

RUDOLF TSCHESCHE und GERHARD STURM

Über Pteridine, XVIII¹⁾**Synthese des 2-Amino-4-hydroxy-6-[D-erythro-trihydroxypropyl]-pteridin-3'-phosphats und seines 7-Isomeren**

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 12. September 1964)

2-Amino-4-hydroxy-6-[D-erythro-trihydroxypropyl]-pteridin-3'-phosphat und das 7-Isomere werden durch Kondensation von 2.4.5-Triamino-6-hydroxypyrimidin mit Ribose-5-phosphat hergestellt und an Anionenaustauschern getrennt. Die Phosphorylierung von 2-Amino-4-hydroxy-6-trihydroxypropylpteridin mit β -Cyan-äthylphosphat/Trichloracetonitril führt nur zu einem einheitlichen, schwer trennbaren Produkt.

2-Amino-4-hydroxy-6-[D-erythro-trihydroxypropyl]-pteridin-3'-phosphat (I) sollte insbesondere nach F. WEYGAND und Mitarbb.²⁾ als erste Zwischenstufe bei der bereits vielseitig diskutierten³⁻¹⁰⁾ Biosynthese der Pteridine aus Purinen gebildet werden. Inzwischen gelang M. GOTO und H. S. FORREST¹¹⁾ tatsächlich die Isolierung eines solchen Pteridinphosphates aus *Echerichia coli* mit allerdings noch nicht ermittelter Seitenkettenkonfiguration. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir zunächst die Darstellung von chromatographisch reinem I. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, I radioaktiv markiert geeigneten Enzymsystemen anzubieten.

Die Synthese von I wurde analog zur üblichen Darstellung derartiger Polyhydroxyalkyl-pteridine durch Kondensation von 2.4.5-Triamino-6-hydroxypyrimidin (V) mit Ribose-5-phosphat durchgeführt. Wie bereits F. WEYGAND und Mitarbb.¹²⁾ bei der Kondensation von Glucose und Ribose mit V zeigten, entstehen im allgemeinen Verbindungen des Typs Ia—IVa nebeneinander. Entsprechend bildeten sich hier mit Ribose-5-phosphat die Verbindungen I—IV.

1) XVII. Mittell.: R. TSCHESCHE, B. HESS, I. ZIEGLER und H. MACHLEIDT, Liebigs Ann. Chem. **658**, 193 [1962].

2) F. WEYGAND, H. SIMON, G. DAHMS, M. WALDSCHMIDT, H. J. SCHLIEP und A. WACKER, Angew. Chem. **73**, 402 [1961].

3) A. ALBERT, Biochem. J. **57**, X [1954].

4) G. W. E. PLAUT, J. biol. Chemistry **208**, 513 [1954].

5) F. WEYGAND und M. WALDSCHMIDT, Angew. Chem. **67**, 328 [1955].

6) F. WEYGAND, H. J. SCHLIEP, H. SIMON und G. DAHMS, Angew. Chem. **71**, 522 [1959].

7) W. S. MCNUTT, J. Amer. chem. Soc. **83**, 2303 [1961].

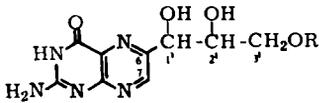
8) E. VIEIRA und E. SHAW, J. biol. Chemistry **236**, 2507 [1961].

9) J. J. REYNOLDS und G. M. BROWN, J. biol. Chemistry **237**, PC 2713 [1962]; **239**, 317 [1964].

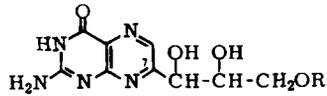
10) L. JAENICKE und PH. CHAN, Angew. Chem. **72**, 752 [1960].

11) Biochem. biophysic. Res. Commun. **6**, 180 [1961].

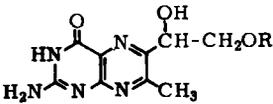
12) F. WEYGAND, H. SIMON, K. D. KEIL und H. MILLAUER, Chem. Ber. **97**, 1002 [1964].

I : R = PO₃H₂

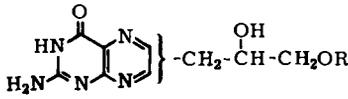
Ia: R = H

II : R = PO₃H₂

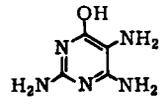
IIa: R = H

III : R = PO₃H₂

IIIa: R = H

IV : R = PO₃H₂

IVa: R = H



V

Papierchromatographisch lassen sich Isomere vom Typ Ia/IIa nicht unterscheiden. Beim Biopterin gelang die Abtrennung von seinem 7-Isomeren und seine Reingewinnung an Kieselgel¹¹⁾ und auf phosphorylierter Cellulose¹³⁾ (P-Cellulose). Über P-Cellulose konnten auch die isomeren Trihydroxypropyl-pteridine von H. REMBOLD und Mitarbb.^{13, 14)} rein gewonnen werden.

Das Mengenverhältnis von I und II ließ sich auch durch Anwendung der verschiedensten, in der Literatur angegebenen Kondensationsbedingungen¹⁵⁻¹⁷⁾ nie besser als etwa I : II = 1 : 4 beeinflussen. Neben viel dunklen Zersetzungsprodukten bildete sich oberhalb von 70° ebenso wie in stärker saurem Milieu (ab pH 3) nur Verbindung III. Ihr Anteil am Kondensationsprodukt sank mit fallender Temperatur; entsprechend vergrößerte sich die Menge von I und II. Überraschenderweise erfolgte die Kondensation schon bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden. Unter derart milden Bedingungen (20—37°) ließen sich nur Pentosen, im Gegensatz zu Glucose und ihrem 6-Phosphat, mit V umsetzen; hierbei bildeten sich durch Zersetzung kaum Nebenprodukte.

In einigen Laufmitteln ließ sich das Rohkondensationsprodukt papierchromatographisch in mehrere Komponenten zerlegen; es gelang so die Gewinnung von einheitlichem III und reinem Gemisch I/II. Diese Isomeren waren jedoch auch dünn-schichtchromatographisch nicht trennbar. Entsprechende Versuche an Anionenaustauschern wie Amberlite, Polyäthylenimino(PEI)-, Aminoäthyl(AE)- und Diäthylaminoäthyl(DEAE)-Cellulose, endeten zunächst immer mit fast vollständiger Veränderung der aufgetragenen Pteridine, obwohl eine gewisse Auftrennung zu beobachten war. Bereits beim Aufgeben, wobei starke Adsorption am Säulenkopf eintrat, aber auch beim Eluieren mit den dazu nötigen Ionenkonzentrationen wurden die Phosphorsäureester verseift. Es ergab sich schließlich, daß die Verseifung durch vorheriges Beladen der Austauscher mit Salzsäure nahezu völlig verhindert werden konnte.

13) H. REMBOLD und H. METZGER, Chem. Ber. **96**, 1395 [1963].

14) H. REMBOLD und L. BUSCHMANN, Chem. Ber. **96**, 1406 [1963].

15) H. S. FORREST und H. K. MITCHELL, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4865 [1955].

16) E. L. PATTERSON, R. MILSTREY und E. L. R. STOKSTAD, J. Amer. chem. Soc. **78**, 5868 [1956].

17) F. WEYGAND, A. WACKER und V. SCHMIED-KOWARZIK, Chem. Ber. **82**, 25 [1949].

In diesem Zustand zeigte nur AE-Cellulose mit möglichst geringer Austauschkapazität — etwa 0.2—0.4 mÄquivv./g — eine ausreichende Trennfähigkeit. Eine höhere Kapazität führte zu großen Verlusten infolge verstärkter Adsorption und zu einer unvollständigen Trennung von I und IV.

Beim Beschicken der Säule mit Rohprodukt wurden die Phosphate am Säulenkopf in einer schmalen, im UV-Licht sichtbaren Zone adsorbiert. Basische und neutrale Stoffe, die sich z. T. erst durch die nie restlos zu verhindernde Zersetzung am Austauscher bildeten, ließen sich schon mit Wasser eluieren. Beim Anlegen eines steilen, linearen LiCl-Gradienten folgten dann die Pteridinphosphate in der Reihenfolge II, IV, I und III. Wegen seiner Löslichkeit in Methanol und Aceton ist LiCl leicht von den hierin unlöslichen Lithiumsalzen der Pteridinphosphate abtrennbar. Durch dreimalige Rechromatographie der I- bzw. II-haltigen Fraktionen über die gleiche Säule wurden etwa 5 mg I und 60 mg II als Lithiumsalze rein gewonnen.

Zur Kontrolle von papier-, dünn-schicht- und säulenchromatographischer Trennung diente ebenso wie für die Beurteilung von Kondensationsergebnissen und der Reinheit der schließlich gewonnenen Pteridine der oxydative Abbau mit KMnO_4 und NaJO_4 . Die entstandenen Pteridincarbonsäuren bzw. -aldehyde konnten papierchromatographisch getrennt und nach dem Eluieren im UV vermessen werden. Daneben diente der enzymatische Abbau zu den phosphorsäurefreien Verbindungen als Struktur- und Reinheitsbeweis.

Die Lithiumsalze von I und II sind hellgelbe, aus wenig Wasser durch Zugabe von Methanol kristallin ausfallende, sehr gut wasserlösliche Substanzen. Gegen verdünnte Säuren und Basen erwiesen sie sich auch bei längerem Stehenlassen oder kurzem Erhitzen beständig. Die Labilität an Anionenaustauschern dürfte in starken, zwischenmolekularen Kräften bei der Adsorption ihre Ursache haben. Die Verbindungen sind sehr lichtempfindlich. Die UV-Spektren von I und II entsprechen bis auf eine geringe bathochrome Verschiebung der Maxima bis zu $1\text{ m}\mu$ ganz denen des 6- bzw. 7-Trihydroxypropyl-pteridins. Charakteristisch ist hier ebenso wie beim Paar Biopterin/Isobiopterin bei I ein Maximum bei $247\text{ m}\mu$ in 0.1 n HCl , das bei II nur noch als Schulter zu erkennen ist (s. Tab. 1).

Die Pteridine Ia—IVa wurden analog der Gewinnung von Biopterin¹⁾ durch Kondensation von Ribose mit V und nach chromatographischer Trennung an Kieselgel und auf Papier gewonnen.

Die Phosphorylierung von Ia mit β -Cyan-äthylphosphat/Trichloracetonitril führte zu einem Produkt, das sich chemisch uneinheitlich verhielt. Chromatographisch unterschied es sich kaum von I. Möglicherweise hatte nicht nur die primäre OH-Gruppe reagiert; die Ausbildung eines cyclischen Phosphates ist ebenfalls nicht auszuschließen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Gewinnung der Pteridine Ia—IVa: Nach bereits früher beschriebenen Verfahren¹⁾ wurde das Kondensationsprodukt aus Ribose und V an Kieselgelsäulen, hier allerdings im System Methanol/Wasser/konz. Ammoniak (75:24:1) sowie auf Papier in den Systemen 1-proz. wäbr. Na_2CO_3 -Lösung und n-Propanol/1-proz. wäbr. Ammoniak (2:1) aufgetrennt.

Kondensation von Ribose-5-phosphat mit 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin (V): Zu 200 mg Borsäure, 250 mg Natriumacetat, 1.6 g Eisessig und 1.2 g Hydrazinhydrat in 10 ccm Wasser wurden 860 mg *V*·2 HCl und 1.6 g *Ribose-5-phosphat* (Bariumsalz) gegeben. Nach ca. 48 Stdn. Rühren bei 25–30°, wobei der Hauptumsatz bereits während der ersten 10 Stdn. erfolgte, wurde das rötlich-gelbe Rohpteridin (ca. 500 mg) in 300 ccm Wasser gelöst und zur Vorreinigung über eine P-Celluloseschicht filtriert. Die erhaltene, stark saure Lösung wurde mit Lithiumhydroxyd neutralisiert und eingeeengt.

Die *präparative Papierchromatographie* zur Gewinnung von einheitlichem III und reinem Isomerengemisch I/II wurde auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2668 absteigend mit *n*-Butanol (wassergesätt.)/5% Cyclohexylamin durchgeführt. Substanz III lief als im UV dunkelblau fluoreszierende Zone voraus, während eine hellblau fluoreszierende Zone nahe dem Start die Isomeren I/II enthielt. Durch Waschen der Papierbögen in Äther wurden diese vom organischen Laufmittel befreit, die Zonen ausgeschnitten und die Pteridine anschließend mit verd. Ammoniak eluiert. Die UV-Werte von derart gewonnenem III (ca. 15 mg aus 200 mg Rohpteridin) sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1. UV-Maxima (in $m\mu$) der dargestellten Pteridine I–III

Pteridin	0.1 <i>n</i> NaOH	log ϵ	0.1 <i>n</i> HCl	log ϵ
I	364	3.86	321	3.88
	255	4.40	247	4.02
	280	Schulter		
II	361	3.81	319	3.86
	253	4.21	210	4.15
	275	Schulter	247	Schulter
III	357	3.88	320	4.28
	253	4.33	252	4.28
			216	4.61

Bereitung der Aminoäthyl-Cellulose-Säule: 25 g AE-Cellulose (Serva; Kapazität 0.4 mÄquivv./g) wurden zweimal in ca. 0.1 *n* HCl aufgeschlämmt, sedimentiert, dekantiert und in eine Glas-säule mit Fritte (20 × 3 cm) eingeschlammmt. Nacheinander wurde mit 100 ccm 0.1 *n* HCl und dann solange mit Wasser nachgewaschen, bis das Eluat nahezu neutral reagierte. Auf gleiche Weise wurde regeneriert.

Trennung der Pteridinphosphate an AE-Cellulose: Zwei Drittel der obigen Pteridinlösung (ca. 300 mg Rohpteridin in 100 ccm Wasser) wurden langsam auf die Säule aufgegeben. Neutrale und schwach basische Substanzen wurden mit Wasser eluiert und ein linearer LiCl-Gradient (1 l, ansteigend von 0.01–0.25 *n*) angelegt. Die Pteridinphosphate wurden in Fraktionen zu je 20 ccm aufgefangen und diese durch Oxydation¹⁾ getestet. Es wurde je 1 ccm Lösung entnommen, mit einer gleichen Menge 0.1 *n* NaOH versetzt und wie beschrieben mit KMnO₄ oxydiert. Eine schnelle Trennung der gebildeten Pteridincarbon-säuren gelang papierchromatographisch mit 1-proz. wäbr. Na₂CO₃-Lösung (Laufzeit etwa 1 Stde.).

AE-Cellulose höherer Kapazität führt trotz der Säurebelastung zu starker Verseifung der Phosphorsäureester. Diese Zersetzung läßt sich durch schwaches Ansäuern der Elutionslösung auf pH 6–4 (für Austauschkapazitäten von 0.68–0.9 mÄquivv./g) zurückdrängen, jedoch sinkt gleichzeitig die Trennfähigkeit des Austauschers stark ab.

Gewinnung der Lithiumsalze der Pteridinphosphate: Entsprechende Fraktionen der AE-Säule wurden vereinigt, i. Vak. zur Trockne eingedampft und das LiCl durch Zugabe von Methanol

in Lösung gebracht. Die unlöslichen Pteridine wurden abzentrifugiert und aus wenig Wasser durch Zutropfen von Methanol umkristallisiert. Ausb.: I etwa 5 mg, II 60 mg.

$\text{Li}_2[\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_7\text{P}]$ (345.1) Ber. C 31.37 H 2.93 P 8.98

I: Gef. C 30.88 H 3.55 P 8.83

II: Gef. C 30.25 H 3.51 P 8.95

I: $[\alpha]_D^{20}$: -7° ($c = 0.3$); II: $[\alpha]_D^{20}$: -15° ($c = 0.7$) (in Wasser, Perkin-Elmer-141-Polarimeter).

Phosphorylierung von Trihydroxypropyl-pteridin (Ia): 100 mg Ia, gelöst in 100 ccm absol. Dimethylsulfoxyd/Pyridin (4:1) wurden mit 0.4 ccm einer β -Cyan-äthylphosphat-Lösung (1 mMol/ccm = 0.136 g/ccm) und 280 mg Trichloracetonitril ca. 5 Stdn. auf 70° erwärmt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde die Schutzgruppe durch achtätiges Stehenlassen mit gesätt. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung (120ccm) bei 30° abgespalten und das $\text{Ba}^{2\oplus}$ als Sulfat abgeschieden. Das Rohprodukt wurde papierchromatographisch mit 1-proz. wäßr. Na_2CO_3 -Lösung gereinigt; die Ausb. betrug etwa 4 mg. Dieses *Pteridinphosphat* erwies sich chromatographisch einheitlich, ließ sich aber mit alkalischer Phosphatase sowie mit NaJO_4 nicht restlos abbauen.

Abbau durch Phosphatase: In Boratpuffer pH 9.3 wurden etwa 0.3 mg *Pteridinphosphat* gelöst und 10 mg alkalische *Phosphatase* (Fluka) zugegeben. Die Lösung wurde 48 Stdn. bei 37° inkubiert und dann direkt in den verschiedenen Laufmitteln chromatographiert.

Tab. 2. Papierchromatographische^{a)} R_F -Werte der Pteridine I–III und Ia–III a

Pteridin	System 1 ^{b)}	System 2 ^{c)}	System 3 ^{d)}
I + II	0.90	0.035 ^{e)}	0.015 ^{e)}
III	0.85	0.05 ^{e)}	0.03 ^{e)}
Ia + IIa	0.61	0.21	0.05
IIIa	0.51	0.28	0.11

a) Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 b, absteigend.

b) 1-proz. wäßr. Na_2CO_3 -Lösung.

c) n-Propanol/1-proz. wäßr. Ammoniak (2:1).

d) n-Butanol (wassergesätt.)/5% Cyclohexylamin.

e) Im Durchlaufchromatogramm ermittelt.