

**Neue regiospezifische Synthese von L-Bioterin
und von dessen Derivaten**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung
der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von
BERNHARD SCHIRCKS
von Chur (GR)

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. M. Viscontini

Zürich 1978

aku-Fotodruck

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung	9
1.1. Isolierung und Strukturaufklärung von 6-Hydroxy-alkyl-pterinen	9
1.1a. L-Sepiapterin und Deoxysepiapterin	9
1.1b. L-Biopterin	11
1.1c. D-Neopterin und L-Monapterin	12
1.2. Vorkommen und biochemische Bedeutung	13
1.2a. Pterine im Urin	13
1.2b. Hydroxylierung von L-Phenylalanin	14
1.2c. Hydroxylierung von L-Tyrosin	19
1.2d. Hydroxylierung von L-Tryptophan	21
1.2e. L-Biopterin als Wachstumsfaktor	23
1.2f. Pterine in Algen	24
1.3. Biogenese	25
2. Synthese von L-Biopterin	29
2.1. Theoretische Betrachtung und Problem- stellung	29
2.2. Neue regiospezifische Synthese von L-Biopterin	34
2.2a. 5-Deoxy-L-arabinose	36
2.2b. 5-Deoxy-L-arabinose-phenylhydrazon	38
2.2c. Triacetyl-5-deoxy-L-arabinose-phenyl- hydrazon und Tetraacetyl-5-deoxy-L- arabinose-phenylhydrazon	39
2.2d. Kondensation mit 6-Hydroxy-2,4,5-triamino- pyrimidin-dihydrochlorid	41
2.2e. Oxydation und Entacetylierung	43
2.2f. Synthese von L-Biopterin ohne Isolierung der Zwischenprodukte	43
2.2g. Reinigung des L-Biopterins	44

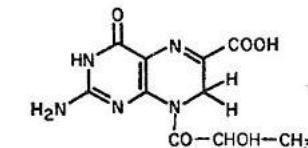
3. Synthese von L-Biopterinderivaten und deren Charakterisierung	47
3.1. 7,8-Dihydro-L-biopterin	47
3.2. Analyse der Reaktionsprodukte aus 7,8-Dihydro-L-biopterin in saurem Milieu	51
3.3. Deoxysepiapterin	54
3.4. (6R,S)-5,6-Dihydrodeoxysepiapterin	55
3.5. 2'-Deoxybiopterin	57
3.6. (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin	59
3.7. Rückoxydation von (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin	61
3.8. L-Sepiapterin	64
3.9. 5,6-Dihydro-L-sepiapterin	67
4. Klinische Versuche mit (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin, 7,8-Dihydrobiopterin und L-Sepiapterin	68
5. Experimenteller Teil	69
6. Zusammenfassung	85
7. Literaturverzeichnis	86

1. Einleitung

1.1. Isolierung und Strukturaufklärung von 6-Hydroxyalkyl-pterinen

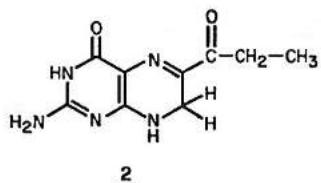
1.1a. L-Sepiapterin und Deoxysepiapterin

Schon bei den ersten chromatographischen Untersuchungen der fluoreszierenden Stoffe aus *Drosophila melanogaster*, ausgeführt von Hadorn und Mitchell, wurden zwei gelb fluoreszierende Verbindungen gefunden, die neben Riboflavin auftraten [1]. Diese gelben Produkte kommen in der Wildform nur in geringen Mengen vor, sind jedoch in der Mutante Sepia stark angereichert. Forrest und Mitchell konnten im Jahre 1954 den einen dieser gelben Stoffe isolieren [2]. Sie schrieben der Verbindung die folgende Strukturformel zu:



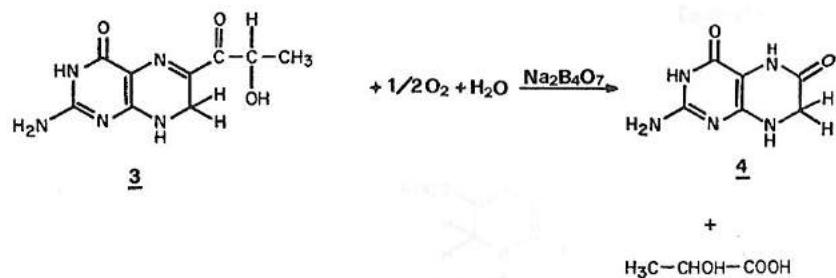
Ziegler-Günder und Hadorn gaben dem Produkt den Namen Sepiapterin [3]. 1959 isolierten und beschrieben Viscontini und Möhlmann das ebenfalls gelb fluoreszierende Deoxysepiapterin (2) (früher Isosepiapterin genannt) [4]. (In der vorliegenden Arbeit wurde für die Nomenklatur der Verbindungen, in denen eine OH-Gruppe durch H ersetzt wurde nicht das im Deutschen

übliche subtraktive Präfix Desoxy..., sondern das englische Deoxy... verwendet.)



2

Erst 1960 schlug Nawa für Sepiapterin die Struktur 3 vor [5].

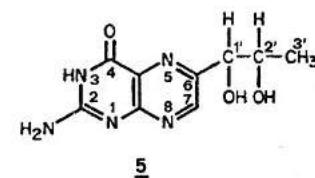


Er fand, dass sich 3 in einer Boraxlösung unter Aufnahme eines halben Moles Sauerstoff zu Dihydroxanthopterin (4) und Milchsäure zersetzt. Später konnte die vorgeschlagene Struktur mit Hilfe der 1H -NMR.-Spektroskopie bestätigt werden [6].

1.1b. L-Biopterin

Ein Jahr nach der Entdeckung des Sepiapterins (3), wurde von drei verschiedenen Arbeitsgruppen, praktisch gleichzeitig, das Biopterin (5) gefunden. So beschrieben Viscontini et al. eine aus *Drosophila melanogaster* isolierte, intensiv hellblau fluoreszierende Verbindung, die sie als HB_2 bezeichneten [7].

Wenig später berichteten Patterson et al. über die Gewinnung von etwa 20 mg einer hellblau fluoreszierenden Substanz aus 4000 Litern menschlichem Urin, deren UV.-Spektrum auf ein 6-Alkylpterin schliessen liess [8]. Sie bezeichneten diese neue Verbindung Biopterin und gaben für dessen Struktur die Formel 5 an.



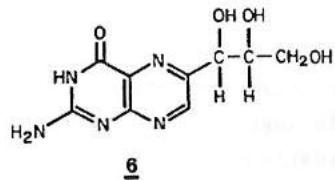
Das IR.-Spektrum wies auf eine Methylgruppe hin und die Ergebnisse der Elementaranalyse stimmten am besten mit Formel 5 überein. Auf die Lage der Seitenkette schlossen Patterson et al. aus Oxydationsversuchen mit Perjodat. In saurem Milieu erhielten sie 6-Formylpterin, im basischen Pterin-6-carbonsäure [8].

Zur gleichen Zeit veröffentlichten auch Forrest und Mitchell ihre Ergebnisse über die Isolierung von Pterinderivaten aus *Drosophila melanogaster*, wobei sie die Konstitution

der einen Komponente als diejenige der Formel 5, d.h. eines 6-(1',2'-Dihydroxypropyl)-pterins nachweisen konnten [9]. Die Struktur wurde von ihnen durch Synthese gesichert. Auch vermuteten Forrest und Mitchell, dass es sich bei HB₂ ebenfalls um Biopterin (5) handeln müsse [9]. Dies wurde denn auch in weiteren Arbeiten von Viscontini et al. bestätigt [10,11].

1.1c. D-Neopterin und L-Monapterin

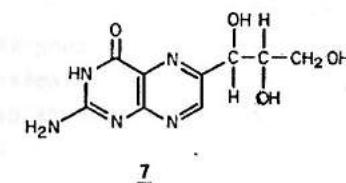
Zwei weitere Pterine, strukturell nahe verwandt mit Biopterin (5) und Sepiapterin (3) wurden in Insekten und Bakterien gefunden. Aus 2000 Larven der Honigbiene wurde von Rembold und Buschmann Neopterin (6) isoliert [12]. Bei Behandlung von 6 mit Kaliumpermanganat wurde Pterin-6-carbonsäure erhalten, was auf ein 6-Alkyl-pterin schliessen liess. Die Vermutung, dass Neopterin (6) eine Trihydroxypropylseitenkette aufweist, konnte durch Synthese der zwei Diastereomerenpaare bestätigt werden.



Nur das D-Erythro-Isomere hatte die gleichen chromatographischen Eigenschaften wie das natürliche D-Neopterin

(6) und zeigte die gleiche Aktivität beim Crithidia fasciculata Test (siehe Abschnitt 1.2e.) [12].

Das L-Monapterin (7) wurde von Viscontini et al. aus Pseudomonas roseus-fluorescens isoliert und als 6-(L-threo-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin identifiziert [13].



1.2. Vorkommen und biochemische Bedeutung

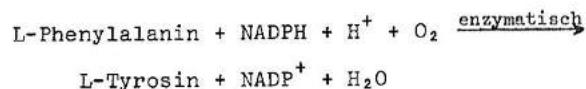
1.2a. Pterine im Urin

Im menschlichen Urin findet man eine grosse Zahl von Pterinen. Fukushima und Shiota fanden, dass pro Person und Tag 1 mg L-Biopterin (5) und 0.4 mg D-Neopterin (6) ausgeschieden werden [14]. Mindestens die Hälfte des Biopterins wird in der Dihydroform gefunden. Fukushima und Shiota halten es aber auch für möglich, dass alles Biopterin in der Dihydro- oder in der Tetrahydroform vorliegt, das dann aber beim Isolieren oxydiert wird. Neben L-Biopterin (5) und D-Neopterin (6) fanden sie auch kleine Mengen an Monapterin (7) (L-Threoneopterin), Pterin-6-carbonsäure, Pterin (61), Sepiapterin (3), Deoxysepiapterin (2), Xanthopterin und

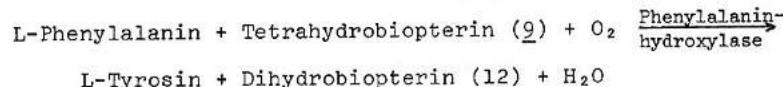
Isoxanthopterin. Sie vermuten, dass Deoxysepiapterin (2), Pterin-6-carbonsäure und Xanthopterin Folgeprodukte von andern hydrierten Pterinen sind [14]. Aus obiger Aussage ist die zentrale Bedeutung der Kenntnis der chemischen Eigenschaften von Dihydro- (8) und Tetrahydrobiopterin (9) ersichtlich.

1.2b. Hydroxylierung von L-Phenylalanin

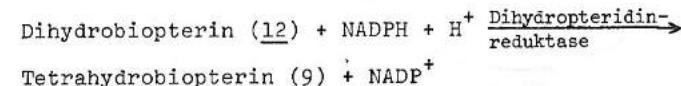
1963 fand Kaufman, dass bei der Hydroxylierung von L-Phenylalanin (14) zum L-Tyrosin (15) 7,8-Dihydrobiopterin (8) als Cofaktor wirkt [15]. Die Reaktion verläuft dabei nach folgender Gleichung [16]:



Damit die Reaktion abläuft, müssen zwei Enzyme vorhanden sein. Das eine Enzym wird am einfachsten aus der Leber von Ratten und das andere aus der Leber von Schafen isoliert. Bei grossen Mengen an 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (9) findet die Hydroxylierung von L-Phenylalanin auch ohne das Enzym aus der Schafslleber statt. Daraus wird gefolgert, dass die Hydroxylierung durch das Enzym aus der Rattenleber (Phenylalaninhydroxylase) gemäss folgender Gleichung katalysiert wird:



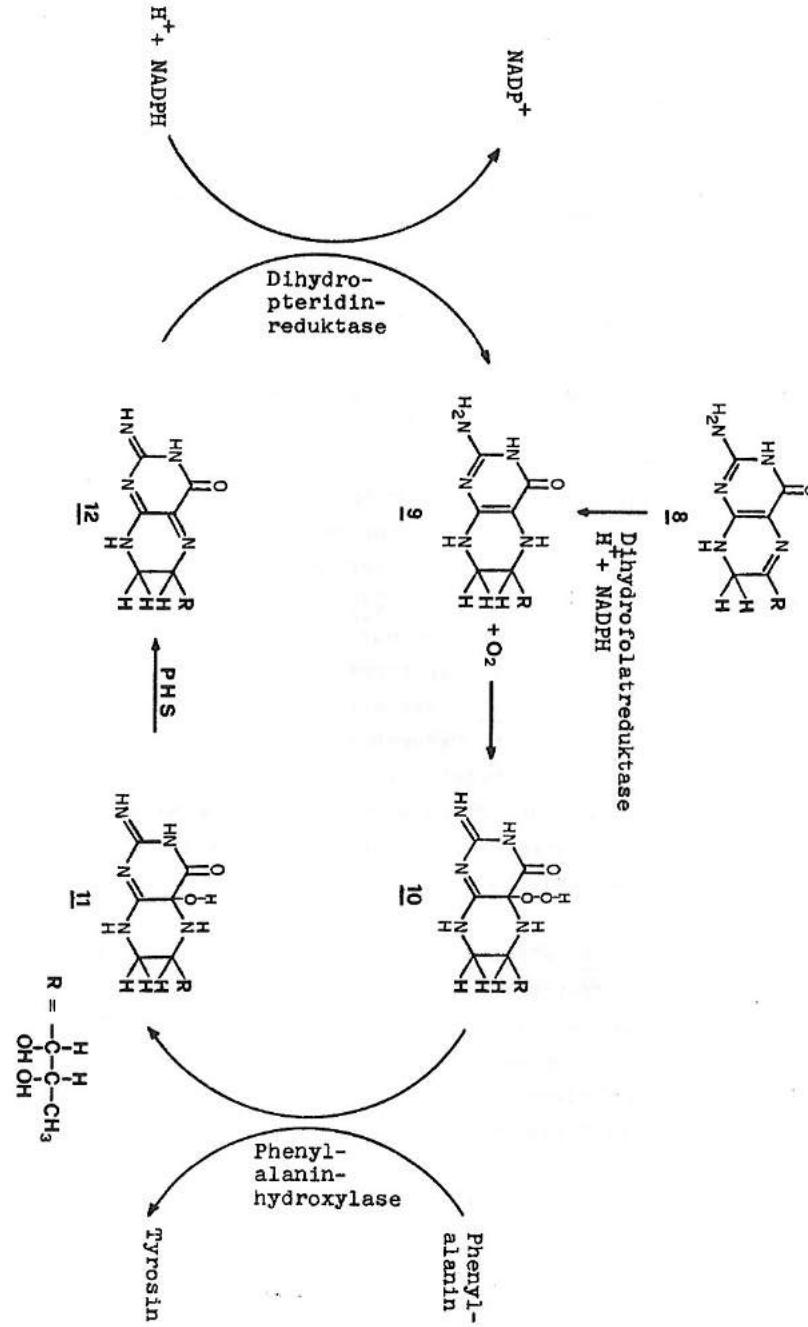
Das Enzym aus der Schafslleber (Dihydropteridinreduktase) und das NADPH werden gebraucht um das Dihydrobiopterin (12) wieder zum Tetrahydrobiopterin (9) zu reduzieren.



Kaufman vermutet, dass das bei der Hydroxylierung beteiligte Dihydrobiopterin eine chinoide Struktur (12) durchlaufen muss [16]. 12 lagert sich rasch in das 7,8-Dihydrobiopterin (8) um. Die Existenz von 12 konnte bis heute nur UV.-spektrometrisch wahrscheinlich gemacht werden [17].

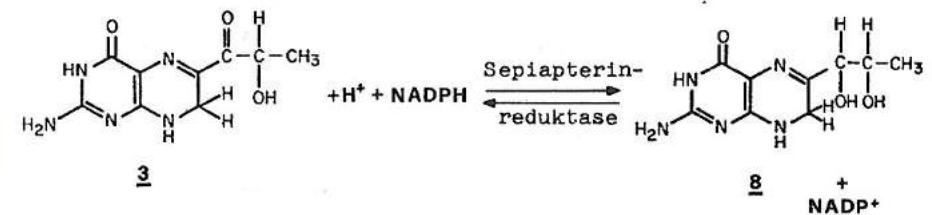
Vor kurzem veröffentlichte Kaufman, in Anlehnung an den Oxydationsmechanismus der Tetrahydropterine von Viscontini [18], eine Arbeit in der er zeigt, dass bei der Reaktion des Tetrahydrobiopterins (9) zum parachinoiden Dihydrobiopterin (12) ein weiteres Zwischenprodukt vorliegen muss [19]. Mit Sauerstoff bildet sich aus dem Tetrahydrobiopterin (9) ein Tetrahydrobiopterin-hydroperoxid (10), das eine Hydroxylgruppe auf das Phenylalanin überträgt. Dadurch entsteht eine Verbindung 11, die durch Wasserabspaltung ins parachinoiden Dihydrobiopterin (12) übergeht. Diese Wasserabspaltung wird durch ein Protein katalysiert (phenylalanine hydroxylase stimulating protein = PHS) [19].

7,8-Dihydrobiopterin (8) wirkt nur in Gegenwart von Dihydrofolatreduktase als Cofaktor bei der Hydroxylierung. Die Dihydrofolatreduktase reduziert das 7,8-Dihydrobiopterin (8) zum 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (9). Wenn die Dihydrofolatreduktase alles 8 reduziert hat, wird sie nicht mehr benötigt, weil dann die Dihydropteridinreduktase die Reduktion



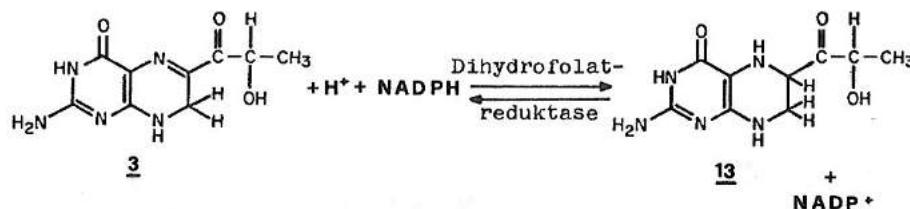
des anfallenden parachinoiden Dihydrobiopterins (**12**) übernimmt [19].

Kaufman isolierte aus Rattenleber ein Enzym das die Reduktion von L-Sepiapterin (**3**) zu 7,8-Dihydrobiopterin (**8**) katalysiert [16]. Dieses Enzym wirkt auch als Katalysator bei der Rückreaktion.



Kaufman hält es für möglich, dass die Sepiapterinreduktase bei der Regulierung der Aktivität der Hydroxylierungs-Coenzyme mitwirkt [16]. Sepiapterinreduktase könnte auf diese Art wirksam sein, weil sie befähigt ist, die Reaktion zu katalysieren, welche die Umwandlung der coenzym-aktiven Verbindung (Dihydrobiopterin (**8**)) in die coenzym-inaktive Verbindung (Sepiapterin (**3**))) ermöglicht. Anderseits ist es auch möglich, dass bei der Biogenese von Dihydrobiopterin (**8**) das Sepiapterin (**3**) das letzte Zwischenprodukt darstellt, welches dann durch die Sepiapterinreduktase zu Dihydrobiopterin reduziert wird [16] (siehe Abschnitt 1.3.).

Katoh reduzierte L-Sepiapterin (3) mit aus Hühnerleber isolierter Dihydrofolatreduktase und erhielt 5,6-Dihydro-L-sepiapterin (13) [20].



Die Cofaktor-Aktivität von 5,6-Dihydro-L-sepiapterin (13) war aber bei der Phenylalaninhydroxylierung deutlich kleiner, als diejenige von 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin (9) [20]. Die Aktivitätsabnahme hat ihren Ursprung wahrscheinlich in der Abspaltung der Hydroxylgruppe an C-2', welche bereits bei einem pH<8 eintritt (siehe Abschnitt 3.9.).

Die Kenntnis der enzymatischen Hydroxylierung von Phenylalanin (14) zum Tyrosin (15) ist deshalb von grosser Bedeutung, weil bei der Krankheit Phenylketonurie (PKU), die zu Schwachsinn und Entwicklungsstörungen führt, die Bildung von Tyrosin (15) aus Phenylalanin (14) gestört ist [21,22]. Diese Stoffwechselkrankheit scheint aber in den meisten Fällen nicht eine Folge des Fehlens des Cofaktors (Tetrahydrobiopterin (9)) zu sein, sondern nach der Arbeit von Kaufman auf ein Fehlen des Apoenzyms (Phenylalaninhydroxylase) zu beruhen [23] (siehe auch Abschnitt 4.).

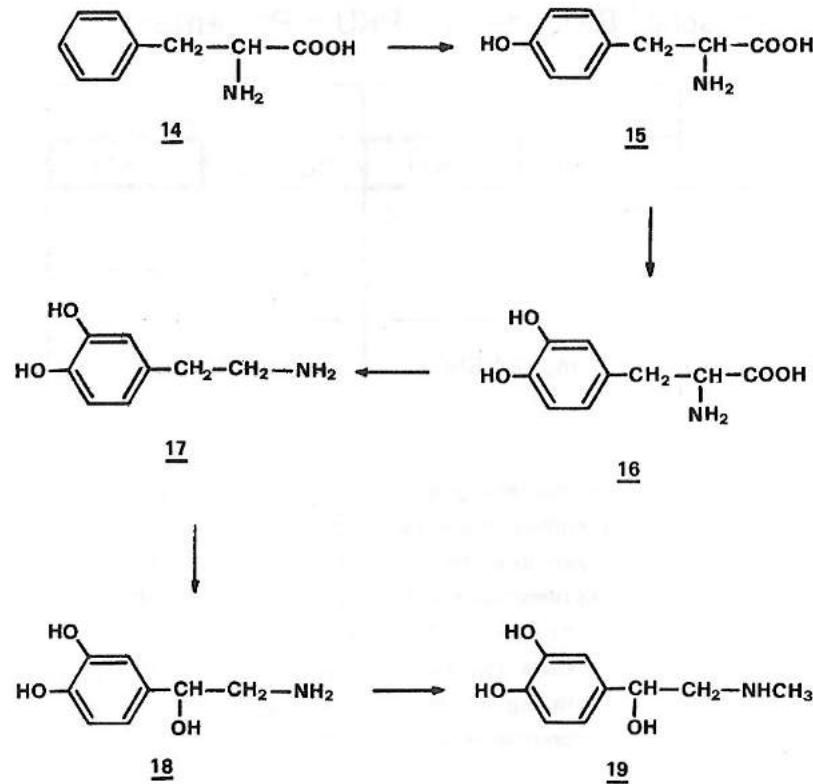
Biochemische Befunde für PKU-Patienten

Verbindung	URIN		PLASMA	
	normal	PKU	normal	PKU
L-Phenylalanin	10–30	200–400	0,84	15–60
L-Tyrosin	15–50	—	1,03	—
mg/24 Std.				mg/100 ml

Als Folge akkumuliert das Phenylalanin (14) im Blutplasma (15–60 mg/100 ml) gegenüber Normalwerten von ca. 1 mg/100 ml und beträchtliche Mengen des Phenylalanins (14) und seiner atypischen Stoffwechselprodukte werden im Urin ausgeschieden. Da Entwicklungsstörungen und Anzeichen von Schwachsinn ausbleiben, wenn eine rigorose Beschränkung des Phenylalanins (14) in der Nahrung eingehalten wird, ist die Frühdiagnose der Phenylketonurie entscheidend [24].

1.2c. Hydroxylierung von L-Tyrosin

Tetrahydrobiopterin (9) wirkt nicht nur bei der Hydroxylierung des Phenylalanins (14) zu Tyrosin (15) als Cofaktor sondern auch bei der Hydroxylierung des Tyrosins (15) zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) (16).



Noradrenalin (18) und Adrenalin (19) leiten sich biogenetisch vom Tyrosin (15) ab, das nach Hydroxylierung zum 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) (16) und Decarboxylierung in das biogene Amin 3,4-Dihydroxyphenylethylamin (DOPamin) (17) umgewandelt wird.

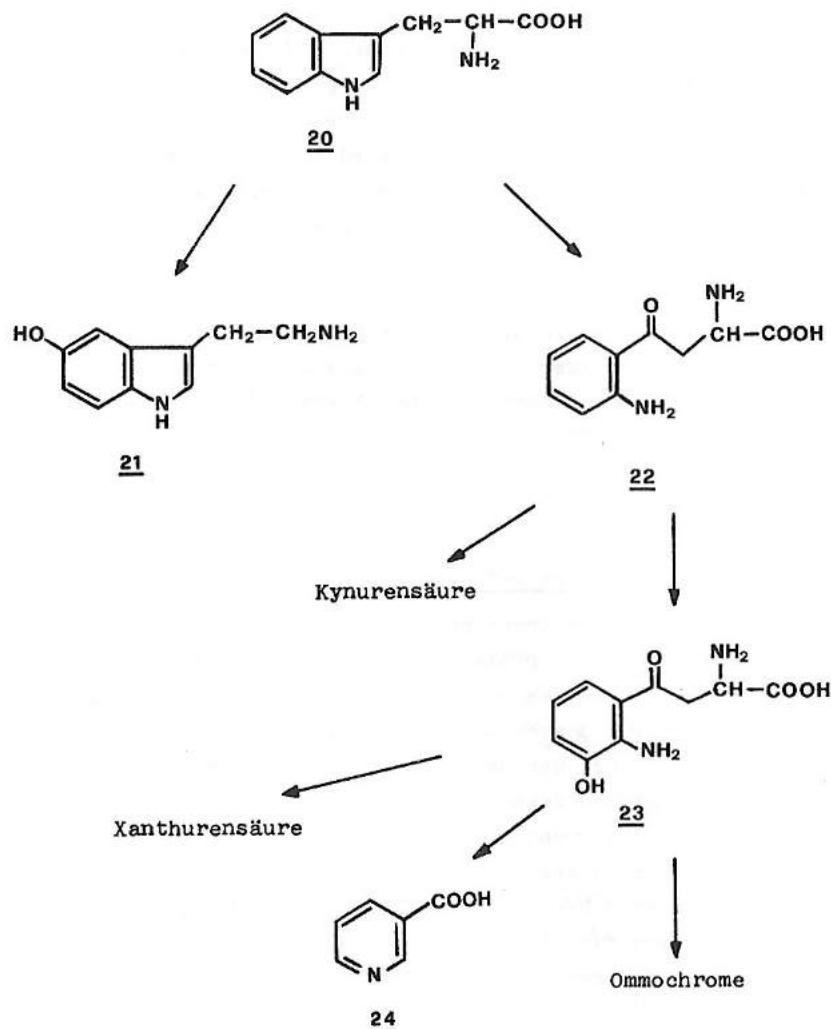
In nichthormonbildenden Organen wie Lunge, Leber und Darm stellt das DOPamin (17) das Endprodukt der Biosynthese dar und macht 90% der Gesamtkatechamine aus. Im sympathischen Nervensystem und im Nebennierenmark erfolgt durch spezifische β -Hydroxylierung die Bildung von Noradrenalin (18), das durch Methylierung der primären Aminogruppe weiter in Adrenalin (19) überführt wird. Für die ersten beiden Stufen wird Tetrahydrobiopterin (9) benötigt, aber bei der vierten Stufe, obwohl ebenfalls eine Hydroxylierung, wirkt ein anderes Enzymsystem.

DOPA (16) ist auch das Edukt bei der Biogenese von Melanin. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die Haut der Arthropoden, Fische und Amphibien besonders reich an Pterinen ist [24].

1.2d. Hydroxylierung von L-Tryptophan

Die Hydroxylierung des Tryptophans (20) kann sowohl in 3- als auch in 5-Stellung erfolgen. Der Angriff in der 5-Stellung führt nach einer anschliessenden Decarboxylierung zum Serotonin (21), dessen wichtige Funktionen bei der Blutdruckregulierung, der Gerinnung und bei gewissen psychischen Vorgängen bekannt sind.

Die Ringöffnung des Tryptophans (20) (sehr wahrscheinlich über ein 1,2-Epoxid) ergibt Kynurenin (22), welches durch Hydroxylierung in 3-Hydroxykynurenin (23) übergeht, der Schlüsselsubstanz für die Bildung von Nicotinsäure (24), Xanthurensäure und den Ommochromen [24].



Alle diese Reaktionen wurden invitro von Viscontini und Mattern durch Umsetzung von Tryptophan (20) mit Tetrahydropterin und Fe^{II} in Gegenwart von Sauerstoff beobachtet [25].

Besondere Aufmerksamkeit wurde jedoch der Bildung von Serotonin (21) geschenkt, vor allem im Zusammenhang mit der Nervenreizübertragung. So befassen sich zwei Arbeiten mit dieser 5-Hydroxylierung im Gehirn, wobei eine eindeutige Abhängigkeit des Enzymsystems von einem Tetrahydropterin nachgewiesen werden konnte [26,27].

1.2e. Biopterin als Wachstumsfaktor

Ausser der Coenzym-Wirkung für die Hydroxylierung von Phenylalanin (14), Tyrosin (15) und Tryptophan (20), ist das Biopterin (5) ein unentbehrlicher Wachstumsfaktor für die Trypanosomid Flagellaten Crithidium fasciculatum. Der auf dieser Wirkung beruhende Wachstumstest war lange Zeit die einzige Methode um sehr kleine Mengen von Biopterin (5) nachzuweisen. So konnte Frank et al. den Gehalt an Biopterin (5) und Neopterin (6) im Blut des Menschen und von einigen Säugetieren abschätzen [28]. Eine Übersicht über die Methode gibt Guttmann [29]. Allerdings lässt sich das Biopterin (5) durch andere 6-Polyhydroxy-alkyl-pterine ersetzen, die jedoch wesentlich weniger aktiv sind [12].

Trihydroxy-propyl pterine halboptimale Wuchsstoff-konz. (mg/ml Nährlösung)

D-Neopterin*	10
L-Neopterin**	0.03
D-Monapterin**	10
L-Monapterin*	2

*Naturprodukt

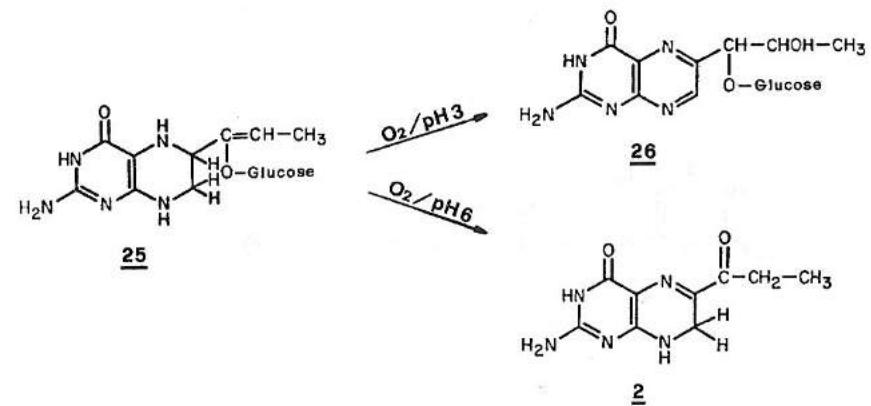
**in der Natur nicht vorkommende Produkte

7-substituierte Pterinderivate sind vollkommen inaktiv. Die Flagellate Crithidia fasciculata ist auf die Zuführung von Biopterin (5) angewiesen. Soweit bekannt können aber alle andern Lebewesen das Biopterin (5) selber synthetisieren (siehe Abschnitt 1.3.).

1.2f. Pterine in Algen

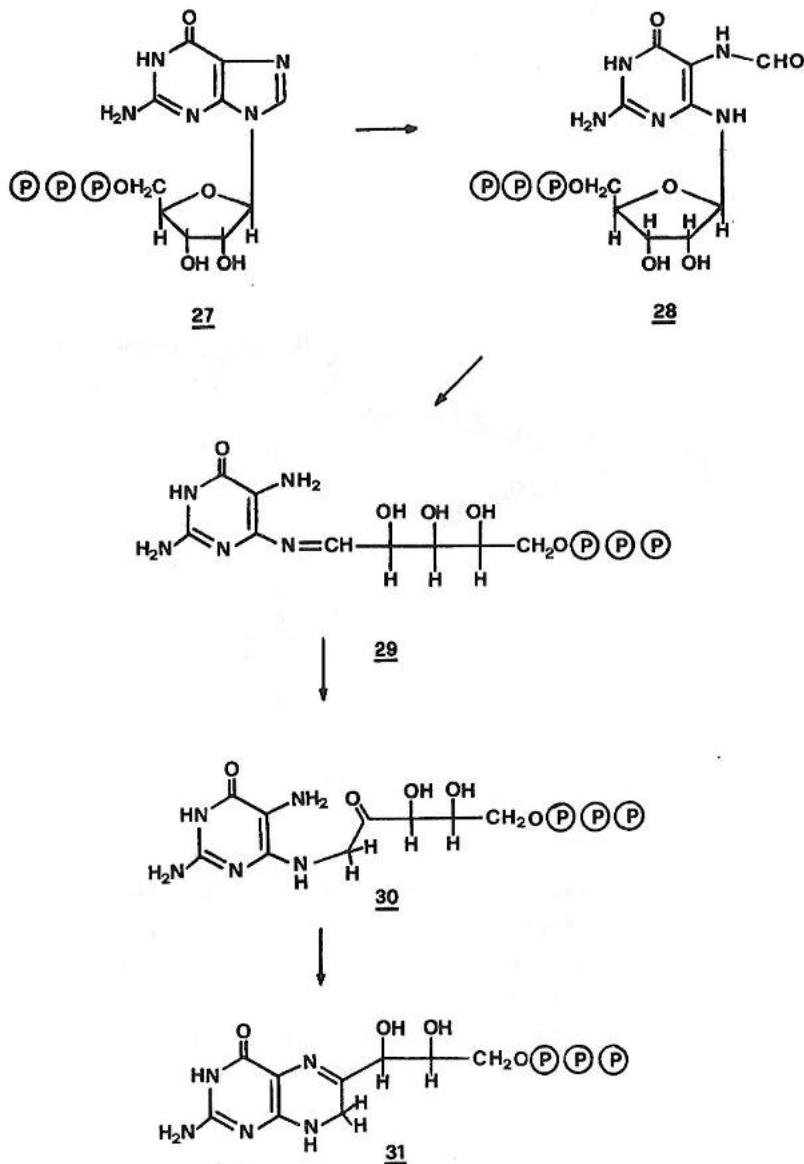
Forrest et al. fanden, dass Pterine in den blaugrünen Algen in relativ hohen Konzentrationen vorkommen [30]. Falls eine Suspension von blaugrünen Algen einem Kälteschock ausgesetzt werden, verlieren sie ihre photosynthetische Aktivität und gleichzeitig werden verschiedene Pterine frei. Man kann daher vermuten, dass Pterine eine wichtige Rolle bei der Photosynthese spielen. Wenn die Suspension bei pH=3 zwei Wochen stehen gelassen wurde, konnte ein Glucosid (26) von Biopterin isoliert werden. Forrest et al. konnten aber

die Verknüpfung mit der Biopterinseitenkette nicht eindeutig auf die 1'- oder 2'-Hydroxylgruppe festlegen. Wurden die Suspensionen aber bei pH=5-6 zwei Wochen lang stehen gelassen, so entstand als Hauptprodukt Deoxysepipterin (2). Forrest et al. nehmen an, dass das Glucosid (26) des Biopterins und das Deoxysepiapterin (2) aus einem Glucosid eines Tetrahydropterins (25) mit ungesättigter Seitenkette entstehen [31].



1.3. Biogenese

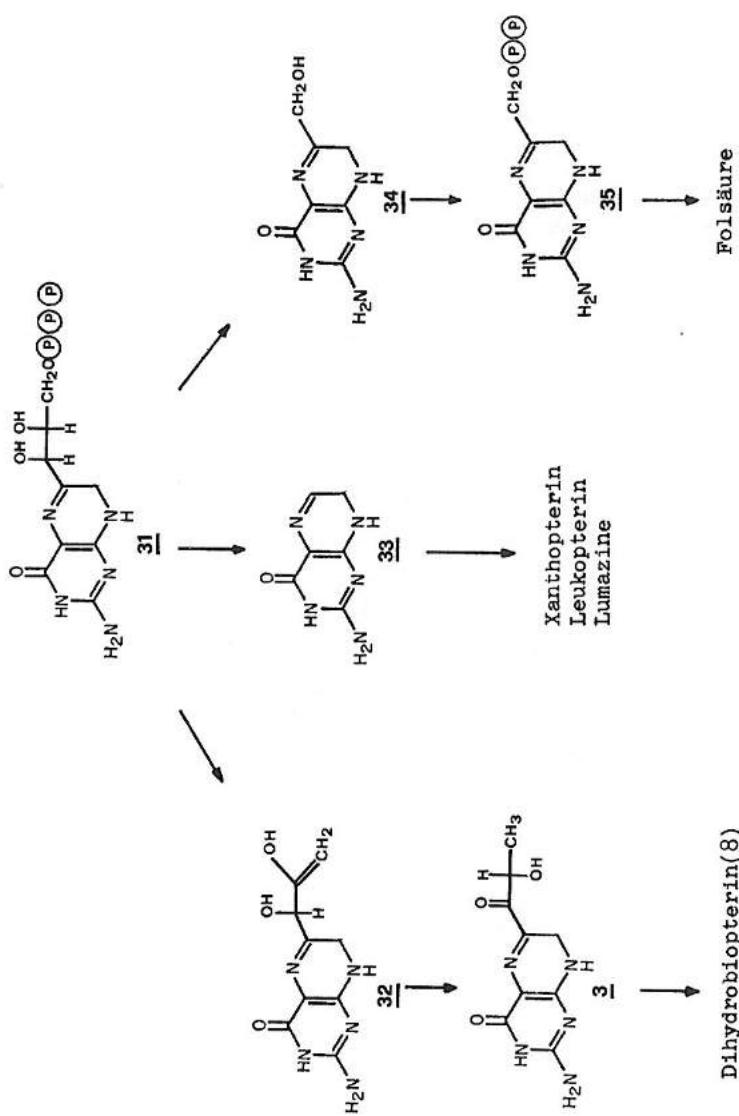
Auf Grund der Arbeiten von Weygand et al. [32] konnten Brenner-Holzach und Leuthardt bei Drosophila melanogaster zeigen, dass das Guanosin-5-triphosphat (27) eine Vorstufe zu den verschiedenen Pterinen darstellt [33]. Dabei wird zuerst der Imidazolring des Purins zum Formylamino-pyrimidin-derivat (28) geöffnet, aus dem die Formylgruppe als



C-1-Fragment abgespalten wird. Die so gebildete Schiff'sche Base (29) kann nach einer Amadori-Umlagerung wieder zu 31 cyclisieren, nun aber unter Bildung eines hydrierten Pyrazinringes. Es entsteht primär das 6-Hydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-6-(D-erythrotrihydroxypropyl)-pterin-3'-triphosphat, welches unter Wasserabspaltung leicht in das 7,8-Dihydro-D-neopterin-3'-triphosphat (31), übergeht [33].

Brown zeigte, dass 31 unter Abspaltung von Glycolaldehyd ins 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin (34) übergehen kann [34]. Das 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin-diphosphat (35) (oder -triphosphat) ist die unmittelbare Vorstufe zur Folsäure.

Aus 7,8-Dihydro-D-neopterin-3'-triphosphat (31) kann auch L-Sepiapterin gebildet werden, das dann zum Dihydrobiopterin (8) weiterreagiert (siehe Abschnitt 1.2b.). Für die Bildung des L-Sepiapterins (3) wird nach dem Vorschlag von Fukushima die Verbindung (31) dehydratisiert, wodurch eine Doppelbindung zwischen C-2' und C-3' entsteht, die über die 2'-Carbonylform zu einem Endiol tautomisieren kann [35]. Eine weitere Umlagerung führt dann direkt zum L-Sepiapterin (3).



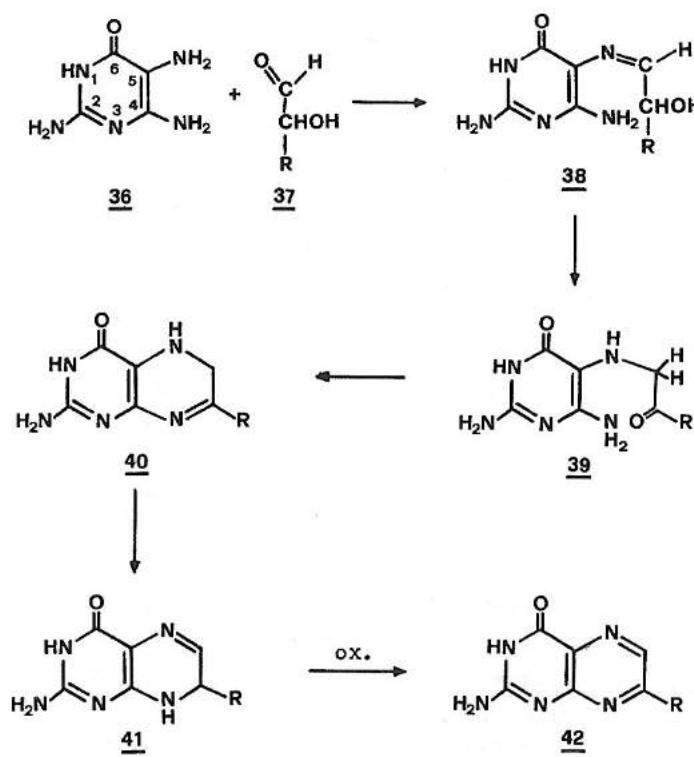
2. Synthese von L-Biopterin

2.1. Theoretische Betrachtung und Problemstellung

Im Jahre 1955 gelang Forrest und Mitchell erstmals die Synthese von Biopterin (5) [9]. Ein Jahr später folgten Patterson, Milstrey und Stokstad, die zuvor Biopterin (5) aus Urin isoliert hatten [36]. Um die Konfiguration des Biopterins (5) zu bestimmen, kondensierten sie verschiedene Zucker mit 6-Hydroxy-2,4,5-triamino-pyrimidin (36). Weil 5-Deoxypentosen nicht leicht zugänglich sind, kondensierten sie die Pentosen D- und L-Arabinose und D- und L-Xylose mit 36. Von diesen Produkten wurde die Aktivität bei *Crithidia fasciculata* bestimmt. Das Kondensationsprodukt von L-Arabinose hatte ungefähr 10% der Aktivität des natürlichen Biopterins (5) und war ungefähr 100 bis 1000 mal so aktiv wie die anderen Kondensationsprodukte. Aus diesen Versuchen schlossen Patterson et al., dass es sich beim natürlichen Biopterin (5) wahrscheinlich um das 2-Amino-4-hydroxy-6-[1,2-dihydroxypropyl-(L-erythro)]-pteridin handelt. Sie kondensierten deshalb 5-Deoxy-L-arabinose (52) mit 36 und erhielten ein Produkt das beim C. fasciculata-Test gleich aktiv war wie das aus Urin gewonnene L-Biopterin (5).

Die Ausbeute an synthetischem L-Biopterin (5) betrug aber weniger als 1% [36]. Wie früher schon viele Forschungsgruppen festgestellt hatten, entstehen bei der Kondensation von 36 mit Zuckern immer Isomerengemische von 6- und 7-substituierten Pterinen. Im 6-Hydroxy-2,4,5-triamino-pyrimidin (36) ist die Aminogruppe in Position 5 basischer als diejenige in Position 4, da letztere mit der Carbonylfunktion an 6 ein vinyloges Amid bildet. Daher kann angenommen

werden, dass die Carbonylgruppe einer Aldose 37 mit der Aminogruppe in 5-Stellung von 36 zur Schiff'schen Base 38 kondensiert. Man würde nun erwarten, dass man aus Aldosen 7-substituierte und mit Ketosen 6-substituierte Pterine erhält. Man erhält aber immer ein Gemisch von 6- und 7-substituierten Verbindungen.



Forrest und Walker versuchten die Pterinausbeuten durch Zugabe von Hydrazin zu erhöhen [37]. Sie erhielten aus Glucose und auch aus Fructose ausschliesslich 6-(Tetrahydroxybutyl)-pterin. Es wird angenommen, dass sich aus

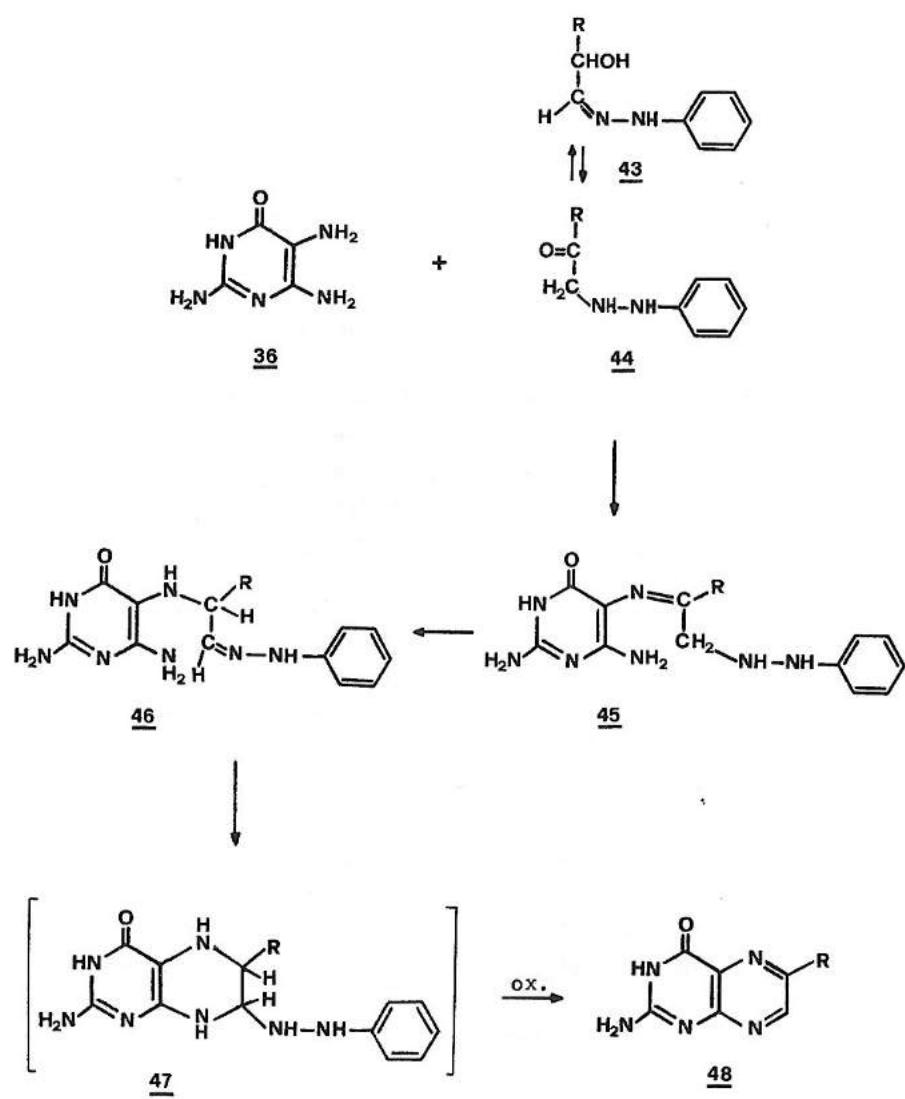
den Zuckern die Osazone bilden, welche nach der Anlagerung von 36 unter zweimaliger Hydrazinabspaltung in 6-substituierte Pterinderivate übergehen [37].

Bei Aldopentosen erhöhte der Hydrazin-Zusatz den Anteil an 6-substituierten Pterinen (48), aber die Bildung von 7-substituierten Pterinen (42) konnte nicht verhindert werden. Die Trennung der 6- und 7-substituierten Isomeren kann nur durch aufwendige Säulenchromatographie erreicht werden [38].

Im Jahre 1968 ist es Viscontini et al. gelungen, eine einfache Synthese von reinen 7-isomerenfreien 6-(Trihydroxypropyl)-pterinen zu entwickeln [39, 40]. Dabei wird aus der entsprechenden Aldopentose vorerst das Phenylhydrazon (43) hergestellt. Bei der Kondensation mit 36 lagert sich 43 nach Amadori in eine Phenylhydrazinoketose (44) um, die mit der basischen 5-Aminogruppe von 36 reagiert. Mit D-Arabinose z.B. erhält man D-Neopterin (6) mit einer Ausbeute von 46% [40].

Nach dem Erfolg bei der Synthese von D-Neopterin (6) und L-Monapterin (7), unternahmen Viscontini und Provenzale auch Versuche mit 5-Deoxypentosen, um nach dem gleichen Prinzip eine gute Synthese des Biopterins (5) auszuarbeiten. [41]. Es trat aber ganz unerwartet eine neue bei Neopterin (6) und Monapterin (7) nicht beobachtete Schwierigkeit auf. Bei der Oxydation des gebildeten Tetrahydro-(di-hydroxypropyl)-pterins (47) wurde aus unerklärlichen Gründen stets die Seitenkette in beträchtlichem Ausmass abgespalten, was zu grossen Mengen Pterin (61) führte [41].

Andrews, Barber und Tong wählten einen neuen Reaktionsweg [42]. Sie kondensierten 1-Amino-1-deoxy-L-ribulose mit



2-Amino-4-chloro-5-nitro-6-hydroxy-pyrimidin. Diese beiden Edukte sind aber schwer zugänglich und die Ausbeute an Biopterin (5) beträgt nur 10-15%.

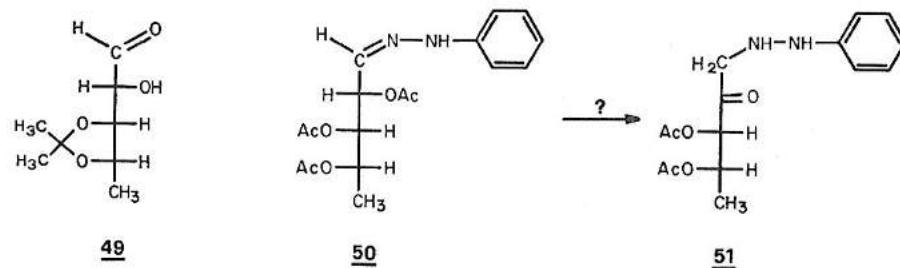
Taylor und Jacobi kondensierten 2-Amino-3-benzyl-oxygen-carbonyl-5-(L-erythro-1',2'-dihydroxypropyl)-pyrazin-1-oxid mit Guanidinhydrochlorid und erhielten nach anschliessender Reduktion L-Biopterin (5) mit einer Ausbeute von 12% (bezogen auf Deoxyarabinose (52)) [43].

Später (1975) versuchten Sugimoto und Matsuura die von Viscontini und Provenzale entwickelte Synthese zu verbessern [44]. Sie konnten aber weder die Bildung von Pterin (61) verhindern noch die Ausbeute an Biopterin (5) erhöhen. Bis zu diesem Zeitpunkt gab es noch keine befriedigende Synthese für Biopterin (5). Albert sagte 1975 in seiner Eröffnungsrede zum 5. Internationalen Pteridinsymposium in Konstanz das Folgende: "Several synthesis of biopterin have been described, but it is still very expensive. Were it more abundant, it could be used more freely. Abnormalities in phenylalanine metabolism lead to mental subnormality and failure to hydroxylate tyrosine would prevent synthesis of all the catecholamines. There may be clinical uses for biopterin to be developed here, if it were more abundant" [45]. Die Firma Calbiochem AG verkaufte 1977 50 mg Biopterin für SFr. 455.--.

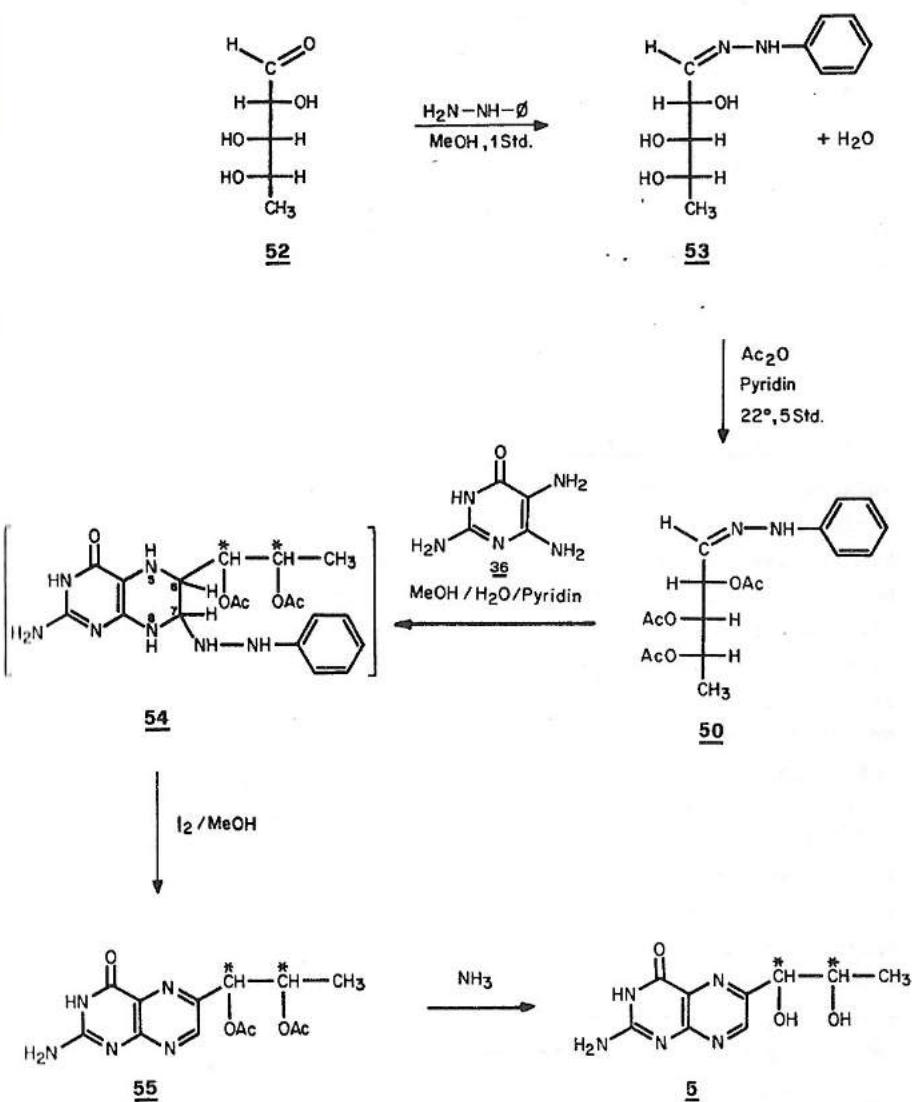
Deshalb stellte sich die Aufgabe eine einfache regiospezifische Synthese von L-Biopterin (5) in guter Ausbeute zu entwickeln. Dabei wurde auf die Arbeit von Viscontini und Frei zurückgegriffen [46]. Sie kondensierten D,L-2,3-O-Isopropyliden-4-methyl-erythrulose mit 36 und erhielten nach Oxydation an der Luft das D,L-1',2'-O-Isopropyliden-biopterin ohne Abspaltung der Seitenkette. Durch hydrolytische Abspaltung der Isopropylidengruppe wurde in guter Ausbeute reines

D,L-Biopterin erhalten. Diese Synthese stiess auf wenig Interesse, weil man für biologische und klinische Versuche nur reines L-Biopterin (5) verwenden kann. Viscontini und Frei waren aber von der richtigen Ueberlegung ausgegangen, dass durch Schützen der C-1'-OH-Gruppe die Oxydation am C-1' zurückgedrängt und dadurch die Abspaltung der Seitenkette verhindert werden kann.

2.2. Neue regiospezifische Synthese von L-Biopterin



Da wir keinen Weg fanden das Isopropylidenderivat 49 zu synthetisieren, versuchten wir die Phenylhydrazinoketose 51 aus 2,3,4-Triacetyl-5-deoxy-L-arabinose-phenylhydrazon (50) herzustellen. Jedoch konnte die C-2-O-Acetylgruppe nicht entacetyliert werden, ohne dass auch die C-3- und C-4-O-Acetylgruppen entacetyliert wurden. Erstaunlicherweise



konnte aber das 2,3,4-Triacetyl-5-deoxy-L-arabinose-phenylhydrazon (50) mit 36 zu einem acetylierten Tetrahydrobiopterinderivat (54) kondensiert werden. Nach Oxydation und Entacetylierung von (54) wurde isomerenfreies L-Biopterin (5) erhalten [47].

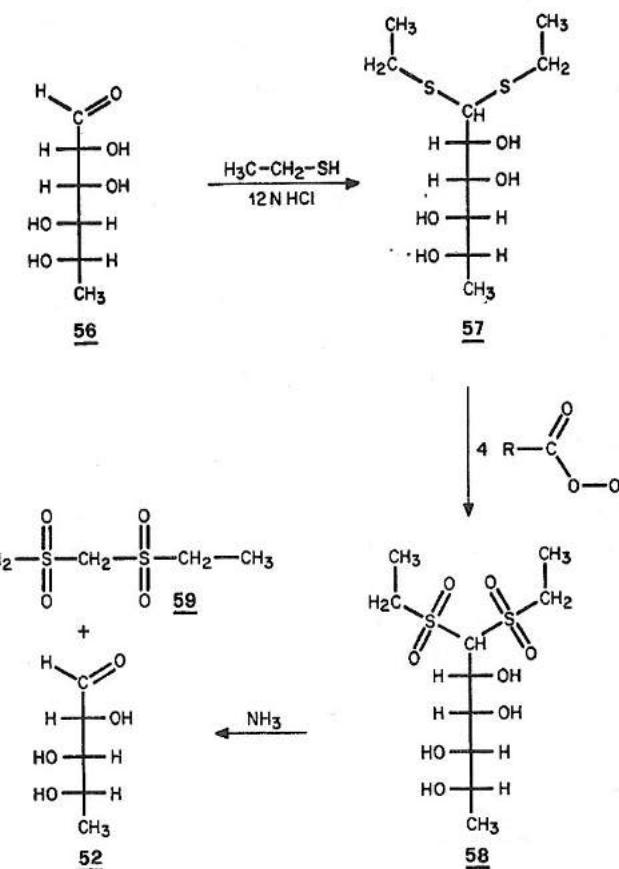
Die Kondensation wurde in neutralem Milieu bei 35-40°C durchgeföhrt. Unter diesen Bedingungen wird die C-2-O-Acetylgruppe von 50 ohne Zusatz von 36 nicht entacetyliert. Ohne weitere Versuche ist es nicht möglich, den Reaktionsmechanismus für die Bildung von 54 abzuklären.

2.2a. 5-Deoxy-L-arabinose

Anfänglich stellten wir die Deoxyarabinose (52) nach dem Verfahren von Zinner et al. her [48]. Dabei wird L-Arabinose-diaethyl-mercaptal mit p-Toluolsulfonsäurechlorid bei tiefer Temperatur partiell zu 5-Tosyl-L-arabinose-diaethylmercaptal verestert. Dieses wird mit Lithiumaluminimumhydrid zu 5-Deoxy-L-arabinose-diaethylmercaptal reduziert. Daraus gewinnt man durch Abspaltung von Aethylmercaptan die 5-Deoxy-L-arabinose (52) [48].

Später fanden wir, dass das von Taylor und Jacobi angewandte Verfahren zur Herstellung von Deoxyarabinose (52) einfacher ist [43].

Aus L-Rhamnose (56) wird mit Aethylmercaptan und 12N Salzsäure das L-Rhamnosediaethylmercaptal (57) hergestellt. Anschliessende Oxydation mit m-Chlorperbenzoësäure in wasserfreiem Dioxan führt zum 1,1-Diaethylsulfonyl-L-manno-2,3,4,5-tetrahydroxyhexan (58), aus dem man durch Behandlung mit ammoniakalischer Lösung 5-Deoxy-L-arabinose (52) erhält. Das abgespaltene Diaethylsulfonyl-methan (59)



wird durch Extraktion mit Chloroform entfernt [43].

Weil es für die Oxydation von 57 zu 58 mindestens vier Mol m-Chlorperbenzoësäure braucht und die m-Chlorperbenzoësäure teuer ist, suchten wir nach einem billigeren Oxydations-

mittel. Hardy, Rydon und Thompson oxyderten β -Methylthio-aethylester mit Wasserstoffperoxid und Ammonium-molybdat zu β -Methylsulphonyl-aethylester [49]. Es gelang jedoch nicht 57 zu 58 nach diesem Verfahren zu oxydieren, so dass wir weiterhin *m*-Chlorperbenzoësäure als Oxydationsmittel einsetzen mussten.

Taylor und Jacobi dampften die von Dieaethylsulfonyl-methan (59) befreite wässrige Lösung von Deoxyarabinose (52) unter Vakuum zur Trockene ein [43]. Anschliessend wurde 52 in absolutem Methanol gelöst und wieder zur Trockene eingeengt. Dieser Vorgang wurde mehrere Male wiederholt, wobei die Deoxyarabinose (52) jeweils als Öl isoliert wurde. Da Hinweise vorlagen, dass mit obiger Methode nicht alles Methanol entfernt werden konnte, dampften wir die wässrige Lösung direkt am Hochvakuum ein. Beim Trocknen am Hochvakuum wurde mit Hilfe von kontinuierlich entnommenen Proben zur Elementaranalyse festgestellt, dass der Wassergehalt stetig abnimmt und unter ein Mol zu liegen kommt, wobei sich jedoch gleichzeitig das Produkt dunkel färbt und sich zersetzt. Dies steht im Widerspruch zu Taylor und Jacobi, welche ein Mol Wasser pro Mol Deoxyarabinose (52) angeben [43].

2.2b. 5-Deoxy-L-arabinose-phenylhydrazone

Die Bildung des Phenylhyrazons 53 aus 5-Deoxy-L-arabinose (52) ist einfach. Die 5-Deoxy-L-arabinose (52) reagiert in methanolischer Lösung sehr rasch mit Phenylhydrazin. Ohne Erfolg versuchten wir aber das gebildete Phenylhydrazone 53 durch Umkristallisation in verschiedenen Lösungsmitteln

zu reinigen. Es wurde deshalb durch zweimaliges Umfällen gereinigt, indem wir 53 in Methanol lösten und durch Zugebung von Aether und n-Hexan fällten.

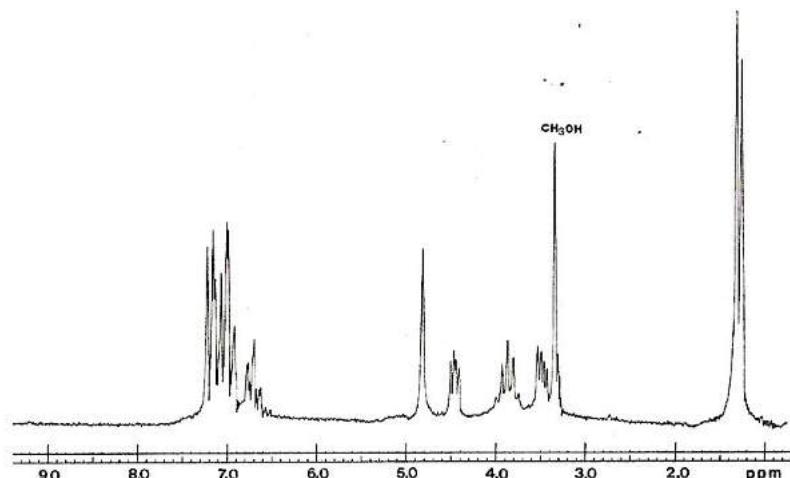
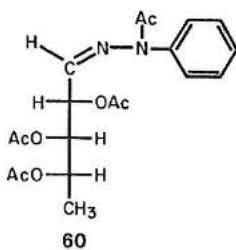
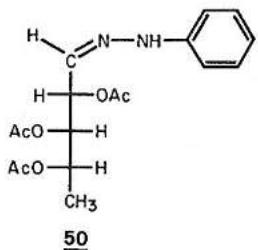


Fig. 1 ¹H-NMR.-Spektrum von 5-Deoxy-L-arabinose-phenylhydrazone (53) in CD₃OD.

2.2c. Triacetyl-5-deoxy-L-arabinose-phenylhydrazone und Tetraacetyl-5-deoxy-L-arabinose-phenylhydrazone

Wenn man 5-Deoxy-L-arabinose (52) mit Pyridin und Essigsäure-anhydrid bei Raumtemperatur (22°C) reagieren lässt, entsteht ein Triacetylderivat. Erhitzt man Deoxyarabinose (52)

aber in Essigsäureanhydrid auf 80°C, erhält man eine Verbindung mit vier Acetylgruppen. Aufgrund der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (Fig. 2) nehmen wir an, dass es sich um die Strukturen 50 und 60 handelt.



Tetraacetyl-deoxyarabinose-phenylhydrazone (60) reagiert nicht mit 36 in den unter 2.2d. beschriebenen üblichen Kondensationsbedingungen. 2,3,4-Triacetyl-deoxy-L-arabinose-phenylhydrazone (50) ist instabil und zersetzt sich bei der Chromatographie auf Kieselgel. 50 ist immer mit ca. 5% 60 verunreinigt und das Nebenprodukt 60 konnte nicht abgetrennt werden.

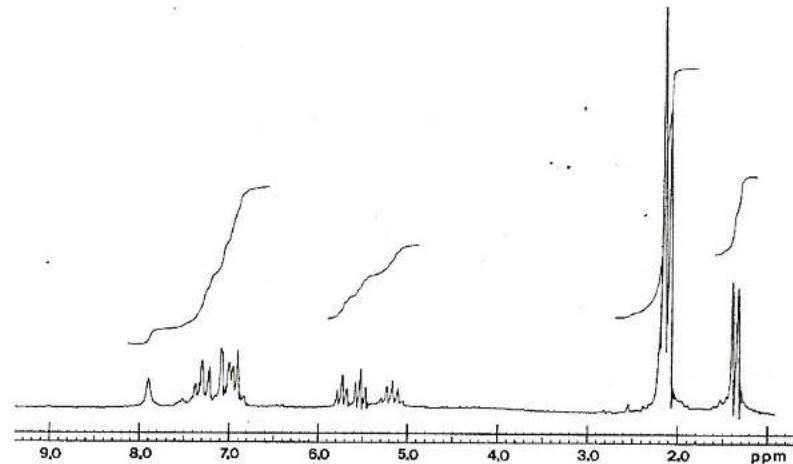


Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 2,3,4-Triacetyl-5-deoxy-L-arabinose-phenylhydrazone (50) in CDCl_3 .

2.2d. Kondensation mit 6-Hydroxy-2,4,5-triamino-pyrimidindihydrochlorid

Die Kondensation von D-Arabinosephenylhydrazone mit dem Pyrimidinderivat 36 erfolgt in 50% Methanol unter Rückflussierung (75°C, 4 Std.) [40]. Auch das Deoxyarabinose-phenylhydrazone (53) reagiert erst beim Erhitzen mit 36, während das Triacetyl-deoxyarabinosephenylhydrazone (50) schon bei 22°C reagiert.

Um den Mechanismus der Kondensation abzuklären, versuchten wir das Kondensationsprodukt 54 unter Stickstoff zu reinigen indem wir es mehrmals in Methanol lösten und durch Zugabe von Aether und n-Hexan fällten. Das ¹H-NMR.-Spektrum konnte aber nicht interpretiert werden.

Die Kondensation von Triacetyl-5-deoxy-L-arabinose-phenylhydrazon (50) mit 36 wird unter Stickstoff in einem Gemisch von Methanol und Wasser (1:1) bei 35-40°C durchgeführt. Nach der Oxidation mit Jod und alkalischer Entacetylierung des Kondensationsproduktes erhielten wir neben L-Biopterin (5) immer Spuren von Pterin (61). Da Pterin (61) nur durch aufwendige Säulenchromatographie entfernt werden kann, versuchten wir die Bildung von 61 vollständig zu unterdrücken.

Man kann annehmen, dass die Abspaltung der Seitenkette nur möglich ist, wenn die C-1'-O-Acetyl-Gruppe entacetyliert wurde. Deshalb führten wir die Kondensationen in wasserfreien Lösungsmitteln (abs. Methanol, DMSO, DMFA) und bei Raumtemperatur durch. Die Bildung von Pterin (61) konnte jedoch nie ganz vermieden werden.

6-Hydroxy-2,4,5-triamino-pyrimidinsulfat ist ein käufliches Produkt. Wegen der besseren Löslichkeit setzten wir aber für die Synthese das Dihydrochlorid ein. Das nicht protonierte Pyrimidinderivat 36 wird an der Luft rasch oxydiert. In unserem Reaktionsgemisch wird die freigesetzte Salzsäure durch Pyridin neutralisiert.

Anfänglich führten wir die Kondensation in einem Reaktionsgefäß durch, das wir mit Stickstoff spülten. Eine deutliche Erhöhung der Ausbeute an Biopterin (5) wurde erhalten als die Kondensation in einem Handschuhkasten (Inertgas: N₂) durchgeführt wurde. Gleich gute Ausbeuten werden erhalten

nach Zugabe von Natriumdithionit in das Kondensationsgemisch unter Ausschluss von Sauerstoff.

2.2e. Oxydation und Entacetylierung

Die Oxydation kann mit Sauerstoff, Braunstein oder Jod ausgeführt werden. Diejenige mit Sauerstoff dauert zu lange. Bei der Oxydation mit Braunstein ist das Abnutzen von MnO₂ schwierig. Die Oxydation mit Jod verläuft dagegen problemlos. Für ein Mol eingesetztes 36 werden ca. vier Äquivalente Jod verbraucht. Das Oxydationsprodukt wird durch Umkristallisation aus Wasser gereinigt, wobei man das Diacetylbiopterin (55) neben wenig Monoacetylbiopterin erhält. Nach Entacetylierung in Ammoniak/Methanol (1:1) bei 50°C und Reinigung an einer mit Dowex 1X8 beschickten Säule wurde reines Biopterin (5) erhalten.

2.2f. Synthese von L-Biopterin ohne Isolierung der Zwischenprodukte

Wie in Abschnitt 2.2a. schon erwähnt, ist die Reinigung von Deoxyarabinose (52) sehr aufwendig und es tritt während der Aufarbeitung eine teilweise Zersetzung des Produktes ein. Deshalb verzichteten wir auf die Isolierung von 52 und erhielten nach Durchführung der Gesamtsynthese eine höhere Ausbeute an Biopterin (5).

Auch das Deoxyarabinose-phenylhydrazon (53) muss nicht gereinigt werden. Das überschüssige Phenylhydrazin wird in der nächsten Stufe acetyliert und stört die folgenden Syn-

theseschritte nicht.

Für die Acetylierung des Deoxyarabinose-phenylhydrazons (53) wird Essigsäureanhydrid und Pyridin verwendet. Nach Beendigung der Reaktion wird zuerst Methanol und anschliessend Wasser zugegeben. Dabei wird das überschüssige Essigsäureanhydrid dem Reaktionsgemisch entzogen. Das Gemisch wird als Lösungsmittel für die folgende Kondensation verwendet.

Das Pyridin, das für die Acetylierung zugegeben wurde, neutralisiert bei der Kondensation die Salzsäure des 6-Hydroxy-2,4,5-triamino-pyrimidin-dihydrochlorids (36 · 2 HCl).

Auch für die Oxydation und das Entacetylieren muss nicht von gereinigten Zwischenprodukten ausgegangen werden.

Nach diesem Verfahren können alle Reaktionen (6 Stufen) von 1,1-Diaethylsulfonyl-L-manno-2,3,4,5-tetrahydroxyhexan (58) bis zum rohen L-Biopterin (5) im gleichen Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Die Ausbeute beträgt 40-45% (bezogen auf 58) [47].

2.2g. Reinigung von L-Biopterin

Zuerst wurde versucht das rohe L-Biopterin (5) durch Umkristallisation aus Wasser und Entfärbung mit Tierkohle zu reinigen. Unter grossem Verlust wurde so hellgelbes L-Biopterin (5) erhalten, das aber immer noch Spuren von Pterin (61) enthielt, dessen Löslichkeitsprodukt viel kleiner ist, als jenes von Biopterin (5). Auch durch Umkristallisation in verdünntem Ammoniak oder Essigsäure, konnte das Pterin (61) nicht entfernt werden. Neopterin (6) und Monapterin (7) wurden erfolgreich über eine Ionenaustauschersäule gereinigt

(Dowex 1X8) [40]. Die gleiche Methode eignet sich gut für L-Biopterin (5) [41]. Es können so mit einer Säule (7x30 cm) 4 g L-Biopterin (5) gereinigt werden. In [41] wurde zur Elution eine 0.03 M Ammoniumformiatlösung vom pH 8-7.5 verwendet. Man erhält aber weniger Eluat, wenn man die Konzentration des Puffers auf 0.15 Mol/l und den pH auf 9 erhöht.

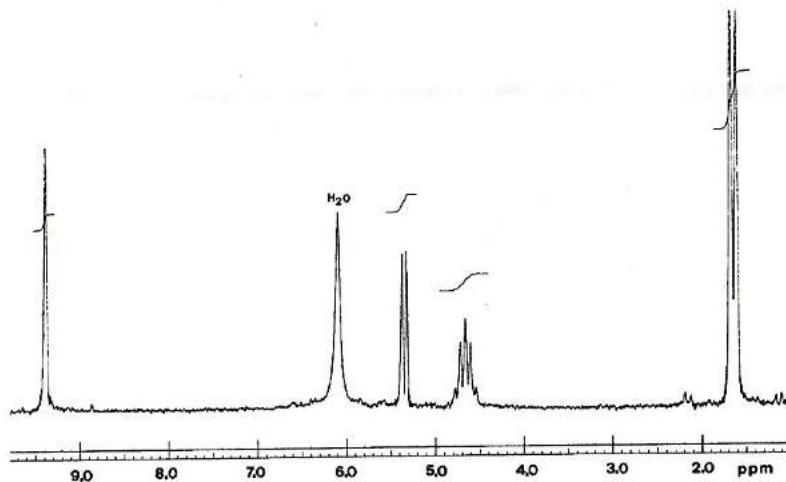


Fig. 3 ^1H -NMR.-Spektrum von L-Biopterin (5) in 3N DCl.

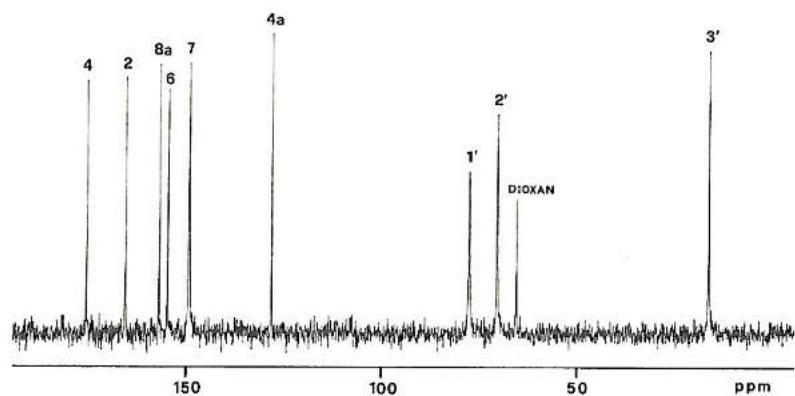


Fig. 4 ^{13}C -PFT-NMR.-Spektrum von L-Biopterin (5) in 3N NaOD.

3. Synthese von L-Biopterinderivaten und deren Charakterisierung

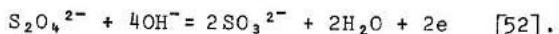
Für die Herstellung von Derivaten des L-Biopterins (5) wurde bis vor kurzem natürlich gewonnenes L-Biopterin (5) verwendet. Z.B. isolierten 1972 Fukushima und Shiota L-Biopterin (5) noch aus Froschhäuten [14]. Da wir jetzt Biopterin (5) in grossen Mengen herstellen können, wird die Untersuchung dessen Derivate stark erleichtert.

3.1. 7,8-Dihydro-L-biopterin

Für die Reduktion von L-Biopterin (5) zu 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) muss ein Reduktionsmittel gewählt werden, welches das Biopterin (5) nicht gleich zum Tetrahydrobiopterin (9) reduziert. Bei der katalytischen Reduktion mit Platin in Trifluoressigsäure bildet sich sehr rasch die Diastereomerenmischung der Tetrahydrobioptерine. Dagegen kann z.B. mit Zink in Natronlauge 8 hergestellt werden [16]. Eine der gebräuchlichsten Methoden für die Reduktion von Pterinen zur 7,8-Dihydrostufe ist heute die Reduktion mit Natrium-dithionit. Bei der Isolierung der Produkte können jedoch Schwierigkeiten entstehen. 7,8-Dihydrofolsäure z.B. wird aus dem Reaktionsgemisch isoliert, indem sie durch Zugabe von Säure ausgefällt wird [50]. Dihydrobiopterin (8) kann aber nicht durch Zugabe von Säure ausgefällt werden, weil es sich in saurem Milieu rasch zersetzt. Fukushima und Akino mussten deshalb das Dihydrobiopterin (8) mittels aufwendiger Säulenchromatographie reinigen [51].

Wir haben jetzt eine einfache Methode gefunden, welche auch für grosse Ansätze geeignet ist. Biopterin (5) wird unter

Stickstoff in einer wässrigen Lösung von Natriumdithionit aufgeschlämmt und mit möglichst wenig Natronlauge in Lösung gebracht. Die Lösung hat dann einen pH von ca. 10.5. Das Reaktionsgemisch wird auf 70°C erhitzt bis es hellgelb wird. Beim Abkühlen fällt das 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) aus, da der pH im Verlauf der Reaktion auf ca. 6.5 sinkt.



Nach dem Umkristallisieren aus Wasser erhält man mit einer Ausbeute von 72% reines 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) [53]¹⁾.

Die Reduktionsgeschwindigkeit ist stark pH-abhängig. Im basischen Milieu ist die Reduktionsgeschwindigkeit wesentlich kleiner als im leicht sauren Bereich. Die Reduktion von 8 zu 9 mit Natriumdithionit zeigt die gleiche pH-Abhängigkeit, verläuft aber viel langsamer als die Reduktion von 5 zu 8, so dass die Reduktion bis zur Dihydrostufe ziemlich selektiv verläuft.

7,8-Dihydro-L-biopterin (8) in neutraler wässriger Lösung wird mit Sauerstoff, Wasserstoffperoxyd oder Braunstein langsam, in verdünnter Essigsäure und Braunstein hingegen sehr rasch zu reinem L-Biopterin (5) zurückoxydiert. Pfleiderer liess Tetrahydrobiopterin (9) an der Luft in Natriumbicarbonatlösung bei pH 7.5 oxydieren und erhielt als Hauptprodukt Dihydroxyanthopterin (4) neben wenig Biopterin (5)²⁾ und Pterin (61) [54]. Er nahm an, dass die Oxy-

1) Auf die gleiche Art kann auch 7,8-Dihydro-L-Neopterin hergestellt werden (siehe exper. Teil).

2) Bei dem so erhaltenen Biopterin kann die absolute Konfiguration der Seitenkette nicht mehr mit Bestimmtheit angegeben werden.

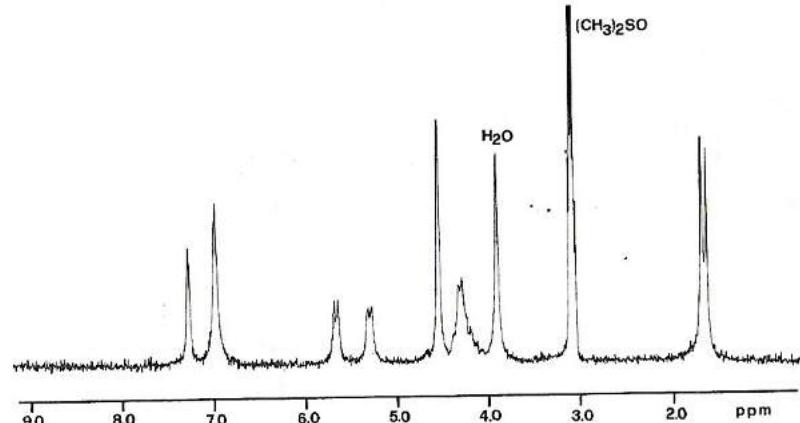


Fig. 5 1H -PFT-NMR.-Spektrum von 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) in $(CD_3)_2SO$.

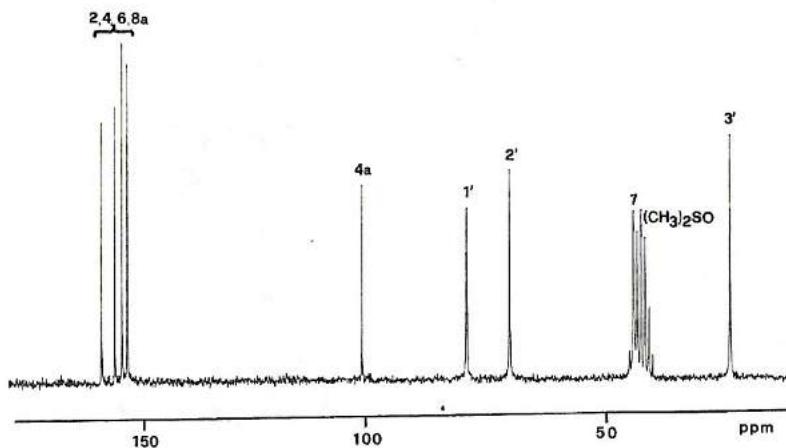
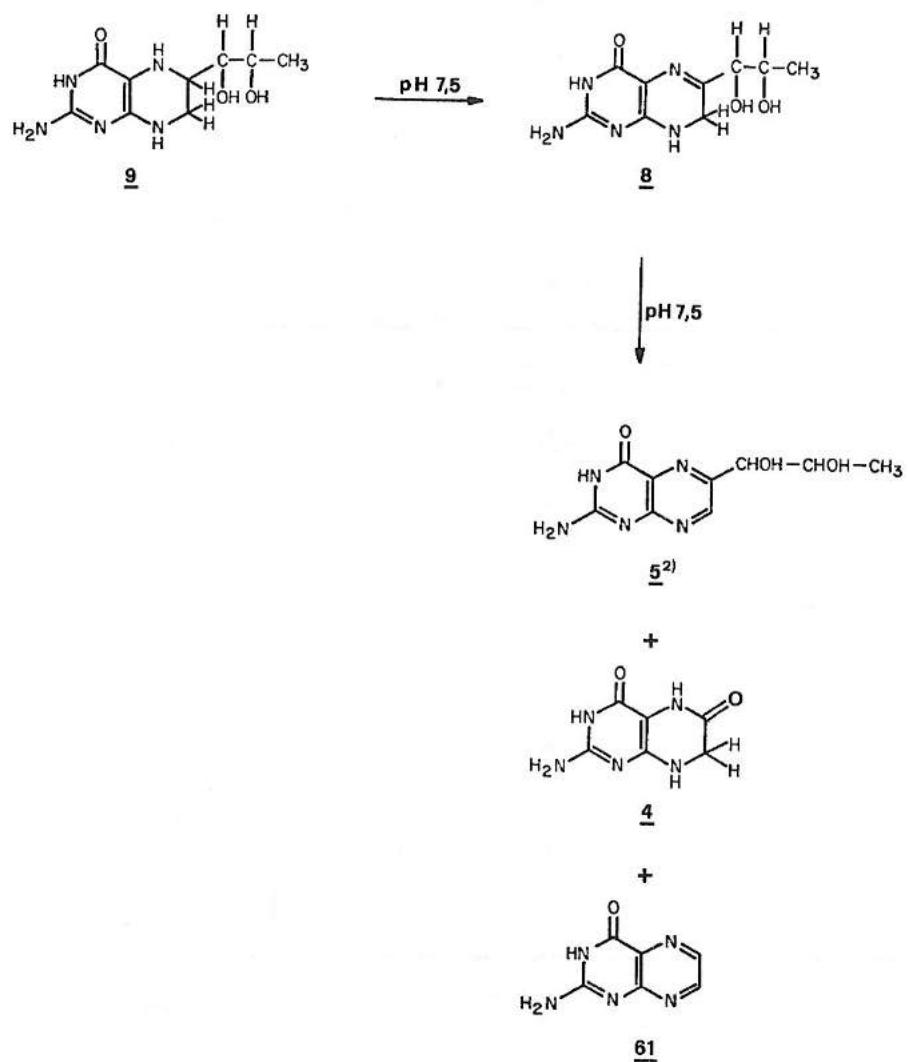


Fig. 6 ^{13}C -PFT-NMR.-Spektrum von 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) in $(CD_3)_2SO$.

dation über das 7,8-Dihydrobiopterin (8) verläuft.

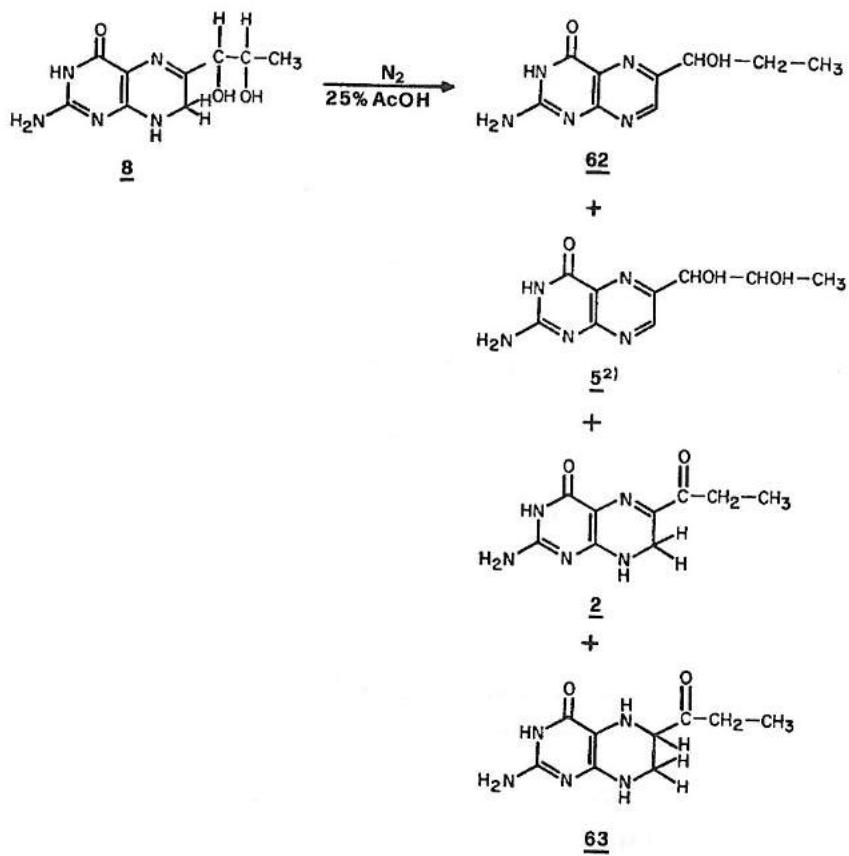


Die Oxydation von 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) bei pH 7.5 liefert tatsächlich die gleichen Produkte, so dass jetzt mit Sicherheit angenommen werden kann, dass die Oxydation von 9 im schwach basischen Milieu über 8 verläuft. Diese Resultate sind von besonderer Bedeutung seitdem Watson, Schlesinger und Cotton im Urin von Patienten mit Phenylketonurie Dihydroxanthopterin (4) fanden [55]. Es kann angenommen werden, dass das Dihydrobiopterin (9) im Körper von Patienten mit Phenylketonurie zu Dihydroxanthopterin (4) abgebaut wird.

Die Rückoxydation von 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) in saurem Milieu wird in Abschnitt 3.5. besprochen. Unter Stickstoff ist 8 in neutraler, wässriger Lösung stabil. In 1N NaOH zersetzt es sich langsam. So war es uns nicht möglich ein ¹³C-PFT-NMR.-Spektrum in 1N NaOH aufzunehmen. In saurem Milieu zersetzt sich 8 rasch.

3.2. Analyse der Reaktionsprodukte aus 7,8-Dihydro-L-biopterin in saurem Milieu

Schon 1963 fand Kaufman, dass sich 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) beim Erhitzen in verdünnter Salzsäure zersetzt und als Hauptprodukt Biopterin (5)²⁾ bildet [55]. Katoh und Akino reduzierten L-Sepiaapterin (3) mit Sepiaapterinreduktase zu 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) und behandelten das so gewonnene 8 mit verdünnter Schwefelsäure bei -20°C [56]. Sie erhielten Biopterin (5)²⁾ und Deoxysepiapterin (2). Fukushima und Shioya stellten Deoxysepiapterin (2) her indem sie Dihydro-biopterin (8) auf eine Phospho-Sephadex-Säule trugen, die Säule über Nacht stehen liessen und dann die



gelb fluoreszierende Bande eluierten [14]. Sie erhielten so Deoxysepiapterin (2) mit einer Ausbeute von ca. 20%.

Wir erhitzten 8 in verdünnter Essigsäure unter Stickstoff und fanden, dass sich auch dann Biopterin (5)²⁾ und Deoxysepiapterin (2) bilden. Deoxysepiapterin (2) hat die gleiche Oxydationsstufe wie 8. Das Biopterin (5)²⁾ kann aber nur durch Oxydation aus 8 entstehen. Wenn aber 8 zu (5)²⁾ oxydiert wird, muss gleichzeitig ein Reduktionsprozess stattfinden. Wir machten deshalb von der Reaktionslösung eine Dünnschicht unter Stickstoff und fanden unter der UV.-Lampe einen blau fluoreszierenden Fleck (Biopterin (5)²⁾) und einen gelb fluoreszierenden Fleck (Deoxysepiapterin (2)). Als wir die Dünnschichtfolie über eine offene Ammoniakflasche hielten, bildete sich ein zweiter gelber Fleck. Um diese Verbindung zu isolieren, dampften wir die Reaktions-Lösung zur Trockene ein und extrahierten mit Wasser. Biopterin (5) und Deoxysepiapterin (2) sind im Wasser schwerlöslich, so dass nur die unbekannte Verbindung in Lösung ging. Ein ¹H-NMR.-Spektrum zeigte eindeutig, dass es sich um das 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin (63) handelt. Da diese Substanz noch nie in der Literatur erwähnt wurde, synthetisierten wir sie später durch Reduktion aus Deoxysepiapterin (2) (siehe Abschnitt (3.4.).

Das Biopterin (5)²⁾ und das Deoxysepiapterin (2) trennten wir durch Chromatographie an einer Cellulose-Säule. Die ¹H-NMR.-Spektren zeigten aber, dass es sich bei der blau fluoreszierenden Verbindung um ein Gemisch von Biopterin (5)²⁾ und 2'-Deoxybiopterin (62) im Verhältnis 3:1 handelt. Aus 8 entstehen beim Erwärmen in verdünnter Essigsäure folgende Produkte: Biopterin (5)²⁾ (34%), 2'-Deoxybiopterin

(62) (12%), Deoxysepiapterin (2) (13%) und 5,6-Dihydro-deoxysepiapterin (63) (23%). 2 und 62 haben die gleiche Oxydationsstufe wie Dihydrobiopterin (8), während 63 durch Reduktion und 5²⁾ durch Oxydation entsteht. Wir können damit das erste Mal eine intermolekulare Disproportionierungs-Reaktion bei Pterinen nachweisen.

3.3. Deoxysepiapterin

Wenn 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin (63) in verdünnter Essigsäure an der Luft stehen gelassen wird, bildet sich langsam Deoxysepiapterin (2). Um nun Deoxysepiapterin (2) in möglichst grosser Ausbeute aus Dihydrobiopterin (8) zu erhalten, muss die Reaktionslösung nach dem Erwärmen einige Tage an der Luft stehen gelassen werden, damit 63 zu 2 oxydiert wird. Anschliessend kann 2 durch Chromatographie auf einer Cellulose-Säule aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden. Die Isolierung von 2 ist aber einfacher, wenn man die zur Trockene eingedampfte Reaktionslösung mit 7N NaOH versetzt. Dabei fällt das Natriumsalz des Deoxysepiapterins (2) in Form von dunkelroten Nadeln aus, während das Biopterin (5²⁾) und das 2'-Deoxybiopterin (62) gelöst bleiben. Die 7N NaOH muss auf 0°C gekühlt werden, weil sich sonst das Deoxysepiapterin (2) langsam zersetzt. In verdünnter Salzsäure ist 2 schwerlöslich und in Trifluoressigsäure zersetzt es sich rasch [53].

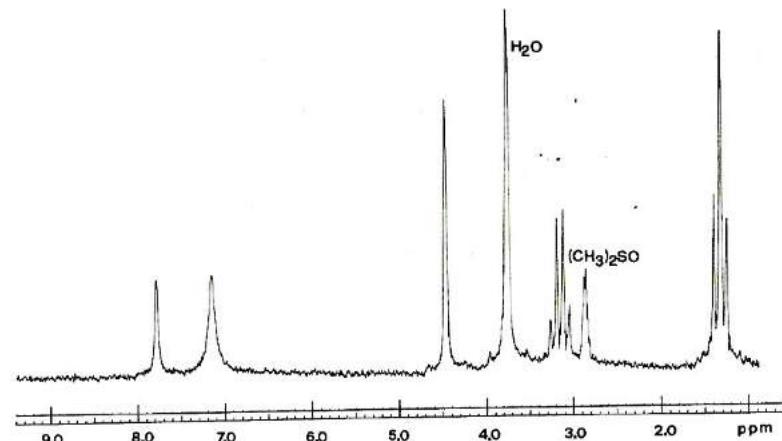


Fig. 7 ¹H-NMR.-Spektrum von Deoxysepiapterin (2) in (CD₃)₂SO.

3.4. (6R,S)-5,6 -Dihydrodeoxysepiapterin

Bei der Reduktion von Deoxysepiapterin (2) mit Natrium-dithionit entsteht als Hauptprodukt 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin (63). Die Abtrennung der anorganischen Salze bereitete uns anfänglich Schwierigkeiten, weil das 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin (63) in Wasser gut löslich ist.

Wenn $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in konzentrierter Salzsäure aufgeschlämmt wird, entstehen unlösliche Zersetzungspprodukte [52]. Nach dem Abnutzen dieser Zersetzungspprodukte kann die Lösung auf -5°C abgekühlt werden, ohne dass sich eine Fällung bildet. Wird eine Mischung von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ und 63 in konzentrierter Salzsäure (22°C) aufgenommen und abgenutscht, fällt beim Abkühlen dieser Lösung auf -5°C 63 in Form von feinen Nadeln aus.

Das UV.-Spektrum von 63 stimmt mit jenem von 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (9) überein. Im Gegensatz zum $^1\text{H-NMR.}$ -Spektrum von 9 kann dasjenige von 63 gut interpretiert werden (siehe Fig. 8).

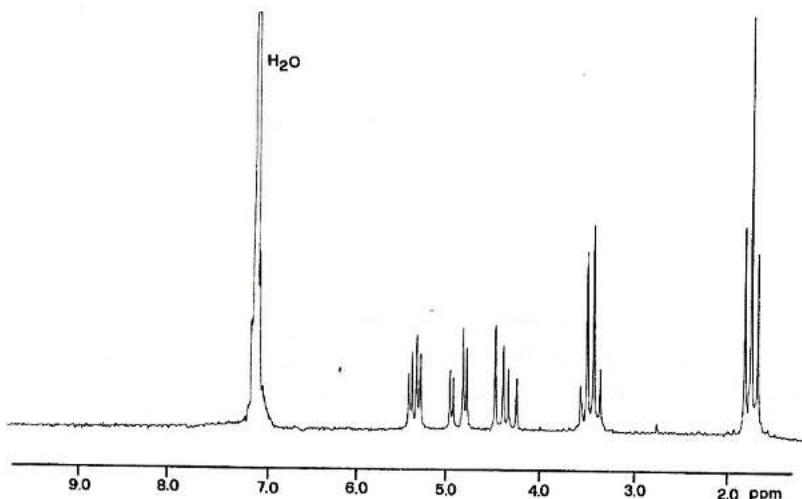


Fig. 8 $^1\text{H-NFT-NMR.}$ -Spektrum von 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin (63) in 3N DCl.

Mit Hilfe der Kopplungskonstanten der Wasserstoffatome $\text{H}_{\alpha}\text{-C}(6)$ und $\text{H}_{\alpha}\text{-C}(7)$ kann die Konformation von 63 bestimmt werden. Der Tetrahydropyrazinring in 63 besitzt eine Halbsessel-Konformation mit ausgeprägter äquatorialer Anordnung der C(6)-Seitenkette. Die $\text{H}_{\alpha}\text{-C}(6)$ - und $\text{H}_{\alpha}\text{-C}(7)$ -Atome sind transdialixial, das $\text{H}_{\beta}\text{-C}(7)$ - ist zum $\text{H}_{\alpha}\text{-C}(6)$ -Atom gauche angeordnet. Dies ergibt für 63 eine analoge Konformation wie sie für 5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure und 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure ermittelt wurde [57].

3.5. 2'-Deoxybiopterin

Diese Verbindung wurde bis jetzt in der Literatur noch nie erwähnt.

Da wir bei der quantitativen Analyse der Reaktionsprodukte aus Dihydrobiopterin (8) in verdünnter Essigsäure nur 12% 2'-Deoxybiopterin (62) fanden, versuchten wir es anfänglich durch katalytische Hydrierung von Deoxysepiapterin (2) herzustellen. Dabei entsteht das Tetrahydro-2'-deoxybiopterin (64) das mit Jod leicht zum 2'-Deoxybiopterin (62) oxydiert werden kann.

Gleichzeitig entstehen aber Nebenprodukte, die nicht vollständig entfernt werden konnten. Wir entschlossen uns deshalb, das beim Erwärmen von Dihydrobiopterin (8) in verdünnter Essigsäure entstehende 2'-Deoxybiopterin (62) zu isolieren und zu reinigen. So konnten wir 62 als Nebenprodukt der Deoxysepiapterinsynthese gewinnen. Die Reinigung erfolgte durch Dowex-Chromatographie.

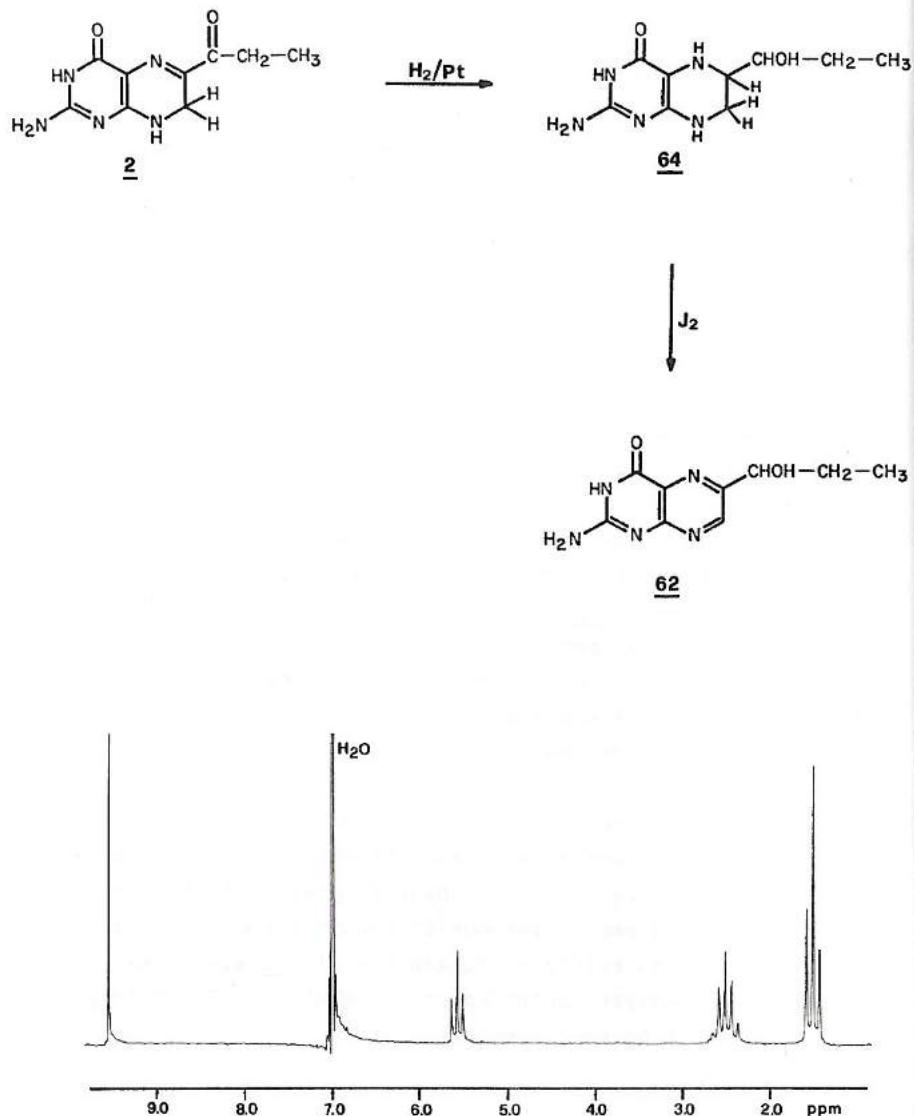


Fig. 9 ^1H -PFT-NMR.-Spektrum von 2'-Deoxybiopterin (62) in 3N DCl .

3.6. (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin

1966 untersuchten Rembold und Metzger die Reduktion von Biopterin (5) zu Tetrahydrobiopterin (9) [58]. Als Reduktionsmittel setzten sie Zink mit Salzsäure, Natriumborhydrid und Natriumdhithionit ein und führten auch die katalytische Reduktion mit PdO durch. Sie fanden, dass die katalytische Reduktion mit PdO in 0.2N Salzsäure die höchste Ausbeute ergab. Da ihnen aber nur wenig L-Biopterin (5) zur Verfügung stand, mussten sie im Mikromol-Bereich arbeiten und setzten [$8\text{-}^{14}\text{C}$] Biopterin ein, was die quantitative Bestimmung der Reaktionsprodukte ermöglichte [58].

Für grössere Mengen eignet sich die von Viscontini und Bobst eingeführte Hydrierung von Pterinen in Trifluoressigsäure am besten. Dieses Verfahren hatte sich auch schon bei der Hydrierung des Neopterins (6) und Monapterins (7) bewährt [60]. Die Reduktion des Biopterins (5) in Trifluoressigsäure erfolgt sehr rasch und nach dem Abfiltrieren des Platins wird das Tetrahydrobiopterin (9) als Dihydrochlorid durch Zugabe von Salzsäure, Methanol und Aether gefällt.

Wie die ^1H -NMR.- und ^{13}C -PFT-NMR.-Spektren Fig. 10 und 11 zeigen, liegt das Tetrahydrobiopterin (9) als Diastereomerengemisch vor. Aufgrund der deutlich verschiedenen ^{13}C -PFT-NMR.-Spektren der beiden Diastereomeren kann ihr Mischungsverhältnis von 2 zu 1 abgeschätzt werden [53].

Es muss aber angenommen werden, dass nur eines der beiden Diastereomeren biologisch aktiv ist. Deshalb versuchten wir eines der beiden Diastereomeren durch Umkristallisation anzureichern. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus konzentrierter Salzsäure konnten wir aber keine Anreicherung

eines Diastereomeren beobachten.

Im Gegensatz zu Dihydrobiopterin (8) ist Tetrahydrobiopterin (9) unter Stickstoff in Natronlauge und Salzsäure stabil.

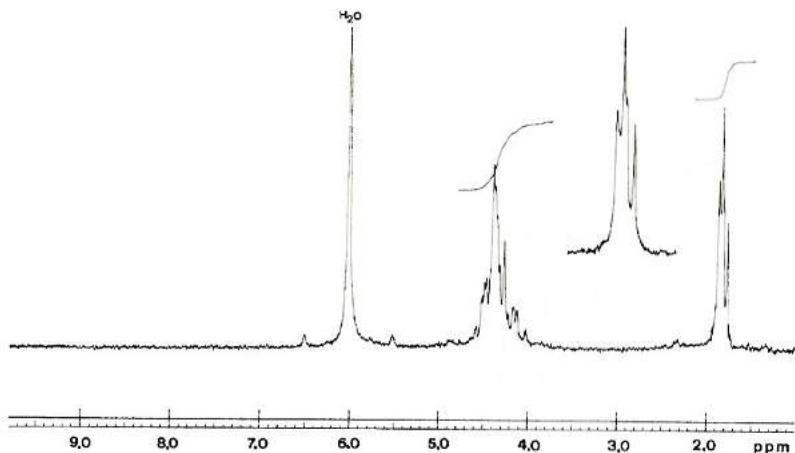


Fig. 10 ^1H -NMR.-Spektrum von (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin (9) in 3N DCl. (Die Verdoppelung des Signals der Methyl-Protonen ist auf das Vorhandensein von Diastereomerenpaare zurückzuführen).

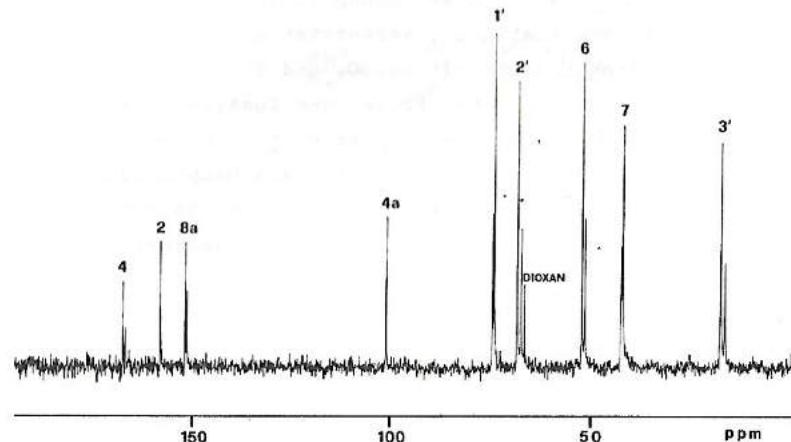


Fig. 11 ^{13}C -PFT-NMR.-Spektrum von (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin (9) in 3N NaOD.

3.7. Rückoxydation von 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin

Wenn man eine wässrige Lösung von Tetrahydrobiopterin-dihydrochlorid (9) mit NaHCO_3 neutralisiert und an der Luft stehen lässt, entsteht als Hauptprodukt Pterin (61) neben wenig Biopterin (5)²⁾. Gibt man vor der Oxydation noch etwas Natriumchlorid hinzu, erhöht sich der Anteil an Biopterin (5) leicht. Um eine Neutralisation zu vermeiden, reduzierten wir Biopterin (5) mit PtO_2 indem wir es in Wasser aufschlämmten und so lange reagieren liessen bis

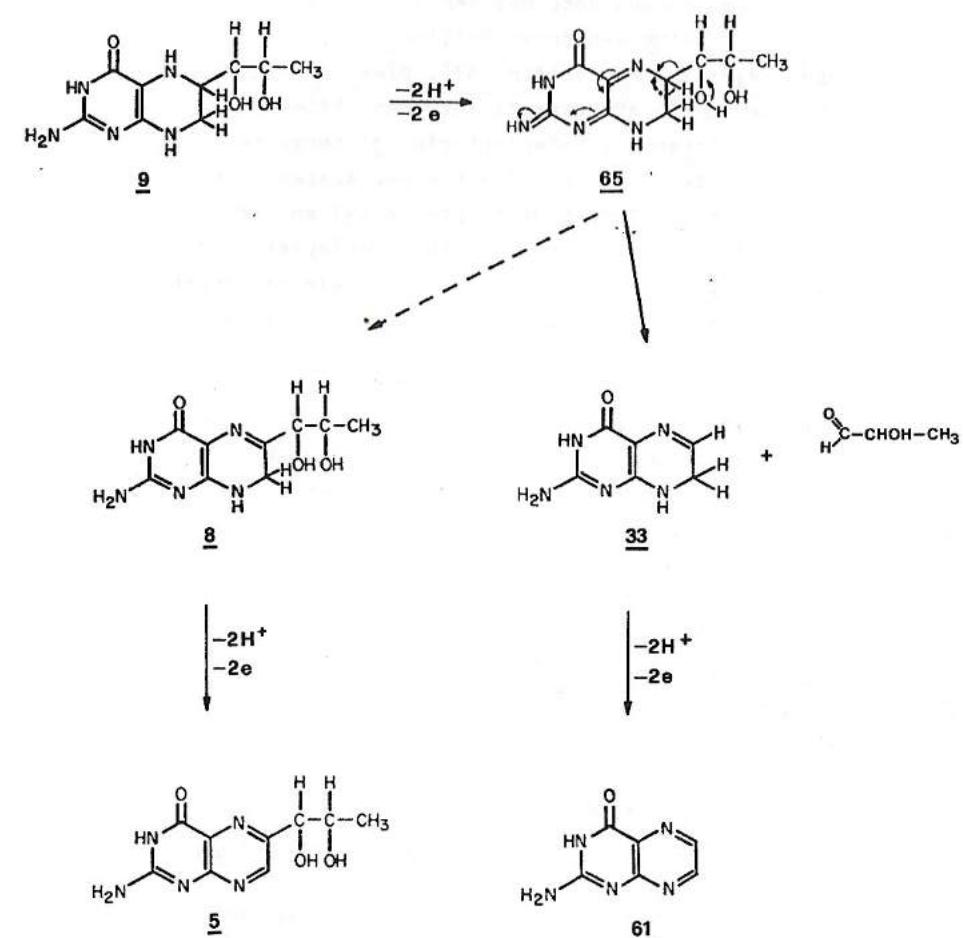
alles Biopterin (5) gelöst war, die Lösung nicht mehr fluoreszierte und eine Probe ein UV.-Spektrum ergab, das frei von Dihydrobiopterin (8) war. Diese Lösung filtrierten wir unter Stickstoff vom Platin ab, versetzten einen Teil davon mit NaCl , einen anderen mit Na_2SO_4 und liessen die Proben an der Luft stehen. In der Probe ohne Zusätze entstand Pterin (61) und nur Spuren von Biopterin (5). In den zwei andern Proben entstand neben Pterin (61) als Hauptprodukt wenig Biopterin (5). Durch Zugabe von sehr viel Salzen konnte der Anteil an Biopterin (5) nicht mehr wesentlich erhöht werden.

Pearson beschreibt die Herstellung von reinem Dihydrobiopterin (8) durch Oxydation von Tetrahydrobiopterin (9) mit der stöchiometrischen Menge Sauerstoff [61]. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu den von uns erhaltenen Resultaten, denn wie wir schon im Abschnitt 3.1. erwähnten, wird bei der Rückoxydation von Dihydrobiopterin (8) die Seitenkette nicht mehr abgespalten.

In Anlehnung an den Mechanismus für die Rückoxydation von Tetrahydroppterinen von Viscontini et al. [17] postulierten Rembold, Metzger und Gutensohn einen Mechanismus für die Abspaltung der Seitenkette bei der Rückoxydation von Tetrahydronopterin [62]. Wir nehmen an, dass die Rückoxydation von Tetrahydrobiopterin (9) analog verläuft.

Dieser Mechanismus erklärt allerdings nicht, warum in Gegenwart von Salzen vermehrt Biopterin (5) entsteht, und dass bei der Oxydation von Tetrahydro-2'-deoxybiopterin (64) nur Spuren von Pterin (61) entstehen.

Die Rückoxydation von 9 im basischen Milieu wurde bereits in Abschnitt 3.1. beschrieben.

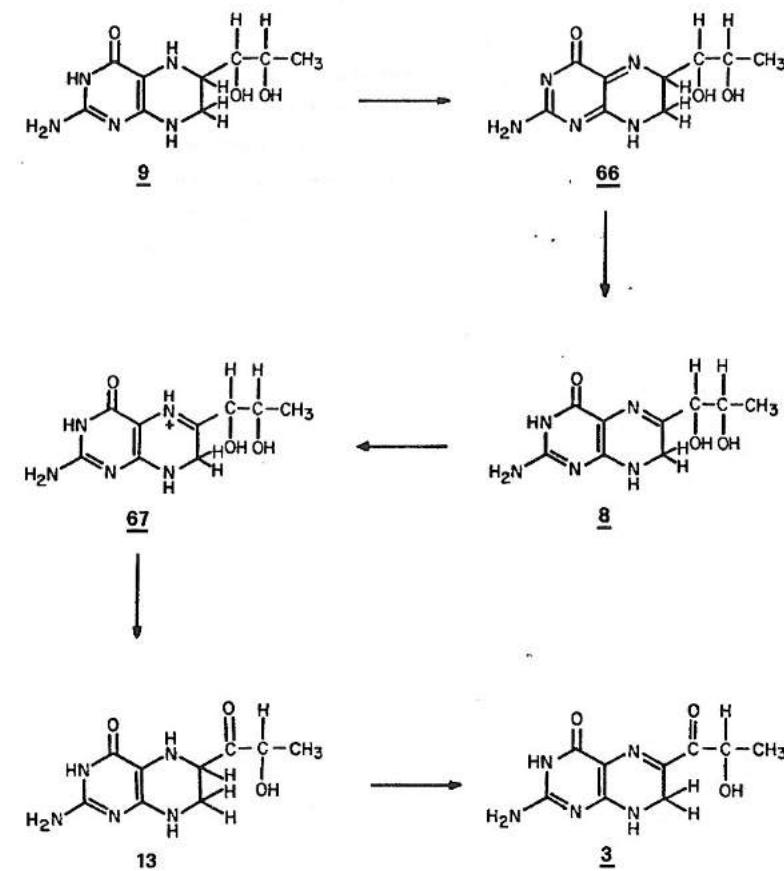


3.8. L-Sepiapterin

1972 erhielten Sugiura und Goto bei der Rückoxydation von Dihydronoopterin 2-Amino-4-hydroxy-6-(1'-oxo-2',3'-di-hydroxypropyl)-7,8-dihydropteridin [63]. Diese Verbindung ist mit Sepiapterin (3) strukturell verwandt. Pfleiderer versuchte auf ähnlichem Weg L-Sepiapterin (3) herzustellen [54]. Er erhielt L-Sepiapterin (3) mit einer Ausbeute von 20% durch Oxydation von Tetrahydrobiopterin (9) an der Luft in einer Pufferlösung mit pH=4. Neben Sepiapterin (3) entstand als Hauptprodukt Biopterin (5)²⁾ und kleine Mengen von Pterin (61), Pterin-6-carbonsäure und Deoxysepiapterin (2) [54].

Da die Produktverteilung bei der Oxydation von Tetrahydrobiopterin (9) pH-abhängig ist, nahm Pfleiderer an, dass als Zwischenprodukt Dihydrobiopterin (8) gebildet wird [54]. Wir versuchten deshalb das Sepiapterin (3) unter den gleichen Bedingungen aus Dihydrobiopterin (8) herzustellen. Wir stellten aber fest, dass aus Dihydrobiopterin (8) signifikant weniger Sepiapterin (3) entsteht, als von Tetrahydrobiopterin (9) ausgehend. Damit ist es unwahrscheinlich, dass 8 bei dieser Reaktion ein Zwischenprodukt ist. Pfleiderer nahm weiter an, dass das Dihydrobiopterin (8) durch eine Lobry de Bruyn-Alberta van Ekenstein Umlagerung in das 5,6-Dihydrosepiapterin (13) überführt wird, aus dem dann durch Oxydation L-Sepiapterin (3) entsteht [54].

Es gelang uns das 5,6-Dihydrosepiapterin (13) zu synthetisieren (siehe Abschnitt 3.9.). 13 geht aber bei pH 4 rasch in 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin (63) über und man erhält nach Oxydation an der Luft Deoxysepiapterin (2). Damit ist es eindeutig, dass die Sepiapterinbildung nicht nach dem



von Pfleiderer postulierten Mechanismus verläuft. Wir vermuten, dass hier wie bei der Deoxysepiapterinbildung intermolekulare Reaktionen stattfinden. Da Pfleiderer [54] die Sepiapterinsynthese ohne experimentellen Teil publizierte, mussten wir selber nach den detaillierten, optimalen Reaktionsbedingungen suchen. Es stellte sich heraus, dass die Produktverteilung von der Pufferkonzentration abhängt. Bei zu hoher Pufferkonzentration bildet sich mehr Deoxysepiapterin (2) als Sepiapterin (3), bei zu kleiner Pufferkonzentration bilden sich nur Spuren von Deoxysepiapterin (2) aber auch die Ausbeute an Sepiapterin (3) ist gering. Wir liessen 9 deshalb in einer ca. 0.4N Natriumacetat-Pufferlösung (pH=4) an der Luft oxydieren. Nach zweimaligem Auftragen auf eine Cellulosesäule und Umkristallisation aus Wasser erhielten wir reines Sepiapterin (3) [53].

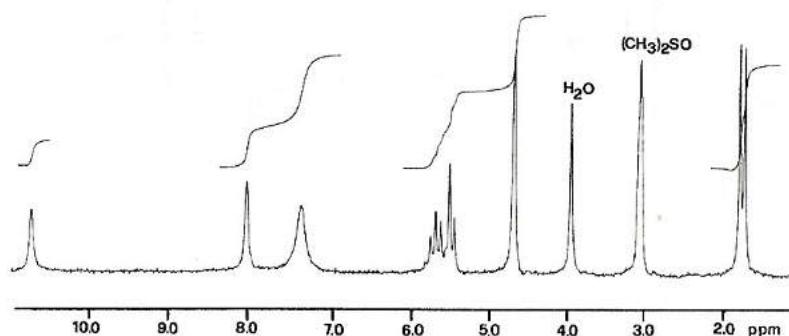
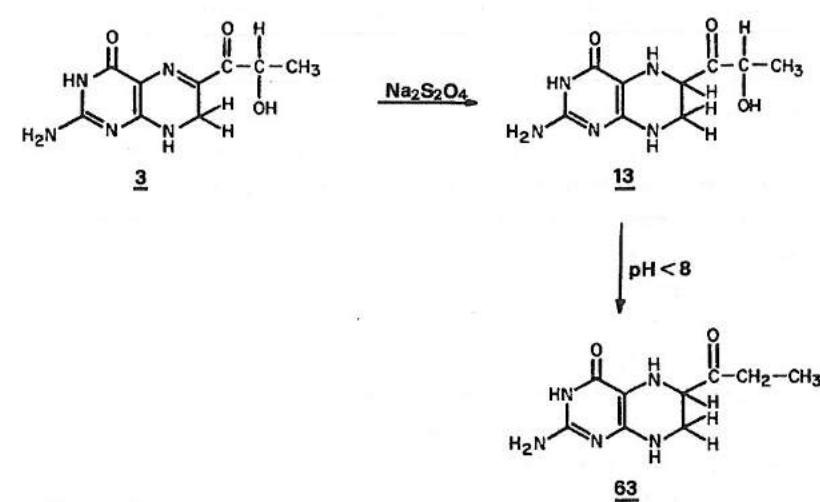


Fig. 12 ^1H -PFT-NMR.-Spektrum von L-Sepiapterin (3) in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

3.9. 5,6-Dihydro-L-sepiapterin

Anfänglich versuchten wir 5,6-Dihydro-L-sepiapterin (13) gleich wie 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin (63) herzustellen, indem wir Sepiapterin (3) mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduzierten und das Produkt durch Umkristallisation in konzentrierter Salzsäure reinigten. Das ^1H -NMR.-Spektrum zeigte dann aber, dass wir reines 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin (63) erhalten hatten.



Wenn L-Sepiapterin (3) mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in einem Puffer mit pH=9 reduziert und anschliessend nach Zugabe von Ammoniak an der Luft zurückoxydiert wird, findet man auf dem Dünnschichtchromatogramm ein Band für 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin (63).

schicht als Hauptprodukt Sepiapterin (3). Wird die Rückoxydation bei einem pH von 5 durchgeführt, entsteht als Hauptprodukt Deoxysepiapterin (2). Es kann angenommen werden, dass bei der Reduktion von Sepiapterin (3) mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 5,6-Dihydrosepiapterin (13) entsteht, das sich aber im sauren und neutralen Milieu unter Bildung von Deoxysepiapterin (2) zersetzt.

4. Klinische Versuche mit (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin, 7,8-Dihydrobiopterin und L-Sepiapterin

Wie bereits in Abschnitt 1.2b. erwähnt wurde, besteht bei der Phenylketonurie meist ein Defekt des Apoenzyms Phenylalaninhydroxylase. Sehr selten beruht die Störung der Hydroxylierung von Phenylalanin aber auch auf einem Defekt des regenerierenden Systems der Dihydropteridinreduktase oder der Biosynthese von Dihydrobiopterin.

In Zusammenarbeit mit Prof.Dr. H.-C.Curtius, Dr. Niederwieser vom Kinderspital in Zürich und mit Aerzten in München wurden Vesuche an einem Kind mit Defekter Dihydrobiopterin-Biosynthese durchgeführt [64]. Nach Verabreichung von 25 mg 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin-dihydrochlorid (9 · 2HCl) sank der Phenylalaningehalt im Blut innerhalb 3 Stunden von 20 auf 2 mg/100 ml und blieb mindestens 36 Stunden auf diesem tiefen Niveau [64]. Auch 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) und L-Sepiapterin (3) waren ähnlich aktiv.

5. Experimenteller Teil

1) Allgemeines

Die ^1H -PFT-NMR.-Spektren wurden auf einem Varian LX-100-15 Spektrographen aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden den entsprechenden ^1H -NMR.-Spektren entnommen, welche auf einem Varian HA-100-NMR.-Spektrographen aufgenommen wurden (Standard: Tetramethylsilan; Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, m = Multiplett, H = Proton(en); die spezifische optische Drehung $[\alpha]_{D}^{25}$, wurde an einem LEP A2 Zeiss-Gerät gemessen.

2) L-Rhamnose-Diaethylmercaptal (57), 1,1-Diaethylsulfonyl-L-manno-2,3,4,5-tetrahydroxyhexan (58) und 5-Deoxy-L-arabinose (52) wurden nach [43] hergestellt.

3) 5-Deoxy-L-arabinose-phenylhydrazon (53).

100 mg (0.66 mmol) 5-Deoxy-L-arabinose-hydrat (52 · H_2O) wurden in einem Handschuhkasten (Inertgas: N_2) mit 80 mg (0.74 mmol) Phenylhydrazin in 20 ml 95 proz. Methanol gelöst und 1 Std. bei 22°C stehen gelassen. Nach Einengung der Lösung auf ca. 3 ml wurde mit 35 ml Aether und 50 ml n-Hexan versetzt, 6 Std. bei 0°C stehen gelassen, das ausgefallene Phenylhydrazon 53 abgenutscht, gewaschen mit Aether-Hexan 1:1 und getrocknet (0.01 Torr, 40° , 15 Std.): 105 mg (71%) 53.

¹H-NMR. (CD_3OD) (Fig. 1)³⁾: 7,35-6,55 (m, 5 arom. H); 7,19 (d, $J_{1,2} = 6,0$ Hz, H-C(1)); 4,45 (q, $J_{2,3} = 3,6$ Hz, H-C(2)); 3,87 (m, $J_{3,4} = 6,4$ Hz, $J_{4,5} = 6,2$ Hz, H-C(4)); 3,48 (q, H-C(3)); 1,28 (d, 3H-C(5)).

$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2$	Ber.	C 58,91	H 7,19	N 12,49%
(224,27)	Gef.	C 59,37	H 7,67	N 11,16%

4) 2,3,4-Triacetyl-5-deoxy-L-arabinose-phenylhydrazone (50).

100 mg (0,45 mmol) 53 wurden in einem Handschuhkasten (Inertgas: N_2) in 1 ml Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid gelöst. Anschliessend 5 Std. (22°C) stehen gelassen, bei 40°C zur Trockene eingeengt und der Rückstand getrocknet (0,01 Torr, 40°C , 15 Std.).

H-NMR. (CDCl_3) (Fig. 2): 7,90 (s, =N-NH-); 7,55-6,80 (m, 5 arom. H); 6,93 (d, H-C(1)); 5,74 (m, H-C(2)); 5,52 (m, H-C(3)); 5,17 (m, H-C(4)); 2,15 und 2,09 (2 s und 1 s, 3-CO-CH₃); 1,36 (d, $J_{4,5} = 6,2$ Hz, 3H-C(5)).

5) Tetraacetyl-5-deoxy-L-arabinose-phenylhydrazone (60).

100 mg (0,45 mmol) 53 wurden in 4 ml Essigsäureanhydrid gelöst und 2 Std. auf 80°C erwärmt. Nach Einengung zur Trockene wurde 60 mit einer Silikagelsäule ($\varnothing 5 \times 20$ cm) gereinigt. Als Laufmittel wurde Benzol/Methanol 19:1 verwendet. Das 60 enthaltende Eluat wurde zur Trockene eingeengt und der Rück-

3) Für das ¹H-NMR.-Spektrum wurden die H-Atome der OH-Gruppen in (53) gegen Deuterium in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ 2:1 bei 50°C ausgetauscht.

stand getrocknet (0,01 Torr, 40°C , 15 Std.): 128 mg (73%) (60).

¹H-NMR. (CDCl_3): 7,60-6,67 (m, 5 arom. H); 6,33 (d, $J_{1,2} = 4,5$ Hz, H-C(1)); 5,62 (m, $J_{2,3} = 4,5$ Hz, H-C(2)); 5,27 (q, $J_{3,4} = 6,4$ Hz, H-C(3)); 5,05 (m, $J_{4,5} = 6,0$ Hz, H-C(4)); 2,43, 2,04, 2,00, 1,98 (4 s, 4 -CO-CH₃); 1,20 (d, 3H-C(5)).

6) 1',2'-Diacetyl-L-biopterin (55).

Zu einer Lösung von 10 ml Methanol und 0,5 ml Pyridin wurden 100 mg (0,28 mmol) 50 gegeben. Dazu kamen 10 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ gelöst in 4 ml Wasser und eine Lösung von 67 mg (0,31 mmol) 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-dihydrochlorid (36·2HCl) in 4 ml Wasser. Die Reaktionslösung wurde unter Sauerstoffausschluss 20 Std. auf $35-40^\circ\text{C}$ erwärmt, wobei eine dunkelrote Lösung mit wenig Fällung entstand. Es wurde eine Lösung von 0,17 g (0,67 mmol) Jod in 3 ml Methanol zugegeben. Im Verlauf der Oxydation schied sich 55 in Form eines braunen, feinen Niederschlages aus. Nach 30 Min. wurde die Lösung auf Jodüberschuss⁴⁾ geprüft und anschliessend zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 7 ml Wasser aufgeschlämmt, die unlöslichen Teile abgenutscht mit 20 ml Aethanol/Aether 1:1 gewaschen, zweimal aus Wasser unter Verwendung von Aktivkohle umkristallisiert und getrocknet (0,01 Torr, 40°C , 15 Std.): 12 mg (12%) 55. Dünnschichtchromatographisch (Cellulosefolie, Laufmittel: Wasser) wurden folgende Produkte gefunden: Wenig Pterin und Monoacetylbiopterin (?), Haupt-

4) Falls der Test auf Jod mit Jod-Stärke-Papier negativ ist, wird zusätzliches Jod zugegeben bis zur positiven Anzeige des Testes.

produkt: 1,2-Diacetylbiopterin (55). Nach mehrmaliger Umkristallisation nahm die Menge Monoacetylbiopterin zu.

¹H-NMR. (CF₃COOD): 9,01 (s, H-C(7)); 6,17 (d, J_{1',2'} = 4,6 Hz, H-C(1')); 5,66 (m, H-C(2')); 2,35, 2,18 (2 s, 2 -CO-CH₃); 1,46 (d, J_{2',3'} = 5,6 Hz, 3H-C(3')).

7) L-Biopterin (5).

100 mg (0,36 mmol) (55) wurden in 10 ml konz. Ammoniak gelöst, die Lösung 1 Std. bei 50°C gehalten und zur Trockene eingeengt. Anschliessend wurde der Rückstand in 80 ml 1 proz. Ammoniak gelöst und an einer mit Dowex 1X8 beschickten Säule (Ø 4,5x15 cm) chromatographiert. Die Eluierung erfolgte mit 0,15 N Ammoniumformiatlösung, pH 9. Die das Biopterin enthaltende Fraktion wurde bis auf ca. 100 ml eingeengt und 2 Std. bei 0°C stehen gelassen. Das ausgefallene Biopterin (5) wurde abgenutscht, mit wenig Wasser (4-5°C) gewaschen, aus Wasser umkristallisiert und getrocknet (0,01 Torr, 40°C, 15 Std.): 57 mg (67%) 5.

8) Synthese von L-Biopterin (5) ohne Isolierung der Zwischenprodukte

14 g (42,1 mmol) 1,1-Diaethylsulfonyl-L-manno-2,3,4,5-tetrahydroxyhexan (58) wurden in 120 ml Wasser aufgeschlämmt, die erhaltene Suspension mit verdünntem Ammoniak auf pH 9-10 gebracht, 14 Std. bei 22°C gerührt und zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 80 ml 95 proz. Methanol gelöst und zur Lösung 5,0 g (46,2 mmol) Phenylhydrazin gegeben.

Nach 1 Std. (22°C) wurde zur Trockene eingeengt, der Rückstand in 35 ml Pyridin und 35 ml Essigsäureanhydrid unter Kühlung gelöst und 5 Std. bei 22°C stehen gelassen. Anschliessend wurde zur klaren Lösung 1100 ml Methanol, eine Lösung von 1,4 g Na₂S₂O₄ in 300 ml Wasser und 10,3 g (48,1 mmol) 6-Hydroxy-2,4,5-triamino-pyrimidin-dihydrochlorid (36.2HCl) gelöst in 500 ml Wasser zugegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Sauerstoffausschluss 20 Std. auf 35-40°C erwärmt, wobei eine dunkelrote Lösung mit wenig Fällung entstand. Für die Oxydation versetzte man die Lösung mit 25 g (98,7 mmol) Jod gelöst in 300 ml Methanol. Nach 30 Min. wurde die Lösung auf Jodüberschuss⁴ geprüft und anschliessend zur Trockene eingeengt. Nach Zufügung von 150 ml Methanol und 200 ml konz. Ammoniak wurde 1 Std. auf 50°C erwärmt und dann zur Trockene eingeengt. Der braune Rückstand wurde mit 200 ml Methanol aufgeschlämmt, abgenutscht und nacheinander mit 50 ml Wasser (4-5°C), 200 ml Methanol und 100 ml Aether gewaschen. Das abgenutschte, rohe L-Biopterin (5) wurde in 2200 ml 1 proz. Ammoniak gelöst, die Lösung filtriert und an einer mit Dowex 1X8 beschickten Säule (Ø 7x30 cm) chromatographiert. Die Eluierung erfolgte mit 0,15 N Ammoniumformiatlösung, pH 9. Es bildeten sich zwei blau fluoreszierende Banden, wobei die untere, breite dem Biopterin (5), die obere, schmale dem Pterin (61) entspricht. Die das Biopterin enthaltende Fraktion (ca. 12 l) wurde bis auf ca. 400 ml eingeengt und 2 Std. bei 0°C stehen gelassen. Das ausgefallene Biopterin (5) wurde abgenutscht, mit wenig Wasser (4-5°C) gewaschen, aus Wasser umkristallisiert und getrocknet (0,01 Torr, 40°C, 14 Std.): 4,2 g (42%) 5.

Das getrocknete L-Biopterin ist hygrokopisch und nimmt an der Luft ein Mol Wasser auf.

Löslichkeit: 19 mg in 100 ml Wasser (22°C)

$^1\text{H-NMR}$. (3N DCl) (Fig. 3): 9,37 (s, H-C(7)); 5,34 (d, $J_{1',2'} = 4,8$ Hz, H-C(1')); 4,66 (m, $J_{2',3'} = 6,2$ Hz, H-C(2')); 1,62 (d, 3H-C(3')).

$^{13}\text{C-PFT-NMR}$. (3N NaOD) (Fig. 4): 173,60, C(4); 164,08, C(2); 155,70, C(8a); 153,56, C(6); 148,35, C(7); 127, 97, C(4a); 78,76, C(1'); 71,84, C(2'); 19,59, C(3').

$[\alpha]_{D}^{25} = -66^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (c = 0,2, 0,1N HCl)

C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₃ (237,22)	Ber.	C 45,57 Gef.	H 4,67 H 4,96	N 29,53% N 29,48%
--	------	-----------------	------------------	----------------------

9) 7,8-Dihydro-L-biopterin (8).

Biopterin (5) lässt sich mit Natriumdithionit unter geeigneten experimentellen Bedingungen selektiv sowohl zu Dihydro-biopterin (8) als auch zu Tetrahydrobiopterin (9) reduzieren. Z.B. kann aus der folgenden Tabelle die Reduktionszeit von 5 zu 8 bei 25° mit Natriumdithionit in Abhängigkeit des pH-Wertes entnommen werden. Dabei wurden im Handschuhkasten (Inertgas: N₂) 1 mg (0,0042 mmol) (5) in 2 ml 0,2 m Natrium-phosphat-Puffer gelöst und mit 3 mg (0,017 mmol) Natrium-dithionit versetzt.

Zur Darstellung von 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) wurden 200 mg (0,85 mmol) L-Biopterin (5) im Handschuhkasten (Inertgas: N₂) zusammen mit 600 mg (3,45 mmol) Natriumdithionit in 6 ml

pH des Puffers Zeitdauer für die Bildung von 8 aus (5)⁵⁾

4	4 Sek.
6	20 Min.
7,5	3 1/2 Std.
9	46 Std.
12	11 Tage

Wasser aufgeschlämmt und durch Zugabe von 3N NaOH in Lösung gebracht (pH ca. 10,5). Diese Lösung wurde auf 70° erwärmt, wobei sich die Farbe von gelb über braun nach hellgelb änderte (10-20 Min.). Danach wurde auf 0° gekühlt und 12 Std. stehen gelassen (0°), wobei 8 ausfiel, da als Folge der Reduktion das pH auf ca. 6,5 sank. Unter Luftzutritt wurde 8 abgenutscht und mit wenig Eiswasser und Aceton gewaschen. Umkristallisation aus Wasser (80°) im Handschuhkasten (Inertgas: N₂) und Trocknung (0,01 Torr, 40° , 10 Std.) ergaben 139 mg (72%) 8.

$^1\text{H-PFT-NMR}$. ((CD₃)₂SO) (Fig. 5): 7,22 (s, H-N(8)); 6,96 (s, 2H-N(2')); 5,65, 5,25 (2 d, $J = 4,4$ und $4,4$, 2H-O-C (1' oder 2'))⁶⁾; 4,46 (s, 2H-C(7)); 4,15-4,40 (m, H-C(1') und H-C(2')); 1,60 (d, $J = 5,6$, 3H-C(3')).

$^{13}\text{C-PFT-NMR}$. ((CD₃)₂SO) (Fig. 6): 158,7, 155,8, 154,2, 153,0, C(2,4,6,8a); 101,2, C(4a); 78,0, C(1'); 68,5, C(2'); 41,2, C(7); 20,0, C(3').

5) Diese wurde mit Hilfe des Verschwindens der Fluoreszenz bei der Reaktion von 5 nach 8 abgeschätzt.

6) Die Zuordnung der beiden Hydroxylgruppen an C(1') bzw. C(2') konnte nicht ermittelt werden.

$$[\alpha]_{D}^{22^{\circ}} = +35^{\circ} \pm 2^{\circ} (c = 0,4, 0,1N \text{ NaOH}).$$

8 ist hygroskopisch (5% Wasseraufnahme in 10 Min.) jedoch wenig löslich in Wasser (203 mg/100 ml H₂O, 22°).

C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₃ · 2 H ₂ O ⁷⁾	Ber. C 39,27 (275,27)	H 6,23 Gef. C 38,79	N 25,44% H 6,57	N 25,60%
---	--------------------------	------------------------	--------------------	----------

10) 7,8-Dihydro-L-neopterin.

Die Darstellung, ausgehend von L-Neopterin [40], erfolgte analog zu 8.

Ausbeute: 121 mg (60%) 7,8-Dihydro-L-neopterin.

¹H-NMR. (0,4N NaOD) (Fig. 13): 4,95 (d, J_{1',2'} = 6,1 Hz, H-C(1')); 4,80 (s, 2H-C(7)); 4,75-4,35 (m, H-C(2') und 2H-C(3')).

$$[\alpha]_{D}^{22^{\circ}} = +37^{\circ} \pm 2^{\circ} (c = 0,4, 0,1N \text{ NaOH}).$$

C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄ · H ₂ O ⁸⁾	Ber. C 39,56 (291,27)	H 5,53 Gef. C 39,25	N 25,63% H 5,40	N 26,04%
---	--------------------------	------------------------	--------------------	----------

7) Um 8 · 2 H₂O zu erhalten, wurde 8 bis zur Gewichtskonstanz an der Luft stehen gelassen.

8) Um 7,8-Dihydro-L-neopterin-hydrat aus 7,8-Dihydro-L-neopterin zu erhalten, wurde 7,8-Dihydro-L-neopterin bis zur Gewichtskonstanz an der Luft stehen gelassen.

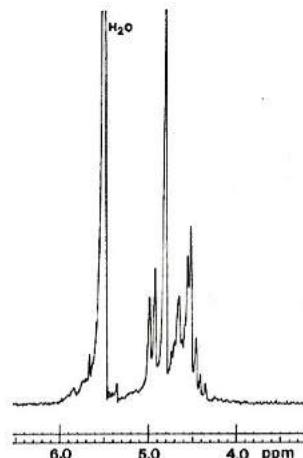


Fig. 13 Ausschnitt aus dem ¹H-NMR.-Spektrum von 7,8-Dihydro-L-neopterin in 0,4 N NaOD.

11) Oxydoreduktion unter Stickstoff von 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) in saurem Milieu.

Eine Lösung von 100 mg (0,418 mmol) 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) in 15 ml 25 proz. Essigsäure wurde im Handschuhkasten (Inertgas: N₂) 20 Min. auf 60° gehalten und anschliessend zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde dreimal mit je 4 ml Wasser (20°) extrahiert und diese Extrakte zur Trockene eingeengt. Nach Trocknung 0,01 Torr, 40°, 5 Std.) wurden 19 mg (23%) 63⁹⁾ erhalten. Der nach obiger Wasserextraktion verbliebene Rückstand wurde in 80 ml Wasser (60°) gelöst und die entstandene Lösung auf

9) Die ¹H-NMR.-Spektren (100 MHz) zeigen neben den beschriebenen Produkten wenig Verunreinigungen (< 10%).

eine Cellulosesäule (\varnothing 3,8x30 cm) aufgetragen. Nach einer ersten Elution mit 15 ml Wasser (60°) und dem Erkalten der Säule auf 22° wurde die Chromatographie mit Wasser (22°) fortgesetzt. Die erste, blau fluoreszierende Fraktion, wurde zur Trockene eingeengt und getrocknet (0,01 Torr, 40° , 5 Std.). Ausbeute: 39 mg (Gemisch aus Biopterin (5)²) und 2'-Deoxybiopterin (6₂). Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum⁹) zeigte ein Verhältnis von Biopterin (5)²) zu 2'-Deoxybiopterin (6₂) von 3:1. Dies entspricht einer Ausbeute von 34% an Biopterin (5)²) und 12% 2'-Deoxybiopterin (6₂) bezogen auf 8. Die zweite, gelb fluoreszierende Fraktion er gab 10,5 mg (13%) 2⁹.

12) Deoxysepiapterin (2).

Diese Substanz entsteht neben 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin (6₃) während der Oxydoreduktion von 7,8-Dihydro-L-biopterin (8) unter Sauerstoffausschluss. Das nicht fluoreszierende 6₃ wird aber leicht mit Sauerstoff zu 2 oxydiert. Aus dieser Tatsache wurde folgende Methode zur Gewinnung von 2 ausge arbeitet: 300 mg (1,26 mmol) 7,8-Dihydro-L-biopterin 8 wurden in 20 ml 25 proz. Essigsäure aufgeschlämmt, während 20 Min. auf 60° gehalten und anschliessend unter Luftzutritt bei 22° stehen gelassen, bis auf dem DC kein 6₃ mehr sichtbar war¹⁰⁾. Danach wurde die Lösung zur Trockene eingeengt, der Rückstand in 8 ml 7N NaOH aufgenommen und eine Stunde lang bei 0° gerührt, wobei das Natriumsalz von 2 in Form von dunkelroten Nadeln auskristallisierte.

10) Die Entwicklung von 6₃ erfolgte mittels Ammoniakdämpfen.

Die Kristalle wurden abzentrifugiert, gewaschen mit 3 ml 7N NaOH (0°) und in 15 ml Wasser gelöst. Die erhaltene Lösung wurde mit Eisessig auf pH 5-6 gebracht und auf 0° abgekühlt. Das reine Deoxysepiapterin 2 wurde abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Umkristallisation aus Wasser und Trocknung (0,01 Torr, 40° , 20 Std.) ergaben 97 mg (35%) 2. - Das so erhaltene Deoxysepiapterin (2) ist mit dem aus Drosophila melanogaster (Mutante Sepia) isolierten Produkt [4] identisch.

$^1\text{H-NMR}$. ((CD₃)₂SO) (Fig. 7): 7,77 (s, H-N(8)); 7,14 (s, 2H-N(2')); 4,45 (s, 2H-C(7)); 3,14 (q, 2H-C(2')); 1,30 (t, 3H-C(3')).

2 ist hygroskopisch und wenig löslich in Wasser.

C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₂	Ber.	C 48,86	H 5,01	N 31,66%
(221,22)	Gef.	C 49,26	H 5,10	N 31,75%

13) (6R,S)-5,6-Dihydro-deoxysepiapterin-dihydrochlorid (6₃ · 2 HCl).

Im Handschuhkasten (Inertgas: N₂) wurden 100 mg (0,45 mmol) Deoxysepiapterin (2) in 80 ml H₂O aufgeschlämmt. Zur erhaltenen Suspension wurde langsam eine 0,1 m Lösung von Natriumdithionit bis zum Erreichen einer hellorangen Lösung zugetropft. Anschliessend wurde zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 3 ml 12N HCl aufgenommen. Danach wurden die ungelösten Salze abgenutscht und die Lösung zuerst 5 Std. bei 5° und anschliessend 12 Std. bei -5° gehalten,

wobei 63 in Form von mikrokristallinen, farblosen Nadeln ausfällt. Abzentrifugieren, waschen mit Methanol/Aether (4:1), Aether und Trocknung (0,01 Torr, 40°, 15 Std.) ergeben 75 mg (56%) 63.

¹H-PFT-NMR. (3N DC1) (Fig. 8)¹¹⁾: 5,30, 4,81 und 4,31 (A-, M- und X-Teil eines AMX-Systems, $J_{AM} = 3,7$ Hz, $J_{AX} = 8,8$ Hz, $J_{MZ} = 14,5$ Hz, H_a - C(6), H_e - C(7), H_a - C(7); 3,39 (q, J = 7 Hz, 2H-C(2')); 1,68 (t, J = 7 Hz, 3H-C(3')).

UV. (0,1N HCl): $\lambda_{max} = 266$ nm ($\epsilon = 10^4 800$). 63 · 2 HCl ist hygroskopisch und gut in Wasser löslich.

C₉H₁₃N₅O₂ · 2 HCl Ber. C 36,50 H 5,11 N 23,65 Cl 23,94% (296,07) Gef. C 36,37 H 5,34 N 23,39 Cl 23,46%

14) 2'-Deoxybiopterin (62).

62 kann durch katalytische Hydrierung von Deoxysepiapterin (2) und anschliessender Oxydation mit Jod hergestellt werden. Dabei entstehen jedoch Nebenprodukte, welche nicht abgetrennt werden konnten. 62 entsteht aber auch bei der Oxydoreduktion von 7,8-Dihydrobiopterin (8) in verdünnter Essigsäure. Es wird deshalb bei der Deoxysepiapterin-Synthese ebenfalls gebildet (siehe 12)), wobei man 62 in den alkalischen Mutterlaugen findet. Für die Isolierung wurden die alkalischen Mutterlaugen mit Eisessig neutralisiert, auf 0° gekühlt, der entstandene Niederschlag abgenutscht und mit Wasser gewaschen. Die Substanz wurde in 150 ml

11) Für das ¹H-NMR.-Spektrum wurde 63 nochmals aus 12N HCl umkristallisiert.

1 proz. Ammoniak gelöst und auf eine Dowex 1X8-Säule (Ø 4,5x15 cm) aufgetragen. Dann wurde mit einem 0,15N Ammoniumformiat-Puffer (pH = 8) das Biopterin (5)²⁾ vollständig eluiert. Darauf wurde mit dem gleichen Puffersystem, jedoch bei einem pH von 7, weiter eluiert. Nach Eluierung des Pterins (61) konnte anschliessend das 2'-Deoxybiopterin (62) erhalten werden. Die 62 enthaltende Fraktion wurde bis auf ca. 20 ml eingeengt und über Nacht bei 0° stehen gelassen. 62 wurde abzentrifugiert, mit wenig Eiswasser gewaschen, aus Wasser umkristallisiert und getrocknet (0,01 Torr, 40°, 15 Std.) 12 mg (5%) 62.

¹H-PFT-NMR. (3N DC1) (Fig. 9): 9,49 (s, H-C(7); 5,48 (t, H-C(1')); 2,46 (m, 2H-C(2')); 1,48 (t, 3H-C(3')).

$[\alpha]_{D}^{22} = 0^\circ$ (c = 0,2; 0,1N NaOH).

62 ist hygroskopisch und wenig löslich in Wasser.

C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₂	Ber.	C 48,86	H 5,01	N 31,66%
(221,20)	Gef.	C 48,55	H 4,47	N 31,29%

15) (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin-dihydrochlorid (9 · 2 HCl).

Nach der Vorhydrierung von 150 mg PtO₂ in 25 ml Trifluoressigsäure (22°) wurden 500 mg (2,11 mmol) L-Biopterin (5) zugegeben. Nach Aufnahme von 2 Mol Wasserstoff war die Hydrierung beendet. Anschliessend wurde unter Stickstoff vom Katalysator abfiltriert, die farblose Lösung auf 0°

gekühlt, mit einer kalten (0°) Lösung von 0,6 ml 1*N* HCl, 10 ml abs. Methanol und 80 ml abs. Aether versetzt, worauf $\underline{\text{9}} \cdot 2$ HCl ausfiel. Das Dihydrochlorid von $\underline{\text{9}}$ wurde in einem Handschuhkasten (Inertgas: N₂) abgenutscht, mit Aether gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 60° , 15 Std.): 643 mg (97%) $\underline{\text{9}} \cdot 2$ HCl.

¹H-NMR. (3*N* DCI) (Fig. 10): 4,60 - 4,00 (m, H-C(1'), H-C(2')), H-C(6) und 2H-C(7)); 1,84, 1,80 (2 d¹²), J = 5,5 und 6,0, 3H-C(3')).

(0,6*N* NaOD): 4,55 - 4,20 (m, H-(C2')); 4,15 - 3,45 (m, H-C(1'), H-C(6) und 2H-C(7)); 1,71, 1,67 (2 d¹²), J = 6,2 und 6,2, 3H-C(3')).

¹³C-PFT-NMR. (3*N* NaOD)¹³: 167,21, 166,67, C(4); 157,93, 157,78, C(2); 151,73, 151,29, C(8a); 101,68, 101,39, C(4a); 74,99, 74,65, C(1'); 68,86, 67,89, C(2'); 52,58, 51,86, C(6); 42,84, 42,49, C(7); 17,94, 16,93, C(3').

$\underline{\text{9}} \cdot 2$ HCl ist hygroskopisch und sehr gut in Wasser löslich (> 20 g/100 ml, 22°).

C₉H₁₅N₅O₃ · 2 HCl Ber. C 34,40 H 5,45 N 22,29 Cl 22,57% (31^b,17) Gef. C 34,09 H 5,19 N 22,20 Cl 22,75%

12) Die 2 d der Methylprotonen sind auf das Vorhandensein von Diastereomeren zurückzuführen.

13) Die Zuordnung der Signallagen der ¹³C-Atome erfolgte durch Vergleich der chemischen Verschiebungen in [60]. Aufgrund der deutlich unterscheidbaren Spektren der beiden Diastereomeren kann ihr Mischungsverhältnis von ca. 2:1 abgeschätzt werden.

16) Darstellung von (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin-dihydrochlorid (9 · 2 HCl) mit Natriumdithionit.

Im Handschuhkasten (Inertgas: N₂) wurden 50 mg (0,21 mmol) L-Biopterin ($\underline{\text{5}}$) mit 300 mg (1,72 mmol) Natriumdithionit in 3 ml Wasser aufgeschäumt und durch Zugabe von 3*N* NaOH gelöst. Diese Lösung wurde auf 70° erwärmt, wobei sich die Farbe von gelb über braun nach hellgelb änderte. Nach dem Abkühlen wurde das pH der Lösung mit 3*N* Essigsäure oder 3*N* Natronlauge auf 5,5, 6,5 oder 8 eingestellt. Anschliessend wurde so lange auf 70° gehalten, bis beim Abkühlen keine Fällung mehr entstand. Beim Anfangs-pH 5,5 musste 35 Min., beim pH 6,5 55 Min. und beim pH 8 90 Min. lang erwärmt werden. Die Lösung wurde zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 3 ml 12*N* HCl aufgenommen. Damit konnte von den ungelösten Salzen abgenutscht werden. Nach Zugabe von 40 ml Methanol und 300 ml Aether wurde das ausgefällte $\underline{\text{9}} \cdot 2$ HCl abgenutscht, mit Aether gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 60° , 15 Std.): 45 mg (34%) $\underline{\text{9}} \cdot 2$ HCl.

17) L-Sepiapterin-dihydrat (3 · 2 H₂O).

150 mg (0,48 mmol) 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin-dihydrochlorid ($\underline{\text{9}} \cdot 2$ HCl) wurden in 20 ml Natriumacetatpuffer¹⁴, pH = 4, gelöst und unter Luftzutritt während 6 Tagen stehen gelassen. Dabei wurde das Volumen und das pH der Lösung konstant gehalten, anschliessend zur Trockene eingengt, der Rückstand in 70 ml Wasser bei 60° gelöst und zur Chromatographie auf eine Cellulosesäule (Ø 4x35 cm) aufgetragen. Die erste Elution geschah mit 20 ml Wasser (60°). Nach dem

14) Für die Herstellung des Puffers wurden 2,4 g Natriumacetat (wasserfrei) in 200 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurde Eisessig bis pH = 4 (ca. 7 ml) zugegeben.

Erkalten der Säule wurde die Chromatographie mit reinem Wasser (22°) fortgesetzt. Die das L-Sepiapterin (3) enthaltende Fraktion wurde eingeengt und der Rückstand wieder in 40 ml Wasser (22°) gelöst. Die Lösung wurde auf die gleiche Säule gebracht und das L-Sepiapterin (3) mit Wasser erneut eluiert. Die das L-Sepiapterin (3) enthaltende Fraktion wurde zur Trockene eingeengt und bis zur Gewichtskonstanz an der Luft stehen gelassen. Ausbeute: 27 mg (21%) 3 · 2 H₂O. Umkristallisation aus Wasser (60°) ergab 20 mg (15%) 3 · 2 H₂O.

Das ¹H-PFT-NMR.-Spektrum des synthetischen L-Sepiapterins (3) in (CD₃)₂SO (Fig. 12) ist mit jenem des natürlichen Produktes identisch [6]: 10,74 (s, H-N(3)); 7,99 (s, H-N(8)); 7,35 (s, 2H-N(2')), 5,30 - 5,75 (m, H-O-C(2') und H-C(2')); 4,58 (s, 2H-C(7)); 1,66 (d, J = 6,4 Hz, 3H-C(3')).

$$[\alpha]_{D}^{25} = + 363 \pm 6^\circ \text{ (c = 0,4, 0,1N NaOH)}^{15}.$$

C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₃ · 2 H ₂ O	Ber. C 39,56 (273,25)	H 5,53 Gef. C 39,97	N 25,63% H 5,46	N 26,20%
---	--------------------------	------------------------	--------------------	----------

6. Zusammenfassung

Es wird eine neue regiospezifische Synthese von L-Biopterin beschrieben. Durch Kondensation von 2,3,4-Triacetyl-5-deoxy-L-arabinose-phenylhydrazone mit 6-Hydroxy-2,4,5-triamino-pyrimidin wird nach Oxydation des Tetrahydroderivates Diacetyl-biopterin erhalten, aus dem man nach Entacetylierung reines L-Biopterin in hoher Ausbeute erhält.

Die katalytische Reduktion des L-Bioptērins führt zur erwarteten Mischung von zwei diastereomeren Formen des 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterins. 7,8-Dihydro-L-biopterin wird in einem einfachen Verfahren durch Reduktion mit Natriumdithionit erhalten. Sepiapterin entsteht bei der Oxydation von (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin an der Luft in einem Puffer von pH 4. Um den Mechanismus der Sepiapterin-Bildung abzuklären, stellten wir 5,6-Dihydro-L-sepiapterin her, das aber nicht isoliert werden konnte. Bei pH < 7 ist das Tetrahydrobiopterin unter Licht und Sauerstoffausschluss beständig. Dagegen geht das 7,8-Dihydrobiopterin in verdünnter Essigsäure unter Stickstoff inter- und intramolekulare Redox-Reaktionen ein, welche zu Biopterin, 2'-Deoxybiopterin, 5,6-Dihydrodeoxysepiapterin und Deoxysepiapterin führen. Daraus wurden Synthesen für 2'-Deoxybiopterin, 5,6-Dihydro-deoxysepiapterin und Deoxysepiapterin abgeleitet.

15) Die Messung der optischen Drehung in NaOH-Lösung erwies sich als problematisch, da das L-Sepiapterin (3) langsam ein achirales Enolat bildet [6].

7. Literaturverzeichnis

- [1] E. Hadorn und H. Mitchell, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 37, 650 (1951).
- [2] H.S. Forrest und H. Mitchell, J. Am. Chem. Soc. 76, 5658 (1954).
- [3] J. Ziegler-Gründer und E. Hadorn, Zeitschr. Vererbungslehre 89, 235 (1958).
- [4] M. Viscontini und E. Moehlmann, Helv. 42, 836 (1959)
- [5] S. Nawa, Bull. Chem. Soc. Japan 33, 1555 (1960).
- [6] Y. Iwanami und M. Akino, J. Nutr. Sci. Vitaminol. 21, 143 (1975).
- [7] M. Viscontini, M. Schoeller, E. Loeser, P. Karrer und E. Hadorn, Helv. 38, 397 (1955).
- [8] E.L. Patterson, H.P. Broquist, A.M. Albrecht, M.H. v. Saltza und E.L.R. Stokstad, J. Am. Chem. Soc. 77, 3167 (1955).
- [9] H.S. Forrest und H.K. Mitchell, J. Am. Chem. Soc. 77, 4865 (1955).
- [10] M. Viscontini, E. Loeser, P. Karrer und E. Hadorn, Helv. 38, 2034 (1955).
- [11] M. Viscontini, E. Loeser und P. Karrer, Helv. 41, 440 (1958).
- [12] H. Rembold und L. Buschmann, Chem. Ber. 96, 1406 (1963).
- [13] M. Viscontini, M. Ponteau-Thonvenot, R. Bühler-Moor und M. Schroeder, Helv. 47, 1948 (1964).
M. Viscontini und R. Bühler-Moor, 51, 1548 (1968).
- [14] T. Fukushima und T. Shiota, J. Biol. Chem. 247, 4549 (1972).
- [15] S. Kaufman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 50, 1085 (1963).
- [16] S. Kaufman, J. Biol. Chem. 242, 3934 (1967).

- [17] M. Viscontini und A. Bobst, Helv. 48, 816 (1965).
- [18] M. Viscontini, Chemistry and Biology of Pteridines, Inter. Acad. Printing, Tokyo, 1970, S. 217 und die sich darin befindenden Literaturzitate.
- [19] S. Kaufman, Chemistry and Biology of Pteridines, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1975, S. 291.
- [20] wie [18] aber S. 225.
- [21] G.A. Jervis, J. Biol. Chem. 169, 651 (1947).
- [22] S. Udenfriend und S.P. Bessmann, J. Biol. Chem. 203, 961 (1953).
- [23] S. Kaufman, Science 128, 1507 (1958).
- [24] E. Buddecke, Grundriss der Biochemie, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1973, S. 76.
- [25] M. Viscontini und G. Mattern, Helv. 53, 832 (1970).
- [26] D.G. Grahame-Smith, Biochem. J. 105, 351 (1967).
- [27] W. Lovenberg, E. Jequier und A. Sjoerdsma, Science 155, 217 (1967).
- [28] O. Frank, H. Baker und H. Sobotka, Nature 197, 490 (1963).
- [29] H.N. Guttman, Pteridine Chemistry, Pergamon Press, 1964, S. 255.
- [30] H.S. Forrest, C. Van Baalen und J. Meyers, Arch. Biochem. Biophys. 78, 95 (1958).
- [31] F. Maclean, H.S. Forrest und J. Meyers, Arch. Biochem. Biophys. 114, 404 (1966).
- [32] H. Simon, F. Weygand, J. Walter, H. Wacker und K. Schmidt, Z. Naturforsch. 18b, 757 (1963).
- [33] O. Brenner-Holzach und F. Leuthardt, Z. physiol. Chem. 348, 605 (1967).
- [34] wie [18] aber S. 243.
- [35] T. Fukushima, Arch. Biochem. Biophys. 139, 361 (1970).
- [36] E.L. Patterson, R. Milstrey und E.L.R. Stokstad, J. Am. Chem. Soc. 78, 5868 (1956).
- [37] H.S. Forrest und J. Walter, J. Chem. Soc. 1949, 2077.

- [38] H. Rembold und H. Metzger, Chem. Ber. 96, 1395 (1963).
- [39] M. Viscontini und R. Provenzale, Helv. 51, 1495 (1968).
- [40] M. Viscontini, R. Provenzale, S. Ohlgart und J. Malle-vialle, Helv. 53, 1202 (1970).
- [41] M. Viscontini und R. Provenzale, Helv. 52, 1225 (1969).
- [42] K.J.M. Andrews, W.E. Barber und B.P. Tong, Chem. Comm. 1968, 120.
- [43] E.C. Taylor und P.A. Jacobi, J. Am. Chem. Soc. 98, 2301 (1976).
- [44] T. Sugimoto und S. Matsuura, Bull. Chem. Soc. Japan 48, 3767 (1975).
- [45] W. Pfleiderer, "Chemistry and Biology of Pteridines", Proc. of the 5th International Symposium, Walter de Gruyter, Berlin & New York, 1975, S. 11.
- [46] M. Viscontini und W.F. Frei, Helv. 55, 574 (1972).
- [47] B. Schircks, J.H. Bieri und M. Viscontini, Helv. 60, 211 (1977).
- [48] H. Zinner, K. Wessely und H. Kristen, Chem. Ber. 92, 1618 (1959).
- [49] P.M. Hardy, H.N. Rydon und R.C. Thompson, Tetrahedron Lett. 21, 2525 (1968).
- [50] S. Futterman, J. biol Chemistry 228, 1031 (1957).
- [51] T. Fukushima und M. Akino, Arch. Biochem. Biophys. 128, 1 (1968).
- [52] F.A. Cotton und G. Wilkinson, Anorganische Chemie, Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/Bergstr. (1970) S. 515.
- [53] B. Schircks, J.H. Bieri, M. Viscontini, Helv. im Druck.
- [54] wie [45] aber S. 941.
- [55] B.M. Watson, P. Schlesinger und R.G.H. Cotton, Clinica Chimica Acta, im Druck.
- [56] S. Katoh und M. Akino, Experientia 22, 793 (1966).

- [57] H.-J. Furrer, J.H. Bieri und M. Viscontini, Helv. im Druck.
- [58] H. Rembold und H. Metzger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 194 (1967).
- [59] A. Bobst und M. Viscontini, Helv. 49, 875 (1966).
- [60] B. Schircks, J.H. Bieri und M. Viscontini, Helv. 59, 248 (1976).
- [61] A.J. Pearson, Chemistry and Industry, 233 (1974).
- [62] H. Rembold, M. Metzger und W. Guttensohn, Biochim. Biophys. Acta 230, 117 (1971).
- [63] K. Sugiura und M. Goto, Bull. Chem. Soc. Japan 46, 939 (1973).
- [64] J. Schaub, H.-Ch. Curtius, A. Niederwieser, H. Bartholomé, M. Viscontini, B. Schircks und J.H. Bieri, Archives of Disease in Childhood, im Druck.