

192. Über Pterinchemie

75. Mitteilung¹⁾

Synthese von 7-Aminoxanthopterin²⁾

von Konrad Baumgartner³⁾ und Jost H. Bieri

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

(8. VII. 80)

Synthesis of 7-Aminoxanthopterin

Summary

7-Aminoxanthopterin (II) is obtained in good yield and purity by the transformation of isomer-free xanthopterin-7-carboxylic acid (I) with NH_3 followed by oxidation with MnO_2 . The Frontier Orbital Theory contributes to a better understanding of the reaction pathway.

1. Einleitung. - In der vorliegenden Arbeit wird über die Herstellung von 7-Aminoxanthopterin (II) durch Umsetzen von Xanthopterin-7-carbonsäure (I) mit Ammoniak berichtet. Zum Verständnis dieser Reaktion kann die Grenzorbintheorie [3] [4] beitragen, wobei in der Literatur bereits Beispiele für die erfolgreiche Anwendung dieser Theorie auf das Reaktionsverhalten von Stickstoffheterocyclen (Pyridinium-Ion [5], protonierte Pyrimidine [6] und Uracil [7]) gegenüber Nucleophilen bekannt sind.

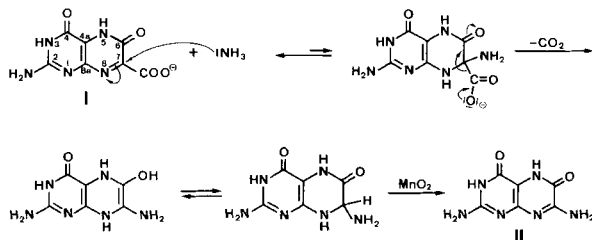
2. Diskussion der Resultate. - Bei der Chromatographie von Xanthopterin-7-carbonsäure (I) auf Cellulose mit verdünntem Ammoniak entstand ein Produkt, welchem die Struktur II zugeschrieben wurde. Diese ist von besonderem Interesse, da Aminopterine allgemein von pharmakologischer Bedeutung sind [8]. Für die Reaktion von I mit NH_3 wurde der in *Schema 1* skizzierte Mechanismus postuliert, aus dem die notwendigen Konsequenzen zur Optimierung der Synthese von II gezogen wurden (z. B. Zugabe von MnO_2 zur Beschleunigung der Oxydation). Damit wurde II in guter Ausbeute und Reinheit erhalten, so dass die Struktur von II durch Elementaranalyse, ^{13}C -FT.-NMR.- (Fig. 1), ^{15}N -FT.-NMR.- (Fig. 2) und Massenspektroskopie gestützt werden konnte.

¹⁾ 74.Mitt. s. [1].

²⁾ Teilweise von J. H. B. anlässlich des 6. Internationalen Pteridin-Symposiums in La Jolla, Kalifornien (25.-28. September 1978), präsentiert [2].

³⁾ Teil der geplanten Dissertation von K. Baumgartner, Universität Zürich.

Schema 1. Reaktionsmechanismus für die Bildung von 7-Aminoxanthopterin (II).



In der Literatur sind auch nucleophile Reaktionen an C(7) von Xanthopterin (III) in basischer Lösung beschrieben, wobei Xanthopterin-7-carbonsäureamid (IV) [11] und Erythropterin (V) [12] als Produkte gebildet werden (Schema 2). Wurde III nun mit Ammoniak umgesetzt, so entstand ebenfalls 7-Aminoxanthopterin (II) (vgl. exper. Teil). Hingegen reagierten unter den gleichen Bedingungen (NH₃/MnO₂) Pterin (VI), Pterin-7-carbonsäure (VII) und Isoxanthopterin-6-carbonsäure (VIII) nicht.

Zum Verständnis dieses unterschiedlichen Reaktionsverhaltens trägt die Grenzorbitaltheorie [3] [4] bei, wonach diejenige Stelle einer Molekel am ehesten be-

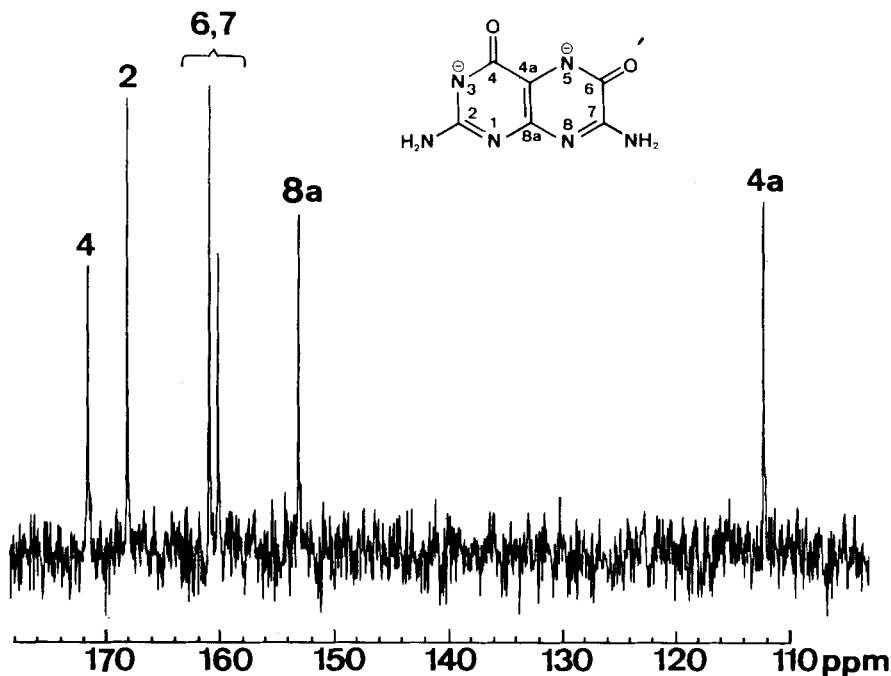


Fig. 1. ¹³C-FT-NMR-Spektrum von 7-Aminoxanthopterin (II) in 1N NaOD. Die Zuordnung der Signale erfolgte nach [9] und [15], sowie durch Korrelation der berechneten π -Elektronendichten mit den ¹³C-NMR-Spektren von II und verschiedenen weiteren Pterin-Derivaten (vgl. dazu Fussnote 3).

fähigt ist zu reagieren, welche die grösste Grenzorbitaldichte aufweist. Ist das angreifende Reagens ein Nucleophil bzw. ein Elektrophil, so wirkt das LUMO bzw. das HOMO als Grenzorbital. Diese Theorie wurde auf die Reaktionen von I und III mit Ammoniak angewandt. Wie *Figuren 3* und *4* zeigen, ist die LUMO-Dichte (Rechenmethode vgl. exper. Teil) in I^{3-} und III^{2-} an C(7) am grössten⁴).

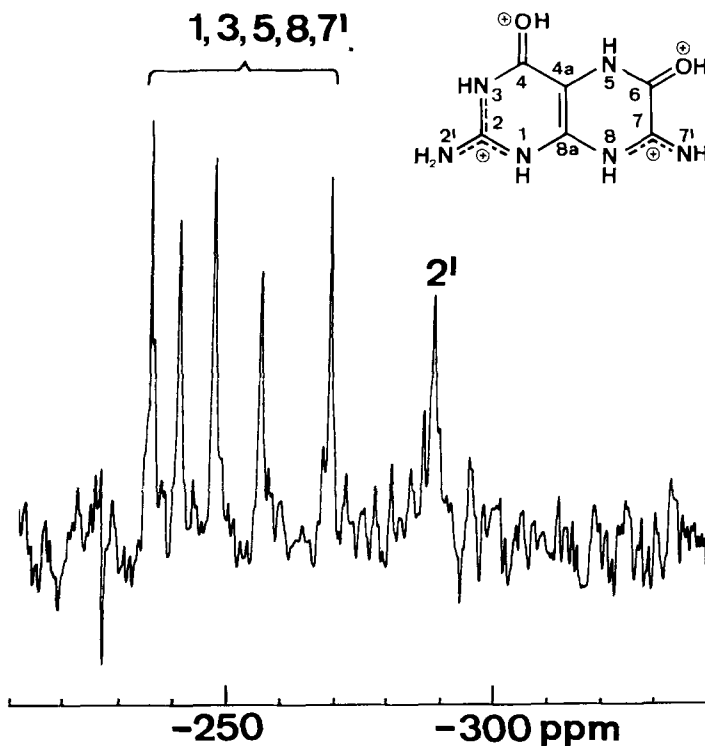
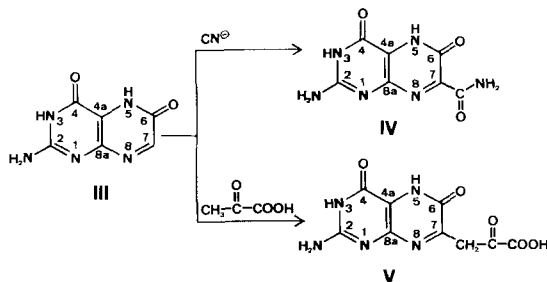


Fig. 2. ^{15}N -FT-NMR.-Spektrum von 7-Aminoxanthopterin (II) in FSO_3H . Die nur teilweise mögliche Zuordnung der Signale erfolgte nach [10].

Schema 2. Nucleophile Reaktionen mit Xanthopterin (III)



⁴) Die berechneten LUMO der kationischen, neutralen und der verschiedenen anionischen Formen von I und III zeigen ebenfalls grösste Dichte an C(7).

Damit ist ein nucleophiler, grenzorbital-kontrollierter Angriff von Ammoniak an C(7) von I und III als Primärschritt durchaus möglich. Dagegen erscheint ein ladungskontrollierter Angriff an C(7) unwahrscheinlich, wie die berechneten Atomladungen (s. Tab.) und das ^{13}C -NMR.-Spektrum von III [15] zeigen.

Werden dagegen die Grenzorbitale der Verbindungen VI-VIII betrachtet (Tab.), welche nicht mit Ammoniak reagieren, so lässt sich folgendes feststellen:

Tabelle. Grenzorbital(LUMO)- und Gesamtladungsdichten der Verbindungen I^{3-} , II^+ , II^{2-} , III^{2-} , VI^- , VII^{2-} und VIII^{3-}

Verbindung	ΔE^a	$(c_i^{\text{LUMO}})^2b)$				Gesamtladungsdichten ^{c)}			
		N(5)	C(6)	C(7)	N(8)	N(5)	C(6)	C(7)	N(8)
	0,95	0,115	0,013	0,248	0,198	-0,57	+0,41	-0,08	-0,29
	0,18 ^{d)}	0,026 0,068	0,004 0,041	0,018 0,232	0,037 0,039	-0,12	+0,33	+0,30	-0,36
	0,84	0,157	0,062	0,306	0,179	-0,47	+0,35	+0,18	-0,44
	1,3	0,159	0,020	0,301	0,241	-0,48	+0,39	-0,07	-0,31
	1,75	0,292	0,043	0,182	0,256	-0,18	-0,01	+0,08	-0,30
	1,63	0,249	0,044	0,176	0,239	-0,25	+0,03	+0,01	-0,28
	0,42	0,254	0,186	0,042	0,074	-0,19	-0,16	+0,46	-0,66

a) ΔE ist gleich der Energiedifferenz (in eV) zwischen dem LUMO und dem nächsthöheren unbesetzten Molekelorbital (für deren Bedeutung vgl. [4]). Das LUMO von II^+ besitzt σ -Charakter und weist die grösste Orbitaldichte an C(2) auf. Allerdings besitzt das nächsthöhere unbesetzte Molekelorbital π -Charakter mit der grössten Dichte an C(7). Da der Energieunterschied (ΔE) zwischen diesen beiden Orbitalen nur 0,18 eV beträgt, können sie als quasi entartet betrachtet werden. Dies ist eine Ausnahme, da die übrigen in der Tabelle aufgeführten Verbindungen klar ausgezeichnete Grenzorbitale aufweisen, welche alle π -Charakter besitzen.

b) c_i^{LUMO} ist der Koeffizient des Atomorbitals i im LUMO der betreffenden Verbindung [3].

c) Die Gesamtladungsdichten sind in der Einheit Elementarladung gegeben.

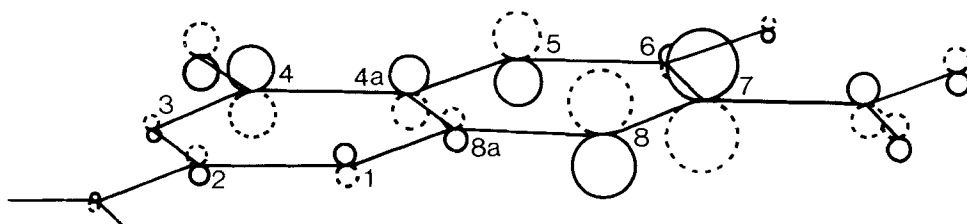


Fig. 3. LUMO des Tri-anions von Xanthopterin-7-carbonsäure (I^{3-}). Das Tri-anion wurde in Anlehnung an [13] formuliert.

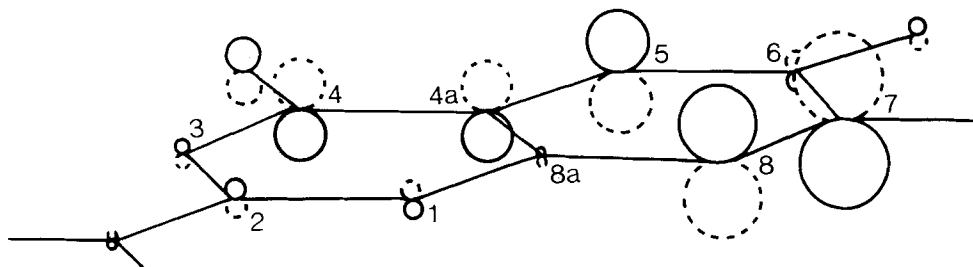
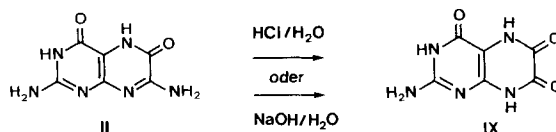


Fig. 4. LUMO des Di-anions von Xanthopterin (III^{2-}) ($pK_a^1 = 6,59$; $pK_a^2 = 9,31$ [14])

Der Beitrag zum LUMO durch das C(7)-*p*-Orbital in VI und VII ist signifikant kleiner als in I und III. Den grössten Beitrag liefert nun das N(5)-*p*-Orbital. In VIII wäre ein allfälliger Angriff von Ammoniak selbstverständlich in 6-Stellung zu erwarten. Die Rechnung zeigt, dass der Beitrag zum LUMO durch das C(6)-*p*-Orbital ebenfalls vergleichsweise gering ist und vom N(5)-*p*-Orbital übertroffen wird. Die quantenchemischen Berechnungen stehen somit im Einklang mit der experimentellen Tatsache, dass diese Verbindungen mit Ammoniak nicht reagieren.

Dagegen zeigen die berechneten Grenzorbital- und Gesamtladungsdichten (Tab.) sowie das ^{13}C -NMR.-Spektrum (Fig. 1) von 7-Aminoxanthopterin (II), dass in saurem und basischem Milieu sowohl ein grenzorbital- als auch ein ladungskontrollierter Angriff eines Nucleophils in 7-Stellung möglich ist. Dies wird durch die Bildung von Leukoapterin (IX) aus II bestätigt (Schema 3).

Schema 3. Hydrolyse von 7-Aminoxanthopterin (II) in saurer oder basischer Lösung zu Leukoapterin (IX)



Herrn Prof. Dr. M. Viscontini, Universität Zürich, und Herrn Dr. R.E. Geiger danken wir für wertvolle Diskussionen, Herrn Dipl.-Chem. W.-P. Hummel für seinen Hinweis auf die Möglichkeit einer Reaktion von Xanthopterin-7-carbonsäure (I) mit Ammoniak, Herrn Dr. W. Schwotzer (Abt. Prof. Dr. W. von Philipsborn) für die Aufnahme der NMR.-Spektren und für seine Hilfe bei deren

Interpretation, Herrn Prof. Dr. M. Hesse für die Massenspektren, Herrn H. Frohofer, Leiter der Mikroanalytischen Abteilung unseres Institutes, für die Elementaranalysen und Herrn Dr. J. Kuhn für die Überlassung seines CNDO-CI-Programmes, sowie dem Rechenzentrum der Universität Zürich für die Gewährung von Rechenzeit.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines und Rechenmethode.* Die ^{15}N - und ^{13}C -FT.-NMR.-Spektren (für die instrumentellen Daten vgl. [10] [15]) wurden auf einem Varian-XL-100-15-Spektrographen aufgenommen; chemische Verschiebungen in ppm. Die Massenspektren wurden an einem CEC-21-110B-Gerät (Direkteinlass, 70 eV) registriert; Angaben in m/z (rel.-%). Analytische Dünnschichtchromatogramme (DC.) an Cellulose-CEL-300-UV₂₅₄-Fertigfolien (Macherey-Nagel); Produkte sichtbar im UV.-Licht bei 254 bzw. 366 nm; Laufmittel 4proz. Lösung von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$. Die UV.-Spektren wurden an einem Perkin-Elmer 555 Spektrophotometer gemessen. - Die Grenzorbital- und Gesamtladungsdichten wurden mit dem CNDO-Verfahren [16] bestimmt. Der Konfigurationswechselwirkungsteil wurde von Kuhn [17] ausgearbeitet⁵). Die Rechnungen wurden mit einem FORTRAN-Programm von Kuhn unter Verwendung seines Parametersatzes ausgeführt [17]. Die Atomkoordinaten der gerechneten Verbindungen wurden aufgrund der Röntgenstrukturdaten von Xanthopterin-monohydrochlorid ermittelt [18]. Für die zusätzlichen Teilstrukturen wurden die für solche Systeme üblichen Bindungslängen und Bindungswinkel verwendet. Die graphische Darstellung der SCF-Molekelorbitale erfolgte mit dem PLOT-Programm von Haselbach & Schmelzer, wobei die Durchmesser der Kreise den MO-Koeffizienten proportional sind [19].

2. *Herstellung von Xanthopterin-7-carbonsäure-monohydrat (I · H₂O).* Die Synthese erfolgte nach [20]. Da I Isoxanthopterin-6-carbonsäure (VIII) enthielt, wurde isomerenfreies I wie folgt erhalten: 100 g trockenes DEAE-Sephadex A-25 wurde in 0,1M Barbitalpuffer bei pH 9 gequollen, in eine Säule mit einem Durchmesser von 4,4 cm gefüllt und mit 0,1M Barbitalpuffer äquilibriert (pH=9), so dass die Säulenhöhe 25 cm betrug. Beim Lösen von 500 mg (2,1 mmol) I in 250 ml 0,1M Barbitalpuffer bei pH 9 sank das pH. Die Korrektur auf pH 9 erfolgte mit 1N NaOH. Von wenig Ungelöstem wurde abzentrifugiert und die Lösung auf die Säule aufgetragen. Es wurde mit 0,1M Barbitalpuffer (pH=9) mit linearem Salzgradienten bis 0,5M NaCl eluiert, dabei die grün-gelb fluoreszierende Zone ($\lambda=366$ nm) in Fraktionen gesammelt und diese mit 1N HCl angesäuert (pH=2-3), wobei das orange I ausfiel. Abzentrifugieren, Waschen mit H₂O, Methanol und Äther und Trocknung (22°/0,01 Torr, 12 Std.) ergaben 240 mg (48%) isomerenfreies I · H₂O und 136 mg (27%) verunreinigtes I⁶).

3. *Herstellung von 7-Aminoxanthopterin-monohydrat (II · H₂O).* Zur gelben Lösung von 500 mg (2,05 mmol) I · H₂O in 500 ml 25proz. NH₃-Lösung wurden 2,5 g 85-90proz. Mangan(IV)oxid gegeben. Es wurde ca. 5 Tage bei 22° gerührt, dann über Hyflo filtriert und mit 25proz. NH₃-Lösung nachgewaschen. Das schwach gelbe Filtrat wurde bei 30° so lange vom Ammoniak befreit, bis das hellgelbe II auszufallen begann. Filtration, Waschen mit H₂O und Äthanol und Trocknung (40°/0,01 Torr, 12 Std.) ergaben 252 mg (58%) II · H₂O. - UV. (1N NaOH): 355 (4,0), 282 (3,80), 245 (4,21); min. 305 (3,42), 271 (3,78). UV. (1N HCl): 361 S (3,97), 348 (4,16), 333 (4,12), 290,5 (3,49), 285,5 S (3,93), 240,5 (4,24); min. 339 (4,11), 304 (3,80), 266 (3,74). - ^{13}C -NMR. (1N NaOD; Fig. 1) [9]: 171,4 (C(4)); 168,0 (C(2)); 160,9, 160,1 (C(6) und C(7)); 153,1 (C(8a)); 112,6 (C(4a)). - ^{15}N -NMR. (FSO₃H; Fig. 2) [10]: -236,4, -241,9, -248,3, -257,2, -270,0 (N(1), N(3), N(5), N(8) und N(7)); -289,3 (N(2')). - MS.: 194 (M^+ , 100), 166 (25), 124 (29).

$\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_6\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (194,15) Ber. C 33,97 H 3,80 N 39,61% Gef. C 33,24 H 3,55 N 38,76%

⁵) Die berechneten Elektronenübergänge stimmen qualitativ befriedigend mit den UV.-Spektren überein [22].

⁶) Die Reinheit der I enthaltenden Fraktionen musste wie folgt überprüft werden: Xanthopterin-7-carbonsäure (I; Rf 0,63) wurde mit Ammoniak gemäss Kap. 3 zu 7-Aminoxanthopterin (II; Rf 0,17) umgesetzt. Damit wurde die Abwesenheit von Isoxanthopterin-6-carbonsäure (VIII; Rf 0,57) und die Reinheit von I festgestellt.

4. *Herstellung von Leukopterin (IX) durch saure Hydrolyse von II.* Eine Aufschlammung von 500 mg (2,4 mmol) II · H₂O in 500 ml 1N HCl wurde 20 Std. unter Rückfluss erhitzt (heterogenes Gemisch). Filtration, Waschen mit H₂O und Äthanol und Trocknung (80°/0,01 Torr, 12 Std.) ergaben 405 mg (87%) IX. Zur Reinigung wurden 250 mg IX in 125 ml H₂O durch tropfenweise Zugabe von 1N NaOH bei 90° gelöst und durch Zugabe von 125 ml 2N HCl bei 22° wieder ausgefällt. Zentrifugieren, Waschen mit H₂O und Äthanol und Trocknung (80°/0,01 Torr, 12 Std.) ergaben 118 mg (47%) IX. Die analytischen Daten von IX stimmten mit denjenigen in [15] und [21] überein.

5. *Herstellung von IX durch basische Hydrolyse von II.* In 50 ml 0,1N NaOH wurden 100 mg (0,47 mmol) II · H₂O 20 Std. unter Rückfluss gekocht. Beim Ansäuern mit konz. HCl-Lösung fiel IX aus. Aufarbeiten wie oben ergab 81 mg (88%) rohes IX. Die analytischen Daten stimmen mit denjenigen in [21] überein.

6. *Herstellung von II aus Xanthopterin (III).* Wie in Kap. 3 beschrieben, wurde III zu II umgesetzt, wobei die analytischen Daten (DC., UV.) mit denjenigen von II aus I übereinstimmen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. N. Ganguly, P. K. Sengupta, J. H. Bieri & M. Viscontini, *Helv.* 63, 1754 (1980).
- [2] K. Baumgartner & J. H. Bieri, 'Chemistry and Biology of Pteridines', Elsevier/North-Holland, New York, Amsterdam und Oxford 1979, S. 7.
- [3] K. Fukui, 'Theory of Orientation and Stereoselection', Springer, Berlin 1975.
- [4] I. Fleming, 'Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions', Wiley, London und New York 1976.
- [5] G. Klopman, *J. Am. Chem. Soc.* 90, 223 (1968).
- [6] W. P. K. Girke, *Chem. Ber.* 112, 1 (1979).
- [7] T. J. O'Donnell, P. R. Le Breton & L. L. Shipman, *J. Phys. Chem.* 82, 343 (1978).
- [8] R. L. Blakely, 'The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines', Wiley, New York 1969.
- [9] U. Ewers, H. Günther & L. Jaenicke, *Chem. Ber.* 106, 3951 (1973); *ibidem*, *ibid.* 107, 3275 (1974).
- [10] W. Schwotzer, J. H. Bieri, M. Viscontini & W. von Philipsborn, *Helv.* 61, 2108 (1978).
- [11] M. Viscontini & M. Piraux, *Helv.* 45, 1000 (1962).
- [12] M. Viscontini & H. Stierlin, *Helv.* 46, 51 (1963).
- [13] W. Pfeleiderer & M. Rukwied, *Chem. Ber.* 95, 1591 (1962).
- [14] Y. Inoue & D. O. Perrin, *J. Chem. Soc.* 1962, 2600.
- [15] G. Müller & W. von Philipsborn, *Helv.* 56, 2680 (1973).
- [16] J. A. Pople & O. L. Beveridge, 'Approximate Molecular Orbital Theory', Mc Graw-Hill, New York 1970.
- [17] J. Kuhn, Dissertation, Universität Zürich 1971.
- [18] J. H. Bieri, W.-P. Hummel & M. Viscontini, *Helv.* 59, 2374 (1976).
- [19] E. Haselbach & A. Schmelzer, *Helv.* 54, 1299 (1971).
- [20] R. Purmann, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 548, 284 (1941).
- [21] M. Viscontini, *Helv.* 40, 586 (1957).
- [22] K. Baumgartner, Diplomarbeit, Universität Zürich 1977.