

Wenn das rohe Hydrochlorid des Salsolins (V) mit geringem Verlust aus absolutem Äthanol + Äther umkristallisiert wird, steigt der Schmelzpunkt auf 147–149°*).

Salsolinpikrat: Citrongelbe Nadeln; aus Wasser umkristallisiert und bei 80° getrocknet Schmp. 189–191°.

$C_{17}H_{18}O_9N_4$ (422.2) Ber. C 48.32 H 4.30 N 13.28 Gef. C 48.53 H 4.37 N 13.45

Aus den Angaben der Tafel ersieht man, daß die Kondensation sich nur bei β -[3,4-Dioxy-phenyl]-äthylamin-hydrobromid (IV a) und β -[3-Oxy-4-methoxy-phenyl]-äthylamin-hydrochlorid (IV e) vollzog. Bei den übrigen Phenyläthylamin-Derivaten kam die Bildung des Isochinolinringes praktisch nicht zustande.

118. Rudolf Tschesche und Friedhelm Korte: Über Pteridine, V. Mitteil.*): Die Konstitution des Ichthyopterins

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstitutes der Universität Hamburg]

(Eingegangen am 28. Juni 1951)

Es wurde papierchromatographisch erkannt, daß das von R. Hüttel und G. Sprengling beschriebene Ichthyopterin aus den Häuten von Cypriniden des Bodensees nicht vollkommen einheitlich ist. Die Hauptkomponente ist die 6,9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure; sie wurde synthetisch bereitet und stimmt in allen Eigenschaften mit dem Naturprodukt überein, soweit ein Vergleich bei den vorliegenden geringen Mengen des letztgenannten möglich war.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte sind von verschiedenen Arbeitsgruppen blau fluoreszierende Naturstoffe isoliert worden, die jedoch nur zu einem Teil in ihrer Konstitution erkannt werden konnten. Unter ihnen interessierte uns

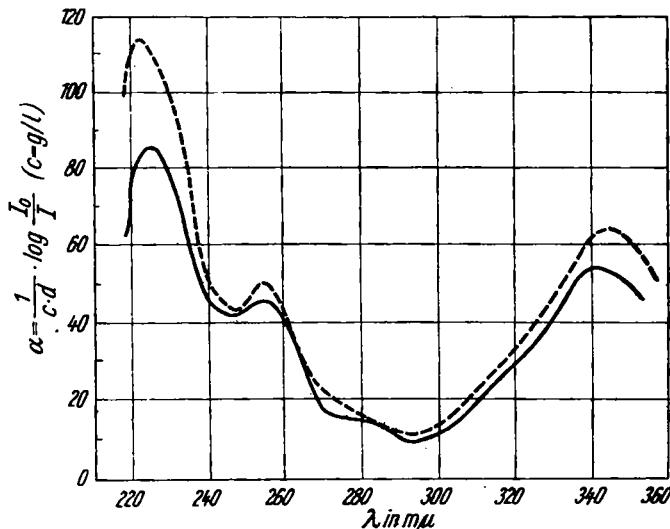


Abbildung 1. Lichtabsorption in n_{20} NaOH (d = 1 cm) von Ichthyopterin ($c = 0.0262$ g/l) — und Isoxanthopterin ($c = 0.0215$ g/l) - - -

* IV. Mitteil.: B. 84, 641 [1951].

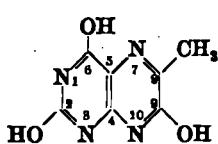
besonders das von Hüttel und Sprengling¹⁾ beschriebene Ichthyopterin, das nach seinem Verhalten den Pteridinen zuzuordnen ist. Herr Dr. Hüttel²⁾ stellte uns liebenswürdigerweise 4.9 mg Ichthyopterin zur Verfügung, das aus den Cypriniden *Leuciscus rutilus*, *Scardinius erythrophthalmus* und *Blicca björkna* isoliert worden war. Wir versuchten durch Vergleich mit synthetischen Produkten die Konstitution der Verbindung zu erkennen.

Als Kriterien standen uns das chemische Verhalten, UV-Spektrum, pH-Abhängigkeit der Fluorescenz und die Analyse zur Verfügung. Im chemischen Verhalten und dem UV-Spektrum (Abbild. 1) entspricht das Ichthyopterin weitgehend dem Isoxanthopterin.

Die Analogie ist so stark, daß man die beiden Stoffe für identisch halten könnte, wenn nicht die Analyse deutliche Unterschiede zeigte. Eine Gegenüberstellung der Verbrennungswerte ergibt folgenden Befund:

Ichthyopterin:	C 42.33–42.62	H 4.04–4.59	N 27.12–28.11
Ixoanthopterin:	C 40.22	H 2.81	N 39.10

Setzt man die Einheitlichkeit des Ichthyopterins voraus, so sind die Analysendaten so unterschiedlich, daß man trotz der großen Schwierigkeiten, die häufig einer richtigen Pteridin-Analyse entgegenstehen, die Identität beider Verbindungen ausschließen muß. Den in der Analyse von Hüttel zu niedrigen N-Wert versuchten wir zunächst derart zu deuten, daß vielleicht die NH₂-Gruppe in 2-Stellung des Pteridinsystems durch ein OH ersetzt ist. Da die OH-Gruppe in 9-Stellung weitgehend bestimend für das chemische und optische Verhalten eines Pteridins ist, sollte hier keine Änderung gegenüber Isoxanthopterin erwartet werden. Als Ort einer Substitution bleibt dann nur noch die 8-Stellung übrig. Um die Voraussetzungen der Analysenwerte zu erfüllen, substituierten wir zunächst diese Stellung durch CH₃ und synthetisierten die nebenstehende Verbindung.



Wir erhielten sie nach dem Verfahren von R. Tschesche, K. H. Köhncke und F. Korte³⁾ durch Umsatz des 2,6-Dioxy-4,5-diamino-pyrimidins mit Oxalessigester in Eisessig. Die dabei entstehende 2,6,9-Trioxy-pteridyl-essigsäure wird bei 280° zum 2,6,9-Trioxy-8-methyl-pteridin decarboxyliert. Um zu zeigen, daß sich bei dieser Kondensation nicht vielleicht das andere Isomere bildet, desaminierten wir 8-Methyl-isoxanthopterin mit Natriumnitrit in Schwefelsäure⁴⁾ und verglichen die so erhaltene Verbindung mit unserem durch Kondensation aus Oxalessigester gewonnenen Produkt. Die beiden Stoffe waren identisch, wodurch der Beweis erbracht ist, daß die vorliegende Verbindung dem Isoxanthopterin-Typ angehört.

Die Verbindung hat aber ein anderes UV-Spektrum und ist leichter löslich, der saure Charakter tritt mehr zurück, und die Fluorescenz ist nicht so ausgeprägt, wie beim Ichthyopterin. Dieses hat also sicher eine andere Konstitution (Abbild. 2).

¹⁾ A. 544, 69 [1943].

²⁾ Wir danken Hrn. Dr. R. Hüttel, München, auch an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des kostbaren Materials.

³⁾ B. 84, 485 [1951].

⁴⁾ E. C. Taylor jr. u. C. K. Cain, Journ. Amer. chem. Soc. 71, 2538 [1949].

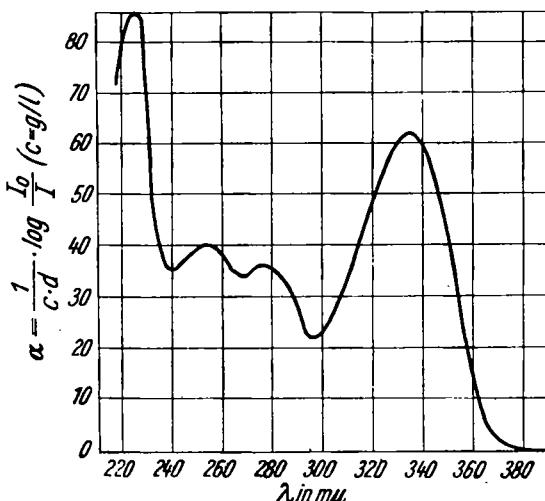
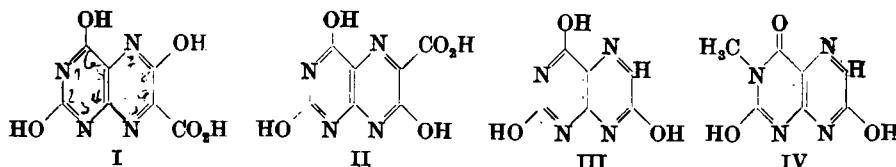


Abbildung 2. Lichtabsorption von 2,6,9-Trioxo-8-methyl-pteridin in $n/20$ NaOH ($c = 0.02055$ g/l; $d = 1$ cm)

Die Wahrscheinlichkeit, daß die unterzubringende CH_3 -Gruppe nicht in 8-Stellung, sondern an N^1 oder N^3 als N -Methyl angeordnet war, erschien zwar nicht sehr groß, sollte aber zur Sicherheit ausgeschlossen werden. Dazu synthetisierten wir zunächst die Verbindung IV über die Stufen II u. III.



2,6,9-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(8) (II) entsteht durch Umsatz des 2,6-Dioxy-4,5-diamino-pyrimidines mit Mesoxalsäure in wäßrigem Medium. Dabei bilden sich analog der Synthese der Isoxanthopterin-carbonsäure nach R. Purmann⁵⁾ die Isomeren I und II die sich durch heiße $2n$ NaOH trennen lassen. Dabei geht I mit gelber Farbe in Lösung, während sich aus II ein farbloses Natriumsalz bildet, das ausfällt. Die von W. Steinbuch⁶⁾ als hellgelb beschriebene „Desimino-isoxanthopterin-carbonsäure II“ ist also sicher ein Gemisch der beiden Isomeren. Die Spektren der beiden Carbonsäuren sind sehr ähnlich (Abbildung 3). Ebenso wie die Isoxanthopterin-carbonsäure läßt sich nun auch die 2,6,9-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(8) durch Erhitzen im Stickstoffstrom bei 280° zu 2,6,9-Trioxo-pteridin (III) de-carboxylieren. Dieses Desimino-isoxanthopterin ist ebenso wie sein 8-Methyl-Derivat in heißer n HCl erheblich löslicher als das Isoxanthopterin. Die Einführung einer OH-Gruppe

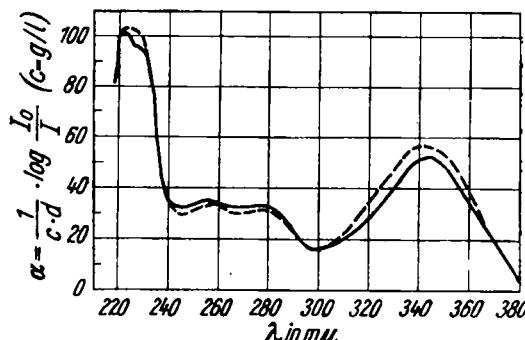


Abbildung 3. Lichtabsorption in $n/20$ NaOH (d = 1 cm) von 2,6,8-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(9) (II) und 2,6,9-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(8) (III) ($c = 0.02235$ g/l und $c = 0.028$ g/l)

⁵⁾ A. 548, 284 [1941].

⁶⁾ Helv. chim. Acta 31, 2051 [1948].

in 2-Stellung eines Pteridin-Derivates scheint die Löslichkeit in Wasser zu erhöhen. Das UV-Spektrum von III ist dem seines 8-Methyl-Derivates ähnlich (Abbildung 4).

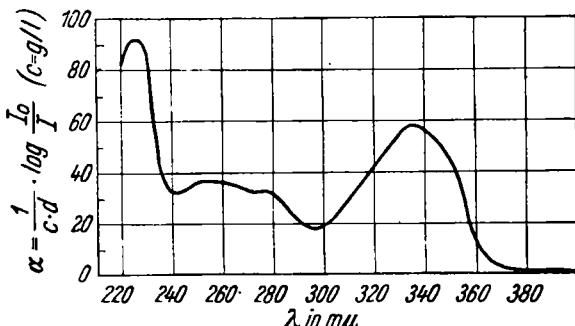


Abbildung 4. Lichtabsorption von 2,6,9-Trioxo-pteridin
(c = 0,020 g/l in $n/20$ NaOH, d = 1 cm)

Mit Sicherheit läßt sich zeigen, daß diese Verbindung in der Zusammensetzung vom Ichthyopterin abweicht, da ihr UV-Spektrum und ihre Löslichkeit in Wasser von denen des Ichthyopterins verschieden sind.

Nachdem wir noch ein dem 6,8-Dioxy-2-amino-9-acetyl-pteridin⁸⁾ entsprechendes desaminiertes Produkt durch Kondensation von 2,6-Dioxy-4,5-diamino-pyrimidin mit Acetoxoalester hergestellt und dessen physikalische Eigenschaften untersucht haben, läßt sich feststellen, daß sich 6-Oxy-2,4,5-triamino-pyrimidin bei der Kondensation mit α -Dicarbonyl-Verbindungen ähnlich wie das 2,6-Dioxy-4,5-diamino-pyrimidin verhält. Es bilden sich die beiden möglichen Isomeren in etwa gleichen Verhältnissen, wie bei der 2-Amino-Verbindung. Diese Isomeren lassen sich durch die gleichen oder ähnlichen Verfahren trennen, wie das bei den 6-Oxy-2-amino-pteridinen bekannt ist. Sie zeichnen sich jedoch diesen gegenüber durch eine erheblich größere Löslichkeit aus.

Auf Grund dieser Erfahrungen hielten wir es für unwahrscheinlich, Ichthyopterin unter den in 2-Stellung desaminierten Pteridinen zu finden. Nach den von Hüttel und Sprengling¹⁾ angegebenen Eigenschaften und der Tatsache, daß bisher in der Natur kein in 2-Stellung desaminiertes Pteridin aufgefunden wurde, versuchten wir, das Grundskelett des Ichthyopterins auf das 6-Oxy-2-amino-pteridin zurückzuführen. Um ganz sicher zu gehen, daß es sich nicht doch um ein verunreinigtes Isoxanthopterin handelte, untersuchten wir beide Verbindungen papierchromatographisch (vergl. die Tafel, S. 806). Dabei stellte sich heraus, daß sich das Ichthyopterin vom Isoxanthopterin und allen bisher in der Natur gefundenen Pteridinen unterscheidet, ferner auch, daß das Ichthyopterin von Hüttel und Sprengling nicht ganz einheitlich war. Neben dem Hauptfleck mit dem R_F-Wert 0,64 tritt nach dem Entwickeln mit 3-proz. Ammoniumchlorid-Wasser⁹⁾ noch ein schwächerer, blau fluoreszierender Fleck mit dem R_F-Wert 0,07 auf. An der aufgetropften Stelle

¹⁾ H. Bredereck u. E. Hoepfner, B. 75, 1094 [1942]; H. Bredereck, G. Müller u. E. Berger, B. 78, 1085 [1940].

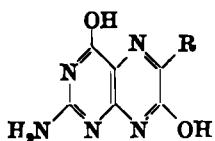
⁸⁾ R. Tschesche u. F. Korte, B. 84, 77 [1951].

⁹⁾ R. Tschesche u. F. Korte, B. 84, 641 [1951].

Zur Methylierung benutzten wir nach den Erfahrungen von H. Bredereck²⁾ an Purinen Dimethylsulfat. Es ließ sich unter den verschiedensten Versuchsbedingungen ein Produkt isolieren, das eine Methylgruppe mehr enthielt, deren Stellung in 1 oder in 3 angenommen werden kann. Aus den Hydrolysenbefunden von Taylor und Cain⁴⁾, nach denen eine 6-Amino-Gruppe am Pteridinskelett als Iminogruppe vorliegt, ist die Struktur IV am wahrscheinlichsten.

bleibt ein deutlich grün fluoreszierender Stoff zurück, der mit Ammoniumchlorid-Lösung nicht wandert. Diese Feststellungen der Papierchromatographie erleichterten die weitere Arbeit erheblich. Es war nach dem Nachweis einer Verunreinigung nicht mehr nötig, daß bei sonst gleichen Eigenschaften die Analyse eines synthetischen Produktes den von Hüttel und Sprengling angegebenen Werten genau entsprach.

Nimmt man die Analysenwerte als ungefähren Anhaltspunkt, legt das Grundskelett des 6-Oxy-2-amino-pteridins zugrunde und läßt weiter wegen des chemischen Verhaltens die OH-Gruppe in 9-Stellung, so kann der zu niedrige N-Wert nur durch Anwesenheit eines Substituenten in 8-Stellung hervorgerufen sein. Hierbei steht eine Substitution durch einen C und O enthaltenen Rest zur Diskussion. Die in den folgenden Formelbildern wiedergegebenen Verbindungen V-IX würden einer solchen Forderung entsprechen.



- V: R = $\text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_2\text{OH}$
 VI: R = $\text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO}_2\text{H}$
 VII: R = $\text{CH}_2 \cdot \text{CO}_2\text{H}$
 VIII: R = $\text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{CO}_2\text{H}$
 IX: R = $[\text{CH}(\text{OH})]_2 \cdot \text{CH}_2\text{OH}$

Von diesen kommt die Verbindung IX nicht in Betracht, da schon das 6,9-Dioxy-2-amino-8-oxymethyl-pteridin¹⁰⁾ ein anderes Spektrum aufweist als das Ichthyopterin. Wir hielten vor allem deswegen an dem von Hüttel und Sprengling angegebenen UV-Spektrum als Richtweiser fest, da sich der Einfluß einer Verunreinigung in der Analyse oft deutlicher ausprägt als im UV-Spektrum. Die Verbindungen V-VIII könnten ein dem Ichthyopterin ähnliches Spektrum zeigen. V scheidet aus, da es optisch aktiv sein müßte, und das Ichthyopterin zum mindesten keine erkennbare Drehung der Ebene des polarisierten Lichtes zeigte. Es bleiben also als Verbindungen, die möglicherweise mit Ichthyopterin identisch sein könnten, VI, VII und VIII übrig.

Wir synthetisierten sie durch Umsetzung des Oxalessigesters⁸⁾, Oxalpropionsäureesters¹¹⁾ bzw. des Oxalbernsteinsäureesters¹²⁾ mit 6-Oxy-2,4,5-triamino-pyrimidin in Eisessig. Bei der Kondensation mit Oxalbernsteinsäureester entsteht primär die Dicarbonsäure (analog VI; $\text{CH}(\text{CO}_2\text{H}) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO}_2\text{H}$ an Stelle von $\text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO}_2\text{H}$), die beim Umkristallisieren ebenso wie die Methyl-[6,9-dioxy-2-amino-

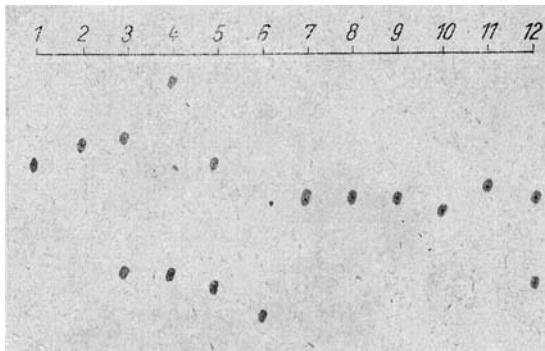


Abbildung 5. Papierchromatogramm
(Die Zahlen entsprechen der Nummerierung in der Tafel auf S. 808).

¹⁰⁾ K. H. Köhneke, Dissertat. Hamburg 1950.

¹¹⁾ R. F. B. Cox u. S. M. McElvain, Org. Syntheses 17, 54 [1937].

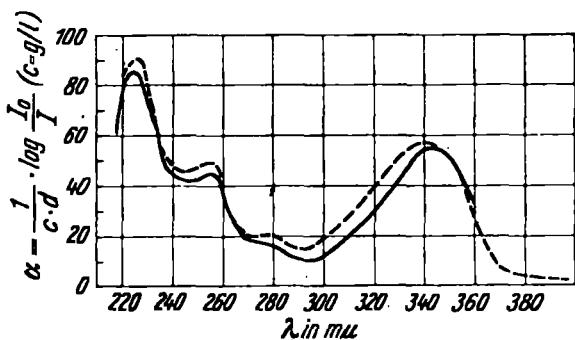
¹²⁾ W. Wislicenus u. M. Nassauer, A. 285, 1 [1895]; B. 22, 885 [1889].

pteridyl-(8)-essigsäure (VIII) CO_2 verliert. Wir bestimmten den R_F -Wert der Verbindungen, indem wir, wie bereits beschrieben⁸), 1 mg in 10 ccm 3 n wäbr. NH_3 lösten und 3 Tropfen zu je 5 cmm auf ein Papier 2043a Schleicher-Schüll auftrugen (Abbild. 5). Die Tafel zeigt die R_F -Werte dieser dem Isoxanthopterin nahestehenden Pteridine.

Tafel. R_F -Werte

Verbindung	R_F -Wert	Fluorescenz
1 Isoxanthopterin	0.32	blau fluorescierend
2 Methyl-isoxanthopterin	0.29	" "
3 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure ..	0.30 0.64	" "
4 Ichthyopterin	0.07 0.64	" "
5 Methyl-[6.9-dioxy-2-amino-pteridyl-(8)]-essigsäure	0.36 0.67	" "
6 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-propionsäure ..	0.77	" "
7 6.9-Dioxy-2-amino-8-äthyl-pteridin	0.38	" "
8 2.6.9-Trioxo-8-methyl-pteridin	0.39	" "
9 2.6.8-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(9)	0.39	gelbgrün
10 2.6.9-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(8)	0.44	blau fluorescierend
11 2.6.9-Trioxo-pteridin	0.40	" "
12 2.6.9-Trioxo-pteridyl-(8)-essigsäure	0.39 0.66	" "

Bei der 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure (3), der Methyl-[6.9-dioxy-2-amino-pteridyl-(8)]-essigsäure (5) und der 2.6.9-Trioxo-pteridyl-(8)-essigsäure (12) entsprechen die Flecken mit dem geringeren R_F -Wert jeweils dem decarboxylierten Methylprodukt.



Abbild. 6. Lichtabsorption in $n/10 \text{ NaOH}$ ($d=1 \text{ cm}$) von Ichthyopterin ($c = 0.0262 \text{ g/l}$) — und 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure ($c = 0.0224 \text{ g/l}$) ---

papierchromatographisch nachgewiesene Verunreinigung hervorgerufen, die aber kaum mehr als 10% ausmachen dürfte.

Da sich die 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure nun in heißer 2 n NaOH zum Methylprodukt decarboxyliert, müßte bei einer Identität mit dem Ichthyopterin auch bei diesem eine Zersetzung nachweisbar sein. Wir erhitzten daher je 0.5 mg Ichthyopterin und 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure in 5 ccm $n \text{ NaOH}$ 1 Stde. auf dem Wasserbad und bestimmten den R_F -Wert der entstandenen Produkte. Unter diesen Bedingungen zersetzen sich beide Verbindungen nicht vollständig. Beim Ichthyopterin entsteht jedoch ein Fleck, dessen R_F -Wert dem des Methyl-isoxanthopterins in der Lage

Die 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure (VII) zeigt den gleichen R_F -Wert wie der Hauptanteil des natürlichen Ichthyopterins. Alle anderen Produkte differieren davon deutlich. Die nebenstehende Abbild. 6 zeigt den Vergleich der UV-Absorption der beiden Verbindungen.

Die geringere Extinktion des Ichthyopterins wird wahrscheinlich durch die

entspricht. Erhitzt man beide Stoffe 2 Stdn. in 2*n* NaOH, so tritt bei der Essigsäure fast vollständige Decarboxylierung ein, ebenso verschwindet der Fleck mit dem *R*_F-Wert 0.64 beim Ichthyopterin. Beim Erhitzen in *n* NaOH zeigt sich beim Ichthyopterin noch ein grünlich fluoreszierender Fleck mit dem *R*_F-Wert 0.17, der augenscheinlich von der Verunreinigung herrührt. Leider konnten wir wegen der geringen uns zur Verfügung stehenden Menge natürlichen Ichthyopterins keine Abbauprodukte isolieren. Es verhalten sich jedoch unter den beschriebenen Bedingungen die beiden Stoffe äquivalent¹³⁾. Nach den bisher für das Ichthyopterin bekannten Kriterien — chemisches Verhalten, UV-Absorption, *R*_F-Wert, wie auch der *pH*-Abhängigkeit der Fluoreszenz — muß man die 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure als identisch mit dem Hauptanteil des Hüttelschen Ichthyopterins betrachten. Die Unterschiede der Analysenwerte können auf die im Ichthyopterin nachgewiesene Verunreinigung zurückgeführt werden:

Ichthyopterin: C 42.33—42.62 H 4.04—4.59 N 27.12—28.11
6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure: C 40.51 H 2.98 N 29.53

Nach Aufnahme der UV-Absorption und Bestimmung des *R*_F-Wertes benutzten wir den Rest des uns zur Verfügung stehenden natürlichen Ichthyopterins, um es in seiner Wirksamkeit gegenüber *Streptococcus faecalis* R im Folsäuretest zu untersuchen. Es zeigte hier ebenso wie die 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure mit etwa 30 γ/ccc eine schwache Hemmung des Wachstums¹⁴⁾ ***).

So wünschenswert und wichtig es wäre, durch Darstellung reinen Ichthyopterins und direkten Vergleich mit der 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure die Konstitution zu sichern, so darf man doch schon nach den bisher bekannten Tatsachen diese als den weit überwiegenden Bestandteil des Ichthyopterins ansprechen.

In den letzten Jahren sind weiter eine Reihe blau fluoreszierender Naturstoffe isoliert und als Pteridine angesprochen worden, ohne daß es gelang, die Konstitution zu sichern. Hierzu gehören das Fluorescyanin von Polonovski¹⁵⁾, die blau fluoreszierenden Substanzen aus den Augen von *Squalus acanthias*¹⁶⁾ und den Augen von *Foxinus foxinus*¹⁷⁾. Es wäre wünschenswert, diese Stoffe mit der 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure zu vergleichen.

Wir danken der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

¹³⁾ Die *pH*-Abhängigkeit der Fluoreszenz der 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure, die wir ebenfalls bestimmten, entspricht den von Hüttel angegebenen Werten.

¹⁴⁾ Wie Herr Dr. Hüttel dem einen von uns brieflich mitteilte, wurde die wachstumshemmende Eigenschaft des Ichthyopterins schon von Hrn. Dr. E. Möller, Heidelberg, bei einem ähnlichen Bakterium erkannt.

¹⁵⁾ Anm. b. d. Korrektur (8. 8. 1951): Beide Substanzen werden von alkalischer KMnO₄-Lösung in der Hitze zerstört, analog allen anderen bekannten und untersuchten Pteridinen mit einer OH-Gruppe in 8- oder 9-Stellung. Ferner tritt in beiden Fällen bei 15 stdg. UV-Bestrahlung in saurer Lösung Zersetzung unter Verschwinden des charakteristischen *R*_F-Wertes ein.

¹⁶⁾ M. Polonovski, R. G. Busnel u. M. Person, *Helv. chim. Acta* 29, 1238 [1946].

¹⁷⁾ A. Piri u. D. M. Simpson, *Biochem. Journ.* 40, 14 [1948].

¹⁷⁾ D. M. Simpson, *Analyst* 72, 382 [1947].

Beschreibung der Versuche

2.6.9-Trioxo-pteridyl-(8)-essigsäure: 20 g Oxalessigester werden mit 11 g 2.6-Dioxy-4,5-diamino-pyrimidin in 100 ccm Eisessig unter häufigem Schütteln 1 Stde. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Zugabe von 100 ccm Wasser wird das Erhitzen noch 30 Min. fortgesetzt und die Lösung i. Vak. auf 70 ccm eingeengt. Nach Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank filtriert man ab und kristallisiert aus Wasser um; Ausb. 6–7 g farblose Kristalle (40–50% d.Th.).

$C_8H_6O_5N_4$ (238.2) Ber. C 40.34 H 2.54 N 23.35 Gef. C 39.76 H 2.44 N 23.33

2.6.9-Trioxo-8-methyl-pteridin¹⁸⁾: Man erhitzt 2 g 2.6.9-Trioxo-pteridyl-(8)-essigsäure auf 280° im Stickstoff-Strom, bis sich kein Kohlendioxyd mehr entwickelt. Man bestimmt das Kohlendioxyd mit Barytwasser und findet etwa 80–90% d.Th. an Bariumcarbonat. Das Decarboxylierungsprodukt wird durch Umkristallisieren des in n NaOH schwer löslichen Natriumsalzes gereinigt und zum Schluß aus Wasser umkristallisiert. Es bildet dabei farblose Prismen; Ausb. 1.1 g (50% d.Th.).

$C_7H_6O_5N_4$ (194.2) Ber. C 43.31 H 3.11 N 28.86 Gef. C 42.98 H 2.85 N 28.32

2.6.9-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(8) (II): Man löst 4.8 g 2.6-Dioxy-4,5-diamino-pyrimidinsulfat in 500 ccm siedendem Wasser und gibt 3.2 g des Dinitratumsalzes der Mesoxalsäure¹⁹⁾ hinzu. Der pH-Wert beträgt dabei 6.1. Nach 1stdg. Kochen kühlte man ab und erhält 4.5 g eines gelben Produktes, das 3 mal mit je 100 ccm 2 n NaOH ausgekocht und in der Hitze filtriert wird. Dabei bildet sich das farblose Natriumsalz der 2.6.9-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(8), das ungelöst bleibt, während das gelbe Isomere in Lösung geht. Zum Schluß erhitzt man nochmals mit 200 ccm 2 n NaOH. Das Natriumsalz ist dann farblos; es wird in 0.1 n NaOH gelöst und in die Lösung siedende 2 n HCl eingetropft. Man erhält 2.9 g der farblosen 2.6.9-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(8), die sich als schwer löslicher Niederschlag absetzen.

$C_7H_6O_5N_4$ (224.1) Ber. C 37.51 H 1.80 N 25.00 Gef. C 37.12 H 2.30 N 25.48

Die gelben Filtrate werden mit konz. Salzsäure angesäuert, die Fällung wird in verd. Alkalilauge gelöst und die Lösung zur Reinigung nochmals in 2 n HCl eingetropft, wobei 1 g der gelben 2.6.8-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(9) (I) anfällt.

$C_7H_6O_5N_4$ (224.1) Ber. N 25.00 Gef. N 24.75

2.6.9-Trioxo-pteridin (III): Man decarboxyliert 3 g 2.6.9-Trioxo-pteridin-carbonsäure-(8) (II) im Stickstoff-Strom durch Erhitzen auf 260–280°, bis sich kein Kohlendioxyd mehr entwickelt, und kristallisiert das entstandene 2.6.9-Trioxo-pteridin aus Wasser um; Ausb. 2 g farblose Kristalle (60% d.Th.).

$C_7H_6O_5N_4$ (150.1) Ber. C 40.01 H 2.24 N 31.11 Gef. C 39.38 H 2.93 N 30.68

Desaminierung von 6,9-Dioxy-2-amino-8-methyl-pteridin: 2 g 6,9-Dioxy-2-amino-8-methyl-pteridin werden in 200 ccm 20-proz. Schwefelsäure teilweise heiß gelöst. Nach dem Abkühlen gibt man eine Lösung von 2 g Natriumnitrit (in 50 ccm Wasser gelöst) tropfenweise unter Röhren hinzu. In der Kälte ist keine Reaktion nachweisbar; beim Erhitzen auf 80–90° entwickelt sich Stickstoffdioxyd und die Verbindung geht langsam in Lösung. Nachdem alles gelöst ist, wird abgekühlt, neutralisiert, eingeengt und das ausgefallene farblose 2.6.9-Trioxo-8-methyl-pteridin aus Wasser umkristallisiert; Ausb. 0.7 g (etwa 30% d.Th.).

$C_7H_6O_5N_4$ (194.2) Ber. N 28.86 Gef. N 29.20

Methylierung des 2.6.9-Trioxo-pteridins²⁰⁾: Man löst 1.9 g 2.6.9-Trioxo-pteridin in 30 ccm Natronlauge derart, daß der pH-Wert bei 8.5 liegt, und tropft bei etwa 35° 1.3 g = 1 ccm Dimethylsulfat und gleichzeitig so viel 33-proz. Natronlauge zu (etwa 1.2 ccm), daß der pH-Wert der Lösung bei pH 8–8.5 bleibt. Nach etwa 2 Stdn. säuert man auf pH 4 an, engt notfalls noch ein und kristallisiert das ausgefallene farblose Pteridin aus Wasser um; Ausb. 1.2 g (etwa 60% d.Th.).

$C_7H_6O_5N_4$ (194.2) Ber. C 43.31 H 3.11 N 28.86 Gef. C 42.60 H 2.86 N 29.33

¹⁸⁾ Nach Ausführung der Synthese erhielten wir Kenntnis davon, daß die Verbindung bereits von R. Purrmann (s. Habil.-Schrift, München, Juli 1943), allerdings auf anderem Wege hergestellt wurde. ¹⁹⁾ M. Conrad u. H. Reinbach, B. 85, 1819 [1902].

Methyl-[6.9-dioxy-2-amino-pteridyl-(8)]-essigsäure (VIII): 4.8 g 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidinsulfat werden mit 3.2 g Natriumacetat und 4 g Oxalpropionsäureester in 30 ccm Eisessig 1 Stde. unter öfterem Umschütteln auf dem Wasserbad erhitzt. Nach 30 Min. verdünnt man mit 30 ccm Wasser und setzt das Erhitzen noch 30 Min. fort. Nach dem Abkühlen wird das Pteridin abgesaugt. Es verliert leichter CO_2 als die 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure (schon beim Eintropfen in heiße n HCl), und wurde daher als Rohprodukt verbrannt; zur Herstellung wurden besonders reine Ausgangsstoffe verwendet; Ausb. 3 g (60% d.Th.).

$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4\text{N}_6$ (251.2) Ber. C 43.03 H 3.61 N 28.22 Gef. C 42.55 H 3.22 N 27.69

6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-propionsäure (VI): 4.8 g 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidinsulfat werden mit 3.2 g Natriumacetat und 5.8 g Oxalbernsteinsäureester¹²⁾ in 20 ccm Eisessig unter häufigem Umschütteln 30 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Zugabe von 30 ccm Wasser erhitzt man noch 30 Minuten. Nach dem Abkühlen wird abfiltriert, die Fällung in n NaOH aufgelöst und die Lösung in heiße n HCl eingetropft. Dabei fällt nach mehrmaligem Wiederholen der Operation ein annähernd farbloses, aber etwas rotstichiges Pteridin-Derivat an, das nach der Analyse der 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-propionsäure entspricht. Das intermediär entstehende Bernsteinsäure-Derivat verliert also wie die Methylessigsäure CO_2 beim Umkristallisieren. Man erhält nach 2 maliger Kristallisation durch Auflösen in n NaOH und Eintropfen in heiße n HCl 1.5–2 g (30–40% d.Th.) in farblosen Kristallen.

$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4\text{N}_6$ (251.2) Ber. C 43.03 H 3.61 N 28.22 Gef. C 42.66 H 3.07 N 27.57

Decarboxyliert man das Rohprodukt durch Erhitzen auf 280°, so tritt Zersetzung ein.

2.6.9-Trioxo-9-acetonyl-pteridin: 4.8 g 2.6-Dioxy-4.5-diamino-pyrimidinsulfat werden in 500 ccm siedendem Wasser gelöst und mit 3.2 g Acetonoxalester, in 20 ccm Methanol gelöst, versetzt. Man kocht 30 Min. und filtriert nach dem Erkalten den gelben, teilweise kristallinen Niederschlag ab; Ausb. 3.2 g (50% d.Th.). Durch Desaminierung des 6.8-Dioxy-2-amino-9-acetonyl-pteridins mit Natriumnitrit nach dem oben angegebenen Verfahren⁴⁾ lässt sich eine Verbindung mit den gleichen Eigenschaften herstellen; dadurch ist das gleichartige Kondensationsverhalten des 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidins und des 2.6-Dioxy-4.5-diamino-pyrimidins nachgewiesen.

$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4\text{N}_4$ (236.2) Ber. C 45.76 H 3.41 N 23.72 Gef. C 45.22 H 3.80 N 24.22

pH -Abhängigkeit der Fluoreszenz (Abbildung 7): Die pH -Abhängigkeit der Fluoreszenz wurde mit dem Fluoreszenzzuflussgerät zum Beckman-Spektrophotometer gemessen. Als Vergleichslösung diente Chininsulfat in $n/10$ H_2SO_4 ($c = 5 \gamma/\text{ccm}$). Die 6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure wurde in einer Konzentration von 0.5 γ/ccm gemessen, ebenso das 6.9-Dioxy-2-amino-8-methyl-pteridin. Als Pufferlösung dienten für pH 1: Salzsäure, pH 3: Salzsäure + Glykokoll, pH 5.7 u. 8: prim. Kaliumphosphat und sek. Natriumphosphat und für pH 10: Glykokoll + Natronlauge.

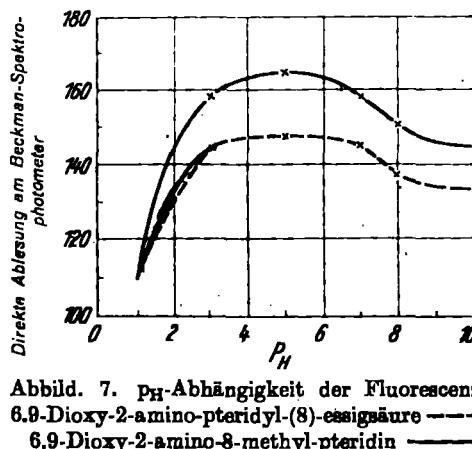


Abbildung. 7. pH -Abhängigkeit der Fluoreszenz:
6.9-Dioxy-2-amino-pteridyl-(8)-essigsäure ——
6.9-Dioxy-2-amino-8-methyl-pteridin ——