

Brian Green *) und Heinz Rembold

Synthese des Biopterins und seiner drei optischen Isomeren

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Eingegangen am 20. Dezember 1965)

D-Ribose, L-Arabinose, D-Xylose und L-Xylose werden durch Reduktion ihrer Methylpentosefuranosid-5-tosylate mit Lithiumalanat und milde Hydrolyse der Glykoside in einer Gesamtausbeute von 26–34% in die entsprechenden 5-Desoxy-pentosen umgewandelt. Nach Kondensation mit 2.4.5-Triamino-6-oxo-dihydropyrimidin werden daraus Biopterin und 7-Biopterin sowie deren mögliche optische Isomere hergestellt. Der Vergleich mit natürlichem Biopterin bestätigt die L-erythro-Konfiguration seiner 6-Dihydroxypropyl-Seitenkette. Die optischen Isomeren zeigen im mikrobiologischen Test etwa 10% der Wachstumswirkung des L-erythro-Biopterins.

In neuerer Zeit wurden verschiedene mischfunktionelle Oxygenasen beschrieben, die durch hydrierte Pterine aktiviert werden¹⁾. Als natürlich vorkommenden Cofaktor der Phenylalaninhydroxylase hat Kaufman²⁾ ein Dihydrobiopterin aus Rattenlebern isoliert. Für die Frage, wie spezifisch das natürlich vorkommende Biopterin (2-Amino-4-hydroxy-6-[L-erythro-1.2-dihydroxy-propyl]-pteridin) als Cofaktor wirkt, wäre es wünschenswert, auch seine optischen Isomeren auf ihre Aktivität zu testen. Gleichzeitig würde mit der Synthese dieser Verbindungen ein chemischer Struktur-beweis für das natürliche Biopterin erbracht. Patterson und Mitarbb.³⁾ hatten auf die optische Konfiguration des aus Menschenharn isolierten Naturstoffes aus dem Vergleich mit verschiedenen synthetischen Polyhydroxyalkyl-pterinen geschlossen: im mikrobiologischen Test mit *Crithidia fasciculata* zeigte nur das L-erythro-Dihydroxypropyl-pterin eine dem Naturstoff vergleichbare Wachstumswirkung. Auch bei den vier optischen Isomeren des Neopterins fanden wir nur für L-erythro-Neopterin eine dem Biopterin entsprechende Wirksamkeit⁴⁾.

Bei der Reinigung dieser Stoffe hatte sich die zuerst beim Biopterin angewandte Methode der chromatographischen Isomerentrennung auf phosphorylierter Cellulose⁵⁾ bereits ausgezeichnet bewährt. Das Hauptproblem der vorliegenden Arbeit bestand deshalb in der Erarbeitung eines einfachen und allgemein anwendbaren Verfah-

*) Jetzige Anschrift: Univ. of Maine, Dep. of Chemistry, Orono, Maine, USA.

1) S. Kaufman, Proc. nat. Acad. Sci. USA **50**, 1085 (1963); T. Nagatsu, M. Levitt und S. Udenfriend, J. biol. Chemistry **239**, 2910 (1964); A. R. Brennemann und S. Kaufman, Biochem. biophysic. Res. Commun. **17**, 177 (1964); L. Ellenbogen, R. J. Taylor und G. B. Brundage, Biochem. biophysic. Res. Commun. **19**, 708 (1965); S. Nakamura, A. Ichiyama und O. Hayashi, Federat. Proc. **24**, 604 (1965).

2) S. Kaufman, l. c. 1).

3) E. L. Patterson, R. Milstrey und E. L. R. Stokstad, J. Amer. chem. Soc. **78**, 5868 (1956).

4) H. Rembold und L. Buschmann, Chem. Ber. **96**, 1406 (1963).

5) H. Rembold und H. Metzger, Chem. Ber. **96**, 1395 (1963).

rens zur Synthese der 5-Desoxy-pentosen, durch deren Kondensation mit 2,4,5-Triamino-6-oxo-dihydropyrimidin die optische Konfiguration der Dihydroxypropyl-Seitenkette im Biopterin festgelegt wird.

Von den acht möglichen Pentosen dienten D-Ribose (**1a**), L-Arabinose (**2a**), D-Xylose (**3a**) und L-Xylose (**4a**) als Ausgangsmaterial. Für die Darstellung von 5-Desoxy-pentosen sind in der Literatur Methoden beschrieben, die aber meist unständiglich und in unbefriedigenden Ausbeuten verlaufen.

Bei dem Verfahren von Zinner und Mitarbb.⁶⁾ zur Synthese von 5-Desoxy-D-arabinose wird das Zuckermethylmercaptol tosyliert und die Synthese ohne Schutz der sekundären Hydroxylgruppen durchgeführt. Wir haben nach diesem Verfahren 5-Desoxy-L-arabinose dargestellt und den Zucker zum L-erythro-Biopterin kondensiert. Leider ließ sich die Zinner'sche Methode wegen der starken Wasserlöslichkeit der Mercaptale nicht ohne weiteres auf die Synthese der anderen drei Desoxypentosen übertragen. Bei der von Folkers und Mitarbb.⁷⁾ beschriebenen Synthese von 5-Desoxy-D-ribose wird vom Acetonid des furanoiden Methylglykosids ausgegangen, das sich aber nur in einer Ausbeute von 50% darstellen läßt. Zur Synthese von 5-Desoxy-D-xylose nach Levene und Compton⁸⁾ wird das Acetonid in zwei Stufen hergestellt, wobei die Hydroxylgruppe in Stellung 3 ungeschützt bleibt.

Eine Kombination dieser Verfahren führt zu einer in wenigen Schritten und in vergleichsweise guter Ausbeute (26 bis 34%) verlaufenden Synthese der gewünschten Zucker. Wie am Beispiel der Synthese von 5-Desoxy-D-ribose (**1a**—**1e**) gezeigt wird, setzen wir das ungeschützte furanoide Methylglykosid **1b** direkt mit *p*-Toluolsulfochlorid in Pyridin um. Das 5-Tosylat **1c** wird dann mit Lithiumalanat zum 5-Desoxymethyl-furanosid **1d** reduziert, welches bei schwach saurer Hydrolyse die freie 5-Desoxy-pentose **1e** liefert.

Eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg der Synthese ist demnach die Gewinnung möglichst reiner Pentosefuranoside. Nach Levene und Mitarbb.⁹⁾ entstehen bei Behandlung von D-Xylose (**3a**) mit 0.5% Chlorwasserstoff in Methanol 87% α - und β -Methyl-furanosid neben 6% Pyranosid und 5% nicht umgesetztem Zucker. D-Ribose (**1a**) wird unter diesen Bedingungen fast quantitativ in ihr Methylfuranosid umgewandelt. Die Glykosidierung verläuft nach kinetischen Untersuchungen von Bishop und Cooper¹⁰⁾ in vier Stufen über das Furanosid zum Gleichgewicht zwischen α - und β -Pyranosid (**1h**), wobei in jedem Fall die Bildung des Furanosids kinetisch stark begünstigt ist, wenn auch in allen Fällen die Pyranoside die thermodynamisch stabilen Endprodukte sind und im Gleichgewicht zu 70—98% vorliegen. Danach sollte kurzzeitige Behandlung der Pentosen mit salzsaurem Methanol unter milden Bedingungen zu mindestens 95% ein Gemisch von α - und β -Furanosid, also ein tosylierbares Derivat mit freier primärer Hydroxylgruppe liefern.

Im ersten Syntheseschritt wird die Pentose mit 0.5% Chlorwasserstoff in absolutem Methanol bei Raumtemperatur in das ölige Gemisch aus α - und β -Methylglykosid (**1b**—**4b**) umgewandelt. Ihre Reinheit wurde durch Dünnschichtchromatographie und

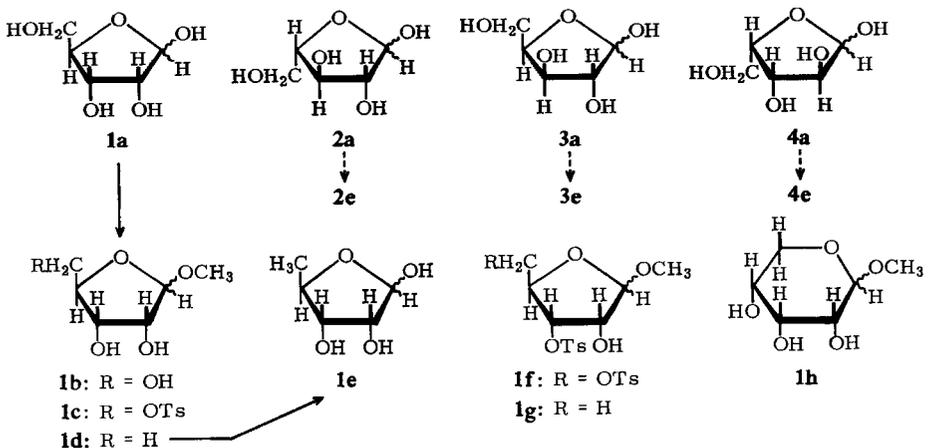
6) H. Zinner, K. Wessely und H. Kristen, Chem. Ber. **92**, 1618 (1959).

7) C. H. Shunk, J. B. Lavigne und K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. **77**, 2210 (1955).

8) P. A. Levene und J. Compton, J. biol. Chemistry **111**, 325 (1935).

9) P. A. Levene, A. L. Raymond und R. T. Dillon, J. biol. Chemistry **95**, 699 (1932).

10) C. T. Bishop und F. P. Cooper, Canad. J. Chem. **41**, 2743 (1963).



durch ihre NMR-Spektren (Tab. 1) geprüft. Diese zeigen beim Vergleich mit Literaturwerten¹¹⁾, daß die dargestellten Furanoside keinen erkennbaren Anteil von Pentosepyranosid (vgl. **1h**) enthalten. Die NMR-Spektren lassen ferner das Verhältnis von α - und β -Glykosid erkennen. Da ein Proton an C-1 mit einem *cis*-ständigen C-2-Proton einen kleinen Dieder-Winkel von $0-10^\circ$ bildet, haben die Signale der beiden Protonen eine Kopplungskonstante von $J = 3.5-5$ Hz, während der Wert bei einem *trans*-ständigen Proton $J \leq 2$ ist. Nach dem Intensitätsverhältnis der ausgeprägten 1-OCH₃-Signale liegt das Methyl-D-ribofuranosid fast vollkommen in der β -Form, Methyl-D-xylofuranosid dagegen zu gleichen Teilen als α - und β -Glykosid vor.

Die rohen Tosylate enthalten nach dem Verhältnis der aromatischen (Tab. 1, Tosyl) zu den 1-H- bzw. 1-OCH₃-NMR-Signalen eine Tosylgruppe pro Molekül. Spuren von Ditosylaten (**1f**) dürften bei der weiteren Synthese entfernt werden, da unter den angewandten Bedingungen nur eine Reduktion der primären Tosyloxygruppe zu erwarten ist (**1g**). In der Tat lassen sich in den NMR-Spektren der 5-Desoxy-methyl-pentoseide (**1d-1d**) keine aromatischen Signale feststellen. Eine Tosylierung eventuell vorhandener Methylpyranoside dürfte wegen der fehlenden primären Hydroxylgruppe schwerlich erfolgen, so daß diese Verbindungen bei der Aufarbeitung entfernt werden.

Die NMR-Spektren der 5-Desoxy-methyl-pentosefuranoside (**1d-1d**) zeigen bereits die Reinheit der Substanzen, wobei als neues Signal das der Methylgruppe bei 1.3–1.4 ppm auftritt. Das Methylglykosid der 5-Desoxy-D-ribose (**1d**) enthält etwa 60% β -Form gegenüber etwa 80% beim Methyl-D-ribofuranosid. Beim 5-Desoxy-methyl-D-xylofuranosid ist das Verhältnis $\alpha:\beta$ unverändert gleich eins. Wie beim Glykosid der 5-Desoxy-D-ribose ist die 5-Methyl-Gruppe als für die α - und β -Form unterschiedliches Dublett erkennbar. Das 5-Desoxy-methyl-L-arabinofuranosid liegt nach seinem NMR-Spektrum ausschließlich in der β -Form vor.

Ein Strukturvergleich der verschiedenen Pentosefuranoside macht das unterschiedliche Verhältnis von $\alpha:\beta$ -Methylglykosid verständlich. Wegen der α -ständigen Hy-

¹¹⁾ B. Capon und D. Thacker, Proc. chem. Soc. [London] 1964, 369.

Tab. 1. Charakteristische Signale der NMR-Spektren verschiedener Zuckerderivate in ppm. DMSO = Hexadeutero-dimethylsulfoxyd. Relative Intensitäten der Signale in Klammern

Substanz	1-H	5-H	1-OCH ₃	Tosyl
Methyl-D-ribofuranosid, in DMSO	α 4.77 d ($J \approx 4$ Hz) } (1.1) β 4.67 scharf. Sign. }		3.31 s (0.7) } (3.0) 3.27 s (2.43) }	
Methyl-D-xylofuranosid, in DMSO	α 4.77 d ($J \approx 4$ Hz) } (1.3) β 4.65 scharf. Sign. }		3.28 s, 3.32 s (1.5+1.5)	
Methyl-D-ribofuranosid-5-tosylat, in CDCl ₃	5% β 4.82 scharf. Sign. (1)	4.15 s (2)		7.2–8.0 (4.5) A ₂ B ₂ 2.46 (2.8)
Methyl-D-xylofuranosid-5-tosylat, in CDCl ₃	α 4.90 d ($J \approx 5$ Hz) } (0.99) β 4.86 scharf. Sign. }	4.16 s (–) 4.28 s (–)	3.45 s (1.0) } (3.0) 3.29 s (2.0) }	7.2–8.0 (4.9) A ₂ B ₂ 2.46
5-Desoxy-methyl-D-ribofuranosid, in CDCl ₃	α 4.96 d ($J \approx 4.5$ Hz) } (1.2) β 4.85 scharf. Sign. }	1.32 d ($J \approx 7$ Hz) } (3.0) 1.40 d ($J \approx 6$ Hz) }	3.51 s (1.0) } (2.8) 3.41 s (1.8) }	
5-Desoxy-methyl-D-xylofuranosid, in CDCl ₃	α 4.82 d ($J \approx 1$ Hz) } (1) β 4.81 d ($J \approx 5$ Hz) }	1.30 d ($J \approx 6$ Hz) } (3.0) 1.33 d ($J \approx 6$ Hz) }	3.41, 3.43 s	
L-Arabinose-diäthylmercaptal-5-tosylat, in CDCl ₃		3.98 s (–)	* 2.7 q ($J \approx 7$ Hz) (4.5) * 1.28 t ($J \approx 7$ Hz) (6)	7.2–8.0 (4) A ₂ B ₂ 2.46 (3)
5-Desoxy-L-arabinose-diäthylmercaptal, in CDCl ₃		1.30 d ($J \approx 6$ Hz) (3)	* 2.75 q ($J \approx 5$ Hz) (4.0) * 1.3 t ($J \approx 7.5$ Hz) (6)	
5-Desoxy-methyl-L-arabinofuranosid, in CDCl ₃	β 4.87 d ($J \approx 2$ Hz) (1.0)	1.38 d ($J \approx 6$ Hz) (2.9)	3.41 s (3.0)	

*) 1-SC₂H₅.

droxylgruppen an den C-Atomen 2 und 3 ist bei der D-Ribose (1a) die Bildung des β -Glykosids begünstigt, ebenso bei der L-Arabinose (2a), deren Hydroxylgruppe an C-2 α -Konfiguration hat. Daß beim D-Xylose-methylglykosid (3b) die beiden Isomeren im gleichen Verhältnis entstehen, ist durch den Einfluß der β -ständigen Gruppen an den C-Atomen 3 und 4 verständlich. Eine Epimerisierung der sekundären Hydroxylgruppen während der Alanatreduktion und der anschließenden Aufarbeitung ließ sich weder in den NMR-Spektren noch im mikrobiologischen Verhalten der synthetisierten Polyhydroxyalkyl-pterine feststellen.

Die 5-Desoxy-pentosen 1e—4e werden durch milde Hydrolyse aus den Glykosiden mit 1 n wäßriger HCl bei 65° gewonnen. Sie fallen ausnahmslos sirupös an und wurden als wäßrige Lösungen eingefroren. Ihre Reinheit wurde durch Dünnschichtchromatographie bewiesen.

Die 5-Desoxy-pentosen haben wir nach dem bereits beschriebenen Verfahren⁵⁾ mit 2.4.5-Triamino-6-oxo-dihydropyrimidin kondensiert. Die durch mehrmalige Chromatographie an Phosphor-Cellulose gereinigten Biopterin-Isomeren wurden an Hand ihrer Drehwerte, ihres Verhaltens bei der Dünnschicht- und Papierchromatographie und ihrer Wachstumswirkung im mikrobiologischen *Crithidia*-Test charakterisiert und mit dem Naturstoff aus Weiselzellenfuttersaft⁵⁾ verglichen (Tab. 2). Eventuell vorhandenes Neopterin (Trihydroxypropyl-pterin), das aus Spuren von nicht reduzierter Pentose stammt, läßt sich durch Chromatographie über Dowex 1X8 abtrennen⁴⁾. Die Daten für die UV-Spektren der reinen Pterine sind in Tab. 3 angegeben.

Tab. 2. Vergleich der vier isomeren 2-Amino-4-hydroxy-6- und -7-[1.2-dihydroxy-propyl]-pteridine mit natürlichem Biopterin. a = Dünnschichtplatten mit Kieselgel G/0.1 m H₃BO₃ gestrichen, Fließmittel Isopropylalkohol/5-proz. wäßr. H₃BO₃-Lösung (4:1). b = Papier Schleicher & Schüll 2043 b, Fließmittel Isopropylalkohol/5-proz. wäßr. H₃BO₃-Lösung (6:1), absteigend. c = Fließmittel Isopropylalkohol/10-proz. H₃BO₃-Lösung (4:1), absteigend

-[1.2-Dihydroxy- -propyl]- pterin	<i>R_F</i> -Werte in			$[\alpha]_D^{25}$ in 0.1 n HCl (c = 0.2)	halboptimale Wachstoffsstoffkonz. (mγ/ccm Nährflsg.)
	a	b	c		
Biopterin	0.34	0.28	0.30	-63°	0.008
6-L-erythro-	0.34	0.28	0.30	-62°	0.006
6-D-erythro-	0.34	0.28	0.30	+61°	0.7
6-L-threo-	0.16	0.24	0.26	+95°	0.2
6-D-threo-	0.16	0.24	0.26	-94°	0.5
7-L-erythro-	0.39	0.28	0.30	-18°	
7-D-erythro-	0.39	0.28	0.30	+7°	
7-L-threo-	0.24	0.24	0.26	+79°	
7-D-threo-	0.24	0.24	0.26	-74°	

Wie bei den Neopterin-Isomeren so hat auch bei den vier optischen Isomeren des Biopterins nur das 6-L-erythro-Isomere die gleiche biologische Wirkung wie der Naturstoff. Auch in ihrer optischen Aktivität und im chromatographischen Verhalten sind die beiden Stoffe identisch.

Tab. 3. UV-Absorption des Biopterins und 7-Biopterins sowie der optischen Isomeren. Vergleich mit natürlichem Biopterin aus Weiszellenfuttersaft.
 λ_{\max} in m μ , ϵ in l·Mol⁻¹·cm⁻¹

-[1.2-Dihydroxy- -propyl]- pterin	Wasser		0.1 n HCl		0.1 n NaOH	
	λ_{\max}	ϵ	λ_{\max}	ϵ	λ_{\max}	ϵ
Biopterin	274	12 650	247	11 130	254	21 050
	345	5 260	320.5	7 850	363	6 600
6-L-erythro-	274	14 800	247	11 950	254	24 550
	346	6 520	320	8 600	363	7 950
6-D-erythro-	274	15 480	247	11 150	254	24 550
	345.5	6 300	320	7 800	363	7 450
6-L-threo-	274	14 950	247	11 420	254	24 100
	346	6 050	321.5	8 040	363	7 320
6-D-threo-	274	15 550	247	11 930	254	24 800
	345.5	6 500	321.5	8 300	363	7 720
7-L-erythro- ⁵⁾	272.5	11 800	245	9 150	251.5	20 300
	343	7 800	317.5	10 550	359	8 720
7-D-erythro-	272.5	11 120	245	7 900	251.5	20 350
	343	7 200	318	9 620	359	8 320
7-L-threo-	272	11 650	245	8 830	251.5	22 450
	343	7 480	318	10 580	359	8 830
7-D-threo-	272	10 920	245	8 850	251	22 150
	343.5	7 150	318	10 460	359	8 800

Durch die Synthese der vier isomeren 6-Dihydroxypropyl-pterine wird damit die von *Patterson* und Mitarbb.³⁾ aufgestellte Struktur des natürlich vorkommenden Biopterins bestätigt. Ob eines der anderen optischen Isomeren ebenfalls in der Natur vorkommt — z. B. als Intermediärprodukt bei der verschiedentlich diskutierten Umwandlung von Neopterin in Biopterin⁴⁾ — vermögen wir noch nicht zu entscheiden.

Herrn Professor *A. Butenandt* sind wir für die großzügige Förderung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet. Der *A. v. Humboldt-Stiftung* haben wir für ein Forschungsstipendium, der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für Sachbeihilfen zu danken. Herr *U. Riedel* leistete wertvolle technische Hilfe. Herrn Dr. *J. Sonnenbichler* danken wir für die Unterstützung bei der Diskussion der NMR-Spektren, Fräulein *I. Ehrhardt* für die Aufnahme der UV-Spektren, Fräulein *S. Schär* für die Durchführung der mikrobiologischen Tests.

Beschreibung der Versuche

Die NMR-Spektren wurden mit dem Spektrometer A/60 (Varian), die UV-Spektren mit dem selbstregistrierenden UV-Spektralphotometer DK 2 (Beckman), die Drehwerte mit dem Polarimeter LEP (Zeiss) aufgenommen. Die chromatographischen Fraktionen haben wir mit dem UV-Spektralphotometer PMQ II (Zeiss) vermessen. Sämtliche Lösungen wurden bei 25–30°-Badtemp. im Rotationsverdampfer (Wasserstrahlvak.) schonend eingengt.

Methyl-pentosefuranoside (1b–4b)

Die jeweilige *Pentose* **1a–4a** (20 g) wird in einer Lösung von 2.5 g HCl in 500 ccm trockenem *Methanol* suspendiert und gerührt, bis eine Probe mit *o*-Dinitrobenzol in 10-proz. wäßr. Na₂CO₃-Lösung bei 100° keine Färbung mehr gibt. *D*-Ribose, *D*-Xylose und *L*-Xylose lösen sich innerhalb von 30 Min., *L*-Arabinose löst sich nach 6 Stdn. Die Glykosidierung ist bei den drei erstgenannten Zuckern nach 7 Stdn., bei *L*-Arabinose nach 10 Stdn. beendet. Man setzt 20 g Ag₂CO₃ zu und rührt die Suspension bis die Lösung neutral reagiert. Dann wird durch Kieselgur filtriert und i. Vak. eingengt. Die meist dunkelbraune Lösung wird nach 24 Stdn. nochmals mit *Methanol* verdünnt und über Kieselgur filtriert (um restliche Silberverbindungen zu entfernen) und die fast farblose Lösung i. Wasserstrahlvak., anschließend mit der Ölpumpe, bis zur Gewichtskonstanz eingengt. Es ist sorgfältig darauf zu achten, daß das *Methanol* auf diese Weise vollständig entfernt wird. Der farblose Sirup wiegt 21.0–21.8 g. Die Glykoside zersetzen sich zum Teil bei der Destillation und werden deshalb ohne weitere Reinigung für die Tosylierung verwendet.

Die dünn-schichtchromatographische Reinheitsprüfung erfolgte an Kieselgur G (mit 0.02 *m* Na-Acetat gepuffert)¹², Fließmittel Benzol/Essigester (1:1), Sprühmittel Anisaldehyd in Äthanol/H₂SO₄. *R_F*-Werte: Methyl-*D*-ribofuranosid 0.78, Methyl-*D*- und -*L*-xylofuranosid 0.84.

Methyl-pentosefuranosid-5-tosylate (1c–4c)

1b–4b (20.62 g, 0.126 Mol) werden jeweils in trockenem Pyridin (125 ccm) bei –10° mit einer ebenfalls auf –10° abgekühlten Lösung von *p*-Toluolsulfochlorid (25.0 g, 0.131 Mol) in trockenem Pyridin (125 ccm) versetzt. Man läßt 4 Stdn. bei –10°, weitere 16 Stdn. bei Raumtemp. stehen, gießt die gelbe Lösung dann in Eiswasser und läßt das Eis auftauen (5–6 Stdn.). Das abgeschiedene gelbe Öl wird mit CHCl₃ (3 mal 250 ccm) extrahiert, der Extrakt mit Wasser (5 mal 100 ccm), 10-proz. wäßr. NaHCO₃-Lösung (100 ccm) und Wasser (100 ccm) gewaschen, dann mit MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Das dickflüssige gelbe Öl wird mehrfach mit trockenem Benzol bis zur Gewichtskonstanz eingengt. Ausbeuten 34.6–36.9 g. Die Tosylate sind nicht stabil und zersetzen sich innerhalb einiger Monate zu schwarzen Ölen. *R_F*-Werte in der Dünnschichtchromatographie (s. oben): *Methyl-D-ribofuranosid-5-tosylat* (**1c**) 0.94, *Methyl-D-* und -*L-xylofuranosid-5-tosylat* (**3c**, **4c**) 0.91.

UV-Maxima (log ε): **1c**: 224.5 (4.13), 256.5 (2.84), 262 (2.90), 267 (2.85), 273 mμ (2.75). **3c**: 224 (4.07), 256.5 (2.71), 262 (2.78), 267 (2.75), 273 mμ (2.67).

5-Desoxy-methyl-pentosefuranoside (1d–4d)

Zu einer Lösung des jeweiligen *Tosylats* **1c–4c** (36 g) in mit Na getrocknetem Tetrahydrofuran (300 ccm) wird in einen mit Kühler, Tropftrichter und Rührer versehenen Rundkolben langsam eine Suspension von 12 g LiAlH₄ (großer Überschuß) in trockenem Tetrahydrofuran zugegeben (die Suspension muß durch langsames Zugeben des Alanats zum Tetrahydrofuran – nicht umgekehrt! – vorbereitet werden). Anschließend wird das Gemisch 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt, dann auf 0° abgekühlt und *vorsichtig* unter Stickstoff mit feuch-

¹² E. Stahl, Dünnschichtchromatographie, S. 473, Springer-Verlag, Berlin 1962.

tem Tetrahydrofuran behandelt, um überschüss. LiAlH_4 zu zersetzen. Dann setzt man dem gallertigen Gemisch 400 ccm Wasser zu, rührt die Suspension gut um und saugt auf einer Nutsche ab. Man drückt den Niederschlag gut aus, suspendiert ihn in 200 ccm Wasser und saugt wieder ab. Die vereinigten Filtrate werden i. Vak. bei $15-20^\circ$ auf 200 ccm eingeengt und als alkalische Lösung über eine Dowex 1X8-Säule (Formiatform, 20mal 1.5 cm) filtriert, die man mit Wasser solange auswäscht, bis das Eluat nach vorherigem Erhitzen mit 2*n* HCl im *o*-Dinitrobenzol-Test keine Farbe mehr gibt. Die bei 20° auf 200 ccm eingeengte Lösung wird über Dowex 50 (H-Form, 20×3 cm) in der gleichen Weise von den Kationen befreit und dann unter Zugabe von Wasser mehrmals auf 50 ccm eingeengt, um aus der Dowex-1-Säule stammende Ameisensäure zu entfernen. Für die Aufnahme der NMR-Spektren wurde ein Teil der Lösung zur Trockene eingeengt, dreimal mit trockenem Benzol eingeengt und dann 5 Stdn. lang in 5% HCl enthaltendem trockenem Methanol stehengelassen. Nach Behandlung mit Ag_2CO_3 (vgl. 1b—4b) wurde das Methanol entfernt. Die erhaltenen 5-Desoxy-methyl-pentosefuranoside lassen sich i. Vak. destillieren. 1d erstarrt bei Raumtemp. allmählich zu einer nur z. Tl. durchkristallisierten Masse, 3d und 4d fallen als farblose Öle an. Die Eigenschaften des auch über das Mercaptal hergestellten 5-Desoxy-methyl-L-arabinofuranosids 2d werden auf S. 2170 beschrieben. Im Dünnschichtchromatogramm laufen die Substanzen kurz hinter der Front, sie wurden deshalb erst nach Hydrolyse zu den 5-Desoxy-pentosen charakterisiert.

5-Desoxy-pentosen (1e—4e)

Die aus der vorhergehenden Stufe angefallene, ein Gemisch von *Glykosid* und freiem Zucker enthaltende Lösung wird mit 1*n* HCl (100 ccm pro 0.01 Mol Glykosid) 6 Stdn. lang bei 65° gehalten. Die gelbe Lösung wird nach Abkühlen mit Amberlite IR-4B (regeneriert mit 4-proz. wäbr. Na_2CO_3 -Lösung) versetzt und so lange gerührt, bis sie neutral ist. Die Suspension wird in ein Chromatographierohr gegossen und mit dest. Wasser ausgewaschen, bis das Eluat mit *o*-Dinitrobenzol nicht mehr reagiert. Dann wird auf 100 ccm eingeengt. Die Konzentration der 5-Desoxy-pentosen wird nach l. c.¹³⁾ colorimetrisch bestimmt. Zu 2 ccm Wasser in einem Reagenzglas werden die Lösungen in folgender Reihenfolge zupipettiert: 0.1 ccm 0.1% *o*-Dinitrobenzol in Äthanol, 0.5 ccm 25-proz. wäbr. Na_2CO_3 -Lösung, 0.2—0.6 ccm der etwa 0.1-proz. Zuckerlösung, 2 ccm Wasser. Es wird gut umgeschüttelt, genau 5 Min. lang in kochendem Wasser erhitzt und dann sofort die UV-Absorption bei $465 \text{ m}\mu$ (Photometer Eppendorf) bestimmt. Als Eichsubstanz wird eine reine Pentose verwendet. Die Gesamtausbeute betrug für die 5-Desoxy-pentose 1e 12% (hoher Verlust wegen ungenügender Abtrennung des Methanols vor der Tosylierung), für 2e 28%, für 3e 26% und für 4e 34%. Die Reinheit der Zucker wurde dünnschichtchromatographisch auf dem oben beschriebenen Träger geprüft. Eine geringe Menge Pentose, die bei der anschließenden Synthese als Nebenprodukt abgetrennt wurde, ließ sich nur im Falle der 5-Desoxy-D-ribose feststellen. Fließmittel: Essigester/Isopropylalkohol/ H_2O (65:23.5:11.5, Vol.-%). Sprühreagenz: 18 ccm 95-proz. Äthanol, 1 ccm konz. Schwefelsäure, 1 ccm Anisaldehyd. R_F -Werte:

5-Desoxy-D-ribose (1e)	0.89 (grau, gelber Rand)
5-Desoxy-L-arabinose (2e)	0.94 (gelb)
5-Desoxy-D-xylose (3e)	0.89 (grau, gelber Rand)
5-Desoxy-L-xylose (4e)	0.89 (grau, gelber Rand)
D-Ribose (1a)	0.75 (graugrün)
L-Arabinose (2a)	0.60 (gelbgrau)
D-Xylose (3a)	0.70 (grau)
L-Xylose (4a)	0.70 (grau)

¹³⁾ Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), 4. Aufl., Bd. II, S. 621, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1953.

Die R_F -Werte schwanken etwas mit dem Alter der Sorptionsschichten. Die Bestimmung der optischen Aktivität lieferte in Wasser folgende $[\alpha]_D^{25}$ -Werte (in Klammern Literaturwerte): **1e** ($c = 3.4$) $- 3.2^\circ$, durch Verunreinigung mit D-Ribose verfälscht, ($+11^\circ$ ⁷⁾; **2e** ($c = 1.8$) -6.0° (-6.9° ¹⁴), -5.1° ¹⁵, -4.7° ¹⁶); **3e** ($c = 2.2$) $+10^\circ$ ($+13.26^\circ$ ⁸); **4e** ($c = 3.4$) -14.0° (-13.0° ¹⁷).

L-Arabinose-diäthylmercaptopal wurde nach Fischer¹⁸) hergestellt. Ausb. nach Umkristallisation aus Isopropylalkohol 68%, Schmp. 125–126° (Lit.¹⁸): 124–126°, $[\alpha]_D^{25}$ (in Methanol): $+11^\circ$ ($c = 2.0$). λ_{\max} (in Äthanol) 235 μ ($\log \epsilon = 2.75$).

L-Arabinose-diäthylmercaptopal-5-tosylat: Eine auf -10° gehaltene Lösung des *Mercaptals* (17.28 g) in trockenem Pyridin (75 ccm) wird mit *p-Toluolsulfochlorid* (13.5 g, entspr. 1.05 Äquivv.) in ebenfalls auf -10° abgekühltem Pyridin (75 ccm) versetzt und 2 Stdn. bei dieser Temperatur gehalten. Man läßt weitere 16 Stdn. bei Raumtemp. stehen, gießt dann in 750 ccm Eiswasser und filtriert die zunächst ölig ausfallende Substanz nach dem Erstarren ab. Ausb. nach Umkristallisieren aus CHCl_3 /Benzin 21.96 g (78%). Schmp. 58–64°, nach nochmaliger Kristallisation 68–69°.

UV (in Äthanol): λ_{\max} ($\log \epsilon$) 223 (4.11), 250 (2.95), 256 (2.95), 261.5 (2.92), 273 μ (2.69).

5-Desoxy-L-arabinose-diäthylmercaptopal: Zu einer Lösung des *Tosylats* (21.0 g) in trockenem Benzol (160 ccm) und Äther (480 ccm) wird bei Raumtemp. unter Rühren eine Suspension von LiAlH_4 (8.4 g, großer Überschuß) in trockenem Äther (240 ccm) langsam zugepfropft. Es wird 8 Stdn. unter Rückfluß gekocht und weitere 16 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Überschüss. LiAlH_4 zersetzt man mit 5 *n* HCl (50 ccm) und filtriert das Gemisch ab. Der braune Rückstand wird dreimal mit je 100 ccm heißem Benzol extrahiert, dieses mit MgSO_4 getrocknet und abgedampft. Den wäßr. Extrakt sättigt man mit NaCl und schüttelt mit Äther (3 mal 100 ccm) aus. Der Äther wird nach Trocknen mit MgSO_4 abdestilliert. Gesamtausb. 8.8 g. Die Substanz schmilzt nach Kristallisation aus Benzol bei 100–104°, Ausb. 5.4 g (44%). Nach nochmaliger Kristallisation Schmp. 103.5–105.5°. $[\alpha]_D^{25}$ (in Methanol): $+20.5^\circ$ ($c = 0.9$). λ_{\max} (in Äthanol) 235 μ ($\log \epsilon = 2.73$).

5-Desoxy-methyl-L-arabinofuranosid (2d): Das *Mercaptopal* (4.8 g) wird in 180 ccm absol. Methanol gelöst und mit HgCl_2 (16 g) 30 Min. unter Rückfluß gekocht, wobei sofort ein weißer Niederschlag ausfällt. Nach Filtrieren wird in die Lösung H_2S eingeleitet, nach dem Absaugen des HgS wird mit Ag_2CO_3 neutralisiert. Nach Einengen i. Vak. kristallisiert der Rückstand aus Benzol/Benzin in farblosen Nadeln. Schmp. 78–82°, $[\alpha]_D^{25}$ (in Wasser): -111° ($c = 0.7$). Ausb. 2.26 g (76%).

5-Desoxy-L-arabinose (2e): Das *Glykosid 2d* (1 g) wird, wie oben beschrieben, mit 1 *n* HCl (80 ccm) hydrolysiert. Ausb. 870 mg (95%).

6- und 7-[1.2-Dihydroxy-propyl]-pterine

Die Standardbedingungen für die Kondensation der *Desoxypentosen* mit *2.4.5-Triamino-6-oxo-dihydropyrimidin* wurden bereits beschrieben⁹). Es wurden je 1.5 g Desoxypentose (im Falle der Desoxy-L-arabinose 770 mg) in 100-mg-Portionen eingesetzt. Das ausgefallene Rohprodukt wurde abzentrifugiert, mit wenig Wasser, dann mit Methanol und Äther gewaschen und getrocknet. Rohausbeuten: *D-erythro*- 586 mg, *L-erythro*- 440 mg, *D-threo*- 828 mg, *L-threo*- 884 mg.

¹⁴) L. Hough und T. J. Taylor, J. chem. Soc. [London] 1955, 3544.

¹⁵) O. Ruff, Ber. dtsh. chem. Ges. 35, 2360 (1902).

¹⁶) R. Kuhn, W. Bister und W. Dafeldecker, Liebigs Ann. Chem. 617, 115 (1958).

¹⁷) H. Müller und T. Reichstein, Helv. chim. Acta 21, 251 (1938).

¹⁸) E. Fischer, Ber. dtsh. chem. Ges. 27, 673 (1894).

Zur chromatographischen Reinigung⁵⁾ wird das Rohprodukt mit 300 ccm Wasser ausgekocht, der nach Abkühlen auf 20° ausgefallene Niederschlag nochmals mit 100 ccm Wasser gekocht und das vereinigte Filtrat auf eine Phosphor-Cellulosesäule (4 × 20 cm) vorsichtig aufgetragen. Nach Elution mit Wasser wird die Zone mit $E_{272}/E_{252m\mu} = 1.5-2.0$ gesammelt und eingengt. Sie wird in 4 Portionen rechromatographiert, wobei das 6-Isomere mit einem Quotienten von 2.0 und das 7-Isomere mit einem solchen von 1.5 gesammelt wird. Die Zwischenzone wurde nochmals chromatographiert. *D-erythro*-Biopterin enthielt noch eine geringe Menge Neopterin. Es wurde, wie beschrieben⁴⁾, in 25 ccm Wasser gelöst auf eine Dowex IX8-Säule (Formiatform, 2 × 40 cm) aufgetragen und mit Wasser eluiert. Das vor dem Biopterin wandernde Neopterin kann auf diese Weise entfernt werden. Die chromatographisch reinen Isomeren wurden noch zweimal aus Wasser umkristallisiert. Ausbeuten für die einzelnen Isomeren:

<i>6-L-erythro</i>	16.7 mg	<i>7-L-erythro</i>	nicht isoliert
<i>6-D-erythro</i>	19.7 mg	<i>7-D-erythro</i>	30.7 mg
<i>6-L-threo</i>	10.9 mg	<i>7-L-threo</i>	34.7 mg
<i>6-D-threo</i>	18.3 mg	<i>7-D-threo</i>	25.9 mg

Die Eigenschaften der Verbindungen sind in den Tab. 2 und 3 zusammengestellt. Alle hier dargestellten Polyhydroxyalkyl-pterine zersetzen sich beim Erhitzen über 250°.

[566/65]