

Gewinnung von Phosphorsäure aus Phosphat

12 Gewichtsteile tertiäres Calciumphosphat werden mit der gleichen Menge (nicht ganz die äquiv. Menge) konz. Schwefelsäure in der Kugelmühle zunächst eine Stunde für sich, dann nach Zusatz von 50 Volumteilen absol. Äther vermahlen und die Ätherlösung von den unlöslichen Salzen — Calciumsulfat und etwas nicht bzw. unvollständig umgesetztes Phosphat — abfiltriert. Nach Verdampfen des Äthers konnten über 70% der Theorie an reiner, schwefelsäurefreier Phosphorsäure gewonnen werden. Die Ausbeute wird vollständiger, wenn nach dem Mahlen kurz aufgeköcht wird und wenn die ätherunlöslichen Rückstände gründlich mit Äther ausgewaschen werden.

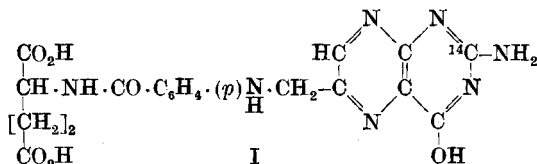
83. Friedrich Weygand, Hans-Joachim Mann und Helmut Simon: Synthese von Pteroyl-*l*-glutaminsäure-[2-¹⁴C]

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg]

(Eingegangen am 6. März 1952)

Ausgehend von Ba¹⁴CO₃ wurde über 2,4,5-Triamino-6-oxy-pyrimidin-[2-¹⁴C] durch Kondensation mit 1,1,3-Tribrom-aceton und *p*-Aminobenzoyl-*l*-glutaminsäure nach papierchromatographischer Reinigung Pteroyl-*l*-glutaminsäure in krist. Form erhalten.

Kürzlich beschrieben wir die Synthese von Pteroyl-*l*-glutaminsäure-[11-¹⁴C]¹⁾. Im Hinblick auf gewisse biochemische Fragestellungen benötigten wir nunmehr Pteroyl-*l*-glutaminsäure-[2-¹⁴C] (I). Wir gewannen sie durch Kondensation von *p*-Amino-benzoyl-*l*-glutaminsäure mit 1,1,3-Tribrom-aceton²⁾ und 2,4,5-Triamino-6-oxy-pyrimidin-[2-¹⁴C]. Nach Abschluß der vorliegenden Untersuchung erhielten wir davon Kenntnis, daß in USA sowohl 2,4,5-Triamino-6-oxy-pyrimidin-[2-¹⁴C]³⁾ als auch Folinsäure-[2-¹⁴C]⁴⁾ hergestellt worden sind; allerdings wurden bisher Einzelheiten nicht mitgeteilt.



Bei Ansätzen, die 10 bis 100 mg Folinsäure liefern sollen, ist die Gewinnung der Folinsäure in krist. Zustand äußerst schwierig. Die gleichen Beobachtungen machten offenbar auch die amerikanischen Autoren⁴⁾. Wir arbeiteten daher eine papierchromatographische Reinigungsmethode aus. Bewährt hat

¹⁾ F. Weygand u. G. Schäfer, B. 85, 307 [1952].

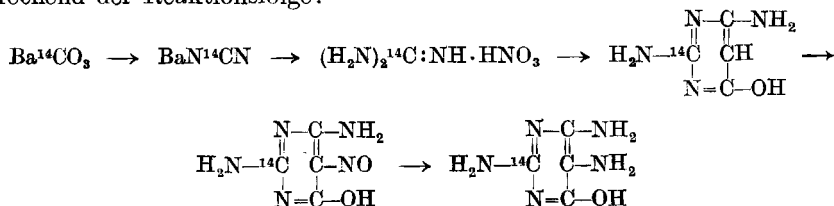
²⁾ H. Hultquist u. P. F. Dreisbach, U.S.Pat. 2443165 [1948]; F. Weygand u. V. Schmied-Kowarzik, B. 82, 333 [1949].

³⁾ H. E. Skipper u. L. L. Bennett, Referat in Nucleonics 7, Nr. 4, S. 50 [1950].

⁴⁾ C. T. Fong, C. M. Judson, N. H. Marsh u. D. J. Salley, Referat in Nucleonics 7, Nr. 4, S. 49 [1950]; Synthese mit 1,1,3-Tribrom-aceton. Die Reinigung erfolgte über Zn- und Mg-Salze. Ausb. 1%, bez. auf Guanidin-hydrochlorid; Reinheitsgrad > 90%. H. E. Skipper et al., Referat in Nucleonics 7, Nr. 4, S. 49 [1950]; Synthese mit 2,2,3-Tribrom-propionaldehyd; „Difficulty in achieving satisfactory purification conditions has been experienced“

sich hierbei ein Entwicklungsgemisch aus Alkohol-Wasser und $2n \text{ NH}_3$ (25 : 20 : 5 Voll.). Damit läßt sich die Folsäure (R_F 0.65–0.75) leicht von den Nebenprodukten der Synthese abtrennen. Als wertvoll erwies sich ferner die Verwendung von 5–8 mm starken Kartons aus Linters⁵⁾. Die Gewinnung von krist. Folsäure bei 1–2 mMol Ansätzen bietet somit keine Schwierigkeiten mehr. Bisher haben wir die Synthese nur mit einer Radioaktivität von 0.025 mC/mMol durchgeführt, der Verwendung von 1–3 mC/mMol steht aber nichts mehr im Wege.

Die Darstellung des 2.4.5-Triamino-6-oxy-pyrimidins-[2-¹⁴C] erfolgte entsprechend der Reaktionsfolge:



Beschreibung der Versuche

2.4.5-Triamino-6-oxy-pyrimidin-[2-¹⁴C]: Nach den Angaben in Isotopic Carbon⁶⁾ wurde, ausgehend von 1.0 mMol $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ (Aktivität 0.83 mC/mMol) über BaN^{14}CN Guanidin-nitrat-¹⁴C hergestellt. Auf die Überführung in Guanidin-hydrochlorid über das Pikrat, wie sie dort beschrieben ist, wurde jedoch verzichtet, da sich herausstellte, daß hierbei beträchtliche Verluste auftreten. Es wurde daher das im Gemisch mit Bariumnitrat und Ammoniumnitrat vorliegende Guanidin-nitrat direkt zur Kondensation mit Cyanessigester verwendet. Dadurch mußte mehr Natriumäthylat verwendet werden, als nach W. Traube⁷⁾ notwendig ist. Ferner haben wir auf die Isolierung von Cyanacetyl-guanidin verzichtet.

Es wurde also zunächst nach Isotopic Carbon⁶⁾ bis einschließlich der Schmelze von BaNCN mit NH_4NO_3 verfahren. Sodann wurde mit 7 ccm absol. Alkohol 15 Min. unter Rückfluß gekocht, was nach Zugabe von 3 ccm Natriumäthylat-Lösung (aus 1 g Natrium in 20 ccm absol. Alkohol) 20 Min. fortgesetzt wurde. Dabei entwich das aus dem NH_4NO_3 in Freiheit gesetzte Ammoniak. Nach Filtration (der Rückstand enthielt nur 0.05% der eingesetzten Radioaktivität) gab man zum Filtrat 0.18 ccm Cyanessigester und erhitze 2 Stdn. unter Rückfluß. Nach Stehen über Nacht wurde der Alkohol verdampft und der Rückstand in 3 ccm Wasser aufgenommen, mit 0.3 ccm konz. Salzsäure auf pH 2–3 gebracht, einige Min. auf 80° erhitzt, nach dem Abkühlen auf 25° mit 0.35 ccm einer frisch bereiteten Natriumnitrit-Lösung (aus 300 mg NaNO_2 + 1 ccm Wasser) tropfenweise unter Schütteln versetzt und sodann 20 Min. auf 80° erwärmt. Das ausgefallene rosarote 2.4-Diamino-5-nitroso-6-oxy-pyrimidin-[2-¹⁴C] wurde abgesaugt, zur Reduktion in 2.5 ccm Wasser suspendiert und bei 60–80° unter lebhaftem Schütteln mit 330 mg Natriumdithionit⁸⁾ in 3 ccm Wasser tropfenweise versetzt. Nach Zugabe von weiteren 330 mg Natriumdithionit in 2 ccm Wasser waren nur noch Spuren

⁵⁾ Solche Kartons wurden auf unsere Veranlassung von der Fa. C. Schleicher & Schüll, Dassel, hergestellt. Sie haben sich auch bei der präparativen Trennung von Zuckern und Aminosäuren bewährt.

⁶⁾ Isotopic Carbon, M. Calvin, C. Heidelberger, J. C. Reid, B. M. Tolbert u. P. E. Yankwich (J. Wiley & Sons, New York 1949), u. zwar S. 158–159.

⁷⁾ B. 33, 1371 [1900].

⁸⁾ C. K. Kain, M. I. Malette u. E. C. Taylor jr., Journ. Amer. chem. Soc. 68, 1996 [1946].

der Nitroverbindung vorhanden, die nach Zugabe von etwas festem Natriumdithionit verschwanden. Nach Zusatz von 0.05 ccm konz. Schwefelsäure fiel das 2.4.5-Triamino-6-oxy-pyrimidin-[2-¹⁴C]-sulfat-dihydrat in krist. Form aus. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wurde es abgesaugt; Ausb. 55 % d. Th., ber. auf Ba¹⁴CO₃.

Pteroyl-*l*-glutaminsäure-[2-¹⁴C]: In einem 100 ccm Erlenmeyer-Kolben mit weitem Hals wurden 485 mg inakt. 2.4.5-Triamino-6-oxy-pyrimidin-sulfat-dihydrat, 15 mg der gleichen 2-¹⁴C-Verbindung und 520 mg *p*-Aminobenzoyl-*l*-glutaminsäure (alles zunächst fein zerrieben) mit 20 ccm Wasser auf dem Wasserbad erwärmt; dann ließ man auf 20° abkühlen. Unter Rühren wurden nun innerhalb 15 Min. 1.6 g 1.1.3-Tribrom-aceton, gelöst in 10 ccm 95-proz. Alkohol, eingetropfelt. Den pH-Wert der Reaktionsmischung hielt man durch laufende Zugabe von 2*n*NaOH zwischen 3 und 4 (Kontrolle mit Merck-Universalindicatorpapier). Nach beendeter Zugabe wurde noch 15 Min. nachgerührt, auf 0° abgekühlt und nach einigen Stdn. zentrifugiert.

Der Niederschlag wurde im Zentrifugenglas nacheinander mit 50 ccm Wasser und 50 ccm Alkohol gewaschen und dann mit einem Gemisch aus Alkohol-Wasser-2*n*NH₃ (25 : 20 : 5 Voll.) verrührt. Durch Eintragen von Whatman-Papierpulver wurde ein steifer Brei hergestellt. Dieser wurde auf eine Porzellannutsche (ø 9.5 cm), die zuvor mit einer 15 mm dicken festgestampften Schicht von Whatman-Papierpulver beschickt worden war, gleichmäßig aufgedrückt. Nun wurde mit 2mal 100 ccm des gleichen Gemisches eluiert. Das Eluat wurde i. Vak. bis auf 50 ccm eingeengt. Nach Zugabe von Eisessig wurde der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert, wiederum in 50 ccm des Alkohol-Wasser-Ammoniak-Gemisches gelöst und mit Whatman-Pulver zu einem Brei verrührt. Dieser wurde nun auf eine Säule (13.5 × 3.5 cm) des gleichen Pulvers aufgepreßt. Unter schwachem Saugen ließ man 3mal je 50 ccm Alkohol-Wasser-Ammoniak-Gemisch durch die Säule laufen. Das Eluat wurde i. Vak. auf 50 ccm eingedampft, mit Essigsäure auf pH 3.5 gebracht und die ausgefallene Folinsäure mit der Zentrifuge gesammelt.

Nun löste man sie in 2 ccm des Alkohol-Wasser-Ammoniak-Gemisches auf und brachte dieses auf den glattgeschnittenen Rand einer 9 cm breiten Filterplatte aus Linters (Schleicher & Schüll¹⁵) von 0.6 cm Dicke gleichmäßig mit der Pipette auf. Anschließend wurden noch etwa 6 ccm Gemisch mit einer Pipette vorsichtig aufgetragen, wobei schon das Abwandern einer gelben Zone zu beobachten war. Die Platte wurde dann in eine Schale eingestellt, die das gleiche Gemisch enthielt und die sich in einem geschlossenen Gefäß befand. Nachdem das Lösungsmittel 15 cm weit gewandert war, wurde aus der Platte die Zone herausgebrochen, die vor der UV-Lampe Fluoreszenzlöschung zeigte und im Tageslicht gelb aussah. Nach Verrühren mit 100 ccm 2*n*NH₃ wurde der Papierbrei auf einer Nutsche abgesaugt; nachgewaschen wurde mit 50 ccm Wasser. Nach dem Einengen des Filtrates auf etwa 100 ccm wurde mit Eisessig angesäuert, zum Sieden erhitzt und filtriert. Das Filtrat ließ man in einem großen Wasserbad (2 l) langsam erkalten, nachdem mit einer Spur krist. Folinsäure angeimpft worden war. Die 2-¹⁴C-Folinsäure schied sich über Nacht in Form feiner Nadeln ab; Ausb. 30 mg (3.3 %, ber. auf Triamino-oxy-pyrimidinsulfat). Mikrobiologisch bestimmter Reinheitsgrad 100 %.