

186. Über Pterinchemie

43. Mitteilung [1]

Synthese von D-Neopterin-3'-phosphat und D-Neopterin-2',3'-cyclophosphat. Betrachtungen über die Biopterin-Biogenese¹⁾

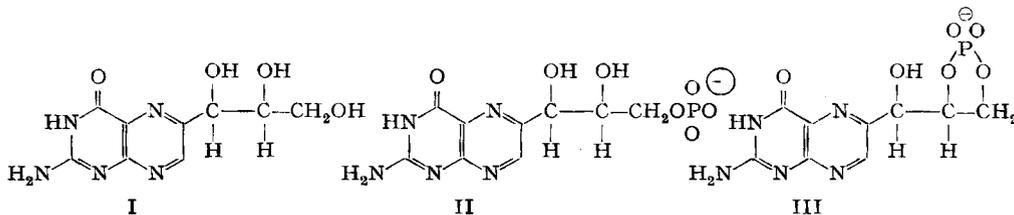
von Max Viscontini und Yoshiteru Furuta

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

(10. V. 73)

Zusammenfassung. Die Synthese des D-Neopterin-3'-phosphates (II) und des entsprechenden Cyclophosphates III wird beschrieben. Bei der Behandlung von D-Neopterin mit Polyphosphorsäure in der Wärme tritt Cyclisierung der Trihydroxypropyl-Kette mit dem N(5)-Atom unter Verlust von zwei Molekeln Wasser ein. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dieser leichten Wasserabspaltung und der Biogenese des Sepiapterins bzw. Biopterins wird diskutiert.

Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung von Goto [2] über die Synthese von 6-Trihydroxypropyl-pterin-phosphaten veranlasst uns, unsere eigene Arbeit auf dem gleichen Gebiet zu publizieren. Mit dem Ziel, die Biogenese des Biopterins zu untersuchen (schon publizierte Arbeiten auf diesem Gebiete siehe [3]) haben wir, in Anlehnung an die Synthese von 6-Hydroxymethyl-pterin-phosphat [1], eine entsprechende Synthese von 6-erythro-Trihydroxypropyl-pterin-3'-phosphat (D-Neopterin-3'-phosphat) (II) entwickelt²⁾.

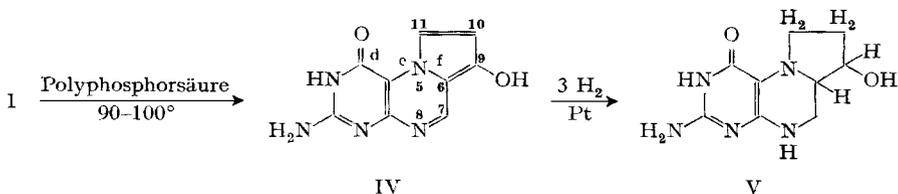


Da vermutlich das L-Monapterin-2',3'-cyclophosphat bei Mikroorganismen ziemlich verbreitet ist [2] [4], schien es uns ebenfalls wichtig, solche Pterin-cyclophosphate synthetisch herzustellen.

Behandelt man D-Neopterin (I) mit Polyphosphorsäure bei Zimmertemperatur, so entsteht eine Reihe von phosphorylierten Estern, weil die primären und sekundären Hydroxygruppen der Seitenkette gleichzeitig reagieren können, wie wir es schon bei der Synthese des Riboflavin-5'-phosphates [5] und des Glucose-6-phosphates [6] festgestellt hatten. Bei 90–100° wird eine andere Substanz gebildet, welche wir kristallin erhalten haben und der wir aufgrund der NMR-, MS- und UV.-Spektren und der Elementaranalyse die Struktur eines 9-Hydroxy-pyrrolo[5.6-f]-pterins (IV) zugeteilt haben.

¹⁾ Teil der geplanten Dissertation von Y. Furuta, Zürich 1973.

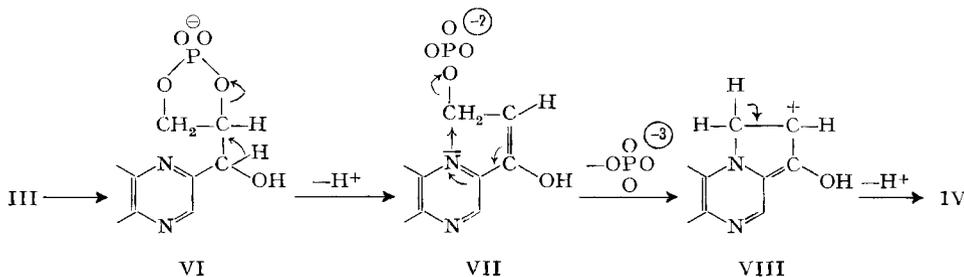
²⁾ Herr Prof. Dr. H. S. Forrest hat uns am 1. 7. 72 schriftlich mitgeteilt, dass ihm eine ähnliche Synthese mit L-Monapterin gelungen sei.



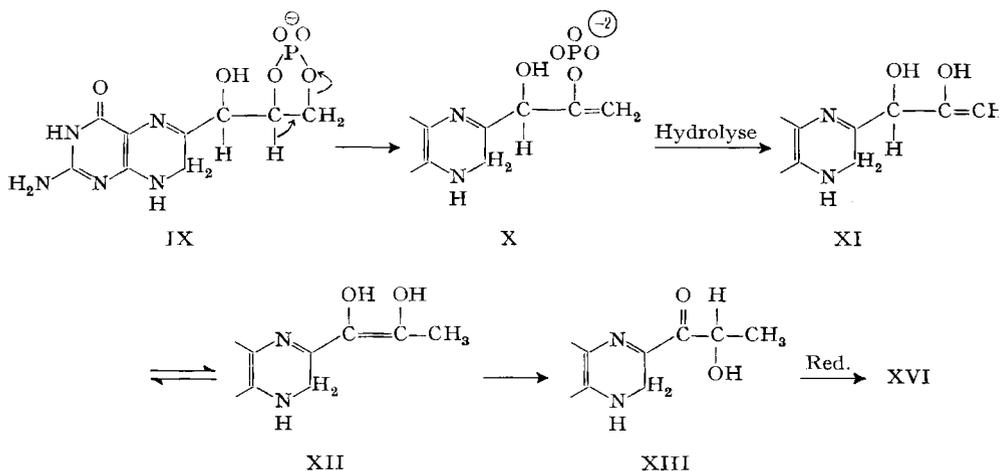
In Übereinstimmung mit dieser Struktur nimmt die Substanz IV bei katalytischer Hydrierung 3 Mol. H_2 auf und bildet ein Hexahydroderivat V, das das UV-Spektrum eines Tetrahydropterins aufweist.

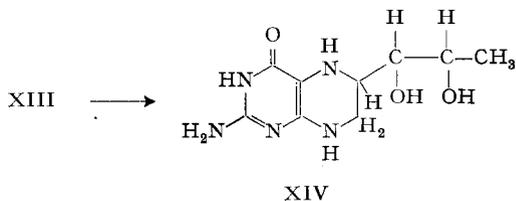
Die Bildung des Pyrrolo-pterins IV aus phosphorylierten Hydroxypropyl-pterinen scheint uns bedeutend, weil sie die Leichtigkeit der Entfernung von einer oder zwei Hydroxygruppen aus der Seitenkette beweist.

Ein möglicher Mechanismus ist in der Reaktionsfolge III \rightarrow VI \rightarrow VII \rightarrow VIII \rightarrow IV (s. Schema) dargestellt. Wir gehen vom Cyclophosphat III aus, weil solche Ester,

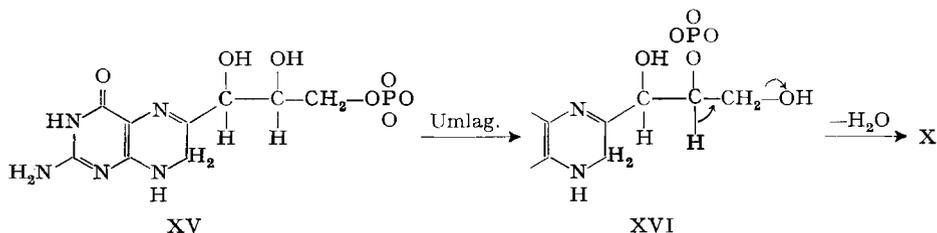


die in der Natur vorkommen, sehr reaktionsfähig sind und als Dihydroderivat IX zu Sepiapterin (XIII) bzw. Tetrahydrobiopterin (XIV) führen könnten, wie es folgendes, noch hypothetisches Reaktionsschema zeigt:





Obwohl uns dieser Mechanismus am wahrscheinlichsten erscheint, kann die Biosynthese des Sepiapterins auch von einem Phosphorsäureester XV ausgehen, wie es bei der Biosynthese der Brenztraubensäure der Fall ist:



Um die Bildung des Pyrrolo-pterins IV zugunsten jener des Neopterin-phosphates zu verdrängen, haben wir die chemische Phosphorylierung des Neopterin nicht mehr bei 90–100°, sondern bei Zimmertemperatur durchgeführt. Nach 24 Std. werden in der Reaktionsmasse neben nicht reagiertem Neopterin mittels Papierelektrophorese Neopterin-3'-phosphat und zahlreiche polyphosphorylierte, unbeständige Neopterin-ester nachgewiesen. Das Neopterin-3'-phosphat lässt sich bequem mittels Chromatographie auf Dowex 1×8-Säule gewinnen. Die Cyclisierung zu 2'-3'-Cyclophosphat geschieht mittels Dicyclohexylcarbo-diimid (DCC).

Wir danken Herrn Prof. Dr. *W. v. Philipsborn* für die Aufnahme der NMR.-Spektren, Herrn Prof. Dr. *M. Hesse* für die Aufnahme der MS.-Spektren, Herrn *H. Frohofer* für die Mikroanalysen und dem *Schweizerischen Nationalfonds* für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen: Die Phosphorsäureester sind hygroskopisch. Sie werden deshalb vor der Analyse mit Luft über Nacht equilibriert, nachdem man sie bei Zimmertemperatur/5 · 10⁻² Torr getrocknet hatte. Die NMR.-Spektren wurden mit einem *Varian A-60-* bzw. *HA-100 MHz-Kernresonanzspektrographen* gemessen (interner bzw. externer Standard: Tetramethylsilan); Abkürzungen: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *m* = Multipl., Pr = Proton(en).

KMnO₄-Oxydation der Pterine: 1 mg Pterinderivat, gelöst in 0,5 ml 0,1N NaOH, wird bei 80–90° tropfenweise mit einer verdünnten Lösung von KMnO₄ versetzt, bis die Lösung violett gefärbt bleibt. Danach wird das überschüssige KMnO₄ mit wenig Äthanol reduziert und das ausgefallene MnO₂ abfiltriert. Das mit CH₃COOH neutralisierte, klare Filtrat wird chromatographisch untersucht.

HJO₄-Oxydation der Pterine. 1 mg Pterinderivat, gelöst in 0,5 ml Wasser, wird bei Zimmertemperatur mit 5 mg NaJO₄ versetzt. Nach 48 Std. wird die Lösung chromatographisch untersucht.

D-Neopterin-3'-phosphat (II). Zu 3,25 g 85proz. Phosphorsäure gibt man 2,5 g P₂O₅. Die Mischung wird mit einem Glasstab gerührt, bis eine klare Masse gebildet wird. Nach dem Erkalten

auf Zimmertemperatur wird 1 g D-Neopterin zugegeben und die Mischung wiederum mit dem Glasstab gerührt, bis die Masse homogen wird. Man lässt die trübe Masse in einem Exsikkator über CaCl_2 bei Zimmertemperatur 24 Std. stehen, wobei sie klar wird. Hierauf gibt man 200 ml Eiswasser zu. Durch Papierchromatographie und Papierelektrophorese stellt man die Anwesenheit folgender Substanzen in der Lösung fest: D-Neopterin, D-Neopterin-3'-phosphat und zahlreiche polyphosphorylierte, unbeständige Ester. Zur Trennung des D-Neopterin-3'-phosphates wird die Lösung über eine mit Dowex 1×8 (H^+) beschickte Säule (4×25 cm) chromatographiert, wobei man mit 1proz. Essigsäure eluiert. Zunächst kommen die freien Polyphosphorsäuren, gefolgt von den Neopterin-polyphosphaten, dann das Neopterin-3'-phosphat (II). Das den Ester II enthaltende Eluat wird im Rotationsverdampfer (30° Badtemperatur) eingedampft. Der Rückstand wird in 200 ml Wasser gelöst und wiederum über eine mit Dowex 1×8 (HCOO^-) beschickte Säule (3×20 cm) chromatographiert. Man eluiert am Anfang mit 200 ml H_2O und darauf mit 1N HCOOH . Das den fluoreszierenden Ester II enthaltende Eluat wird im Rotationsverdampfer (30°) eingedampft. Der Rückstand wird in 50proz. HCOOH (minimale Menge) aufgenommen, vom Unlöslichen abfiltriert, mit Äthanol gefällt, abzentrifugiert, je dreimal mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet: 460 mg weisses Pulver. $[\alpha]_D^{25}$: $+21,8^\circ$ (0,1N HCl , $c = 1,0$). NMR.-Spektrum (100 MHz, 1N NaOD , Fig. 1): $\text{C}(3')\text{H}_2$: t, 4,92 ppm, 3 Pr; $\text{C}(2')\text{H}$:

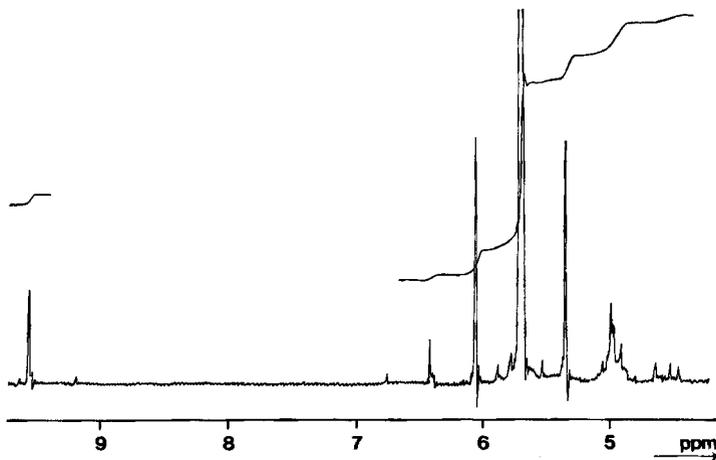


Fig. 1. NMR.-Spektrum von D-Neopterin-3'-phosphat (II) in 1N NaOD aufgenommen
Erläuterungen siehe im experimentellen Teil

m , 4,42–4,63 ppm, 1 Pr; $\text{C}(1')\text{H}$: erscheint mit im H_2O -Signal; $\text{C}(7)\text{H}$: s, 9,50 ppm, 1 Pr. Das UV.-Spektrum (Fig. 2) ist mit jenem der klassischen Pterine identisch.

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_7\text{N}_5\text{P} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Ber. C 27,89	H 4,69	N 18,08	P 8,01	P (hydrolys.) 0 %
(387,26)	Gef. „ 28,04	„ 4,04	„ 17,89	„ 7,61	„ 0,09%

Der Ester II lässt sich mit NaJO_4 zu 6-Formylpterin oxydieren.

D-Neopterin-2',3'-cyclophosphat (III). Eine Suspension von 500 mg Neopterin-3'-phosphat (II), in 5 ml H_2O + 50 ml Pyridin wird mit 11 g DCC versetzt, 3 Tage bei Zimmertemperatur geschüttelt, dann mit 700 ml H_2O versetzt und filtriert. Das Filtrat wird im Rotationsverdampfer (30°) eingedampft, der Rückstand in dem minimalen Volumen 1proz. NH_4OH gelöst, mit dem 2fachen Volumen Methanol verdünnt und über eine mit trockenem Cellulosepulver beschickte und gegenüber Isopropylalkohol/1proz. NH_4OH (2:1) equilibrierte Säule ($8,5 \times 30$ cm) chromatographiert: 3 blaue fluoreszierende Banden trennen sich voneinander, die zweite entspricht dem cyclischen Phosphat III. Das dieses Produkt enthaltende Eluat wird im Rotationsverdampfer (30°) eingedampft, der Rückstand in 25 ml Wasser aufgenommen und über eine mit CM-Sephadex (H^+) beschickte Säule (3×20 cm) chromatographiert. Wasser wird als Elutionsmittel verwendet. Das das blau fluoreszierende Cyclophosphat enthaltende Eluat wird im Rotationsverdampfer

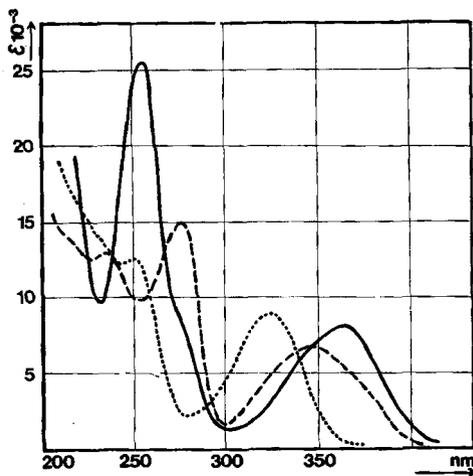


Fig.2. UV.-Spektren von D-Neopterin-3'-phosphat (II) und von D-Neopterin-2',3'-cyclophosphat (III)
 0,1N HCl ----- Phosphatpuffer pH 6,8 ————— 0,1N NaOH

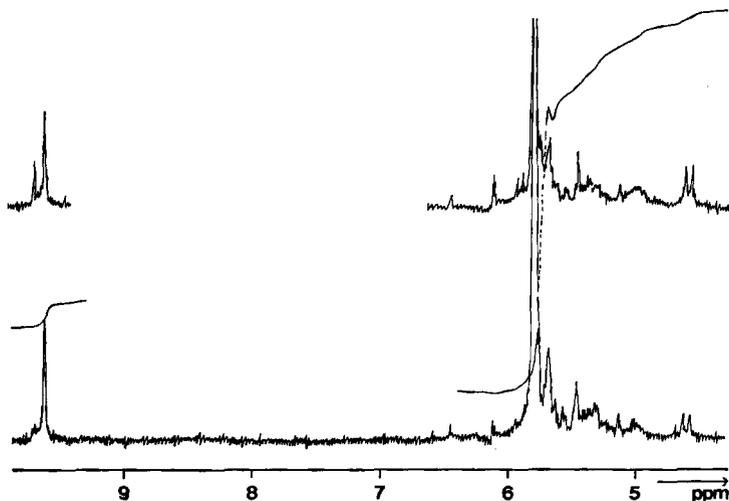


Fig. 3. NMR.-Spektrum von D-Neopterin-2',3'-cyclophosphat (III) in 1N NaOD aufgenommen
 Der cyclische Ester ist unbeständig und wird schon nach 15 Min. teilweise zu Neopterin-3'-phosphat hydrolysiert (obere Kurve)

(25°) eingedampft. Den Rückstand löst man in minimalem Volumen H_2O auf, filtriert die trübe Lösung und versetzt das klare Filtrat mit Äthanol, bis eine Trübung entsteht. Nach 15 Std. Stehen im Kühlschrank werden die gebildeten Mikrokristalle abzentrifugiert, einmal mit 50proz. Äthanol, je dreimal mit Äthanol und Äther gewaschen und im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet: 150 mg strohgelbes Pulver. NMR.-Spektrum (100 MHz, 1N NaOH, Fig. 3): C(1')H, C(2')H, C(3')H: m, 4,55–5,70 ppm, 3 Pr; C(7)H: s, 9,62 ppm, 1 Pr. Das UV.-Spektrum stimmt mit jenem des Neopterin-3'-phosphates (Fig. 2) völlig überein.

$C_9H_{10}O_6N_5P \cdot 5H_2O$	Ber. C 26,68	H 4,94	N 17,28	P 7,65%
(405,2)	Gef. „ 25,95	„ 3,67	„ 17,95	„ 7,62%

Der Cyclophosphat-ester III wird von NaJO_4 nicht angegriffen. Er wird jedoch in 1N HCl oder NaOH bei 100° in 10 Min. oder bei Zimmertemperatur in einigen Stunden vollkommen zu Neopterin-3'-phosphat hydrolysiert.

Tabelle I. *Rf*-Werte der Dünnschichtchromatographie auf MN-PORYGRAM Cel 300.

Laufmittel: A = 3proz. NH_4Cl ; B = 4proz. Na_2HPO_4 ; C = Propanol-2/2proz. CH_3COONa (1:1); D = Propanol-2/1proz. NH_4OH (2:1); E = *n*-Butanol/ $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ (20:3:7)

Verbindung	Laufmittel				
	A	B	C	D	E
D-Neopterin	0,70	0,70	0,56	0,52	0,33
D-Neopterin-3'-phosphat	0,84	0,93	0,36	0,07	0,06
D-Neopterin-2', 3'-cyclophosphat	0,83	0,83	0,56	0,41	0,09
6-Formyl-pterin	0,36	0,42	0,65	0,46	0,55
Pterin-6-carbonsäure	0,51	0,54	0,32	0,20	0,29

Tabelle II. *Papier*elektrophorese in 0,05M Phosphatpuffer
pH 5,8; Dauer $1\frac{1}{2}$ Std.; Spannung 15 V/cm; 1 mA/cm Streifenbreite

Verbindung	Wanderung zur Anode in mm
D-Neopterin	- 5
D-Neopterin-3'-phosphat	+ 27
D-Neopterin-2', 3'-cyclophosphat	+ 26

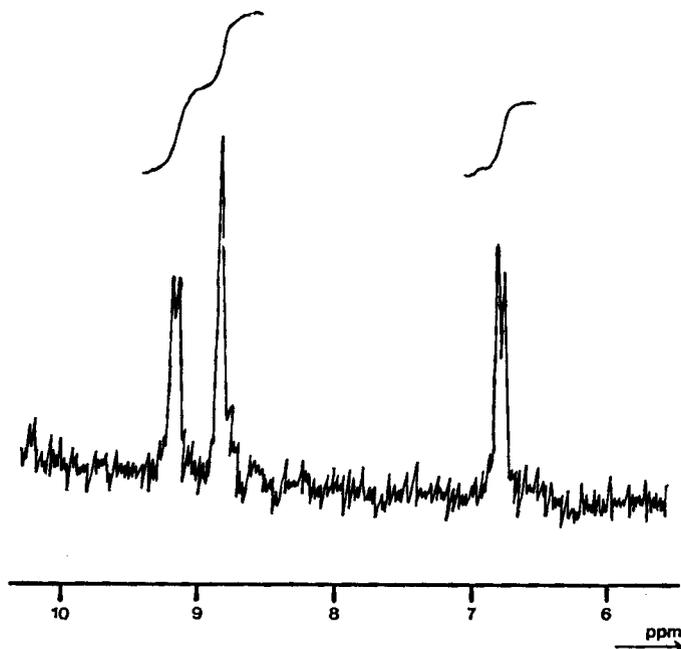


Fig. 4. NMR.-Spektrum von Pyrrolo-pterin (IV) in CF_3COOH aufgenommen

9-Hydroxy-pyrrolo-pterin (IV). Zu 325 mg 85proz. Phosphorsäure gibt man 250 mg P_2O_5 . Die Mischung wird mit einem Glasstab gerührt, bis eine klare Masse gebildet wird. Daraufhin wird das Reaktionsgefäß in ein Ölbad von 90–100° gebracht und der Polyphosphorsäure werden 100 mg *D*-Neopterin zugegeben. Man hält die gelbe Masse unter Rühren mit dem Glasstab 15 Min. bei 100°, wobei sie langsam rot wird, kühlt sie ab, versetzt sie mit 20 ml Eiswasser und lässt sie 15 Std. im Kühlschrank stehen. Das ausgefallene orangefarbene Produkt wird abzentrifugiert, je dreimal mit Eiswasser, Äthanol und Äther gewaschen und in minimaler Menge 1proz. CF_3COOH gelöst. Die Lösung wird über eine mit CM-Sephadex (H^+) beschickte Säule (4 × 30 cm) unter Elution mit 4proz. $HCOOH$ chromatographiert. Die gelbgefärbte Zone wird aufgefangen und im Rotationsverdampfer (30°) eingedampft. Umkristallisation des Rückstandes durch Auflösen in minimaler Menge CF_3COOH , Filtration und Zugabe von Wasser. Nach 24 Std. Stehen im Kühlschrank werden die orangefarbenen Kristalle abzentrifugiert, einmal mit Eiswasser, je dreimal mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet: 62 mg (47%). Das Produkt kristallisiert mit 1 Mol CF_3COOH . NMR.-Spektrum (60 MHz, CF_3COOH , Fig. 4): C(10)H, *d*, 6,83 ppm, 1 Pr; C(7)H, *s*, 8,82 ppm, 1 Pr; C(11)H, *d*, 9,17 ppm, 1 Pr. Massenspektrum: *m/e* 217 (Molekularpik). UV.-Spektrum: Siehe Fig. 5.

$C_9H_7O_2N_5 \cdot CF_3COOH$ (331,22) Ber. C 39,89 H 2,42 N 21,14% Gef. C 39,10 H 2,42 N 20,65%

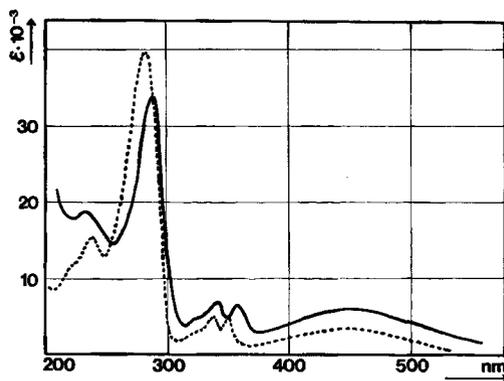


Fig. 5. UV.-Spektrum von Pyrrolo-pterin (IV) in 0,1N HCl ————— in 0,1N NaOH

6,7,8,9,10,11-Hexahydro-9-hydroxy-pyrrolo-pterin (V). 100 mg Pyrrolo-pterin IV werden in 10 ml CF_3COOH mit 50 mg PtO_2 reduziert (760 mm, 25°). Nach 40 Min. ist die Aufnahme von 3 Mol-Äqu. H_2 beendet. Die Lösung wird unter Stickstoff vom Katalysator abfiltriert, mit 5 ml einer mit SO_2 gesättigten 0,015N H_2SO_4 -Lösung versetzt, auf 1 ml im Vakuum eingengt und mit Äthanol versetzt, bis eine erste Trübung entsteht. Nach 15 stdg. Stehenlassen im Kühlschrank wird die hexahydrierte Substanz abzentrifugiert, je dreimal mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 95 mg eines farblosen Sulfates. Das UV.-Spektrum stimmt mit jenem des echten Tetrahydropterins überein (λ_{max} : 264 nm, 0,1N HCl).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 42. Mitteilung: *M. Viscontini & Yoshiteru Furuta*, *Helv.* 56, 1710 (1973).
- [2] *K. Sugiura, H. Yamashita & M. Goto*, *Bull. chem. Soc. Japan*, 45, 3564 (1972).
- [3] *T. Fukushima*, *Arch. biochemistry Biophysics* 139, 361 (1970); *S. Katoh, M. Nagai, Y. Nagai, T. Fukushima & M. Akino*, in "Chemistry and Biology of Pteridines", Intern. Acad. Print. Co., Tokyo, 1970, 225; *H. Rembold & W. L. Gyure*, *Angew. Chem.* 84, 1088 (1972).
- [4] *G. Guroff & C. A. Rhoads*, *J. biol. Chemistry* 244, 142 (1969); *T. Urushibara, H. S. Forrest, D. S. Hoare & R. N. Patel*, *Biochem. J.* 125, 141 (1971).
- [5] *M. Viscontini, C. Ebnöther & P. Karrer*, *Helv.* 35, 457 (1952).
- [6] *M. Viscontini & C. Olivier*, *Helv.* 36, 466 (1953).