

## 258. Über Pterinchemie

68. Mitteilung [1]

### Regiospezifische Deuterierungen von Folsäure

von Esam Khalifa, Hans-Jürg Furrer, Jost H. Bieri und Max Viscontini

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

Herrn Prof. Dr. E. Lederer zum 70. Geburtstag gewidmet

(1.V.78)

---

#### Regiospecific deuteration of folic acid

##### *Summary*

Introduction of a nitroso function at the N(10)-position of folic acid activates the C(9)-hydrogen atoms in such a way, that the exchange of H with D at this position, in NaOD-solution, is extremely facilitated. This fact is utilized in the synthesis of 9,9-dideuterio-folic acid (IV), 7,9,9-trideuterio-folic acid (VII) and 7-deuterio-folic acid (IX). These three products are necessary for the <sup>1</sup>H-NMR.-spectroscopical determination of the conformation of 5,6,7,8-tetrahydrofolic acid and its derivatives.

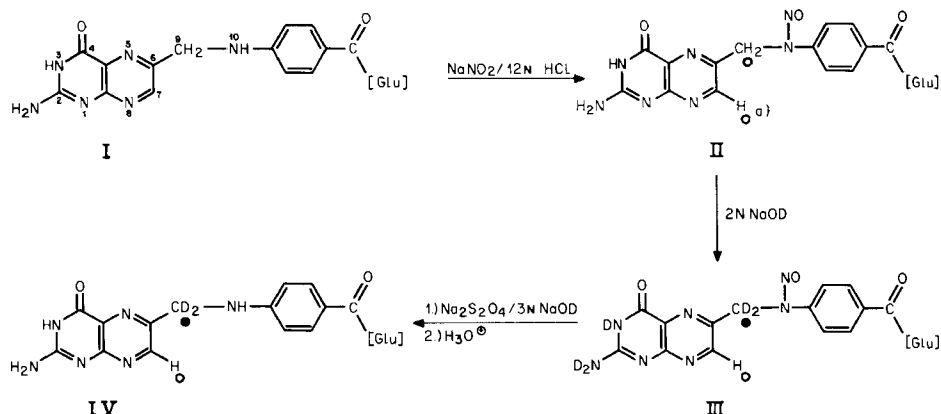
---

Im Anschluss an Strukturuntersuchungen an 5,6,7,8-Tetrahydropterinen dehnten wir unsere Arbeiten auf die Derivate der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure-Reihe aus [2]. Dabei zeigte es sich, dass zur <sup>1</sup>H-NMR.-spektroskopischen Konformationsanalyse Produkte mit hoher Deuterium-Einbaurate (92-95%) benötigt werden. In der vorliegenden Mitteilung beschreiben wir die regiospezifischen Deuterierungen der Folsäure (I) in den Stellungen 7, 7 und 9, sowie 9 (*Schemata 1-3*).

Für die Synthese von 9,9-Dideuterio-folsäure (IV) wurde I an N(10) nitrosiert [3]. Durch Behandlung der erhaltenen N(10)-Nitroso-folsäure (II) mit Natriumdeuteriumoxid-Lösung, wurde an C(9) ein leichter H/D-Austausch bewerkstelligt, welcher zu 9,9-Dideuterio-N(10)-nitroso-folsäure (III) führte. Dies kann auf die -I-Effekte des Pyrazin-Ringes einerseits und der N(10)-Nitroso-Funktion andererseits zurückgeführt werden, welche die Acidität der zwei C(9)-Protonen erhöhen. Anschliessend liess sich die Nitrosogruppe in III selektiv durch Behandlung mit alkalischer Natriumdithionit-Lösung reduktiv entfernen, wobei IV erhalten wurde (*Schema 1*).

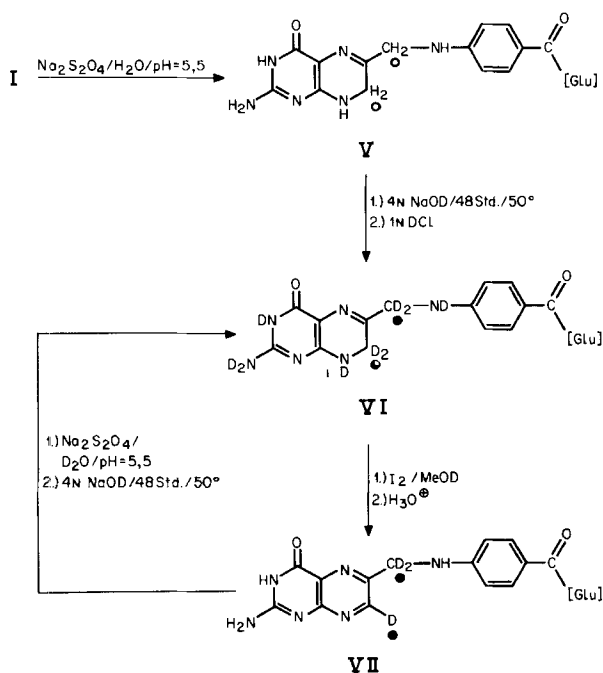
Zur Herstellung von 7,9,9-Trideuterio-folsäure (VII) wurde I vorerst zu 7,8-Dihydrofolsäure (V) reduziert [4]. Darauf wurden in V dank der N(5),C(6)-Iminstruktur basenkatalysiert die dazu  $\alpha$ -ständigen C(7)- und C(9)-Wasserstoffatome gegen

Schema 1



- <sup>a)</sup> Die gegen Deuterium auszutauschenden Wasserstoffatome werden mit ○ markiert. Nach erfolgter <sup>2</sup>H-Substitution wird die entsprechende Stelle mit ● bezeichnet.

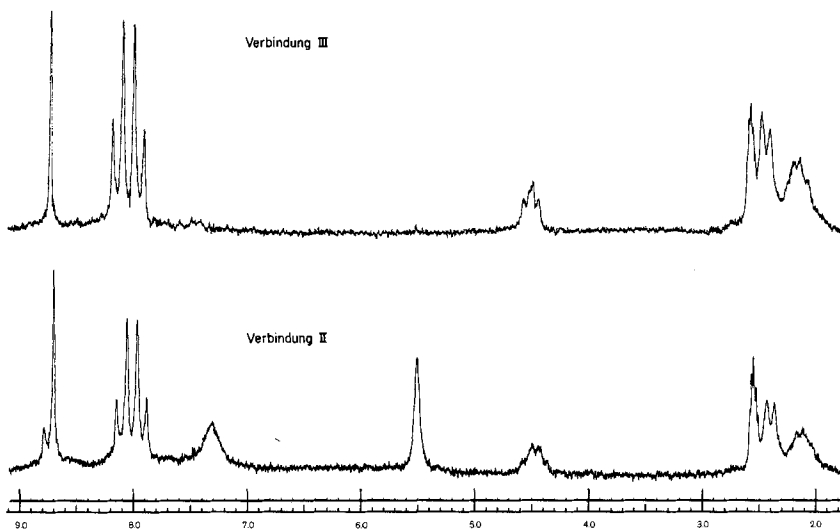
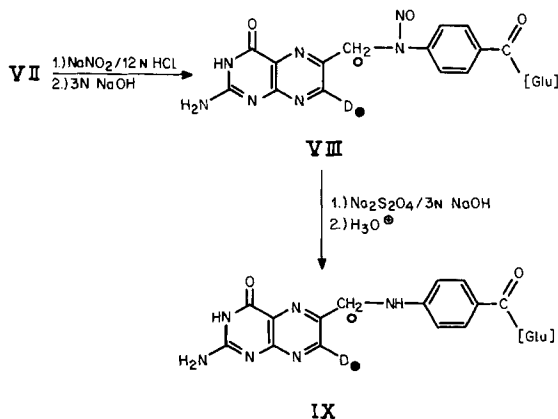
Schema 2



Deuterium ausgetauscht [5]<sup>1)</sup>. An C(7) wurde jedoch nur eine D-Einbaurrate von 80–85% erreicht. Durch Oxydation in methanolischer Jod-Lösung konnte VII erhalten werden.

<sup>1)</sup> Dieses Ergebnis widerspricht dem in [6] angegebenen, wo mitgeteilt wird, dass kein Tritiumeinbau an C(9) der 7,8-Dihydrofolsäure (V) beobachtet werden konnte.

Schema 3



Figur.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (100 MHz) von II und III in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

Zur Erhöhung des Deuterierungsgrades an C(7) wurde VII unter Verwendung von  $\text{D}_2\text{O}$  zu VI reduziert, anschliessend mit deuterierter Base behandelt und zu VII zurückoxydiert. Zur Erreichung einer D-Einbaurate von 92–95% in VII musste dieser Reduktions-Oxydations-Zyklus zweimal durchgeführt werden (Schema 2).

Zur Synthese von 7-Deuterio-folsäure (IX) wurde von VII ausgegangen, da VII das D-C(7) bereits enthält und dieses nicht mehr ausgetauscht wird. Nach Nitrosierung und Behandlung mit Base wurde VIII erhalten, deren Nitroso-Gruppe selektiv mit alkalischer Natriumdithionit-Lösung reaktiv entfernt wurde (Schema 3).

Wir danken Herrn E. Vonbank (Abteilung von Herrn Prof. Dr. W. von Philipsborn) für seine Hilfe bei der Aufnahme der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren.

## Experimenteller Teil

**1. Allgemeine Bemerkungen.** - Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden auf einem *Varian-HA-100-NMR*-Spektrographen in  $\text{NaOD}$  und  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  (Standard: Tetramethylsilan) aufgenommen; chemische Verschiebungen in ppm; Abkürzungen: *s*=Singulett, *qa*=Quartett, *m*=Multipllett, *br.*=breit, *H*=Proton(en). Alle  $\text{NaOD}$ -Proben wurden in einem Handschuhkasten (Inertgas:  $\text{N}_2$ ) hergestellt. Die beschriebenen deuterierten Verbindungen wiesen eine Deuterium-Einbaurrate von 92-95% auf.

**2. N(10)-Nitroso-folsäure (II).** Die Verbindung wurde nach [3] hergestellt. -  $^1\text{H-NMR}$ . (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) (*Fig.*): 8,75 (*d*,  $J=8$  Hz,  $\text{HN-C}(a)$ ); 8,68 (*s*,  $\text{H-C}(7)$ ); 8,08 und 7,94 (*A*- und *B*-Teil eines *AA'BB'*-Systems,  $J=9$  Hz, 4 arom. H); 7,50-7,15 (*br. s*, 2  $\text{H-N}(2')$ ); 5,50 (*s*, 2  $\text{H-C}(9)$ ); 4,64-4,32 (*m*,  $\text{H-C}(a)$ ); 2,55-1,90 (*m*, 2  $\text{H-C}(\beta)$  und 2  $\text{H-C}(\gamma)$ ).

**3. 9,9-Dideuterio-N(10)-nitroso-folsäure (III).** Die unter  $\text{N}_2$  hergestellte Lösung von 1 g (2,12 mmol) II in 10 ml 2N  $\text{NaOD}$  wurde nach 24stdg. Stehenlassen bei  $30^\circ$  mit 15 ml  $\text{D}_2\text{O}$  verdünnt und unter Rühren mit 2N  $\text{DCl}$  bis zu einem pH von 3 versetzt. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit  $\text{D}_2\text{O}$  gewaschen und getrocknet ( $40^\circ/0,01$  Torr, 12 Std.). Zur Erreichung der geforderten Deuterium-Einbaurrate wurde die obige Vorschrift einmal wiederholt. Ausbeute: 850 mg (84%) III. -  $^1\text{H-NMR}$ . (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) (*Fig.*): Analoges Spektrum wie unter 2. beschrieben, jedoch ohne die  $\text{HN-}$  und 2  $\text{H-C}(9)$ -Resonanzen. Das  $\text{H-C}(a)$ -Proton der Glutaminsäureeinheit absorbiert als *qa*-artiges *m* (Teil eines *ABX*-Systems).

**4. 9,9-Dideuterio-folsäure (IV).** Die in einem Handschuhkasten (Inertgas:  $\text{N}_2$ ) hergestellte Lösung von 1 g (2,10 mmol) III in 15 ml 3N  $\text{NaOD}$  wurde mit 1 g (5,74 mmol)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  versetzt, 72 Std. bei  $22^\circ$  stehengelassen, unter Luftzutritt filtriert, mit 40 ml  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und auf  $0^\circ$  gekühlt. Durch Zugabe von 3N  $\text{HCl}$  bis pH 2,8 ( $0^\circ$ ) fiel IV aus. Es wurde sofort abzentrifugiert ( $0^\circ$ ), mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, getrocknet ( $40^\circ/0,01$  Torr, 12 Std.) und anschließend in 12 ml 5N  $\text{NaOH}$  gelöst, die Lösung mit Aktivkohle behandelt, filtriert und stehengelassen (48 Std.,  $-5^\circ$ ). Das ausgefallene Natriumsalz von IV wurde bei  $0^\circ$  abzentrifugiert, in 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst ( $22^\circ$ ), das pH mittels 1N  $\text{HCl}$  auf 2,8 gebracht, wobei das Produkt IV ausfiel. Abzentrifugieren, waschen mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Trocknung ( $40^\circ/0,01$  Torr, 12 Std.) ergaben 570 mg (61%) IV. -  $^1\text{H-NMR}$ .: Entspricht dem in [7] aufgeführten Spektrum, jedoch ohne Pik 2  $\text{H-C}(9)$ ; (100 MHz;  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ): 9,03 (*s*,  $\text{H-C}(7)$ ); 8,52 (*d*,  $J=8$  Hz,  $\text{HN-C}(a)$ ); 8,04 und 7,02 (*A*- und *B*-Teil eines *AA'BB'*-Systems,  $J=9$  Hz, 4 arom. H); 7,34 (*br. s*, 2  $\text{H-N}(2')$ ); 4,90-4,60 (*m*,  $\text{H-C}(a)$ ); 2,80-2,20 (*m*, 2  $\text{H-C}(\beta)$  und 2  $\text{H-C}(\gamma)$ ).

**5. 7,8-Dihydrofolsäure (V).** Herstellung nach [4]. -  $^1\text{H-NMR}$ .: Entspricht den in [5] und [7] beschriebenen Spektren.

**6. 7,7,9,9-Tetradeuterio-7,8-dihydrofolsäure (VI)<sup>2</sup>.** Die Lösung von 1 g (2,25 mmol) V in 5 ml 4N  $\text{NaOD}$  wurde 24 Std. bei  $50^\circ$  unter Lichtausschluss gerührt, mit 20 ml  $\text{D}_2\text{O}$  verdünnt ( $22^\circ$ ) und das pH mit 1N  $\text{DCl}$  auf pH 3 gebracht. Die voluminöse Fällung VI wurde abzentrifugiert und getrocknet ( $40^\circ/0,01$  Torr, 12 Std.). Nach einmaliger Wiederholung obiger Vorschrift wurde eine D-Einbaurrate in Stellung 7 von 85% beobachtet (vgl. [5] und *Schema 2*). Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Trocknung ( $40^\circ/0,01$  Torr, 12 Std.) ergaben 820 mg (80%) VI. -  $^1\text{H-NMR}$ .: Analoge Spektren wie unter [5] und [7] beschrieben, jedoch ohne Pik 2  $\text{H-C}(9)$  und zu 15% Pik 2  $\text{H-C}(7)$ .

**7. 7,9,9-Trideuterio-folsäure (VII).** Unter Einleitung von Stickstoff und Rühren wurde 1 g (2,21 mmol) VI in 40 ml  $\text{D}_2\text{O}$  aufgeschlämmt und durch tropfenweise Zugabe von 1N  $\text{NaOD}$  in Lösung gebracht. Danach wurden 570 mg (2,24 mmol) Jod, gelöst in 10 ml Monodeuteriomethanol, langsam zugetropft, wobei das pH im Bereich zwischen 7 und 9 gehalten wurde (Korrektur mit 1N  $\text{NaOD}$ ). Anschließend wurde auf  $40^\circ$  erwärmt, Aktivkohle zugegeben und 15 Min. gerührt. Nach Filtration wurde das pH bei  $22^\circ$  mit 2N  $\text{HCl}$  auf 2,8 gebracht, wobei VII ausfiel. Das Produkt wurde abzentrifugiert, mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Methanol gewaschen, in 400 ml  $\text{H}_2\text{O}$  unter Einleitung von  $\text{N}_2$  aufgeschlämmt

<sup>2</sup>) Die Herstellung von VI erfolgte in einem Handschuhkasten (Inertgas:  $\text{N}_2$ ).

und die Mischung auf 80° gebracht. Durch tropfenweise Zugabe von 0,1 N NaOH trat bei einem pH von 10 Auflösung ein. Nach Zugabe von 150 mg Aktivkohle, 15 Min. Rühren bei 80° wurde heiss filtriert und anschliessend das Filtrat bei 90° durch Zugabe von 12 N HCl auf pH 3 gebracht. Stehenlassen (22°, 24 Std.), abzentrifugieren, waschen mit H<sub>2</sub>O und Trocknung (40°/0,01 Torr, 6 Std.) ergaben 730 mg (73,5%) kristallines VII (D-C(7)-Einbaureate: 80-85%).

Um die gewünschte D-Einbaureate zu erhalten, wurde VII nochmals nach [4] unter Verwendung der entsprechenden deuterierten Reagentien, jedoch ohne Verwendung von Ascorbinsäure nach [5] im Handschuhkasten (Inertgas: N<sub>2</sub>) zu VI reduziert, wie unter 6 beschrieben mit 4N NaOD behandelt und anschliessend mit Jod, wie oben beschrieben, zu VII oxydiert (vgl. dazu *Schema 2*). Nochmalige Wiederholung des Reduktions-Oxydations-Zyklus ergab in Stellung 7 einen Deuteriumgehalt von 92-95%. - <sup>1</sup>H-NMR.: Analoge Spektren wie unter 4. aufgeführt, jedoch ohne Pik für H-C(7).

**8. 7-Monodeuterio-N(10)-nitroso-folsäure (VIII).** VII wurde nach [3] in Stellung 10 nitrosiert. Der D/H-Austausch an C(9) wurde wie unter 3 beschrieben ausgeführt, jedoch unter Verwendung von 2 N NaOH bei 40°. - <sup>1</sup>H-NMR.: Wie unter 2. beschrieben, jedoch ohne Pik für H-C(7).

**9. 7-Monodeuterio-folsäure (IX).** Herstellung wie unter 4 beschrieben, aber unter Verwendung von 3 N NaOH. - <sup>1</sup>H-NMR.: Entspricht den in [7] und unter 4. aufgeführten Spektren, jedoch ohne Pik für H-C(7).

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 67. Mitt.: S. Antoulas, J. H. Bieri & M. Viscontini, *Helv.* 61, 2246 (1978).
- [2] H.-J. Furrer, J. H. Bieri & M. Viscontini, *Helv.* 61, 2731 (1978).
- [3] D. B. Cosulich & J. M. Smith, Jr., *J. Amer. chem. Soc.* 71, 3574 (1949).
- [4] S. Futtermann, *J. biol. Chemistry* 228, 1031 (1957); R. L. Blakley, *Nature* 188, 231 (1960).
- [5] W. Frick, Dissertation, Universität Zürich 1975.
- [6] S. F. Zakrzewski, E. A. Evans & R. F. Phillips, *Analyt. Biochemistry* 36, 197 (1970).
- [7] M. Poe, *J. biol. Chemistry* 248, 7025 (1973).