

acid cleavage provided the dihydrochloride (m. p. 247 to 249°C) of cylindrocarpic acid (V) [previously<sup>2</sup> obtained by acid hydrolysis of dihydrocylindrocarpine (III)], thus demonstrating that cylindrocarpine 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. ARCHER<sup>14</sup>, T. GEORGE,  
B. GILBERT<sup>14</sup>, 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.

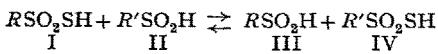
### Spontane Transsulfuration zwischen organischen Thiosulfonsäuren und Sulfinsäuren

Die organischen Thiosulfonate der allgemeinen Formel  $R-SO_2-SH$  gewannen an biologischem Interesse, nachdem das Thiotaurin unter den Stoffwechselprodukten *in vivo* des Cystins<sup>1,2</sup> und der Alaninthiosulfonsäure, *in vitro* unter den Abbauprodukten des Cystins durch chemische<sup>3</sup> und enzymatische<sup>4</sup> 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), anderseits 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 geringen 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 transsulfuration reactions between alaninthiosulfonic acid and hypotaurine, and between thiotaurine and cysteinesulfinic acid, have been demonstrated.

<sup>1</sup> D. CAVALLINI, C. DE MARCO und B. MONDOVÍ, J. biol. Chem. 234, 854 (1959).

<sup>2</sup> D. CAVALLINI, C. DE MARCO, B. MONDOVÍ und L. TENTORI, J. Chrom. 3, 20 (1960).

<sup>3</sup> D. CAVALLINI, C. DE MARCO und B. MONDOVÍ, Arch. Biochem. Biophys. 87, 281 (1960).

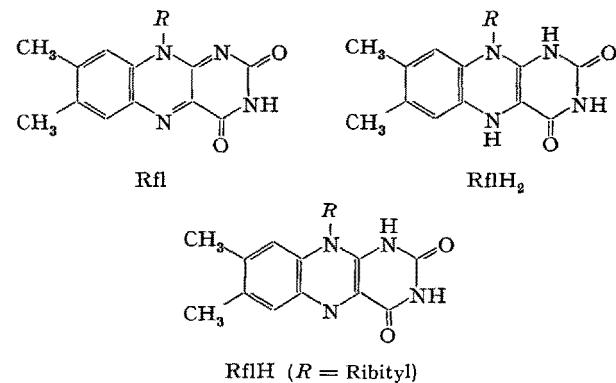
<sup>4</sup> D. CAVALLINI, C. DE MARCO, B. MONDOVÍ und G. MORI, Enzymologia, 22, 161 (1960).

### Über das Verhalten von Riboflavin-Semichinon gegen Metallionen.

#### Modellstudien zur Metall-Flavoenzymkatalyse

Wir haben früher<sup>1</sup> gezeigt, dass Riboflavin, welches in der Chinonform Rfl vorliegt, entgegen den Befunden anderer Autoren<sup>2</sup> kein starker Metallchelat-Bildner ist<sup>3</sup>. Aus der schwachen Metall-Affinität von Rfl lässt sich die Metall-Spezifität aktiver Flavoenzyme<sup>4,5</sup> nicht erklären.

Auch die aus Rfl durch Aufnahme von 1 Mol  $H_2$  entstehende Leukoform RflH<sub>2</sub> zeigt, wie wir fanden<sup>6</sup>, keine potentiometrisch oder spektrophotometrisch nachweisbare Metall-Affinität.



In der Zwischenzeit ist man – vor allem durch die Untersuchungen von BEINERT<sup>7</sup> – darauf aufmerksam gemacht worden, dass ein dritter Flavin-Strukturtyp, die Flavosemichinone RflH<sup>8</sup>, für die Biokatalyse ausschlaggebende Bedeutung hat.

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

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

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

<sup>3</sup> Eine Ausnahme bilden Ag- und Hg-Ionen, vgl. <sup>11, 19</sup>.

<sup>4</sup> D. J. D. NICHOLAS, Nature 179, 800 (1957).

<sup>5</sup> H. R. MAHLER, Adv. Enzymol. 17, 233 (1956).

<sup>6</sup> pH-Titration unter  $H_2$  in Gegenwart von Pd auf Silicagel.

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

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

<sup>9</sup> 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).

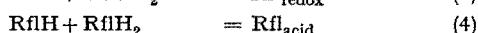
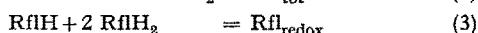
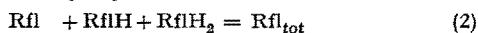
BERG und SZENT-GYÖRGY belegt<sup>10</sup>, die im physiologischen Milieu statistisch begünstigte Ausbildung von Ladungs-Transfer-Komplexen mit geeigneten Donor-Systemen wie Tryptophan und Adenin<sup>11,12</sup>. Einen zweiten wesentlichen Faktor vermuteten wir in der Metallionen-Affinität des RflH.

Wir haben daher versucht, die Flavosemichinone koordinationschemischen Studien zugänglich zu machen. Eine bestimmte Menge Riboflavin («Rfl<sub>tot</sub>») wurde katalytisch reduziert<sup>13</sup>. Zu der unter bestmöglichem Luftausschluss heiss filtrierten Lösung liess man Luft zutreten bis zu etwa 40%iger Autoxydation. Das genaue Autoxydationsäquivalent («Rfl<sub>redox</sub>») wurde dann durch Behandlung mit überschüssigem Jod und Rücktitration mit Thiosulfat, gleichzeitig das Säureäquivalent («Rfl<sub>acid</sub>») unter absolutem Luftausschluss durch pH-Titration<sup>13</sup> bestimmt.

Das Semichinon RflH unterliegt den Gleichgewichtsreaktionen

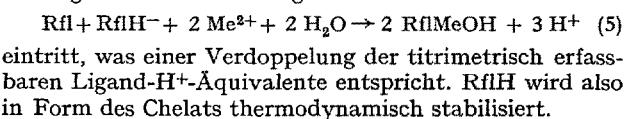
$$2 \text{ RflH} \xrightleftharpoons[\text{a}]{\text{b}} (\text{RflH})_2 \rightleftharpoons \text{Rfl} + \text{RflH}_2 \quad (1)$$

RflH<sub>2</sub> und RflH sind beides einbäische Säuren vom ungefähr gleichen pK 6<sup>14</sup>. Rfl dissoziert erst bei pH ~ 10, was in diesem Zusammenhang unwesentlich ist. Das «Flavochinhydrone» (RflH)<sub>2</sub> ist als Ladungs-Transfer-Komplex aus Flavochinon Rfl und Leukoflavin RflH<sub>2</sub> aufzufassen im Einklang mit der von PULLMAN und PULLMAN<sup>15</sup> gegebenen Kennzeichnung der Donor-Akzeptor-Eigenschaften von Flavinen. Auch (RflH)<sub>2</sub> bildet nur ein Mono-Anion (Kuhnsches «Verdoflavin»<sup>16</sup>), da ein Ladungs-Transfer-Komplex (Rfl-)<sub>2</sub> aus elektrostatischen Gründen nicht stabil ist. (RflH)<sub>2</sub> verhält sich somit acidimetrisch und potentiometrisch, nicht aber spektrophotometrisch als Gemisch (Rfl + RflH<sub>2</sub>). Wir haben daher im pH-Bereich 2–9 an neutralen Partikeln nur Rfl, RflH und RflH<sub>2</sub> zu betrachten, deren Konzentrationen sich aus dem folgenden Gleichungs-System errechnen lassen:



In einem typischen Versuch<sup>13</sup> fanden wir zum Beispiel für eine zu 37% aufoxidierte Leukoflavin-Lösung im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich das Verhältnis Rfl:RflH:RflH<sub>2</sub> = 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 RflH vor, was auch mit BEINERTS spektrophotometrischen Befunden<sup>17</sup> an reduziertem Flavinmononucleotid übereinstimmt.

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



Zur weiteren Charakterisierung der Chelate RflMe<sup>+</sup> haben wir Riboflavin in Veronalpuffer vom pH 7,4 mit und ohne Zusatz von Ni<sup>2+</sup> bzw. Cd<sup>2+</sup> katalytisch hydriert und nach dem Abdekantieren vom Katalysator die Autoxydation spektrophotometrisch<sup>18</sup> verfolgt. Die metallhal-

tigen Lösungen zeigen gegenüber den metallfreien eine ausgeprägte Schulter bei 510–520 m $\mu$ , welche mit fortschreitender Autoxydation ein Intensitätsmaximum von  $E \sim 10^3$  durchläuft, während Anfangs- und Endwert von  $E_{520}$  unter 2,10<sup>2</sup> liegen. Differenzspektren zwischen metallfreien und metallhaltigen Lösungen zeigen Maxima im Bereich 500 m $\mu$ , im Falle des Ni<sup>2+</sup> präzis bei 500 ± 0,5 m $\mu$ .

Diese langwellige Absorption der Chelate RflMe<sup>+</sup> entspricht der des Kations RflH<sub>2</sub><sup>+</sup> (503 m $\mu$ )<sup>17</sup> (Kuhnsches «Rhodoflavin»<sup>18</sup>), welches mit RflMe<sup>+</sup> «isoelektronisch» und nur in stark saurem Milieu beständig ist. Diese Absorption entspricht ferner der Ladungs-Transfer-Bande im Rfl-Tryptophan-Komplex<sup>19</sup> (490 m $\mu$ ) sowie der langwellige Bande des Flavochinon-Ag-Komplexes (pH 1: 492 m $\mu$ , pH 5,7: 500 m $\mu$ )<sup>19</sup>.

Die genaue Ausmessung der RflMe<sup>+</sup>-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 GREEN<sup>20</sup>, 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 strukturchemische Erklärung.

P. HEMMERICH<sup>21</sup>

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 (RflH<sub>2</sub>), but by those of the semiquinoid radical (RflH). The reaction of RflH 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.

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

<sup>11</sup> G. WEBER, Biochem. J. 47, 114 (1950).

<sup>12</sup> Unveröffentlichte eigene Versuche (H. BRINTZINGER und P. HEMMERICH).

<sup>13</sup> Rfl<sub>tot</sub> = 4–8 · 10<sup>–3</sup> M, Lösungsmittel 50%ige Methylcellosolve aq., Katalys. Pd auf Kohle, Potentiometer Metrohm E 187.

<sup>14</sup> L. MICHAELIS und G. SCHWARZENBACH<sup>8</sup> geben pK<sub>RflH<sub>2</sub></sub> = 6,2, pK<sub>RflH</sub> = 6,6. Wir finden in Übereinstimmung damit pK 6,25 für RflH<sub>2</sub>/RflH-Gemisch. Dieselben Autoren finden RflH/Rfl<sub>tot</sub> maximal 0,1–0,2 bei 30°C und pH 5–7,5 für Rfl<sub>tot</sub> kleiner als 10<sup>–4</sup> M, gegen höhere Konzentrationen abfallend.

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

<sup>16</sup> R. KUHN und R. STRÖBELE, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 753 (1937).

<sup>17</sup> H. BEINERT, J. Amer. chem. Soc. 78, 5323 (1956).

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

<sup>19</sup> P. BAMBERG, P. HEMMERICH und H. ERLENMEYER, wird demnächst publiziert.

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

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