

in CDCl_3 : δ 1,20 (*d*, $J = 6$, 3H), 2,02 (*s*, 3H), 2,06 (*s*, 3H), 3,39 (*s*, 3H), 3,47 (*s*, 3H), 3,61 (*dd*, $J_1 = 3$, $J_2 = 2$, 1H), 3,79 (*m*, 1H), 4,70 (*d*, $J = 2$, 1H), 5,0–5,2 (*k*, 2H).

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_7$ Ber. C 52,16 H 7,30% Gef. C 51,90 H 7,29%

Die Mikroanalysen wurden im analytischen Laboratorium der ETH (Leitung *W. Manser*) ausgeführt. Die NMR.-Spektren verdanken wir der Abteilung für Instrumentalanalyse der ETH (Leitung Prof. *W. Simon*), die Massenspektren Herrn Dr. *J. Seibl*. Herrn *André Müller* danken wir für Mithilfe bei der Ausführung der Abbaureaktionen.

Der CIBA-Aktiengesellschaft, Basel, danken wir für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Die Fermentationen wurden in einer von der *Stiftung Volkswagenwerk* zur Verfügung gestellten Apparatur «*Ferma-Cell*», New Brunswick, durchgeführt. Wir danken der *Stiftung Volkswagenwerk* für diese Hilfe.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 79. Mitteilung: *W. Keller-Schierlein*, *R. Muntwyler* & *H. Zähler*, *Experientia* 25, 786 (1969).
- [2] *R. Corbaz*, *L. Eitlinger*, *E. Gäumann*, *W. Keller-Schierlein*, *F. Kradolfer*, *L. Neipp*, *V. Prelog*, *P. Reusser* & *H. Zähler*, *Helv.* 40, 199 (1957).
- [3] *W. Simon* & *E. Heilbronner*, *Helv.* 38, 508 (1955).
- [4] *H. Brockmann* & *W. Lenk*, *Chem. Ber.* 92, 1880 (1959).
- [5] *H. Brockmann* & *G. Budde*, *Chem. Ber.* 86, 432 (1953).
- [6] *M. P. Kunstmann* & *L. A. Mitscher*, *J. org. Chemistry* 31, 2920 (1966).
- [7] *H. Brockmann*, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* (Ed. *L. Zechmeister*) 21, 121 (1963).
- [8] *W. Keller-Schierlein*, *K. Povalla* & *H. Zähler*, *Arch. Mikrobiol.* 67, 339 (1969).

89. Über Pterinchemie

30. Mitteilung [1]

Die Oxydation der hydrierten Lumazine durch Luftsauerstoff und das unerwartete Verhalten der 6,7-Diphenyl-5,6-dihydropteridine in sauren Lösungen¹⁾

von **M. Viscontini** und **H. Leidner**

Organisch-Chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, 8001 Zürich

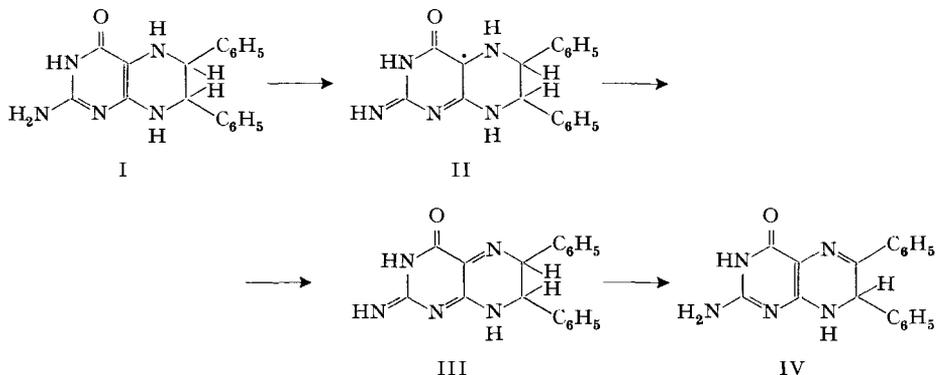
(5. II. 70)

Herrn Prof. Dr. *R. Tschesche* zum 65. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung. Die hydrierten 6,7-Diphenyllumazine sind gegen Luftsauerstoff beständiger als die entsprechenden 6,7-Diphenylpteridine, werden jedoch nach einem gleichen Mechanismus oxydiert. Während die tetrahydrierten Pteridine unter intermediärer Bildung eines trihydrierten Radikals und anschliessend eines dihydrierten chinoiden Pteridins zu 7,8-Dihydropteridinen oxydiert werden, verläuft die Oxydation der 5,6-Dihydropteridine anders. In neutralen sowie in alkalischen Lösungen wird ein monohydriertes Radikal gebildet, welches dem Sauerstoff ein zweites Elektron und Proton abgibt, unter Bildung der entsprechenden Pteridine. In sauren Lösungen addiert die 7,8-Doppelbindung eine Molekel Wasser. Die so entstandenen hydratisierten Pteridine werden – wie die Tetrahydropteridine – viel rascher oxydiert, so dass die Oxydation der 5,6-Dihydropteridine leichter in sauren als in neutralen Lösungen erfolgt. Das intermediäre 7-Hydroxy-6,7-diphenyl-5,6,7,8-tetrahydroalumazin wurde als Hydrochlorid rein isoliert.

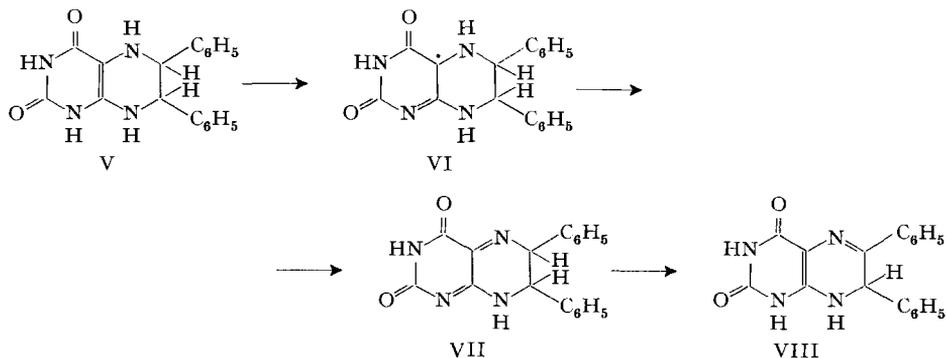
¹⁾ Auszug aus der Dissertation *Leidner* [2].

Nachdem die gegen Luftsauerstoff unbeständigen Di- und Tetrahydro-Derivate der 6,7-Diphenyl-pterin- bzw. -lumazin-Reihe erhalten wurden [3] [4] und in unserem Laboratorium zur Verfügung standen, war es interessant zu studieren, ob alle diese Produkte nach einem ähnlichen Mechanismus und in einer gleichen Weise oxydiert werden. Kurze Andeutungen hierzu haben wir schon in der 17. und 20. Mitteilung [4] [5] gemacht, wo wir festgestellt hatten, dass die Oxydation des 6,7-Diphenyl-5,6,7,8-tetrahydropterins (I) zu 6,7-Diphenyl-7,8-dihydropterin (IV) ebenso leicht und anscheinend nach dem gleichen Mechanismus (I → II → III → IV) wie bei den früher untersuchten 5,6,7,8-Tetrahydropterinen [6] verläuft:



Unsere ersten Versuche bestanden darin, die entsprechende Oxydation des 6,7-Diphenyl-5,6,7,8-tetrahydrolumazins (V) auszuführen, um sie mit jener des Tetrahydropterins I zu vergleichen. Die Kinetik dieser Oxydation wurde mittels UV.-Spektroskopie in saurer, neutraler und alkalischer wässriger-äthanolischer Lösung verfolgt.

Eine gewisse Beständigkeit zeigt das Tetrahydrolumazin V in saurer Lösung, in welcher die Oxydation zum Dihydrolumazin VIII mehr als 48 Stunden dauert. Die Oxydation in neutraler bzw. alkalischer Lösung verläuft viel rascher (18 bzw. 3 Stunden) und führt auch zum 7,8-Dihydrolumazin VIII, so dass hier ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Oxydation des entsprechenden Tetrahydropterins I postuliert werden kann:



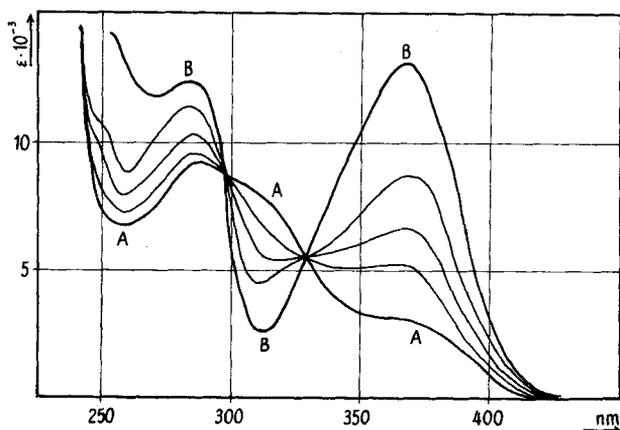


Fig. 1. Oxydationsverlauf unter Lichtausschluss des 6,7-Diphenyl-5,6,7,8-tetrahydrolumazins (V) zum 6,7-Diphenyl-7,8-dihydrolumazin (VIII) in 50-proz. Äthanol, Gesamtdauer 18 Std.

Kurve A, vor Beginn der Oxydation; Kurve B, nach vollständiger Oxydation
Die Zwischenspektren wurden 20 Min., 50 Min. und 1½ Std. nach Beginn der Oxydation aufgenommen.

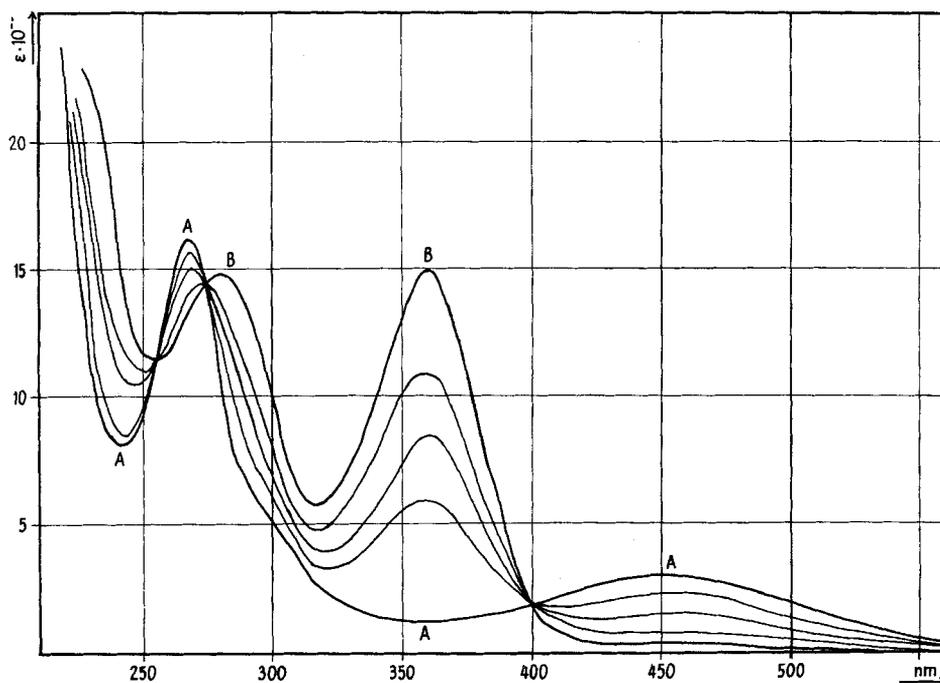


Fig. 2. Oxydationsverlauf unter Lichtausschluss des 6,7-Diphenyl-5,6-dihydropterins (IX) (Kurve A, vor Beginn der Oxydation) zum 6,7-Diphenyl-pterin (XI) (Kurve B, nach vollständiger Oxydation) in 0,1 N HCl (50-proz. Äthanol); Gesamtdauer: 24 Std.

Die Zwischenspektren wurden 3 Std. 45 Min., 6 Std. 15 Min. und 10 Std. nach Beginn der Oxydation aufgenommen.

Eindeutig steht jedoch fest, dass nicht nur bei saurem pH, sondern bei allen pH-Werten das Tetrahydrolumazin V viel beständiger ist als das entsprechende Tetrahydropterin I. Da bei der Untersuchung der Kinetik (siehe z. B. die Oxydation bei pH 7, Fig. 1) kein Zwischenprodukt erfasst werden kann, muss angenommen werden, dass die erste Stufe ($V \rightarrow VI$) am langsamsten verläuft und dass die Entfernung eines Elektrons aus dem N(5)-Atom von V schwieriger ist als aus dem entsprechenden N-Atom des Tetrahydropterins I.

Von Interesse ist die Beobachtung, dass die nicht enzymatische Hydroxylierung des Phenylalanins, die gewöhnlich in Gegenwart von Tetrahydropteringen stattfindet [5] [7], weder durch I noch durch V katalysiert wird, weil wahrscheinlich die Radikale II und VI mit OH-Radikalen schneller reagieren als mit der Phenylalaninmolekel selbst.

Als zweite Aufgabe verglichen wir die Beständigkeit des 6,7-Diphenyl-5,6-dihydropterins (IX) und des entsprechenden Lumazins XII in saurer, neutraler und alkalischer Lösung. Wir wussten bereits, dass das rote 5,6-Dihydropterin IX leicht durch Fe^{III} zum gelben 6,7-Diphenylpterin (XI) oxydiert wird [3]. Durch Messungen der UV.-Spektren von IX in 50-proz. methanolischer Lösung bei pH 1, 6 und 13 stellten wir fest, dass Luftsauerstoff bei gewöhnlicher Temperatur eine ähnliche Oxydation bewirkt, die durch UV.-Licht noch beschleunigt wird. Die Oxydation

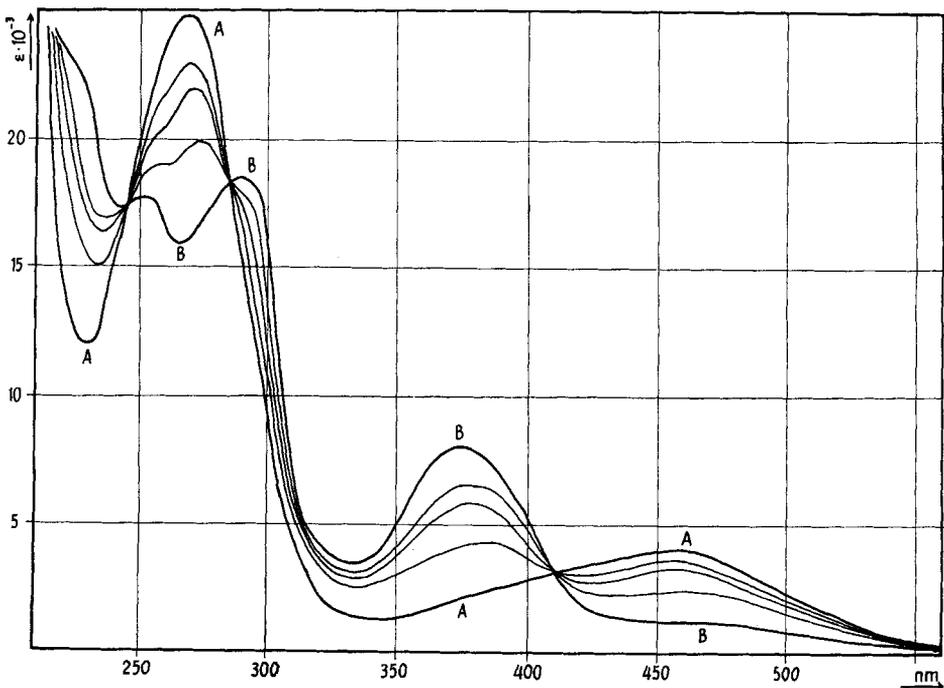
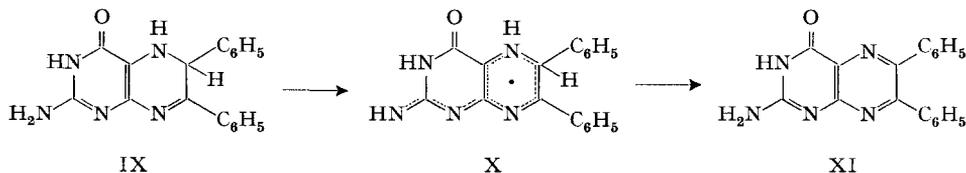


Fig. 3. Oxydationsverlauf unter Lichtausschluss des 6,7-Diphenyl-5,6-dihydropterins (IX) (Kurve A, vor Beginn der Oxydation) zum 6,7-Diphenylpterin (XI) in 50-proz. Äthanol

Nach 144 Std. ist die Oxydation noch nicht beendet (Kurve B). Die Zwischenspektren wurden 24 Std., 48 Std. und 72 Std. nach Beginn der Oxydation aufgenommen.

unter Lichtausschluss dauert 24 Stunden bei pH 1, mehr als 144 Stunden bei pH 6 und 24 Stunden bei pH 13 (Fig. 2, 3 und 4). Das Dihydropterin IX ist also in saurer Lösung unbeständiger als in neutraler, was sehr unerwartet ist. Nimmt man an, dass die Oxydation über das schon nachgewiesene monohydrierte Radikal X verläuft, so würde man eine umgekehrte Feststellung erwarten, da bekanntermassen die Radikal-Kationen der hydrierten Pterine – und voraussichtlich auch der hydrierten Lumazine – beständiger sind als die entsprechenden ungeladenen Radikale [8]. Das uner-



wartete Verhalten lässt vermuten, dass die Oxydation bei saurem pH über einen anderen Mechanismus als bei neutralem oder alkalischem pH verläuft. Das gleiche Verhalten wurde bei den Versuchen mit dem 6,7-Diphenyl-5,6-dihydrolumazin (XII) beobachtet und gleichzeitig aufgeklärt. Die Oxydation des Dihydrolumazins XII unter Lichtausschluss dauert 96 Stunden bei pH 1, mehr als 124 Stunden bei pH 6 und

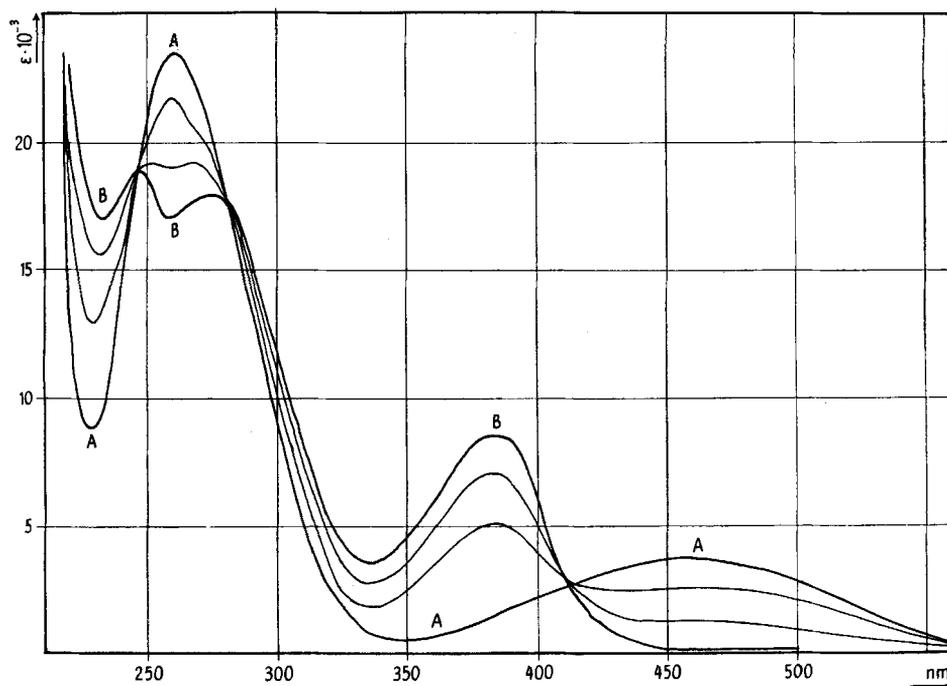
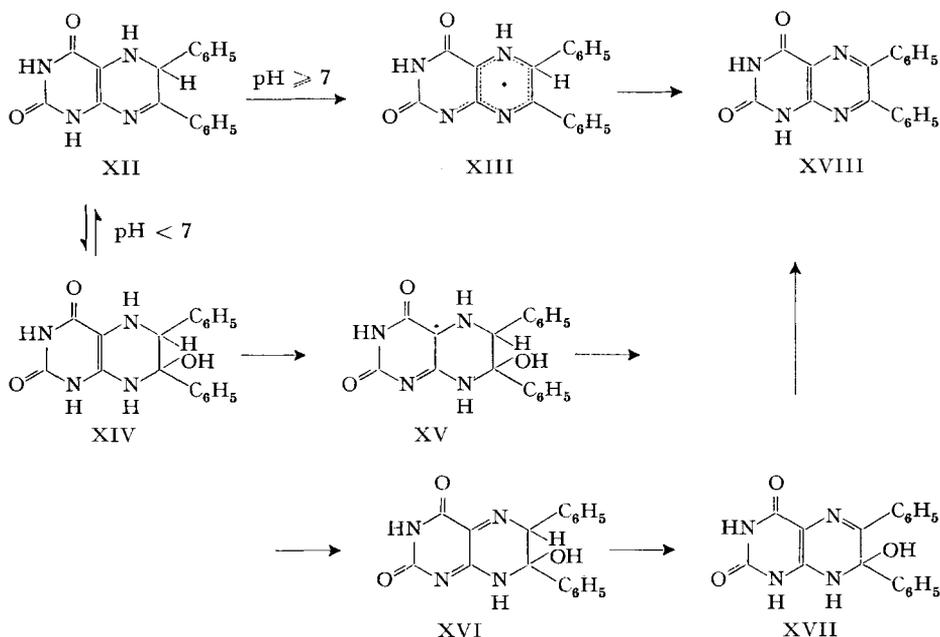


Fig. 4. Oxydationsverlauf unter Lichtausschluss des 6,7-Diphenyl-5,6-dihydropterins (IX) (Kurve A vor Beginn der Oxydation) zum 6,7-Diphenyl-pterin (XI) (Kurve B, nach vollständiger Oxydation) in 0,1N NaOH (50-proz. Äthanol)

Gesamtdauer: 24 Std.; die Zwischenspektren wurden 2 Std. und 10 Std. nach Beginn der Oxydation aufgenommen.



6 Stunden bei pH 13 (Fig. 5, 6 und 7). Während die Kinetik der Oxydation bei pH 6 oder 13 keine Abnormität zeigt, wurde bei pH 1 das Erscheinen eines Zwischenproduktes (Kurve C, Fig. 5) beobachtet. Das UV.-Spektrum dieses Produktes gleicht sehr dem des 6,7-Diphenyl-5,6,7,8-tetrahydrolumazins (V). Auf Grund dieser Ähnlichkeit kann angenommen werden, dass die erste Stufe der Reaktion in der kovalenten Hydratation der 7,8-Doppelbindung besteht. In der Tat konnten wir durch Behandeln von 5,6-Dihydrolumazin XII in saurer äthanolischer Lösung im Dunkeln und Abstoppen der Reaktion nach einer bestimmten Zeit durch vollständiges Abdampfen des sauren Mediums ein Produkt isolieren, welchem auf Grund seines UV.-Spektrums und der Elementaranalyse die Formel eines Hydrochlorids des 7-Hydroxy-6,7-diphenyl-5,6,7,8-tetrahydrolumazins (XIV) zugeschrieben wurde.

Es sei hier erwähnt, dass die kovalente Hydratation der Pteridine, insbesondere bei alkalischem pH, schon seit einigen Jahren bekannt und gut untersucht ist [9], dass aber die Isolierung eines hydratisierten Lumazins als Kation unseres Wissens bis jetzt noch nicht gelungen ist.

Das UV.-Spektrum des 7-Hydroxy-tetrahydrolumazins XIV in absolutem Äthanol zeigt nach kurzer Zeit wieder das flache Maximum des Dihydrolumazins XII bei 445 nm. Dadurch ist bewiesen, dass die Reaktion $\text{XII} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{XIV}$ reversibel ist. Beim langsamen Verdunsten des Lösungsmittels kristallisiert das Dihydrolumazin XII aus.

Bei der Oxydation von XII in saurer Lösung handelt es sich eigentlich nicht um die Oxydation eines Dihydrolumazins unter Bildung eines neutralen monohydrierten Radikals XIII, sondern um die Oxydation eines aus XII durch Hydratation entstandenen Tetrahydro-Derivates XIV unter Bildung eines ungeladenen trihydrierten

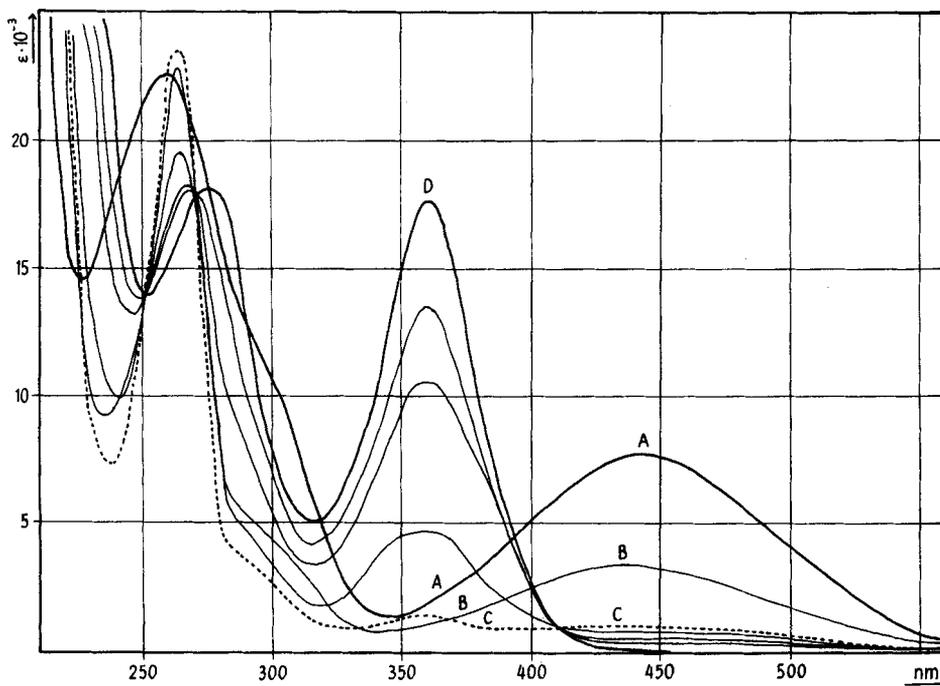


Fig. 5. Oxydationsverlauf unter Lichtausschluss des 6,7-Diphenyl-5,6-dihydrolumazins (XII) in 0,1 N HCl (50-proz. Äthanol)

Kurve A: Spektrum von XII vor Ansäuern der äthanolischen Lösung,

Kurve B: nach Ansäuern der äthanolischen Lösung,

Kurve C (punktirt): nach 80 Min., Spektrum eines Tetrahydrolumazins: die Oxydation hat begonnen,

Kurve D: Diphenylillumazin (XVIII) nach 96 Std. Oxydation.

Die Zwischenspektren wurden 6 Std. 45 Min., 24 Std. und 32 Std. nach Beginn der Oxydation aufgenommen.

Radikals XV. Als Zwischenprodukt bildet sich das chinoide Dihydrolumazin XVI, das durch Umlagerung zu XVII und nachfolgende Wasserabspaltung 6,7-Diphenylumazin (XVIII) liefert.

Sehr wahrscheinlich verläuft die Oxydation des 5,6-Dihydropterins IX in saurer Lösung nach einem ähnlichen Mechanismus. Das entsprechende hydratisierte 5,6-Dihydropterin ist jedoch so unbeständig, dass es bei der Untersuchung der Kinetik nicht gefasst werden konnte.

Wir danken Herrn H. Frohofer, Leiter unseres mikroanalytischen Laboratoriums, für die Ausführung der Elementaranalysen.

Experimentelles. – *Kinetische Messungen.* Das Lösen der reduzierten Produkte zur Aufnahme der UV.-Spektren erfolgte unter besonderen Vorsichtsmassnahmen, wie Sättigen des Lösungsmittels mit Stickstoff und Lösen der Probe unter Stickstoffatmosphäre, unter Verwendung der von Bobst [10] beschriebenen Versuchsanordnung.

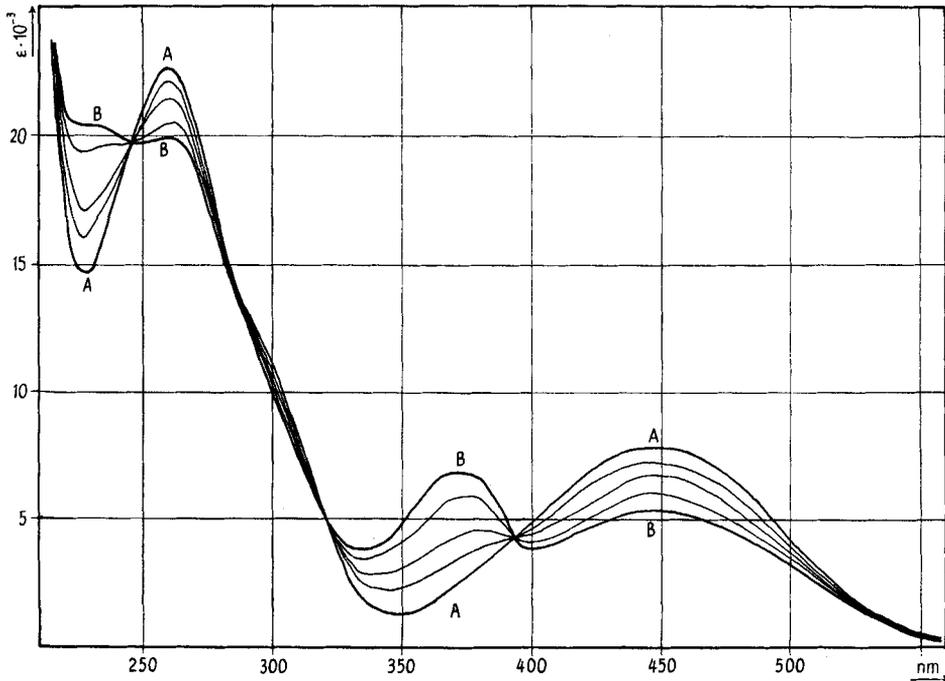
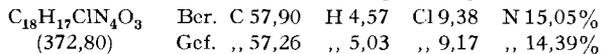


Fig. 6. Oxydationsverlauf unter Lichtausschluss des 6,7-Diphenyl-5,6-dihydrolumazins (XII) (Kurve A, vor Beginn der Oxydation) in 50-proz. Äthanol
Nach 124 Std., Kurve B, ist die Oxydation zum Diphenyllumazin (XVIII) bei weitem noch nicht beendet. Die Zwischenspektren wurden 24 Std., 48 Std. und 96 Std. nach Beginn der Oxydation aufgenommen.

Die UV.-spektroskopische Verfolgung der Oxydationskinetik der reduzierten Pterine und Lumazine in Lösung durch den Luftsauerstoff erfolgte mit dem automatischen UV.-Spektrophotometer DK₂ von Beckman.

7-Hydroxy-6,7-diphenyl-5,6,7,8-tetrahydrolumazin (XIV). In einem 100-ml-Zweihalskolben werden 100 mg 6,7-Diphenyl-5,6-dihydrolumazin (XII) in 30 ml mit Stickstoff gesättigtem Eisessig weitgehend gelöst, dann wird noch mit 30 ml stickstoffgesättigtem 50-proz. Äthanol, das 0,1N an HCl ist, versetzt und im Dunkelraum 3 Std. mit einem Magnetrührer gerührt. Die Lösung verfärbt sich von tiefrot nach hellorange. Die saure Mischung wird im Rotationsverdampfer eingedampft und die zurückbleibende orangefarbene Substanz mit wenig Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und im Wasserstrahlvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.



Eine unter Stickstoff hergestellte gesättigte Lösung von XIV in Äthanol scheidet nach einigen Tagen, im Dunkeln belassen, rote Kristalle von 6,7-Diphenyl-5,6-dihydrolumazin (XII) aus.

Versuche zur Hydroxylierung des Phenylalanins Zwei Lösungen von je 10 mg Phenylalanin, 10 mg Mohr'schem Salz und 20 mg EDTA in 15 ml Phosphatpuffer (0,1M, pH 6,8) werden mit 10 mg Tetrahydroderivat I bzw. V in 5 ml N,N-Dimethylformamid versetzt. Diese Mischungen werden 3 Std. in einem Wasserbad von 37° in einem offenen Gefäß gerührt. Nach Klärung durch Zentrifugation werden die Lösungen auf ein kleines Volumen eingengt und mit ein paar Tropfen eines Gemisches Propanol/Ammoniak (7:3) versetzt. Durch chromatographischen Vergleich in Propanol/Ammoniak (7:3) auf Cellulose-Dünnschichtplatten mit authentischem Material konnte kein Tyrosin in den Reaktionslösungen nachgewiesen werden.

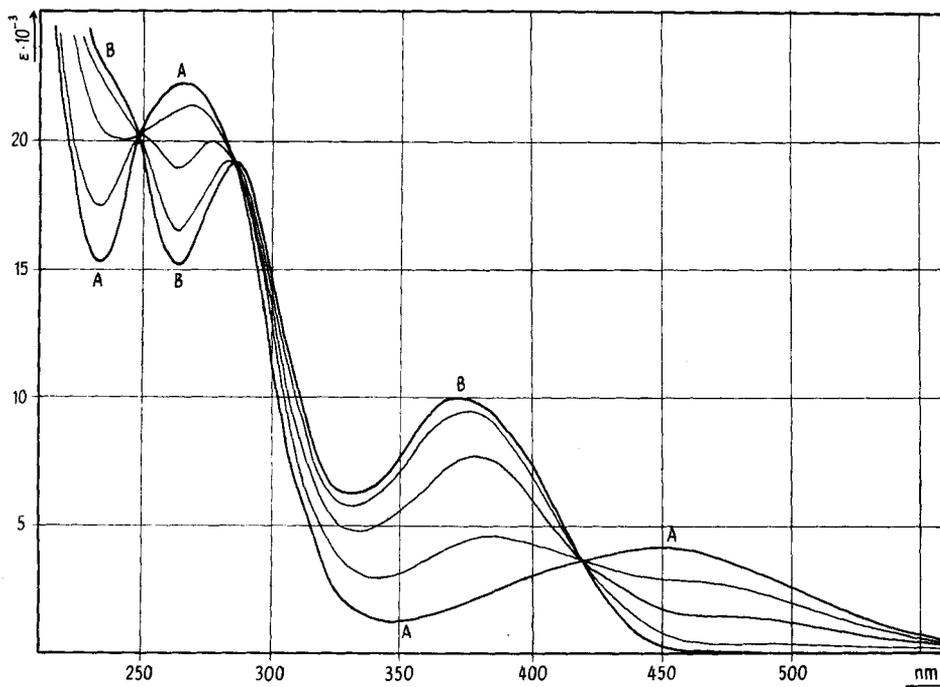


Fig. 7. Oxydationsverlauf unter Lichtausschluss des 6,7-Diphenyl-5,6-dihydrohumazins (XII) (Kurve A, vor Beginn der Oxydation) in 0,1N NaOH (50-proz. Äthanol) zum Diphenylhumazin (XVIII) (Kurve B, nach vollständiger Oxydation)
Gesamtdauer: 6 Std.; die Zwischenspektren wurden 15 Min., 60 Min. und 2 Std. 30 Min. nach Beginn der Oxydation aufgenommen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 29. Mitteilung: *M. Viscontini & G. Mattern*, *Helv.* 53, 377 (1970).
- [2] *H. Leidner*, Dissertation, Naturw. Fakultät, Universität Zürich 1967.
- [3] *M. Viscontini & S. Huwylev*, *Helv.* 48, 764 (1965); *M. Viscontini & H. Leidner*, *Helv.* 51, 1029 (1968).
- [4] *M. Viscontini & T. Okada*, *Helv.* 50, 1492 (1967).
- [5] *M. Viscontini, H. Leidner, G. Mattern & T. Okada*, *Helv.* 49, 1911 (1966).
- [6] *M. Viscontini & A. Bobst*, *Helv.* 48, 816 (1965).
- [7] *A. Bobst & M. Viscontini*, *Helv.* 49, 884 (1966).
- [8] *A. Ehrenberg, P. Hemmerich, F. Mueller, T. Okada & M. Viscontini*, *Helv.* 50, 411 (1967).
- [9] *A. Alberti*, *Angew. Chem. (Intern. Edit.)* 6, 919 (1967); *W. Pfeleiderer, J. Bunting, D. D. Perrin & G. Nuebel*, *Chem. Ber.* 99, 3503 (1966).
- [10] *A. Bobst*, Dissertation, Naturw. Fakultät, Universität Zürich 1965.