

- [2] P. Holtz, K. Stock & E. Westermann, Arch. exp. Path. Pharmacol. 248, 387 (1964); H. Yamanaka, M. J. Walsh & V. E. Davis, Nature 227, 1143 (1970); V. E. Davis & M. J. Walsh, Science 167, 1005 (1970); G. Cohen & M. Collins, *ibid.* 167, 1749 (1970); T. L. Sourkes, Nature 229, 413 (1970).
 [3] A. M. Hjort, E. J. de Beer & R. W. Fassett, J. Pharmacol. exp. Therap. 62, 195 (1938); D. W. Fassett & A. M. Hjort, *ibid.* 63, 253 (1938); A. M. Hjort, E. J. de Beer, J. S. Buck & L. O. Randall, *ibid.* 76, 263 (1942); A. H. Beckett, Progr. Drug Res. 7, 455 (1959).
 [4] E. A. Bell, J. R. Nulu & C. Cone, Phytochemistry 10, 2191 (1971).
 [5] W. M. Whaley & T. R. Govindachari, 'The Pictet-Spengler Synthesis of Tetrahydroisoquinolines and Related Compounds' in Organic Reactions, Vol. VI, Chap. 3, R. Adams, ed., John Wiley & Sons, Inc., New York 1951.
 [6] G. Bartholini, I. Kuruma & A. Pletscher, Nature 230, 533 (1971).

4. Über Pterinchemie

39. Mitteilung [1]

Zur Frage des "aktiven Formaldehyds".

Wird durch Formaldehyd-Anlagerung an Tetrahydrofolsäureanaloge ein Imidazolidinring gebildet?

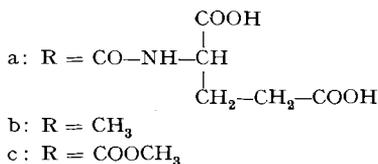
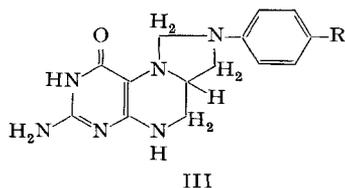
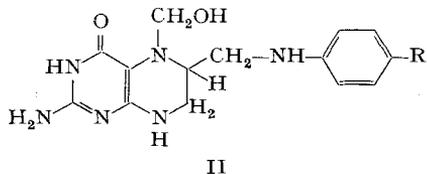
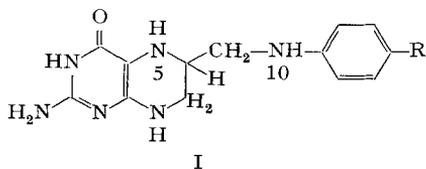
von M. Viscontini und J. Bieri

Organisch-chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

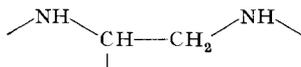
(30. X. 71)

Zusammenfassung. Es werden Versuche mit Tetrahydrofolsäure-Modellsubstanzen unternommen, um die eigentliche Struktur des sogenannten «aktiven Formaldehyds» abzuklären. Alle Addukte der tetrahydrierten Substanzen mit Formaldehyd erweisen sich als Hydroxymethyl- und nicht als Imidazolidin-Derivate. Ob das Additionsprodukt des Formaldehyds mit Tetrahydrofolsäure ebenfalls ein Hydroxymethyl-Derivat ist, bleibt noch abzuklären.

Seitdem entdeckt wurde, dass in Leberextrakten Serin in Gegenwart von Tetrahydrofolsäure (H_4 -Folat, Ia), Glycin und Formaldehyd gebildet wird [2] [3], stellt sich die Frage nach der richtigen Struktur des sogenannten «aktiven Formaldehyds» (Anlagerungsprodukt von 1 Mol. HCHO an eine Molekel H_4 -Folat). In ihrer Mitteilung diskutierten Kisliuk & Sakami [2] die Bildung von 5-Hydroxymethyl- H_4 -Folat

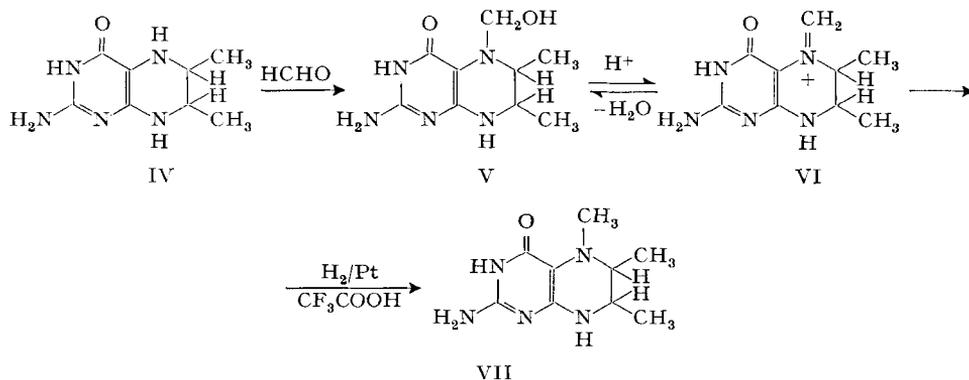


(IIa); *Blakley* [3] vermutete das Entstehen einer Methylenbrücke zwischen den N(5)- und N(10)-Gruppierungen mit Formaldehyd unter Bildung eines Imidazolidinringes (IIIa). Diese letzte Struktur IIIa für den «aktiven Formaldehyd» gilt heute als die richtige [4], gestützt durch das (falsche) Ergebnis [5], dass nur die im Pyrazinring hydrierten Pterine der Folsäurereihe mit den funktionellen Gruppen N(5) und N(10), die einer Äthylendiamin-Gruppierung angehören, in Anlehnung an bekannte Reaktionen zwischen HCHO und Äthylendiaminen, mit HCHO reagieren können.



Aber heute wissen wir, dass auch die hydrierten Pterine ohne Seitenkette, und damit ohne die funktionelle Gruppe N(10), unter reversibler Anlagerung von HCHO in N(5)-Stellung, Hydroxymethyl-Derivate bilden [6], so dass man sich fragen muss, ob für den «aktiven Formaldehyd» nicht etwa die Struktur IIa die richtige ist. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse unserer in dieser Richtung unternommenen Versuche zeigen, dass bestimmte H_4 -Folat-Analoga nach der Anlagerung von Formaldehyd höchstwahrscheinlich keinen Imidazolidinring bilden. Wir haben H_4 -Folat-Analoga und nicht H_4 -Folat (Ia) selbst gewählt, weil die NMR.-Spektren von H_4 -Folat infolge der grossen Zahl von Methylengruppen kaum verwendbare Auskünfte über die Struktur des «aktiven Formaldehyds» vermitteln können.

In der Absicht, eine einfache Arbeitsmethode zu entwickeln, wird zuerst die Anlagerung von HCHO an 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (IV) untersucht, da bei dieser Modellsubstanz sich kein Imidazolidinring bilden kann. Das Addukt von



IV mit HCHO wird unter Sauerstoffausschluss in wässriger Lösung (pH 2–6) leicht erhalten und wurde als 5-Hydroxymethyl-6,7-dimethyl-tetrahydropterin (V) charakterisiert. Sein NMR.-Spektrum in Fluorsulfonsäure (Fig. 2), verglichen mit demjenigen des Eduktes IV (Fig. 1), zeigt ein *AB*-System, zentriert bei 8,76 ppm. Wir schliessen daraus, dass V in starken Säuren nach Protonierung leicht eine Molekel Wasser verliert, unter Bildung des kationischen Imins VI. Dieses Verhalten wird ferner bestätigt durch die leichte katalytische Hydrierung von VI zu 5,6,7-Trimethyl-tetrahydropterin (VII) in Trifluoressigsäure. Das Dublett (3,70 ppm, $J = 5$ Hz) der

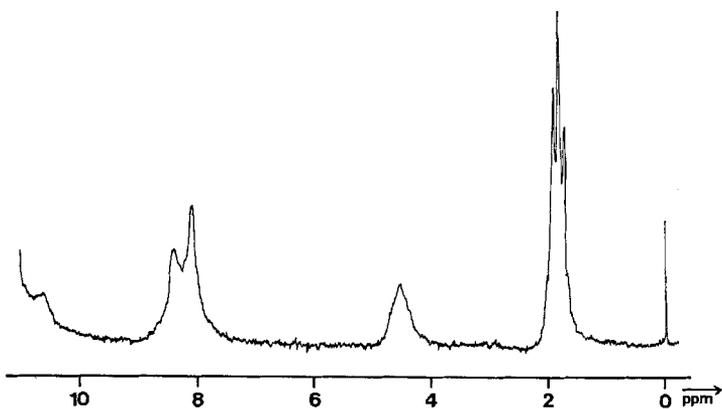


Fig. 1. NMR.-Spektrum von 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (IV), aufgenommen in FSO_3H

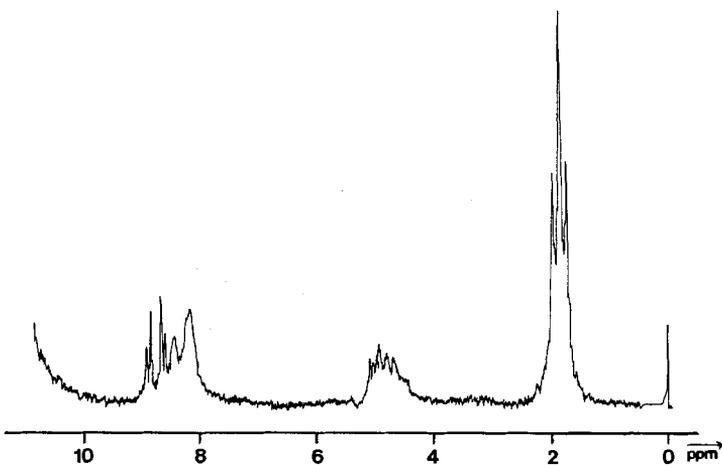


Fig. 2. NMR.-Spektrum von N(5)-Hydroxymethyl-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (V), aufgenommen in FSO_3H

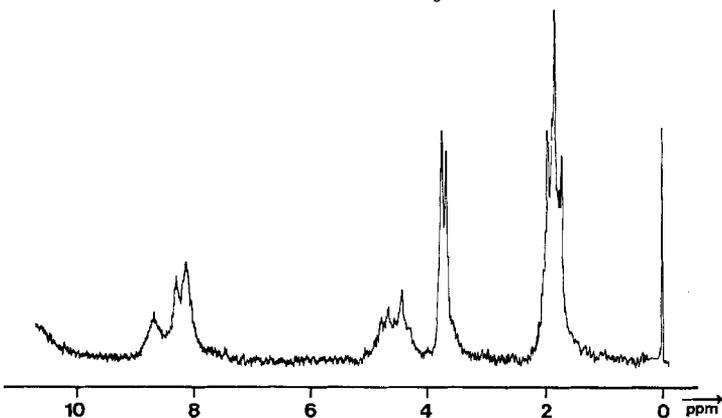
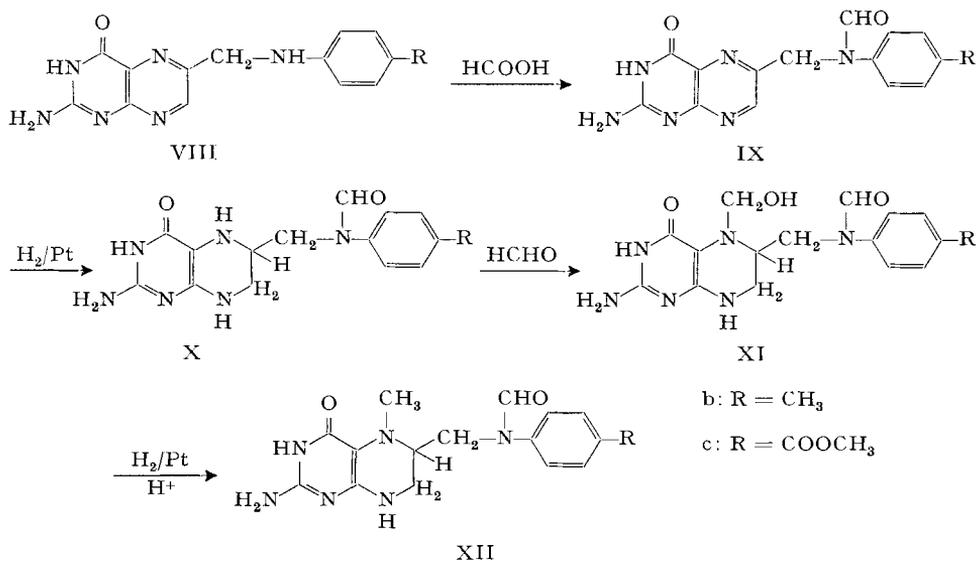


Fig. 3. NMR.-Spektrum von N(5),6,7-Trimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (VII), aufgenommen in FSO_3H

5-Methylgruppe im NMR.-Spektrum von VII in Fluorsulfonsäure (Fig. 3) bedeutet, dass in dieser starken Säure das N(5)-Atom protoniert vorliegt. In Trifluoressigsäure ist für die gleiche Gruppierung nur ein Singulett bei 3,40 ppm zu beobachten¹⁾.

Nachdem die Lage des N(5)-CH₃-Signals eines 5-Methyltetrahydropterins eindeutig lokalisiert ist, können Versuche mit Folsäureanalogen unternommen werden. Wir wählten das 6-[(N-*p*-Tolyl)-aminomethyl]-tetrahydropterin (Ib) und den Tetrahydropterinsäure-methylester (Ic), da beide Verbindungen eine sekundäre Aminogruppe in 10-Stellung analog zu Ia besitzen. Zudem weisen die Aminogruppierungen verschiedene Basizitäten auf. Diese werden unterschiedlich beeinflusst durch den induktiven und mesomeren Effekt der Substituenten in *p*-Stellung. Das p*K*_s der 10-Aminogruppe ist ganz allgemein schwer zu messen. In Analogie zu den p*K*_s-Werten von Toluidin (5,08; 25°) und *p*-Aminobenzoesäure-methylester (2,38; 25°) schätzen wir die p*K*_s von Ib und Ic auf 5–5,5 bzw. 2–2,5. Diese Werte sind ähnlich den p*K*_s-Werten der 5-Aminogruppe des Tetrahydropterins (5,6) bzw. der N(2')-Aminogruppe des Pterins (2,3) [7]. Vergleicht man diese Werte, so stellt man fest, dass die Bedingungen für eine Imidazolidinbildung am besten in der Substanz Ib erfüllt sind. Es ist hingegen damit zu rechnen, dass das N(10)-Atom von Ic mit HCHO am langsamsten reagieren wird. Vergleicht man andererseits die NMR.-Spektren von Ib (Fig. 4) und Ic (Fig. 5) mit demjenigen von Ia (Fig. 6), so stellt man fest, dass Ia und Ic eine sehr ähnliche chemische Umgebung um das N(10)-Atom besitzen müssen. Ic (weniger Ib) kann somit, verglichen mit Ia, als eine echte Modellsubstanz betrachtet werden.

Um die Reaktion der 5-Aminogruppe ungestört zu untersuchen, wurde in den Verbindungen Ib und Ic die 10-Aminogruppe vorerst blockiert. Zu diesem Zweck wurden das 6-[(N-*p*-Tolyl)-aminomethyl]-pterin (VIIIb) und der Pterinsäure-



¹⁾ In dieser Arbeit befassen wir uns nicht mit der Stereochemie dieses synthetisch hergestelltes Produktes, welches als Gemisch von zwei racemischen Diastereomeren vorliegen kann.

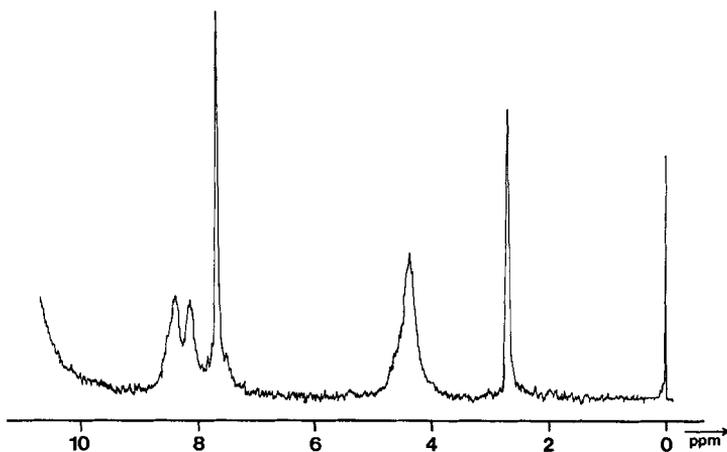


Fig. 4. NMR.-Spektrum von 6-[(*N*-*p*-Tolyl)-aminomethyl]-5,6,7,8-tetrahydropterin (*Ib*), aufgenommen in FSO_3H

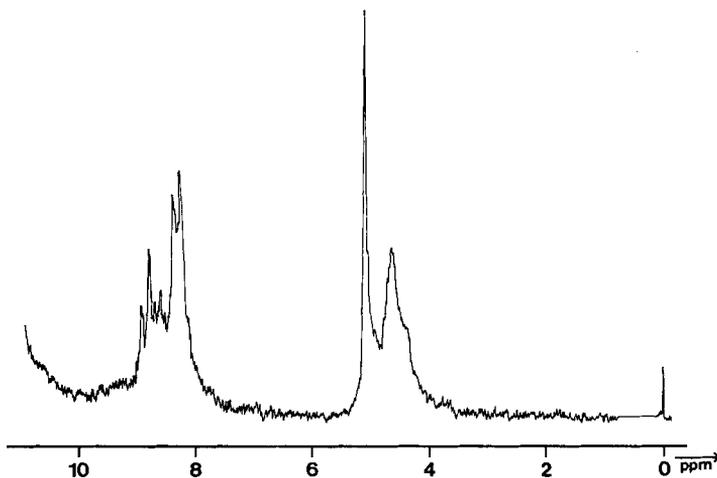


Fig. 5. NMR.-Spektrum von 5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure-methylester (*Ic*), aufgenommen in FSO_3H

methylester (*VIIIc*) mit Ameisensäure in 10-Stellung formyliert [8] und darauf zu *Xb* bzw. *Xc* katalytisch reduziert. Die beiden letzteren Substanzen lagern eine Molekel HCHO an unter Bildung der 5-Hydroxymethyl-10-formyl-tetrahydropterine *XIb* und *XIc*, die sich als reine Substanzen isolieren und anschliessend zu den 5-Methyl-10-formyl-tetrahydropterin *XIIb* und *XIIc* katalytisch reduzieren liessen.

Das $\text{N}(5)\text{-CH}_3$ -Signal erscheint in Trifluoressigsäure als Singulett für *XIIb* bei 3,48 ppm, für *XIIc* bei 3,46 ppm (Fig. 8) und in Fluorsulfonsäure als Dublett [wegen Protonierung am $\text{N}(5)$], für *XIIb* bei 3,76 ppm ($J = 8$ Hz), für *XIIc* bei 3,74 ppm ($J = 6$ Hz). Die Lagen dieser Signale stimmen mit denjenigen des 5,6,7-Trimethyl-tetrahydropterin (*VII*) gut überein. Dieser Befund beweist, dass die NMR.-Spektro-

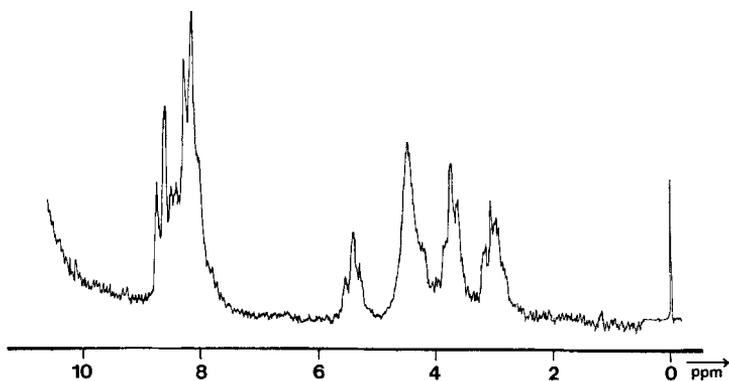


Fig. 6. NMR.-Spektrum von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (Ia), aufgenommen in FSO_3H

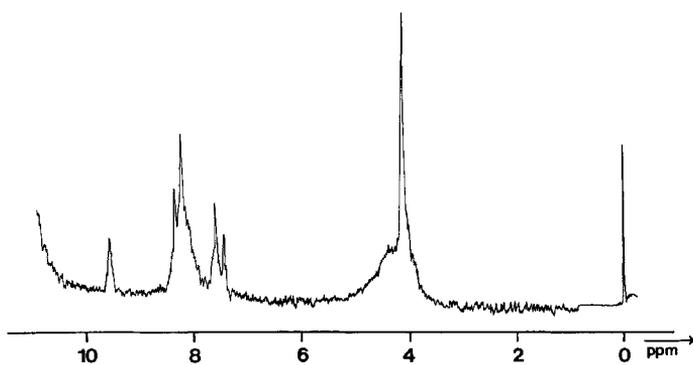


Fig. 7. NMR.-Spektrum von N(10)-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropteroin-säure-methylester (Xc), aufgenommen in CF_3COOH

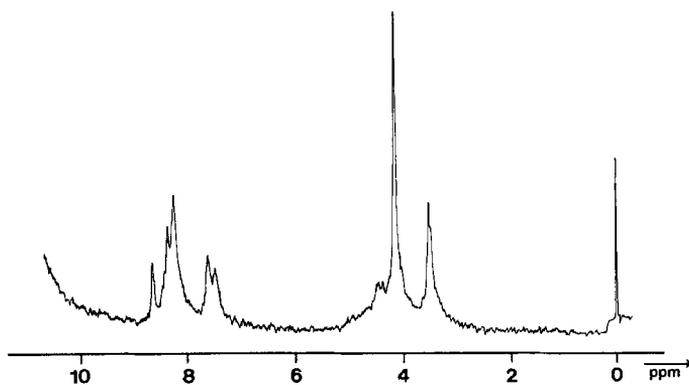
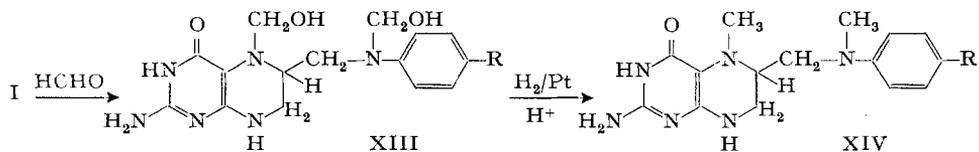


Fig. 8. N(5)-Methyl-N(10)-formyl-5,6,7,8-tetrahydropteroin-säure-methylester (XIIc), aufgenommen in CF_3COOH

metrie für die Konstitutionsaufklärung von 5-Methyl-tetrahydropterinen mit Vorteil eingesetzt werden kann.

Daraufhin dehnten wir die Versuche auf die Modellsubstanzen Ib und Ic aus: mit überschüssigem Formaldehyd werden isolierbare Addukte gebildet, deren Ele-



mentaranalysen für die Strukturen XIII (b und c) sprechen, in welchen je zwei Molekeln HCHO angelagert sind. Nach katalytischer Hydrierung liefern beide Addukte Tetrahydropterine mit 2 N-CH₃-Gruppierungen (Elementaranalysen, NMR.-Spektren). Die Integrale der N-CH₃-Protonen sprechen für die Anwesenheit von 6 solcher Protonen pro Molekel; es kann sich also nicht um Mischungen von 5-Methyl- und 10-Methyl-tetrahydropterin handeln, sondern es müssen 5,10-Dimethyl-tetrahydropterine vorliegen.

Lässt man unter gleichen Bedingungen Ib mit nur einem Mol-Äqu. HCHO reagieren, so wird dieser Formaldehyd an den N(5)- und den N(10)-Atomen angelagert, wobei die 5-Stellung gegenüber der 10-Stellung kaum bevorzugt wird, und es entsteht immer, neben unverändertem Edukt Ib, das Produkt XIII b. Anders verhält sich Ic: hier wird die 5-Stellung deutlich gegenüber der 10-Stellung bevorzugt und es entsteht immer eine Mischung von Addukten, die wir nicht näher untersucht haben. In diesem speziellen Fall schliessen wir die Möglichkeit einer teilweisen Imidazolidinring-Bildung nicht aus. Wird die Formaldehyd-Konzentration erhöht, so wird die N(5)-Anlagerung vervollständigt, aber gleichzeitig nimmt auch die N(10)-Hydroxymethylierung zu.

Zusammenfassend können wir sagen, dass unter den von uns gewählten Bedingungen die Anlagerung von HCHO zu Hydroxymethyl-Gruppierungen führt und dass kein einheitliches Imidazolidin-Derivat von Ib und Ic erhalten werden kann. Deutlich ist der Einfluss der p*K*_s-Werte der 5- bzw. 10-Aminogruppe auf das Anlagerungsverhalten von HCHO, und es ist durchaus möglich, dass die Tetrahydrofolsäure (Ia), die in der 10-Stellung ein tieferes p*K*_s als Ic besitzen sollte, an dieser Aminogruppe nur wenig Formaldehyd anlagert, auch wenn ein HCHO-Überschuss vorhanden ist. Ob sich das durch Anlagerung an N(5) gebildete Hydroxymethyl-Derivat IIa tatsächlich in ein Imidazolidin-Derivat III a umwandeln kann, bleibt noch abzuklären.

Wir setzen unsere Arbeiten in dieser Richtung fort.

Wir danken Herrn Prof. Dr. W. v. Philipsborn für die NMR.-Spektrenaufnahme, Herrn Prof. Dr. M. Hesse für die Massenspektrenaufnahme und Herrn H. Frohofer, Leiter unserer mikroanalytischen Abteilung, für die Elementaranalysen.

Experimenteller Teil

Die Massenspektren wurden an einem CEC-21-110 B-Gerät (Direkteinlass, 70 eV) registriert. Die NMR.-Spektren wurden mit einem Varian A-60- bzw. HA-100-Kernresonanzspektrographen in CF₃COOH (interner Standard: Tetramethylsilan) oder in FSO₃H (externer Standard: verdünnte

Lösung von Tetramethylsilan in CCl_4 aufgenommen. Abkürzungen: S = Singulett, D = Dublett, T = Triplett, M = Multipllett, br = breit, Pr = Proton(en).

6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin-monosulfat-monohydrat (IV). Nach dem Vorhydrieren von 45 mg PtO_2 in 20 ml Trifluoressigsäure werden 120 mg (0,63 mMol) 6,7-Dimethylpterin [9] zugegeben. Nach 15 Min. ist die Hydrierung beendet (760 Torr, 25°). Nun gibt man 85 mg Schwefelsäure in 2 ml Äthanol und einige Tropfen 5-proz. schweflige Säure zu, filtriert vom Katalysator ab, dampft das Filtrat ein und verdünnt den öligen Rückstand mit einigen Tropfen 5-proz. schwefliger Säure. Zugabe von wenig Norit, kurzes Aufkochen und Filtrieren in ein Gemisch von 10 ml Äthanol und 6 ml Äther ergibt eine weisse Fällung. Diese wird abzentrifugiert, mit heissem Äthanol und mit Äther gewaschen und getrocknet; 151 mg (77,3%) IV. NMR.-Spektrum²⁾ (60 MHz, CF_3COOH): N(5)H und N(8)H: br S, 8,16 ppm, 2 Pr; N(2')H₂: S, 7,76 ppm, 2 Pr; C(6)H und C(7)H: br S, 4,20 ppm, 2 Pr; C(6)—CH₃ und C(7)—CH₃: br S, 1,52 ppm, 6 Pr. NMR. (60 MHz, FSO_3H , Fig. 1): N(5)H und N(8)H: br S, 8,40 ppm, 2 Pr; N(2')H₂: S, 8,10 ppm, 2 Pr; C(6)H und C(7)H: br S, 4,54 ppm, 2 Pr; C(6)—CH₃: D, 1,88 ppm, J = 6 Hz, 3 Pr; C(7)—CH₃: D, 1,76 ppm, J = 6 Hz, 3 Pr. Massenspektrum³⁾: m/e (rel. %) 195 (M⁺, 100), 180 (80), 165 (40), 152 (20), 135 (7), 126 (9), 111 (9), 82,5 (12), 69 (19).

$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Ber.	C 30,86	H 5,50	N 22,50	S 10,30%
(311,33)	Gef. ,,	30,72	,, 5,60	,, 22,28	,, 10,30%

N(5)-Hydroxymethyl-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (V). 100 mg (0,32 mMol) IV werden unter sauerstofffreiem Stickstoff bei Zimmertemperatur in 8 ml Wasser aufgeschlämmt, darauf durch Zutropfen von 2N Natronlauge gelöst (pH 2). Dann setzt man 0,8 ml Formaldehyd (35-proz.) zu und bringt das pH mittels 2N Natronlauge im Lauf von 15 Min. auf 6, wobei das weisse Produkt V auszufallen beginnt. Das Gemisch wird 15 Min. weitergerührt, dann wird die Ausscheidung abzentrifugiert, mit stickstoffgesättigtem Wasser gewaschen und getrocknet (0,05 Torr, 80°, 7 Std.): 60 mg (82,9%) V. NMR. (60 MHz, FSO_3H , Fig. 2): N(5)=CH₂: AB-System: $\delta_A = 8,87$ ppm, $\delta_B = 8,65$ ppm, J = 5 Hz, 2 Pr; N(8)H: br S, 8,42 ppm, 1 Pr; N(2')H₂: br S, 8,16 ppm, 2 Pr; C(6)H und C(7)H: M, 5,18–4,34 ppm, 2 Pr; C(6)—CH₃: D, 1,88 ppm, J = 6 Hz, 3 Pr; C(7)—CH₃: D, 1,76 ppm, J = 6 Hz, 3 Pr.

$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_2$ (225,25)	Ber.	C 47,99	H 6,71	N 31,09%	Gef. C 48,29	H 6,26	N 31,54%
--	------	---------	--------	----------	--------------	--------	----------

N(5),6,7-Trimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin-dihydrochlorid-monohydrat (VII). Nach der Vorhydrierung von 30 mg PtO_2 in 12 ml Trifluoressigsäure werden 100 mg (0,45 mMol) V zugegeben. Nach 45 Min. ist die Hydrierung beendet (760 Torr, 25°). Nun werden 200 mg 12N HCl in 8 ml Methanol zugegeben und der Katalysator abfiltriert. Durch Zugabe von 60 ml Äther wird das weisse Produkt ausgefällt, das abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und getrocknet wird; 122 mg (88,9%) VII. NMR. (60 MHz, CF_3COOH): N(8)H: br S, 8,20 ppm, 1 Pr; N(2')H₂: br S, 7,91 ppm, 2 Pr; C(6)H und C(7)H: M, 4,50–3,68 ppm, 2 Pr; N(5)—CH₃: S, 3,40 ppm, 3 Pr; C(6)—CH₃ und C(7)—CH₃: br S, 1,54 ppm, 6 Pr. NMR. (60 MHz, FSO_3H , Fig. 3): N⁺(5)H: br S, 8,68 ppm, 1 Pr; N(8)H: S, 8,32 ppm, 1 Pr; N(2')H₂: br S, 8,11 ppm, 2 Pr; C(6)H und C(7)H: M, 5,00–4,16 ppm, 2 Pr; N(5)—CH₃: D, 3,70 ppm, J = 5 Hz, 3 Pr; C(6)—CH₃: D, 1,88 ppm, J = 6,5 Hz, 3 Pr; C(7)—CH₃: D, 1,76 ppm, J = 6,5 Hz, 3 Pr. NMR. (100 MHz, D_2O): C(6)H: Q_D⁴⁾, 4,61 ppm, J_{C(6)—H, C(6)—CH₃} = 6 Hz, J_{C(6)—H, C(7)—H} = 3 Hz, 1 Pr; C(7)H: Q_D, 4,24 ppm, J_{C(7)—H, C(7)—CH₃} =

²⁾ Die Zuordnung der >N—H— , bzw. der $\text{—N}^+\text{—H—}$ -Resonanzen erwies sich bei IV, V und VII als schwierig. Das vermehrte Auftreten von Di- und Triktionen (oftmals im Gemisch) lässt sich auf den positiv induktiven Effekt der beiden Methylgruppen zurückführen. Die in dieser Arbeit getroffene Zuordnung stützt sich auf die Zahl der durch Integration erhaltenen Protonen und auf den Vergleich einer grossen Zahl von Spektren.

³⁾ Für die Aufnahme des Massenspektrums wurde das 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterinhydrochlorid [9] verwendet, da das Sulfat nicht verdampfbar ist.

⁴⁾ Q_D = Quartett mit Dublett-Feinstruktur.

⁵⁾ Mit Hilfe des Massenspektrums kann festgestellt werden, dass die Molekel in sehr geringem Masse an zwei weiteren Stellen methyliert ist. Dass diese «Übermethylierung» festgestellt wird, hängt mit der grösseren Flüchtigkeit von N—CH₃- gegenüber N—H-Verbindungen zusammen.

6 Hz, $J_{C(7)-H, C(6)-H} = 3$ Hz, 1 Pr; C(6)—CH₃: D , 1,80 ppm, $J = 6$ Hz, 3 Pr; C(7)—CH₃: D , 1,67 ppm, $J = 6$ Hz, 3 Pr. Massenspektrum⁵): m/e (rel. %) 209 (M^+ , 100), 194 (79), 179 (59), 96 (13), 82 (17), 69 (44).

$C_9H_{15}N_5O_2 \cdot 2HCl, H_2O$	Ber. C 36,00	H 6,37	N 23,33	Cl 23,62%
(300,19)	Gef. ,, 36,05	,, 5,77	,, 23,56	,, 22,79%

N(10)-Formyl-pterovinsäure-methylester-monohydrat (IXc) wird nach einer von Wolf [8] verwendeten und durch uns modifizierten Methode hergestellt. Eine Lösung von 150 mg (0,46 mMol) VIIIc [1] in 12 ml Ameisensäure (99-proz.) wird unter Stickstoff 2 Std. auf dem Dampfbad gehalten. Anschliessend wird abgekühlt und die Lösung auf ca. 3 ml eingengt. Nach Zugabe von 6 ml Wasser (Fällung des gelbbraunen Formylderivates) wird mittels konz. Ammoniak das pH auf 6 gebracht. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet: 146 mg (84,9%) IXc. NMR. (60 MHz, CF₃COOH): C(7)H: S , 9,08 ppm, 1 Pr; Formyl-H: S , 8,79 ppm, 1 Pr; N(2')H₂: $br S$, 8,74 ppm, 2 Pr; arom. Pr: AB -System: $\delta_A = 8,25$ ppm, $\delta_B = 7,59$ ppm, $J = 9$ Hz, 4 Pr; C(9)H₂: S , 5,55 ppm, 2 Pr; O—CH₃: S , 4,13 ppm, 3 Pr. (60 MHz, FSO₃H): C(7)H: S , 9,40 ppm, 1 Pr; Formyl-H: S , 9,25 ppm, 1 Pr; arom. Pr: AB -System: $\delta_A = 8,65$ ppm, $\delta_B = 8,19$ ppm, $J = 8$ Hz, 4 Pr; C(9)H₂: S , 6,16 ppm, 2 Pr; O—CH₃: S , 4,94 ppm, 3 Pr.

$C_{16}H_{14}N_6O_4 \cdot H_2O$ (372,34) Ber. C 51,61 H 4,33 N 22,57% Gef. C 51,73 H 4,30 N 22,82%

N(10)-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterovinsäure-methylester-dihydrochlorid (Xc). Nach der Vorhydrierung von 23 mg PtO₂ in 10 ml Trifluoressigsäure werden 100 mg (0,28 mMol) IXc zugegeben. Nach 2 Std. sind 2 Mol.-Äqu. Wasserstoff aufgenommen (760 Torr, 25°). Nun werden 170 mg 12N HCl in 3 ml Methanol zugegeben und der Katalysator abfiltriert. Durch Zugabe von 60 ml Äther wird das Produkt ausgefällt. Der weisse Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und getrocknet (0,05 Torr, 20°, 8 Std.): 120 mg (98,9%) Xc. NMR. (60 MHz, CF₃COOH, Fig. 7): Formyl-H: S , 9,55 ppm, 1 Pr; arom. Pr: AB -System: $\delta_A = 8,21$ ppm, $\delta_B = 7,45$ ppm, $J = 8$ Hz, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: M , 4,82–3,92 ppm, 5 Pr; O—CH₃: S , 4,09 ppm, 3 Pr. (60 MHz, FSO₃H): Formyl-H: S , 9,56 ppm, 1 Pr; arom. Pr: AB -System: $\delta_A = 8,77$ ppm, $\delta_B = 8,11$ ppm, $J = 8$ Hz, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: M , 5,40–4,00 ppm, 5 Pr; O—CH₃: S , 5,04 ppm, 3 Pr.

$C_{16}H_{18}N_6O_4 \cdot 2HCl$	Ber. C 44,55	H 4,67	N 19,48	Cl 16,44%
(431,28)	Gef. ,, 44,36	,, 4,95	,, 20,14	,, 15,32%

N(5)-Hydroxymethyl-N(10)-formyl-5,6,7,8-tetrahydropterovinsäure-methylester (XIc). 100 mg (0,23 mMol) Xc werden unter sauerstofffreiem Stickstoff in 16 ml 50-proz. Methanol und 0,5 ml 2N NaOH gelöst (25°). Durch Zutropfen von 1N HCl wird das pH auf 7 gebracht. Dann setzt man 0,4 ml Formaldehyd (35-proz.) zu und bringt durch weitere Zugabe von 1N HCl das pH auf 3, wobei langsam eine schwach hellgelbe Trübung erscheint. Im Lauf von 15 Min. wird das pH mittels 2N NaOH auf 6 gebracht. Nach weiterem Rühren während 15 Min. wird der entstandene Niederschlag abzentrifugiert, mit stickstoffgesättigtem Wasser gewaschen und getrocknet (0,05 Torr, 80°, 8 Std.): 59 mg (65,5%) XIc.

$C_{17}H_{20}N_6O_5$ (388,38) Ber. C 52,57 H 5,19% Gef. C 52,31 H 4,85%

N(5)-Methyl-N(10)-formyl-5,6,7,8-tetrahydropterovinsäure-methylester-dihydrochlorid (XIIc). Nach der Vorhydrierung von 30 mg PtO₂ in 18 ml Trifluoressigsäure werden 100 mg (0,26 mMol) XIc zugegeben. Nach 2½ Std. ist die Wasserstoffaufnahme beendet (760 Torr, 25°). Nun werden 180 mg 12N HCl in 4 ml Methanol zugegeben und der Katalysator abfiltriert. Durch Zugabe von 80 ml Äther wird das Produkt XIIc ausgefällt. Anschliessend wird abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und getrocknet (0,05 Torr, 20°, 6 Std.): 110 mg (95,9%) XIIc. NMR. (60 MHz, CF₃COOH, Fig. 8): Formyl-H: S , 8,61 ppm, 1 Pr; arom. Pr: AB -System: $\delta_A = 8,22$ ppm, $\delta_B = 7,50$ ppm, $J = 8$ Hz, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: M , 5,36–3,66 ppm, 5 Pr; O—CH₃: S , 4,09 ppm, 3 Pr; N(5)—CH₃: S , 3,46 ppm, 3 Pr. NMR. (60 MHz, FSO₃H): Formyl-H: S , 9,14 ppm, 1 Pr; arom. Pr: AB -System: $\delta_A = 8,73$ ppm, $\delta_B = 8,11$ ppm, $J = 8$ Hz, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: M , 5,16–4,34 ppm, 5 Pr; O—CH₃: S , 4,96 ppm, 3 Pr; N(5)—CH₃: D , 3,74 ppm, $J = 6$ Hz, 3 Pr.

$C_{17}H_{20}N_6O_4 \cdot 2HCl$	Ber. C 45,84	H 4,98	N 18,87	Cl 15,92%
(445,31)	Gef. ,, 45,45	,, 5,35	,, 19,13	,, 15,33%

6-[[*N(10)-Formyl-N-p-tolyl-aminomethyl*]-pterin (IXb) [1] [8] wird analog IXc dargestellt, Ausbeute: 91,4%. NMR. (60 MHz, CF₃COOH): C(7)H: S , 8,90 ppm, 1 Pr; Formyl-H: S , 8,56 ppm.

1 Pr; N(2')H₂: *br S*, 8,56 ppm, 2 Pr; aromat. Pr: *S*, 7,18 ppm, 4 Pr; C(9)H₂: *S*, 5,41 ppm, 2 Pr; C(1')—CH₃: *S*, 2,36 ppm, 3 Pr. (60 MHz, FSO₃H): C(7)H: *S*, 9,44 ppm, 1 Pr; Formyl-H: *S*, 9,06 ppm, 1 Pr; N(2')H₂: *br S*, 8,19 ppm, 2 Pr; aromat. Pr: *S*, 7,74 ppm, 4 Pr; C(9)H₂: *S*, 6,16 ppm, 2 Pr; C(1')—CH₃: *S*, 2,72 ppm, 3 Pr. Massenspektrum: *m/e* (rel. %) 310 (*M*⁺, 10), 282 (36), 265 (8), 177 (37), 176 (30), 107 (76), 106 (100), 91 (33).

C₁₅H₁₄N₆O₂ (310,31) Ber. C 58,05 H 4,55 N 27,09% Gef. C 58,40 H 4,29 N 27,43%

6-[[*N*(10)-Formyl-*N*-*p*-tolyl]-aminomethyl]-5,6,7,8-tetrahydropterin-dihydrochlorid (*Xb*) wird analog *Xc* dargestellt. Ausbeute: 96,2%. NMR.-Spektrum: (60 MHz, CF₃COOH): Formyl-H: *S*, 9,20 ppm, 1 Pr; N(2')H₂: *br S*, 8,00 ppm, 2 Pr; aromat. Pr: *S*, 7,28 ppm, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: *M*, 5,00–3,80 ppm, 5 Pr; C(1')—CH₃: *S*, 2,40 ppm, 3 Pr. NMR. (60 MHz, FSO₃H): Formyl-H: *S*, 9,06 ppm, 1 Pr; N(5)H: *br S*, 8,34 ppm, 1 Pr; N(2')H₂: *S*, 7,96 ppm, 2 Pr; aromat. Pr: *S*, 7,64 ppm, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: *M*, 5,28–4,11 ppm, 5 Pr; C(1')—CH₃: *S*, 2,68 ppm, 3 Pr.

C₁₅H₁₈N₆O₂·2HCl Ber. C 46,51 H 5,20 N 21,70 Cl 18,31%
 (387,27) Gef. ,, 46,81 ,, 5,19 ,, 22,27 ,, 18,37%

6-[[*N*(5)-Hydroxymethyl-*N*(10)-formyl-*N*-*p*-tolyl]-aminomethyl]-5,6,7,8-tetrahydropterin (*XIb*). 100 mg (0,26 mMol) *Xb* werden unter Sauerstoffausschluss in 8 ml Wasser, 11 ml Methanol und 0,8 ml Formaldehyd (35%) gelöst (25°). Die Lösung wird 15 Min. gerührt, dann wird im Lauf von 15 Min. das pH mittels 2*N* NaOH auf 6 gebracht. Nach weiteren 15 Min. Rühren wird die Lösung eingengt, bis das Produkt massiv auszufallen beginnt. Nach Stehen über Nacht im Kühlschrank wird die Suspension abzentrifugiert, mit kaltem, stickstoffgesättigtem Wasser gewaschen und getrocknet (0,05 Torr, 80°, 6 Std.); 57 mg (64,0%) *XIb*.

C₁₆H₂₀N₆O₃ (344,37) Ber. C 55,80 H 5,85 N 24,41% Gef. C 55,67 H 5,75 N 24,44%

6-[[*N*(5)-Methyl-*N*(10)-formyl-*N*-*p*-tolyl]-aminomethyl]-5,6,7,8-tetrahydropterin-dihydrochlorid-monohydrat (*XIIb*) wird analog *XIIc* dargestellt. Ausbeute: 90,2%. NMR. (60 MHz, CF₃COOH): Formyl-H: *S*, 8,46 ppm, 1 Pr; N(2')H₂: *br S*, 8,06 ppm, 2 Pr; aromat. Pr: *S*, 7,29 ppm, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: *M*, 5,00–3,80 ppm, 5 Pr; N(5)—CH₃: *S*, 3,48 ppm, 3 Pr; C(1')—CH₃: *S*, 2,44 ppm, 3 Pr. NMR. (60 MHz, FSO₃H): Formyl-H: *S*, 9,06 ppm, 1 Pr; N⁺(5)H: *br S*, 8,26 ppm, 1 Pr; N(2')H₂: *S*, 7,98 ppm, 2 Pr; aromat. Pr: *S*, 7,66 ppm, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: *M*, 5,32–4,34 ppm, 5 Pr; N(5)—CH₃: *D*, 3,76 ppm, *J* = 8 Hz, 3 Pr; C(1')—CH₃: *S*, 2,69 ppm, 3 Pr.

C₁₆H₂₀N₆O₃·2HCl, H₂O Ber. C 45,82 H 5,76 N 20,04 Cl 16,91%
 (419,31) Gef. ,, 46,00 ,, 5,85 ,, 20,89 ,, 16,81%

5,6,7,8-Tetrahydropterinsäure-methylester-trihydrochlorid-monohydrat (*Ic*). Nach der Vorhydrierung von 23 mg PtO₂ in 10 ml Trifluoressigsäure werden 100 mg (0,31 mMol) Pterinsäure-methylester VIIIc [1] zugegeben. Nach 2 Std. sind 2 Mol-Äqu. Wasserstoff aufgenommen (760 Torr, 25°). Vom Katalysator wird abfiltriert. Das Filtrat wird mit 170 mg 12*N* HCl in 3 ml Methanol versetzt, wobei das weisse Produkt ausfällt. Durch Zugabe von 60 ml Äther wird die Fällung vervollständigt, dann wird der Niederschlag abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und getrocknet: 125 mg (89,2%) *Ic*. NMR. (60 MHz, CF₃COOH⁶⁾): aromat. Pr: *AB*-System: δ_A = 8,22 ppm, δ_B = 7,70 ppm, *J* = 8 Hz, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: *br S*, 4,08 ppm, 5 Pr; O—CH₃: *S*, 4,08 ppm, 3 Pr. NMR. (60 MHz, FSO₃H, Fig. 5): aromat. Pr: *AB*-System: δ_A = 8,85 ppm, δ_B = 8,31 ppm, *J* = 8 Hz, 4 Pr; O—CH₃: *S*, 5,19 ppm, 3 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: *br S*, 4,61 ppm, 5 Pr.

C₁₅H₁₈N₆O₃·3HCl, H₂O Ber. C 39,35 H 5,06 N 18,36 Cl 23,23%
 (457,75) Gef. ,, 40,15 ,, 5,16 ,, 18,20 ,, 23,38%

N(5), *N*(10)-Dihydroxymethyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäure-methylester (*XIIIc*). 100 mg (0,22 mMol) *Ic* werden unter sauerstofffreiem Stickstoff in 10 ml Wasser (25°) gelöst. Mittels 2*N* NaOH wird das pH auf 1,3 gebracht, dann wird die Lösung mit 1 ml Formaldehyd (35-proz.) versetzt und 30 Min. gerührt, darauf wird das pH im Lauf von 30 Min. auf 6 gebracht (2*N*, NaOH), wobei das Produkt langsam auszufallen beginnt. Nach 15 Min. Rühren wird der hellgelbe Niederschlag abzentrifugiert, mit stickstoffgesättigtem Wasser gewaschen und getrocknet (0,05 Torr, 80°, 8 Std.): 65 mg (76,2%) *XIIIc*.

C₁₇H₂₂N₆O₅ (390,39) Ber. C 52,30 H 5,68 N 21,53% Gef. C 51,94 H 5,40 N 21,67%

⁶⁾ Da das Hydrochlorid in CF₃COOH unlöslich ist, wurde das lösliche Sulfat verwendet.

N(5), N(10)-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäure-methylester-dihydrochlorid-monohydrat (XIVc) wird analog XIIc dargestellt. Ausbeute: 95,6%. NMR. - Spektrum: (60 MHz, CF₃COOH): N(2')H₂ und arom. Pr: *M*, 8,50–7,60 ppm, 6 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂; *br S*, 4,08 ppm, 5 Pr; O—CH₃: *S*, 4,08 ppm, 3 Pr; N(5)—CH₃: *S*, 3,46 ppm, 3 Pr; N(10)—CH₃: *S*, 3,29 ppm, 3 Pr. NMR. (60 MHz, FSO₃H): N(2')H₂, N+(5)H, N+(10)H und arom. Pr: *M*, 9,20–7,80 ppm, 8 Pr; O—CH₃: *S*, 5,10 ppm, 3 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: *br S*, 4,70 ppm, 5 Pr; N(5)—CH₃ und N(10)—CH₃: *br S*, 4,00 ppm, 6 Pr.

C₁₇H₂₂N₆O₃·2HCl·H₂O Ber. C 45,43 H 5,83 N 18,70 Cl 15,78%
(449,35) Gef. „ 45,74 „ 5,48 „ 19,54 „ 15,93%

6-[[*N-p-Tolyl-aminomethyl*]-5,6,7,8-tetrahydropterin-tetrahydrochlorid (*Ib*)] wird analog Ic dargestellt. Ausbeute: 90,4%. NMR. (100 MHz, FSO₃H, Fig. 4): N+(10)H₂ und N(5)H: *M*, 8,80–8,40 ppm, 3 Pr; N(2')H₂: *S*, 8,27 ppm, 2 Pr; arom. Pr: *AB*-System: δ_A = 7,82 ppm, δ_B = 7,74 ppm, *J* = 9 Hz, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: *br S*, 4,45 ppm, 5 Pr; C(1')—CH₃: *S*, 2,76 ppm, 3 Pr. Massenspektrum: *m/e* (rel. %) 286 (M⁺, 6), 181 (11), 177 (22), 166 (43), 163 (26), 119 (47), 107 (65), 106 (100), 91 (60), 79 (13), 77 (20).

C₁₄H₁₈N₆O₄·4HCl Ber. C 38,90 H 5,13 N 19,44 Cl 32,81%
(432,20) Gef. „ 39,27 „ 5,58 „ 20,89 „ 31,27%

6-[[*N(5), N(10)-Dihydroxymethyl-N-p-tolyl-aminomethyl*]-5,6,7,8-tetrahydropterin (*XIIIb*)] 100 mg (0,23 mMol) *Ib* werden unter sauerstofffreiem Stickstoff in 8 ml Wasser (25°) gelöst und mit 0,8 ml Formaldehyd (35-proz.) versetzt. Nach 30 Min. Rühren wird das pH im Lauf von 30 Min. auf 6 gebracht (2*N* NaOH), wobei das Produkt langsam auszufallen beginnt. Nach weiterem Rühren während 15 Min. wird der Niederschlag abzentrifugiert, mit stickstoffgesättigtem Wasser gewaschen und getrocknet (0,05 Torr, 80°, 6 Std.): 62 mg (77,4%) *XIIIb*.

C₁₆H₂₂N₆O₃ (346,38) Ber. C 55,48 H 6,40 N 24,26% Gef. C 55,36 H 6,27 N 24,69%

6-[[*N(5), N(10)-Dimethyl-N-p-tolyl-aminomethyl*]-5,6,7,8-tetrahydropterin-dihydrochlorid-dihydrat (*XIVb*)] wird analog XIIc dargestellt. Ausbeute: 90,3%. NMR. - Spektrum: (100 MHz, CF₃COOH): N(2')H₂: *br S*, 8,25 ppm, 2 Pr; arom. Pr: *M*, 7,80–7,14 ppm, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: *M*, 4,60–3,88 ppm, 5 Pr; N(5)—CH₃ und N(10)—CH₃: *br S*, 3,52 ppm, 6 Pr; C(1')—CH₃: *S*, 2,48 ppm, 3 Pr. (100 MHz, FSO₃H): N+(5)H: *br S*, 8,52 ppm, 1 Pr; N(2')H₂: *br S*, 8,23 ppm, 2 Pr; arom. Pr: *M*, 8,10–7,50 ppm, 4 Pr; C(6)H, C(7)H₂ und C(9)H₂: *M*, 4,80–4,22 ppm, 5 Pr; N(5)—CH₃ und N(10)—CH₃: *br S*, 3,86 ppm, 6 Pr; C(1')—CH₃: *S*, 2,74 ppm, 3 Pr.

C₁₆H₂₂N₆O₄·2HCl·2H₂O Ber. C 45,39 H 6,67 N 19,85 Cl 16,75%
(423,34) Gef. „ 45,24 „ 6,41 „ 19,61 „ 15,71%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 38. Mitteilung: *M. Viscontini & J. Bieri*, *Helv.* 54, 2291 (1971).
- [2] *R. L. Kisljuk & W. Sakami*, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 1456 (1954).
- [3] *R. L. Blakley*, *Biochem. J.* 58, 448 (1954).
- [4] *M. J. Osborn, P. T. Talbert & F. M. Huennekens*, *J. Amer. chem. Soc.* 227, 805 (1960); *R. L. Blakley*, «The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines», Wiley, New York 1969; *R. G. Kallen*, *Methods in Enzymology* 18, 705 (1971).
- [5] *R. L. Kisljuk*, *J. biol. Chemistry* 227, 805 (1957).
- [6] *S. Matsuura & T. Sugimoto*, *Research Bulletin (Dept. General Educ., Nagoya Univ.)* 13, 9 (1969); «Chemistry and Biology of Pteridines», S. 35. International Academic Printing Co. Tokyo 1970; *J. M. Whiteley, J. H. Draiss & F. M. Huennekens*, *Arch. Biochemistry Biophysics* 133, 436 (1969).
- [7] *A. Bobst & M. Viscontini*, *Helv.* 49, 875 (1966).
- [8] *D. E. Wolf et al.*, *J. Amer. chem. Soc.* 69, 2753 (1947).
- [9] *H. J. X. Mager, R. Addink & W. Berends*, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 86, 833 (1967).