

Hans Achenbach und Franz König

Zur Biogenese des Xanthocillins, III¹⁾

Die Frage der biogenetischen Gleichwertigkeit der beiden Xanthocillin-Hälften

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

(Eingegangen am 20. Juli 1971)



Die Bildung von monomarkiertem und dimarkiertem Xanthocillin-X (1) durch *P. notatum* Westling wurde nach Gabe von [¹⁵N]Tyrosin studiert. Die Ergebnisse widersprechen der Entstehung von 1 durch Kupplung zweier C₆-C₂-N-Einheiten aus Tyrosin: In dem symmetrischen Xanthocillin-Molekül stammt nur ein Stickstoffatom direkt aus Tyrosin. — Gegenwart von *p*-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure bewirkt eine signifikante Erhöhung der Isotopenanreicherung in 1 bei gleichzeitiger Unterdrückung der Bildung dimarkierter Spezies. Wir schließen daraus, daß diese Ketosäure neben Tyrosin an der Biogenese des Xanthocillins beteiligt ist. — Einbauversuche mit [3-²H₂]Tyrosin bestätigen die Resultate.

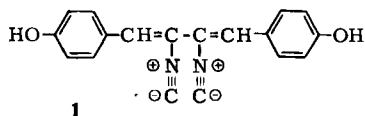
Biogenesis of Xanthocillin, III¹⁾

The Problem of Biogenetic Equivalence of the two C₆-C₂-N-Parts in the Xanthocillin Molecule

After addition of [¹⁵N]tyrosine to cultures of *P. notatum* Westling the formation of mono-labelled and dilabelled xanthocillin-X (1) was studied. The results are in disagreement with the formation of 1 by coupling of two C₆-C₂-N units from tyrosine: Only one nitrogen atom in the symmetric xanthocillin molecule originates directly from tyrosine. — The presence of *p*-hydroxyphenylpyruvic acid causes a significant increase of isotope enrichment in 1 and simultaneously a decrease of formation of dilabelled species. Thus we conclude, that besides tyrosine this keto acid is involved in the biogenesis of xanthocillin. — Incorporation experiments using [3-²H₂]tyrosine corroborate these results.



Wir haben kürzlich gezeigt, daß Tyrosin als intakte C₆-C₂-N-Einheit in Xanthocillin-X (1) eingebaut wird¹⁾.



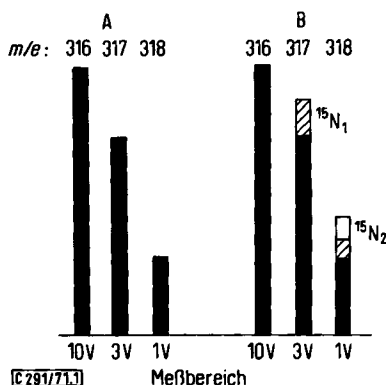
Die Symmetrie der Strukturformel von 1 reizt zu der Frage, ob im Laufe der Biogenese zwei C₆-C₂-N-Bausteine aus Tyrosin zu 1 zusammengefügt werden. Als Mecha-

¹⁾ II. Mittel.: H. Achenbach und F. König, *Experientia* [Basel] 27, 1250 (1971).

nismus könnte in Analogie zur Bildung des Diaryl-butan-Gerüsts in den Lignanen eine Kupplung von zwei entsprechend aktivierten Vorstufen aus Tyrosin diskutiert werden²⁾.

Eine Alternative sehen wir in der Kondensation nur einer C₆-C₂-N-Vorstufe (aus Tyrosin) mit Bausteinen, die aus anderen Quellen stammen. In diesem Falle wären die beiden Hälften des Xanthocillins biogenetisch verschiedener Herkunft.

Eine Entscheidung bietet die massenspektrometrische Isotopenanalyse von **1**, das in Gegenwart von [¹⁵N]Tyrosin gebildet worden ist: Aus den Peakhöhenverhältnissen im Bereich des Molekül-Ions läßt sich neben der Gesamt-¹⁵N-Anreicherung auch der Anteil an unmarkierter, mono-¹⁵N-markierter und di-¹⁵N-markierter Molekülspezies ermitteln (Abbild. 1).



Abbild. 1. Bereich des Molekül-Ions im Massenspektrum (17eV) von Xanthocillin-dimethyläther.

A: ohne markierte Vorstufe; B: 4 Stdn. nach Gabe von [¹⁵N]Tyrosin.

(Aus den gemessenen Peakhöhen wurden die schraffierten Anteile für die mono-¹⁵N-Spezies und der umrandete Anteil für die di-¹⁵N-Spezies nach bekannter Methode³⁾ ermittelt)

Geht man davon aus, daß die Bildung über die Kondensation zweier biogenetisch gleichwertiger C₆-C₂-N-Vorstufen aus Tyrosin erfolgt, so sollte die relative Häufigkeit der drei Markierungstypen in erster Näherung einer statistischen Binominalverteilung entsprechen und nur von der ¹⁵N-Anreicherung in der Vorstufe bzw. im gebildeten Xanthocillin abhängen. Dadurch entsteht eine feste Beziehung zwischen dem Anteil von di-¹⁵N-markiertem **1** und der Gesamt-¹⁵N-Anreicherung im nach Tyrosin-Zugabe gebildeten **1**^{*)}.

*) Rechnung im experimentellen Teil.

²⁾ H. Erdtman in K. Paech und M. V. Tracey, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. III, S. 429, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955.

³⁾ K. Biemann in *Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications*, S. 223, McGraw-Hill, New York 1962.

In diesem Zusammenhang muß berücksichtigt werden, daß zum Zeitpunkt der Tyrosin-Zugabe bereits unmarkiertes **1** im Fermentationsmedium vorhanden ist, das eine zusätzliche Isotopenverdünnung bewirkt, die in unsere Betrachtung nicht eingehen darf. Wir haben diesen Verdünnungsfaktor ermittelt durch UV-spektrometrische Gehaltsbestimmung von **1** im Fermentationsmedium zum Zeitpunkt der Tyrosin-Zugabe und am Ende der Inkubation. Aus der massenspektrometrisch festgestellten Isotopenanreicherung im *isolierten* **1** wurde dann die Anreicherung für denjenigen Anteil von **1** berechnet, der nach Tyrosin-Zugabe entstanden war (= *gebildetes* **1**).

In Tab. 1 sind die Gesamt-¹⁵N-Anreicherungen zusammengestellt, die nach verschiedener Inkubationszeit im gebildeten **1** auftreten. Außerdem findet man den Gehalt an di-¹⁵N-markiertem **1** den Werten gegenübergestellt, die für eine statistische Kombination aus einem Pool berechnet worden sind *).

Tab. 1. Gesamt-¹⁵N-Anreicherung im *gebildeten* Xanthocillin nach verschiedenen Inkubationszeiten; di-¹⁵N-markiertes **1**, bezogen auf insgesamt *gebildetes* **1**

Inkubationszeit (Std.n.)	Gesamt- ¹⁵ N- Anreicherung (%)	di- ¹⁵ N-markiertes 1 (%)	
		gefunden (%)	berechnet (%) für statist. Kombination
1	23	6.5	5.3
2	16	4.9	2.6
3	16	4.8	2.6
4	14	4.7	2.0
5	14	4.5	2.0
6.5	12	4.1	1.4
8	10	3.9	1.0
9.5	10	3.6	1.0
11	9	3.2	0.8

Ein Vergleich der gemessenen und berechneten Daten (Tab. 1; Spalten 3 und 4) zeigt Differenzen, die Zweifel an der biogenetischen Gleichwertigkeit der beiden Xanthocillin-Hälften aufkommen lassen. Überraschenderweise wird mehr di-¹⁵N-markiertes **1** gebildet als für die statistische Zweier-Kombination eines Vorläufers aus einem Pool zu erwarten ist. Wir erklären diesen Befund damit, daß die beiden Isotopnitril-Stickstoffatome über zwei verschiedene Vorläufer in **1** eingebaut werden. Die Pools dieser Vorläufer unterscheiden sich beträchtlich hinsichtlich ihrer Größe und ihrer ¹⁵N-Anreicherung.

Diese Ergebnisse haben uns veranlaßt, den Einfluß von Konkurrenzhemmern für den Tyrosin-Stoffwechsel auf die Bildung von di-¹⁵N-markiertem **1** zu untersuchen.

Ausgangspunkt war die Beobachtung, daß in Gegenwart dieser Substanzen für das α -Kohlenstoffatom und den Stickstoff aus Tyrosin annähernd gleiche Einbauraten gemessen werden, während man ohne Hemmstoffe für den α -Kohlenstoff einen 6mal stärkeren Einbau findet als für den Stickstoff¹⁾.

*) Rechnung im experimentellen Teil.

Diese Daten lassen sich erklären:

entweder mit einer direkten Beteiligung von desaminierten Produkten des Tyrosin-Stoffwechsels an der Biogenese von **1**;

oder durch Transaminierungs-Reaktionen, die zu einer ^{15}N -Verdünnung im Tyrosin führen, das dann ohne Beteiligung anderer Bausteine zu **1** gekuppelt wird.

Für den letzten Fall — die Verknüpfung zweier biogenetisch gleichwertiger $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-N}$ -Vorstufen aus Tyrosin — kann erwartet werden, daß in Gegenwart der Konkurrenzhemmer die Gesamt- ^{15}N -Anreicherung in **1** möglicherweise verändert ist; der relative Anteil an di- ^{15}N -markiertem **1** sollte jedoch hiervon unbeeinflusst bleiben.

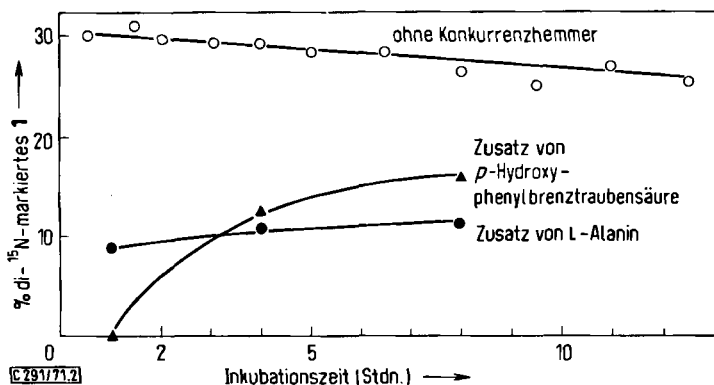


Abbildung 2. Anteil dimarkierte Spezies im gebildeten Xanthocillin nach verschiedenen Inkubationszeiten (bezogen auf Gesamt- ^{15}N -Anreicherung)

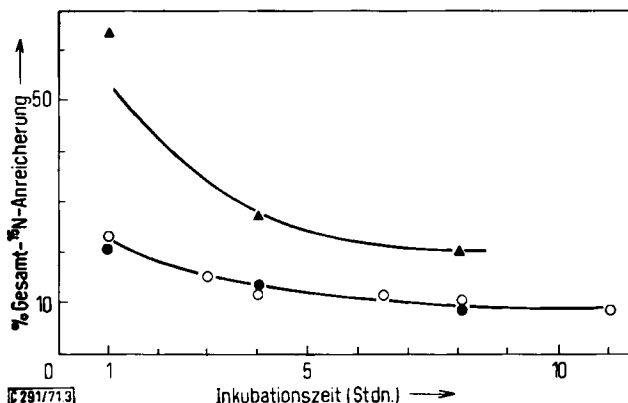
Wie man Abbild. 2 entnimmt, ist in Gegenwart von Alanin — zugesetzt als NH_2 -Donator für Transaminierungs-Reaktionen — die Bildung von dimarkiertem **1** stark reduziert.

Überraschend eindeutig sind die Resultate in Gegenwart von *p*-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure, die durch Produkthemmung eine Desaminierung von Tyrosin unterdrückt: Bei kurzer Inkubationszeit kann dimarkiertes **1** nicht mehr nachgewiesen werden. Außerdem findet man unter diesen Bedingungen eine besonders hohe Gesamt- ^{15}N -Anreicherung in **1** (Abbild. 3) als Zeichen dafür, daß die Xanthocillin-Bildung und der Einbau von Tyrosin in **1** nicht blockiert worden sind.

Die Befunde sind mit der Annahme einer Xanthocillin-Biogenese durch Kupplung von zwei $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-N}$ -Bausteinen aus Tyrosin nicht erklärbar. Sie fordern vielmehr neben Tyrosin die direkte Beteiligung eines weiteren Vorläufers am Aufbau des Diarylbutadien-Gerüsts in **1**.

Um der Frage nachzugehen, inwieweit neben dem Stickstoff auch die $\text{C}_6\text{-C}_2$ -Einheit aus Tyrosin an dieser Asymmetrie beteiligt ist, haben wir den Einbau von $[3\text{-}^2\text{H}_2]$ Tyrosin (**7**) in **1** untersucht.

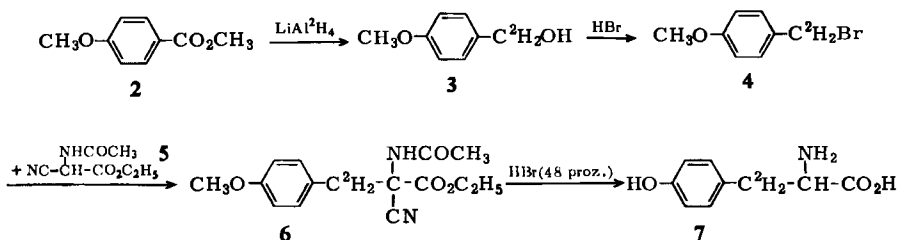
Die Synthese des deuterierten Tyrosins erfolgte ausgehend von der Reduktion des 4-Methoxy-benzoesäure-methylesters (**2**) mit LiAlD_4 zu 4-Methoxy- $[\alpha\text{-}^2\text{H}_2]$ benzylalkohol (**3**). Durch Behandlung mit HBr wurde das entsprechende 4-Methoxy-benzyl-



Abbild. 3. Gesamt-¹⁵N-Anreicherung im gebildeten Xanthocillin nach verschiedenen Inkubationszeiten

- a) ohne Konkurrenzhemmer: ○ — ○
 b) mit Zusatz von L-Alanin: ● — ●
 c) mit Zusatz von *p*-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure: ▲ — ▲

bromid **4** hergestellt und mit *N*-Acetyl-2-cyan-glycin-äthylester (**5**) in Anlehnung an bekannte Vorschriften zu **6** kondensiert⁴⁾. Bei dessen Hydrolyse mit konz. Bromwasserstoffsäure fällt direkt DL-[3-²H₂]Tyrosin (**7**) an.



Den Isotopengehalt und die Spezifität der Markierung in **7** haben wir massenspektrometrisch überprüft. Für diese Messungen wurde **7** zum *N*-Trifluoracetyl-tyrosin-methylester umgesetzt^{5,6)}.

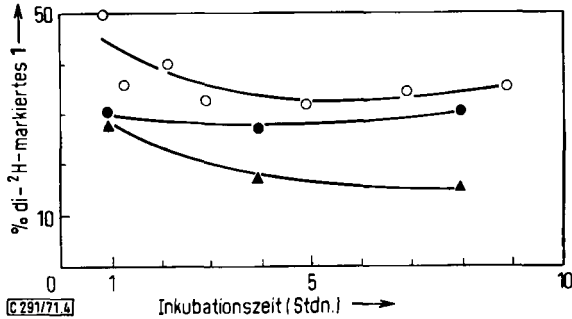
Die Fermentation zur biologischen Produktion von **1** in Gegenwart des deuterierten Tyrosins erfolgte in der gleichen Weise wie bei den Experimenten mit [¹⁵N]Tyrosin. Abbild. 4 zeigt den Anteil an di-²H-markiertem **1** in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Hemmstoffzusatz.

Nach Zugabe der Konkurrenzhemmer beobachtet man auch hier einen deutlichen Abfall der Bildung von dimarkiertem **1**. Im Gegensatz zu den Versuchen mit [¹⁵N]-Tyrosin (Abbild. 2) wird eine völlige Unterdrückung der dimarkierten Spezies aber auch bei kurzer Inkubationszeit nicht erreicht.

⁴⁾ M. Fields, D. E. Walz und S. Rothchild, J. Amer. chem. Soc. **73**, 1000 (1951).

⁵⁾ F. Weygand und R. Geiger, Chem. Ber. **89**, 647 (1956).

⁶⁾ E. Stenhagen, Z. analyt. Chem. **181**, 462 (1961).



Abbild. 4. Anteil dimarkierte Spezies im gebildeten Xanthocillin nach verschiedenen Inkubationszeiten (bezogen auf Gesamt-²H-Anreicherung in 1)

- a) ohne Konkurrenzhemmer: ○—○
- b) mit Zusatz von L-Alanin: ●—●
- c) mit Zusatz von *p*-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure: ▲—▲

Dieses Ergebnis ist verständlich, wenn im Zuge des Tyrosin-Stoffwechsels eine stickstoff-freie, deuterierte Stufe durchlaufen wird, die zusammen mit C₆-C₂-N aus Tyrosin direkt in 1 eingebaut werden kann. Diese Erklärung macht auch den relativ hohen Dimarkierungs-Anteil im gebildeten 1 nach Gabe von deuteriertem Tyrosin verständlich. Im übrigen muß bei der Metabolisierung von [3-²H₂]Tyrosin mit nicht unbedeutlichen Isotopeneffekten und Isotopenverlust durch Enolisierungsreaktionen (auf der Keto-Stufe) gerechnet werden.

Insgesamt ergänzen die Daten der Versuche mit deuteriertem Tyrosin unsere Beobachtungen nach Gabe von [¹⁵N]Tyrosin.

Als Ergebnis kann man festhalten:

1. Die Störung der Bildung von dimarkiertem Xanthocillin durch Konkurrenzhemmer des Tyrosin-Stoffwechsels widerspricht der Hypothese, daß die Biogenese des Xanthocillins über die Kupplung zweier biogenetisch gleichwertiger Vorläufer aus Tyrosin verläuft.

2. Die völlige Unterdrückung der Bildung des dimarkierten Xanthocillins nach Gabe von [¹⁵N]Tyrosin in Gegenwart von *p*-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure und der weniger ausgeprägte gleiche Effekt nach Gabe von [3-²H₂]Tyrosin fordern neben Tyrosin die Beteiligung eines weiteren Vorläufers am Aufbau des Diaryl-butadiengerüsts in 1. Dieser Vorläufer kann im Zuge der Desaminierung des Tyrosins gebildet werden und steht biochemisch der *p*-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure nahe.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Die Isotopenbestimmungen wurden massenspektrometrisch ausgeführt durch Peakhöhenmessung an den Molekül-Ionen. Hierfür stand ein Massenspektrometer SM 1 B der Firma Varian-MAT zur Verfügung: Ionenquelle: EH 1; Ionisierungsenergie: 17 eV; Einlaßsystem: direkt; Probertemperatur: ca. 100°; Auflösung $M/\Delta M = 1500$ (10% Tal).

Für die UV-Messungen benutzten wir ein Spektrophotometer der Firma Carl Zeiss vom Typ DMR 21.

Fermentation von Penicillium notatum Westling

Alle Versuche wurden mit Submerskulturen in Anlehnung an l. c.⁷⁾ durchgeführt.

a) *Kulturmedium*: 188 g Rohrzucker, 15 g Natriumnitrat, 2,5 g Magnesiumsulfat · 7 H₂O, 2,5 g Kaliumchlorid, 8,3 g Yeast-Extrakt (Firma Difco), 0,95 g Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H₂O und 44,69 g Kaliumdihydrogenphosphat wurden in 5 l Leitungswasser gelöst. Sterilisation erfolgte im Autoklaven (30 Min./117°/strömender Wasserdampf).

b) *Beimpfung und Fermentation*: Nach Beimpfen des Kulturmediums mit einer dichten Sporensuspension wurden je 100 ccm in Erlenmeyer-Kolben (300 ccm Inhalt) eingefüllt. Fermentation erfolgte auf einer Rotationsschüttelmaschine (Fa. New Brunswick Scientific Co., Typ G-25) bei einer Temp. von 24–26° und 300 U/Min.

c) *Bestimmung des Xanthocillin-Gehaltes in den Kulturen*: Mit Spezialpipetten (lichte Weite an den Spitzen: 4 mm) wurden 2 ccm Kulturmedium steril entnommen und in einem Zentrifugenglas mit dem gleichen Volumen $n/5$ NaOH versetzt. Man schüttelte kräftig und zentrifugierte das Mycel ab. 1.00 ccm der überstehenden Lösung wurden mit $n/10$ NaOH auf 25 ccm verdünnt und bei 314 nm photometriert. Vorversuche zeigten, daß unter diesen Bedingungen die Xanthocillin-Konzentrationen in der überstehenden Lösung und im abzentrifugierten Mycel gleich sind.

d) *Inkubation mit markierten Vorstufen*: Alle Substanzen wurden vor der Zugabe sterilisiert. Bei Inkubation mit Gemischen wurden die einzelnen Komponenten getrennt sterilisiert und anschließend unter aseptischen Bedingungen gemischt. Die Inkubation erfolgte 5 bis 6 Tage nach der Beimpfung, wenn in den Kulturen die Xanthocillin-Produktion eingesetzt hatte und eine Konzentration von ca. 100 mg Xanthocillin pro l Kulturmedium erreicht war.

Für jeden Einbauversuch verwendeten wir 3 Fermentationskolben (= 300 ccm Kulturmedium).

Inkubiert wurde mit:

- 1) 45 mg DL-[¹⁵N]Tyrosin in 15 ccm $n/100$ NaOH.
- 2) wie 1) + 225 mg L-Alanin.
- 3) wie 1) + 135 mg *p*-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure + 27 mg Phenylbrenztraubensäure-Natriumsalz.
- 4) 45 mg DL-[³⁻²H₂]Tyrosin in 15 ccm $n/100$ NaOH.
- 5) wie 4) + 225 mg L-Alanin.
- 6) wie 4) + 135 mg *p*-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure + 27 mg Phenylbrenztraubensäure-Natriumsalz.

Isolierung des Xanthocillins — Umsetzung zum Dimethyläther: Die Kulturen wurden 1 bis 11 Std. nach der Inkubation mit markierten Vorstufen aufgearbeitet. Aus 300 ccm Kultur-

⁷⁾ H. Achenbach und H. Grisebach, Z. Naturforsch. **20b**, 137 (1965).

medium ernteten wir nach Filtrieren, Waschen und Gefriertrocknen 3 bis 4 g Mycel, das mechanisch zerkleinert und im Soxhlet-Extraktor mit Äther extrahiert wurde. Der Ätherauszug hinterließ beim Einengen und dreimaligen Waschen des Rückstandes mit je 1 cm kaltem Chloroform ca. 20 mg Rohprodukt. Aus diesem wurde das Xanthocillin durch präparative DC abgetrennt (Kieselgel H, 0.5 mm Schichtdicke; Entwicklung mit Benzol/Essigsäure-äthylester/Methanol (6 : 4 : 1v/v/v)). Fünfmalige Extraktion der gelben Zone (R_F 0.6 bis 0.7) mit je 8 ccm kaltem Äthanol lieferte beim Einengen 5–10 mg *Xanthocillin*, das in 3 ccm Methanol aufgenommen und mit ätherischer *Diazomethan*-Lösung versetzt wurde. Nach Stehenlassen über Nacht (5°) wurde der Äther abgezogen und der Rückstand aus wenig heißem Methanol umkristallisiert. Man erhielt 3–4 mg gelbe Nadeln, die sich beim Erhitzen ab 140° zersetzen.

DL-[^{15}N]Tyrosin: Die Herstellung erfolgte aus 1.25 g *p*-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure nach l. c.⁸⁾

Zur Erzeugung des [^{15}N]Ammoniak wurden 756 mg $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Isotopenanreicherung > 97%; Fa. Bio-Rad) mit *NaOH* umgesetzt. Wir erhielten nach Umkristallisieren aus Wasser 800 mg [^{15}N]Tyrosin vom Schmp. 295° (Zers.), Ausb. 65%.

Für die Kontrolle der Isotopenanreicherung wurde eine Probe des Syntheseproduktes zum *N*-Trifluoracetyl-[^{15}N]tyrosin-methylester umgesetzt.

N-Trifluoracetyl-[^{15}N]tyrosin-methylester: Aus 50 mg *DL*-[^{15}N]Tyrosin stellten wir zunächst nach l. c.⁵⁾ *N*-Trifluoracetyl-[^{15}N]tyrosin her. Wir erhielten beim Umkristallisieren aus Äther/Toluol (4 + 1) ein Präparat vom Schmp. 188–189° (Lit.⁵⁾: 192–193°), das in wenig Äther gelöst und mit einer trockenen ätherischen *Diazomethan*-Lösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt wurde. Der nach Abziehen des Äthers verbleibende Rückstand kristallisierte aus Toluol mit Schmp. 123–125°. Ausb. ca. 15 mg (20%).

Die massenspektrometrische Isotopenbestimmung ergab eine Isotopenanreicherung > 98%.

DL-[3- $^2\text{H}_2$]Tyrosin

a) *Isonitroso-cyanessigsäure-äthylester*^{4,9)}: Zu einer Lösung von 11.3 g *Cyanessigsäure-äthylester* in 13 ccm Eisessig tropfte man unter Eiskühlung und Rühren eine Lösung von 21 g *Natriumnitrit* in 28 ccm Wasser, wobei die Temperatur nicht über 20° ansteigen darf. Anschließend rührte man noch 4 Stdn. bei Raumtemperatur und erhielt schließlich einen dicken Brei. Nach Ansäuern mit verd. Salzsäure wurde 5 mal mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherauszüge wurden zunächst mit Natriumcarbonat-Lösung, dann mit Wasser gewaschen und über Calciumchlorid getrocknet. Das Produkt kristallisierte nach Abziehen des Äthers beim Anreiben mit wenig Benzol; Schmp. 127–130₁° (Lit.¹⁰⁾: 129–130°), Ausb. 7.5 g (53%).

b) *N*-Acetyl-2-cyan-glycin-äthylester (5)⁴⁾: 4.0 g *Isonitroso-cyanessigsäure-äthylester* wurden in 100 ccm *Acetanhydrid* mit 1 g *Platin/Kohle* (5%) bei Raumtemp. und Normaldruck hydriert. Nach Beendigung der *Wasserstoff*-Aufnahme wurde der Katalysator über ein Kohlefilter abgetrennt. Abdestillieren des *Acetanhydrids* i. Vak. hinterließ einen Rückstand, der beim Stehenlassen im Vakuumexsiccator (über *NaOH*) kristallisierte; Schmp. 127–128° (Lit.¹⁰⁾: 129°). Ausb. 3.7 g (77%). — H_2 -Verbrauch: Gef. 1340 ccm, ber. 1740 ccm.

⁸⁾ R. Schoenheimer und S. Ratner, *J. biol. Chemistry* **127**, 301 (1939).

⁹⁾ H. L. Snyder und C. W. Smith, *J. Amer. chem. Soc.* **66**, 350 (1944).

¹⁰⁾ *Winthrop Chemical Co., Inc.* (Erf. B. F. Tullar), *Amer. Pat.* 2 393 723, C. A. **40**, 2465 (1946).

c) *4-Methoxy- $[\alpha\text{-}^2\text{H}_2]$ benzylalkohol (3)*: Zu einer gekühlten Suspension von 0.55 g *Lithiumaluminiumdeuterid* in 25 ccm absol. Äther tropfte man eine wasserfreie ätherische Lösung von 3.96 g *4-Methoxy-benzoesäure-methylester*. Anschließend wurde 1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Nach Zugabe von gesättigter Kalium-natrium-tartrat-Lösung zum erkalteten Reaktionsansatz wurde die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Schicht 3 mal mit Äther extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das reine Produkt erhielt man nach Abziehen des Äthers durch Vakuumdestillation mit Sdp.₁₇ 137.5°. Ausb. 2.9 g (87%).

d) *4-Methoxy- $[\alpha\text{-}^2\text{H}_2]$ benzylbromid (4)*: In eine wasserfreie benzolische Lösung von 2.9 g **3** wurde trockener *Bromwasserstoff* (hergestellt nach l. c.¹¹⁾ eingeleitet. Nach beendeter Reaktion trennte man die organische Phase von der entstandenen wäßrigen Schicht ab. Die wäßrige Schicht wurde 3 mal mit Benzol ausgeschüttelt. Die vereinigten Benzolauzüge wusch man gemeinsam mit der organischen Phase nacheinander mit Natriumcarbonatlösung, gesättigter Natriumbromidlösung und Wasser. Man trocknete über Magnesiumsulfat und anschließend über Calciumhydrid. Nach Abziehen des Benzols wurde das Produkt durch Vakuumdestillation gereinigt; Sdp.₁₉ 131°. Ausb. 3.2 g (75%).

e) *2-Acetamino-3-[4-methoxy-phenyl]-2-cyan-[3- $^2\text{H}_2$]propionsäure-äthylester (6)*: Zu einer *Natriumäthylat*-Lösung von 0.36 g Natrium in 45 ccm absol. Äthanol gab man 2.9 g *N-Acetyl-2-cyan-glycin-äthylester (5)*. Unter Rühren und Eiskühlung wurden 3.2 g **4** zugetropft. Nach 2stdg. Rühren bei Raumtemp. wurde mit 35 ccm Wasser versetzt. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt, mehrmals mit Wasser gewaschen und aus Äthanol/Wasser (1 + 1) umkristallisiert; Schmp. 168–169.5°, Ausb. 4.3 g (95%).

f) *DL-[3- $^2\text{H}_2$]Tyrosin (7)*: 4.3 g **6** wurden mit 46 ccm *Bromwasserstoffsäure* (48proz.) 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde i. Vak. zur Trockne eingeengt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Nach Filtrieren über Aktivkohle stellte man mit wäßrigem Ammoniak auf pH 6 ein. Dabei fiel **7** nahezu quantitativ als farbloser Niederschlag aus; Schmp. 290° (Zers.). Ausb. 2.5 g (92%).

Für die Kontrolle der Markierungsspezifität und der Isotopenanreicherung wurden 50 mg des Syntheseproduktes zum *N-Trifluoracetyl-tyrosin-methylester* umgesetzt (s. o.) und massenspektrometrisch analysiert: Das Massenspektrum zeigte Markierung ausschließlich in der β -Position bei einer Isotopenanreicherung > 99% für jedes der beiden Deuteriumatome.

Berechnung der Konzentration von $[\text{}^{15}\text{N}_2]$ Xanthocillin für statistische Kombination zweier $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-N}$ -Vorläufer aus dem gleichen Pool: In erster Näherung wird davon ausgegangen, daß die Isotopenanreicherung im Pool des Xanthocillin-Vorläufers während der Beobachtungszeit konstant bleibt. Diese Prämisse erscheint gerechtfertigt im Hinblick auf die relativ geringe zeitliche Veränderung der Isotopenanreicherung im gebildeten Xanthocillin. Die Konzentration an ^{14}N -Bausteinen im Pool des Vorläufers sei a ; die Konzentration an ^{15}N -Bausteinen sei b . Bei statistischer Kombination von zwei Bausteinen des Pools (in bimolekularer Reaktion) ergibt sich für die Mengenrelationen der drei möglichen Xanthocillin-Spezies ($(^{14}\text{N}^{14}\text{N})$, $(^{14}\text{N}^{15}\text{N})$, $(^{15}\text{N}^{15}\text{N})$):

$$(^{14}\text{N}^{14}\text{N}) : (^{14}\text{N}^{15}\text{N}) : (^{15}\text{N}^{15}\text{N}) = a^2 : 2ab : b^2 \quad (1.1)$$

$$\text{mit } a + b = 1 \quad (1.2)$$

¹¹⁾ G. Brauer in Handbuch der präparativen anorganischen Chemie, S. 258, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1960.

Die *Konzentration* der di- ^{15}N -markierten Spezies im *gebildeten* Xanthocillin ist:

$$[^{15}\text{N}^{15}\text{N}] = \frac{(^{15}\text{N}^{15}\text{N})}{(^{14}\text{N}^{14}\text{N}) + (^{14}\text{N}^{15}\text{N}) + (^{15}\text{N}^{15}\text{N})}$$

Unter Verwendung der Beziehungen (1.1) und (1.2) kommt man zu:

$$[^{15}\text{N}^{15}\text{N}] = b^2$$

Wenn in erster Näherung die ^{15}N -Anreicherung (b) im Pool des Vorläufers gleich der Gesamt- ^{15}N -Anreicherung (b') im *gebildeten* Xanthocillin gesetzt wird, gilt:

$$b = b'$$

$$\text{und damit } [^{15}\text{N}^{15}\text{N}] = b'^2,$$

[291/71]