

293. Über Pterinchemie

50. Mitteilung [1]

 ^{13}C -NMR.-Spektren von 7,8-Dihydro- und 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure

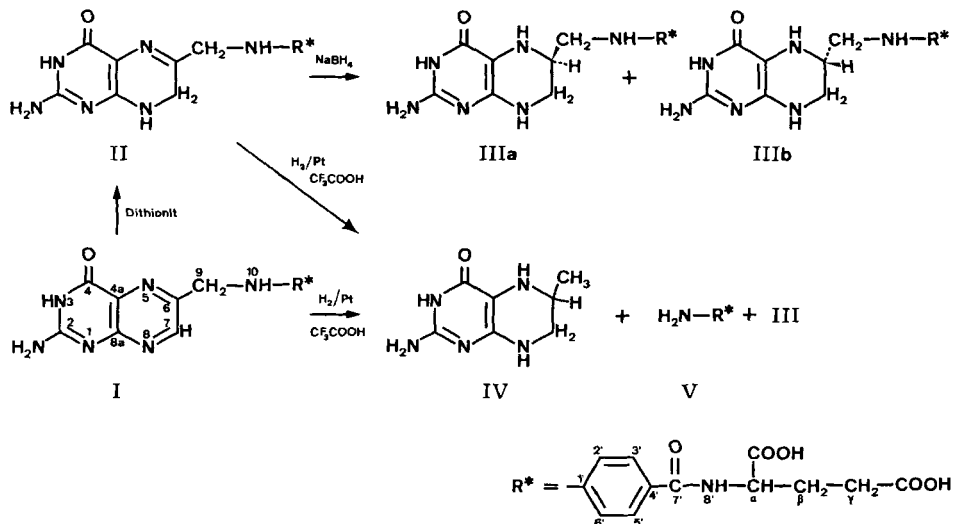
von Willi Frick, Rudolf Weber und Max Viscontini

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

(18. XI. 74)

Zusammenfassung. Es wird eine verbesserte, leichte und mit guter Ausbeute verlaufende Herstellungsmethode für reine Tetrahydrofolsäure beschrieben. Die ^{13}C -NMR.-Spektren von Dihydro- und Tetrahydrofolsäure werden diskutiert.

Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten über die Konfiguration der Tetrahydropterine benötigten wir Spektren von reiner Tetrahydrofolsäure. Mit reiner Tetrahydrofolsäure (III) bezeichnen wir im folgenden die Mischung der zwei Diastereomeren IIIa und IIIb, da es uns noch nicht gelungen ist, diese Mischung in ihre zwei Komponenten zu zerlegen.



1947 berichteten *O'Dell et al.*, dass sich Folsäure in Eisessig katalytisch zu Tetrahydrofolsäure reduzieren liess [2]. Eine Isolierung des reduzierten Produktes wurde jedoch nicht unternommen. Nachdem es uns gelungen war, durch katalytische Reduktion von Pterinen in Trifluoressigsäure Tetrahydropterine sehr rasch und mit ausgezeichneten Ausbeuten zu erhalten, versuchten wir auch die Tetrahydrofolsäure nach dieser Methode herzustellen [3]. Zwar konnte das Sulfat der hydrierten Substanz erhalten werden, aber die Hydrierung dauerte viel länger ($1\frac{1}{2}$ Std.) als bei den übrigen Pterinen (20 Min.) und die beste Ausbeute (52%) liess zu wünschen übrig.

Bei neuen Untersuchungen haben wir festgestellt, dass während der Hydrierung eine partielle Hydrogenolyse der Folsäure in 6-Methyl-tetrahydropterin (IV) und *p*-Aminobenzoylglutaminsäure (V) stattfindet. Durch Säulenchromatographie, Gas-Chromatographie [4] und ^1H -NMR.-Spektroskopie konnten wir zeigen, dass IV in einer Ausbeute von 30–40% gebildet wird. Diese Reaktion verläuft wahrscheinlich analog zur katalytischen Hydrogenolyse von Benzylamin-Derivaten, die von *Sugi & Mitsui* untersucht worden ist [5]. *Hutchings et al.* hatten ihrerseits die reduktive Spaltung der Folsäure mittels Zinkstaub in salzsaurer Lösung zur Bestimmung dieses Vitamins verwendet, indem sie die *p*-Aminobenzoylglutaminsäure (V) kolorimetrisch bestimmten [6].

Mit dem Ziel, diese Hydrogenolyse zu vermeiden, haben wir nach einer schonenderen Methode zur Herstellung der Tetrahydrofolsäure gesucht. Vor 15 Jahren hatten wir beobachtet, dass Xanthopterin mittels NaBH_4 zu Dihydroxanthopterin, im Grunde genommen einem Tetrahydropterin, reduziert wird [7]. *Mathews et al.* publizierten kurz darauf die Reduktion von Dihydrofolsäure (II) mit NaBH_4 zu Tetrahydrofolsäure (III), jedoch ohne ein Produkt zu isolieren [8]. Wir haben uns dieser Methode bedient: ausgehend von Dihydrofolsäure nach *Futtermann* [9], reduzierten wir diese mit NaBH_4 zu Tetrahydrofolsäure, die wir als Dihydrochlorid reinigten. Dabei fanden wir nur noch geringe Anteile an 6-Methyl-tetrahydropterin (IV) (weniger als 5%), während die katalytische Hydrierung von Dihydrofolsäure (II) wiederum zu partieller Hydrogenolyse führte.

In Fig. 1 ist das «off»-Resonanz- ^{13}C -NMR.-Spektrum von Tetrahydrofolsäure abgebildet. Die Strichspektren von Folsäure (I) [10], Dihydrofolsäure (II) und Tetrahydrofolsäure (III) in Fig. 2 entsprechen den ^1H -rauschenkoppelten ^{13}C -Spektren

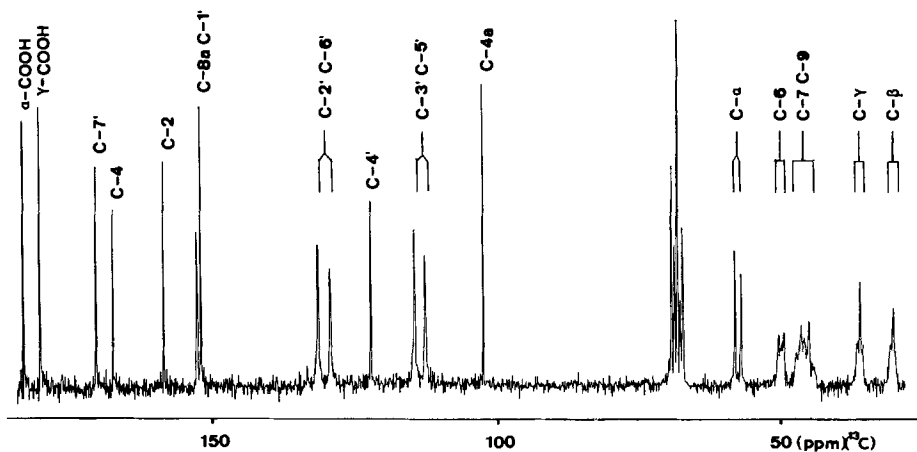


Fig. 1. ^{13}C -«off»-Resonanz Spektrum von Tetrahydrofolsäure in NaOD -Lösung ($\text{pH} = 13,7$)

Die Zuordnung von C(7) und C(9) in der Dihydrofolsäure erfolgte durch Deuterierung¹⁾. Gegenüber der undeuterten Verbindung war der C(9)-Pik stark verkleinert, was durch die schlechtere Relaxation des C(9)-Kerns durch die Deuterium-

¹⁾ R. Weber, W. Frick & M. Viscontini, Helv. in Vorbereitung.

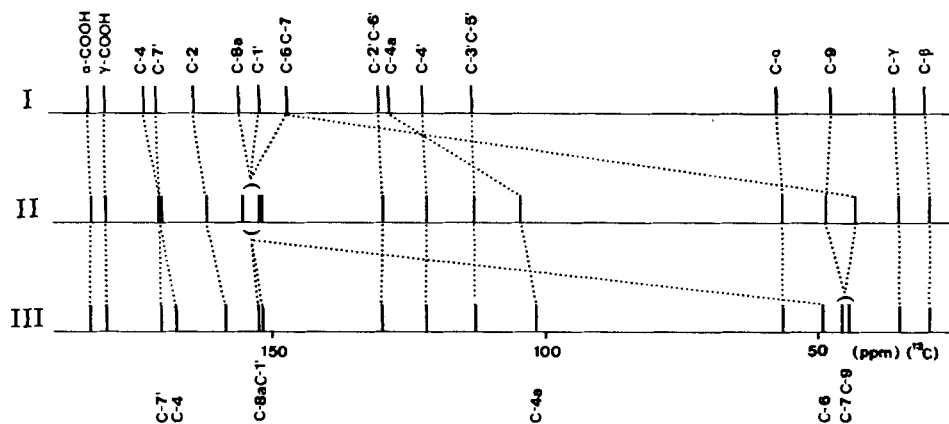


Fig. 2. Schematische Darstellung der ^1H -rauschenkoppelten ^{13}C -NMR.-Spektren von Folsäure (I), 7,8-Dihydrofolsäure (II) und Tetrahydrofolsäure (III) in NaOD-Lösung (I bei pH 12,4, II und III bei pH 13,7)

Atome erklärbar ist. Die Zuordnung im Tetrahydrofolsäure-Spektrum erfolgte aufgrund von ^{13}C -Spektren hydrierter Pterine [1] und unter der wohlbegründeten Annahme, dass die verschiedenen Hydrierungsstufen des Pyrazinringes in I, II und III keinen Einfluss auf die ^{13}C -Shifts des *p*-Aminobenzoylglutaminsäurerestes (V) haben.

Wir möchten betonen, dass keines der gemessenen Spektren Aufschluss darüber geben konnte, ob das erhaltene Tetrahydrofolsäure-dihydrochlorid aus einem einzigen Diastereomeren oder aus einer Mischung der zwei möglichen Diastereomeren besteht.

Wir danken Herrn Prof. W. von Philipsborn und den Herren dipl.-chem. U. Vögeli und R. Hollenstein für die Aufnahme der ^{13}C -Spektren sowie für ihre Hilfe bei deren Interpretation.

Experimenteller Teil

Nachweis des 6-Methyl-tetrahydropterins (IV). – a) Gas-chromatographisch: das Rohprodukt aus der katalytischen Hydrierung von Folsäure [3] wurde silyliert und mittels einer Kapillarkolonne das 6-Methyl-tetrahydropterin (IV) identifiziert [4]. Tetrahydrofolsäure selbst erscheint unter diesen Bedingungen nicht im Chromatogramm.

b) Säulenchromatographisch: Die wässrige Lösung des Rohproduktes wurde unter Stickstoff mit Diäthylamin auf pH 10 gebracht und über eine Kieselgelsäule (45 × 4,5 cm) mit Methanol/Diäthylamin (0,02%) chromatographiert. Die Identifizierung des eluierten 6-Methyl-tetrahydropterins erfolgte durch ^1H -NMR.-Spektroskopie. Die ^1H -NMR.-Spektren der bei verschiedenen Ansätzen erhaltenen rohen Tetrahydrofolsäure liessen jeweils einen Anteil des 6-Methyl-tetrahydropterins (IV) von 30–40% erkennen.

7,8-Dihydrofolsäure (II). Nach [9] hergestellt. Da die Reduktion unter Stickstoff durchgeführt wurde, konnte auf die Zugabe von Ascorbinsäure als Antioxydant verzichtet werden.

Tetrahydrofolsäure-dihydrochlorid (III). 500 mg (1,13 mmol) Dihydrofolsäure (II) wurden unter Stickstoff in 5 ml Wasser aufgeschlämmt und mit 3N NaOH auf pH 9–10 gebracht. Dann wurden 25 mg (0,66 mmol) NaBH_4 zugegeben und die Lösung mittels Magnetrührer gut durchgemischt. Nach 8 Std. wurden weitere 25 mg NaBH_4 zugegeben und nochmals 10 Std. gerührt. Nach Beendigung der Reduktion wurde mit 3N HCl soweit angesäuert bis die Tetrahydrofolsäure gerade noch in Lösung blieb. Die Lösung wurde zur Trockene eingeeengt und der Rückstand mit 2 ml 7N HCl versetzt. Die dabei unlösliche Borsäure wurde abzentrifugiert und einmal mit 7N

HCl gewaschen. Die vereinigten Extrakte wurden mit Tierkohle entfärbt. Beim Stehenlassen bildete sich innerhalb von einer Woche ein schwach gelblicher Niederschlag von Tetrahydrofolsäure-dihydrochlorid. Ausbeute: 356 mg (60%).

¹³C-NMR.-Spektren von II und III. 0,5M Lösungen von II bzw. III in D₂O wurden mit 40% NaOD auf pH 13,7 gebracht. Die Spektren wurden mit einem Varian XL-100 Puls-Spektrometer bei 25,2 MHz aufgenommen. Zur Stabilisierung dienten die ²H-Resonanzen des Lösungsmittels. Für rauschentkoppelte Spektren mussten 6000, für «off»-Resonanz 30 000 Impulsspektren akkumuliert werden. Als Standard diente Dioxan, die ermittelten Resonanzfrequenzen wurden mit δ_{TMS} (Dioxan) = 67,4 ppm auf die δ_{TMS} -Skala umgerechnet.

Die Substanzen wurden unter Stickstoff in NaOD gelöst. Die pH-Messungen erfolgten mit dem Metrohm-pH-Meter und mit einer Philips-Glaselektrode.

¹³C-Resonanzfrequenzen von Dihydrofolsäure (II) und Tetrahydrofolsäure (III) in ppm:

II: COOH(α): 183,3; COOH(γ): 180,4; C(7'): 170,8, 170,5; C(2): 162,1; C(8a), C(1'): C(6): 155,7, 152,4, 152,1; C(2''), C(6''): 129,9; C(4''): 121,9; C(3''): 113,0; C(5''): 113,0; C(4a): 104,4; C(α): 56,8; C(9): 48,5; C(7): 43,2; C(γ): 35,1; C(β): 29,4.

III: COOH(α): 183,3; COOH(γ): 180,3; C(7''): 170,4; C(4): 167,5; C(2): 158,5; C(8a), C(1''): 152,6, 151,8; C(2''), C(6''): 130,0; C(4''): 121,8; C(3''): 113,0; C(4a): 101,8; C(α): 56,6; C(6''): 49,1; C(7''): 45,5, 44,1; C(γ): 35,0; C(β): 29,3.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. H. Bieri & M. Viscontini, *Helv.* 57, 1651 (1974).
- [2] B. L. O'Dell, J. M. Vandenbelt, E. S. Bloom & J. J. Pfiffner, *J. Amer. chem. Soc.* 69, 250 (1947).
- [3] A. Bobst & M. Viscontini, *Helv.* 49, 875 (1966).
- [4] R. Weber, W. Frick & M. Viscontini, *Helv.* 56, 2919 (1973); *ibid.* 57, 1485 (1974).
- [5] Y. Sugi & S. Mitsui, *Tetrahedron* 29, 2041 (1973).
- [6] B. L. Hutchings, E. L. R. Stokstad, J. H. Boothe, J. H. Mowat, C. W. Waller, R. B. Angier, J. Semb & Y. Subbarow, *J. biol. Chemistry* 168, 705 (1947).
- [7] M. Viscontini, *Ind. chim. Belge* 10, 1181 (1960); M. Viscontini & M. Piraux, *Helv.* 45, 615 (1962).
- [8] C. K. Mathews & F. M. Huennekens, *J. biol. Chemistry* 238, 4005 (1963).
- [9] S. Futterman, *J. biol. Chemistry* 228, 1031 (1957).
- [10] U. Ewers, H. Günther & L. Jaenicke, *Chem. Ber.* 106, 3951 (1973); J. A. Lyon, P. D. Ellis & R. B. Dunlap, *Biochemistry* 12, 2425 (1973); G. Müller, Diplomarbeit, Universität Zürich, 1973.

294. Bildung von Estern und Lactonen durch Silberionen-Katalyse

von Hans Gerlach und Adolf Thalmann

Laboratorium für Organische Chemie der Eidg. Technischen Hochschule Zürich

(19. XI. 74)

Summary. A mild and efficient method for the preparation of esters has been found in the silver ion induced reaction of alcohols with 2-pyridyl esters of thiocarboxylic S-acids. Examples are given to show the utility of this push button activation for the rapid formation of macrocyclic lactones and esters at room temperature under non-basic conditions.

Es ist erstaunlich, dass für die Bildung von Estern aus Carbonsäuren und Alkoholen nur wenige, klassische Methoden¹⁾ zur Verfügung stehen. Bei der Herstellung

¹⁾ Aktivierung der Carbonylgruppe durch Protonierung oder Umwandlung in das Carbonylchlorid.