

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]₅₈₉²⁵ = +16,0 ± 0,6° (c = 0,5; 0,1 N NaOH). [α]₅₄₆²⁵ = +20 ± 2° (c = 0,5; 0,1 N NaOH).

| | | | |
|--|--------------|--------|----------|
| C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ · 2 H ₂ O | Ber. C 47,79 | H 4,85 | N 20,53% |
| (477,43) | 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

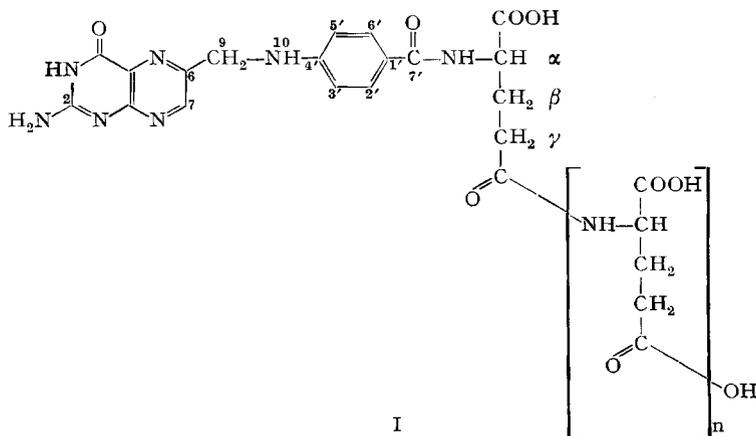
Organisch-chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(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].

Zahlreiche neuere biochemische Arbeiten befassen sich mit den Zusammenhängen, welche zwischen den Strukturen der Folsäurekonjugate (I) und ihrer Wirkungsweise im Organismus bestehen. So wird eine Beeinflussung der Folate (I) in ihrer Verwend-



$n = 1-6$: Pteroylpolyglutaminsäuren (I)

$n = 1$: Pteroyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure (XIII)

barkeit als Wachstumsfaktoren mit der Länge der Peptidkette festgestellt [3], sowie ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Glutaminsäurereste und der Art der peptidischen Kette bei der Bildung gewisser Coenzym-Apoenzym-Komplexe (z. B. Vitamin B₁₂ mit Homocystein-Transmethylase) vermutet [4]. Ferner werden mögliche Mechanismen für die Absorption und die Umwandlung der Pteroylpolyglutaminsäuren (I) in der Darmschleimhaut diskutiert [5]. Diese und weitere Untersuchungen machen es nötig, dass synthetisierte Folsäurekonjugate (I) rein und in genügender Menge zur Verfügung stehen. Ausserdem können die physikalisch-chemischen Daten der synthetischen Pteroylpolyglutaminsäuren (I), mit denen der aus natürlichen Quellen stammenden Konjugaten verglichen werden. Dabei müssen folgende Bedingungen an synthetisierte Produkte gestellt werden: 1. Definierte Zahl der Peptideinheiten («Kettenlänge») und 2. festgelegte Stereochemie.

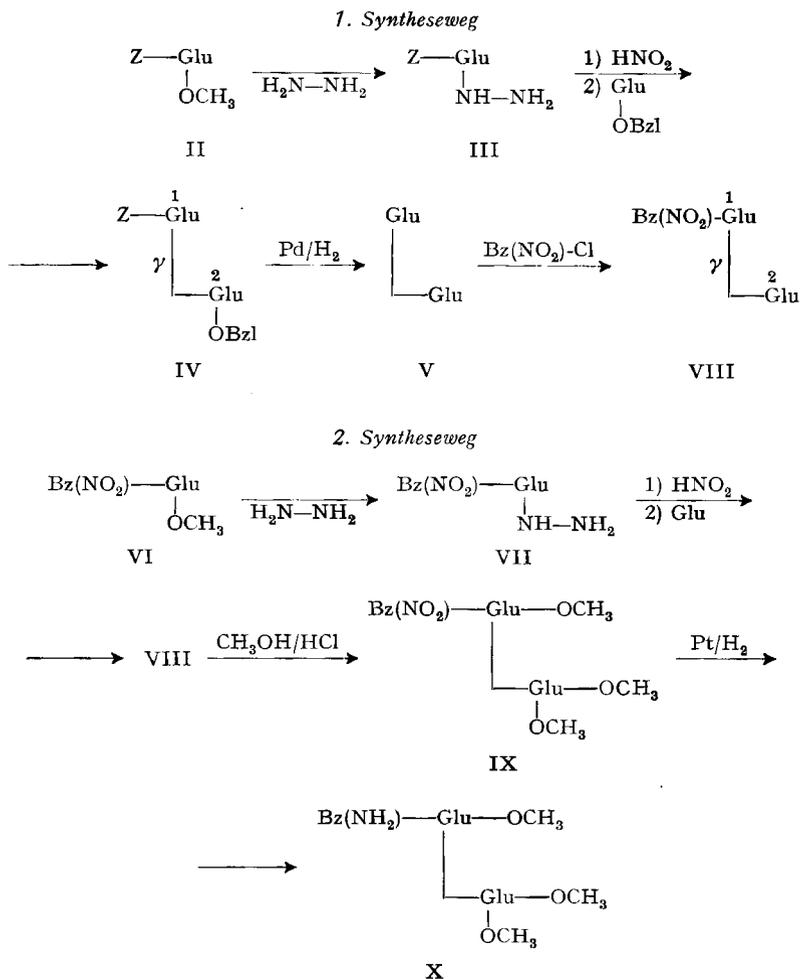
Die bis heute publizierten Synthesen der Folat-Reihe gliedern sich im wesentlichen in zwei Gruppen: Eine erste geht analog der «klassischen» Folsäuresynthese vor [6-7]: Aufbau eines *p*-Amino-benzoyl- γ -L-polypeptides (festgelegte Kettenlänge, definierte Stereochemie), Kondensation mit 2,4,5-Triamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin und α,β -Dibrom-propionaldehyd (mühsame Reinigung, kleine Ausbeuten, zahlreiche inaktive Nebenprodukte, Isomerenmische). Eine zweite verwendet, sowohl für den Aufbau der Peptidkette, wie für die anschliessende Kopplung des Peptidteiles mit Trifluoracetyl-Derivaten von Pteroisäure, die Methode der «mixed anhydrid coupling» [3-4] [8] (Mischung verschiedener Konjugate mit unterschiedlichen Polypeptid-Kettenlängen, acetylierte Nebenprodukte, aufwendige Trennung und Aufarbeitung).

In dieser Mitteilung berichten wir über eine neue, einfache Synthese von Pteroyldi-glutaminsäure XIII (Pteroyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure), welche ein isomerenfreies, stereochemisch einheitliches Produkt liefert.

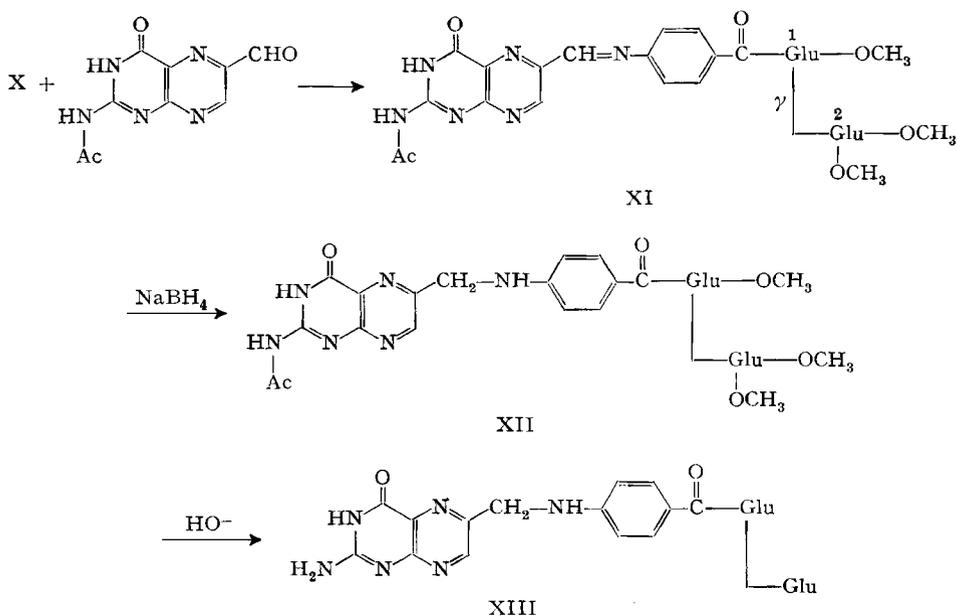
Der Aufbau des Peptidteiles zum *p*-Amino-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester (X) erfolgt auf zwei Wegen. Der eine führt über das vielfältig verwend-

bare Zwischenprodukt γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (V), mit anschliessender Einführung der *p*-substituierten Benzoesäure-Einheit, zu X (II \rightarrow III \rightarrow IV \rightarrow V \rightarrow VIII \rightarrow IX \rightarrow X). Der andere geht vom *p*-Nitro-substituierten Derivat VI aus und führt über die folgenden Reaktionsstufen zu X: VI \rightarrow VII \rightarrow VIII \rightarrow IX \rightarrow X.

In den folgenden Formeln werden die von der IUPAC-IUB-Kommission vorgeschlagenen Symbole und Numerierungen für Aminosäure-Derivate und Peptide verwendet [9].



Die Verknüpfung des Dipeptides (X) mit N(2')-Acetyl-6-formylpterin [1] zu N(2')-Acetyl-6-[N-(*p*-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester)-azomethin]-pterin (XI), die Reduktion zum N(2')-Acetyl-pteroyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester (XII) und die Verseifung zur Pteroyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure (Pteroyl-diglutaminsäure) (XIII) erfolgt analog der Synthese von Folsäure [1].



Die im experimentellen Teil angegebenen optischen Drehungen blieben auch nach wiederholten Umkristallisationen konstant; so dass eine Razemisierung der L-Glutaminsäureeinheiten während der Synthese ausgeschlossen werden kann.

Wir setzen unsere Arbeiten in dieser Richtung fort.

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 *M. Argentini-Schifferle* für ihre grosse Arbeit bei der Darstellung vieler Präparate sowie für zahlreiche analytische Bestimmungen. Dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* danken wir bestens für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Siehe exp. Teil bei [1]. NMR.-Spektren (60 MHz) auch in CDCl_3 und D_2O . Analytische Dünnschichtchromatogramme (DC.) an Kieselgel-SIL N-HR/UV₂₅₄-Fertigfolien (*Macherey-Nagel*).

Schmelzpunkte (Smp.) wurden mit einem Schmelzpunktapparat Mettler FP 5 + FP 52 bestimmt.

Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- γ -methylester (II) [10]. NMR. (CDCl_3): C(α)-COOH: s, 9,99, 1 Pr; Aromat. Pr: s, 7,30, 5 Pr; C(α)-NH: b d, 5,93, $J = 8$ Hz, 1 Pr; Benzyl- CH_2 : s, 5,10, 2 Pr; C(α)H: b m, 4,70–4,06, 1 Pr; C(γ)-COOCH₃: s, 3,60, 3 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: m, 2,60–1,66, 4 Pr. – DC.: Rf = 0,67 (Kieselgel; Lsg.: *n*-Butanol/Aceton/Eisessig/1proz. Ammoniak/Wasser 9:3:2:2:4; Sprühreagenz: gesättigte Lösung von Kaliumbichromat in konz. Schwefelsäure; 100°, 5 Min.: grau).

Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- γ -hydrazid (III). Nach der von uns modifizierten Methode [11]: 1 g (3,38 mmol) Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- γ -methylester (II) werden in 3 ml Äthanol (99%) gelöst und bei Zimmertemp. innerhalb 10 Min. zu 1 ml (20,57 mmol) Hydrazinhydrat (98%) getropft. Das Gemisch wird bei 22° 48 Std. stehen gelassen und anschliessend das Lösungsmittel abgedampft. Das zurückbleibende Öl wird in 3 ml Wasser aufgenommen und die entstehende

Lösung mit 12N HCl auf pH 3,2 gebracht, wobei das Produkt (III) ausfällt. Die überstehende Reaktionslösung wird mit einer ges. Natriumacetat-Lösung neutralisiert und 1 Std. bei +5° gehalten. Der Niederschlag (III) wird abfiltriert, aus Wasser umkristallisiert, abfiltriert und getrocknet (0,01 Torr, 22°, 8 Std.): 0,74 g (73,6%). NMR. (d_6 -DMSO): C(α)-NH: d , 7,56, J = 8 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: s , 7,33, 5 Pr; C(γ)-CO-NH-NH $_2$ ¹⁾: b s , 6,03, 3 Pr; Benzyl-CH $_2$: s , 5,03, 2 Pr; C(α)H: m , 4,20–3,70, 1 Pr; C(β)H $_2$ und C(γ)H $_2$: m , 2,40–1,60, 4 Pr. – NMR. (CF $_3$ COOH): Aromat. Pr: s , 7,33, 5 Pr; Benzyl-CH $_2$: s , 5,23, 2 Pr; C(α)H: m , 4,80–4,33, 1 Pr; C(β)H $_2$ und C(γ)H $_2$: m , 2,90–2,00, 4 Pr. – MS.: m/e (rel. %) 295 (M^+ , < 1), 277 (3), 262 (1), 233 (1), 174 (1), 151 (2), 122 (4), 108 (7), 107 (5), 92 (10), 91 (100), 84 (9), 79 (6), 77 (6), 65 (10), 44 (26). – DC.: Rf = 0,62 (Kieselgel; Lsg.: Eisessig/Wasser 1:250; Sprühreagenz: ges. Lösung von Kaliumbichromat in konz. Schwefelsäure; 100°, 5 Min.: hellblau). – Smp.: 180,7–182,4°.

C $_{13}$ H $_{17}$ N $_3$ O $_5$ (295,29) Ber. C 52,87 H 5,80 N 14,23% Gef. C 53,12 H 5,82 N 14,40%

Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure- γ -benzylester (IV) [10]. NMR. (d_6 -DMSO): Glu 2: C(α)-NH: d , 8,06, J = 8 Hz, 1 Pr; Glu 1: C(α)-NH: d , 7,50, J = 8 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: s , 7,33, 10 Pr; Glu 2: C(γ)-COO-CH $_2$: s , 5,07, 2 Pr; Glu 1: C(α)-NH-CO-CH $_2$: s , 5,03, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m , 4,50–3,73, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H $_2$ und 2 \times C(γ)H $_2$: m , 2,60–1,50, zum Teil unter dem DMSO-Signal. – NMR. (CF $_3$ COOH): Glu 2: C(α)-NH: d , 7,60, J = 8 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: s , 7,33, 10 Pr; 2 \times Benzyl-CH $_2$: b s , 5,23, 4 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m , 4,90–4,30, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H $_2$ und 2 \times C(γ)H $_2$: m , 2,90–2,00, 8 Pr. – DC.: Rf = 0,55 (Kieselgel; Lsg.: Essigsäureäthylester/Äther 1:1; Sprühreagenz: ges. Lösung von Kaliumbichromat in konz. Schwefelsäure; 100°, 5 Min.: grau). – Smp.: 155,8–157,4°.

γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (V). Nach den von uns modifizierten Methoden [10–11]: 1 g (1,99 mmol) Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure- γ -benzylester (IV) werden in 30 ml Eisessig und 10 ml Wasser mit 500 mg Pd/C (10% Pd) hydriert (760 Torr, 22°) und decarboxyliert. (Der Endpunkt der Decarboxylierung wird mit Hilfe einer ges. Ba(OH) $_2$ -Lösung angezeigt.) Der Katalysator wird abfiltriert, das Filtrat auf 4 ml eingengt und das Produkt (V) durch Zugabe von 30 ml Aceton ausgefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in 5 ml Wasser gelöst und 20 ml Aceton zugegeben, wodurch sich nach 3 bis 4 Min. einige Tropfen Öl abscheiden. Die überstehende Lösung wird abdampft, mit weiteren 20 ml Aceton versetzt und stehen gelassen (+5°, 1 Std.). Die auskristallisierte Säure (V) wird abzentrifugiert und getrocknet (0,01 Torr, 100°, 8 Std.): 460 mg (83,3%). – NMR. (d_6 -DMSO): Glu 2: C(α)-NH: d , 8,20, J = 8 Hz, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: C(α)-NH $_2$, 2 \times C(α)-COOH und C(γ)-COOH $_2$: b s , 7,90, 5 Pr; Glu 2: C(α)H: m , 4,46–3,83, 1 Pr; Glu 1: C(α)H: m , 3,66–3,20, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H $_2$ und 2 \times C(γ)H $_2$: m , 2,60–1,60, zum Teil unter dem DMSO-Signal. – NMR. (CF $_3$ COOH): Glu 1: C(α)-NH $_2$: b s , 7,82, 2 Pr; Glu 2: C(α)-NH: d , 7,60, J = 8 Hz, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m , 5,10–4,33, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H $_2$ und 2 \times C(γ)H $_2$: m , 3,20–2,00, 8 Pr. – NMR. (D $_2$ O): Glu 2: C(α)H: p -artiges m , 5,35–5,00, 1 Pr; Glu 1: C(α)H: t , 4,66, J = 6 Hz, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H $_2$ und 2 \times C(γ)H $_2$: m , 3,60–2,60, 8 Pr. – DC.: Rf = 0,20 (Kieselgel); Lsg.: n -Butanol/Eisessig/1proz. Ammoniak 11:6:3; Sprühreagenz: Ninhydrin 0,1% (Merck); 100°, 5 Min.: orange). – Smp.: 194,4–195,8°. [α] $_{589}^{25}$ = +3,5 \pm 0,6° (c = 1; 0,5N HCl).

C $_{10}$ H $_{16}$ N $_2$ O $_7$ (276,26) Ber. C 43,48 H 5,84 N 10,14% Gef. C 43,17 H 5,73 N 10,24%

p -Nitro-benzoyl-L-glutaminsäure- γ -methylester (VI). Nach der von uns modifizierten Methode [7]: 1 g (6,20 mmol) L-Glutaminsäure- γ -methylester und 1,65 g NaHCO $_3$ werden in 15 ml Wasser und 4 ml Aceton gelöst. Unter Rühren kommen 1,14 g (6,20 mmol) p -Nitro-benzoyl-chlorid (Fluka, puriss.) dazu, wobei eine dunkelviolette Farbe erscheint. Das Gemisch wird 4 Std. bei Zimmertemperatur weitergerührt, anschliessend filtriert und das Filtrat mit 12N HCl auf pH 1,5–2,0 gebracht, wobei das Produkt (VI) als Öl ausfällt, welches mit Chloroform (ca. 40 ml) ausgeschüttelt und mit Wasser gewaschen wird. Einengung zur Trockene, Umkristallisation des Rückstandes aus Benzol und stehenlassen (+5°, 4 Std.), wobei das Produkt (VI) kristallin ausfällt. Abfiltrieren und trocknen (0,01 Torr, 60°, 6 Std.) ergibt 1,43 g (74,4%) VI $_2$. – NMR. (d_6 -

1) Die Signallage dieser Protonen hängt vom Wassergehalt des Lösungsmittels und der Messkonzentration ab.

2) Das Produkt (VI) enthält auch nach der Trocknung noch etwas Benzol (NMR.-spektroskopisch feststellbar).

DMSO): C(α)-NH: d , 8,90, J = 8 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: $AA'BB'$ -System: δ_A = 8,31, δ_B = 8,08, J = 8 Hz, 4 Pr; C(α)H: q -artiges m , 4,70-4,20, 1 Pr; C(γ)-COOCH₃: s , 3,60, 3 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: m , 2,00-1,80, zum Teil unter dem DMSO-Signal. - NMR. (CF₃COOH): Aromat. Pr: $AA'BB'$ -System: δ_A = 8,41, δ_B = 8,11, J = 8 Hz, 4 Pr; C(α)-NH: verdeckt unter dem $AA'BB'$ -System; $ca.$ 8,15, 1 Pr; C(α)H: q -artiges m , 5,35-4,85, 1 Pr; C(γ)-COOCH₃: s , 3,90, 3 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: m , 3,00-2,30, 4 Pr. - MS.: m/e (rel. %) 310 (M^+ , 3), 292 (1), 279 (3), 265 (23), 233 (3), 205 (4), 193 (4), 167 (4), 160 (6), 150 (100), 120 (10), 104 (38), 92 (13), 76 (25). - DC.: Rf = 0,47 (Kieselgel; Lsg.: Äthanol (95%)). - $[\alpha]_{589}^{24}$ = -9,0 \pm 0,5° [c = 4; Äthanol (99%)].

p-Nitro-benzoyl-L-glutaminsäure- γ -hydrazid (VII) [7]. NMR. (d₆-DMSO): C(α)-NH: d , 9,13, J = 8 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: $AA'BB'$ -System: δ_A = 8,41, δ_B = 8,11, J = 8 Hz, 4 Pr; C(α)-COOH und C(γ)-CO-NH-NH₂: b s , 6,80; C(α)H: m , 4,66-4,17, 1 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: m , 2,60-1,80, zum Teil unter dem DMSO-Signal. - NMR. (CF₃COOH): Aromat. Pr: $AA'BB'$ -System: δ_A = 8,35, δ_B = 8,08, J = 8 Hz, 4 Pr; C(α)-NH: verdeckt unter dem $AA'BB'$ -System; $ca.$ 8,15, 1 Pr; C(α)H: q -artiges m , 5,20-4,80, 1 Pr; C(β)H₂ und C(γ)H₂: m , 3,20-2,00, 4 Pr. - MS.: m/e (rel. %) 292 (M^+ -18 (H₂O), 7), 276 (6), 261 (5), 248 (10), 233 (6), 167 (5), 150 (100), 120 (24), 104 (33), 98 (17), 84 (18), 76 (20). - DC.: Rf = 0,58 (Kieselgel; Lsg.: DMSO/Aceton/Äther 1:4:4).

p-Nitro-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure (VIII). 1. Syntheseweg (V \rightarrow VIII): 1 g (3,61 mmol) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (V) und 2,2 g Na₂CO₃ werden in 25 ml Wasser und 12 ml Aceton gelöst. Dazu kommen bei Zimmertemp. 670 mg (3,61 mmol) *p*-Nitro-benzoyl-chlorid, wobei sich die Lösung violett färbt. Die Mischung wird 4 Std. gerührt und anschliessend von wenig ungelösten Teilchen abfiltriert. Einengen bis alles Aceton entfernt ist, Behandlung mit Aktivkohle bei 50°, filtrieren, versetzen des Filtrates mit 12N HCl bis pH 1,5, nochmaliges Abfiltrieren von wenig Niederschlag und Stehenlassen (+5°, 24 Std.) ergibt ein weisses Produkt (VIII). Umkristallisation aus Äthanol/Wasser 1:6, stehen lassen (+5°, 48 Std.), abfiltrieren und trocknen (0,01 Torr, 22°, 6 Std.) ergibt 1,17 g (76,5%) VIII.

2. Syntheseweg (VII \rightarrow VIII): Vgl. [7]. Beide Synthesewege ergeben das identische Produkt VIII. - NMR. (d₆-DMSO): Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)-COOH und C(γ)-COOH: b s , 12,33, 3 Pr; Glu 1: C(α)-NH: d , 9,00, J = 8 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr: $AA'BB'$ -System: δ_A = 8,34, δ_B = 8,16, J = 8 Hz, 4 Pr; Glu 2: C(α)-NH: verdeckt unter dem $AA'BB'$ -System, $ca.$ 8,1, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m , 4,70-4,00, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H₂ und 2 \times C(γ)H₂: m , 2,00-1,60, zum Teil unter dem DMSO-Signal. - NMR. (CF₃COOH): Aromat. Pr: $AA'BB'$ -System: δ_A = 8,41, δ_B = 8,11, J = 8 Hz, 4 Pr; Glu 1: C(α)-NH: verdeckt unter dem $AA'BB'$ -System; $ca.$ 8,1, 1 Pr; Glu 2: C(α)-NH: d , 7,70, J = 8 Hz, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m , 5,16-4,66, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H₂ und 2 \times C(γ)H₂: m , 3,05-1,90, 8 Pr. - DC.: Rf = 0,27 (Kieselgel; Lsg.: Äthanol (95%)/Äther 4:1). - Smp.: 194,2-195,5°. - $[\alpha]_{589}^{22}$ = -12,2 \pm 0,5° [c = 1; Äthanol (99%)].

C₁₇H₁₉N₃O₁₀ (425,35) Ber. C 48,00 H 4,50 N 9,88% Gef. C 47,71 H 4,70 N 10,14%

p-Nitro-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester (IX). In eine Lösung von 1 g (2,35 mmol) *p*-Nitrobenzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure (VIII) und 20 ml Methanol (99%) werden unter Rühren bei 22° (Kühlung nötig) HCl während 30 Min. eingeleitet. Die Lösung wird anschliessend zur Trockene eingengt, der Rückstand aus Methanol (99%) umkristallisiert und das kristalline Produkt (IX) getrocknet (0,01 Torr, 22°, 4 Std.): 937 mg (85,3%). - NMR. (CDCl₃): Aromat. Pr: $AA'BB'$ -System: δ_A = 8,25, δ_B = 8,05, J = 8 Hz, 4 Pr; Glu 1: C(α)-NH: verdeckt unter dem $AA'BB'$ -System, 1 Pr; Glu 2: C(α)-NH: d , 6,80, J = 7 Hz, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m , 4,90-4,33, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)-COOCH₃ und C(γ)-COOCH₃: 3 \times s , 3,79, 3,66 und 3,63, 3 \times 3 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H₂ und 2 \times C(γ)H₂: m , 2,66-1,80, 8 Pr. - NMR. (d₆-DMSO): Glu 1: C(α)-NH: d , 9,20, J = 7 Hz, 1 Pr; Aromat. Pr.: $AA'BB'$ -System: δ_A = 8,35, δ_B = 8,15, J = 8 Hz, 4 Pr; Glu 2: C(α)-NH: verdeckt unter dem $AA'BB'$ -System, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m , 4,70-4,10, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)-COOCH₃ und C(γ)-COOCH₃: 3 \times s , 3,70, 3,63 und 3,60, 3 \times 3 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H₂ und 2 \times C(γ)H₂: m , 2,60-1,66, zum Teil unter dem DMSO-Signal. - NMR. (CF₃COOH): Aromat. Pr: $AA'BB'$ -System: δ_A = 8,40, δ_B = 8,10, J = 8 Hz, 4 Pr; Glu 1: C(α)-NH: zum Teil unter dem $AA'BB'$ -System, $ca.$ 8,1, 1 Pr; Glu 2: C(α)-NH: d , 7,86, J = 7 Hz, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m , 5,31-4,43, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)-COOCH₃ und C(γ)-COOCH₃: 3 \times s , 4,00, 3,91 und 3,86, 3 \times 3 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H₂ und 2 \times C(γ)H₂: m , 3,00-2,00, 8 Pr. - MS.: m/e (rel. %) 467

(M^+ , 1), 436 (2), 408 (13), 293 (7), 242 (30), 182 (11), 150 (100), 144 (12), 120 (39), 116 (47), 104 (40), 92 (16), 84 (47), 76 (22), 56 (25). - DC.: Rf = 0,69 (Kieselgel; Lsg.: Äthanol (95%)/Äther 4:1). - Smp.: 157,0-157,5°. - $[\alpha]_{589}^{20} = -31,4 \pm 0,5^\circ$ [$c = 0,5$; Äthanol (99%)].

$C_{20}H_{25}N_3O_{10}$ (467,42) Ber. C 51,39 H 5,39 N 8,99% Gef. C 51,48 H 5,47 N 8,89%

p-Amino-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester (X). 1 g (2,14 mmol) *p*-Nitro-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester (IX) wird in 200 ml Äthanol (95%) gelöst und nach Zugabe von 100 mg Platinoxid bei Zimmertemp. und 50 psi 3 Std. lang hydriert. Nach Abfiltrierung des Katalysators und Einengung bleibt X als Öl zurück, welches in 4 ml Äthanol (95%) aufgenommen, mit 40 ml Äther versetzt und stehen gelassen wird (+5°, 6 Std.). Der weisse Niederschlag wird abfiltriert, aus Äthanol (95%)/Äther 1:6 unkrystallisiert, abfiltriert und getrocknet (0,01 Torr, 22°, 4 Std.): 856 mg (91,2%). - NMR. ($CDCl_3$): Aromat. Pr.: $AA'BB'$ -System: $\delta_A = 7,63$, $\delta_B = 6,60$, $J = 8$ Hz, 4 Pr; Glu 1: C(α)-NH: d , 7,26, $J = 7$ Hz, 1 Pr; Glu 2: C(α)-NH: d , 6,93, $J = 7$ Hz, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)H$: m , 4,90-4,33, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)-COOCH_3$ und C(γ)- $COOCH_3$: $3 \times s$, 3,73, 3,66 und 3,63, 3×3 Pr; *p*-NH₂: verdeckt unter den Methylester-Signalen, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\beta)H_2$ und $2 \times C(\gamma)H_2$: m , 2,60-1,66, 8 Pr. - NMR. (d_6 -DMSO): Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)$ -NH: d , 8,20, $J = 7$ Hz, 2 Pr; Aromat. Pr.: $AA'BB'$ -System: $\delta_A = 7,60$, $\delta_B = 6,53$, $J = 8$ Hz, 4 Pr; *p*-NH₂: s , 5,60, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)H$: m , 4,60-4,00, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)-COOCH_3$ und C(γ)- $COOCH_3$: m , 3,70-3,45, 9 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\beta)H_2$ und $2 \times C(\gamma)H_2$: m , 2,60-1,50, zum Teil unter dem DMSO-Signal. - NMR. (CF_3COOH): Aromat. Pr.: $AA'BB'$ -System: $\delta_A = 8,08$, $\delta_B = 7,68$, $J = 8$ Hz, 4 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)$ -NH: unter dem $AA'BB'$ -System verdeckt, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)H$: m , 5,22-4,50, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)-COOCH_3$ und C(γ)- $COOCH_3$: $3 \times s$, 3,96, 3,91 und 3,86, 3×3 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\beta)H_2$ und $2 \times C(\gamma)H_2$: m , 3,00-1,90, 8 Pr. - MS.: *m/e* (rel. %) 437 (M^+ , 2), 406 (1), 317 (4), 300 (2), 242 (3), 176 (3), 120 (100), 92 (11), 84 (8), 65 (8). - DC.: Rf = 0,64 (Kieselgel; Lsg.: Äthanol (95%)/Äther 4:1; Sprühreagenz: Ninhydrin 0,1% (Merck); 100°, 5 Min.: violett). - Smp.: 116,3-116,7°. - $[\alpha]_{589}^{20} = -31,2 \pm 0,5^\circ$ [$c = 1$; Äthanol (99%)].

$C_{20}H_{27}N_3O_8$ (437,44) Ber. C 54,91 H 6,22 N 9,61% Gef. C 55,15 H 6,25 N 9,37%

N(2')-Acetyl-6-[*N*-(*p*-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester)-azomethin]-pterin(XI). 500 mg (1,85 mmol) *N*(2')-Acetyl-6-formylpterin-dihydrat [1] und 1144 mg (2,61 mmol) *p*-Amino-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester (X) werden durch Pulverisierung intensiv miteinander vermischt. Das Gemisch wird im Hochvakuum (0,01 Torr) zwischen 125 und 130° zum Schmelzen gebracht, wobei das bei der Kondensation zum Azomethinpterin entstehende Wasser gasförmig entweicht (Blasenbildung in der Schmelze). Die Reaktion ist nach 15 Min. beendet. Nach Abkühlung auf Zimmertemp. wird der entstandene harte Rückstand aus heissem Acetonitril umkrystallisiert, wobei wenig, unlösliche, weisse Zersetzungsprodukte nicht in Lösung gehen. Heisses Filtrieren ergibt eine hellgelbe, klare Lösung, aus der sich nach dem langsamen Abkühlen und Stehenlassen (-15°, 48 Std.) *N*(2')-Acetyl-6-[*N*-(*p*-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester)-azomethin]-pterin (XI) voluminös ausscheidet. Das Produkt wird abzentrifugiert, mit wenig kaltem Acetonitril, Äther gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 60°, 6 Std.): 910 mg (75,1%). - NMR.³⁾ Das Azomethinpterin (XI) liegt in einer *syn*- und *anti*-Form vor. Die beiden geometrischen Isomeren können am unterschiedlichen Verhalten ihrer arom. Pr. in CF_3COOH erkannt werden. «Hauptprodukt», ca. 80%: C(9)H: s , 10,00, 1 Pr; C(7)H: s , 9,80, 1 Pr; Aromat. Pr.: s , 8,23, 4 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)$ -NH: unter den arom. Pr. 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)H$: m , 5,30-4,60, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)-COOCH_3$ und C(γ)- $COOCH_3$: $3 \times s$, 3,95, 3,91 und 3,86, 3×3 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\beta)H_2$ und $2 \times C(\gamma)H_2$: m , 3,05-2,00, 8 Pr; *N*(2')-CO-CH₃: s , 2,53, 3 Pr. «Nebenprodukt», ca. 20%: Aromat. Pr.: $AA'BB'$ -System: $\delta_A = 8,08$, $\delta_B = 7,75$, 4 Pr.

In d_6 -DMSO unterscheiden sich die arom. Pr. der beiden Isomeren nicht. (d_6 -DMSO): C(9)H: s , 9,50, 1 Pr; C(7)H: s , 8,76, 1 Pr; Glu 1: C(α)-NH: d , 8,76, $J = 7$ Hz, 1 Pr; Glu 2: C(α)-NH: d , 8,30, $J = 7$ Hz, 1 Pr; Aromat. Pr.: $AA'BB'$ -System: $\delta_A = 8,00$, $\delta_B = 7,50$, $J = 8$ Hz, 4 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)H$: m , 4,66-4,00, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: $2 \times C(\alpha)-COOCH_3$

³⁾ Für die Bestimmung der NMR.-Signallagen der Pterine XI, XII und XIII vgl. die Zuordnungen und Doppelresonanzexperimente in [1].

und C(γ)—COOCH₃: 3 \times s, 3,70, 3,66 und 3,60, 3 \times 3 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H₂ und 2 \times C(γ)H₂: m, 2,60–1,33, zum Teil unter dem DMSO-Signal; N(2')—CO—CH₃: s, 2,20, 3 Pr. — $[\alpha]_{589}^{22} = -29,8 \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,5$; 0,1N HCl).

C₂₉H₃₂N₈O₁₀ (652,61) Ber. C 53,37 H 4,94 N 17,17% Gef. C 53,28 H 5,11 N 17,33%

N(2')-Acetyl-6-[N-(p-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester)-aminomethyl]-pterinmonohydrat: N(2')-Acetyl-pteroyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester-monohydrat (XII). 200 ml 50proz. Äthanol werden mit Stickstoff gesättigt. Dazu kommen 30 mg (0,80 mmol) Natriumborhydrid und unmittelbar darauf 500 mg (0,76 mmol) N(2')-Acetyl-6-[N-(p-benzoyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester)-azomethin]-pterin (XI). Dann erhöht man die Temperatur innerhalb 10 Min. auf 45°, gibt portionsweise, innerhalb 10 Min. bei 45°, gesamthaft 15 mg (0,40 mmol) Natriumborhydrid zu, worauf 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 und rasch auf Zimmertemp. abgekühlt. Das Gemisch wird unter Vakuum zur Trockene eingeeengt und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Nach dem langsamen Abkühlen und Stehenlassen (+5°, 24 Std.) scheidet sich N(2')-Acetyl-pteroyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester-monohydrat (XII) kristallin aus. Das Produkt XII wird abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 22°, 6 Std.): 268 mg (52,0%). — NMR. (CF₃COOH): C(7)H: s, 9,10, 1 Pr; Aromat. System: AA'BB'-System: $\delta_A = 8,08$, $\delta_B = 7,85$, $J = 8$ Hz, 4 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)—NH: unter dem AA'BB'-System, 2 Pr; C(9)H₂: s, 5,20, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m, 5,10–4,40, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)—COOCH₃ und C(γ)—COOCH₃: 3 \times s, 3,86, 3,83 und 3,76, 3 \times 3 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H₂ und 2 \times C(γ)H₂: m, 3,00–2,00, 8 Pr; N(2')—CO—CH₃: s, 2,45, 3 Pr. — NMR. (d₆-DMSO): C(7)H: s, 8,81, 1 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)—NH: b d, 8,26, $J = ca.$ 7 Hz, 2 Pr; Aromat. Pr: AA'BB'-System: $\delta_A = 7,66$, $\delta_B = 6,66$, $J = 8$ Hz, 4 Pr; N(10)H: t, 7,00, $J = 6$ Hz, 1 Pr; C(9)H₂: d, 4,60, $J = 6$ Hz, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m, 4,60–4,20, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)—COOCH₃ und C(γ)—COOCH₃: 3 \times s, 3,63, 3,61 und 3,58, 3 \times 3 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(β)H₂ und 2 \times C(γ)H₂: m, 2,60–1,66, zum Teil unter dem DMSO-Signal; N(2')—CO—CH₃: s, 2,19, 3 Pr. — DC.: Rf = 0,50 (Cellulose; Lsg.: 4proz. NH₄Cl). — $[\alpha]_{589}^{22} = -42,2 \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,25$; 1N HCl). $[\alpha]_{589}^{22} = -21,0 \pm 0,5^\circ$ [$c = 0,25$; Äthanol (99%)].

C₂₉H₃₄N₈O₁₀H₂O (672,64) Ber. C 51,77 H 5,39 N 16,65% Gef. C 51,83 H 5,57 N 16,46%

Pteroyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure: Pteroyldiglutaminsäure (XIII). 60 ml 1N NaOH werden mit sauerstofffreiem Stickstoff gesättigt. Dazu kommen 250 mg (0,37 mmol) N(2')-Acetyl-pteroyl-L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester-monohydrat (XII). Die Lösung wird auf 80° erwärmt, anschliessend das pH mit Eisessig auf 4 gebracht, das Gemisch auf 95° erhitzt und das pH mittels 1N HCl auf 1,5 eingestellt. Zugabe von wenig Aktivkohle, heisses Filtrieren, langsames Abkühlen auf Zimmertemp. und Stehenlassen (+5°, 24 Std.) ergibt hellgelbe, kristalline Pteroyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure (XIII). Das Produkt (XIII) wird abzentrifugiert, mit Wasser, Aceton, Äther gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 22°, 6 Std.): 150 mg (68,6%). — NMR. (CF₃COOH): C(7)H: s, 8,96, 1 Pr; Aromat. Pr: AA'BB'-System: $\delta_A = 8,15$, $\delta_B = 7,91$, $J = 8$ Hz, 4 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)—NH: unter dem AA'BB'-System, 2 Pr; C(9)H₂: s, 5,25, 2 Pr; Glu 1 und Glu 2: 2 \times C(α)H: m, 5,20–4,65, 2 Pr; 2 \times C(β)H₂ und 2 \times C(γ)H₂: m, 3,10–2,10, 8 Pr. — DC.: Rf = 0,61 (Cellulose; Lsg.: 4proz. NH₄Cl). — $[\alpha]_{589}^{22} = -22 \pm 1^\circ$ ($c = 0,25$; 1N HCl).

C₂₄H₂₆N₈O₉H₂O (588,52) Ber. C 48,98 H 4,80 N 19,04% Gef. C 48,79 H 5,17 N 19,49%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 44. Mitt.: J. H. Bieri & M. Viscontini Helv. 56, 2905 (1973).
- [2] R. L. Blakley, "The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines", Wiley, New York 1969.
- [3] H. A. Godwin, I. H. Rosenberg, C. R. Ferenz, P. M. Jacobs & J. Meienhofer, J. biol. Chemistry 247, 2266 (1972).
- [4] C. M. Baugh, J. C. Stevens & C. L. Krumdieck, Biochim. biophys. Acta 212, 116 (1970).
- [5] A. V. Hoffbrand & T. J. Peters, Biochim. biophys. Acta 192, 479 (1969).
- [6] J. H. Boothe, J. H. Mowat, B. L. Hutchings, R. B. Angier, C. W. Waller, E. L. R. Stokstad, J. Semb, A. L. Gazzola & Y. SubbaRow, J. Amer. chem. Soc. 70, 1099 (1948).

- [7] J. H. Boothe, J. Semb, C. W. Waller, R. B. Angier, J. H. Mowat, B. L. Hutchings, E. L. R. Stokstad & Y. SubbaRow, J. Amer. chem. Soc. 71, 2304 (1949).
 [8] C. L. Krumdieck & C. M. Baugh, Biochemistry 8, 1568 (1969); J. Meienhofer, P. M. Jacobs, H. A. Godwin & I. H. Rosenberg, J. org. Chemistry 35, 4137 (1970).
 [9] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, J. biol. Chemistry 241, 2491 (1966).
 [10] S. G. Waley, J. chem. Soc. 1955, 517.
 [11] W. J. LeQuesne & G. T. Young, J. chem. Soc. 1950, 1959.

304. Über Pterinchemie

46., vorläufige Mitteilung [1]

Identifizierung von substituierten Tetrahydropterininen durch Gas-Chromatographie und Massenspektrometrie

von Rudolf Weber, Willi Frick und Max Viscontini

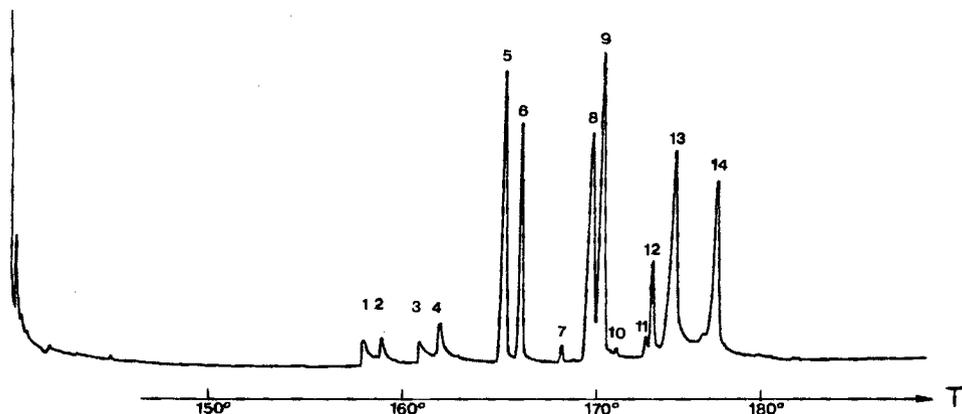
Organisch-chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(25. X. 73)

Zusammenfassung. Silylierte, substituierte Tetrahydropterine lassen sich mit Hilfe der Glaskapillarchromatographie voneinander trennen. Die Kombination Glaskapillarchromatographie-Massenspektrometrie erlaubt, die getrennten Tetrahydropterine zu identifizieren.

Unsere Forschungen mit substituierten Tetrahydropterininen machten die Erarbeitung neuer analytischer Methoden zur Identifizierung jener Substanzen notwendig. Die Gas-Chromatographie schien uns dazu geeignet, zumal ihre Anwendung auf oxydierte Pterine schon bekannt war [2].

Von zwei 7,8-Dihydro- und vier 5,6,7,8-Tetrahydropterininen wurden in Hexamethyldisilazan die Silylderivate hergestellt und die Mischung auf einer Glaskapillare OV 101 (20 m, 0,33 mm i.D.) getrennt (Figur).



Die 14 in der Figur erscheinenden Substanzen wurden beim Anschluss der Glaskapillare an ein niederauflösendes Massenspektrometer als folgende Mono- Di- und Trisilylderivate identifiziert: