

- [14] C. DJERASSI, H. W. BREWER, H. BUDZIKIEWICZ, O. O. ORAZI & R. A. CORRAL, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 3480 (1962).
- [15] C. DJERASSI, A. A. P. G. ARCHER, T. GEORGE, B. GILBERT & L. D. ANTONACCIO, *Tetrahedron* **16**, 212 (1961).
- [16] M. HESSE, *Indolalkaloide in Tabellen*, Springer-Verlag, Heidelberg 1964.
- [17] S. McLEAN, *Canad. J. Chemistry* **42**, 191 (1964).
- [18] K. S. BROWN & C. DJERASSI, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 2451 (1964).
- [19] G. F. SMITH & M. A. WAHID, *J. chem. Soc.* **1963**, 4002.
- [20] B. W. BYCROFT, D. SCHUMANN, M. B. PATEL & H. SCHMID, *Helv.* **47**, 1147 (1964).
- [21] E. WENKERT, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 98 (1962).
- [22] M. PLAT, J. LEMEN, M.-M. JANOT, J. M. WILSON, H. BUDZIKIEWICZ, L. J. DURHAM, Y. NAKAGAWA & C. DJERASSI, *Tetrahedron Letters* **7**, 271 (1962).
- [23] B. K. MOZA, J. TROJÁNEK, A. K. BOSE, K. G. BAS & P. FUNKE, *Tetrahedron Letters* **37**, 2561 (1964).
- [24] H. H. A. LINDE, noch unveröffentlicht.
- [25] M. PLAT, J. LE MEN, M.-M. JANOT, H. BUDZIKIEWICZ, J. M. WILSON, L. J. DURHAM & C. DJERASSI, *Bull. Soc. chim. France* **1962**, 2237.
- [26] J. HRBEK, J. P. JENNINGS, W. KLYNE & F. ŠANTAVÝ, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* **29**, 2822 (1964).

51. De la chimie des ptérines

11^e communication [1]

Sur une nouvelle synthèse de ptérines 7,8-dihydrogénées et sur l'obtention inattendue de l'hydroxyméthyl-6-ptérine isomériquement pure

par M. Viscontini et G. Nasini¹⁾

(29 I 65)

Le produit de base de notre 10^e communication [1] était l'hydrazino-6-ptérine (I) dont PFLEIDERER a décrit une synthèse élégante [2]. En raison de l'importance de ce produit nous avons cherché à l'obtenir – selon la méthode générale décrite dans notre dernier travail [1] – en traitant la tétrahydroptérine (II) par l'hydrazine dans le diméthylformamide. Au cours de la réaction deux produits principaux prennent naissance, l'un à fluorescence bleu-vert, l'autre à fluorescence jaune, qu'on peut obtenir l'un et l'autre à l'état pur par chromatographie sur colonne de cellulose; mais contrairement à ce que nous espérons, l'hydrazino-6-ptérine (I) ne prend pas naissance dans ces conditions.

Le produit à fluorescence bleu-vert est l'hydrazone de la formyl-6-dihydro-7,8-ptérine (III). Dans cette ptérine un atome de carbone supplémentaire est venu se fixer, pendant la substitution, sur C-6 entre le cycle pyrazine et l'hydrazine. On peut le démontrer très facilement par l'oxydation permanganique, qui conduit à l'acide ptérine-carboxylique-6 (VIII) avec d'excellents rendements. La structure III est confirmée par l'analyse élémentaire et par les spectres UV. (fig. 1) et RMN. (fig. 2), qui seront discutés en détail dans la partie expérimentale du présent travail.

¹⁾ Adresse actuelle: Istituto di chimica generale, Politecnico di Milano (Italia).

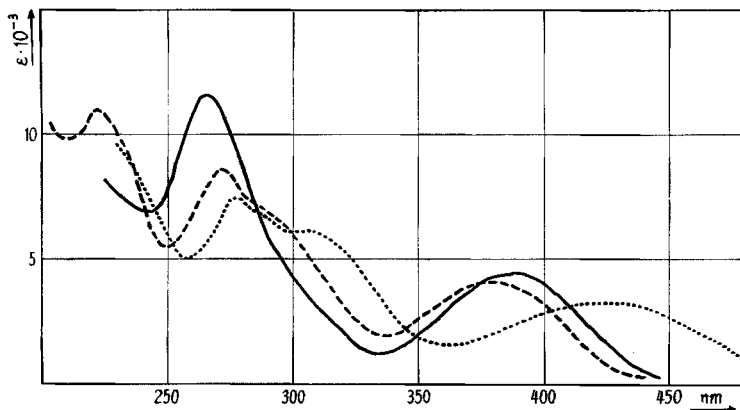
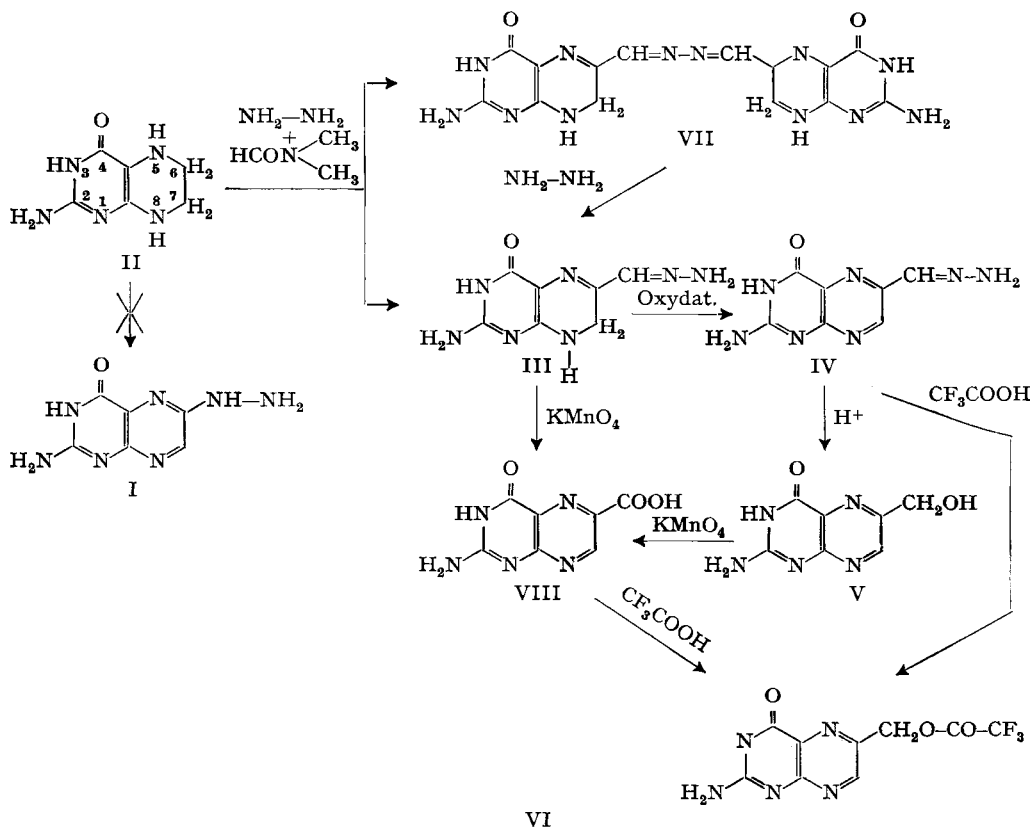


Fig. 1. Spectre UV. de l'hydrazone de la formyl-6-dihydro-7,8-ptérine (III)
 HCl 0,1N; - - - - - pH 7; ——— NaOH 0,1N

La ptérine III se laisse isoler assez facilement ; une fois de plus nous pouvons confirmer la relative stabilité des ptérines dihydrogénées en 7,8 lorsqu'une double liaison conjuguée est présente dans la chaîne latérale fixée sur C-6 [3].

En solution aqueuse et à la température du laboratoire, l'oxydation à l'air de la ptérine III demande trois semaines environ. On peut alors isoler de la solution la ptérine aromatique correspondante IV, dont la stabilité n'est pas plus grande que

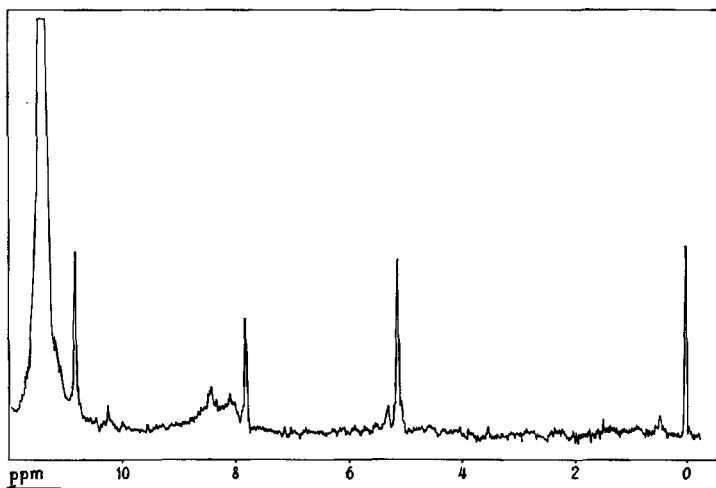


Fig. 2. Spectre RMN. de l'hydrazone de la formyl-6-dihydro-7,8-ptérine (III) dans CH_3COOH (pour les conditions de mesure, se reporter au texte de la publication)

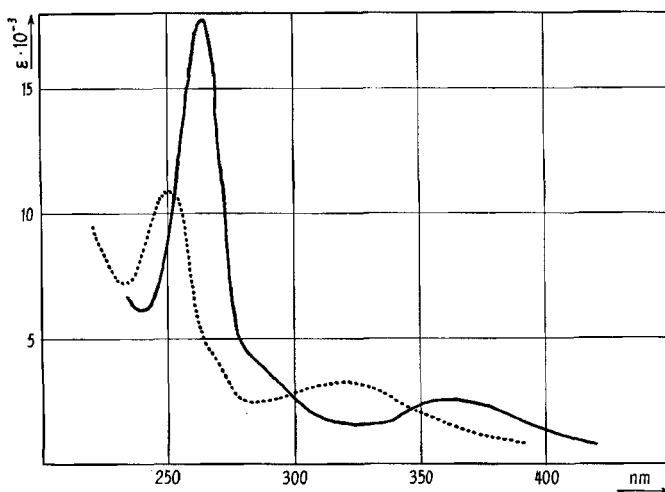


Fig. 3. Spectre UV. de l'hydrazone de la formyl-6-ptérine (IV)
 HCl 0,1N; — NaOH 0,1N

celle de la ptérine 7,8-dihydrogénée III. Bien entendu, la ptérine IV peut être aussi obtenue par oxydation permanganique ménagée de la ptérine III. Nous avons même réussi à isoler une ptérine intermédiaire entre les deux substances III et IV, mais sa grande instabilité (elle se transforme spontanément en ptérine IV) ne nous a pas permis d'en faire une étude détaillée. La ptérine IV a été caractérisée par son analyse élémentaire, son spectre UV. (fig. 3) et son spectre RMN. dans l'acide sulfurique (fig. 4).

C'est en essayant d'effectuer la mesure du spectre RMN. dans CF_3COOH que nous avons observé une réaction inattendue. L'acide trifluoroacétique réagit instantanément sur l'hydrazone IV qu'il décompose, tandis qu'on peut observer à l'œil nu un dégagement d'azote. Après évaporation de CF_3COOH et recristallisation de l'eau ammoniacale on obtient des cristaux d'hydroxyméthyl-6-ptérine (V) pure. Aucune

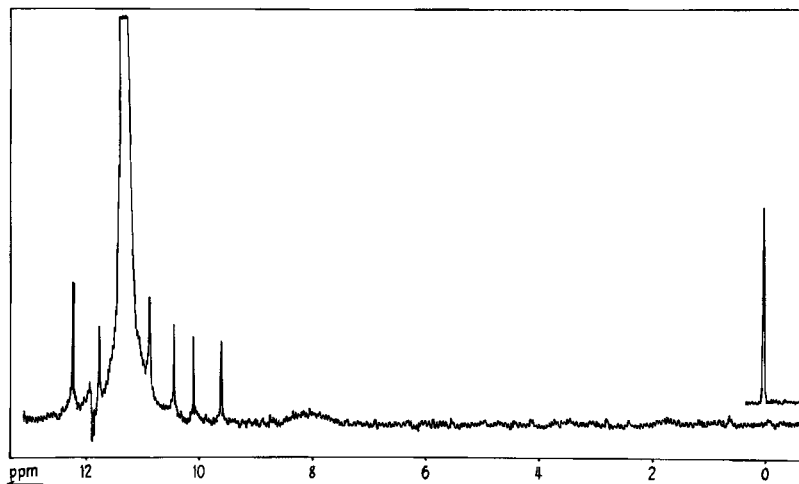


Fig. 4. Spectre RMN. de l'hydrazone de la formyl-6-ptérine (IV), mesuré dans H_2SO_4 concentré

trace d'hydroxyméthyl-7-ptérine n'accompagne la substance, ainsi qu'on le vérifie aisément par oxydation permanganique. La ptérine V a été caractérisée par son analyse élémentaire, ses spectres UV. et IR. et par comparaison chromatographique avec l'hydroxyméthyl-6-ptérine authentique obtenue par dégradation réductive d'acide folique pur [4].

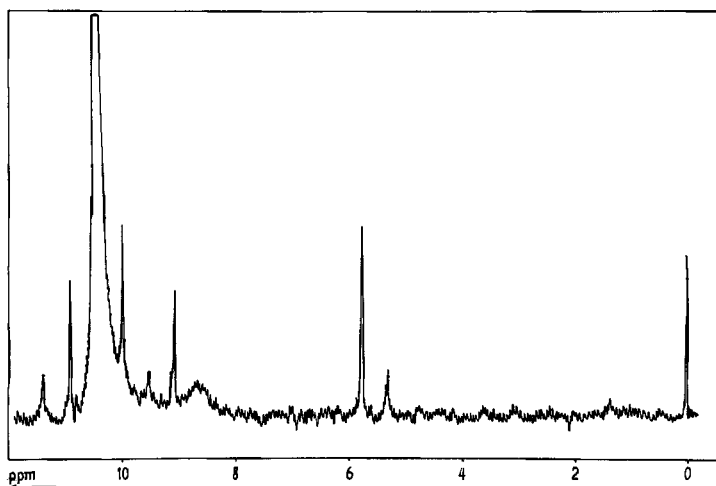
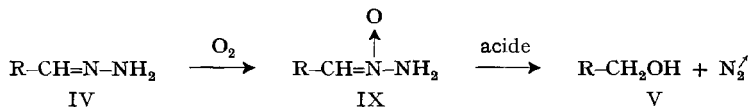


Fig. 5. Spectre RMN. du produit de transposition de l'hydrazone III sous l'action de CF_3COOH

La formation d'hydroxyméthyl-6-ptérine (V) à partir de l'hydrazone IV ne peut se concevoir que par suite d'une oxydo-réduction à laquelle participe l'oxygène atmosphérique. Peut-être l'oxygène se fixe-t-il tout d'abord sous forme de N-oxyde IX sur un des azotes de l'hydrazone IV, la transposition IX \rightarrow V s'effectuant ensuite



sous l'effet d'un acide? En effet la ptérine V s'obtient aussi bien en traitant l'hydrazone IV à l'ébullition à l'air dans HCl 0,1N ou dans H₂SO₄ 0,1N que sous l'action de CF₃COOH pur à la température ordinaire. Dans l'acide trifluoracétique pur, la pté-

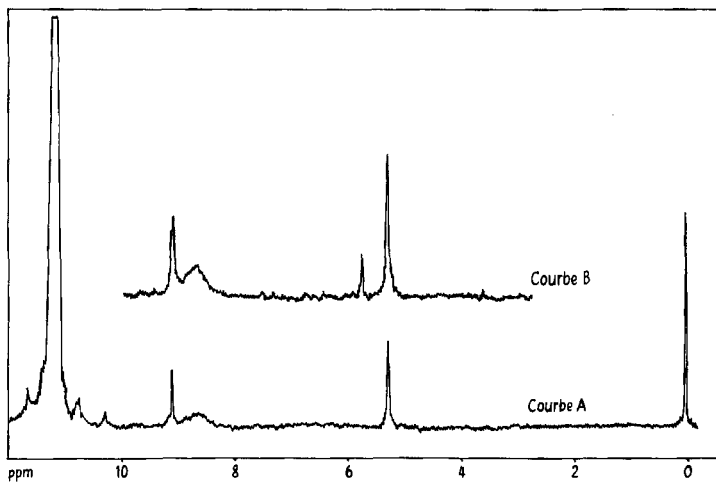


Fig. 6. Spectre RMN. de l'hydroxyméthyl-6-ptérine (V) dans CF₃COOH
 Courbe A: immédiatement après la dissolution de la ptérine V
 Courbe B: 30 min après la dissolution

rine V, formée par transposition au bout de cinq heures, est acylée et le spectre RMN. obtenu (fig. 5) est celui du trifluoracétate VI de la ptérine V, comme l'indique fort bien la comparaison avec le spectre de la même ptérine pure pris immédiatement (fig. 6, spectre A) et 30 minutes après la dissolution (fig. 6, spectre B) dans CF₃COOH.

La deuxième substance, de fluorescence jaune, isolée après réaction de l'hydrazine sur la tétrahydroptérine II dans le diméthylformamide, apparaît en quantité inversement proportionnelle à la concentration d'hydrazine mise en jeu. Nous pensons qu'il s'agit de l'hydrazone double de la formyl-6-dihydro-7,8-ptérine (VII), bien moins stable que l'hydrazone simple III. La substance VII s'oxyde rapidement à l'air et se laisse hydrazinolyser en hydrazone simple III. Son spectre UV. (fig. 7) possède les fortes bandes d'absorption des ptérines dimères, dans les grandes longueurs d'onde, et le spectre RMN. présente les signaux caractéristiques des groupes -CH₂- et -CH=. L'instabilité de la substance ne nous a malheureusement pas permis d'isoler un produit donnant des analyses élémentaires correctes pour la structure VII.

Pour terminer, nous voudrions commenter très rapidement le mode de formation de l'hydrazone III. A dire vrai, nous ne distinguons pas encore clairement comment ce produit peut prendre naissance. Le diméthylformamide (ou une impureté l'accompagnant même pendant sa purification par distillation) est un réactif nécessaire de la synthèse et ne se laisse remplacer ni par l'aldéhyde ni par l'acide formiques. De même

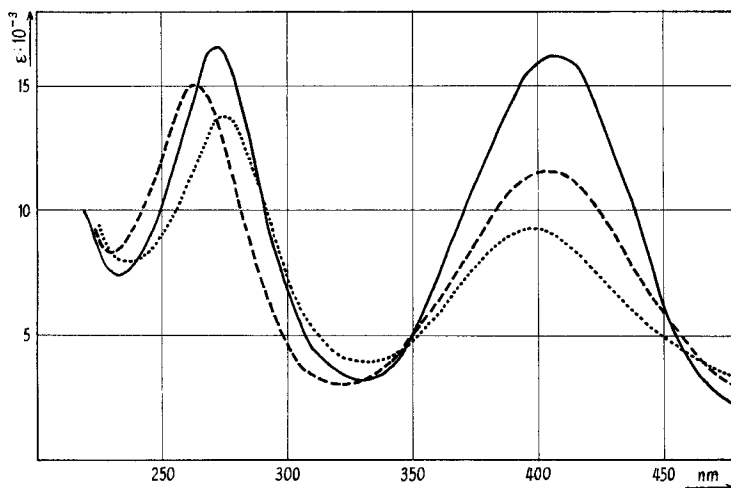
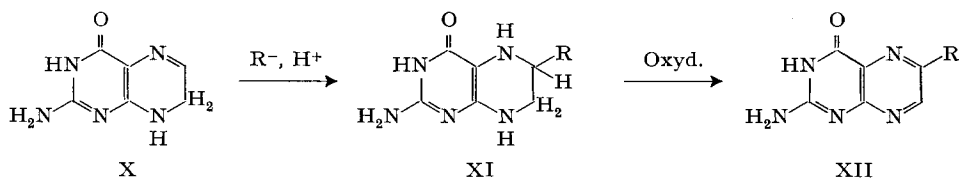


Fig. 7. Spectre UV. de la ptérine dimère VII

(En raison de l'instabilité du produit et de la difficulté de l'obtenir à l'état pur, les extinctions moléculaires doivent être entachées d'une erreur de $\pm 10\%$)

..... HCl 0,1N; - - - - - pH 7; ——— NaOH 0,1N

l'emploi de formylhydrazine entrave toute formation de l'hydrazone III. Formellement parlant, le mécanisme de la réaction est fondamentalement différent de celui qui conduit à la synthèse de tétrahydrop térines XI puis de ptérines substituées en C-6 (XII) par réaction des ions R^- et H^+ sur la dihydroptérine X. Dans ce cas, seul le cycle



pyrazine augmente son indice d'oxydation, tandis que pour l'obtention de l'hydrazone le cycle pyrazine et la chaîne latérale changent en même temps leur niveau d'oxydation. Le carbone du diméthylformamide, dont l'indice formel d'oxydation est 3, devient après réaction le carbone d'une fonction aldéhyde potentielle d'indice 2. L'ensemble de la réaction constitue ici une addition accompagnée d'une oxydo-réduction. Dans l'état actuel de nos travaux il nous est encore impossible de donner l'explication de ce phénomène, qu'on retrouvera encore une fois dans la transposition de l'hydrazone IV en hydroxyméthyl-6-ptérine (V).

M. le D^r L. MERLINI de l'Ecole polytechnique de Milan a effectué, lors de son séjour à Zurich, les premiers travaux d'approche des recherches décrites dans ce mémoire. Nous tenons à le remercier tout particulièrement de son efficace collaboration. Nous remercions aussi le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE et la JUBILÄUMS-STIFTUNG J. R. GEIGY, Bâle, de l'aide matérielle mise à notre disposition. Les microanalyses élémentaires ont été effectuées dans notre service de Microanalyse dirigé par M. H. FROHOFER.

Partie expérimentale

A l'exception du spectre de l'hydrazone IV les spectres RMN. ont été mesurés à l'aide d'un spectromètre VARIAN A 60 dans CF₃COOH pur, avec du tétraméthylsilane comme substance de référence interne ($\delta = 0,00$ ppm). Le spectre de l'hydrazone IV a été mesuré dans H₂SO₄ concentré, avec le tétraméthylsilane dissous dans CHCl₃ comme substance de référence externe ($\delta = 0,00$ ppm).

Hydrazone de la formyl-6-dihydro-7,8-ptérine (III). 300 mg de sulfate de tétrahydroptérine (II) sont suspendus dans 150 ml de diméthylformamide auxquels on ajoute 1,5 ml d'hydrate d'hydrazine. Le tout est abandonné trois jours à l'air et à la température ambiante. Le diméthylformamide est ensuite évaporé sous vide, et le résidu, repris dans un minimum d'eau additionnée d'hydrazine ou d'ammoniaque et de CH₂OH-CH₂SH agissant comme antioxydant. La solution obtenue est chromatographiée sur colonne de papier; éluant: eau légèrement ammoniacale (pH 9-10) renfermant 0,05% de thiol HOCH₂-CH₂SH. On recueille séparément trois bandes fluorescentes. La première, bleue, renferme la ptérine; la seconde, bleu clair, l'hydrazone simple III et la dernière, jaune, l'hydrazone double VII.

La solution renfermant l'hydrazone III est évaporée sous vide, et le résidu, chromatographié une nouvelle fois comme précédemment. Après évaporation sous vide de la nouvelles solution ainsi obtenue, le résidu peut être purifié de deux manières:

a) On le porte en suspension dans de l'eau tiède additionnée de thiol et on ajoute goutte à goutte une solution d'ammoniaque à 5% jusqu'à dissolution. Après filtration, l'ammoniaque est évaporée sous vide et la ptérine III précipite sous forme de poudre microcristalline jaune, qu'on recueille, lave à l'eau, l'éthanol et l'éther. La substance se décompose sans fondre audessus de 250°.

C₇H₉ON₇, 1/2 H₂O (216,2) Calc. C 38,88 H 4,66 N 45,35% Tr. C 39,87 H 4,97 N 44,26%

b) On dissout la substance dans le minimum de NaOH 0,1N à la température ordinaire, filtre la solution et reprécipite la ptérine par neutralisation avec CH₂OH-CH₂SH.

Analyse: Tr. C 40,86 H 6,08 N 45,74%

Le spectre UV. de l'hydrazone de la formyl-6-dihydro-7,8-ptérine (III) (fig. 1) montre un fort déplacement bathochrome pour les pH acides, contrairement au spectre du dihydro-7,8-ptérine-6-carboxamide que nous avons obtenu synthétiquement dans notre laboratoire [3] [5]. Le spectre RMN. (fig. 2) présente le signal très net de -CH₂- à 5,13 ppm; le signal correspondant du carboxamide précédent se situe à 4,80 ppm et celui de la dihydroxanthoptérine à 5,2 ppm (dans H₂SO₄) [6]. Le signal du proton vinylique de la chaîne latérale apparaît à 7,82 ppm tandis que les protons fixés sur les azotes donnent deux larges bandes culminant à 8,1 et 8,4 ppm. Le petit signal à 5,28 ppm correspond aux groupes -CH₂- des traces du dimère VII qui accompagne toujours l'hydrazone III et dont il est fort difficile de la débarrasser.

Oxydation de la ptérine III par KMnO₄. A une solution de 3 mg de ptérine III dans le minimum de NaOH 0,1N on ajoute goutte à goutte une solution diluée de KMnO₄, tout en suivant l'oxydation à l'aide de la chromatographie sur papier (solvant: isopropanol-NH₃ à 1%, 2:1). Lorsque la ptérine III a disparu, on détruit l'excès de KMnO₄ par l'hydrogénosulfite, filtre MnO₂, neutralise avec CH₃COOH et évapore sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonnes de cellulose en éluant l'acide VIII une première fois à l'isopropanol-NH₃ à 1% (3:1), une deuxième fois à l'acétone-CH₃COOH à 1% (3:1) et ensuite à l'isopropanol-NH₃ à 1% (3:1). Ces trois chromatographies sont rendues nécessaires en raison des nombreuses impuretés qui accompagnent l'acide ptérine carboxylique-6. Ainsi purifié il donne le spectre UV. caractéristique et les mêmes Rf que l'acide synthétique, dans tous les solvants usuels de notre laboratoire.

Hydrazone de la formyl-6-ptérine (IV). On abandonne pendant trois semaines à l'air et à la température ambiante une solution de 200 mg de ptérine III dans 5 l d'eau. La solution est en-

suite concentrée sous vide, et le résidu, chromatographié sur une colonne de cellulose (solvant: isopropanol-NH₃ à 1%, 3:1). Une longue bande à fluorescence bleu-vert se développe, qu'on recueille et qu'on concentre sous vide. La substance jaune ainsi obtenue est dissoute dans le minimum d'ammoniaque à 1%, filtrée puis concentrée sous vide. Dès que NH₃ est éliminé, la ptérine IV précipite sous forme d'une poudre microcristalline jaune, sans F. caractéristique et déjà à l'état pur.

C₇H₇ON₇ (205,2) Calc. C 40,97 H 3,44 N 47,79% Tr. C 41,78 H 3,78 N 44,82%

La même ptérine IV s'obtient plus rapidement et plus facilement encore par oxydation ménagée de la ptérine III par KMnO₄ en solution légèrement ammoniacale. La ptérine IV est malheureusement instable, et on doit travailler rapidement et à froid si on veut l'obtenir suffisamment pure. Son spectre UV. (fig. 3) est assez semblable à celui de l'acide ptérine-carboxylique VIII et n'appelle aucun commentaire particulier. Le spectre RMN. ne peut être mesuré que dans l'acide sulfurique concentré (fig. 4). Le proton du chloroforme apparaît dans ce spectre à 7,42 ppm un peu avant la large bande à 8 ppm correspondant aux protons fixés sur les atomes d'azote. Les deux protons vinyliques de la molécule sont localisés à 9,62 et 10,10 ppm sans que nous puissions justifier de manière précise leur origine. Peut-être le signal à 10,10 ppm correspond-il au proton vinylique en C-7 du cycle aromatique ?

Hydroxyméthyl-6-ptérine (V). Il est impossible de prendre le spectre de la ptérine IV dans CF₃COOH. Dès que la solution est terminée on voit apparaître des bulles gazeuses qui se dégagent lentement. Au bout de six h ce dégagement est terminé; dans le spectre RMN, qu'on peut alors mesurer (v. fig. 5) on distingue facilement deux signaux formés par des groupes -CH₂- à 5,39 et 5,75 ppm et les signaux classiques des protons fixés sur l'azote à 8,7 ppm et du proton vinylique aromatique de C-7 à 9,10 ppm [2]. La ou les nouvelles ptérines formées sont donc aromatiques, et pour connaître leur constitution nous avons cherché à les isoler. A cet effet on prépare une solution de 30 mg d'hydrazone III dans 3 ml d'acide trifluoracétique. Après six h on évapore la solution sous vide et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de papier (solvant: isopropanol-NH₃ à 1%, 3:1). Une seule substance, à fluorescence bleue, apparaît sur la colonne. On peut aussi la purifier par dissolution dans l'ammoniaque diluée, filtration et concentration sous vide. La substance obtenue, microcristalline, sans F. caractéristique, est identifiée à l'hydroxyméthyl-6-ptérine (V) par comparaison avec le produit synthétique [4]. Aucune trace d'hydroxyméthyl-7-ptérine ne l'accompagne.

C₇H₇O₂N₆·H₂O (211,18) Calc. C 39,81 H 4,30 N 33,17% Tr. C 40,15 H 4,94 N 33,12%

Dans le spectre RMN. de la ptérine V mesuré immédiatement après dissolution dans CF₃COOH (v. fig. 6, courbe A) on distingue le signal de -CH₂- de la chaîne latérale à 5,39 ppm, celui du proton vinylique aromatique en C-7 à 9,14 ppm ainsi que le large signal à 8,7 ppm des protons fixés sur les atomes d'azote. Mais très rapidement CF₃COOH estérifie l'alcool primaire de la chaîne latérale et après 30 min déjà on voit apparaître dans le spectre un nouveau signal de -CH₂- à 5,75 ppm et du proton vinylique aromatique à 9,10 ppm (fig. 6, courbe B). Ces signaux correspondent à l'ester fluoracétique VI de la ptérine V, dont le spectre à peu près pur est reproduit à la figure 5.

Hydrazone double de la formyl-6-dihydro-7,8-ptérine (VII). La solution d'éluion à fluorescence jaune (voir plus haut) renfermant l'hydrazone double VII est évaporée sous vide, et le résidu, chromatographié une nouvelle fois avec une solution ammoniacale à 10% renfermant 0,05% de CH₂OH-CH₂SH, comme éluant. La bande à fluorescence jaune intense est recueillie, concentrée sous vide, et l'hydrazone VII précipite sous forme de poudre microcristalline jaune orange, instable, sans F. caractéristique. Nous n'avons pas réussi à obtenir un produit chromatographiquement pur dont l'analyse élémentaire fût correcte. Le spectre UV. du produit le plus pur que nous ayons obtenu est reproduit à la fig. 7. A la différence du spectre UV. de l'hydrazone III nous n'observons pas ici de déplacement bathochrome dans les solutions de pH acides. Nous estimons que les hautes extinctions des maximums situés dans les grandes longueurs d'onde sont dues à la forme dimère du produit [7]. Le spectre RMN. dans CF₃COOH, assez diffus, montre néanmoins le signal caractéristique d'un groupe -CH₂- à 5,24 ppm et d'un proton vinylique à 8,32 ppm.

Passage de la ptérine VII à la ptérine III. On chauffe à 60° une solution de 3 mg de ptérine VII dans 1 ml d'hydrate d'hydrazine. Au bout de quelques min la fluorescence jaune de la solution disparaît pour laisser place à une fluorescence bleu-vert. Par chromatographie sur papier on reconnaît dans la nouvelle ptérine formée, la ptérine III.

Rf des ptérines synthétisées

Ptérines	Solvants ^{a)}					
	1	2	3	4	5	6
III	0,11	0,12	0,12	0,18		0,27
IV	0,65	0,28	0,27		0,39	0,38
VII	0,04	0,04	0,05		0,11	0,13

^{a)} N° 1: H₂O; N° 2: citrate de sodium à 3%; N° 3: chlorure d'ammonium à 3%; N° 4: isopropanol-NH₃ à 1%, 2:1; N° 5: isopropanol-H₂O, 2:1; N° 6: isopropanol-acétate d'ammonium à 2%, 1:1.

RÉSUMÉ

Par action de l'hydrate d'hydrazine et du diméthylformamide sur la tétrahydroptérine (II) on obtient l'hydrazone de la formyl-6-dihydro-7,8-ptérine (III), qu'on oxyde ensuite facilement en hydrazone de la formyl-6-ptérine (IV). Un traitement acide transforme par oxydo-réduction cette hydrazone en hydroxyméthyl-6-ptérine (V) isomériquement pure.

Zurich, Institut de chimie organique de l'Université

BIBLIOGRAPHIE

- [1] 10^e Communication: M. VISCONTINI, L. MERLINI, G. NASINI, W. VON PHILIPSBORN & M. PIRAUX, *Helv.* **47**, 2195 (1964).
- [2] W. PFLEIDERER, E. LIEDEK & M. RUKWIED, *Chem. Ber.* **95**, 755 (1962).
- [3] M. VISCONTINI, L. MERLINI & W. VON PHILIPSBORN, *Helv.* **46**, 1181 (1963).
- [4] C. W. WALLER *et al.*, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 4630 (1960).
- [5] H. S. FORREST, C. VAN BAALEN, M. VISCONTINI & M. PIRAUX, *Helv.* **43**, 782 (1960).
- [6] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* **47**, 2087 (1964).
- [7] M. VISCONTINI & M. PIRAUX, *Helv.* **46**, 1537 (1963).

52. Struktur und Synthese von Evolidin¹⁾

von R. O. Studer und W. Lergier

(5. II. 65)

1952 isolierten HUGHES, NEILL & RITCHIE [1] aus den Blättern von *Evodia xanthoxyloides* eine kristalline Substanz, die sie Evolidin benannten. Die saure Hydrolyse führte zu einem Aminosäuregemisch folgender Zusammensetzung: 1 Valin, 2 Leucin, 1 Prolin, 1 Phenylalanin, 1 Serin und 1 Asparagin, was auf ein Heptapeptid stimmte. Im intakten Peptid konnten keine Endgruppen bestimmt werden, was, zusammen mit weiteren Eigenschaften der Verbindung, zur Annahme einer cyclischen Struktur führte. RÖNTGEN-Untersuchungen von CURTIS [2] ergaben ein Molekulargewicht von 769 ± 6 . Dies steht mit dem für ein cyclisches Heptapeptid dieser Aminosäure-Zusammensetzung berechneten Molekulargewicht von 771 gut im Einklang.

¹⁾ Die Abkürzungen folgen den Vorschlägen des V. Europ. Peptidsymposiums, Pergamon Press, Oxford 1963. Z- = Benzylloxycarbonyl, -OBu^t = *t*-Butylester, PTH = Phenylthiohydantoin, DNP = Dinitrophenyl.