

80. Über Pterinchemie

35. Mitteilung [1]

Herstellung von 6-Aminomethyl-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin, ein Beitrag zur Frage der Existenz von Parachinoid-dihydropterin

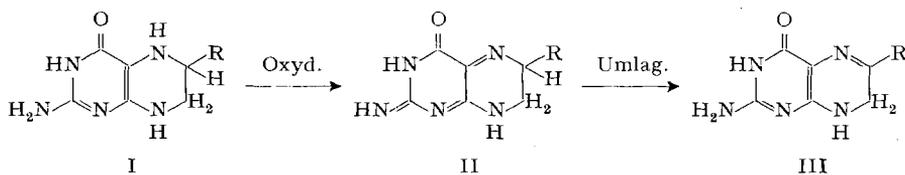
von M. Viscontini, M. Frater-Schroeder und M. Argenti

Organisch-chemisches Institut der Universität, CH-8001 Zürich, Rämistrasse 76

(1. II. 71)

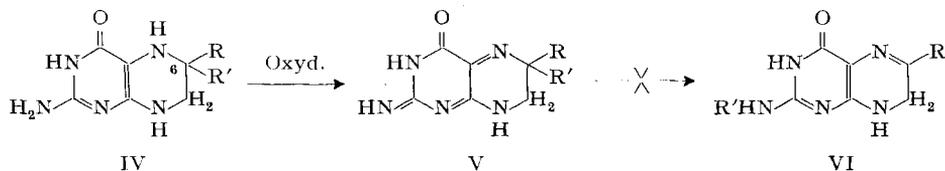
Zusammenfassung. Die erste Synthese eines 6,6-disubstituierten Tetrahydropterin, nämlich des 6-Aminomethyl-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin, wird beschrieben: Das durch Anlagerung von Blausäure an 6-Methyl-7,8-dihydropterin entstandene 6-Cyano-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin wird acetyliert, reduziert und anschliessend desacetyliert. Entgegen unserer Erwartung bildet das 6-Aminomethyl-6-methyl-tetrahydropterin bei der Oxydation durch Luftsauerstoff unter physiologischen Bedingungen kein Parachinoid-dihydropterin, sondern wird direkt zu 6-Methyl-7,8-dihydropterin, Formaldehyd und Ammoniak abgebaut.

Tetrahydropterine, wie z.B. der Citrovorumfaktor (N(5)-Formyl-tetrahydrofolsäure) und die N(5)-Methyl-tetrahydrofolsäure, sind Coenzyme verschiedener Enzymsysteme. S. Kaufman konnte ausserdem vor kurzem zeigen, dass bestimmte Tetrahydropterine I als Katalysatoren der enzymatischen Phenylalanin-Hydroxylierung wirken. Die Vermutung, dass während dieser Hydroxylierung Parachinoid-dihydropterine II eine obligatorische Dihydrostufe der Pterinumwandlung darstellen, wurde



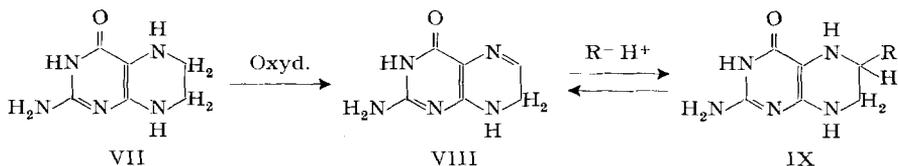
durch einige indirekte Beweise gestützt (Zusammenfassung des Problems, s. [2]). Da aber solche Parachinoid-dihydropterine sich sofort in 7,8-Dihydropterine III umlagern, konnte bis jetzt kein Pterin der Struktur II hergestellt und isoliert werden.

In der Annahme, dass Disubstitution am C(6)-Atom des Tetrahydropteringerüsts eine Umlagerung V \rightarrow VI verunmöglicht, haben wir versucht, derartige substituierte



Pterine IV zu synthetisieren, welche nach der Oxydation die postulierten, stabilisierten Parachinoid-dihydropterine V hätten liefern sollen.

Solche Versuche wurden oft schon, jedoch erfolglos, in unserem Laboratorium durchgeführt. Eine 1959 gemachte Erfahrung [3a] führte diesmal zum Erfolg. Damals wurde gezeigt, dass während der Oxydation von Tetrahydropterin nucleophile Additionen an der 6-Stellung leicht stattfinden. Z. B. bildet sich während der Luftoxydation des Tetrahydropterin VII das 7,8-Dihydropterin VIII. Die entstandene 5,6-Doppelbindung addiert leicht nucleophile Reagenzien $R^- H^+$ unter Bildung des entsprechenden 6-substituierten Tetrahydropterin IX [2] [3]. Die so erhaltenen



Tetrahydropterin IX sind unbeständig und spalten sich grösstenteils oder vollständig durch Retro-*Michael*-Reaktion in die Edukte VIII + RH, so dass für ihre Herstellung exakt definierte Bedingungen einzuhalten sind. In Anlehnung an diese Methode addierten wir Blausäure an 6-Methyl-7,8-dihydropterin (X) in basischer Lösung. Beim raschen Neutralisieren fiel das weisse 6-Cyano-6-methyl-tetrahydropterin (XI) aus. NMR-, IR- und UV.-Spektren (Fig. 1) beweisen die Richtigkeit der Struktur XI.

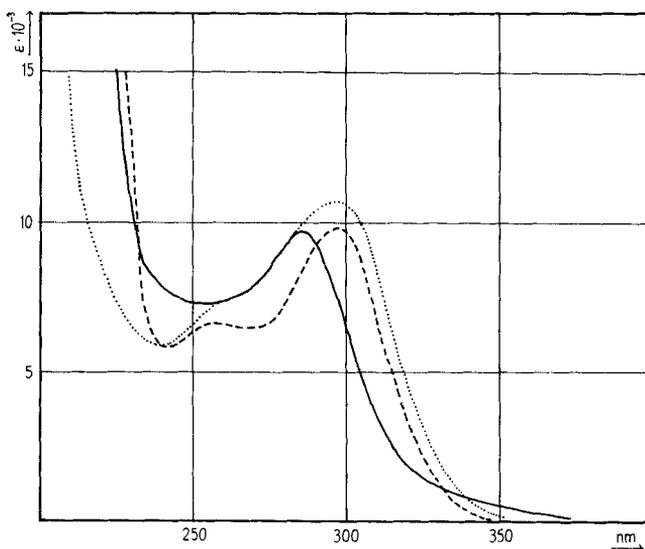


Fig. 1. UV.-Spektrum von 6-Cyano-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (XI) in wässriger Lösung
 0,1N HCl - - - - - pH 6,8 ——— 0,1N NaOH

Für die Elementaranalyse konnte aber keine vollkommen wasserfreie Substanz erhalten werden, weil das sehr unbeständige Produkt beim Trocknen im Hochvakuum HCN verliert. Das Massenspektrum zeigt kein Molekularion-Signal, vielmehr ein sehr intensives Signal bei m/e 179 ($M^+ - \text{HCN}$), welches dem 6-Methyl-7,8-dihydropterin (X) entspricht. In wässriger Lösung wird das Produkt ebenfalls gespalten und nach zwei Stunden liegt bei pH 6,8 nur noch X vor (Fig. 2).

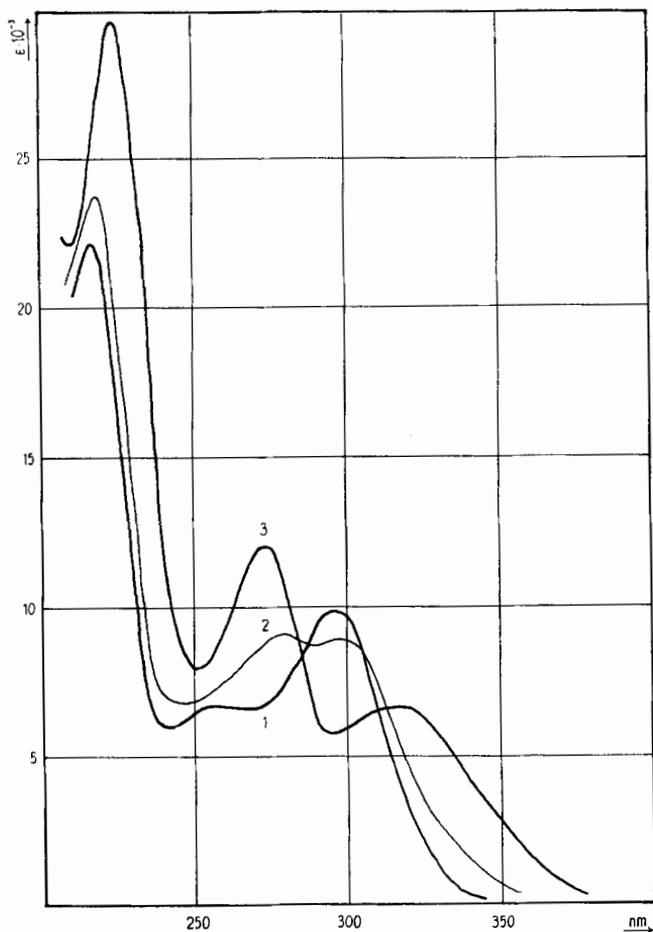
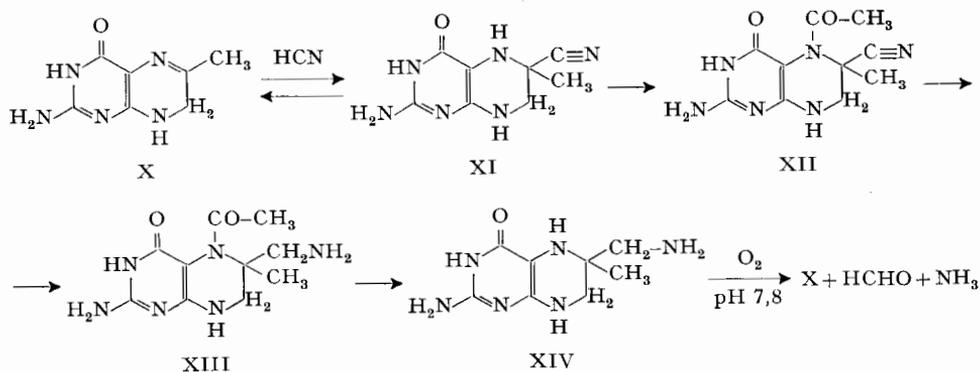


Fig. 2. Zersetzung des Tetrahydropterins XI in wässriger Lösung von pH 6,8
 Kurve 1: Frische Lösung (Tetrahydropterin XI); Kurve 2: Nach 20 Min.; Kurve 3: Nach 2 Std.
 (6-Methyldihydropterin).



Nach diesen Ergebnissen stand fest, dass aus dem Tetrahydropterin XI kein Parachinoid-dihydropterin gewonnen werden konnte. Wir versuchten nun, durch Substitution des N(5)-Protons die Beständigkeit von XI zu erhöhen. Die Formylierung von XI misslang. Die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Dimethylformamid verlief hingegen glatt, wie wir es schon früher beim 5,6,7,8-Tetrahydropterin beobachtet hatten [4]. Das N(5)-Acetyl-tetrahydropterin XII fiel direkt aus der Lösung aus. Durch Zugabe von Äther in der Mutterlauge erhielten wir ein Gemisch von N(5)-mono- und N(2'),N(5)-diacetylierten Produkten, das wie XII selbst direkt hydriert werden kann. Dass die Acetylierung am N(5) stattfindet, wird durch die Beständigkeit des erhaltenen XII bestätigt. Beim Stehen in 0,1N HCl an der Luft ist es erst nach 3 Tagen vollständig hydrolysiert und oxydiert.

Das stabilisierte Produkt XII konnte zu XIII hydriert und letzteres zu XIV desacetyliert werden. Somit erhielten wir ein gewünschtes, C(6)-disubstituiertes Tetrahydropterin.

Die Oxydation dieser Substanz, welche keine retro-*Michael*-ähnliche Abspaltung erleiden kann, nimmt einen sehr unerwarteten Verlauf [1]. In 0,1M Phosphat-Puffer bei pH 6,8 bildet sich nämlich sehr rasch 6-Methyl-7,8-dihydropterin (X) neben Formaldehyd und Ammoniak. Über den möglichen Mechanismus dieser Seitenketten-Abspaltung wird später in dieser Zeitschrift berichtet.

Wir danken Herrn Prof. Dr. W. von Philipsborn, den Herren Drs. A. Diefenbacher und T. Winkler für die Aufnahme und Interpretation der NMR.-Spektren, Herrn Prof. Dr. M. Hesse für die Aufnahme der Massenspektren und Herrn H. Frohofer, Leiter unserer mikroanalytischen Abteilung, für die Ausführung der Elementaranalysen und die Aufnahme der IR.-Spektren. Ferner danken wir dem Schweizerischen Nationalfonds für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Der Aufenthalt von Herrn Dr. M. Argentini in Zürich wird durch ein Austausch-Stipendium (Universität Zürich-Collegio Ghislieri Pavia) ermöglicht.

Experimentelles. – 6-Methylpterin kann nach Boon [5] durch Ringschluss des reduzierten Kondensationsproduktes aus α -Aminoaceton und 2-Amino-4-chlor-5-phenylazo-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin hergestellt werden. Da die Methode aufwendig war und schlechte Ausbeuten ergab, haben wir das Methylpterin nach folgendem Prinzip synthetisiert [6]: Zu einer Lösung von 0,46 g (20 mAtom) Natrium in 400 ml absolutem Methanol in einem 2-l-Rundkolben wurden unter Eiskühlung und Rühren 11,6 g (100 mMol) destilliertes Acetoxyaceton gegeben. Nach 15 Min. wurde das Kühlbad entfernt und das Natriummethylat durch Zugabe von 1,2 g (20 mMol) Eisessig neutralisiert. Darauf wurde die Lösung unter Stickstoff mit einer frisch hergestellten Lösung von 6,56 g (80 mMol) wasserfreiem Natriumacetat, 10 Tropfen Thioäthanol und 10,7 g (50 mMol) 2,4,5-Triamino-6-oxo-dihydropyrimidin-dihydrochlorid in 1100 ml absolutem Methanol versetzt. Der Rundkolben wurde verschlossen und bei Zimmertemperatur unter Weitererrühren stehengelassen. Das 6-Methylpterin begann schon nach 10 Min. auszufallen. Nach 15 Std. wurde es abgutscht, mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet. Rohausbeute: 7 g (79% d.Th.). Dieses 6-Methylpterin enthält noch Spuren von 7-Methylpterin, die aber bei der nächsten Stufe nicht störten und verschwanden.

6-Methyl-7,8-dihydropterin-hydrochlorid (X). Nach [7] hergestellt. Ausbeute 55%. Die Permanganatoxydation ergab nur isomerenfreie Pterin-6-carbonsäure. Signale¹⁾ im NMR.-Spektrum (Trifluoressigsäure): C(6)-CH₃: S, 2,65 ppm, 3 Pr.; C(7)H₂: S, 5,06 ppm, 2 Pr.; N(2')H₂ und N(8)H: br. S, 8,03 ppm, 3 Pr. Die erwartete Aufspaltung zwischen C(7)H₂ und N(8)H konnte nicht beobachtet werden.

6-Cyano-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (XI). In 50 ml 0,1N KOH, die unter Rühren während 1 Std. mit sauerstofffreiem Stickstoff gesättigt worden war, wurden 6 g KCN und 0,3 g (1,27 mMol)

¹⁾ S = Singulett, D = Dublett, T = Triplett, M = Multipllett, br: breit, Pr: Proton(en).

6-Methyl-7,8-dihydropterin-hydrochlorid (X) unter ständigem Stickstoffstrom aufgelöst. Nach 6-std. Rühren bei Zimmertemperatur wurde die Lösung auf 0° abgekühlt und unter Durchleiten von Stickstoff durch Zugabe von Eisessig auf pH 6,5 gebracht. Die weisse Fällung wurde nach einer halben Stunde abfiltriert, mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und bei Zimmertemperatur/12 Torr getrocknet: 0,21 g (0,935 mMol; 74%) XI als weisses, gegenüber Licht, Sauerstoff und Feuchtigkeit sehr unbeständiges Produkt. Sein UV.-Spektrum (Fig. 1) entspricht jenem von klassischen Tetrahydropterin. Signale im NMR.-Spektrum (Trifluoressigsäure): C(6)-CH₃: S, 1,86 ppm, 3 Pr.; C(7)H: D, J ≈ 14 Hz, 3,60 ppm, 1 Pr.; C(7)H': D, J ≈ 14 Hz, 4,10 ppm, 1 Pr. Massenspektrum: kein M⁺, 179 (m/e - HCN) (100%); 164 (76%); 132 (30%). C₈H₁₀N₆O · H₂O (224,22) Ber. C 42,86 H 5,35 N 37,50% Gef. C 42,49 H 5,27 N 36,89%

5-Acetyl-6-cyano-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (XII). Zu 30 ml Essigsäureanhydrid, die mit sauerstoffreiem Stickstoff gesättigt worden waren, gab man 1 ml Dimethylformamid, 0,5 ml

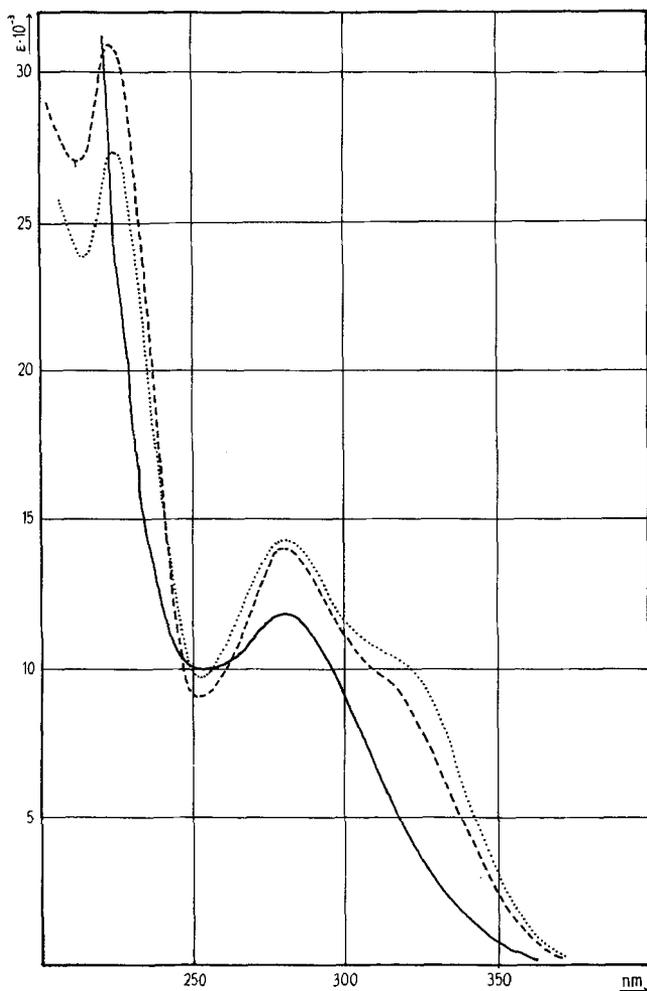


Fig. 3. UV.-Spektrum von 5-Acetyl-6-cyano-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (XII) in wässriger Lösung

..... 0,1N HCl - - - - - pH 6,8 ——— 0,1N NaOH

Dibutylphthalat und 0,1 g (0,45 mMol) Methyl-cyano-tetrahydropterin XI. Die Lösung wurde unter Licht- und Sauerstoffausschluss bei Zimmertemperatur 6 Std. gerührt. Das gebildete weisse Monoacetyltetrahydropterin XII wurde abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und getrocknet: 0,040 g (35%). Das UV.-Spektrum unterscheidet sich von jenem der klassischen Tetrahydropterine

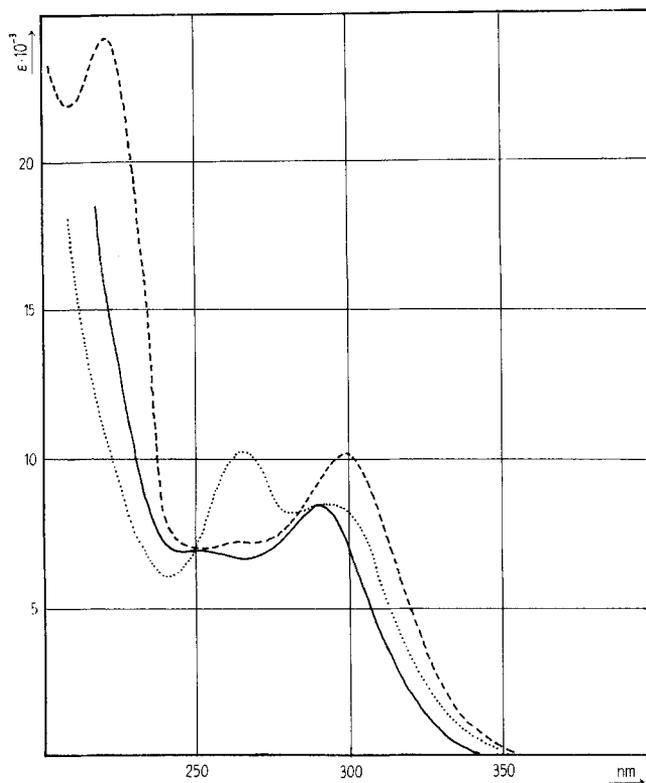


Fig. 4. UV.-Spektrum von 6-Aminomethyl-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (XIV) in wässriger Lösung

..... 0,1N HCl - - - - - pH 6,8 ——— 0,1N NaOH

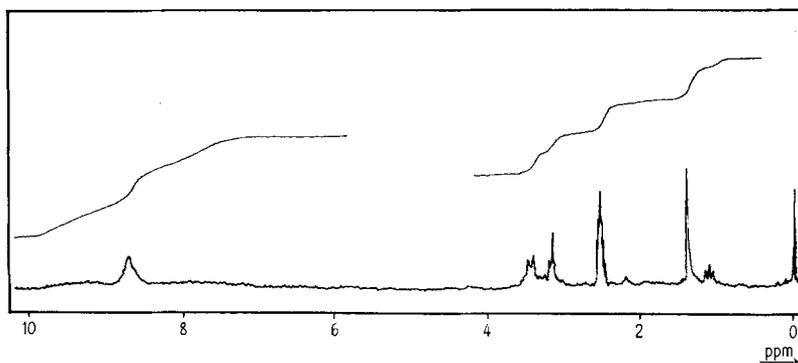


Fig. 5. NMR.-Spektrum von 6-Aminomethyl-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (XIV) in $(CD_3)_2SO$

durch seine bathochrome Verschiebung, insbesondere in neutralen und sauren Lösungen (Fig. 3). Signale im NMR.-Spektrum (Trifluoressigsäure): C(6)-CH₃: S, 1,88 ppm, 3 Pr; N(5)-CO-CH₃: S, 2,50 ppm, 3 Pr; C(7)-H und C(7)-H': 2 D, J ≈ 12,5 Hz, 3,64 und 4,10 ppm, 2 Pr.

C₁₀H₁₂N₆O₂ (248,24) Ber. C 48,38 H 4,87 N 33,86% Gef. C 48,46 H 5,16 N 32,77%

5-Acetyl-6-aminomethyl-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (XIII). 0,1 g (0,4 mMol) 5-Acetyl-6-cyano-6-methyl-tetrahydropterin (XII), in einer Mischung von 1 ml konz. HCl und 100 ml CH₃COOH gelöst, wurden mit 200 mg Platinoxid bei Atmosphärendruck und Zimmertemperatur hydriert. Die Aufnahme von 2 Mol-Äqu. Wasserstoff war nach 4 Std. beendet. Die Dauer der Hydrierung hängt stark vom Reinheitsgrad des Wasserstoffs ab; wir haben stets mit sorgfältig gereinigtem Wasserstoff gearbeitet. Nach Abzentrifugieren des Katalysators und Zugabe von 1 ml konz. HCl wurde die Lösung rasch auf 5 ml eingengt und mit 50 ml Äther versetzt, worauf die entstandene, sehr hygroskopische Fällung abzentrifugiert, 5mal mit Äther gewaschen und 20 Std.

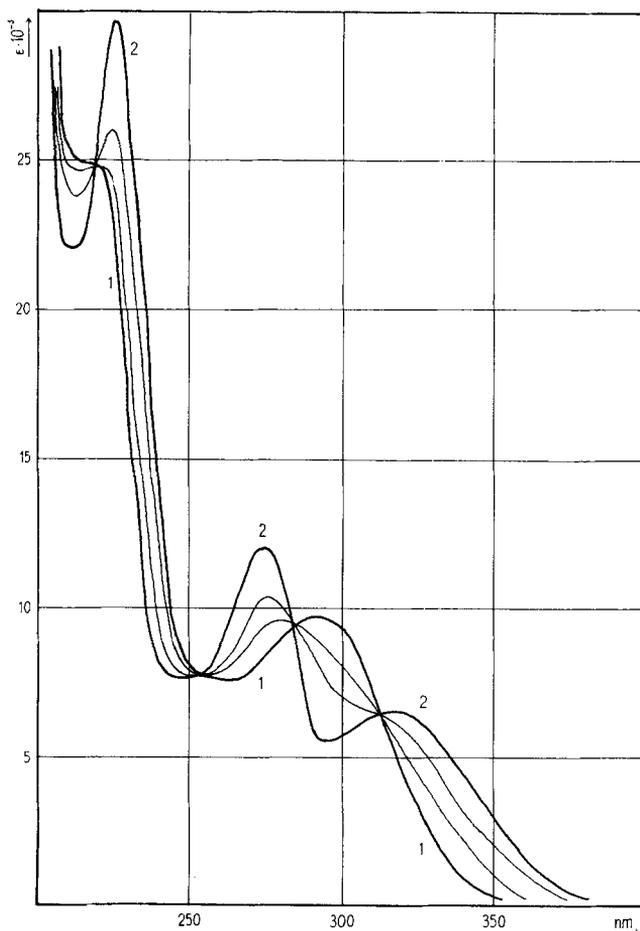


Fig. 6. Luftoxydation von Tetrahydropterin XIV in wässriger Lösung, pH 6,8

Kurve 1: Frische Lösung (Tetrahydropterin XIV); Kurve 2: Nach 45 Min. (6-Methyl-7,8-Dihydropterin (X)). Es sind in Zeitabständen von einer Viertelstunde aufgenommene UV.-Spektren eingezeichnet.

bei Zimmertemperatur/0,01 Torr getrocknet wurde: 0,095 g (70%) XIII. UV.-Spektrum: praktisch identisch mit jenem des Ausgangsproduktes XII. Die Signale im NMR.-Spektrum (Hexadeuterodimethylsulfoxid) lassen sich schwer zuteilen, da das Produkt in Lösung unbeständig ist und das Spektrum selbst kompliziert erscheint: C(6)-CH₃: S, 1,20 ppm; N(5)-COCH₃: S, 2,20 ppm; (CH₂)-NH₃⁺(?): M, 2,50 ppm; C(6)-CH₂- und C(7)H₂(?): M, 3–5 ppm.

$C_{10}H_{16}N_6O_2 \cdot 2HCl \cdot H_2O$	Ber. C 35,00	H 5,83	N 24,34	Cl 20,60%
(343,21)	Gef. „ 34,74	„ 5,35	„ 24,00	„ 19,75%

6-Aminomethyl-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin-trihydrochlorid (XIV). 0,1 g (0,29 mMol) N(5)-Acetylderivat XIII wurden unter Lichtausschluss im Stickstoffstrom in 6 ml absolutem Methanol gelöst und mit 12 ml 10N methanolischem HCl versetzt. Nach einer kurzen exothermen Reaktion begann die Ausscheidung von XIV. Nach weiteren 30 Min. wurde die Suspension auf 0° abgekühlt und zentrifugiert. Die weisse Fällung wurde mehrmals mit Äther gewaschen und getrocknet: 0,049 g (53%) XIV. UV.-Spektrum (Fig. 4): identisch mit jenem der klassischen Tetrahydropterine. Signale im NMR.-Spektrum (Hexadeuterodimethylsulfoxid; in CF₃COOH zersetzt sich das Produkt sofort): C(6)-CH₃: S, 1,38 ppm, 3 Pr; (CH₂)-NH₃⁺(?): M, 2,52 ppm, 3 Pr; C(6)-ClF₂- und C(7)H₂: M, 3–3,5 ppm, 4 Pr; N(2)H₂ br. S, 8,7 ppm, 2 Pr. Das Wasser der Lösung und die leicht austauschbaren Protonen erscheinen in einer breiten Bande von 7 bis 10 ppm (Fig. 5).

$C_8H_{14}N_6O \cdot 3HCl$	Ber. C 30,06	H 5,36	N 26,29	Cl 33,27%
(319,64)	Gef. „ 30,67	„ 5,86	„ 25,48	„ 32,00%

Lufloxydation von 6-Aminomethyl-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (XIV) in wässriger Lösung unter physiologischen Bedingungen. Das UV.-Spektrum einer Lösung von 0,261 mg XIV in 25 ml 0,1M Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 6,8) wurde alle 5 Min. gemessen (Fig. 6). Nach 45 Min. enthält die Lösung reines 6-Methyl-7,8-dihydropterin (X) neben Formaldehyd und Ammoniak [1]. Wird die Oxydation weitergeführt, so erhält man 6-Methylpterin.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 34. Mitteilung: M. Viscontini & M. Argenti, Liebigs Ann. Chem. 745 (1971), im Druck;
33. Mitteilung: M. Viscontini, M. Frater-Schroeder, M. Cogoli-Greuter & M. Argenti, Helv. 53, 1434 (1970).
- [2] M. Viscontini, Fortschr. chem. Forsch. 9, 605 (1968).
- [3] a) M. Viscontini & L. R. Weilenmann, Helv. 42, 1854 (1959); C. van Baalen & H. S. Forrest, J. Amer. chem. Soc. 81, 1770 (1959); b) H. S. Forrest, C. van Baalen, M. Viscontini & M. Piraux, Helv. 43, 1005 (1960); M. Viscontini, L. Merlini & W. von Philipsborn, Helv. 46, 1181 (1963); M. Viscontini & A. Bobst, Helv. 48, 816 (1965); A. Stuart, H. C. S. Wood & D. Duncan, J. chem. Soc. 1966, 285.
- [4] M. Viscontini & L. R. Weilenmann, Helv. 41, 2170 (1958).
- [5] W. R. Boon & T. Leigh, J. chem. Soc. 1951, 1497.
- [6] M. Viscontini, R. Provenzale & W. Frei, in Vorbereitung.
- [7] W. Pfeleiderer & H. Zondler, Chem. Ber. 99, 3008 (1966).