

acid cleavage provided the dihydrochloride (m. p. 247 to 249°C) of cylindrocarpinic acid (V) [previously² obtained by acid hydrolysis of dihydrocylindrocarpine (III)], thus demonstrating that cylindrocarpidine had to possess structure IV.

Acknowledgement. Financial support has been provided by grant No. H-5048 of the National Heart Institute, National Institutes of Health (U. S. Public Health Service) and by the Conselho Nacional de Pesquisas, Brazil. The postdoctorate fellowship of B. G. in Rio de Janeiro was financed from a grant by the Rockefeller Foundation in support of a collaborative research program between Stanford University and the Instituto de Química Agrícola, Rio de Janeiro.

C. DJERASSI, A. A. P. G. ARCHER¹⁴, T. GEORGE, B. GILBERT¹⁴, J. N. SHOOLERY, and L. F. JOHNSON

Department of Chemistry, Stanford University (Calif.), Instituto de Química Agrícola, Rio de Janeiro (Brazil), and Varian Associates, Palo Alto (Calif.), July 29, 1960.

Zusammenfassung

Die Strukturaufklärung von Cylindrocarpin (II) und Cylindrocarpidin (IV) zeigt, dass diese zwei Alkaloide die ersten Mitglieder der Aspidosperminfamilie (I) sind, in denen eine sauerstoffhaltige Seitenkette anstatt der gewöhnlichen C-5-Äthylgruppe vorliegt.

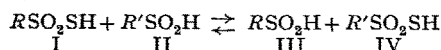
Spontane Transsulfuration zwischen organischen Thiosulfonsäuren und Sulfinsäuren

Die organischen Thiosulfonate der allgemeinen Formel $R-SO_2-SH$ gewannen an biologischem Interesse, nachdem das Thiotaurin unter den Stoffwechselprodukten *in vivo* des Cystins^{1,2} und der Alaninthiosulfonsäure, *in vitro* unter den Abbauprodukten des Cystins durch chemische³ und enzymatische⁴ Reaktionen nachgewiesen wurde.

Es schien uns nun von Interesse, zu erforschen, ob die Verbindungen der Formel $R-SO_2-SH$ spontan Erscheinungen von Transsulfuration aufweisen können, welche zu Verbindungen $R-SO_2-H$ führen.

Zu diesem Zweck wurden einerseits Alaninthiosulfonsäure (I) und Hypotaurin (II), andererseits Thiotaurin (IV) und Cysteinsulfinsäure (III) in 0,02 M wässriger Lösung bei Zimmertemperatur gemischt und die Reaktionsprodukte alsbald papierchromatographisch untersucht (Whatman-Papier No. 4; Elution mit Phenol und Collidin-Lutidin).

Bei beiden Fällen waren im Chromatogramm alle vier erwähnten Verbindungen I–IV vorhanden, ausser dem geringe Spuren von Taurin, welches der Oxydation des Hypotaurins während der Chromatographie entstammte. Änderung des pH zwischen 5 und 8,5 sowie Verlängerung der Reaktionsdauer änderten den chromatographischen Befund nicht. Das Resultat zeigt, dass eine rasche Transsulfurationsreaktion zwischen den Verbindungen vom Typ $R-SO_2-SH$ und Akzeptoren vom Typ $R-SO_2-H$ stattfindet.



Natürlich muss eine solche Transsulfurationsreaktion berücksichtigt werden, wenn biologische Materialien zwecks Feststellung von Thiosulfonaten untersucht werden sollen.

C. DE MARCO und M. COLETTA

Istituto di Chimica Biologica, Università di Roma (Italien), 25. Juli 1960.

Summary

Spontaneous transulfuration reactions between alaninthiosulfonic acid and hypotaurine, and between thiotaurine and cysteinesulfonic acid, have been demonstrated.

¹ D. CAVALLINI, C. DE MARCO und B. MONDOVI, J. biol. Chem. 234, 854 (1959).

² D. CAVALLINI, C. DE MARCO, B. MONDOVI und L. TENTORI, J. Chrom. 3, 20 (1960).

³ D. CAVALLINI, C. DE MARCO und B. MONDOVI, Arch. Biochem. Biophys. 87, 281 (1960).

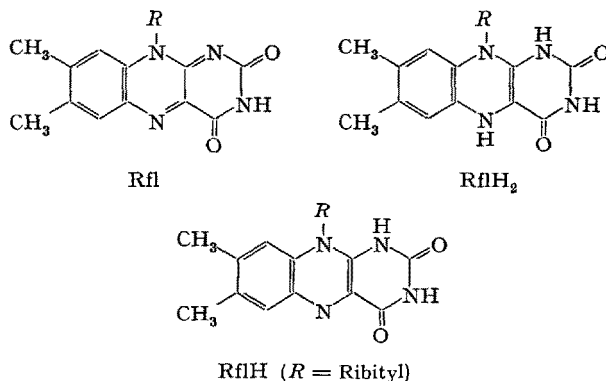
⁴ D. CAVALLINI, C. DE MARCO, B. MONDOVI und G. MORI, Enzymologia, 22, 161 (1960).

Über das Verhalten von Riboflavin-Semichinon gegen Metallionen.

Modellstudien zur Metall-Flavoenzymkatalyse

Wir haben früher¹ gezeigt, dass Riboflavin, welches in der Chinonform Rfl vorliegt, entgegen den Befunden anderer Autoren² kein starker Metallchelator-Bildner ist³. Aus der schwachen Metall-Affinität von Rfl lässt sich die Metall-Spezifität aktiver Flavoenzyme^{4,5} nicht erklären.

Auch die aus Rfl durch Aufnahme von 1 Mol H_2 entstehende Leukoform RflH₂ zeigt, wie wir fanden⁶, keine potentiometrisch oder spektrophotometrisch nachweisbare Metall-Affinität.



In der Zwischenzeit ist man – vor allem durch die Untersuchungen von BEINERT⁷ – darauf aufmerksam gemacht worden, dass ein dritter Flavin-Strukturtyp, die Flavosemichinone RflH⁸, für die Biokatalyse ausschlaggebende Bedeutung hat.

Zu den Faktoren, welche diese radikalische Flavin-Struktur *in vivo* stabilisieren, gehört einmal, wie durch HARBURY *et al.*⁹ experimentell begründet und von ISEN-

¹ P. HEMMERICH und S. FALLAB, Helv. chim. Acta 41, 498 (1958).

² A. ALBERT, Biochem. J. 54, 646 (1953); 47, xvii (1950).

³ Eine Ausnahme bilden Ag- und Hg-Ionen, vgl. ¹¹, ¹⁹.

⁴ D. J. D. NICHOLAS, Nature 179, 800 (1957).

⁵ H. R. MAHLER, Adv. Enzymol. 17, 233 (1956).

⁶ pH-Titration unter H_2 in Gegenwart von Pd auf Silicagel.

⁷ H. BEINERT, J. biol. Chem. 225, 479 (1957); Biochem. biophys. Acta 20, 589 (1956).

⁸ Vgl. L. MICHAELIS und G. SCHWARZENBACH, J. biol. Chem. 123, 538 (1938).

⁹ H. A. HARBURY und K. A. FOLEY, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 44, 662 (1958). – H. A. HARBURY, K. F. LANOUÉ, P. A. LOACH und R. M. AMICK, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 45, 1708 (1960).

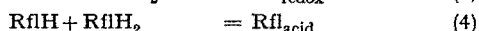
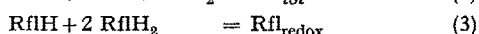
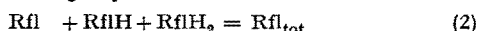
BERG und SZENT-GYÖRGY belegt¹⁰, die im physiologischen Milieu statistisch begünstigte Ausbildung von Ladungs-Transfer-Komplexen mit geeigneten Donor-Systemen wie Tryptophan und Adenin^{11,12}. Einen zweiten wesentlichen Faktor vermuteten wir in der Metallionen-Affinität des RfIH.

Wir haben daher versucht, die Flavosemichinone koordinationschemischen Studien zugänglich zu machen. Eine bestimmte Menge Riboflavin («Rfl_{tot}») wurde katalytisch reduziert¹³. Zu der unter bestmöglichem Luftausschluss heiss filtrierten Lösung liess man Luftzutreten bis zu etwa 40%iger Autoxydation. Das genaue Autoxydationsäquivalent («Rfl_{redox}») wurde dann durch Behandlung mit überschüssigem Jod und Rücktitration mit Thiosulfat, gleichzeitig das Säureäquivalent («Rfl_{acid}») unter absolutem Luftausschluss durch pH-Titration¹³ bestimmt.

Das Semichinon RfIH unterliegt den Gleichgewichtsreaktionen

$$2 \text{RfIH} \xrightleftharpoons[a]{b} (\text{RfIH})_2 \xrightleftharpoons[b]{a} \text{Rfl} + \text{RfIH}_2 \quad (1)$$

RfIH₂ und RfIH sind beides einbasische Säuren vom ungefähr gleichen pK 6¹⁴. Rfl dissoziiert erst bei pH ~ 10, was in diesem Zusammenhang unwesentlich ist. Das «Flavochinhydron» (RfIH)₂ ist als Ladungs-Transfer-Komplex aus Flavochinon Rfl und Leukoflavin RfIH₂ aufzufassen im Einklang mit der von PULLMAN und PULLMAN¹⁵ gegebenen Kennzeichnung der Donor-Akzeptor-Eigenschaften von Flavinen. Auch (RfIH)₂ bildet nur ein Monoanion (Kuhnsches «Verdoflavin»¹⁶), da ein Ladungs-Transfer-Komplex (Rfl)₂ aus elektrostatischen Gründen nicht stabil ist. (RfIH)₂ verhält sich somit acidimetrisch und potentiometrisch, nicht aber spektrophotometrisch als Gemisch (Rfl + RfIH₂). Wir haben daher im pH-Bereich 2–9 an neutralen Partikeln nur Rfl, RfIH und RfIH₂ zu betrachten, deren Konzentrationen sich aus dem folgenden Gleichungs-System errechnen lassen:



In einem typischen Versuch¹⁸ fanden wir zum Beispiel für eine zu 37% autoxydierte Leukoflavin-Lösung im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich das Verhältnis Rfl:RfIH:RfIH₂ = 34:5:61 bei 65 ± 0,2°C. Riboflavin liegt also in reduzierendem Milieu selbst bei höherer Temperatur nur zu einem kleinen Prozentsatz als freies Radikal RfIH vor, was auch mit BEINERTS spektrophotometrischen Befunden¹⁷ an reduziertem Flavinmononucleotid übereinstimmt.

Wir haben bei den beschriebenen pH-Titrationen Schwermetallionen zugesetzt, welche sich selbst nicht an Redox-Reaktionen beteiligen, so vor allem Ni²⁺, Zn²⁺ und Cd²⁺, im Verhältnis Rfl_{tot}:Me = 3:1. Dabei tritt ab pH 6 eine starke Farbintensivierung ein nach karmin- bis kirschrot. Zugleich werden – zusätzlich zu Rfl_{acid} (vgl. oben) – 1,5 Protonen pro Metallion freigesetzt, ohne dass sich Me(OH)₂ bildet. Da Rfl und RfIH₂ auf Metallionen weder spektral noch durch Freisetzung von H⁺ ansprechen, muss diese Erscheinung auf der Komplexbildung von RfIH beruhen und kann dann nur so erklärt werden, dass eine Gleichgewichtsverschiebung



eintritt, was einer Verdoppelung der titrimetrisch erfassbaren Ligand-H⁺-Äquivalente entspricht. RfIH wird also in Form des Chelates thermodynamisch stabilisiert.

Zur weiteren Charakterisierung der Chelate RflMe⁺ haben wir Riboflavin in Veronalpuffer vom pH 7,4 mit und ohne Zusatz von Ni²⁺ bzw. Cd²⁺ katalytisch hydriert und nach dem Abdekantieren vom Katalysator die Autoxydation spektrophotometrisch¹⁸ verfolgt. Die metallhal-

tigen Lösungen zeigen gegenüber den metallfreien eine ausgeprägte Schulter bei 510–520 mμ, welche mit fortschreitender Autoxydation ein Intensitätsmaximum von E ~ 10³ durchläuft, während Anfangs- und Endwert von E₅₂₀ unter 2.10² liegen. Differenzspektren zwischen metallfreien und metallhaltigen Lösungen zeigen Maxima im Bereich 500 mμ, im Falle des Ni²⁺ präzise bei 500 ± 0,5 mμ.

Diese langwellige Absorption der Chelate RflMe⁺ entspricht der des Kations RfIH₂⁺ (503 mμ)¹⁷ (Kuhnsches «Rhodoflavin»¹⁶), welches mit RflMe⁺ «isoelektronisch» und nur in stark saurem Milieu beständig ist. Diese Absorption entspricht ferner der Ladungs-Transfer-Bande im Rfl-Tryptophan-Komplex¹⁰ (490 mμ) sowie der langwelligeren Bande des Flavochinon-Ag-Komplexes (pH 1: 492 mμ, pH 5,7: 500 mμ)¹⁹.

Die genaue Ausmessung der RflMe⁺-Bande war nur möglich auf Grund der Tatsache, dass die Autoxydation durch die Chelatisierung stark verlangsamt wird. Es liegt damit offenbar auch eine kinetische Stabilisierung der Radikalform vor, die Gegenstand unserer weiteren Studien ist.

Die Befunde von MAHLER und GREEN²⁰, denen zufolge Metallionen für die Einelektronen-Übertragung vom Flavin auf Cytochrom, nicht aber für die Dehydrierung von Flavoprotein-Substraten (DPNH, Acyl-CoA) notwendig sind, erfahren durch diese Modellstudien eine strukturelle Erklärung.

P. HEMMERICH²¹

Anorganisch-chemische Anstalt der Universität Basel,
16. August 1960.

Summary

The specific metal-chelating properties of the flavoenzymes are not to be interpreted by the metal affinities of riboflavin (Rfl) and leukoriboflavin (RfIH₂), but by those of the semiquinoid radical (RfIH). The reaction of RfIH with metal ions gives rise to the formation of chelates that are well characterisable by potentiometric and spectrophotometric analysis. By the chelation, the semiquinoid level of the ligand is stabilised in the thermodynamic as well as in the kinetic sense.

¹⁰ I. ISENBERG und A. SZENT-GYÖRGY, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 44, 857 (1958).

¹¹ G. WEBER, Biochem. J. 47, 114 (1950).

¹² Unveröffentlichte eigene Versuche (H. BRINTZINGER und P. HEMMERICH).

¹³ Rfl_{tot} = 4–8 · 10⁻³ M, Lösungsmittel 50%ige Methylcellosolve aq., Katalys. Pd auf Kohle, Potentiometer Metrohm E 187.

¹⁴ L. MICHAELIS und G. SCHWARZENBACH⁸ geben pK_{RfIH₂} = 6,2, pK_{RfIH} = 6,6. Wir finden in Übereinstimmung damit pK 6,25 für RfIH₂/RfIH-Gemisch. Dieselben Autoren finden RfIH/Rfl_{tot} maximal 0,1–0,2 bei 30°C und pH 5–7,5 für Rfl_{tot} kleiner als 10⁻⁴ M, gegen höhere Konzentrationen abfallend.

¹⁵ A. und B. PULLMAN, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 44, 1197 (1958).

¹⁶ R. KUHN und R. STRÜBELE, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 753 (1937).

¹⁷ H. BEINERT, J. Amer. chem. Soc. 78, 5323 (1956).

¹⁸ Wir sind Herrn Prof. K. WALLENFELS, Freiburg i. Br., für die Überlassung seines automatisch registrierenden Cary-Spektrometers sowie Herrn cand. chem. H. DIEKMANN für die Ausführung der Messungen zu grossem Dank verpflichtet.

¹⁹ P. BAMBERG, P. HEMMERICH und H. ERLNMEYER, wird demnächst publiziert.

²⁰ H. R. MAHLER und D. E. GREEN, Science 120, 7 (1954).

²¹ Ich danke Herrn Prof. H. ERLNMEYER für sein Interesse an dieser Arbeit und dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für materielle Unterstützung. Den Herren Prof. H. A. HARBURY, YALE und Dr. H. BRINTZINGER, Basel, danke ich für wertvolle Diskussionen und Hinweise.