

*Remarques.* L'eau est plus soluble dans l'éther que dans le  $\text{CHCl}_3$  et le  $\text{CCl}_4$ , (9 ml/l pour l'éther, 4,8 ml/l pour le  $\text{CHCl}_3$  et 0,62 ml/l pour le  $\text{CCl}_4$ ), mais ce fait n'entraîne pas d'inconvénients pour l'éther en ce qui concerne l'extraction du cobalt. Des essais effectués sur le  $\text{Fe}^{\text{III}}$  et le  $\text{Na}^+$  montrent qu'il passe autant de ces ions dans la phase organique au cours de l'extraction avec le  $\text{CCl}_4$  qu'avec l'éther.

Dans un prochain article nous donnerons la méthode de dosage spectrophotométrique du cobalt, en particulier pour des quantités inférieures au  $\mu\text{g}$ , et le procédé d'extraction par échangeurs d'ions. Puis nous appliquerons ces diverses techniques au dosage du cobalt dans les aciers, dans le zirconium et dans le sang.

Nous remercions le *Fonds National Suisse de la Recherche, Commission pour la Science Atomique*, grâce auquel nous avons pu effectuer ce travail.

#### RÉSUMÉ

L'extraction du cobalt avec l'éther ou le  $\text{CCl}_4$  en présence de dithizone est possible jusqu'au nanogramme. En présence de tampon citrique, l'équilibre entre les phases est beaucoup plus lent à s'établir avec le tétrachlorure de carbone qu'avec l'éther; c'est pourquoi, nous préconisons l'emploi de ce dernier qui présente beaucoup d'avantages.

Il est difficile de réextraire le cobalt de ses solutions organiques, surtout lorsqu'elles renferment moins de 1  $\mu\text{g}$  de ce métal. Nous proposons donc une minéralisation de la dithizone après évaporation du solvant, méthode qui évite toute perte en cobalt.

Laboratoire de Chimie Minérale, de Chimie Analytique  
et de Microchimie de l'Université de Genève

---

## 202. Über Pteridinchemie

2. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Rückoxydation des 2-Amino-6-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-pteridins an der Luft

von M. Viscontini und H. R. Weilenmann

(22. VII. 59)

In einer früheren Arbeit<sup>2)</sup> zeigten wir, wie man das 2-Amino-6-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-pteridin (I) als Sulfitsalz erhalten kann. Gleichzeitig teilten wir mit, dass das freie Tetrahydroderivat unbeständig ist und an der Luft rasch oxydiert wird. Dabei entsteht hauptsächlich das 2-Amino-6-hydroxy-pteridin (V), unter intermediärer Bildung von Zwischenprodukten, die wir damals nicht charakterisierten. Gleiche Beobachtung machte BLAKLEY<sup>3)</sup>, der die Produkte der Rückoxydation der Tetrahydrofolsäure untersuchte; anscheinend konnte er aus der entstandenen Mischung neben Folsäure selbst 2-Amino-6-hydroxy-8-methyl-pteridin sowie Xanthopterin isolieren.

<sup>1)</sup> 1. Mitteilung: M. VISCONTINI, *Helv.* **40**, 586 (1957).

<sup>2)</sup> M. VISCONTINI & H. R. WEILENMANN, *Helv.* **41**, 2170 (1958).

<sup>3)</sup> R. L. BLACKLEY, *Biochem. J.* **65**, 331 (1957).

Bei den Versuchen, die wir hier beschreiben, konnten wir nicht das Tetrahydropteridin I selbst verwenden; wir gingen von seinem Sulfitsalz aus, das, trotzdem es an der Luft vor allem in feuchtem Zustand sehr leicht oxydiert wird, immerhin einigermassen beständig ist. Zugleich stabilisiert die anwesende schweflige Säure die während der Oxydation gebildeten Zwischenprodukte und gestattet, einige von ihnen

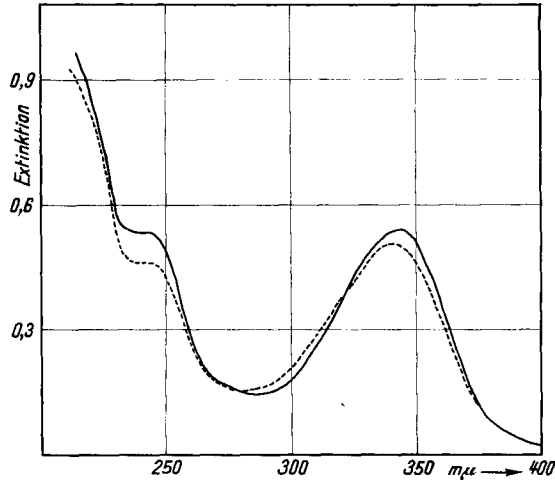


Fig. 1. UV.-Spektrum der Substanz II  
 ----- pH 2,0      ————— pH 12,0

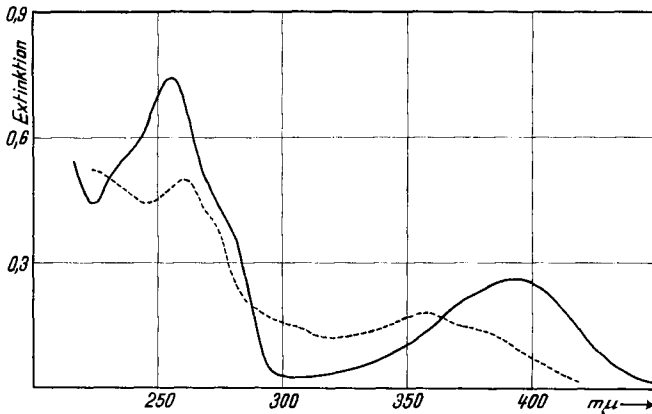


Fig. 2. UV.-Spektrum der Substanz IV  
 ----- pH 2,0      ————— pH 12,0

zu isolieren. Drei von diesen Zwischenprodukten sind besonders unbeständig und wurden nur in Eluaten von Chromatogrammen erhalten. Ihre UV.-Spektren (Fig. 1–3) gleichen denjenigen des Isoxanthopterin, des Xanthopterin und des Dihydro-xanthopterin von O'DELL *et al.*<sup>4)</sup>. An der Luft werden sie sehr rasch zu 2-Amino-6-

<sup>4)</sup> B. L. O'DELL *et al.*, J. Amer. chem. Soc. **69**, 250 (1947).

hydroxy-pteridin (V) weiteroxydiert. Andere Produkte zeigen mehr Beständigkeit: neben dem Pteridin V konnten wir zwei weitere interessante Substanzen isolieren.

Die erste ist eine in Wasser ziemlich gut lösliche Säure, die daraus leicht in langen, hellgelben Nadeln kristallisiert, deren Analyse am ehesten der Formel  $C_8H_5O_4N_5S$

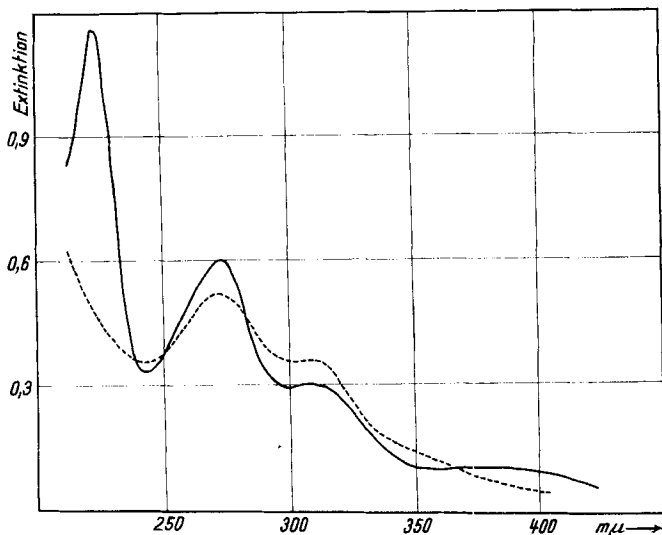


Fig. 3. UV.-Spektrum der Substanz III  
 ----- pH 2,0      ————— pH 12,0

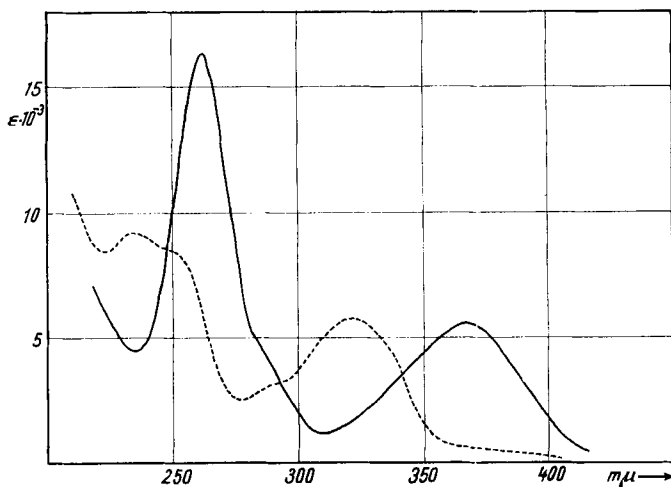
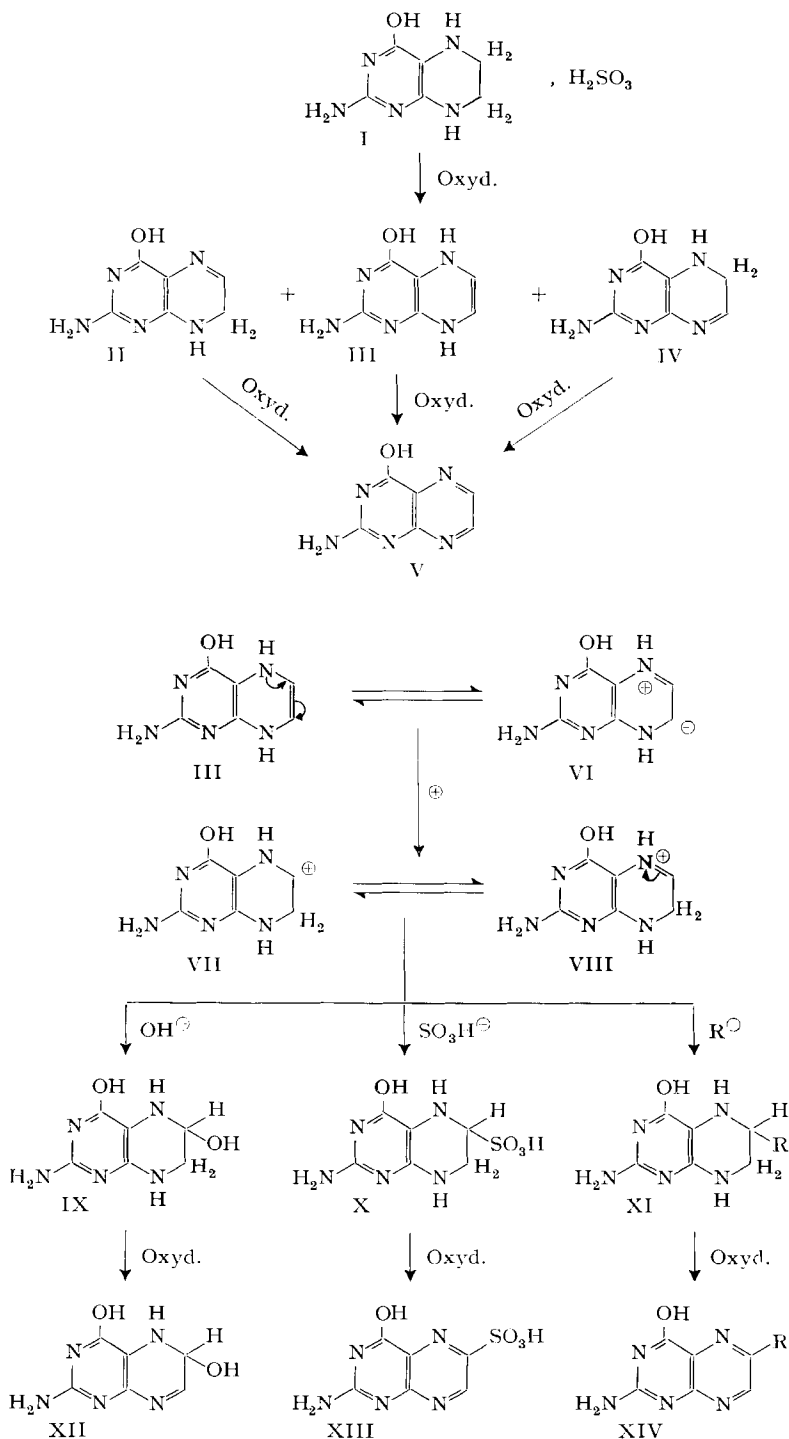


Fig. 4. UV.-Spektrum der Pteridin-sulfonsäure XIII  
 ----- pH 2,0      ————— pH 12,0

entspricht. Durch  $KMnO_4$  wird diese Säure nicht oxydiert. Bei der Elektrophorese wandert sie fast zweimal schneller als die 2-Amino-6-hydroxy-pteridin-8-carbonsäure zum positiven Pol. In UV.-Spektrum (Fig. 4) und Fluoreszenz gleicht sie so



sehr der Pteridin-8-carbonsäure, dass wir für dieses Produkt die Struktur einer Pteridin-8-sulfonsäure (XIII) vorschlagen. Alle unsere Versuche, diese Säure durch direkte Sulfonierung des 2-Amino-6-hydroxy-pteridins zu erhalten, sind bisher erfolglos geblieben.

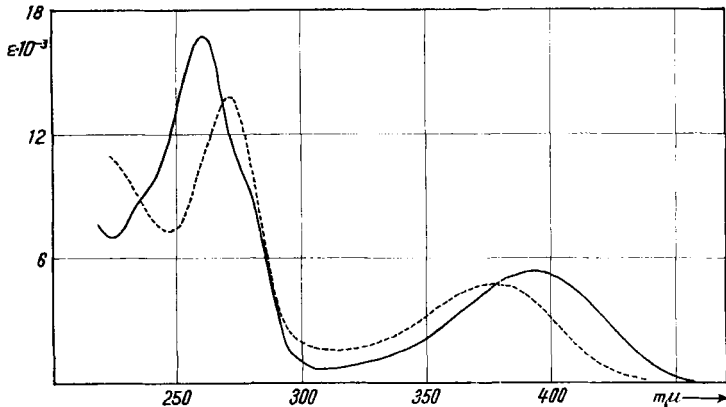


Fig. 5. UV.-Spektrum des Isomeren XII des Dihydro-xanthopterin  
 ----- pH 2,0      ————— pH 12,0

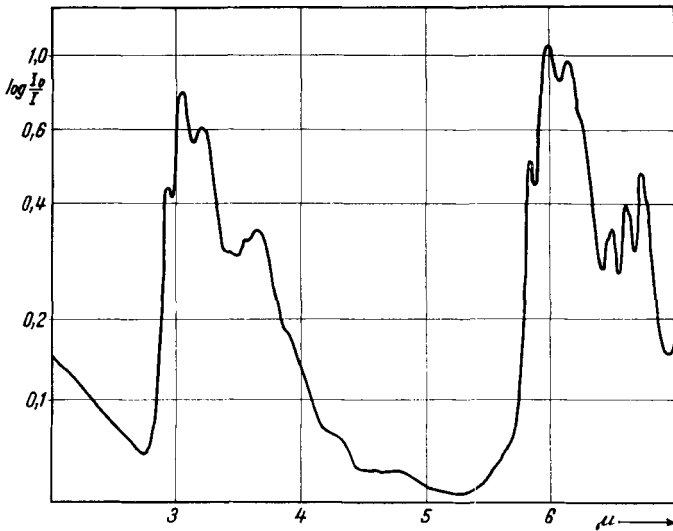


Fig. 6. IR.-Spektrum der Substanz XII (KBr-Tablette)

Die zweite Substanz entsteht bei jeder Rückoxydation des Tetrahydro-pteridins I, in besonders guter Ausbeute in ammoniakalischer Lösung. Die Analysenwerte stimmen sehr gut für die Formel  $C_8H_7O_2N_5$  eines Dihydro-xanthopterin. Dagegen ist das UV.-Spektrum (Fig. 5) vollkommen verschieden von demjenigen des durch katalytische Hydrierung hergestellten Dihydro-xanthopterin<sup>4</sup>). Da andererseits ihr IR.-Spektrum (Fig. 6) eine bei 2,95  $\mu$  liegende Bande zeigt, die man weder beim Xan-

thopterin (Fig. 7), noch bei anderen nicht hydroxylierten Pteridinen findet, könnte man für dieses Produkt die Struktur eines 7,8-Dihydro-xanthopterins (XII) in Betracht ziehen mit einer freien OH-Gruppe in 8-Stellung.

Es ist anzunehmen, dass während der Rückoxydation des Tetrahydro-pteridins I die drei möglichen Dihydro-pterine entstehen, nämlich das 9,10-Dihydro-pteridin II mit der Chromophor-Gruppe des Isoxanthopterins, das 7,8-Dihydro-pteridin IV mit

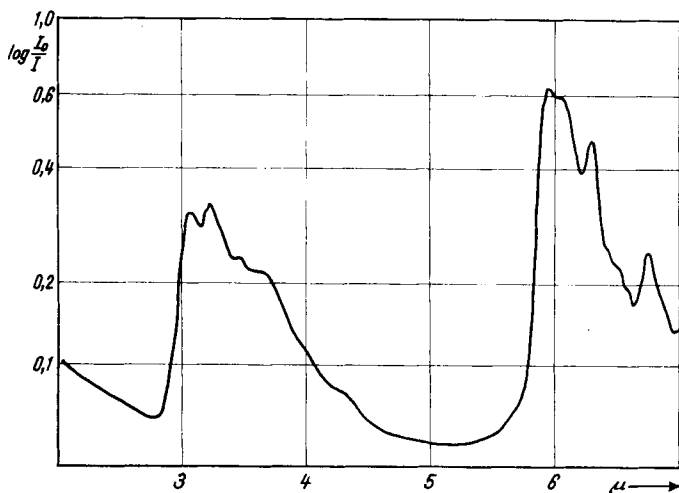


Fig. 7. IR.-Spektrum des Xanthopterins (KBr-Tablette)

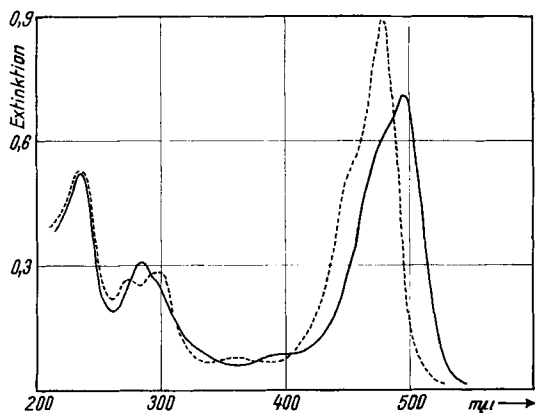


Fig. 8. UV.-Spektrum der Substanz XV  
 ----- pH 2,0      ————— pH 12,0

der Chromophor-Gruppe des Xanthopterins und das 7,10-Dihydro-pteridin III. Durch Weiteroxydation entsteht aus diesen drei Dihydro-pterinen 2-Amino-6-hydroxy-pteridin (V). Es ist denkbar, dass das eine oder das andere der drei Produkte in mesomeren Formen reagieren kann; III könnte z. B. im Gleichgewicht mit VI stehen; findet in polaren Lösungsmitteln eine Protonisierung am C-9 statt, so

entstehen die Ionen VII und VIII, die nucleophile Addition am C-8 erlauben: mit  $\text{OH}^\ominus$  wird das Tetrahydro-pteridin IX und mit  $\text{HSO}_3^\ominus$  das Tetrahydro-pteridin X gebildet. Beide Tetrahydro-pteridine lassen sich an der Luft zum Dihydro-xanthopterin XII und zur Pteridin-8-sulfonsäure XIII oxydieren. Ein ähnlicher Reaktionsmechanismus wurde für die Bildung von 1-Benzyl-2-hydroxy-5-acetyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyridin formuliert<sup>5)</sup>, und FORREST<sup>6)</sup> hat kürzlich die Bildung von 2,8-Diamino-6-hydroxy-pteridin unter den gleichen Bedingungen mitgeteilt.

Das ziemlich häufige Vorkommen von 8-substituierten Pteridinen in der Natur ist wahrscheinlich auf die Reaktionsfähigkeit der Dihydro-pteridine zurückzuführen; in diesem Fall würde aus der nucleophilen Addition eines Restes  $\text{R}^\ominus$  an VII das Tetrahydro-pteridin XI entstehen, das später zum 8-substituierten Pteridin XIV oxydiert wird.

Die Mikroanalysen und die IR.-Spektren wurden in unserem Mikrolabor unter Leitung von Herrn H. FROHOFER ausgeführt bzw. aufgenommen. Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken wir für die materielle Unterstützung dieser Arbeit.

**Experimentelles.** – *Rückoxydation des Tetrahydro-pteridin-sulfits.* Einige  $\mu\text{g}$  von nicht fluoreszierendem Tetrahydro-pteridin-sulfit (I-Sulfit) wurden auf einem Papierstreifen chromatographiert. Als Lösungsmittel diente eine 3-proz.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung, in welche  $\text{SO}_2$  eingeleitet wurde, bis sich durch den Geruch ein Überschuss an  $\text{SO}_2$  feststellen liess. Nach der Entwicklung des Chromatogramms wurde der Papierstreifen an der Luft hängen gelassen. Bald darauf begann der Fleck des Tetrahydro-pteridins ( $\text{Rf} = 0,75\text{--}0,80$ ) zu fluoreszieren, und nach 2 Tagen erreichte die Fluoreszenz das Maximum ihrer Intensität. Die fluoreszierende Zone wurde sorgfältig ausgeschnitten, mit 1-proz.  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung eluiert und so rasch wie möglich wieder chromatographiert. Als Lösungsmittel diente diesmal eine  $\text{SO}_2$ -freie 3-proz.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung. Zahlreiche fluoreszierende Flecke erschienen auf dem Papier, deren Anzahl und Intensität je nach den Versuchen schwankte. Insgesamt wurden 8 Zonen beobachtet, deren  $\text{Rf}$ -Werte in 3-proz.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und deren Fluoreszenzen in der folgenden Tab. I zusammengefasst sind.

Tabelle I. *Luftoxydationsprodukte von I-Sulfit (Rf in 3-proz.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung)*

Produkt	Fluoreszenz	Rf	Produkt	Fluoreszenz	Rf
II	violett	0,84	IV	grün	0,47
I	vorerst ohne Fluoreszenz, nach einiger Zeit grün	0,76	III	schwach blau, kaum sichtbar	0,33
XIII	hellblau	0,65	XII	grün	0,25
V	blau	0,52	XV	orange	0,02
			rote Harze		0,00

Eine neue Eluierung und eine neue Chromatographie dieser verschiedenen Produkte zeigen, dass nur XIII, V, XII und XV beständig sind. Alle anderen erlitten an der Luft weitere Umwandlungen, die mit der Bildung von V endigten.

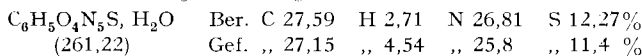
Einige mg des an der Luft so zurückoxydierten Tetrahydro-pteridin-sulfites wurden auf einer Papierpulversäule (8 cm Durchmesser, 50 cm Höhe) mit 3-proz.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung als Entwicklungsmittel chromatographiert. Die Produkte II, XIII, V, III und XII konnten rein eluiert, ihre UV.-Spektren und  $\text{Rf}$ -Werte in verschiedenen Lösungsmitteln gemessen werden (Fig. 1, 3, 4, 5 und Tab. I und II).

*2-Amino-6-hydroxy-pteridin-8-sulfonsäure (XIII).* 450 mg Tetrahydro-pteridin-sulfit (I-Sulfit) wurden auf einem Bogen Filterpapier aufgetragen und an die Luft gehängt. Schon nach kurzer

<sup>5)</sup> A. G. ANDERSON & G. BERKELHAMMER, J. Amer. chem. Soc. **80**, 992 (1958).

<sup>6)</sup> C. VAN BAALLEN & H. S. FORREST, J. Amer. chem. Soc. **81**, 1770 (1959) (siehe auch A. ALBERT, Current Trends in Heterocyclic Chemistry, Proceed. Symposium in Canberra 1957, S. 20).

Zeit trat Fluoreszenz im UV.-Licht auf; das Papier färbte sich gleichzeitig rot. Nach 7 Tagen war die Oxydation des Tetrahydro-pteridins beendet. Das Papier wurde zerkleinert und auf eine Papiersäule (16 cm Durchmesser, 21 cm Höhe) aufgetragen. Das Chromatogramm wurde mit Butanol-Eisessig-Wasser (50/3/7) entwickelt. Einige fluoreszierende Zonen trennten sich dabei ab; die drei ersten enthielten sehr wenig Substanz und wurden nicht aufgearbeitet. Die Elution wurde dann mit Butanol-Eisessig-Wasser (20/6/10) fortgesetzt. Beim Einengen der daraufhin eluierten blau fluoreszierenden Zone erhielt man 60 mg einer hellbraunen Substanz. 55 mg dieser Substanz wurden auf eine Papiersäule (7 cm Durchmesser, 30 cm Höhe) aufgetragen und wiederum mit Butanol-Eisessig-Wasser (50/3/7) chromatographiert. Die blau fluoreszierende Hauptzone wurde aufgefangen und im Vakuum zur Trockne eingengt. Den Rückstand nahm man in etwas Wasser auf, zentrifugierte, wusch mit Äthanol und Äther und trocknete im Vakuum. Ausbeute 20 mg. Aus heissem Wasser 12 mg feine, hellgelbe Nadeln.



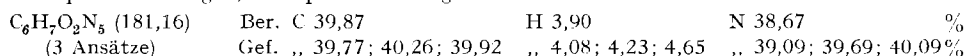
Das Produkt zeigt keinen Smp.; in Wasser ist es wenig, in Laugen leicht löslich. UV.-Absorptionsspektrum s. Fig. 4. Bei der Papierelektrophorese mit 0,05 Mol Ammoniumacetat-Lösung (390 Volt, 5 mA) wandert das 2-Amino-6-hydroxy-pteridin nicht, die Pteridin-8-essigsäure um 11,5 mm, das Xanthopterin um 14 mm und die Pteridin-8-sulfonsäure um 21 mm innerhalb von 32 Min.

Tabelle II. *Rf*-Werte in verschiedenen Laufmitteln

Produkt	Lösungsmittel				
	1	2	3	4	5
I	0,75–0,80				
V	0,50–0,55	0,30–0,35	0,36–0,42	0,51	0,67
XII	0,25	0,23	0,23	0,30	0,60
XIII	0,65	0,08	0,21		
XV	0,02	0,02	0,02	0,03	0,06

Lösungsmittel: 1 3-proz. Ammoniumchlorid  
 2 Butanol-Eisessig-Wasser 20:3:7  
 3 Propanol-1-proz.  $NH_4OH$  2:1  
 4 Propanol-2-proz. Ammoniumacetat 1:1  
 5 Pyridin-Essigester-Wasser 4:3:3

*Dihydro-xanthopterin XII.* Nach dem Hydrieren von 500 mg 2-Amino-6-hydroxy-pteridin (V) wurde das Platin abfiltriert, die Lösung mit Essigsäure neutralisiert, mit etwas schweflicher Säure versetzt und hierauf mit  $NH_4OH$  alkalisch gemacht. Nach 2 Tagen Stehen an der Luft hat man die gelbe Lösung im Rotationseindampfer im Vakuum eingengt und auf eine trocken gestopfte Papierpulversäule von 9 cm Durchmesser und 18 cm Höhe gegeben. Beim Chromatographieren mit Propanol-1-proz.  $NH_4OH$  (2/1) ergaben sich verschiedene fluoreszierende Zonen. Die dritte, grün fluoreszierende Zone aus diesem Chromatogramm wurde eingengt und nochmals an einer Papierpulversäule (7 cm Durchmesser, 25 cm Höhe) mit reinem Wasser chromatographiert. Es wurden 5 Substanzen erhalten: Die erste, hellblau fluoreszierende erwies sich als Pteridin-8-sulfonsäure XIII. Die zweite war das Pteridin V. Die dritte, sehr unbeständige Substanz, wurde mit Dihydro-pteridin IV identisch befunden. Die vierte, das Pteridin XII, liess sich mit schwach ammoniakalischer Lösung eluieren. Beim Einengen im Vakuum bildete sich ein gelbes Pulver, das abzentrifugiert, mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und dann bei 80° im Hochvakuum getrocknet wurde. Ausbeute 20 mg. Dieses Pteridin besitzt keinen Schmelzpunkt. UV.-Absorptionsspektrum s. Fig. 5, IR.-Spektrum s. Fig. 6.



Die fünfte Substanz XV liess sich nur mit 1-proz.  $NH_4$ -Lösung eluieren. Beim Einengen fluoreszierte ihre orange Lösung intensiv gelbgrün. Die Menge des Pteridins XV war zu klein für eine



Analyse. Sein UV.-Spektrum (Fig. 8) zeigt mit demjenigen der Drosopterine<sup>7)</sup> eine interessante Analogie. Im Gegensatz zu den Drosopterinen<sup>8)</sup> ist aber XV gegenüber NaBH<sub>4</sub> beständig wie die anderen Pteridine. Über seine Konstitution können wir nichts aussagen. Vielleicht handelt es sich um ein Dimeres, da seine Rf-Werte in allen Lösungsmitteln auffallend klein sind.

### Zusammenfassung

Bei der Rückoxydation des 2-Amino-6-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-pteridins werden verschiedene, meist unbeständige Produkte gebildet, von denen drei isoliert wurden: der grösste Anteil des hydrierten Pteridins wird zum Ausgangsprodukt zurückoxydiert. In SO<sub>2</sub>-haltiger Lösung erhält man eine beständige Sulfonsäure, während nach Oxydation in NH<sub>3</sub>-Lösung eine nicht sehr stabile Substanz isoliert werden konnte, die mit Dihydro-xanthopterin isomer ist. Die Bedeutung der Bildung der beiden letztgenannten Produkte wird diskutiert.

Zürich, Chemisches Institut der Universität

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

<sup>8)</sup> M. VISCONTINI, Helv. **41**, 1299 (1958).

## 203. Reaktionen mit Mikroorganismen

10. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Die Reduktion von ( $\pm$ )-9-Methyl-*trans*-dekalindion-(1,6) mit *Curvularia falcata*

von V. Prelog und D. Zäch

(25. VII. 59)

In der 4. Mitteilung dieser Reihe<sup>2)</sup> wurde die stereospezifische mikrobiologische Reduktion des leicht zugänglichen ( $\pm$ )-9-Methyl-*cis*-dekalindions-(1,6) beschrieben. Das *trans*-Stereoisomere dieser Verbindung, dessen mikrobiologische Reduktion ebenfalls untersucht werden sollte, entsteht bei der Reduktion des  $\Delta^4$ -9-Methyl-octalindions-(3,8) (I) mit Lithium in flüssigem Ammoniak<sup>3)</sup>. Diese Reaktion gab jedoch in unseren Händen ein kompliziertes Gemisch, in dem nach papierchromatographischer Untersuchung das gewünschte Produkt nur in kleiner Menge vorhanden war. Wir haben deshalb die Carbonyl-Gruppe in Stellung 8 des  $\Delta^4$ -9-Methyl-octalindions-(3,8) durch Ketalisierung mit Äthylenglykol geschützt<sup>4)</sup> (II), worauf die Reduktion mit Lithium und Ammoniak viel glatter verlief und als Hauptprodukt das 1-Monoketal des 9-Methyl-*trans*-dekalindions-(1,6) (III) lieferte. Durch Verseifung des letzteren mit verd. methanolischer Salzsäure entstand das racemische, gesättigte Diketou (IV, VIII) in guter Ausbeute.

<sup>1)</sup> 9. Mitt.: Helv. **42**, 1239 (1959).

<sup>2)</sup> W. ACKLIN, V. PRELOG & D. ZÄCH, Helv. **41**, 1428 (1958).

<sup>3)</sup> I. N. NAZAROW & I. A. GURWITSCH, Ž. Obšč. Chim. **25**, 956 (1955).

<sup>4)</sup> J. KALVODA & H. LOEFFEL, Helv. **40**, 2340 (1957).