

thermische Isomerisierung, alkalische Verseifung in Methanol und Chromatographie an Kieselgel ergab 1 α -Hydroxycholecalciferol (7); Smp. 138–139,5° (Ameisensäuremethylester); $[\alpha]_D = +29^\circ$ (Lit. [2]: Smp. 132–133°, $[\alpha]_D$ in Äther = +26°); IR.-Spektrum (KBr): 3434, 1648, 1630, 1060, 897 cm⁻¹; UV.-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{\max}(\epsilon) = 264$ nm (17600) (Lit. [2]: 264 nm (20200) in Äther); NMR.-Spektrum (CDCl₃) δ -Werte: 0,55, s, 18-CH₃; 0,87, d, $J \cong 7$ Hz, 26- und 27-CH₃; 0,93, d, $J \cong 5$ Hz, 21-CH₃; $\cong 4,22$, m und $\cong 4,45$, m, >CH-OH; 5,02, m und 5,34, m, =CH₂; $\cong 6,01$, d und $\cong 6,39$, d (durch Fernkopplung verbreitert, $J = 11$ Hz), =CH-CH=; MS.: $M^+ 400$, m/e 382, 364, 287, 269, 152, 134 (Lit. [1]: $M^+ 400$, m/e 287, 152, 134).

1 α -Hydroxycholecalciferol (7) ist biologisch aktiv [1] [2]; über eigene biologische Befunde wird später berichtet.

Für die Spektralaufnahmen und Elementaranalysen möchten wir Frl. Dr. *M. Grosjean* und den Herren Dres. *W. Arnold*, *A. Dirscherl*, *G. Englert*, *K. Noack* und *W. Vetter* aus unserer physikalisch-chemischen Abteilung unseren Dank aussprechen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *M. F. Holick, E. J. Semmler, H. K. Schnoes & H. F. DeLuca*, *Science* 180, 190 (1973).
 [2] *D. H. R. Barton, R. H. Hesse, M. M. Pechel & E. Rizzardo*, *J. Amer. chem. Soc.* 95, 2748 (1973).
 [3] *B. Pelc & E. Kodicek*, *J. chem. Soc. (C)* 1970, 1624.
 [4] *M. Lj. Mihailović, Lj. Lorenc, N. Popov & J. Kalvoda*, *Helv.* 54, 2281 (1971).
 [5] *H. H. Inhoffen & Huang-Minlon*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 71, 1720 (1938).
 [6] *A. L. Wilds & C. Djerassi*, *J. Amer. chem. Soc.* 68, 1712 (1946).

169. Über Pterinchemie

42. Mitteilung [1]

Synthese von 6-Hydroxymethyl-mono-, di- und triphosphat sowie deren 7,8-Dihydroderivate¹⁾

von **Max Viscontini²⁾** und **Yoshiteru Furuta**

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

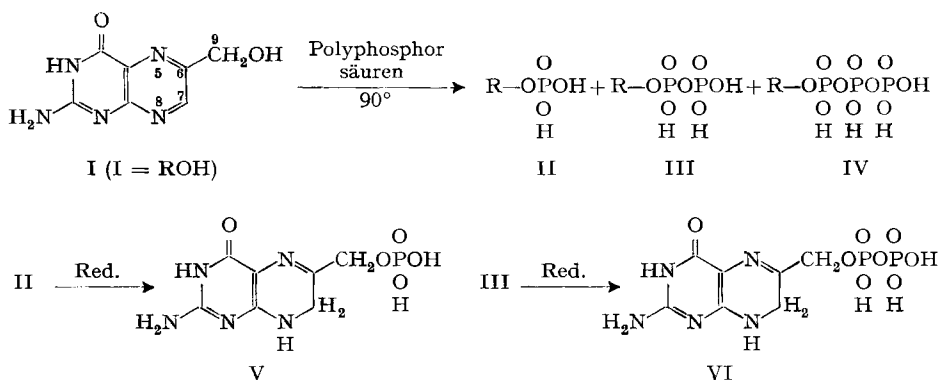
(10. V. 73)

Zusammenfassung. Die Behandlung des 6-Hydroxymethylpterins mit Polyphosphorsäure führt zur Bildung der Mono-, Di- und Triphosphorsäureester. Durch Chromatographie mittels Ionenaustauscher wurden die einzelnen Ester rein erhalten und konnten charakterisiert werden. Die Reduktion des Mono- und des Diphosphates mit Natriumdithionit ergibt die entsprechenden 7,8-Dihydroderivate.

Das 6-Hydroxymethyl-pterin (I), sein 7,8-Dihydroderivat und deren Phosphate II, III, IV, V und VI sind wichtige Vorstufen der Folsäure-Biosynthese [2].

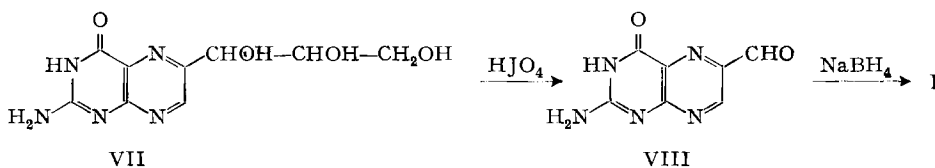
¹⁾ Teil der geplanten Dissertation von *Y. Furuta*, Zürich 1973.

²⁾ Herrn Prof. Dr. *F. Leuthardt* zum 70. Geburtstag gewidmet.



Die Ortho-, Pyro- und Triphosphorsäure-Ester II, III und IV waren bis jetzt chemisch schwer zu erhalten [3]. Die hier beschriebene einfache Synthese macht nun diese Produkte leicht zugänglich.

Die in unserem Laboratorium verbesserte Herstellung von 6-Formyl-pterin (VIII), (VII \rightarrow VIII), [4] hat die Gewinnung des Hydroxymethylpterins (I) mittels NaBH_4 -Reduktion erleichtert. Bei Behandlung dieses Pterins I mit Polyphosphorsäure, in



Anlehnung an die von uns für Coenzyme-Synthesen oft verwendete Phosphorylierungsmethode [5] bildet sich eine Mischung von 6-Hydroxymethyl-phosphat (II), -pyrophosphat (III) und -triphosphat (IV), die sich durch Chromatographie über Dowex 1 \times 8 auftrennen lässt. Die Reduktion des Monophosphates II, bzw. des Diphosphates III mit Natriumdithionit führt zu den entsprechenden 7,8-Dihydroderivaten V und VI. Alle erhaltenen Produkte sind analysenrein, so dass jetzt ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften beschrieben werden können.

Wir danken Herrn Prof. Dr. W. v. Philipsborn für die Aufnahme der NMR.-Spektren, Herrn H. Frohofer für die Mikroanalysen und dem Schweizerischen Nationalfonds für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen: Der für sauerstoffempfindliche Reaktionen verwendete Stickstoff wird zur Reinigung über erhitzte Cu-Späne (400°) geleitet. Da Phosphorsäureester hygroskopisch sind, werden sie vor den Analysen mit Luft über Nacht equilibriert, nachdem man sie bei Zimmertemperatur und $5 \cdot 10^{-2}$ Torr getrocknet hatte. Der Phosphor wird nach Berenblum & Chain [6] bestimmt. Der hydrolysierbare Phosphor wird aus den Phosphorwerten berechnet, welche vor und nach der Hydrolyse mit 1N HCl bei 100° während 15 Min. erhalten werden. Die NMR.-Spektren werden mit einem VARIAN A-60-Kernresonanzspektrographen gemessen (interner Standard: Tetramethylsilan). Abkürzungen: S = Singulett, D = Dublett, br = breit, Pr = Proton(en).

6-Hydroxymethyl-pterin (I). Das aus 4 g (16 mMol) L-Neopterin (VII) feucht erhaltene 6-Formylpterin (VIII) [4] wird in 600 ml 5-proz. NaHCO_3 -Lösung suspendiert. Die Suspension wird

unter N_2 -Strom tropfenweise mit 2N NaOH, bis zum vollständigen Auflösen versetzt. Hierauf gibt man 2,4 g (60 mMol) $NaBH_4$ zu, lässt 1 Std. bei Zimmertemperatur reagieren und stellt mit CH_3COOH auf pH 5 ein. Nach 15-std. Stehen im Kühlschrank wird das nun vollständig auskristallisierte 6-Hydroxymethyl-pterin (I) abzentrifugiert, je dreimal mit wenig Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und aus heisser 0,01N HCl umkristallisiert: 2,3 g (12 mMol, 75%) farblose Nadeln. Nach dem Ergebnis der Papierelektrophorese ist das Produkt rein und frei von Pterin-6-carbonsäure. NMR. (60 MHz, CF_3COOH , Fig. 1): C(9)H₂: S, 5,20 ppm, 2 Pr; N(2)H₂: br S, 8,5 ppm, 2 Pr; C(7)H: S, 8,98 ppm, 1 Pr.

$C_7H_7N_5O_2$ (193,17) Ber. C 43,52 H 3,65 N 36,26% Gef. C 43,46 H 3,85 N 36,83%

Phosphorylierung von 6-Hydroxymethyl-pterin. 2,5 ml 85proz. Phosphorsäure werden auf offener Flamme erhitzt, bis sich die anfangs klare Flüssigkeit eben zu trüben beginnt. Hierauf lässt man die Masse abkühlen, bringt das Gefäss mit den gebildeten Polyphosphorsäuren in ein Ölbad von 90–100°, und trägt 500 mg 6-Hydroxymethyl-pterin ein. Man belässt die gelbe Masse unter Rühren mit einem Glasstab während 15 Min. im Bad von 90–100°, wobei sie langsam braun wird. Man kühlt ab, löst die Masse in 1 ml Eiswasser und füllt durch Zusatz von 500 ml abs.

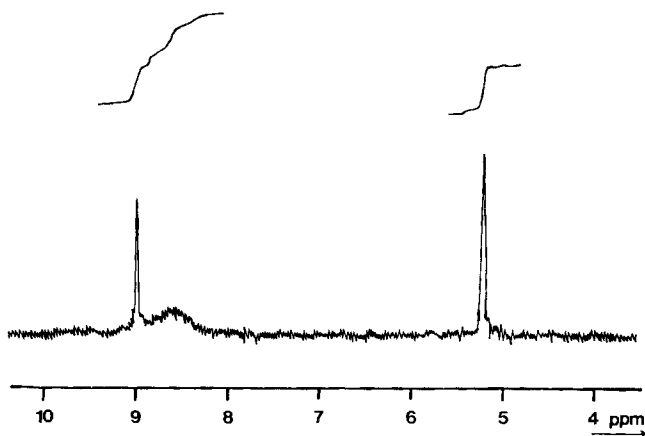


Fig. 1. NMR.-Spektrum von 6-Hydroxymethyl-pterin (I) in CF_3COOH aufgenommen
Erläuterungen siehe im experimentellen Teil

Äthanol die Reaktionsprodukte aus, die nach 3 Std. Stehen im Kühlschrank abzentrifugiert und je dreimal mit Äthanol und Äther gewaschen werden. Man erhält 620 mg einer Mischung, welche – wie die Papierelektrophorese zeigt – aus 6-Hydroxymethyl-pterin-monophosphat (II), -diphosphat (III) und -triphosphat (IV) neben wenig Edukt besteht (siehe Tabelle I).

Trennung der verschiedenen Phosphorsäureester. Die obige Mischung (620 mg) wird in 700 ml Wasser gelöst und das pH der Lösung mit $NaHCO_3$ auf 7 eingestellt. Nach Filtrieren wird die Lösung über eine mit Dowex 1 × 8 (Cl^-) beschickte Säule (3 × 25 cm) chromatographiert, wobei

Papierelektrophoretische Charakterisierung

Wanderung zur Anode nach $1\frac{1}{2}$ Std. Elektrophorese in einer 0,05M Phosphatpufferlösung, pH 5,8 (15 Volt/cm, 1 mA/cm Streifenbreite)

Substanzen	Wanderung in mm
6-Hydroxymethyl-pterin	– 5
6-Hydroxymethyl-pterin-monophosphat	+ 29
–do– -diphosphat	+ 45
–do– -triphosphat	+ 56

man mit 300 ml Wasser das vorhandene 6-Hydroxymethyl-pterin eluiert. Nunmehr werden das 6-Hydroxymethyl-pterin-monophosphat (II) mit 0,01N HCl, das -diphosphat (III) mit 0,05N HCl und das -triphosphat (IV) mit 0,1N HCl eluiert. Die Elution der Ester lässt sich bequem durch ihre Fluoreszenz auf der Säule verfolgen; die einzelnen Produkte lassen sich papierelektrophoretisch identifizieren.

6-Hydroxymethyl-pterin-monophosphat (II). Die das Phosphat II enthaltenden Fraktionen werden im Rotationsverdampfer (30°) auf $\frac{1}{10}$ Volumen eingengt. Nach 15 Std. Stehen im Kühlschrank zentrifugiert man das ausgefallenen Phosphat II ab, wäscht zweimal mit wenig Eiswasser, je dreimal mit Äthanol und Äther und trocknet im Hochvakuum: 314 mg Rohprodukt, das man in 300 ml heissem Wasser löst. Man versetzt die filtrierte, warme Lösung mit 0,6 ml 12N HCl. Beim Erkalten kristallisieren langsam 273 mg 6-Hydroxymethyl-pterin-phosphat in gelbblassen Mikrokristallen aus. NMR. (60 MHz, CF_3COOH , Fig. 2): C(9)H₂: D, 5,25 ppm, 2 Pr; N(2')H₂: br S, 8,5 ppm, 2 Pr; C(7)H: S, 9,02 ppm, 1 Pr.

$C_7H_8N_6O_5P \cdot H_2O$	Ber. C 28,87	H 3,44	N 24,05	P 10,64	P (hydrolys.)	0 %
(291,17)	Gef. „ 27,86	„ 3,81	„ 23,75	„ 10,27	„	0,11 %

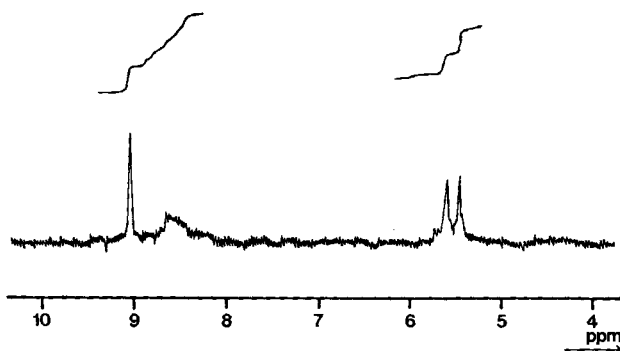


Fig. 2. NMR.-Spektrum von 6-Hydroxymethyl-pterinphosphat (II) in CF_3COOH aufgenommen

6-Hydroxymethyl-pterin-diphosphat (III). Die das Diphosphat III enthaltenden Fraktionen werden mit 1N LiOH auf pH 7 eingestellt, da der Ester in saurem Milieu leicht hydrolysiert wird. Hierauf dampft man im Vakuum (20°) ein und versetzt den Rückstand mit 200 ml abs. Methanol, worauf das LiCl in Lösung geht und das Li-Salz des Diphosphatesters unlöslich bleibt. Dieses Salz wird abzentrifugiert und je dreimal mit Äthanol und Äther gewaschen. Umkristallisation aus wenig Wasser durch vorsichtige Zugabe von Äthanol: 155 mg.

Der freie Diphosphatester III wird mittels Kationenaustauscher gewonnen. Die ganze Arbeit wird im Kühllabor (4°) durchgeführt, um die Hydrolyse des Esters zu vermeiden. Eine Lösung von 155 mg Li-Salz in 20 ml Wasser wird über eine mit Dowex 50W (H⁺) beschickte, mit Wasser gut gewaschene Säule (2 × 40 cm) chromatographiert und mit Wasser eluiert. Die fluoreszierende Zone wird im Rotationsverdampfer (20°) auf 5 ml eingengt. Die filtrierte Lösung wird mit 50 ml abs. Äthanol und einem Tropfen 12N HCl versetzt. Nach 15 Std. Stehen im Kühlschrank erhält man 129 mg gelbblasse Kristalle des freien 6-Hydroxymethyl-pterin-diphosphates (III).

$C_7H_9O_8N_5P_2 \cdot H_2O$	Ber. C 20,64	H 3,72	N 17,21	P 15,21	P (hydrolys.)	7,61 %
(407,19)	Gef. „ 20,50	„ 3,10	„ 18,14	„ 14,91	„	8,12 %

Durch Hydrolyse (1N HCl, 100°, 10 Min.) wird quantitativ 6-Hydroxymethyl-pterin-phosphat (II) gebildet.

6-Hydroxymethyl-pterin-triphosphat (IV). Die das Triphosphat IV enthaltenden Fraktionen werden mit 1N LiOH auf pH 7 eingestellt und im Vakuum bei 20° eingedampft. Der Rückstand wird mit 300 ml abs. Methanol versetzt, worauf das LiCl in Lösung geht und das Li-Salz des Triphosphatesters IV unlöslich bleibt. Das Salz wird abzentrifugiert und je dreimal mit Äthanol

und Äther gewaschen. Umkristallisation aus wenig Wasser durch vorsichtige Zugabe von Äthanol: 88 mg strohgelbes, mikrokristallines Pulver.

$C_7H_8O_{11}N_5P_3Li_4 \cdot H_2O$	Ber. C 17,71	H 1,69	N 14,75	P 19,57	P (hydrolys.) 13,05%
(474,87)	Gef. „ 18,21	„ 3,21	„ 14,10	„ 19,37	„ 12,7 %

Nach der Hydrolyse (1 N HCl, 100°, 10 Min.) erhält man quantitativ das 6-Hydroxymethyl-pterin-phosphat (II). Das freie Triphosphat IV ist sehr unbeständig und konnte nicht rein erhalten werden.

7,8-Dihydro-6-hydroxymethyl-pterin-monophosphat (V). 100 mg 6-Hydroxymethyl-pterin-monophosphat (II) werden in der minimalen Menge einer heissen 5proz. $NaHCO_3$ -Lösung gelöst. Nach Erkalten auf Zimmertemperatur fügt man 500 mg Na-Dithionit zu, lässt 10 Min. stehen, gibt das doppelte Volumen Eisessig zu und kühlt die Lösung im Eisbad ab, wobei der gebildete 7,8-Dihydroester ausfällt. Er wird abzentrifugiert, fünfmal mit 50proz. Essigsäure (4°) und je dreimal mit Äthanol und Äther gewaschen. Dann wird das Produkt (75 mg) in 6 ml Wasser aufgenommen und die Suspension mit 1 N LiOH auf pH 7, eingestellt, wobei Auflösung eintritt. Zur filtrierten Lösung gibt man Äthanol, bis zu beginnender Trübung. Nach 15 Std. Stehen im Kühlschrank werden die gebildeten Kristalle abzentrifugiert, mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet: 58 mg Li-Salz von V. NMR. (60 MHz, CF_3COOH , Fig. 3): C(7)H₂: S, 5,13 ppm, 2 Pr;

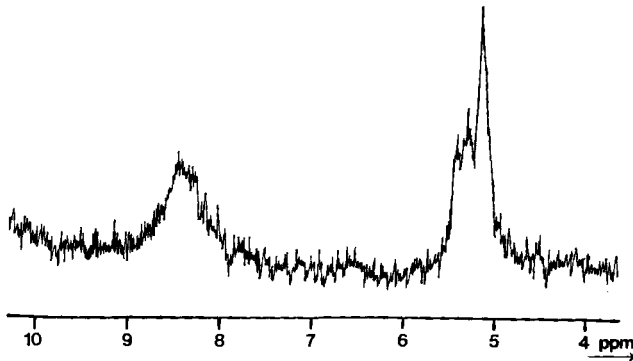


Fig. 3. NMR.-Spektrum von 7,8-Dihydro-6-hydroxymethyl-pterin-phosphat (V) in CF_3COOH aufgenommen

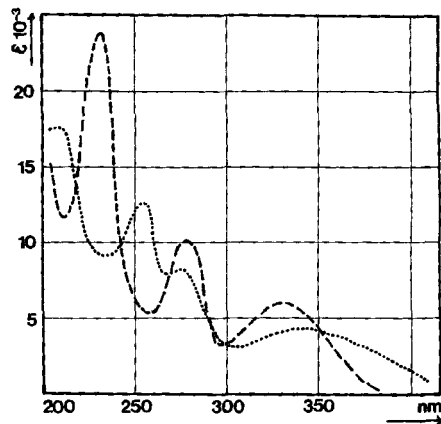


Fig. 4. UV-Spektrum von Dihydroester V
 ----- in 0,1M Phosphatpuffer, pH 6,8
 in 0,1N HCl

C(9)H₂: D, 5,35 ppm, 2 Pr; N(2)H₂: br S, 8,4 ppm, 2 Pr. Das UV.-Spektrum (Fig. 4) entspricht jenem eines 7,8-Dihydropterins (siehe z.B. [7]).

C ₇ H ₈ O ₅ N ₅ PLi ₂ · 5H ₂ O	Ber. C 22,29	H 4,82	N 18,55	P 8,21%
(377,11)	Gef. „ 22,57	„ 4,67	„ 18,95	„ 7,91%

7,8-Dihydro-6-hydroxymethyl-pterin-diphosphat (VI) Dieser Dihydroester wird als Li-Salz nach der gleichen Methode hergestellt. Das UV.-Spektrum stimmt mit jenem des Dihydroesters V überein.

C ₇ H ₈ O ₈ N ₅ P ₂ Li ₃ · 7H ₂ O	Ber. C 16,85	H 4,41	N 14,03	P 12,41%
(4,99,07)	Gef. „ 17,50	„ 3,34	„ 13,38	„ 12,34%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 41. Mitt. *M. Viscontini & W. F. Frei*, *Helv.* 55, 574 (1972).
 [2] *G. M. Brown*, "Chemistry and Biology of Pteridins", Internat. Acad. Publish. Co. Ltd., Tokyo 1970, 242; *T. Shiota*, *R. J. Jackson & C. M. Baugh*, *ibid.*, 265; *K. Iwai*, *O. Okinaka*, *M. Ikeda & N. Suzuki*, *ibid.*, 281; *H. Mitsuda*, *Y. Suzuki & K. Yasumoto*, *ibid.*, 295; *R. J. Jackson & T. Shiota*, *J. biol. Chemistry* 246, 7454 (1971).
 [3] *T. Shiota*, *N. M. Disraely & M. P. McCann*, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 7, 194 (1962); *J. biol. Chemistry* 239, 2259 (1964); *L. Jaenicke* in "Pteridine Chemistry, Proceedings of the 3. Symposium", Pergamon Press, Oxford 1964, S. 377.
 [4] *M. Viscontini & J. Bieri*, *Helv.* 54, 2291 (1971).
 [5] *P. Karrer & M. Viscontini*, *Helv.* 29, 1981 (1946); *M. Viscontini*, *G. Bonetti & P. Karrer*, *ibid.* 32, 1478 (1949); *M. Viscontini*, *G. Bonetti*, *C. Ebnöther & P. Karrer*, *ibid.* 34, 1384 (1951); *M. Viscontini*, *C. Ebnöther & P. Karrer*, *ibid.* 34, 1834 (1951); *M. Viscontini*, *C. Ebnöther & P. Karrer*, *ibid.* 34, 2199 (1951); *M. Viscontini*, *C. Ebnöther & P. Karrer*, *ibid.* 35, 457 (1952).
 [6] *I. Berenblum & E. Chain*, *Biochem. J.* 32, 295 (1938).
 [7] *M. Viscontini & A. Bobst*, *Helv.* 48, 816 (1965).

170. Nuclear Quadrupole Resonance and Stereochemistry I.

α – Chloro Ethers

by Ziba Ardalan and Edwin A. C. Lucken

Département de Chimie Physique, Section de Chimie de l'Université de Genève
30, quai de l'Ecole de Médecine, 1211 Genève 4

(11. IV. 73)

Summary. ³⁵Cl nuclear quadrupole resonance spectra of cyclic α-chloro ethers of known configuration are presented. The resonance frequencies of chlorine atoms in equatorial positions are in every case some 2.5 MHz higher than those of corresponding chlorine atoms in axial positions. Similar results are obtained for open-chain trichloromethyl ethers and the effect is sufficiently well-defined to distinguish between configurational isomers and establish their conformation. These results may be rationalised in terms of a model in which the lone-pair electrons on the oxygen atom hyperconjugate with the electrons of the C-Cl bond.

Introduction. – One of the main problems in the interpretation of nuclear quadrupole coupling constants is the number of approximations necessary to relate them to an electronic structure. The most radical of these sets of approximation, that associated with the names of *Townes & Dailey* [1], assumes that the quadrupole coupling constant arises only from incomplete filling of the valence p-shell. The use of such approximations is likely to involve the fewest errors if they are used to com-