

## 105. De la chimie des ptérides

78<sup>e</sup> Communication<sup>1)</sup>

### Synthèse de l'ester tripolyphosphorique de la tétrahydro-5,6,7,8-D-néoptérine. Essai d'interprétation de la biosynthèse de la L-sépiapterine

par Siméon Antoulas et Max Viscontini

Institut de Chimie Organique de l'Université, 190, Winterthurerstrasse, CH-8057 Zurich

Dédiée au Professeur *Conrad Hans Eugster*, à l'occasion de son 60 anniversaire

(25.III.81)

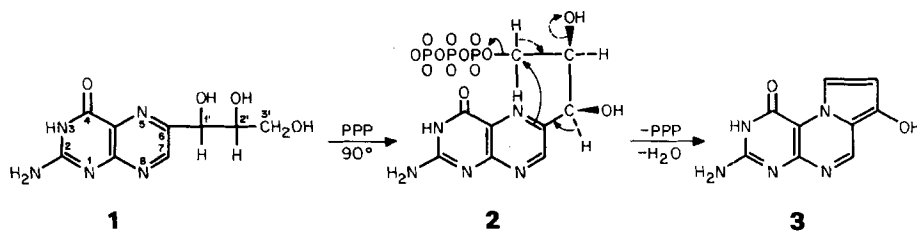
#### Synthesis of 5,6,7,8-Tetrahydro-D-neopterin triphosphosphate. Attempt to Interpret the Biosynthesis of L-Septapterine

##### Summary

The synthesis was achieved by phosphorylation of tetrahydro-5,6,7,8-D-neopterin with polyphosphoric acid. The product is sensitive to light, moisture and oxidation like the other tetrahydropterines. After oxidation in aqueous solution, D,L-sepiapterine was isolated in 5% yield. The oxidation of non-phosphorylated tetrahydro-5,6,7,8-D-neopterin under the same conditions led to D-sepiapterine without inversion of the configuration. These findings were used to give a tentative explanation for the biosynthesis of natural L-sepiapterine from the D-neopterin.

Alors que l'obtention de l'ester tripolyphosphorique de l'hydroxyméthyl-6-ptéridine par traitement de la ptéridine correspondante aux acides polyphosphoriques (PPP) s'effectue sans difficulté [2], dans le cas de la D-néoptérine (1), l'anion tripolyphosphorique de la substance phosphorylée 2 s'élimine facilement de la chaîne

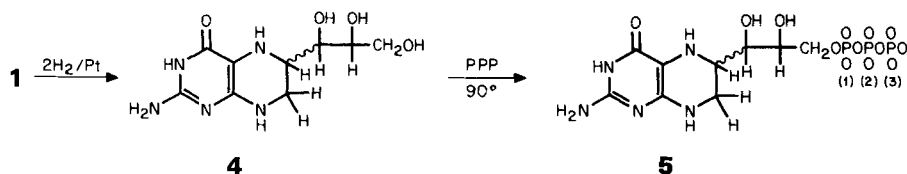
Schéma 1



<sup>1)</sup> 77e Communication: [1].

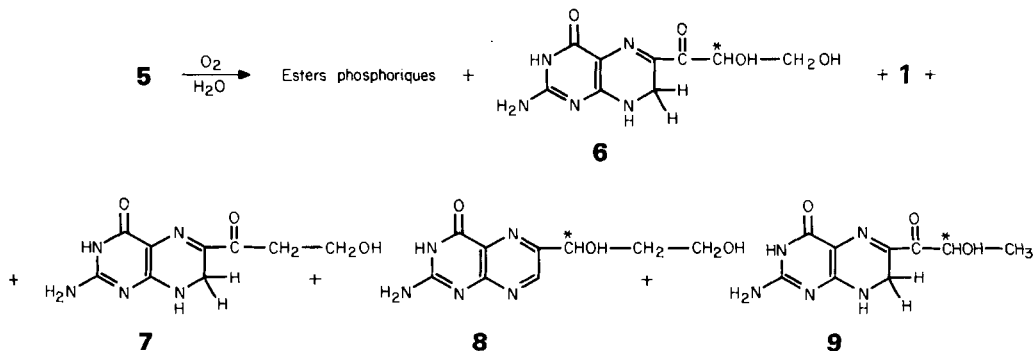
latérale; la double liaison C(5), C(6) du noyau pyrazinique attaque le carbocation ainsi créé, avec formation d'un cycle pyrrolinique. Une déshydratation concomitante ou consécutive conduit au composé **3** fortement coloré [3] (*Schéma 1*).

L'hydrogénation du cycle pyrazinique de la D-néoptérine évite cette cyclisation en supprimant la double liaison C(5), C(6). La phosphorylation de la tétrahydro-5, 6, 7, 8-D-néoptérine-(6*R*, *S*) (**4**) par PPP s'effectue sans difficulté et les esters tri-polyphosphoriques **5** du mélange des deux diastéréoisomères 6*R*, *S* sont obtenus avec un bon rendement.



Le mélange est stable à l'abri de l'air, de la lumière et de l'humidité. En solution aqueuse à l'abri de l'air et de la lumière, la fonction tri-polyphosphorique est lentement hydrolysée; son hydrolyse est totale après 48 h à 20°. En présence d'air et à 20°, l'hydrolyse de la chaîne tri-polyphosphorique est accompagnée d'oxydation du noyau tétrahydrogéné. Après 24 h on obtient une quantité appréciable (5%) de sépiaptérine racémique (**9**) (*Schéma 2*), à côté des esters tri-polyphosphorique, pyrophosphorique et monophosphorique de la D-néoptérine et des produits déjà caractérisés lors de l'oxydation de la dihydro-7, 8-D-néoptérine [4] ou de la tétrahydro-5, 6, 7, 8-D-néoptérine [5], à savoir la D-néoptérine (**1**), 45% [4] [5], l'hydroxy-3'-D, L-sépiaptérine (**6**), 10% [4] [5], la désoxy-2'-hydroxy-3'-sépiaptérine (**7**), 10% [4] et la désoxy-2'-néoptérine **8** (dont la configuration n'a pas pu être établie).

*Schéma 2*



Ces résultats corroborent l'hypothèse que nous avançons il y a quelques années lors de l'obtention de la ptérine tricyclique **3** et par laquelle nous prévoyions la formation de sépiaptérine à partir de néoptérine phosphorylée [3]. Afin de vérifier la nécessité de la phosphorylation de la chaîne latérale de la tétrahydro-D-néoptérine

pour la formation de sépiaptérine, nous avons oxydé dans les mêmes conditions la dihydro-7,8-D-néoptérine et la tétrahydro-5,6,7,8-D-néoptérine-(6*R*,5*S*) (**4**). Nous avons obtenu dans les deux cas non seulement les ptérides **1**, **6**, **7** et **8** isolées par *Sugiura & Goto* [4] à partir de la dihydro-7,8-néoptérine, mais encore, en très petite quantité, la sépiaptérine **9** non signalée par ces auteurs. Nous avons pu isoler **9** à l'état très pur à partir de la tétrahydro-D-néoptérine (**4**). Son pouvoir rotatoire spécifique ( $-310^\circ$ ) montre que l'énantiomère *D* est formé avec rétention de la configuration en C(2'), alors que la sépiaptérine naturelle ( $[\alpha]_D^{20} = +363^\circ$  [6] [7]) appartient à la série *L*. La formation de *D*-sépiaptérine à partir de **4** et de *D,L*-sépiaptérine à partir de **5** découle donc de deux mécanismes différents pour lesquels nous proposons les Schémas 3 et 4.

Schéma 3

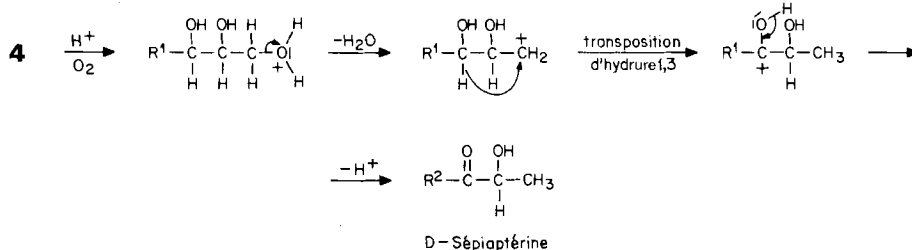
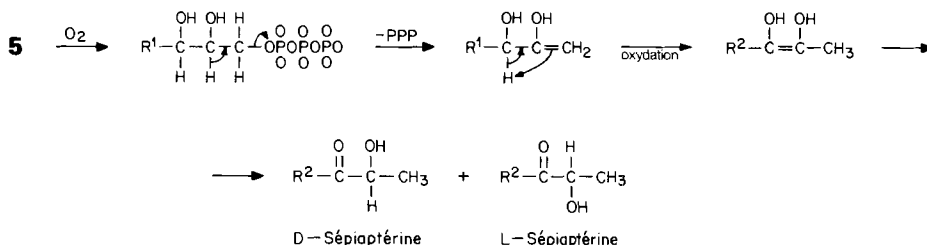


Schéma 4



Dans les deux schémas,  $R^1$  = tétrahydro-5,6,7,8-ptéridine  
 $R^2$  = dihydro-7,8-ptéridine

Le premier mécanisme ne peut être retenu pour la biosynthèse de la sépiaptérine car il n'implique pas une inversion de la configuration en C(2'). Par contre le deuxième pourrait être envisagé, parce que le précurseur **5** est une substance naturelle et parce que la transposition énediol-cétol, stéréosélectivement catalysée par une enzyme, expliquerait l'inversion de configuration de la *D*-néoptérine en *L*-sépiaptérine.

Nous remercions MM. *J.H. Bieri* et *S.N. Ganguly* pour de nombreuses discussions, *H. Egli* (Service du Prof. *W. von Philipsborn*) pour les spectres RMN. et *H. Frohofer* pour les microanalyses.

## Partie expérimentale

**D-Néoptérine (1).** Obtenue selon [8].

**Dihydro-7,8-D-néoptérine.** La réaction est effectuée dans une boîte à gants, sous N<sub>2</sub>, à l'abri de l'humidité. A une suspension de **1** (0,2 g = 0,78 mmol) dans 6 ml d'eau, on ajoute 0,6 g (3,45 mmol) de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> et NaOH 3N jusqu'à dissolution. La solution brunâtre est chauffée à 65° jusqu'à décoloration (20-30 min). Après 12 h à 0°, la dihydro-7,8-néoptérine précipite alors que le pH de la solution s'approche de la neutralité. On filtre, lave à l'eau, à l'acétone et sèche sous vide: 0,115 g (51%);  $[\alpha]_D^{25} = -37,2^\circ \pm 0,5$  ( $c = 0,64$ , DMSO). - <sup>1</sup>H-RMN. (Varian XL-200, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, Fig. 1): 10,5 (s, 1 H, H-N(3)); 7,22 (s, 1 H, H-N(8)); 6,94 (s, 2 H, 2 H-N(2')); 5,63 (d, HO-C(3')); 5,25 (s, 1 H, HO-C(2')); 4,89 (s, 1 H, HO-C(3')); 4,46 (s, 2 H, 2 H-C(7)); 4,40 (m, 1 H, H-C(1')); 4,02-3,64 (m, H<sub>2</sub>O + 3 H, H-C(2') et 2 H-C(3')).

C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (255,24) Calc. C 42,35 H 5,13 N 27,44% Tr. C 41,78 H 5,63 N 27,03%

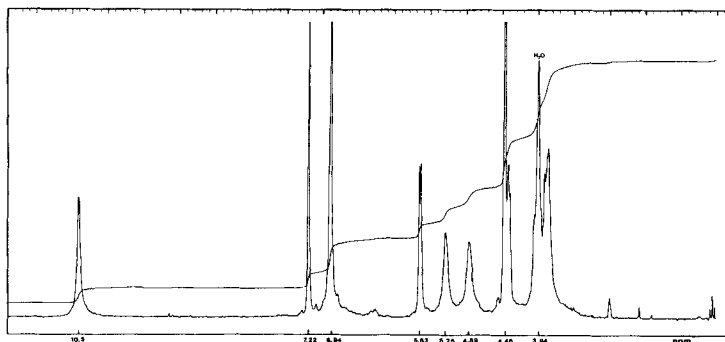


Fig. 1. Spectre <sup>1</sup>H-RMN. de la dihydro-7,8-D-néoptérine dans (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO

**Tétrahydro-5,6,7,8-D-néoptérine-(6R,S) (4).** Obtenue selon [7].

**Tétrahydro-5,6,7,8-D-néoptérine-(6R,S)-triphosphate-3' (5).** Obtenue selon la méthode générale de triphosphorylation [2] [9]. On ajoute 0,5 g (1,94 mmol) de 5-2 HCl à l'acide polyphosphorique obtenu à partir de 3 ml d'acide phosphorique et refroidi à 20°. Le gaz chlorhydrique qui se dégage est évacué sous vide. Lorsque l'effervescence prend fin (40-50 min), on chauffe à 90° (20 min), puis on laisse le mélange réactionnel refroidir dans la boîte à gants et on ajoute lentement en refroidissant 1 ml d'eau à 0°. La solution homogène est versée goutte à goutte dans 200 ml d'acétone; **5** précipite. On centrifuge, lave à l'acétone jusqu'à disparition des acides polyphosphoriques et sèche la poudre blanche aussi obtenue: 0,62 g (70-80%). Le produit ne renferme aucun acide phosphorique libre selon [10]. <sup>13</sup>C-RMN.: le spectre est identique au spectre correspondant de **4** [11]. On y reconnaît également le mélange des deux diastéréoisomères (6R,S), dont nous avons vérifié qu'il est encore optiquement actif. - <sup>31</sup>P-RMN. découplé avec <sup>1</sup>H (Varian XL-200, D<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> comme référence externe, Fig. 2): 0 (s, PO<sub>4</sub>); -9,79 (d, P(3)); -10,60 (d, P(1)); -22,15 (t, P(2)). - <sup>31</sup>P-RMN., couplé avec <sup>1</sup>H (Fig. 3): 0 (s, PO<sub>4</sub>); -9,80 (d, P(3)); -10,64 (d × d, P(1)); -22,19 (t, P(2)).

C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>P<sub>3</sub> Calc. C 21,74 H 3,65 N 14,08 P(libre) 0,0 P(total) 18,69%  
(497,19) Tr. ,, 20,67 ,, 4,33 ,, 13,09 ,, 0,11 ,, 17,92%

Le produit **5** est facilement hydrolysé en solution 1M dans HClO<sub>4</sub> à 60° et à 22°. On y retrouve selon [10] la totalité du phosphore à l'état d'acide phosphorique libre.

**Oxydation de 4.** On fait passer pendant 4-5 jours, à l'abri de la lumière, un courant d'air dans un tampon à l'acétate de sodium (30 ml, pH 4,5) renfermant 0,2 g (0,6 mmol) de **4**. La solution jaune ainsi obtenue est chromatographiée sur une colonne de silicate de magnésium [12]. Une première élution à CH<sub>3</sub>COOH (1%) entraîne la néoptérine (**1**) et la désoxy-2'-néoptérine (**8**). Après concentration de la

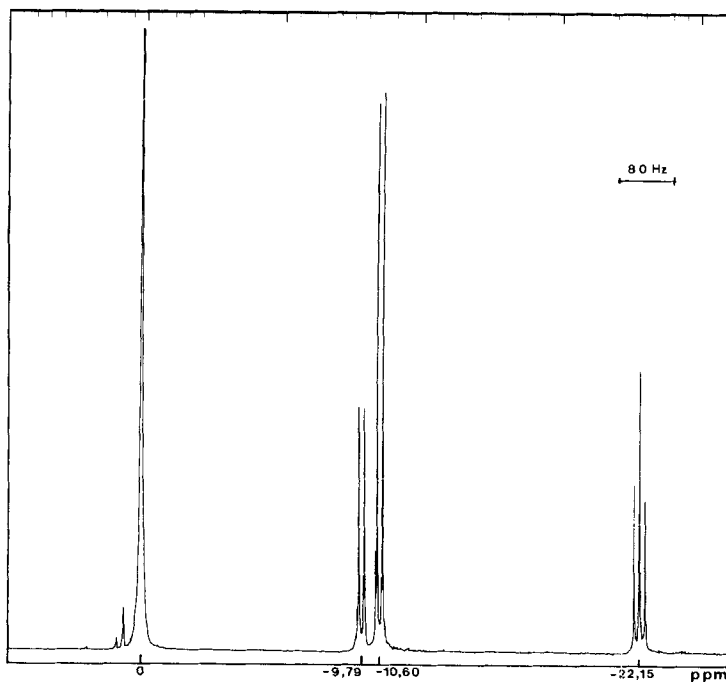


Fig.2. Spectre  $^{31}\text{P}$ -RMN. ( $^1\text{H}$ -découplé) de l'ester triphosphorique (5) de la tétrahydro-5,6,7,8-D-néoptérine

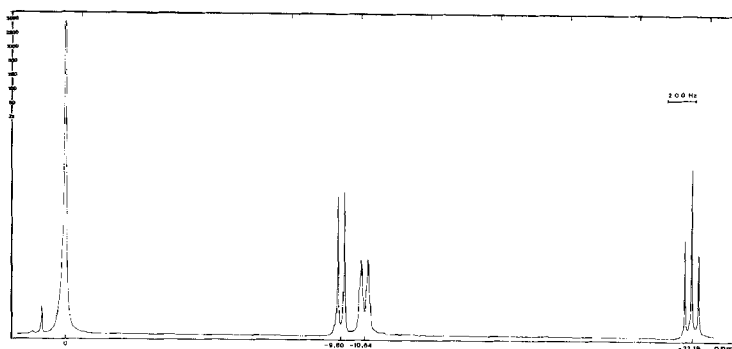


Fig.3. Spectre  $^{31}\text{P}$ -RMN. ( $^1\text{H}$ -couplé) de l'ester triphosphorique (5) de la tétrahydro-5,6,7,8-D-néoptérine

solution sous vide jusqu'à 3-4 ml, **1** (75 mg, 53%) et **8** (2.5 mg, 2%) sont séparés par chromatographie préparative sur plaques de cellulose (propanol-2/solution à 1% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  2:1). Une seconde élution de la colonne à l'acétone (20%) entraîne les substances jaunes **6**, **7** et **9** qu'on sépare par chromatographie sur colonne de cellulose (3 x 35 cm, éluant: butanol/éthanol/eau, 2:1:1). Le composé **7** est élué en premier, suivi de **9** et de **6**. Chaque fraction est concentrée sous vide: 21 mg (14%) de **7**, non oxydé avec  $\text{NaIO}_4$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 0^\circ$  ( $c = 0,667$ , DMSO); 1,5 mg (1%) de **9**, oxydé avec  $\text{NaIO}_4$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -310^\circ$

$\pm 20^\circ$  ( $c=0,1$ , DMSO); 26 mg (17%) de **6**, oxydé avec  $\text{NaIO}_4$ ,  $[\alpha]_D^{25} = -89^\circ \pm 2^\circ$  ( $c=0,1$ , DMSO). Les 3 produits sont caractérisés également par  $^1\text{H-RMN}$ .

*Oxydation de 5.* On abandonne à l'air et à l'abri de la lumière une solution de 0,3 g (0,6 mmol) de **5** dans 35 ml d'eau. Après 48 h, la solution colorée en jaune est chromatographiée sur colonne de cellulose ( $4,5 \times 30$  cm) avec l'eau comme éluant. Les substances à fluorescence bleue (néoptérine, phosphates de néoptérine, **8**) sont éluées en premier, suivies des substances à fluorescence jaune **6**, **7** et **9**. Ces dernières sont séparées par chromatographie sur plaques de cellulose ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 14 mg (10%) de **7**, non oxydé avec  $\text{NaIO}_4$ ,  $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$ ; 7,5 mg (5%) de **9**, oxydé avec  $\text{NaIO}_4$ ,  $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$ ; 15 mg (10%) de **6**, oxydé avec  $\text{NaIO}_4$ ,  $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$ .

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] *A. N. Ganguly, J. H. Bieri & M. Viscontini*, *Helv. Chim. Acta* **64**, 367 (1981).
- [2] *M. Viscontini & Y. Furuta*, *Helv. Chim. Acta* **56**, 1710 (1973).
- [3] *M. Viscontini & Y. Furuta*, *Helv. Chim. Acta* **56**, 1819 (1973).
- [4] *K. Sugiura & M. Goto*, *Bull. chem. Soc. Japan*, **46**, 939 (1973).
- [5] *A. Niederwieser, A. Matasovic, H.-Chr. Curtius, W. Endres & J. Schaub*, *F.E.B.S. Letters*, **118**, 299 (1980).
- [6] *M. Viscontini & E. Möhlmann*, *Helv. Chim. Acta* **42**, 836 (1959).
- [7] *B. Schircks, J. H. Bieri & M. Viscontini*, *Helv. Chim. Acta* **61**, 2731 (1978).
- [8] *M. Viscontini, R. Provenzale, S. Ohlgart & J. Mallevialle*, *Helv. Chim. Acta* **53**, 1202 (1970).
- [9] *P. Karrer & M. Viscontini*, *Helv. Chim. Acta* **29**, 1981 (1946); pour les autres références voir [2].
- [10] *I. Berenblum & E. Chain*, *Biochem. J.* **32**, 295 (1938).
- [11] *B. Schircks, J. H. Bieri & M. Viscontini*, *Helv. Chim. Acta* **59**, 248 (1976).
- [12] *M. May, T. J. Bardos, F. L. Barger, M. Lansford, J. M. Ravel, G. L. Sutherland & W. Shive*, *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 3067 (1951).