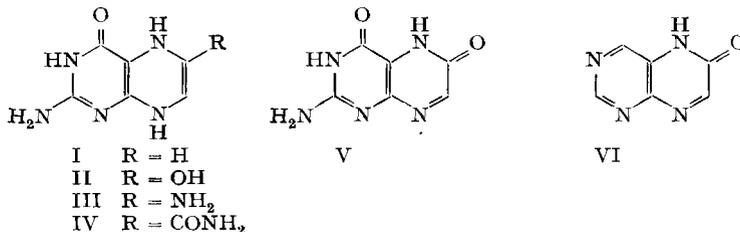


113. De la chimie des ptérines

5^e Communication ¹⁾Addition nucléophile d'HCN sur la xanthoptérine
et la dihydro-7,10-xanthoptérinepar M. Viscontini et M. Piraux²⁾

(7 III 62)

Lors de nos premiers travaux sur les ptérines hydrogénées, nous avons mis en évidence la réactivité chimique de la double liaison 8,9 de la *para*-dihydroptérine I³⁾ et nous avons montré dans ce travail, puis dans un travail effectué conjointement avec FORREST⁴⁾ que l'addition nucléophile des anions NH₂⁻, OH⁻, HSO₃⁻ et CN⁻ s'effectuait facilement sur le carbone 8 du cycle dihydropyrazine pour donner, après réoxydation à l'air, des ptérines ou des dihydroptérines substituées en position 8. Après avoir démontré que les dihydroptérines obtenues dans ces conditions avec les substituants OH (II), NH₂ (III) et CONH₂ (IV) étaient hydrogénées en 7,10, il nous a paru intéressant d'étudier la réactivité de ces ptérines *para*-dihydrogénées, en présence de réactifs nucléophiles. En effet la substitution en 8 du cycle pyrazine par des groupements électronégatifs tels que OH, NH₂ et CONH₂, laisse présager une facile protonation du carbone 8, suivie d'une addition nucléophile sur le carbone 9. Pour des raisons semblables on peut être amené à considérer la xanthoptérine (V) comme une ptérine dihydrogénée en 7,8 et dont la double liaison 9,10 devrait pouvoir subir, elle aussi, des additions nucléophiles conduisant, ici encore, à des ptérines substituées en position 9.



La réactivité de la double liaison 9,10 chez les hydroxy-8-ptéridines est d'ailleurs une propriété qui a déjà été mise en évidence par de nombreux chercheurs. ALBERT et son école ont en effet montré la possibilité d'addition d'une molécule d'eau, d'hydroxylamine ou d'ammoniac sur la double liaison de l'oxo-8-dihydro-7,8-ptéridine (VI) ou si l'on préfère de l'hydroxy-8-ptéridine⁵⁾. Plus récemment encore, et alors que nos travaux expérimentaux étaient achevés, la même école a pu isoler des

¹⁾ 4^e Communication: M. VISCONTINI & M. PIRAUX, *Helv.* 45, 615 (1962).

²⁾ Chargé de Recherches du FONDS NATIONAL BELGE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

³⁾ M. VISCONTINI & H. R. WEILENMANN, *Helv.* 42, 1854 (1959).

⁴⁾ H. S. FORREST *et al.*, *Helv.* 43, 1005 (1960).

⁵⁾ A. ALBERT, *J. chem. Soc.* 1955, 2690; D. J. BROWN & S. F. MASON, *ibid.* 1955, 3443.

produits de réaction entre la ptérine VI, le malonate d'éthyle, l'acétone et le cyanacétate d'éthyle⁶). En outre on a pu mettre en évidence, dans le foie de Porc, un enzyme capable de catalyser l'addition nucléophile de l'acétone sur la double liaison 9,10 de la xanthoptérine⁷).

Comme anion réactionnel de nos expériences nous avons choisi CN⁻ par suite des excellents résultats auxquels nous étions précédemment parvenus. Nous avons donc fait réagir séparément, mais dans des conditions identiques, la dihydro-7,10-xanthoptérine (II) et la xanthoptérine (V), dissoutes dans NH₄OH concentré, avec KCN, et après quelques jours de contact à la température ambiante nous avons isolé les produits d'addition ainsi formés.

La xanthoptérine fournit trois produits de fluorescence jaune, l'un, XIII, de coloration rouge sang, et deux autres, IX et XI, de coloration rouge orangé; en outre elle donne, en très faible quantité, deux autres ptérines de fluorescence verte, que nous croyons être des dimères et sur lesquelles nous reviendrons dans une prochaine publication.

La dihydroxanthoptérine II, transformée en amino-8-dihydroptéridine III, fournit de son côté deux produits de fluorescence jaune, le premier VII de coloration rouge orangé qui lui est propre, et le deuxième IX, déjà obtenu les mêmes conditions à partir de la xanthoptérine. Les structures des produits VII, IX, XI et XIII ont été déduites de leurs analyses élémentaires, de leurs spectres UV. et de leurs produits de dégradation, obtenus par oxydation ou bien par réduction suivie de réoxydation. On trouvera dans la partie expérimentale la description détaillée de ces ptérines. Le tableau I reproduit l'essentiel de leurs propriétés chimiques et la manière dont elles se transforment les unes dans les autres. On voit, à l'étude de ce tableau, que l'ion CN⁻ s'est bien fixé chaque fois, comme nous l'avions prévu, sur le carbone 9 de la xanthoptérine et de la dihydroxanthoptérine. Les tétrahydroxanthoptérines qui se forment vraisemblablement selon le schéma esquissé ci-dessus, sont réoxydées à l'air pour donner des *para*-dihydroxanthoptérines substituées en position 9; dans un seul cas (XI) nous avons obtenu un dérivé de la xanthoptérine, et encore ce produit XI ne se forme-t-il qu'en très petite quantité. Il est aussi intéressant de noter la facile addition d'eau sur le nitrile qui théoriquement prend tout d'abord naissance et qui doit être très fortement polarisé. Cette facile addition avait déjà été observée dans le cas de l'amino-2-hydroxy-6-cyano-8-dihydro-7,10-ptérine⁴).

Les analyses élémentaires ont été effectuées dans notre laboratoire de microanalyse sous la direction de M. FROHOFER que nous remercions de sa collaboration. Nous remercions aussi le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE de l'aide matérielle mise à notre disposition.

Partie expérimentale

I. *Réaction du cyanure de potassium sur la xanthoptérine.* On dissout 1 g de xanthoptérine et 5 g de KCN dans 500 ml d'NH₄OH concentré et abandonne la solution à la température du laboratoire. Au bout de deux semaines, la chromatographie sur papier révèle la présence, à côté de la xanthoptérine de départ, de cinq autres produits qu'on sépare sur des colonnes de cellulose en poudre (8 cm de diamètre, 40 cm de hauteur) à l'aide des éluants habituels: eau, ammoniacque concentrée, éthanol, et mélanges de ces trois solvants. De nombreuses chromatographies sont nécessaires pour obtenir des produits cristallisés exempts de cendres. A côté des deux dimères

⁶) A. ALBERT & F. REICH, J. chem. Soc. 1961, 127.

⁷) F. KORTE & H. BANNUSCHER, Liebigs Ann. Chem. 622, 126 (1959).

est extrêmement instable et son spectre d'absorption UV. ne peut être enregistré que lorsqu'on opère rapidement en présence de NaBH_4 dans la solution (Fig. 2). Le spectre UV. ainsi obtenu, probablement déjà contaminé, correspond au spectre prévu pour un tel produit. La mesure des Rf n'a pas été possible.

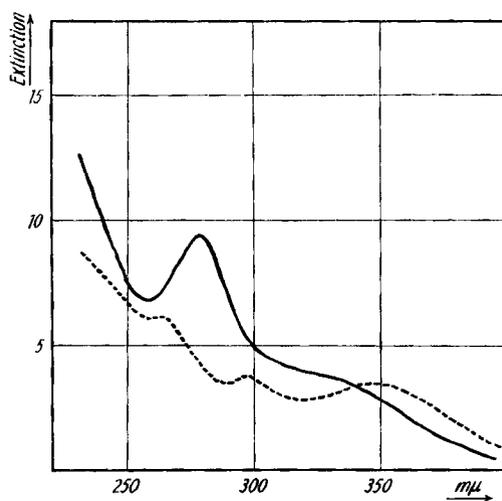


Fig. 2. Spectre UV. de la ptérine IX dihydrogénée (X)
 ----- pH 1 ————— pH 13

Réoxydation à l'air de X. Après filtration du catalyseur, la solution de ptérine hydrogénée X est abandonnée 24 h à l'air. Parmi les produits de réoxydation on isole par chromatographie sur colonne de cellulose en poudre avec les solvants usuels, la ptérine de départ IX, la xanthoptérine (V) et l'amide de l'acide xanthoptérine-carboxylique-9 (XI). Tous ces produits ont été caractérisés par leurs spectres UV. et leur chromatographie sur papier.

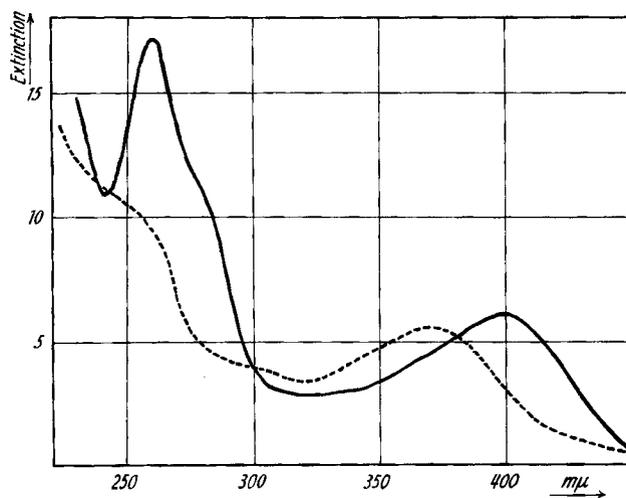
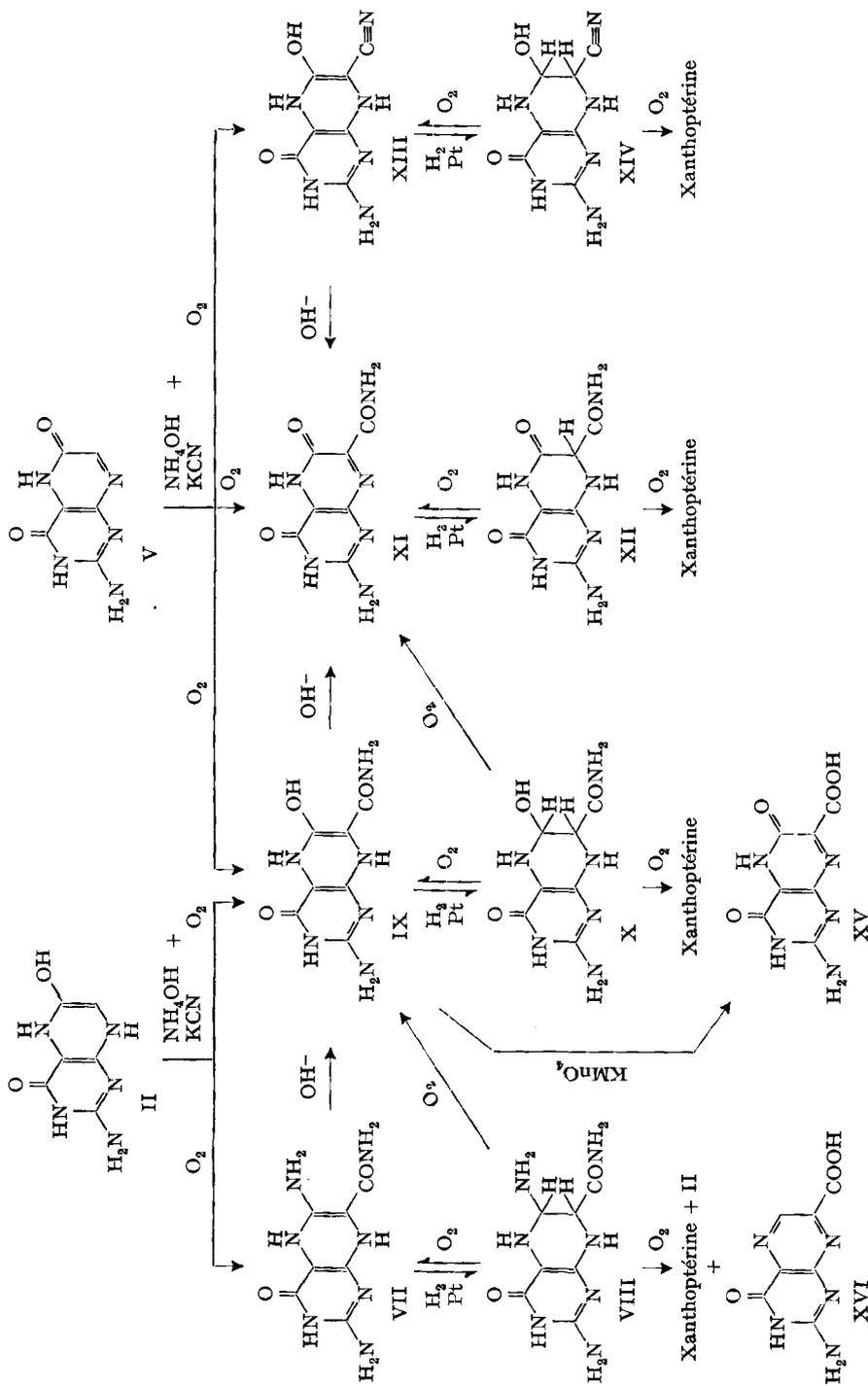


Fig. 3. Spectre UV. de l'amide de l'acide xanthoptérine-carboxylique-9 (XI)
 ----- pH 1 ————— pH 13

Tableau I. Schéma des transformations



Amide de l'acide xanthoptérine-carboxylique-9 (XI). Ce produit prend naissance en très petite quantité à côté de la ptérine IX. Nous avons obtenu trop peu de cette ptérine XI à l'état pur pour en faire une analyse élémentaire, mais ses spectres UV. en milieu basique, neutre et acide (Fig. 3) montrent une trop grande similitude avec ceux de l'acide xanthoptérine-carboxylique-9 (XV) pour qu'il y ait doute au sujet de la constitution de cette substance.

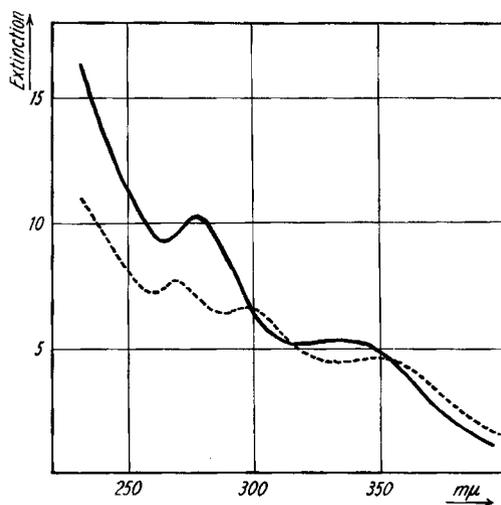


Fig. 4. Spectre UV. de la ptérine XI dihydrogénée (XII)
 - - - - - pH 1 ——— pH 13

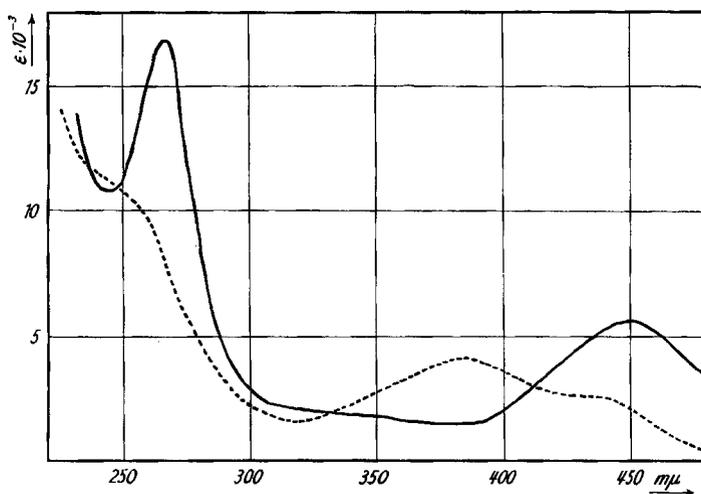


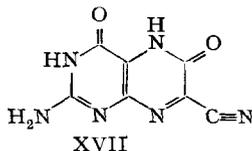
Fig. 5. Spectre UV. de la dihydro-7,10-cyano-9-xanthoptérine (XIII)
 - - - - - pH 1 ——— pH 13

Réduction catalytique de XI. Elle a été effectuée dans des conditions identiques à celles décrites pour la ptérine IX. Le spectre UV. du dérivé dihydrogéné XII ainsi obtenu (Fig. 4) correspond très exactement à celui du dérivé dihydrogéné X obtenu à partir de la ptérine IX. Réoxydé à l'air, X ne fournit que la substance de départ XI à côté d'un peu de xanthoptérine.

Dihydro-7,10-cyano-9-xanthoptérine (XIII). Ce produit rouge, obtenu à l'état cristallisé, donne à l'analyse les valeurs suivantes:

$C_7H_8O_2N_8$ (206,17) Calc. C 40,78 H 2,93 N 40,77% Tr. C 41,09 H 3,75 N 41,30%

Il était difficile de décider si cette ptérine répondait à la formule XIII ou plus simplement à la cyano-9-xanthoptérine (XVII). Nous avons opté pour la structure XIII car les propriétés chimiques et physico-chimiques de ce nitrile se rapprochent beaucoup plus de celles d'un dérivé de la xanthoptérine *para*-dihydrogénée que de celles de la xanthoptérine elle-même; bien entendu notre choix ne se vent ni définitif, ni sans appel.



Le spectre UV. de la ptérine XIII (Fig. 5) présente en milieu alcalin un maximum à $454 m\mu$, alors que l'acide xanthoptérine-carboxylique présente dans les mêmes conditions un maximum vers $395 m\mu$.

Action de NaOH 0,1N sur XIII. La ptérine XIII portée quelques min à l'ébullition dans une solution de soude caustique décimale, subit une transformation quantitative en ptérine XI.

Action de NaBH₄ sur XIII. NaBH₄ est sans action sur la ptérine XIII et ce manque de réactivité parle également en faveur d'une structure *para*-dihydrogénée pour la ptérine XIII.

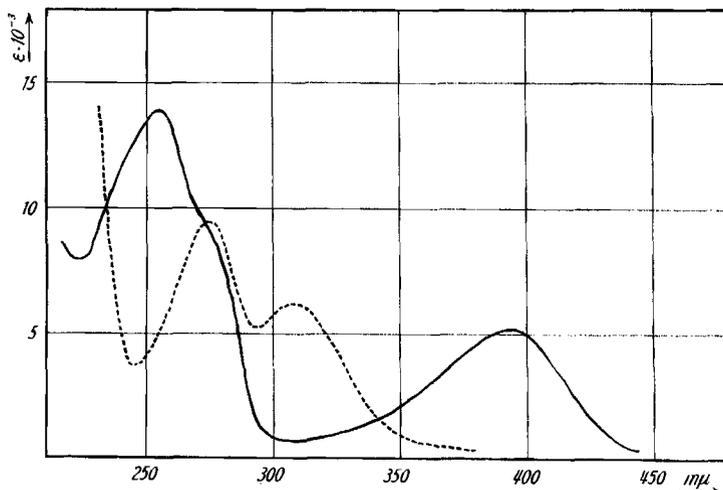


Fig. 6. Spectre UV. de la ptérine XIII dihydrogénée (XIV)
 ----- pH 1 ————— pH 13

Réduction catalytique de XIII en XIV. La réduction, conduite comme précédemment, est terminée au bout de 15 min, après absorption d'une mol. d'H₂ par la ptérine. La ptérine tétrahydrogénée XIV ainsi obtenue présente une intense fluorescence verte qui confère à la solution une teinte également verdâtre. XIV est suffisamment stable pourqu'on puisse en prendre le spectre d'absorption UV. (Fig. 6) et mesurer les Rf (Tableau II). Le spectre UV. en milieu acide correspond exactement à celui de la tétrahydro-7,8,9,10-xanthoptérine¹⁾; par contre le spectre UV. en milieu alcalin présente une allure tout à fait inattendue et ressemble au spectre d'une ptérine normale et non d'une ptérine perhydrogénée. Il est possible que la fonction nitrile soit responsable de ce qui, à première vue, pourrait apparaître comme une anomalie.

Tableau II. *Rf des principaux produits*

Solvant	Rf des produits						
	II, III	V	VII	IX	XI	XIII	XIV
H ₂ O	0,24		0,10	0,65	0,70	0,76	0,59
NH ₄ Cl-H ₂ O (3%)	0,25	0,35	0,09	0,22	0,37	0,45	0,42
NH ₄ OH conc.	0,70		0,34	0,72	0,76	0,88	0,70
propanol/NH ₄ OH 1% (2/1)	0,20	0,13	0,16	0,11	0,16	0,07	0,17
propanol/acétate de NH ₄ 1% (2/1)	0,30		0,20	0,22	0,40	0,31	0,45
butanol/CH ₃ COOH/H ₂ O (20/3/7)	0,21	0,30	0,13	0,08	0,28	0,03	0,27
pyridine/acétate d'éthyle/H ₂ O (4/3/3)	0,60	0,78	0,55	0,45	0,73	0,46	0,58

Réoxydation à l'air de XIV. Cette réoxydation fournit à côté du nitrile de départ XIII, de la xanthoptérine V.

II. *Réaction du cyanure de potassium sur la dihydro-7,10-xanthoptérine (II).* La réaction s'effectue dans les mêmes conditions que pour la xanthoptérine. Nous avons fait réagir 50 mg de ptérine II avec 100 mg de KCN dans 50 ml d'NH₄OH concentré. Des produits de réaction, nous avons pu isoler les deux ptérines VII et IX. La ptérine IX, déjà obtenue par réaction de KCN sur la xanthoptérine, n'apparaît ici qu'en petite quantité et en fin de réaction.

Amide de l'acide diamino-2,8-hydroxy-6-dihydro-7,10-ptéridine-carboxylique-9 (VII). Cette ptérine rougeâtre, obtenue à l'état cristallisée, est le produit principal de la réaction et elle présente toutes les propriétés d'une ptérine *para*-dihydrogénée. Son analyse est la suivante:

C₇H₉O₃N₇ (223,19) Calc. C 38,60 H 4,06 N 44,00% Tr. C 38,19 H 3,54 N 44,93%

Le spectre UV. de la ptérine VII (Fig. 7) correspond à celui d'une ptérine *para*-dihydrogénée et ne se distingue pratiquement pas, en milieu alcalin, de celui de la ptérine IX.

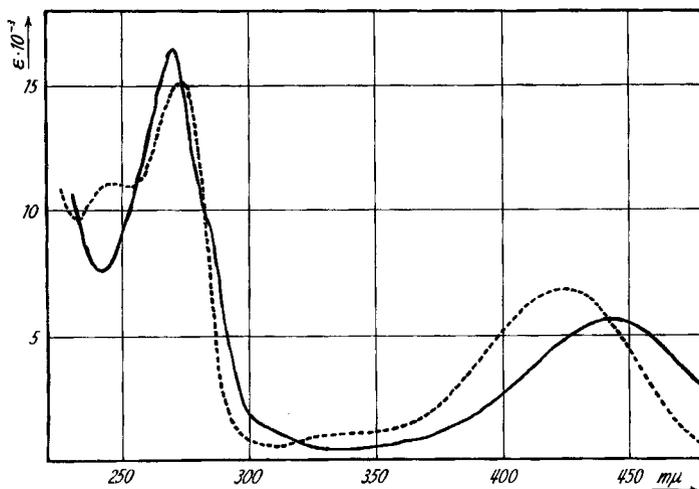


Fig. 7. Spectre UV. de l'amide de l'acide diamino-2,8-hydroxy-6-dihydro-7,10-ptéridine-carboxylique-9 (VII)

----- pH 1 ————— pH 13

Action de NaOH 0,1N sur VII. La ptérine VII, après contact de 48 h avec NaOH 0,1N à la température ordinaire, se transforme intégralement en ptérine IX. Cette transformation correspond à l'élimination hydrolytique de la fonction aminée en position 8, qui est remplacée par un groupement hydroxylé¹).

Action de NaBH₄ sur VII. En solution aqueuse, à pH légèrement alcalin, NaBH₄ est sans action sur la ptérine VII, conformément aux propriétés chimiques d'une ptérine *para*-dihydrogénée.

Réduction catalytique de VII. On hydrogène à 25° 5 mg de ptérine VII dissous dans 5 ml de NaOH 0,05 N, en présence de 10 mg de PtO₂. En 10 min l'hydrogénation est terminée après adsorption d'une mol. d'hydrogène par la ptérine VII. La ptérine tétrahydrogénée VIII ainsi obtenue est incolore et ne présente pas de fluorescence. Son extrême instabilité plaide en faveur de la structure tétrahydrogénée que nous lui avons attribuée. Dès l'ouverture de l'appareil à hydrogénation et même en présence de NaBH₄ la ptérine VIII, au contact de l'air, reprend la fluorescence jaune du produit de départ. Malgré toutes nos précautions et nos essais il nous a été impossible de mesurer ses Rf et son spectre UV.

Réoxydation à l'air de VIII. Les produits de réoxydation, isolés selon les méthodes chromatographiques habituelles, sont les suivants: xanthoptérine, amino-2-dihydroxy-6,8-dihydro-7,10-ptéridine (II) et acide amino-2-hydroxy-6-ptéridine-carbonique-9 (XVI).

RÉSUMÉ

L'ion CN⁻ subit facilement une addition nucléophile sur le carbone 9 de la xanthoptérine et de la dihydro-7,10-xanthoptérine. Le nitrile ainsi formé est très réactif et n'est isolé que comme amide. Après réoxydation à l'air des différents produits d'addition nucléophile on obtient principalement des dérivés de l'acide dihydro-7,10-xanthoptérine-carboxylique-9.

Zurich, Institut de Chimie Organique
de l'Université

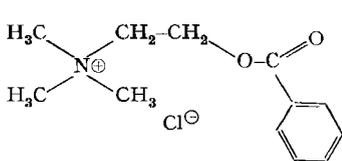
114. Substrat-bedingte Nachbargruppeneffekte als bestimmende Faktoren bei der enzymatischen Hydrolyse

I. Neue Befunde an der Serum-Cholinesterase

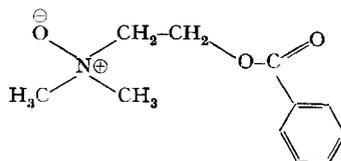
von **Elsbeth Schätzle** und **Max Rottenberg**

(6. III. 62)

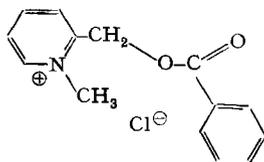
In früheren Arbeiten¹⁾²⁾ waren wir drei Estern (I, II und III) der Benzoesäure begegnet, die sich in ihrer Hydrolyse-Geschwindigkeit bei neutralem und bei alkalischem pH vielseitig und charakteristisch unterscheiden. Es schien deshalb interessant,



I Benzoylcholin-chlorid



II 2-Benzoyloxyäthyl-di-methylaminoxid



III 2-Benzoyloxymethyl-1-methyl-pyridinium-chlorid

¹⁾ E. SCHÄTZLE, M. ROTTENBERG & M. THÜRKAUF, *Helv.* **42**, 1708 (1959).

²⁾ E. SCHÄTZLE, H. URHEIM, M. ROTTENBERG & M. THÜRKAUF, *Experientia* **17**, 350 (1961).