

- [5] I. N. NAZAROV & S. I. ZAV'YLOV, *Izvest. Akad. Nauk SSSR, Otdel. Khim. Nauk* 1952, 300, zitiert nach *Chem. Abstr.* 47, 5364 (1953).
- [6] H. J. WILKENS, Dissertation, Basel 1964.
- [7] *Organic Syntheses Coll. Vol. III*, 181 (1955).
- [8] W. S. JOHNSON, vgl. Fussnote bei [4].
- [9] W. HÜCKEL & F. STEFF, *Liebigs. Ann. Chem.* 453, 163 (1927); F. E. KING, T. HENSHALL & R. L. ST. D. WHITEHEAD, *J. chem. Soc.* 1948, 1373.
- [10] D. H. R. BARTON, *J. chem. Soc.* 1953, 1027; W. HÜCKEL, *Liebigs Ann. Chem.* 676, 581 (1958).
- [11] S. WINSTEIN & N. I. HOLNESS, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 5562 (1955); W. HÜCKEL, *Liebigs Ann. Chem.* 676, 18 (1958).
- [12] *Organic Syntheses, Coll. Vol. III*, 176, 179 (1955).
- [13] W. BAILEY, R. D. HAWORTH & J. MCKENNA, *J. chem. Soc.* 1954, 970.

87. De la chimie des ptérines

13^e communication [1], préliminaire

Sur le mécanisme d'oxydation des tétrahydroptérines en dihydroptérines à pH physiologique

par M. Viscontini et A. Bobst

(27 III 65)

Nous savons aujourd'hui que certaines tétrahydroptérines naturelles agissent comme coenzymes dans les hydroxylations enzymatiques [2] [3]. Il est certain que cette réaction correspond à une oxydoréduction dont le mécanisme est encore mal connu. Persuadé depuis de nombreuses années de l'importance biologique des ptérines hydrogénées [4], notre laboratoire s'est attaché à étudier précisément le mécanisme d'oxydation des tétrahydroptérines (THP). Dans notre 9^e communication [5] nous avons annoncé un travail relatif à ce mécanisme; c'est lui qui fait l'objet du présent mémoire.

Nos travaux ont porté sur les 4 ptérines tétrahydrogénées I, II, III et IV, possédant un cycle pyrimidine amidé (λ_{max} : 265–270 nm dans 0,1N HCl) comme les ptérines naturelles, à l'exclusion de celles qui possèdent un cycle pyrimidine aromatique par suite de substitutions appropriées (λ_{max} > 280 nm dans 0,1N HCl) et qui sont décrites dans notre 9^e communication.

Nos résultats sont déduits de recherches cinétiques, effectuées sur les spectres UV. des substances pendant leur oxydation. Nous pouvons dire, en gros, qu'à pH physiologique les 4 tétrahydroptérines sont oxydées par l'oxygène atmosphérique en ptérines normales, en passant par le stade intermédiaire de dihydro-7,8-ptérines (7,8-DHP). Pour vérifier si l'oxydation des solutions dans les cuvettes du spectrographe était influencée par la lumière UV., nous avons abandonné des solutions pareilles à l'air libre. Les absorptions mesurées dans ces solutions témoins étaient, à temps égaux, pratiquement identiques à celles que présentaient les solutions exposées à la lumière UV.

Par contre on peut observer une action de la lumière UV. lorsque les solutions étudiées sont saturées d'azote. Comme la concentration en oxygène de ces solutions

est très faible, l'oxydation elle-même est fort lente, mais est nettement activée par la lumière UV. (réaction d'ordre zéro). Les recherches de ZIEGLER [6] ont déjà mis ce fait en évidence pour les tétrahydroptéridines naturelles adsorbées sur papier.

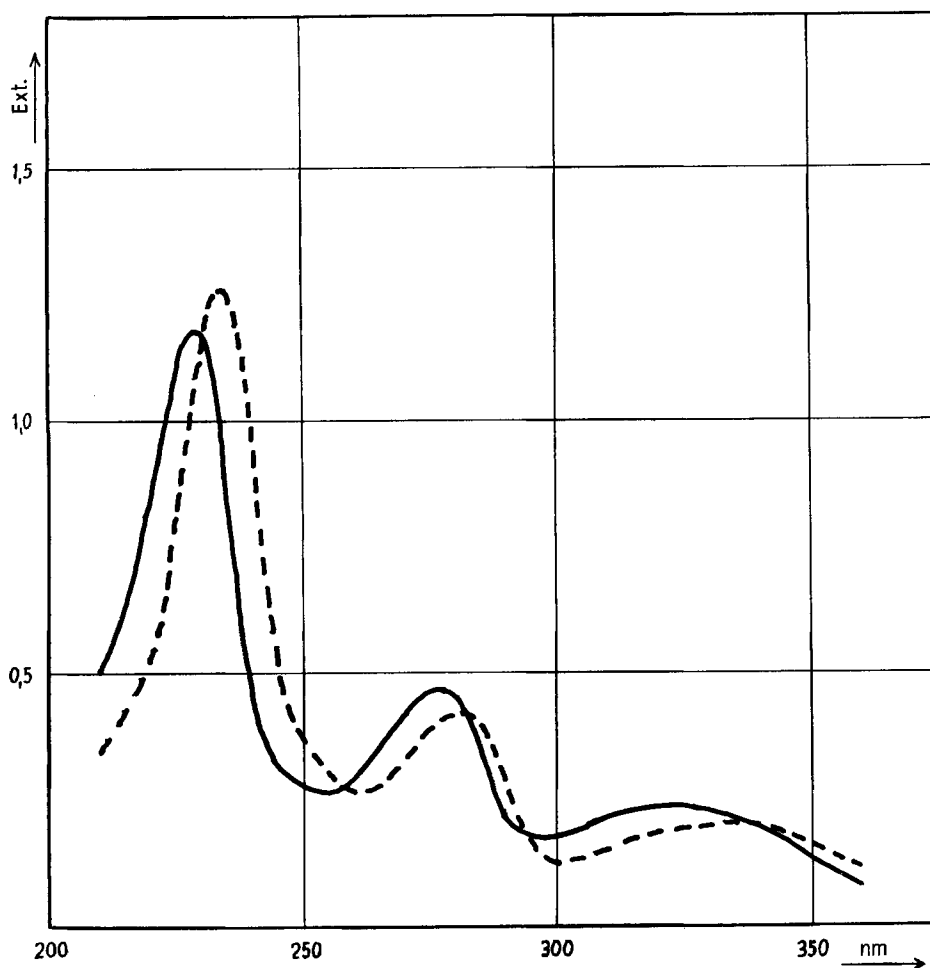
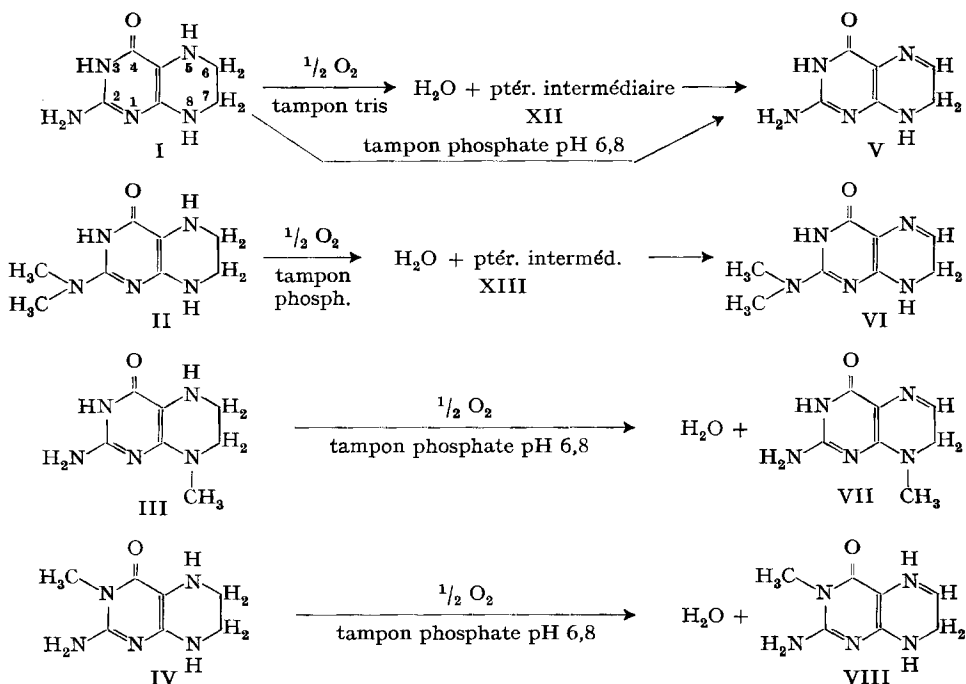


Fig. 1. Spectres UV.

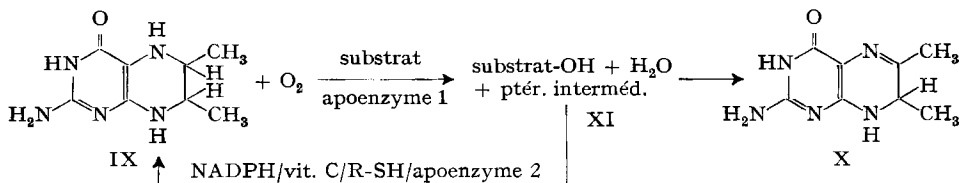
(mesurés dans une solution-tampon aux phosphates de potassium 0,1M, pH 6,8)

— Dihydro-7,8-ptéridine (V)
 - - - N(8)-Méthyl-dihydro-7,8-ptéridine (VII)

Le stade 7,8-DHP (V, VI, VII, VIII) peut être facilement observé en raison de son spectre UV. très caractéristique. Nous reproduisons, à titre comparatif, dans la figure 1, le spectre UV. de la 7,8-DHP (V) ainsi obtenu, à côté du spectre de la N(8)-méthyl-dihydro-7,8-ptéridine (VII) synthétique préparée dans notre laboratoire, pour l'obtention de la THP III.



Rappelons rapidement le schéma de l'hydroxylation enzymatique en présence de THP tel que le propose KAUFMAN :



Pour mettre en évidence l'existence de la ptérine intermédiaire **XI**, KAUFMAN fait réagir le dichlorophénol-indophénol sur la THP **IX** dans un tampon tris à pH 6,8, qui semble ralentir la réaction $XI \rightarrow X$. Notons encore que seule la ptérine intermédiaire **XI** peut être réduite par NADPH alors que la 7,8-DHP (**X**) ne l'est pas.

On peut donc constater que la première partie de l'oxydation chimique des tétrahydroptéridines en ptéridines ressemble au schéma de l'oxydation enzymatique de KAUFMAN. Nous avons alors recherché si l'oxydation chimique par l'oxygène passait aussi par un ou plusieurs produits intermédiaires. Dans une solution tampon phosphate de pH 6,8, les THP **I**, **III** et **IV** conduisent directement aux 7,8-DHP **V**, **VII** et **VIII** (réactions du 1^{er} ordre). La figure 2 reproduit, à titre d'exemple, le passage du spectre UV. de la THP **IV** à celui de la 7,8-DHP **VIII**. La présence ou l'absence de complexe III dans la solution ne change rien à l'allure des courbes obtenues. Par contre, les spectres UV. mesurés pendant l'oxydation de la THP **II** montrent indiscutablement l'existence d'un produit intermédiaire **XIII** qui se transforme ensuite en 7,8-DHP **VI**.

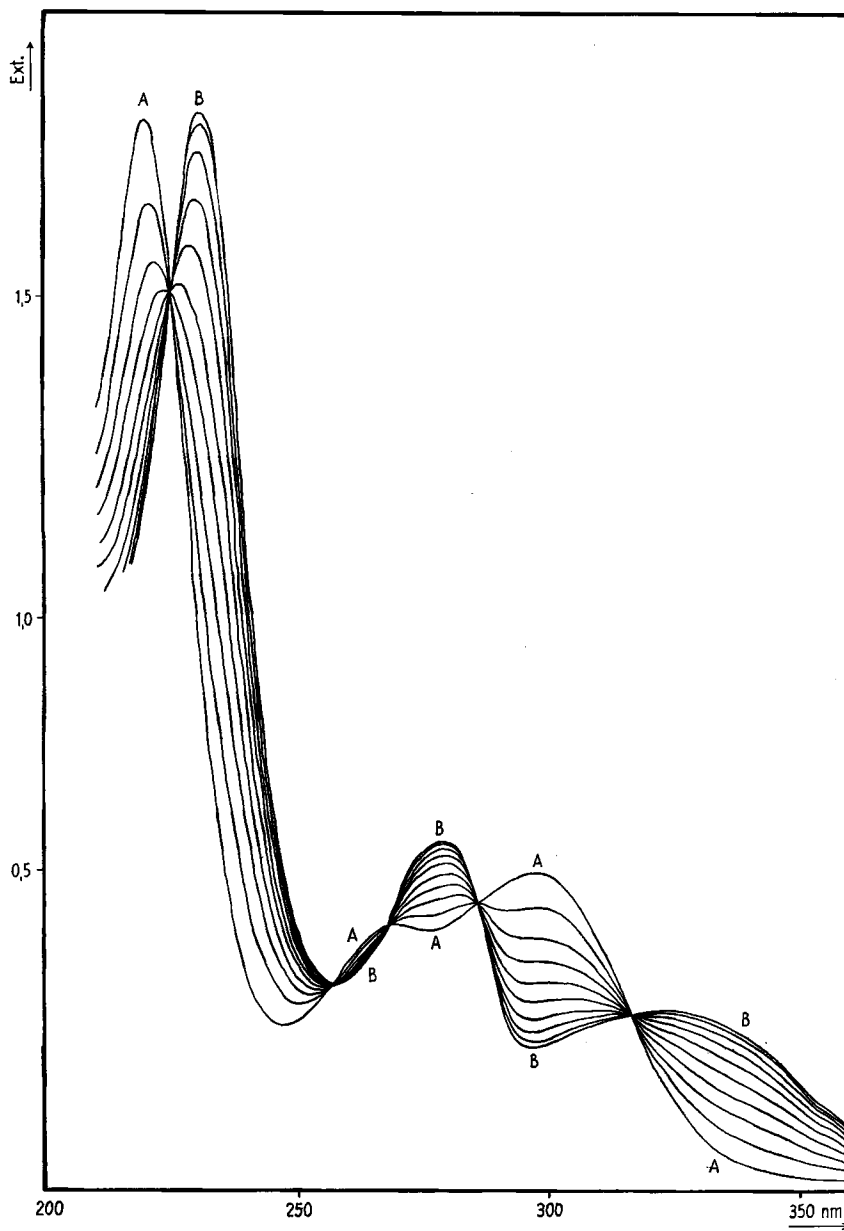


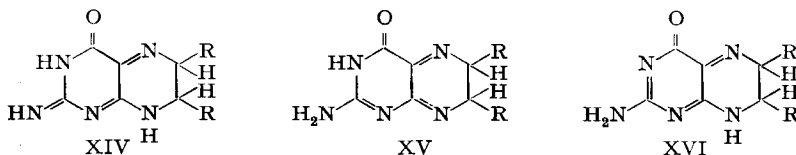
Fig. 2. Cinétique de l'oxydation de la *N*(3)-méthyl-tétrahydroptéridine (IV) par l'oxygène (spectres UV. mesurés dans une solution-tampon de phosphates de potassium 0,1M, pH 6,8, à des intervalles de temps de 3'20'')

Courbe A: *N*(3)-Méthyl-tétrahydroptéridine (IV)

Courbe B: *N*(3)-Méthyl-dihydro-7,8-ptéridine (VIII)

Si maintenant on étudie l'oxydation par O_2 de la THP I dans un tampon tris, pH 6,8, un produit intermédiaire XII apparaît alors, qui se transforme ensuite en 7,8-DHP V. Dans les deux cas les produits intermédiaires XII et XIII ont des spectres UV. fort semblables à celui publié par KAUFMAN [2] pour la ptérine intermédiaire XI.

Quelle peut donc être la structure des ptérines intermédiaires XI, XII et XIII? KAUFMAN [3] ayant montré dans des expériences biologiques effectuées en présence d'oxyde de tritium que les protons fixés sur C-6 et C-7 ne s'échangeaient pas avec le tritium pendant l'oxydation, a proposé des structures quinoïdiques¹⁾ telles que XIV et XV tandis que la structure XVI, véritablement quinoïdique, était aussi mentionnée par PFLEIDERER [7] dans une récente mise au point sur les ptérines. D'ailleurs l'un de nous, à la suite des travaux effectués par VON PHILIPSBORN, STIERLIN & TRABER [8]



dans notre Institut, avait déjà supposé que les ptérines hydrogénées (sépiaptérine, isosépiaptérine et drosoptérine) pouvaient fort bien exister sous une forme quinoïdique analogue à la structure XIV [9]. Dans sa dernière publication, KAUFMAN [3] penche, lui aussi, pour la structure XIV.

A la suite de nos expériences, nous pouvons résumer maintenant comme suit les arguments qui nous permettent d'affirmer que la structure quinoïdique XIV est bien celle de la dihydroptérine intermédiaire qui se transpose ensuite en dihydro-7,8-ptérine.

1° KAUFMAN a obtenu le produit intermédiaire XI en traitant la THP IX par un colorant d'oxydo-réduction; nous-mêmes obtenons les produits intermédiaires XII et XIII par traitement des THP I et II avec O_2 . Les spectres UV. des produits XI, XII et XIII étant semblables, il ne peut s'agir de complexes THP-colorant ou THP- O_2 . Le produit intermédiaire est donc une dihydroptérine ayant déjà transféré ses deux électrons sur le substrat accepteur.

2° La cinétique d'oxydation de la THP IV est fort semblable à la cinétique d'oxydation de la THP I. La présence d'un groupe méthyle sur N-3 à la place d'un proton ne ralentit pas la réaction. Le proton en N-3 ne participe donc pas au mécanisme de l'oxydation et la structure XVI peut être éliminée pour les ptérines intermédiaires.

3° Dans des conditions analogues la vitesse d'oxydation est fortement augmentée lorsque le groupe $-CH_3$ est fixé soit en N-8 (III), soit en N-2' (II). On peut alors penser que la paire d'électrons libres de N-8 ou de N-2' participe à l'oxydation avec formation de produits intermédiaires du type XIV ou XV; toutefois seulement dans le cas de la THP II on peut, dans le tampon phosphate pH 6,8, saisir la présence d'une ptérine intermédiaire stabilisée d'une manière ou d'une autre. De nombreux exemples de la chimie organique nous enseignent qu'un cation tel que XIII possède une certaine

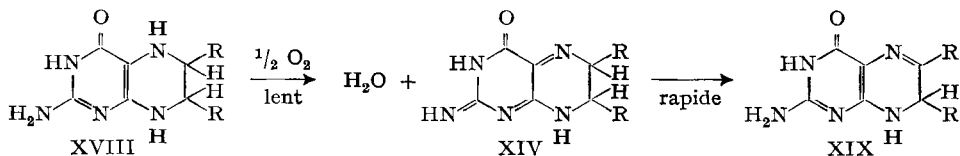
¹⁾ Nous désignons par ce terme des structures à cycle hexagonal avec 4 doubles liaisons (comme chez les quinones), mais dont une seule est cyclique tandis que les 3 autres sont hémicycliques, deux d'entre celles-ci se trouvant en une position soit ortho soit para.

stabilité et c'est lui que nous pouvons mettre en évidence au cours de nos mesures. Il est évident que si une ptérine intermédiaire XVII se formait au cours de l'oxydation



III → VII nous l'aurions, elle aussi, mise en évidence. Si nous ne l'avons pas trouvée c'est que XVII et par conséquent les structures XV ne se forment pas pendant l'oxydation des tétrahydroptéridines.

Le mécanisme d'oxydation que nous proposons est alors le suivant:



Les structures *para*-quinoidiques XIV sont généralement si instables qu'en solution tampon phosphate, pH 6,8, la transposition en 7,8-DHP (XIX) est très rapide. Seulement dans des cas bien particuliers: formation d'un cation stable XIII, tampon tris à pH supérieur au pK de N-5 (entre 5 et 6) mais inférieur au pH de décomposition des THP (pH 8), etc., la ptérine intermédiaire (XI, XII, XIII) *para*-quinoidique peut être mise en évidence avant sa transposition en 7,8-DHP.

Ce mécanisme explique pourquoi la dihydro-isoxanthoptérine est si facilement oxydée en isoxanthoptérine [5] alors que la dihydroxanthoptérine ne l'est pas. Dans le premier cas la formation de la ptérine *para*-quinoidique est facilitée par la présence de la fonction amide en 7,8, dans le deuxième cas elle est empêchée par la présence de la fonction amide en 5,6.

Bien entendu, l'existence d'une dihydroptérine *para*-quinoidique ne préjuge en rien ni du mécanisme de transfert des électrons et des protons des THP sur le substrat récepteur, ni de l'existence d'un complexe THP-substrat par l'intermédiaire duquel s'effectueraient ces transferts; cette existence serait d'ailleurs de très courte durée car nous n'avons pas encore réussi à le mettre en évidence.

Une publication détaillée sur la partie expérimentale de ce travail paraîtra prochainement dans ce journal.

Nous remercions la JUBILÄUMSSTIFTUNG J. R. GEIGY à Bâle, de l'aide matérielle mise à notre disposition.

RÉSUMÉ

Par une étude cinétique de l'oxydation à l'air des tétrahydroptéridines les auteurs montrent qu'après le transfert de deux électrons à l'atome d'oxygène, la ptérine se trouve sous forme d'une ptérine dihydrogénée de structure *para*-quinoidique, fort instable et se transposant rapidement en ptérine 7,8-dihydrogénée.

Zurich, Institut de chimie organique
de l'Université

BIBLIOGRAPHIE

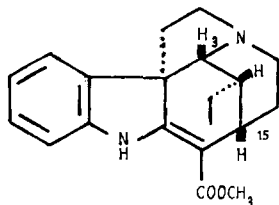
- [1] 12^e communication: M. VISCONTINI & S. HUWYLER, *Helv.* 48, 764 (1965).
 [2] Proceedings of the Third International Symposium on Pteridine Chemistry, September 1962, Pergamon Press, London 1964: S. KAUFMAN, p. 307.
 [3] S. KAUFMAN, *J. biol. Chemistry* 239, 332 (1964).
 [4] M. VISCONTINI & H. R. WEILENMANN, *Helv.* 41, 2170 (1958).
 [5] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* 47, 2087 (1964).
 [6] *Loc. cit.* [2]: I. ZIEGLER, p. 295.
 [7] W. PFLIEDERER, *Angew. Chem.* 75, 993 (1963).
 [8] *Loc. cit.* [2]: W. VON PHILIPSBORN, H. STIERLIN & W. TRABER, p. 169.
 [9] *Loc. cit.* [2]: M. VISCONTINI, p. 267, et dans les discussions qui ont suivi les diverses communications (en particulier p. 290 et 323).

88. Notiz über Limatin aus *Aspidosperma limae* WOODS.

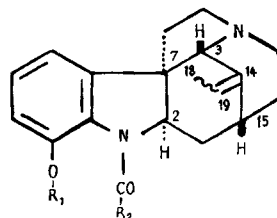
von M. Pinar, B. W. Bycroft, J. Seibl und H. Schmid

(30. III. 65)

Aspidosperma limae WOODS. (*Apocynaceae*) wurde bisher ziemlich eingehend auf ihren Alkaloidgehalt hin untersucht, wobei aus der Wurzelrinde folgende Alkaloide isoliert worden sind: Aspidocarpin [1], Aspidolimin [1], Limaspermin [2], 3'-Methoxylimaspermin [3], Limapodin [3], 3'-Methoxylimapodin [3] und (+)-Tubotaiwin (I) [3]. Die Stammrinde hat bisher die Basen Aspidolimidin, Aspidolimin, Desmethoxypalosin und Aspidocarpin ergeben [4]. Mit Ausnahme von I gehören alle erwähnten Alkaloide zur Aspidospermingruppe und besitzen dieselbe absolute Konfiguration wie (-)-Aspidospermin [5] [6]; einzig die absolute Konfiguration des Aspidolimidins ist noch nicht bekannt.



(+) - I



II: $R_1 = H$; $R_2 = C_2H_5$
 III: $R_1 = COCH_3$; $R_2 = C_2H_5$
 IV: $R_1 = R_2 = CH_3$

Die Untersuchung einer anderen Stammrinde¹⁾ hat nun zur Isolierung eines neuen Alkaloids, des in kleiner Menge anfallenden *Limatin* (II) geführt. Daneben wurden die bereits früher erwähnten [4] Stammrinden-Alkaloide angetroffen. Das neue Alkaloid $C_{21}H_{26}O_2N_2$ mit Smp. 175–176° und $[\alpha]_D = +166^\circ$ ($CHCl_3$) wurde als Pikrat und O-Acetylderivat III (Smp. 172–174°) charakterisiert. Die UV.-Spektren

¹⁾ Wahrscheinlich stammt die Stammrinde von demselben Baum, dessen Wurzelrinde untersucht worden ist. Es ist möglich, dass *A. limae* WOODS. in verschiedenen «physiologischen Varietäten» vorkommt (c. f. [7]), deren Alkaloidgehalt quantitativ wechseln kann.