

168. Die Synthese von Cyclodopa (Leukodopachrom)

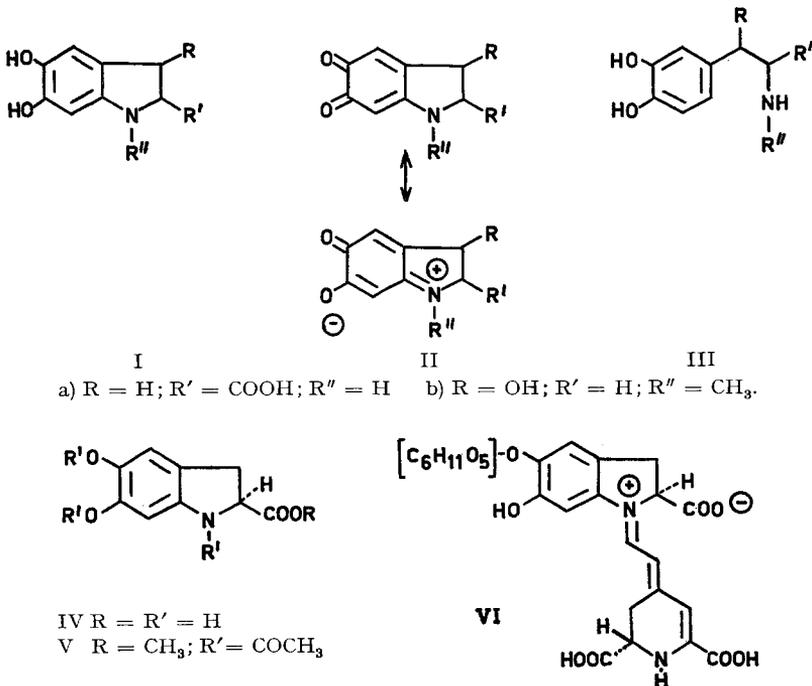
von **H. Wyler** und **J. Chiovini**

Institut de chimie organique, Université de Lausanne

(25. VI. 68)

Summary. The synthesis of the methylester of cyclodopa (5,6-dihydroxy-indoline-2-carboxylic acid) is achieved by oxidative conversion of dopa methyl ester to dopachrome methyl ester and its subsequent reduction at pH 8, using respectively potassium hexacyanoferrate(III) and sodium dithionite. The efficiency of the oxidation step was found to be dependent on the rather low concentration of the reactants and the very short reaction time involved. After its production cyclodopa methyl ester was stabilized by immediate protonation followed by acetylation leading in a high yield to O,O,N-triacetyl cyclodopa methyl ester. By partial hydrolysis this derivative gives an O,N-diacetyl cyclodopa methyl ester and further N-acetyl cyclodopa methyl ester. Cyclodopa methyl ester and cyclodopa are obtained by prolonged anaerobic hydrolysis. Micro-separation procedures, nmr-, uv-spectra and chiral-optical properties of cyclodopa and its derivatives are reported and discussed. It is shown by nmr evidence that under acidic conditions the aromatic proton on C(7) of cyclodopa slowly exchanges with deuterium. When an alcoholic solution of cyclodopa methyl ester and semicarbazide is allowed to oxidize in the air, the semicarbazone of dopachrome methyl ester forms.

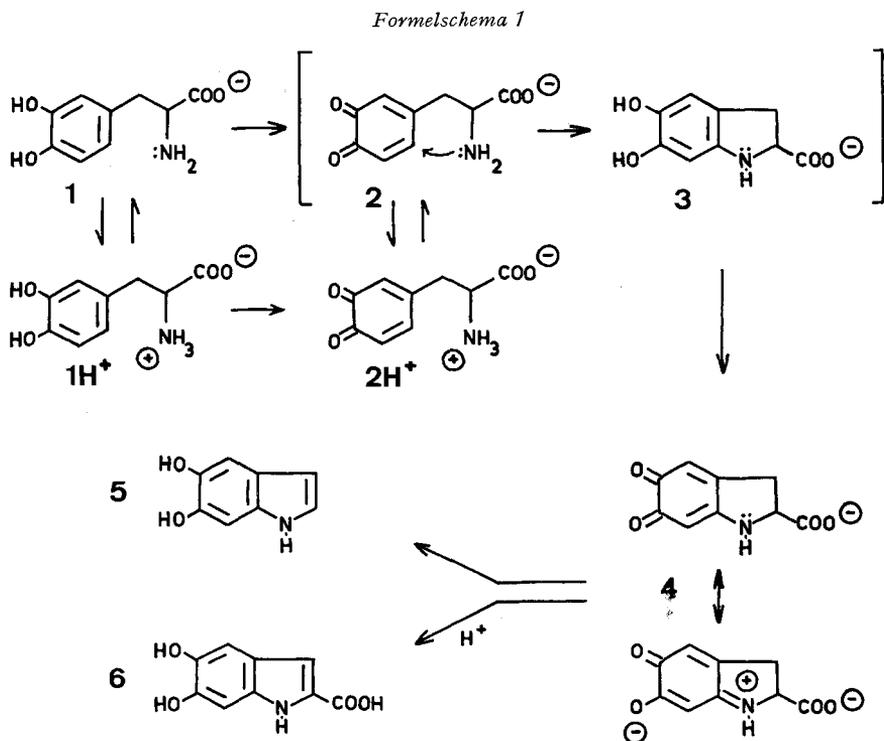
Einleitung. – Cyclodopa Ia ist unter dem Namen «Leukodopachrom» schon länger bekannt. Die ältere Bezeichnung umschreibt seine farblose, reduzierte Vorstufen-



Natur zum roten «Dopachrom» II a. Der neue Ausdruck [1] dagegen soll die Verbindung Ia als eine natürliche Aminosäure charakterisieren.

Wir entdeckten das S-Enantiomere IV des bis dahin in Substanz unbekanntem Cyclodopa als Strukturbestandteil des Randenfarbstoffs Betanin (VI) [2] und isolierten es nach geeignetem Abbau in Form seines Derivates V. Etwas später gelang die in [3] kurz gestreifte Synthese, die jetzt hier beschrieben wird¹⁾.

Die Verbindung Ia wurde zum ersten Mal im Rahmen einer Formulierung erwähnt, mit der RAPER [4] [5] vor nunmehr 40 Jahren die Rötung von Dopa-Lösungen unter oxydativen Bedingungen erklärte (vgl. unser Formelschema 1). RAPER nahm an, dass aus Dopa (1) über Dopa-chinon (2) durch intramolekulare Aminaddition die Dihydroindol-Verbindung 3, Cyclodopa, entsteht, welche ihrerseits rasch zum roten Dihydroindol-chinon 4, später Dopachrom genannt [6], oxydiert wird. Im weiteren Verlauf der Reaktion disproportioniert sich die Verbindung 4, so dass RAPER je nach den Bedingungen (neutral oder schwach sauer) die Indole 5 oder 6 in Form von methylierten Derivaten fassen konnte.



Von Anfang an suchte RAPER diese Erscheinungen mit der Bildung der Melanine [7] in Zusammenhang zu bringen. Die Oxydation von Dopa führt nämlich letzten Endes zur Ausfällung des sog. «Dopa-Melanins», dessen Entstehungsweise und Struk-

¹⁾ A. S. DREIDING, unter dessen Leitung das vorliegende Thema in Arbeit genommen wurde, sei an dieser Stelle herzlich für erwiesene Ermunterung und Diskussion gedankt.

tur noch immer untersucht werden [8]. Die RAPER'sche Formulierung hat im besonderen dazu angeregt, den Einbau von Dopa (**1**) oder seinen Oxydationsprodukten **5** und **6** in natürlichen Melaninen nachzuweisen [9].

Es zeigte sich später, dass das Formelschema 1 allgemein dem Oxydationsverhalten der Catecholamine (III) entsprach, die bei der Oxydation unter neutralen Bedingungen die vielfach untersuchten Aminochrome, d.h. Dihydroindol-chinone (II) ergeben [10] [11] [12]. Am Beispiel des Catecholamins Adrenalin (IIIb) u.a. konnten vor kurzem HAWLEY *et al.* [13] durch ein kinetisches Argument den von RAPER [4] vorausgesetzten Reaktionsweg bestätigen. Mit Hilfe einer schnell arbeitenden elektrochemischen Messmethode²⁾ konnten sie erstmals die Cyclisierung des primär gebildeten offenen Chinons (vgl. **2**) quantitativ verfolgen. Im sauren Bereich bis ca. pH 6 hängt dementsprechend die Reaktionsgeschwindigkeit von dem Anteil der nicht protonierten Form der an der Cyclisierung beteiligten Aminogruppe im Protonierungsgleichgewicht ab (vgl. **2**, **2 H⁺**).

Während die intermediäre Bildung des Cyclodopa und analoger Cyclisierungsprodukte (I) der Catecholamine nie ernsthaft in Abrede gestellt wurde, zweifelte man an deren Existenzfähigkeit [12]. Dies lag vor allem daran, dass eine einfache Reduktion der Aminochrome II zu den entsprechenden Hydrochinonen («Leukoaminochromen» I) nicht realisierbar schien, sondern immer wieder zu verwirrenden Resultaten führte [11] [12]. Man beobachtete zwar die zu erwartende Entfärbung der roten Aminochrom-Lösungen und konnte beim Adrenochrom (IIb) und Dopachrom (IIa) polarographisch eine Reduktionsstufe nachweisen [14] [15]; dabei stellte man ausserdem die eventuell dem reduzierten Leukoadrenochrom Ib zukommende optische Aktivität fest [16] [17]. Doch bei fast allen Versuchen einer Isolierung wurden an Stelle des erwarteten «Leukoaminochroms», d.h. einer Dihydroindol-Verbindung, nur Indol-Verbindungen aufgefunden [17], wie sie bei der Disproportionierung der Aminochrome zu erwarten wären; bei der Reduktion mit Dithionit und Hydrogensulfit wurden Hydrogensulfit-Additionsverbindungen beobachtet [18]. Nur im Fall des 7-Joddopachrom-äthylesters gelang es, ein Reduktionsprodukt zu fassen, das durch seine reversible Oxydierbarkeit den Eigenschaften einer «Leukoverbindung» entsprach [6] [12].

Da die grosse Reaktionsbereitschaft eines «Leukoaminochroms» I dessen Isolierung illusorisch zu machen schien, hat man andere Wege eingeschlagen, um zu den interessanten und wenig erforschten Dihydroindol-Verbindungen zu gelangen (z.B. Synthese von 5,6-Dihydroxy-indolin [19], racemischer Indolin-2-carbonsäure [20] und racemischer 5,6-Dihydroxy-indolin-carbonsäure [21]).

Die Synthese. – Es ergab sich aus den Erfahrungen bei der Isolierung des Cyclodopa als Spaltprodukt des Betanins [2], dass es gelingen musste, ein Derivat der gesuchten Verbindung zu erhalten, falls sie sofort nach ihrer Bildung in ihren stabilen, vollkommen acetylierten Methylester V umgewandelt werden konnte. Dieser Kunstgriff führte zum Erfolg.

Das Verfahren gliedert sich im wesentlichen in drei Reaktionsschritte (Formelschema 2): 1. Dopa-methylester (**7**), aus Dopa (**1 H⁺**) nach der Methode von BRENNER & HUBER [22] als Hydrochlorid **7 HCl** hergestellt, wird in 0,008 M, auf pH 8 gepuffer-

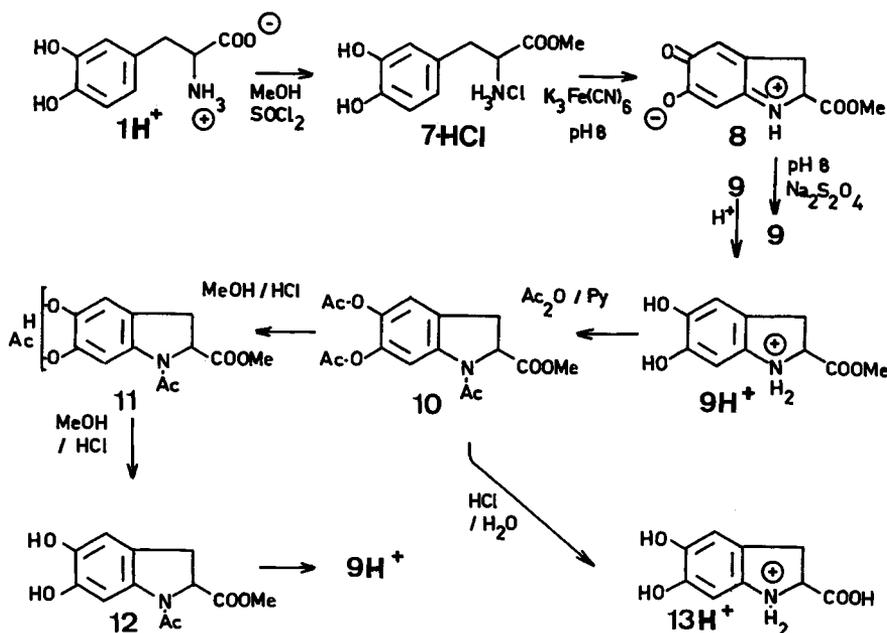
²⁾ Die Autoren nennen sie «potentiostatic chronoamperometry».

ter Lösung mit überschüssigem Kaliumhexacyanoferrat(III) zum roten Dopachrom-methylester (**8**) oxydiert. 2. Nach wenigen Sekunden wird **8** durch Natriumdithionit zum farblosen Cyclodopa-methylester (**9**) reduziert. 3. Das Reaktionsgemisch wird sofort angesäuert (9 H^+), abgedampft und der Rückstand mit Acetanhydrid-Pyridin acetyliert. Der entstandene O,O,N-Triacetylcyclodopa-methylester (**10**) kristallisiert nach chromatographischer Reinigung und wird in einer Gesamtausbeute von ca. 80% erhalten.

Die Arbeitsweise in den drei Reaktionsphasen wird durch den folgenden Sachverhalt bestimmt:

1. Die oxydative Umwandlung des Dopa-methylesters (**7**) in den Dopachrom-methylester (**8**) bei pH 8 ist unter den angegebenen Konzentrationsbedingungen – 0,008M Dopa-methylester und 0,05M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ – praktisch innerhalb von 1–2 Sek. beendet, wie dies unsere halbquantitativen spektroskopisch-kinetischen Messungen (s. Exp. Teil) zeigen. Dieses Verhalten entspricht demjenigen anderer Catecholamine

Formelschema 2



(III), deren Oxydationsgeschwindigkeiten durch HAWLEY *et al.* [13] ermittelt worden sind. In konzentrierteren Lösungen aber wird die Oxydation erheblich verlangsamt; so ergibt ein in den Proportionen und Bedingungen völlig analoger Ansatz mit dem einzigen Unterschied einer fünffach erhöhten Konzentration, d.h. 0,04M Dopa-methylester und 0,25M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, ein Gemisch von nur 45% Triacetyl-cyclodopa-methylester und 55% Ausgangsmaterial (in Form von Triacetyldopa-methylester). Wir vermuten, dass die Verlangsamung der Oxydation mit der bekanntlich in konzentrierteren Lösungen abnehmenden Aktivität des Kaliumhexacyanoferrats(III) [23] in Zusammenhang steht.

2. Der nach der Oxydation in Lösung befindliche Dopachrom-methylester (**8**) zersetzt sich rasch, wie wir ebenfalls spektroskopisch feststellten (s. Exp. Teil). Dieser Zersetzung beugt man durch die rasch anschliessende Zugabe des Reduktionsmittels vor. Auch die Reduktion verläuft sehr rasch, denn bei der Mischung der Lösungen tritt momentan Entfärbung ein. Da Oxydation wie Reduktion praktisch quantitativ verlaufen und momentan beendet sind, hängt die Ausbeute an Cyclodopa-methylester nur vom experimentellen Zeitfaktor ab.

3. Das entstandene Reduktionsprodukt **9** muss möglichst rasch stabilisiert werden. Wie schon bekannt (vgl. [11] [12]) entstehen nämlich beim Verweilen der Reduktionslösung an der Luft im UV.-Licht stark fluoreszierende, saure Produkte, die wahrscheinlich den in der Literatur erwähnten sog. Bisulfit-Addukten analog sind. Es ist verständlich, dass Cyclodopa-methylester (**9**) wie auch Cyclodopa (**Ia**) dem Oxydationspotential bei pH 8 entsprechend (ca. +0,3 V nach FRIEDHEIM [24] und WIESNER [15]) durch Sauerstoff zu Dopachrom-methylester (**8**) bzw. Dopachrom (**IIa**) zurückoxydiert werden können. Möglicherweise stehen reduzierte Form (d.h. Cyclodopa-methylester) und oxydierte Form (d.h. Dopachrom-methylester) unter den gegebenen Umständen in einem Gleichgewicht. Als Chinon kann das entstehende Aminochrom aber auch mit den bei der Oxydation des Dithionits gebildeten Sulfit-Ionen reagieren, so dass es zu einer Produktverlagerung zu Gunsten der erwähnten Addukte kommt. Dies konnten wir verhindern durch unverzügliche Protonierung des in Lösung befindlichen Cyclodopa-methylesters (**9** zu **9 H⁺**); sein Oxydationspotential wird dadurch auf ca. -0,17 V gebracht, so dass er wesentlich langsamer mit Sauerstoff reagiert. Die angesäuerte Lösung kann ohne nennenswerte Verluste abgedampft werden. Die anschliessende Acetylierung führt das Produkt in das stabile Derivat **10** über, das sich ausserdem leicht von den begleitenden Salzen trennen lässt. Dank der vorgängigen Einführung der Esterfunktion vollzieht sich die Acetylierung ohne Racemisation; das freie Cyclodopa hingegen, das aus Dopa erhalten werden kann, wird erwartungsgemäss infolge Azlactonbildung [25] unter diesen Bedingungen racemisiert.

Die Schutzgruppen von **10** lassen sich stufenweise entfernen. Bei der Behandlung mit verdünnter wässrig-methanolischer Salzsäure bei Zimmertemperatur werden zunächst nur die beiden O-Acetylgruppen verseift, wobei eine Acetylgruppe etwas schneller abgespalten wird. Das in der Lösung angereicherte Zwischenprodukt 5- oder 6-O,N-Diacetyl-cyclodopa-methylester (**11**) lässt sich aus dem Gemisch mit Ausgangsmaterial **10** und nachfolgender Verseifungsstufe N-Acetylcyclodopa-methylester (**12**) chromatographisch abtrennen. Letzterer entsteht in methanolischer Salzsäure relativ rasch. In geringem Masse wird dabei auch die N-Acetylgruppe abgespalten. Diese Amid-Hydrolyse lässt sich vermeiden, wenn man anstelle von Säure verdünntes Ammoniak unter Sauerstoffausschluss einsetzt. Cyclodopa und Cyclodopa-methylester werden in den protonierten Formen **13 H⁺** bzw. **9 H⁺** beim Erhitzen von **10** in wässriger bzw. methanolischer Salzsäure erhalten, sofern Sauerstoff völlig ausgeschlossen wird.

Eigenschaften von Cyclodopa und seinen Derivaten. – Cyclodopa und sein Methylester sind sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff. In neutralen Lösungen werden sie an der Luft unter sofortiger Rosafärbung rasch zu den entsprechenden Aminochromen **4** bzw. **8** oxydiert. In stark sauren Lösungen sind sie wesentlich beständiger;

es wird keine Rotfärbung beobachtet, dagegen nehmen die Lösungen eine dunkle Farbe an.

Trotz dieser Unbeständigkeit können Cyclodopa oder dessen Methylester noch in Mengen von ca. 10 μg mikro-separativ nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 1). In der Papierchromatographie eignet sich als Laufmittel besonders mit 1N Salzsäure gesättigtes Butanol, das sich schon bei Catecholaminen bewährt hat [26]. Die Flecke von Cyclodopa und seinem Ester werden wie diejenigen von Catecholaminen mit Kaliumferricyanid-Reagens nach JAMES [27] sichtbar gemacht. Das Verhalten von Cyclodopa und seinem Ester in der Papierelektrophorese liefert ein weiteres wertvolles Indiz zur Identifizierung. Cyclodopa zeigt sehr ähnliche Ladungseigenschaften wie Dopa; es unterscheidet sich von diesem nur durch eine geringere kationische Wanderungsgeschwindigkeit bei pH 2,4 (0,1M Ameisensäure). Während der Papierelektrophorese, die in kurzer Zeit durchgeführt werden muss, findet ständig Autoxydation zum Dopa-

Tabelle 1. *Papierchromatographie und Papierelektrophorese von Cyclodopa und Cyclodopa-methylester und Vergleichssubstanzen*

| | Papierchromatographie | Papierelektrophorese | | Sichtbarmachung |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| | BuOH-1N HCl Rf | 0,05 Pf ^{e)} E_S | 0,1 F ^{f)} E_S | |
| Cyclodopa | 0,25 | 0 (rosa Strasse 0 bis +0,7) | -0,5 | a) rosa (Dopachrombildung) b) dunkel c) braun-grau d) rot |
| Cyclodopa-methylester | 0,3 | -0,05 | -2,8 (rosa Strasse 0 bis -2,8) | a) rotorange (Dopachrombildung) b) dunkel c) gelbbraun d) rot |
| Dopachrom | | +0,8 | 0 | a) rosarot b) blau (Zers.-Prod.) c) braun-grau d) grau-braun |
| Dopachrom-methylester | 0,65 | 0 | 0 | a) rotorange b) blau (Zers.-Prod.) c) gelbbraun d) graubraun |
| Dopa | 0,12 | 0 | -0,75 | b) dunkel d) rot |
| Dopa-methylester | | -0,75 | -3,6 | b) dunkel d) rot |
| Tyrosin | 0,3 | 0 | -0,1 | b) dunkel |
| Phenylalanin | 0,5 | 0 | -0,1 | b) dunkel |
| Salicylsäure | 0,84 | 1 | 1 | b) blau |

a) sichtbar

b) UV.-Lampe CAMAG 254 nm

c) nach längerem Stehen an der Luft

d) 2-proz. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in Phosphatpuffer pH 8

e) 0,05M Pyridiniumformiat

f) 0,1M Ameisensäure

chrom statt. Das dabei entstehende Zersetzungsmuster ist recht charakteristisch. Das gebildete Dopachrom wandert bei pH 4,5 als Anion in Form einer Strasse von dem unter diesen Bedingungen als Zwitterion vorliegenden Cyclodopa weg; bei pH 2,4 wandert Dopachrom nicht, es bleibt daher als rosa Strasse hinter dem kationisch wandernden Cyclodopa zurück. Der bei der Elektrophorese von Cyclodopa-methylester entstehende, neutrale Dopachrom-methylester wird in beiden Pufferlösungen als Strasse hinter dem kationisch wandernden Cyclodopa-methylester deponiert. In den getrockneten Elektrophorese-Streifen sind die Aminochrom-Flecke und -Strassen im UV.-Licht durch die intensiv blaue Fluoreszenz ihrer Indol-Folgeprodukte (s. **5** und **6**) gekennzeichnet.

Protonenresonanz-Spektroskopie. Die auch allgemein in der NMR.-Spektroskopie von Aminosäuren verwendete Trifluoressigsäure [28] erwies sich als geeignetes Lösungsmittel für Cyclodopa. In dieser Lösung macht sich eine oxydative Zersetzung erst nach längerem Stehen durch Schwärzung bemerkbar. Es fällt sogleich auf, dass im NMR.-Spektrum von Cyclodopa in Trifluoressigsäure das Signal der beiden Protonen am Iminium-Stickstoff fehlt, während z.B. die Protonen der Ammonium-Gruppe in α -Aminosäuren als breites Singlett bei δ ca. 7,5 [28], diejenigen am Anilinium-Stickstoff in Aminophenolen bei δ 8,5–8,8³⁾ erscheinen. Der offenbar rasche Austausch der Protonen am Indolin-Stickstoff im Cyclodopa scheint mit der hohen Acidität seiner konjugierten Säure im Zusammenhang zu stehen.

Das NMR.-Spektrum von Cyclodopa in Deuterotrifluoressigsäure (Fig.1) zeigt besonders klar eine typische ABX-Signalgruppierung, welche durch die Wechselwirkung der Protonen an den Stellungen 2 und 3 des Dihydro-Heteroringes verursacht wird. Das Proton H-C(2), dem der bei tieferem Feld erscheinende X-Teil des Koppungssystems zukommt (H_x , $\delta = 5,3$), koppelt mit dem syn-periplanar gelegenen

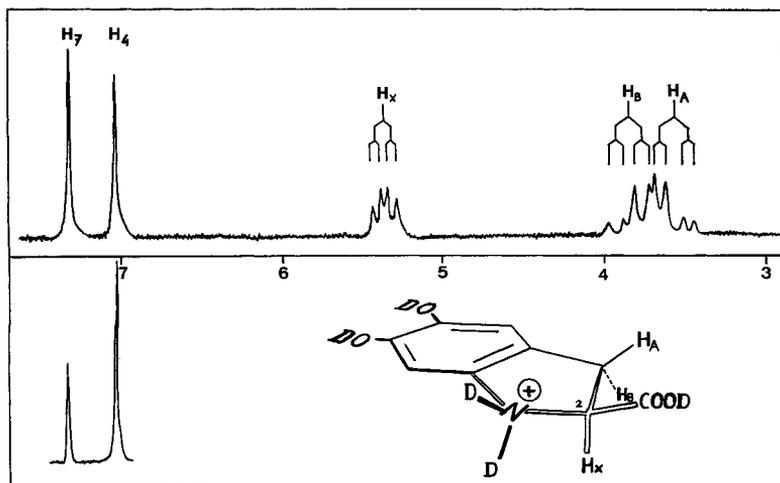


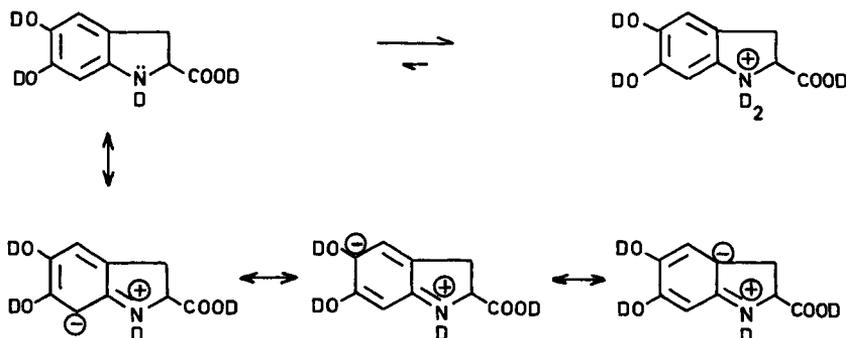
Fig.1. Protonenresonanz-Spektrum von Cyclodopa in Deuterotrifluoressigsäure bei 100 Hz (Ausschnitt; Skala in δ -Werten von internem Tetramethylsilan)

³⁾ Eigene Messungen.

Nachbarproton am C(3) (H_B , $\delta = 3,8$) mit einer grösseren Konstante ($J = 9,5$) als mit dem anti-clinalen Proton am C(3) (H_A , $\delta = 3,4$; $J = 6$). Eine solche Zuordnung ergibt sich aus der Modellbetrachtung auf Grund der KARPLUS'schen Beziehung [29]. Ausser diesem Kopplungsmuster treten nur noch zwei Singlette der aromatischen Protonen H-C(4) und H-C(7) auf. Das Singlett von H-C(7) ($\delta = 7,34$) erscheint unter der Feldbeeinflussung der benachbarten Iminiumgruppe bei tieferem Magnetfeld als dasjenige von H-C(4) ($\delta = 7,04$).

In einem separaten Experiment stellten wir fest, dass das aromatische Proton H-C(7) unter sauren Bedingungen gegen Deuteron ausgetauscht werden kann. Cyclo-dopa in Deuterotrifluoressigsäure wurde unter völligem Ausschluss von Sauerstoff und unter Vakuum im NMR.-Röhrchen eingeschmolzen. Während 3 Std. Erhitzen auf 70° noch keine wesentliche Änderung des Spektrums brachte, hatte das Signal des Protons H-C(7) nach 3 Std. Erhitzen auf 83° mehr als 50% seiner Fläche eingebüsst; das Signal des Protons H-C(4) dagegen blieb vollständig erhalten (s. Fig. 1 unten). Im Formelschema 3 wird gezeigt, dass die sterisch begünstigte Resonanzbeteiligung des einsamen Elektronenpaares am Stickstoff den Protonenaustausch am C(7), nicht aber denjenigen am C(4) erlaubt. Somit bestätigt das Austauschexperiment auf unabhängige Weise die vorgenommene Zuordnung der Signale der aromatischen Protonen.

Formelschema 3



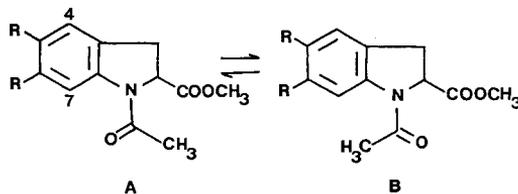
Die NMR.-Spektren der ebenfalls in Trifluoressigsäure untersuchten N-acetylierten Derivate von Cyclo-dopa (10–12) enthalten wiederum das charakteristische *ABX*-System. Jedoch ist die Kopplung der anti-clinalen Protonen am C(2) und C(3) durchwegs kleiner als diejenige im Cyclo-dopa ($J = 3$, statt 6); dieser Effekt könnte mit einer durch die Acylierung eingetretenen Verflachung des Fünfringes und der damit verbundenen Verkleinerung des Torsionswinkels C(2)–C(3) zusammenhängen.

Die Spektren der N-Acetyl-derivate liefern ein eindrückliches Beispiel für die schon mehrfach beobachteten Anisotropieeffekte durch gehinderte Rotation um die Amidbindung. So haben NAGARAJAN *et al.* [30] an einer Reihe von N-acylierten Indolinen eine auffällige Verschiebung des Aromatenprotons H-C(7) beobachtet. In unserem Beispiel zeigen sich die Auswirkungen der Anisotropie sowohl auf H-C(7) als auch auf die Acetyl-methyl- und sogar die Methoxyl-Protonen (vgl. Tabelle 2). Das Rotameren-

Gleichgewicht äussert sich in einer Überlagerung der Spektren von 2 Spezies, deren eine, «Rotamer A» (Anteil 0,7), gegenüber der anderen, «Rotamer B» (Anteil 0,3), überwiegt. Im stabileren Rotameren A orientiert sich die Methylgruppe des N-Acetyls zur ungehinderteren Seite, d. h. in Richtung C(2), so dass die Carbonylfunktion der Seite des Benzolrings zugewandt ist. Dies erklärt die grosse Verschiebung des Singletts von H-C(7) um 1 ppm nach tieferem Feld. Interessanterweise beobachtet man auch eine kleine Verschiebung des Aromatenprotons H-C(4), dessen Singlett im Rotameren A um 0,05 ppm bei höherem Feld angetroffen wird, also in der entgegengesetzten Richtung verschoben ist als dasjenige von H-C(7). Das Singlett der Acetyl-methyl-Protonen findet sich im Rotameren A bei höherem Magnetfeld als im Rotameren B. Hierfür lassen sich gleichzeitig zwei Argumente aufbringen. Nach dem einen würde die Verschiebung des Signals nach tieferem Feld im Rotameren B dem entschirmenden Einfluss des aromatischen Rings zugeschrieben, nach dem anderen die Verschiebung des Signals nach höherem Feld im Rotameren A dem schirmenden Einfluss der Carbomethoxy-Funktion. Im Zusammenhang mit der letztgenannten Möglichkeit sei darauf hingewiesen, dass auch das zur Carboxylgruppe *cis*-ständige Proton am C(3) bei höherem Feld erscheint als das *trans*-ständige. Einen kleinen Unterschied – den wir nicht begründen können – bemerkt man auch in der Verschiebung des Methylsingletts der Carbomethoxy-Gruppe; dasjenige des Rotameren A erscheint um 0,02 ppm bei tieferem Feld.

Tabelle 2. Chemische Verschiebungen der Aromaten-, Methoxyl- und N-Acetyl-Protonen in Cyclo-dopa-Derivaten

| | δ -Werte in ppm in Trifluoressigsäure | | | |
|---|--|--------|--------------------|----------------------|
| | H-C(7) | H-C(4) | CH ₃ O- | CH ₃ CO-N |
| O, O, N-Triacetyl-cyclodopa-methylester (10) | | | | |
| A | 8,20 | | 7,20 | 3,98 |
| B | | 7,30 | 7,25 | 3,95 |
| | | | | 2,68 |
| | | | | 2,43 |
| 5- oder 6-O, N-Diacetyl-cyclodopa-methylester (11) | | | | |
| A | 8,05 | | 7,07 | 3,99 |
| B | | 7,23 | 7,12 | 3,97 |
| | | | | 2,70 |
| | | | | 2,47 |
| N-Acetyl-cyclodopa-methylester (12) | | | | |
| A | 7,92 | | 6,95 | 3,98 |
| B | | 7,18 | 6,98 | 3,95 |
| | | | | 2,75 |
| Cyclodopa | 7,34 | | 7,05 | - |
| | | | | - |



UV.-Spektren und chiral-optische⁴⁾ Eigenschaften. Aus den enantiomeren Dopamethylestern der *R*(= *D*) und der *S*(= *L*) Konfiguration entstanden bei der Synthese spezifisch *R*- und *S*-Triacetylcyclodopa-methylester. Die Verbindungen kristallisieren aus Äther mit Lösungsmittel (Smp. 60–61°), das beim Trocknen abgegeben wird

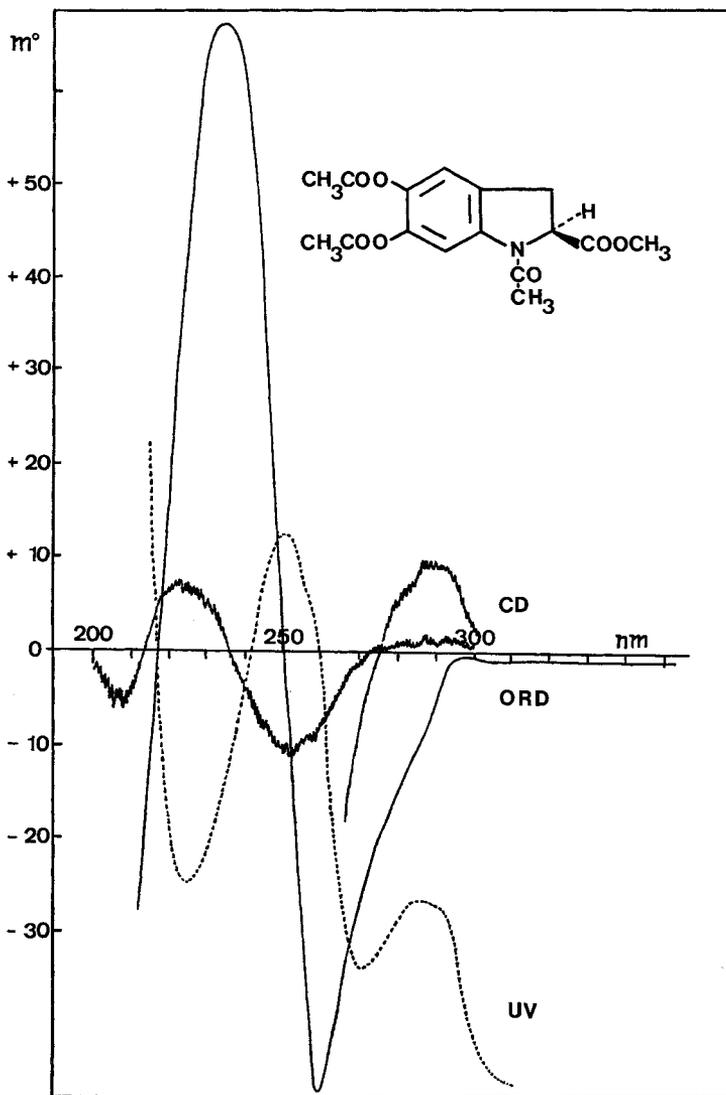


Fig. 2. ORD-, CD- und UV.-Spektrum von *O,O,N*-Triacetyl-*S*-cyclodopa-methylester in Methanol
ORD.-Skala in Milligrad (m°)

UV.- und CD.-Skala in ϵ bzw. $\Delta\epsilon$ (nicht eingezeichnet; vgl. exp. Teil)

⁴⁾ Der Ausdruck chiral-optisch wurde von Dr. ULRICH WEISS (National Institutes of Health) im Titel eines Vortrags am Organisch-chemischen Institut der Universität Zürich verwendet (Juni 1966).

(Smp. 94–96°). Das 1:1-Gemisch bildet eine Molekularverbindung vom erstaunlich höheren Schmelzpunkt 157–158°.

Im UV.-Spektrum von Triacetylcyclodopa-methylester werden drei Maxima 210, 250 und 288 nm mit in dieser Reihenfolge abnehmender Extinktion registriert. Die CD.-Kurve der Verbindung mit *S*-Konfiguration *V* in Fig. 2 zeigt aber vier alternierende COTTON-Effekte: Positive bei 290 und 230 nm, negative bei 250 und 208 nm. Der Übergang bei 230 nm fällt im UV.-Spektrum praktisch mit einem Minimum zusammen. In der ORD.-Kurve ist der kleine positive COTTON-Effekt bei 290 nm dem viel grösseren negativen bei 250 nm überlagert. Am Beispiel einer Reihe von *N*-Acylindolin-alkaloiden haben KLYNE *et al.* [31] eine Korrelation der Struktur mit dem Vorzeichen des starken COTTON-Effektes des *N*-Acylindolin-Chromophors, den sie im Bereich von 237–265 nm fanden, abgeleitet. Unser Beispiel eines einfachen *N*-Acetylindolins fügt sich in diese Regel ein. Nach der Modellbetrachtungweise von KLYNE

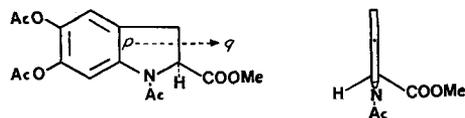


Fig. 3.

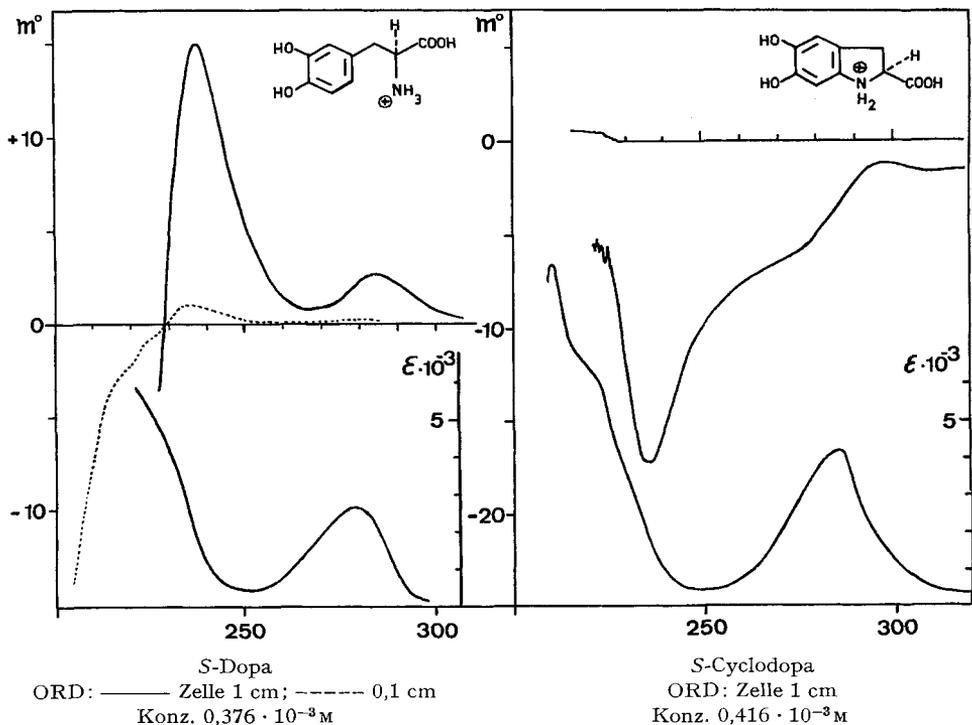
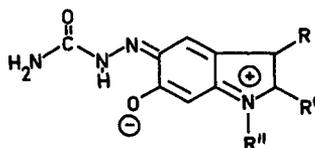


Fig. 4. ORD.- und UV.-Spektren von *S*-Dopa und *S*-Cyclodopa in 20-proz. HCl (ORD.-Kurven oben, UV.-Kurven unten)
 ORD.-Skala in Milligrad (m°); UV.-Skala in ϵ

et al. (Fig. 3) steht die Carbomethoxy-Gruppe unseres *S*-Triacetylcyclodopa-methyl-esters auf derselben Seite der Ringebene, wie die dem Chromophor benachbart substituierten Ringe jener Alkaloide, die einen negativen Haupt-COTTON-Effekt zeigen.

In starker Salzsäure besitzen Cyclodopa und Dopa ähnliche UV.-Spektren (Fig. 4); das Maximum des Cyclodopa bei 285 nm ist bei leicht erhöhter Extinktion gegenüber demjenigen von Dopa nur um 6 nm bathochrom verschoben. In den ORD.-Kurven von *S*-Dopa und *S*-Cyclodopa (Fig. 4) im selben Lösungsmittel ist bei beiden Verbindungen der Übergang bei 280 nm von einem kleinen positiven COTTON-Effekt begleitet, während ihre COTTON-Effekte bei der Schulter um 230 nm entgegengesetzte Vorzeichen haben.

Dopachrom-semicarbazone aus Cyclodopa. Bekanntlich bilden Aminochrome II mit Ketonreagentien leicht Mono-Kondensationsderivate (vgl. [11]). IWAO [32] konnte beweisen, dass im Adrenochrom-semicarbazone (VII) und Adrenochrom-oxim die Ketongruppe am C(5) substituiert worden war.



VII R = OH; R' = H; R'' = CH₃

VIII R = H; R' = COOCH₃; R'' = H

Es ist bis heute nicht gelungen, entsprechende Derivate von Dopachrom (IIa) in befriedigender Ausbeute zu erhalten. Dopachrom selbst liess sich nie in Substanz isolieren, da es leicht disproportioniert wird (siehe Einleitung), insbesondere in Anwesenheit von Metall-Ionen [12]. Unter grossen Verlusten gelang bis heute nur die Darstellung verschiedener Phenylhydrazone von Dopachrom [33].

Wie schon in einer vorläufigen Mitteilung erwähnt [3], entsteht in neutraler Lösung von Cyclodopa und Semicarbazid an der Luft ein Produkt, das spektroskopisch den gut bekannten Aminochrom-semicarbazonen, z. B. dem Adrenochrom-semicarbazone (VII) [34], gleicht (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3. UV.-spektroskopische Eigenschaften der Semicarbazone von Dopachrom und Dopachrom-methylester in wässriger Lösung

| Semicarbazone von: | sauer ^{a)} nm (ε) | neutral nm (ε) | alkalisch ^{a)} nm (ε) |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Dopachrom | – | Max 352 (24800) Infl. 430 (4800) | – |
| | pH 1,5 | – | pH 12 |
| Dopachrom-methylester | Max 372 (28000) – | Max 353 (26000) Infl. 426 (3600) | – |
| | pH 1,1 | pH 6,1 | Max 428 (24000) pH 12 |
| Adrenochrom [33] | Max 377 (29100) – | Max 356 (25400) Infl. 445 (6800) | – Max 447 (30100) |

^{a)} Zugabe von 2 Tropfen 20-proz. HCl bzw. 4 Tropfen 2N KOH zu 3 ml der Messlösung

Wie wir nun gefunden haben (s. Exp. Teil), bildet sich beim Stehen einer Lösung von Cyclodopa-methylester und freiem Semicarbazid an der Luft in glatter Reaktion ein orangegelbes Semicarbazon (wahrscheinlich VIII), das die UV.- und IR.-spektroskopischen Eigenschaften von Aminochrom-semicarbazonen [11] [34] aufweist. Der erfolgreiche Verlauf der Reaktion hängt offenbar damit zusammen, dass der entstehende Dopachrom-methylester direkt vom Ketonreagens abgefangen wird.

Die EIDGENÖSSISCHE STIFTUNG ZUR FÖRDERUNG DER SCHWEIZERISCHEN VOLKSWIRTSCHAFT DURCH WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG hat diese Arbeit finanziell unterstützt. Eine grössere Gabe von Dopa hat uns die Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel, zur Verfügung gestellt. Die STIFTUNG FÜR STIPENDIEN AUF DEM GEBIETE DER CHEMIE gewährte dem erstgenannten Autor ein Stipendium. Eine ergänzende Unterstützung wurde demselben von Seiten der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel, zu teil. Den genannten Institutionen danken wir für die uns gewährte Hilfe.

Experimenteller Teil

Mitbearbeitet von **Marianne Gerber** und **H. P. Rüesch**

Die Smp. wurden auf einem Mikroskop-Heiztisch beobachtet und sind korrigiert. Beschreibung der Spektren: UV.-Spektren (erhalten auf BECKMAN DB und DK₂): UV. (Lösungsmittel): Max., Min. od. Infl. (= Inflektion) in nm (ϵ); IR.-Spektren auf PERKIN ELMER Mod. 21 und BECKMAN IR 5 mit NaCl Optik: IR. (Trägermaterial): Bandenmaxima in Kaiser (s = stark, m = mittel, w = schwach, b = breit). Die mit dem VARIAN-A-60-Spektrometer registrierten NMR.-Spektren werden signal- oder signalgruppenweise von tiefem zu hohem Feld notiert: NMR. (Lösungsmittel): δ -Wert in ppm/Multiplizität (Aufspaltung in Hz), Anzahl der Protonen Pr (Zuordnung). Die δ -Werte beziehen sich auf internes Tetramethylsilan = 0. Bei Multipletten gibt der δ -Wert den arithmetischen Mittelpunkt an; S = Singlett, D = Dublett, T = Triplett, Q = Quartett, M = Multipllett, b = verbreiterte Linien.

Die Rotationsdispersionsspektren (ORD) wurden freundlicherweise von Herrn M. CLERC von der Firma APPLIED RESEARCH LABORATORIES in Lausanne auf dem SPEKTROPOL 1 der französischen Firma FICA aufgenommen. Ein weiteres ORD.- sowie ein CD.-Spektrum verdanken wir der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel. Beschreibung: ORD. (Lösungsmittel): Wellenlänge des Messpunktes in nm (molekulares Drehvermögen $[\Phi]$, Charakteristikum des Messpunktes); CD. (Lösungsmittel, Konzentration): Max, Min od. Infl. in nm ($\Delta\epsilon$), Breite b von Nullpunktskreuzung zu Nullpunktskreuzung in nm.

1. O,O,N-Triacetylcyclodopa-methylester (5,6-Diacetoxy-N-acetyl-indolin-2-carbonsäure-methylester) 10. – S-(L)-Dopa-methylester (β -(3,4-Dihydroxyphenyl)-alanin-methylester). Nach BRENNER & HUBER [22] tropft man zu 20 ml Methanol bei -20° unter Rühren 5 ml Thionylchlorid so, dass die Temperatur nicht über 5° ansteigt. In das Gemisch gibt man 1 g L-Dopa, lässt 2 Std. bei Zimmertemperatur stehen und kocht 1 Std. unter Rückfluss. Beim Abdampfen im Rotationsverdampfer kristallisiert das Hydrochlorid des S-Dopa-methylesters, Smp. $48-49^\circ$.

Triacetyl-S-cyclodopa-methylester (V). Zu einer gut gerührten Lösung von 0,5 g S-Dopa-methylester-hydrochlorid in 150 ml SOERENSEN-Phosphatpuffer pH 8⁵⁾ giesst man in einem Mal eine Lösung von 4,075 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 100 ml Puffer, so dass praktisch momentan völlige Durchmischung begleitet von charakteristischer Rotfärbung eintritt. Nach 6 Sek. werden ebenso eine ca. 1 Min. zuvor bereitete Lösung von 2,75 g Natriumdithionit in 50 ml Puffer und, nach eingetretener Entfärbung auf hellgelb (ca. 1 Sek.), 5 ml konz. Salzsäure zugefügt. Das Gemisch wird im Rotationsverdampfer abgedampft, wobei man vor dem Eindampfen des letzten Flüssigkeitsrestes zur Verhinderung des Schäumens etwas Benzol zusetzen kann. Den Rückstand versetzt man mit 25 ml Acetanhydrid und 25 ml Pyridin und verteilt den Bodenbelag durch systematisches Aufkratzen mit einem Spatel sorgfältig in der Flüssigkeit. Nach 4 Std. wird filtriert, der Salzurückstand gut mit Methylenechlorid gewaschen und die vereinigte Lösung im Rotationsverdampfer abgedampft. Den Rückstand nimmt man in je 50 ml 0,5N HCl und Methylene-

⁵⁾ 0,5 g KH_2PO_4 und 22,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ /l.

chlorid auf, wäscht den Methylenchloridextrakt mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser neutral und dampft im Rotationsverdampfer ein. Das Dünnschichtchromatogramm des Rückstandes zeigt ausser dem Hauptfleck des Triacetylcyclodopa-methylesters (Rf 0,7) ungleich schwächere Flecke bei Rf 0,9 (Schwefel), Rf 0,8 (unbekanntes Produkt) und 0,2 (schwacher länglicher Fleck, Gemisch von partiellen Hydrolyseprodukten). Das Rohprodukt wird mit Methylenchlorid-Methanol 19:1 (*v/v*) an einer Säule von 80 g Kieselgel МЕРСК (0,05–0,5 mm) beschleunigt chromatographiert. Es werden Fraktionen von 5–10 ml gesammelt und dünn-schichtchromatographisch auf Einheitlichkeit geprüft. Sofort nach der ersten, hauptsächlich Schwefel enthaltenden Zone erscheint das Produkt in einem Gesamteluat von 90 ml, wobei die Hauptmenge (516 mg) schon in den ersten 45 ml enthalten ist; Ausbeute 561 mg (83% d. Th.) Triacetyl-S-cyclodopa-methylester, der beim Bespritzen mit Äther kristallisiert und aus heissgesättigter ätherischer Lösung umkristallisiert werden kann. Smp. 60–61°; nach mehrmaliger Umkristallisation 68–70°. Beim Trocknen über Paraffin bei 50°/0,005 Torr verliert die Substanz ca. 10% ihres Gewichts und schmilzt nun bei 94–96°. $[\alpha]_D = -61^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,03$; CHCl_3).

$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_7$ Ber. C 57,31 H 5,11 N 4,18% Gef.⁶⁾ C 57,31 H 5,10 N 4,31%

UV. (MeOH): Max. 210 (17200), 250 (14500), 288 (4900); Schultern: 256 (12800), 293 (4800); Min. 226 (5400), 274 (3200) nm (ϵ). – IR. (CH_2Cl_2): 1754 (*s*), 1670 (*s*), 1613 (*m*), 1486 (*s*), 1426 (*m*, Infl.), 1395 (*s*), 1370 (*s*), 1323 (*s*), 1282 (*m*, *b*), 1216 (*s*), 1181 (*s*), 1168 (*s*, Infl.), 1124 (*m*), 1080 (*m*), 1026 (*m*, Infl.), 1005 (*s*), 869 (*s*, *b*). IR. (KBr). – NMR. (CDCl_3): 8,04/*S*, 0,76 Pr (Teil von H-C(7)); 6,95/*s*, 1,24 Pr (Teil von H-C(7) und H-C(4)); 4,95/*Q* ($J = 3$; $J = 9$), 1 Pr, X-Teil von ABX (H-C(2)); 3,75/*S*, 3 Pr (CH_3O); 3,53/*Q* ($J = 9$; $J = 16$), (H-C(3) *cis* zu H-C(2)) und 3,12/*Q* ($J = 3$; $J = 16$), (H-C(3) *trans* zu H-C(2)), zusammen 2 Pr, AB-Teil von ABX; 2,25/*S*, 6 Pr ($2 \times \text{O}-\text{COCH}_3$); 2,24/*S*, 1 Pr und 2,12/*b S*, 2 Pr ($\text{N}-\text{COCH}_3$). Beim Erwärmen auf ca. 60° sinkt das Singlett $\delta = 7,95$ unter Verbreiterung zusammen und wird nach $\delta = 7,85$ verschoben. NMR. (CF_3COOH): 8,20/*S*, 0,68 Pr und 7,30/*S*, 0,32 Pr (H-C(7)); 7,25/*S*, ca. 0,3 Pr und 7,20/*S*, ca. 0,7 Pr (H-C(4)); 5,37/*Q* ($J = 9,5$, $J = 3$), X-Teil von ABX, 1 Pr (H-C(2)); 3,98/*S*, ca. 2 Pr und 3,95/*S*, ca. 1 Pr (CH_3O); 3,83/*Q* ($J = 16$; $J = 9,5$) (H-C(3) *cis* zu H-C(2)) und 3,43/*Q* ($J = 16$; $J = 3$) (H-C(3) *trans* zu H-C(2)) zusammen 2 Pr, AB-Teil des ABX; 2,68/*S*, ca. 1 Pr und 2,43/*S*, ca. 2 Pr ($\text{CH}_3\text{CO}-\text{N}$); 2,45/*S*, 6 Pr ($2 \times \text{CH}_3\text{CO}-\text{O}$). – CD. (MeOH, Konz. 0,0079%): Max. 290 (+1,06), $b = 307-274$; Min. 252 (-11,4), $b = 274-236$; Infl. 230 (+4,6) und Max 221 (+7,2), $b = 236-216$; Min 208 (-5,5), $b = 216$ -unterhalb 200 nm ($\Delta\epsilon$). – ORD. (MeOH): 310 (-400); 296 (-200) Gipfel; 291 (-2200) Infl.; 272 (-12000); 261 (-23800) Tal; 250,5 (0); 234 (+33600) Gipfel; 217,5 (0); 214 (-14400) nm. ($[\Phi]$). Positiver Cotton-Effekt bei 250 nm, $a = -574$. ORD. (CHCl_3): 700 (-167); 650 (-211), 600 (-234), 589 (-265), 550 (-308), 450 (-550), 400 (-800), 380 (-965), 360 (-1200), 340 (-1530), 320 (-1985), 310 (-2010), 304–294 (0) Gipfel, 290 (-10100), 280 (-30100), 270 (-36800), 266–262 (-40200) Tal, 260 (-36800), 254 (0), 250 (+16750), 240–245 (+33500) Gipfel, 230 (0) nm ($[\Phi]$). Fehlergrenzen: 700–320 nm $\pm 17^\circ$; 310 nm $\pm 1700^\circ$; 304–230 nm $\pm 17000^\circ$.

Beispiel eines Oxydationsansatzes mit erhöhter Konzentration aber sonst gleichen Bedingungen: 0,5 g S-Dopa-methylester in 25 ml Puffer und 4,07 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 50 ml Puffer. Es wurden 0,8 g Substanz erhalten. In einer ersten Chromatographie an 80 g Kieselgel wurden in den ersten drei Fraktionen von je 10 ml 147 mg ölige Substanz abgetrennt (Rf 0,8) nebst Schwefel. Die folgenden 6 Fraktionen (412 mg) brachten Gemische von Triacetyl-S-cyclodopa-methylester und Triacetyl-S-dopa-methylester und wurden nach Wiedervereinigung an 50 g Kieselgel rechromatographiert. Triacetyl-S-cyclodopa-methylester erschien nun im Anschluss an drei Vorfraktionen (21 mg) in drei Fraktionen (139,8 mg); darauf folgten 2 Fraktionen eines 1:1 Gemisches von Triacetyl-S-cyclodopa-methylester und Triacetyl-S-dopa-methylester (46,1 mg) und schliesslich drei Fraktionen von Triacetyl-S-dopa-methylester (170,9 mg; Smp. 122–3°). Bilanz: ca. 163 mg Triacetyl-S-cyclodopa-methylester (45%) und 194 mg Triacetyl-S-dopa-methylester (55%).

Triacetyl-R-cyclodopa-methylester: Aus R-(D)-Dopa nach gleichem Verfahren wie das S-Enantiomere hergestellt. Smp. (nach Trocknung) 93–96°; $[\alpha]_D = +69,8^\circ$ ($c = 2,97$; CHCl_3). UV.- und NMR.-Spektren wie diejenigen des S-Enantiomeren.

⁶⁾ Die Mikroanalyse wurde im Laboratoire Microchimique, Ecole de Chimie, Université de Genève (Leitung Dr. KURT EDER) ausgeführt.

Triacetyl-RS-cyclodopa-methylester kann sowohl aus *RS*-Dopa als auch aus den optisch aktiven Aminosäuren erhalten werden. Im letzteren Fall oxydiert und reduziert man die freie Aminosäure anstatt deren Ester. Während der anschliessenden Acetylierung des freien Cyclodopa findet Racemisierung statt. Das Triacetylcyclodopa wird dann mittels Diazomethan in Methylenchlorid verestert. Smp. 157,5–158,5°. Ein 1:1-Gemisch der *S*- und der *R*-Verbindung schmilzt bei 153–154° (leichtes Sintern bei 93°). Die UV.- und NMR.-Spektren sind mit denjenigen der optisch aktiven Produkte identisch.

2. Hydrolyseprodukte aus Triacetylcyclodopa-methylester. – *Hydrolyse unter Luftabschluss*: Die sauren Hydrolyselösungen werden bei der Temperatur flüssiger Luft gefroren; dann wird das Gefäss auf 10^{-3} bis 10^{-6} Torr (Hg-Diffusionspumpe) evakuiert und geschlossen. Nun lässt man auftauen, wobei die gelösten Gase entweichen. Darnach wird erneut gefroren und evakuiert. Diese Prozedur wiederholt man dreimal und verschliesst dann das Gefäss unter Vakuum. Bei Hydrolysen in basischem Milieu wird entweder das Lösungsmittel ohne Substanz entgast, dann die Substanz zugegeben, das Gefäss evakuiert, abgeschlossen und auftauen gelassen, oder man destilliert das entgaste Lösungsmittel (verd. Salzsäure oder verd. Ammoniak) in einem überbrückten und unter Vakuum abgeschlossenen Glassystem zur vorgelegten Substanz und entfernt nach beendeter Hydrolyse das Lösungsmittel im Vakuum.

5- oder 6-O, N-Diacetyl-S-cyclodopa-methylester (11). 500 mg Triacetyl-S-cyclodopa-methylester werden unter Magnetrührung in 50 ml eines 1:1-Gemisches von 1N HCl und Methanol suspendiert. Die Substanz geht im Laufe von 15 Min. in Lösung. In regelmässigen Zeitabständen werden Proben von 0,02 ml entnommen und mit dem gleichen Lösungsmittel auf 10 ml verdünnt. Das UV.-Spektrum der verdünnten Proben zeigt im Laufe von 1 Std. eine allmähliche Verlagerung des ursprünglichen Max. 289 nm auf die Schulter bei 294 nm. Eine Probe des Reaktionsgemisches zeigt im Dünnschichtchromatogramm 3 Flecke: Ausgangsmaterial (Rf 0,75), O, N-Diacetyl-S-cyclodopa-methylester (Rf 0,35) und N-Acetyl-S-cyclodopa-methylester (Rf 0,2). Nach dem Eindampfen der Lösung wird der Rückstand in Wasser-Methylenchlorid aufgenommen. Die neutralgewaschene Methylenchlorid-Schicht enthält praktisch nur Ausgangsmaterial und Diacetylcyclodopa-methylester. Durch Chromatographie an 50 g Kieselgel mit Methylenchlorid-Methanol 19:1 (Fraktionen zu 10 ml) werden die beiden extrahierten Komponenten getrennt: In den ersten 5 Fraktionen erscheinen 296 mg Ausgangsmaterial; dann folgen nach einer Zwischenfraktion (9 mg) in zwei weiteren Fraktionen 72 mg O, N-Diacetyl-S-cyclodopa-methylester; aus Methylenchlorid-Äther Kristalle vom Smp. 119–120°. UV. (MeOH): Max. 213 (16000), 253 (11000), 290–294 (4000); Min. 230 (5100), 275 (2600) nm (ϵ). – IR. (KBr): 3380–3120, 1750, 1660, 1625, 1360, 1330, 1210–1175 (alle Banden s) K. – NMR. (CDCl₃): 8,29/S, 0,8 Pr und 6,81/S, 0,2 Pr (H-C(7)); 6,81/S, 1 Pr (H-C(4)); 4,95/Q, X-Teil eines ABX ($J = 10$; $J = 3,5$), 1 Pr (H-C(2)); 3,75/S, 3 Pr (CH₃O); 3,54/Q ($J = 16$; $J = 10$), (H-C(3) *cis* zu H-C(2)) und 3,12/Q ($J = 16$; $J = 3,5$), (H-C(3) *trans* zu H-C(2)), zusammen 2 Pr, AB-Teil des ABX; 2,30/S, 3 Pr (CH₃COO-); ca. 2,3/S, 1 Pr und 2,21/S, 2 Pr (CH₃CON-). – NMR. (CF₃COOH): 8,05/S, 0,7 Pr und 7,23/S, 0,3 Pr (H-C(7)); 7,12/S, 0,3 Pr und 7,07/S, 0,7 Pr (H-C(4)); 5,39/Q ($J = 9,5$; $J = 3$), 1 Pr, X-Teil eines ABX (H-C(2)); 3,99/S, ca. 2 Pr und 3,97/s, ca. 1 Pr (CH₃O); 3,66/Q ($J = 17$; $J = 9,5$) (H-C(3) *cis* zu H-C(2)) und 3,40/Q ($J = 17$; $J = 3$) (H-C(3) *trans* zu H-C(2)) zusammen 2 Pr, AB-Teil eines ABX; 2,70/S, 0,9 Pr und 2,47/S, 2,1 Pr (CH₃CO-N); 2,48/S, 3 Pr (CH₃CO-O).

5- oder 6-O, N-Diacetyl-RS-cyclodopa-methylester: Smp. 173–174°. NMR.-Spektrum wie das des *S*-Enantiomeren.

N-Acetylcyclodopa-methylester (12). – a) *S-Verbindung durch Verseifung in verd. Ammoniak*: Zu 200 mg Triacetyl-S-cyclodopa-methylester werden im geschlossenen System 16 ml entgastes 1N Ammoniak (1 ml NH₄OH konz. + 15 ml H₂O) destilliert. Nach 2½ Std. bei 40° wird die gelbe Lösung abgedampft. Zum Rückstand werden 5 ml entgaste 0,1N HCl destilliert. Ein Teil des Produktes fällt nun als farbloses Kristallinat an: 45 mg nach Zentrifugation, Waschen mit Wasser und Trocknen. Smp. 197–199° (Zers.). IR. (KBr): 3400 (s), 3100 (s, b), 1730 (s), 1680 (s), 1630–1620 (b, s), 1510 (s) K. – NMR. (CF₃COOH): 7,92/S, 0,8 Pr und 7,18/S, 0,2 Pr (H-C(7)); 6,98/S und 6,95/S, 1 Pr (H-C(4)); 5,35/Q (X-Teil von ABX) ($J = 3$; $J = 9$), 1 Pr (H-C(2)); 3,98/S, ca. 2 Pr und 3,95/S, ca. 1 Pr (CH₃O); 3,54/(Zentrum einer nicht gut aufgelösten Signalgruppe) AB-Teil von ABX, 2 Pr (2 H-C(3)); 2,75/S, 1,2 Pr und 2,52/S, 1,8 Pr (CH₃CON-).

b) *RS-Verbindung durch Verseifung in salzsaurem Methanol*: 50 mg Triacetyl-RS-cyclodopa-methylester werden in 10 ml 1N HCl-Methanol gelöst. Der Verlauf der Verseifung wird wie bei der

Herstellung von **11** verfolgt: Nach 5 Min. hat sich das Max. von 288 nm auf die Schulter bei 295 nm verlegt (Spektrum des 5- oder 6-O,N-Diacetylcyclodopa-methylesters). Im Laufe weiterer 20 Min. bildet sich ein neues Max. bei 306 nm unter Zerfall des Max. bei 250 nm aus, wobei die Schulter bei 256 nm als neues Max. bei 258 nm in Erscheinung tritt. Die Umsetzung ist nach 50 Min. praktisch beendet. Der durch Eindampfen erhaltene Rückstand kristallisiert aus Methanol-Äther; Smp. 221–226° (Zers.) (unkorr.). – UV. (MeOH): Max. 214 (26200), 258 (10900), 306 (8050); Min. 234 (4400), 283 (3100) nm (ϵ). – NMR.: wie für die S-Verbindung.

S-Cyclodopa-methylester. 3,15 mg Triacetyl-S-cyclodopa-methylester wurden in 1 ml 1N HCl-Methanol (1 ml Methanol + 0,18 ml Acetylchlorid) wie beschrieben unter Vakuum 24 Std. auf 80° erhitzt und dann auf 10 ml verdünnt = Lösung für ORD.-Spektrum. Zur Aufnahme eines UV.-Spektrums wurde diese Lösung 1:1 mit 1N HCl-Methanol verdünnt. UV. (1N HCl-MeOH): Max. 291 (4200) nm (ϵ). – ORD. (1N HCl-MeOH): 360–310 (–450); 299–302 (–230, Gipfel); 289 (–1200); 278 (–2280); 254 (–3500); 237–238 (–6870, Tal); 228 (–2100) nm ($[\Phi]$) \pm 100. + Cotton-Effekt 289 nm, $a = ca\ 9$, $b = 22$ nm; – Cotton-Effekt ca. 220–230 (Nullpunktskreuzung nicht erreicht, $a!$ = –69.

S-Cyclodopa (IV). Für das UV.- und ORD.-Spektrum wurde eine Probe von 3,84 mg Triacetyl-S-cyclodopa-methylester wie beschrieben 24 Std. in 1 ml 20-proz. HCl (konz. HCl–H₂O 1:1) unter Vakuum auf 80° erhitzt und dann auf 10,0 ml verdünnt = Lösung für ORD.; Verdünnung für UV.-Spektrum 1:1. Zur Messung der spezifischen Drehung wurden in gleicher Weise 99,6 mg Substanz in 2 ml 20-proz. HCl verseift und dann auf das Messvolumen verdünnt. Für das NMR.-Spektrum wurde die Probe nach der Verseifung im Hochvakuum eingedampft und der Rückstand in CF₃COOD gelöst. Die Lösung pipettierte man in ein Glaskölbchen, an dessen Hals seitlich ein NMR.-Röhrchen mit vorbereiteter Abschmelzstelle angebracht war. Die Lösung wurde gefroren und wie weiter oben beschrieben unter Hochvakuum entgast. Dann wurde das Glassystem unter Vakuum abgeschmolzen. Die Lösung wurde nun durch Kippen in das NMR.-Röhrchen gebracht und die Lösungsreste durch vorsichtiges Erwärmen unter Rückfluss nachgespült. Schliesslich wurde die Lösung gefroren und das NMR.-Röhrchen abgeschmolzen. $[\alpha]_D^{25} = -92^\circ$ ($c = 1,65$; 20-proz. HCl). – UV. (20-proz. HCl): Max. 210 (9230), 285 (4150); Infl. 220 (6380), 228 (3900); Min. 249 (340) nm (ϵ). – ORD. (20-proz. HCl): 360–330 (–654); 319–303 (–770); 297–295 (–587, Gipfel); 283 (–1930, Infl.); 276 (–2790); 249 (–4810); 235 (–8370, Tal); 225 (–3220) nm ($[\Phi]$) \pm 100. + Cotton-Effekt 283 nm, $a = ca. +13$, $b = 23$ nm; – Cotton-Effekt ca. 230 nm, Nullpunktskreuzung nicht erreicht, $a!$ = –84. – NMR. (CF₃COOD): 7,34/S, 1 Pr (H–C(7)); 7,05/S, 1 Pr (H–C(4)); 5,36/Q ($J = 9,5$; $J = 6$), 1 Pr, X-Teil eines ABX (H–C(2)); 3,89/Q ($J = 16,5$; $J = 9,5$), (H–C(3) *cis* zu H–C(2)) und 3,61 ($J = 16,5$; $J = 6$) (H–C(3) *trans* zu H–C(2)), AB-Teil eines ABX, zusammen 2 Pr. NMR. (CF₃COOD) nach 3 Std. 70°: unverändert; nach 2³/₄ Std. 83°: Das Singlett $\delta = 7,34$ zeigt noch ca. 0,4 Pr. Rest des Spektrums unverändert.

UV.-Spektrum und ORD. von S(L)-Dopa (Produkt der FLUCKA AG.): UV. (20-proz. HCl): Max. 279 (2600); Min. 250 (300) nm (ϵ). – ORD. (20-proz. HCl): 285 (+605, Gipfel), 277 (+314, Infl.), 264 (+134, Tal), 250 (+1190), 237–238 (+3290, Gipfel), 229 (0), 227 (–920) nm ($[\Phi]$) \pm 50. + Cotton-Effekt 277 nm, $a = ca. +8$, $b = 21$ nm; + Cotton-Effekt 229 nm, $a!$ = +33.

3. Mikro-Identifikation der Produkte. – *Dünnschichtchromatographie*: Die acetylierten Methylesterderivate von Cyclodopa werden auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator (beschichtet durch Aufgiessen einer Kieselgelsuspension in Essigester und an der Luft getrocknet) mit Methylchlorid-Methanol 19:1 als Laufmittel chromatographiert. Die Produkte erscheinen unter der CAMAG-Lampe 254 nm als dunkle Flecke; sie können ferner mit Joddämpfen sichtbar gemacht werden.

Tabelle 4. Rf-Werte von Cyclodopaderivaten in der Dünnschichtchromatographie

Die Rf-Werte schwanken um $\pm 0,05$ und sind auf 0,05 Einheiten auf- oder abgerundet.

Kieselgel; Methylchlorid-Methanol 19:1

| | | | |
|-----------------------------------|-----|------------------------------------|-----|
| Triacetylcyclodopa-methylester | 0,7 | N-Acetylcyclodopa-methylester | 0,2 |
| Triacetyldopa-methylester | 0,5 | 5,6-Diacetoxy-indol-2-carbonsäure- | 0,7 |
| O,N-Diacetylcyclodopa-methylester | 0,3 | methylester | |
| | | (im UV. hellblaue Fluoreszenz) | |

Papierchromatographie und Papierelektrophorese: Auf WHATMAN Nr. 1 Papierstreifen $6,6 \times 28$ cm wurden ca. $0,7 \mu\text{l}$ von Lösungen aufgetragen, die 10 mg Substanz/ml enthielten (d.h. pro Auftrag ca. $7 \mu\text{g}$); als Vergleichssubstanz wurde stets Salicylsäure mitgegeben. Jede Substanz wurde auf jedem Streifen an zwei Stellen aufgetragen.

Bereitung von Proben von Cyclodopa und Cyclodopa-methylester für die Papierchromatographie und Papierelektrophorese: Je 10 mg Triacetylcyclodopa-methylester wurden unter Sauerstoffausschluss mit 1 ml 20-proz. HCl resp. 1N HCl-Methanol unter Vakuum in einem Rohr eingeschmolzen und 24 Std. auf 80° erhitzt. Die Lösungen wurden eingedampft und die Rückstände in je 1 ml 0,1M Ameisensäure aufgenommen. Die an der Luft sich bald orange verfärbenden Lösungen liessen sich durch Gefrieren während einiger Tage konservieren. Zur Analyse genügte ein Auftrag dieser Lösungen auf eine Tupfengrösse von 4–5 mm Durchmesser. Chromatographiert wurde absteigend (Ergebnisse siehe Tabelle 1). Zur Elektrophorese diente eine vereinfachte DURRUM-Apparatur nach WUNDERLY [35]. Die Substanzen wurden nebst Glucose (als Markierung der neutralen Flüssigkeitsbewegung) auf einer Querlinie in 1,2 cm Entfernung von der Mitte auf der Kathodenseite aufgetragen. Nach Benetzung mit 0,05M Pyridiniumformiat (pH 4,5) oder 0,1M Ameisensäure (pH 2,4) wurde während 30–40 Min. eine Spannung von 400–420 V angelegt. Nach dem Trocknen der Streifen und Markieren der Flecke wurden Wanderungsdistanzen der Fleckenschwerpunkte relativ zu denjenigen von Salicylsäure mit Bezug auf die durch die Glucosemarkierung ermittelte Nulllinie berechnet = E_S -Werte. (Entwicklung der Glucoseflecke mit Anilinphthalat nach PARTRIDGE [36]). Resultate siehe Tabelle 1.

4. Spektroskopische Studien zu Bildung von Dopachrom und Dopachrom-methylester. – a) *Bestimmung der molekularen Extinktion von Dopachrom bei pH 8:* Lösungen von $0,5\text{--}6 \cdot 10^{-3}\text{M}$ Dopachrom wurden durch Mischung gleicher Volumen von Dopa- und Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösungen in pH-8-Puffer⁵⁾ in den vorbereiteten Konzentrationen erzeugt. Die Extinktion dieser Lösungen bei 480 nm (Max. von Dopachrom) wurden in einer 1-mm-Kuvette (1-cm-Kuvette mit Glaseinsatz) bei Zimmertemperatur ($23\text{--}25^\circ$) ohne Thermostatisierung in einem automatisch registrierenden BECKMAN DB-Spektrophotometer gemessen, dessen Schreiber gleichzeitig mit der Durchmischung der Lösungen in Funktion gesetzt worden war. Zur Messung von konzentrierteren Lösungen mit E -Werten von über 1,5 wurde in die Referenzkuvette eine wässrige Kongorot-Lösung (Max 490 nm) gegeben, deren E -Wert von 0,9–1,1 bei 480 nm separat ermittelt worden war. Das Instrument zeigte nun den Differenzwert der Extinktion bezüglich des erhöhten Absorptionspegels in der Referenzkuvette an; die gefundenen Werte wurden um den Betrag der Absorption der Kongorot-Lösung vermehrt.

Vom Moment der Messung an – ca. 30–40 Sek. nach Bereitung der Lösung – zeichnete das Gerät während 2–3 Min. eine linear abnehmende Zerfallskurve der Extinktion. Wenn unter Verzicht auf hohe Pipettiergenauigkeit die rote Oxydationslösung direkt in der Kuvette bereitet wurde, konnte eine erste Messung schon 4 Sek. nach erfolgter Mischung gemacht werden; diese Versuche zeigten ebenfalls schon eine abnehmende Intensitätskurve. Es durfte deshalb angenommen werden, dass die Oxydation des Dopa zum Dopachrom unter diesen Umständen praktisch in 1–2 Sek. vollendet war. Die rückwärtige Verlängerung der Zerfallsggeraden auf den Zeitpunkt 0 ergab somit in erster Näherung den Extinktionswert der dem eingesetzten Dopa äquivalenten Menge Dopachrom. Diese Auswertung war zulässig, da die Dopachromlösung nur langsam an Extinktion einbüsste; der in einer grossen Zahl von Messungen beobachtete Verlust erreichte in der ersten Min. ca. 2–3%. Die Messungen wurden in Serien gleicher Konzentration des Oxydationsmittels und variierender Menge Dopa mit Molverhältnissen Dopa: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ von 1:40 bis 1:4 durchgeführt. In jeder Serie waren die Extinktionswerte der Konzentration proportional. Die molare Extinktion von Dopachrom wurde im Mittel zu $\epsilon_{480} = 3700 \pm 200$ gefunden.

b) *Spektroskopische Verfolgung der Bildung von Dopachrom-methylester:* Brauchbare Messresultate liessen sich nur erhalten, wenn die Lösungen des Oxydationsmittels und des Dopa-methylesters in der Kuvette gemischt und möglichst rasch gemessen wurden. Für die präparativ interessanten Konzentration von $8 \cdot 10^{-3}\text{M}$ Dopa-methylester wurden in die Kuvette zu 0,45 ml einer 0,055M Lösung von $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in Phosphat-Puffer pH 8⁶⁾ 0,05 ml einer 0,08M Lösung von Dopa-methylester-hydrochlorid (ebenfalls in Puffer) eingespritzt. Es wurde rasch durchgeschüttelt, der Glaseinsatz eingeschoben und die Kuvette in den Messraum gesteckt; dies benötigte 9–12 Sek. In der Referenzkuvette befand sich eine Kongorotlösung des Extinktionswertes $E = 1,64$ bei 480 nm.

Unter den gegebenen Absorptionsverhältnissen trat eine Trägheit in der Anzeige des Instrumentes auf, welche bis zum ersten brauchbaren Messwert eine Verzögerung von weiteren 12 Sek. verursachte, so dass insgesamt vom Zeitpunkt der Mischung bis zur ersten Messung 24 Sek. verstrichen. Von diesem Moment an zeichnete der Schreiber eine steile Zerfallskurve, die nach 15 Sek. Abfall wieder anstieg. Die nun aufkommende Absorption wird durch eine braune Trübung verursacht. Die Messungen des offenbar komplexen Vorganges sind nur schlecht reproduzierbar, namentlich was die Steilheit des abfallenden Kurventeils betrifft. Verglichen mit den stabileren Dopachromlösungen ist hier der Extinktionsverlust 2–3mal grösser und beträgt 5 bis 12% pro Min.; in verdünnteren Lösungen an Dopachrom-methylester steigen die Verluste sogar bis auf 27% pro Min. Die Ursachen dieser Erscheinung sind unbekannt. Das kurze gerade Kurvenstück der Zerfallskurve diente wie im Fall der Dopachromlösungen zur Extrapolation auf die Zeit 0. Bei der mässigen Messgenauigkeit dürfen die gefundenen Extinktionswerte 3460 bis 3640 noch dem theoretischen Wert von 3700 gleichgesetzt werden, d.h. dass auch die Oxydation des Dopa-methylesters praktisch in 1–2 Sek. beendet ist.

5. Semicarbazone von Dopachrom und Dopachrom-methylester. – a) *Spektroskopische Charakterisierung in verdünnten Lösungen.* – *Dopachrom-semicarbazon:* Nach anaerober Hydrolyse von 1,28 mg Triacetylcyclodopa-methylester (V) (2 ml 1N HCl, 24 Std. 90°) wurde die Lösung des freigesetzten Cyclodopa eingedampft. Der Rückstand wurde mit einer Lösung von 20 mg Semicarbazid-hydrochlorid und 50 mg Natriumacetat in 10 ml H₂O versetzt. Nach 2 Std. wurde der gelb verfärbten Lösung 1 ml entnommen und mit H₂O auf 10 ml verdünnt. UV., berechnet auf der Basis der Molarität des eingesetzten V: Max. 352 (24800); Infl. 430 (4800).

Dopachrom-methylester-semicarbazon (VIII): Zum Produkt der Hydrolyse von 1,246 mg V (in 2 ml 1N HCl-Methanol, 24 Std. 80°) wurden in Gegenwart von Luft 20 mg Semicarbazid-hydrochlorid und 50 mg Natriumacetat in 10 ml Wasser gegeben. Innerhalb der ersten halben Min. begann sich die Lösung rosa zu verfärben und war nach 1 Min. rötlich orange. Nach 2¹/₄ Std. wurde der gelben Lösung eine Probe von 1 ml entnommen und mit H₂O auf 10 ml verdünnt. UV., berechnet auf der Basis der molaren Konzentration des eingesetzten V: Max. 353 (26000); Infl. 426 (3600). UV. (3 ml H₂O + 4 Tropfen 2N NaOH, pH 12,6): 428 (24000). UV. (3 ml + 2 Tropfen 20-proz. HCl, pH 1,6): 372 (28000) nm (e).

b) *Isolierung von Dopachrom-methylester-semicarbazon (VIII):* 195 mg Triacetyl-S-cyclodopa-methylester (V) werden mit dem Gemisch von 10 ml Methanol und 1,8 ml Acetylchlorid (= 1N HCl-MeOH) unter Ausschluss von Sauerstoff 48 Std. auf 50° erhitzt. Das zur Trockene gebrachte Hydrolyseprodukt (Cyclodopa-methylester) wird in 2 ml Äthanol aufgenommen und mit dem filtrierten Extrakt einer feinen Verreibung von 1 g Semicarbazid-hydrochlorid und 1 g Natriumacetat in 10 ml Äthanol versetzt. Beim Stehen an der Luft und bei 0° verfärbt sich die Lösung orange-gelb. Nach 2 Std. wird im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Bei Zugabe von 5 ml Wasser zum sirupartigen Rückstand kristallisiert das Semicarbazon VIII in orange-gelben, mikroskopisch feinen Nadeln; filtriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet 78,4 mg (51%). Aus Methanol-Wasser umkristallisiert Smp. 245° (unkorr.). Papierchromatographie: R_f = 0,46 in 0,05M Pyridiniumformiat (gleichzeitig mitlaufende Salicylsäure R_f = 0,80). UV. (H₂O): Max. 227 (6500), 356 (19900); Infl. 287 (800), 430 (2900); Min. 215, 265. UV. (3 ml + 1 Tropfen 2N KOH, pH 12): Max. 232 (20000), 432 (23100); Min. 283. UV. (3 ml + 1 Tropfen HCl konz., pH 1,5): 372 (21100). – IR. (KBr): 3436 (s, Infl.), 3311 (s), 2882 (s), 2326 (m), 1706 (s, Infl.), 1695 (s, Infl.), 1672 (s)–1658 (s), 1608 (s), 1536 (s, b), 1460 (s, b), 1412 (s, Infl.), 1287 (s), 1227 (s, b), 1083 (s), 902 (m), 881 (m, b), 782 (m, b), 1316 (s, b). – Zur Analyse im Hochvakuum über P₂O₅ getrocknet:

C₁₁H₁₂N₄O₄ (264,24) Ber. C 50,00 H 4,58 N 21,20% Gef.⁷⁾ C 49,15 H 5,00 N 21,09%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. WYLER, M. E. WILCOX & A. S. DREIDING, *Helv.* **48**, 361 (1965).
 [2] H. WYLER & A. S. DREIDING, *Helv.* **45**, 638 (1962).
 [3] H. WYLER, T. J. MABRY & A. S. DREIDING, *Helv.* **46**, 1745 (1963).

⁷⁾ Diese Analyse entstammt dem Mikroanalytischen Laboratorium des Organisch-chemischen Instituts der Universität Zürich, Leitung H. FROHOFER.

- [4] H. S. RAPER, *Biochem. J.* **21**, 89 (1927).
- [5] W. L. DULIERE & H. S. RAPER, *Biochem. J.* **24**, 239 (1930).
- [6] J. D. BU'LOCK & J. HARLEY-MASON, *J. chem. Soc.* **1951**, 2248.
- [7] R. H. THOMSON in «Comparative Biochemistry», M. FLORKIN & H. S. MASON Edit., Vol. III, S. 727, Acad. Press, New York 1962.
- [8] G. A. SWAN, *Ann. New York Acad. Sci.* **100**, 1005 (1963); N. C. ROBSON & G. A. SWAN, in «Structure and Control of the Melanocyte», S. 155, G. DELLA PORTA & O. MÜHLBOCK Edit., Springer Verlag, Heidelberg 1966; G. W. KIRBY & L. OGUNKOYA, *Chem. Comm.* **1966**, 546.
- [9] K. HEMPEL, *Z. Naturforschg.* **22b**, 173 (1967); R. A. NICOLAUS, M. PIATELLI & E. FATTORUSSO, *Tetrahedron* **20**, 1163 (1964).
- [10] H. SOBOTKA, N. BARSEL, J. D. CHANLEY, *Fortschr. Chem. organ. Naturst.* **14**, 217 (1957).
- [11] R. A. HEACOCK, *Chem. Rev.* **59**, 181 (1959).
- [12] R. A. HEACOCK, *Adv. heterocycl. Chemistry* **5**, 205 (1965).
- [13] M. D. HAWLEY, S. V. TATAWAWADI, S. PIEKARSKY & R. N. ADAMS, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 447 (1967).
- [14] G. B. KOELLE & J. S. FRIEDENWALD, *Arch. Biochemistry Biophysics* **32**, 370 (1951).
- [15] K. WIESNER, *Biochem. Z.* **313**, 48 (1942); **314**, 214 (1943).
- [16] D. E. GREEN & D. RICHTER, *Biochem. J.* **31**, 596 (1937).
- [17] J. HARLEY-MASON, *J. chem. Soc.* **1950**, 1276.
- [18] J. VAN ESPEN, *Pharmaceut. Acta Helv.* **33**, 207 (1958); S. BOUCHILLOUX & A. KODJA, *Bull. Soc. Chim. biol.* **42**, 1045 (1960); R. L. TSE & M. J. OESTERLING, *Clin. chim. Acta* **8**, 893 (1963); R. A. HEACOCK & B. D. SCOTT, *Biochim. biophysic. Acta* **62**, 591 (1962).
- [19] S. N. MISHRA & G. A. SWAN, *J. chem. Soc. C* **1967**, 1424.
- [20] C. B. HUDSON & A. V. ROBERTSON, *Austral. J. Chemistry*, **20**, 1935 (1967).
- [21] Y. OMOTE, Y. FUJINUMA, KUNG-TU KUO & N. SUGIYAMA, *Nippon Kagaku Zasshi* **87**, 760 (1966), *Chem. Abstr.* **65**, 15304 (1966).
- [22] M. BRENNER & W. HUBER, *Helv.* **36**, 1109 (1953).
- [23] R. A. ROBINSON & R. H. STOKES, «Electrolyte Solutions», S. 503, Butterworth, London 1959.
- [24] E. A. H. FRIEDHEIM, *Naturwiss.* **21**, 177 (1933).
- [25] J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, «The Chemistry of the Amino Acids», **2**, 832, J. WILEY & Sons, Inc., New York London 1961.
- [26] U. HAMBERG & U. S. VON EULER, *Acta chem. scand.* **4**, 1185 (1950); H. BERNHEIMER, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **247**, 202 (1964).
- [27] W. O. JAMES, *Nature* **161**, 851 (1948).
- [28] F. A. BOVEY & G. V. D. THIERS, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 2870 (1959).
- [29] M. KARPLUS, *J. chem. Physics*, **30**, 11 (1959); *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2870 (1963).
- [30] K. NAGARAJAN, M. D. NAIR & P. M. PILLAI, *Tetrahedron* **23**, 1683 (1967).
- [31] W. KLYNE, R. J. SWAN, B. W. BYCROFT & H. SCHMID, *Helv.* **49**, 833 (1966).
- [32] J. IWAO, *Pharmaceut. Bull. (Tokyo)* **4**, 251 (1956).
- [33] W. L. C. VEER, *R. Tr. chim. Pays-Bas* **58**, 949 (1939); A. KODJA & S. BOUCHILLOUX, *Biochim. biophysic. Acta* **41**, 345 (1960).
- [34] F. RAMIREZ & P. VON OSTWALDEN, *J. org. Chemistry* **20**, 1676 (1955).
- [35] CH. WUNDERLY, G. SCHNEIDER & F. HUGENTOBLE, *C. r. 3^e Congrès Internat. Europ. d'Hématologie*, Rome 1951.
- [36] S. M. PARTRIDGE, *Nature* **167**, 864 (1951).