

reinen Stickstoffs durch das Gefäß geleitet wurde, um die Luftkohlendensäure auszuschließen. Wenn sich die Arbeitstemperatur in der Lauge eingestellt hatte, wurde die notwendige Menge vorgewärmten Formaldehyds (30-proz., käufliches Formalin) auf einmal zugegeben, die Lösungen durch einen verstärkten Stickstoffstrom gut vermischt und sofort eine Probe von 10.0 ccm entnommen.

Durch Eingießen in eine abgemessene Menge $n/_{10}$ HNO_3 wurde die Umsetzung abgebrochen, der Laugengehalt durch Rücktitration der noch unverbrauchten Salpetersäure festgestellt und in der gleichen Probe der Gehalt an Formaldehyd durch merkurimetrische Titration bestimmt.

Gelegentlich wurde die Aldehydtitration etwas dadurch gestört, daß in dem Kondensationsprodukt Stoffe auftraten, die Hg(II) -Salze zu Hg(I) -Verbindungen reduzierten. Der verursachte Fehler war jedoch nicht größer als 1.5% der eingemessenen Formaldehydmenge.

53. Friedrich Weygand und Gerhard Schaefer; Synthese von Pteroyl-*l*-glutaminsäure-[11- ^{14}C] (Folinsäure-[11- ^{14}C])

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg]

(Eingegangen am 21. Dezember 1951)

Bei der Kondensation von 2,3-Dibrom-propionaldehyd (Acrolein-dibromid) mit 6-Oxy-2,4,5-triamino-pyrimidin und *p*-Amino-benzoyl-*l*-glutaminsäure zu Folinsäure liefert die CH_2Br -Gruppe des Acrolein-dibromids die Methylenbrücke, wie sich durch Verwendung von 2,3-Dibrom-propionaldehyd-[3- ^{14}C] und Abbau der erhaltenen ^{14}C -Folinsäure ergab.

Bei der ersten bekannt gewordenen Folinsäure-Synthese^{1,2)}, die auch heute noch die technisch bedeutungsvollste ist, wird 2,3-Dibrom-propionaldehyd mit 6-Oxy-2,4,5-triamino-pyrimidin (IV) und *p*-Amino-benzoyl-*l*-glutaminsäure (III) kondensiert. Es war bisher nicht bekannt, ob bei dieser Kondensation, die am besten im „Eintopfverfahren“³⁾ durchgeführt wird, die Aldehydgruppe oder die CH_2Br -Gruppe des Acroleindibromids die Methylenbrücke zwischen dem Pteridinring und dem *p*-Amino-benzoyl-*l*-glutaminsäure-Rest liefert.

Zur Klärung dieser Frage durch Verwendung von ^{14}C war es notwendig, ein ^{14}C -Acroleindibromid herzustellen, in dem entweder C^1 oder C^3 markiert war. Im Hinblick auf die leichte Zugänglichkeit von Acrolein durch Kondensation von Formaldehyd mit Acetaldehyd nach dem von H. Schulz und H. Wagner⁴⁾ angegebenen Verfahren entschlossen wir uns, C^3 zu markieren und dementsprechend H_2^{14}CO mit $\text{H}_3\text{C}\cdot\text{CHO}$ zu Acrolein-[3- ^{14}C] zu kondensieren.

H_2^{14}CO ist aus $\text{H}_3^{14}\text{C}\cdot\text{OH}$ schon öfters dargestellt worden (Ausbeuten 50–70% d.Th.)⁵⁾. Unter Einhaltung genauer Versuchsbedingungen (vergl.

¹⁾ R. B. Angier, J. H. Boothe, B. L. Hutchings, J. H. Mowat, J. Semb, E. L. R. Stokstad, Y. SubbaRow u. C. W. Waller, *Science* **103**, 667 [1946].

²⁾ C. W. Waller, B. L. Hutchings, J. H. Mowat, E. L. R. Stokstad, J. H. Boothe, R. B. Angier, J. Semb, Y. SubbaRow, D. B. Cosulich, M. J. Fahrenbach, M. E. Hultquist, E. Kuh, E. H. Northey, D. R. Seeger, J. P. Sickels u. J. M. Smith jr., *Journ. Amer. chem. Soc.* **70**, 19 [1948].

³⁾ III u. IV vorgelegt und Acroleindibromid zugefügt. ⁴⁾ *Angew. Chem.* **62**, 105 [1950].

⁵⁾ A. R. Jones u. W. J. Skraba, *Science* **110**, 332 [1949]. C. Heidelberger, *Journ. biol. Chem.* **179**, 139 [1949]. H. R. V. Arnstein, *Nature (London)* **164**, 361 [1949].

Versuchsteil) konnte diese Reaktion bei Verwendung von 6 ccm Methanol mit einer Aktivität von 1 mC in 86-proz. Ausbeute durchgeführt werden.

Die Kondensation von $H_2^{14}CO$ mit Acetaldehyd führten wir mit dem auch technisch verwendeten Katalysator (Natriumsilicat auf SiO_2) durch und erhielten bei einem Durchsatz durch die Apparatur (vergl. Versuchsteil) 39% d.Th. an Acrolein-[3- ^{14}C] (I). Um Verluste an radioaktivem Acrolein zu vermeiden, die bei einer Abtrennung von nicht umgesetztem Formaldehyd und Acetaldehyd durch Destillation unvermeidlich gewesen wären, wurde das Reaktionsgemisch direkt bromiert. Bei der nachfolgenden Kondensation des so erhaltenen 2,3-Dibrom-propionaldehyds-[3- ^{14}C] (II) mit III und IV stören, wie Vorversuche mit nichtradioaktivem Material zeigten, der noch vorhandene Formaldehyd und Acetaldehyd nicht. Um eine möglichst hohe Ausbeute an Folin säure, bezogen auf II zu erhalten, wurden auf 1 Mol. II je 2 Moll. III und IV verwendet. Die ^{14}C -Folin säure (V) wurde so in 11-proz. Ausbeute, ber. auf I, bzw. in 3.7-proz. Ausbeute, ber. auf das ursprüngliche eingesetzte radioaktive Methanol, in reiner, kristallisierter Form erhalten.

Um die Stellung des ^{14}C -Atoms in der radioaktiven Folin säure zu ermitteln, wurde sie zunächst in bekannter Weise⁶⁾ mit Permanganat zur 6-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure-(8) (VI) oxydiert, die durch Erhitzen auf 250–290°⁶⁾ zu 6-Oxy-2-amino-pteridin (VII) decarboxyliert wurde. Das dabei abgespaltene Kohlendioxyd wurde in Bariumcarbonat übergeführt und in dieser Form der radioaktiven Messung unterworfen.

Tafel 1. Ergebnisse der radioaktiven Messungen
(extrapoliert auf die Schichtdicke 0 mg/cm²; Zählrohr mit 4 mg/cm² Glimmerfolie)

Verbindung	Impulse/Min./ mg/cm ²	Mol.-Gew.	Impulse/Min./ Millimol/cm ²
Folin säure + 2 H ₂ O	1050	477	502000
6-Oxy-2-amino-pteridin-carbon- säure-(8) + 0.5 H ₂ O	2300	216	497000
BaCO ₃	2500	197	493000

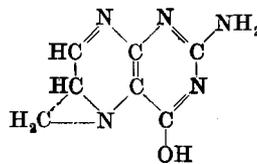
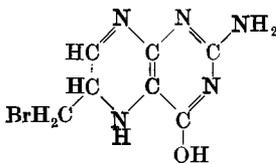
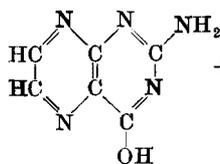
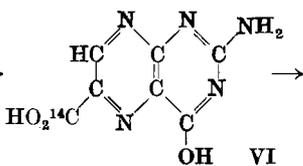
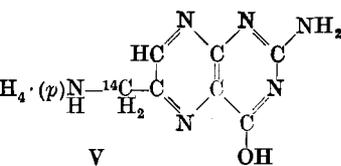
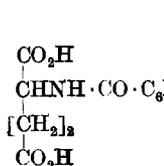
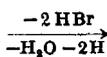
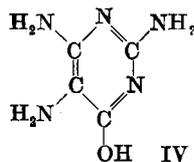
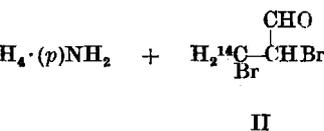
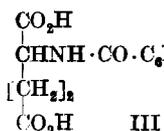
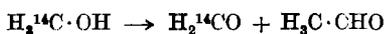
In der Tafel 1 sind die Ergebnisse der radioaktiven Messungen an Folin säure, 6-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure-(8) und am Bariumcarbonat aufgeführt. Man erkennt, daß die Zahl der Impulse pro Millimol für alle drei Verbindungen praktisch gleich ist.

Danach muß das bei der Decarboxylierung gebildete 6-Oxy-2-amino-pteridin (VII) frei von Radioaktivität sein, was sich nicht ohne weiteres zeigen ließ, denn die Decarboxylierung erfolgte nur zu etwa 60%. Daß VII tatsächlich frei von ^{14}C ist, ergab sich nach papierchromatographischer Auftrennung einer Probe des Decarboxylierungs-Rückstandes (vergl. Tafel 2).

⁶⁾ E. L. R. Stokstad, B. L. Hutchings, J. H. Mowat, J. H. Boothe, C. W. Waller, R. B. Angier, J. Semb, u. Y. Subbarow, Journ. Amer. chem. Soc. 70, 5 [1948].

Tafel 2. Ergebnisse der radioaktiven Messungen am Decarboxylierungs-Rückstand nach papierchromatographischer Trennung

	Meßzeit	Gesamtimpulse	Imp./Min.	Imp./Min. nach Abzug des Nulleffektes
Nulleffekt	30 Min.	417	14	0
6-Oxy-2-amino-pteridin	30 Min.	396	13	0
6-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure-(8)	30 Min.	3275	109	96



Somit steht einwandfrei fest, daß entsprechend den obenstehenden Formelbildern die CH₂Br-Gruppe des Acroleindibromids die Methylenebrücke in der Folinsäure liefert.

Bezüglich des Reaktionsverlaufes, der dazu führt, daß das 3-ständige C-Atom des Acroleindibromids die Methylenebrücke liefert, lassen sich folgende Annahmen machen: Acroleindibromid geht in der auf pH 4 gepufferten Lösung zunächst in α-Brom-acrolein (H₂C:CBBr·CHO) über. Dieses addiert sich am III zu -C₆H₄·NH·CH₂·CHBr·CHO, das dann mit IV Ringschluß zu Dihydrofolinsäure eingeht. Schließlich erfolgt Dehydrierung zu Folinsäure. Für diese Annahme sprechen die Angaben eines Patentes von Parke, Davis & Co.⁷⁾, wonach α-Chlor- bzw. α-Brom-acrolein zunächst an III addiert wird und dann mit IV Folinsäure ergibt. In gleicher Richtung weisen auch unsere Versuche über die direkte Synthese von Chinoliniumverbindungen⁸⁾ mit Acroleindibromid bzw. α-Brom-acrolein und N-Alkyl-p-amino-benzoesäuren. Hingegen liefert die

⁷⁾ Brit. Pat. 639154.

⁸⁾ F. Weygand u. W. Rupp, B. 83, 455 [1950].

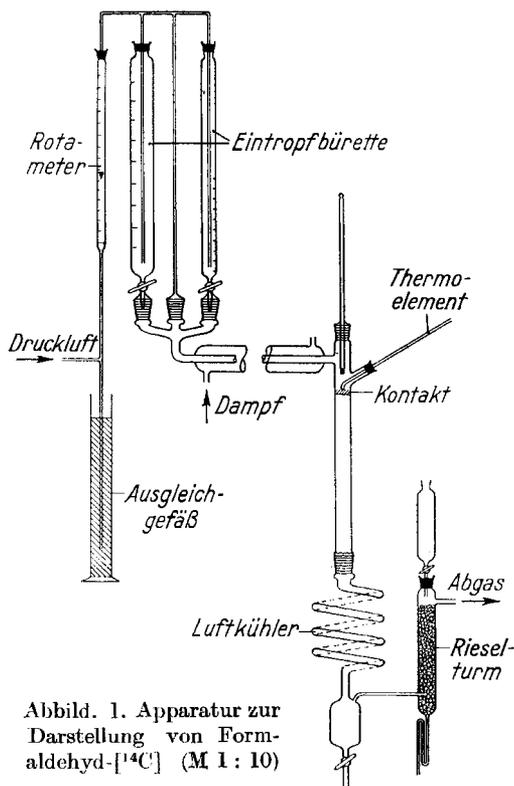
Schiffsche Base aus Acroleindibromid und III bei der Kondensation mit IV¹ unter den Bedingungen des „Eintopfverfahrens“ (Folinsäure nur in Spuren²). Nach den in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Ergebnissen liegt in dieser Schiffschen Base $-C_6H_4 \cdot N : CH \cdot CHBr \cdot CH_2Br$ die umgekehrte Reihenfolge der C-Atome vor, wie sie schließlich in der Folinsäure erscheint.

Denkbar wäre auch folgender Mechanismus, für den allerdings keine experimentellen Hinweise vorliegen: Acroleindibromid reagiert mit der α -ständigen $CHBr$ -Gruppe mit der basischsten Aminogruppe von IV⁹) (5 ständige Aminogruppe) unter HBr -Abspaltung, worauf zwischen der Aldehydgruppe und der 4 ständigen Aminogruppe Wasser zu VIII abgespalten wird. In diesem findet intramolekulare HBr -Abspaltung zu IX statt, das als Äthylenimin-Derivat mit III zu Dihydrofolinsäure reagiert, die dann dehydriert wird.

Der Badischen Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen/Rhein, insbesondere Hrn. Dr. U. Gerloff, und Hrn. Dr. H. Schulz, Degussa, Frankfurt/Main, danken wir bestens für Unterstützung und wertvolle Ratschläge bei der Ausführung der Gasphasenreaktionen. Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir für finanzielle Unterstützung, der Fa. Frieseke & Hoepfner, Erlangen-Bruck, für leihweise Überlassung eines Strahlungsmeßgerätes FH 44 und Hrn. Karl Wacker für geschickte Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Beschreibung der Versuche

1) Formaldehyd- $[^{14}C]$: Die Dehydrierung von Methanol zu Formaldehyd wurde in einer Quarzapparatur (Abbild. 1) vorgenommen; als Kontakt diente elektrolytisch



Abbild. 1. Apparatur zur Darstellung von Formaldehyd- $[^{14}C]$ (M 1 : 10)

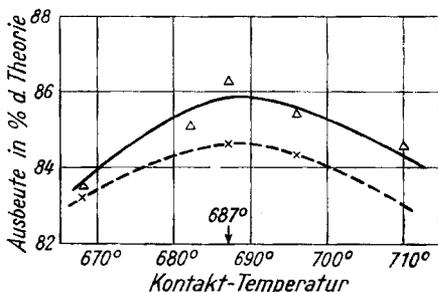
abgeschiedenes, fein granuliertes Silber. Die optimalen Reaktionsbedingungen waren in zahlreichen Einzelversuchen (~ 60) mit inaktivem Methanol ermittelt worden. Die obere Kurve in der Abbild. 2 zeigt die Formaldehydausbeuten (Mittelwerte der letzten 19 Einzelversuche).

Der Katalysator wurde zu Versuchsbeginn erhitzt und behielt seine Temperatur konstant bei, wenn bei einer Belastung von 38 g 50-proz. Methanol pro Stde. zur Oxydation etwa 39 l Luft pro Stde. zugeführt wurden. Aus der oberen Kurve der Abbild. 2 geht hervor, daß die Ausbeuten bei Versuchen, die über einen Zeitraum von 1 bis 7 Stdn. durchgeführt wurden, etwa 1% höher liegen als die entsprechenden Werte, die man bei der Oxydation von nur 12 g Gemisch innerhalb einer Versuchszeit von 15 Min. erhält (untere Kurve, Abbild. 2). Das Optimum der Ausbeute liegt bei einer Katalysator-Temperatur von 687°. Diese Werte gelten nur für die verwendete Apparatur.

⁹) W. Wilson, Journ. chem. Soc. London 1948, 1157.

Da der Kontakt seine optimale Wirkung erst nach einer gewissen Zeit erreicht, wurde ein Gemisch von 19 g Wasser und 19 g inaktivem Methanol im Verlaufe einer Stde. durch die Apparatur geleitet und anschließend auf radioaktives, etwa 50-proz. wäfr. Methanol umgeschaltet. Es standen 0.028 g $H_3^{14}C \cdot OH$ (Harwell) mit einer Aktivität von 1mC zur Verfügung. Dieses wurde mit 6.0 ccm inakt. Methanol und 6.0 ccm Wasser verdünnt.

Aus 19 g inakt. Methanol + 19 ccm Wasser wurde bei 1stdg. Versuchsdauer ein wäfr. Kondensat erhalten, das 15.28 g Formaldehyd, 0.5 g Methanol und 0.002 g Ameisensäure enthält. Das Waschwasser aus dem anschließenden Rieselturm enthielt noch 0.28 g Formaldehyd. Die Abgase enthielten 5% CO_2 und 11.4% H_2 . Wenn man den Formaldehyd im Waschwasser des Rieselturmes verwirft, so erhält man also eine Ausbeute an Formaldehyd von 85.8% d.Th., das in 25-proz. wäfr. Lösung anfällt. Da die Dehydrierung des radioaktiven Formaldehyds anschließend unter genau gleichen Versuchsbedingungen

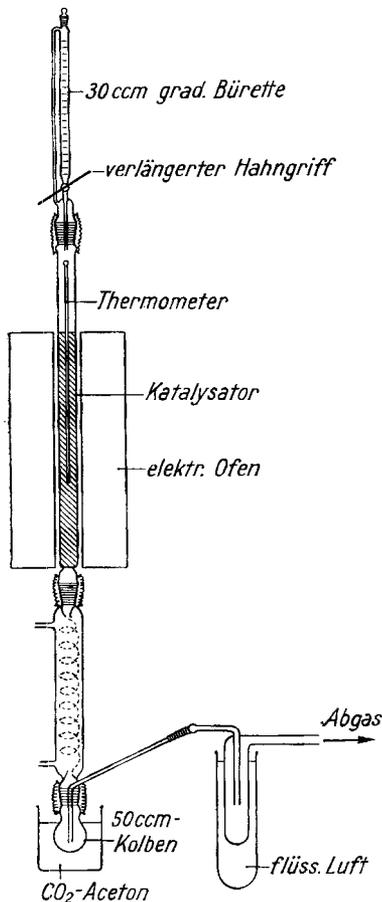


Abbild. 2. Dehydrierung von Methanol- $[^{14}C]$ zu Formaldehyd- $[^{14}C]$; 1—7 Stdn.-Versuch ———, 15 Min.-Versuch ———

stattfind (es wurde lediglich auf das Vorratsgefäß mit radioaktivem Methanol umgeschaltet), kann die gleiche Ausbeute angenommen werden.

Demnach wurden aus 6 g Methanol 4.75 g $H_2^{14}CO$ erhalten, der als 26-proz. wäfr. Lösung vorlag. Im Gegensatz zu sämtlichen Versuchen mit inakt. Material enthielt jedoch die radioaktive Formaldehyd-Lösung geringe Mengen weißer Flöckchen (polymerisierter Formaldehyd?).

2) Acrolein- $[3-^{14}C]$ (I): Die Kondensation von Formaldehyd mit Acetaldehyd nach H. Schulz und H. Wagner⁴⁾ wurde in einer Apparatur nach Abbild. 3 vorgenommen. Diese besteht aus einem graduierten, röhrenförmigen Tropftrichter, dessen Hahnkücken zur besseren Feineinstellung mit verlängerten Handgriffen versehen und dessen Abtropfrohr als Capillare ausgebildet ist. Das anschließende Kontaktrohr hat eine Länge von 50 cm und einen inneren Durchmesser von 17 mm. Als Katalysator dient Silicagel, das mit 10% seines Gewichtes mit Natriumsilicat imprägniert ist⁴⁾. Die ursprünglich 4—8 mm langen Stränge wurden im Mörser auf eine Korngröße von 1—2 mm zerkleinert, das daneben entstandene feine Mehl wurde abgesiebt und verworfen. Der so vorbereitete Katalysator wurde auf die am unteren Ende des Rohres befindliche kurze Glaswollschicht bis zu einer Höhe von 10 cm aufgeschüttet. Dann wurde ein Thermometer eingesteckt, das den Bereich um 280° gut abzulesen gestattet, worauf der Katalysator weiter bis zu einer Gesamtschichthöhe von 30 cm so eingefüllt wurde, daß das Thermometer in der Rohrachse blieb. Die Kontaktmasse wurde nach oben durch einen kurzen Glaswollepfropfen abgeschlossen. Die Beheizung geschah mit einem 37cm langen elektrischen Ofen.



Abbild. 3. Apparatur zur Darstellung von Acrolein- $[3-^{14}C]$ (M 1 : 10)

Unterhalb des Kontaktrohres befindet sich ein kurzer Schlangenkühler, der mit stehendem Wasser etwa $\frac{3}{4}$ gefüllt ist; wird mit fließendem Wasser gekühlt, so verstopft der nicht umgesetzte Formaldehyd durch Polymerisation die ersten Windungen des Kühlrohres. Die Vorlage wurde mit 20–30 mg Hydrochinon beschickt und während der Kondensation mit fester Kohlensäure und Aceton gekühlt. Da die Abgase nur noch sehr geringe Mengen Acrolein enthielten, wurde darauf verzichtet sie in einem nachgeschalteten Rieselturm auszuwaschen. Sie wurden über eine mit flüssiger Luft gekühlte Falle abgesaugt.

Wie bei der technischen Darstellung⁴⁾ erwies sich auch hier, daß der optimale Temperaturbereich zwischen 300 und 310° liegt. Da die Reaktion exotherm verläuft, wurde der Kontakt auf 295° gleichbleibend angeheizt, worauf mit dem Zutropfen des Gemisches begonnen wurde. Die Tropfgeschwindigkeit wurde so reguliert, daß alle 6 Sek. ein Tropfen fiel. Auf diese Weise wurde eine gleichmäßige Belastung erreicht, die im Falle des radioaktiven Versuchs 19.2 ccm/Stde. betrug.

Die nach 1) erhaltene Formaldehyd-Lösung wurde mit 7.1 g Acetaldehyd (1 Mol) gemischt zur Umsetzung gebracht. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit 6 ccm Wasser, das mit gleicher Tropfgeschwindigkeit über den Kontakt geschickt wurde, nachgewaschen.

Auch im Falle des Acroleins wurde die Ausbeute an radioaktivem Material nicht durch direkte Titration bestimmt. Bei 13 Vorversuchen war unter den beschriebenen Bedingungen eine Ausbeute von 39–39.5% d.Th. erhalten worden. Aus den nach 1) erhaltenen 4.75 g Formaldehyd waren daher maximal 3.5 g Acrolein zu erwarten, was bei der Überführung in Acroleindibromid bestätigt wurde (vergl. unter 3).

3) 2,3-Dibrom-propionaldehyd-[3-¹⁴C] (Acroleindibromid-[3-¹⁴C]) (II): Vorversuche mit inakt. Material hatten ergeben, daß das bei der Darstellung erhaltene Gemisch unmittelbar weiterbromiert und ohne Beeinträchtigung der Ausbeute das im Gemisch mit Formaldehyd und Acetaldehyd vorliegende Acroleinbromid zur Pteroyl-l-glutaminsäure-Synthese verwendet werden konnte.

Wie ausgeführt wurde, konnten maximal 3.5 g Acrolein vorliegen, die zu vollständiger Bromierung 10.0 g Brom erfordert hätten. Um Oxydation der Aldehyde zu vermeiden, wurde die Bromierung im Kältegemisch vorgenommen. Das acroleinhaltige, wäbr. Kondensat wurde mit 4 ccm Äther versetzt und während des Bromierens so weit gekühlt, daß das in kleinen Anteilen zugesetzte Brom jeweils nach 30–45 Sek. entfärbt war. Nach Zugabe von 9.9 ccm blieb eine hellgelbe Färbung bestehen, d. h. die Addition war beendet. Daraus ergibt sich, daß die bei der Formaldehyd- und Acrolein-Synthese bei den zahlreichen Vorversuchen mit inakt. Material ermittelten Ausbeuten auch beim radioaktiven Versuch erreicht wurden.

4) Pteroyl-l-glutaminsäure-[11-¹⁴C] (Folinsäure-[11-¹⁴C]) (V): Durch Vorversuche mit nichtradioaktivem Material wurde zunächst ermittelt, bei welchem Mol.-Verhältnis von *p*-Amino-benzoyl-l-glutaminsäure (III) zu 6-Oxy-2,4,5-triamino-pyrimidin-sulfat (IV) eine maximale Ausbeute an Folinsäure erreicht wird, wenn 1 Mol. Acroleindibromid verwendet wird.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind nachstehend zusammengefaßt:

6-Oxy-2,4,5-triamino-pyrimidin-sulfat (Mol.)	<i>p</i> -Amino-benzoyl-l-glutaminsäure (Mol.)	Ausb. an krist. Folinsäure, ber. auf 1 Mol. Acrolein-dibromid % d.Th.
1	1	2.3
1	2	2.7
2	1	8.8 u. 9.3
2	2	12.5
3	3	12.3

Für die Kondensation mit Acroleindibromid-[3-¹⁴C] wurden daher auf 1 Mol. dieser Verbindung je 2 Moll. 6-Oxy-2,4,5-triamino-pyrimidin-sulfat und *p*-Amino-benzoyl-l-glutaminsäure verwendet.*

30 g 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidin-sulfat und 30 g *p*-Amino-benzoyl-*l*-glutaminsäure wurden in wenig Wasser aufgeschlämmt und in 1.5 l siedendes Wasser eingerührt, in dem zuvor 20 g krist. Natriumacetat gelöst worden waren. Nachdem Lösung eingetreten war, wurde auf Zimmertemperatur abgekühlt und der p_H -Wert auf 4.0 eingestellt, worauf die zuvor hergestellte Lösung des ¹⁴C-Acroleindibromids (II) (wäbr. und äther. Schicht) und von 5.5 g Chinon in 1500 ccm Äthanol unter heftigem Rühren im Laufe von 1½ Stdn. eingetropfelt wurde. Durch Zugabe von *n* NaOH wurde der p_H -Wert auf 4 gehalten (Prüfung durch Tüpfeln). Nachdem noch 1 Stde. nachgerührt war, ließ man über Nacht stehen. Der ausgefallene Niederschlag wurde scharf abgesaugt und mit Wasser sowie 500 ccm Alkohol gewaschen.

Zur Gewinnung der krist. Pteroyl-*l*-glutaminsäure wurde das ziegelrote Produkt mit 50 ccm 2*n* NaOH unter Zerreiben im Mörser aufgeschlämmt und in 1200 ccm Wasser eingetragen. Nach Zusatz von weiteren 40 ccm 2*n* NaOH trat vollständige Lösung ein. Mit Hilfe von 12 g BaCl₂·2H₂O, das in wenig Wasser gelöst war, wurde ein hellbrauner Niederschlag gefällt, der über Kieselerde abgesaugt wurde. Das Filtrat wurde mit 2*n* HCl auf p_H 7 gebracht, aufgekocht und mit 5 g der Bleicherde Tonsil versetzt. Nach Filtrieren der siedenden Lösung wurde der Rückstand mit 4 l Wasser und anschließend mit 3 l Wasser ausgekocht. Die drei Filtrate wurden mit Eisessig auf p_H 3.5 eingestellt, worauf beim Abkühlen und Stehen über Nacht ein hellgelber Niederschlag ausfiel. Die drei Fraktionen wurden vereinigt und in 4 l siedendem Wasser unter Zusatz von *n* NaOH (p_H 7) gelöst. Nach Zusatz von 10 g Tonsil wurde nochmals aufgekocht und siedend filtriert. Nach dem Ansäuern mit verd. Salzsäure bis auf p_H 3.5 fiel beim langsamen Erkalten über Nacht krist. Pteroyl-*l*-glutaminsäure-[11-¹⁴C] + 2 H₂O (V) in Form feiner Nadelchen aus; Ausb. 1.9 g = 3.65% d.Th. bez. auf das in 1) eingesetzte Methanol oder 11.1% d.Th. bez. auf Acrolein.

C₁₀H₁₃O₆N₇ (441.4) Ber. C 51.70 H 4.34 Gef. C 51.20 H 4.58 (Wasserfreies Präp.)

Mikrobiologisch ergab sich die genau gleiche Wuchsstoffwirkung wie mit krist. „Folic acid“ der Lederle Laboratories Division (USA.).

Die Messung der Radioaktivität gab einen Wert von 1050 Impulsen/Min./mg/cm² 10) extrapoliert auf die Schichtdicke 0 mg/cm². Das entspricht einer Aktivität von 1050·477 = 502·10⁸ Imp./Min./Millimol/cm².

5) 6-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure [¹⁴C]-(8) (VI): 0.5 g radioaktive Folinsäure (V) wurden in 50 ccm Wasser durch Zugabe von 10 ccm 2*n* NaOH unter Erwärmen gelöst. Darauf wurden 50 ccm einer 2-proz. wäbr. Kaliumpermanganat-Lösung zutropft. Nach Entfärbung mit 2 ccm Äthanol wurde die Lösung heiß filtriert, mit konz. Salzsäure auf p_H 1 angesäuert und mit Natriumacetat auf p_H 3 abgepuffert. Beim Kühlen fiel die Carbonsäure VI aus, die abzentrifugiert und mit Wasser und Äthanol gewaschen wurde. Getrocknet wurde über konz. Schwefelsäure-Natriumhydroxyd; Ausb. 0.226 g schwach gelbliches Pulver.

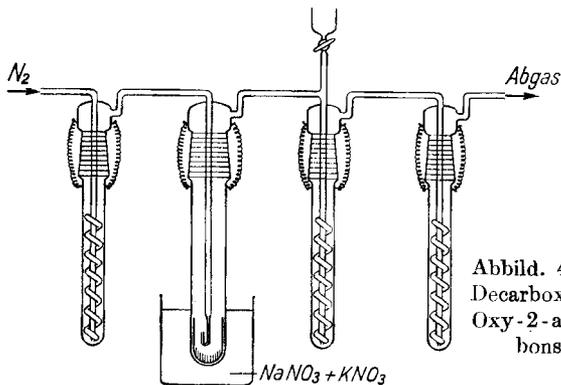
C₇H₅O₃N₅·0.5 H₂O (216.1) Ber. H₂O 4.16 Gef. H₂O 4.02

Extrapoliert auf die Schichtdicke 0 mg/cm² ergab sich eine Aktivität von 2300 Imp./Min./mg/cm², was 2300·216 = 497·10⁸ Imp./Min./Millimol/cm² entspricht.

6) Decarboxylierung der 6-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure [¹⁴C]-(8): Die Decarboxylierung der radioaktiven 6-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure-(8) (VI) wurde in der in der Abbild. 4 wiedergegebenen Apparatur vorgenommen. Sie besteht aus dem Reaktionsgefäß, dem eine Waschflasche vor- und zwei Waschflaschen nachgeschaltet sind. Sie sind so ausgebildet, daß zwischen dem zentrisch bis zum Boden reichenden Einleitungsrohr und der Innenwandung des Gefäßes eine eng gewickelte Glasspirale genau hineinpaßt. Dadurch wird erreicht, daß dem Gase trotz geringer Menge an Absorptionsflüssigkeit ein langer Austauschweg zur Verfügung steht. Die zur decarboxylierende Substanz wurde in ein knapp über dem Boden abgesprengtes Reagenzglas eingefüllt, darin eingewogen, decarboxyliert und wieder zurückgewogen.

10) Fensterzählrohr der Fa. Friesecke & Hoepfner, Erlangen-Bruck, mit Glimmerfolie 4 mg/cm²; Strahlungsmeßgerät FH 44 der gleichen Firma.

219 mg der Carbonsäure wurden in das Reaktionsgefäß eingeführt. Die am Anfang und Ende der Apparatur befindlichen Waschflaschen wurden mit n NaOH beschickt, worauf ein schwacher Strom Stickstoffs 1.5 Stdn. durchgeleitet wurde. Dann wurde die unmittelbar an das Decarboxylierungsgefäß angeschlossene Waschflasche rasch mit 8 ccm carbonatfreier n NaOH¹¹⁾ gefüllt, das System wieder verschlossen und der Reaktionsraum in einem Natriumnitrat-Kaliumnitrat-Bad auf 270° erhitzt. Während 4 Stdn. wurde die Temperatur zwischen 260 und 290° gehalten und ein schwacher Stickstoffstrom durchgeleitet. Diesen ließ man auch nach Entfernung des Heizbades noch 15 Min. bestehen.



Abbild. 4. Apparatur zur Decarboxylierung von 6-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure [¹⁴C]- (8)

Nach Beendigung der Decarboxylierung wurde die Absorptionslauge rasch in einen Kolben übergeführt u. die Waschflasche mit so viel ausgekochtem dest. Wasser nachgespült, daß die Lauge auf 120 ccm verdünnt wurde. Während des sofort vorgenommenen Aufkochens wurden 520 mg Ammoniumchlorid zugesetzt und das Carbonat durch rasches Zutropfenlassen von 15 ccm 0.3 m BaCl₂ ausgefällt¹²⁾. Nach kurzem Evakuieren ließ man erkalten, saugte das Bariumcarbonat ab und wusch es mit Wasser. Getrocknet wurde bei 100° im Trockenschrank; Ausb. 0.120 g BaCO₃ (60% d.Th.).

Das decarboxylierte Produkt zeigte eine Gewichtsabnahme von 0.0367 g. Berücksichtigt man, daß die Carbonsäure 0.5 Moll. Wasser enthalten hatte, das während des 4stdg. Erhitzens ausgetrieben worden ist, so sind von den eingesetzten 0.219 g Carbonsäure 0.0095 g abzuziehen. Die Gewichtsabnahme bei der Decarboxylierung betrug also nur 0.0272 g = 61% d.Th., was mit dem Gewicht des Bariumcarbonats übereinstimmt.

Bei Extrapolation auf die Schichtdicke 0 ergab sich eine Aktivität von 2500 Imp./Min./mg/cm², was 2500 · 197 = 493 · 10³ Imp./Min./Millimol/cm² entspricht.

Papierchromatographische Trennung von 6-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure [¹⁴C]- (8) und 6-Oxy-2-amino-pteridin: Ein Teil des Decarboxylierungs-Rückstandes, der noch unveränderte Carbonsäure und 6-Oxy-2-amino-pteridin enthielt, wurde in 0.5 n NH₃ zu einer 0.1-proz. Lösung gelöst. Damit wurde die gesamte Startlinie eines 60 × 60 cm Papierbogens Whatman Nr. 1 beschickt und mit einem Gemisch aus 80 Tln. sek. Butanol, 20 Tln. 90-proz. Ameisensäure und 50 Tln. Wasser entwickelt¹³⁾. Man erhielt zwei breite, im UV-Licht stark fluoreszierende Streifen der getrennten Komponenten, wobei das 6-Oxy-2-amino-pteridin am weitesten gewandert war. Die Streifen wurden ausgeschnitten, und die Carbonsäure und ihre Decarboxylierungs-Produkte mit verd. Ammoniak-Lösung eluiert. Die Lösungen wurden in kleinen Meß-Schälchen eingedampft. Die Ausmessung der Radioaktivität ist in der Tafel 2 angegeben.

¹¹⁾ Die carbonatfreie Lauge wurde durch Auflösen von Natriumhydroxyd p. a. in Wasser zu einer 50-proz. Lösung, Filtrieren (nach längerem Stehenlassen unter Reinstickstoff) und sofortiges Verdünnen mit der entsprechenden Menge abgekochten Wassers hergestellt.

¹²⁾ Isotopic Carbon, M. Calvin, Ch. Heidelberg, J. C. Reid, B. M. Tolbert u. P. F. Yankwich (J. Wiley & Sons, Inc., New York 1949), S. 85.

¹³⁾ F. Weygand, A. Wacker u. V. Schmid-Kowarzik, *Experientia* 6, 184 [1950].