

Herren Dres. B. PRIJS und Th. KADEN für die Durchsicht des Manuskriptes dankbar. Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG sei für Unterstützung unserer Arbeiten gedankt.

SUMMARY

The catalytic properties in H_2O_2 decomposition of Ni^{2+} -chelates of the following ligands have been investigated: ethylenediamine, diethylenetriamine, triethylenetetramine, 2,2'-bipyridine, pyrophosphate and ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, and of the following peptides and peptide-like ligands: glycylglycine, N,N'-diglycyl-ethylenediamine, N,N'-diglycyl-1,5-diaminopentane and polymyxin B.

Only if not all the coordination positions of Ni^{2+} are occupied, *i.e.* only if a ternary peroxy complex can be formed, Ni^{2+} - (or Cu^{2+} -) chelates show catalytic activity. Evidence is given that the ternary complex is formed with HOO^- . The stability constant of such a complex between HOO^- and the Ni^{2+} -2,2'-bipyridine chelate is estimated ($\log K_{Ni-dipy}^{Ni-dipy} \cong 4.5$)

Institut für anorganische Chemie,
Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. ERLLENMEYER, U. MÜLLER & H. SIGEL, *Helv.* **49**, 681 (1966).
- [2] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER & E. BÖHNI, *Helv.* **48**, 1161 (1965).
- [3] H. ERLLENMEYER, H. SIGEL, H. CH. CURTIUS & P. ANDERS, *Helv.* **49**, 19 (1966).
- [4] H. ERLLENMEYER, H. BRINTZINGER, H. SIGEL & H. CH. CURTIUS, *Experientia* **21**, 371 (1965).
- [5] H. SIGEL & U. MÜLLER, *Helv.* **49**, 671 (1966).
- [6] H. BRINTZINGER & H. ERLLENMEYER, *Helv.* **48**, 826 (1965).
- [7] M. K. KIM & A. E. MARTELL, *Biochemistry* **3**, 1169 (1964).
- [8] a) Th. KADEN & S. FALLAB, *Helv.* **44**, 714 (1961); b) G.-M. SCHWAB & G. GREGER, *Z. physikal. Chem.* **13**, 248 (1957).
- [9] H. BRINTZINGER, *Helv.* **44**, 744 (1961).
- [10] R. B. MARTIN, M. CHAMBERLIN & J. T. EDSALL, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 495 (1960).
- [11] Th. KADEN, private Mitteilung.
- [12] C. J. BALLHAUSEN & A. D. LIEHR, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 538 (1959).
- [13] H. SIGEL & H. BRINTZINGER, *Helv.* **47**, 1701 (1964).
- [14] V. A. KARGIN, *Z. anorg. allg. Chem.* **183**, 77 (1929).
- [15] L. L. INGRAHAM, *Arch. Biochem. Biophysics* **81**, 309 (1959).

101. Über Pterinchemie

14. Mitteilung [1]

**Neues Verfahren zur Darstellung und Stabilisierung
von Tetrahydrofolsäure und Tetrahydropterin**

von **A. Bobst** und **M. Viscontini**

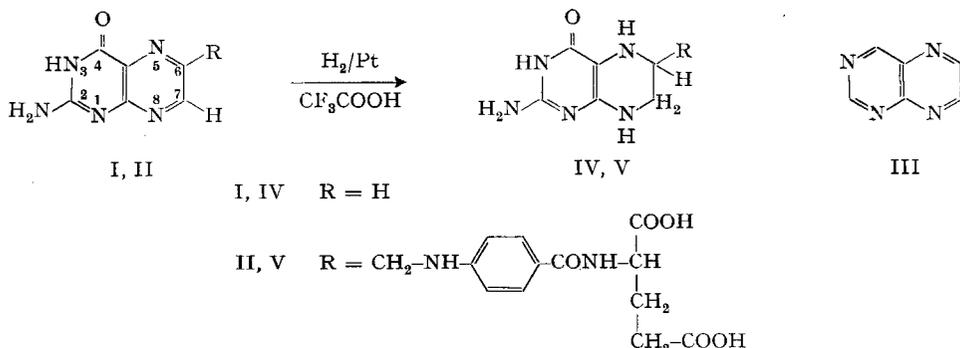
(28. XII. 65)

In unserer 9. und in unserer 13. vorläufigen Mitteilung [2] [1] berichteten wir über Tetrahydropterine und deren Reoxydationsmechanismus zur Dihydrostufe. Diese Arbeiten wären nicht möglich gewesen, wenn wir damals nicht ein neues Verfahren zur Hydrierung des Pterins (I), dessen Derivate und der Folsäure (II) gefunden hätten. Dienlich war auch die Ausarbeitung einer Methode zur Stabilisierung der

hochreaktiven Verbindungen. Besonders die Gewinnung stabiler Tetrahydropterine ermöglichte es uns, einige physikalische Daten von hydrierten Pterinen genauer zu bestimmen. Heute beschreiben wir ausführlich die Herstellungsmethode der hydrierten Pterine und deren Stabilisierung.

Die erste grössere Arbeit über die Hydrierung substituierter Pterine erschien 1947 im Zusammenhang mit der Reduktion der Folsäure [3]. Wegen der Unbeständigkeit der erhaltenen Produkte war es den Autoren nicht gelungen, die hydrierten Pterine zu isolieren. Man nahm an, dass bei der katalytischen Hydrierung von Pterinderivaten nur der Pyrazinkern angegriffen wird [4], da bekannt war, dass sich der Pyrimidinkern, besonders im basischen Milieu, nur sehr schwer katalytisch reduzieren lässt [5]. Die Richtigkeit dieser Annahme konnten wir erstmals beweisen, als wir in den NMR.-Spektren (in Trifluoressigsäure aufgenommen) der in unserem Laboratorium rein hergestellten tetrahydrierten Pterine ein Methylen-singulett bei 3,93 ppm fanden. Einen weiteren Hinweis, der schon früher herangezogen worden war [6], erhielten wir durch einen Vergleich der UV.-Spektren unserer hydrierten Produkte mit dem Spektrum des 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidins, das nun erstmals in verschiedenen pH-Bereichen (Fig. 1 und 2) gemessen wurde.

Die Hydrierung des Pterins (I) ist im Gegensatz zu derjenigen des unsubstituierten Pteridins (III) wesentlich schwerer, da die Resonanzenergie beim Pterin um $0,48 \beta$ grösser ist. Diese Stabilisierung rührt von der Amino- und der Hydroxyl-Gruppe her, die Elektronen an die Elektronenmangel aufweisende π -Schicht des Heterocyclus abgeben können. Das Pteridin (III) ist nämlich wegen seines hohen N:C-Verhältnisses keine wirklich aromatische Substanz. Es wird aber zu einer solchen durch Einführung elektronenspendender Substituenten. Diese Tatsache erklärt ebenfalls die von TAYLOR [7] gemachte Feststellung, dass Tetrahydropteridin stabiler als Tetrahydropterin (IV) ist. Bei der Hydrierung des Pterins (I) beträgt der Verlust an Re-



sonanzenergie $1,18 \beta$ [8]. Deshalb ist es auch nicht erstaunlich, dass die Pterine nur unter sehr energischen Bedingungen hydriert werden können und die reduzierten Produkte gegenüber Oxydationsmitteln äusserst unbeständig sind.

Die Hydrierung mit PtO₂ als Katalysator in 1N NaOH als Lösungsmittel verläuft sehr langsam (Fig. 3). Im neutralen Bereiche ist wegen der Unlöslichkeit des Pterins (I) in Lösungsmitteln wie Wasser, Äthanol, Dimethylformamid usw. keine Hydrierung möglich. Im sauren Bereiche besteht die Gefahr, dass neben dem Pyrazinkern

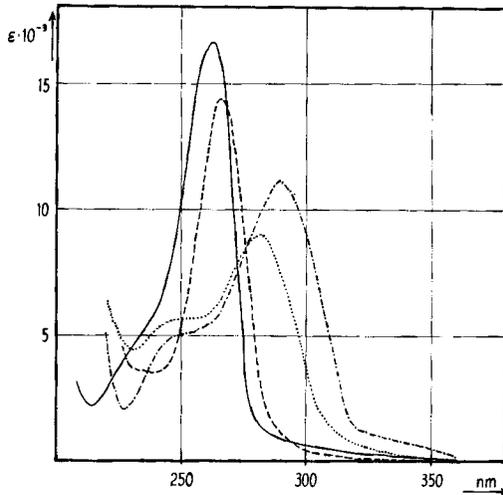


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektrum vom Sulfat des Tetrahydropterins (IV)

- 2,12N HCl
- - - - - pH 3,5 (0,1M CH₃COOH)
- · - · - pH 8 (0,1M Trispuffer)
- 0,1N KOH

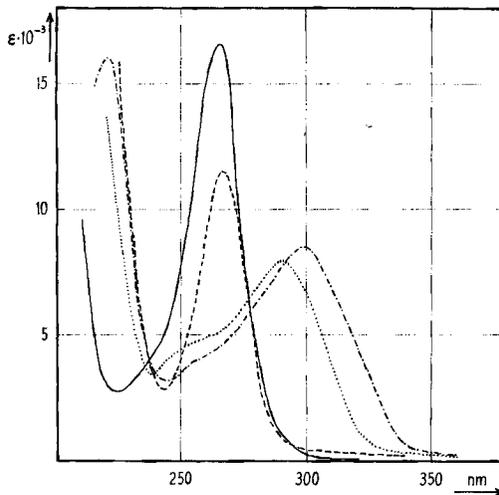


Fig. 2. UV.-Absorptionsspektrum vom Sulfat des 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidins

- 1N HCl
- - - - - pH 3,5 (0,1M CH₃COOH)
- · - · - pH 8 (0,1M Trispuffer)
- 0,1N KOH

auch der Pyrimidinkern angegriffen wird, da sich Pyrimidine im sauren Milieu reduzieren lassen [9]. Bei Versuchen in wässrigen HCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen erhielten wir das beste Resultat mit einer 1N Lösung. Beim Arbeiten mit kleineren Säurekonzentrationen sinkt einerseits die Löslichkeit des Pterins (I) und

andererseits steigt die Aktivität des Katalysators beträchtlich, da weniger Chlor-Ionen zugegen sind, die ihn partiell vergiften können. In 0,05 N HCl-Lösung wurden so bei zweimaligem Hinzufügen von Katalysator und bei 12stündiger Hydrierung sowohl der Pyrazin- als auch der Pyrimidin-Kern hydriert. Bei Säurekonzentrationen über 1 N sinkt die Aktivität des Katalysators so sehr, dass die Hydrierung nicht zu Ende geführt werden kann. In 1 N HCl ist die Hydrierungsgeschwindigkeit ca. 1,5 mal grösser als in 1 N NaOH. Wir fanden ausserdem, dass die Hydrierung in NaOH oder HCl zu Nebenprodukten führt, denn das Hydrierungsprodukt von papierchromatographisch reinem Pterin (I) zeigt im UV.-Licht bei pH 1 neben dem Absorptionsmaximum bei 265 nm eine etwas langwelligere schwache, aber fremde Absorptionsbande (die übrigens früher auch dem Tetrahydropterin (IV) zugeordnet wurde [10]). Nach der Hydrierung der Pterine in den erwähnten Lösungsmitteln erhält man die Hydrierungsprodukte rein erst durch Umkristallisieren, was bei der Unbeständigkeit dieser Stoffe sehr schwierig ist.

Eisessig kommt für die Hydrierung als Lösungsmittel ebenfalls nicht in Betracht, da das Pterin (I) darin kaum löslich und daher die Hydrierungszeit zu gross ist. Ameisensäure, in der sich das Pterin (I) gut löst, ist schon früher [11] für die Hydrierung von Pterinderivaten beigezogen worden. Das zu hydrierende Produkt soll dabei 2 Mol-Äq. Wasserstoff aufgenommen haben; wir beobachteten aber immer nur Aufnahme von $1\frac{1}{2}$ Mol-Äq. Wasserstoff in diesem Lösungsmittel. Überdies ergaben NMR.-Spektren, dass kein reines Tetrahydropterin gebildet wurde. Zu guten Resultaten führten jedoch Hydrierungen in halogenierten Carbonsäuren, besonders in Trifluoressigsäure, mit Platin bzw. Rhodium als Katalysator (vgl. Fig. 3).

In Fig. 3 entspricht die Horizontale bei 8,06 cm³ einer Aufnahme von 2 Mol Wasserstoff pro Mol Pterin (I). Aus den Kurven ist deutlich ersichtlich, dass die Hy-

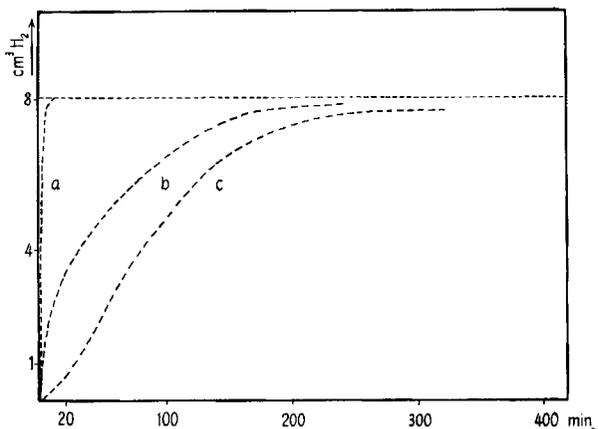


Fig. 3. Hydrierung von Pterin (I) zu 5,6,7,8-Tetrahydropterin (IV) in verschiedenen Lösungsmitteln (Katalysator: PtO_2)

Druck und Temperatur sind auf Normalbedingungen reduziert

Kurve a: H_2 -Aufnahme von 0,18 mMol Pterin in CF_3COOH

Kurve b: H_2 -Aufnahme von 0,18 mMol Pterin in 1 N HCl

Kurve c: H_2 -Aufnahme von 0,18 mMol Pterin in 0,1 N NaOH

drierung des Pterins (I) in Trifluoressigsäure etwa 30mal rascher als in 1N HCl und wesentlich schneller als in 0,1N NaOH vor sich geht. Wie die UV.-Spektren des hydrierten Produktes zeigen, ist in Trifluoressigsäure reines Tetrahydropterin entstanden. Mit Hilfe dieses Verfahrens haben wir alle in der 9. Mitteilung [2] beschriebenen Modellverbindungen¹⁾ und neuerdings auch die Folsäure (II) hydriert. Zur Isolierung der auf diese Weise erhaltenen Tetrahydropterine müssen sie vorerst stabilisiert werden. Um prinzipiell eine Beständigkeit der Verbindungen gegenüber Sauerstoff zu erwirken, muss im Ringsystem die Elektronendichte heruntermgesetzt werden. Dies lässt sich entweder durch Einführung von Substituenten mit -M- und -I-Effekt oder durch Protonierung der basischen Zentren der Molekeln erreichen. Die erste Möglichkeit kam für unsere Versuche nicht in Frage, da sich zur Stabilisierung nur Substituenten eignen (z. B. Acyl-, Nitro-Gruppen), die nicht ohne weiteres wieder abgespalten werden können. Dagegen erwies sich die Anlagerung eines Protons zur Erhöhung der Beständigkeit der hydrierten Pterine in unserem Falle als günstig.

Wir fanden, dass die in der 13. Mitteilung [1] beschriebenen Produkte (Tetrahydropterin (IV), (N-2')-Dimethyl-tetrahydropterin, (N-8)-Methyl-tetrahydropterin und (N-3)-Methyl-tetrahydropterin) verhältnismässig stabile Dihydrochloride geben, die leider etwas hygroskopisch und an der Luft nicht unbeschränkt haltbar sind; mit der Zeit verfärben sie sich leicht rötlich. Durch Aufbewahren unter Lichtausschluss und im Exsiccator über Phosphorpentoxid lässt sich die Autoxydation merklich verzögern. Jedoch bilden Tetrahydropterin (IV) und Tetrahydrofolsäure (V) beständige Sulfate.

Wegen der Unbeständigkeit der hydrierten Pterine in wässrigen Lösungen, besonders bei pH-Werten über 3, sind gewisse Vorsichtsmassnahmen bei der Aufnahme ihrer UV.-Spektren erforderlich. Bei den bisher veröffentlichten Spektren hydrierter Pterine in neutralem bzw. basischen Milieu handelt es sich zum Teil um schon halbwegs oxydierte Produkte.

Versuche, im pH-Bereich über 3 die Autoxydation der hydrierten Produkte durch Zugabe von Thiol (Äthylmercaptan) oder von Natriumborhydrid zu hemmen, waren erfolglos, wie die UV.-spektroskopische Verfolgung der Oxydation [1] zeigte. Nachdem wir jedoch den im Lösungsmittel enthaltenen Sauerstoff durch Einleiten von gereinigtem Stickstoff (Pyrogallol) verdrängt hatten, konnten wir sowohl neutrale als auch basische Lösungen hydrierter Pterine zubereiten, die einige Stunden stabil waren, falls sie dem UV.-Licht nicht ausgesetzt waren.

Beim Vergleich der UV.-Spektren des Tetrahydropterins (IV) mit denjenigen des 2,5,6-Triamino-4-hydroxy-pyrimidins (Fig. 1 und 2) fällt die grosse Ähnlichkeit der Spektren in den verschiedenen pH-Bereichen auf, in denen die Molekeln als Dikation, Monokation, in der Neutralform und als Anion vorliegen. Anscheinend ist das für die Absorption des Lichtes verantwortliche Elektronensystem in allen diesen Formen gleich. Das UV.-Spektrum der Tetrahydrofolsäure (V) ist in Fig. 4 abgebildet.

Die NMR.-Spektren der hydrierten Pterine wurden sofort nach ihrer Hydrierung in CF_3COOH vermessen, da die Lage der Protonensignale durch die Anwesenheit von Chlorid- bzw. Sulfat-Ionen beeinflusst wird.

¹⁾ Die Synthesen dieser Modellpterine werden demnächst in dieser Zeitschrift publiziert.

Zur Aufnahme der Spektren wurde die Lösung des in Trifluoressigsäure reduzierten Pterins noch in der Hydrierapparatur mit Wasserstrahlvakuum auf eine Konzentration von 5–10% an hydriertem Pterin eingengt. Darauf entnahmen wir die Lösung dem Hydrierkolben mit einer Pipette, deren Spitze mit einem Wattebausch versehen war, um den Katalysator zurückzuhalten. Ein NMR.-Röhrchen wurde mit der so gewonnenen Lösung gefüllt, Tetramethylsilan als interner Standard zugegeben und

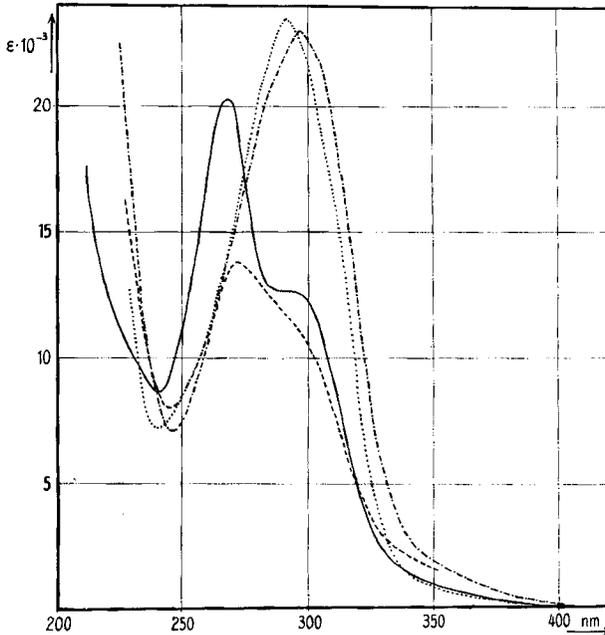


Fig. 4. UV.-Absorptionsspektrum vom Sulfat der Tetrahydrofolsäure (V)

- 2,12 N HCl
- - - - - pH 3,5 (0,1 M CH_3COOH)
- · - · - · - pH 8 (0,1 M Trispuffer)
- · · · · 0,1 N KOH

das Spektrum aufgenommen (Fig. 6). Vergleicht man das NMR.-Spektrum der Fig. 6 mit demjenigen der Fig. 5, so ist die Auswirkung der Reduktion deutlich erkennbar. Im Spektrum des aromatischen (N-3)-Methylpterins (Fig. 5) liegen die Signale der Vinylprotonen bei 9,03 ppm vor, die im Spektrum des (N-3)-Methyl-tetrahydropterins (Fig. 6) verschwunden sind; das Tetrahydropterin weist hingegen die Signale der Methylenprotonen bei 3,93 ppm auf. Wenn als Norm die drei Wasserstoffatome der (N-3)-Methylgruppe genommen werden, lässt sich anhand des Integrals deutlich zeigen, dass das Vinylsignal (Fig. 5) aus zwei, das Methylensignal (Fig. 6) aus vier Wasserstoffatomen besteht. Die Anzahl der Wasserstoffatome in den Methylengruppen lässt sich nur bei denjenigen Pterinen errechnen, die beispielsweise mit Methylgruppen substituiert sind. Die Wasserstoffatome, die am Stickstoff gebunden sind, tauschen mehr oder weniger leicht mit Protonen der Trifluoressigsäure aus. Daher können sie nicht vollständig integriert und nicht als Norm für die übrigen Wasserstoffatome ver-

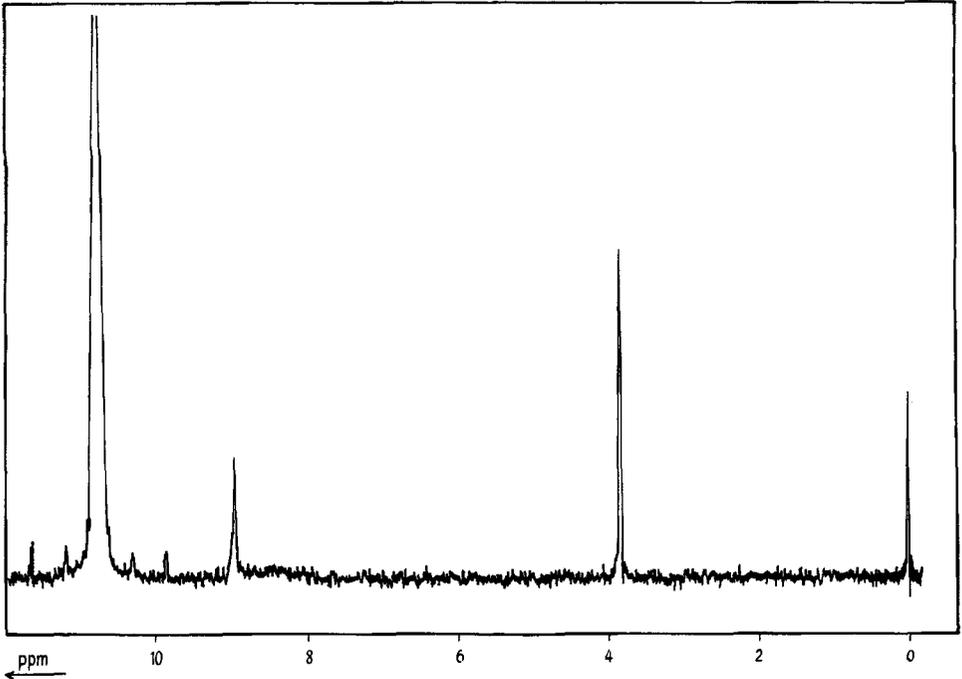


Fig. 5. NMR.-Spektrum von (*N*-3)-Methylpterin in CF_3COOH ($\delta_{TMS} = 0$ ppm)

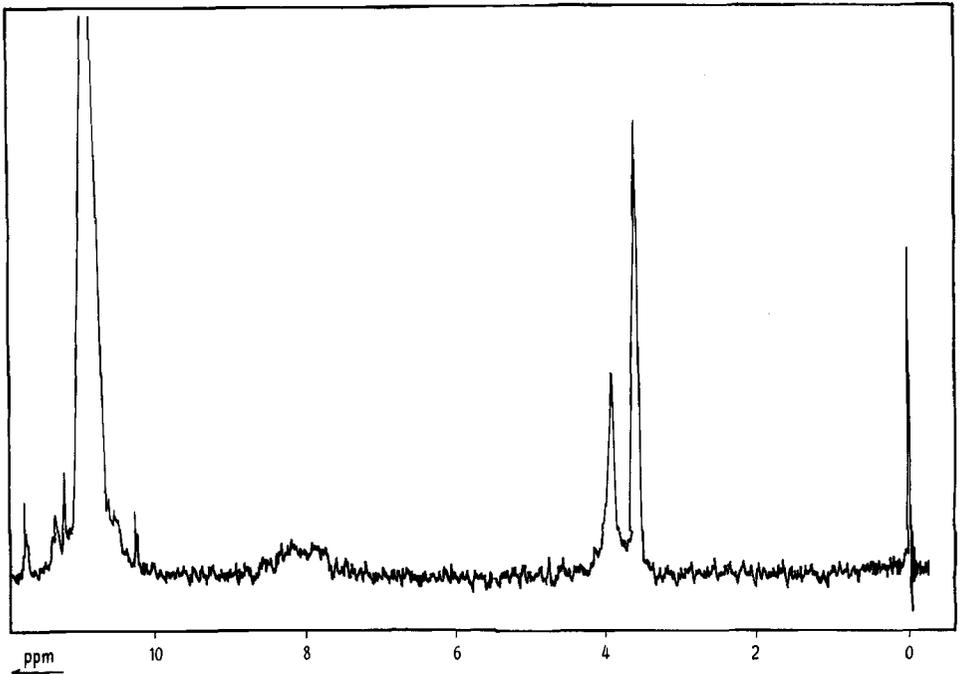


Fig. 6. NMR.-Spektrum von (*N*-3)-Methyl-tetrahydropterin in CF_3COOH ($\delta_{TMS} = 0$ ppm)

wendet werden. Hingegen konnte bei allen hydrierten Pterinen, die eine oder mehrere Methylgruppen enthalten, der Wasserstoffgehalt der beiden Methylengruppen bestimmt werden. In allen Fällen stimmt das Verhältnis der Wasserstoffatome der Methyl- und der Methylen-Gruppen mit dem theoretisch zu erwartenden Wert überein.

Für das Tetrahydropterin (IV) ergeben sich drei Protolysenstufen mit den folgenden pK_a -Werten: $1,3 \pm 0,1$; $5,6 \pm 0,1$; $10,6 \pm 0,1$. Das pK_a 5,6 wurde potentiometrisch, die anderen zwei spektrophotometrisch ermittelt. Das pK_a 10,6 kann dem (N-3)-H zugeschrieben werden, da beim (N-3)-Methyl-tetrahydropterin diese Protolysenstufe nicht vorkommt. Das pK_a 1,3 lässt auf die Anwesenheit eines Basizitätszentrums schliessen, das vermutlich durch die (N-1)-, (N-2')-Amidinstruktur hervorgerufen wird. Das pK_a 5,6 ist auf die durch die Hydrierung gebildete (N-5)-sekundäre Aminogruppe im Pyrazinkern zurückzuführen. 2,5,6-Triamino-4-hydroxy-pyrimidin besitzt ebenfalls drei ähnliche pK_a -Werte [12]: 2,0; 5,1; 10,1. Beim Pterin (I) findet man hingegen nur zwei pK_a -Werte [10] [13]: 2,0 und 7,9.

Der mikroanalytischen Abteilung unseres Instituts unter der Leitung von Herrn H. FROHOFER danken wir für die Elementaranalysen. Ebenfalls danken wir der Firma J. R. GEIGY A.G., Basel, für die Überlassung der in dieser Arbeit verwendeten Katalysatoren.

Experimenteller Teil

Die Protonenresonanz-Spektren wurden mit einem VARIAN-A-60 (MHz)-Kernresonanz-Spektrographen an 5–10-proz. Lösungen bei 20–25° aufgenommen. Als interner Standard diente Tetramethylsilan (TMS) für CF_3COOH , und eine verdünnte Lösung von TMS in Tetrachlorkohlenstoff für konz. Schwefelsäure ($\delta_{TMS} = 0$ ppm). Die Messwerte sind mit einem Fehler von $\pm 2\%$ behaftet.

Für die potentiometrische Bestimmung des pK_a -Wertes 5,6 wurde 0,005 Mol der getrockneten Substanz in mit Stickstoff gesättigtem Wasser gelöst und mit CO_2 -freier 0,1N KOH titriert. Als pH-Meter diente ein PHILIPS-Gerät (PR 9403) mit einer Glas- und Kalomel-Elektrode. Die Standardisierung erfolgte mit POLYMETRON-Präzisionspufferlösungen nach N.B.S.-Rezepten bei pH 4,00; 6,88 und 9,22 bei 20°. Die Aufnahme einer Titrationskurve erfolgte in 4–5 Min. Der gefundene Wert $pK_a = 5,6$ ist das Mittel von 9 pK_a -Werten der entsprechenden pH, berechnet nach der Formel: $pK_a = pH + \log \frac{HA}{A^-}$.

Die spektroskopischen pK_a -Bestimmungen wurden an einem BECKMAN-Spektrophotometer-DK₂-Automaten in 0,01M Pufferlösungen durchgeführt, und zwar bei 265 nm für pK_a 1,3 und bei 310 nm für pK_a 10,6. Für die Berechnung der pK_a -Werte benützten wir die Formel:

$$pK_a = pH - \log \frac{E_A - E}{E - E_B}$$

E_A = Extinktion des Dikations bzw. der Neutralform

E_B = Extinktion des Kations bzw. Anions

E = gemessene Extinktion beim entsprechenden pH

Die UV.-Spektren wurden unter gereinigtem Stickstoff (Pyrogallol) mit Hilfe des automatischen Spektrophotometers DK₂ jeweils innerhalb von 2–3 Min. aufgenommen. Die Maxima und Minima wurden anschliessend mit einem UNICAM-Spektrophotometer SP 500 genau ausgemessen. Die katalytischen Hydrierungen wurden durch Schütteln der Reaktionslösung mit Wasserstoff bei Zimmertemperatur und Atmosphärendruck durchgeführt.

Tetrahydropterin (IV): Nach der Vorhydrierung von 24 mg PtO_2 in 10 ml Trifluoressigsäure werden 62 mg Pterin (I) [14] (0,38 mMol) zugegeben. Nach 10 Min. Schütteln unter Wasserstoff bei Zimmertemperatur und Atmosphärendruck sind 2 Mol-Äq. Wasserstoff aufgenommen. An-

schliessend wird noch während einiger Minuten bis zur vollständigen Entfärbung der Lösung weitergeschüttelt. NMR. in CF_3COOH : 6,7-Methylen: Singulett, 3,93 ppm.

Tetrahydropterin-sulfat (IV-Sulfat): Die vorstehend erwähnte reduzierte Pterinlösung wird unter Stickstoff vom Katalysator abfiltriert und darauf langsam mit 42 mg konz. Schwefelsäure, die 1 ml Äthanol zugegeben wurde, versetzt. Nach $\frac{1}{4}$ Std. Stehen wird der gebildete Niederschlag abzentrifugiert, dreimal mit heissem Äthanol und zweimal mit Äther gewaschen, 2 Std. bei Zimmertemperatur und $5 \cdot 10^{-2}$ Torr vorgetrocknet und darauf 8 Std. bei 110° und $5 \cdot 10^{-2}$ Torr getrocknet: 70 mg weisses Pulver. NMR. in H_2SO_4 : 6,7-Methylen: Singulett, 4,15 ppm.

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}_5\text{S}$	Ber. C 27,17	H 4,17	N 26,41	S 12,09%
(265,22)	Gef. ,, 26,83	,, 4,11	,, 25,81	,, 12,59%

Tetrahydropterin-dihydrochlorid (IV): Die oben erwähnte hydrierte Pterinlösung wird vom Katalysator unter Stickstoff abfiltriert und langsam mit 180 mg HCl, gelöst in 3 ml Methanol, versetzt. Nach $\frac{1}{4}$ Std. Stehen bei 0° zentrifugiert man den gebildeten Niederschlag ab, wäscht ihn dreimal mit Äther und trocknet ihn 1 Std. bei Zimmertemperatur vor. Darauf wird noch 4 Std. bei 110° und $5 \cdot 10^{-2}$ Torr getrocknet: 80 mg weisses Pulver.

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{ON}_5\text{Cl}_2$	Ber. C 30,02	H 4,62	N 29,17	Cl 29,5%
(240,11)	Gef. ,, 30,94	,, 4,50	,, 29,42	,, 30,6%

Tetrahydrofolsäure (V): Nach Vorhydrierung von 25 mg PtO_2 in 8,5 ml Trifluoressigsäure werden 176 mg Folsäure (0,37 mMol) (FLUKA-Handelsprodukt), die in 1,5 ml CF_3COOH gelöst wurden, zugegeben. Die Aufnahme von 2 Mol-Äq. Wasserstoff ist nach 20 Min. beendet; da die Lösung aber noch stark braungelb ist, wird noch 40 Min. weiter unter Wasserstoff geschüttelt, bis die Lösung nur noch schwach gelblich ist. Dabei wird ca. $\frac{1}{2}$ Mol Wasserstoff aufgenommen.

Tetrahydrofolsäure-sulfat (V-Sulfat): Nach Reduktion der Folsäure wird die Lösung unter Stickstoff vom Katalysator abfiltriert und anschliessend mit 0,4 mMol konz. Schwefelsäure, gelöst in 1 ml Äthanol, langsam versetzt. Nach $\frac{1}{4}$ Std. Stehen bei 0° wird der gebildete weisse Niederschlag abzentrifugiert, dreimal mit heissem Äthanol, dann zweimal mit Äther gewaschen und 3 Std. bei Zimmertemperatur sowie 4 Std. bei 110° und $5 \cdot 10^{-2}$ Torr getrocknet: 115 mg weisses Pulver.

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{N}_7\text{H}_2\text{SO}_4$	Ber. C 41,99	H 4,64	N 18,04	S 5,90%
(543,53)	Gef. ,, 42,13	,, 4,71	,, 18,41	,, 6,80%

Hydrierung des (N-3)-Methylpterins (3-Methyl-2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin): Nach der Vorhydrierung von 15 mg PtO_2 in 5 ml Trifluoressigsäure werden 30 mg (N-3)-Methylpterin zugegeben. Die Hydrierung und das Aufarbeiten des gewonnenen Tetrahydropterins werden wie oben beschrieben ausgeführt.

NMR. des (N-3)-Methylpterins in CF_3COOH : (N-3)-Methyl: Singulett, 3,86 ppm; Vinyl-H (C-6, C-7): Singulett, 9,03 ppm.

NMR. des (N-3)-Methyl-tetrahydropterins in CF_3COOH : (N-3)-Methyl: Singulett, 3,63 ppm; 6,7-Methylen: Singulett, 3,93 ppm.

SUMMARY

A new method for preparing hydrogenated pterines by catalytic hydrogenation in halogenated acids is described. The best results are obtained with platinum or rhodium in trifluoroacetic acid. By this procedure the complete and selective hydrogenation of the pyrazine nucleus of pterine, its N-methylated derivatives and of folic acid is effected in short time. For the first time the oxygen sensitive hydrogenation products have been isolated as hydrochlorides or sulphates. Some UV., NMR. and pK_a data of 5,6,7,8-tetrahydrogenated pterines are given.

Zürich, Organisch-Chemisches Institut
der Universität

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 13^e Communication: M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* **48**, 816 (1965).
 [2] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* **47**, 2087 (1964).
 [3] B. L. O'DELL, J. M. VANDENBELT, E. S. BLOOM & J. J. PEIFFNER, *J. Amer. chem. Soc.* **69**, 250 (1947).
 [4] I. J. KREMS & P. E. SPOERRI, *Chem. Reviews* **40**, 279 (1947).
 [5] E. B. BROWN & T. B. JOHNSON, *J. Amer. chem. Soc.* **45**, 2702 (1923); B. LYTHGOE & L. S. RAYNER, *J. chem. Soc.* **1951**, 2323.
 [6] L. F. CAVALIERI & A. BENDICH, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 2587 (1950); D. B. COSULICH *et al.*, *ibid.* **74**, 3252 (1952).
 [7] E. C. TAYLOR & W. R. SHERMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 2464 (1959).
 [8] B. PULLMAN & A. PULLMAN, «Quantum Biochemistry», New York und London, Interscience Publishers 1963.
 [9] V. H. SMITH & B. E. CHRISTENSEN, *J. org. Chemistry* **20**, 829 (1955).
 [10] M. VISCONTINI & H. R. WEILENMANN, *Helv.* **41**, 2170 (1958).
 [11] J. A. BROCHMAN *et al.*, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 4326 (1950).
 [12] A. POHLAND, E. H. FLYNN, R. G. JONES & W. SHIVE, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 3247 (1951).
 [13] A. ALBERT, D. J. BROWON & G. CHEESEMAN, *J. chem. Soc.* **1952**, 4219.
 [14] C. K. CAIN, M. F. MALETTE & E. C. TAYLOR, *J. Amer. chem. Soc.* **68**, 1996 (1946).

102. De la chimie des ptérines

15^e communication [1]Hydroxylation non-enzymatique de la phénylalanine
en tyrosine à l'aide de ptérines tétrahydrogénéespar A. Bobst¹⁾ et M. Viscontini

(28 XII 65)

Dans nos dernières communications [1] [2] nous avons décrit une nouvelle méthode pour réduire les ptérines, stabiliser les tétrahydroptérines (THP) ainsi obtenues et étudier leur mécanisme d'oxydation en dihydroptérines par l'oxygène à pH physiologique. Nous avons constaté qu'après le transfert de deux électrons sur l'atome d'oxygène, la ptérine se retrouve sous forme de ptérine dihydrogénée (DHP) de structure para-quinoidique (III), fort instable et se transposant rapidement en ptérine 7,8-dihydrogénée.

Dans le présent travail nous étudions l'oxydation de tétrahydroptérines (I) en présence de phénylalanine, car nous savons que le coenzyme d'hydroxylation biologique de la phénylalanine est certainement une THP [3].

Pour ces recherches nous nous sommes adressés en premier lieu au système d'UDENFRIEND [4], qui a étudié les hydroxylation de divers substrats aromatiques en présence de vitamine C, de Fe^{II} et d'acide éthylènediamine-tétracétique (EDTA) en milieux aqueux.

Nous avons tout d'abord voulu vérifier si ce système était capable d'hydroxyler la phénylalanine en tyrosine. C'est effectivement le cas, comme nous avons pu le dé-

¹⁾ Adresse actuelle: Institut de Biologie Physico-chimique de l'Université de Paris, 13, Rue Pierre Curie, Paris V^e (Directeur: Prof. Dr. B. PULLMAN).