

HEINZ REMBOLD und HEINZ METZGER
Synthese und chromatographische Trennung von
[8 α -¹⁴C]Biopterin und [8 α -¹⁴C]7-Biopterin¹⁾

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Eingegangen am 4. Dezember 1962)

Durch chromatographische Trennung an phosphorylierter Cellulose wurden Biopterin und 7-Biopterin erstmals in reiner Form erhalten. Im Gegensatz zum Biopterin ist 7-Biopterin im Wachstumstest bei *Crithidia fasciculata* inaktiv. Die Ausbeute ist bei der Biopterinsynthese stark von den Reaktionsbedingungen abhängig und liefert unter optimalen Bedingungen 7% Biopterin und 26% 7-Biopterin, bezogen auf eingesetztes 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin. Die Radiosynthese der beiden Pterine, ausgehend von K¹⁴CN, wird beschrieben. Ferner werden die Eigenschaften des 2-Amino-4-hydroxy-6- bzw. 7-[L-erythro-1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridins mitgeteilt.

Biopterin (2-Amino-4-hydroxy-6-[L-erythro-1.2-dihydroxy-propyl]-pteridin, III) wurde mit Hilfe seiner Wuchsstoffaktivität bei der Flagellate *Crithidia fasciculata* von E. L. PATTERSON und Mitarbb.²⁾ 1955 aus menschlichem Harn isoliert und in seiner Struktur geklärt. Dieses in der Natur weit verbreitete Pterin konnten zur gleichen Zeit H. S. FORREST und H. K. MITCHELL³⁾ sowie M. VISCONTINI und Mitarbb.⁴⁾ aus der Taufiege *Drosophila melanogaster* isolieren. Für unsere Untersuchungen über die Königinnenentstehung bei der Honigbiene⁵⁾ ist von besonderem Interesse, daß Biopterin einen der wenigen charakteristischen Unterschiede zwischen dem Weiselzellenfuttersaft und dem Futtersaft der Arbeiterinnenlarven bildet⁶⁾. Über seine biologische Funktion ist noch nichts bekannt. Untersuchungen mit [2-¹⁴C]Biopterin zeigen seine große Stoffwechselstabilität sowohl bei der Honigbiene⁷⁾ und der Taufiege⁸⁾ als auch bei der Ratte⁹⁾.

Zur Synthese des Biopterins (III) kondensiert man 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin (I) in Gegenwart von Hydrazin mit 5-Desoxy-L-arabinose (II). Neben dem gewünschten Produkt entsteht hauptsächlich das isomere 7-Biopterin (2-Amino-4-hydroxy-7-[L-erythro-1.2-dihydroxy-propyl]-pteridin, IV).

1) Teil der Diplomarb. H. METZGER, Univ. München.

2) E. L. PATTERSON, H. T. BROQUIST, A. M. ALBRECHT, M. H. v. SALTZA und E. L. R. STOKSTAD, J. Amer. chem. Soc. 77, 3167 [1955].

3) J. Amer. chem. Soc. 77, 4865 [1955].

4) M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, F. KARRER und E. HADORN, Helv. chim. Acta 38, 397 [1955].

5) Zusammenfassung: H. REMBOLD, Umschau Wiss. Techn. 1961, 488, 524.

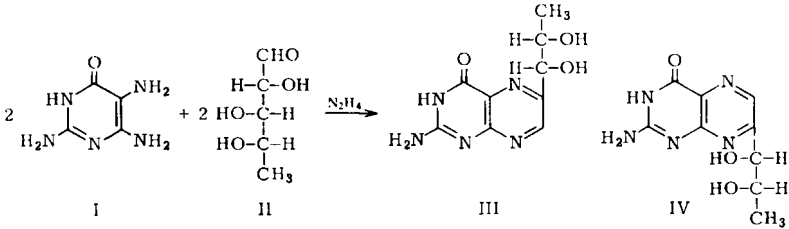
6) A. BUTENANDT und H. REMBOLD, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 311, 79 [1958].

7) H. REMBOLD und G. HANSER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 319, 213 [1960].

8) H. REMBOLD, Angew. Chem. 73, 543 [1961].

9) H. REMBOLD, III. Internat. Pteridinsymp., Stuttgart Sept. 1962, im Druck.

Eine Reindarstellung der beiden Isomeren III und IV, die sich in ihrem papierchromatographischen Verhalten nicht unterscheiden, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht. E. L. PATTERSON und Mitarbb.¹⁰⁾ reinigten das Rohprodukt durch fraktionierte Fällung, Chromatographie an einer Magnesol-Celite-Säule und anschließende Chromatographie an Dowex 50 mit 2*n* HCl. Sie erhielten auf diesem Wege ein



angereichertes Biopterin, wie ein Vergleich der UV-Spektren zeigt. M. VISCONTINI und H. RASCHIG¹¹⁾ trennten auf einer Cellulosepulversäule mit 3-proz. Ammoniumchloridlösung. Dieses auch von uns benutzte Verfahren¹²⁾ erlaubt nur die Abtrennung des Isomerenengemisches aus dem Rohkondensationsprodukt¹³⁾. Die von uns angewandte Verteilungschromatographie auf Aluminiumoxyd im System 80% Methanol/20% Wasser⁶⁾ erlaubt bei geringer Kapazität ebenfalls nur eine Anreicherung des Biopterins. Kürzlich beschrieben R. TSCHESCHE und Mitarbb.¹⁴⁾ eine Isomeren-trennung durch Verteilungschromatographie an Kieselgel im System 90% Methanol/9% Wasser/1% konz. Ammoniak. 7-Biopterin wurde anschließend durch eine zweite Verteilungschromatographie auf Cellulosepulver im System *n*-Butanol/wäßr. Ammoniak/Pyridin von Begleitstoffen abgetrennt. Dieses Verfahren soll weiter unten diskutiert werden.

REINIGUNG VON BIOPTERIN UND 7-BIOPTERIN¹⁵⁾

Die Reinigung von Biopterin und 7-Biopterin gelingt durch Kationenaustausch-Chromatographie an phosphorylierter Cellulose (P-Cellulose). Dieses Verfahren besitzt gegenüber den bislang beschriebenen Reinigungsmethoden eine Reihe von Vorteilen: Die Kapazität der P-Cellulose ist bei geringem Säulenvolumen sehr hoch (bis zu 1 Gramm Rohbiopterin bei einem Säulenvolumen von 130 ccm); die Isomeren lassen sich mit Wasser und dadurch besonders schonend eluieren; sie unterscheiden sich befriedigend in ihren Retentionsvolumina (das spezif. Retentionsvolumen = Retentionsvolumen der Substanz: Säulenvolumen betrug bei der von uns benutzten Cellulose für Biopterin 13, für 7-Biopterin 15); eine dreifache Chromatographie liefert die Stoffe in extrem reiner Form; durch die Möglichkeit, in einem Arbeits-

¹⁰⁾ E. L. PATTERSON, R. MILSTREY und E. L. R. STOKSTAD, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 5868 [1956].

¹¹⁾ *Helv. chim. Acta* **41**, 108 [1958].

¹²⁾ G. HANSER und H. REMBOLD, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **319**, 200 [1960].

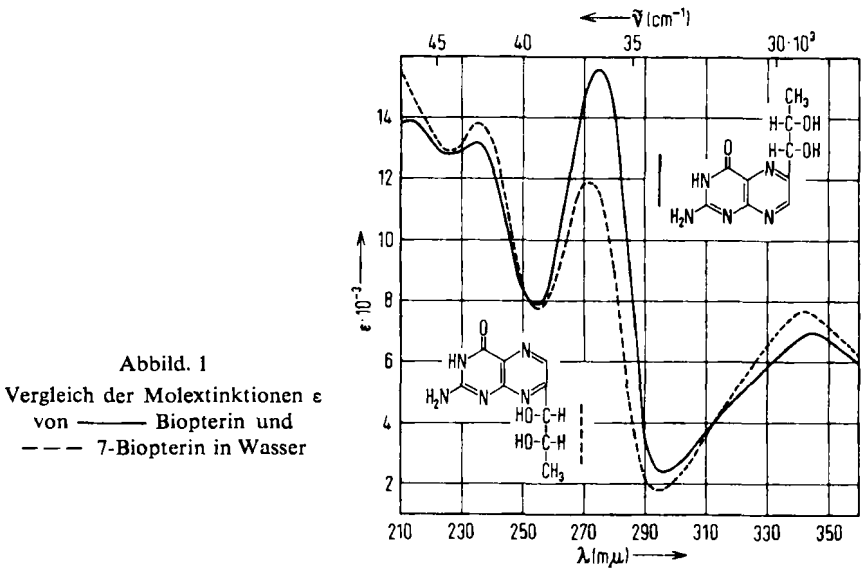
¹³⁾ M. VISCONTINI, *Ind. chim. belge* **1960**, 1181.

¹⁴⁾ R. TSCHESCHE, B. HESS, I. ZIEGLER und H. MACHLEIDT, *Liebigs Ann. Chem.* **658**, 193 [1962].

¹⁵⁾ Vorläuf. Mitteil.: H. REMBOLD und H. METZGER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **329**, 291 [1962].

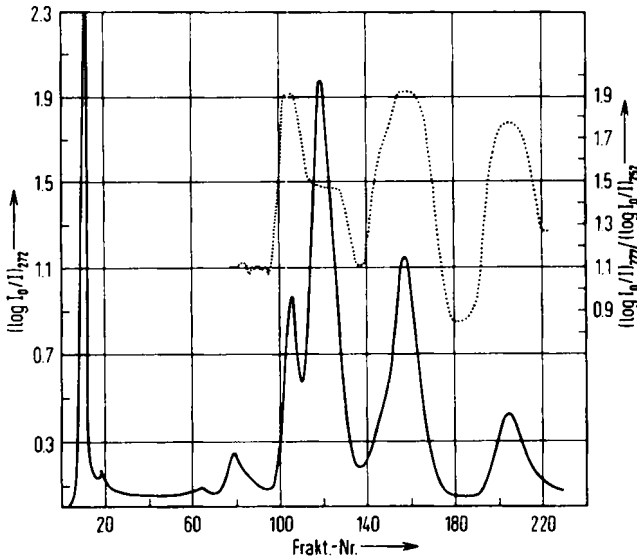
verfahren sowohl die Isomeren voneinander zu trennen als auch die Nebenprodukte der Kondensation zu entfernen, ist eine Reindarstellung des Biopterins und des 7-Biopterins unter geringen Substanzverlusten möglich.

Die papierchromatographische Untersuchung und der Abbau zu den entsprechenden Pterincarbonsäuren zeigen, daß sich die beiden Isomeren nach dem beschriebenen Verfahren in reiner Form gewinnen lassen. Beim Vergleich des in Wasser gemessenen UV-Spektrums von Biopterin und 7-Biopterin (Abbild. 1) fallen neben einer schwach bathochromen Verschiebung der beiden längerwelligigen Maxima des Biopterins vor allem die starken Unterschiede in den molaren Extinktionen um 270 m μ auf. Es ist



deshalb möglich, die beiden reinen Isomeren bereits in den chromatographischen Fraktionen durch Vergleich ihrer UV-Extinktionen und ihrer Retentionsvolumina zu identifizieren. Man verfolgt beim Retentionsvolumen des Biopterins den Quotientenverlauf, der sich aus dem Verhältnis der UV-Absorption bei einer Wellenlänge mit großen zu einer solchen mit geringen Unterschieden in der Molextinktion ergibt. Wir verwenden den Quotienten E_{272}/E_{252} , der für Biopterin den Wert 1.92, für 7-Biopterin den Wert 1.48 hat. Als Beispiel ist in Abbild. 2 die Auswertung einer Trennung von 20 mg Rohbiopterin auf einer P-Cellulosesäule gezeigt. Mit der Front werden Neutral- und saure Anteile, u. a. Pterin-carbonsäure-(6) und -(7) eluiert. Ein weiteres, intensiv gelbes und für Polyhydroxyalkylpterine charakteristisches Zersetzungsprodukt unbekannter Konstitution erscheint ab Fraktion 70. Anschließend werden Biopterin ab Fraktion 95 und 7-Biopterin ab Fraktion 110 eluiert. Der Quotient ist bei den reinen Isomeren konstant und zeigt, wie gut diese mit einer kurzen Übergangszone aufgetrennt werden. Die darauf folgende Zone (Fraktionen 140–175) besteht ebenfalls aus zwei Isomeren, wie man sowohl am Quotientenverlauf als auch am Verlauf der UV-Absorption erkennen kann. Diese Verbindung erscheint bei der papierchromatographi-

schen Auftrennung des Rohbiopterins als zweiter, blau fluoreszierender Hauptfleck mit einem R_F -Wert, der dem der Biopterinisolomeren sehr ähnlich ist. Ab Fraktion 185 folgt eine Zone mit stärker basischen Eigenschaften, die sich nicht mehr deutlich aufspaltet. Die Auftrennung des Rohproduktes auf P-Cellulose liefert in einer Reihe weiterer Zonen Substanzen mit gelber und blauer Fluoreszenz, die erst mit einem Ameisensäuregradienten eluiert werden können, und zeigt, welche Vielzahl von Nebenreaktionen bei der Synthese von Polyhydroxyalkylpterin ablaufen.



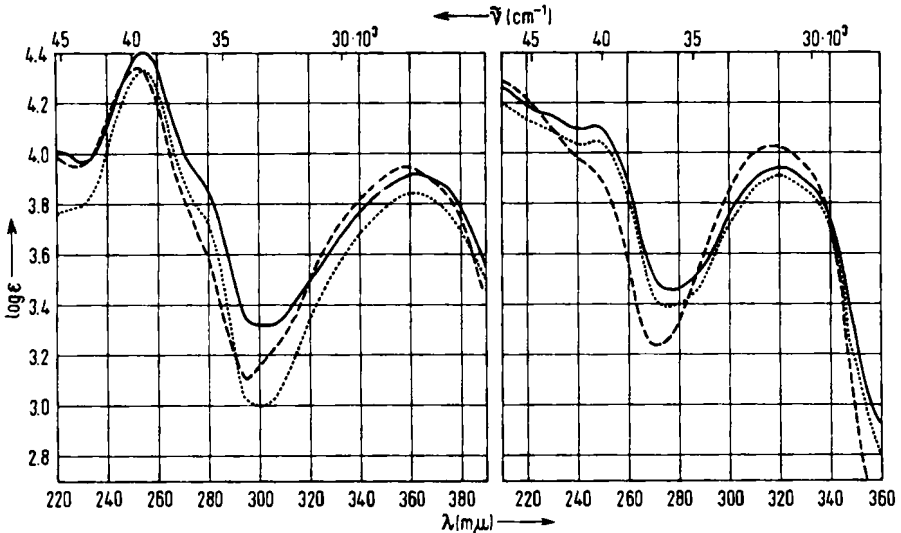
Abbild. 2. Chromatographie von Rohbiopterin an P-Cellulose. — Extinktionsverlauf (E_{272}) und Quotientenverlauf (E_{272}/E_{252}) der eluierten Substanzonen. Säule: 18 mm Durchmesser, 310 mm Länge. 10-ccm-Fractionen

Bei Untersuchungen über das chromatographische Verhalten von Polyhydroxyalkylpterin fanden wir¹⁶⁾, daß deren Retentionsvolumen bei Elution mit Wasser auf P-Cellulose umgekehrt proportional zur Anzahl der Hydroxylgruppen in der Seitenkette ist. Man darf daraus ableiten, daß die nach dem Biopterin mit Wasser eluierten Substanzen, die gleichzeitig den Hauptanteil der Nebenprodukte bilden, eine geringere Anzahl von Hydroxylgruppen als Biopterin und 7-Biopterin besitzen müssen.

Durch mehrfache Chromatographie wurden die beiden Isomeren in vollkommener Reinheit als farblose Kristalle gewonnen. Ihre UV-Spektren sind in Säure und Alkali deutlich verschieden (Abbild. 3). Besonders charakteristisch ist die Absorptionsbande bei $247 \text{ m}\mu$ ($0.1N \text{ HCl}$), die bei 7-Biopterin nur noch als Schulter erkennbar ist. Das langwellige Maximum des Biopterins ist im Sauren und Alkalischen schwach bathochrom verschoben, die Molextinktionen sind stark verschieden. Die UV-Daten und die spezifischen Drehwerte der beiden Isomeren sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Auf die gleiche Weise gewannen wir die beiden isomeren 2-Amino-4-hydroxy-6- bzw. 7-[L-erythro-1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridine aus der entsprechenden Kondensation

¹⁶⁾ H. REMBOLD und L. BUSCHMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 330, 132 [1962].

von I mit L-Arabinose. Deren UV-Spektren stimmen mit denen der Biopterinisomeren völlig überein.



Abbild. 3. Vergleich der Molextinktionen $\log \epsilon$ von ——— synthetischem Biopterin und - - - - 7-Biopterin mit ····· natürlichem Biopterin aus Weiselzellenfuttersaft in 0.1 n NaOH (links) und 0.1 n HCl (rechts)

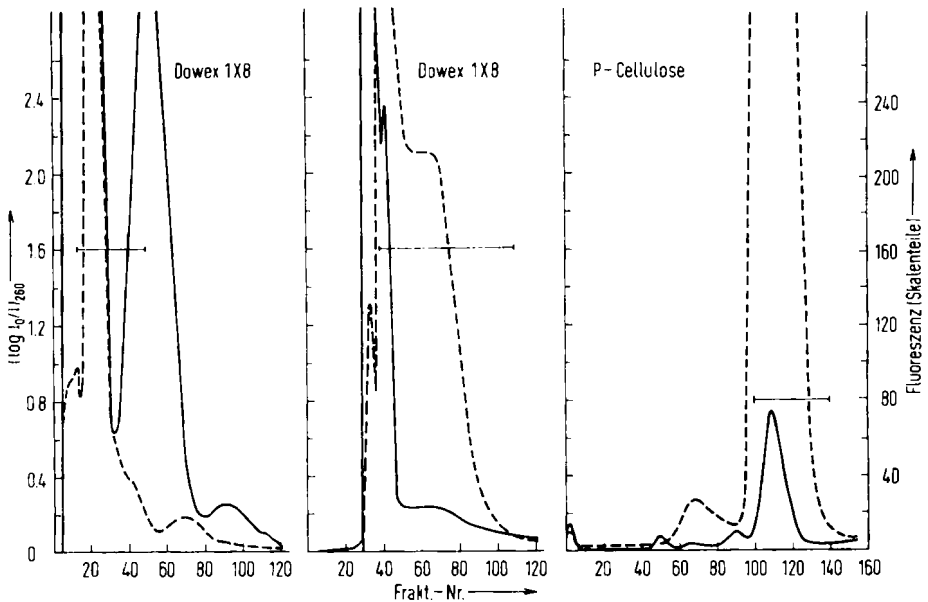
Tab. 1. UV-Absorption und spezif. Drehwerte der reinen Substanzen. Die UV-Daten der isomeren Trihydroxypropylpterine sind mit denen der entsprechenden Biopterinisomeren identisch

		Biopterin			7-Biopterin	
in 0.1 n HCl	λ_{\max} (m μ)	207	247	320	209.5	317
	ϵ (l. Mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	18 500	12 650	8 760	19 100	10 550
	$[\alpha]_D^{25}$	-59 ± 3° (c = 0.42)			-11 ± 3° (c = 0.22)	
in 0.1 n NaOH	λ_{\max} (m μ)	217	254	362	251.5	359
	ϵ (l. Mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	10 500	25 100	8 300	21 650	8 720
	$[\alpha]_D^{25}$	-44 ± 3° (c = 0.40)			-13 ± 3° (c = 0.20)	
in 0.1 n HCl	$[\alpha]_D^{25}$	-44 ± 3° (c = 0.40)			-13 ± 3° (c = 0.20)	

Biopterin und 6-[L-erythro-Trihydroxy-propyl]-pterin ergeben im *Crithidia*-Test¹²⁾ halbmaximales Wachstum bei einer Konzentration von 2.5×10^{-5} γ/cm Nährmedium, 7-Biopterin und 7-[L-erythro-Trihydroxy-propyl]-pterin sind auch bei 1000fach höherer Konzentration kein Wuchsstoff und hemmen die Wachstumswirkung der entsprechenden 6-Isomeren nicht.

Der extrem empfindliche *Crithidia*-Test macht die von R. TSCHESCHE und Mitarbb.¹⁴⁾ beschriebene Wachstumswirkung ihres als Isobiopterin bezeichneten 7-Isomeren unter der Annahme verständlich, daß Biopterin noch nicht restlos abgetrennt ist. Eine vergleichende

Wuchsstoffanalyse zeigte, daß unser 7-Biopterin noch etwa 0.05%, Isobiopterin von R. TSCHESCHE und Mitarbb. noch etwa 1% Biopterin enthalten kann. Wir trennten deshalb eine Vergleichsprobe von je 1 mg Biopterin und Isobiopterin *) an P-Cellulose auf. Eine Auswertung auf dem oben beschriebenen Wege zeigte beim Vergleich der chromatographischen Fraktionen in ihrer UV-Absorption bei $252\text{ m}\mu$, daß sich Biopterin durch die von den Autoren beschriebene Verteilungschromatographie in guter Reinheit gewinnen läßt, wenn auch Begleitstoffe noch in solcher Menge enthalten sind, daß das UV-Spektrum merklich verändert wird. Die hellgelbe Vergleichsprobe bestand, bezogen auf die UV-Absorption bei $252\text{ m}\mu$, aus 95% Biopterin, 2–3% 7-Biopterin, 1% Pterincarbonensäure und Spuren anderer Begleitstoffe, vor allem eines gelb fluoreszierenden Nebenproduktes. Das ebenfalls hellgelbe Isobiopterin enthielt dagegen etwa 25% Begleitstoffe, die größtenteils noch aus dem Rohprodukt stammten: 75% 7-Biopterin, 1% Biopterin, 3% Pterincarbonensäure, 20% andere Verunreinigungen. Es zeigte sich, daß durch die von den Autoren angewandten Verteilungschromatographien vor allem die auf P-Cellulose vor dem Biopterin wandernde, blau fluoreszierende und intensiv gelbe Substanz (Frakt. 80, Abbild. 2) und ein Teil eines gelb fluoreszierenden Nebenproduktes nicht vom 7-Biopterin abgetrennt werden. Die geringen Mengen Pterincarbonensäure dürften aus einer geringen Photolyse des sehr lichtempfindlichen Materials stammen. Nach der Chromatographie auf P-Cellulose war das gewonnene 7-Biopterin im *Crithidia*-Test nicht mehr wuchsstoffaktiv. Ebenso stimmten die UV-Spektren der Vergleichsproben nach der Chromatographie mit denen unseres synthetischen Biopterins und 7-Biopterins überein.



Abbild. 4. Isolierung von Biopterin aus dem Djalysat von 300 g Weiselszellenfuttersaft. Chromatographie an Dowex 1X8 und Rechromatographie des bezeichneten Bereichs auf Dowex 1X8. 14-ccm-Fraktionen, Elutionsmittel Wasser. Feinreinigung des bezeichneten Bereichs an P-Cellulose. 7.5-ccm-Fraktionen. Elutionsmittel Wasser. — Absorption bei $260\text{ m}\mu$, --- Fluoreszenzwerte

*) Herrn Professor R. TSCHESCHE, Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn, danken wir auch an dieser Stelle für die Überlassung von je 1 mg Biopterin und Isobiopterin.

Um unser synthetisches Material mit dem natürlichen Biopterin vergleichen zu können, haben wir das letztere nach dem an anderer Stelle beschriebenen Standardverfahren¹⁶⁾ durch Chromatographie eines wäßrigen Extraktes aus 300 Gramm Weisenzellenfuttersaft auf Dowex 1X8 angereichert und dann auf P-Cellulose gereinigt (Abbild. 4). Auch hier hat sich die Kombination von Anionen- und Kationenaustauscher gut bewährt und die Isolierung dieses Pterins mit wenigen Schritten ermöglicht. Nach Umkristallisieren aus Wasser wurden 1.5 mg Biopterin erhalten, dessen UV-Spektrum in 0.1 *n* NaOH und in 0.1 *n* HCl (Abbild. 3) dem unseres synthetischen Materials entspricht und das auch das gleiche Verhalten im *Criethidia*-Test zeigt. Die beiden Verbindungen besitzen einzeln und im Gemisch folgende identische *R_F*-Werte (zum Vergleich 6-[Trihydroxy-propyl]-pterin):

	synthet. und natürl. Biopterin	6-[Trihydroxy-propyl]- pterin
n-Butanol-(1)/Eisessig/Wasser (20:3:7)	0.28	0.13
Propanol-(1)/1-proz. wäßr. Ammoniak (2:1)	0.32	0.21
3-proz. wäßr. Ammoniumchloridlösung	0.62	0.60
4-proz. wäßr. Natriumcitratlösung	0.59	0.55

EINFLUSS DER REAKTIONSBEDINGUNGEN AUF DIE BIOPTERINAUSBEUTE¹⁵⁾

Die beschriebene Auftrennung von Rohbiopterin an P-Cellulose erlaubt eine relativ einfach durchzuführende Ausbeutebestimmung. Es genügt, die die beiden Isomeren enthaltende Zone (vgl. Abbild. 2) von den übrigen Begleitstoffen abzutrennen und von einem Aliquot dieses Gemisches den Quotienten E_{272}/E_{252} zu bestimmen. Man vergleicht einen Bereich großer Unterschiede in der Molextinktion (272 μ) mit einem solchen gleicher Extinktion (isosbestischer Punkt bei 252 μ) und erhält daraus eine lineare Abhängigkeit für das Isomerenverhältnis zwischen den beiden Endwerten 1.92 (100% Biopterin) und 1.48 (100% 7-Biopterin). Dieses Verfahren erfordert einen geringen Arbeitsaufwand und ist mit einem möglichen Fehler von etwa $\pm 5\%$ wesentlich genauer als bei einer Isomerenbestimmung durch Abbau zu den isomeren Carbonsäuren, anschließende papierchromatographische Auftrennung und Extinktionsmessung der eluierten Pterincarbonsäuren¹⁴⁾. Aus der UV-Absorption bei 252 μ läßt sich ferner die Gesamtkonzentration der Lösung bestimmen: c (Biopterin + 7-Biopterin) = $0.03 \log (I_0/I)_{252}$ (mg/ccm). Für die Ausbeutebestimmung trennten wir jeweils ein Aliquot der Reaktionslösung auf P-Cellulose. Dieses Verfahren erlaubt eine absolute Ausbeutebestimmung, da auch die in der Mutterlauge vorhandenen Pterine mit erfaßt werden.

Die in Tab. 2 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß für die Kondensation zum Biopterin sowohl Hydrazin als auch Säure nötig sind. Fehlen eine oder beide dieser Komponenten, so entsteht Biopterin nur in Spuren. Hauptprodukt ist in diesem Falle die als Nebenprodukt immer entstehende Substanz, welche in Abbild. 2 zwischen den Fraktionen 140–175 erscheint. Wird die Essigsäurekonzentration in Gegenwart von Hydrazin variiert, so ändert sich die Gesamtausbeute bei den beiden Isomeren nur wenig, der Biopterinanteil aber deutlich. Die optimalen Reaktionsbedingungen liegen bei der Kondensation in 20-proz. Essigsäure. Eine höhere Essigsäurekonzentration verschlechtert, wahrscheinlich durch Salzbildung mit der 5-Aminogruppe des Pyri-

midins I, die Biopterinausbeute; bei Kondensation in $2n$ HCl fiel nach Abkühlen und Neutralisieren der Reaktionslösung keine Substanz mehr aus. Versuche, die 5-Amino-Gruppe durch Zusatz von Aceton intermediär zu blockieren und so die Reaktion bevorzugt zum Biopterin zu leiten, hatten keinen Erfolg. Eine Verlängerung der Reaktionszeit von 25 Minuten auf 4.5 Stunden führte zu einer Verschlechterung der

Tab. 2. Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Kondensation von 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin (THP) mit 5-Desoxy-L-arabinose. a = Spaltung des Zuckerhydrazons in 20-proz. Essigsäure bei 95° , nach 30 Min. Zugabe von $\text{THP}\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$. b = Reaktionszeit 4.5 Stdn. Alle anderen Versuche wurden nach Standardbedingungen (S. 1404) ausgeführt.

Zusatz von $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	Reaktionslösung	Ausbeuten in % bezogen auf $\text{THP}\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$		% Biopterin im Isomeren- gemisch
		Biopterin + 7-Biopterin	Biopterin	
—	Wasser	Spuren		
—	10-proz. Essigsäure	Spuren		
—	20-proz. Essigsäure	2.5		
+	Wasser	Spuren		
+	10-proz. Essigsäure	32	6	19
+	20-proz. Essigsäure	33	7	21
+	10-proz. Essigsäure	33	6	18
	+ 10% Aceton			
+	20-proz. Essigsäure	35	7	20
	+ 10% Aceton			
+	50-proz. Essigsäure	35	5	14
	+ 10% Aceton			
+	20-proz. Essigsäure a	20	5	25
+	20-proz. Essigsäure b	16		
+	1 n Na-Acetat-puffer, pH 4.0	20	3.5	17

Ausbeute; dafür bildete sich in größerer Menge das auch bei Kondensation ohne Hydrazinzusatz entstehende Nebenprodukt. Stellt man zunächst das Hydrazon her, indem man die Methyltetrose 15 Minuten lang in der Hitze mit Hydrazinhydrat reagieren läßt, spaltet anschließend durch Erhitzen in 20-proz. Essigsäure bei 100° und gibt nach 30 Minuten das Pyrimidin I zu, so ändert sich zwar das Isomerenverhältnis zugunsten des Biopterins, gleichzeitig nimmt aber die Gesamtausbeute beträchtlich ab. Bemerkenswert ist ferner die wesentlich geringere Ausbeute bei Kondensation in Puffer, einem Verfahren, nach dem die Polyhydroxyalkylpterine üblicherweise synthetisiert werden.

Synthese von $[8\alpha\text{-}^{14}\text{C}]$ Biopterin und $[8\alpha\text{-}^{14}\text{C}]7$ -Biopterin

Das für die Synthese benötigte $[4\text{-}^{14}\text{C}]2.4.5$ -Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-sulfat haben wir, ausgehend von K^{14}CN in einem vereinfachten und modifizierten Verfahren nach F. KORTE und H. BARKEMEYER¹⁷⁾, W. TRAUBE¹⁸⁾ sowie C. K. CAIN und Mitarbb.¹⁹⁾ dargestellt. 5-Desoxy-L-arabinose wurde durch Abbau der L-Rhamnose

¹⁷⁾ Chem. Ber. 89, 2400 [1956]; 90, 392 [1957].

¹⁸⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 33, 1371 [1900].

¹⁹⁾ C. K. CAIN, M. F. MALLETT und E. C. TAYLOR, J. Amer. chem. Soc. 68, 1996 [1946].

nach D. L. MACDONALD und H. O. L. FISCHER²⁰⁾ mit der Modifizierung von E. L. PATTERSON und Mitarbb.¹⁰⁾ gewonnen. Durch Kondensation in 20-proz. Essigsäure und chromatographische Reinigung auf dem beschriebenen Wege wurden 2.4 mg reines [8a-¹⁴C]Biopterin (0.5% d. Th., bezogen auf KCN) und 7.7 mg reines [8a-¹⁴C]7-Biopterin (1.6% d. Th.) mit einer spezifischen Aktivität von 1 mC/mMol erhalten.

Herrn Professor A. BUTENANDT sind wir für die großzügige Förderung dieser Arbeit sehr dankbar. Der Weiselzellenfuttersaft wurde von Herrn Dr. K. A. FORSTER, Fa. H. MACK, NACHF. zur Verfügung gestellt, wofür auch an dieser Stelle gedankt sei. Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für eine Sachbeihilfe. Fräulein S. SCHÄR leistete bei der Isolierung des natürlichen Biopterins, Fräulein G. RÄDEL bei der Durchführung des *Crithidia*-Tests, Fräulein I. EHRHARDT bei der Aufnahme der UV-Spektren wertvolle Hilfe.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die chromatographischen Fraktionen wurden mit einem UV-Spektralphotometer PMQ II (Zeiss), die UV-Spektren mit einem selbstregistrierenden UV-Spektralphotometer DK2 (Beckman) vermessen.

Präparation der Chromatographiesäule

Als Säulenfüllung verwendeten wir P-Cellulose der Fa. Serva (Austauschkapazität 0.77 mÄqu/g) oder Schleicher & Schüll (1.76 mÄqu/g). Auf der stärker phosphorylierten Cellulose der Fa. Whatman wurden die Pterine so stark festgehalten, daß sie erst mit schwacher Säure eluiert werden konnten. Die für ein Säulenvolumen von 130 ccm ausreichende Menge P-Cellulose wird mehrmals in Wasser aufgeschlämmt und dadurch von feinen Bestandteilen befreit. Das Material wird dann als dünner Brei mit Wasser in ein Chromatographierohr (Durchmesser 24 mm, Länge 500 mm) eingefüllt, das unten mit Watte und einem Hahn verschlossen ist. Nachdem sich das Säulenmaterial homogen gepackt hat, wird mit etwa 500 ccm einer wäßr. Lösung, enthaltend 2.5% Ammoniumformiat und 2.5% Ameisensäure, anschließend mit 600 ccm 5-proz. wäßr. Ameisensäure behandelt. Dann wird die Säule mit Wasser neutral gewaschen. Zur Erzielung einer einwandfreien Trennung ist es wichtig, die Oberfläche der Säule homogen festzudrücken, ehe die Substanzlösung aufgetragen wird. Die präparierte Säule soll eine Füllhöhe von ungefähr 30 cm haben, jedoch lassen sich mit kleineren Säulen und entsprechend geringeren Substanzmengen auch befriedigende Trennungen erzielen. Zum Regenerieren wäscht man die Säulenfüllung mit dem angegebenen Formiatpuffer so lange, bis die Hauptmenge der fluoreszierenden Verbindungen herausgewaschen ist (0.5–1.5 l, je nach Grad der Verschmutzung), anschließend mit 0.6 l 5-proz. Ameisensäure und etwa 0.5 l Wasser. Selbst nach zwanzigmaliger Benutzung lieferte unsere Säule noch gute Trennergebnisse. Wegen deutlicher Hydrolyse des Säulenmaterials soll nicht bei erhöhter Temperatur chromatographiert werden.

Chromatographie des Rohbiopterins

100 mg Rohbiopterin werden mit 150 ccm Wasser aufgekocht, die Lösung nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur filtriert. Das in dieser Flüssigkeitsmenge vollständig gelöste Biopterin wird mit einer Pipette vorsichtig auf die Säule aufgetragen. Nach Einziehen der Lösung wird mit mehreren Portionen warmem Wasser nachgespült und dann die Säule mit einem Vorratsgefäß verbunden. Durch einen Ionenaustauscher entsalztes Wasser enthält immer merkliche Mengen gelöster Stoffe; es empfiehlt sich deshalb, für die Chromatographie dest.

²⁰⁾ J. Amer. chem. Soc. 74, 2087 [1952].

Wasser zu verwenden. Beim Anleuchten mit der UV-Lampe ist die Pterinzone als blau fluoreszierende Bande am Säulenkopf zu erkennen. Man reguliert auf 8–10 Tropfen pro Min. ein und fängt die ausfließende Lösung in 10- oder 25-ccm-Frakt. auf. Die Chromatographie wird im Dämmerlicht durchgeführt, um Lichtzersetzungen zu vermeiden. Zur Auswertung werden die Fraktionen bei 272 m μ vermessen und bei einer optischen Dichte über 1.5 entsprechend verdünnt. Vom Beginn der ersten stark blau fluoreszierenden Hauptzone an wird außerdem bei 252 m μ gemessen und der Quotient E_{272}/E_{252} bestimmt. Die Biopterinzone mit einem Quotienten über 1.70 und die Zone des 7-Biopterins mit einem solchen zwischen 1.70 und 1.45 wird gesammelt und i. Vak. eingengt. Bei der Rechromatographie werden die jeweiligen Fraktionen mit konstantem Quotienten isoliert, die Übergangszonen notfalls nochmals chromatographiert. Die Lösungen der reinen Isomeren werden im Rotationsverdampfer auf 5–7 ccm eingengt und 24 Stdn. bei 0° gehalten. Der erhaltene Niederschlag wird bei +5° abzentrifugiert und noch dreimal aus je 3 ccm Wasser umkristallisiert. Der Niederschlag wird mit wenig Methanol gewaschen und bei 110° i. Vak. getrocknet. Ausb. 4 mg *Biopterin*, 23 mg *7-Biopterin*. Nach Permanganatoxydation auf dem bereits beschriebenen Wege²¹⁾ wurde reine Pterin-carbonsäure-(6) bzw. -(7) erhalten.

Das Retentionsvolumen der Substanzzonen ist stark vom Phosphorylierungsgrad des Säulenmaterials abhängig und sollte bei der beschriebenen Säule für Biopterin etwa 1.7 l betragen. Bei nicht völlig regenerierten Säulen oder stark salzhaltigen Biopterinlösungen ist das Retentionsvolumen stark verkürzt und die Trennung nur unvollständig. Der Wert für die UV-Quotienten ist in gewissen Grenzen von den verwendeten Meßgeräten abhängig (besonders von einer unterschiedlichen Durchlässigkeit der Küvetten und von der Justierung des Gerätes), aber für die jeweilige Meßeinrichtung konstant.

2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-sulfat wurde nach C. K. CAIN, M. F. MALETTE und E. C. TAYLOR¹⁹⁾ hergestellt.

5-Desoxy-L-arabinose: Ausgehend von 100 g *L-Rhamnose*, erhielten wir nach der Vorschrift von E. L. PATTERSON und Mitarbb.¹⁰⁾ 7.5 g (9.1% d. Th.) *5-Desoxy-L-arabinose* als Sirup. Die quantitative Zuckerbestimmung wurde auf colorimetrischem Wege²²⁾ durchgeführt.

Herstellung von Rohbiopterin (Standardbedingungen): 119.6 mg 96-proz. *Hydrazinhydrat* (2.3 mMol) werden in einen 50-ccm-Rundkolben eingewogen und mit 110 mg *5-Desoxy-L-arabinose* (0.82 mMol) in 0.5 ccm Wasser auf dem Wasserbad erhitzt. Nach 15 Min. gibt man zu der Lösung 3.5 ccm Wasser und 1.0 ccm Eisessig (oder ein entsprechendes Reaktionsmedium nach Tab. 2) und erhitzt mit 91.5 mg *2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-sulfat* (0.38 mMol) weitere 25 Min. auf dem Wasserbad. Die Lösung kann in gewissen Grenzen (wir verwendeten zur Ausbeutebestimmung 1/5 des Reaktionsansatzes, verdünnt mit 30 ccm Wasser) direkt auf die Säule aufgetragen werden. Isoliert man das nach 10 Stdn. im Eisschrank ausgefallene Rohprodukt, so macht dieses 50–65% d. Th. aus. Es enthält etwa 20% Biopterin und lieferte 6.3 mg *Biopterin* (7% d. Th.) und 23.7 mg *7-Biopterin* (26% d. Th.).

Völlig analog wurden durch Kondensation mit *L-Arabinose* reines *2-Amino-4-hydroxy-6-bzw. 7-[L-erythro-1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridin* hergestellt.

Isolierung von Biopterin aus Weiselzellenfuttersaft: 300 g Weiselzellenfuttersaft wurden mit 150 ccm Wasser verdünnt und 5 mal gegen je 3 l Wasser dialysiert. Die gesammelten Dialysate haben wir im Rotationsverdampfer vor der Wasserstrahlpumpe auf etwa 300 ccm eingengt, 3 mal mit je 250 ccm Äther ausgeschüttelt und dann auf 70 ccm eingengt. Dieses Konzentrat

²¹⁾ H. REMBOLD und L. BUSCHMANN, Liebigs Ann. Chem. 662, 72 [1963].

²²⁾ Methoden d. organ. Chemie (Houben-Weyl), 4. Aufl.; Bd. II, S. 621, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1953.

wurde auf eine Dowex 1X8-Säule (Formiatform, 2 cm Durchmesser, 50 cm Länge; die Präparation der Säule haben wir an anderer Stelle¹⁶⁾ beschrieben) aufgetragen und mit dest. Wasser entwickelt. Die Biopterin enthaltenden Fraktionen (vgl. Abbild. 4) haben wir nach dem Einengen auf 50 ccm nochmals auf einer solchen Säule chromatographiert und die auf 50 ccm eingeeengten Biopterinfraktionen dann auf einer P-Cellulose-Säule (2 cm Durchmesser, 25 cm Länge) durch Elution mit Wasser gereinigt. Die das abgetrennte Biopterin enthaltenden Fraktionen wurden auf 2 ccm eingeeengt und nach Erhitzen auf 50° filtriert. Nach 24 Stdn. hatte sich bei +5° ein Niederschlag abgeschieden, der bei derselben Temperatur abzentrifugiert und aus 1 ccm Wasser umkristallisiert wurde. Den abgetrennten Niederschlag haben wir in 2 ccm heißem Wasser gelöst und durch Lyophilisieren getrocknet. Nach Trocknen bei 110° wog das isolierte *Biopterin* 1.5 mg.

[4-¹⁴C]2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-sulfat: In einen 100-ccm-Rundkolben werden 203.5 mg *Chloressigsäure* (2.15 mMol) eingewogen, 300 mg wasserfreies K₂CO₃ zugegeben und anschließend langsam 1 ccm Wasser. Nach beendeter CO₂-Entwicklung fügt man 130.2 mg K¹⁴CN (2 mMol, spezif. Aktivität 1 mC/mMol) zu und erhitzt 1 Stde. lang auf dem Wasserbad. Nach Abziehen des Wassers im Rotationsverdampfer wird das K-Salz der Cyanessigsäure 2 Tage lang über CaCl₂ getrocknet. Man verestert dann in 4 ccm absol. Methanol mit 0.8 ccm *Dimethylsulfat* (8.5 mMol), indem man 1 Stde. unter Rückfluß kocht, gibt 292.8 mg *Guanidinnitrat* (2.4 mMol), 4 ccm absol. Methanol und tropfenweise eine Lösung von 0.3 g Na in 3 ccm absol. Methanol zu, erhitzt 2 Stdn. auf dem Wasserbad und versetzt dann mit 5 ccm Wasser, stellt mit konz. Salzsäure auf pH 4 ein und destilliert das Methanol vollständig ab. Man gibt anschließend 1 ccm Wasser zu, bei 90° eine konz. NaNO₂-Lösung bis zu dessen Überschuß, hält noch weitere 5 Min. bei dieser Temperatur und pipettiert dann den rosaroten Niederschlag von [4-¹⁴C]2.4-Diamino-6-hydroxy-5-nitroso-pyrimidin in ein Zentrifugenglas. Den Niederschlag wäscht man mit je 3 ccm Wasser 3 mal aus, löst die Nitrosoverbindung in 3 ccm 10-proz. Natronlauge und versetzt so lange bei 95° mit festem Dithionit, bis die anfangs dunkelrote Lösung hellgelb wird. Es wird weitere 5 Min. bei 95° gehalten, dann wird konz. Salzsäure bis pH 1 zugetropft und eine kleine Spatelspitze A-Kohle zur Adsorption des entstandenen Schwefels zugegeben. Die Lösung wird noch heiß abgesaugt und dann mit 12 Tropfen konz. Schwefelsäure und 2 ccm Methanol versetzt. Man läßt 12 Stdn. im Eisschrank stehen und erhält 50.1 mg (11% d. Th., bez. auf KCN) des radioaktiven Pyrimidins als farblose Nadeln, die abgesaugt und mit Methanol gewaschen werden.

Radiosynthese des Rohbiopterins

In einen 50-ccm-Rundkolben werden 66.1 mg 96-proz. *Hydrazinhydrat* (1.27 mMol) eingewogen und 63 mg *5-Desoxy-L-arabinose* (0.47 mMol) in 0.5 ccm Wasser zugegeben, wobei sich die Lösung etwas erwärmt. Man hält auf dem Wasserbad für 15 Min. bei 95°, fügt dann 1.9 ccm Wasser, 0.6 ccm Eisessig und 50.1 mg [4-¹⁴C]2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-sulfat (0.21 mMol) zu und erhitzt weitere 25 Min. Bereits nach 15 Min. färbt sich die Lösung dunkelgelb. Nach beendeter Reaktion verdünnt man mit Wasser auf 30 ccm und trägt diese Lösung sofort auf die vorbereitete P-Cellulose-Säule auf. Nach zweimaliger Rechromatographie an derselben Säule erhält man mit der beschriebenen Auswertung 2.4 mg reines [8a-¹⁴C]-*Biopterin* (0.5% d. Th., bez. auf eingesetztes KCN) und 7.7 mg [8a-¹⁴C]7-*Biopterin* (1.6% d. Th.).