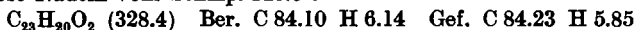


gestelltem II (Schmp. 198–199°) bzw. dessen Diacetylderivat (Schmp. 213°) Schmp.-Erniedrigungen. Die beiden nach verschiedenen Methoden dargestellten Präparate von II gaben eine Eisen(III)-chlorid-Reaktion, die mit der für das angebliche „ β,β -Dinaphthol“ von E. Bamberger und S. Wildi⁴⁾ beschriebenen grasgrünen Farbreaktion völlig übereinstimmt.

Der bisher noch nicht beschriebene Dimethyläther von II wurde durch Methylierung in alkalischer Lösung mit Dimethylsulfat in der üblichen Weise erhalten. Aus Benzol farblose Nadeln vom Schmp. 146,5°.



270. Rudolf Tschesche und Friedhelm Korte: Über Pteridine IX. Mittel.*): Zur Kenntnis des sogen. Fluorescyanins

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

(Eingegangen am 2. Oktober 1954)

Das sogenannte „Fluorescyanin“ wurde als ein Gemisch erkannt, dessen eine Komponente Isoxanthopterin darstellt. Ferner finden sich darin Lactoflavin und eine weitere Verbindung, die bei der Oxydation mit Perjodsäure 4.7-Dioxy-2-amino-pteridin-aldehyd-(6) liefert.

Im Jahre 1943 berichteten Polonovski und Mitarbb.¹⁾ über das Vorkommen einer blau fluoreszierenden Substanz in der Haut des Karpfens, der sie die Bezeichnung Fluorescyanin gaben. Sie sollte auch in der Haut anderer Cypriniden sowie in der Leber, Niere und Retina vorkommen, andere Quellen sollten sich in Reptilien, Crustaceen und Insekten finden. Weiter berichtete der gleiche Arbeitskreis²⁾ über ein ebenfalls blau fluoreszierendes Pigment aus den Eiern und Puppen des Seidenspinners (*Bombyx mori*), das mit Fluorescyanin identisch sein sollte. Obwohl die Substanz bisher niemals rein dargestellt und in der ersten Arbeit ein Stickstoff-Gehalt des Konzentrates von nur 15,3% ermittelt worden war, wurde die Pteridin-Natur vermutlich auf Grund der intensiven Fluoreszenz angenommen. 1951 haben wir über die Konstitution des von R. Hüttel und G. Sprengling³⁾ aus der Haut von Cypriniden isolierten Ichthyopterins berichtet⁴⁾, das als [4.7-Dioxy-2-amino-pteridyl-(6)]-essigsäure (I) ermittelt wurde. Nachdem 1951 Y. Hirata und S. Nawa⁵⁾ Fluorescyanin und Ichthyopterin ebenfalls als identisch angesehen hatten, erklärten 1952 die gleichen Autoren, daß keine Identität vorläge⁶⁾.

*) VIII. Mittel.: R. Tschesche u. F. Vester, Chem. Ber. 86, 454 [1953].

1) M. Polonovski, R. G. Busnel u. M. Pesson, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 217, 163 [1943].

2) M. Polonovski u. R. G. Busnel, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 226, 1047 [1948]; M. Polonovski, R. G. Busnel u. M. Javillier, ebenda 259, 585 [1950].

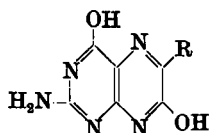
3) Liebigs Ann. Chem. 554, 69 [1943].

4) R. Tschesche u. F. Korte, Chem. Ber. 84, 801 [1951].

5) C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 145, 661 [1951].

6) Y. Hirata, S. Nawa, S. Matsuura u. H. Kakizawa, Experientia [Basel] 9, 339 [1952].

Wir haben die Untersuchung des Fluorescyanins**) aufgenommen, um die divergierenden Angaben der Literatur zu klären und möglichst auch die Konstitution dieses angeblichen Pteridins aus *Bombyx mori* festzulegen. Als wichtiger Anhaltspunkt lag einmal die Feststellung der japanischen Autoren vor, daß die Oxydation des Fluorescyanins mit Permanganat Isoxanthopterin-carbonsäure (II) liefert; zum anderen hatten wir beobachtet, daß ein nach Polonovski und Mitarbb.¹⁾ gewonnenes Fluorescyanin bei der Oxydation mit Überjodsäure den 4.7-Dioxy-2-amino-pteridin-aldehyd-(6) (III) ergibt⁷⁾. Da sich aus der Höhe der Extinktion des UV-Absorptionsspektrums des Fluorescyanins nach Hirata und Nawa der Schluß ziehen ließ, daß das Molekulargewicht nicht wesentlich dasjenige anderer einfacher Pteridine übersteigen konnte, hatten wir die Annahme gemacht, daß Fluorescyanin vielleicht die Glykolverbindung IV sein könnte. Wegen der Kostbarkeit des Ausgangsmaterials schien die synthetische Herstellung von IV der einfachste Weg der Konstitutionsbestimmung zu sein.



- I: R = CH₂·CO₂H
 II: R = CO₂H
 III: R = CHO
 IV: R = CHO·CH₂OH
 XIII: R = H

Um die Synthese von IV durchzuführen, versuchten wir zunächst die Kondensation von 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidin (V) mit Erythronsäurelacton (XII) in Eisessig, jedoch ohne greifbaren Erfolg. Auch der Versuch, V mit dem Enol des α -Keto- γ -butyrolactons (VI) zu einem 7-Oxy-pteridin-Derivat umzusetzen, verlief ergebnislos.

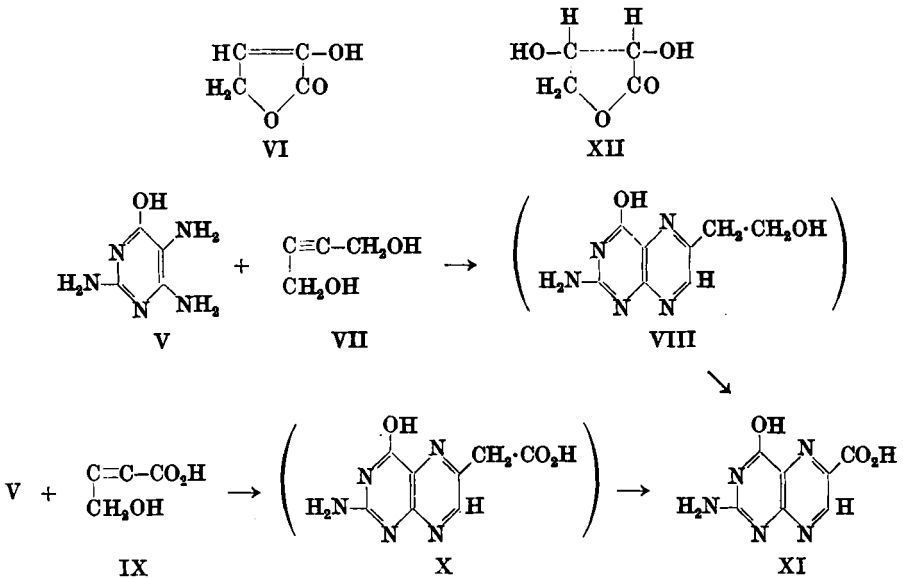
Weiter wurde die Frage geprüft, ob es möglich sei, Bromwasserstoff aus der [4.7-Dioxy-2-amino-pteridyl-(6)]- α -brom- α -methyl-essigsäure abzuspalten, um so nach Decarboxylierung zu einem 6-Vinyl-pteridin-Derivat zu kommen. Dabei entstanden zwar violett gefärbte Umsetzungsprodukte aber anscheinend kein Vinylderivat, so daß die vorgesehene anschließende Anlagerung von 2 Oxygruppen an die Doppelbindung nicht durchführbar war.

Weiter wurde versucht, Acetylderivate mit 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidin (V) zu kondensieren, um Pteridinderivate mit einer Oxygruppe an C⁶ und einer geeignet substituierten Seitenkette an C² zu erhalten. Als Acetylenkomponenten wurden Butin-(2)-diol-(1.4) (VII), γ -Oxy-tetrolsäure (IX) und Propiolsäure verwendet. Die Umsetzung erfolgte in geschmolzenem Natriumacetat. Auf Grund der Löslichkeit des Reaktionsproduktes in $n/_{10}$ HCl ließ sich nachweisen, daß sich in keinem Fall das gewünschte 7-Oxy-pteridin-Derivat gebildet haben konnte. Während Propiolsäure überhaupt keine Umsetzung zeigte, ergaben VII und IX Pteridine, die durch Oxydation mit Permanganat zu 4-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure-(6) (XI) abgebaut werden konnten. Es dürfte sich daher bei diesen Verbindungen um die [4-Oxy-2-amino-pteridyl-(6)]-essigsäure (X) aus γ -Oxy-tetrolsäure und um das 4-Oxy-2-amino-6-[β -oxy-äthyl]-pteridin (VIII) aus Butindiol handeln. Die Umsetzung ist also als Wasserabspaltung zwischen der Oxygruppe der Acetylenkomponente und der Aminogruppe in 4-Stellung des Pyrimidins und Dehydrierung auf-

**) Hrn. Prof. Dr. M. Polonovski und Hrn. Prof. Dr. R. G. Busnel, Paris, sowie Hrn. Dr. M. Cretschmar, Bundesforschungsanstalt für Kleintierzucht, Celle, danken wir herzlich für die freundliche Überlassung von Eiern von *Bombyx mori*.

⁷⁾ R. Tschesche u. F. Korte, Angew. Chem. 65, 600 [1953].

zufassen, während sich die Aminogruppe in 5-Stellung an die Acetylenbindung anlagert. Damit übereinstimmend zeigte die Propiolsäure keine Reaktion*).



Das gewünschte Glykolderivat IV konnte schließlich in kleiner Menge aus Erythronsäurelacton (XII) und V durch Zusammenschmelzen mit Natriumacetat gewonnen werden. Während im allgemeinen α -Oxy- oder α -Keto-Fünfring-Lactone unter den üblichen Reaktionsbedingungen zur Herstellung von Pteridinderivaten nicht oder anomal reagieren, wie zahlreiche Versuche in unserem Institut bisher ergaben, konnte unter den oben erwähnten Bedingungen ein Produkt erhalten werden, dessen Analyse den Werten des Glykols IV entsprach. Es erwies sich mit dem sogenannten Fluorescyanin von Hirata und Nawa⁵⁾ als nicht identisch. Sowohl auf Grund des UV-Spektrums, $\lambda_{\text{max}} = 252, 280, 350 \text{ m}\mu$, wie auch der Laufstrecke im Papierchromatogramm in 3-proz. wäßr. Ammoniumchlorid-Lösung, $R_F = 0,61$ (Papier von Schleicher & Schüll, Nr. 2043a Mgl) konnte eine Identität mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Über die Bildung des entsprechenden 6-Oxy-Isomeren aus V und XII lassen sich keine Aussagen machen, da in diesem Zusammenhang nur die 7-Oxy-pteridine betrachtet wurden.

Da nach den Angaben der japanischen Autoren die Konstitution des Glykols IV die einzige Möglichkeit war, die für Fluorescyanin noch übrig blieb, und diese Struktur für die Verbindung nunmehr nicht in Frage kam, war eine Überprüfung der Einheitlichkeit des Fluorescyanins von Polonovski und Mitarbb.³⁾ notwendig. Unterwirft man ein nach den Angaben der französischen Autoren hergestelltes Präparat der Papierchromatographie, so

*) Wir danken Hrn. Dr. V. Wolf, Hamburg, vielmals für die Überlassung der verwendeten Acetylderivate.

zeigt sich die Uneinheitlichkeit. Neben einer blau fluoreszierenden Komponente, die in 3-proz. wäbr. Ammoniumchloridlösung einen R_F -Wert von 0,19 hat, in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) von 0,15 und in Butanol/Eisessig/Wasser (8:1:1) von 0,13, finden sich bei der Beobachtung im ultravioletten Licht mehrere weitere Flecke. Einer davon hat in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) den R_F -Wert 0,43, fluoresciert grün und dürfte dem Lactoflavin zukommen, wie Parallelversuche mit dieser Substanz ergaben. Ein weiterer blau fluoreszierender, ziemlich unscharfer Fleck mit dem R_F -Wert 0.30–0.34 in 3-proz. wäbr. Ammoniumchloridlösung geht offenbar auf ein Gemisch mehrerer Stoffe zurück. Einer von diesen ist mit Isoxanthopterin (XIII) identisch, das durch mehrfaches Umkristallisieren des Rohfluorescyanins aus $n/5$ HCl rein erhalten werden konnte. Diese Verbindung ist zweifellos mit dem „Fluorescyanin“ von Hirata und Nawa⁵⁾ identisch. Der gefundene R_F -Wert bei der Papierchromatographie, das UV-Spektrum zusammen mit den sonstigen physikalischen Eigenschaften sowie die Analyse zeigen dies eindeutig. Das von den japanischen Autoren angegebene UV-Spektrum stimmt in allen Einzelheiten mit den von A. Albert und H. C. S. Wood⁶⁾ für Isoxanthopterin angegebenen Werten überein; Isoxanthopterin konnten wir auch aus den Flügeln von *Bombyx mori* isolieren*). Wir glauben nicht, daß es sich bei dieser Verbindung um ein bei der Aufarbeitung entstandenes Umwandlungsprodukt des Naturstoffs handelt.

Schwieriger ist die Frage nach der Herkunft der Isoxanthopterin-carbonsäure (II) bzw. des entsprechenden Aldehyds (III) zu beantworten, die bei dem oxydativen Abbau des Fluorescyanins entstehen. Wir vermuten, daß sich in dem Rohfluorescyanin noch ein zusammengesetztes Pteridin analog der Folsäure befindet, das vermutlich in 7-Stellung eine Oxygruppe enthält. Oxydiert man nämlich 7-Oxy-pteroyl-glutaminsäure⁹⁾ mit Überjodsäure, so entsteht der 4.7-Dioxy-2-amino-pteridin-aldehyd-(6), der als Phenylhydrazon gefaßt werden konnte. Das unbekannte zusammengesetzte Pteridinderivat, das beim Abbau die genannten einfachen Pteridinderivate liefert, wird vermutlich wie Oxyfolsäure nur eine geringfügige Fluorescenz aufweisen, so daß es sich im Papierchromatogramm im UV-Licht wenig bemerkbar macht**).

Beim Versuch rohes Fluorescyanin aufzutrennen, haben wir auch eine Adsorption an Floridinerde XXF versucht. Bei der Elution mit einem Gemisch von Aceton, 10 % konz. Ammoniak und 50 % Wasser wurde eine neue blau fluoreszierende Verbindung gewonnen, die in Ammoniumchloridlösung den hohen R_F -Wert von 0,85 aufwies, der vorher nicht beobachtet wurde. Diese Verbindung ist vermutlich kein Pteridin, da sie im Ultraviolettl nur ein Maximum bei 255 $m\mu$ zeigt, ihr also die für Pteridine charakteristische Absorp-

⁵⁾ Nature [London] 172, 118 [1953].

⁶⁾ Wir danken Hrn. Prof. Dr. H. H. Inhoffen, Braunschweig, sehr für die zur Verfügung gestellten Flügel von *Bombyx mori*.

⁹⁾ R. Tschesche, K. H. Köhncke u. F. Korte, Chem. Ber. 84, 485 [1951].

***) Allerdings ließ sich im Rohfluorescyanin keine *p*-Amino-benzoesäure kolorimetrisch nachweisen unter Bedingungen, die zur Bestimmung in Folsäure verwendet werden.

tion bei 300–400 μ fehlt. Um das Vorliegen eines im Pyrazinring hydrierten Pteridinderivates auszuschließen, haben wir sie in der Kälte mit Permanganat oxydiert, dabei änderte sich das Spektrum nicht. Wurde die Oxydation bei 40° vorgenommen, so zersetzte sich die Substanz unter Verschwinden der Fluorescenz. Es scheint möglich, daß es sich bei dieser Substanz um das sogenannte „Fluorescyanin B“ handelt, über das Polonovski auf dem Symposium über Pteridine im März dieses Jahres in London berichtete.

Unsere Versuche zeigen somit, daß Fluorescyanin ein Gemisch verschiedener Substanzen und keine einheitliche Verbindung darstellt. Die einzige bisher chemisch einigermaßen definierte, und von Hirata und Nawa als „Fluorescyanin“ angesprochene Komponente ist nunmehr als Isoxanthopterin erkannt***). Ferner findet sich im Rohprodukt auch Lactoflavin.

Beschreibung der Versuche

Isolierung des rohen Fluorescyanins: 30 g Eier von *Bombyx mori* werden mit 30 g Quarzsand in der Kugelmühle 24 Stdn. gemahlen und bei 10⁻¹ Torr und einer Wasserbadtemperatur von 50° getrocknet. Anschließend wird das Pulver mit Trichloräthylen erschöpfend extrahiert. Bei der Extraktion mit 10-proz. wäbr. Ammoniak gehen die blau fluoreszierenden Anteile in Lösung. Man benötigt dazu meistens eine 5malige Extraktion mit der doppelten Gewichtsmenge Ammoniak. Beim Eintropfenlassen dieser alkalischen Lösung in 2*n*HCl, wobei die Lösung am Ende noch die Acidität einer $n/_{10}$ HCl haben soll, fällt ein braunroter Niederschlag aus. Durch 5maliges Umfällen aus heißem Ammoniak mit Salzsäure wird dieses Produkt gereinigt. Der Niederschlag wird nun in verd. Ammoniak aufgelöst. Nach dem Eintropfenlassen der Lösung in 1*n*HCl und 5maligem Umfällen erhält man so 10 mg Rohfluorescyanin.

Perjodatspaltung des Fluorescyanins: 20 mg rohes Fluorescyanin werden in 50 ccm Wasser durch 10 Min. langes Erhitzen weitgehend gelöst und die Lösung nach dem Abkühlen auf 30° mit 5 mg $K_2H_3JO_6$ unter Rühren versetzt. Im Laufe einer halben Stunde wird nun unter Erhöhung der Temperatur auf 80° mit $n/_{100}$ HCl langsam angesäuert und die Reaktionslösung noch 30 Min. bei 80° gerührt. Nach dem Neutralisieren wird aus der Lösung das Phenylhydrazon des 4.7-Dioxy-2-amino-pteridin-aldehyds-(6) durch Zugabe von 50 mg Phenylhydrazin gewonnen. Man erhält etwa 4 mg des roten Phenylhydrazons, das in seinem chemischen Verhalten und seinem UV-Spektrum mit authentischem Material identisch ist.

Kondensation von 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidin (V) mit γ -Oxy-tetrolsäure (IX): 1.5 g 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidinsulfat werden mit 0.6 g γ -Oxy-tetrolsäure in 30 g krist. Natriumacetat im Ölbad bei 110° geschmolzen. Im Verlauf von 30 Min. steigert man die Temperatur auf 160–170°, bis die Schmelze erstarrt. Nach dem Abkühlen nimmt man mit 100 ccm Wasser auf und filtriert das unlösliche Rohprodukt ab. Ausb. 30% d. Theorie. Es ist löslich in verd. Salzsäure, so daß die entstandene Komponente kein 7-Oxy-Produkt sein kann. Oxydiert man das Rohprodukt in $n/_{2}$ Na_2CO_3 mit Kaliumpermanganat bei 90°, so erhält man nach dem Aufarbeiten neben einer kleineren Menge des 7-Isomeren die bereits bekannte 4-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure-(6) (XI). Ausb. 20% d. Th., bez. auf das Rohprodukt.

$C_7H_5O_3N_5$ (207.2) Ber. C 40.58 H 2.43 N 33.81 Gef. C 40.20 H 2.05 N 33.43

Das papierchromatographische Verhalten in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) und in 3-proz. Ammoniumchlorid/Wasser (Papier von Schleicher & Schüll, Nr. 2043a MgI) und

***) Während der Korrektur ging uns eine Arbeit von S. Nawa und T. Taira (Proc. Imp. Acad. [Tokyo] 80, 632 [1954]) zu, in der ebenfalls das Vorkommen von Isoxanthopterin im „Fluorescyanin“ festgestellt wird. Ferner berichten die Autoren über den Nachweis dieses Pteridins im Körper von *Drosophila melanogaster*.

das UV-Spektrum sind mit dem von authentischer 4-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure-(6) (XI) identisch.

Kondensation von 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidin (V) mit Butin-(2)-diol-(1.4): 2.5 g 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidin werden mit 0.86 g Butin-(2)-diol-(1.4) und 50 g krist. Natriumacetat vermischt und bei 110° im Ölbad zur Schmelze gebracht. Nach langsamer Steigerung der Temperatur innerhalb von 30 Min. erstarrt die Schmelze, und das Rohprodukt wird nach dem Abkühlen durch Umsetzen mit Wasser gewonnen. Die Ausb. an Ungelöstem beträgt etwa 35% d.Theorie. Es ist löslich in n_{10} HCl, so daß auch hier kein 7-Oxy-pteridin entstanden sein kann. Bei der Oxydation in n_5 Na₂CO₃ bei 90° mit Kaliumpermanganat läßt sich wieder die 4-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure-(6) (XI) isolieren. Ausb. 18% d.Th., bez. auf das Rohprodukt.

C₇H₅O₃N₅ (207.2) Ber. C 40.58 H 2.43 N 33.81 Gef. C 40.01 H 2.18 N 33.44

Bei der Reaktion von 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidinsulfat mit Propiolsäure und nach anschließender Oxydation mit Kaliumpermanganat läßt sich keine 4-Oxy-2-amino-pteridin-carbonsäure-(6) gewinnen.

Kondensation von 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidin (V) mit Erythronsäurelacton (XII): 25 g 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidinsulfat werden mit 15 g Erythronsäure und 80 g krist. Natriumacetat bei 110° im Ölbad geschmolzen. Die Temperatur wird im Laufe von $\frac{1}{4}$ Stde. auf 150° gesteigert, nach dem Erstarren und Abkühlen wird die Schmelze mit Wasser aufgenommen. Der verbleibende Rückstand (etwa 3–5 g) wird in 20 ccm n_{10} NaOH gelöst und die Lösung in 25 ccm siedende n_{10} HCl eintropfen gelassen. Dabei fallen etwa 50–100 mg eines schwer löslichen Produktes in der Wärme aus. Nach 8maligem Umfällen in der gleichen Weise lassen sich etwa 15 mg eines farblosen Pteridins isolieren.

C₈H₇O₄N₅ (239.2) Ber. C 40.17 H 3.79 N 29.28 Gef. C 39.68 H 3.43 N 28.66

Die Verbindung gibt bei der Spaltung mit Kaliumperjodat unter den oben angeführten Bedingungen und Umsetzung mit Phenylhydrazin das Phenylhydrazon des 4.7-Dioxy-2-amino-pteridin-aldehyds-(6) (III), das sich oberhalb von 300° zersetzt; R_F -Wert in 3-proz. Ammoniumchlorid/Wasser = 0.52.

Isolierung von Isoxanthopterin (XIII) aus den Eiern von *Bombyx mori*: 100 mg der oben beschriebenen rohen Fluorescyaninfraction werden in n_{10} NaOH gelöst. Durch Eintropfenlassen der Lösung in siedende n_{10} HCl nach vorheriger vorsichtiger Behandlung mit Aktivkohle können etwa 10 mg eines papierchromatographisch einheitlichen Produktes isoliert werden. Es ist teilweise kristallin und stimmt in allen Kriterien mit dem von Hirata und Mitarbb.⁴⁾ beschriebenen „Fluorescyanin“ überein. Auf Grund der Analyse, der papierchromatographischen Werte und des UV-Spektrums ist diese Verbindung identisch mit Isoxanthopterin.

C₆H₅O₂N₅ (179.1) Ber. C 40.23 H 2.81 N 39.10 Gef. C 39.98 H 2.59 N 38.88

Papierchromatographie in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) R_F -Wert = 0.26 und in 3-proz. Ammoniumchlorid/Wasser R_F -Wert = 0.30. UV-Absorption λ_{\max} = 339, $\log \epsilon$ = 4.15; λ_{\max} = 254, $\log \epsilon$ = 4.06; λ_{\max} = 223, $\log \epsilon$ = 4.56.

Arbeitet man die Flügel von *Bombyx mori* nach dem Verfahren von C. Schöpf und E. Becker¹⁰⁾ auf, so läßt sich ebenfalls Isoxanthopterin rein darstellen, wobei man aus etwa 10 g 15 mg Isoxanthopterin mit den gleichen Kriterien, wie oben angegeben, erhalten kann.

Adsorption des rohen Fluorescyanins an Floridinerde XXF (Bensmann-Bremen): 50 mg rohes Fluorescyanin werden in 30 ccm 1*n* NH₃ gelöst und auf einer Nutsche an 50 g Floridinerde XXF adsorbiert. Beim Ablösen mit Methanol + 10% konz. wäßrigem NH₃ wird eine stark blau fluoreszierende Komponente erhalten. Diese Substanz hat in 3-proz. wäßr. Ammoniumchlorid-Lösung einen R_F -Wert von 0.85. Ihr UV-Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei 255 μ . Man löst etwa 50 bei der Papierchromatographie erhaltene Flecken vom Papier, vereinigt die Extrakte und oxy-

¹⁰⁾ Liebigs Ann. Chem. 507, 283, 287 [1933]; vergl.: R. Tschesche u. F. Korte, Chem. Ber. 84 641 (1951)

diert die erhaltene Fraktion 15 Min. in $n/_{10}$ Na_2CO_3 bei 40° mit Kaliumpermanganat. Anschließend wird das überschüss. Kaliumpermanganat durch Methanol zerstört. Es zeigt sich danach, daß das Absorptionsmaximum im UV unverändert geblieben ist. Oxydiert man jedoch bei Siedetemperatur, so zersetzt sich die im UV absorbierende Komponente vollständig.

Perjodatspaltung der 7-Oxy-pteroyl-glutaminsäure: 50 mg 7-Oxy-pteroyl-glutaminsäure werden in 100 ccm Wasser suspendiert und mit 30 mg $\text{K}_2\text{H}_3\text{JO}_8$ versetzt. Im Laufe einer halben Stunde wird die Lösung unter Rühren und langsamer Erhöhung der Temperatur auf 80° mit $n/_{100}$ HCl angesäuert und die Reaktionslösung noch 30 Min. bei dieser Temperatur gehalten. Bei p_{H} 4 werden dann 80 mg Phenylhydrazin zugegeben, wobei ein rotes Produkt ausfällt, das in allen Eigenschaften mit dem Phenylhydrazon des 4.7-Dioxy-2-amino-pteridin-aldehyds-(6) (III) übereinstimmt. Ausb. 10 mg.

271. Rudolf Tschesche und Rudolf Petersen: Die Trennung der Alkaloide der Kurchirinde (*Holarrhena antidysenterica*) mit Hilfe chromatographischer Verfahren

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

(Eingegangen am 4. Oktober 1954)

Aus einer Kurchirinde indischer Herkunft konnte mit Hilfe chromatographischer Verfahren neben den bekannten Alkaloiden Conessin, Conessidin, Conessimin und Conimin ein anscheinend noch unbekanntes Alkaloid der Summenformel $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{ON}_2$ isoliert werden, das die Bezeichnung Holarrhessimin erhielt.

Von der Rinde von *Holarrhena antidysenterica* (Kurchirinde) ist bekannt, daß sie ein kompliziertes Gemisch von Alkaloiden enthält, denen das Ringsystem der Steroide zugrunde liegt. Es sind bisher über ein Dutzend verschiedener Basen beschrieben worden¹⁾, die aber nicht immer in jedem Rindenmuster vorkommen und deren Einheitlichkeit vielfach zweifelhaft ist. Es schien uns daher eine Neuuntersuchung der Rinde erforderlich, wobei einerseits auf möglichst schonende Aufarbeitung Wert gelegt wurde, und andererseits moderne chromatographische Methoden zur Anwendung kommen sollten. Durch Kontrolle der Isolierungsschritte mittels Papierchromatographie sollte eine Veränderung empfindlicher Alkaloide erkannt werden und vor allem möglichst alle in einigermassen ausreichender Menge vorkommenden Basen erfaßt werden.

Als Lösungsmittel für die Papierchromatographie haben sich folgende Gemische bewährt:

1. Essigester/Pyridin/Wasser (10:4.5:10),
2. Methyläthylketon/Glykolmonomethyläther/Wasser (30:1.5:7),
3. Glykol/Butanol/Wasser (1:2:3) und
4. *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) obere Phase.

Besonders das letztgenannte Lösungsmittelgemisch erwies sich als brauchbar, da es eine Lokalisierung der Alkaloide ohne Schwanzbildung auf dem Papier ermöglichte.

¹⁾ A. Bertho, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 277, 244 [1939].