

ZUSAMMENFASSUNG

Aus frischen Fruchtkörpern von *Amanita muscaria* (L. ex Fr.) HOOKER, wurden Prämuscimol, $C_5H_8O_5N_2$, Smp. 145° (Zers.) und Muscazon, $C_5H_6O_4N_2$, isoliert. Beide Substanzen reagieren mit Ninhydrin gelb. Prämuscimol geht leicht unter Wasser- und CO_2 -Abspaltung in Muscimol über. Prämuscimol wirkt wie Muscimol stark narkosepotenzierend.

Organisch-Chemisches Institut
der Universität, Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. F. R. MÜLLER & C. H. EUGSTER, *Helv.* **48**, 910 (1965).
 [2] T. TAKEMOTO *et al.*, *Yakugaku Zasshi* **84**, 1198, 1233 (1964); *Chem. Abstr.* **62**, 8121 (1965).
 [3] A. R. GAGNEUX, F. HÄFLIGER, R. MEIER & C. H. EUGSTER, *Tetrahedron Letters* **1965**, im Druck.

99. Beiträge zur Chemie der Carotinoide

2. Mitteilung

Säurekatalytische Reaktionen von Isozeaxanthin

von E. C. Grob und R. P. Pflugshaupt

(5. IV. 65)

In der 1. Mitteilung [1] beschrieben wir säurekatalysierte Umsetzungen von Isozeaxanthin, Lutein und Zeaxanthin in verschiedenen Lösungsmitteln. In 0,01M HCl haltigen Alkoholen erhielten wir aus Isozeaxanthin die entsprechenden Diäther,

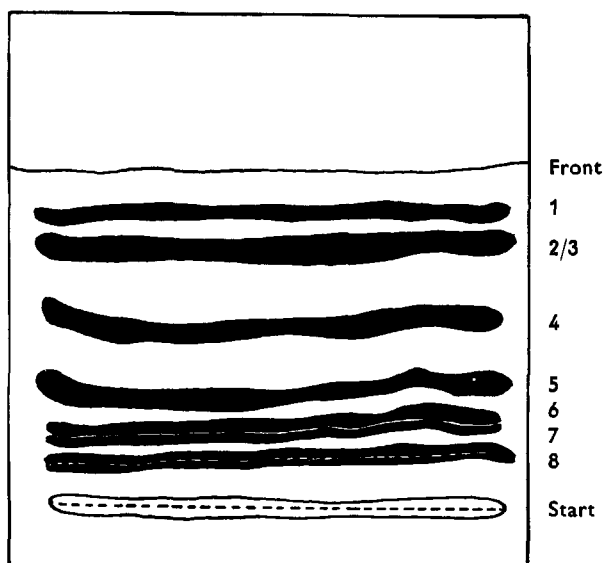


Fig. 1. *Dünnschichtchromatogramm der Reaktionsprodukte von Isozeaxanthin in Benzol-HCl*
(Kieselgel-G, Benzol:Petroläther:Äthanol 50:50:4)

aus Lutein die Monoäther, während Zeaxanthin, das keine allylständige OH-Gruppe besitzt, nicht reagierte.

In der vorliegenden Arbeit werden die entsprechenden Reaktionen von Isozeaxanthin in Benzol-0,01M HCl beschrieben [2]. Lässt man auf chromatographisch gereinigtes Isozeaxanthin bei Zimmertemperatur und diffusum Tageslicht während 20 Min. Benzol-0,01M HCl einwirken und unterbricht danach die Reaktion durch Zugabe einer kleinen Menge Kaliumcarbonat, wird bei der Auftrennung des Reaktionsgemisches das Dünnschichtchromatogramm der Fig. 1 erhalten.

Die Zonen 2 und 3 lassen sich erst durch Rechromatographieren mit einem unpolaren Laufmittel (Benzol: Petroläther 1:1) trennen. Die Zonen 6 und 7 sind mit Methylenchlorid: Äthylacetat 5:1 gut trennbar. Zone 8 besteht aus unverändertem Isozeaxanthin. Zur weiteren Untersuchung wurden die einzelnen Zonen eluiert und rechromatographiert. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte geschah auf Grund folgender Feststellungen: a) Spektren: sichtbar, UV., IR.; b) Chromatographisches Verhalten; c) Verätherbarkeit der hydroxylhaltigen Komponenten; d) Oxydierbarkeit hydroxylhaltiger Komponenten; e) Reduzierbarkeit carbonylhaltiger Komponenten.

Charakterisierung und Identifizierung der Reaktionsprodukte

Zone 1. – *Rf*-Wert: 0,85 (Kieselgel-G; Benzol: Petroläther: Äthanol 50:50:4).

UV-Spektrum (auch sichtbarer Bereich) (Fig. 2) Maxima: 445; 470; 501 nm. Die sehr ausgeprägte Feinstruktur liefert einen Hinweis für das Vorhandensein einer Retrostruktur. Nach der Lage der Maxima muss Zone 1 eine Verbindung mit 12 konjugierten Doppelbindungen sein.

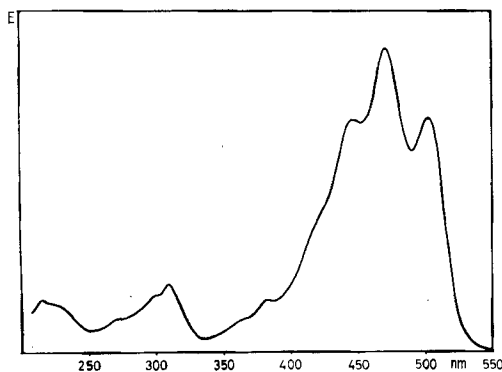


Fig. 2. *UV*-Spektrum von Zone 1 (Dehydro-retro- β -carotin)

IR-Spektrum (Fig. 3): OH-Gruppen: –; C=O-Gruppen: –; Retrostruktur: +, da Aufspaltung der sog. all-*trans*-Bande bei 965 cm^{-1} in ein Dublett bei 955 und 977 cm^{-1} [3]; Symmetrie: Das Spektrum ist sehr einfach, deshalb muss die Molekel symmetrisch gebaut sein; d. h. es muss sich um Dehydro-retro- β -carotin handeln (I).

Zone 2. – *Rf*-Wert: 0,78.

UV-Spektrum (Fig. 4): Maxima: 419,5; 443; 472,5 nm, also wesentlich kürzerwellig als Zone 1. Das Spektrum weist jedoch den gleichen Habitus auf, was für die Retrostruktur spricht.

IR-Spektrum (Fig. 5): OH-Gruppen: –; C=O-Gruppen: schwaches Dublett bei 1690 und 1705 cm^{-1} , also im Bereich der isolierten Carbonylgruppe. Retrostruktur: +. Die normale all-*trans*-Bande ist bei 965 cm^{-1} als schwache Schulter sichtbar, was auf eine Verunreinigung zurückzuführen sein dürfte (die Zonen 2 und 3 liegen auf dem Dünnschichtchromatogramm sehr nahe

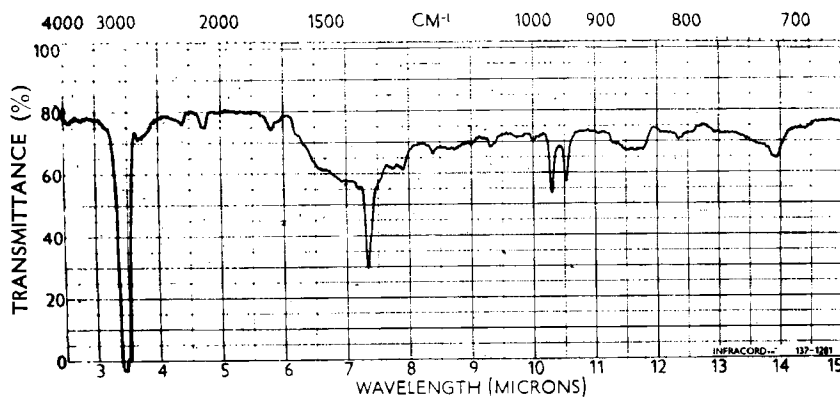


Fig. 3. IR.-Spektrum von Zone 1 (Dehydro-retro- β -carotin)

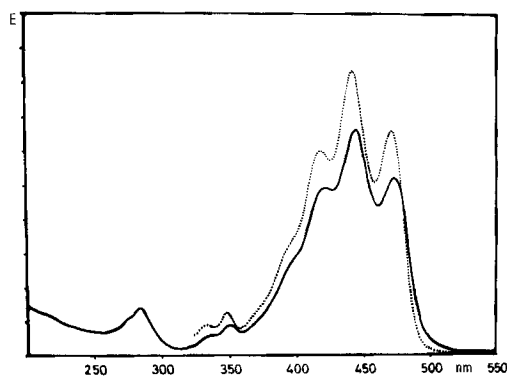


Fig. 4. UV.-Spektren zu Zone 2

— ursprüngliche Substanz. Reduktionsprodukt

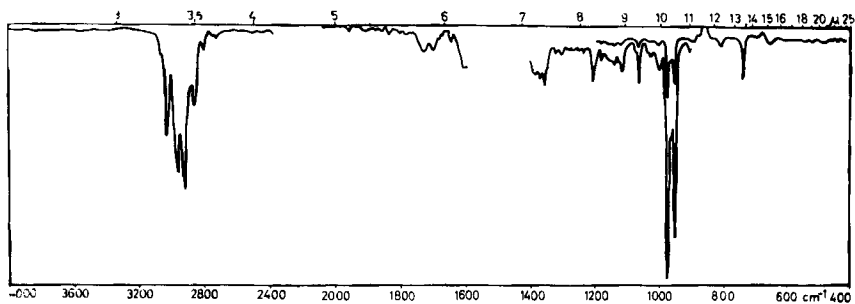
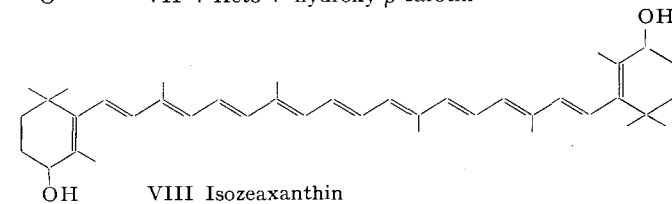
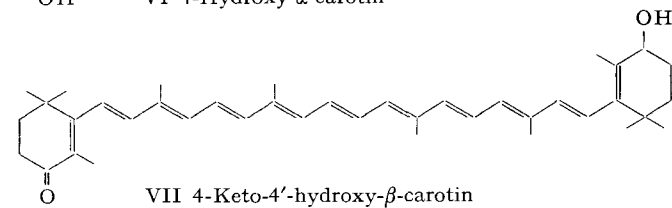
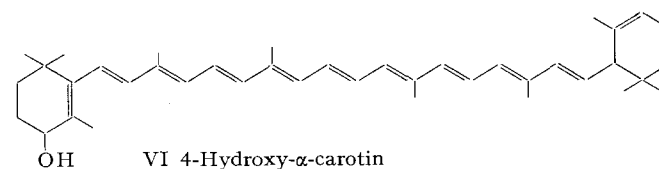
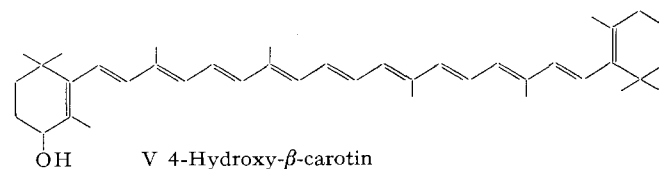
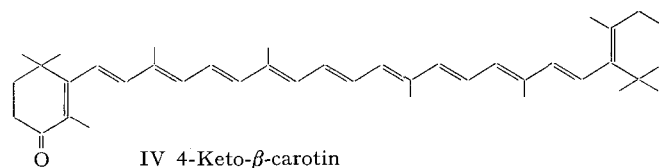
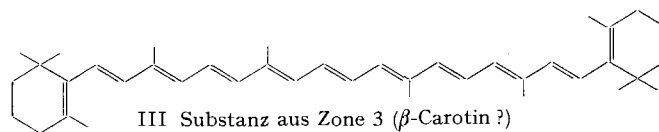
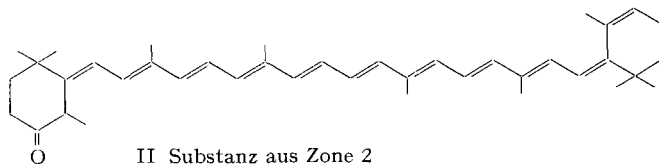
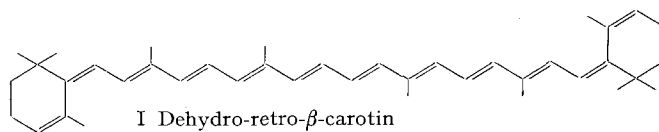


Fig. 5. IR.-Spektrum von Zone 2

beieinander). Symmetrie: Die Fingerprintregion des Spektrums ist etwas bandenreicher als bei Zone 1, die Substanz ist wahrscheinlich nicht symmetrisch.

Reduktion der Substanz aus Zone 2: Um zu entscheiden, ob die laut IR.-Spektrum erwartete Carbonylgruppe tatsächlich vorhanden ist, wurde die Substanz mit Natriumborhydrid reduziert. Tatsächlich entsteht ein Reaktionsprodukt mit grösserer Polarität, das sich im Dünnschichtchromatogramm im Bereich der Monohydroxycarotinoide findet.

Konstitutionsformeln der Reaktionsprodukte von Isozeaxanthin in Benzol-0,01 M HCl



UV.-Spektrum des Reduktionsproduktes (Fig. 4): Maxima: 418; 442; 471 nm. Aus der schwachen Blauverschiebung der Absorptionsbanden gegenüber denjenigen der Zone 2 kann geschlossen werden, dass die Carbonylgruppe nicht konjugiert ist. Für die Substanz aus Zone 2 schlagen wir die Konstitution II vor.

Zone 3. – *Rf-Wert*: 0,76.

UV.-Spektrum (Fig. 6): Maxima 427 (Schulter); 451; 479,5 nm. Das Spektrum ist identisch mit dem von β -Carotin. Also muss die Molekel 11 konjugierte Doppelbindungen enthalten, die wie beim β -Carotin angeordnet sind.

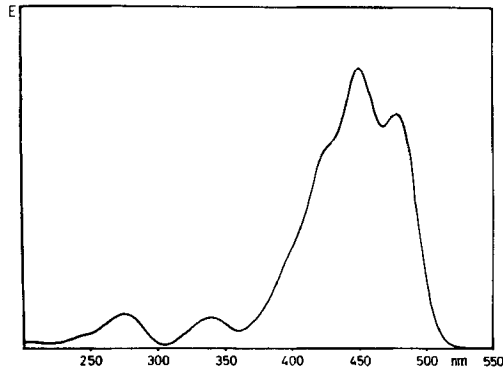


Fig. 6. *UV.-Spektrum von Zone 3 (β -Carotin)*

IR.-Spektrum (Fig. 7): OH-Gruppen: –; C=O-Gruppen: sehr schwache Bande im Bereich der nicht konjugierten Carbonylgruppe (1730 cm^{-1}). Durch Behandlung mit Natriumborhydrid konnte gezeigt werden, dass die Substanz keine Carbonylgruppe enthält, die beobachtete Bande also von Verunreinigungen herrührt. Retrostruktur: –.

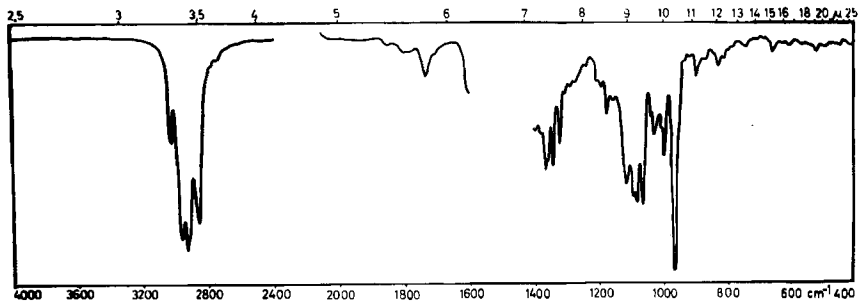


Fig. 7. *IR.-Spektrum von Zone 3 (β -Carotin)*

Auf dem Dünnschichtchromatogramm ist die Substanz knapp von β -Carotin trennbar, möglicherweise handelt es sich um ein *cis*-Isomeres von β -Carotin (III).

Zone 4. – *Rf-Wert*: 0,55.

UV.-Spektrum (Fig. 8): Maxima: ca. 432 (schwache Schulter); 458,5 (Hauptmaximum); ca. 483 nm (schwache Schulter). Das Verschwinden der Feinstruktur und die Rotverschiebung des Hauptmaximums gegenüber β -Carotin um ca. 6 nm sprechen für eine Substanz mit dem C-Gerüst des β -Carotins und einer konjugierten Carbonylgruppe.

IR.-Spektrum (Fig. 9): OH-Gruppen: –; C=O-Gruppen: Starke Bande bei 1670 cm^{-1} , welche auf eine konjugierte Carbonylgruppe zurückzuführen ist. Retrostruktur: –.

Reduktion der Zone 4: Durch die Reduktion mit Natriumborhydrid erhält man aus Zone 4 ein Monohydroxycarotinoid, das mit der Substanz aus Zone 5 identisch ist.

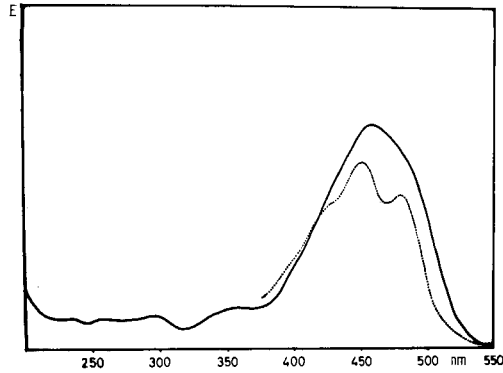


Fig. 8. UV.-Spektren zu Zone 4
 — ursprüngliche Substanz (4-Keto- β -carotin, Echinenon)
 Reduktionsprodukt (4-Hydroxy- β -carotin)

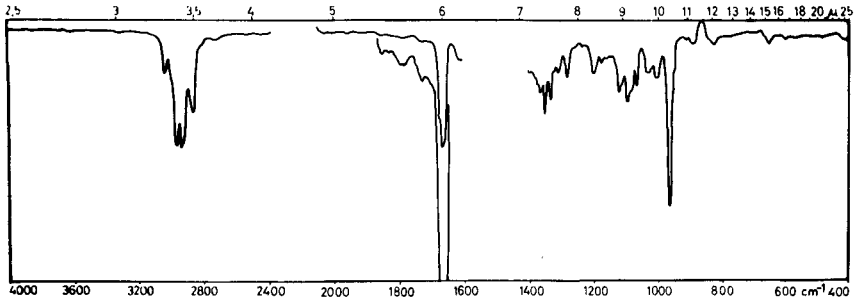


Fig. 9. IR.-Spektrum von Zone 4 (4-Keto- β -carotin)

UV.-Spektrum des Reduktionsproduktes (Fig. 8): Maxima: 427 (Schulter), 451, 479 nm (vgl. UV.-Spektrum Zone 5).

Verätherbarkeit des Reduktionsproduktes von Zone 4: In HCl-haltigem Äthanol verätherbar; das Reduktionsprodukt muss also eine allylständige OH-Gruppe enthalten und ist als 4-Hydroxy- β -carotin aufzufassen. Die Substanz der Zone 4 ist demnach 4-Keto- β -carotin (Echinenon) (IV).

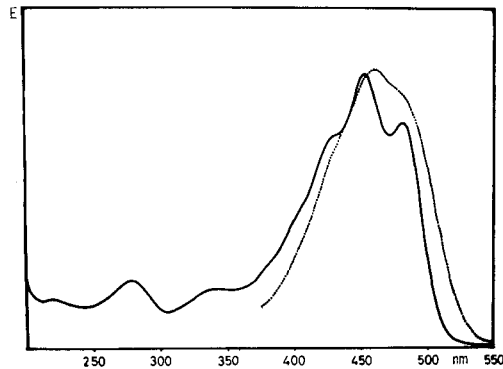


Fig. 10. UV.-Spektren zu Zone 5
 — ursprüngliche Substanz (4-Hydroxy- β -carotin)
 Oxydationsprodukt (4-Keto- β -carotin)

Zone 5. – *Rf*-Wert: 0,35.

UV-Spektrum (Fig. 10): Maxima 427 (Schulter); 451; 478,5 nm. Das Spektrum ist analog dem von β -Carotin, dessen Hauptmaximum allerdings bei 453 nm liegt. Die schwache hypsochrome Verschiebung von 2 nm kann auf die Anwesenheit einer OH-Gruppe hindeuten.

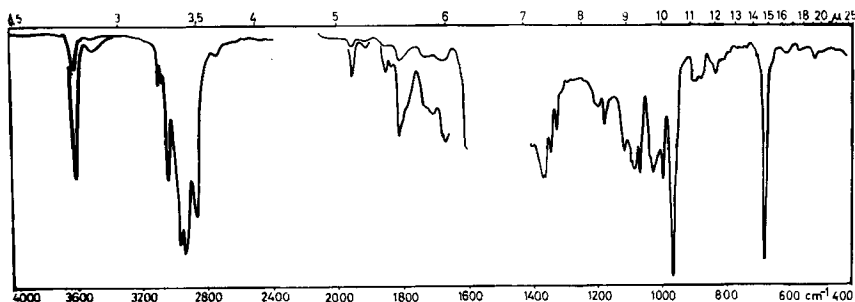


Fig. 11. *IR*-Spektrum von Zone 5 (4-Hydroxy- β -carotin)

IR-Spektrum (Fig. 11): OH-Gruppe: +. Scharfe Bande bei 3605 cm^{-1} , schwache Bande bei 3490 cm^{-1} (H-Brücken). Die Bande bei 1030 cm^{-1} zeigt, dass sich die OH-Gruppe in 4-Stellung befinden muss [4]. C=O-Gruppen: -. Retrostruktur: -.

Verätherbarkeit: Mit Äthanol leicht zu veräthern, also muss die OH-Gruppe allylständig sein.

Oxydierbarkeit: Mit MnO_2 lässt sich die Substanz der Zone 5 zu einem Carbonylderivat oxydieren [5], das mit der Substanz aus Zone 4 (IV) identisch ist.

UV-Spektrum des Oxydationsproduktes (Fig. 10): Maxima: ca. 431 (sehr schwache Schulter), 459,5 (Hauptmaximum), ca. 482 nm (schwache Schulter) (vgl. Fig. 8). Die Substanz aus Zone 5 ist demnach 4-Hydroxy- β -carotin (V).

Zone 6. – *Rf*-Wert: 0,26.

UV-Spektrum (Fig. 12): Maxima: Maxima: 423 (ausgeprägte Schulter); 445,5; 474 nm. Das Spektrum ist gleich dem von Lutein, von dem es sich allerdings durch eine Verschiebung um ca. 1 nm nach kürzeren Wellenlängen unterscheidet; das weist auf die Anwesenheit einer OH-Gruppe in Allylstellung zum konjugierten System hin.

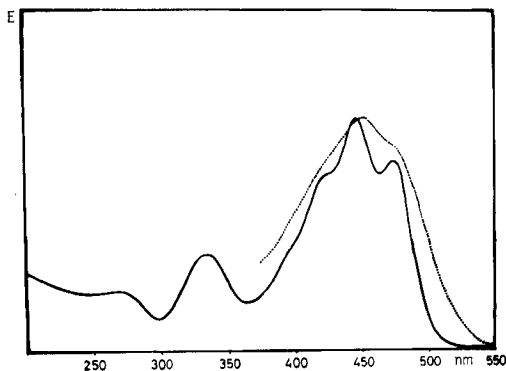


Fig. 12. *UV*-Spektren zu Zone 6

— ursprüngliche Substanz (4-Hydroxy- α -carotin)
 Oxydationsprodukt (4-Keto- α -carotin)

Verätherbarkeit: Mit Äthanol-HCl leicht zu veräthern, also muss die OH-Gruppe allylständig sein.

Oxydierbarkeit: Die Hydroxylgruppe konnte mit MnO_2 zur Carbonylgruppe oxydiert werden.

UV.-Spektrum des Oxydationsproduktes (Fig. 12): Maxima: ca. 425 (schwache Schulter), 451 (Hauptmaximum), ca. 474 nm (schwache Schulter). Das Spektrum besitzt keine Feinstruktur und ist identisch mit dem von 4-Keto- α -carotin.

Die Substanz aus Zone 6 muss also 4-Hydroxy- α -carotin sein (VI).

Zone 7. – *Rf.-Wert:* 0,24.

UV.-Spektrum (Fig. 13): Maxima: ca. 431 (schwache Schulter), 457,5 (Hauptmaximum), ca. 481 nm (schwache Schulter). Das Spektrum erinnert an dasjenige von Zone 4, liegt aber ca. 1 nm

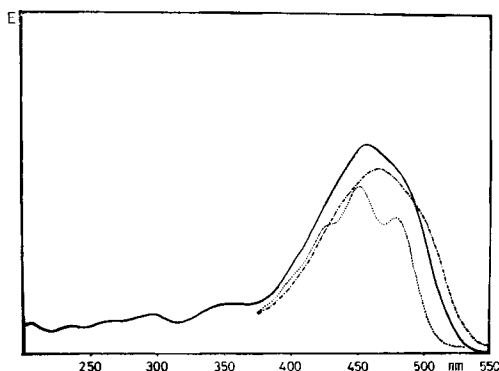


Fig. 13. *UV.-Spektren zu Zone 7*

- ursprüngliche Substanz (4-Keto-4'-Hydroxy- β -carotin)
- Reduktionsprodukt (Isozeaxanthin)
- · - · - Oxydationsprodukt (Canthaxanthin)

kürzerwellig, was auf die Anwesenheit einer allylständigen OH-Gruppe hinweist, welche nebst der schon für Zone 4 postulierten Carbonylgruppe vorhanden sein muss.

IR.-Spektrum (Fig. 14): OH-Gruppen: +. Scharfe Bande bei 3605 cm^{-1} , keine durch H-Brücken gedämpfte Bande (Verdünnung). Die Bande bei 1030 cm^{-1} weist auf die 4-Stellung der OH-Gruppe hin. C=O-Gruppe: +. Scharfe, intensive Bande bei 1670 cm^{-1} , welche auf die Anwesenheit einer konjugierten Carbonylgruppe hinweist. Retrostruktur: -.

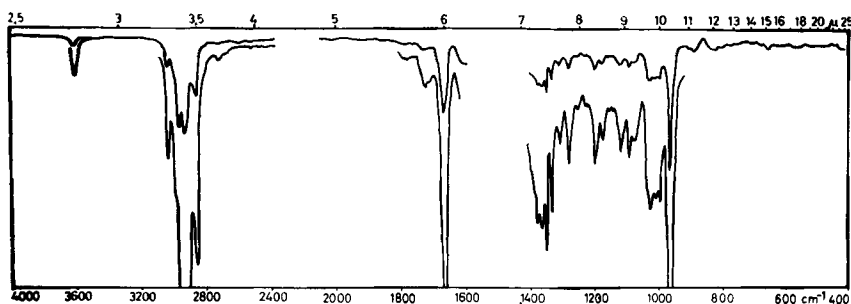


Fig. 14. *IR.-Spektrum von Zone 7 (4-Keto-4'-hydroxy- β -carotin)*

Verätherbarkeit: In Äthanol-HCl leicht zu veräthern, also muss die OH-Gruppe allylständig sein.

Reduzierbarkeit: Durch Reduktion mit Natriumborhydrid wurde Isozeaxanthin erhalten, das mit Äthanol-HCl einen Diäther ergab.

UV.-Spektrum des Reduktionsproduktes (Fig. 13): Maxima: 428 (Schulter); 451; 478,5 nm. Das Spektrum entspricht demjenigen von Isozeaxanthin (Fig. 15).

Oxydierbarkeit: MnO_2 oxydiert die Substanz aus Zone 7 zu Canthaxanthin (4,4'-Diketo- β -carotin).

UV.-Spektrum des Oxydationsproduktes (Fig. 13): Maxima: 467 nm. Das Spektrum hat keine Feinstruktur und ist identisch mit dem von Canthaxanthin (Fig. 15).

Die Substanz aus Zone 7 ist demnach 4-Keto-4'-hydroxy- β -carotin (VII).

Zone 8. – *Rf-Wert:* 0,16.

UV.-Spektrum (Fig. 15): Maxima: 427 (Schulter); 450; 478 nm. Das Spektrum ist analog dem von β -Carotin, liegt aber um ca. 3 nm kürzerwellig, was auf die beiden allylständigen OH-Gruppen zurückzuführen ist.

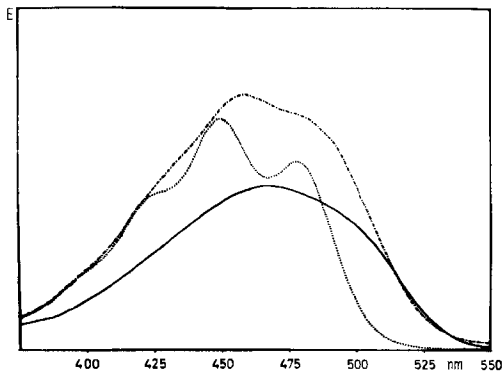


Fig. 15. UV.-Spektrn zu Zone 8

- ursprüngliche Substanz (4,4'-Dihydroxy- β -carotin)
- · - · - Oxydationsprodukt 1 (= Substanz Zone 7, 4-Keto-4'-hydroxy- β -carotin)
- Oxydationsprodukt 2 (Canthaxanthin)

IR.-Spektrum (Fig. 16): OH-Gruppen: +. Scharfe, intensive Bande bei 3605 cm^{-1} . Bei 3490 cm^{-1} deutliche Bande der assoziierten OH-Gruppe. Die Bande bei 1030 cm^{-1} deutet darauf hin, dass die OH-Gruppen in 4-Stellung stehen. C=O-Gruppen: Die Anwesenheit eines Dubletts bei 1660 und 1680 cm^{-1} , d. h. im Bereich der konjugierten Carbonylgruppe, könnte hier Anlass zu Fehlinterpretationen bieten. Das synthetische Isozeaxanthin A der Firma HOFFMANN-LA ROCHE zeigt im gleichen Bereich eine Bande, so dass der Schluss gezogen werden darf, dass es sich um eine Bande anderen Ursprungs handelt [5]. Retrostruktur: –.

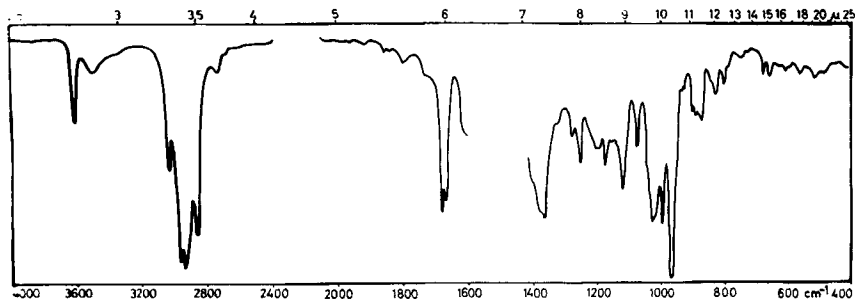


Fig. 16. IR.-Spektrum von Zone 8 (Isozeaxanthin)

Reduzierbarkeit: Die Substanz der Zone 8 lässt sich nicht reduzieren, d. h. die erwähnte IR.-Absorptionsbande kann nicht von einer Carbonylgruppe herrühren.

Verätherbarkeit: Die Substanz der Zone 8 ist unverändertes Isozeaxanthin A und B, das sich leicht in den Diäther überführen lässt.

Oxydierbarkeit: Oxydiert man Zone 8 mit MnO_2 , so erhält man nach ca. 20 Min. zwei Reaktionsprodukte, wobei das Produkt 1 mit der Substanz aus Zone 7, und Produkt 2 mit Canthaxanthin identisch ist.

UV.-Spektren der Oxydationsprodukte (Fig. 15): Oxydationsprodukt 1 (= Zone 7), Maxima: ca. 431 (schwache Schulter), 457,5 (Hauptmaximum), 481 nm (schwache Schulter). Oxydationsprodukt 2 (Canthaxanthin), Maxima: 467 nm.

Zone 8 ist demnach unverändertes Isozeaxanthin.

Die UV.-Spektren wurden alle in Cyclohexan mit dem Spektrophotometer BECKMAN DK-2A aufgenommen. Die IR.-Spektren wurden in CS_2 aufgenommen; dasjenige der Zone 1 mit dem Spektrophotometer PERKIN-ELMER 21 IR., die übrigen mit dem Spektrophotometer BECKMAN IR.-9.

Der Firma HOFFMANN-LA ROCHE danken wir für die grosszügige Unterstützung dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die säurekatalysierte Reaktion von Isozeaxanthin in Benzol-0,01M HCl untersucht. Für die einzelnen Reaktionsprodukte werden auf Grund chromatographischer, spektroskopischer und chemischer Eigenschaften Konstitutionsformeln vorgeschlagen.

Institut für allgemeine und spezielle organische Chemie
der Universität Bern

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. C. GROB & R. P. PFLUGSHAUPT, *Helv.* **45**, 1592 (1962).
- [2] R. P. PFLUGSHAUPT, Diss., Universität Bern 1965.
- [3] H. STRAIN *et al.*, *J. org. Chemistry* **26**, 5061 (1961).
- [4] C. BODEA *et al.*, *Liebigs Annalen Chem.* **627**, 237 (1959).
- [5] O. ISLER *et al.*, *Helv.* **39**, 451 (1956).

100. Über den Mechanismus der Trypsin-katalysierten Ester-Hydrolyse: Modellversuche an Substraten

von Margrit Gemperli, Werner Hofmann und Max Rottenberg¹⁾

(26. III. 65)

Zur sicheren Beurteilung der im Titel erwähnten Enzymwirkung war es notwendig, die Umsatzgeschwindigkeiten der betreffenden Substrate ohne Enzym genau zu kennen²⁾. Die am häufigsten gebrauchten spezifischen Ester-Substrate für Trypsin sind N-Benzoyl- und N-p-Toluolsulfonyl-L-arginin-methyl- oder äthylester. Potentiometrische Titration beim konstanten pH 10,0 und konstanter Temperatur zeigte sowohl bei den Methyl- als auch bei den Äthylestern, dass jeweils das Benzoylderivat 5 bis 6 mal schneller alkalisch hydrolysiert wird als das N-Tosylderivat (Tab. 1). Ähnliches

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen am First Meeting of European Biochemical Societies, London 1964 (Abstract Nr. A 11).

²⁾ Ein ähnliches Problem haben LORAND *et al.* [1] beim Thrombin untersucht; wir danken Herrn Dr. LORAND für schriftliche Mitteilungen.