

Zur Chemie des Porphobilinogens

Darstellung von Aminomethylpyrrolylmethanen aus Porphobilinogen

Chemistry of Porphobilinogen

Preparation of Aminomethylpyrrolylmethanes from Porphobilinogen

Jochen Bausch, Albrecht Eberle und Gerhard Müller

Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung, Universität Stuttgart

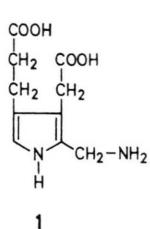
Herrn Prof. Dr. H. Bredereck zum 70. Geburtstag gewidmet

(Z. Naturforsch. **29 c**, 479–487 [1974]; eingegangen am 14. März/25. Juni 1974)

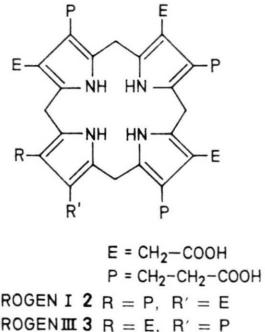
Aminomethylpyrrolylmethane

New methods for the synthesis of the aminomethyl dipyrrolylmethane and the aminomethyl tripyrane, which are resulting from formal head to tail condensation of porphobilinogen are described. Porphobilinogen was used as base material in these procedures. The aminomethyl group of porphobilinogen reacts as an alkylating agent with several amines as well as with porphobilinogen-lactam. The condensation of porphobilinogen with its lactam gave the dipyrrolylmethane-lactam, which afforded after hydrolysis the desired aminomethyl dipyrrolylmethane. The condensation of the latter with porphobilinogen-lactam gave the lactam of the aminomethyl tripyrane, which was then hydrolysed to the free aminomethyl tripyrane.

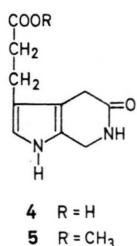
Polypyrrolylmethane sind wertvolle Zwischenprodukte sowohl für biochemische Studien zur Biogenese der natürlichen Tetrapyrrole als auch für deren Synthese. Bei unseren Untersuchungen zur Biosynthese natürlicher Tetrapyrrole haben wir uns



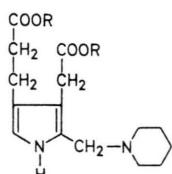
1



UROGEN I 2 R = P, R' = E
UROGEN III 3 R = E, R' = P



4 R = H
5 R = CH₃



6 R = H
7 R = CH₃

Sonderdruckanforderungen an Dr. Gerhard Müller, Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart, D-7000 Stuttgart 80, Pfaffenwaldring 55.

Abkürzung: PBG: Porphobilinogen.

unter anderem auch mit der Gewinnung von Aminomethylpyrrolylmethanen von der Art, wie sie durch stufenweise Kondensation von Porphobilinogen (PBG) **1** entstehen, beschäftigt. Untersuchungen über deren Verwertbarkeit zur Porphyrinring-Bildung sollten es ermöglichen, einen näheren Einblick in den Mechanismus der enzymchemischen Bildung von Uroporphyrinogen III **3**, dem Grundkörper der natürlichen Tetrapyrrole, zu gewinnen. Zum Mechanismus der enzymatischen Isomerisierung wurden mehr als 20 Hypothesen diskutiert¹, von denen einige durch experimentelle Befunde bereits widerlegt sind, andere bedürfen noch der experimentellen Überprüfung. Erst in jüngster Zeit wurden nun auch Untersuchungen über die Verwertung von Aminomethylpyrrolylmethanen bei der enzymchemischen Uroporphyrinogen I/III-Bildung von Frydman *et al.*^{1–4} beschrieben, aus denen geschlossen wird, daß die Art der Verknüpfung der ersten beiden PBG-Einheiten der entscheidende Schritt bei der Isomerisierung zur Uroporphyrinogen III-Bildung ist.

Bei unseren Versuchen zur Gewinnung von Aminomethylpyrrolylmethanen, bei denen wir sowohl enzymchemische als auch chemische Methoden auf ihre Brauchbarkeit überprüft haben, verwendeten wir als Ausgangsmaterial PBG, das aus δ -Aminolävulinsäure mittels Zellsuspensionen von *P. shermanii* leicht zugänglich ist⁵. Bogorad *et al.* ist es gelungen, durch Hemmung der Uroporphyrin-

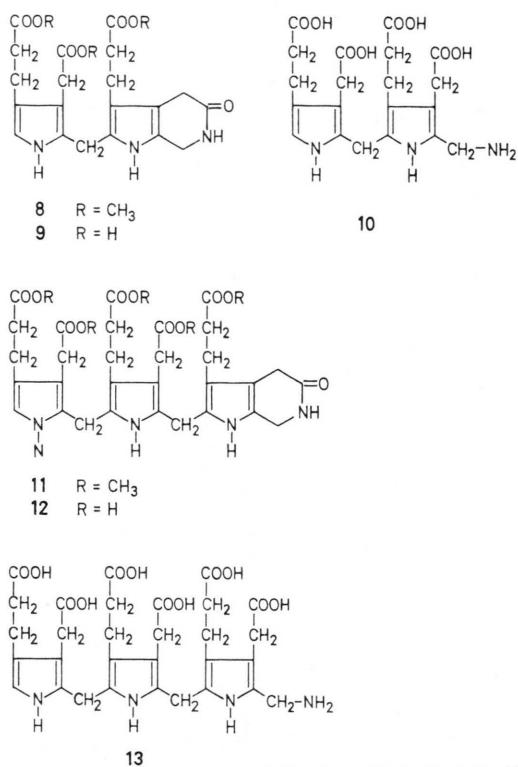


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.



nogen I-Synthetase mittels Hydroxylamin oder Ammonsalzen ein Aminomethyl-dipyrrolylmethan bzw. -tetrapyrrolylmethan anzureichern^{6, 7}. Bei ähnlichen von uns durchgeführten Versuchen zum Abfangen von Zwischenprodukten bei der Uroporphyrinogen-Bildung mittels angereicherten Enzympräparationen aus *P. shermanii* sowie mit Zellsuspensionen von *P. shermanii*, bei denen Hemmstoffe der Uroporphyrinogen-Bildung zugesetzt wurden, war es uns nicht möglich, freie Aminomethylpyrrolylmethane nachzuweisen. Wir versuchten daher, diese Verbindungen auf chemischem Wege zu synthetisieren.

PBG ist sehr reaktionsfähig und über seinen Aminomethylkohlenstoff zu mannigfachen Reaktionen befähigt. In saurer, neutraler und alkalischer Lösung entstehen durch Selbstkondensation Uroporphyrinogene. Ferner konnten wir bei früheren Versuchen zeigen, daß PBG in alkalischem Medium mit primären und sekundären Aminen, Aminoalkoholen und bestimmten Aminosäuren unter Amin austausch reagiert sowie zur C-Alkylierung befähigt ist⁸. Mauzerall⁹ nimmt auf Grund von Beobachtungen bei der chemischen Uroporphyrinogen-Bildung in neutralen und alkalischen Lösungen aus PBG an,

dass der erste Schritt auch der langsamste in der Reaktionsfolge ist. Die Reaktion des Aminomethyl-dipyrrolylmethans bzw. des -tripyrrrolylmethans mit dem PBG ist dann bevorzugt; beim linearen Tetramer ist die Cyklisierung zum spannungsfreien Uroporphyrinogen begünstigt. Für eine gezielte Darstellung von Aminomethylpyrrolylmethanen durch stufenweise Kondensation von PBG war es daher notwendig, die reaktive Aminomethylgruppe am C-2 des PBG zu blockieren. Hierzu bot sich das Laktam des Porphobilinogens 4 an, dessen Laktamring sich unter milden Bedingungen wieder hydrolysieren lässt¹, und das aus PBG sehr gut herzustellen ist¹⁰.

Auf Grund dieser Befunde haben wir folgende Möglichkeiten zur Darstellung von Aminomethylpolypyrrrolylmethanen in Betracht gezogen sowie einer näheren Überprüfung unterworfen. Nach der Darstellung tertiärer Mannichbasen aus PBG und sekundären Aminen versuchten wir, deren Ester mit Porphobilinogen-laktamester bzw. mit den Estern der Folgeprodukte zu verknüpfen. Ferner wurden Versuche zur direkten Alkylierung des Porphobilinogen-laktams mittels PBG als Alkylierungsmittel durchgeführt. Da sowohl Uroporphyrinogene^{9, 11} als auch Dipyrrolylmethane^{9, 12} in saurem Medium isomerisieren, mußten für eine gezielte Darstellung der Aminomethylpyrrolylmethane durch stufenweise Kondensation des PBG die Verknüpfungen in neutralem oder alkalischem Medium durchgeführt werden. Voraussetzung für eine Verknüpfung von PBG mit seinem Laktam war, daß die Reaktivität der C-5-Position im PBG in seinem Laktam bzw. Laktamester erhalten bleibt oder nur wenig herabgesetzt ist.

Aminomethylpolypyrrrolylmethane von der Art, wie man sie zum Studium der enzymchemischen Uroporphyrinogen I/III-Bildung benötigt, wurden inzwischen auf anderem Wege von mehreren Arbeitsgruppen dargestellt^{1, 13–15}.

Tertiäre Amine aus PBG durch Aminaustausch

PBG ist über seinen Aminomethyl-Kohlenstoff zum Amin-Austausch befähigt⁸. Als Konkurrenz-Reaktion erfolgt bei diesen Umsetzungen immer die Uroporphyrinogen-Bildung. Zur Darstellung tertiärer Mannich-Basen wurden Umsetzungen mit Dimethyl- und Diäthylamin, Pyrrolidin, Piperidin und Morpholin durchgeführt. Die Umsetzungen

werden am besten während 24 Stunden bei 70 °C in wäßriger Lösung ausgeführt. Wegen der Uroporphyrinogen-Bildung ist es notwendig, die Aminkomponente in großem Überschuß zu verwenden. Der Gesamtumsatz des PBG mit den Aminen beträgt jeweils ca. 60%. Die Abtrennung von nicht umgesetztem PBG, gleichzeitig entstandenem Uroporphyrin sowie geringer Mengen anderer Nebenprodukte gelingt mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie an Sephadex CM C-25. Es zeigte sich jedoch, daß die meisten Produkte nach der Anreicherung über die Hg-Salze und deren Zersetzung mittels H₂S sehr schlecht kristallisieren und zu leicht oxidierbaren Porphyringen und anderen Nebenprodukten kondensieren, so daß in den meisten Fällen die Gesamtausbeute stark herabgesetzt wird. Für unsere weiteren Untersuchungen erwies sich das Piperidyl-PBG **6** als am günstigsten, da es sehr leicht kristallisiert (Ausbeute: 55%). Eine Kristallisation gelang noch beim Diäthylamin- sowie in geringerem Maße auch bei Dimethylamin-Derivat. Die übrigen Produkte konnten nach der HgS-Fällung lediglich durch Gefriertrocknung in weniger reiner Form erhalten werden. In ihrem chemischen Verhalten zeigen die von uns dargestellten tertiären Amine des PBG weitgehende Ähnlichkeit zum PBG. Wäßrige Lösungen, besonders saure, sind wenig stabil, und es entstehen neben anderen Kondensationsprodukten die Uroporphyrinogene. Bei der Elektrophorese wandern sie sowohl im sauren (pH 2,7 und 3,9) als auch im alkalischen Bereich stets ein wenig langsamer als PBG. Eine Ausnahme macht das Morpholin-Derivat, das bei pH 9,2 fast doppelt so schnell wie PBG wandert.

Versuche zur Verknüpfung von Piperidyl-Porphobilinogen-dimethylester **7 mit Porphobilinogen-Laktam-methylester **5** und mit dem Dipyrrolylmethan-Laktam-trimethylester **8****

Die Veresterungen der Reaktionspartner erfolgten mit Diazomethan durch geringfügige Veränderungen der von Cookson und Rimington beschriebenen Methode für das PBG-Laktam¹⁰.

Dipyrrolylmethan-Laktam-trimethylester **8:** Die Eliminierung des Piperidylrestes wurde entweder mit Methyljodid in methanolischer Lösung in Gegenwart von NaHCO₃ oder mittels Acetylendicarbonsäuredimethylester in tertiar Butanol/Tetrahydrofuran durchgeführt. Der PBG-Laktamester **5**

zeigt relativ schlechte Löslichkeitseigenschaften und ist nur in Alkoholen einigermaßen gut löslich, die aber mit Ausnahme von tertiären Carbinolen mit Acetylendicarbonsäuredimethylester unter Enolätherbildung reagieren¹⁶. Die Umsetzungen, die zur Vermeidung der Pyromethen-Bildung unter Ausschluß von Sauerstoff durchgeführt wurden, ließen sich mittels der Dünnschichtchromatographie laufend verfolgen. Hierbei erwies sich Methyljodid für die Eliminierung des Piperidyl-Restes als am günstigsten. Der Ester des Piperidyl-PBG ist unter diesen Bedingungen äußerst reaktionsfähig, beim Laktamester handelt es sich allerdings um einen sehr trüben Reaktionspartner. Um die Bildung von Kondensationsprodukten aus Piperidyl-PBG-ester **7** sowie die Entstehung der Uroporphyrinogen-octamethylester gering zu halten, verwendeten wir den Laktamester **5** im Überschuß, und der Piperidyl-PBG-ester **7** wurde aus dem gleichen Grund in kleinen Portionen zugesetzt. Trotzdem wurden aber neben dem gewünschten Dipyrrolylmethan-laktam-trimethylester **8** größere Mengen verschiedener Kondensationsprodukte gebildet; die Ausbeute an **8** betrug bei der optimalen Reaktionstemperatur von 30 °C etwa 50%. Bei Verwendung von Acetylendicarbonsäuredimethylester war es uns nicht möglich, eine vollständige Umsetzung des Piperidyl-PBG-esters **7** zu erreichen; die Ausbeute an **8** betrug hier nur etwa 20%, wobei im Verhältnis dieselben Nebenprodukte entstehen, wie bei den Umsetzungen mit Methyljodid. Die Abtrennung der Nebenprodukte ist jeweils sehr schwierig und aufwendig, gelingt aber durch präparative Dünnschicht- oder durch Säulenchromatographie. Da die Ausbeuten der isolierten Dipyrrolylmethane nie mehr als 10% betrugen, kommt diesen beiden Verfahren keine präparative Bedeutung zu. Sie waren aber von Bedeutung bei der Identifizierung des Dipyrrolylmethans **9**, das durch direkte Verknüpfung von PBG mit seinem Laktam dargestellt wurde.

Tripyrran-Laktam-pentamethylester **11:** Piperidyl-PBG-ester **7** läßt sich in Gegenwart von Methyljodid mit **8** zum Tripyrran **11** kondensieren. Hierbei entstehen wiederum größere Mengen von Nebenprodukten, die sich nur durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel abtrennen lassen. Auch dieses Verfahren war daher nur von Interesse zur Identifizierung des Tripyrrans **12**, das durch Kondensation des Aminomethyldipyrrolylmethans **10** mit PBG-Laktam entstand.

Aminomethyldipyrrolylmethan-Laktam **9** aus PBG **1** und PBG-Laktam **4**

Die Alkylierung von PBG-Laktam mittels PBG, dessen Aminomethylkohlenstoff als Alkylierungsmittel wirkt, erwies sich zur Darstellung des gewünschten Dipyrrolylmethans als recht günstig. Die Kondensation erfolgt am besten in wässriger Lösung unter strengem Ausschluß von Sauerstoff während mehrerer Stunden bei 80 °C. Um die Selbstkondensation des PBG gering zu halten, verwendeten wir einen Überschuß von PBG-Laktam. Unter diesen Bedingungen entstehen neben Uroporphyrinogen nur geringe Mengen anderer Nebenprodukte. Die Abtrennung des Dipyrrolylmethan-laktams **9** von Nebenprodukten und nicht umgesetztem PBG-Laktam gelingt recht gut durch Ionenaustauscherchromatographie an Sephadex DEAE A-25 bei pH 7,2. Hierbei läßt sich nicht umgesetztes PBG-Laktam nach der Elution von der Säule durch Ansäuern ausfällen und somit annähernd quantitativ zurückgewinnen. Das Laktam des Aminomethylpyrrolylmethans wird durch stufenweise Erhöhung der Pufferkonzentration von der Säule eluiert und kann anschließend durch Ansäuern ausgefällt oder aber über sein Hg-Salz, was einen zusätzlichen Reinigungsschritt bedeutet, isoliert werden. Die Veresterung von **9** mit Diazomethan, die auch Voraussetzung für massenspektrometrische Untersuchungen war, ergab das mit **8** identische Veresterungsprodukt.

Aminomethyldipyrrolylmethan **10:** Durch Hydrolyse des Laktamrings von **9** bzw. des Laktamrings und der Estergruppen von **8**, die unter milden alkalischen Bedingungen nach einer von Frydman *et al.*¹ beschriebenen Methode durchgeführt werden, erhält man das Aminomethyldipyrrolylmethan **10**.

In sauren und neutralen Lösungen erwies sich das Aminomethyldipyrrolylmethan **10** als äußerst instabil. Bei der Inkubation von **10** im Sörensen-Puffer pH 7,6 bei 37 °C entstehen Uroporphyrinogene, die nach der Oxidation und der Isomeranalyse über die Coproporphyrine als die Isomeren I und III (oder IV) identifiziert wurden¹⁷. Da sich die Isomeren III und IV zur Zeit noch nicht unterscheiden lassen, ist es nicht möglich, exakte Aussagen über die tatsächliche Zusammensetzung des Isomerengemisches zu machen. Diese Befunde wurden auch von Frydman *et al.* festgestellt und be-

reits ausführlich diskutiert². Bei der Elektrophorese bei pH 9,2 verhält sich **9** wie das entsprechende Aminomethyldipyrrolylmethan **10**. Beide wandern nur wenig langsamer als Uroporphyrin, aber wenigstens doppelt so schnell wie PBG. Weitgehende Ähnlichkeit zeigen auch die UV-Absorptionsspektren der beiden Dipyrrolylmethane nach der Umsetzung mit Ehrlich's Reagens. Bei beiden verschwindet das Maximum bei 562 nm innerhalb von 20 min fast vollständig, während gleichzeitig bei 489 nm (**9**) bzw. 484 nm (**10**) ein neues Absorptionsmaximum entsteht; hierbei verfärbt sich die Lösung von rot nach gelb. Ein ähnliches Verhalten wurde schon von Bogorad *et al.* bei enzymatisch gewonnenem Aminomethyldipyrrolylmethan festgestellt⁶.

Aminomethyltripyrran-Laktam **12** aus Aminomethyldipyrrolylmethan **10** und PBG-Laktam **4**

In Anlehnung an die oben beschriebene Methode zur Darstellung von **9** versuchten wir, das Tripyrran, das durch stufenweise Kondensation von PBG entsteht, entweder durch Verknüpfung von PBG mit **9** oder von **10** mit dem PBG-Laktam zu synthetisieren. Bei diesen Versuchen, die unter den gleichen Bedingungen wie bei der Darstellung von **9** durchgeführt wurden und bei denen die Laktamkomponente jeweils im Überschuß verwendet wurde, zeigte es sich, daß beide Wege zum Tripyrran führen. Die Umsetzung von **10**, das äußerst reaktionsfähig ist, mit PBG-Laktam erwies sich aber als günstiger, da hierbei weniger Nebenprodukte entstehen. Neben dem Tripyrran entstehen vorwiegend Uroporphyrinogene durch Selbstkondensation des Aminomethyl-dipyrrolylmethans. Die Abtrennung der Nebenprodukte zur Isolierung des Tripyrrans gelingt am besten durch Ionenaustauscherchromatographie an Whatman DE-52, pH 8,2. Voraussetzung zur Isolierung eines reinen Produktes ist, daß sowohl die Umsetzung als auch die Austauscherchromatographie unter Ausschluß von Sauerstoff durchgeführt werden. Nach der Elution von der Austauschersäule läßt sich sowohl das Tripyrran-Laktam **12** als auch nicht umgesetztes PBG-Laktam, das auch bei diesem Verfahren annähernd quantitativ zurückgewonnen wird, durch Ansäuern ausfällen. Nach der Veresterung von **12** mit Diazomethan erwies sich das Veresterungsprodukt chromatographisch als identisch mit **11**, das bei der Umsetzung von Piperidyl-PBG-

ester mit **8** entstanden war. Nach der Hydrolyse des Laktamrings von **12** läßt sich das wenig stabile Aminomethyltripyrran **13** durch Ansäuern ausfällen. UV-spektrophotometrische Untersuchungen zeigten, daß beim Stehenlassen wäßriger Lösungen von **13** Uroporphyrinogene entstehen. Wir haben dazu keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Frydman et al.⁴ nehmen aber an, daß durch Dimerisierung zunächst Hexapyrrolylmethane entstehen, aus denen dann die thermodynamisch begünstigten cyklischen Tetrapyrrole gebildet werden. Die UV-Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte von **12** und **13** mit Ehrlich's Reagens zeigen ein ähnliches Verhalten wie die der analogen Dimeren. Während die Hauptmaxima bei 563 nm (**12**) und bei 564 nm (**13**) fast vollständig verschwinden, treten gleichzeitig neue Maxima bei 488 nm (**12**) bzw. bei 492 nm (**13**) auf. Bei der Elektrophorese bei pH 9,2 wandern die beiden Tripyrane etwas langsamer als die Uroporphyrine und nur wenig schneller als die Dipyrrolylmethane.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen ergeben, daß sowohl beim Dipyrrolylmethan-Laktam **9**, als auch beim Tripyran-Laktam **12** bei der Veresterung mit Diazomethan geringe Mengen eines höher methylierten Produktes auftreten. Zur Klärung der Frage, ob es sich hierbei um ein N- oder das C-methylierte Produkt handelt, bedarf es weiterer Untersuchungen. Methylierungen am N-1 von substituierten Monopyrrolen mittels Diazomethan wurden erst kürzlich beobachtet und auch beschrieben^{18, 19}.

Durch Kondensation der Dipyrrolylmethane **10** und **9** erhält man das entsprechende Bilan. Nach weiteren Studien zu dessen Reindarstellung und Identifizierung werden wir hierüber berichten.

Beschreibung der Versuche

Dünnschichtchromatogramme wurden auf Kieselgel DC-Plastikfolien der Firma Merck mittels folgender Fließmittel durchgeführt: A Isopropanol/33-prozentiges Ammoniak 7:3; B Isopropanol/33-prozentiges Ammoniak 7:5; C Äthanol/33-prozentiges Ammoniak 7:5; D 5% Methanol in Chloroform. In den stark ammoniakhaltigen Fließmitteln A, B und C sind die R_F -Werte sehr schwer reproduzierbar und besitzen wenig Aussagewert. Zur Identifizierung der in diesen Fließmitteln chromatographierten Verbindungen verwenden wir daher die relativen RPGB-Werte (R_F -Wert von PBG wird will-

kürlich gleich 1 gesetzt). Im Fließmittel D bleibt PBG am Start sitzen, so daß in diesem Fall die R_F -Werte angegeben werden. Zum Besprühen der Elektropherogramme und Chromatogramme benützten wir eine 2-prozentige Lösung von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 6 N HCl (Ehrlich-Reagens). Bei der Aufnahme von Absorptionsspektren haben wir das von Mauzerall beschriebene modifizierte Ehrlich-Reagens²⁰ verwendet. Elektrophoresen wurden in 0,5 M Essigsäure (pH 2,7) oder in 0,05 M Veronal-Na-Puffer (pH 9,2) durchgeführt. Folgende Spektrometer wurden verwendet: Varian HA 100 und Varian A 60 (NMR, 5% NaOD in D_2O , int. Standard 2,2,3,3-Tetradeutero-3-(trimethylsilyl)-propiionsäure Na-salz); Zeiss RPQ 20 C (Absorptionspektren); Varian MAT 711 (Massenspektren, 200 °C und 70 eV). Ausnahmen sind im Text angegeben.

4-(2-Carboxyäthyl)-3-carboxymethyl-2-piperidino-methylpyrrol **6**

80 mg (0,328 mmol) PBG werden in 10 ml H_2O , dem 2 ml (20,3 mmol) Piperidin zugefügt wurden, gelöst und 24 Stunden bei 70 °C im Sandbad erhitzt. Eine Reaktionskontrolle gelingt mittels DC. Anschließend wird im Vakuum auf 1 ml eingeengt und der Ansatz auf eine Säule (15 cm Länge, 4 cm Durchmesser) aus Sephadex CM C-25 gegeben, deren H⁺-Form mit Natriumacetatpuffer (pH 4,5 0,2 M an CH₃COOH) so lange gewaschen worden war, bis das Eluat pH 4,5 hatte. Dann eluiert man mit diesem Puffer und prüft das Eluat laufend mit Ehrlich-Reagens auf die für Pyrrole typische Farreaktion. Nach geringen Mengen Uroporphyrin verlassen etwa 50 ml Lösung einer Verbindung, die mit Ehrlich-Reagens eine blauviolette Färbung ergibt und die infolge geringer Stabilität nicht isoliert und identifiziert wurde (evtl. 4-(2-Carboxyäthyl)-3-carboxymethyl-2-hydroxymethylpyrrol), die Säule. Weiteren 20 ml mit sehr schwacher Ehrlich-Reaktion folgen ca. 100 ml einer Lösung von Piperidyl-PBG, das eine rotviolette Ehrlich-Reaktion zeigt. Nach 30 ml, die keine Ehrlich-Reaktion zeigen, folgt nicht umgesetztes PBG. Der pH des Eluats, das Piperidyl-PBG enthält, wird mit verdünnter HCl auf 4 gestellt und das Piperidyl-PBG mit 20-prozentiger Quecksilber(II)-acetat-Lösung gefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, dreimal mit verdünnter Essigsäure (pH 4) gewaschen und mit H₂S zersetzt¹⁰. Dann zentrifugiert man vom HgS ab und wäscht dieses zweimal mit wenig Wasser. Die vereinigten Überstände werden mit 0,5 N Ammoniak auf pH 4 gestellt, wobei sich das Piperidyl-PBG kristallin abscheidet. Nach mehreren Stunden im Kühlschrank saugt man die Kristalle ab, wäscht mit wenig eis-

kalter verdünnter Essigsäure (pH 4), anschließend mit wenig eiskaltem Aceton und trocknet im Vakuum bei 60 °C über P₂O₅. Ausbeute 51 mg (52,5% der Theorie). Falls eine Umkristallisation notwendig ist, wird in möglichst wenig 0,5 N Ammoniak gelöst, eventuell filtriert, der pH mit Eisessig vorsichtig auf 4 eingestellt und wie oben weitergearbeitet.

Eine weitere Reinigungsmöglichkeit stellt die Adsorption an Amberlite XAD-2 (100–200 µm) dar. Hierzu werden 10 mg des Rohprodukts in möglichst wenig 0,5 N Ammoniak gelöst und auf eine Säule (10 cm Länge, 2 cm Durchmesser) aus XAD-2, das zuerst mit Aceton und dann mit Wasser gewaschen worden war, gegeben. Nach dem Auftragen wird mit H₂O nachgewaschen und das Piperidyl-PBG mit Aceton/H₂O (1:1) eluiert.

Schmelzpunkt: 203 °C u. Zers. DC: R_{PBG} 3,0 (A). NMR (δ ppm, 60 MHz): 6,63 (1H, s, =CH=); 3,45 (2H, s, –CH₂–N<); 3,36 (2H, s, –CH₂COOH); 2,47 (8H, m, –CH₂–CH₂–COOH, –CH₂–N–CH₂–); 1,45 (6H, s, –(CH₂)₃–).

Analyse: C₁₅H₂₂N₂O₄ (Mol.-Gew. 294)

Gef.: C 61,33 H 7,42 N 9,60,
Ber.: C 61,22 H 7,48 N 9,52.

Zur Darstellung des Dimethylesters **7** werden 40 mg **6** mit einem Überschuß an Diazomethan (aus 6 g Nitrosomethylharnstoff) in 80 ml trockenem Äther und 10 ml abs. Methanol zwei Tage bei 4–5 °C unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man **7** als wenig beständiges Öl, das sich aber in methanolischer Lösung über einen längeren Zeitraum im Kühlschrank aufbewahren lässt und für die weiteren Umsetzungen verwendet wird.

Ausbeute: 39 mg (89% d. Th.). DC: R_F 0,088 (D).

Durch mehrstündigtes Stehenlassen von **7** in einer wäßrig/methanolischen 1 M Piperidinlösung lässt sich das Ausgangsprodukt **6** zurückgewinnen.

4-(2-Carboxyäthyl)-3-carboxymethyl-2-diäthylaminomethylpyrrol

Ansatz, Reaktionszeit, Reaktionstemperatur und Aufarbeitung analog zum Piperidyl-PBG. Eine Reinigung an XAD-2 gelingt nicht.

Ausbeute: 9 mg kristallines Produkt (9,7% d. Th.). Schmelzpunkt: 177 °C u. Zers. DC: R_{PBG} 3,27 (A).

Analyse: C₁₄H₂₁N₂O₄ (Mol.-Gew. 281)

Gef.: C 59,62 H 7,49 N 10,18,
Ber.: C 59,78 H 7,47 N 9,96.

4-(2-Carboxyäthyl)-3-carboxymethyl-2-dimethylaminomethylpyrrol

80 mg (0,328 mmol) PBG werden in 20 ml (15,6 mmol) einer 3,5-prozentigen wäßrigen Dimethylaminolösung gelöst und 18 Stunden bei 70 °C im Sandbad erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgt wie beim Piperidyl-PBG. Eine Reinigung gelingt durch Adsorption an Amberlite XAD-9 (300–1000 µm). Sie erfolgt analog der Reinigung des Piperidyl-PBG an XAD-2.

Ausbeute: 4 mg kristallines Produkt (4,8% d. Th.). DC: R_{PBG} 2,22 (A).

Analyse: C₁₂H₁₈N₂O₄ (Mol.-Gew. 254)

Gef.: C 56,25 H 7,02 N 10,46,
Ber.: C 56,69 H 7,08 N 11,02.

4-(2-Carboxyäthyl)-3-carboxymethyl-2-(N-morpholino)-methylpyrrol

Ansatz, Reaktionszeit, Reaktionstemperatur und Aufarbeitung wie beim Piperidyl-PBG. Durch Gefriertrocknung des HgS-Überstands erhält man das Produkt als ein amorphes, rötliches Pulver.

Ausbeute: 39 mg (40% d. Th.). DC: R_{PBG} 2,83 (A). NMR (δ ppm, 60 MHz): 6,67 (1H, s, =CH=); 4,10 (2H, s, –CH₂–); 3,80 (4H, m, –CH₂–O–CH₂–); 3,33 (2H, s, –CH₂–COOH); 3,10 (4H, m, –CH₂–N–CH₂–); 2,45 (4H, m, –CH₂–CH₂–COOH).

Analyse: C₁₄H₂₀N₂O₅ (Mol.-Gew. 296)

Gef.: C 56,58 H 6,68 N 9,26,
Ber.: C 56,75 H 6,75 N 9,45.

2-[4-(2-Carboxyäthyl)-3-carboxymethylpyrrol-2-ylmethyl]-4.5.6.7-tetrahydro-5-oxo-1H-pyrrolo[2.3-c]pyridin-3-propionsäure **9**

320 mg (1,52 mmol) PBG-Laktam und 160 mg (0,656 mmol) PBG werden in 160 ml H₂O und 3 ml einer 10-prozentigen wäßrigen Diäthylaminolösung gelöst. Dann wird 5 Stunden unter Sauerstoffausschluß bei 70 °C im Sandbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der pH-Wert mit verd. HCl auf pH 7,2 gestellt und die Lösung auf eine Säule (20 cm Länge, 3 cm Durchmesser) aus Sephadex DEAE A-25 gegeben, deren Cl[–]-Form mit Tris-HCl-Puffer (pH 7,2; 0,05 M an Tris) so lange gewaschen worden war, bis das Eluat einen pH-Wert von 7,2 hatte. Bei der Elution mit diesem Puffer erhält man zuerst geringe Mengen von nicht umgesetztem PBG, dann folgt in etwa 300 ml Puffer das überschüssige PBG-Laktam, das durch Einstellen des pH-Wertes auf 4 mit Eisessig und Abkühlen ausgefällt wird (150 mg, 47% des eingesetzten Laktams). Anschließend wird mit obigem Tris-Puffer, der 1% NH₄Cl

enthält, weiter eluiert. Dabei erhält man nach etwa 100 ml einer nicht weiter untersuchten Verbindung, die eine stark blauviolette Ehrlich-Reaktion zeigt, in ungefähr 500 ml Puffer das Dipyrrolylmethan **9**, dessen anfangs rotviolette Ehrlich-Farbe nach einiger Zeit in gelbbraun übergeht. Um die Elution von **9** zu beschleunigen, wurde die NH₄Cl-Konzentration des Elutions-Puffers von anfänglich 1% über 2% bis 3% erhöht. Nach dem Einstellen des pH-Wertes der Lösung mit Eisessig auf 4 beginnt **9** nach kurzer Zeit auszukristallisieren. Es wird nach 1–2-stündigem Stehen im Kühlschrank über eine G 4-Glasfritte abgesaugt, mit wenig eiskaltem verd. Essigsäure (pH 4) und gleich anschließend mit wenig kaltem Aceton gewaschen. Man trocknet im Vakuum bei 40 °C über P₂O₅ unter Sauerstoffschluss. Ausbeute: 160 mg (58,5% d. Th.).

Ein reineres Produkt kann über das Hg-Salz¹⁰ erhalten werden. In diesem Falle verwendet man zur Elution Na₂SO₄ anstelle von NH₄Cl. Das Eluat wird mit verd. HCl auf pH 4 gebracht und **9** mit 20-prozentiger Quecksilber(II)-acetat-Lösung gefällt. Das Hg-Salz zentrifugiert man ab, wäscht dreimal mit verd. Essigsäure (pH 4), und zerstetzt mit H₂S. Der HgS-Niederschlag wird abzentrifugiert, mit H₂O gewaschen und dreimal mit 0,5 N Ammoniak extrahiert. Der pH-Wert der Ammoniakextrakte wird mit Eisessig auf 4 gestellt, wobei sich **9** kristallin abscheidet. Nach 1–2 Stunden im Kühlschrank werden die Proben getrennt abgesaugt, getrocknet und mittels DC auf Reinheit geprüft. Ausbeute: 107 mg (39% d. Th.).

Falls eine Umkristallisation nötig ist, wird in möglichst wenig 0,5 N Ammoniak gelöst, eventuell filtriert, der pH-Wert mit Eisessig vorsichtig auf 4 gestellt und wie oben weitergearbeitet.

Schmelzpunkt: 214 °C u. Zers. DC: R_{PBG} 1,67 (B). NMR (δ ppm, 100 MHz): 6,5 (1H, s, =CH–); 4,26 (2H, s, –CH₂–NH–); 3,77 (2H, s, –CH₂–); 3,33 (2H, s, –CH₂–CO–); 2,5 (10H, m, –CH₂–CH₂–COOH, –CH₂–COOH).

Analyse: C₂₀H₂₃N₃O₇ (Mol.-Gew. 417)

Gef.: C 57,43 H 5,61 N 10,03,
Ber.: C 57,55 H 5,51 N 10,07.

5-Aminomethyl-2-[4-(2-carboxyäthyl)-3-carboxymethylpyrrol-2-yl-methyl]-4-carboxymethylpyrrol-3-propionsäure **10**

329 mg **9** werden in 12 ml 1 M KOH gelöst und unter Zugabe von etwas Na-amalgam 78 Stunden bei 25 °C unter Sauerstoffschluss im Dunkeln aufbewahrt¹. Anschließend wird der pH-Wert mit HCl auf 4 gestellt, worauf sich **10** kristallin abschei-

det. Nach 1–2-stündigem Stehen im Kühlschrank saugt man ab, wäscht mit wenig eiskaltem verd. Essigsäure (pH 4), sofort anschließend mit wenig kaltem Aceton und trocknet im Vakuum bei 40 °C über P₂O₅. Sämtliche Arbeiten werden unter Argon ausgeführt, die Substanz wird unter Argon im Dunkeln aufbewahrt. Ausbeute: 286 mg (80% d. Th.).

Die Umkristallisation wird, wie bereits mehrfach beschrieben, durchgeführt. Die Substanz kristallisiert wie PBG mit einem Molekül Kristallwasser. DC: R_{PBG} 0,93 (B). NMR (δ ppm, 60 MHz): 6,57 (1H, s, –CH=); 3,83 (2H, s, –CH₂–); 3,60 (2H, s, –CH₂–NH₂); 3,40; 3,35 (4H, s, –CH₂–COOH); 2,53 (8H, m, –CH₂–CH₂–COOH).

Analyse: C₂₀H₂₅N₃O₈·1H₂O (Mol.-Gew. 453)

Gef.: C 52,86 H 5,91 N 9,51,

Ber.: C 52,90 H 5,95 N 9,27.

2-{5-[4-(2-Carboxyäthyl)-3-carboxymethylpyrrol-2-yl-methyl]-4-(2-carboxyäthyl)-3-carboxymethylpyrrol-2-yl-methyl}-4,5,6,7-tetrahydro-5-oxo-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-propionsäure **12**

Sämtliche Arbeiten werden unter Ausschluß von Sauerstoff und im Dunkeln bzw. in stark gedämpftem Licht durchgeführt. Zur Darstellung der Lösungsmittel und Pufferlösungen verwendet man ausgekochtes Wasser und leitet während der Chromatographie Stickstoff durch die Elutionsmittel.

80 mg (0,177 mmol) **10** und 160 mg (0,076 mmol) **4** werden in 16 ml H₂O suspendiert und durch Zugabe einer 10-prozentigen wäßrigen Diäthylaminlösung gelöst. Dann tropft man noch so lange diese Lösung hinzu, bis der pH-Wert 8,2 beträgt und hält anschließend das Reaktionsgemisch während 3 Stunden bei 70 °C. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird die Reaktionslösung auf eine Säule (18 cm Länge, 3 cm Durchmesser) aus Whatman DE-52, die zuvor mit Tris/HCl-Puffer (pH 8,2; 0,05 M an Tris) äquilibriert wurde, gegeben. Die Elution erfolgt zunächst mit Tris-Puffer obiger Konzentration; hierbei verläßt zuerst **4** die Säule, das durch Einstellen des pH-Wertes auf 4 mit Eisessig oder halbkonzentrierter HCl und Abkühlen ausgefällt wird. Bei der weiteren Elution wird dem Tris-HCl-Puffer NaCl zugesetzt, dessen Anteil allmählich erhöht wird. Nachdem mit einer 1-prozentigen NaCl-Pufferlösung 250 ml eluiert wurden, erhöht man auf 1,5% an NaCl, fängt hierbei 250 ml Eluat auf und eluiert unter diesen Bedingungen weitere 400 ml von der Säule. Die folgenden 100 ml enthalten das Tripyrran **12**, das mit Ehrlich's Reagens unter Rotviolettfärbung, die langsam in braun übergeht, reagiert. Gleich nach der Elution wird der pH-Wert des Eluats mit halb-

konzentrierter HCl unter Argon auf 4 gestellt, wobei **12** sofort auszukristallisieren beginnt. Nach 1–2-stündigem Stehen im Kühlschrank werden die Kristalle abzentrifugiert, mit eiskalter Essigsäure (pH 4) und gleich anschließend mit wenig kaltem Aceton gewaschen. Dann wird **12** im Vakuum bei 40 °C über P₂O₅ getrocknet.

Ausbeute: 47 mg (41% d. Th., bezogen auf **10**). Zers. ab 190 °C. DC: *R*_{PBG} 1,09 (C); *R*_{PBG} 0,737 (B). NMR (δ ppm, 100 MHz): 6,88 (1H, s, –CH=); 4,62 (2H, s, –CH₂–NH–); 4,16 (4H, s, –CH₂–); 3,71 (6H, s, –CH₂–COOH, –CH₂–CO–); 2,85 (12H, m, –CH₂–CH₂–). Analyse: C₃₀H₃₄N₄O₁₁ (Mol.-Gew. 626)

Gef.: C 57,32 H 5,46 N 8,84,
Ber.: C 57,50 H 5,44 N 8,95.

*5-Aminomethyl-2-[5-[4-(2-carboxyäthyl)-3-carboxymethylpyrrol-2-yl-methyl]-4-(2-carboxyäthyl)-3-carboxymethylpyrrol-2-yl-methyl]-4-carboxymethylpyrrol-3-propionsäure **13***

100 mg **12**, die in 1 ml 1 M KOH unter Ausschluß von Sauerstoff gelöst wurden, läßt man nach Zugabe von etwas Natriumamalgam während 72 Stunden bei 30 °C stehen. Dann wird **13** durch Ansäuern mit halbkonzentrierter HCl auf pH 4 und 1/2-stündigem Stehen im Gefrierfach ausgefällt. Anschließend wird abzentrifugiert, mit eiskalter Essigsäure (pH 4) sowie mit wenig kaltem Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum bei 40 °C über P₂O₅ liegt **13** als leicht rötliches, wenig stabiles amorphes Pulver vor, das unter Argon aufbewahrt wird. Ausbeute: 76 mg (74% d. Th.). DC: *R*_{PBG} 0,474 (B). NMR (δ ppm, 100 MHz): 6,80 (1H, s, –CH=); 4,18 (4H, s, –CH₂–); 3,96 (2H, s, –CH₂–NH₂); 3,74 (6H, s, –CH₂–COOH); 2,83 (12H, m, –CH₂–CH₂–).

*Methyl 2-[4-(2-Methoxycarbonyläthyl)3-methoxy-carbonylmethylpyrrol-2-yl-methyl]-4,5,6,7-tetrahydro-5-oxo-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-3-propionat **8***

1. 80 mg (0,36 mmol) PBG-Laktam-methylester, dargestellt nach Cookson und Rimington¹⁰, werden in der Wärme in 20 ml absolutem Methanol gelöst. Zu dieser Lösung werden fünfmal im Abstand von je einer Stunde jeweils 0,1 ml CH₃J sowie 10 mg (0,031 mmol) von **7**, das zuvor in 1,25 ml absolutem Methanol gelöst wurde, zugegeben. Danach gibt man zu dem Ansatz, der unter Ausschluß von Sauerstoff (N₂!) bei 30 °C geschüttelt wurde, eine Spatelspitze NaHCO₃ und läßt ihn dann unter den gleichen Bedingungen 5 Stunden weiterreagieren. Die Umsetzung zu **8**, die mittels der Dünnschichtchromatographie verfolgt wird, beträgt gegen Ende

der Reaktion etwa 40–50% (bezogen auf **7**). Zur Isolierung von **8** wird das Reaktionsgemisch nach dem Abfiltrieren des NaHCO₃ zusammen mit etwas Quarzsand im Vakuum zur Trockene eingeengt und so auf eine Säule aus Aluminiumoxid S (Fa. Riedel de Haen, neutral aktiv, für Säulenchromatographie), das zuvor mit dem Elutionsmittel aufgeschlämmt und mehrmals gewaschen worden war, gegeben. Bei der anschließenden Säulenchromatographie mittels Chloroform/Isopropanol (95/5, V/V) werden jeweils 5 ml Fraktionen aufgefangen und diese mit Ehrlich's Reagens getestet. Nach der dünnenschichtchromatographischen Untersuchung der Ehrlich-positiven Fraktionen vereinigt man die ausschließlich das Dipyrrolymethan **8** enthaltenden und engt sie im Vakuum zur Trockene ein. Der Rückstand wird in wenig Methanol aufgenommen, durch ein Blauband-Filter filtriert und im Vakuum wieder zur Trockene eingeengt. Diese Operation wird zur Entfernung restlichen Trägermaterials unter Argon und Verwendung des gleichen Filters mehrmals wiederholt. Nach der Umkristallisation des Rückstandes aus wenig Methanol erhält man **8** als chromatographisch einheitliches Produkt. Ausbeute 5,7 mg (10% d. Th.). Der überschüssige PBG-Laktamester läßt sich bei diesem Verfahren durch Erhöhung des Isopropananteils auf 40% langsam von der Säule eluieren.

Eine säulenchromatographische Anreicherung von **8** gelingt in gleicher Weise an Kieselgel (Fa. Woelm, 20% H₂O als stationäre Phase) mittels Chloroform/Methanol (95/5, V/V). Die Auftrennung ist etwas ungünstiger, doch läßt sich der überschüssige Laktamester leichter von der Säule eluieren. Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung von **8** bietet die präparative Schichtchromatographie an Kieselgel (Fa. Merck, PSC-Fertigplatten, Kieselgel F 254) mittels Chloroform/Methanol (95/5, V/V).

Schmelzpunkt: 192 °C. DC: *R*_F 0,375 (D).

Analyse: C₂₃H₂₉N₃O₇ (Mol.-Gew. 459)

Gef.: C 59,86 H 6,34 N 9,44 M⁺ 459,
Ber.: C 60,10 H 6,30 N 9,50 M 459.

2. Zu einer Lösung von 80 mg (0,36 mmol) PBG-Laktam-methylester, die in der Wärme in 50 ml absolutem tert.-Butanol und 5 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst wurden, fügt man 35,2 mg (0,248 mmol) Acetylendicarbonsäuredimethylester hinzu. Dann wird während 3 Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren eine Lösung von 40 mg (0,124 mmol) **7** in 8 ml absolutem Tetrahydrofuran zugetropft und anschließend noch 6–7 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Reaktion wird unter Sauerstoffausschluß durchgeführt und die Umsetzung mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Bei diesem Verfahren werden ca.

20% des eingesetzten Dimethylesters **7** zur Bildung von **8** verwertet.

3. 292 mg (0,7 mmol) **9** werden mit einem Überschuß an Diazomethan (aus 48 g Nitroso-methylharnstoff) in 640 ml trockenem Äther und 80 ml abs. Methanol zwei Tage bei 4–5 °C unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, das Rohprodukt mit Äther gewaschen und anschließend aus abs. Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 194 mg (60% d. Th.). Schmelzpunkt: 192 °C. DC: R_F 0,375 (D). NMR (δ ppm, 100 MHz, C_5D_5N , int. Standard TMS): 10,93 (1H, s, –NH–); 10,68 (1H, s, –NH–); 8,23 (1H, s, –CH₂–NH–CO–); 6,7 (1H, s, =CH–); 4,35 (2H, s, –CH₂–NH–); 4,12 (2H, s, –CH₂–); 3,6; 3,55 (13H, s, –CH₂–CO–, –CH₂–COOCH₃, –O–CH₃); 2,75 (8H, m, –CH₂–CH₂–COOCH₃).

*Methyl 2-{5-[4-(2-Methoxycarbonylähyl)-3-methoxycarbonylmethylpyrrol-2-yl-methyl]-4-(2-methoxycarbonylähyl)-3-methoxycarbonylmethylpyrrol-2-yl-methyl}-4.5.6.7-tetrahydro-5-oxo-1*H*-pyrrolo[2.3-*c*]pyridin-3-propionat **11***

1. Zu 110 ml einer mit KOH getrockneten ätherischen Lösung von Diazomethan (aus 11 g Nitroso-methylharnstoff) gibt man in der Kälte 40 mg (0,064 mmol) **12**, die zuvor in 40 ml trockenem Äther und 20 ml abs. Methanol gelöst wurden, und führt das Gemisch im Dunkeln während 24 Stunden bei 5 °C. Dann wird das Lösungsmittel vor-

sichtig im Vakuum entfernt und das Reaktionsprodukt aus wenig abs. Methanol umkristallisiert. Man erhält **11** als ein weiß-gräuliches Produkt. Bei der chromatographischen Überprüfung des Rohproduktes erwies sich die Hauptfraktion in verschiedenen Fließmitteln mit dem von Frydman *et al.*⁴ auf anderem Wege dargestellten **11** als identisch.²¹

Ausbeute: 23 mg (52% d. Th.). Schmelzpunkt: 210 °C. DC: R_F 0,45 (D). M⁺ 696, M 696.

2. Unter Stickstoff gibt man zu einer Lösung von 114 mg (0,248 mmol) **8** in 20 ml absolutem Methanol 40 mg (0,124 mmol) **7**, die in 5 ml absolutem Methanol gelöst wurden, sowie 0,5 ml CH₃J und eine Spatelspitze NaHCO₃ hinzu und läßt das Gemisch während 24 Stunden bei 30 °C unter Schütteln reagieren. **11** läßt sich durch die präparative Schichtchromatographie an Kieselgel mittels Chloroform/Methanol (95/5, V/V) von den anderen Umsetzungsprodukten abtrennen. Es erwies sich dünnenschichtchromatographisch als identisch mit dem nach dem obigen Verfahren synthetisierten Produkt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie sind wir für die Förderung unserer Arbeiten durch Personal- und Sachbeihilfen zu Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. H. Plieninger, Heidelberg, danken wir für anregende Diskussionen und Hinweise. Ferner sind wir Frau Ingeborg Haver für fleißige und gewissenhafte Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

- ¹ B. Frydman, S. Reil, A. Valasinas, R. B. Frydman u. H. Rapoport, J. Amer. Chem. Soc. **93**, 2738 [1971]; und Zitate darin.
- ² R. B. Frydman, A. Valasinas u. B. Frydman, Biochemistry **12**, 80 [1973].
- ³ R. B. Frydman, A. Valasinas, H. Rapoport u. B. Frydman, FEBS-Letters **25**, 309 [1972].
- ⁴ R. B. Frydman, A. Valasinas, S. Levy u. B. Frydman, FEBS-Letters **38**, 134 [1974].
- ⁵ G. Müller, Z. Naturforsch. **27b**, 473 [1972].
- ⁶ R. Radmer u. L. Bogorad, Biochemistry **9**, 4736 [1970].
- ⁷ R. Radmer u. L. Bogorad, Biochemistry **11**, 904 [1972].
- ⁸ G. Müller, G. Bezold, W. Dieterle u. G. Siebke, Z. Naturforsch. **26b**, 92 [1971].
- ⁹ D. Mauzerall, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 2605 [1960].
- ¹⁰ G. H. Cookson u. C. Rimington, Biochem. J. **57**, 476 [1954].
- ¹¹ D. Mauzerall, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 2601 [1960].

¹² J. W. Harbuck u. H. Rapoport, J. Org. Chemistry **37**, 3618 [1972] und Zitate darin.

¹³ J. M. Osgerby, J. Pluscec, Y. C. Kim, F. Boyer, N. Stojanac, H. D. Mah u. S. F. MacDonald, Canad. J. Chem. **50**, 2652 [1972].

¹⁴ A. R. Battersby, D. A. Evans, K. H. Gibson, E. McDonald u. L. Nixon, J. C. S. Perkin I, 1546 [1973].

¹⁵ H. Plieninger, Heidelberg, Private Mitteilung.

¹⁶ E. Winterfeld, Chem. Ber. **97**, 1952 [1964].

¹⁷ W. Fähnle, Dissertation, Universität Stuttgart 1974, in Vorbereitung.

¹⁸ R. Bonnett and A. F. McDonagh, J. C. S. Perkin I, 881 [1973].

¹⁹ G. A. Swan u. A. Waggett, J. Chem. Soc. **1970**, 285.

²⁰ D. Mauzerall u. S. Granick, J. Biol. Chem. **219**, 435 [1956].

²¹ Wir danken Herrn Prof. B. Frydman, Buenos Aires, für die vergleichenden Untersuchungen.