

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 4. Mitteilung: *A. K. Wick*, *Helv.* 57, 85 (1968).
 [2] *A. K. Wick*, *Chimia* 22 Suppl., «Synthese und Reaktionsmechanismen in der Farbstoffchemie», S. 156 (1968).
 [3] *W. Mieg*, IG.-Farben, DRP. 451495, *Friedl.* 76, 1345.
 [4] *W. Bradley & C. R. Thitchener*, *J. chem. Soc.* 1953, 1085.
 [5] Vgl. z. B. DRP. bzw. DBP. Nr. 628124, 630703, 638217, 844777, 959578, 960029, 964976, 975600, 1093931, 1105083, 1232296 und 1239792.
 [6] *J. W. Wilson & I. J. Worrall*, *Inorg. nucl. Chemistry Letters* 3, 57 (1967).
 [7] *A. K. Wick*, *Helv.* 49, 1748 (1966).
 [8] *A. K. Wick*, *Helv.* 50, 377 (1967).
 [9] *J. Arient, J. Knížek, J. Marhan & V. Slavík*, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* 33, 3280 (1968).
 [10] *R. Scholl & J. Mansfeld*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 43, 1734 (1910).
 [11] *FIAT* Final Report Nr. 1313 II, S. 137 (Washington DC 1948).
 [12] *R. Q. Brewster & T. Groening*, *Org. Synth., Coll. Vol. II*, 446.

95. Über Pterinchemie

31. Mitteilung [1]

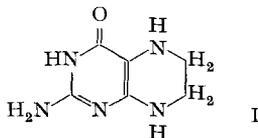
Hydroxylierung von Tryptophan mittels Tetrahydropterin
unter physiologischen Bedingungen¹⁾von **M. Viscontini** und **G. Mattern**

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

(17. IV. 70)

Zusammenfassung. Die experimentelle Arbeit der 21., vorläufigen Mitteilung [3] wird beschrieben. Dort wurde gezeigt, dass Tryptophan an der Luft in wässriger Lösung mittels Tetrahydropterin und Eisen(II) als Sauerstoffaktivator unter physiologischen Bedingungen hydroxyliert wird, wobei 5-Hydroxytryptophan, Melanine, Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, Xanthommatin u. a. isoliert werden können.

Tryptophan nimmt in der Biochemie eine zentrale Stelle ein wegen seiner enzymatischen Umwandlung zu 5-Hydroxytryptophan, β -Indolessigsäure und Kynurenin, drei Schlüsselprodukte des pflanzlichen und tierischen Stoffwechsels. Nachdem wir gezeigt hatten, dass die Tetrahydropterine als Katalysatormodell der enzymatischen Hydroxylierung von Phenylalanin verwendet werden können [4], lag es nahe zu prüfen, ob das Tryptophan ebenfalls mittels Tetrahydropterin (I) unter physiologi-

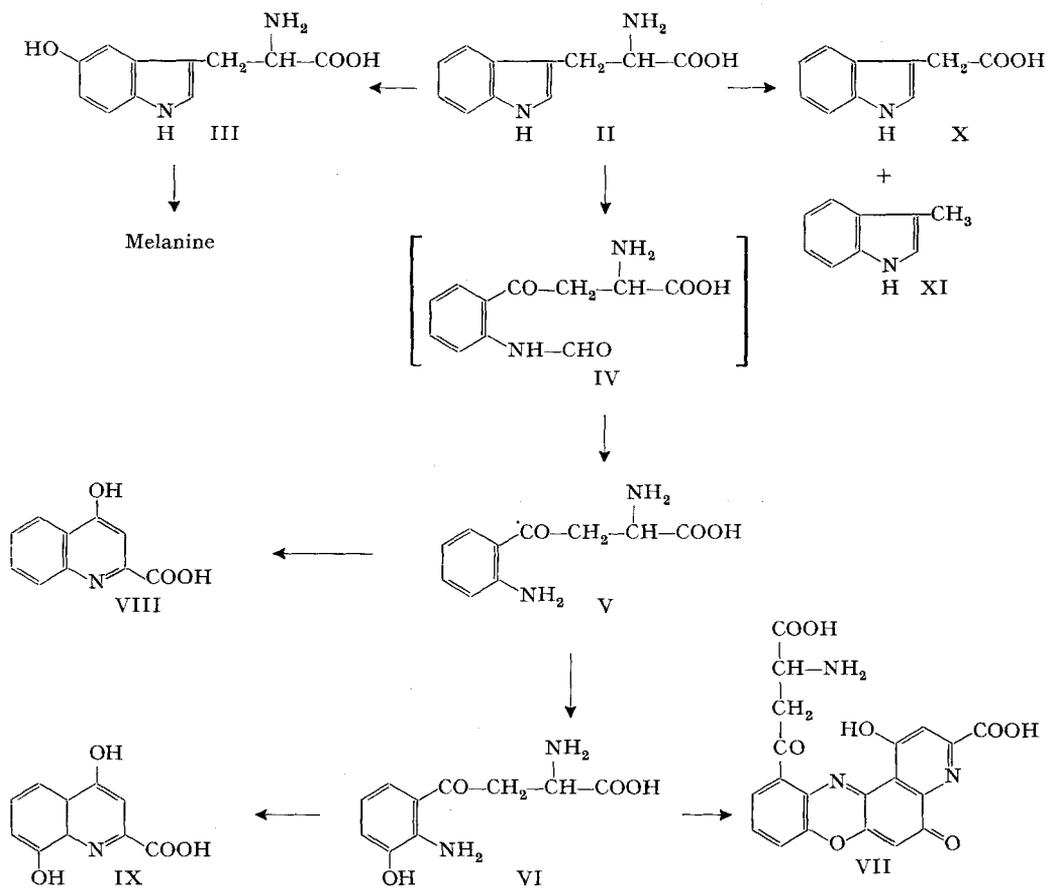


schen Bedingungen hydroxyliert werden kann. Eine solche Hydroxylierung findet tatsächlich statt, und die ersten Ergebnisse dieser Versuche wurden in der 21. Publi-

¹⁾ Auszug aus der Dissertation *Mattern* [2].

kation [3] mitgeteilt. Die Oxydation des Tryptophans erfolgte wie jene des Phenylalanins an der Luft in einer Phosphatpufferlösung, pH 7,1, mit Eisen(II)- und Pyrophosphat-Ionen als Liganden, NaBH₄ sowie mit entsprechenden Mengen von 3-[¹⁴C]-Tryptophan für die radioaktiven Messungen.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Tryptophan (II) nach folgendem Schema vom Sauerstoff angegriffen wird:

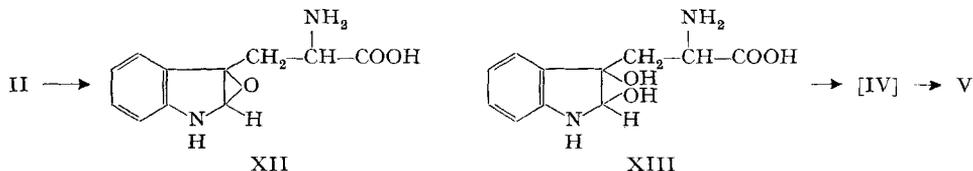


Alle diese Reaktionen, die übrigens denen des enzymatischen Tryptophanstoffwechsels völlig gleich sind, können mit Hilfe der OH-Radikal-Theorie, die wir für die Hydroxylierung des Phenylalanins entwickelt haben, erklärt werden. Es sei auch erwähnt, dass *Nofre et al.* [5] mittels des «modifizierten *Fenton's* Reagens» (Fe²⁺, EDTA, H₂O₂), wobei eindeutig OH-Radikale entstehen, das Tryptophan zu den gleichen Substanzen abgebaut haben.

Bei unseren Experimenten entsteht, analog zur Phenylalanin-Hydroxylierung, das 5-Hydroxytryptophan (III). Die C(5)-Stellung ist wegen des mesomeren Effektes der NH-Gruppe des Pyrrolringes begünstigt. Die C(7)-Stellung sollte theoretisch ebenfalls oxydiert werden, wir haben jedoch nie 7-Hydroxytryptophan nachweisen

können. Auffallend ist die geringe Ausbeute an 5-Hydroxytryptophan (0,037%) und die relativ grosse Ausbeute an Melaninen (0,27%). Man kann daraus schliessen, dass zwar die Bildung von 5-Hydroxytryptophan wegen der anderen konkurrierenden Reaktionswege beschränkt ist, dass aber die darauffolgende Oxydation zu Dihydrotryptophan und Kondensation zu Melaninen begünstigt ist.

Das Kynurenin (V) entsteht sehr wahrscheinlich ganz ähnlich wie bei dem enzymatischen Abbau des Tryptophans. Die Doppelbindung des Pyrrolringes von II wird epoxydiert zu XII, das durch Hydrolyse der Epoxygruppe das Diol XIII ergibt; letzteres wird unter Ringöffnung zum N-Formylkynurenin (IV) oxydiert, das wir jedoch nicht nachgewiesen haben. Das daraus durch Abspaltung der Formylgruppe



entstehende Kynurenin (V) wurde in Ausbeuten von 0,4% isoliert. Durch weitere Oxydation und Ringschluss des Kynurenins entsteht die Kynurensäure (VIII), die wir in Ausbeuten bis zu 0,1% bestimmten.

Eine Hydroxylierung in C(3)- und C(5)-Stellung des Kynurenins ist theoretisch möglich. Sicher konnten wir nur 3-Hydroxykynurenin (VI) zu 0,17% nachweisen. Daraus entstehen durch Oxydation und Kondensation Xanthurensäure (IX) und Xanthommatin (VII) in Ausbeuten von 0,05 bzw. 0,07%. Neben den bereits erwähnten oxydierten und hydroxylierten Substanzen treten noch einfachere Indolderivate und aliphatische α -Aminosäuren auf. Chromatographisch und anhand des α -Aminosäureanalysators konnten wir u. a. Spuren von Alanin, Serin und Glycin nachweisen (insgesamt knapp 0,1%). Diese drei α -Aminosäuren entstehen auch bei der Phenylalanin-Hydroxylierung und sehr wahrscheinlich nach demselben Mechanismus.

Bei der Reaktion mit Tryptophan werden auch Indol und 5-Hydroxyindol gebildet, die beide nur qualitativ nachgewiesen wurden, sowie β -Indol-essigsäure (X; 0,025%) und Skatol (XI; 0,014%). Dagegen konnten wir 3-Indolyl-propionsäure nicht nachweisen.

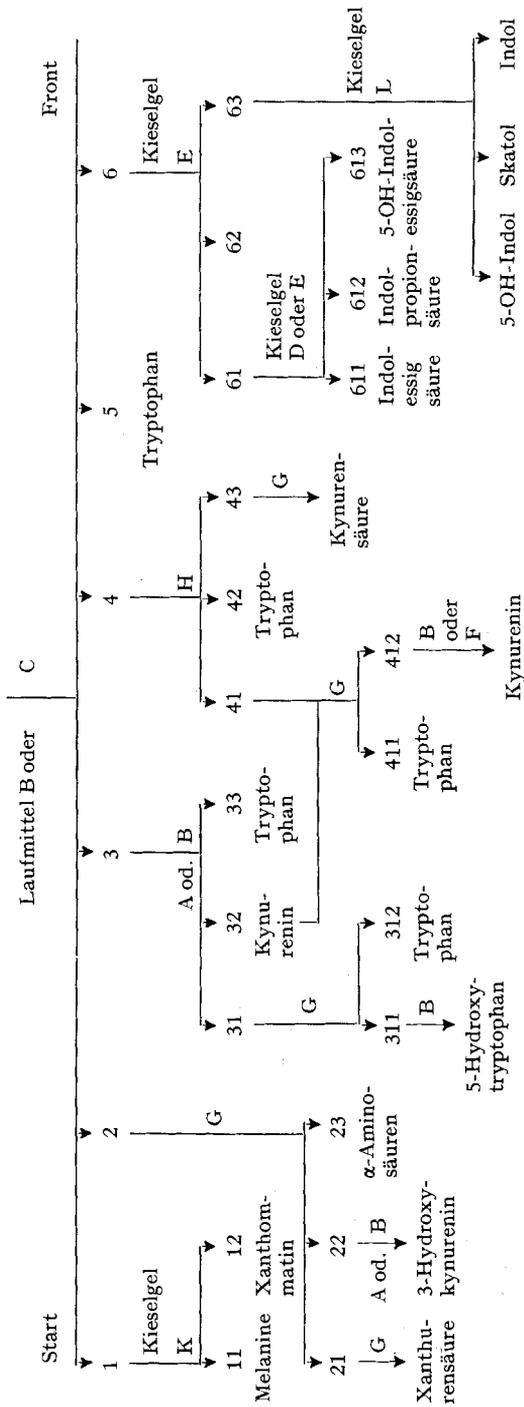
Wir danken Herrn *H. Frohofer*, Leiter unserer mikroanalytischen Abteilung, für die radioaktiven Messungen, Herrn Doz. Dr. *B. Linzen*, Zoologisches Institut der Universität München, für die Überlassung der Vergleichsubstanzen 3-Hydroxykynurenin und Xanthommatin sowie Herrn PD Dr. *R. Humbel*, Biochemisches Institut der Universität Zürich, für die Aufnahme der Spektren am α -Aminosäureanalysator *Bechman*, Typ 120 B.

Experimentelles. – *Ausführung der Untersuchungen:* 10 mg (50 μMol) mit 3- ^{14}C -Tryptophan (gesamte eingesetzte Aktivität 10^6 dpm) versetztes Tryptophan, 1 mg (2,5 μMol) $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 1 mg (2,9 μMol) Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) werden mit 3 mg (11 μMol) Tetrahydropterinsulfat (I) in 5 ml einer 0,025 M Phosphatpufferlösung, pH 7,1, $1/2$ Std. bei 35° an der Luft gerührt. Während der ersten 15 Min. werden je drei Portionen zu 5 mg NaBH_4 hinzugefügt. Die Lösung wird daraufhin abgedampft und der Rückstand (die gebildeten Hydroxylierungsprodukte) chromatographisch (s. Trennschema) getrennt; die einzelnen Produkte werden so lange gereinigt, bis ihre Radioaktivität nahezu konstant bleibt.

Zum Nachweis der einzelnen Zonen wird jeweils 1–1,5 cm der Dünnschichtplatten mit entsprechenden, unten erwähnten Sprühreagenzien besprüht und entwickelt. Ein Verlust von etwa

Trennschema

Tryptophan-Hydroxylierungsgemisch



10% tritt bei jeder Rechromatographie ein. Chromatographiert wird sowohl auf Kieselgel G (*Merck AG*, Darmstadt) als auch auf Cellulosepulver MN 300 (*Macherey, Nagel & Co*, Düren). Laufmittel (Zusammensetzung in Vol.-Teilen):

A	<i>n</i> -Butanol/CH ₃ COOH/H ₂ O	(20:5:1)	F	HCOOH/CH ₃ OH/H ₂ O	(1:15:24)
B	<i>n</i> -Butanol/CH ₃ COOH/H ₂ O	(4:1:1)	G	20-proz. KCl(H ₂ O)	
C	<i>n</i> -Propanol/konz. NH ₃ (H ₂ O)	(7:3)	H	20-proz. HCl/iso-Propanol	(1:4)
D	CHCl ₃ /CH ₃ OH/CH ₃ COOH	(15:4:1)	K	HCOOH/CH ₃ OH/36-proz.	(50:15:20:1)
E	Benzol/CH ₃ OH/5-proz.	(10:15:2)		HCl/H ₂ O	
	NH ₃ (H ₂ O)		L	Cyclohexan/CHCl ₃	(1:1)

Isolierung von 5-Hydroxytryptophan (III). Der nach der Hydroxylierung erhaltene Rückstand wird mit dem Gemisch C aufgenommen, mit 3 mg inaktivem 5-Hydroxytryptophan als Träger versetzt, auf vier Celluloseplatten aufgetragen und mit dem Gemisch C unter N₂-Atmosphäre chromatographiert. Die durch Ninhydrin, *Ehrlich*-Reagens oder UV.-Licht sichtbar gemachten Zonen 1, 2, 3, 4, 5, 6 werden von den Platten abgekratzt und am Tricarb Scintillation Counter (*Packard*, Modell 500 C) ausgezählt.

Die für das Auszählen mit CH₃COOH, CH₃OH (1:1) sowie mit Toluol und mit dem Scintillator «POPOP + PRO» (*Packard*) versetzte Lösung der Zone 3 wird aus dem Polyäthylen-Zähltröpfchen mit Methanol herausgespült und die Lösung samt der Cellulose eingedampft, danach erneut mit verd. Ammoniak/*n*-Propanol [*n*-Propanol/konz. NH₃/H₂O (7:3:10)] aufgenommen und 2 Min. auf dem Wasserbad unter N₂ gekocht, um alles 5-Hydroxytryptophan zu lösen. Anschliessend wird zentrifugiert und die Lösung unter Zusatz von 3 mg inaktivem 5-Hydroxytryptophan wieder chromatographiert, wobei dieses Mal Laufmittel A oder B verwendet wird. Bei der Chromatographie der Zone 31 (3. Chromatographie) wird Laufmittel G, beim vierten Chromatographieren (Zone 311) das Laufmittel B verwendet.

Nach der zweiten Chromatographie ist die Zerfallsanzahl von 13700 auf 1200 dpm herabgesunken, was darauf hindeutet, dass überschüssiges Tryptophan (Zone 33) zum grössten Teil mit diesem Verfahren entfernt werden konnte. Die Werte nach dem dritten Chromatographieren (330 dpm) zeigen dann keinen starken Abfall mehr (290 dpm).

Die leichte Zerfallsabnahme nach der 3. und der 4. Chromatographie erklärt sich daraus, dass das 5-Hydroxytryptophan schon bei Zimmertemperatur zu Melanin oxydiert wird, denn die Startzone (braun gefärbt) weist ebenfalls eine Aktivität auf, die nicht vom Tryptophan herrühren kann.

Schon nach der zweiten Chromatographie ist der Celluloseuntergrund, auf dem sich keine Verbindungen befinden, praktisch frei von jeglicher Aktivität (10–15 dpm).

Bestimmung des Kynurenins (V). Das eluierte Gemisch der Zone 4 wird mit 3 mg inaktivem Kynurenin versetzt, auf Celluloseplatten aufgetragen und mit dem Laufmittel H chromatographiert. Es entstehen drei Fraktionen: 41 (Kynurenin), 42 (Tryptophan) und 43 (Kynurensäure). Die Fraktion 41 wird mit dem Laufmittel G, in dem Kynurenin (Rf: 0,70) vor dem Tryptophan (Rf: 0,56) läuft, rechromatographiert. Bei der letzten Chromatographie der Zone 42 im Laufmittel B (oder F) wird das Kynurenin rein erhalten und ausgezählt.

Hydroxylierung von Kynurenin (V) mittels Tetrahydropterin (I) an der Luft. Wird anstelle von Tryptophan Kynurenin in das Reaktionsgemisch gegeben, welches neben Fe²⁺ und Pyrophosphat auch noch Tetrahydropterin enthält, so bilden sich 3-Hydroxykynurenin (VI), Xanthommatin (VII), Kynurensäure (VIII) und Xanthurensäure (IX), die im Laufmittel C gut voneinander getrennt werden können. Wir können daraus schliessen, dass Kynurenin selbst mit Tetrahydropterin unter physiologischen Bedingungen hydroxyliert werden kann. In Abwesenheit von Tetrahydropterin aber unter sonst gleichen Bedingungen wird Kynurenin praktisch nicht hydroxyliert.

Bestimmung der Kynurensäure (VIII). Die Kynurensäure wird in der Chromatographie der Fraktion 4 von Kynurenin und begleitendem Tryptophan getrennt und erscheint in der Zone 43. Sie wird nochmals gereinigt mit dem Laufmittel G und gesondert ausgezählt.

Bestimmung des 3-Hydroxykynurenins (VI). Im Gegensatz zu Kynurenin ist 3-Hydroxykynurenin im basischen pH-Bereich sehr empfindlich, wo es sich zu Xanthommatin (VII) und Xanthurensäure (IX) kondensiert. Entwickelt man das erste Chromatogramm mittels C, so bleibt in der Fraktion 1 sehr viel Xanthommatin am Start zurück. Deshalb verwendet man für die Bestimmung des 3-Hydroxykynurenins, des Xanthommatins und der Kynurensäure als erstes Lauf-

mittel B und nicht C. Die 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure enthaltende Zone 2 wird abgekratzt und mit G rechromatographiert, wobei 3 Zonen 21, 22, 23 getrennt werden. Die Zone 22 enthält das 3-Hydroxykynurenin, das mittels Laufmittel A oder B gereinigt wird, bevor es gesondert ausgezählt wird.

Bestimmung der Xanthurensäure (IX). Die Zone 21 wird mittels G erneut chromatographiert und schliesslich radiometrisch bestimmt.

Bestimmung des Xanthommatins (VII) und der Melanine. Beim ersten Chromatographieren des Reaktionsgemisches in B bleiben Xanthommatin und die Melanine am Start in der Zone 1. Diese wird abgekratzt, mit K eluiert, auf Cellulose oder Kieselgelplatten aufgetragen und im gleichen Lösungsmittelgemisch laufen gelassen. Melanin bleibt in der Zone 11 am Start zurück und kann mit 0,1N NaOH eluiert und im UV. bei 290 nm bestimmt werden. Xanthommatin dagegen läuft in diesem Laufmittel fast an der Front, wird abgekratzt und ausgezählt.

Trennung und Bestimmung der Indolderivate. Auf den Chromatogrammen, die in B oder C gelaufen sind, wird oberhalb der Tryptophanzone 5 eine weitere Zone 6 festgestellt, die weder im UV. sichtbar noch ninhydrinpositiv ist, die sich aber mit Ehrlich-Reagens deutlich färbt. Diese Zone wird abgekratzt, mit Methanol eluiert und erneut mit E chromatographiert, was die Zonen 61, 62 und 63 ergibt. Die Zone 61, besprüht mit Ehrlich-Reagens, färbt sich bläulich. Sie wird eluiert und nach Zugabe von je 3 mg inaktiver β -Indol-essigsäure (X), β -Indol-propionsäure und 5-Hydroxyindol-essigsäure im Laufmittel D oder E rechromatographiert. Von den drei entstandenen Zonen 611, 612, 613 ist nur die der Indol-essigsäure deutlich radioaktiv.

Wir haben die Produkte der Zone 62, die sich mit Ehrlich-Reagens intensiver rot färben, nicht identifizieren können.

Die obere Zone 63 hingegen wird erneut eluiert und mit L laufen gelassen, wobei Indol, 5-Hydroxyindol und Skatol mit Ehrlich-Reagens nachgewiesen werden. Von diesen drei Substanzen kann nur Skatol radioaktiv bestimmt werden.

Nachweis der α -Aminosäuren. Nach der Hydroxylierung wird das Gemisch abgedampft, der Rückstand mit 3 ml (1:3)-Gemisch von 20-proz. $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ aufgenommen, auf Celluloseplatten aufgetragen und mit Laufmittel G chromatographiert. Die aliphatischen α -Aminosäuren befinden sich im Bereich von Rf 0,70-0,90. Diese Zone wird abgekratzt und mehrmals mit 20-proz. $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ eluiert. Das eingeeengte Eluat wird auf Celluloseplatten aufgetragen und in Phenol/Wasser (9:1) laufen gelassen. Die Rf-Werte von Alanin (0,56), Glycin (0,40) und Serin (0,28) erlauben einen sofortigen Nachweis, der mit dem α -Aminosäureanalysator bestätigt wird.

Quantitative Ergebnisse. Die Radioaktivitäten der Tryptophan-Abbauprodukte aus 10 Hydroxylierungen sind in der Tabelle zusammengefasst.

Radioaktivitäten der Reaktionsprodukte

Melanin & Xanthommatin	Xanthommatin	Kynurenin	3-OH-Kyn.	Kynurensäure	Xanthurensäure	5-OH-Try.	Indol-essigsäure	Skatol
2530	1000	2835	1620	1060	561		250	
1540	906	3930	1980	1058	561	470	240	160
3080	360	3930	1800	1059	488	460	200	150
3520	525	3445	1900	1062	488	460	365	150
4290	880	3200		1062		480		
2440		3800				400		
3550		3800				320		
2750						325		
2600						330		
2930						390		
Mittelwert:								
2930	734	3563	1825	1060	525	410	264	153
Ausbeute in %:								
0,27	0,07	0,4	0,17	0,1	0,05	0,037	0,025	0,014

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 30. Mitteilung: *M. Viscontini & H. Leidner*, *Helv.* **53**, 789 (1970)
 [2] Dissertation *G. Mattern*, Naturw. Fakultät, Universität Zürich 1969.
 [3] *M. Viscontini & G. Mattern*, *Helv.* **50**, 1664 (1967).
 [4] *M. Viscontini & G. Mattern*, *Helv.* **53**, 372, 377 (1970).
 [5] *C. Nofre, J. P. Charrier & A. Cier*, *Bull. Soc. Chim. biol.* **45**, 913 (1963).

96. ESR. Spectra of the Radical Ions of Indeno[1,2,3-*cd*]fluorantheneby **Ch. Elschenbroich** and **F. Gerson**

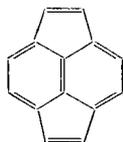
Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel

(2. IV. 70)

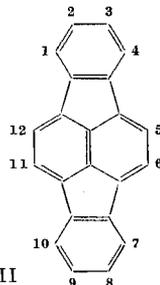
Summary. The ESR. spectra of the radical anion and the radical cation of indeno[1,2,3-*cd*]-fluoranthene have been recorded. Their hyperfine structures are consistent with those expected on the basis of simple MO models.

In the last few years, there has been a great deal of interest in the radical ions of nonalternant hydrocarbons [1] [2] [3]. The ESR. spectra of such ions were successfully used as an experimental test for the MO prediction that the radical anion and the radical cation of the same nonalternant compound should in general have different spin populations.

This short communication presents the ESR. results for indeno[1,2,3-*cd*]fluoranthene (II), first synthesized by *Stubbs & Tucker* [4]. The compound II is a dibenzo derivative of a nonalternant hydrocarbon, pyracylene (I), which has not yet been prepared [5].



I



II

The radical anion II^{\ominus} can be readily produced by conventional methods such as reaction with an alkali metal in 1,2-dimethoxyethane or electrolytic reduction in *N,N*-dimethylformamide with tetraalkylammonium perchlorate as supporting salt. Attempts to generate the radical cation II^{\oplus} by dissolving the neutral hydrocarbon II in conc. sulfuric acid failed, since no ESR. signal could be detected. Use of unpurified antimony trichloride as a solvent at $+80^{\circ}\text{C}$ (with the pentachloride impurity as a presumable oxidizing agent) [6] resulted in a broad absorption which did not show any indication of hyperfine structure. A similar unresolved signal, but only of 3 gauss width, was observed on the oxidation of II by SbCl_5 in methylene chloride at -70°C [2]. This signal arises from a paramagnetic material which is insoluble at low temperature. On warming the solution, the unresolved signal was gradually replaced by a multiline spectrum; however, at the same time, the overall intensity decreased, owing to radical decay (half life 10 min. at room temperature).