

reproduzierbare Werte von  $D$  erhält, sollte als nächstes geprüft werden, ob sich auch bei Variation der Bedingungen konstante  $D$ -Werte ergeben. Wir haben bereits in diesem Sinne Vorversuche durchgeführt, z. B. wurde für verschiedene Werte von  $d$  zwischen 0,5 und 1,3 mm innerhalb der Fehlergrenzen stets der gleiche  $D$ -Wert erhalten.

In unserer früheren Arbeit<sup>2)</sup> haben wir für Tristearin in Triolein (ebenfalls mit einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95%)  $D$  zu  $(15,0 \pm 8,8) \cdot 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/sec angegeben. Das Konfidenzintervall des in der vorliegenden Arbeit bestimmten Wertes liegt in diesen Grenzen. Wir geben dem neuen Wert wegen seiner grösseren Genauigkeit den Vorzug.

Wir sind dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* für die Unterstützung dieser Arbeit zu grossem Dank verpflichtet; weiter dankt der eine von uns (R.J.) der ESSO RESEARCH LTD., London, für die Gewährung eines Stipendiums.

#### SUMMARY

A method for measuring diffusion coefficients in liquids is described. The diffusing substance  $S$  is radioactively tagged. At time zero it is concentrated at the bottom of a vessel containing the diffusion medium  $M$ . During the experiment it moves through  $M$  by diffusion towards a GEIGER-MÜLLER tube. From the total number of counts registered as a function of time a time lag  $L$  is determined which is characteristic for the experiment. The value of the diffusion coefficient  $D$  is calculated from  $L$  and from the thickness  $d$  of  $M$ . For tristearin in triolein we find (with a confidence level of 95%)  $D = (7,57 \pm 0,83) \cdot 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/sec.

Physikalisch-chemische Anstalt der Universität Basel

## 228. Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*

11. Mitteilung

### Chemische Eigenschaften des 2-Amino-6-hydroxy-pteridins

von M. Viscontini und H. R. Weilenmann

(24. IX. 58)

Das 2-Amino-6-hydroxy-pteridin (I) wurde als Naturstoff zum ersten Male aus *Drosophila melanogaster*, wo es das HB<sub>2</sub>-Pteridin begleitet, isoliert<sup>1)</sup>). Später haben wir dieses Pterin, immer in Begleitung von HB<sub>2</sub>, in *Astacus fluviatilis*<sup>3)</sup> und in *Ephestia kühniella*<sup>4)</sup> wiedergefunden.

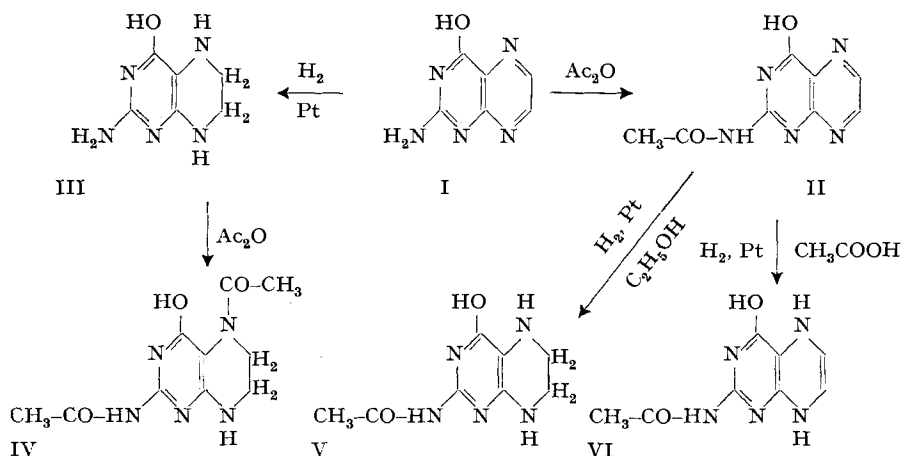
<sup>1)</sup> M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER & E. HADORN, *Helv.* **38**, 397 (1955).

<sup>2)</sup> H. S. FORREST & H. K. MITCHELL, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 4865 (1955).

<sup>3)</sup> M. VISCONTINI, H. SCHMID & E. HADORN, *Experientia* **11**, 390 (1955).

<sup>4)</sup> M. VISCONTINI, A. KÜHN & A. EGELHAAF, *Z. Naturforsch.* **11**, 501 (1956).

Seit zehn Jahren weiss man auch, dass das Pteridin I ein Abbauprodukt der Folsäure<sup>5)</sup>, und neuerdings, dass es ein solches des  $\text{HB}_2$ <sup>2)</sup><sup>6)</sup> und der Drosopterine ist<sup>7)</sup>. Wir glauben deshalb, dass man es in allen lebenden Organismen, wo  $\text{HB}_2$  isoliert werden kann, vorfinden wird. In der Literatur findet man in bezug auf dieses Pteridin allerdings nur fragmentarische Angaben. Das 2-Amino-6-hydroxy-pteridin wurde erstmals von C. K. CAIN, M. F. MALETTE & E. C. TAYLOR<sup>8)</sup> aus 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin und Glyoxal und später von G. P. G. DICK & H. C. S. WOOD<sup>9)</sup> aus 2-Chlorpyrazin-3-carbonsäure-methylester und Guanidin synthetisch hergestellt. E. L. R. STOKSTAD *et al.*<sup>10)</sup> gaben sein UV.-Adsorptionsspektrum wieder, und ALBERT *et al.*<sup>11)</sup> fanden für seine pK-Werte 2,31 und 7,92 (spektrophotometrisch).



Da nur wenige rein chemische Angaben über dieses Produkt vorlagen, haben wir diese Substanz näher untersucht. Unsere ersten Versuche, welche wir nicht ausführlich beschreiben wollen, weil sie eine Wiederholung der oben erwähnten Arbeiten sind, bestätigten den zwitterionischen Charakter des Pteridins I, erkennbar an seinem UV.-Absorptionsspektrum (Fig. 1) und an seinen Löslichkeitseigenschaften. Wir haben die pK-Werte 2,51 und 8,02 spektrophotometrisch berechnet und sie in guter Übereinstimmung mit den früher in der Literatur angegebenen Werten gefunden. Das IR.-Spektrum (Fig. 2) ist bemerkenswert; charakteristisch ist die Form der Kurve zwischen 3 und 5,5  $\mu$ . Um die Natur dieser Bande zu ermitteln, haben wir das Pteridin I mit Acetanhydrid behandelt und so ein Monoacetylpteridin erhalten, das leicht kristallisiert und sich, obwohl unbeständig, aus Wasser umkristallisieren

<sup>5)</sup> O. H. LOWRY, O. A. BESSEY & E. J. CRAWFORD, J. *biol. Chemistry* **180**, 389 (1949).

<sup>6)</sup> M. VISCONTINI, E. LOESER & A. EGELHAAF, *Naturwissen.* **43**, 379 (1956).

<sup>7)</sup> M. VISCONTINI, E. HADORN & P. KARRER, *Helv.* **40**, 579 (1957).

<sup>8)</sup> J. *Amer. chem. Soc.* **68**, 1996 (1946).

<sup>9)</sup> J. *chem. Soc.* **1955**, 1379.

<sup>10)</sup> J. *Amer. chem. Soc.* **70**, 5 (1948).

<sup>11)</sup> A. ALBERT, D. J. BROWN & G. CHEESEMAN, J. *chem. Soc.* **1952**, 4219.

lässt. Die Eigenschaften dieses Acetylpteridins entsprechen denjenigen der Acetylpteridine, die vor mehreren Jahren in unserem Institut verwendet wurden, um substituierte Pteridine zu isolieren und charakterisieren<sup>12)</sup>. Das UV.-Absorptionsspektrum des acetylierten Pteridins (Fig. 3) zeigt, dass die Acylierung am freien basischen Stickstoffatom des Kohlenstoffes 2 stattfand; das Produkt enthält nur eine schwache Säuregruppe, die Enolfunktion am Kohlenstoffatom 6, vom pK 7,27<sup>13)</sup>. Dementsprechend verliert das IR.-Spektrum (Fig. 4) die 3,65- $\mu$ -Bande, die für die freie Aminogruppe der Pteridine charakteristisch scheint. Das N-Acetylpteridin II fluoresziert nicht mehr. Will man seine Lage auf dem Papier nach dem Chromatographieren sichtbar machen, so muss man den entwickelten und getrockneten Papierstreifen in einer  $\text{NH}_3$ -Atmosphäre einige Zeit belassen. Auf diese Weise wird die Acetylgruppe rasch hydrolysiert, und die Fluoreszenz des 2-Amino-6-hydroxy-pteridins tritt wieder auf.

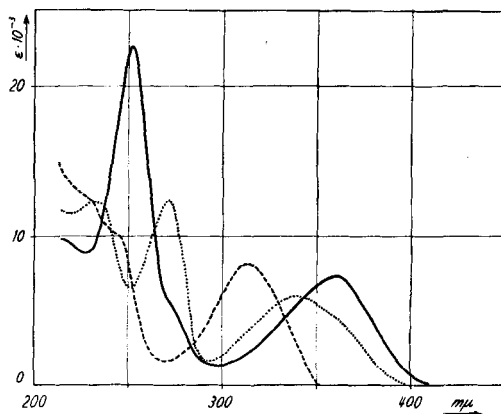


Fig. 1

UV.-Absorptionsspektrum von 2-Amino-6-hydroxy-pteridin (I).

----- in 0,1-n.HCl      ..... in Pufferlösung von pH 6  
 ————— in 0,1-n.NaOH

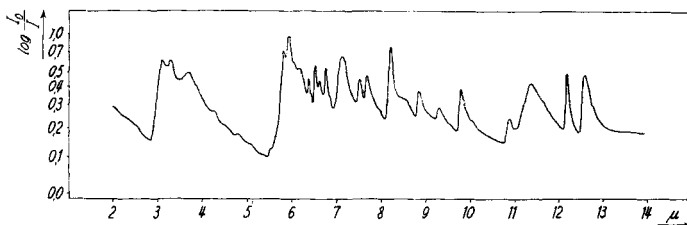


Fig. 2

IR.-Absorptionsspektrum von 2-Amino-6-hydroxy-pteridin (I) (KBr-Tablette)

<sup>12)</sup> P. KARRER & R. SCHWYZER, *Helv.* **32**, 423 (1949).

<sup>13)</sup> Spektrophotometrisch berechnet.

Es ist schon lange bekannt, dass hydrierte Pterine biologisch reaktionsfähiger sein können als die dehydrierten, z. B. ist die Dihydro- bzw. Tetrahydro-folsäure wirksamer als die Folsäure selbst<sup>14)15)</sup>. FORREST & MITCHELL<sup>16)</sup> haben auch für das Sepiapterin aus *Drosophila melanogaster* eine dihydrierte Struktur vorgeschlagen. Wir glauben selbst, dass die Drosopterine Dihydroprodukte sind<sup>17)</sup>, ebenso wie die aus *Ephestia kühniella* isolierten Pigmente G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub><sup>4)</sup>, für welche wir ihrer Unbeständigkeit wegen keine Struktur ermitteln konnten. Alle diese Betrachtungen haben uns veranlasst, das Studium der Hydrierungsprodukte des Pteridins I und des N-Acetylpteridins II aufzunehmen.

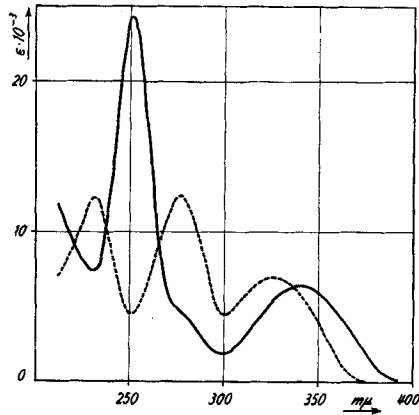


Fig. 3

UV.-Absorptionsspektrum von 2-Acetylamino-6-hydroxy-pteridin (II)  
 ----- in 0,1-n.HCl      ——— in 0,1-n.NaOH

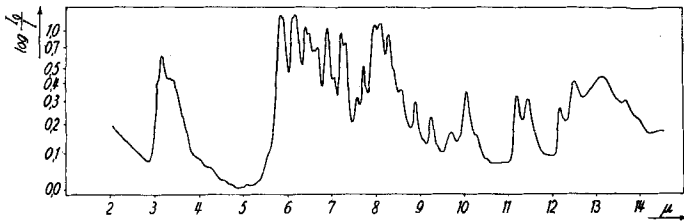


Fig. 4

IR.-Absorptionsspektrum von 2-Acetylamino-6-hydroxy-pteridin (II) (KBr-Tablette)

Die katalytische Hydrierung von 8- und 9-substituierten 2-Amino-6-hydroxy-pteridinen wurde schon mehrmals durchgeführt und beschrieben. Die Mehrzahl dieser Arbeiten bezieht sich auf die Struktur des *Citrovorum*-Faktors

<sup>14)</sup> B. L. ODELL, J. M. VANDENBELT, E. S. BLOOM & J. PFIFFNER, J. Amer. chem. Soc. **69**, 250 (1949); MARGIE MAY *et al.*, *ibid.* **73**, 3067 (1951).

<sup>15)</sup> BARBARA ROTH *et al.*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3247 (1952).

<sup>16)</sup> H. S. FORREST & H. K. MITCHELL, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5658 (1954).

<sup>17)</sup> M. VISCONTINI, Helv. **41**, 1299 (1958).

oder Leucoverins<sup>14)</sup><sup>15)</sup>). Als Folge dieser Versuche nimmt man an, dass der Pyrazinring der Pteridine durch Anlagerung von 2 Mol.  $H_2$  reduziert wird, da das UV.-Spektrum der so erhaltenen Tetrahydro-pteridine demjenigen der Triamino-hydroxy-pyrimidin-Derivate ähnlich ist<sup>15)</sup><sup>18)</sup><sup>19)</sup>. Die Hydrierung des 2-Amino-6-hydroxy-pteridins verläuft ganz ähnlich; sie ist nach der Aufnahme von 2 Mol.  $H_2$  beendet, die zwei Doppelbindungen des Pyrazinringes werden gesättigt und die Fluoreszenz verschwindet. Das UV.-Absorptionsspektrum

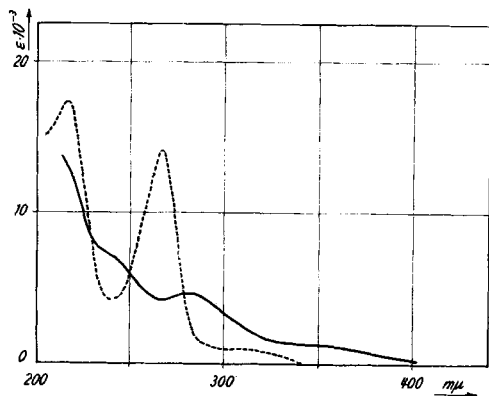


Fig. 5

UV.-Absorptionsspektrum von 2-Amino-6-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-pteridin (III)

----- in 0,1-n.HCl  
 ——— in 0,1-n.NaOH

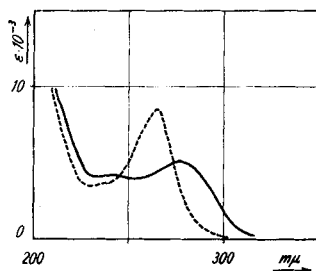


Fig. 6

UV.-Absorptionsspektrum von 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin

----- in 0,1-n.HCl  
 ——— in 0,1-n.NaOH

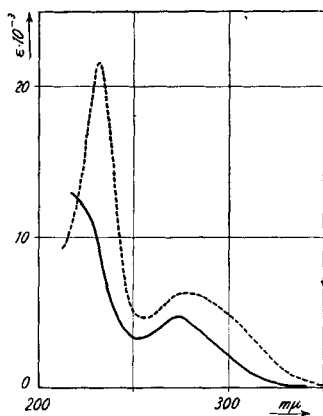


Fig. 7

UV.-Absorptionsspektrum der Diacetyl-tetrahydro-pteridins IV

----- in 0,1-n.HCl      ——— in 0,1-n.NaOH

<sup>18)</sup> DONNA B. COSULICH *et al.*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3252 (1952).

<sup>19)</sup> L. B. CAVALIERI & A. BENDICH, J. Amer. chem. Soc. **72**, 2587 (1950).

des hydrierten Produktes (Fig. 5) ist mit demjenigen des 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidins (Fig. 6) verwandt und spricht somit für die Struktur III des so erhaltenen Tetrahydro-pteridins. Die hydrierte Substanz III ist ausserordentlich unbeständig und erleidet an der Luft eine sofortige Rückoxydation, unter Bildung von komplizierten Zwischenprodukten und roten Harzen. Um dieses Tetrahydro-pteridin zu isolieren, ist es nötig, mit  $\text{SO}_2$ -enthaltenden Lösungen zu arbeiten. Unter diesen Bedingungen kann man ein Tetrahydro-pteridin-sulfit erhalten, das sich im Vakuum einige Zeit ohne grosse Zersetzung aufbewahren lässt. Man kann dieses Salz acetylieren; das gebildete kristalline Produkt ist viel beständiger als das Ausgangsmaterial. Die Analyse lässt vermuten, dass es sich um ein Diacetyl-tetrahydro-pteridin handelt, dessen UV.-Absorptionsspektrum (Fig. 7) wenig Änderungen erlitten hat. Man stellt im sauren Gebiet nur eine hypochrome Verschiebung der Maxima von 267 nach 232 und von 310 nach 280  $m\mu$  fest, verbunden mit einer Erhöhung der molaren Extinktion, wie dies übrigens bei der Acylierung der freien Aminogruppe des 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidins<sup>19)</sup> in 5-Stellung auch der Fall ist. Dementsprechend schreiben wir diesem Diacetyl-Derivat die Struktur IV zu.

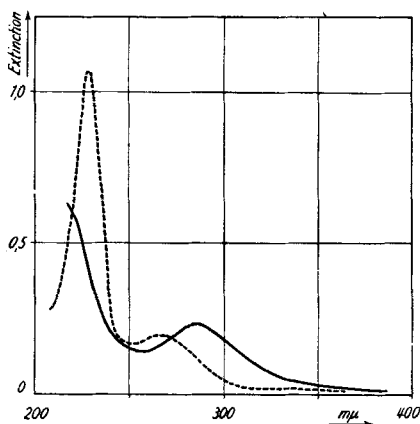


Fig. 8

UV.-Absorptionsspektrum von 2-Acetylamino-6-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-pteridin (V)  
 ----- in 0,1-n.HCl      ————— in 0,1-n.NaOH

Die katalytische Hydrierung des N-Acetylpteridins II verläuft anders. In Äthanol, mit Pt als Katalysator, nimmt das Produkt unter Verlust der Fluoreszenz zwei Mol.  $\text{H}_2$  auf. Das UV.-Absorptionsspektrum (Fig. 8) des Acetylamino-tetrahydro-pteridins entspricht demjenigen eines Produktes mit der Struktur V. Wegen ihrer Unbeständigkeit war es leider unmöglich, die Substanz zu isolieren. Hingegen ist die Reduktion in Eisessig nach Aufnahme einer Molekel  $\text{H}_2$  beendet; die Fluoreszenz verschwindet ebenfalls. Das Dihydro-Derivat ist auch unbeständig, lässt sich schwer isolieren und weist ein unerwartetes UV.-Absorptionsspektrum auf (Fig. 9), mit Banden, die im gan-

zen denjenigen des Ausgangsmaterials entsprechen, jedoch mit grösseren molaren Extinktionen. Da das Produkt nicht fluoresziert, nehmen wir an, dass dieses Dihydro-pteridin noch das Gerüst des 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidins besitzt, mit der Struktur VI eines 2-Acetylamino-6-hydroxy-7,10-dihydro-pteridins.

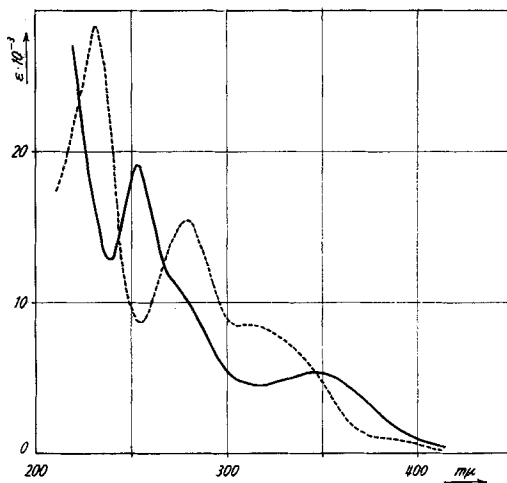


Fig. 9

UV.-Absorptionsspektrum von 2-Acetylamino-6-hydroxy-7,10-dihydro-pteridin (VI)

----- in 0,1-n.HCl      ——— in 0,01-n.NaOH

Alle oben beschriebenen hydrierten Pteridine sind aussergewöhnlich unbeständig, reduzieren in der Kälte Silbernitrat-Lösung und werden an der Luft unter Bildung von rotgefärbten Pigmenten rüccoxydiert.

Herrn Prof. P. KARRER danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit.

**Experimentelles.** — 2-Acetylamino-6-hydroxy-pteridin (II). 1 g 2-Amino-6-hydroxy-pteridin<sup>8)</sup> wurde mit 70 ml Essigsäureanhydrid 7 Std. unter Rückfluss gekocht und die heisse Lösung filtriert; die Acetylverbindung kristallisierte beim Abkühlen in feinen weissen Nadelchen aus; das Produkt lässt sich aus heissem Wasser umkristallisieren, in das zur Verhinderung einer Oxydation etwas SO<sub>2</sub> eingeleitet wurde. Ausbeute 0,7 g. Das Produkt zersetzt sich bei 285° und schmilzt zusammen bei 310°.

C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> N <sub>5</sub>	Ber. C 46,83	H 3,44	N 34,14%
(205,18)	Gef. „ 46,66	„ 3,90	„ 34,36%

Rf-Werte des Produktes in verschiedenen Lösungsmitteln: 3-proz. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung = 0,65–0,70; Butanol, Eisessig, Wasser 20:3:7 = 0,50; Propanol, 1-proz. NH<sub>3</sub>-Lösung 2:1 = 0,62.

2-Amino-6-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-pteridin-sulfit (III-Sulfit). Man hydrierte 1 g 2-Amino-6-hydroxy-pteridin in 50 ml n. NaOH mit 109 mg Platinoxid als Katalysator. Bei 720 Torr und 18° wurden in 18 Std. 310 ml H<sub>2</sub> aufgenommen (unter diesen Bedingungen für 2 Mol. H<sub>2</sub> ber. 316 ml). Das Platin wurde abfiltriert, die Lösung mit Essigsäure neutralisiert (pH 7) und eingengt. Den Rückstand hat man in wenig Wasser aufgenommen und in die Lösung SO<sub>2</sub> eingeleitet, bis letztere leicht nach SO<sub>2</sub> roch. Nach Behandeln mit wenig Tierkohle wurde die Lösung im Vakuum eingengt. Ein weisses Produkt fiel

aus, das abfiltriert sowie mit Äthanol und Äther gewaschen wurde. Wegen seiner Unbeständigkeit liess sich dieses Tetrahydro-pterin nicht umkristallisieren. Die Substanz verkohlt ohne Schmelzen oberhalb 250°.

$C_6H_{11}O_4N_5S$	Ber. C 28,91	H 4,45	N 28,10	S 12,86%
(249,25)	Gef. „ 29,72	„ 4,20	„ 27,50	„ 14,80%

In  $NH_4Cl$ -Lösung chromatographiert weist das nicht fluoreszierende Produkt einen Rf-Wert von 0,75 auf. Die Fluoreszenz tritt erst nach Oxydation an der Luft auf.

*2-Acetylamino-7-acetyl-6-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-pteridin (IV)*. 500 mg Tetrahydro-pteridin III wurden in 50 ml einer Mischung von Eisessig und Essigsäureanhydrid (1:1) unter Rückfluss gekocht, bis Lösung eingetreten war. Hierauf hat man die Lösung im Vakuum zur Trockene eingeeengt, den festen Rückstand in 40° warmem Äthanol gelöst und die Lösung mit wenig Tierkohle entfärbt. Die erhaltene äthanolische Lösung wurde bis zur Trübung eingeeengt. Man fügte Äther zu, und nach einigen Std. Stehen setzte sich ein weisser, kristalliner Niederschlag ab. Das auskristallisierte Derivat wurde abfiltriert, gewaschen und getrocknet. Wie das Tetrahydro-pteridin III lässt sich das Diacetyl-tetrahydro-pteridin IV wegen seiner Unbeständigkeit nicht umkristallisieren. Das Produkt verkohlt oberhalb 250° ohne zu schmelzen.

$C_{10}H_{13}O_5N_5$	Ber. C 47,80	H 5,22	N 27,88	$-COCH_3$ 34,26%
(251,25)	Gef. „ 46,78	„ 5,47	„ 25,70	„ 30,85%
$C_8H_{11}O_2N_5$	Ber. „ 46,00	„ 5,27	„ 33,50	„ 20,60%
(Monoacetylderivat)				

*Mikrohydrierung von 2-Acetylamino-6-hydroxy-pteridin (II)*. – a) Eine *Hydrierung in Eisessig* (25°/725 Torr) wurde in 5 ml Eisessig mit 6,1 mg  $PtO_2$  als Katalysator durchgeführt. 7,6 mg N-Acetylpteridin II nahmen in 27 Std. 1,00 ml  $H_2$  auf (für 1 Mol. berechnet 0,98 ml). In  $H_2$ -Atmosphäre blieb die Lösung farblos, sie färbte sich aber rot, sobald  $O_2$  dazutrat.

b) Eine *Hydrierung in Äthanol* (25°/725 Torr) wurde in 5 ml abs. Äthanol mit 7,2 mg  $PtO_2$  als Katalysator durchgeführt. 8,3 mg N-Acetylpteridin II nahmen in 5 Std. 1,95 ml  $H_2$  auf (für 2 Mol. berechnet 2,13 ml). In  $H_2$ -Atmosphäre blieb die Lösung farblos, sie färbte sich aber rot, sobald  $O_2$  dazutrat.

Die Mikroanalysen wurden unter der Leitung von Herrn H. FROHOFER im Mikrolabor des Institutes ausgeführt. Die IR.-Absorptionsspektren wurden ebenfalls von Herrn H. FROHOFER aufgenommen.

### Zusammenfassung

Die chemischen Eigenschaften des 2-Amino-6-hydroxy-pteridins wurden eingehend untersucht. Dieses Pteridin lässt sich zum 2-Acetylamino-6-hydroxy-pteridin acetylieren und zum 2-Amino-6-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydropteridin hydrieren. Das Acetylpteridin kann je nach Bedingungen entweder ein 7,10-Dihydro- oder ein 7,8,9,10-Tetrahydro-acetyl-Derivat bilden. Alle hergestellten Hydro-pteridine sind unbeständige Substanzen, die sich an der Luft leicht zurückeroxydieren lassen.

Zürich, Chemisches Institut der Universität