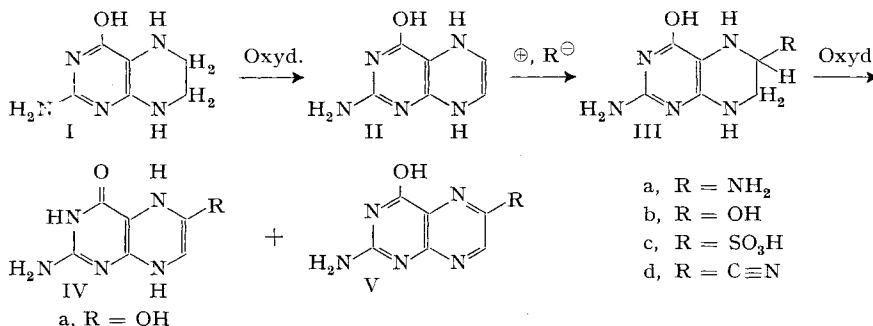


128. Über Pterinchemie

3. Mitteilung¹⁾Reaktion von $\text{CN}^\ominus$ mit hydriertem 2-Amino-6-hydroxy-pteridinvon H. S. Forrest²⁾, C. Van Baalen²⁾, M. Viscontini³⁾ und M. Piraux³⁾

(12. IV. 60)

Neuere Arbeiten in unseren Laboratorien haben gezeigt, dass 2-Amino-6-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-pteridin (I) sehr leicht durch intermediäre Bildung von den drei möglichen Dihydro-Derivaten zum 2-Amino-6-hydroxy-pteridin oxydiert werden kann¹⁾. Eines von diesen intermediären Dihydro-Derivaten, wahrscheinlich das 7,10-*para*-Dihydropteridin II, kann mit nucleophilen Reagentien unter Bildung von 8-substituierten Tetrahydropteridinen III reagieren, welche nach Oxydation an der Luft entweder zu normalen 8-substituierten Pteridinen V oder zu Dihydropteridinen IV führen, die durch ihre 8-Substitution stabilisiert sind. So wurden das 2,8-Diamino-6-hydroxy-pteridin (Va) und das Xanthopterin (Vb) durch Oxydation in Gegenwart von NH_4OH oder NaOH ⁴⁾, die 2-Amino-6-hydroxy-pteridin-8-sulfonsäure (Vc) und ein Dihydroxanthopterin IVa durch Oxydation in Gegenwart von Sulfid und NH_4OH erhalten¹⁾.



Um die Gültigkeit dieser theoretischen Überlegungen zu prüfen, haben wir gleichzeitig und unabhängig voneinander in unseren beiden Laboratorien das Verhalten der $\text{CN}^\ominus$ -Ionen während der Oxydation von I an der Luft studiert. Es wäre denkbar, dass durch nucleophile Addition von $\text{CN}^\ominus$ an das Dihydropteridin II ein Pteridin-8-nitril Vd entsprechend dem oben erwähnten Schema entstehen würde. Tatsächlich isoliert man nach der Oxydation ein gelbes, stark gelbgrün fluoreszierendes, gut kristallisierendes Produkt, dessen Summenformel $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_6$ einem 2-Amino-6-hydroxy-dihydro-pteridin-8-carboxamid (VII) entspricht.

¹⁾ 2. Mitteilung: M. VISCONTINI & H. R. WEILENMANN, *Helv.* **42**, 1854 (1959).

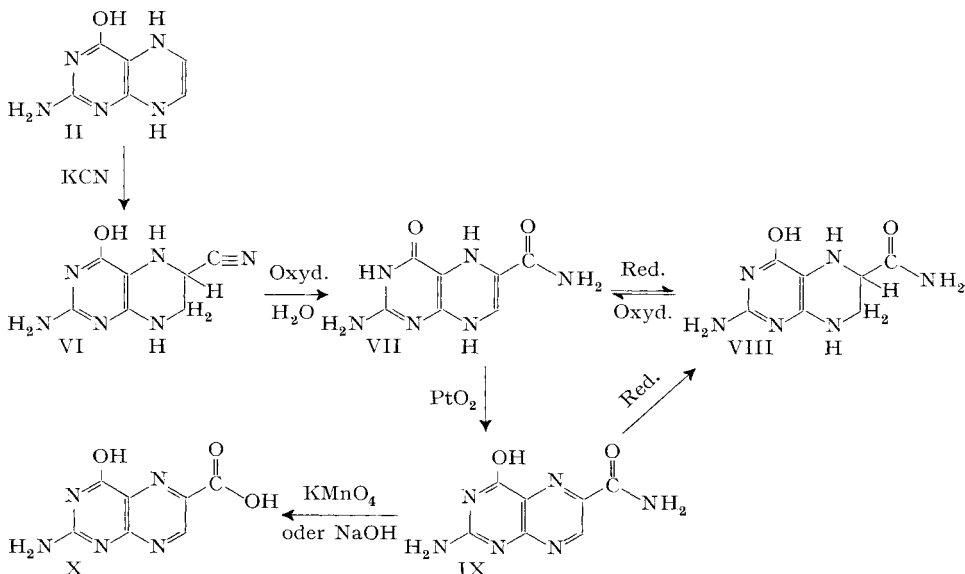
²⁾ Genetics Foundation, the University of Texas, Austin 12 (USA).

³⁾ Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich.

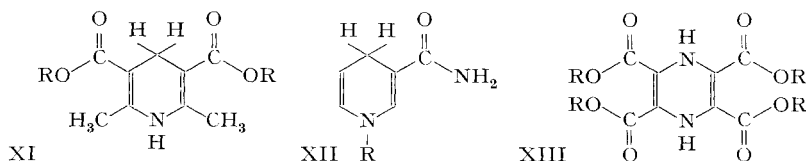
⁴⁾ C. VAN BAALEN & H. S. FORREST, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 1770 (1959).

Die Richtigkeit dieser Struktur wurde physicochemisch und chemisch folgendermassen bewiesen:

1. Das neue Produkt VII ist ein Dihydropteridin: a) Sein UV.-Absorptionsspektrum (Fig. 1) zeigt mit den bisherigen bekannten Spektren von carboxylierten Dihydropyridinen und Dihydropyrazinen eine auffallende Analogie. Wir denken vor



allem an die HANTZSCH'schen Basen XI⁵⁾, an die N-substituierten Dihydronicotylamide XII⁵⁾ und an die von MAGER & BERENDS⁶⁾ synthetisierten Dihydropyrazine XIII. In jedem Fall zeigen die UV.-Spektren der hydrierten Substanzen, verglichen mit denjenigen ihrer entsprechenden aromatischen Ausgangsprodukte, eine sehr deutliche bathochrome Verschiebung. Diese Verschiebung scheint für die carboxylierten Dihydro-Heterocyclen ein Characteristicum zu sein.



b) Das Produkt VII ist weder anfallend sauer noch anfallend basisch. Seine pK -Werte von 1,75 und 9,6 bestätigen die sehr schwache Basizität und Acidität des Produktes, entsprechend den Drosopterinen, den Sepiapterinen⁷⁾⁸⁾ und dem durch Oxydation des Tetrahydropteridins I entstandenen Dihydroxanthopterin IVa, welche alle hydrierte Pterine darstellen.

⁵⁾ W. TRABER & P. KARRER, *Helv.* **41**, 2066 (1958).

⁶⁾ H. I. X. MAGER & W. BERENDS, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, **78**, 109 (1959).

⁷⁾ M. VISCONTINI & E. MÖHLMANN, *Helv.* **42**, 1679 (1959).

⁸⁾ H. S. FORREST, D. HATFIELD & C. VAN BAALen, *Nature* **183**, 1269 (1959).

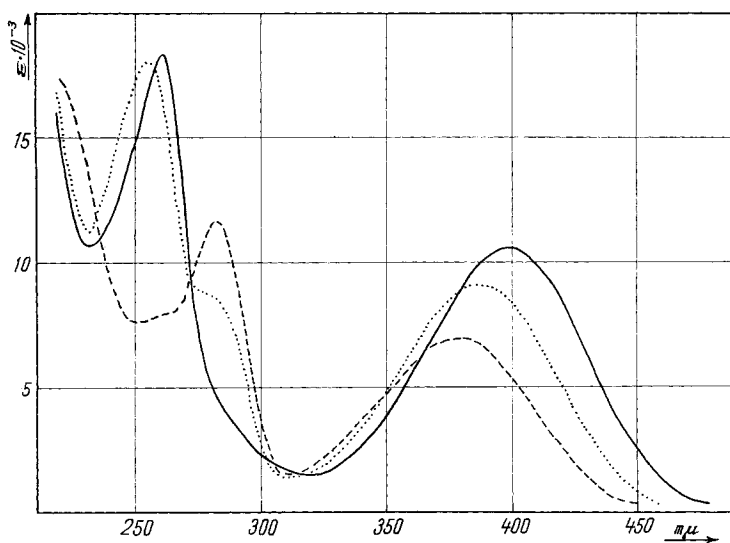


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektren von 2-Amino-6-hydroxy-7,10-dihydro-pteridin-8-carboxamid (VII)
 --- pH 2 pH 7 ——— pH 12

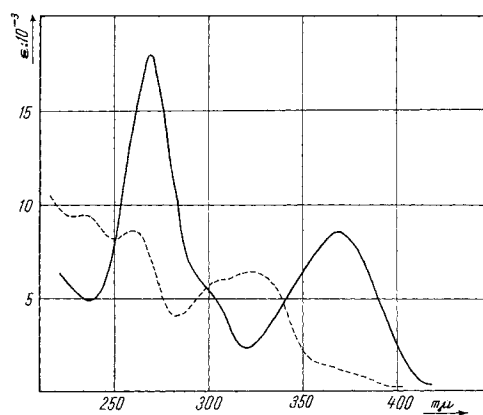


Fig. 2. UV.-Absorptionsspektren von 2-Amino-6-hydroxy-pteridin-8-carboxamid (IX)
 --- pH 2 ——— pH 12

c) Bei bestimmten Bedingungen lässt sich VII unter Aufnahme von einem Mol H_2 katalytisch reduzieren und man erhält ein farbloses, unbeständiges, sich an der Luft leicht oxydierendes Produkt VIII. Am Ende der Rückoxydation findet man das Ausgangsmaterial VII wieder.

2. Das neue Produkt VII ist in 8-Stellung substituiert: a) Oxydiert man Produkt VII unter schonenden Bedingungen mit PtO_2 , so entsteht ein neues, blau fluoreszierendes, nicht hydriertes Pterin, dessen UV.-Spektrum (Fig. 2) demjenigen der Pteridin-8-carbonsäure ähnlich ist. Die Summenformel dieses Pterins $C_7H_6O_2N_6$ entspricht der Formel von 2-Amino-6-hydroxy-pteridin-8-carboxamid (IX).

b) Dieses Pteridin IX lässt sich unter schärferen Bedingungen zur Pteridin-8-carbonsäure (X), die wir eindeutig charakterisiert haben (UV.-Spektren, Papierchromatographie), oxydieren oder hydrolysieren.

3. Das Produkt VII ist nicht ein Nitril, sondern ein Amid: Sein IR.-Spektrum (Fig. 3) zeigt die --CO--NH-- -Bande bei $5,9 \mu$, nicht aber bei $4,5 \mu$ die für die $\text{--C}\equiv\text{N--}$ -Gruppe typische Bande. Es ist anzunehmen, dass nach der nucleophilen Addition des $\text{--C}\equiv\text{N--}$ -Restes an das Dihydropteridin II die Dreifachbindung leicht hydratisiert und in eine Carboxamid-Gruppierung umgewandelt wird.

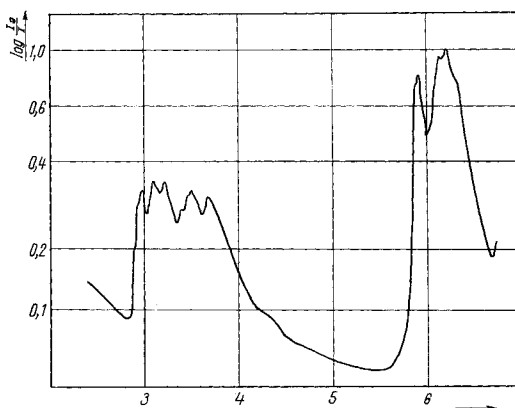


Fig. 3. IR.-Spektrum von 2-Amino-6-hydroxy-7,10-dihydro-pteridin-8-carboxamid (VII)

Es bleibt nun noch übrig, die Lage der 2 Wasserstoffatome des so erhaltenen dihydrierten Pterins VII zu ermitteln. Wenn man die schon bekannte Reihe der Dihydro-pyrazine bzw. -pyridine studiert, fällt eindeutig auf, dass von allen die *para*-dihydrierten Derivate die beständigsten sind. Da nun das neue Dihydropteridin VII verhältnismässig beständig ist und sich nicht in ein anderes Dihydropteridin umlagert, nehmen wir an, dass es sich ebenfalls um ein *p*-Dihydropteridin handelt.

Zum Schluss möchten wir noch kurz erwähnen, dass sich das schwer zu reduzierende 2-Amino-6-hydroxy-7,10-dihydro-pteridin-8-carboxamid (VII) gegenüber NaBH_4 recht beständig verhält, wie übrigens auch die bekannten Dihdropyridine. Diese Tatsache ist für die Konstitutionsaufklärung der Drosopterine und Sepiapterine von grosser Bedeutung. Wie wir schon in früheren Veröffentlichungen angedeutet haben⁷⁾⁹⁾, wird wahrscheinlich während der NaBH_4 -Reduktion das Gerüst dieser Pigmente nicht verändert, sondern nur ihre Seitenketten reduziert.

Die Mikroanalysen und die IR.-Spektren wurden in Austin und im Mikrolabor in Zürich unter Leitung von Herrn H. FROHOFER ausgeführt bzw. aufgenommen.

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG und der ROBERT A. WELCH FOUNDATION, Houston, Texas, danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Herr Dr. M. PIRAUX, chargé de recherche, und Herr C. VAN BAALen danken dem FONDS NATIONAL BELGE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE bzw. der NATIONAL SCIENCE FOUNDATION für Stipendien.

⁹⁾ M. Viscontini, *Helv.* **41**, 1299 (1958); M. VISCONTINI & E. MÖHLMANN, *Helv.* **42**, 836 (1959).

Experimentelles. – 2-Amino-6-hydroxy-7,10-dihydro-pteridin-8-carboxamid (VII). Herstellung in Austin: 400 mg 2-Amino-6-hydroxy-pteridin wurden in möglichst wenig 0,1N NaOH gelöst und mit 200 mg Py als Katalysator hydriert. Die Wasserstoffaufnahme verlief langsam, aber das Ende der Hydrierung konnte einfach durch das Verschwinden der blauen Fluoreszenz der Lösung festgestellt werden. Der Katalysator wurde dann so rasch wie möglich abfiltriert und das Filtrat mit 800 mg KCN und 3 g MnO_2 versetzt. Nach einigen Min. wurde das MnO_2 abfiltriert und das neue Filtrat 18 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen, nachdem das pH mit Hilfe von Essigsäure auf 4 gebracht worden war. Der gebildete gelbe Niederschlag wurde abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert. Das Pterin VII fiel in gelben Nadeln aus.

Rf-Werte verschiedener Pteridinderivate

Lösungsmittel	n-Propanol 1-proz. NH_4OH 2:1	Butanol, CH_3COOH , H_2O 4:1:5	4-proz. Natrium- citrat	H_2O
Dihydropteridin VII	0,13	0,18	0,13	0,10
Pteridin-8-carboxamid IX	0,18	0,16	0,15	0,43
Hydrolyse- oder Oxydationsprodukt von IX	0,14	0,17	0,41	
Pteridin-8-carbonsäure	0,14	0,17	0,41	

Herstellung in Zürich: Nach der vollständigen Hydrierung von 2 g 2-Amino-6-hydroxy-pteridin in 0,1N NaOH wurde zuerst die Lösung mit 2 g KCN versetzt und nachher das Pt abfiltriert. Das Filtrat wurde eine Woche bei Zimmertemperatur stehengelassen und das Dihydropterin VII durch Chromatographie an einer Papiersäule mit Wasser als Lösungsmittel isoliert. Von 200 mg des so erhaltenen Pterins wurden 100 mg in 500 ml warmem Wasser gelöst, dem 5 ml konz. NH_4OH zugefügt waren. Beim einfachen Stehenlassen an der Luft verdünnte sich das Ammoniak allmählich und das Dihydropterin VII kristallisierte in langen gelben Nadeln sehr langsam aus. Ausbeute 60 mg. Die pK-Werte des Dihydropterins wurden durch Spektrophotometrie in 15 Pufferlösungen ermittelt; sie betragen 1,75 und 9,6. Rf-Werte in verschiedenen Lösungsmitteln s. Tabelle.

$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_6$ (208,18) Ber. C 40,38 H 3,87 N 40,37 +
 Gef. „ 40,5 „ 4,0 „ 40,9% (Austin)
 Gef. „ 40,42 „ 4,22 „ 40,42% (Zürich)

2-Amino-6-hydroxy-pteridin-8-carboxamid (IX). 50 mg Dihydropteridin VII wurden in 500 ml schwach alkalischem Wasser gelöst und zur Lösung 100 mg PtO_2 gegeben. Nach 10-tägigem Rühren hat man das PtO_2 abfiltriert. Die ursprünglich gelbgrüne Fluoreszenz der Lösung war durch eine hellblaue ersetzt und die gelbe Farbe der Lösung war verschwunden. Das gebildete Produkt IX fiel bei Neutralisation und Einengen aus. Es wurde abfiltriert und wie das Dihydropteridin VII aus Wasser-Ammoniak durch einfaches Verdunsten des Ammoniaks langsam umkristallisiert. Farblose Mikrokristalle, die intensiv blau fluoreszieren. Ausbeute 20 mg.

$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2\text{N}_6$ (206,17) Ber. C 40,78 H 2,93 N 40,77% Gef. C 40,02 H 4,69 N 40,22%

Das Pteridin IX wird ebenfalls durch Oxydation von VII durch Brom, Kaliumferricyanid, Natriumperiodat, KMnO_4 usw. gebildet. Es bildet sich auch am Sonnenlicht oder durch 4-stdg. Erhitzen einer wässrigen Lösung von VII im Vakuum bei 260°. Rf-Werte s. Tabelle.

Pteridin-8-carbonsäure X aus dem Pteridin IX. 5 mg reines Pteridin IX wurden in 10 ml 1N NaOH gelöst und mit überschüssigem KMnO_4 einige Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nachdem die Oxydation beendet war, wurde das noch vorhandene KMnO_4 mit Sulfid reduziert, die Lösung neutralisiert, das MnO_2 abfiltriert und das entstandene blau fluoreszierende Pteridin an einer Papiersäule chromatographiert. Dieses Pteridin erwies sich als reine 2-Amino-6-hydroxy-pteridin-8-carbonsäure (X). Diese Pteridincarbonsäure entsteht auch durch Hydrolyse des Pteridins IX mit 2N HCl während 1 Std. bei 100°.

Katalytische Hydrierungen. Alle Mikrohydrierungen (0,25–0,5 mg Substanz) wurden in einem WARBURG-Apparat bei 25° und unter normalem Druck durchgeführt.

a) Dihydropteridin VII. Die Aufnahme von Wasserstoff betrug 0,95 Mol/Mol in 0,1N NaOH oder in CH_3COOH mit Pd als Katalysator. Die gelbe Farbe und die gelblichgrüne Fluoreszenz der Lösung verschwanden während der Hydrierung. Bei Stehenlassen an der Luft traten Farbe und Fluoreszenz wieder auf und das Ausgangsmaterial VII liess sich nachweisen. Mit Platin als Katalysator verläuft die Hydrierung sehr langsam und dauert länger als 48 Std.

b) Pteridin IX. In 0,1N NaOH mit Pd betrug die Aufnahme von Wasserstoff 1,8 Mol/Mol. Zu Beginn der Hydrierung wird die Lösung gelb, und diese Farbe bleibt, bis die Reduktion beendet ist. Gegen Schluss der Hydrierung verschwinden die gelbe Farbe und die gelblichgrüne Fluoreszenz. Bei Stehenlassen an der Luft treten beide wieder auf. In der wieder oxydierten Lösung lässt sich das Dihydropteridin VII leicht nachweisen. Die Hydrierung mit Pt als Katalysator gelang nicht.

SUMMARY

The reaction of cyanide ion with reduced 2-amino-6-hydroxy-pteridine yields 2-amino-6-hydroxy-dihydro-pteridine-8-carboxamide. Evidence is presented that the hydrogens are in the 7 and 10 positions. They can be readily removed by a number of mild oxidizing agents.

Austin, Zoological Department, University of Texas, USA
Zürich, Organisch-chemisches Institut der Universität

129. Nachweis kleiner Mengen Trehalose und verwandter Zucker in einem Gemisch

von M. Wyss-Huber, Herb. Jäger und Ek. Weiss

(14. IV. 60)

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über den Trehalosegehalt von Organen der Tsetsefliege¹⁾ erwies es sich als notwendig, eine Methode zur Bestimmung möglichst aller in diesen Organen vorhandenen Zucker auszuarbeiten. Nach dem von WYATT & KALF²⁾ benützten Verfahren werden enzymatisch mit Trehalase, Glucoseoxydase, Peroxydase und o-Dianisidin³⁾ nur Trehalose und Glucose nachgewiesen. EVANS & DETHIER⁴⁾ trennten und identifizierten Zucker aus Insektenhämolymph papierchromatographisch unter Nachweis der Zucker nach einer Modifikation der Silbermethode von TREVELYAN *et al.*⁵⁾. Quantitative Bestimmungen der Zucker führten sie mit Hilfe der Anthronreaktion⁶⁾ durch. Für ihre Methode wird jedoch mehr Material benötigt, als es in unserem Falle zu erwarten war. Da uns nur sehr wenig Material mit einem sehr geringen, in seiner Zusammensetzung noch unbekannten Zuckergehalt zur Verfügung steht (2–20 γ Trehalose pro 100 mg Gewebe¹⁾), ist

¹⁾ R. GEIGY, M. HUBER, D. WEINMANN & G. R. WYATT, *Acta tropica* **16**, 255 (1959). – Diese Arbeiten werden vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS subventioniert.

²⁾ G. R. WYATT & G. F. KALF, *J. gen. Physiol.* **40**, 833 (1957).

³⁾ A. ST. HUGGETT & D. A. NIXON, *Biochem. J.* **66**, 12 (1957).

⁴⁾ D. R. EVANS & V. G. DETHIER, *J. Insect Physiol.* **7**, 3 (1957).

⁵⁾ W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER & J. S. HARRISON, *Nature* **166**, 444 (1950).

⁶⁾ R. J. DIMLER, W. C. SCHAEFER, C. S. WISE & C. E. RIST, *Analyt. Chemistry* **24**, 1411 (1952).