

Diss. ETH Nr. 9968

# **Über strukturelle Zusammenhänge zwischen Blausäure und natürlichen Purinen und Pteridinen**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
Klemens Eduard Koch  
Chim. dipl. der Université de Lausanne  
geboren am 19. Mai 1964  
von Uezwil AG

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. A. Eschenmoser, Referent  
Prof. Dr. C. Ganter, Korreferent

Zürich 1992

## ZUSAMMENFASSUNG

Angesichts der zentralen Stellung von (aus HCN ableitbaren) 5,6-Diaminopyrimidin-Bausteinen in der Struktur von natürlichen Purinen, Pteridinen und Flavinen wurde in dieser Arbeit die Frage nach der Existenz von elementaren synthetischen Zugängen zu partiell hydrolysierten Derivaten von Tetraaminopyrimidin und 2,6-Diaminopurin, sowie zu Folsäure- und Riboflavin-Vorstufen untersucht.

### Die Hydrolyse von Tetraaminopyrimidin und 2,6-Diaminopurin

Die hydroxidkatalysierte Hydrolyse (in Ergänzung dazu beschrieb Strupp [17] die säurekatalysierte) von Tetraaminopyrimidin ergab nach 20 Tagen entgast in Natronlauge 2M bei 125°C gemäss HPLC bei 5% Umsatz 1% an 2,5,6-Triaminopyrimidinon-4, 1.3% 4,5,6-Triaminopyrimidinon-2 und 0.5% Diaminouracil. Etwas leichter verliefen die analogen Hydrolysen von 2,5,6-Triaminopyrimidinon-4 und 4,5,6-Triaminopyrimidinon-2 zu Diaminouracil.

In Ergänzung zur bekannten [21] säurekatalysierten Hydrolyse von Diaminopurin isolierten wir bei der analogen von Isoguanin ebenfalls Xanthin in guter Ausbeute.

### Die Hydrolyse von HCN-Oligomeren

Das HCN-Trimere Aminomalonsäuredinitril ist ein zentrales Zwischenprodukt auf dem Weg zu natürlichen Pyrimidin-, Purin- und Pteridinstrukturen. So dokumentierte Trinks [14] seine Reaktion mit Guanidin zum Tetraaminopyrimidin. Aminomalonsäuredinitril ist thermisch nicht sehr stabil und äusserst reaktiv, insbesondere auch gegenüber seinem Ausgangsprodukt HCN, mit dem es zum Tetrameren Diaminomaleinsäuredinitril reagiert. Das Monoamid Aminomalonsäurenitrilamid ist bedeutend stabiler. Die Hydratisierung von Aminomalonsäuredinitril zu seinem Monoamid in neutraler Lösung ist jedoch bei Raumtemperatur weit langsamer als die Zersetzung. Nach unseren Untersuchungen sind aber verschiedene Aldehyde bei pH 8 wirksame Katalysatoren dieser Hydratisierung. Am effizientesten ist Formaldehyd, wovon 2 Äquivalente innert 10min die Hydratisie-

rung von Aminomalonsäuredinitril 20mM in wässriger Lösung bei pH 8 und RT zum Monoamid in 42% Ausbeute ( $^1\text{H-NMR}$ , nach Kristallisation 27%) bewirkten. Daneben entstand 20% Aldolisierungsprodukt Amino(hydroxymethyl)malonsäurenitrilamid. Dieses und sein Diamid Amino(hydroxymethyl)malonsäurediamid, sowie das stabile Endprodukt 5,5-Dicarbamoyloxazolidin konnten bei längeren Reaktionszeiten und zuletzt auch höheren Formaldehydkonzentrationen als kristalline Produkte isoliert werden. Aus 5,5-Dicarbamoyloxazolidin entstand durch Hydrolyse in Natronlauge bei RT und Decarboxylierung kristallin isoliertes DL-Serin in 80% Ausbeute.

Auch das HCN-Tetramer Diaminomaleinsäuredinitril konnte acetaldehyd-katalysiert bei pH 8 hydratisiert werden, allerdings bei längerer Reaktionszeit und kleinerer Ausbeute. Bei pH 7 und RT entstand nach 48h aus Diaminomaleinsäuredinitril mit Acetaldehyd ein Addukt, das aber bei der Kristallisation in siedendem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  in ein anderes Diastereomer überging, welches durch eine Röntgenstrukturanalyse als rac.-3,5-Diaza-7-oxa-2-carbamoyl-1-cyano-4,6,8-trimethylbicyclo[3.3.0]-2-octen (1SR, 4SR, 6RS, 8SR) erkannt wurde. Formaldehyd bewirkte eine Zersetzung von Diaminomaleinsäuredinitril bei pH-Werten von 5 bis 8.

Das HCN-Tetramer 5-Aminoimidazol-4-carbonsäurenitril wurde - mit Überschüssen von Formaldehyd katalysiert - bei pH 7 bis 10 und RT vollständig zum 5-Aminoimidazol-4-carbonsäureamid hydratisiert.

### **Kondensation von C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Vorläufern zu Pyrimidinen und Purinen**

Aminomalonsäurenitrilamid reagierte mit Guanidin in der Schmelze bei 40°C über 3h zum (potentiellen Folsäure-Vorläufer) 2,5,6-Triaminopyrimidinon-4 in 53% Ausbeute. Bei verschiedenen analogen Reaktionsbedingungen gab Harnstoff mit Aminomalonsäuredinitril, respektive Aminomalonsäurenitrilamid kein 4,5,6-Triaminopyrimidinon-2, respektive Diaminouracil.

In Ergänzung zu literaturbekannten ([14] [19] [20] [22] [59]) Zugängen zu partiell hydrolysierten 5,6-Diaminopurinstrukturen aus geeigneten Pyrimidin- oder Imidazolvorläufern untersuchten wir die Reaktion von Harnstoff mit 5-Aminoimidazol-4-carbonsäurenitril, respektive 5-Aminoimidazol-4-carbonsäureamid, welche in guten Ausbeuten Isoguanin, respektive Xanthin gab.

## Riboflavin und Folsäure

Im Bestreben, die komplexe Struktur des Riboflavins auf einfache HCN-abgeleitete Bausteine zurückzuführen, war es in unserem Laboratorium gelungen [17] im Anschluss an die Arbeiten von Wood [25] dafür einen beinahe durchgehenden potentiell präbiotischen Bildungsweg ausgehend von Aminomalonsäuredinitril und Guanidin zu finden. Als einzige Lücke blieb die reduktive Verknüpfung von Diaminouracil mit Ribose zum 6-Amino-5-ribitylaminouracil. Trotz intensiver Bemühungen konnte sie in dieser Arbeit nicht geschlossen werden.

Als Modellreaktion wurde versucht, aus 6-Amino-5-methylaminouracil und 4-Hydroxybenzaldehyd in einem thermischen Schritt das Chromophorsystem von F<sub>420</sub>, dem Riboflavinanalogon von Methanbakterien zu bilden. Die Ausgangsprodukte kondensierten in der Schmelze zum erwarteten Imin, welches aber nicht in die gesuchte Richtung weiterreagierte.

Für die Folsäure dagegen wurde ein durchgehend potentiell präbiotischer Bildungsweg gefunden, von Dunn [15] bis zur Azafolsäure, und von Peng [29] die Hydrolyse dieser Azaform zur Folsäure. 4-Aminobenzonitril kondensierte mit DL-Glycerinaldehyd bei 110°C unter Amadori-Umlagerung zum 1-(4-Cyanophenyl)-amino-3-hydroxy-2-propanon in 18% Ausbeute neben 31% Ausgangsprodukt und 12% anderen isolierten Produkten. Das Amadori-Produkt kondensierte weiter mit freiem Tetraaminopyrimidin in Acetonitril bei 65°C zur (mit authentischem Material identischer) Azafolsäure in 22% Ausbeute neben 8% anderen Pteridinen. Die Azafolsäure wurde in Kalilauge 0.5M bei 100°C in 60% Ausbeute zur (mit authentischem Material identischer) Folsäure hydrolysiert.

Die beschriebene Rückführung der Folsäure auf elementare Ausgangsstoffe mittels elementaren Reaktionen illustriert, dass auch die Folsäure eine elementare Struktur besitzt.

## SUMMARY

5,6-Diaminopyrimidine building blocks occupy a central position in the structure of natural purines, pteridines and flavines. This study examines elementary synthetic approaches to partially hydrolysed derivatives of tetraaminopyrimidine and 2,6-diaminopurine, as well as to precursors of folic acid and riboflavine.

### Hydrolysis of tetraaminopyrimidine and 2,6-diaminopurine

Hydroxide catalyzes tetraaminopyrimidine hydrolysis. After 20 days, tetraaminopyrimidine in degassed 2M sodium hydroxide at 125°C forms 1% of 2,5,6-triaminopyrimidinon-4, 1.3% of 4,5,6-triaminopyrimidinon-2 and 0.5% diaminouracil at 5% turnover by HPLC. The analogous hydrolysis of 2,5,6-triaminopyrimidinon-4 and 4,5,6-triaminopyrimidinon-2 to diaminouracil proceeded somewhat easier. Strupp [17] has described the complementary hydrolysis catalysed by acid.

The hydrolysis of diaminopurine to xanthine catalysed by acid is described in the literature [21]. We have shown that the analogous acid catalysed hydrolysis of isoguanine also gives xanthine in good yield.

### Hydrolysis of HCN-oligomers

The HCN-trimer aminomalonodinitrile is a central intermediate on the way to the structure of natural pyrimidines, purines and pteridines. Trinks [14] documented its reaction with guanidine to tetraaminopyrimidine. Aminomalonodinitrile is thermally unstable and highly reactive towards the starting product HCN. Aminomalonodinitrile reacts to form the tetramer diaminomaleinodinitrile. The monoamide aminomalononitrilamide is much more stable. The hydration of aminomalonodinitrile to its monoamide in neutral solution at room temperature is far slower than decomposition. According to our investigations, however, different aldehydes at pH 8 are effective catalysts for this hydration. Formaldehyde is the most powerful, whereof 2 equivalents effected in 10min the hydration of 20mM aminomalonodinitrile to the monoamide in 42% yield (<sup>1</sup>H-NMR, after crystallization 27%). The conditions used were aqueous solution, pH 8 and RT. The aldolisation product

amino(hydroxymethyl)malononitrilamide was also formed in 20% yield. Longer reaction times and higher formaldehyde concentrations provided the aldolisation product and its diamide amino(hydroxymethyl)malondiamide, as well as the stable final product 5,5-dicarbamoyloxazolidine in crystalline form. Crystalline DL-Serine in 80% yield has been isolated from sodium hydroxide catalysed hydrolysis of 5,5-dicarbamoyloxazolidine at RT followed by decarboxylation.

Acetaldehyde catalysis results in hydration of the HCN-tetramer diaminomaleinodinitrile at pH 8, although at longer reaction times and lower yields. Diaminomaleinodinitrile reacts with acetaldehyde at pH 7 and RT to provide an adduct. This compound is transformed during crystallization in boiling  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to another diastereomer, which has been identified by X-ray structure analysis as rac.-3,5-diaza-7-oxa-2-carbamoyl-1-cyano-4,6,8-trimethylbicyclo[3.3.0]-2-octene (1SR, 4SR, 6RS, 8SR). Diaminomaleinodinitrile decomposes in the presence of formaldehyde at pH 5 to 8.

The HCN-tetramer 5-aminoimidazol-4-carbonitrile has been hydrated completely to 5-aminoimidazol-4-carbonic acid amide using formaldehyde catalysis at pH 7 to 10 and RT.

### **Condensation of C<sub>3</sub>- and C<sub>4</sub>-precursors to pyrimidines and purines**

Aminomalononitrilamide can be reacted with guanidine over 3h in the melt at 40°C to 2,5,6-triaminopyrimidinon-4 (a potential precursor of folic acid) in 53% yield. Urea does not give the expected product 4,5,6-triaminopyrimidinon-2 with aminomalonodinitrile under analogous reaction conditions. Attempts to react urea with aminomalononitrilamide have not been successful in providing diaminouracil.

Approaches to structures of partially hydrolysed 5,6-diaminopurines from suitable pyrimidine or imidazole precursors are described in literature ([14] [19] [20] [22] [59]). We have supplemented these results by showing that isoguanine and xanthine can be prepared in good yield by the reaction of urea with 5-aminoimidazol-4-carbonitrile and 5-aminoimidazol-4-carbonic acid amide respectively.

## Riboflavine and folic acid

The research in our laboratory has also focused on elucidating pathways from simple HCN-derived residues to the complex structure of riboflavine. An almost uninterrupted potentially prebiotic pathway starting from aminomalonodinitrile and guanidine has been documented [17] based on the pioneering work of Wood [25]. The reductive coupling of diaminouracil with ribose to 6-amino-5-ribitylamouracil has not yet been realized despite intense efforts.

The formation of the chromophoric system of F<sub>420</sub> (the riboflavine analogue from methane producing bacteria) in one thermal step from 6-amino-5-methylamouracil and 4-hydroxybenzaldehyde has been tried as a model reaction. The starting products condensed to the expected imine, which however did not give the expected product.

A continuous potentially prebiotic pathway was found for folic acid. Dunn [15] documented a way to azafolic acid, and Peng [29] has hydrolysed this azaform to folic acid. 4-Aminobenzonitrile has been condensed [15] with DL-glyceraldehyde at 110°C and undergoes an Amadori rearrangement to give 1-(4-cyanophenyl)-amino-3-hydroxy-2-propanon. This product was isolated in 18% yield together with 31% starting material and 12% of other products. The Amadori product condensed further in acetonitrile at 65°C with free tetraaminopyrimidine to afford azafolic acid which was isolated in 22% yield together with 8% other pteridines. Hydrolysis of azafolic acid in 0.5M potassium hydroxide at 100°C provided folic acid (identical to authentic material) in 60% yield.

Folic acid is built up through the described sequence of elementary reactions from elementary starting products. Folic acid, therefore, is to be considered to have an elementary structure.