

Liganden – bestätigt, dass sich aber andererseits durch Vergleich der Anlagerung von Glycin an verschiedene CuY-1:1-Komplexe eine Sonderstellung (vgl. [1]) derjenigen ternären Cu²⁺-Komplexe zeigt, an deren Aufbau 2,2'-Bipyridyl beteiligt ist.

Herrn Dr. B. PRIJS danken wir für sein Interesse, Herrn A. TALOS für seine sorgfältige Hilfe bei den Experimenten und dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für die Unterstützung unserer Arbeiten.

SUMMARY

The stability constant of the Cu²⁺-2,2'-bipyridyl-glycine complex ($\log K_{\text{CuBipyGly}}^{\text{CuBipy}} = 7,88$) was measured and compared with that of the binary Cu²⁺-glycine complex ($\log K_{\text{CuGly}}^{\text{Cu}} = 8,27$). The value $\Delta \log K = -0,4$ (cf. equation (3)) is in the order which should be expected for the coordination of a mixed O–N-ligand to (Cu-Bipy)²⁺ which results in the formation of a ternary complex (cf. [1]).

A comparison of the stabilities of the Cu²⁺-2,2'-bipyridyl-glycine complex with other ternary Cu²⁺-ligand-glycine complexes ([5]–[8]; table) shows that the ternary complex which includes 2,2'-bipyridyl is especially stable.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. SIGEL, *Chimia* 21, 489 (1967).
- [2] G. A. L'HEUREUX & A. E. MARTELL, *J. inorg. nucl. Chemistry* 28, 481 (1966).
- [3] H. SIGEL, H. BRINTZINGER & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* 46, 712 (1963).
- [4] G. ANDEREGG, *Helv.* 46, 2397 (1963).
- [5] M. BONNET & R. A. PÂRIS, *Bull. Soc. chim. France* 1966, 747; R.-P. MARTIN & R. A. PÂRIS, *ibid.* 1964, 80.
- [6] R.-P. MARTIN & R. A. PÂRIS, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* 257, 3932 (1963); 258, 3038 (1964).
- [7] R.-P. MARTIN & R. A. PÂRIS, *Bull. Soc. chim. France* 1963, 1600.
- [8] R. DEWITT & J. I. WATERS, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 3810 (1954); S. KIDA, *Bull. chem. Soc. Japan* 29, 805 (1956).
- [9] «Stability Constants», Special Publication Nr. 17, The Chemical Society, London 1964.

192. De la chimie des ptérines

22^e communication [1]

Sur le mécanisme d'oxydation des tétrahydroptérines et plus particulièrement de la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérine

par M. Viscontini et T. Okada

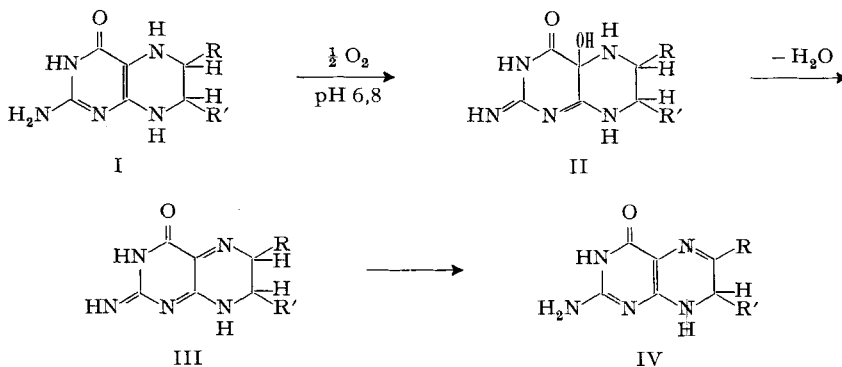
(8 VII 67)

Dans les 17^e et 18^e communications de cette série de travaux nous avons proposé deux mécanismes pour l'oxydation des tétrahydroptérines (I) d'une part et pour l'hydroxylation de la phénylalanine en tyrosine d'autre part. Le premier de ces mécanismes est de type radicalaire pur et ne met en jeu qu'un seul atome d'oxygène par molécule de tétrahydroptérine ou de phénylalanine [2]; le deuxième, également radicalaire [3], se rattache au concept d'oxydation mixte selon MASON [4], d'après

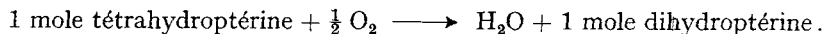
lequel une molécule d'oxygène est consommée pendant la réaction, un atome d'oxygène formant une molécule d'eau avec l'hydrogène provenant du substrat réducteur (ici la tétrahydroptérine), le deuxième servant à l'hydroxylation de la phénylalanine. Nos préférences vont au premier de ces deux mécanismes pour les oxydations considérées, mais nous en discuterons le pourquoi plus tard; aujourd'hui nous ne décrirons que le processus expérimental qui nous a conduit à faire ce choix¹⁾.

Il est désormais bien établi que les tétrahydroptérines (I) activent l'oxygène moléculaire, ce qui lui permet d'entrer en réaction soit avec la tétrahydroptérine elle-même, soit avec un accepteur d'oxygène tel que la phénylalanine, soit avec les deux en même temps; mais l'on ignorait jusqu'à présent le mécanisme de cette activation. Nous avons d'abord pensé que l'oxygène pouvait être fixé sur N(5) sous forme de N-oxyde [2] avant de réagir comme radical OH; en réalité le radical OH se forme dans un complexe de tétrahydroptérine et de fer(II) ou de fer(III), comme nous le montrons ci-dessous.

En absence d'un autre accepteur d'oxygène, les tétrahydroptérines I sont oxydées en dihydro-7,8-ptérines IV (voir nos travaux [2], [5]). La dihydroptérine quinoïdique III, dont la transposition protonique conduit à la dihydroptérine IV, est un des produits intermédiaires de la réaction [6]; nous ignorions alors s'il existait d'autres produits intermédiaires entre I et III.



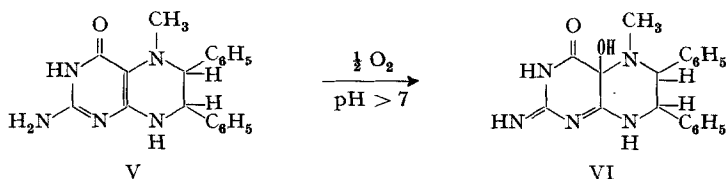
Les mesures cinétiques et volumétriques montrent que l'oxydation $\text{I} \rightarrow \text{IV}$, au cours de laquelle nous n'avons jamais décelé la formation de H_2O_2 , se fait stoechiométriquement selon l'équation globale:



Nous avons pourtant trouvé une exception à cette équation dans le cas de la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérine (V): ici il ne se forme pas d'eau,

¹⁾ Le présent travail a fait l'objet d'une conférence donnée à l'Université Lovanium de Kinshasa (République démocratique du Congo) en janvier 1967 et répétée à l'Université de Louvain (Belgique) le 8 février 1967. Une mise au point sur l'ensemble du problème de l'hydroxylation intitulée: «Tetrahydropterine als Katalysatoren der chemischen und enzymatischen Phenylalanin-Hydroxylierung zum Tyrosin» est actuellement sous presse pour la revue «Fortschritte der chemischen Forschung», Springer-Verlag, Heidelberg. Nous y esquissons à grands traits la théorie que nous exposons ici d'une manière plus détaillée et plus expérimentale.

mais l'oxygène activé est fixé en position 4a sous forme d'hydroxyle et on obtient la tétrahydroptérine quinolique VI, très stable [1].



En fait nous nous trouvons devant le cas particulier et fort intéressant où le substrat réducteur fixe de l'oxygène en étant hydroxylé, au lieu de perdre de l'hydrogène. L'étude de la consommation d'oxygène s'imposait donc dans cet exemple où le produit final de la réaction est un corps stable, contrairement à tous les autres exemples étudiés jusqu'ici.

Comme nous l'avons déjà dit [7], la tétrahydroptérine V est stable en milieu acide; au-dessus de pH 7 elle est oxydée par l'air en VI d'autant plus rapidement que la solution est plus alcaline; en outre, la réaction est fortement accélérée par Fe^{2+} ou Fe^{3+} , surtout en présence d'EDTA ou d'ions pyrophosphate. Pour obtenir de bonnes mesures cinétiques et volumétriques nous avons travaillé à pH 8,7 en présence de Fe^{2+} et d'EDTA. Les résultats (fig. 1) montrent que:

a) la consommation d'oxygène correspond exactement à un atome par molécule de tétrahydroptérine, comme dans les cas précédents;

b) Fe^{2+} est inactif comme tel, tandis que Fe^{3+} est actif, ce qui prouve que seul Fe^{3+} joue un rôle particulier dans le mécanisme d'activation de l'oxygène en présence des tétrahydroptérines.

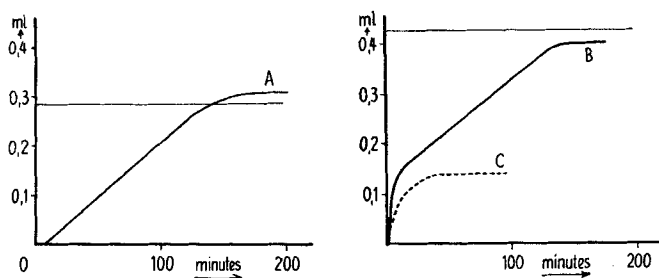


Fig. 1. Cinétique de l'oxydation de la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptéridine (V) en présence d'oxygène pur

Courbe A: pH 8,7, avec Fe^{3+} et EDTA

Courbe B: pH 8,7, avec Fe^{2+} et EDTA

Courbe C: oxydation $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ à pH 8,7 avec EDTA, mais sans tétrahydroptérine V

Les lignes horizontales correspondent à l'absorption de $\frac{1}{2} \text{O}_2$ par mole de tétrahydroptérine. Pour les conditions expérimentales voir le texte.

Pour mettre ce rôle en évidence nous avons étudié ce qui se passait en milieu acide, alors que la présence d'un complexant n'est plus nécessaire pour maintenir Fe^{3+} en solution. FeCl_3 est un réactif idéal pour cette étude, car son hydrolyse confère à la solution un pH nettement acide. Lorsqu'on dissout dans un mélange hydroalcoolique

la tétrahydroptérine V et FeCl_3 en proportions convenables, on voit apparaître une coloration rouge intense fort instable et qui vire rapidement au jaune vert; il y a donc formation initiale d'un complexe tétrahydroptérine- Fe^{3+} (courbe 1, figure 2) qui se transforme en un second complexe plus stable (courbe 6, même figure). Le fait remarquable est que la vitesse de transformation est inversement proportionnelle à la concentration d'oxygène présent dans la solution: en absence complète d'oxygène le premier complexe ne peut pas être observé au spectromètre, car la coloration rouge vire au jaune vert en une fraction de seconde. Cette expérience prouve que l'ion Fe^{3+} subit une réduction en Fe^{2+} qui devient le centre d'un nouveau complexe: radical cationique de tétrahydroptérine- Fe^{2+} , et que l'oxygène est, comme on pouvait s'y attendre, un inhibiteur de cette réduction.

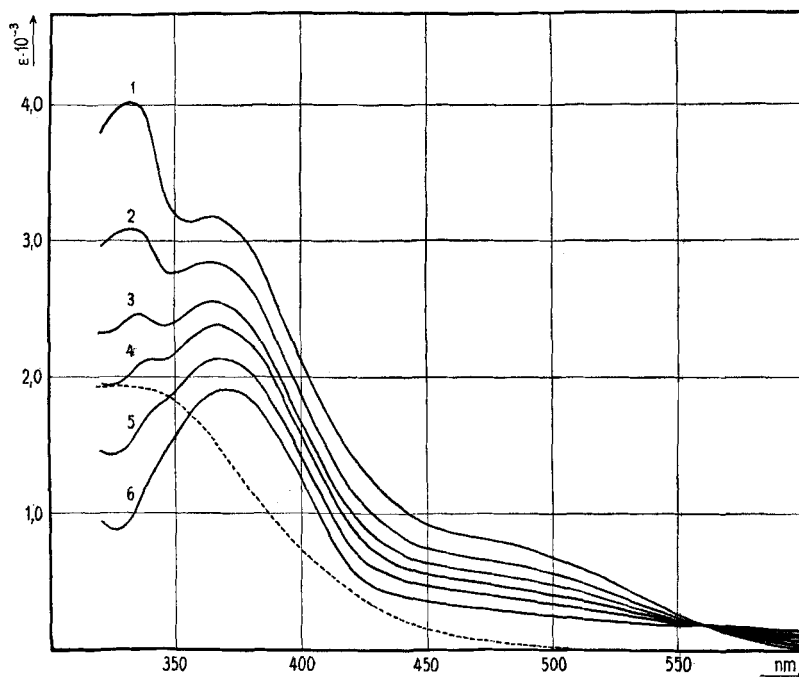


Fig. 2. Transformation à l'air libre du complexe tétrahydroptérine V (2 moles) - Fe^{3+} (1 atome-équivalent) (courbe 1) en radical cationique de tétrahydroptérine V - Fe^{2+} (courbe 6)

Courbe 2: 2' après la 1^{ère} mesure

Courbe 3: 6' après la 1^{ère} mesure

Courbe 4: 10' après la 1^{ère} mesure

Courbe 5: 20' après la 1^{ère} mesure

Courbe 6: 50' après la 1^{ère} mesure

Spectre UV. d'une solution de FeCl_3 de même concentration. Pour les conditions expérimentales voir le texte.

Pour établir la composition du premier complexe nous avons ajouté, en présence d'oxygène, à une même quantité de tétrahydroptérine V des quantités croissantes de FeCl_3 , et constaté que l'extinction moléculaire du complexe à 370 nm atteint son

maximum pour une proportion molaire tétrahydroptérine $V:Fe^{3+} = 2:1$ (figure 3). Voilà pourquoi nous attribuons au complexe rouge la structure VII, semblable à celle que nous avons proposée pour le complexe mixte tétrahydroptérine (I) – EDTA – Fe^{3+} [2], avec la différence qu'ici la molécule d'EDTA est remplacée par une seconde molécule de tétrahydroptérine.

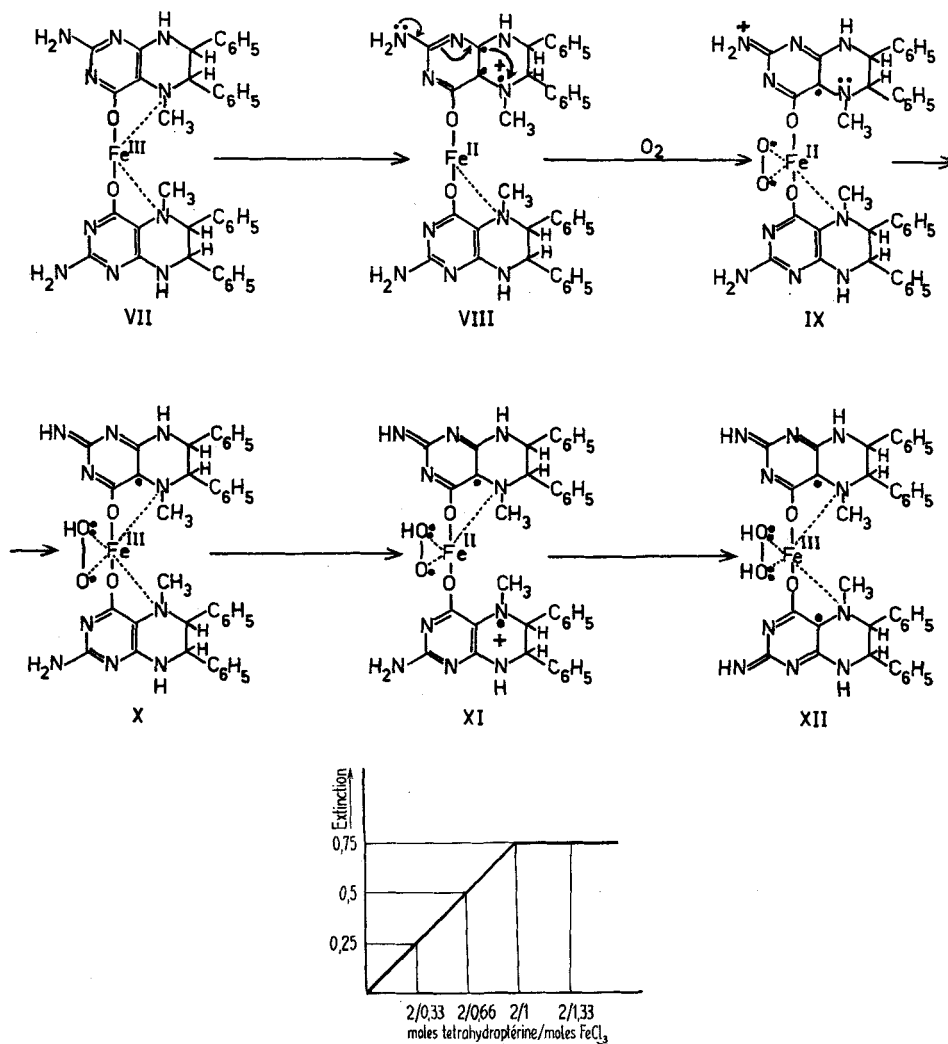
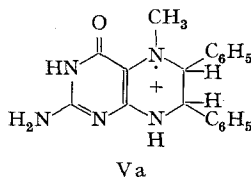


Fig. 3. Extinction maxima à 370 nm du complexe tétrahydroptérine V – Fe^{3+} en fonction du rapport molaire tétrahydroptérine V/ $FeCl_3$.

La réduction $Fe^{III} \rightarrow Fe^{II}$ doit s'effectuer très facilement à l'intérieur de ce complexe VII par transfert d'un électron de N(5) sur Fe^{III} pour donner Fe^{II} ; un nouveau complexe VIII est alors formé, dans lequel un reste de tétrahydroptérine ayant perdu un électron est devenu un radical avec une charge positive. En milieu

acide cet ion-radical doit être relativement stable. BOBST est arrivé à une conclusion identique par le calcul [8] et depuis lors nous avons pu, en collaboration avec EHRENBURG, HEMMERICH & MÜLLER [3], démontrer l'existence de ce radical cationique de tétrahydroptérine, Va, relativement stable en milieu acide.



On peut admettre que la même réaction ait lieu en milieu neutre: par le transfert intramoléculaire d'un électron on aboutit alors au complexe IX dans lequel un reste de tétrahydroptérine est transformé en radical-cation avec la charge positive portée par N(2') et un électron célibataire en C(4a). Le proton de N(2'), libéré, pourra se fixer sur tout centre électronégatif ou nucléophile qui s'offrira à lui. Nous admettons que ce centre nucléophile est constitué par la molécule d'oxygène qui est venue se fixer coordinativement sur Fe^{II}, comme cela est si souvent le cas dans la chimie des complexes du fer(II). On aboutit alors aux transformations IX → X → XI. Dans le complexe X, le fer(II) de IX, ayant transmis un électron à la molécule d'oxygène, a repris son niveau d'oxydation III et est prêt à extraire un nouvel électron en N(5) du deuxième reste de tétrahydroptérine, avec formation de XI, pour le transmettre ensuite à la molécule d'oxygène; celle-ci coordonne alors un nouveau proton, et il se forme finalement le complexe XII, dans lequel deux électrons célibataires sont localisés sur chacun des atomes C(4a) des restes tétrahydroptérines, tandis qu'une molécule de peroxyde d'hydrogène est fixée coordinativement sur Fe^{III}. Cette molécule H₂O₂ se décompose ensuite en deux radicaux OH qui s'additionnent aux deux radicaux tétrahydroptériniques pour former deux molécules d'hydroxy-tétrahydroptérine VI avec libération simultanée de l'ion Fe³⁺.

Si l'on suppose que les tétrahydroptérines I réagissent également avec O₂ et Fe³⁺ pour former des hydroxy-4a-tétrahydroptérines (II) comme le fait la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérine (V), on comprend que ces dérivés II instables perdent une molécule d'eau pour aboutir aux dihydroptérines quinoïdiques III; les tétrahydroptérines II pourraient donc être, elles aussi, des produits intermédiaires de l'oxydation des tétrahydroptérines I en dihydroptérines IV.

Ces expériences démontrent que la déshydrogénation des tétrahydroptérines en dihydroptérines ne peut guère se faire selon un mécanisme d'oxydation mixte. Nous voudrions néanmoins souligner une fois de plus que ce dernier mécanisme ne doit pas être exclu à priori dans le cas de l'hydroxylation de la phénylalanine en tyrosine. Seules manquent encore les bases expérimentales (mesure exacte de la consommation en oxygène) pour décider de manière univoque quel est le mécanisme qui convient dans ce dernier cas.

Nous remercions le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, L'EIDGENÖSSISCHE STIFTUNG ZUR FÖRDERUNG SCHWEIZERISCHER VOLKSWIRTSCHAFT et la STIFTUNG FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG AN DER UNIVERSITÄT ZÜRICH pour l'aide matérielle mise à notre disposition.

Partie expérimentale. – Les consommations d'oxygène ont été mesurées à 25° et à la pression atmosphérique dans un appareil à microhydrogénation rempli d'oxygène pur. Les spectres UV. ont été mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre automatique BECKMAN DK-2.

Oxydation de la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérine (V) à pH alcalin. 6,9 mg (20,7 μ moles) de V sont dissous dans 5 ml d'un mélange CH₃OH-tampon aux phosphates de potassium 0,2M, pH 11,6 (1:1). La solution est portée dans l'appareil rempli d'oxygène dont on suit manométriquement l'absorption. L'oxydation est terminée en 200 min, tandis que l'hydroxy-4a-tétrahydroptérine VI précipite. Oxygène consommé: 0,32 ml (calc. pour 1/2 O₂ par mole de V: 0,335 ml).

Oxydation de la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérine (V) en présence de Fe³⁺ et Fe²⁺. A pH 8,7 l'oxydation de V est si lente qu'on ne peut pratiquement pas la mesurer. L'adjonction de Fe³⁺ ou Fe²⁺ accélère la réaction suffisamment pour rendre les mesures manométriques possibles à ce pH:

a) 6 mg (18 μ moles) de V sont dissous dans 5 ml d'un mélange CH₃OH-tampon aux phosphates de potassium 0,05M, pH 8,7 (2:3) renfermant 11 μ moles de FeCl₃, 6 H₂O et 11 μ moles d'EDTA. L'oxydation est terminée en 200 min. Oxygène consommé: 0,32 ml (calc.: 0,28 ml). L'hydroxy-4a-tétrahydroptérine VI précipite en fin de réaction.

b) 6 mg (18 μ moles) de V sont oxydés comme précédemment, les 11 μ moles de FeCl₃ étant remplacées par 11 μ moles de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 6 H₂O. L'oxydation est plus rapide (150 min); oxygène consommé: 0,40 ml; cet excès est dû à l'oxydation Fe²⁺ → Fe³⁺. En effet une expérience parallèle effectuée dans les mêmes conditions, mais sans V, indique une consommation d'oxygène de 0,14 ml (courbe C, fig. 1). L'oxydation de V consomme donc: 0,40–0,14 = 0,26 ml d'oxygène (calc.: 0,28 ml).

Complexe méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérine (V) – Fe³⁺. On dissout dans 3 ml de méthanol-eau (1:1), contenus dans une cuvette de spectrophotomètre, 1 mg de V et des quantités croissantes de FeCl₃, 6 H₂O. Une intense coloration rouge apparaît, dont le spectre UV. est mesuré au spectrophotomètre. Comme solution de référence on utilise une solution semblable mais ne renfermant pas de FeCl₃. L'interprétation de la fig. 3 montre que le complexe VII est formé de 2 molécules de V par Fe³⁺. Ceci étant établi, on suit par spectrophotométrie d'une solution de 1 mg (2,85 μ moles) de V et 0,42 mg (1,42 μ mole) de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 6 H₂O dans 3 ml de méthanol-eau (1:1) la transformation Fe^{III} → Fe^{II} à l'intérieur du complexe VII (fig. 2). Dans des conditions identiques le mélange tétrahydroptérine V – Fe²⁺ ne donne naissance à aucun spectre mesurable.

RÉSUMÉ

On décrit comment la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérine s'autoxyde en milieu alcalin en utilisant un atome-équivalent d'oxygène pour former l'hydroxy-4a-méthyl-5-tétrahydroptérine quinolique correspondante. L'oxydation est catalysée par Fe³⁺, qui forme d'abord un complexe avec la tétrahydroptérine. Dans ce complexe un électron est transféré de la tétrahydroptérine sur le fer. Un mécanisme radicalaire d'oxydation des tétrahydroptérines, basé sur ces données expérimentales, est proposé et discuté.

Institut de Chimie Organique
de l'Université de Zurich

BIBLIOGRAPHIE

- [1] 21e communication: M. VISCONTINI & G. MATTERN, *Helv.* 50, 1664 (1967).
- [2] M. VISCONTINI, H. LEIDNER, G. MATTERN & T. OKADA, *Helv.* 49, 1911 (1966).
- [3] A. EHRENBERG, P. HEMMERICH, F. MÜLLER, T. OKADA & M. VISCONTINI, *Helv.* 50, 411 (1967).
- [4] H. S. MASON, *Advances Enzymol.* 19, 79 (1957).
- [5] A. BOBST, Thèse de doctorat, Université de Zurich, 1966.
- [6] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* 48, 816 (1965).
- [7] M. VISCONTINI & T. OKADA, *Helv.* 50, 1492 (1967).
- [8] A. BOBST, *Helv.* 50, 1480 (1967).