

Es wurden etwa 100 mg Glykosid in 100 ccm heißem dest. Wasser gelöst bzw. aufgeschlämmt. Nach Abkühlung wurden 100 mg Luizym und 1 ccm Toluol zugesetzt. Jetzt verblieb der Ansatz 6 Tage im Thermostaten bei 37°. Im Anschluß daran wurde i. Vak. auf 25 ccm eingeengt, mit 150 ccm Äthanol versetzt, kurz aufgekocht und heißfiltriert. Die blanke alkohol. Lösung wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand in 10 ccm dest. Wasser aufgenommen und je dreimal mit 25 ccm Chloroform und mit 25 ccm Chloroform + Äthanol (2:1), oder sechsmal mit 25 ccm Chloroform + Äthanol (2:1) ausgeschüttelt. Die Extrakte passierten drei Schütteltrichter mit je 3 ccm dest. Wasser. Die Extrakte sowie die vereinigten wäßr. Phasen wurden i. Vak. eingedampft. Aus den Rückständen der Extrakte wurden die Kristallisate gewonnen, während im Rückstand der wäßr. Phasen der Zucker durch Titration bestimmt wurde. Zur Titration ist hinzuzufügen, daß bei Einsatz von 100 mg Luizym unter den angegebenen Arbeitsbedingungen ein Zuckerblindwert von 8–10 mg einzusetzen ist.

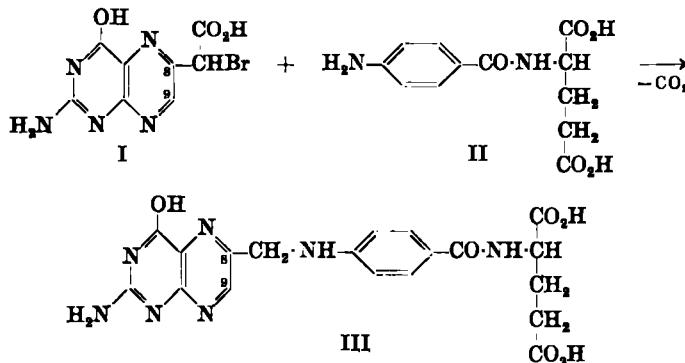
### 87. Rudolf Tschesche, Friedhelm Korte und Rudolf Petersen: Über Pteridine. III. Mitteil.\*): Zur Synthese der Pteroyl-glutaminsäure

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstitutes der Universität  
Hamburg]

(Eingegangen am 24. März 1951)

Es wird über eine mit verhältnismäßig guten Ausbeuten und reproduzierbar verlaufende Synthese der Pteroyl-glutaminsäure berichtet.

Bei der Synthese des Erythropterins<sup>1)</sup> war die leichte Austauschbarkeit des Broms im 6,8-Dioxy-2-amino-9-bromacetonyl-pteridin gegen OH und auch NH<sub>2</sub> aufgefallen. Da in der bromierten 6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure (I) das Brom ähnlich reaktionsfähig erschien, versuchten wir diese mit *p*'-Amino-benzoyl-glutaminsäure (II) zur Pteroyl-glutaminsäure (III) umzusetzen.



Gegenüber der Mehrzahl der bekannten Verfahren zur Synthese dieser Verbindung — durch gleichzeitigen Umsatz dreier Komponenten<sup>2,3)</sup> — kann bei dieser Reaktion keine Verbindung entstehen, welche die *p*-Amino-benzoyl-

<sup>\*)</sup> II. Mitteil.: B. 84, 485 [1951]. <sup>1)</sup> R. Tschesche u. F. Korte, B. 84, 77 [1951].

<sup>3)</sup> M. E. Hultquist, E. Kuh u. a., Journ. Amer. chem. Soc. 70, 23 [1948].

<sup>3</sup> R. B. Angier, E. L. R. Stokstad, J. H. Mowat u. B. L. Hutchings, Journ. Amer. chem. Soc. 70, 25 [1948]; J. H. Boothe, C. W. Waller, E. L. R. Stokstad u. B. L. Hutchings, Journ. Amer. chem. Soc. 70, 27 [1948].

glutaminsäure über die Methylenbrücke in 9-Stellung enthält. Die von F. Weygand, A. Wacker und V. Schmied-Kowarzik<sup>4)</sup> angegebene Druckhydrierung des 6-Oxy-2-amino-pteridinaldehyds-(8) in Gegenwart der *p*-Aminobenzoyl-glutaminsäure gibt wechselnde Ausbeuten (10–40%) an Pteroyl-glutaminsäure. Es erschien deshalb interessant zu prüfen, ob die Kondensation der bromierten 6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure befriedigende und gleichmäßige Ausbeuten gibt.

Dazu bromierten wir zunächst die von J. H. Mowat, J. H. Boothe u. a.<sup>5)</sup> dargestellte 6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure in Schwefelsäure-Eisessig zur 6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-bromessigsäure. Im Gegensatz zum 6,9-Dioxy-2-amino-8-brommethyl-pteridin ist diese in Eisessig löslich und muß durch Eingießen in absoluten Äther isoliert werden. Sie wurde unter verschiedenen Bedingungen mit *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure, bzw. deren Ester umgesetzt. Die Tafel zeigt einige dieser Reaktionsbedingungen.

Tafel. Umsetzung von 6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-bromessigsäure mit *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure und deren Ester

1 Mol. 6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-bromessigsäure kondensiert mit:	Lösungsmittel	HBr-Abspaltung durch:	Reaktionsdauer in Stdn.	Temperatur	% Gehalt des Rohprodukts an Pteroyl-glutaminsäure
2 Moll. PAG <sup>+</sup> )	Wasser	Kaliumcarbonat	12	18°	9, 10, 26
2 " "	Wasser	"	½	100°	3, 12
1½ " "	Methanol	"	12	18°	11
2 " PAG-Ester	Dioxan	Natriumacetat	12	18°	14
2 " " "	Glykol	—	12	18°	4
2 " " "	"	Quecksilber(II)-cyanid	12	18°	0
2 " " "	"	Natriumacetat	13	12 Stdn. bei 18° 1 Stde. bei 80°	31
2 " " "	"	"	½	110–120°	10
1½ " " "	"	"	12	18°	33–43 (12 Ansätze)
1½ " " "	"	"	12½	12 Stdn. bei 18° ½ Stde. bei 120 bis 150°	29

\*) PAG = *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure

Danach gelingt die Reaktion am besten in wasserfreiem Glykol bei Anwesenheit von Natriumacetat. Die Ausbeute beträgt im Rohprodukt reproduzierbar 35–45% Pteroyl-glutaminsäure und liegt damit beträchtlich über den Rohausbeuten der anderen Verfahren, soweit überhaupt quantitative Angaben gemacht sind<sup>6)</sup>. Lediglich S. Uyeo und

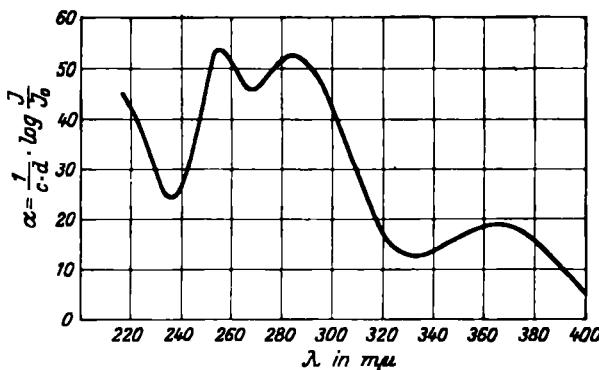
<sup>4)</sup> B. 82, 25 [1949]. <sup>5)</sup> Journ. Amer. chem. Soc. 70, 17 [1948].

<sup>6)</sup> So entstehen bei der Kondensation von 6-Oxy-2-amino-8-brommethyl-pteridin mit *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure nach Boothe, Waller u. Mitarb.<sup>3)</sup> 14.8% Pteroyl-glutaminsäure.

Mitarbb.<sup>7)</sup> beschreiben ein Verfahren, bei dem sie in Anwesenheit von Natriumhydrogen-sulfit bei der Kondensation in 37-proz. Ausbeute kristalline Pteroyl-glutaminsäure in 80-proz. Reinheit erhalten. Allerdings haben die Verfasser die Reinheit der Pteroyl-glutaminsäure nur chemisch bestimmt<sup>8)</sup>. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß auch nach diesem Verfahren z. Tl. das 9-Isomere gebildet wird.

Die Reindarstellung stieß zunächst auf Schwierigkeiten. Als Nebenprodukt ist im wesentlichen die 6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-oxyessigsäure zu erwarten. Das Verfahren von Weygand, Wacker und Schmied-Kowarzik<sup>4)</sup> – Auskochen des Rohproduktes mit Natriumacetat-Lösung – schlug in diesem Fall fehl. Ebenso führte die Reinigungsmethode analog der bei der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure<sup>9)</sup> angewandten nach Tschesche, Köhncke und Korte nicht zum Ziel. Es gelang jedoch durch Behandeln mit Calciumhydroxyd und nachfolgende Darstellung des Silbersalzes reine Pteroyl-glutaminsäure in Ausbeuten von mindestens 30% auf Pteridylessigsäure berechnet, zu erhalten. Bei der Aufarbeitung decarboxylierte die intermedial entstandene Carbonsäure.

Die Vorteile dieses Verfahrens liegen 1.) in dem höheren Pteroyl-glutaminsäuregehalt des Rohproduktes, 2.) in der Sicherheit, mit der die Kondensation ohne Isomermöglichkeit erfolgt (12 Ansätze gaben Werte zwischen 35 und 45%), 3.) in der einfachen Reinigung und 4.) in der leichten apparativen Durchführung. Im UV-Spektrum (Abbild.), im chemischen Verhalten und



Abbild. UV-Spektrum von Pteroyl-glutaminsäure

in der bakteriologischen Wirksamkeit gegenüber *Streptococcus faecalis* R und *Lactobacillus casei* zeigt die nach obigen Verfahren dargestellte Substanz keine Abweichung gegenüber authentischer Pteroyl-glutaminsäure.

Wir danken der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

<sup>7)</sup> S. Uyeo, S. Mizukami, T. Kubota u. S. Takagi, Journ. Amer. chem. Soc. **72**, 5339 [1950].

<sup>8)</sup> New and Nonofficial Remedies, J. B. Lippincot Company, New York, N. Y. 1948, 618. <sup>9)</sup> R. Tschesche, K. H. Köhncke u. F. Korte, B. **84**, 485 [1951].

### Beschreibung der Versuche

**6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-bromessigsäure (I):** Man löst in einer 50 ccm-Glasstopfenflasche 2.2 g 6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure in 15 ccm konz. Schwefelsäure und gibt unter Kühlung 15 ccm Eisessig zu. Nach Eintropfen von 0.52 ccm Brom bleibt das Reaktionsgemisch 2 Stdn. bei Zimmertemperatur stehen, wobei Bromwasserstoff-Dämpfe entweichen. Anschließend gießt man unter kräftigem Rühren in 200 ccm absol. Äther, wobei die Bromverbindung als farbloser voluminöser Niederschlag gewonnen wird. Nach dem Verdampfen des Äthers färbt sich das Bromprodukt schnell dunkel und verklebt. Eine Brombestimmung wurde in der Weise ausgeführt, daß eine bestimmte Menge Pteridylessigsäure bromiert und in Äther ausgefällt wurde. (Ausb. etwa 70% d.Th.).

$C_8H_8O_2N_3Br$  (300.1) Ber. Br 26.6 Gef. Br 22.8

Der Fehlbetrag erklärt sich aus der unvollständigen Ausfällung durch den Äther.

**Pteroyl-glutaminsäure (III):** 4.1 g *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure-diäthylester werden zusammen mit 6 g wasserfreiem Natriumacetat in 200 ccm wasserfreiem Glykol gelöst. Zu dieser Lösung gibt man die mit absol. Äther gewaschene 6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-bromessigsäure, die durch Bromieren von 2.2 g 6-Oxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure entsteht, und schüttelt 2 Stdn. bei Zimmertemperatur. Nach 12 Stdn. wird in 1 l heißes Wasser gegossen. Der  $p_H$ -Wert beträgt dann 3.5–4. Schon beim Eingießen decarboxyliert die Carbonsäure, nach 15 Min. bei 100° ist die Kohlendioxyd-Abspaltung — Probe mit Bariumhydroxyd-Lösung — abgeschlossen. Die Flüssigkeit mit dem braunen Niederschlag bleibt über Nacht im Kühlschrank und wird dann abgesaugt; Ausb. 2.9 g eines 35–45% Pteroyl-glutaminsäureester enthaltenden Produktes. Die Bestimmung erfolgt nach Spaltung mit Zinkstaub und Säure auf colorimetrischem Wege durch Diazotierung und Kupplung mit Thymol<sup>10)</sup>.

**Reinigung der Pteroyl-glutaminsäure:** Zur Verseifung des Esters wurde 1 g des Rohproduktes in 200 ccm Kalkwasser (bei 20° gesätt.) 1 Stde. bei 60° gerührt, von Kalksalzen abfiltriert und die Lösung dann über eine Säule (3 cm/10 cm) von Kieselgur filtriert. Auf der Säule schied sich ein dunkelbrauner Farbstoff ab, beim Nachwaschen mit Kalkwasser wanderte durch die Kieselgursäule ein gelber Ring. Dieser wurde aufgefangen und das Filtrat angesäuert. Der nach Stehen über Nacht bei 0° abgeschiedene hellgelbe Niederschlag hatte einen Pteroyl-glutaminsäure-Gehalt von 65%; es wurden so 450 mg erhalten.

450 mg eines Pteroyl-glutaminsäure enthaltenden Produktes löste man in 400 ccm heißem Wasser reingepulvert auf. Vom wenig Ungleisten wurde heiß abfiltriert und zu der 80° warmen Lösung eine ebenso warme Lösung von 0.25 g Silbernitrat in 20 ccm Wasser hinzugesetzt. Man filtrierte heiß ab und schwemmte den Niederschlag in Wasser auf. Das Silbersalz ließ sich durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zerlegen, der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mehrmals mit 0.1 n NaOH ausgezogen. Nach dem Ansäuern auf  $p_H$  3.5 erhielt man 260 mg Pteroyl-glutaminsäure in 90–100-proz. Reinheit. Aus dem Kalk, wie aus dem Silberniederschlag ließen sich noch kleinere Mengen Pteroyl-glutaminsäure isolieren.

$C_{19}H_{18}O_6N_7$  (441.4) Ber. C 51.70 H 4.34 N 22.21 Gef. C 51.83 H 4.29 N 21.25<sup>11)</sup>

<sup>10)</sup> Journ. Amer. med. Ass. 187, 367 [1948].

<sup>11)</sup> Die Analyse wurde von Hrn. Dr. Ing. A. Schoeller, Kronach, ausgeführt.