

## 154. De la chimie des ptérines

20<sup>e</sup> communication [1]

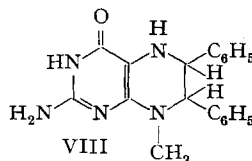
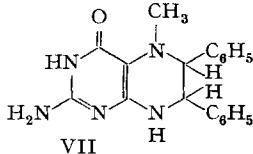
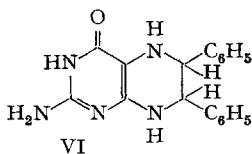
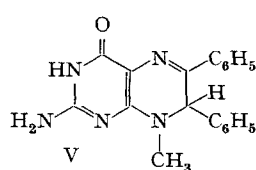
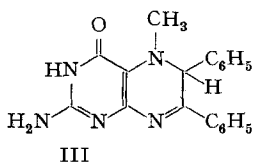
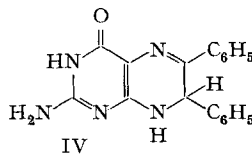
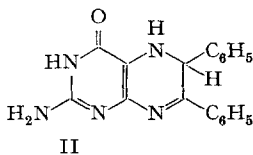
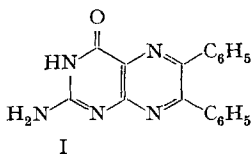
**Obtention et comportement chimique  
de diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérines substituées ou non**

par M. Viscontini et T. Okada

(27 V 67)

Dans la 17<sup>e</sup> communication [2] de cette série de travaux, nous avons proposé une théorie de l'hydroxylation enzymatique, basée sur ce que l'on sait du comportement chimique des diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérines et sur le fait que l'oxygène moléculaire est activé par ces substances. Dans le présent mémoire nous décrivons d'une manière détaillée l'obtention, la caractérisation et le comportement chimique des trois diphényl-tétrahydroptérines qui furent à la base de notre expérimentation.

Jusqu'ici une diphénylptérine et 4 diphényl-dihydroptérines ont été décrites: la diphényl-6,7-ptérine (I) [3], la diphényl-6,7-dihydro-5,6-ptérine (II) [4], la méthyl-5-diphényl-6,7-dihydro-5,6-ptérine (III) [4], la diphényl-6,7-dihydro-7,8-ptérine (IV) [4], la méthyl-8-diphényl-6,7-dihydro-7,8-ptérine (V) [5]. Lorsque nous essayâmes d'hydrogéner catalytiquement ces cinq substances dans CF<sub>3</sub>COOH selon la méthode qui nous avait donné jusqu'ici d'excellents résultats [6], afin d'obtenir les tétrahydroptérines VI, VII, VIII correspondantes, nous constatâmes que l'hydrogène était bien absorbé, mais malgré tous nos efforts il fut impossible d'isoler des milieux de réaction des substances bien définies. A titre d'exemple, nous décrivons dans la partie expérimentale notre essai d'obtention de la tétrahydroptérine VI par réduction catalytique de la diphénylptérine I.



Lors de nos études sur les ptérides naturelles partiellement hydrogénées telles la sépiapterine, les drosoptérides ou la xanthoptéride, nous avons constaté que  $\text{NaBH}_4$  était un excellent agent de réduction de ces substances [7]. C'est ce qui nous a poussés à utiliser ce réactif pour la réduction des dihydroptérides II, III, IV et V. Effectivement on obtient facilement VI à partir de II ou IV, VII à partir de III, et VIII à partir de V. Ces trois tétrahydroptérides ont été caractérisées par leurs analyses, leurs spectres UV. et leurs spectres de RMN.

Ainsi qu'il fallait s'y attendre, les tétrahydroptérides VI et VIII sont instables en solution au contact d'oxygène; comme la plupart des tétrahydroptérides étudiées dans notre laboratoire, elles sont très rapidement réoxydées en dihydro-7,8-ptérides. Par spectrophotométrie on peut suivre les réactions: VI  $\rightarrow$  IV et VIII  $\rightarrow$  V, et constater qu'il n'y a pas formation de produit intermédiaire [8]. Le comportement de la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptéride (VII) est, par contre et comme nous l'avions supposé [9], fort différent. A pH 6,8, son oxydation est très lente; il faut 8 jours environ pour obtenir sa transformation en un nouveau produit dont le  $\lambda_{\text{max}}$  dans l'UV. a subi un déplacement hypsochrome de 288 à 259 nm (Fig. 1). La vitesse

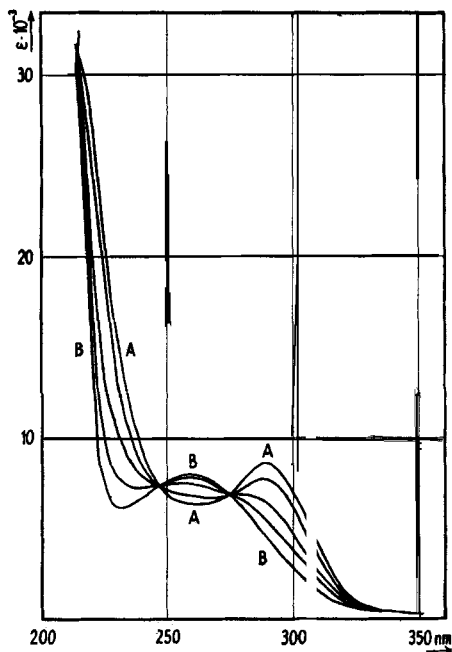
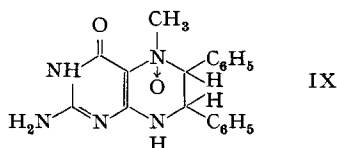


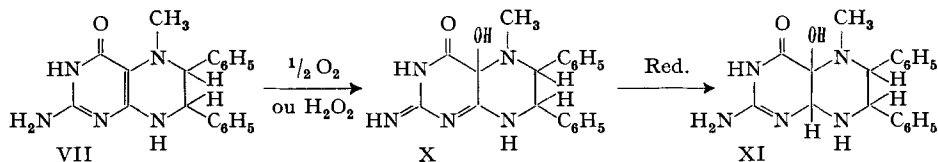
Fig. 1. Cinétique de l'oxydation (spectre UV.) de la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptéride (VII) (courbe A) en N(2')-déshydroxy-4a-méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-ptéride (X) (courbe B)

Solvant: méthanol/solution-tampon aux phosphates de potassium 0,1M, pH 6,8 (1:1). Temps de réaction: 190 heures.

d'oxydation est fortement augmentée par  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , EDTA et les ions  $\text{OH}^-$ . C'est ainsi qu'à pH 11,6 le produit d'oxydation, rapidement formé, précipite sous forme d'une poudre blanche dont l'analyse élémentaire, le spectre de masse et le spectre de RMN. montrent qu'il s'agit d'une substance identique à un dérivé de la ptéride VII résultant de la fixation d'un atome d'oxygène et que nous avons déjà décrit [2], en proposant une structure N-oxyde IX pour cette substance qui se forme également par simple traitement de la tétrahydroptéride VII à l'eau oxygénée. En réalité il ne peut s'agir d'un N-oxyde, car le produit fixe 1  $\text{H}_2$  par hydrogénation catalytique ou par traite-



ment au  $\text{NaBH}_4$ , sans perte d'oxygène. Une étude plus poussée a montré que le produit d'oxydation de VII ne peut être que la N(2')-déhydro-hydroxy-4-a-méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydroptérine X, facilement réduite en hydroxy-4-a-méthyl-5-diphényl-6,7-hexahydroptérine (XI). Les spectres de masse, UV. et de RMN. confirment l'exacti-



tude de ces structures, qui nous ont été d'importance capitale pour le développement d'une théorie de l'hydroxylation enzymatique. Dans le tableau ci-dessous nous reportons, en ppm, les principaux signaux et les intégrations correspondantes des spectres de RMN. des ptérines VII, X et XI mesurés dans  $\text{CF}_3\text{COOH}$  avec le tétraméthylsilane comme référence interne.

*Spectres de RMN. (signaux en ppm)*

Substances	N(5)- $\text{CH}_3$	C(6)-H	C(7)-H	C(8a)-H	Protons aromatiques
VII	3,80 3 prot. singulet	4,95	5,62 2 pr. doublets, $J = 4 \text{ Hz}$		6,8-7,5 10 pr. multiplet
X	3,04 3 pr. singulet	5,66	5,84 2 pr. doublets, $J = 4 \text{ Hz}$		6,6-7,45 10 pr. multiplet
XI	2,70 3 pr. singulet	5,35	5,48 2 pr. doublets, $J = 3 \text{ Hz}$	6,15 1 pr. singulet	6,65-7,6 10 pr. multiplet

Nous tenons à remercier M. le Prof. Dr. W. VON PHILIPSBORN et M. le PD Dr. M. HESSE, de notre Institut, à qui nous devons les spectres de RMN. et de masse, ainsi que M. H. FROHOFER, chef du laboratoire de microanalyse, pour les analyses élémentaires. Ces travaux ont été financés par le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, la GEIGY-JUBILÄUMS-STIFTUNG, Bâle, et l'EIDGENÖSSISCHE STIFTUNG ZUR FÖRDERUNG SCHWEIZERISCHER VOLKSWIRTSCHAFT DURCH WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG, que nous remercions également de l'aide mise à notre disposition.

### Partie expérimentale

Les spectres de RMN. ont été mesurés à température ordinaire avec des appareils VARIAN A-60 (MHz) et HR-100 (MHz), avec le tétraméthylsilane comme étalon interne ( $\delta_{\text{TMS}} = 0 \text{ ppm}$ ). Les spectres UV. ont été obtenus avec un spectrophotomètre automatique BECKMAN DK 2. Les spectres de masse ont été mesurés avec un spectrographe ATLAS CEC 21-110b (70 eV, injection directe).

*Diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérine (VI)*. Dans un ballon tricol avec ampoule à robinet et agitateur on ajoute lentement, sous courant d'azote, à une suspension de 200 mg (0,66 mmole) de diphényl-6,7-dihydro-5,6-ptérine (II) dans 160 ml de NaOH 0,1 N, une solution de 2,5 g (66 mmoles)

de  $\text{NaBH}_4$  dans 20 ml d'eau. La ptérine II se dissout peu à peu tandis que la coloration rouge du milieu réactionnel passe au jaune (10 à 15 h). On neutralise avec  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1 N et recueille par centrifugation le précipité formé. Le précipité est lavé à l'eau, à l'alcool, à l'éther, puis séché sous vide (0,1 Torr) à la température ambiante. On obtient 50 mg (25%) de tétrahydroptérine VI pratiquement incolore. Son spectre UV. (fig. 2) présente l'aspect classique des spectres UV. de tétrahydroptérines synthétiques [6]. – Le spectre de RMN. (fig. 3) est également semblable aux spectres

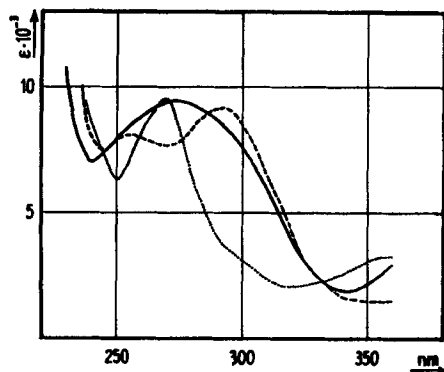


Fig. 2. Spectre d'absorption UV. de la diphenyl-6,7-tetrahydro-5,6,7,8-ptérine (VI), mesuré sous atmosphère d'azote

..... méthanol/HCl 1 N (9:1), pH 1;  
 ----- méthanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (9:1), pH 6,5;  
 ————— méthanol/NaOH 0,1 N (9:1), pH 12

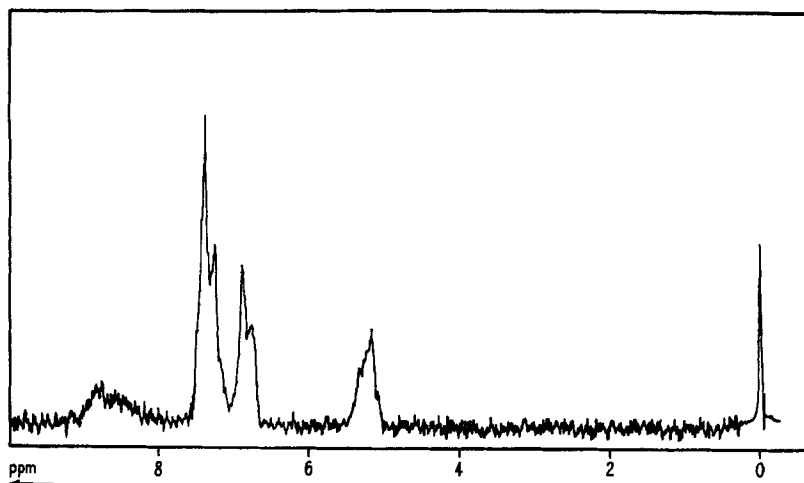


Fig. 3. Spectre de RMN. de la diphenyl-6,7-tetrahydro-5,6,7,8-ptérine (VI) dans  $\text{CF}_3\text{COOH}$  ( $\delta_{\text{TMS}} = 0$  ppm)

correspondants de tétrahydroptérines. Les deux protons introduits en C(6) et C(7) par la réduction donnent un signal mal résolu entre 5 et 5,5 ppm, alors que la diphenylptérine I n'en montre aucun dans cette région. – Le spectre de masse indique un poids moléculaire de 319 (100%). Autres pics caractéristiques:  $m/e$  315 ( $M^+ - 4$ , 42%), 242 (31%), 240 (33%), 228 (66%), 98 (77%), 91 (93%), 84 (35%), 83 (47%), 82 (29%), 81 (47%), 79 (35%), 77 (35%).

$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ON}_5$  (319,37) Calc. C 67,69 H 5,37 N 21,93% Tr. C 67,85 H 5,27 N 21,76%

La tétrahydroptérine VI se conserve sans décomposition à l'état solide et à l'abri de la lumière. Par contre, en solution, spécialement aux pH supérieurs à 3, elle est réoxydée très rapidement, et sans formation de produit intermédiaire décelable, en diphenyl-6,7-dihydro-7,8-ptérine (IV), reconnaissable à son spectre UV. très caractéristique [4] (v. fig. 4).

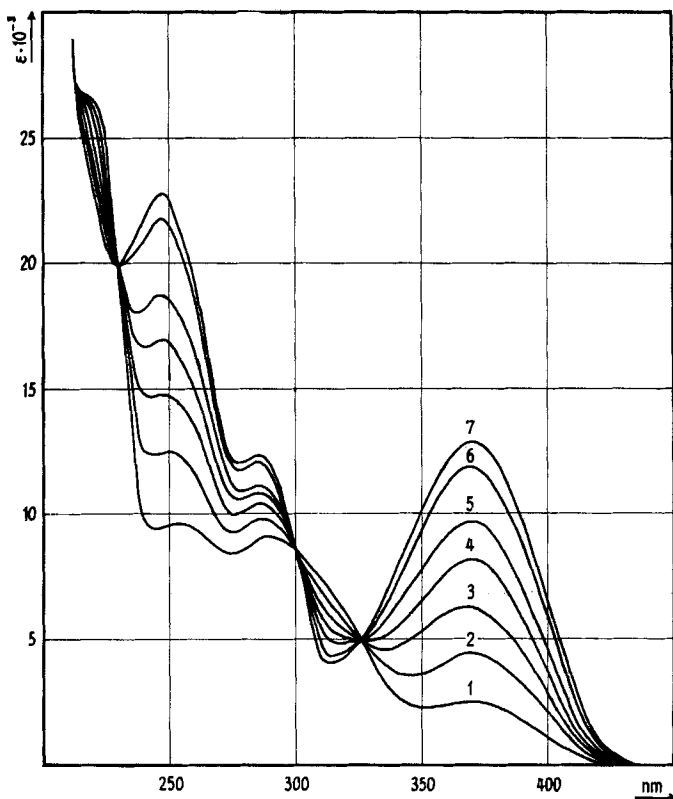


Fig. 4. Cinétique de l'oxydation de la diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérine (VI) en diphényl-6,7-dihydro-7,8-ptérine (IV) sous atmosphère normale.

Solvant: méthanol/solution-tampon aux phosphates de potassium 0,1 M, pH 6,8 (1:1).

- Courbe 1: tétrahydroptérine VI 5 min après la mise en solution  
 Courbe 2: tétrahydroptérine VI 30 min après la mise en solution  
 Courbe 3: tétrahydroptérine VI 60 min après la mise en solution  
 Courbe 4: tétrahydroptérine VI 90 min après la mise en solution  
 Courbe 5: tétrahydroptérine VI 120 min après la mise en solution  
 Courbe 6: tétrahydroptérine VI 180 min après la mise en solution  
 Courbe 7: dihydroptérine IV

*Essai d'hydrogénation catalytique de la diphényl-6,7-ptérine (I).* On hydrogène 10,2 mg de I dans 3 ml de  $\text{CF}_3\text{COOH}$  en présence de 5 mg de  $\text{PtO}_2$ . La solution se colore aussitôt en rouge (formation de dihydro-5,6-ptérine (II) ?) pour pâlir dès la fixation du premier mole-équ. d'hydrogène. Après absorption de 2 moles-équ. de  $\text{H}_2$ , la réduction est terminée (durée totale 10-15 min). Après avoir travaillé la solution selon la méthode standard mise au point dans notre laboratoire [6], on n'obtient qu'un mélange de tétrahydroptérine VI et de dihydroptérine IV.

*N-Méthyl-tétrahydroptéridines préparées par réduction au borohydrure de sodium.* — a) *Méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérine (VII).* Dans un ballon tricol avec ampoule à robinet et agitateur on ajoute lentement et sous courant d'azote, à une suspension de 100 mg (0,3 mmole) de méthyl-5-diphényl-6,7-dihydro-5,6-ptérine (III) dans 16 ml de méthanol et 1,5 ml  $\text{NaOH}$  1 N, une solution de 1,5 g (40 mmoles) de  $\text{NaBH}_4$  dans 5 ml d'eau. III se dissout peu à peu, tandis que la coloration rouge du milieu réactionnel passe au jaune (24 h). On filtre, évapore le méthanol sous vide, neutralise la solution restante avec  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N et recueille par centrifugation le précipité

formé, qui est lavé plusieurs fois à l'eau puis séché sous 0,1 Torr à la température ambiante: 55 mg (52%) de tétrahydroptérine VII pratiquement incolore. Pour l'analyse le produit est recristallisé d'un mélange méthanol-eau. La tétrahydroptérine VII, comme la dihydroptérine de départ III, est très stable et peut être conservée à l'état solide sans précautions spéciales. Son spectre UV. (fig. 5) présente l'aspect normal des spectres correspondants de tétrahydroptérines synthétiques. Il en est de même pour son spectre de RMN. – Le spectre de masse indique un poids moléculaire de 333 (100%). Autres pics importants:  $m/e$  318 ( $M^+ - 15$ , 6%), 256 (16%), 242 (63%), 180 (40%), 120 (51%), 91 (77%), 77 (37%).

$C_{19}H_{19}ON_5 \cdot H_2O$  (351,40) Calc. C 64,94 H 6,02 N 19,93% Tr. C 65,41 H 6,22 N 20,38%

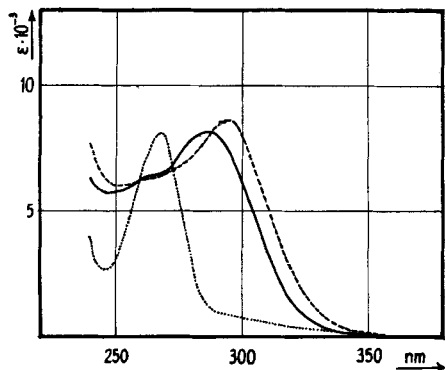


Fig. 5. Spectre d'absorption UV. de la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptéridine (VII)

..... méthanol/HCl 1N (9:1), pH 1;  
 ——— méthanol/H<sub>2</sub>O (9:1), pH 6,5;  
 ——— méthanol/NaOH 0,1N (9:1), pH 12

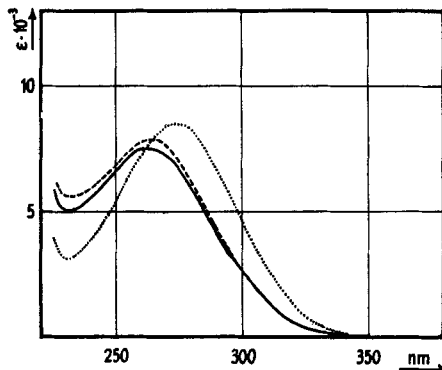


Fig. 6. Spectre d'absorption UV. de la N(2')-déhydro-hydroxy-4a-méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydroptéridine (X).

..... méthanol/HCl 1N (9:1), pH 1;  
 - - - - - méthanol/H<sub>2</sub>O (9:1), pH 6,5;  
 ——— méthanol/NaOH 0,1N (9:1), pH 12

b) Méthyl-8-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptéridine (VIII). 80 mg (0,24 mmole) de méthyl-8-diphényl-6,7-dihydro-7,8-ptéridine (V) sont traités comme ci-dessus avec 1,5 g (40 mmoles) de NaBH<sub>4</sub>. Après 40 h de réaction on évapore le méthanol, neutralise la solution restante, centrifuge, lave et recueille 25 mg (31%) de tétrahydroptéridine VIII. – Spectre UV.:  $\lambda_{max}$  (pH 6,8): 255 nm ( $\epsilon = 9 \cdot 10^8$ ); 304 nm ( $\epsilon = 9,8 \cdot 10^8$ ). Le spectre de RMN. n'appelle aucune remarque particulière. – Spectre de masse:  $m/e$  333 (100%), 256 (10%), 254 (16%), 242 (26%), 180 (9%), 91 (21%).

$C_{19}H_{19}ON_5$  (333,38) Calc. C 68,45 H 5,74 N 21,01% Tr. C 68,31 H 5,59 N 20,40%

Comme toutes les tétrahydroptérines, la tétrahydroptéridine VIII est extrêmement instable en solution en présence d'oxygène. Dans ces conditions et à pH 6,8 elle se transforme quantitativement en 140 min en méthyl-8-diphényl-7,8-ptéridine (V), sans mise en évidence (spectrophotométrie) de produit intermédiaire.

N(2')-Déhydro-hydroxy-4a-méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydroptéridine (= imino-2-oxo-4-hydroxy-4a-méthyl-5-diphényl-6,7-octahydro-2,3,4,4a,5,6,7,8-ptéridine) (X) à partir de VII. – a) Par oxydation par O<sub>2</sub>. Dans une solution de 6,9 mg de tétrahydroptéridine VII dans 5 ml d'un mélange méthanol – tampon aux phosphates de potassium, pH 11,6 (1:1), on fait passer un courant d'oxygène. Au bout de 2 h on centrifuge le précipité blanc formé, lave à HCl 1N, à l'eau, et sèche sous 0,1 Torr à la température ambiante: 4,2 mg (58%) d'un produit stable. Le spectre UV. de la substance (fig. 6) ne diffère pas sensiblement du spectre UV. des tétrahydroptérines de ce mémoire. Le spectre de RMN. (voir tableau) n'appelle aucun commentaire particulier. – Dans le spectre de masse on voit au contraire apparaître un phénomène commun à d'autres ptéridines hydrogénées telles que la tétrahydroptéridine VI et la 7,8-dihydroptéridine IV: une perte d'hydrogène pendant la mesure. Dans le cas de l'hydroxy-tétrahydroptéridine X et de la dihydroptéridine IV, la perte de 2 atomes d'hydro-

gène est totale. *m/e*: 347 ( $M^+ - 2$ , 36%), 304 (26%), 200 (20%), 180 (12%), 131 (36%), 120 (100%), 104 (28%), 91 (18%), 90 (14%), 89 (19%), 85 (95%), 77 (39%).

$C_{19}H_{19}O_2N_5$  (349,38) Calc. C 65,31 H 5,48 N 20,05% Tr. C 65,58 H 5,13 N 19,87%

b) *A l'aide de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. A une solution de 2 mg de VII dans 2 ml de méthanol on ajoute 2 gouttes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Après 5 min on peut recueillir 1 mg de X pur.

*Hydroxy-4a-méthyl-5-diphényl-6,7-hexahydro-4a,5,6,7,8,8a-ptérine (XI)*. On hydrogène 15,3 mg (44  $\mu$ moles) de ptérine X dans 3 ml de CF<sub>3</sub>COOH en présence de 6 mg de PtO<sub>2</sub>. En 1 h 1,1 ml (43  $\mu$ moles) d'hydrogène est absorbé. Après filtration du catalyseur, on évapore CF<sub>3</sub>COOH, reprend le résidu dans un peu d'eau et neutralise avec NaOH 2N. Le précipité blanc formé est recueilli par centrifugation, lavé à l'eau et séché sous 0,1 Torr à température ambiante: 8 mg (52%) d'un produit blanc, stable. Le produit n'absorbe pas dans l'UV. et son spectre de RMN. (tableau) montre un nouveau signal à 6,15 ppm, correspondant à un proton sans couplage. — Le spectre de masse devrait indiquer un poids moléculaire de 351. Ici encore il y a perte d'une ou plusieurs molécules de H<sub>2</sub> pendant la mesure. L'ensemble du spectre ressemble à celui de la ptérine X: *m/e* 350 (2%), 349 ( $M^+ - 2$ , 7%), 348 (5%), 347 ( $M^+ - 4$ , 18%), 304 (2%), 264 (13%), 202 (9%), 200 (11%), 180 (76%), 131 (22%), 120 (100%), 118 (41%), 91 (14%), 90 (21%), 77 (18%).

$C_{19}H_{21}O_2N_5, H_2O$  (369,41) Calc. C 61,77 H 6,28 N 18,96% Tr. C 61,16 H 6,68 N 17,67%

On peut également réduire 5 mg de ptérine X dans un mélange méthanol/eau (70:30) avec 50 mg de NaBH<sub>4</sub>. Après 15 h à température ambiante, on évapore le solvant sous vide, reprend le résidu dans un peu d'eau, neutralise à H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N et recueille le précipité par centrifugation. La substance blanche ainsi obtenue, 2 mg (40%), est identique à l'hydroxy-hexahydroptérine XI décrite ci-dessus.

#### RÉSUMÉ

Les diphényl-6,7-, méthyl-5-diphényl-6,7- et méthyl-8-diphényl-6,7-tétrahydro-5,6,7,8-ptérines ont été obtenues par réduction au NaBH<sub>4</sub> des ptérines ou dihydroptérines correspondantes. Alors que la première et la troisième sont facilement réoxydées en dihydro-7,8-ptérines, la méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydroptérine, traitée par O<sub>2</sub> ou par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fixe un atome d'oxygène pour donner la N(2')-déhydro-hydroxy-4a-méthyl-5-diphényl-6,7-tétrahydroptérine, stable. Tous ces corps ont été caractérisés par analyse élémentaire et par leurs spectres UV., de RMN. et de masse.

Institut de chimie organique  
de l'Université  
CH 8001 Zürich, Rämistr. 76

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] 19<sup>e</sup> Communication: A. BOBST, *Helv.* 50, 1480 (1967).
- [2] M. VISCONTINI, H. LEIDNER, G. MATTERN & T. OKADA, *Helv.* 49, 1911 (1966).
- [3] C. CAIN, M. MALLETT & E. TAYLOR, *J. Amer. chem. Soc.* 68, 1996 (1946).
- [4] M. VISCONTINI & S. HUWYLER, *Helv.* 48, 764 (1965).
- [5] W. E. FIDLER & H. C. S. WOOD, *J. chem. Soc.* 1957, 4157.
- [6] A. BOBST & M. VISCONTINI, *Helv.* 49, 875 (1966).
- [7] M. VISCONTINI & E. MOEHLMANN, *Helv.* 42, 836 (1959); M. VISCONTINI, *Ind. chim. Belge* 1960, 1181; K. G. SCRIMGEOUR & K. S. VITOLS, *Biochemistry* 5, 1438 (1966).
- [8] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* 48, 816 (1965); 49, 1815 (1966).
- [9] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* 47, 2087 (1964).