

- [6] A. SAMSON, *Optic. Spectr.* 13, 285 (1962).
[7] J. FEITELSON, *J. chem. Physics* 44, 1497 (1966).
[8] R. VOLTZ, *C. r. hebd. Séances, Acad. Sci.* 257, 1473 (1963).
[9] W. ZIMMERMANN, *Rev. sci. Instr.* 32, 1063 (1961).
[10] J. KROPP & M. BURTON, *J. chem. Physics* 37, 1742 (1962).
[11] S. LIPSKY & M. BURTON, *J. chem. Physics* 36, 2858 (1959).
[12] A. WEISSBERGER, *Techniques of Organic Chemistry IX*, 677 (1956).
[13] P. LERCH & M. COSANDEY, *Helv.* 47, 2417 (1964).
[14] K. MEYER, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 47, 835 (1914).
[15] M. KASHA, *Discuss. Faraday Soc.* 9, 14 (1950).

233. Über Pterinchemie

23. Mitteilung [1]

Radikalbildung während der Oxydation von Tetrahydrofolsäure und 5,6,7,8-Tetrahydropterin

von A. Bobst

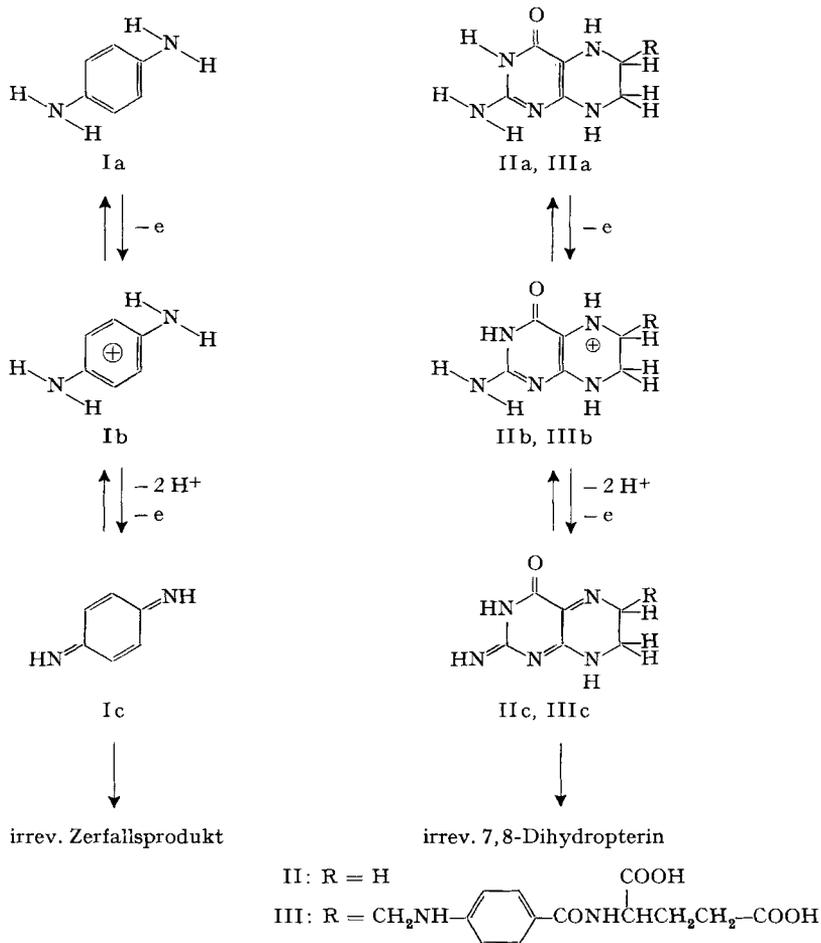
(12. IX. 67)

Die vorliegende Arbeit ist ein weiterer Beitrag zum Verständnis der Redoxmechanismen von Tetrahydrofolsäure (III a) und 5,6,7,8-Tetrahydropterin (II a), zwei Verbindungen, die als Elektronendonatoren in enzymatischen [2] oder nicht-enzymatischen [3] Hydroxylierungssystemen wirken. Ein Verfahren zur Darstellung und Stabilisierung dieser äusserst autoxydablen Produkte ist bereits entwickelt worden [4], so dass diese Verbindungen für physikalisch-chemische Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Es existieren indirekte Befunde, welche eine Oxydation dieser Verbindungen über einen Radikalmechanismus für möglich erscheinen lassen, doch ist ein direkter experimenteller Nachweis bisher nicht gelungen. Man weiss, dass die Autoxydation von II a durch Eisen (II) bzw. (III) katalysiert wird und dass sich während der Oxydation Polymere bilden.

Als Arbeitshypothese wurde nun angenommen, dass sich der Oxydationsverlauf von *p*-Phenylendiamin ähnlich demjenigen von 5,6,7,8-Tetrahydropterin und Tetrahydrofolsäure verhält. Vergleicht man nämlich die Elektronenverteilung beider Systeme (vgl. die Formeln I mit den entsprechenden Formeln II bzw. III) und den Verlauf der Resonanzenergie nach Entfernung von 1 bzw. 2 Elektronen in den Verbindungen I, II und III [5], so lässt sich in den Systemen eine Analogie erkennen. MICHAELIS [6] hatte anhand potentiometrischer Messungen gezeigt, dass es unter geeigneten Bedingungen möglich ist, *p*-Phenylendiamin in einem Zweistufenmechanismus zu oxydieren. Er stellte fest, dass die Lebensdauer des sich als Zwischenprodukt bildenden Radikals erhöht ist, wenn es in der protonisierten Form vorliegt und wenn auch die Untersuchung in einem nichtwässrigen Milieu durchgeführt wird. Die Stabilität des Radikals ist ebenfalls erhöht, wenn die Wasserstoffatome der Aminogruppen durch Methylgruppen ersetzt werden. Im Falle des 5,6,7,8-Tetrahydropterins ergaben MO-Berechnungen [5], dass die Methylierung des N(5)-Wasserstoffes die

grösste Resonanzstabilisierung bewirkt. Es war tatsächlich möglich, beim N(5)-Methyl-6,7-diphenyl-5,6,7,8-tetrahydro-pterin, das allerdings in einem Hydroxylierungssystem unwirksam ist [7], ein Radikal-Kation nachzuweisen, das genügend stabil war, um sich ohne besondere Vorsichtsmassnahme mit Hilfe der Elektronenspinresonanz untersuchen zu lassen [8]. Die Struktur des Kations wurde auf Grund der Hyperfeinanalyse sichergestellt.



Für das Auffinden der Radikale von Tetrahydropterin und Tetrahydrofolsäure, zwei Elektronendonatoren, die im Hydroxylierungssystem wirksam sind, war von früheren, erfolglosen Untersuchungen bekannt, dass besondere Vorsichtsmassnahmen zum Nachweis dieser Radikale geboten sind. Die Durchflusstechnik, in der ESR. häufig für kurzlebige Radikale verwendet, kam wegen der zur Verfügung stehenden kleinen Menge an Substanz nicht in Frage. Das *p*-Phenylendiamin, dessen Radikal in einer Mischung von Essigsäure und Methanol mit Br₂ oder H₂O₂ erzeugt werden kann, wurde als Modellverbindung gewählt, um die experimentellen Bedingungen auszuarbeiten. Anschliessend wurden unter analogen Bedingungen das Tetrahydro-

pterin IIa und die Tetrahydrofolsäure (IIIa) untersucht. Auf diese Weise war es möglich, die Entstehung von instabilen Radikalen während der Oxydation dieser Substanzen mittels Elektronenspinresonanz nachzuweisen. Die Reaktion wurde in einer Mischung von Trifluoressigsäure und Methanol mit H_2O_2 als Oxydationsmittel bei Zimmertemperatur durchgeführt. Dabei färbt sich die Lösung vorübergehend rot. Sowie der rötliche Farbton erschien, wurde der Reaktionsverlauf durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff unterbrochen und anschliessend bei dieser Temperatur das ESR.-Spektrum aufgenommen. Fig. 1 und 2 zeigen die ESR.-Signale der Oxydationszwischenprodukte von 5,6,7,8-Tetrahydropterin (IIa) und Tetrahydrofolsäure (IIIa) bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff.

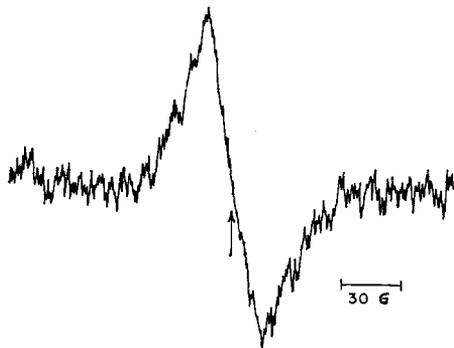


Fig. 1. ESR.-Spektrum (flüssig- N_2 -Temp.) aufgenommen während der Oxydation von IIa
Der Pfeil entspricht einem G -Wert von ≈ 2

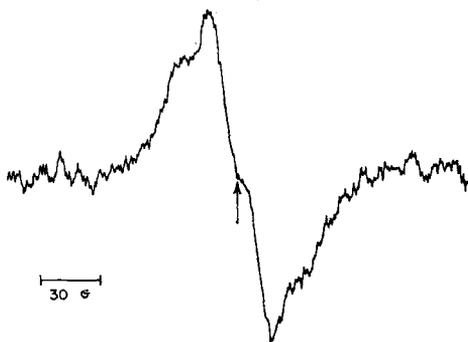


Fig. 2. ESR.-Spektrum (flüssig- N_2 -Temp.), aufgenommen während der Oxydation von IIIa
Der Pfeil entspricht einem G -Wert von ≈ 2

Beim Erwärmen der Reaktionslösungen auf Zimmertemperatur verschwanden sowohl das ESR.-Signal wie auch der rote Farbton. Im Falle der Oxydation von IIIa wurde unter gleichen Bedingungen wie bei IIa eine grössere Radikalkonzentration gemessen und die Lösung war intensiver rot gefärbt. Das ESR.-Signal wird den rot gefärbten Radikalen der Struktur IIIb bzw. IIb zugeschrieben. Auf Grund von HMO-Berechnungen [5] sollte die grösste Spindichte auf dem N(5) lokalisiert sein.

Zur Zeit sind Untersuchungen mit Hilfe eines «computer of average transients» im Gange, und es wird erwartet, damit etwas über die Hyperfeinstruktur aussagen zu können, um die theoretischen Resultate zu überprüfen. Man hofft ebenfalls zeigen zu können, wie die grössere Stabilität des Tetrahydrofolsäure[⊖]-Radikals (IIIb) mit dem betreffenden Rest R zusammenhängt.

Das hier besprochene Experiment zeigt die Radikalbildung von zwei Molekeln, die von biologischer Bedeutung sind. Die Resultate sind hinsichtlich des Reaktionsmechanismus der Monooxygenasen, in denen Tetrahydropterin als Elektronendonator wirkt, von Interesse. Es besteht die Möglichkeit, dass in einer geeigneten biologischen Matrix, die ein Schwermetall enthalten kann, die Sauerstoffaktivierung mit der Bildung des Radikals des Elektronendonators gekoppelt ist.

Experimentelles. – Die ESR.-Spektren wurden mit einem Spektrometer von 100 KHz Magnetfeldmodulation und 3-cm-Mikrowellen aufgenommen. Die ESR.-Messungen der Oxydationszwischenprodukte von Tetrahydropterin und Tetrahydrofolsäure wurden in Quarzröhrchen (3 mm Durchmesser) bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff durchgeführt. Für die Oxydation verwendete man etwa 0,2 ml einer Mischung von CF₃COOH/CH₃OH (Volumenverhältnis 6:1) mit 7–8 μMol IIa bzw. IIIa und 8–9 μMol H₂O₂.

Der Autor ist Herrn Prof. M. CALVIN für die Durchsicht des Manuskripts zu grossem Dank verpflichtet. Die Arbeit wurde in dankenswerter Weise vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS und von der STIFTUNG FÜR STIPENDIEN AUF DEM GEBIETE DER CHEMIE unterstützt.

SUMMARY

EPR. investigations show the existence of one-electron oxidation of 5,6,7,8-tetrahydropterine and tetrahydrofolic acid resulting in unstable cationic radicals of red color which are trapped at liquid nitrogen temperature.

Chemical Biodynamics Laboratory
University of California, Berkeley, California

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 22. Mitteilung: M. VISCONTINI & T. OKADA, *Helv.* **50**, 1845 (1967).
- [2] S. KAUFMAN & B. LEVENBERG, *J. biol. Chemistry* **234**, 2683 (1959).
- [3] A. BOBST & M. VISCONTINI, *Helv.* **49**, 884 (1966).
- [4] A. BOBST & M. VISCONTINI, *Helv.* **47**, 2087 (1964); **49**, 875 (1966).
- [5] A. BOBST, *Helv.* **50**, 1480 (1967).
- [6] L. MICHAELIS, M. P. SCHUBERT & S. GRANICK, *J. Amer. chem. Soc.* **67**, 1981 (1939).
- [7] M. VISCONTINI, H. LEIDNER, G. MATTERN & T. OKADA, *Helv.* **49**, 1911 (1966).
- [8] A. EHRENBERG, P. HEMMERICH, F. MÜLLER, T. OKADA & M. VISCONTINI, *Helv.* **50**, 411 (1967).