

60. Über Pterinchemie

40. Mitteilung [1]

Weiterer Beitrag zur Synthese des Biopterins

von M. Viscontini, R. Provenzale und W. F. Frei

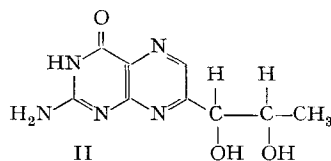
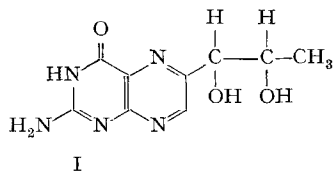
Organisch-chemisches Institut der Universität, CH-8001 Zürich, Rämistrasse 76

(5. I. 72)

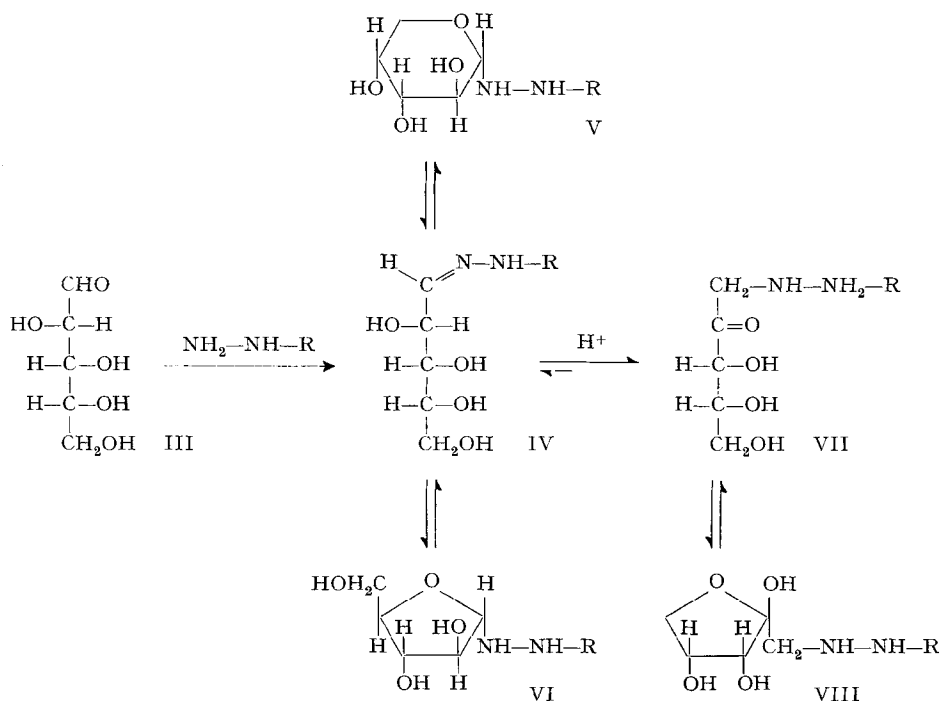
Zusammenfassung. Eine neue Synthese des Biopterins ausgehend von L-4-Methyl-erythrulose und 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin wird beschrieben. Bei der Oxydation des intermediär gebildeten Tetrahydrobiopterins wird die Dihydroxypropyl-Kette so leicht abgespalten, dass die Ausbeute an Biopterin auch bei dieser Synthese 15% nicht übersteigt. Eine mögliche Erklärung dieser Abspaltung wird vorgeschlagen.

Nach dem Erfolg bei der Synthese von Neopterin und Monapterin [2] haben wir versucht, das Biopterin nach dem gleichen Prinzip herzustellen [3]. Obwohl die Synthese gelang, traten dabei zwei unerwartete Schwierigkeiten auf, welche die geringe Ausbeute an Biopterin (10–15%) zur Folge hatten. Erstens liessen sich die als Edukte dienenden L-1-Amino-4-methyl-tetroside schlecht umlagern und es konnte kein reines *Amadori*-Umlagerungsprodukt isoliert werden; lediglich mit dem Benzyl-phenyl-hydraxon der 5-Desoxy-L-arabinose wurden befriedigende Mengen an Biopterin erhalten. Zweitens wurde bei der Luftoxydation der intermediär gebildeten 6-Dihydroxypropyl-tetrahydropterine stets die Seitenkette in 6-Stellung sehr leicht abgespalten, was zu grossen Mengen unerwünschtem Pterin führte.

Wir haben zunächst versucht, die obige Methode zu optimieren: die Reaktionsbedingungen wurden in bezug auf pH, Temperatur, Konzentration der Reaktionspartner und auch durch Verwendung einer Reihe verschiedener Hydrazone, wie Phenyl-, Benzyl-phenyl-, α -Naphthyl-, β -Naphthyl- und Phenäthyl-hydraxon, variiert, die Ausbeuten blieben aber gering und das Biopterin (I) war stets vom isomeren 7-Isobiopterin (II) begleitet.

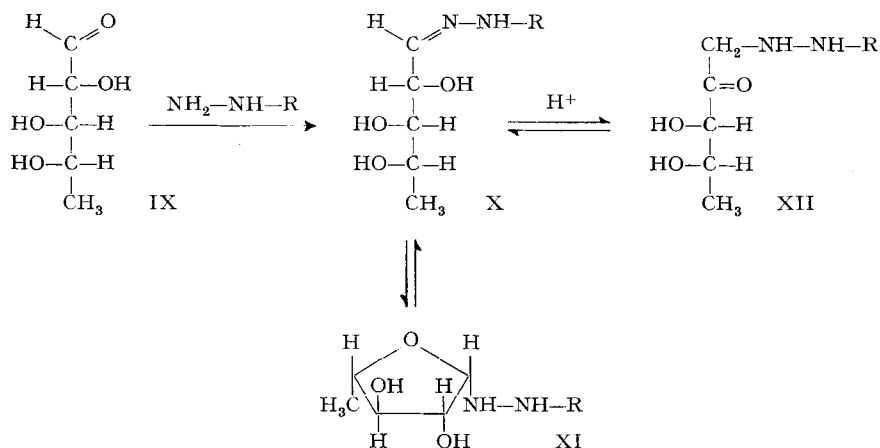


Wir erklären die abweichenden Ergebnisse zwischen der Neopterin- bzw. Monapterin-Synthese und der Biopterin-Synthese in der unterschiedlichen Stabilisierungsmöglichkeit der Pentosen und der 4-Methyltetrosen durch Bildung cyclischer Halb-acetalformen. Die Hydrazone der Pentosen (z. B. der D-Arabinose (III)) können als offene Kette (IV), als Pyranoid-(V) oder als Furanoid-Ring (VI) vorliegen. Das offenkettige Produkt der säurekatalysierten *Amadori*-Umlagerung (1-Hydrazino-D-ribu-



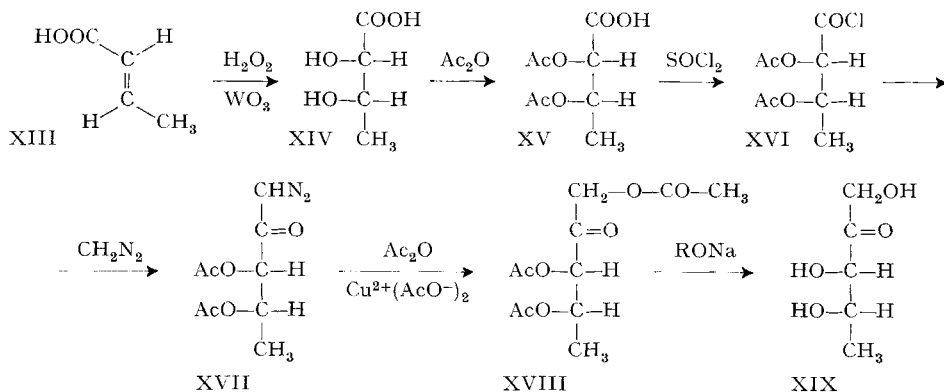
lose (VII)) kann ebenfalls durch eine furanoide Halbacetal-Struktur VIII stabilisiert werden.

Das Hydrazone X der für die L-Biopterin-Synthese zu verwendenden 4-Methyl-tetrose IX (L-5-Desoxyarabinose) kann noch die furanoide Ringstruktur XI annehmen,



men, aber die 1-Hydrazinoerythrose XII kann nur noch als offene Kette vorliegen. Wegen Mangel an Stabilisierungsmöglichkeit liegt das Gleichgewicht $\text{X} \rightleftharpoons \text{XII}$ stärker auf Seite des Hydrazons als bei Pentosen.

Da die Herstellung des Biopterins mittels L-1-Hydrazino-4-methyl-erythrulose (XII) sich als nicht sehr vielversprechend erwies, haben wir nach einer andern Methode gesucht und gedacht, dass die L-4-Methyl-erythrulose (XIX) beständiger als das entsprechende Hydrazinoderivat XII sein könnte. XIX ist unseres Wissens



noch unbekannt und wurde, zunächst als Racemat, dann als L-Enantiomeres, nach obigem Schema hergestellt. Die D,L-erythro-2,3-Dihydroxy-buttersäure (XIV) wird nach *Mugdan & Young* [4] aus trans-Crotonsäure (XIII) hergestellt. Die Spaltung des Racemates in die Enantiomeren wurde von *Hoff-Jorgensen* [5] beschrieben. *Bachelor & Miana* [6] haben durch ORD.-Messungen die absolute Konfiguration der (–)-erythro-Dihydroxy-buttersäure als 2(R), 3(R) bestimmt; damit gehört die (–)-drehende Säure der D-Reihe an. Da bei der Racematspaltung nach [5] nur das Chininsalz der D(–)-Säure kristallisiert, kann die L(+)-Säure nicht frei von D(+)-Säure gewonnen werden.

Die Kondensation der Methyl-tetrose XIX mit 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin verläuft ohne besondere Schwierigkeiten, aber bei der Oxydation des hydrierten Kondensationsproduktes stellt man wieder eine starke Abspaltung der C(6)-Seitenkette fest. Es entsteht stets wenig Biopterin neben viel Pterin. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass nur Spuren von 7-Isobiopterin gebildet werden. Das aus L(+)-Dihydroxybuttersäure erhaltene Biopterin zeigt eine zu tiefe spezifische optische Drehung (+ 27° anstatt + 60° für reines L-Biopterin [31]), ein Beweis dafür, dass die L-Säure XIV nicht optisch rein ist. Im experimentellen Teil beschreiben wir die Synthese des D,L-Biopterins. Jene des L-Biopterins verläuft ganz analog.

Wir danken Herrn *H. Frohofer*, Leiter unserer mikroanalytischen Abteilung, für die Ausführung der Mikroanalysen, die Aufnahme der IR.-Spektren und die Messungen der optischen Drehungen, *Fr. S. Harre* für ihre Mithilfe bei der Synthese zahlreicher Substanzen. Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds unterstützt.

Experimenteller Teil

D,L-erythro-2,3-Dihydroxy-buttersäure (XIV). Die Säure wird nach [4] mit folgenden Änderungen hergestellt: 1,5 g Wolframsäure werden in 253,6 g (4 Mol) 30proz. H₂O₂ gelöst, nach Zugabe von 207 g (2,4 Mol) trans-Crotonsäure XIII auf 1200 ml mit Wasser verdünnt und unter Rühren während 4 Std. auf 70° erwärmt. Nach dem Abkühlen wird aus dem Gemisch die verbleibende Crotonsäure dreimal mit je 300 ml CHCl₃ extrahiert und die wässrige Lösung zur Trockene ein-

gedampft. Der zähflüssige Rückstand wird aus Essigester umkristallisiert. Farblose Kristalle, Smp. 81°, Ausbeute: 135 g (45%).

Die Racemat-Spaltung wird nach [5] ausgeführt. Die so gewonnene *L*-erythro-Dihydroxybuttersäure besitzt eine spezifische optische Drehung von +7° und ist eindeutig nicht optisch rein.

D,L-erythro-2,3-Diacetoxy-buttersäure (XV) und *D,L*-erythro-2,3-Diacetoxy-buttersäurechlorid (XVI). Beide Substanzen werden nach [7] hergestellt, wie auch das *L*-Säurechlorid, $[\alpha]_D^{20} = +6^\circ$ ($c = 3$, CHCl_3).

D,L-erythro-3,4-Diacetoxy-diazoketon (XVII). Zu einer wasserfreien, ätherischen, aus 40 g *N*-Nitroso-*p*-toluolsulfomethylamid hergestellten Diazomethanolösung tropft man bei 0° eine Lösung von 6,25 g (28 mMol) frisch destilliertem Säurechlorid XVI in 100 ml absolutem Äther zu und lässt über Nacht bei 25° stehen. Man engt die Lösung unter Vakuum ein, wobei man zur Zersetzung des überschüssigen Diazomethans etwas Eisessig in die Vorlage gibt. Das zurückbleibende Rohprodukt wird an einer Kieselgelsäule (4 × 20 cm) mit Benzol/Essigester 4:1 gereinigt. Die gelbgefärbte Diazoketon-Zone lässt sich leicht verfolgen; die entsprechende Fraktion wird aufgefangen, zur Trockne eingeeengt und der Rückstand direkt analysiert. Ausbeute: 5,75 g (90%) eines zähflüssigen Öls.

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ (228,20) Ber. C 47,37 H 5,30 N 12,28% Gef. C 47,09 H 5,36 N 12,20%

Das *L*-Diazoketon wird in analoger Weise dargestellt, $[\alpha]_D^{20} = +38^\circ$ ($c = 3$, CHCl_3).

D,L-1,3,4-Triacetoxy-erythrulose (XVIII). 6 g (26 mMol) Diazoketon XVII werden in 150 ml Eisessig und 1 ml Essigsäureanhydrid gelöst und mit 10 mg Kupfer(II)-acetat 3 Std. auf 60–70° erhitzt, wobei Stickstoff entweicht. Anschliessend erhitzt man für 1 Std. auf 100° und destilliert den Eisessig am Rotationsverdampfer ab. Da während der Reaktion teilweise Deacetylierung eintritt, wird das erhaltene Öl während 6 Std. mit Essigsäureanhydrid auf dem Wasserbad und unter Wasserausschluss nachacetyliert. Hierauf destilliert man das Essigsäureanhydrid im Vakuum ab und das zurückbleibende Triacetat XVIII im Kugelrohr (0,5 Torr, 90°): 3,5 g (50%) eines zähflüssigen, farblosen, nicht kristallisierenden Öls.

$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_7$ (260,30) Ber. C 50,77 H 6,28% Gef. C 50,78 H 5,98%

Die entsprechende *L*-Erythrulose wird auf gleiche Weise hergestellt und ohne weitere Reinigung für die Synthese des *L*-Biopterins verwendet.

D,L-Biopterin (I). Die Synthese erfolgt bei Gelb-Licht und unter reinem Stickstoff. Eine Lösung von 260 mg (1 mMol) *D,L*-Triacetoxy-erythrulose (XVIII) in 5 ml abs. Methanol wird mit einer Lösung von 10 mg Natrium in 10 ml abs. Methanol bei 0° versetzt. Nach 15 Min. wird das Gemisch mit methanolischer Essigsäure neutralisiert. Durch Dünnschichtchromatographie (Silicagel, Aceton/Essigester 1:9) wird die Bildung der freien *D,L*-Erythrulose (XIX) verifiziert. Zu der Erythrulose-Lösung gibt man 164 mg (2 mMol) wasserfreies Natriumacetat, einen Tropfen Thioäthanol und 214 mg (1 mMol) Triaminohydroxypyrimidin-Dihydrochlorid. Die erhaltene Lösung wird in ein vorgewärmtes Ölbad von 75° gebracht, mit Magnet gerührt und 2 Std. erwärmt. Die Bildung des Kondensationsproduktes bzw. das Verschwinden des Pyrimidins kann dünnschichtchromatographisch mit Celluloseplatten und Butanol/Eisessig/Wasser 20:3:7 als Elutionsmittel leicht verfolgt werden.

Nach 2 Std. filtriert man den gebildeten, braunen Niederschlag ab, zieht das Methanol unter Vakuum ab, nimmt den Rückstand in 100 ml Wasser (pH 7) auf und leitet zur Oxydation des Kondensationsproduktes bei 25° über Nacht Luft in die Lösung ein, wobei neben *D,L*-Biopterin (I) viel Pterin ausfällt. Die entstandene Suspension wird unter Vakuum eingeeengt, der Rückstand in wenig Aceton aufgenommen, abzentrifugiert, in einer 1proz. minimalen Menge NH_4OH gelöst und die Lösung vom Ungelösten abfiltriert. Das Filtrat wird zunächst auf eine mit Dowex 1 × 8 beschickte Säule (2 × 10 cm) gebracht, und hierauf werden die absorbierten Pterine mit 0,03M Ammoniumformiat-Puffer von pH 7,2 eluiert. Die blau fluoreszierenden Fraktionen werden papierchromatographisch geprüft (Lösungsmittel wie oben) und die Elution unterbrochen, sobald kein Biopterin im Eluat mehr erscheint. Ein grösserer Teil des begleitenden Pterins wird somit abgetrennt und eine erste Reinigung erreicht. Die das Biopterin enthaltenden Fraktionen werden im Rotationsverdampfer abgedampft und der Rückstand, welcher mit Äthanol vom Ammoniumformiat befreit wird, nochmals chromatographiert (Dowex 1 × 8, 3 × 25 cm, 0,03M Ammoniumformiat von pH 8 am Anfang, 7,2 am Ende). Die das Biopterin enthaltenden Fraktionen

werden auf 2 ml eingengt und mit 15–12 ml Äthanol versetzt. Das ausgefallene Biopterin wird abzentrifugiert, mit Äthanol und Äther gewaschen und aus heissem Wasser umkristallisiert, wobei man 30 mg (12–13%) reines DL-Biopterin erhält (Analysen, UV.- und IR.-Spektren).

Das L-Biopterin wird nach dem gleichen Verfahren gewonnen, $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ \pm 7^\circ$ ($c = 0,15$, 0,1N HCl) (das reine L-Biopterin besitzt eine spezifische optische Drehung von -60° [3]).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 39. Mitteilung: M. Viscontini & J. Bieri, *Helv.* 54, 21 (1971).
- [2] M. Viscontini & R. Provenzale, *Helv.* 51, 1495 (1968); M. Viscontini, R. Provenzale, S. Ohlgart & J. Mallevialle, *Helv.* 53, 1202 (1970).
- [3] M. Viscontini & R. Provenzale, *Helv.* 52, 1225 (1969).
- [4] M. Mugdan & D. P. Young, *J. chem. Soc.* 1949, 2988.
- [5] E. Hoff-Jorgensen, *Z. physiol. Chem.* 268, 194 (1941).
- [6] F. W. Bachelor & G. A. Miama, *Canad. J. Chem.* 102, 187 (1969).
- [7] J. W. E. Glattfeld & W. G. Straitiff, *J. Amer. chem. Soc.* 60, 1384 (1938).

61. Über Pterinchemie

41. Mitteilung [1]

Eine neue Synthese von D, L-Biopterin

von M. Viscontini und W. F. Frei

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

(5. I. 72)

Zusammenfassung. – Die Kondensation von D,L-2,3-O-Isopropyliden-4-methyl-erythrulose mit 2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin wird beschrieben. Die Luft-Oxydation des hydrierten Kondensationsproduktes führt zu D,L-1',2'-O-Isopropyliden-biopterin ohne Abspaltung der Seitenkette. Durch hydrolytische Abspaltung der Isopropylidengruppe wird in guter Ausbeute reines, isomerenfreies D, L-Biopterin erhalten.

Eine gute Synthese des L-Biopterins existiert noch nicht: entweder ist das erhaltene Produkt mit dem 7-Isobiopterin verunreinigt oder es findet während der letzten oxydativen Stufe der Synthese eine Abspaltung der 1',2'-Dihydroxypropyl-Kette statt. Diese Abspaltung scheint stets einzutreten, wenn eine 1,2-Dihydroxypropyl-Kette vorhanden ist, während sie bei einer Trihydroxy-propyl-Kette nicht oder nicht in so starkem Ausmass beobachtet wird. Es dürfte sich dabei um eine Oxydation am C(1')-Atom handeln, wie wir es in der 37. Mitteilung [2] angedeutet haben. Die Versuche der 40. Mitteilung [1] beweisen, dass wir mit der L-5-Methyl-erythrulose XIII ein Edukt in den Händen haben, welches sich leicht mit dem Triamino-hydroxypyrimidin IX kondensiert. Leider konnten wir bei der anschliessenden Oxydation die Abspaltung der Seitenkette nicht vermeiden, so dass die Ausbeute an Biopterin bescheiden blieb. Es schien uns möglich, durch Schützung der C(1')-OH-Gruppe die Oxydation am C(1') zurückzudrängen. Somit stellte sich das Problem, einen geeigneten Schutz für die C(3)-OH-Gruppe der Erythrulose XIII zu finden. Aus der daraufhin von uns geplanten Synthese der Methyl-erythrulose ergibt sich zusätzlich die Bedingung, dass die Schutzgruppe gegenüber Basen beständig sein muss, da bei