBACH-HELMRICH, *Chem. Ber.* **90**, 2699 [1957].

<sup>8)</sup> W. LANGENBECK und R. HUTSCHENREUTER, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **65**, 1750 [1932].

## a) Parahämatine als Tyrosinasemodelle

Werden die Parahämatine des L-Histidins und L-Histidinanhydrids (Hämin : L-Histidin = 1 : 130 bzw. Hämin : L-Histidinanhydrid = 1 : 20) als Oxydasemodelle verwendet, so beobachtet man deutliche stereospezifische Effekte, wobei die L-Form des DOPA bis zu 43% schneller durch Luftsauerstoff oxydiert wird als D-DOPA (Abbild. 1).

Abbild. 1  
Tyrosinaseaktivität von  
I L-Histidin-Parahämatin bei pH 7,2,  
a = D-DOPA, b = L-DOPA.  
II L-Histidin-Parahämatin bei pH 7,8,  
a = D-DOPA, b = L-DOPA.  
III L-Histidinanhydrid-Parahämatin  
bei pH 7,2,  
a = D-DOPA, b = L-DOPA  
(Katalysatorkonzentration  
 $5 \cdot 10^{-7}$  Mol/ccm;  
Substratkonzentration  
 $2,5 \cdot 10^{-5}$  Mol/ccm,  
 $n/5$  Phosphatpuffer)



## b) Oxydatische Wirkungen von Basenkomplexen des Kupfer-Protoporphyryns

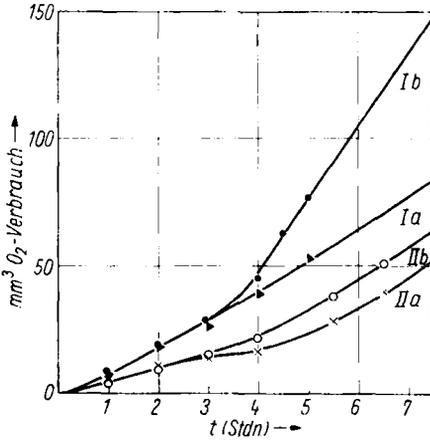
Kupfer-Protoporphyryn zeigt bei Anwesenheit optisch aktiver organischer Basen wie L-Histidinanhydrid (20-facher Überschuß) und L-Histidin (130-facher Überschuß) nach einiger Zeit eine deutliche Differenz in der Oxydationsgeschwindigkeit der Antipoden des DOPA, wobei im Gegensatz zu den Parahämatischen D-DOPA bis zu 30% schneller oxydiert wird als L-DOPA (Abbild. 2).

Das Auftreten einer stereospezifischen Aktivität im Verlaufe der Oxydation läßt auf eine allmähliche Bildung einer hämochromogenartigen optisch aktiven Basenverbindung des Kupfer-Protoporphyryns mit koordinativ sechswertigem Kupfer<sup>9)</sup> schließen.

In Übereinstimmung hiermit zeigen die Absorptionsspektren des Kupfer-Protoporphyryns in Anwesenheit von überschüssigem Histidin gegenüber den Spektren der

<sup>9)</sup> Vgl. F. HEIN, „Chemische Koordinationslehre“, 1. Aufl., Verlag S. Hirzel, Leipzig 1954, S. 13, 14, 56, 154 und 486.

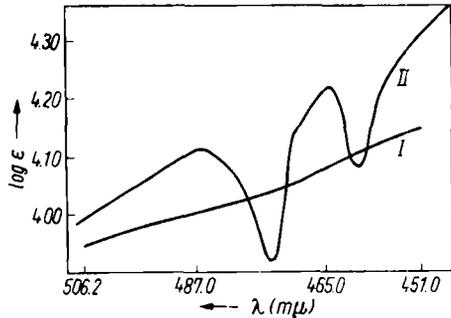
reinen Komponenten zwei deutlich erkennbare zusätzliche Extinktionsmaxima bei ca. 487.0  $m\mu$  und 465.0  $m\mu$  (Abbild. 3).



Abbild. 2  
Tyrosinaseaktivität von I  
L-Histidin-Kupfer-Protoporphyrin,  
a = L-DOPA, b = D-DOPA.  
II L-Histidinanhydrid-  
Kupfer-Protoporphyrin,  
a = L-DOPA, b = D-DOPA  
(Katalysatorkonzentration  
 $5 \cdot 10^{-7}$  Mol/ccm,  
Substratkonzentration  
 $2.5 \cdot 10^{-5}$  Mol/ccm, pH 7,  
 $n/5$  Phosphatpuffer)

Diese Meßergebnisse zeigen, daß der chelatartige Einbau von Kupfer(II)-Ionen in optisch aktive Verbindungen wie L-Histidinanhydrid oder das System L-Histidin/Protoporphyrin bzw. L-Histidinanhydrid/Protoporphyrin entweder zur Steigerung

Abbild. 3  
Absorptionsspektren von I  
Kupfer-Protoporphyrin  
und II Kupfer-Protoporphyrin-  
Histidin-Komplex  
im sichtbaren Bereich  
(wäßriges Medium, pH 7,  
 $n/5$  Phosphatpuffer,  
 $c = 0.500$  mMol/l)



der Gesamtaktivität oder zur Ausbildung einer sterisch gerichteten Oxydation führt. Träger der beschleunigenden und stereochemisch spezifischen Wirksamkeit des *o*-Diphenol-spezifischen Enzyms der Tyrosinase könnte danach ein ähnlicher komplexer Bindungstyp mit hoher Koordination zwischen Kupferionen und den endständigen Gruppen des Enzymproteins sein, wobei dem Kupfer möglicherweise eine analoge Rolle zukommt, wie dem zentralen Eisen in den häminhaltigen Atmungsfermenten.

### III. DIE AMINOSÄUREDEHYDRASEWIRKUNG DES 3,4-DIHYDROXY-PHENYLALANINS

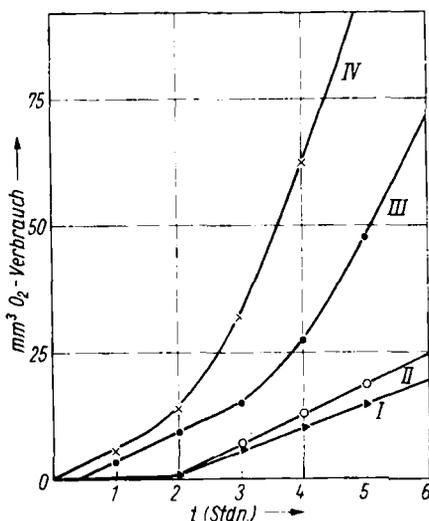
S. EDLBACHER und J. KRAUS<sup>10)</sup> sowie B. KISCH<sup>11)</sup> beobachteten am Beispiel des Glycins, daß Brenzcatechin und seine Derivate in Gegenwart von Luftsauerstoff als

<sup>10)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 48, 239 [1928].

<sup>11)</sup> Biochem. Z. 236, 380 [1931]; 242, 1, 21 [1931].

Aminosäuredehydrasen wirken. Wie aus Abbild. 4 hervorgeht, fanden wir, daß auch 3,4-Dihydroxy-phenylalanin in der Lage ist, L-Histidin zu dehydrieren.

Abbild. 4  
Dehydrasewirkung  
des DOPA auf L-Histidin.  
Molares Verhältnis  
DOPA : Histidin = 1 : 5, pH 7,  
 $n/5$  Phosphatpuffer.  
I DL-DOPA (Autoxydation),  
II D-DOPA/L-Histidin,  
III DL-DOPA/L-Histidin,  
IV L-DOPA/L-Histidin



Diese Reaktion wurde jedoch erst bei molaren Verhältnissen von DOPA : Histidin oberhalb 1 : 5 beobachtet, d. h. bei relativ hohen Dehydrasekonzentrationen. Sie verläuft äußerst stereospezifisch. L-DOPA dehydriert L-Histidin relativ schnell, während D-DOPA praktisch Dehydrase-inaktiv ist. Es wird lediglich, wie der Vergleich mit der Autoxydationskurve des DL-DOPA zeigt, durch den Luftsauerstoff zum *o*-Chinon oxydiert, ohne dabei den Wasserstoff des Histidins aufzunehmen.

Dieser Aminosäuredehydraseeffekt des DOPA ist von erheblich kleinerer Größenordnung als die Tyrosinaseeffekte des Histidin-Parahämamins (vgl. Abbild. 1) und tritt zudem nur bei freiem Histidin, nicht aber bei Histidinanhydrid auf. Die Tyrosinaseeffekte des Histidin-Kupfer-Protoporphyrins sind darüber hinaus stereospezifisch umgekehrt gerichtet wie die Dehydrasewirkung des DOPA (vgl. Abbild. 2), so daß letztere als prinzipielle Fehlerquelle für die dargelegten Meßergebnisse ausscheidet.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

### A. Racematspaltung des DL-3,4-Dihydroxy-phenylalanins

#### 1. Darstellung der Ausgangsstoffe

*Dibenzoyl-D-weinsäure*: Nach C. L. BUTLER und L. H. CRETCHER<sup>12)</sup>; Schmp. 90°;  $[\alpha]_D^{20}$ : -112.0° ( $c = 1.20$ , in Äthanol).

*DL-3,4-Dihydroxy-phenylalanin (DOPA)*: Aus Vanillin und Glycinanhydrid nach K. HIRAI<sup>13)</sup>. Aus dem Hydrojodid erfolgte die Darstellung der freien Aminosäure wie von C. R. HARRINGTON und W. MC CARTNEY<sup>14)</sup> beschrieben. Schmp. 269° (Zers.).

<sup>12)</sup> J. Amer. chem. Soc. 55, 2605 [1933].

<sup>13)</sup> Biochem. Z. 114, 70 [1921].

<sup>14)</sup> Biochem. J. 21, 852 [1927].

*DL-DOPA-äthylester-hydrochlorid*: Mittels Äthanol/Chlorwasserstoff analog der Methode von E. FISCHER<sup>15)</sup>. Ausb. quantitativ. Schmp. 109—110°.

*DL-DOPA-äthylester*: Entsprechend der Vorschrift von G. HILLMANN<sup>16)</sup> (vgl. auch die Darstellung des Tyrosin-äthylesters nach G. LOSSE<sup>4)</sup>). Ausb. 82% bis 92% d. Th., Schmp. 105—106°.

### 2. Spaltung des *DL-DOPA-äthylesters*

4.6 g *DL-DOPA-äthylester* werden in 34.8 ccm absol. n-Propanol, gemeinsam mit 20.8 g Dibenzoyl-D-weinsäure gelöst und schnell mit 111 ccm absol. Äther versetzt. Nach 12 stdg. Stehenlassen bei 21° haben sich 6.4 g *D-DOPA-äthylester-dibenzoyl-D-hydrogentartrat* ausgeschieden (107% d. Th.). Schmp. 153—157°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-68.0^\circ$  ( $c = 1.559$ , in Äthanol).

$C_{29}H_{29}NO_{12}$  (583.5) Ber. C 59.80 H 5.01 N 2.40 Gef. C 59.44 H 5.05 N 2.65

Durch Einengen der Mutterlauge i. Vak. bis zur Trockne und anschließendem Zusatz von 200 ccm absol. Äther kristallisieren 3.0 g *L-DOPA-äthylester-dibenzoyl-D-hydrogentartrat* (50.4% d. Th.), Schmp. 138—141°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-45.0^\circ$  ( $c = 0.812$ , in Äthanol).

Gef. C 60.10 H 5.08 N 2.81

### 3. Gewinnung von *D-* und *L-DOPA-äthylester-hydrochlorid*

Die Darstellung von *D-DOPA-* und *L-DOPA-äthylester-hydrochlorid* aus den Dibenzoyl-D-hydrogentartraten erfolgt durch Ausfällung mit absol. Äther aus absol. äthanolischer Salzsäure<sup>4)</sup>.

*D-DOPA-äthylester-hydrochlorid*: Ausb. 94.5% d. Th. Nach Umkristallisieren aus absol. Äthanol/Äther Schmp. 128—132°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+9.59^\circ$  ( $c = 1.332$ , in Wasser).

$C_{11}H_{15}NO_4 \cdot HCl$  (261.1) Ber. C 50.05 H 6.15 N 5.35 Gef. C 49.98 H 6.42 N 5.43

*L-DOPA-äthylester-hydrochlorid*: Ausb. 96.0% d. Th. Nach Umkristallisieren aus absol. Äther/Äthanol Schmp. 126—129°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-8.95^\circ$  ( $c = 1.053$ , in Wasser).

Gef. C 50.00 H 6.50 N 5.30

### 4. Darstellung der optisch reinen *DOPA-Antipoden*

Die reinen *DOPA-äthylester-hydrochloride* lassen sich durch halbstündiges Kochen mit 20-proz. Salzsäure verseifen. Durch Neutralisation mit Ammoniak gegen Kongopapier werden hieraus auf übliche Weise die freien, optisch reinen Aminosäureantipoden gewonnen<sup>17)</sup>.

*D-DOPA*: Ausb. 78% d. Th., Schmp. 282° (Zers.),  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+12.05^\circ$  ( $c = 2.012$ , in *n*HCl).

*L-DOPA*: Ausb. 50% d. Th., Schmp. 280—282° (Zers.),  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-12.5^\circ$  ( $c = 0.640$ , in *n*HCl).

$C_9H_{11}NO_4$  (197.1) Ber. N 7.11 Gef. (D) N 7.26 (L) N 7.00

## B. Darstellung der Katalysatoren

1. *L-Histidinanhydrid-Kupfer-Chelat*: Eine Lösung von 0.5 g *Kupfersulfat* wird bis zur Sättigung mit *L-Histidinanhydrid*<sup>18)</sup> versetzt und nach dem Erwärmen auf 60° mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt. Beim Stehenlassen kristallisieren 1.3 g (81.3% d. Th.) des Chelates aus. Umkristallisiert aus Methanol/Wasser (1:1), blaue Nadeln.

$C_{24}H_{28}N_{12}O_4 \cdot CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (798.0) Ber. C 36.00 H 4.75 N 21.00

Gef. C 36.03 H 4.98 N 21.06

<sup>15)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. **34**, 433 [1901].

<sup>16)</sup> Z. Naturforsch. **1**, 682 [1946].

<sup>17)</sup> C. R. HARRINGTON und S. S. RANDALL, Biochem. J. **25**, 1029 [1931].

<sup>18)</sup> H. PAULY, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **64**, 75 [1909].

2. *L-Glutamin-Kupfer-Chelat*: Aus äquimolekularen Mengen *L-Glutamin* und *Kupfersulfat* analog B 1. Ausb. quantitativ, blaue feine Nadeln.

$C_{10}H_{18}N_4O_6Cu$  (353.6) Ber. C 34.00 H 5.09 N 15.80 Gef. C 34.15 H 5.20 N 15.50

3. *L-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester-Kupfer-Chelat*<sup>19)</sup>: Aus *Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester* und *basischem Kupfercarbonat* in wäßrigem Medium. Tiefblaue Kristallblättchen.

$C_{12}H_{20}N_2O_8Cu$  (383.7) Ber. C 37.62 H 5.21 N 7.30 Gef. C 37.55 H 5.12 N 7.25

4. *L-Histidinanhydrid-Parahämatin*: Eine Lösung von 113 mg *Hämin* in 100 ccm Phosphatpuffer, pH 7.0, wird mit 1 g *L-Histidinanhydrid* in 20 ccm heißem Wasser versetzt. Nach kurzem Stehenlassen beginnt die Kristallausscheidung und ist nach ca. 1 Stde. beendet. Ausb. 132.0 mg (57.5% d. Th.). Rotviolette Kristallblättchen.

$C_{58}H_{61}N_{16}O_9Fe \cdot 5H_2O$  (1272.1) Ber. C 54.95 H 5.60 N 17.61

Gef. C 54.63 H 5.60 N 17.61

5. *Protoporphyrin-Kupfer*<sup>20)</sup>: Aus äquimolekularen Mengen *Protoporphyrin-hydrochlorid*<sup>21)</sup> und *Kupfersulfat* in Wasser/Methanol (1 : 2) bei 70°. Rotvioletes Pulver. Ausb. 80% d. Th. Extinktionsmaxima bei 574.0 m $\mu$  und 537.0 m $\mu$  in *n/5* Phosphatpuffer.

$C_{34}H_{32}N_4O_4Cu$  (624.1) Ber. C 65.42 H 5.17 Cu 10.30

Gef. C 65.00 H 5.36 Cu 10.00

### C. Katalytische Messungen

Die Oxydaseaktivitäten wurden nach der bekannten Warburgschen Meßmethode in wäßriger Lösung bei 30° ermittelt. Falls nicht anders vermerkt, erfolgten die Messungen bei pH 7.0 unter Verwendung eines *n/5* Phosphatpuffers nach H. T. S. BRITTON und G. WELFORD<sup>22)</sup>. Die benötigten Hämin- und Protoporphyrin-Kupfer-Lösungen wurden wie folgt dargestellt:

32.60 mg Hämin bzw. 31.20 mg Protoporphyrin-Kupfer löst man in 10 ccm 0.2 *n* NaOH, läßt unter Rühren bis zum pH 7.0 (Glaselektrode) eine 0.2 *n* Kaliumhydrogenphosphat-Lösung zutropfen, filtriert anschließend und füllt auf 100 ccm auf.

Zur Darstellung der Parahämatine bzw. Kupfer-Protoporphyrin-Basen-Komplexe werden 10 ccm der oben beschriebenen Hämin- bzw. Protoporphyrin-Kupfer-Lösung mit gleichen Volumenteilen einer Lösung von 2.0 g *L-Histidin* oder 300 mg *L-Histidinanhydrid* pro 100 ccm *n/5* Phosphatpuffer versetzt. Nach 2–3 tägigem Stehenlassen wurden jeweils 2 ccm Lösung pro Versuch angewandt.

### D. Optische Messungen

Die Aufnahmen der Absorptionsspektren der Protoporphyrin-Kupfer-Basen-Komplexe erfolgten im Universal-Spektrophotometer der Firma VEB Carl Zeiss, Jena, unter Verwendung von Vergleichslösungen gleicher Basen- und Pufferkonzentrationen wie bei den Lösungen der entsprechenden Protoporphyrin-Kupfer-Basen-Komplexe.

19) H. JESCHKEIT, Dissertat. Univ. Halle, unveröffentlicht.

20) H. FISCHER und B. PÜTZER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **154**, 58 [1926].

21) A. TREIBS, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **286**, 11 [1950/51].

22) *J. chem. Soc. [London]* **1937**, 1848.