

molécules d'acétone et d'acétone- $d_6$  (SM., RMN.). De même **10** traité par de la butanone en présence de chlorure mercurique conduit à **13**. Les pourcentages de réarrangement de **10** en **11** sont très faibles ou nuls dans les solvants non carbonylés (benzène, éther éthylique, xylène, diméthylsulfoxyde, heptane) en présence de catalyseurs acides variés (Dowex 50 H<sup>+</sup>, HgCl<sub>2</sub>, BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O).

Nous remercions le *Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique* d'un subside (N° 2123-69). Nous exprimons notre reconnaissance au Dr B. Willhalm (*Firmenich & Cie*, Genève) et à M. J. C. Landry (Ecole de Chimie, Genève) pour l'enregistrement des spectres de masse.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. Horton & J. D. Wander, Abstracts of papers 150th. Meeting Amer. Chem. Soc., 21 D (1965).
- [2] W. Meyer zu Reckendorf, *Angew. Chem.* 79, 151 (1967).
- [3] K. Freudenberg, W. Durr & H. von Hochstetter, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 61, 1735 (1928).
- [4] P. J. Beynon, P. M. Collins & W. G. Overend, *Proc. chem. Soc.* 1964, 342.
- [5] J. M. J. Tronchet, J. M. Bourgeois, R. Graf & Mme J. Tronchet, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci. [C]* 269, 420 (1969).
- [6] K. Onodera, S. Hirano & N. Kashimura, *Carbohydrate Research* 6, 276 (1968).
- [7] J. M. J. Tronchet, N. Le-Hong & Mlle F. Perret, *Helv.* 53, 154 (1970).
- [8] E. G. Bourne, G. P. McSweeney, M. Stacey & L. F. Wiggins, *J. chem. Soc.* 1952, 1408; H. Zinner, *Chem. Ber.* 92, 1616 (1959).
- [9] D. J. Bell, *J. chem. Soc.* 1947, 1461; C. Cone & L. Hough, *Carbohydrate Research* 1, 1 (1965).

## 43. Über Pterinchemie

28. Mitteilung [1]

### Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin mittels Tetrahydropterin unter physiologischen Bedingungen

von M. Viscontini und G. Mattern<sup>1)</sup>

Organisch-Chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(10. I. 70)

*Zusammenfassung.* Es werden die Versuche und Ergebnisse beschrieben, die zur Entwicklung der Theorie eines Radikalmechanismus für die Hydroxylierung des Phenylalanins mittels Tetrahydropterin unter physiologischen Bedingungen beigetragen haben.

In der 17. Mitteilung [2] hatten wir erwähnt, dass bei der Hydroxylierung des Phenylalanins mittels Tetrahydropterin nicht nur *p*-Tyrosin, wie wir in der 15. Mitteilung [3] berichtet hatten, sondern auch *o*- und *m*-Tyrosin gebildet werden, und zwar im Verhältnis *o*:*m*:*p* = 2:1:1.

Hier beschreiben wir nun die Versuche, die zu diesen Ergebnissen geführt haben. Um die besten Resultate zu erzielen, wurde zunächst die Wirkung verschiedener, nachstehender Faktoren genau untersucht.

a) *Katalytische Wirkung der Eisen-Ionen.* Diese sind für die Bildung der Tyrosine unentbehrlich [3], die Ausbeute an Tyrosin ist jedoch keine Funktion der Konzentra-

<sup>1)</sup> Auszug aus der Dissertation von G. Mattern, Universität Zürich, 1969.

tion des Eisens. Katalytische Mengen von  $1 \mu\text{Mol Fe}^{\text{II}}$  oder  $10 \mu\text{Mol Fe}^{\text{III}}$  sind schon ausreichend, wenn man 5 ml einer  $0,025 \text{ M}$  Phosphatpufferlösung, pH 6,9, verwendet, die  $60 \mu\text{Mol}$  Phenylalanin,  $10 \mu\text{Mol}$  Tetrahydropterinsulfat und die gleiche molare Konzentration von EDTA wie  $\text{Fe}^{\text{II}}$  oder  $\text{Fe}^{\text{III}}$  enthält (Tabelle 1).

Tabelle 1. Einfluss der Fe-Ionenkonzentration auf die Bildung von *p*-Tyrosin  
(alle Angaben in  $\mu\text{Mol}$ )

$\text{Fe}^{\text{II}}$	0	1,2	17,5	88	175
<i>p</i> -Tyrosin	0,22	1,1	1,7	1,3	1,0
$\text{Fe}^{\text{III}}$	0	5,3	12	88	175
<i>p</i> -Tyrosin	0,22	0,7	0,9	1,0	0,9

Ausgewählte natürliche Eisenkomplexe besitzen nur geringe Katalysatorwirkung (Tabelle 2).

Tabelle 2. Einfluss einiger Eisenkomplexe auf die Bildung von *p*-Tyrosin  
(Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1)

Komplex	Ferrioxamin	Ferrichrysin	Hämatin
Menge in mg	1	1	1
Gebildetes <i>p</i> -Tyrosin in $\mu\text{Mol}$	0,28	0,25	0,20

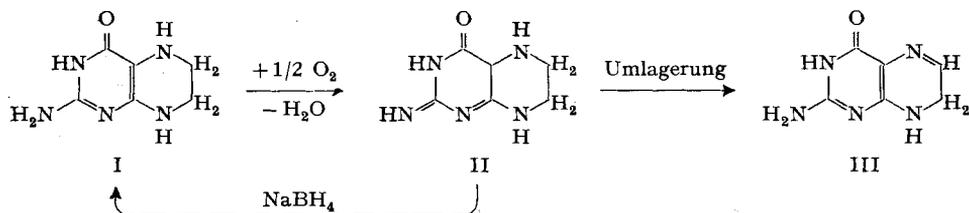
b) *Rolle der Liganden der Fe-Ionen.* Bei der Hydroxylierung des Phenylalanins mit dem modifizierten *Fentons*-Reagens ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) liegen optimale Bedingungen dann vor, wenn EDTA als Chelat verwendet wird und das Verhältnis  $[\text{EDTA}]:[\text{Fe}^{\text{II}}] = 1$  beträgt [4]. Auch in unserem Falle erwies sich dieses Verhältnis als am besten geeignet. Optimale Bedingungen liegen ebenfalls vor, wenn man EDTA durch Pyrophosphat-Ionen in der gleichen molaren Konzentration ersetzt.

c) *Einfluss der Reaktionszeit.* 2–2 $\frac{1}{2}$  Stunden reichten für die optimale Hydroxylierung aus. Eine längere Reaktionsdauer führte zur vermehrten Bildung von dihydroxylierten Verbindungen (DOPA usw.) und zu Melaninen, ohne dass noch ein merklicher Konzentrationsanstieg an Tyrosinen beobachtet werden konnte.

d) *Rolle des pH.* Die besten Ergebnisse erhielten wir bei pH 6,9–7.

e) *Konzentration des Tetrahydropterins.* Im Gegensatz zu unseren Ausführungen in der 15. Mitteilung [3] sind grössere Mengen an Tetrahydropterin zur Hydroxylierung nicht nötig; kleine Konzentrationen ergeben ebenfalls gute Resultate, besonders wenn zur Reaktionslösung noch  $\text{NaBH}_4$  gefügt wird.

f) *Rolle des  $\text{NaBH}_4$ .* Bei Zugabe von entsprechenden Mengen an  $\text{NaBH}_4$  zur Reaktionslösung wird die Ausbeute an Tyrosin fast verdoppelt. Optimale Bedingungen werden erreicht, wenn in einem Zeitraum von  $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$  Stunde ca.  $0,5 \text{ mMol}$   $\text{NaBH}_4$  zugegeben wird. Das durch  $\text{O}_2$  zum Chinoid-dihydropterin (II) oxydierte Tetrahydropte-



rin(I) [5] wird durch das Borhydrid reduziert und dadurch wieder aktiviert. Anhand der erhöhten Tyrosinbildung muss angenommen werden, dass die Reduktion von II zu Tetrahydropterin (I) schneller verläuft als die Umlagerung von II zu 7,8-Dihydropterin (III).

g) *Weiteroxydation der gebildeten Tyrosine.* Ausser den Tyrosinen, die wir in 5–6% Ausbeute erhielten, konnten noch DOPA (1,2%) sowie Melanine (2–2,5%) nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden noch Spaltprodukte wie Hydrochinon und Alanin festgestellt.

h) *Mechanismus der Hydroxylierungsreaktion.* Über den Verlauf der Reaktion haben wir schon eine ausführliche Theorie publiziert [6].

Wir danken Herrn PD Dr. R. Humbel, Biochemisches Institut der Universität Zürich, für die Bestimmungen am Aminosäureanalysator und Herrn H. Frohofer, Leiter unserer mikroanalytischen Abteilung, für alle anderen, hier beschriebenen Analysen und Messungen.

**Experimentelles.** – 1. *Bestimmung der Tyrosine.* Je nach den experimentellen Bedingungen erfolgte sie kolorimetrisch, durch Bestimmung von  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität oder mittels Aminosäureanalysator.

1.1. *Kolorimetrische Bestimmung.* *o*-Tyrosin liess sich ohne nennenswerte Schwierigkeit kolorimetrisch mittels Ninhydrin-Reagenz bestimmen [7]. Das *m*-Tyrosin hingegen lässt sich kaum von *p*-Tyrosin chromatographisch trennen. Zu seiner kolorimetrischen Bestimmung wurde das 2,6-Dichloro-*p*-chinon-4-chlorimin [8] verwendet; diese Methode ist sehr spezifisch und wird weder vom Phenylalanin noch vom *o*- und *p*-Tyrosin gestört. Das *p*-Tyrosin konnte weder mit dem Ninhydrin- noch mit dem Millon-Reagenz [9] fehlerfrei bestimmt werden; wir haben deshalb die von Thomas [10] beschriebene Methode in folgender abgeänderter Ausführung verwendet: 120 mg  $\alpha$ -Nitroso- $\beta$ -naphthol werden in 100 ml 96-proz. Äthanol gelöst (Lösung bei 5° für längere Zeit haltbar). Proben von je 2 ml der zwischen 25 und 75  $\mu\text{g}$  enthaltenden *m*- und *p*-Tyrosinlösung werden mit 1 ml der Nitrosonaphthol-Lösung und 1 ml 33-proz.  $\text{HNO}_3$  versetzt, umgeschüttelt und mit 2 ml konz. HCl versetzt. Die Probe wird wiederum geschüttelt, dann im kochenden Wasserbad genau 1 Min. erhitzt, anschliessend im Eisbad unter Umrühren abgekühlt und bei 510 nm am Spektralphotometer (Unicam SP 500) gemessen. Nach Thomas soll dies innerhalb von 8 Min. geschehen, aber wir haben beobachtet, dass nach 12–15 Min. immer noch keine Extinktionsänderung eintritt. Mit dieser Methode wird die Summe *m*- + *p*-Tyrosin gemessen. Von dieser Summe wird der mittels 2,6-Dichloro-*p*-chinon-4-chlorimin ermittelte Wert des *m*-Tyrosins abgezogen und so die Konzentration des *p*-Tyrosins berechnet.

1.2. *Bestimmung der Tyrosine mittels Radioaktivitätsmessungen.* Zur Bestimmung wurden die einzelnen Zonen der Cellulose-Dünnschichtchromatogramme durch Besprühen eines 1–1,5 cm breiten Randstreifens mit Ninhydrin sichtbar gemacht und abgekratzt. Während *o*-Tyrosin von den anderen Substanzen getrennt wird, werden *m*- und *p*-Tyrosin zusammen ausgezählt. Die von den Platten abgekratzten Zonen wurden in Plastiköpfchen mit Essigsäure/Methanol (1:1) sowie mit Toluol und dem Scintillator «POPOP + PPO» (Packard) versetzt und am «Tricarb Scintillation Counter» (Packard, Modell 500c) ausgezählt. Ein Aktivitätsverlust von 10-proz. pro Chromatogramm wurde bei jeder Auswertung berücksichtigt.

1.3. *Bestimmung der  $\alpha$ -Aminosäuren mit dem Beckman-Analysator.* Phenylalanin, Alanin, Glycin und *o*-Tyrosin lassen sich voneinander gut trennen, dagegen fallen *m*- und *p*-Tyrosin in einem Pik zusammen.

2. *Kolorimetrische Bestimmung des DOPA:* Nach Arnow [11] mit Nitrit-Molybdat-Reagenz.

3. *Die Hydroxylierungen.* – 3.1. *Ausführung.* Zu 10 mg (60  $\mu\text{Mol}$ ) Phenylalanin, das mit 3- $^{14}\text{C}$ -Phenylalanin (ca.  $4,3 \cdot 10^5$  dpm pro Versuch) versetzt war, 1 mg (2,5  $\mu\text{Mol}$ )  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  und 1 mg (2,9  $\mu\text{Mol}$ )  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  wurden 3 mg (10  $\mu\text{Mol}$ ) Tetrahydropterinsulfat in 5 ml einer 0,025M Phosphatlösung vom pH 6,9 gegeben. Die Lösung wurde mit 1–2 Tropfen 2N NaOH auf pH 6,9–7 gebracht. Während der ersten 15–30 Min. wurden je drei Portionen zu 5 mg  $\text{NaBH}_4$  hinzugefügt. Das Gemisch wurde  $1\frac{1}{2}$ –2 Std. bei 37° an der Luft gerührt, die Lösung daraufhin wie folgt aufgearbeitet, bis die Hydroxylierungsprodukte getrennt und gereinigt erhalten werden konnten (nahezu konstante Radioaktivität).

3.2. *Trennung der Hydroxylierungsprodukte* (siehe Trennschema). Die Trennung lässt sich am besten auf Celluloseplatten (Cellulosepulver MN 300, Firma *Macherey, Nagel & Co.*, Düren) erreichen. Als Laufmittel haben wir folgende Gemische verwendet:

A: *n*-Propanol/33-proz. NH<sub>4</sub>OH (7:3)

B: Collidin, gesättigt mit Wasser

C: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)

Nach Beendigung der Hydroxylierungsreaktion gibt man 20 ml Gemisch A zu und filtriert durch eine kleine Cellulosesäule (3 cm Höhe, 1 cm Durchmesser). Das Eluat 1, von Melaninen befreit, wird eingengt, mit wenig Gemisch A versetzt und zentrifugiert. Die klare Lösung 11 wird auf ein kleines Volumen eingengt, auf Cellulosepulver-Platten (20 × 20 cm) aufgetragen und mit dem Gemisch A chromatographiert. Nach dem Trocknen wird jeweils zum Nachweis der einzelnen Zonen ein Streifen von 1,5 cm am Rand der Platten mit einer Lösung von 300 mg Ninhydrin in 100 ml *n*-Butanol + 3 ml Eisessig besprüht und bei 90° entwickelt. Anhand der sichtbar gemachten Zonen und der im UV.-Licht fluoreszierenden Streifen von Pterinderivaten werden die  $\alpha$ -Aminosäure-haltigen Cellulosestreifen (111, 112, 113) von den Platten abgekratzt, in Zentrifugengläsern gesammelt, mit je 2 ml Wasser und 2 Tropfen 2*N* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> im Wasserbad eluiert, die Eluate abgekühlt, zentrifugiert und eingengt. Durch mehrmaliges Wiederholen des Verfahrens, bis die Radioaktivität der verschiedenen Produkte nahezu konstant bleibt, können Phenylalanin (1111) und *o*-Tyrosin (1122) ziemlich rein erhalten werden. Beide Substanzen werden in einer letzten Dünnschichtchromatographie mit dem Gemisch C gereinigt und darauf kolorimetrisch oder mittels Radioaktivitätsmessungen bestimmt. *m*- und *p*-Tyrosin (1133) lassen sich nicht mit dem Gemisch A voneinander trennen; zu ihrer Trennung wird das Gemisch B verwendet. Nach dem Trocknen der Platten bei 100° färbt sich die Zone 11331 (*m*-Tyrosin) gelb, die Zone 11332 (*p*-Tyrosin) grau. Diese Methode ist jedoch nur qualitativ und dient nur als Beweis für die Anwesenheit beider Tyrosine in der Zone 1133. Ihre Bestimmung wird jeweils kolorimetrisch, wie oben beschrieben, auf der gereinigten Zone 1133 ausgeführt. Die Melanine (2) werden von der Cellulosesäule mit 0,1*N* KOH eluiert und entweder mittels Radioaktivität oder Kolorimetrie nach *Florence* [12] bestimmt.

Für die Trennung von 3,4- und 2,3-DOPA kann das basische Gemisch A nicht verwendet werden, hingegen gibt das saure Gemisch C gute Resultate. Die Mischung beider Substanzen wird entweder mittels Radioaktivität oder Kolorimetrie bestimmt.

Tabelle 3 enthält die Rf-Werte der verschiedenen, nach der Hydroxylierung isolierten Substanzen mit ihren charakteristischen Nachweisfarben.

Tabelle 3. *Rf*-Werte und Farbreaktionen der nach Hydroxylierung erhaltenen Substanzen

Substanzen	Rf im Gemisch A	Rf im Gemisch C	Ninhydrin- Reagenz	Thomas- Reagenz	Arnow- Reagenz
Phenylalanin	0,61		violett	0	0
<i>o</i> -Tyrosin	0,54		"	rot	rosa
<i>m</i> -Tyrosin	0,35		"	"	"
<i>p</i> -Tyrosin	0,33		"	tiefrot	"
Alanin	0,30		"	0	0
2,3-DOPA		0,21	"	rot	tiefrot
3,4-DOPA		0,23	"	"	"
<i>p</i> -Hydrochinon	0,87		0	0	braun

3.3. *Ergebnisse*. Als arithmetische Mittel der Bestimmungen (mittels Kolorimetrie und Radioaktivitätsmessungen von zahlreichen Hydroxylierungen) wurden gefunden:

<i>o</i> - + <i>m</i> - + <i>p</i> -Tyrosin	5,5%, Verhältnis 2-3:1:1
2,3- + 3,4-DOPA	1,2%
Melanine	2,3%
Alanin	Spuren
Hydrochinon	0,5%
zurückgewonnenes Phenylalanin	65%

