

SUMMARY

Hexa-, penta- and tetra-peptides of similar composition bearing aromatic amino-acids on both ends are active in the plastein reaction. Analogous tri- and di-peptides, however, do not polymerize in the presence of pepsin. Substitution by alanine of the amino-end standing tyrosine in the pentapeptide did not affect its ability to form plastein, whereas the same substitution at the carboxy-end caused inactivity. No correspondence exists in peptides between pK values of the acidic and basic end groups and reactivity in plastein formation. Other structural features seem therefore to be responsible.

Syntheses of the investigated peptides are described.

Institut für Organ. Chemie
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität,
Frankfurt am Main

**280. Fluoreszierende Stoffe aus *Rhodnius prolixus* Stål
(Hemiptera, Heteroptera)**

**Ein neues Kynureninderivat: 3-Hydroxykynurenin-schwefelsäure-
ester = Rhodnitin¹)**

von **M. Viscontini** und **H. Schmid**

Herrn Prof. Dr. TH. POSTERNAK zum 60. Geburtstag gewidmet

(29. VIII. 63)

Rhodnius prolixus ist eine grosse, bis zwei Zentimeter lange blutsaugende Raubwanze, die im tropischen und subtropischen Amerika²⁾ als Parasit von Warmblütern lebt. Im Rahmen von systematischen Untersuchungen, die gegenwärtig in unserem Institut durchgeführt werden, und auf Anregung von Herrn Prof. Dr. E. HADORN, Zoologisch-vergleichend anatomisches Institut der Universität Zürich, haben wir das Muster der fluoreszierenden Stoffe dieses im Laboratorium leicht zu züchtenden hemimetabolen Insekts studiert.

Lässt man Extrakte ganzer Larven oder Imagines in einem zweidimensionalen Papierchromatogramm laufen, so lassen sich unter UV.-Licht mindestens 5 fluoreszierende Stoffe nachweisen. Wir bezeichnen sie mit den folgenden Buchstaben (Fig. 1, oben, und Tab. I).

Exkrete dieser Insekten ergeben auf einem zweidimensionalen Papierchromatogramm ein Fluoreszenzmuster mit den beiden Substanzen K und KE, aber in viel grösserer Konzentration (Fig. 1, unten).

¹) Teil der Dissertation von H. SCHMID, Zoologisch-vergleichend anatomisches Institut der Universität Zürich, 1964.

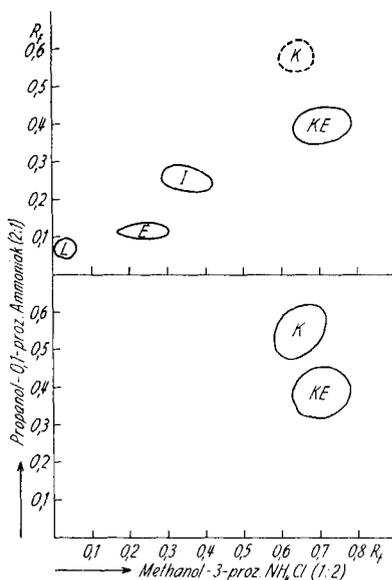
²) Insbesondere in Venezuela und Mexiko.

Tabelle I. *Fluoreszierende Stoffe aus Rh. prolixus*

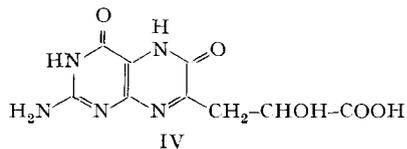
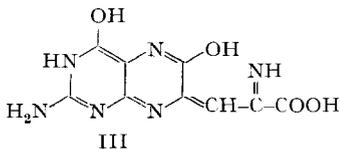
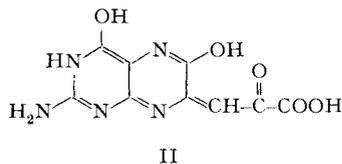
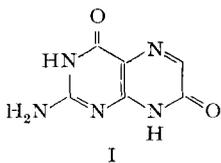
Substanzen		Fluoreszenz
L	(Lepidopterin)	gelb
E	(Erythropterin)	orangerot
I	(Isoxanthopterin)	violett
K	(Kynurenin)	hellblau
KE	(unbekannt)	hellblau bis blaugrün (je nach pH und Lösungsmittel)

Fig. 1. Zweidimensionale Chromatogramme von Extrakten (Methanol/1-proz. NH_3 , 1:1) aus Larven (oben) und Exkreten (unten) von *Rhodnius prolixus*

Mit Ausnahme des K in der oberen Abb. sind nur die unter UV.-Licht regelmässig und deutlich sichtbaren fluoreszierenden Flecke eingetragen.

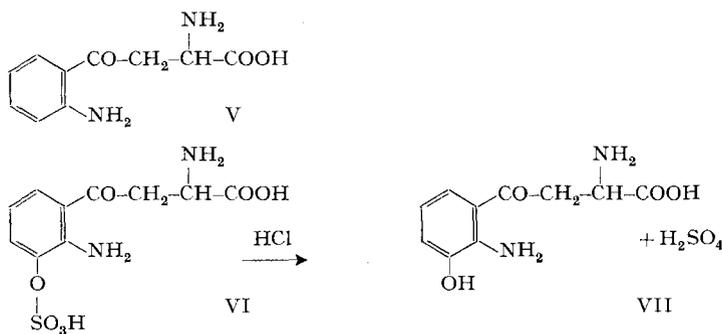


Wir isolierten die 5 nachgewiesenen fluoreszierenden Stoffe (Tab. I) durch Chromatographie auf Papiersäulen, eine Methode, die wir stets mit gutem Erfolg anwenden. Vier dieser Verbindungen sind bereits bekannt, nämlich Isoxanthopterin (I), Erythropterin (II), Lepidopterin (III) und Kynurenin (IV). Sie wurden durch ihre UV.-Spektren und papierchromatographischen Vergleich mit synthetischen Substanzen identifiziert, Kynurenin ausserdem noch durch Analysen charakterisiert. Konstitutionsaufklärung der neuen Substanz KE s. unten.

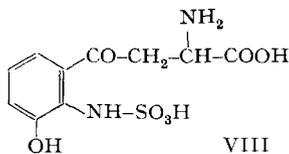


Ausser den genannten 5 Stoffen fanden wir in einem Experiment eine geringe Menge Ekapterin (IV) als Begleitstoff von Erythropterin. Ob Ekapterin als genuines Produkt in *Rh. prolixus* vorliegt, können wir nicht mit Sicherheit entscheiden, da diese Substanz auf Papierchromatogrammen von frischen Tierextrakten nie nachgewiesen werden konnte. Es mag sein, dass es nur durch Oxydoreduktion von Erythropterin entstanden ist, was wir bei der Aufarbeitung von Erythropterin-Extrakten aus *Ephestia kühniella* oft beobachteten³⁾. Auf jeden Fall ist es nun zum zweiten Mal eindeutig bewiesen, dass 9-substituierte Xanthopterinhomologe nicht nur in der Ordnung der Lepidopteren (Schmetterlinge) vorkommen, fanden doch MERLINI & MONDELLI⁴⁾ schon vor einiger Zeit Erythropterin in der Feuerwanze *Pyrrhocoris apterus* (L.). Im übrigen ist wahrscheinlich zu erwarten, dass Erythropterin stets von Lepidopterin und Ekapterin begleitet sei. Wie schon erwähnt, ist die bei *Rh. prolixus* gefundene Substanz KE bisher noch nicht beschrieben. KE ist im Gegensatz zu Kynurenin (V) in Extrakten ganzer Tiere in relativ grosser Menge vorhanden und fluoresziert – verglichen mit Kynurenin – mehr blaugrün. Wir konnten 150 mg dieser Verbindung, die wir Rhodnitin nennen wollen, als Ammoniumsalz isolieren und ihre Struktur aufklären.

Auf Grund von UV.-Spektren (Fig. 2), Elementaranalysen und den Ergebnissen der sauren Hydrolyse glauben wir, dass es sich um einen Schwefelsäureester (VI) des 3-Hydroxykynurenins (VII) handelt.



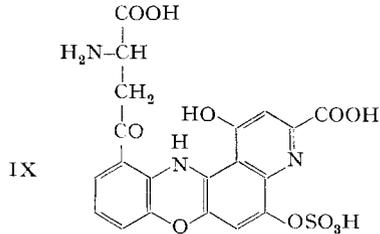
Das UV.-Spektrum (Fig. 2) ist oberhalb pH 7 demjenigen von Kynurenin (Fig. 3) sehr ähnlich, die Maxima sind lediglich um 4–5 m μ bathochrom verschoben. Erst bei saurem pH tritt ein Unterschied auf. Durch Salzsäure wird Rhodnitin in 3-Hydroxykynurenin (VII, UV.-Spektrum: Fig. 4) und Schwefelsäure gespalten. Demzufolge bleibt für Rhodnitin nur die Struktur VI möglich, da ein Sulfonamid (VIII) ein ganz anderes UV.-Spektrum hätte als dasjenige der Figur 2.



³⁾ M. VISCONTINI & H. STIERLIN, *Helv.* **44**, 1783 (1961); **45**, 2479 (1962).

⁴⁾ L. MERLINI & R. MONDELLI, *Gazz. chim. ital.* **92**, 1251 (1962).

Rhodnitiin ist optisch aktiv und verhält sich gegenüber Luft, Oxydationsmitteln und Carbonylderivaten unbeständig. Bei diesen Umwandlungen entstehen gefärbte Produkte, die wir nicht näher untersuchten. Man kann aber aus den Arbeiten von BUTENANDT und seinen Mitarbeitern folgern, dass es sich um Phenoxazonderivate handelt.



Es sei hier erwähnt, dass Ommiin und Ommatin D ebenfalls Schwefelsäureester von Tryptophan-Metaboliten sind. Ommatin D (IX) ist der Schwefelsäureester des

Fig. 2. UV.-Absorptionsspektrum von
Rhodnitiin
----- pH 1 ——— pH 7 bis 13

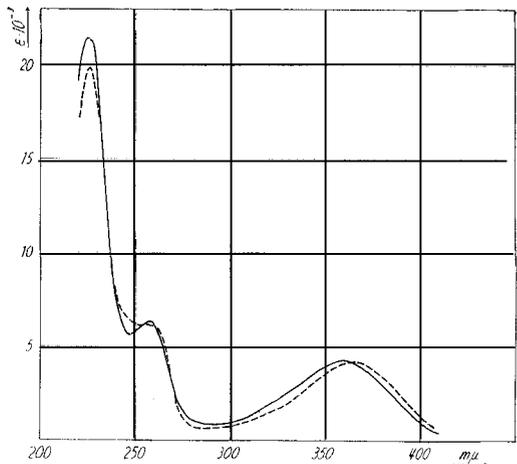
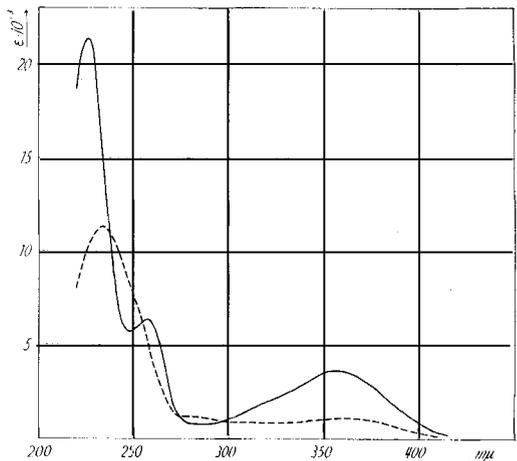


Fig. 3. UV.-Absorptionsspektrum von
Kynurenin aus Rhodnius prolixus
----- pH 1 ——— pH 7 bis 13



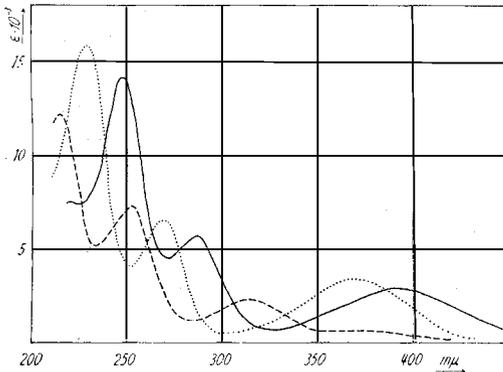


Fig. 4. UV.-Absorptionsspektrum von 3-Hydroxykynurenin aus *Rhodnius prolixus*
 ----- pH 1 - - - - - pH 7 ——— pH 13

Dihydroxanthommatins und somit nah verwandt mit unserem Rhodnitin⁵⁾. Der Zusammenhang zwischen Dihydroxanthommatin, Ommatin D und Rhodnitin wie auch ihre physiologische und biologische Bedeutung bleiben noch abzuklären.

Herrn Prof. Dr. E. HADORN sei für seine Anregungen und sein Interesse an dieser Arbeit bestens gedankt. Die Herren Prof. Dr. A. BUTENANDT und Dr. SCHÄFER, M.P.I. für Biochemie, München, haben uns in freundlicher Weise DL-3-Hydroxykynurenin sowie UV.- und IR.-Spektren desselben zur Verfügung gestellt, wofür wir ihnen sehr zu Dank verpflichtet sind. In unserer mikroanalytischen Abteilung (Leiter: Herr H. FROHOFER) wurden die Analysen durchgeführt und die IR.-Spektren aufgenommen. Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG danken wir für seine materielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

Fluoreszierende Stoffe aus ganzen Tieren. 10 g Imagines (50 Tage nach Fütterung der Nymphen) und ebensoviel Papierpulver wurden unter Zugabe von destilliertem Wasser bei 0° homogenisiert. Nach Gefrier Trocknung des entstandenen Breies wurden die Fettstoffe mit Äther daraus entfernt (20 h im SOXHLET-Extraktor). Das wieder getrocknete und mit reinem Isopropanol zu einem Brei angerührte Homogenat trugen wir auf eine Papiersäule von 9 cm Durchmesser und 5 cm Höhe auf, wuschen zuerst mit Isopropanol, dann Isopropanol-Wasser (4:1) und eluierten anschliessend die fluoreszierenden Stoffe nacheinander mit Isopropanol-Wasser (3:2), Isopropanol-1-proz. Ammoniumacetatlösung (3:2) und zuletzt mit Isopropanol-1-proz. Ammoniaklösung (2:1). Die Hauptmenge des Erythropterins liess sich erst mit dem ammoniakalischen Lösungsmittel gewinnen. Da aber Erythropterin in Gegenwart von Ammoniak nicht beständig ist⁶⁾, mussten alle aufgefangenen Lösungen sofort eingeengt und dann mit HCl neutralisiert werden. Dabei entstand ein braunschwarzer Niederschlag von Verunreinigungen, begleitet von adsorbierten Pterinen. Nach Abtrennung von der Mutterlauge wurde dieser Niederschlag in Wasser aufgeschlämmt und durch tropfenweise Zugabe von Ammoniak wieder in Lösung gebracht. Nach erneutem vorsichtigem Ansäuern bis pH 3-4 fielen Verunreinigungen aus, während die Pterine in Lösung blieben. Beide Mutterlaugen wurden hierauf gemeinsam weiterverarbeitet.

Die einzelnen fluoreszierenden Komponenten des nach der beschriebenen Methode extrahierten Stoffgemisches wurden durch mehrmaliges Chromatographieren mit verschiedenen Lösungsmitteln voneinander getrennt und gereinigt (Tab. II), bis sie sich papierchromatographisch als einheitlich erwiesen.

Fluoreszierende Stoffe aus Exkreten. Zur Gewinnung des Kotes wurde der Boden der Zuchtgefässe mit Filtrierpapier belegt. Wir homogenisierten im Mixer eine grosse Anzahl solcher Papiere unter Zugabe von Wasser und nutschten die braune Lösung ab. Durch vorsichtiges Ansäuern mit HCl und anschliessendes Filtrieren gelang es, einen Teil der unerwünschten Stoffe als Niederschlag zu entfernen. Das Filtrat wurde eingeengt und dreimal im Scheidetrichter ausgeäthert.

⁵⁾ A. BUTENANDT, E. BIEKERT & B. LINZEN, *Z. physiol. Chem.* 312, 227 (1958); A. BUTENANDT, G. NEUBERT & U. BAUMANN, *ibid.* 314, 15 (1959); A. BUTENANDT, E. BIEKERT, N. KOGA & P. TRAUB, *ibid.* 321, 258 (1960).

Tabelle II. *Trennung und Reinigung von Pierinen aus Rhodnius-Imagines und -Larven*
 Lösungsmittel: Isopropanol = Ipr, Ammoniumacetat = AcONH₄, Eisessig = AcOH

Säule	Maße in cm		Lösungsmittel	Effekt	weitere Verwen- dung	
	∅	H				
I	9	5	Ipr	rein	Waschen	Säule II
			Ipr-H ₂ O	4:1	Waschen	
			Ipr-H ₂ O	3:2	Elution	
			Ipr-1-proz. AcONH ₄	3:2	Elution	
			Ipr-1-proz. NH ₄ OH	2:1	Elution: Erythropterin nach Fällung von Verunreinigungen Falls mit NH ₄ OH stehengelassen, entsteht Lepidopterin	
II	3	15	0,3-proz. NH ₄ Cl		Reinigung	Säule V
III	3	21	Ipr-H ₂ O	2:1	Trennung: Erythropterin Isoxantho- pterin	Säule III Säule IV
IV	1,4	15	Ipr-1-proz. NH ₄ Cl	1:1	Trennung: Ekapterin Erythropterin	Säule VII Säule VI rein
V	2,2	20	1-proz. NH ₄ Cl H ₂ O		Waschen Elution: Lepidopterin	rein
VI	1,1	9	0,3-proz. NH ₄ Cl		Reinigung: Ekapterin	rein
VII	2,2	21	Ipr-1-proz. NH ₄ OH	2:1	Reinigung	Säule VIII
VIII	1,3	20	Ipr-2-proz. AcONH ₄	2:1	Reinigung: Isoxantho- pterin	rein

Trennung und Reinigung der einzelnen Komponenten erfolgten durch Säulenchromatographie. Da uns aber vorerst die Natur der Stoffe K und KE unbekannt war und wir deshalb ziemlich grosse Mengen isolieren wollten, gestaltete sich der Arbeitsgang ziemlich kompliziert. Die Tabelle III gibt davon eine vereinfachte, auf das Wesentliche beschränkte Darstellung.

Tabelle III. *Säulenchromatographie der Extraktstoffe aus Rhodnius-Kot*

Säule	Maße in cm		Lösungsmittel	Effekt	weitere Verwen- dung	
	∅	H				
I	9	38	Ipr	rein	Waschen	
			Ipr-H ₂ O	4:1	Elution, grobe Trennung:	
			Ipr-H ₂ O	65:35		
II	6,5	40	0,1-proz. NH ₄ Cl		Substanz K Substanz KE	Säule II Säule VI
III	4	13	Butanol/AcOH/H ₂ O	50:3:7	Reinigung von K	Säule III
			Ipr	rein	Waschen	
			Ipr-H ₂ O	1:1	Elution von K	Säule IV
IV	6,5	36	Ipr-H ₂ O	4:1	Reinigung von K	Säule V
V	6,5	24	Ipr-H ₂ O	9:1	Reinigung von K = reines Kynurenin	
VI	7	40	Ipr-1-proz. NH ₄ OH	4:1	Reinigung von KE	Säule VII
VII	9	21	0,1-proz. NH ₄ Cl		Reinigung von KE	Säule VIII
VIII	9	48	Ipr-H ₂ O	4:1	Entfernung von NH ₄ Cl	
					Reinigung von KE = reines Rhodnitin	

Die besten Trennungen erhielten wir mit Isopropanol-Wasser 4:1 und 0,1-proz. NH_4Cl -Lösung. Bei den letzten chromatographischen Reinigungen gaben wir den Lösungsmitteln pro Liter 0,2 ml 2-Mercaptoäthanol zu, um die Substanzen vor der Oxydation durch Luft zu schützen.

Kynurenin aus Rhodnius. Das nach der Tabelle III isolierte Produkt K wurde mit synthetischem DL-Kynurenin verglichen. Die UV.-Spektren beider Proben (Fig. 3) zeigen den genau gleichen Kurvenverlauf. Auch die IR.-Spektren (Fig. 5) sind identisch. Die Rf-Werte (Tab. IV) auf Mischchromatogrammen sind in verschiedenen Lösungsmitteln gleich. Das synthetische Produkt gibt in Isopropanol-Wasser (4:1 und 3:2), Isopropanol-2-proz. Ammonacetat-Lösung (1:1), Butanol-Eisessig-Wasser (20:3:7) und Pyridin-Essigester-Wasser (4:3:3) bei genügend langer Entwicklungszeit Doppelflecke, die den beiden Antipoden D und L entsprechen. Wie erwartet, bildet das aus *Rhodnius* isolierte Kynurenin stets einheitliche Flecke.

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{N}_2$ Ber. C 57,68 H 5,81 N 13,46% Gef. C 55,48 H 5,86 N 13,67% (aus *Rhodnius*)
(208,21) 57,03 .. 5,64 .. 14,85% (synth.)

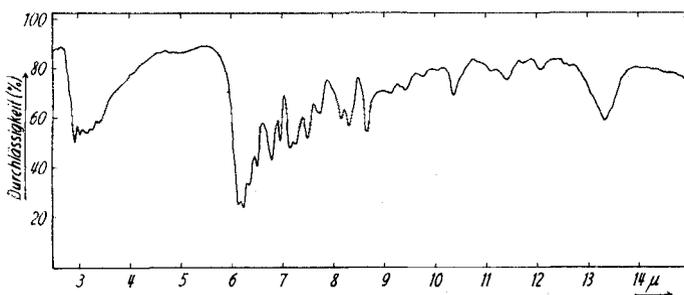


Fig. 5. IR.-Spektrum von Kynurenin (in KBr aufgenommen)

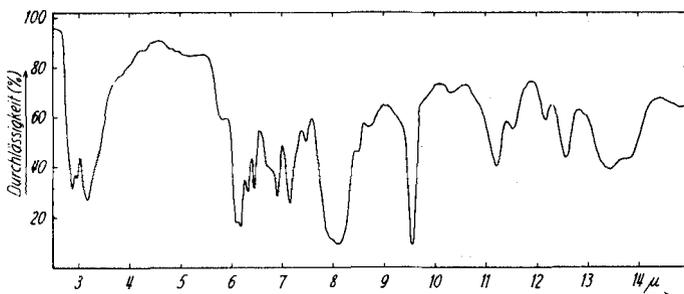
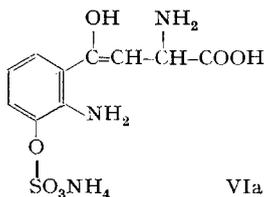


Fig. 6. IR.-Spektrum von Rhodnitin (in KBr aufgenommen)

Tabelle IV. Rf-Werte von Kynurenin (K), 3-Hydroxykynurenin (HK) und Rhodnitin (KE) in verschiedenen Lösungsmitteln (aufsteigend chromatographiert)

Lösungsmittel		Rf-Werte von		
		K	HK	KE
Isopropanol/Wasser	(4:1)	0,30	0,25	0,15
Isopropanol/Wasser	(3:2)	0,57	0,52	0,59
Isopropanol/1-proz. Ammoniaklösung	(2:1)	0,58	0,31	0,47
Isopropanol/2-proz. Ammoniumacetat-Lösung	(1:1)	0,76	0,70	0,71
Butanol/Eisessig/Wasser	(20:3:7)	0,43	0,40	0,16
Wasser	rein	0,80	0,68	0,95
3-proz. Natriumcitrat-Lösung		0,80	0,71	0,86
1-proz. Ammoniumchlorid-Lösung		0,79	0,70	0,88

Ammoniumsalz von 3-Hydroxykynurenin-schwefelsäureester (Rhodnitin). An den UV.-Spektren (Fig. 2) des nach Tabelle III isolierten Rhodnitins lässt sich unschwer erkennen, dass es sich um ein Kynureninderivat handeln muss. Auch das IR.-Spektrum des Produktes (Fig. 6) weicht von dem des Kynurenins nicht stark ab. Unklar ist, warum beiden Spektren die bei 5,5–6 μ zu erwartenden Keto- und Carboxyl-Banden fehlen. Da dies aber auch für das Spektrum von 3-Hydroxykynurenin zutrifft, handelt es sich offenbar um eine charakteristische Eigenschaft derartigen Verbindungen (Enol- anstatt Keto-Gruppierung VIa?).



$C_{10}H_{15}O_7N_3S$ (321,31)	Ber. C 37,38 Gef. „ 37,62	H 4,71 „ 5,09	N 13,08 „ 12,00	S 9,98% „ 10,25%
-----------------------------------	------------------------------	------------------	--------------------	---------------------

Das isolierte reine Ammoniumsalz des Rhodnitins ist in festem Zustand hell gelblich bis beige, in Lösung und als Chromatogrammleck gelb. Es fluoresziert blau mit einem Stich gegen blaugrün und ist lichtbeständig. In Wasser ist es sehr leicht, in Methanol gut löslich, nicht aber in Propanol, Aceton, Äther oder anderen apolaren organischen Lösungsmitteln. Das Rhodnitin ist Ninhydrinpositiv und optisch aktiv: $[\alpha]_D^{25} = -19,6^\circ \pm 2^\circ$ (H_2O). Ein Smp. kann nicht bestimmt werden, da sich das Salz bei etwa 190° zu zersetzen beginnt.

Versetzt man eine methanolische Lösung des Rhodnitins mit Aceton, so fällt ein Teil der Substanz aus. Die Mutterlauge färbt sich bei Zimmertemperatur im Laufe einiger Stunden rot und liefert durch Chromatographie drei Stoffe mit roter, oranger und gelber Fluoreszenz. Diese Substanzen haben wir noch nicht chemisch untersucht.

Hydrolyse des Rhodnitins. 10 mg reines Rhodnitin wurden in 2 ml 6N HCl gelöst und $\frac{1}{2}$ Std. unter Rückfluss gekocht. Papierchromatogramme des Hydrolysates neben Vergleichssubstanzen zeigten, dass der ursprüngliche fluoreszierende Stoff vollständig verschwunden und statt dessen 3-Hydroxykynurenin entstanden war (Tab. IV).

Mit Bariumacetat liessen sich 7 mg $BaSO_4$ ausfällen (Theorie: 7,25 mg). Durch zweimaliges Chromatographieren des Filtrats mit Butanol-Eisessig-Wasser (40:3:7) und Isopropanol-Wasser (4:1) auf dünnen Cellulosesäulen erhielten wir reines 3-Hydroxykynurenin.

ZUSAMMENFASSUNG

Neben Erythropterin, Lepidopterin, Isoxanthopterin und Kynurenin wurde aus *Rhodnius prolixus* STÄL ein Schwefelsäureester des 3-Hydroxykynurenins isoliert. Für diesen neuen Naturstoff schlagen wir den Namen Rhodnitin vor.

Organisch-chemisches Institut
der Universität Zürich