

Table. Asymmetric hydrogenation of benzoylformic acid and α -acetamidoacrylic acid

Product	Carrier of catalyst	Amount of catalyst [mg]	Yield [%]	$[\alpha]_D^{25}$	Con-figuration	Optical purity ^b [%]
Mandelic acid	L-Alanine modified	100	93	-0.04° ($c = 5.56$, H_2O)	D	0.03
	IRC-50	50	92	-0.05° ($c = 4.76$, H_2O)	D	0.03
	L-Phenyl-alanine modified	100	90	-0.12° ($c = 5.52$, H_2O)	D	0.08
	IRC-50	50	95	-0.13° ($c = 4.79$, H_2O)	D	0.08
Alanine	L-Alanine modified	100	100	-0.27° ($c = 0.84$, 1 N NaOH) ^a	D ^a	0.19 ^a
	IRC-50					
	L-Phenyl-alanine modified	100	100	-0.16° ($c = 0.83$, 1 N NaOH) ^a	D ^a	0.11 ^a
	IRC-50					

^a DNP-alanine. — ^b (+)-mandelic acid: $[\alpha]_D = +156.2^\circ$, H_2O . — DNP-alanine: $[\alpha]_D = +143.9^\circ$, 1 N NaOH

acid. Optical rotatory dispersion curves of each product were examined in order to determine that the optical rotations were due to the optically active alanine or mandelic acid.

This study was supported by Grant no. NGR 10-007-052 from the National Aeronautics and Space Administration, U. S. A. Sterically controlled synthesis of optically active organic compounds, part XI. Contribution no. 151 of the Institute of Molecular Evolution, University of Miami.

Received April 15, 1970

[1] Terentev, A. P., Klabunovski, E. I., in: Asymmetrische Synthese. By E. I. Klabunovski, p. 124, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1963). — [2] Akabori, S., et al.: Nature **178**, 323 (1956). — [3] Izumi, Y., et al.: Bull. Chem. Soc. Japan **36**, 21 (1963). — [4] Grubhofer, N., Schleith, L.: Z. Physiol. Chem. **296**, 262 (1954). — [5] Perrone, J. C.: Nature **167**, 513 (1951). — [6] Harada, K., Matsu-moto, K.: J. Org. Chem. **31**, 2985 (1966).

Hemin Dialkylphosphate Compounds

C. S. RUSSELL and T. M. SIEGEL

Department of Chemistry,
The City College of The City University of New York

Iron(III) forms complexes with orthophosphate which can be extracted into chloroform solution with amines [1]. Iron(III) forms chloroform-soluble complexes with dialkylphosphoric acids [2]. However, to the best of our knowledge, ferri-dialkylphosphate compounds in which iron is also bound to tetradentate porphyrin have not been described.

We wish to report evidence for the formation of ferri-porphyrin di-(2-ethylhexyl)-phosphate (hemin DEHP); ferri-porphyrin dioctadecylphosphate (hemin DODP) and ferri-porphyrin

phyrin adenosine monophosphate (hemin AMP) in solution. We have also prepared a solid derivative of protohemin and DEHP.

Solid protohemin di-(2-ethylhexyl)-phosphate was prepared by dissolving chlorohemin in 1 N NaOH and precipitating with DEHP. The mixture was extracted with chloroform, filtered and the solvent removed and replaced with hexane from which a black solid precipitated. Calc. for $C_{34}H_{58}O_4Fe$ [(C₈H₁₇O)₂PO₂]₂ · 2 H₂O: C 61.2; H 8.0; N 4.3; P 4.8; Fe 4.3. Found: C 60.9; H 7.9; N 4.2; P 4.9; Fe 4.2. Maxima in chloroform: 380 sh, 403, 506, 537, 632 nm.

Hemin dialkylphosphate formation was studied by observing changes in spectra in the region 360–660 nm, when chlorohemins were dissolved in a chloroform solution of the tetra-ethylammonium salt of DEHP, DODP or AMP. The spectra of chlorohemin dimethyl ester and protohemin dimethyl ester DEHP, are presented in Fig. 1. The spectra of the phosphate derivatives are typical in their general characteristics [3] of high-spin pentacoordinate iron in hemin. They differ from the spectrum of the corresponding chlorohemin, in that they show a split Soret band in which the more intense peak is at higher wavelength. The maxima between 450 and 660 nm are all shifted to lower wavelengths. The red shift in the Soret band caused by replacing Cl with DEHP as ligand, may be due to the large size of the latter and be an example of the "stereoelectronic" effect of ligand size on metalloporphyrin spectra which Corwin and coworkers [4] have postulated.

The infrared spectrum of the solid derivative, which contains two dialkylphosphate groups, indicates that the phosphoryl groups are different and possibly only one ligand is bound to iron and the second is hydrogen bonded to the first. H-bonded P=O with ν at 1,225 cm⁻¹ is observed as well as bands at 1,120 and 1,170 cm⁻¹ assigned to ν_{sym} POO and ν_{asym} POO, respectively [2, 5, 6].

We are grateful for a grant from The City University of New York for partial support of this work.

Received February 20 and April 24, 1970

[1] Shevchuk, I. A., Skripnik, N. A., Rolesnik, R. I.: Russ. J. Inorg. Chem. **12**, 400 (1967). — [2] Smythe, L. E., Whately, T. L., Warner, R. L.: Inorg. Nucl. Chem. **30**, 1553 (1968), and references cited therein. — [3] Falk, J. E.: Porphyrins and Metalloporphyrins. Amsterdam: Elsevier 1964, p. 82. — [4] Corwin, A. H., et al.: J. Amer. Chem. Soc. **90**, 6577 (1968). — [5] Vorsina, I. A., Levin, I. S.: Russ. J. Inorg. Chem. **14**, 415 (1969); **14**, 795 (1969), in Russian]. — [6] Smith, T. D.: J. Inorg. Nucl. Chem. **9**, 150 (1959).

3,3',4'-Trichlor-4-(3,4-dichloranilino)-azobenzol, ein Abbauprodukt des Herbizides Propanil im Boden

H. A. B. LINKE*

Department of Biochemistry and Microbiology,
Rutgers University, New Brunswick, USA

Bodenmikroorganismen bauen das Herbizid Propanil (3,4-Dichlorpropionanilid) (1) zu 3,4-Dichloranilin (2) ab (Reaktion I) [1]. (2) wird im Boden nach einer noch unklaren Reaktion II zu 3,3',4',4'-Tetrachlor-azobenzol (3) dimerisiert [2]. Offenbar ist

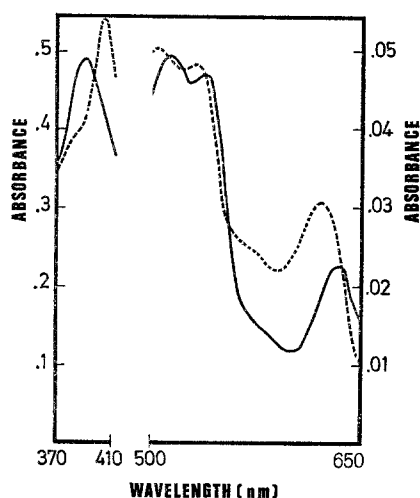
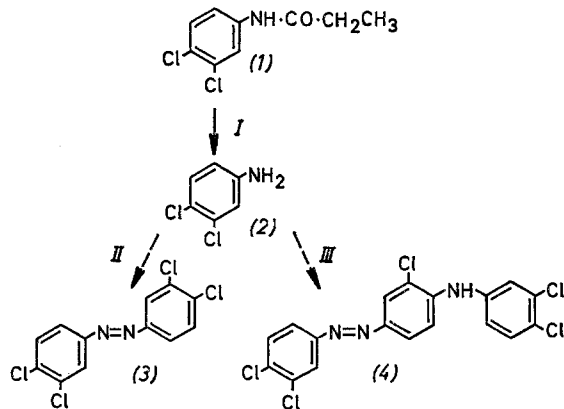


Fig. 1. Chlorohemin dimethyl ester, 2.4×10^{-6} M in $CHCl_3$ (—). Protohemin dimethyl ester di-(2-ethylhexyl)-phosphate, 2.4×10^{-6} M in $CHCl_3$ (---)



dafür freie Peroxidase im Boden [3] verantwortlich, denn es war auch *in vitro* möglich, (3) enzymatisch mit Peroxidase zu synthetisieren [4]. Eine quantitative Analyse der Abbauprodukte von (1) im Boden [5] mit ringmarkiertem ^{14}C -Propanil führte zusätzlich zur Isolierung einer intensiv gelben Substanz (Fp. 147–149 °C, Maxima im Massenspektrum bei 145/147, 173/175, 270/272 und 443/445). Eine Elementaranalyse ergab C 53,66 H 4,26 Cl 33,80 N 7,59. Die Struktur konnte durch Synthese [6] und IR-Spektroskopie sichergestellt werden; es handelt sich um ein 3,3',4,4'-Trichlor-4-(3,4-dichloranilino)-azobenzol (4). Das asymmetrische Azobenzol (4) konnte auch *in vitro* enzymatisch aus (2) mit Peroxidase unter den bereits beschriebenen Bedingungen [4] synthetisiert werden. Dadurch wird es verständlich, daß für die Reaktion III, ähnlich wie bei der Reaktion II, eine Mitbeteiligung von freier Peroxidase im Boden angenommen werden kann.

Da einerseits (1) im Welt-Reisanbau eine große ökonomische Bedeutung erlangt hat und andererseits bei einigen asymmetrischen Azobenzolen eine ausgesprochen cancerogene Wirkung gefunden wurde [7], sollte den Transformationsprodukten solcher Pestizide hinsichtlich ihrer toxologischen Wirkung ein besonderes Augenmerk geschenkt werden.

Eingegangen am 13. April 1970

* Allied Chemical Corporation, Central Research Laboratory, Box 309, Morristown, New Jersey 07960, USA.

[1] Lanzilotta, R. P., Pramer, D.: Appl. Microbiol. **19**, 301 (1970). — [2] Bartha, R., Pramer, D.: Science **156**, 1617 (1967). — [3] Bartha, R., Bordeleau, L.: Soil Biol. Biochem. **1**, 139 (1969). — [4] Bartha, R., Linke, H. A. B., Pramer, D.: Science **161**, 582 (1968). — [5] Linke, H. A. B., Bartha, R.: Bacteriol. Proc. **1970**, 9, A 59. — [6] Rosen, J. D.: Persönliche Mitteilung. — [7] Weisburger, J. H., Weisburger, E. K.: Chem. Eng. News **44** (6), 124 (1966).

Proteolytische Aktivität eines Vogelspinnengiftes

D. MEBS

Institut für Rechtsmedizin der Universität Frankfurt a. M.

Über Enzyme in Spinnengiften liegen nur wenige Untersuchungen vor; so konnte Kaiser [1] im Gift von *Ctenus nigriventer* und *Lycosa raptoria* starke proteolytische Aktivitäten nachweisen. Am Gift einer südamerikanischen Vogelspinne, *Pamphobeteus roseus* (Mello-Leitão, Orthognatha, Familie: Dipluridae), das uns freundlicherweise Prof. Bücherl, Instituto Butantan, São Paulo (Brasilien), zur Verfügung stellte, haben wir daher die proteolytischen Eigenschaften untersucht.

Das Rohgift zeigte gegenüber Casein eine bemerkenswert hohe Aktivität (8250 E./mg; Kunitz-Test [2], eine Einheit ist als die Enzymmenge definiert, die bei 20 min Inkubation, 37 °C, einen Extinktionsanstieg von 0,001 bei 280 nm bewirkt), die mit bei Schlangengiften gemessenen Protease-Aktivitäten vergleichbar ist (*Bothrops nummifera* 8700 E./mg, *Crotalus atrox* 7200 E./mg [3]). Durch Gelchromatographie an Sephadex G-50-, G-75- und Biogel P-60-Säulen konnte das Rohgift in drei proteolytisch aktive Fraktionen (A, B und C) aufgetrennt werden. Ihr pH-Optimum liegt bei 8,5, die spezifische Aktivität beträgt 17 500 (A), 25 000 (B) und 15 000 E./mg (C).

Alle Fraktionen spalten weder N-Benzoyl-L-arginin-äthylester, p-Toluolsulfonyl-L-arginin-methylester, N-Acetyl-L-tyrosin-äthylester noch N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid und werden nicht durch Trasylol, Sojabohnen-, Ovomuroid-, dem Trypsin-spezifischen Inhibitor N-Tosyl-L-lysylchloromethan und dem Chymotrypsin-spezifischen Inhibitor N-Tosyl-L-phenylalanyl-chloromethan gehemmt. Eine Ähnlichkeit mit Trypsin oder Chymotrypsin kann daher ausgeschlossen werden.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Protease-Fractionen gelang durch Dünnschichtchromatographie an Sephadex G-50 (superfine) nach Determann und Michel [4] mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 + 0,5 M NaCl als Elutionsmittel und Cobrotoxin (Toxin aus *Naja naja atra*-Gift [5], Mol.-Gewicht 6950, freundlicherweise von Prof. Yang, Taiwan, überlassen), Cytochrom c, Myoglobin und α -Chymotrypsinogen als Eichsubstanzen. Ihre Wanderungsstrecken wurden auf die des Cytochrom c (= 1) bezogen und die erhaltenen Werte (R_{cyto}) gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen (Fig. 1). Alle drei Protease-Fractionen zeigten unter-

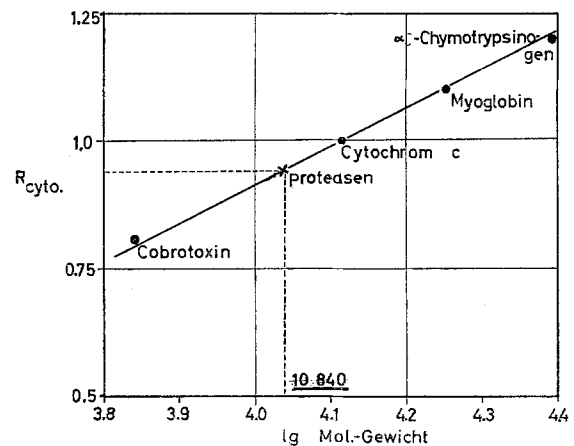


Fig. 1. Molekulargewichtsbestimmung durch Dünnschichtchromatographie an Sephadex G-50 (superfine)

einander die gleichen Wanderungsstrecken, ihr Molekulargewicht wurde mit 10840 ± 620 ($n = 30$) bestimmt. Danach scheint es sich um ein Enzym zu handeln, das bei der Gel-filtration zu höhermolekularen Formen assoziierte.

Proteasen mit ähnlich geringem Molekulargewicht wurden bisher nur bei Invertebraten, ebenfalls bei Arthropoden, nachgewiesen, so bei Hornissenlarven (*Vespa orientalis*; Mol.-Gew. 12 500 [6]) und beim Flußkrebs (*Astacus leptodactylus*; Mol.-Gew. 11 000 [7]). Das Vorkommen starker proteolytischer Aktivität in Spinnengiften weist auf ihre Bedeutung für eine extrakorporale Verdauung hin.

Eingegangen am 18. März und 13. April 1970

[1] Kaiser, E.: Monatsh. Chemie (Wien) **84**, 482 (1953). — [2] Kunitz, M.: J. Gen. Physiol. **30**, 291 (1947). — [3] Mebs, D.: Inter. J. Biochem. (im Druck). — [4] Determann, H., Michel, W.: J. Chromatog. **25**, 303 (1966). — [5] Yang, C. C., et al.: Toxicon **7**, 43 (1969). — [6] Sonneborn, H. H., et al.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **350**, 389 (1969). — [7] Pfeleiderer, G., et al.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **348**, 1319 (1967).

DNS-Synthesezeit und mittlere Generationsdauer der Mammapithelien der Ratten in Abhängigkeit vom Brunstzyklus

Autoradiographische Untersuchung

W. FÉAUX DE LACROIX, U. LÖHRS,

K. J. LENNARTZ und M. EDER

Pathologisches Institut der Universität Köln

Pathologisches Institut der Universität München

Eine Änderung des Zellzyklus des Uterus- und Vaginalepithels von Maus und Ratte in Abhängigkeit vom Brunstzyklus ist bekannt [1–3]. Bresciani [4] konnte zeigen, daß sich die DNS-Synthesezeit des Mammapithels kastrierter weiblicher