

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**

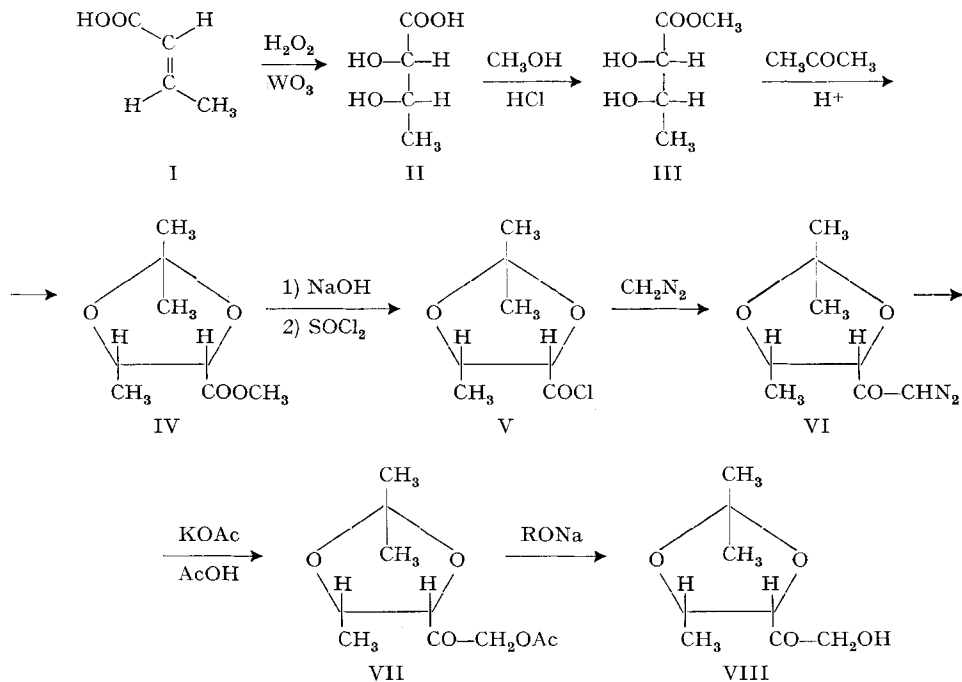
Organisch-chemisches Institut der Universität, CH-8001 Zürich, Rämistrasse 76

(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

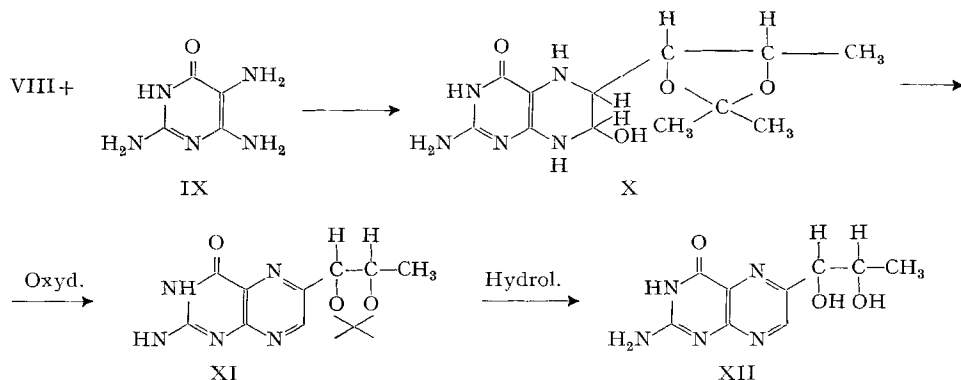
dieser Synthese eine O-Acetyl-Gruppe spezifisch durch basische Hydrolyse entfernt werden soll. Den besten Schutz bietet unter diesen Bedingungen die O-Isopropyliden-Gruppe, mit der sich beide OH-Gruppen der späteren 1'- und 2'-Stellung des Biopterins gleichzeitig schützen lassen. Das geeignetste Produkt, das alle obigen Bedingungen erfüllt, ist somit die L-3,4-O-Isopropyliden-4-methyl-erythrose (VIII). Da die Herstellung des L-Enantiomeren sehr schwierig ist, haben wir zunächst das Racemat nach folgendem Schema gewonnen:



Die aus *trans*-Crotonsäure (I) gewonnene D,L-*erythro*-2,3-Dihydroxy-buttersäure (II) [1] wird zunächst in den Methylester III und dieser in das Isopropyliden-Derivat IV übergeführt. Der Ester IV wird zum entsprechenden Natriumsalz verseift und anschliessend mittels Thionylchlorid in das Säurechlorid V umgewandelt, das ohne Zersetzung destilliert werden kann und, sofort mit Diazomethan versetzt, ins Diazoketon VI übergeführt wird. Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie wird das Diazoketon VI in D,L-1-Acetyl-3,4-O-isopropyliden-4-methyl-erythrose (VII) umgewandelt, welche bei Vakuumdestillation im Kugelrohr spontan kristallisiert.

Für die Kondensation mit 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin IX muss die Acetylgruppe der Methyl-erythrose VII entfernt werden, was durch Behandlung einer alkoholischen Lösung von VII mit katalytischen Mengen Natriumalkoholat bzw. NaOH erreicht wird. Unter diesen Bedingungen sollte die Isopropyliden-Gruppe beständig sein. Bei der anschliessenden Kondensation von VIII mit IX wird jedoch immer die Bildung einer gewissen Menge von freiem D,L-Biopterin (XII) neben Spuren von 7-Isobioplerin festgestellt, was vorerst auf eine Entfernung der Isopropyliden-Gruppe während der Kondensation zurückgeführt wurde. Eine sorgfältige Analyse

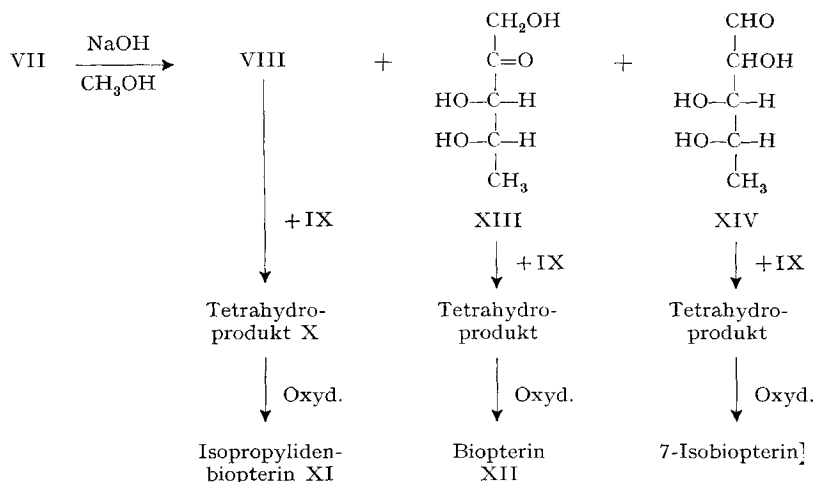
der Reaktion zeigte aber, dass das D,L-Biopterin sofort bei der Vereinigung von VIII und IX entsteht, während das D,L-O-Isopropyliden-tetrahydrobiopterin X wesentlich langsamer gebildet wird. Daraus muss geschlossen werden, dass die Isopropyliden-Gruppe bereits während der basischen Entacetylierung teilweise abgespalten wird. Dieses unerwartete und unseres Wissens bis jetzt in der Literatur noch nicht erwähnte Verhalten führt VII zur freien 4-Methyl-erythrose XIII, was chro-



matographisch bewiesen werden konnte. Wir glauben, diese Reaktion auf die Tatsache zurückführen zu können, dass die Schutzgruppe in α , β zu einer Carbonylgruppe steht, wobei letztere kein cyclisches Halbacetal bilden kann.

Die besten Ausbeuten bei der Kondensation an Isopropyliden-biopterin XI (40%) werden erzielt, wenn die Abspaltung der Acetylgruppe bei 0° unter Verwendung von 0,8 Äqu. NaOH in CH₂OH während 2 Min. ausgeführt wird.

Zusammenfassend lässt sich die Biopterin-Synthese folgendermassen formulieren:



Das entstandene Isopropyliden-tetrahydrobiopterin X wird als Rohprodukt durch Luftsauerstoff oxydiert und anschliessend an einer Cellulosesäule sehr leicht von Biopterin und 7-Isobiopterin getrennt. Auf der Säule zeigt sich gelegentlich im UV.-

Licht eine äussert schwache Pterinbande (zwischen dem Isopropylidenbiopterin XI und dem Biopterin XII). Die Entstehung des Pterins wird auf Abspaltung der Seitenkette aus dem primär gebildeten hydrierten Biopterin resp. Isobiopterin (IX + XIII und IX + XIV) zurückgeführt.

Das Isopropyliden-biopterin XI lässt sich durch Hydrolyse in 20-proz. CH_3COOH bei 100° quantitativ in reines D,L-Biopterin überführen. Oxydation zur Pterin-6-carbonsäure und IR.-Spektrum bestätigen das Fehlen des 7-Isobiopterins als Begleitstoff. Ausbeuten bis 40% DL-Biopterin wurden in mehreren Ansätzen erreicht und stellen einen bedeutenden Fortschritt gegenüber früheren Synthesen dar.

Wir danken Herrn H. Frohofer, Leiter unserer mikroanalytischen Abteilung, für die Ausführung der Mikroanalysen und die Aufnahme der IR.-Spektren und Fr. S. Harre für ihre Mithilfe bei der Synthese zahlreicher Substanzen.

Experimenteller Teil

D,L-erythro-2,3-Dihydroxy-buttersäure-methylester (III). In 500 ml abs. Methanol wird getrockneter HCl eingeleitet bis zu 3proz. Gewichtszunahme. Zu dieser Lösung werden 40 g (0,33 Mol) D,L-erythro-2,3-Dihydroxy-buttersäure [1] gefügt und das Ganze 24 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen wird die Lösung mit NH_3 neutralisiert und unter Vakuum bis zu einem dicken Sirup eingengt. Dieses Rohprodukt wird bei 10 Torr fraktioniert, wobei die bei 109° konstant siedende Fraktion aufgefangen wird. Ausbeute: 32 g (71%).

$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4$ (134,13) Ber. C 44,77 H 7,52% Gef. C 44,32 H 7,84%

D,L-erythro-2,3-O-Isopropyliden-dihydroxy-buttersäuremethylester (IV). 40 g (0,3 Mol) Methyl-ester III werden in 700 ml wasserfreiem Aceton mit 100 g wasserfreiem Kupfersulfat und 0,8 ml konz. H_2SO_4 während 18 Std. bei 25° intensiv gerührt. Anschliessend wird das pH auf 7,2 eingestellt. Die unlöslichen Salze werden durch eine 1 cm dicke Hyflow-Schicht abfiltriert und das klare Filtrat am Rotationsverdampfer zum Sirup eingengt. Dieses Rohprodukt wird fraktioniert (10 Torr) und bei $72\text{--}73^\circ$ aufgefangen. Ausbeute: 41 g (79%). NMR.-Spektrum¹⁾ (CDCl_3), C(3)— CH_3 : δ , 1,2 ppm, 3H; $\text{C} \begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ \diagup \end{smallmatrix} \begin{smallmatrix} \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$: 2s, 1,38 und 1,6 ppm, 6H; O— CH_3 : s, 3,73 ppm, 3H; C(2)—H und C(3)—H: br m, 4,2–4,7 ppm, 2H.

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4$ (179,16) Ber. C 55,16 H 8,10% Gef. C 55,57 H 8,52%

Natriumsalz der D,L-erythro-2,3-O-Isopropyliden-dihydroxybuttersäure. 35 g (0,2 Mol) obiger Ester IV werden in 1500 ml abs. Äther gelöst, mit einer Mischung von 4,625 g (0,2 Äqu.) Natrium und 3,62 g (0,2 Mol) H_2O in 50 ml Methanol versetzt und unter sehr intensivem Rühren – da sonst eine kaum zentrifugierbare, gallertige Masse entsteht –, 18 Std. bei 25° belassen. Man kühlt auf -5° und zentrifugiert bei dieser Temperatur das gebildete Natriumsalz ab, wäscht mit 500 ml Äther nach und trocknet bei 10^{-4} Torr (25°). Ausbeute: 34 g (94%).

$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_4\text{Na}$ (182,12) Ber. C 46,16 H 6,09% Gef. C 45,64 H 6,20%

D,L-erythro-2,3-O-Isopropyliden-dihydroxy-buttersäurechlorid (V). 13,63 g (0,075 Mol) Natriumsalz werden in 150 ml CHCl_3 nach Zerreiben aufgeschlämmt und unter Rühren bei -10° tropfenweise mit 25 ml frisch destilliertem SOCl_2 versetzt. Anschliessend lässt man innerhalb einer Stunde auf RT. aufwärmen und rührt eine weitere Std. bei 60° , wobei bereits NaCl ausfällt. CHCl_3 und überschüssiges SOCl_2 werden am Rotationsverdampfer (20°) entfernt, der Rückstand fraktioniert (10 Torr) und die Fraktion bei $65\text{--}66^\circ$ aufgefangen. Ausbeute: 8 g (60%). NMR.-Spektrum (CDCl_3): $\text{C} \begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ \diagup \end{smallmatrix} \begin{smallmatrix} \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$: 2s, 1,4 und 1,6 ppm, 6H; C(3)— CH_3 : δ , 1,45 ppm, 3H; C(2)—H und C(3)—H: br m, 4,3–4,9 ppm, 2H.

$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_3\text{Cl}$ (178,63) Ber. C 47,2 H 6,22 Cl 19,87% Gef. C 45,71 H 6,23 Cl 20,38%

¹⁾ Mit einem A-60-Varian-Apparat gemessen gegen TMS als internen Standard ($\delta = 0$); Abkürzungen: s = Singulett; δ = Dublett; t = Triplett; br = breit; m = Multiplett.

D,L-erythro-3,4-O-Isopropyliden-propyl-diazomethyl-ke-ton (VI). Zu einer ätherischen, aus 43 g N-Nitroso-*p*-toluolsulfonamid hergestellten Diazomethanolösung tropft man bei 0° eine Lösung von 7,5 g (0,042 Mol) frisch destilliertem Säurechlorid V in 50 ml Äther zu und lässt über Nacht bei 25° rühren. Die Lösung wird daraufhin im Vakuum eingengt, wobei in den Auffangkolben etwas Eisessig vorgelegt wird, um das mit Äther abgehende überschüssige Diazomethan zu zerstören. Das zurückbleibende Rohprodukt wird an einer Kieselgelsäule (40 × 200 mm) mit Petroläther/Äther 5:1 chromatographiert. Das gelbe Diazoketon VI lässt sich gut verfolgen und auffangen. Die Reinigung erfolgt durch Kugelrohrdestillation (70–80°, 10⁻³ Torr). Ausbeute: 5,8 g (67%). NMR.-Spektrum (CDCl₃): C(4)–CH₃: *d*, 1,25 ppm, 3 H; $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \text{C} \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$; 2s, 1,4 und 1,6 ppm, 6 H; C(3)–H und C(4)–H: *br m*, 4,2–4,8 ppm, 2 H; C(1)–H: *s*, 5,85 ppm, 1 H.

C₈H₁₂N₂O₃ (184,20) Ber. C 52,17 H 6,52 N 15,22% Gef. C 52,44 H 6,77 N 16,15%

D,L-1-Acetyl-3,4-O-isopropyliden-4-methyl-erythrulose (VII). 2,5 g (13,5 mMol) Diazoketon VI werden in 20 ml Eisessig und 0,5 ml Essigsäureanhydrid gelöst und mit 1 g wasserfreiem Kaliumacetat und 20 mg Kupferacetat 12 Std. auf 60–70° erwärmt, wobei N₂ entweicht. Anschliessend wird die Lösung 1 Std. auf 100° erhitzt und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird in 100 ml Äther aufgenommen, die Lösung vom Kaliumacetat filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt, wobei das Acetat VII spontan auskristallisiert. Vorreinigung durch Sublimation (10⁻⁴ Torr, Badtemperatur 60°, Kühler –20°). Reinigung durch Umkristallisation aus Äther/Hexan. Smp. 60°. Ausbeute: 1,750 g (60%). NMR.-Spektrum (CDCl₃) (Fig. 1): C(4)–CH₃: *d*, 1,22 ppm, 3 H; $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \text{C} \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$; 2s, 1,38 und 1,61 ppm, 6 H; CO–CH₃: *s*, 2,18 ppm, 3 H; C(3)–H und C(4)–H: *br m*, 4,2–4,9 ppm, 2 H; C(1)–H₂: *d*, 4,96 ppm, 2 H.

C₁₀H₁₆O₅ (216,20) Ber. C 55,55 H 7,46% Gef. C 55,29 H 7,51%

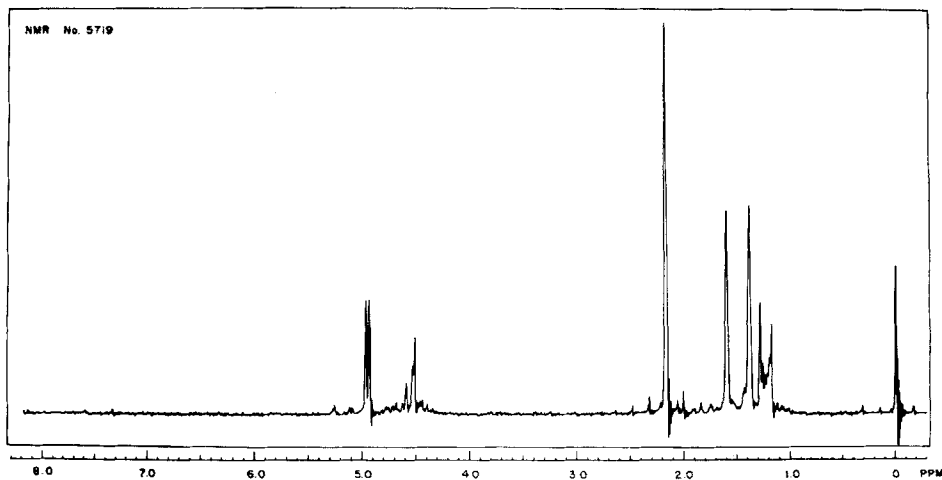


Fig. 1. NMR.-Spektrum von *D,L-1-Acetyl-3,4-O-isopropyliden-4-methyl-erythrulose* (VII) in CDCl₃ aufgenommen

Erläuterungen siehe den experimentellen Teil

D,L-1',2'-O-Isopropyliden-bi-pterin (XI). Die Synthese wird bei Gelblicht und unter gereinigtem Stickstoff durchgeführt. In einem Dreihalskolben, der mit Rückflusskühler und N₂-Einleitungsrohr versehen ist, werden 535 mg (2,5 mMol) 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-hydrochlorid, 50 ml Methanol und 3 Tropfen Thioäthanol zugegeben. Diese Mischung wird durch Zugabe von NaOCH₃ auf pH 5,4 gebracht, wobei sich eine klare Lösung ergibt.

In einem zweiten Kolben wird bei 0° unter N₂ eine Lösung von 535 mg (2,5 mMol) Acetylerythrulose VII in 10 ml Methanol und 2 Tropfen Thioäthanol hergestellt, unter Rühren mit

2 ml N KOH in Methanol versetzt, 2 Min. reagieren gelassen und daraufhin zu der Triamino-hydroxy-pyrimidin-Lösung gegossen. Die erhaltene Mischung wird mit CH_3COOH bzw. NaOCH_3 auf pH 7,8–8,2 eingestellt und 2 Std. bei 75° gerührt. Dabei wird das pH ständig kontrolliert und falls nötig auf 7,8–8,2 nachgestellt. Die Bildung des Isopropyliden-tetrahydrobiopterins wird mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie leicht verfolgt (Isopropylalkohol konz. NH_4OH 3:1).

Nach 2 Std. wird die Lösung abgekühlt und unter Vakuum eingengt. Der hellgelbe, feste Rückstand wird in 200 ml Wasser aufgenommen, die erhaltene Lösung auf pH 7 (NaHCO_3) gebracht und über Nacht durch Einleiten von Luft bei 25° oxydiert. Die Lösung wird wieder unter Vakuum eingengt, der braune, feste Rückstand in der minimalen Menge konz. NH_4OH gelöst, die neue Lösung mit 5fachem Vol. Isopropylalkohol und 3–5 g Cellulosepulver versetzt und nochmals zur Trockne eingengt. Das beschichtete Papierpulver trägt man auf eine trocken gestopfte Cellulosesäule (9 × 20 cm), die mit Laufmittel (Isopropylalkohol: konz. NH_4OH 5:1) equilibriert wurde. Trennleistung: 150–200 ml pro Std. Die erste blau fluoreszierende Zone besteht aus Isopropyliden-biopterin. Es folgt eine schwache, scharfe Zone (Pterin) und schliesslich eine zweite starke Zone (Biopterin und Isobiopterin). Die weiteren, zum Teil gelb fluoreszierenden Zonen wurden nicht untersucht.

Die Mischung Biopterin-Isobiopterin wird nach [3] in ihre Komponenten getrennt.

Die Isopropylidenbiopterin-Fractionen werden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, mit Aceton aufgeschlämmt, abzentrifugiert, einmal mit Wasser/Äthanol 1:1, zweimal mit Methanol, zweimal mit Aceton, zweimal mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 275 mg (40%). NMR.-Spektrum (5 N NaOD in D_2O , TMS. als externer Standard): $\text{C}(2')\text{—CH}_3$: d, 1,21 ppm, 3 H; $\text{C}(1')\text{—H}$ und $\text{C}(2')\text{—H}$: m, 4,3–5,9 ppm, 2 H (zum Teil mit dem OH-Signal); $\text{C}(7)\text{—H}$: s, 8,9 ppm, 1 H. IR.-Spektrum (Perkin-Elmer IR.-Spektrophotometer 21), s. Fig. 2.

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_3$ (277,28) Ber. C 52,0 H 5,45 N 25,27% Gef. C 51,51 H 5,65 N 23,98%

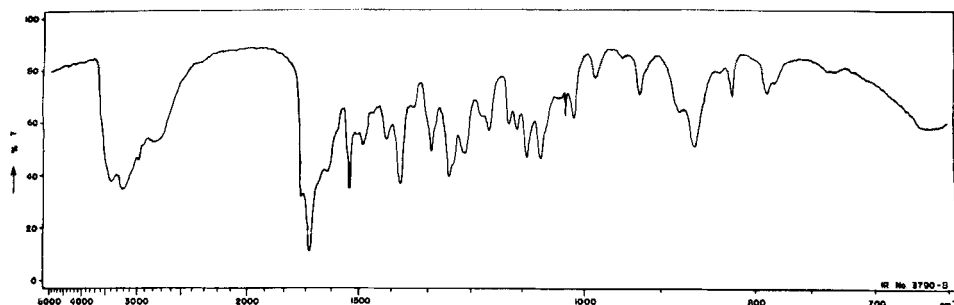


Fig. 2. IR.-Spektrum von Isopropylidenbiopterin in KBr aufgenommen

D,L-Biopterin (XII). 200 mg (0,72 mMol) Isopropylidenbiopterin XI werden in 20-proz. CH_3COOH 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Man kontrolliert die Reaktion durch Dünnschichtchromatographie und engt unter Vakuum ein, wobei das Biopterin ausfällt. Die verbleibende Lösung wird auf pH 4,5 gebracht, auf 0° gekühlt, das ausgefallene Biopterin abzentrifugiert, zweimal mit kaltem Wasser, zweimal mit Methanol, zweimal mit Aceton, zweimal mit Äther gewaschen und getrocknet (10^{-4} Torr, 100°). Ausbeute: 155 mg (90%).

Das Produkt zeigt alle chemischen Eigenschaften des natürlichen Biopterins.

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3$ (237,22) Ber. C 45,57 H 4,67 N 29,52% Gef. C 45,32 H 4,91 N 29,57%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 40. Mitteilung: M. Viscontini, R. Provenzale & W. F. Frei, *Helv.* 55, 570 (1972).
- [2] M. Viscontini & M. Argenti, *Helv.* 54, 2287 (1971).
- [3] M. Viscontini & R. Provenzale, *Helv.* 52, 1225 (1969).