

302. Über Pterinchemie

44. Mitteilung [1]

Eine eindeutige Synthese isomerenfreier Folsäure

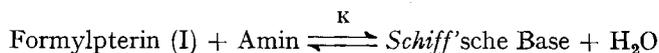
von Jost H. Bieri und Max Viscontini

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

(10. X. 73)

Summary. A new, simplified and unequivocal synthesis of folic acid free of isomers is described. A melt of N(2')-acetyl-6-formylpterin and dimethyl-N-(*p*-aminobenzoyl)-L-glutamate was quantitatively converted to 6-azomethin-pterine-ester IV. NaBH₄-reduction followed by basic hydrolysis of acetyl and ester groups gives pure folic acid in good yield.

Durch die Synthese von 7-isomerenfreiem 6-Formylpterin (I) aus L-Neopterin, kann eine Reihe von in 6-Stellung substituierten Folsäureanalogen zugänglich gemacht werden. Dabei wird 6-Formylpterin (I) mit *para*-substituierten aromatischen Aminen zu den entsprechenden Schiff'schen Basen umgesetzt. Die Kondensation verläuft um so leichter, je tiefer das pK_B des verwendeten Amins liegt. Oder anders ausgedrückt, je basischer das Amin, um so grösser ist die Gleichgewichtskonstante K folgender Reaktion:



Anschliessend werden die erhaltenen Schiff'schen Basen mittels Natriumborhydrid glatt zu den 6-substituierten Aminomethyl-pterinen (Folsäureanalogen) reduziert [2].

Die bis heute publizierten Folsäuresynthesen verwenden, in einer ersten Gruppe, für den Aufbau 2,4,5-Triamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin, α,β -Dibrom-propionaldehyd (oder andere reaktionsfähige Dreikohlenstoff-Komponenten wie α,α,β -Tribrom-propionaldehyd, 1,1,3-Tribrom-aceton, 1,3-Dibrom-aceton, Dihydroxy-aceton etc.), sowie *p*-Amino-benzoyl-L-glutaminsäure, was zu kleinen Ausbeuten und zahlreichen biologisch inaktiven Nebenprodukten führt. Eine zweite Gruppe geht von Formylpterin [3] bzw. N(2')-Acetyl-formylpterin [4] und *p*-Amino-benzoyl-L-glutaminsäure aus, wobei für die Synthese des Pterinteiles 2,4,5-Triamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin und eine unsymmetrische α,β -Dicarbonyl-Komponente verwendet wird. Beide Methoden geben bei der Bildung des Pyrazinringes Gemische von 6- und 7-Isomeren, die nur sehr schwer voneinander zu trennen sind [5].

Es lag daher nahe, ausgehend von 6-Formylpterin (I), in Anlehnung an die Darstellung isomerenfreier Folsäureanaloge [2], eine Synthese von ausschliesslich in 6-Stellung substituiertem Folsäure (VI) zu versuchen. Die direkte Kondensation von 6-Formylpterin (I) mit *p*-Amino-benzoyl-L-glutaminsäure gelang nicht. Dagegen liess sich 6-Formylpterin (I) mit *p*-Amino-benzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester (III) [6] in Natriumhydrogencarbonat-/Natriumacetat-Lösung (pH = 4,8) unter Rückfluss kondensieren. Obwohl der Ester (III) in grossem Überschuss eingesetzt wurde, konnten

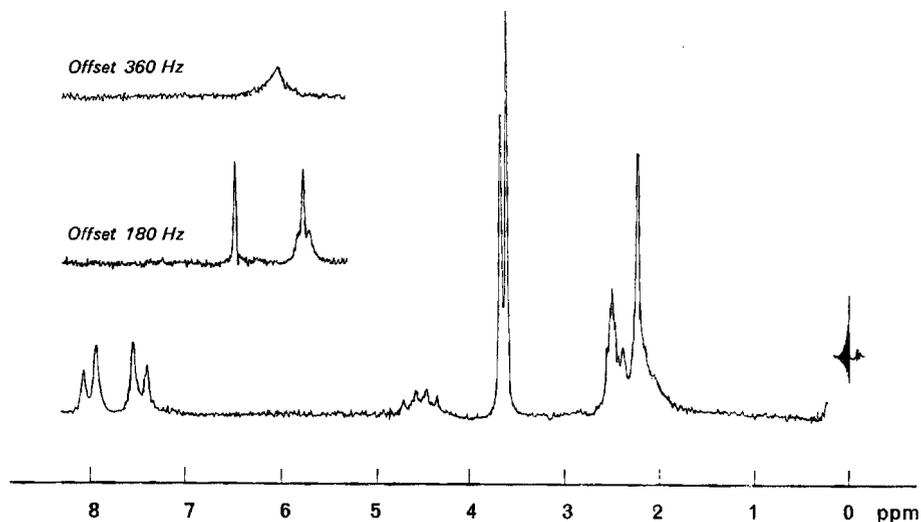


Fig. 1. NMR.-Spektrum (60 MHz) von *N*(2')-Acetyl-6-[*N*-(*p*-benzoyl-*L*-glutaminsäure-dimethylester)-azomethin]-pterin (IV) aufgenommen in d_6 -DMSO

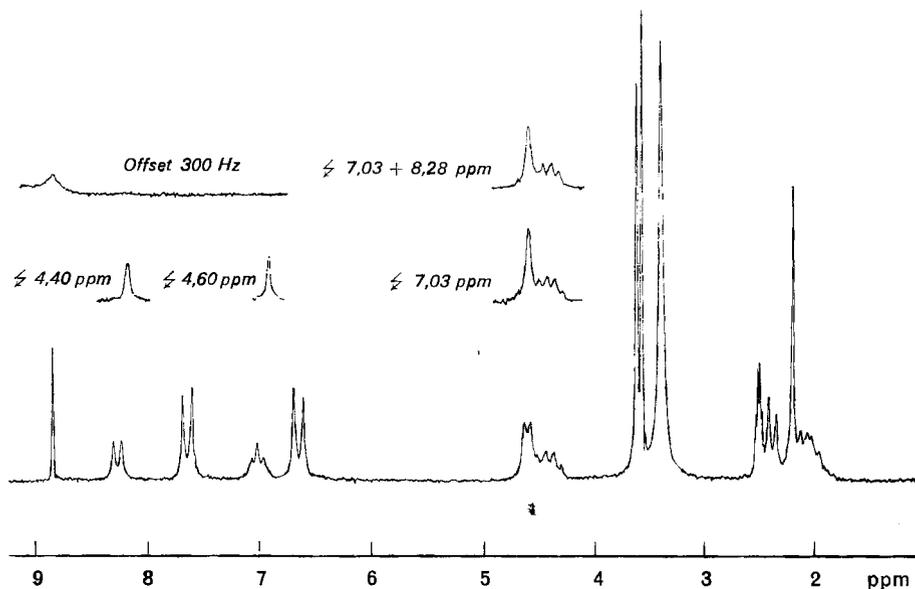
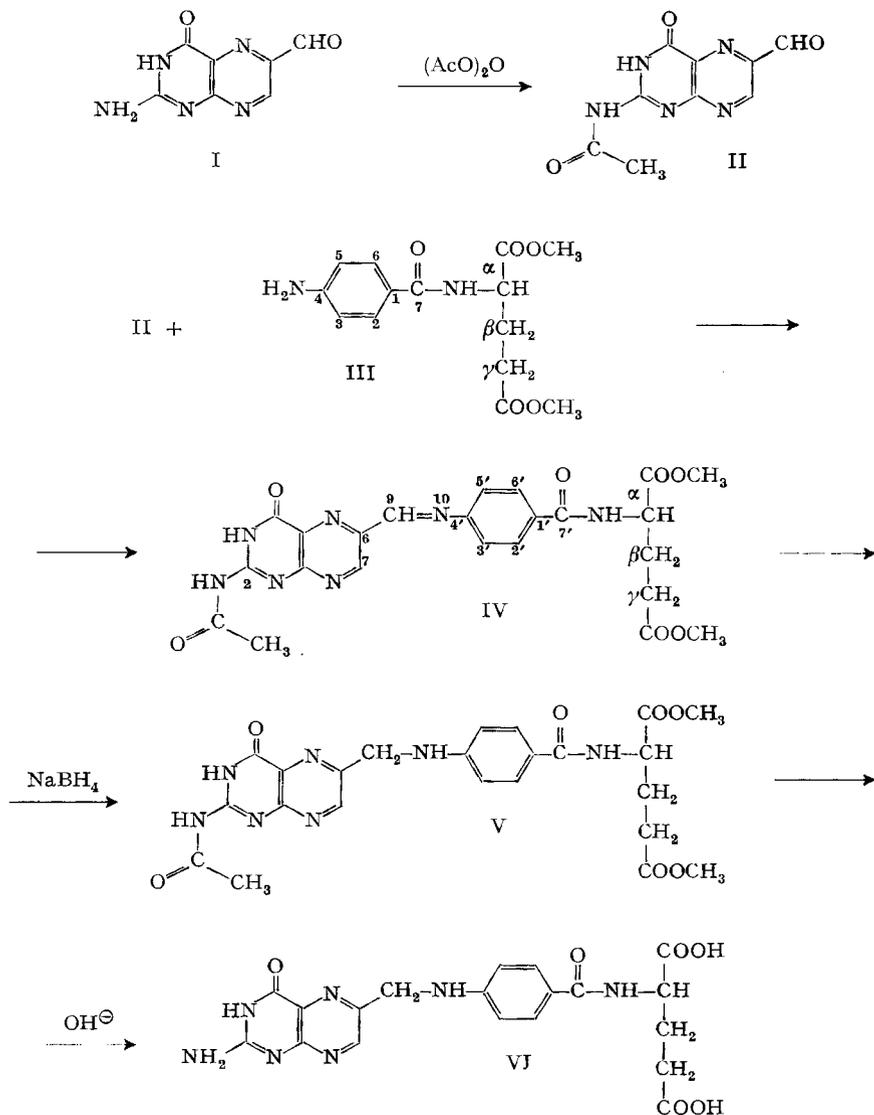


Fig. 2. NMR.-Spektrum (100 MHz) von *N*(2')-Acetyl-folsäure-dimethylester-dihydrat (V) aufgenommen in d_6 -DMSO. Durch Doppelresonanz werden die Signale von C(9)H₂ und N(10)H bzw. C(α)H und CO(7')-NH zugeordnet

nie mehr als 60% Ausbeute an *Schiff*'scher Base erhalten werden. Nach der anschließenden Reduktion des Reaktionsgemisches mit Natriumborhydrid liessen sich dünn-schichtchromatographisch und NMR.-spektroskopisch 6-Hydroxymethylpterin und Folsäure-dimethylester eindeutig nachweisen [7].

Diese Ergebnisse veranlassten uns, einen neuen Weg zur vereinfachten Herstellung isomerenfreier Folsäure zu suchen. In dieser Mitteilung berichten wir über die erhaltenen Resultate.



Aus 6-Formylpterin (I) wird durch Acetylierung das N(2')-Acetyl-6-formylpterin (II) erhalten, das wesentlich bessere Eigenschaften als I besitzt (erhöhte Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln wie Wasser, Äthanol, Acetonitril *etc.* und somit Umkristallisierbarkeit). N(2')-Acetyl-6-formylpterin (II) und *p*-Aminobenzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester (III) werden im molaren Verhältnis 1:2 im Hochvakuum in

der Schmelze (120–125°) in die *Schiff'sche* Base (IV) übergeführt. Durch die irreversible Entfernung des bei der Azomethinbildung entstehenden Wassers der Reaktionsgleichung $\text{II} + \text{III} \rightleftharpoons \text{IV} + \text{H}_2\text{O}$ liegt das Gleichgewicht, unter den gewählten Bedingungen, ganz auf der rechten Seite. Mit diesem zentralen Schritt der vorliegenden Folsäuresynthese wird folgendes erreicht:

1. N(2')-Acetyl-6-formylpterin wird vollständig in die *Schiff'sche* Base IV überführt, so dass sich eine mühsame Trennung von Edukt und Produkt erübrigt.

2. Die Kopplung findet ausschliesslich in 6-Stellung statt, so dass ein isomerenfreies Produkt IV entsteht.

Das Kondensationsprodukt IV wird anschliessend in Äthanol/Wasser 1:1 mittels Natriumborhydrid zum N(2')-Acetyl-folsäure-dimethylester (V) reduziert, wobei keine Reduktion des Pyrazinringes beobachtet wird [8].

Durch alkalische Verseifung von V erhält man in guter Ausbeute dünn-schichtchromatographisch reine, isomerenfreie Folsäure (VI). Die im experimentellen Teil angegebenen optischen Drehungen blieben auch nach wiederholten Umkristallisationen konstant, so dass eine Racemisierung in der L-Glutaminsäureeinheit während der Synthese ausgeschlossen werden kann. Die spezifische optische Drehung der von uns synthetisierten Folsäure (VI) ist, innerhalb der Fehlergrenze, identisch mit dem in der Literatur angegebenen Wert [3] [9].

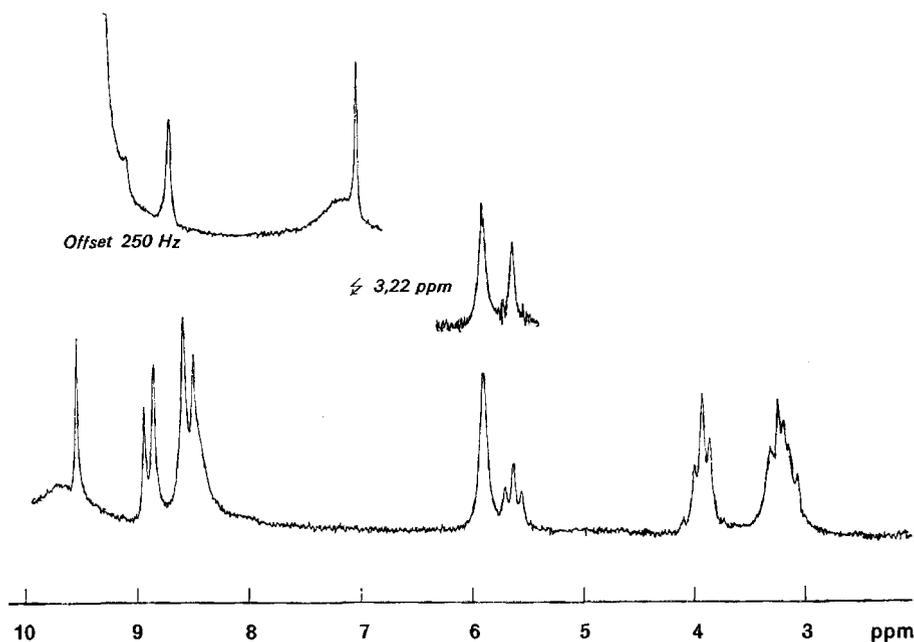


Fig. 3. NMR.-Spektrum (100 MHz) von Folsäure-dihydrat (VI) aufgenommen in FSO_3H . Durch Doppelresonanz werden die Signale von $\text{C}(\alpha)\text{H}$ und $\text{C}(\beta)\text{H}_2$ zugeordnet

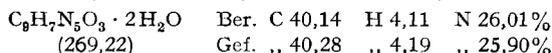
Wir danken Herrn Prof. Dr. W. von Philipsborn für die NMR-, Herrn Prof. Dr. M. Hesse für die Massenspektrenaufnahme und Herrn H. Frohofer, Leiter unserer mikroanalytischen Abteilung für die Elementaranalysen und optischen Drehungen. Ganz besonders danken möchten wir Frau

*P. Stoëva*¹⁾ für ihre wertvolle Hilfe bei zahlreichen Vorversuchen zu dieser Arbeit und Frau *M. Argentin-Schifferle* für ihre grosse Arbeit bei der Darstellung zahlreicher Präparate. Der Aufenthalt von Frau *P. Stoëva* an der Universität Zürich (Oktober 1970 bis April 1971) wurde durch die UNO finanziert. Dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* danken wir bestens für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Die Massenspektren (MS.) wurden an einem CEC-21-110B-Gerät (Direkteinlass, 70 eV) registriert. Die Kernresonanzspektren (NMR.) wurden mit einem Varian T-60- bzw. HA-100-NMR.-Spektrographen in CF₃COOH (interner Standard: Tetramethylsilan), d₆-DMSO (interner Standard: Tetramethylsilan) oder in FSO₃H (externer Standard: verdünnte Lösung von Tetramethylsilan in CCl₄) aufgenommen; chemische Verschiebungen in ppm; Abkürzungen: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quartett, *m* = Multipllett, *b* = breit, *Pr* = Proton(en). Analytische Dünnschichtchromatogramme (DC.) an Cellulose-CEL 300 UV₂₅₄-Fertigfolien (*Macherey-Nagel*); Produkte sichtbar im UV.-Licht bei 254 bzw. 350 nm; Laufmittel: Lsg. A = 4proz. NH₄Cl; Lsg. B = *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 20:3:7; Lsg. C = 2-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser 20:3:6. Die spezifischen optischen Drehungen [α]₅₄₆ bzw. [α]₅₈₉ wurden an einem LEP A 2 Zeiss-Gerät gemessen, *c* = Konzentration in %. Der für sauerstoffempfindliche Reaktionen verwendete Stickstoff wurde zur Reinigung über erhitzte Cu-Späne (ca. 400°) geleitet.

N(2′)-Acetyl-6-formylpterin-dihydrat (II). 1 g (5,23 mmol) fein pulverisiertes 6-Formylpterin (I) [2] wird unter Stickstoff in 1350 ml Essigsäureanhydrid aufgeschlämmt. Das Reaktionsgemisch wird bei 130° gehalten, bis sich das gesamte 6-Formylpterin (I) gelöst hat. Nach Abkühlung auf Zimmertemp. wird die gelbe Lösung unter Vakuum zur Trockene eingeeengt und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Zugabe von wenig Aktivkohle und heisses Filtrieren ergibt eine hellgelbe, klare Lösung, aus der sich nach dem langsamen Abkühlen und Stehenlassen (+5°, 24 Std.) *N*(2′)-Acetyl-6-formylpterin-dihydrat (II) als blass hellgelbe Plättchen kristallin ausscheidet. Das Produkt wird abfiltriert, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 20°, 6 Std.): 1,13 g (80,3%). (Der Rückstand kann in gleich guter Ausbeute (80%) aus Acetonitril umkristallisiert werden, wobei anschliessend das Produkt mit wenig kaltem Acetonitril und Äther gewaschen wird). NMR. (60 MHz, CF₃COOH): C(9)H: *s*, 10,09, 1 Pr; C(7)H: *s*, 9,45, 1 Pr; *N*(2′)-CO-CH₃: *s*, 2,55, 3 Pr. – (60 MHz, d₆-DMSO): *N*(2′)H und *N*(3)H: *b* *s*, 12,14, 2 Pr; C(9)H: *s*, 9,96, 1 Pr; C(7)H: *s*, 9,16, 1 Pr; *N*(2′)-CO-CH₃: *s*, 2,21, 3 Pr. – MS.: *m/e* (rel. %) 233 (*M*⁺, 8), 218 (10), 191 (43), 163 (11), 162 (7), 136 (22), 122 (7), 109 (6), 93 (11), 81 (12), 69 (26), 55 (24), 43 (100), 42 (47), 28 (21). – DC.: Lsg. A: Rf = 0,75; Lsg. B: Rf = 0,28.



p-Amino-benzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester (III) [6]. NMR.²⁾ (60 MHz, CF₃COOH): CO(7)-NH: *d*, 8,15, *J* = 7 Hz, 1 Pr, *d* zum Teil durch das AA′BB′-System verdeckt; Aromat. Pr: AA′BB′-System: δ_A = 8,13, δ_B = 7,75, *J* = 8 Hz, 4 Pr; C(α)H: *q*-artiges *m*, 5,34–4,80, 1 Pr; C(α)-COOCH₃: *s*, 4,04, 3 Pr; C(γ)-COOCH₃: *s*, 3,90, 3 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: *m*, 2,90–2,20, 4 Pr. – (60 MHz, d₆-DMSO): CO(7)-NH: *d*, 8,17, *J* = 7 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: AA′BB′-System: δ_A = 7,60, δ_B = 6,56, *J* = 8 Hz, 4 Pr; C(4)-NH₂: *b* *s*, 5,58, 2 Pr; C(α)H: *q*-artiges *m*, 4,63–4,16, 1 Pr; C(α)-COOCH₃: *s*, 3,64, 3 Pr; C(γ)-COOCH₃: *s*, 3,58, 3 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: *m*, 2,50–1,80, zum Teil unter dem DMSO-Signal. – MS.: *m/e* (rel. %) 294 (*M*⁺, 10), 266 (2), 265 (2), 235 (4), 208 (2), 189 (2), 174 (3), 135 (5), 119 (12), 120 (100), 92 (10), 65 (7). – [α]₅₈₉²² = –27,7 ± 0,5° (*c* = 2; 0,1 N HCl).

N(2′)-Acetyl-6-[*N*-(*p*-benzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester)-azomethin]-pterin (IV). 400 mg (1,49 mmol) *N*(2′)-Acetyl-6-formylpterin-dihydrat (II) und 1000 mg (3,40 mmol) *p*-Amino-

¹⁾ Gegenwärtige Adresse: Institut de Recherches Scientifiques de Chimie Pharmaceutique, Rue Jelyo Voivoda 1a, Sofia 56, Bulgarie.

²⁾ Die Zuordnung der α- bzw. γ-Methylestergruppierungen, sowie des Amidprotons in der Glutaminsäureeinheit, erfolgte durch Vergleich der NMR.-Spektren, welche wir im Laufe unserer Synthese von *p*-Amino-benzoyl-γ-L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester erhielten [10].

benzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester (III) werden durch Pulverisierung intensiv miteinander vermischt. Das Reaktionsgemisch wird im Hochvakuum (0,01 Torr) zwischen 120 und 125° zum Schmelzen gebracht, wobei das bei der Kondensation zum Azomethinpterin entstehende Wasser gasförmig entweicht (Blasenbildung in der Schmelze). Die Reaktion ist nach 5 Min. beendet. Nach Abkühlung auf Zimmertemp. wird der entstandene harte Rückstand aus Acetonitril umkristallisiert, wobei wenig, unlösliche, weisse Zersetzungsprodukte nicht in Lösung gehen. Nach Zugabe von Aktivkohle und heissem Filtrieren ergibt sich eine hellgelbe, klare Lösung, aus der sich nach dem langsamen Abkühlen und Stehenlassen (–15°, 24 Std.) N(2′)-Acetyl-6-[N-(p-benzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester)-azomethin]-pterin (IV) als hellgelbe Plättchen kristallin ausscheidet. Das Produkt wird abfiltriert, mit wenig kaltem Acetonitril, Äther gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 60°, 6 Std.): 590 mg (77,9%). Das mit Hilfe von Acetonitril vom überschüssigen Ester (III) befreite Produkt (IV) kann ebenfalls in guter Ausbeute (80%) aus Wasser umkristallisiert werden, wobei das Dihydrat von IV erhalten wird.

NMR.: Das Azomethinpterin (IV) liegt in einer *syn*- und *anti*-Form vor. Die beiden geometrischen Isomeren können am unterschiedlichen Verhalten ihrer arom. Pr. in CF₃COOH erkannt werden. «Hauptprodukt», ca. 90% (60 MHz, CF₃COOH): C(9)H: s, 9,99, 1 Pr; C(7)H: s, 9,79, 1 Pr; CO(7′)-NH: d, 8,28, J = 7 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: s, 8,24, 4 Pr; C(α)H: q-artiges m, 5,18–4,88, 1 Pr; C(α)-COOCH₃: s, 4,00, 3 Pr; C(γ)-COOCH₃: s, 3,91, 3 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: m, 2,98–2,10, 4 Pr; N(2′)-CO-CH₃: s, 2,58, 3 Pr. – «Nebenprodukt», ca. 10% (60 MHz, CF₃COOH): Aromat. Pr: AA′BB′-System: δ_A = 8,07, δ_B = 7,69. – In d₆-DMSO unterscheiden sich die arom. Pr. der beiden Isomeren nicht (60 MHz, d₆-DMSO, Fig. 1): N(2′)H und N(3)H: b s, 12,06, 2 Pr; C(9)H: s, 9,49, 1 Pr; C(7)H: s, 8,77, 1 Pr; CO(7′)-NH: d, 8,73, J = 7 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: AA′BB′-System: δ_A = 7,97, δ_B = 7,47, J = 8 Hz, 4 Pr; C(α)H: q-artiges m, 4,73–4,22, 1 Pr; C(α)-COOCH₃: s, 3,68, 3 Pr; C(γ)-COOCH₃: s, 3,61, 3 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: m, 2,50–1,80, zum Teil unter dem DMSO-Signal; N(2′)-CO-CH₃: s, 2,22, 3 Pr. – DC. «Hauptprodukt»: Lsg. A: Rf = 0,54; Lsg. B: Rf = 0,54. «Nebenprodukt»: Lsg. A: Rf = 0,44; Lsg. B: Rf = 0,44. [α]₅₈₉²² = –17,7 ± 0,5° (c = 0,5; 0,1N HCl).

C₂₃H₂₃N₇O₇ (509,47) Ber. C 54,22 H 4,55 N 19,25% Gef. C 54,43 H 4,57 N 19,15%

N(2′)-Acetyl-6-[N-(p-benzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester)-aminomethyl]-pterin-dihydrat: N(2′)-Acetylpteroyl-glutaminsäure-dimethylester-dihydrat oder N(2′)-Acetyl-folsäure-dimethylester-dihydrat (V). 160 ml 50proz. Äthanol werden mit Stickstoff gesättigt. Dazu kommen 24 mg (0,64 mmol) Natriumborhydrid und unmittelbar darauf 400 mg (0,80 mmol) fein pulverisiertes N(2′)-Acetyl-6-[N-(p-benzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester)-azomethin]-pterin (IV). Dann erhöht man die Temperatur innerhalb 10 Min. auf 45°, gibt noch portionsweise, innerhalb 10 Min. bei 45°, gesamt 12 mg (0,32 mmol) Natriumborhydrid zu, wobei darauf geachtet werden muss, dass das pH nicht über 9,0 ansteigt (evtl. Korrektur mit 10proz. Essigsäure). Danach wird das pH mittels 10proz. Essigsäure auf 6,0 gebracht, das Reaktionsgemisch rasch auf Zimmertemp. abgekühlt, unter Vakuum zur Trockene eingeengt und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Nach dem langsamen Abkühlen und Stehenlassen (+5°, 24 Std.) scheidet sich N(2′)-Acetyl-folsäure-dimethylester-dihydrat (V) kristallin aus. Das Produkt V wird abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 40°, 6 Std.): 270 mg (62,8%). NMR. (60 MHz, CF₃COOH): C(7)H: s, 9,16, 1 Pr; CO(7′)-NH: d, 8,15, J = 7 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: AA′BB′-System: δ_A = 8,12, δ_B = 7,94, J = 8 Hz, 4 Pr; C(9)H₂: s, 5,34, 2 Pr; C(α)H: q-artiges m, 5,20–4,80, 1 Pr; C(α)-COOCH₃: s, 3,99, 3 Pr; C(γ)-COOCH₃: s, 3,88, 3 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: m, 3,00–2,20, 4 Pr; N(2′)-CO-CH₃: s, 2,56, 3 Pr. – (100 MHz, d₆-DMSO, Fig. 2): N(2′)H und N(3)H: b d, 12,1, 2 Pr; C(7)H: s, 8,86, 1 Pr; CO(7′)-NH: d, 8,28, J = 7 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: AA′BB′-System: δ_A = 7,66, δ_B = 6,68, J = 8 Hz, 4 Pr; N(10)H: t, 7,03, J = 6 Hz, 1 Pr; C(9)H₂: d, 4,60, J = 6 Hz, 2 Pr; C(α)H: q-artiges m, 4,60–4,30, 1 Pr; C(α)-COOCH₃: s, 3,61, 3 Pr; C(γ)-COOCH₃: s, 3,56, 3 Pr; C(γ)H₂: t, 2,42, J = 6 Hz, 2 Pr; C(β)H₂: m, 2,30–1,80, 2 Pr; N(2′)-CO-CH₃: s, 2,20, 3 Pr. – DC.: Lsg. A: Rf = 0,38; Lsg. B: Rf = 0,65. [α]₅₈₉²² = –10,0 ± 0,6° (c = 0,25; Äthanol).

C₂₃H₂₅N₇O₇ · 2H₂O Ber. C 50,45 H 5,33 N 17,90%
(547,52) Gef. „ 50,35 „ 5,56 „ 17,92%

{{[2-Amino-4-hydroxy-6-pteridyl-methyl]-p-amino-benzoyl}-L-glutaminsäure-dihydrat: Pteroyl-glutaminsäure-dihydrat oder Folsäure-dihydrat (VI). 160 ml 0,1N Natronlauge werden mit sauerstofffreiem Stickstoff gesättigt. Dazu kommen 400 mg (0,72 mmol) N(2′)-Acetyl-folsäure-dimethyl-

ester-dihydrat (V). Die Lösung wird auf 80° erwärmt und anschliessend das pH mit Eisessig auf 3,5 gebracht. Beim langsamen Abkühlen auf Zimmertemp. und Stehenlassen (+ 5°, 24 Std.) kristallisiert die hellgelbe Folsäure (VI) aus. Das Produkt (VI) wird abfiltriert, in der Reihenfolge mit Wasser, Äthanol, Äther gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 22°, 6 Std.): 320 mg (91,7%). – NMR. (60 MHz, CF₃COOH): C(7)H: s, 8,94, 1 Pr; N(2')H₂: b s, 8,70, 2 Pr; Aromat. Pr: AA'BB'-System: δ_A = 8,10, δ_B = 7,88, J = 8 Hz, 4 Pr; CO(7')–NH: Signal durch das AA'BB'-System der arom. Pr. verdeckt; 1 Pr; C(9)H₂: s, 5,23, 2 Pr; C(α)H: t-artiges m, 5,40–4,80, 1 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: m, 3,00–2,20, 4 Pr. – (100 MHz, FSO₃H, Fig. 3): N(3)H: s, 11,20, 1 Pr; N(10)H und CO(7')–NH: b s, 9,70, 2 Pr; Aromat. Pr: AA'BB'-System: δ_A = 8,89, δ_B = 8,55, J = 9 Hz, 4 Pr; N(2')H₂: verdeckt unter dem AA'BB'-System bei ca. 8,5, 2 Pr; C(9)H₂: s, 5,89, 2 Pr; C(α)H: t, 5,63, J = 8 Hz, 1 Pr; C(γ)H₂: t, 3,92, J = 7 Hz, 1 Pr; C(β)H₂: m, 3,50–2,80, 2 Pr. – DC.: Lsg. A: Rf = 0,30; Lsg. C: Rf = 0,05. [α]₅₈₉²² = +16,0 ± 0,6° (c = 0,5; 0,1 N NaOH). [α]₅₄₆²² = +20 ± 2° (c = 0,5; 0,1 N NaOH).

C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ · 2 H ₂ O (477,43)	Ber. C 47,79 H 4,85 N 20,53%
	Gef. „ 47,74 „ 5,00 „ 20,04%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 43. Mitt.: M. Viscontini & Y. Furuta, *Helv.* 56, 1819 (1973).
- [2] M. Viscontini & J. H. Bieri, *Helv.* 54, 2291 (1971).
- [3] F. Weygand, A. Wacker & V. Schmied-Kowarzik, *Chem. Ber.* 82, 25 (1949).
- [4] M. Sletzinger, D. Reinhold, J. Grier, M. Beachem & M. Tishler, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 6365 (1955).
- [5] F. Weygand, H. Simon, K. D. Keil & H. Millauer, *Chem. Ber.* 97, 1002 (1964).
- [6] R. Koehler, L. Goodman, J. DeGraw & B. R. Baker, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 5779 (1958).
- [7] J. H. Bieri, Dissertation, Universität Zürich, 1972.
- [8] R. L. Blakley, *Biochem. J.* 72, 707 (1959).
- [9] C. K. Mathews & F. M. Huennekens, *J. biol. Chemistry*, 235, 3304 (1960).
- [10] E. Khalifa, J. H. Bieri & M. Viscontini, *Helv.* 56, 2911 (1973).

303. Über Pterinchemie

45. Mitteilung [1]

**Eine neue und eindeutige Synthese isomerenfreier
Pteroyl-γ-L-glutamyl-L-glutaminsäure**

von **Esam Khalifa, Jost H. Bieri** und **Max Viscontini**

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

(10. X. 73)

Summary. A new and unequivocal synthesis of pteroyl-γ-L-glutamyl-L-glutamic acid free of isomers is described. A melt of N(2')-acetyl-6-formylpterine and trimethyl-N-(p-amino-benzoyl)-γ-L-glutamyl-L-glutamate was quantitatively converted to 6-azomethin-pterine-trimethylester XI. NaBH₄-reduction followed by basic hydrolysis of acetyl and methyl ester groups gives pure pteroyl-γ-glutamyl-glutamic acid in good yield.

Pteroylpolyglutaminsäuren (Folsäurekonjugate) (I) tragen 2 bis 7 Glutaminsäure-einheiten in jeweils γ-peptidischer Bindung und sind bei Mikroorganismen, sowie im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet [2].