

Diacetyl-Verbindung: Die Darstellung erfolgt in der oben beschriebenen Weise. Aus Aceton-Wasser erhält man gelblichweiße Nadeln, die bei 87° sintern und bei 71–72° schmelzen.

$C_{24}H_{30}O_{10}N_4S_2$ (598.6) Ber. C 48.15 H 5.05 N 9.36 S 10.71
Gef. C 48.35 H 5.20 N 9.64 S 11.09

Azothiazol-(2.2')-diessigsäure-(4.4')-dicarbonsäure-(5.5')-tetraäthylester (II, R' = CH₂·CO₂C₂H₅, R'' = CO₂C₂H₅): 2g Hydrazothiazol-(2.2')-diessigsäure-(4.4')-dicarbonsäure-(5.5')-tetraäthylester werden mit 20 ccm verd. Salpetersäure erhitzt und der rote Niederschlag in heißem Aceton gelöst. Beim Hinzufügen von Wasser in der Hitze fallen rote, glitzernde Nadelchen aus, die bei 109–110° schmelzen.

$C_{20}H_{24}O_8N_4S_2$ (512.5) Ber. C 46.87 H 4.72 N 10.93 Gef. C 47.25 H 4.63 N 10.80

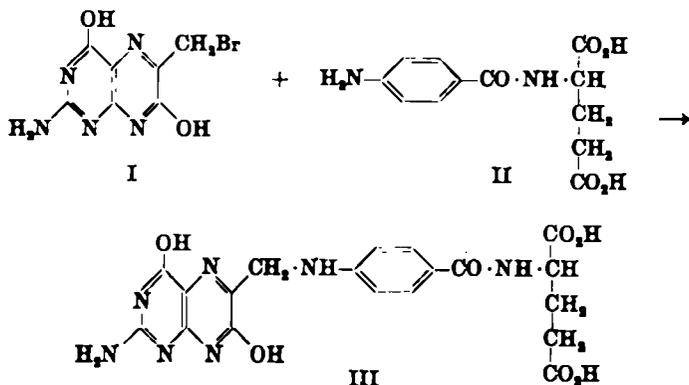
72. Rudolf Tschesche, Karl-Heinz Köhncke, Friedhelm Korte: Über Pteridine, II. Mitteil.: Die Synthese der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure

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

(Eingegangen am 28. Februar 1951)

Es wird über die Synthese und die Eigenschaften der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure berichtet.

Im vergangenen Jahr¹⁾ haben wir die Synthese der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure mitgeteilt, die möglicherweise als ein Zwischenprodukt der Bildung der Folsäure (folic acid) in Bakterien anzusehen ist. Damals hatten wir nur ein etwa 10-proz. Rohprodukt für die bakteriologischen Versuche zur Verfügung. In dieser Arbeit berichten wir nun über die Reindarstellung und die Eigenschaften der Verbindung. Dafür war zunächst die Kondensation des 6.9-Dioxy-2-amino-8-brommethyl-pteridins (I) mit *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure (II) so zu verbessern, daß die 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure (III) in guten und reproduzierbaren Ausbeuten entstand.



Anfangs versuchten wir die Kondensation bei pH 8–12, ohne jedoch zu brauchbaren Ergebnissen zu gelangen. Erst als wir die Reaktion bei pH 4.4

¹⁾ R. Tschesche, C. H. Köhncke u. F. Korte, *Ztschr. Naturforsch.* 5b, 132 [1950].

bis 4.9 durchführten, wurden die Ausbeuten befriedigend. Anscheinend hydrolysiert das Brom im alkalischen Medium zu schnell ab und tauscht nicht mit der *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure aus. Die nachfolgende Tafel gibt die Ausbeuten unter verschiedenen Kondensationsbedingungen wieder:

Tafel. Kondensation von 6.9-Dioxy-2-amino-8-brommethyl-pteridin mit *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure

1 Mol. 6.9-Dioxy-2-amino-8-brommethyl-pteridin, kondensiert mit 1 Mol.:	Lösungsmittel	pH	Temp.	t Min.	Geh. des Rohprodukts an 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure i. %
1. PABGS*)	Wasser	8; 9; 10; 11	25°	60—180	4—20
2. PABGS-Methylester	Glykol	8; 9; 10; 11	25°	60—180	4—15
3. PABGS-Methylester	Glykol	8; 9; 10; 11	140°	60	8
4. PABGS-Methylester	Glykol	4.4—4.9	140°	60	25—30
5. PABGS	Wasser	4.4—4.9	25°	300	30—35
6. PABGS-Methylester	Methanol-Wasser 1:1	4.4—4.9	25°	300	30—35

*) PABGS = *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure

Danach läßt sich das Verfahren bei einem pH = 4.4—4.9 in Wasser, Alkohol-Wasser oder Glykol bei 25° oder 140° mit etwa gleichen und einigermaßen brauchbaren Ausbeuten durchführen. Wegen der leichteren Reindarstellung des *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure-diäthylesters haben wir später vorwiegend nach den Verfahren 5 und 6 gearbeitet.

Auch durch die Hydrierung des 6.9-Dioxy-2-amino-pteridin-aldehyds-(8) mit *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure unter Druck, analog dem Verfahren von F. Weygand, A. Wacker u. V. Schmied-Kowarzik²⁾ gelang es, wie die mikrobiologische Prüfung zeigte, die 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure herzustellen. Jedoch enthielt das Rohprodukt nur etwa 20% der gesuchten Verbindung*).

Wir hielten daher an dem zuerst erwähnten Reaktionsweg fest, da das in guter Ausbeute und Reinheit entstehende 6.9-Dioxy-2-amino-8-brommethyl-pteridin als Ausgangssubstanz am geeignetsten erschien. Zur Kontrolle der Versuche bestimmten wir, wie bereits angegeben¹⁾, die gebundene *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure auf colorimetrischem Wege durch Diazotierung und Kupplung mit Thymol nach Spaltung der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure in saurer Lösung mit Zinkstaub.

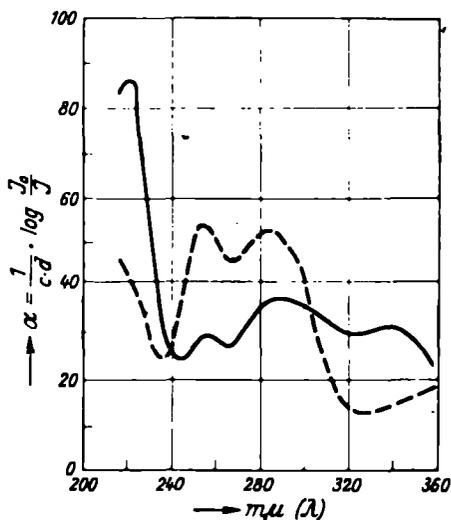
Die Reinigung erwies sich anfangs als schwierig, da die zur Isolierung der Pteroyl-glutaminsäure bekannten Verfahren — Bildung von Schwermetallsalzen, Adsorption, Behandlung mit Ionenaustauschern — keine guten Ergebnisse brachten. Schließlich fanden wir in dem Ausziehen der Rohprodukte mit gesättigter Calciumhydroxyd-Lösung ein genügendes Verfahren zur Anreicherung. Rührt man ein 30% 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure enthaltendes Produkt bei etwa 60° 30 Min. mit Kalkwasser und filtriert heiß ab, so läßt

²⁾ B. 82, 25 [1949].

*) Anmerkung b. d. Korrektur (17. 5. 1951): Inzwischen stellten wir fest, daß hierbei auch Aktivität b. *Leuconostoc citrovorum* auftritt, so daß möglicherweise ein Gemisch verschiedener Wirkstoffe entsteht.

sich aus dem Filtrat nach Ansäuern auf $pH = 3-4$ ein Niederschlag erhalten, der eine Anreicherung der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure auf 60–70% aufweist. Eine Wiederholung des Verfahrens gibt oft schon ein 90-proz. Produkt, das sich aus Wasser umkristallisieren läßt. Eine vollständig durchkristallisierte Substanz ist allerdings nur nach häufigem Umkristallisieren aus Wasser zu erhalten.

Die Abbild. 1 zeigt ein Kristallbild der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure, die Abbild. 2 ihr UV-Spektrum.



Abbild. 1. Kristalle von 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure, 140fache Vergrößerung

Abbild. 2. UV-Spektren von 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure ——— und Pteroyl-glutaminsäure - - - - -, gemessen in $n_{20} NaOH$ mit dem Beckman-UV-Spektrophotometer

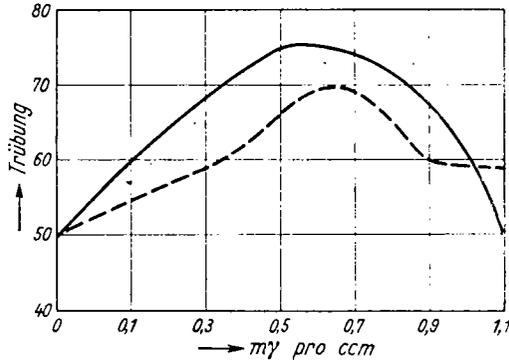
Die 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure ist in Wasser schwerer löslich als die Pteroyl-glutaminsäure; sie löst sich bei 100° in Wasser zu 200 mg/l, während die Löslichkeit der letzteren³⁾ ungefähr 1 g/l bei 100° (0.0016 mg/ccm bei 25°) beträgt. Die Farbe der Oxy-Verbindung ist blasser gelb als die der Pteroylglutaminsäure. Die Einführung der OH-Gruppe in 9-Stellung bewirkt also in Farbe und Löslichkeit eine Verschiebung zum Isoxanthopterin-Typ. Die 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure wird durch Licht wie Pteroyl-glutaminsäure zersetzt. Löst man 200 mg reine 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure in 1 l Wasser bei 100° und läßt 7 Tage bei 0° am Tageslicht stehen, so enthält der Niederschlag nach Ansäuern auf pH 3 nur noch 30% der ursprünglichen Verbindung; der Rest ist zersetzt.

Die Wachstumswirkung der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure ist im Difco-Nährmedium⁴⁾ bei *Streptococcus faecalis* R ungefähr die gleiche wie die der 9-Desoxy-Verbindung (Abbild. 3). Dagegen zeigt sie bei *Lactobacillus casei* bis zu 0.01 γ /ccm keinen Effekt. Dieser Befund geht mit der Unwirksamkeit des 6.9-Dioxy-2-amino-pteridinaldehyds-(8) bei diesem Bakterium parallel. Auch bei *Leuc. citrovorum* ist bis zu 0.01 γ /ccm keine Wachstumswirkung von

³⁾ B. L. Hutchings u. Mitarbb., Journ. Amer. chem. Soc. 70, 1 [1948].

⁴⁾ Difco-Laboratories, Detroit I, Michigan.

Oxypteroyl-glutaminsäure festzustellen⁵⁾. Tierversuche mit der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure sind im (Gange*).



Abbild. 3. Wachstumskurven von *Streptococcus faecalis* R i. Ggw. von Pteroyl-glutaminsäure ——— und 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure - - - -

Wir danken der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft für die Gewährung eines Forschungs-Stipendiums an den einen von uns (Köhncke) und für weitere finanzielle Unterstützung.

Beschreibung der Versuche

6.9-Dioxy-2-amino-8-methyl-pteridin: 40 g 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidin-sulfat, 30 g wasserfreies Natriumacetat und 40 g Oxaleessigester werden in 400 ccm wasserfreiem Eisessig unter öfterem Umschütteln 1 Stde. auf dem siedenden Wasserbad erwärmt. Dabei scheidet sich die Pteridinessigsäure als eine gelbe Substanz ab. Nach Zugabe von 400 ccm Wasser hält man weitere 30 Min. auf 100°. Die Säure wird noch heiß abgesaugt, mit Wasser gewaschen und in 1 l siedender 10-proz. Natronlauge aufgenommen. Nach kurzem Kochen mit Kohle wird die siedende alkal. Lösung der Pteridinverbindung in siedende verd. Salzsäure (2 l) gegossen. Die Substanz fällt in farblosen Flocken aus, die nach dem Abkühlen abfiltriert, mit Methanol gewaschen und im Trockenschrank bei 100° getrocknet werden. Man erhält so ein Gemisch von Methylpteridin und Pteridinessigsäure, das man noch so lange in einem Kaliumhydrogensulfat-Bad in einem Stickstoffstrom auf 280° erhitzt, bis keine Kohlensäure mehr entwickelt wird. Die Methylpteridinverbindung kann ohne weiteres zur Brommethylverbindung verarbeitet werden.

6.9-Dioxy-2-amino-8-brommethyl-pteridin(I): Die Lösung von 15 g der beschriebenen Methylpteridinverbindung in 100 ccm konz. Schwefelsäure wird in 400 ccm wasserfreien Eisessig gegossen. Nach Umschütteln wird die dunkel gefärbte Lösung, aus der bisweilen das Sulfat nach einigen Minuten ausfallen kann, mit 4 ccm wasserfreiem Brom versetzt und sofort auf dem Babo-Trichter zum Sieden erhitzt (Rückflußkühler und Calciumchlorid-Rohr). Bevor der Eisessig zum Sieden gekommen ist, ist die Bromverbindung bereits als weißes Kristallmehl quantitativ ausgefallen. Nach dem Abkühlen wird sie auf einer Nutsche (12 cm Ø) abgesaugt und mit Eisessig gewaschen. Nach dem Waschen mit 500 ccm Methanol erhält man 21–22 g farblose Bromverbindung I.

⁵⁾ Wir danken Hrn. Prof. F. Weygand-Heidelberg für die Prüfung unserer 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure bei *Leuc. citrovorum*, wodurch unabhängig von uns diese Beobachtung bestätigt wird.

^{*} Anmerkung b. d. Korrektur (17. 5. 1951): Herr Dr. K. Junkmann, Schering A.G., Berlin, stellte fest, daß sie etwa $\frac{1}{13}$ der Wirksamkeit wie Pteroyl-glutaminsäure auf die Retikulozytose bei erwachsenen männlichen Ratten hat.

p-Nitro-benzoyl-*l*(+)-glutaminsäure: Zu einer Lösung von 158 g Glutaminsäure-hydrochlorid (Schmp. 206°) in 850 ccm Wasser und 120 g Natriumhydroxyd werden unter Rühren und Kühlen durch fließendes Wasser innerhalb von 60 Min. 200 g *p*-Nitro-benzoylchlorid zugegeben. Gleichzeitig werden in kleinen Anteilen 850 ccm 2*n* NaOH (68 g NaOH in 810 ccm Wasser gelöst) hinzugefügt, wobei die Temperatur nicht über 15° steigen darf. Die Lösung bleibt dabei stark alkalisch. Nachdem noch 60 Min. gerührt worden ist, wird — ebenfalls unter Rühren — so viel konz. Schwefelsäure zugegeben (180–200 ccm), daß ein pH 4.0 erreicht wird. Die ausgeschiedene *p*-Nitro-benzoesäure (etwa 50 g) wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und das Filtrat langsam auf pH 1.5 gebracht. Es bildet sich ein geringer ölgiger Niederschlag, der bei einigem Stehen mit der Hauptmenge der ausfallenden *p*-Nitro-benzoyl-glutaminsäure erstarrt. Schmp. nach dem Trocknen im Exsiccator 112–115°; Ausb. 230 g.

p-Amino-benzoyl-glutaminsäure-diäthylester: 60 g *p*-Nitro-benzoyl-glutaminsäure werden in 500 ccm Wasser mit Hilfe von Natronlauge gelöst, die Lösung auf pH 5.5 eingestellt und dann bei Zimmertemperatur mit Raney-Nickel hydriert. Die Wasserstoffaufnahme beträgt etwa 10 l, die Dauer der Hydrierung 3–5 Stdn. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wird durch Einstellen von pH 3.0 die *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure(II) in Freiheit gesetzt und die Lösung i. Vak. zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird darauf mit 500 ccm 96-proz. Alkohol, der mit Chlorwasserstoff gesättigt ist, übergossen und stehen gelassen. Nach 2 Tagen und häufigem Umschütteln wird der Alkohol i. Vak. abgedampft, der Rückstand mit Wasser übergossen, und ein unlösliches Nebenprodukt abgesaugt. Der *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure-diäthylester wird aus seinem wasserlöslichen Hydrochlorid durch Neutralisieren mit Ammoniak bei pH 8 unter Kühlung mit Eis in Freiheit gesetzt. Man erhält weiße Kristalle, die abgesaugt und getrocknet werden. Schmp. 136°; Ausb. 28–36 g.

9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure (III): 1.) 33.5 g *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure-diäthylester werden in 2 l wasserfreiem Glykol auf 140° erhitzt, wobei die Lösung mit so viel Natriumacetat versetzt wird, daß beim Verdünnen mit einem gleichen Volumen Wasser ein pH von 4.5 erreicht wird. Es werden dann 27.2 g 6.9-Dioxy-2-amino-8-brommethyl-pteridin in möglichst feiner Form eingetragen. Dabei hält man den pH -Wert zwischen 4.4 und 4.9. Man erhitzt 40 Min. unter kräftigem Rühren auf 140°, läßt abkühlen und gießt die rote Lösung in 2 l Wasser. Es wird über Nacht stehen gelassen, die braunen Flocken werden abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Anschließend verseift man den gebildeten Ester durch Rühren (etwa 4 Stdn.) mit der ber. Menge Natronlauge, oder durch Stehen über Nacht in 0.1*n* NaOH. Nach dem Ansäuern und Waschen mit Methanol erhält man 25 g, die 25–30 % 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure enthalten.

2.) 26.7 g *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure werden in 2 l Wasser bei pH 4.5 gelöst und unter Rühren 27.2 g 6.9-Dioxy-2-amino-8-brommethyl-pteridin in möglichst feiner Form eingetragen. Man hält den pH -Wert zwischen 4.4 und 4.9 und rührt bei 25° 5 Stunden. Anschließend wird die Fällung abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Ausb. 30–35 g; Gehalt an 9-Oxy-pteroylglutaminsäure 30–35%.

3.) Man löst 33.5 g *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure-diäthylester in 1 l wäbr. Methanol (1 : 1), hält den pH -Wert zwischen 4.4 und 4.9 und trägt 27.2 g 6.9-Dioxy-2-amino-8-brommethyl-pteridin bei 25° möglichst fein ein. Nach 5stdg. Rühren wird der Niederschlag abfiltriert und zur Verseifung 4 Stdn. mit der ber. Menge Natronlauge gerührt. Bei pH 3–4 fällt ein Niederschlag aus, der abzentrifugiert wird. Ausb. 30–35 g; Gehalt an 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure 30–35%.

4.) 5 g 6.9-Dioxy-2-amino-pteridin-aldehyd-(8) werden mit 10 g *p*-Amino-benzoyl-*l*-glutaminsäure, 3 g Natriumhydrogencarbonat und 20 g Natriumacetat in 2 l 70-proz. Alkohol unter Zusatz von 1 g Raney-Nickel 1 Stde. bei 120–130° unter 20 Atü Wasserstoff geschüttelt. Nach dem Abkühlen wird auf pH 3 gebracht und die ausgefallene Substanz durch Umfällen aus Natronlauge gereinigt. Es wurden so 5 g eines 20-proz. Produktes gewonnen.

Reinigung: Man rührt 15 g eines 30% 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure enthaltenden Produktes dreimal mit je 2 l gesätt. Kalkwasser je 30 Min. bei 60°, filtriert vom

Ungelöstes und säuert die Filtrate auf pH 3–4 an. So erhält man 4–5 g einer Fällung die 60–70% 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure enthält.

Der unlösliche Rückstand der Kalkwasserextraktion wird mit Salzsäure bei pH 3 in die freie Säure übergeführt, wobei man 7–9 g erhält, in denen noch 12–15% 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure enthalten sind.

Wenn man 7 g dieses 12–15% 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure enthaltenden Materials aufs neue mit je 2 l Kalkwasser je 30 Min. bei 60° rührt, so lassen sich aus dem Filtrat noch einmal 500–700 mg 60-proz. 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure isolieren.

Durch Wiederholung des angeführten Verfahrens lassen sich aus 6 g eines nunmehr 60–70-proz. Rohproduktes durch dreimaliges Behandeln mit je 2 l Kalkwasser 2,5 g eines in der Regel 90–100-proz. Materials isolieren. Aus dem Kalkrückstand gewinnt man noch 2,5 g 23-proz. 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure. Es werden so verhältnismäßig leicht mehr als 50% der im Rohpräparat enthaltenen 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure als Reinsubstanz gefaßt. Die Verbindung ist gelb, aus Wasser bei pH 4 umkristallisierbar. Sie zeigt keinen Schmelzpunkt. Zur Analyse wurde der Dimethylester der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure entsprechend den Angaben bei der Bildung des Pteroyl-glutaminsäureesters³⁾ dargestellt.

$C_{21}H_{22}N_7O_7$ (497.5) Ber. C 53.11 H 4.64 N 19.71 Gef. C 52.62 H 5.12 N 19.93

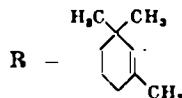
73. Ferdinand Bohlmann: Konstitution und Lichtabsorption, I. Mitteil.: Carbonyl-Derivate*)

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule Braunschweig] (Eingegangen am 29. Januar 1951)

Es wurden die Absorptionsspektren einer größeren Zahl von Carbonyl-Derivaten untersucht. Die allgemein beobachtete Verschiebung der Lichtabsorption ins Langwellige gegenüber der bei den Carbonyl-Ausgangsverbindungen wird dem freien Elektronenpaar der NH-Gruppe zugeschrieben.

Zur Charakterisierung von Carbonyl-Verbindungen sind eine Reihe von stickstoffhaltigen Substanzen im Gebrauch, die sich praktisch alle vom Hydrazin ableiten. Eine Ausnahme bilden nur die Oxime. Alle diese Verbindungen geben mit Carbonyl-Verbindungen Derivate, die sich durch charakteristische Spektren auszeichnen. In der Literatur sind bereits eine große Zahl derartiger Absorptionsspektren beschrieben¹⁻⁷⁾. Bei diesen Spektren ist

*) In dieser Arbeit werden die in der Carotinoid-Chemie üblichen Namen benutzt. Es bedeutet:



1) L. K. Evans u. A. E. Gillam, Journ. chem. Soc. London 1948, 565.

2) E. A. Braude u. E. R. H. Jones, Journ. chem. Soc. London 1945, 498.

3) J. D. Roberts u. Ch. Green, Journ. Amer. chem. Soc. 68, 214 [1946]

4) A. E. Gillam u. D. Moss, Journ. chem. Soc. London 1947, 1387.

5) A. Burawoy, Journ. chem. Soc. London 1941, 20.

6) E. A. Braude, E. Jones, H. Koch, R. Richardson, F. Sondheimer u. J. Toogood, Journ. chem. Soc. London 1949, 1890.

7) J. Meisenheimer, A. 502, 156 [1933].