

## 141. Über Pterinchemie

70. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Konformationsanalyse von 5, 10-Methenyl-(6*RS*)-5, 6, 7, 8-tetrahydro-L-folsäure<sup>2)</sup>

von Esam Khalifa, Jost H. Bieri und Max Viscontini

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich-Irchel, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Dreiding zum 60. Geburtstag gewidmet

(19.II.79)

#### Conformational analysis of 5,10-methenyl-(6*RS*)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folic acid<sup>2)</sup>

##### Summary

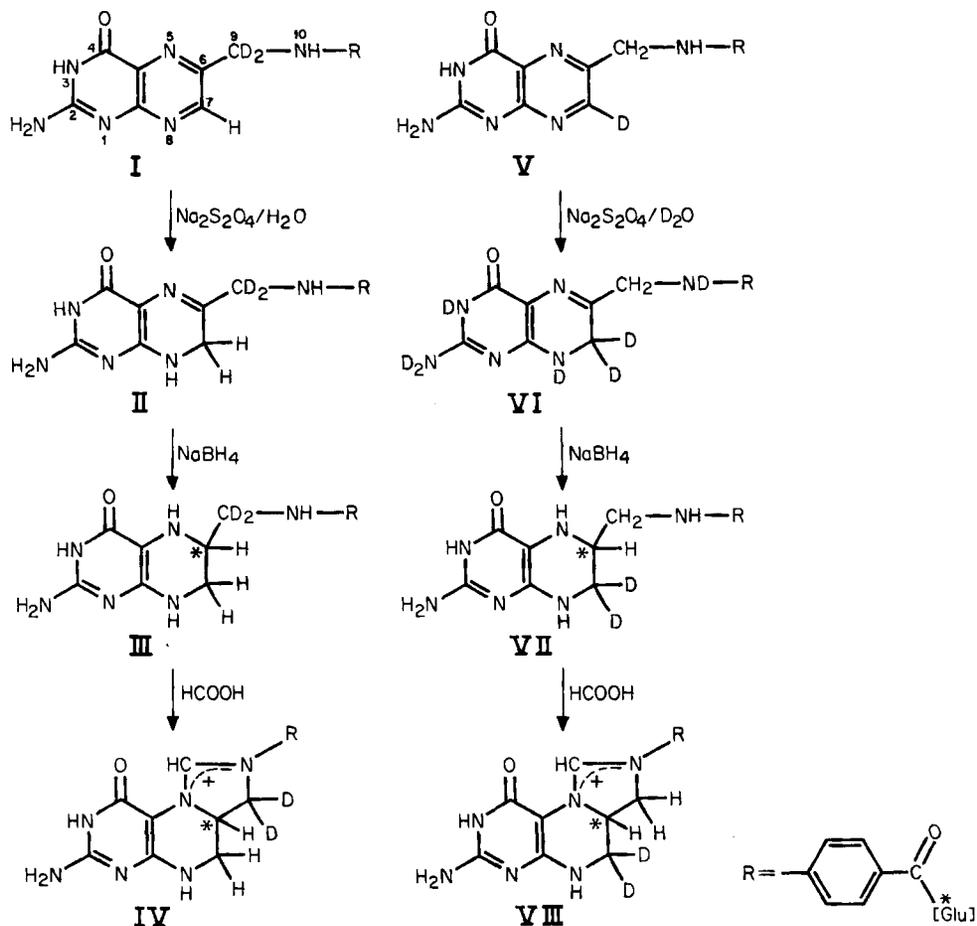
Conformational analysis of the diastereomeric 9,9-dideuterio-5,10-methenyl-(6*RS*)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folic acids (IV) in the 100-MHz-<sup>1</sup>H-NMR. spectrum shows a *trans*-diaxial arrangement of H<sub>a</sub>-C(6) (*A*-part) and H<sub>a</sub>-C(7) (*X*-part) ( $J_{AX}=10.6$  Hz) and a *gauche* arrangement of H<sub>a</sub>-C(6) and H<sub>e</sub>-C(7) (*M*-part) ( $J_{AM}=4.2$  Hz). Accordingly the tetrahydropyrazine ring in IV exists in the same manner as in tetrahydrofolic acid but with a more marked half chair conformation and with a pseudo equatorial position of the C(6), C(9) bond.

A similar analysis of the diastereomeric 7,7-dideuterio-5,10-methenyl-(6*RS*)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folic acids (VIII) in the 360-MHz-<sup>1</sup>H-NMR. spectrum shows an almost identical situation with higher values of  $J$  between H<sub>a</sub>-C(6) (*A*-part) and H-C(9 $\beta$ ) (*B*-part) on one side ( $J=11.2$ ) and between H<sub>a</sub>-C(6) and H-C(9 $\alpha$ ) (*X*-part) on the other side ( $J_{AX}=9.2$ ). This can be reached only when the imidazolium ring of VIII is nearly planar (*Fig. 3*).

**1. Einleitung.** - In Fortsetzung der Arbeiten über die Konfiguration von 7,8-Dihydro- [2] und 5,6,7,8-Tetrahydropterin-Derivaten [1] dehnen wir mit der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen auf das Gemisch der diastereomeren 5,10-Methenyl-(6*RS*)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäuren (IX) aus. Bekanntlich ist eines der beiden Diastereomeren IX eine Zwischenstufe sowohl für die chemische wie für die enzymatische Überführung von 5- bzw. 10-Formyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-

<sup>1)</sup> 69. Mitt. s. [1].

<sup>2)</sup> Da die Titelverbindung seit langer Zeit unter dem angegebenen Namen bekannt ist, wird dieser Name beibehalten; aufgrund der IUPAC-Regel C-83.1 scheint uns allerdings korrekter, wenn «methenyl» durch «methylenylum» ersetzt wird, wobei es jedem klar sein muss, dass es sich hier um den Namen einer Grenzformel handelt: die positive Ladung sitzt in Wirklichkeit auf einem oder auf dem anderen der benachbarten N-Atome (Red.).



folsäure ineinander [3], so dass die Kenntnis der Konfiguration des hydrierten Ring-systemes in IX von zentraler Bedeutung ist. Mittels der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnte die Konformation des Tetrahydropyrazin- und des Imidazolium-Ringes sowie die Anordnung der Substituenten an C(6) festgelegt werden.

Die Synthesen der zur  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Konformationsanalyse von IX benötigten deuterierten Verbindungen IV und VIII sind im *Schema* dargestellt. Zur Konformationsbestimmung des Tetrahydropyrazin- (in IV) und des Imidazolium-Ringes (in VIII) wurden die Wasserstoffatome in Stellung 9 bzw. 7 gegen Deuterium ausgetauscht (> 95%, vgl. exper. Teil). Die 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure-Derivate IV und VIII sollten prinzipiell aus einer Mischung von zwei Diastereomeren bestehen, da im Verlauf deren Synthesen ein neues chirales Zentrum an C(6) gebildet wird. Wie bei den von uns erhaltenen und beschriebenen 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäuren [1] [4], konnte kein Unterschied in den  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren für die beiden Diastereomeren beobachtet werden. Daher wurde in *Figur 3* willkürlich für IX die (6*R*)-Struktur gezeichnet.

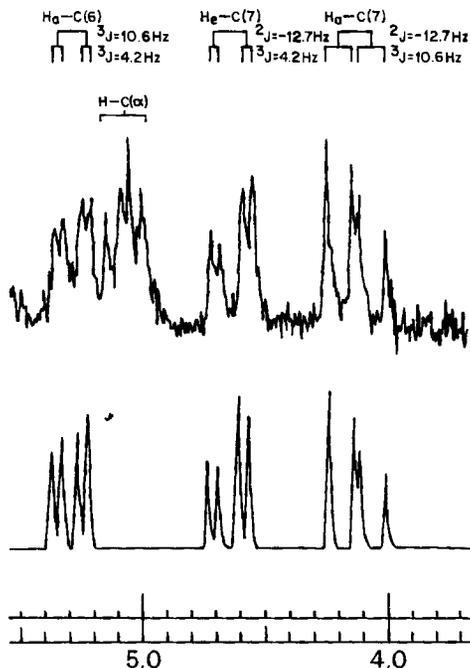


Fig. 1. Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR.-Spektrum (100 MHz, 0,5N DCl) von IV im Bereich der Tetrahydropyrazinring-Protonen mit dem entsprechenden computersimulierten Spektrum. (Das Multiplet bei 5,09 ppm rührt vom C( $\alpha$ )-Proton der Glutaminsäure-Einheit her).

**2. Ergebnisse.** - Das zur Konformationsanalyse des Tetrahydropyrazin-Ringes von IV aufgenommene  $^1\text{H}$ -NMR.-Spektrum (100 MHz) (Fig. 1) konnte eindeutig interpretiert werden. Es zeigt ein angenähertes *AMX*-System, aus welchem die chemischen Verschiebungen des C(6)-Protons und der beiden C(7)-Protonen sowie die zur Konformationsanalyse benötigten geminalen und vicinalen Kopplungskonstanten herausgelesen werden können:

$$J_{AM} = 4,2; \quad J_{MX} = -12,7; \quad J_{AX} = 10,6 \text{ Hz.}$$

Das mit den obigen Daten simulierte  $^1\text{H}$ -NMR.-Spektrum von IV ist mit dem experimentellen identisch (Fig. 1).

Das 100-MHz- $^1\text{H}$ -NMR.-Spektrum von VIII konnte dagegen für die Konformationsanalyse des Imidazolium-Ringes nicht eindeutig interpretiert werden. Dafür liessen sich aus dem 360-MHz-Spektrum (Fig. 2), welches für diesen Ring ein *ABX*-System zeigt, durch eine *ABX*-Analyse die benötigten Parameter ermitteln.  $\text{H}_a\text{-C}(6)$  (*A*-Teil),  $\delta_{\nu_0} = 5,30$  ppm;  $\text{H-C}(9\beta)$  (*B*-Teil),  $\delta_{\nu_0} = 5,24$  ppm;  $\text{H-C}(9\alpha)$  (*X*-Teil),  $\delta_{\nu_0} = 4,90$  ppm.  $J_{AX} = 9,2$ ;  $J_{BX} = -11,8$ ;  $J_{AB} = 11,2$  Hz. Die Zuordnung der chemischen Verschiebung des  $\text{H}_a\text{-C}(9)$ -Protons im *AB*-Teil erfolgte durch Synthese von 6-Monodeuterio-5,10-methenyl-(6*RS*)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (X), diejenige von  $\text{H}_a\text{-C}(6)$  konnte mit der Verbindung IV (Spektrum in Fig. 1) ermittelt werden.

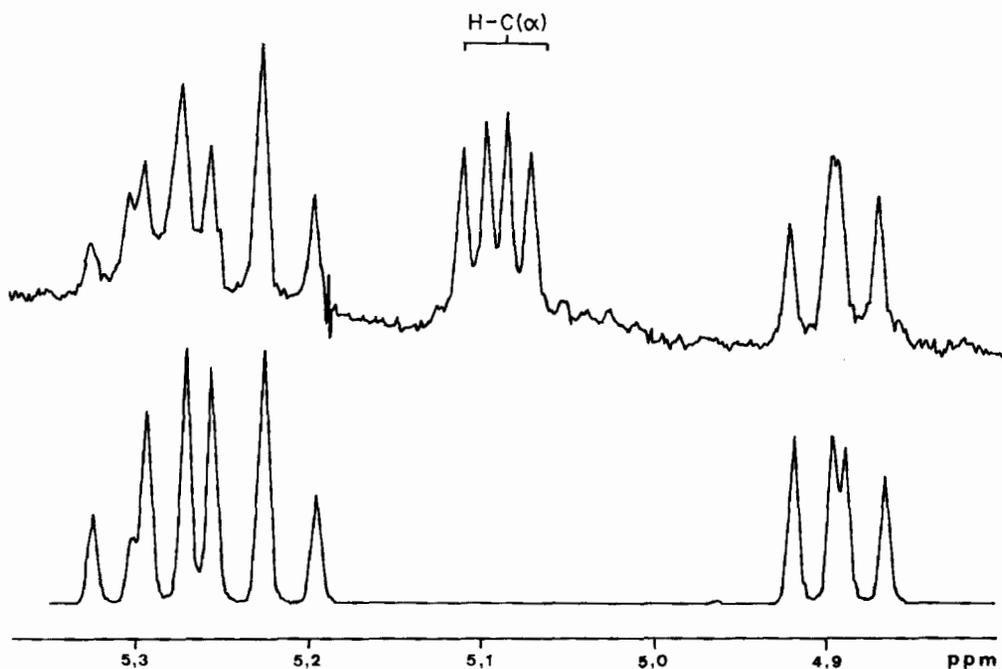


Fig. 2. Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR-Spektrum}$  (360 MHz, 0,5N DCl) von VIII im Bereich der C(6)- und C(9)-Protonen mit dem entsprechenden computersimulierten Spektrum. (Das Multipllett bei 5,08 ppm rührt vom C( $\alpha$ )-Proton der Glutaminsäure-Einheit her.)

Wie Figur 2 zeigt, ist das simulierte Spektrum von VIII mit dem experimentellen identisch.

**3. Diskussion.** - Die vicinalen Kopplungskonstanten der  $\text{H}_a\text{-C}(6)$ - und der  $\text{H}_a\text{-C}(7)$ -Protonen im Tetrahydropyrazin-Ring von 10,6 Hz belegen deren *trans*-axiale Anordnung, diejenigen von 4,2 Hz die *gauche*-Konformation von  $\text{H}_a\text{-C}(6)$  und  $\text{H}_c\text{-C}(7)$ . Daraus resultiert eine ausgeflachte Halbsessel-Konformation mit pseudo-äquatorialer Anordnung der C(6), C(9)-Bindung, welche einen Teil des Imidazolium-Ringes darstellt. Im Imidazolium-Ring selbst belegt die vicinale Kopplungskonstante von 11,2 Hz für  $\text{H}_a\text{-C}(6)$  und  $\text{H-C}(9\beta)$  deren *trans*oide, diejenige von 9,2 Hz für  $\text{H}_a\text{-C}(6)$  und  $\text{H-C}(9\alpha)$  deren *cis*oide Anordnung. Daraus ergibt sich für den Imidazolium-Ring eine angenähert planare Struktur.

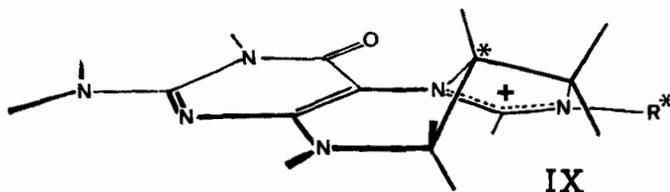


Fig. 3. Räumliche Darstellung der Molekülstruktur von IX

Die von uns ermittelte Konformation von IX steht im Einklang mit einer kürzlich und unabhängig von uns ausgeführten Röntgenstrukturanalyse [5].

Wir danken Herrn Dr. W. Schwotzer (Abteilung Prof. Dr. W. von Philipsborn) für seine wertvolle Hilfe bei der Aufnahme und Interpretation der NMR.-Spektren.

#### Experimenteller Teil

1. *Allgemeines*. Siehe [1] und [6].
2. *9,9-Dideuterio-L-folsäure (I) und 7-Monodeuterio-L-folsäure (V)*. Die Verbindungen I und V wurden nach [6] hergestellt.
3. *9,9-Dideuterio-7,8-dihydro-L-folsäure (II) und 9,9-Dideuterio-(6RS)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (III)*. Die Verbindungen II und III wurden nach [1] hergestellt.
4. *7,7-Dideuterio-7,8-dihydro-L-folsäure (VI) und 7,7-Dideuterio-(6RS)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (VII)*. Die Verbindungen VI und VII wurden nach [1] hergestellt, jedoch unter Verwendung des in 7-Stellung monodeuterierten Reaktanden V. Für die Synthese von VI wurden die entsprechenden deuterierten Reagenzien verwendet und in einem Handschuhkasten (Inertgas: N<sub>2</sub>) gearbeitet. Damit entfiel die Zugabe von Ascorbinsäure.
5. *9,9-Dideuterio-5,10-methenyl-(6RS)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (IV)*. Im Handschuhkasten (Inertgas: N<sub>2</sub>) wurden 200 mg (0,44 mmol) III in 5 ml Ameisensäure (98proz.) gelöst und stehen gelassen (22°, 24 Std.). Unter Luftzutritt wurde die Lösung zu einer Mischung von 40 ml Äther, 3 ml Äthanol und 200 mg 12N HCl bei 5° unter Rühren getropft. Der Niederschlag IV wurde abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und getrocknet (22°/0,01 Torr, 4 Std.). Anschliessend wurde IV in 2 ml 2N HCl bei 22° gelöst und bei 5° stehen gelassen, wobei IV ausfiel. Abzentrifugieren, waschen mit wenig 2N HCl (5°) und Umkristallisation aus 1N HCl (ca. 60°) ergab das Chlorhydrat von IV in einer Ausbeute von 64%. Die analytischen Daten stimmen mit den in [7] beschriebenen Daten überein. - <sup>1</sup>H-NMR. (100 MHz, 0,5N DCl) (Fig. 1): 9,95 (s, H- $\dot{C}$ [N(5),N(10)]); 8,33 und 7,94 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J=9 Hz, 4 arom. H); 5,30 (H<sub>a</sub>-C(6)); 5,09 (H-C(a)); 4,65 (H<sub>c</sub>-C(7)); 4,12 (H<sub>a</sub>-C(7)); 3,15-2,50 (m, 2 H-C(β) und 2 H-C(γ)).
6. *7,7-Dideuterio-5,10-methenyl-(6RS)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (VIII)*. Die Verbindung VIII wurde wie unter 5. beschrieben hergestellt, jedoch ausgehend von VII. - <sup>1</sup>H-NMR. (360 MHz, 0,5N DCl) (Fig. 2): 9,95 (s, H- $\dot{C}$ [N(5),N(10)]); 8,33 und 7,94 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J=9 Hz, 4 arom. H); 5,30 (H<sub>a</sub>-C(6)); 5,24 (H-C(9β)); 5,09 (H-C(a)); 4,90 (H-C(9α)); 3,15-2,50 (m, 2 H-C(β) und 2 H-C(γ)).
7. *6-Monodeuterio-5,10-methenyl-(6RS)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (X)*. Ausgehend von L-Folsäure wurde 7,8-Dihydro-L-folsäure nach [8] hergestellt. Nach [1], jedoch unter Verwendung von NaBD<sub>4</sub> und den entsprechenden deuterierten Lösungsmitteln, wurde 6-Monodeuterio-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure erhalten. Wie unter 5. beschrieben, wurde X synthetisiert. - <sup>1</sup>H-NMR. (100 MHz, 0,5N DCl): 9,95 (s, H- $\dot{C}$ [N(5),N(10)]); 8,33 und 7,94 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J=9 Hz, 4 arom. H); 5,23 und 4,88 (A- und B-Teil eines AB-Systems, J=-11,8 Hz, 2 H-C(9)); 5,08 (H-C(a)); 4,64 und 4,13 (A- und B-Teil eines AB-Systems, J=-12,7 Hz, 2 H-C(7)); 3,15-2,50 (m, 2 H-C(β) und 2 H-C(γ)).

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H.-J. Furrer, J. H. Bieri & M. Viscontini, *Helv.* 61, 2744 (1978).
- [2] J. H. Bieri, *Helv.* 60, 2303 (1977).
- [3] R. L. Blakley, 'The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines', Wiley, New York 1969.
- [4] W. Frick, R. Weber & M. Viscontini, *Helv.* 57, 2658 (1974).
- [5] J. C. Fontecilla-Camps, Ch. E. Bugg, C. Temple, jr., J. D. Rose & J. A. Montgomery, 'Chemistry and Biology of Pteridines', Elsevier/North-Holland, New York, Amsterdam, Oxford 1979, S. 235.
- [6] E. Khalifa, H.-J. Furrer, J. H. Bieri & M. Viscontini, *Helv.* 61, 2739 (1978).
- [7] D. B. Cosulich, B. Roth, J. M. Smith, jr., M. E. Hultquist & R. P. Parker, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 3252 (1952).
- [8] S. Futtermann, *J. biol. Chemistry* 228, 1031 (1957); R. L. Blakley, *Nature* 188, 231 (1960).