

Pteridine, LXVIII¹⁾**Überführung von Biopterin in Sepiapterin und absolute Konfiguration des Sepiapterins²⁾**

Wolfgang Pfeleiderer

Fachbereich Chemie der Universität Konstanz,
Postfach 7733, D-7750 Konstanz

Eingegangen am 27. Dezember 1978

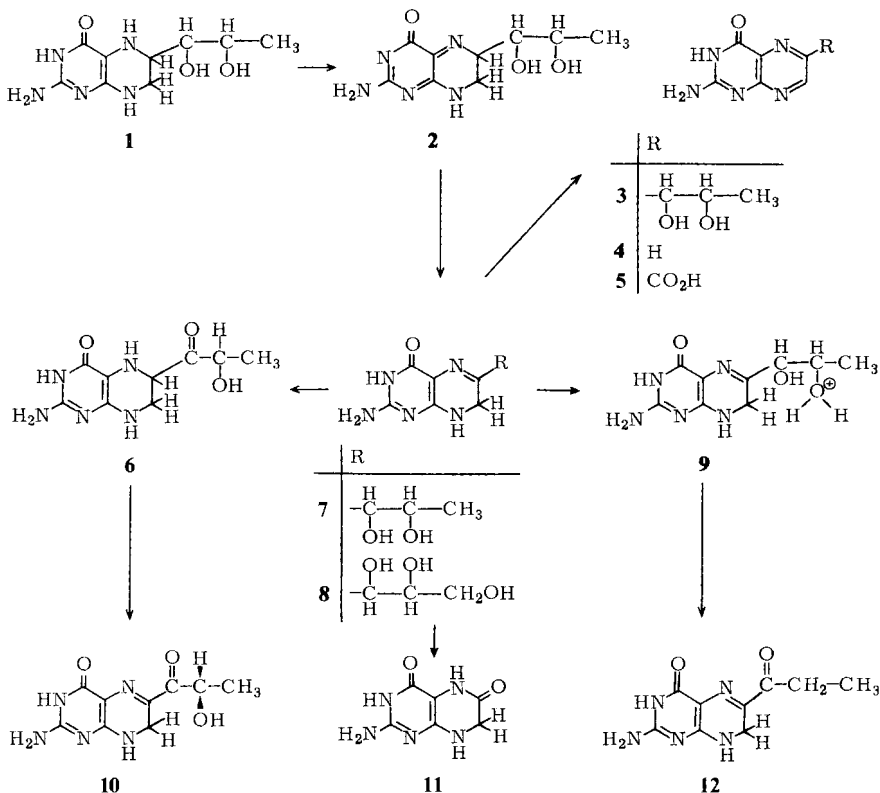
Pteridines, LXVIII¹⁾**Transformation of Biopterin into Sepiapterin and Absolute Configuration of Sepiapterin²⁾**

A new synthesis of the *Drosophila* pigment sepiapterin (**10**) has been found in the pH-dependent autoxidation of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (**1**). Most sepiapterin is formed at pH 4 leading to a 20% yield. Autoxidation of **1** at pH 7.5 caused a more severe degradation with preferential formation of 7,8-dihydroxanthopterin (**11**). The absolute configuration of the chiral center in **10** has been established and this natural product characterized as 6-[(S)-lactoyl]-7,8-dihydropterin. The photochemical degradation of **10** yielded pterin-6-carboxylic acid (**5**).

Im Auge von *Drosophila melanogaster* sind zwei gelb fluoreszierende Pterinpigmente³⁾ vorhanden, die aufgrund ihres angereicherten Vorkommens in der Mutante *sepia* unter den Namen Sepia-(**10**)⁴⁾ und Iosepiapterin (**12**)⁵⁾ bekannt sind. Für die Isolierung von **10**^{4,6,7)} erwies sich diese Mutante als sehr geeignet, während **12**⁸⁾ in der blaugrünen Alge, *Anacystis nidulans*, eine bessere natürliche Quelle besitzt. Bei den Konstitutionsermittlungen von **10**⁷⁾ und **12**⁹⁾ wurde die in den sehr ähnlichen physikalischen Eigenschaften offenbarte strukturelle Analogie beider Produkte sichtbar, die keine Isomeren¹⁰⁾ darstellen, sondern sich am C-2'-Atom der Seitenkette funktionell unterscheiden. Synthetisch ist Desoxysepiapterin (**12**) durch Einführung der C₃-Seitenkette in 7,8-Dihydropterin⁹⁾ bzw. die säurekatalysierte Umwandlung des 7,8-Dihydrobiopterins (**7**)^{11,12)} zugänglich, während sich Sepiapterin (**10**) bislang nur einmal in Form seiner Racemates¹³⁾ in minimaler Ausbeute erhalten ließ und demzufolge ein besserer synthetischer Zugang zu dieser Verbindung erforderlich erschien.

Bei Reoxidationsexperimenten hydrierter 6-substituierter Pterine war uns aufgefallen, daß speziell 7,8-Dihydro-Derivate chemisch interessant, aber wenig untersucht sind. Die partielle Hydrierung der 7,8-Positionen hat zur Folge, daß eine Polyhydroxyalkyl-Seitenkette in 6-Stellung, wie sie etwa in 7,8-Dihydrobiopterin (**7**) oder -neopterin (**8**)¹⁴⁾ vorliegt, im Zusammenhang mit der benachbarten Azomethin-Funktion im Ring als aza-analoges Kohlenhydrat angesehen werden kann. Unter diesem Gesichtspunkt ist es nicht verwunderlich, daß **7**, das zunächst bei der Reoxidation des 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterins (**1**) über das chinoide Zwischenprodukt **2**^{15,16)} entsteht, verschiedenen pH-abhängigen Umwandlungsreaktionen unterliegt, die ihre Parallelen in der Kohlenhydrat-Chemie besitzen. Die Reoxidation von **1** unter Luft, jedoch bei Ausschluß von Licht wegen der Photolabilität der meisten Pteridin-Derivate, führt bei pH 4 zu einem Gemisch mehrerer Verbindungen, aus dem Biopterin (**3**), Sepiapterin (**10**), Desoxysepiapterin (**12**), Pterin

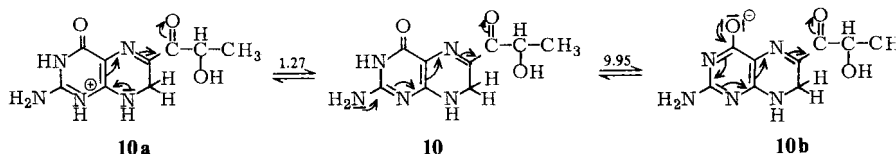
(4) und Pterin-6-carbonsäure (5) isoliert bzw. identifiziert werden konnten. Biopterin (3) stellt dabei das Hauptreaktionsprodukt dar, das seine Entstehung wohl der Aromatisierungstendenz von 7 verdankt. 7, das im übrigen bei der zeitlichen Verfolgung der Reaktion spektroskopisch nachgewiesen werden kann, ist möglicherweise auch einer Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein-Transformation¹⁷⁾ zu 5,6-Dihydrosepiapterin (6) zugänglich, aus dem sich durch erneute Luft-oxidation Sepiapterin (10) selbst bilden könnte. Es kann durch Chromatographie an Cellulose mit 20% Ausbeute isoliert werden. Neuere Untersuchungen zum selben Fragenkomplex¹⁸⁾ deuten jedoch an, daß die Reaktionsabfolge auch komplexerer Natur sein kann und 7 vermutlich nicht die Rolle eines zentralen Zwischenproduktes zukommt.



Es darf ferner angenommen werden, daß als Nebenreaktion 7 unter Protonierung der 2'-OH-Gruppe zu 9 reagiert und dann Dehydratisierung und 1,2-H-Verschiebung in der Seitenkette eintreten, wie dies in Analogie schon lange aus der Umwandlung von Glycerinaldehyd bzw. 1,3-Dihydroxyaceton in Methylglyoxal¹⁷⁾ bekannt ist, denn nur so ist die gleichzeitige Entstehung kleiner Mengen an Desoxysepiapterin (12) unter den gewählten Reaktionsbedingungen zu verstehen. In stärker saurem Medium läuft letztere Reaktion der Sepiapterin-Bildung den Rang ab, was folgerichtig zur Desoxysepiapterin-Synthese^{11, 12)} geführt hat.

Oxidation von 1 in Natriumhydrogencarbonat-Lösung bei pH 7.5 führt hauptsächlich zu 7,8-Dihydroxanthopterin (11)¹⁹⁾ neben kleinen Mengen an Biopterin (3) und Pterin (4). Es ist naheliegend, daß auch bei diesem oxidativen Abbau 7 als Zwischenprodukt auftritt, das vom Nucleophil in 6-Stellung angegriffen wird und dann einer Retroaldol-Spaltung der Seitenkette unterliegt.

Sepiapterin (**10**) haben wir anhand verschiedener physikalischer Eigenschaften charakterisiert. Die im normalen pH-Gebiet vorhandenen zwei pK_a -Werte²⁰⁾ wurden spektrophotometrisch² neu bestimmt und zu 1.27 und 9.95 gefunden, wobei der erste Wert das Gleichgewicht Monokation (**10a**) \rightleftharpoons Neutrale Molekül (**10**) und der zweite entsprechend die Beziehung Neutrale Molekül \rightleftharpoons Monoanion (**10b**) beschreibt.



Sepiapterin stellt vom chemischen Standpunkt aus betrachtet einen Merocyanin-Farbstoff dar, dessen langwelliger Chromophor in der Neutralform in der Längsrichtung polarisiert und von der 2-Amino- und der 6-Carbonyl-Gruppe als den wirksamsten Elektronendonator- und -acceptor-Substituenten begrenzt sein dürfte. Da die Protonierung eine hypsochrome und die Deprotonierung eine nahezu gleich große bathochrome Verschiebung der langwelligeren Absorptionsbande bedingt, liegt der Schluß nahe, daß hierbei das chromophore System um eine konjugierte Doppelbindung verkürzt bzw. verlängert wird, wie dies durch die Formulierung **10a** bzw. **10b** zum Ausdruck kommt und in den UV-Spektren (Abb. 1) demonstriert ist. Desoxysepiapterin (**12**) besitzt erwartungsgemäß sehr ähnliche physikalische Eigenschaften wie **10**, wobei als kleiner Unterschied die schwach hypsochrom verschobenen langwelligeren Absorptionsmaxima in den UV-Spektren auffallen.

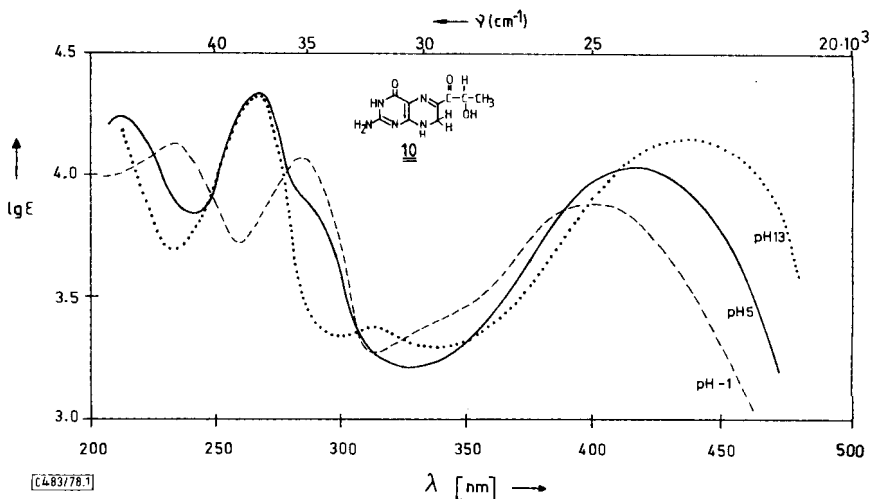


Abb. 1. UV-Absorptionsspektren des Monokations (pH \sim 1.0) — — —, Neutrale Moleküls (pH 5.0) ——— und Monoanions des Sepiapterins (**10**) (pH 13.0)

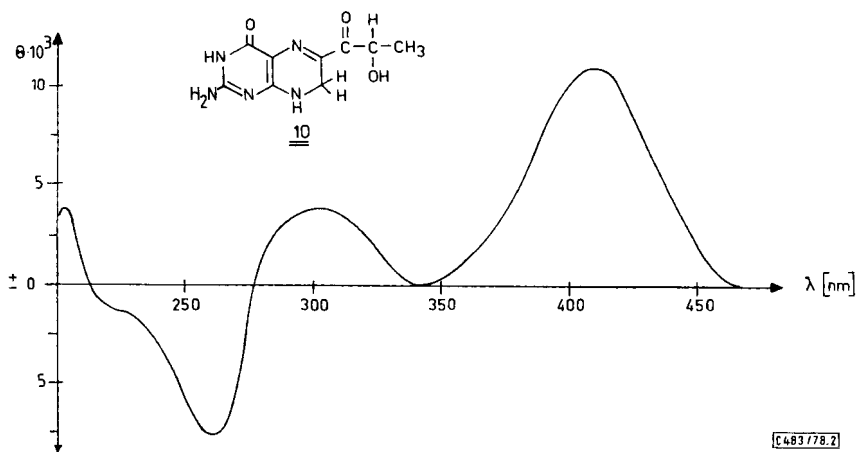
Ein weiteres, bislang ungelöstes strukturelles Problem bildete die Ermittlung der absoluten Konfiguration des chiralen Zentrums des Sepiapterins (**10**) an C-2' der Seitenkette. Es wurde früher^{5, 19)} schon vermutet, daß das C-2'-Atom dieselbe absolute Konfiguration wie in Biopterin (**3**) besitzt, da bei der Reduktion von **10** mittels Natriumborhydrid und anschließender Oxidation **3** isoliert und durch den *Crithidia*-Test identifiziert werden konnte. Diese Schlußfolgerung scheint aber nicht eindeutig, da die Reduktion der Carbonyl-Funktion in **10** ohne Frage ei

Diastereomerengemisch erwarten läßt, dessen Oxidation neben Biopterin (3) mit seiner *L-erythro*-Konfiguration auch noch Ciliapterin²²⁾, das *L-threo*-Isomere, hätte liefern müssen. Die oxidative Überführung von 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (1) in Sepiapterin (10) stellt jedoch einen Beweis für die übereinstimmenden absoluten *L*- bzw. (*S*)-Konfigurationen beider chiraler C-2'-Zentren dar. Zum selben Ergebnis kommen auch jüngste Untersuchungen²³⁾ über den oxidativen Abbau von 10 und die Konfigurationsbestimmung der resultierenden Milchsäure. Sepiapterin (10) kann demzufolge auch als 6-[(*S*)-Lactoyl]-7,8-dihydropterin bezeichnet werden.

Tab. 1. Physikalische Daten von Pteridin-Derivaten

pK _a -Wert in H ₂ O	UV-Absorptionsspektren λ _{max} (nm)lg ε						pH- Wert	Molekül- art
Biopterin (3)								
2.25 ± 0.05	247	320	4.07	3.92			− 1.0	+
7.98 ± 0.08	235	272 344	4.08	4.18 3.79			5.0	o
	254 [274]	363	4.38 [3.87]	3.86			11.0	−
Sepiapterin (10)								
1.27 ± 0.1	233	283 [330]	4.12	4.07 [3.38]	3.89		− 1.0	+
9.95 ± 0.05	212	266 [287]	4.23	4.24 [3.88]	4.04		5.0	o
		266 313 438	4.23	3.38 4.15			13.0	−
Desoxysepiapterin (12)								
1.35 ± 0.1	232	284 [330]	4.14	4.10 [3.35]	3.89		− 1.0	+
10.05 ± 0.1	213	265 [286]	4.22	4.23 [3.89]	4.01		5.0	o
		267 312 430	4.22	3.28 4.10			13.0	−

[] = Schulter; + = Kation; o = Neutalmolekül; - = Monoanion.

Abb. 2. CD-Spektrum des (*S*)-Sepiapterins (10) in Methanol

Ein weiterer experimenteller Beweis für die Richtigkeit der Konfigurationszuordnung kann im chiroptischen Verhalten von **10** gesehen werden, für das sowohl das natürliche als auch das aus **1** erhaltene synthetische Material im CD-Spektrum einen positiven Cotton-Effekt beim langwelligen Übergang zeigt (Abb. 2). Aus dem synthetischen Racemat¹³⁾ des (R,S)-Sepiapterins läßt sich entsprechend nach Behandlung mit Sepiapterin-Reduktase das unnatürliche Enantiomere erhalten, für dessen langwellige Bande im ORD-Spektrum ein negativer Cotton-Effekt gefunden wurde.

In ersten orientierenden Untersuchungen haben wir uns ferner mit der bekannten Photolabilität^{7, 20)} von **10** beschäftigt, da sie für die Chemie dieses Naturstoffes von speziellem Interesse ist. Wir stellten fest, daß Sepiapterin im Puffer von pH 7 schon bei normalem Tageslicht einen raschen einheitlich verlaufenden Photoabbau zu Pterin-6-carbonsäure (**5**) erfährt, ohne daß hierbei spektrophotometrisch irgendeine Zwischenstufe festgestellt werden konnte. Einzelheiten über den mechanistischen Ablauf dieser interessanten photochemischen Spaltung werden zur Zeit anhand einfacher Modellsbstanzten näher untersucht.

Ich danke dem *Fonds der Chemischen Industrie* für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Dr. K. J. M. Andrews, Roche Ltd., England, für die Überlassung von Tetrahydrobiopterin-dihydrochlorid und der chem.-techn. Assistentin Frau M. Bischler für die Bestimmung der physikalischen Daten.

Experimenteller Teil

UV-Absorptionsspektren und photochemischer Abbau: Cary Recording Spectrometer, Modell 118, der Firma Appl. Phys. Corp. — CD-Spektren: Cary-Recording-Spektrometer, Modell 1115/60. — Chromatographische Untersuchungen: Cellulose-Dünnschicht-Folien F 1440 bzw. F 1440 LS 254 von Schleicher und Schüll. — Säulenchromatographie: Cellulosepulver CF-11 der Fa. Whatman.

Sepiapterin (10): Die Lösung von 0.20 g 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin-dihydrochlorid ($1 \cdot 2 \text{ HCl}$)^{18, 24)} in 25 ml Phosphat-Puffer pH 4 wird bei Raumtemp. im offenen Erlenmeyer unter Lichtausschluß 2.5 Tage magnetisch gerührt. Es tritt rasche Gelbfärbung der Lösung ein, und nach ca. 15 h beginnt die Abscheidung eines braunen Niederschlags. Nach beendeter Reaktion wird der Niederschlag (0.11 g), der überwiegend aus Biopterin (**3**) sowie wenig Pterin (**4**) und Pterin-6-carbonsäure (**5**) besteht, abgesaugt und das gelborangefarbene Filtrat auf eine Cellulosesäule (30 × 5 cm) gegeben. Man entwickelt mit Wasser, wobei Auftrennung in drei Zonen, eine schnelllaufende blaufluoreszierende sowie zwei langsamer wandernde gelbfluoreszierende Banden erfolgt. Die mittlere, gelbe Fraktion wird gesammelt, i. Vak. bei Raumtemp. eingeengt (31 mg; 20%) und der gelbe Rückstand aus 5 ml Ethanol/1 ml Wasser unter Zugabe von etwas Ether umkristallisiert, wobei 20 mg (13%) chromatographisch reines, gelbes Kristallpulver anfallen, die i. Vak. bei 40°C über P_2O_5 getrocknet werden.

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (255.2) Ber. C 42.35 H 4.43 N 27.44 Gef. C 42.28 H 4.40 N 27.35

Desoxysepiapterin (Isepiapterin) (12): Die langsam wandernde zweite gelbe Zone wird von der Säule eluiert, i. Vak. zur Trockne eingeengt und der gelbe Rückstand aus wäßr. Ethanol umkristallisiert. Ausb. 2 mg, chromatographisch und spektrophotometrisch mit authentischem Material¹⁸⁾ identisch.

7,8-Dihydroxanthopterin (11): Die Lösung von 30 mg $1 \cdot 2 \text{ HCl}$ in 3 ml 1 N NaHCO_3 wird bei Raumtemp. im offenen Erlenmeyer und unter Lichtausschluß magnetisch gerührt. Nach 2 Tagen wird der abgeschiedene Niederschlag (12 mg) abgesaugt und aus verd. Natronlauge/Essigsäure unter Verwendung von wenig Aktivkohle umgefällt. Das erhaltene, gelbliche Kristallpulver (6 mg) erwies sich chromatographisch und spektrophotometrisch mit authentischem Material¹⁹⁾ identisch.

Literatur

- ¹⁾ LXVII. Mitteil.: Z. Kazimierzczuk und W. Pfeleiderer, Chem. Ber. **112**, 1499 (1979).
- ²⁾ W. Pfeleiderer in Chemistry and Biology of Pteridines, Ed. W. Pfeleiderer, S. 941, W. de Gruyter, Berlin 1975.
- ³⁾ E. Hadorn und H. K. Mitchell, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **37**, 650 (1951).
- ⁴⁾ I. Ziegler-Günder und E. Hadorn, Vererbungsl. **89**, 235 (1958).
- ⁵⁾ M. Viscontini und E. Möhlmann, Helv. Chim. Acta **42**, 836 (1959).
- ⁶⁾ H. S. Forrest und H. K. Mitchell, J. Am. Chem. Soc. **76**, 5656, 5658 (1954).
- ⁷⁾ S. Nawa, Bull. Chem. Soc. Jpn. **33**, 1555 (1960).
- ⁸⁾ H. S. Forrest, C. van Baalen und J. Myers, Arch. Biochem. Biophys. **83**, 508 (1959).
- ⁹⁾ S. Nawa und H. S. Forrest, Nature (London) **196**, 169 (1962).
- ¹⁰⁾ Isolepiapterin (12) sollte deshalb in Zukunft Desoxysepiapterin genannt werden.
- ¹¹⁾ S. Katoh und M. Akino, Experientia **22**, 793 (1966).
- ¹²⁾ T. Fukushima und T. Shiota, J. Biol. Chem. **247**, 4549 (1972).
- ¹³⁾ K. Sugiura und M. Goto, Nippon Kagaku Kaishi **1972**, 206.
- ¹⁴⁾ K. Sugiura und M. Goto, Bull. Chem. Soc. Jpn. **46**, 939 (1973).
- ¹⁵⁾ J. A. Blair und A. J. Pearson, Tetrahedron Lett. **1973**, 203.
- ¹⁶⁾ A. J. Pearson und J. A. Blair in Lit.²⁾, S. 775.
- ¹⁷⁾ J. C. Speck, Adv. Carbohydr. Chem. **13**, 63 (1958).
- ¹⁸⁾ B. Schircks, J. H. Bieri und M. Viscontini, Helv. Chim. Acta **61**, 2731 (1978).
- ¹⁹⁾ W. Pfeleiderer, Chem. Ber. **107**, 785 (1974).
- ²⁰⁾ M. Viscontini und E. Möhlmann, Helv. Chim. Acta **42**, 1679 (1959).
- ²¹⁾ A. Albert und E. P. Serjeant, The Determination of Ionization Constants, S. 44, Chapman and Hall Ltd., London 1971.
- ²²⁾ G. W. Kidder und C. V. Dewey, J. Biol. Chem. **243**, 826 (1968).
- ²³⁾ S. Matsuura, T. Sugimoto und M. Tsusue, Bull. Chem. Soc. Jpn. **50**, 2168 (1977).
- ²⁴⁾ Geschenk der Roche Ltd., England.

[483/78]