

169. Über Pterinchemie

26. Mitteilung [1]

Synthesen von 6-substituierten Pterinen: Herstellung von reinem (–)-L-Neopterin und (–)-D-Monapterin

von M. Viscontini und R. Provenzale

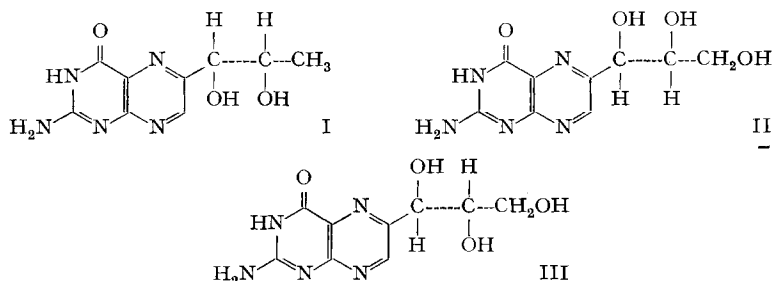
Organ.-Chemisches Institut der Universität Zürich

(22. V. 68)

Zusammenfassung. Die Synthese von 7-isomerfreien 6-(Hydroxypropyl)-pterinen wird anhand der Darstellung von (–)-L-Neopterin und (–)-D-Monapterin beschrieben. Die Methode beruht auf der Herstellung von reinen, beständigen Aminoketosen und ihrer Kondensation mit 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin (IV) in wasserfreien Alkoholen. Die Reinigung erfolgt durch Chromatographie auf Dowex 1 X4 und Trennung der entstandenen 6-substituierten Tetrahydropterine X von den begleitenden Pterinen, insbesondere von den unbeständigeren 7-substituierten Tetrahydropterinen XVII. Eine anschliessende Oxydation mit O₂ der Tetrahydropterine X und eine nochmalige Chromatographie auf Dowex 1 erbringt die gewünschten Pterine in reinem Zustand.

Seit 1947, als KARRER *et al.* [2] zum ersten Mal Polyhydroxyalkyl-pterine durch Kondensation von Zuckern mit 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin (IV) erhielten, wurden diese Produkte Gegenstand intensiver Forschung. Die letzte Arbeit von WEYGAND *et al.* [3] stellt gleichzeitig eine ausgezeichnete Zusammenfassung unserer Kenntnisse auf diesem heute wichtig gewordenen Gebiet dar.

Drei wichtige Vertreter dieser Verbindungsgruppe, nämlich L-Biopterin (I): (–)-6-(L-erythro-1',2'-Dihydroxypropyl)-pterin [4], D-Neopterin (II): (+)-6-(D-erythro-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin [5] und L-Monapterin (III): (+)-6-(L-threo-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin [6], wurden aus Lebewesen isoliert und sind genau studiert worden. Zahlreiche andere 6-(Polyhydroxyalkyl)-pterine sind ebenfalls als natürliche Produkte erkannt worden, wie z. B. Ichthyopterin: 6-(threo- oder erythro-1',2'-Dihydroxypropyl)-isoxanthopterin [7] und Bufochrom: 6-(D- oder L-erythro-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin [8] [9].



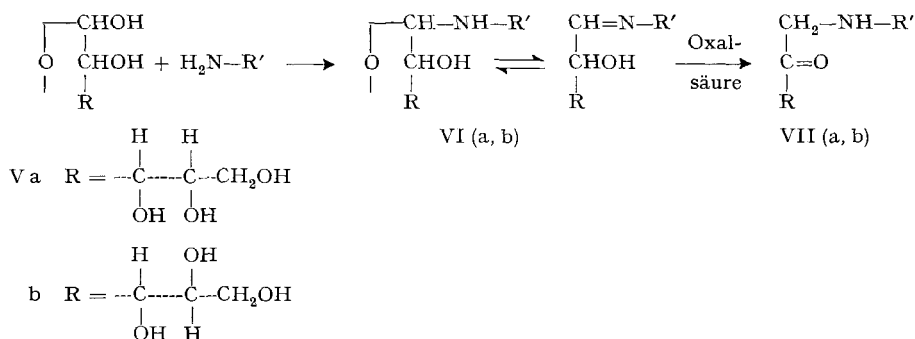
Bei den bisherigen Synthesen dieser Produkte durch Kondensation des Pyrimidins IV mit den geeigneten Zuckern werden neben den entsprechenden 1'-Desoxy-Verbindungen stets Mischungen von 6- und 7-(Polyhydroxyalkyl)-pterinen erhalten

[10]. Zahlreiche Autoren haben versucht, diese Mischungen chromatographisch in die einzelnen Komponenten aufzutrennen [11], doch waren die gewonnenen Produkte nie ganz rein. Daher wollten wir versuchen, durch Änderung der Arbeitsbedingungen die Bildung von 6-(Polyhydroxyalkyl)-pterinen so zu begünstigen, dass sie von den übrigen Kondensationsprodukten leichter getrennt werden könnten.

Heute wissen wir, dass die Kondensation eines α -Oxo- β -hydroxy-Derivates mit dem Pyrimidin IV mit der Bildung einer SCHIFF'schen Base am N(5)-Atom beginnt, gefolgt von einer AMADORI-Umlagerung und einer weiteren Kondensation zwischen der gebildeten Oxo- und der C(4)-NH₂-Gruppe des Pyrimidins IV [1]. Gemäss diesem Reaktionsmechanismus sollte prinzipiell das Pyrimidin IV mit einer Aldose ein 7-(Polyhydroxyalkyl)-pterin und mit einer Ketose ein 6-(Polyhydroxyalkyl)-pterin ergeben. Dies war praktisch nie der Fall, weil bisher die Reaktionen in wässrigem Milieu durchgeführt wurden und unter diesen Bedingungen sekundäre Hydrolysen und Umlagerungen von SCHIFF'schen Basen, Aminoketonen und Aldehyd-ammoniak-Verbindungen leicht stattfanden [3].

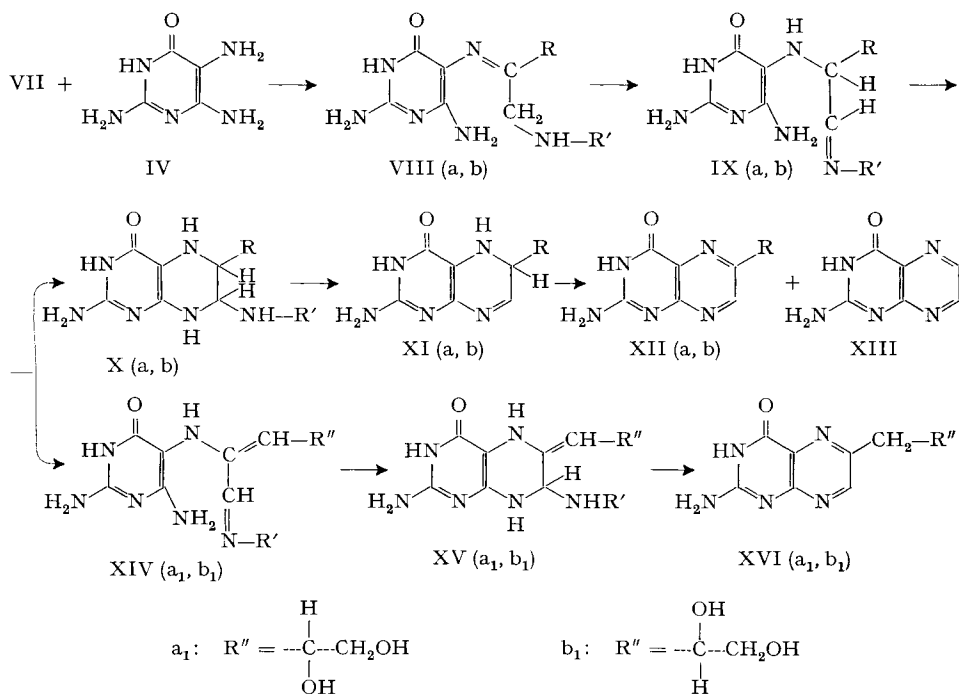
Um alle diese sekundären Reaktionen zu vermeiden, arbeiten wir a) mit beständigeren Ausgangsprodukten, b) in wasserfreiem Milieu.

a) Für die Herstellung von 6-(Polyhydroxyalkyl)-pterinen benötigen wir als Ausgangsmaterial Ketosen, die aber schwer zugänglich sind; wir ersetzen sie durch die entsprechenden Aminoketosen VII, die durch protonkatalysierte AMADORI-Umlagerungen von N-Aldoglykosiden VI leicht erhalten werden:



b) Setzt man nun die Aminoketose VII mit dem Pyrimidin IV in absolutem Methanol bzw. Äthanol unter Sauerstoffausschluss um, so nimmt die Reaktion folgenden Verlauf (S. 1497):

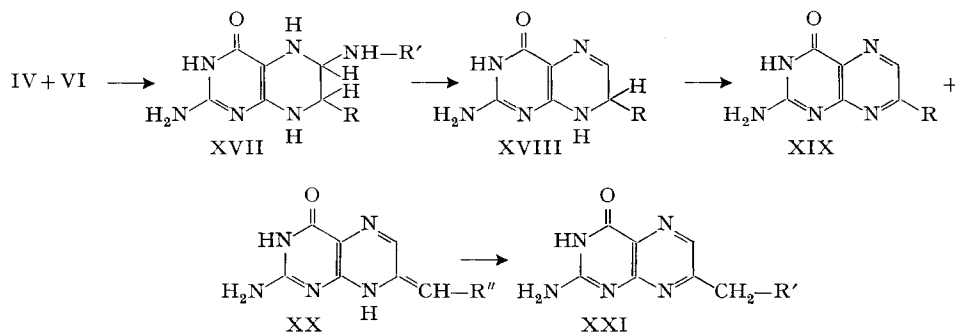
Durch AMADORI-Umlagerung ergibt die zunächst gebildete SCHIFF'sche Base VIII die neue Base IX; deren C(5)-NH₂-Gruppe addiert sich an die neu gebildete Doppelbindung, und es entsteht ein Tetrahydropterin X. Dieses farblose und nicht fluoreszierende Tetrahydropterin wird durch Chromatographie auf einer Dowex-1-X4-Säule von gefärbten und fluoreszierenden Begleitstoffen abgetrennt. In seiner wässrigen Lösung treten rasch weitere Reaktionen auf. Sehr wahrscheinlich tritt zunächst das Amin R'-NH₂ aus, da bald ein in 7,8-Stellung ungesättigtes, fluoreszierendes Produkt XI erscheint [1] [12]. Durch Oxydation oder durch Austritt der Zuckerkette entsteht aus XI entweder das 6-(Polyhydroxyalkyl)-pterin XII oder das Pterin XIII. Die bei-



den Pterine XII und XIII lassen sich nachher leicht auf Dowex 1 voneinander abtrennen.

Vor dem Ringschluss zum Tetrahydropterin X kann aber die Seitenkette der SCHIFF'schen Base IX eine Molekel Wasser verlieren unter Bildung von XIV. Dieser Wasserentzug ist durch die Konjugation der entstandenen Doppelbindung in der Kette begünstigt und gibt eine gute Erklärung für die Bildung zunächst eines Tetrahydropterins XV mit exocyclischer Doppelbindung und dann eines 6-(1'-Desoxy)pterins XVI, das man nach der Oxydation von XV chromatographisch nachweisen kann, wenn auch immer nur in sehr geringer Menge.

Trotz allen Vorsichtsmassnahmen lässt es sich nicht vermeiden, dass sich etwas N-Aldoglykosid VI zurückbildet, das mit dem Pyrimidin IV reagiert. Als Kondensa-



tionsprodukt erscheint dann neben X ein Tetrahydropterin XVII, das unbeständig ist und sich sehr rasch in das 7,8-Dihydropterin XVIII umwandelt.

Dieses Dihydropterin XVIII wird zum Teil zu 7-(Polyhydroxyalkyl)-pterin (XIX) oxydiert, aber hauptsächlich zu 7-(1'-Desoxy)-pterin (XXI) dehydratisiert (leichte α, β -Wassereliminierung, Formel XX). Die drei fluoreszierenden 7-substituierten Pterine XVIII, XIX und XXI lassen sich bei der ersten Chromatographie auf Dowex-1-X4-Säule von dem nicht fluoreszierenden und beständigeren Tetrahydropterin X abtrennen, so dass bei der zweiten Chromatographie XII leicht rein erhalten wird.

Diese neue Methode scheint ganz allgemein verwendbar zu sein. Sie verläuft so leicht, dass es durchaus möglich ist, auf die Isolierung der Aminoketosen VII zu verzichten. Im experimentellen Teil beschreiben wir eine solche Synthese des D-Monapterins, bei welcher die Aminoketose VIIb durch Umsetzung von D-Xylose (Vb) mit Phenylhydrazin und darauffolgender Behandlung mit Oxalsäure gebildet wird. Ausführlicher beschreiben wir auch die schrittweise Synthese der beiden Antipoden des natürlichen Neopterins bzw. Monapterins. Die IR.-Spektren beider Antipoden (Fig. 1 und 2) sind einander sehr ähnlich und unterscheiden sich deutlich nur im 8,5- μ -

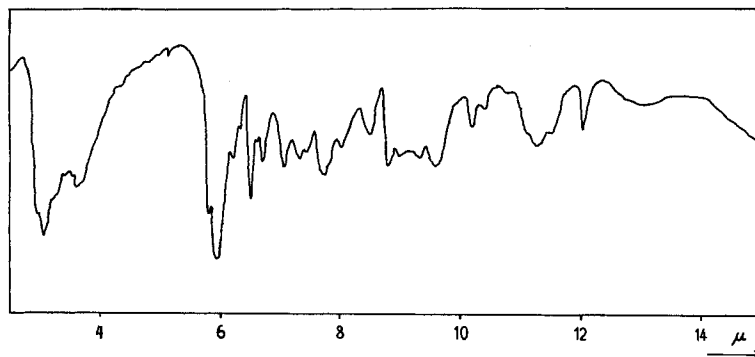


Fig. 1. IR.-Spektrum von L-Neopterin, in KBr aufgenommen

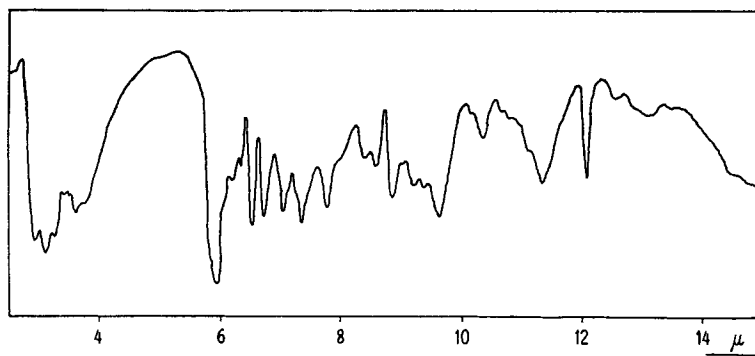


Fig. 2. IR.-Spektrum von D-Monapterin, in KBr aufgenommen

Gebiet. Dort zeigt das (–)-L-Neopterin eine Doppelbande (8,4 und 8,6 μ) und das (–)-D-Monapterin eine einfache Bande (8,5 μ). Die (–)-L-Neopterin- und (–)-D-

Monapterin-IR.-Spektrn stimmen, wie zu erwarten war, mit denjenigen des Bufochroms [9] bzw. des natürlichen (+)-L-Monapterins [6] überein.

Die Mikroanalysen und IR.-Spektrn wurden in unserem mikroanalytischen Labor unter der Leitung von Herrn H. FROHOFER ausgeführt bzw. aufgenommen. Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimentelles. – *N-Benzylamino-L-arabinosid (VIa)*. Eine Mischung von je 5 g L-Arabinose (Va) und Benzylamin wird nach 4 Std. Stehen bei Zimmertemperatur auf 50° bis zur vollständigen Lösung der Arabinose erwärmt (30 Min.). Nach dem Erkalten wird unter Rühren der viskosen Masse soviel Essigester zugegeben, bis das Produkt VIa erstarrt. Man filtriert und wäscht mit Essigester und Äther: 7 g (90%) farblose Substanz, Smp. 109–110°, nach Umkristallisation Smp. 111°; $[\alpha]_D^{26} = +4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; CH₃OH). Für den Antipoden wurden folgende Werte angegeben [13]: Smp. 117–118°; $[\alpha]_D^{26} = -4^\circ$.

C₁₂H₁₇NO₄ (239,36) Ber. C 60,24 H 7,16 N 5,85% Gef. C 59,99 H 7,15 N 5,88%

1-Benzylamino-1-desoxy-L-ribulose-oxalat (VIIa). 6 g VIa, gelöst in 200 ml wasserfreiem Dioxan, werden mit einer Lösung von 2,5 g wasserfreier Oxalsäure in 50 ml Dioxan versetzt. Nach einiger Zeit beginnt sich die Lösung zu trüben, und bald darauf erstarrt der ganze Kolbeninhalt. Nach 12 Std. filtriert man das Produkt ab, wäscht es mit Isopropanol, Äther und trocknet im Exsikkator über CaCl₂: 6 g weisse Substanz; nach Umkristallisieren aus Äthanol Smp. 130–131°, $[\alpha]_D^{26} = -8^\circ \pm 3^\circ$. Für den Antipoden wurden folgende Werte angegeben [13]: Smp. 145–146°, $[\alpha]_D^{26} = +5^\circ$.

C₁₄H₁₉NO₈ (329,30) Ber. C 51,06 H 5,82 N 4,25% Gef. C 51,27 H 6,01 N 4,53%

1-Benzylamino-1-desoxy-D-xylulose-oxalat (VIIb): nach MICHEEL & HAGEMANN hergestellt [14].

(–)-L-Neopterin (XIIa). Synthese und Isolierung müssen unter Lichtausschluss durchgeführt werden. In einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Rührer löst man unter N₂-Atmosphäre 0,820 g (10 mMol) wasserfreies Natriumacetat, 1,07 g (5 mMol) Triaminohydroxy-pyrimidinhydrochlorid (IV) und 5 Tropfen Thioäthanol in 200 ml siedendem, wasserfreiem Methanol (Ausscheidung von NaCl). Dann gibt man 1,645 g (5 mMol) L-Ribulose-oxalat (VIIa) zu, kocht 3 Std., filtriert nach Erkalten und dampft das Filtrat im Rotationsverdampfer ab. Der Rückstand wird

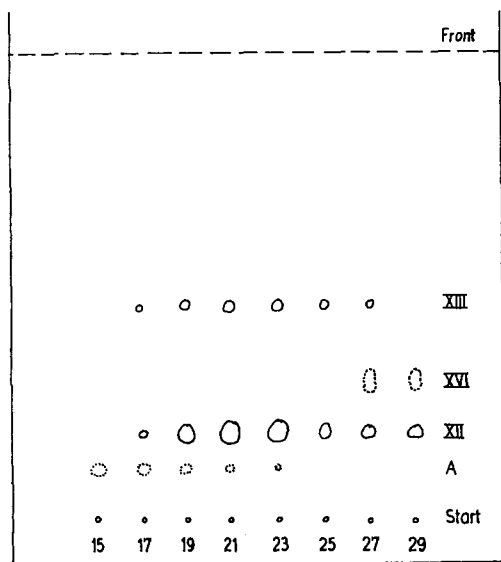


Fig. 3. Dünnschichtchromatographie der Fraktionen 15–29 nach der partiellen Oxydation mit O₂

Lösungsmittel: Butanol-Eisessig-Wasser (10:3:7)

4–5mal mit je 5 ml einer 0,03N Ammoniumformiat-Lösung, eingestellt auf pH 7, behandelt. Die durch Zentrifugieren geklärte Lösung wird auf eine Dowex 1 X4-Säule (300 × 40) gebracht und mit derselben Ammoniumformiat-Lösung eluiert. Man sorgt dafür, dass Lösungen und Substanzen mittels N₂ von O₂ befreit werden. Man fängt 30 Fraktionen (Durchlaufgeschwindigkeit 20 ml/10 min) von je 20 ml auf. Die ersten 15 sind stark gefärbt, enthalten uns nicht interessierende Substanzen und werden deshalb verworfen. Die restlichen, die praktisch nicht fluoreszieren, werden mit Ameisensäure auf pH 4–5 gebracht und durch Durchleiten von O₂ 30 Min. lang teilweise oxydiert. Eine sehr starke Fluoreszenz zeigt sich in all den so behandelten Lösungen, die mit Dünnschichtchromatographie auf ihre Zusammensetzung geprüft werden (Fig. 3). Die Fraktionen, die das 1'-Desoxypterin XVIa enthalten (27–30), werden verworfen, die anderen (17–26) vereinigt und 12 Std. weiter mit O₂ oxydiert. Die das L-Neopterin neben anderen Pterinen enthaltende Lösung wird im Rotationsverdampfer abgedampft. Der Rückstand wird mit Äthanol und Äther gewaschen, in 1-proz. Ammoniak gelöst und die Lösung durch Zentrifugieren geklärt. Durch Zusatz von Ameisensäure wird das pH der klaren Lösung auf 10–11 gebracht, dann wird sie auf einer Dowex-1-formiat-Säule (200 × 40) chromatographiert. Man eluiert mit einer 0,03N Ameisensäure-Ammoniak-Lösung, pH 8,5. Das Pterin XIII bleibt oben auf der Säule zurück. Wenn die Trennung in zwei Banden erreicht ist, bringt man mit Ameisensäure das pH der Elutionslösung auf 7–7,3. Danach trennen sich aus der zweiten Bande zuerst das nicht näher charakterisierte Pterin A und dann das L-Neopterin (XIIa) ab.

Die L-Neopterinlösung (chromatographisch kontrolliert) wird im Rotationsverdampfer auf 2 ml eingengt, mit Äthanol versetzt und bei 5° einige Std. stehengelassen. Das rohe L-Neopterin wird abzentrifugiert und aus Wasser umkristallisiert: 70 mg (5,5%) weisse Substanz, die keine Spur des 7-Isomeren XIXa enthält (Prüfung der mit KMnO₄-Oxydation entstandenen Pterin-6-carbonsäure auf Cellulose-Dünnschichtchromatographie nach Reinigung auf Dowex-50-Säule [15]).

C₉H₁₁N₅O₄ (253,22) Ber. C 42,69 H 4,38 N 27,67% Gef. C 43,15 H 4,22 N 28,25%

Das reine L-Neopterin ist nicht sehr gut löslich, rund 150 mg in 100 ml 0,1N HCl. $[\alpha]_D^{24} = -53^\circ \pm 5^\circ$ ($c = 0,15$; 0,1N HCl). REMBOLD und Mitarbeiter fanden $[\alpha]_D^{25} = +45^\circ \pm 3^\circ$ für das synthetische D-Neopterin [16] und $-44^\circ \pm 3^\circ$ für das synthetische L-Neopterin [11], welche durch Chromatographie auf phosphorylierter Cellulose gereinigt wurden.

(-)-D-Monapterin (XIIb). Nach demselben Verfahren aus D-Xyloseoxalat (VIIb) synthetisiert. Man erhält 126 mg (10%) weisse Substanz, frei von 7-Isomeren. Das reine D-Monapterin ist löslicher als das L-Neopterin in H₂O und 0,1N HCl (250 mg/100 ml). $[\alpha]_D^{24} = -115^\circ \pm 5^\circ$ ($c = 0,244$; 0,1N HCl). Wir haben $+107^\circ \pm 5^\circ$ für das natürliche L-Monapterin [6] gefunden. REMBOLD [16] gibt $-92^\circ \pm 3^\circ$ und $+97^\circ \pm 3^\circ$ für die von ihm synthetisierten D- und L-Monapterine an.

C₉H₁₁N₅O₄ (253,22) Ber. C 42,69 H 4,38 N 27,67% Gef. C 42,03 H 4,42 N 27,23%

Allgemeines Herstellungsverfahren von 6-(Polyhydroxyalkyl)-pterinen (XII): Synthese von D-Monapterin (XIIb). Einerseits werden 1,5 g (10 mMol) D-Xylose (Vb) in der minimalsten Menge absoluten Methanols gelöst und hierauf mit 1,08 g (10 mMol) Phenylhydrazin versetzt. Die Lösung wird 30 Min. gekocht, auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit 0,9 g (10 mMol) wasserfreier Oxalensäure versetzt. In einem mit Rückflusskühler, Rührer und N₂-Zuleitung versehenen Dreihalskolben löst man andererseits 0,82 g (10 mMol) wasserfreies Natriumacetat, 1,07 g (5 mMol) Hydrochlorid von Triamino-hydroxy-pyrimidin IV und 5 Tropfen Thioäthanol in 100 ml siedendem wasserfreiem Methanol. Nach der Ausscheidung von NaCl giesst man die zuvor bereitete Phenylhydrazinoketose-Lösung hinzu, kocht noch 3 Std. und arbeitet nach der oben angegebenen Vorschrift auf. Man erhält 150 mg (12%) reines D-Monapterin.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 25. Mitteilung: M. VISCONTINI & H. LEIDNER, *Helv.* 51, 1029 (1968).
- [2] P. KARRER, R. SCHWYZER, B. ERDEN & A. SIEGWART, *Helv.* 30, 1031 (1947).
- [3] F. WEYGAND, H. SIMON, K. D. KEIL & H. MILLAUER, *Chem. Ber.* 97, 1002 (1964).
- [4] E. L. PATTERSON *et al.*, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 3167 (1955); 78, 5868, 5871 (1956); H. S. FOREST & H. K. MITCHELL, *ibid.* 77, 4865 (1955); M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER & E. HADORN, *Helv.* 38, 397 (1955); M. VISCONTINI, E. LOESER, P. KARRER & E. HADORN, *Helv.* 38, 1222, 2034 (1955).

- [5] H. REMBOLD & L. BUSCHMANN, *Liebigs Ann. Chem.* **662**, 72 (1963).
- [6] M. VISCONTINI, M. POUTEAU-TOUVENOT, R. BÜHLER & M. SCHROEDER, *Helv.* **47**, 1948 (1964), und noch nicht veröffentlichte Ergebnisse.
- [7] R. HÜTTEL & G. SPENGLING, *Liebigs Ann. Chem.* **554**, 69 (1943); R. TSCHESCHE & A. GLASER, *Chem. Ber.* **91**, 2081 (1958); T. KAUFFMANN, *Liebigs Ann. Chem.* **625**, 133 (1959).
- [8] T. HAMA & T. GOTO, *Kagaku* (Japan), Iwanami-Schoten, **22**, 542 (1952); T. HAMA & M. OBIKA, *Experientia* **14**, 182 (1958).
- [9] T. GOTO, *Japan. J. Zool.* **14**, 83,91 (1963).
- [10] F. WEYGAND, A. WACKER & V. SCHMIED-KOWARZIK, *Experientia* **4**, 427 (1948); *Chem. Ber.* **82**, 25 (1949); R. B. ANGIER *et al.*, *J. Amer. chem. Soc.* **70**, 3029 (1948).
- [11] M. VISCONTINI, *Ind. chim. Belge* **1960**, 1181; H. REMBOLD & H. METZGER, *Chem. Ber.* **96**, 1395 (1963); R. TSCHESCHE, B. HESS, I. ZIEGLER & H. MACHLEIDT, *Liebigs Ann. Chem.* **658**, 193 (1962); M. GOTO, M. OHNO, H. S. FORREST & J. M. LAGOWSKI, *Arch. Biochemistry Biophysics* **170**, 444 (1965).
- [12] M. VISCONTINI & S. HUWYLER, *Helv.* **48**, 764 (1965).
- [13] T. NEILSON & H. C. S. WOOD, *J. chem. Soc.* **1962**, 44.
- [14] F. MICHEEL & G. HAGEMANN, *Chem. Ber.* **92**, 2836 (1959).
- [15] C. L. KRUMDIECK, E. SHAW & C. M. BAUGH, *J. biol. Chemistry* **241**, 383 (1965).
- [16] H. REMBOLD & L. BUSCHMANN, *Chem. Ber.* **96**, 1406 (1963).
-