

RUDOLF TSCHESCHE und ARMIN GLASER

Über Pteridine, XVI¹⁾**Synthesen des 7-Hydroxy-biopterins und über seine Beziehungen zum Ichthyopterin**

Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität Hamburg

(Eingegangen am 20. Mai 1958)

7-Hydroxy-biopterin wurde hergestellt aus 2-Amino-4.7-dihydroxy-6-acetyl-pteridin durch Bromierung in α -Stellung der Seitenkette, Ersatz des Broms durch Hydroxyl und Reduktion der Ketogruppe mit Natriumborhydrid. Ferner wurde es gewonnen durch Oxydation von 6-Acetyl-isoxanthopterin mit Selenioxyd und Reduktion des gebildeten 6- $[\alpha,\beta$ -Dioxo-propyl]-isoxanthopterins mit dem gleichen Reagenz. Es zeigte im Verhalten große Ähnlichkeit mit Ichthyopterin.

Im Jahre 1943 haben R. HÜTTEL und G. SPRENGLING²⁾ über die Isolierung eines intensiv blau fluoreszierenden Naturstoffes „Ichthyopterin“ aus der Haut und den Schuppen von Weißfischen berichtet. 1951 zeigten R. TSCHESCHE und F. KORTE³⁾, daß es sich hierbei um ein Isoxanthopterinderivat handelte, das eine erhebliche Ähnlichkeit mit der 2-Amino-4.7-dihydroxy-pteridin-essigsäure-(6) (I) aufwies und mit dieser Verbindung identisch sein könnte. Der direkte Vergleich mit dem Hüttelschen „Ichthyopterin“ ergab keine wesentlichen Unterschiede, jedoch ließen die vorhandenen sehr geringen Mengen an natürlichem Material keine völlig sichere Aussage zu. 1955 berichteten S. MATSUURA, S. NAWA, M. GOTO und Y. HIRATA⁴⁾, daß Ichthyopterin und 2-Amino-4.7-dihydroxy-pteridin-essigsäure-(6) nicht identisch wären und daß in den Schuppen japanischer Karpfen drei Pteridine nebeneinander vorkämen, von denen sie zwei als Isoxanthopterin (II) und Isoxanthopterin-carbonsäure-(6) (III) identifizierten, während die dritte Verbindung als Ichthyopterin angesprochen wurde. Im folgenden Jahr fand I. ZIEGLER-GÜNDER⁵⁾ ebenfalls, daß Ichthyopterin zwar ähnlich, aber nicht gleich 2-Amino-4.7-dihydroxy-pteridin-essigsäure-(6) ist, und stellte eine erhebliche Photolabilität des Ichthyopterins fest. Es müsse als unwahrscheinlich angesehen werden, daß HÜTTEL und SPRENGLING genuines Ichthyopterin in den Händen gehabt hätten, da ihre Aufarbeitung ohne die erforderlichen Schutzmaßnahmen (absol. Dunkelheit, bzw. Rotlicht) erfolgt sei. Diese Feststellung mache es wünschenswert, die Bezeichnung Ichthyopterin dem genuinen Pteridin der Fischhäute vorzubehalten.

Es war nunmehr notwendig, das Problem der chemischen Natur des Ichthyopterins erneut aufzugreifen. Da die inzwischen festgestellte Photolabilität dieses Naturstoffes und seine

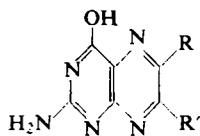
1) XV. Mitteil.: R. TSCHESCHE und H. ENDE, Chem. Ber. **91**, 2074 [1958], vorstehend.

2) Liebigs Ann. Chem. **554**, 69 [1943]. ³⁾ Chem. Ber. **84**, 801 [1951].

4) J. Biochem. (Japan) **42**, 419 [1955]; C. A. **50**, 7113 [1956].

5) Z. vergleich. Physiol. **39**, 163 [1956].

geringe Konzentration in natürlichem Material eine Isolierung nicht besonders aussichtsreich erscheinen ließen, erachteten wir die Synthese weiterer Isoxanthopterinderivate und ihren Vergleich mit Ichthyopterin zunächst als den besten Weg zur Lösung der vorliegenden Frage. Nun haben kürzlich E. L. PATTERSON, M. H. VON SALTZA und E. L. R. STOKSTAD⁶⁾ sowie E. L. PATTERSON, R. MILSTREY und E. L. R. STOKSTAD⁷⁾ über die Isolierung und Synthese eines neuen Pteridins (IV) aus menschlichem Harn berichtet, welches sie Biopterin nennen und das einen Wachstumsfaktor für *Crithidia fasciculata*⁸⁾ darstellt. Dieselbe Verbindung wurde zur gleichen Zeit von H. S. FORREST und H. K. MITCHELL⁹⁾ auch aus den Augen von *Drosophila mel.* isoliert. Da die japanischen Autoren⁴⁾ festgestellt hatten, daß Ichthyopterin wahrscheinlich in α -Stellung der Seitenkette in Position 6 des Pteridingerüsts eine Hydroxygruppe trägt, bemühten wir uns zunächst vor allem um eine Synthese des 7-Hydroxy-biopterins (V). Als Ausgangsprodukt bot sich das schon von S. MATSUURA, S. NAWA, H. KAKIZAWA und Y. HIRATA¹⁰⁾ aufgebaute 2-Amino-4,7-dihydroxy-6-acetylpteridin (VI) an, das man durch Kondensation von Acetonoxalester mit 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin gewinnen kann. Leider gelang es nach den Angaben der japanischen Autoren nicht, ein vom isomeren Xanthopterinderivat (VII) freies Ausgangsmaterial zu erhalten, doch konnte die Bildung des Isomeren durch Kondensation in Gegenwart von Morpholin stark herabgesetzt werden.



I: R = -CH ₂ ·CO ₂ H;	R' = -OH
II: R = -H;	R' = -OH
III: R = -CO ₂ H;	R' = -OH
IV: R = -CH(OH)·CH(OH)·CH ₃ ;	R' = -H
V: R = -CH(OH)·CH(OH)·CH ₃ ;	R' = -OH
VI: R = -CH ₂ ·CO·CH ₃ ;	R' = -OH
VII: R = -OH;	R' = -CH ₂ ·CO·CH ₃
VIII: R = -CH(OCO·CH ₃)·CO·CH ₃ ;	R' = -OH
IX: R = -CHO	R' = -OH
X: R = -CO·CO·CH ₃ ;	R' = -OH
XI: R = -CH ₂ OH;	R' = -OH
XII: R = -CH ₂ ·CH(OH)·CH ₂ OH;	R' = -OH
XIII: R = 	R' = -OH
XIV: R = -CH ₂ ·CH ₂ ·CH ₂ OH	R' = -OH

Die Einführung einer Hydroxygruppe in die α -Stellung der Seitenkette gelang über die α -Brom-Verbindung, die aus VI und einem Mol. Brom in Eisessig/Schwefelsäure kristallin dargestellt werden konnte. Die Verbindung erwies sich als ziemlich instabil und wurde direkt mit Kaliumacetat in Eisessig bei 60° weiter umgesetzt. Das 6-[α -Acetoxy-acetyl]-isoxanthopterin (VIII) kristallisierte und ließ sich mit 0.05 *n* Na₂CO₃ zum Ketol verseifen. Mit 0.1 *n* NaOH wurde dieses schon in 5 Stdn. zu 50% gespalten, es entstand wahrscheinlich der Isoxanthopterin-aldehyd-(6) (IX)¹¹⁾. Da die Verseifung der Acetoxygruppe so leicht erfolgte, wurde auf eine vorherige Abspaltung des Acetylrestes verzichtet und die α -Acetoxy-Verbindung VIII in natriumcarbonatalkalischer Lösung direkt mit Natriumborhydrid reduziert. Zur Reinigung wurde das 7-Hydroxy-biopterin (V) an Magnesol chromatographiert, als bewegliche

⁶⁾ J. Amer. chem. Soc. **78**, 5871 [1956]. ⁷⁾ J. Amer. chem. Soc. **78**, 5868 [1956].

⁸⁾ E. L. PATTERSON, H. P. BROQUIST, A. M. ALBRECHT, M. H. VON SALTZA und E. L. R. STOKSTAD, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3167 [1955].

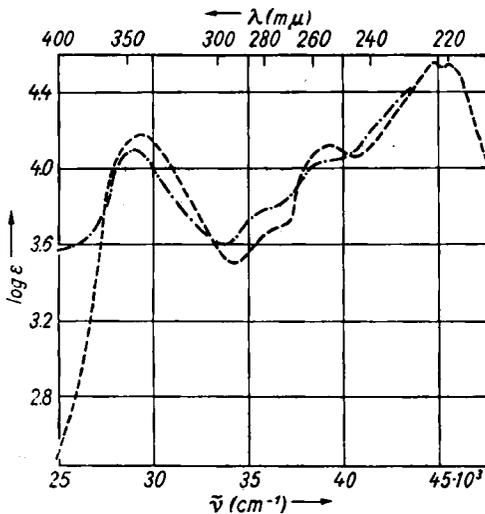
⁹⁾ J. Amer. chem. Soc. **77**, 4865 [1955]. ¹⁰⁾ J. Amer. chem. Soc. **75**, 4446 [1953].

¹¹⁾ R. TSCHESCHE, C.-H. KÖHNCKE und F. KORTE, Chem. Ber. **84**, 485 [1951].

Phase diente $n/_{10}$ NH_3 . Es konnte so ein papierchromatographisch reines 7-Hydroxy-biopterin erhalten werden. Die angenommene Konstitution ließ sich durch Abbau mit Perjodat sichern; hierbei wurde Isoxanthopterin-aldehyd-(6) (IX) und Acetaldehyd erhalten; letzterer wurde als Dimedon-Verbindung charakterisiert.

7-Hydroxy-biopterin konnte noch auf einem zweiten Weg hergestellt werden. Durch Oxydation von 6-Acetyl-isoxanthopterin (VI) mit Selenoxyd ließ sich die CH_2 -Gruppe in α -Stellung in die Ketogruppe überführen (X). Die Reduktion des erhaltenen 6- $[\alpha,\beta$ -Dioxo-propyl]-isoxanthopterin (X) mit Natriumborhydrid führte dann ebenfalls zum 7-Hydroxy-biopterin. Die Ausbeute nach diesem Verfahren betrug 35% d. Th., während das erst genannte nur 10%, bezogen auf 6-Acetyl-isoxanthopterin, geliefert hatte.

Nach dem Vergleich*) des synthetischen 7-Hydroxy-biopterins mit natürlichem Ichthyopterin ist kaum mehr ein Zweifel möglich, daß beide Stoffe identisch sind. Wir stellten an unserem synthetischen Material noch fest, daß es mit Aluminiumamalgam Isoxanthopterin (II) bildet, wie es MATSUURA und Mitarbb.⁴⁾ an natürlichem Material beobachtet haben. Das UV-Spektrum (s. Abbild.) des 7-Hydroxy-biopterins zwischen



UV-Spektren von
7-Hydroxy-biopterin (V) (-----)
und von 6- $[\alpha$ -Hydroxy-acetyl]-
isoxanthopterin (---·)
in 0,05 n NaOH

280 und 360 $m\mu$ ist demjenigen aller Isoxanthopterin-derivate ähnlich und weist keine Besonderheiten auf. Die von ZIEGLER-GÜNDER⁵⁾ festgestellte Lichtzersetzung des Ichthyopterins führt, wie wir fanden, in saurer wie in alkalischer Lösung zu Isoxanthopterin (II). Diese Beobachtung hatte auch schon Ziegler-Günder gemacht, aber angenommen, daß dabei nicht II entsteht, da dieses gegen Licht weitaus stabiler sein müßte. Wenn man jedoch die Bestrahlungsversuche auf Papier durchführt, so zeigt sich, daß auch Isoxanthopterin besonders in alkalischer Lösung unter Verschwinden der Fluoreszenz zersetzt wird, wenn auch langsamer als Ichthyopterin. Papierchro-

*) Durchgeführt von Herrn Dr. TH. KAUFFMANN, Organisch-Chemisches Institut der Techn. Hochschule Darmstadt, der über die Ergebnisse demnächst berichten wird.

matographisch konnte als erstes Umwandlungsprodukt des 7-Hydroxy-biopterins Isoxanthopterin erkannt werden. Das eventuell auch noch als Zersetzungsprodukt in Frage kommende 6-Hydroxymethyl-isoxanthopterin (XI) zeigt ganz andere R_F -Werte. Diese Verbindung wurde von C.-H. KÖHNCKE¹²⁾ aus 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin und Brombrenztraubensäure in wäßriger Lösung hergestellt; sie läßt sich auch aus dem 6-Aldehyd mit Natriumborhydrid gewinnen. Ihre erste Herstellung erfolgte von P. KARRER und R. SCHWYZER¹³⁾.

Über die sterische Zuordnung des Ichthyopterins kann noch nichts ausgesagt werden. Bei unserem optisch inaktiven Material sind theoretisch 4 Formen bzw. 2 Racemate möglich; wahrscheinlich ist bei unseren Synthesen nur eines von beiden entstanden. Für Biopterin haben PATTERSON und Mitarbb.⁶⁾ gezeigt, daß die Seitenkette L-erythro-Konfiguration besitzt; bei der zu vermutenden gegenseitigen physiologischen Beziehung beider Naturstoffe dürfte dies möglicherweise auch für Ichthyopterin gelten, doch bedarf diese Frage einer weiteren Prüfung *).

Die Wirksamkeit von Biopterin als Wachstumsfaktor bei *Crithidia fasciculata* ließ es wünschenswert erscheinen, auch 7-Hydroxy-biopterin bei diesem Organismus zu prüfen. Herr Dr. E. L. R. STOKSTAD, American Cyanamid Corp. Pearl River, hatte die Freundlichkeit, unser synthetisches Material durch Herrn Dr. G. KIDDER untersuchen zu lassen. Er teilte uns mit: „In the presence of 0.002 Gamma/ml of PGA **, 1 Gamma/ml of oxybiopterine results in the same growth as 0.00005 Gamma/ml of our synthetic biopterine. Full response is not given even with 10 Gamma/ml of the oxybiopterine. It is apparent that your pteridine has only a slight activity for *Crithidia*.“ ***)

Wenn man die Analysenwerte von HÜTTEL und SPRENGLING²⁾ für Ichthyopterin mit denen des 7-Hydroxy-biopterins vergleicht, so stimmen sie recht gut überein. Wir möchten aber daraus nicht ableiten, daß dieses Präparat ganz oder teilweise 7-Hydroxy-biopterin gewesen ist; diese Frage dürfte sich aus Materialmangel nicht mehr entscheiden lassen. Immerhin schien es uns notwendig, auch noch die beiden Isomeren des 7-Hydroxy-biopterins herzustellen, um zu prüfen, wie weit sie für eine Identität in Frage kommen könnten. Es handelt sich dabei um 6-[β . γ -Dihydroxypropyl]-isoxanthopterin (XII) und die entsprechende α . γ -Dihydroxy-Verbindung. Von diesen konnte aber nur die Verbindung XII bisher synthetisiert werden.

Für ihre Gewinnung wurde 6-[γ -Benzoyloxy- β -oxo-propyl]-isoxanthopterin durch Kondensation von 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin mit δ -Benzoyloxy- α . γ -dioxo-valeriansäureester¹⁴⁾ hergestellt. Reduktion mit Natriumborhydrid und Verseifung lieferte XII. Die Verbindung ist viel weniger photolabil als 7-Hydroxy-biopterin; sie blieb bei der UV-Bestrahlung im wesentlichen unverändert. Bei der Reaktion mit Aluminiumamalgam trat erwartungsgemäß keine Abspaltung der Seitenkette entsprechend den Befunden der japanischen Autoren¹⁰⁾ ein. Diese Verbindung verhält sich also anders als Ichthyopterin.

*) Die Bezeichnung 7-Hydroxy-biopterin ist nur dann voll gerechtfertigt, wenn unser synthetisches Material auch die erythro-Form darstellt. Sollte sich dies als falsch herausstellen, müßte der Name geändert werden.

***) Pteroyl-glutaminsäure.

****) Wir möchten den Herren der AMERICAN CYANAMID CORP. auch hier unseren besonderen Dank für ihre Untersuchung aussprechen.

12) Dissertat. C.-H. KÖHNCKE, Univ. Hamburg 1950. 13) Helv. chim. Acta 32, 423 [1949].

14) R. TSCHESCHE und H. SCHÄFER, Chem. Ber. 88, 81 [1955].

Für die Herstellung des 6-[α - γ -Dihydroxy-propyl]-isoxanthopterins wurde versucht, Methoxalyl- γ -butyrolacton¹⁵⁾ mit 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin zu kondensieren. Man erhält so in der Tat das gewünschte α -[Isoxanthopteryl-(6)]- γ -butyrolacton (XIII), das sich auch zu 6-[γ -Hydroxy-propyl]-isoxanthopterin (XIV) decarboxylieren läßt. Die Anwendung der bekannten Verfahren zur Einführung einer OH-Gruppe in die α -Stellung der Seitenkette dieser Verbindung oder in das Butyrolactonderivat blieb jedoch bisher ohne Erfolg.

Über die R_F -Werte der hergestellten Pteridinderivate, ihre Lichtempfindlichkeit und das Verhalten gegen Aluminiumamalgam s. Versuchsteil.

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und dem FONDS DER CHEMIE vielmals für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

6-Acetyl-isoxanthopterin (VI): 22 g *6-Hydroxy-2.4.5-triamino-pyrimidin-hydrochlorid*, gelöst in 500 ccm Wasser, wurden mit der Lösung von 25 ccm Morpholin und 18 g *Acetonoxalsäure-äthylester* in 50 ccm Methanol versetzt und 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Es fiel ein orangefarbener Niederschlag aus, der nach Abkühlen auf 30° abgesaugt und mit Wasser, Methanol und Äther gewaschen wurde. Die Ausb. betrug 18 g (75 % d. Th.). Für die folgenden Versuche wurde dieses Rohprodukt eingesetzt.

6-[α -Brom-acetyl]-isoxanthopterin: 2.3 g feingepulvertes *VI* wurden mit 12 ccm Eisessig verrührt und unter Kühlung mit 12 ccm konz. Schwefelsäure versetzt. Nachdem sich alles gelöst hatte, wurden noch weitere 24 ccm Eisessig zugegeben. Nach Zusatz von 1.6 g *Brom* erfolgte alsbald Aufhellung und Bromwasserstoffentwicklung. Über Nacht hatte sich ein hellgelber Niederschlag ausgeschieden, der abgesaugt und mit Eisessig, Methanol und Äther gewaschen wurde. Ausb. 1.68 g (53.5 % d. Th.).

Durch Zusatz von Äther zur Mutterlauge konnte eine weitere Menge Niederschlag erhalten werden, doch erwies sich das Produkt als uneinheitlich.

6-[α -Acetoxy-acetyl]-isoxanthopterin (VIII): 1 g der vorstehenden *Bromverbindung* wurde in einer Lösung von 3 g wasserfr. *Kaliumacetat* in 500 ccm Eisessig suspendiert und 2 Stdn. bei 60° gerührt. Danach war fast vollkommene Auflösung erfolgt. Die Lösung wurde bei höchstens 45° Badtemperatur i. Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1 l siedender 10-proz. Essigsäure aufgenommen. Nachdem sich die Lösung auf 60° abgekühlt hatte, wurde sie filtriert und auf ein geringes Volumen im Vakuum eingengt. Ein dabei entstandener Niederschlag wurde abgesaugt und mit Methanol und Äther gewaschen. Ausb. 0.41 g (42.7 % d. Th.). Zur Analyse wurde die Verbindung aus 10-proz. Essigsäure umkristallisiert.



6-[α -Hydroxy-acetyl]-isoxanthopterin: 637 mg *VIII* wurden in 100 ccm 0.05 *n* Na_2CO_3 gelöst und über Nacht stehengelassen. Danach wurde von einigen ausgeschiedenen braunen Flocken abfiltriert, das Filtrat mit Eisessig angesäuert und i. Vak. auf ein kleines Volumen eingengt. Das ausgeschiedene Pteridin wurde abgesaugt und mit Wasser, Methanol und

¹⁵⁾ F. KORTE und H. MACHLEIDT, Chem. Ber. 90, 2150 [1957].

Äther gewaschen. Ausb. 280 mg (51.3 % d. Th.). Zur Analyse wurde die Verbindung 3 mal aus 10-proz. Essigsäure umkristallisiert.

$C_9H_9N_5O_4$ (251.2) Ber. C 43.03 H 3.61 N 27.88 Gef. C 42.52 H 3.88 N 27.73

Spaltung des Ketols mit Lauge: 2 mg des vorstehenden Ketols wurden in 4 ccm 0.1 *n* NaOH gelöst und bei Raumtemperatur stehengelassen. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und papierchromatographisch untersucht. Die Spaltung konnte durch die Abnahme der Fluoreszenz verfolgt werden. Nach 5 Stdn. betrug die Intensität nur noch 50 % des Ausgangswertes. Nach 20 Stdn. war kein Ketol mehr nachweisbar. Bei der Papierchromatographie in 3-proz. Ammoniumchloridlösung trat jetzt nur noch der Fleck des *Isoxanthoprotein-aldehyds*-(6) (IX) auf, wie der Vergleich mit authent. Material zeigte. 7-Hydroxy-biopterin wurde unter den gleichen Bedingungen im Dunkeln nicht gespalten.

7-Hydroxy-biopterin (V): a) Der Lösung von 571 mg VIII in 100 ccm 0.1 *n* Na_2CO_3 fügte man nach einigen Stdn. 80 mg Natriumborhydrid, in 20 ccm Wasser gelöst, hinzu. Nach 4 Stdn. wurde mit Eisessig angesäuert und die Lösung i. Vak. auf das halbe Volumen eingeeengt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und betrug 238 mg (46.6 % d. Th.).

Zur Reinigung wurden 100 mg in möglichst wenig 0.2 *n* NH_3 gelöst und auf eine Säule mit Magnesol gebracht (Länge der Magnesolschicht 5 cm, \varnothing 2.5 cm, das Magnesol wurde mit Wasser in die Säule eingeschlämmt). Eluiert wurde mit 500 ccm 0.1 *n* NH_3 . Die das 7-Hydroxy-biopterin enthaltenden Fraktionen wurden nach dem Ansäuern mit Eisessig i. Vak. zur Trockne eingedampft. Es hinterblieb ein hellgelber Rückstand, der mit wenig Wasser aufgenommen wurde, wobei das 7-Hydroxy-biopterin ungelöst blieb. Es wurde noch einmal aus 10-proz. Essigsäure umkristallisiert und erwies sich nunmehr als papierchromatographisch einheitlich.

$C_9H_{11}N_5O_4 \cdot 1/2 H_2O$ (262.2) Ber. C 41.27 H 4.61 N 26.74 Gef. C 41.51 H 4.72 N 26.44

b) 2. Darstellungsmethode für V durch Selenioxyd-Oxydation von VI und anschließende Natriumborhydrid-Reduktion s. unten.

Abbau von V mit Perjodsäure: 100 ccm einer kalt gesätt. Lösung von V in 10-proz. Essigsäure wurden mit 100 mg Kaliumperjodat, in 10 ccm Wasser gelöst, versetzt. Die Lösung trübte sich schnell, und es schieden sich gelbe Flocken ab, die nach 2 Stdn. abfiltriert wurden. Nach 2maligem Umkristallisieren aus 20-proz. Essigsäure wurde der entstandene *Isoxanthoprotein-aldehyd*-(6) (IX) analysiert.

$C_7H_5N_5O_3$ (207.2) Ber. C 40.58 H 2.43 N 33.81 Gef. C 40.25 H 2.83 N 33.76

Papierchromatographisch erwies sich der Aldehyd als identisch mit authent. Material.

Mit einer 2. Probe von 50 ccm 7-Hydroxy-biopterin-Lösung wurde eine entsprechende Spaltung mit Perjodat vorgenommen. Der gebildete Acetaldehyd wurde mit Stickstoff über einen Kühler in 20 ccm Dimedonlösung (100 mg Dimedon in 50 ccm eines Natriumacetat/Salzsäure-Puffers von p_H 4.5 gelöst) eingeleitet. Am andern Morgen hatte sich aus der Dimedonlösung eine krist. Substanz vom Schmp. 140–141° abgeschieden, die mit der *Dimedon-Verbindung des Acetaldehyds* keine Schmelzpunktsdepression zeigte.

Reduktion von V mit Aluminiumamalgam: In 1 ccm einer 7-Hydroxy-biopterin-Lösung (ca. 0.2 mg im ccm) wurde ein ca. 1 mm starker Aluminiumdraht, der mit Quecksilber(II)-chlorid amalgamiert worden war, eingetaucht. Nach 15 Min. wurde der Draht entfernt und die Lösung mit 2 Tropfen 2 *n* NH_3 versetzt. Das ausgeschiedene Aluminiumhydroxyd wurde abzentrifugiert und die klare Lösung papierchromatographisch untersucht. Das entstandene Pteridin erwies sich als identisch mit *Isoxanthoprotein*.

6-[α,β -Dioxo-propyl]-isoxanthopterin (X): Die Suspension von 1.175 g VI und 0.555 g Selendioxyd in 200 ccm Eisessig erwärmt man unter Rühren zunächst 5 Stdn. auf 70° und steigerte anschließend die Temperatur 2 Stdn. auf 90°. Die Reaktionslösung wurde noch heiß vom ausgeschiedenen Selen filtriert und dann i. Vak. bis fast zur Trockne eingedampft. Das abgeschiedene Pteridin wurde in Wasser suspendiert, abfiltriert und mit Wasser, Methanol und Äther gewaschen. Ausb. 440 mg (35.4 % d. Th.).

Zur Reinigung der Verbindung wurde eine Säule vom \varnothing 2.5 cm benutzt, in die WHATMAN-Cellulosepulver mit 5-proz. Essigsäure bis zur Höhe von 30 cm eingeschlämmt worden war. Auf die Säule wurde eine gesättigte Lösung des Rohprodukts in 5-proz. Essigsäure aufgebracht (50 ccm) und mit 5-proz. Essigsäure nachgewaschen. In den ersten drei 50-ccm-Fractionen fand sich das gesuchte Pteridin; sie wurden vereinigt und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Den Rückstand kristallisierte man aus 5-proz. Essigsäure um. Beim Waschen mit Methanol bildete sich ein Methanol-Addukt.

$C_9H_7N_5O_4 \cdot CH_3OH$ (281.2) Ber. C 42.71 H 3.94 N 24.90 Gef. C 43.22 H 3.48 N 24.76

2. Darstellungsmethode des 7-Hydroxy-biopterins (V): 1.175 g rohes VI wurden in der oben beschriebenen Weise mit Selendioxyd umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt suspendierte man in 100 ccm 0.1 n Na_2CO_3 und gab 150 mg Natriumborhydrid zu. Nach 2stdg. Rühren wurde mit Essigsäure angesäuert, zum Sieden erhitzt und heiß filtriert. Beim Erkalten schied sich das gebildete V aus und wurde in der oben angegebenen Weise gereinigt. Ausb. 0.446 g (35.3 % d. Th.).

6-Hydroxymethyl-isoxanthopterin (XI)¹⁶⁾: Eine Suspension von 2.57 g 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin in 125 ccm siedendem Wasser wurde mit 3.5 g Brombrenztraubensäure versetzt. Es entstand schnell ein gelber, feinkrist. Niederschlag, der nach mehreren Stdn. abgesaugt wurde. Zur Reinigung wurde er in 70 ccm sehr verd. Natronlauge mit etwas Entfärbungskohle einige Min. erhitzt, die Lösung filtriert und das Filtrat heiß in 100 ccm siedende 2 n HCl eingegossen. XI schied sich sofort in weißen Flocken aus und war nach einmaliger Wiederholung dieses Prozesses rein. Ausb. 1.2 g.

$C_7H_7N_5O_3$ (209.2) Ber. C 40.19 H 3.37 N 33.48 Gef. C 39.80 H 3.20 N 33.58

6-[γ -Benzoyloxy- β -oxo-propyl]-isoxanthopterin: Die Lösung von 10 g 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-hydrochlorid in 150 ccm heißem Wasser wurde mit 10 ccm Morpholin sowie der Lösung von 18 g δ -Benzoyloxy- α,γ -dioxo-valeriansäure-äthylester¹⁴⁾ in 150 ccm Methanol versetzt und 10 Min. auf dem siedenden Wasserbade erhitzt, wobei ein Teil des Methanols abdestillierte. Nach dem Erkalten wurde das abgeschiedene Pteridin abgesaugt und mit Wasser, Methanol und Äther gewaschen. Ausb. 11.4 g (68.7 % d. Th.). Eine Reinigung der Verbindung durch Umkristallisation gelang nicht.

6-[β,γ -Dihydroxy-propyl]-isoxanthopterin (XII): In eine Lösung von 200 mg Natriumborhydrid in 100 ccm 0.1 n NaOH wurde unter Rühren 1 g 6-[γ -Benzoyloxy- β -oxo-propyl]-isoxanthopterin eingetragen und das Gemisch über Nacht stengelassen. Der Reaktionsansatz wurde mit Entfärbungskohle behandelt, filtriert und mit Eisessig angesäuert. Die entstandene Suspension erhitzte man zum Sieden und filtrierte das ungelöste Material ab. Das Filtrat wurde auf die Hälfte eingengt und das ausgefallene Pteridin abgesaugt und wie üblich gewaschen. Ausb. 480 mg (67.3 % d. Th.).

Die Reinigung erfolgte wieder mittels einer Cellulosesäule (5.5 cm \varnothing , Länge 25 cm). Auf sie brachte man 100 ccm einer gesätt. Lösung des Pteridins in 5-proz. Essigsäure. Die ersten

¹⁶⁾ Bearbeitet von C.-H. KÖHNCKE.

drei 100-ccm-Fractionen engte man gemeinsam i. Vak. ein und kristallisierte das dabei ausgefallene Pteridin aus 10-proz. Essigsäure um.

$C_{10}H_{11}N_5O_4$ (253.2) Ber. C 42.69 H 4.38 N 27.67 Gef. C 42.89 H 4.61 N 27.14

α -[Isoxanthopteryl-(6)]- γ -butyrolacton (XIII): Die Lösung von 4.28 g 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-hydrochlorid in 60 ccm heißem Wasser versetzte man mit 4.5 ccm Morpholin sowie einer Lösung von 3.72 g α -Äthoxalyl- γ -butyrolacton in 60 ccm heißem Methanol und erhitzte 30 Min. auf dem siedenden Wasserbad, wobei das Methanol teilweise abdestillierte. Die noch heiße Reaktionslösung säuerte man mit Eisessig an, erhitzte zum Sieden und saugte das ungelöste Pteridin ab. Es wurde wie üblich gewaschen und erwies sich danach als weitgehend einheitlich. Ausb. 2.98 g (56.6% d. Th.). Zur Analyse wurde aus 30-proz. Essigsäure umkristallisiert.

$C_{10}H_9N_5O_4$ (263.2) Ber. C 45.63 H 3.45 N 26.61 Gef. C 45.27 H 3.74 N 26.35

6-[γ -Hydroxy-propyl]-isoxanthopterin (XIV): Die Suspension von 1 g α -[Isoxanthopteryl-(6)]- γ -butyrolacton in 50 ccm 1 n HCl wurde 1½ Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Pteridin abgesaugt und wie üblich gewaschen. Ausb. 0.673 g (74.8% d. Th.). Zur Reinigung wurde es in 0.1 n NaOH gelöst und die Lösung mit Kohle behandelt. Die filtrierte Lösung ließ man in siedende 10-proz. Essigsäure eintropfen. Das Pteridin fiel dabei in farblosen Nadeln aus.

$C_9H_{11}N_5O_3$ (237.2) Ber. C 45.57 H 4.67 N 29.53 Gef. C 45.28 H 4.61 N 28.83

Lichtzeretzung der dargestellten Pteridine: 1 mg des zu untersuchenden Pteridins wurde in 5 ccm 10-proz. Essigsäure gelöst; von dieser Lösung trug man 1 Tropfen auf das Papier SCHLEICHER & SCHÜLL 2043a an der Startlinie auf. Die Flecken wurden getrocknet und 30 Min. mit einer UV-Lampe bestrahlt. Anschließend wurden die Chromatogramme in den später beschriebenen Lösungsmittelsystemen entwickelt.

Aufgebrachte Pteridinderivate	Wiedergef. Pteridinderivate
7-Hydroxy-biopterin (V)	Isoxanthopterin (II)
6-[β , γ -Dihydroxy-propyl]-isoxanthopterin (XII)	Ausgangsmaterial und ein sehr schw. unbekannter Fleck
Isoxanthopterin-carbonsäure-(6) (III)	Ausgangsmaterial neben wenig Isoxanthopterin (II)
6-[α , β -Dioxo-propyl]-isoxanthopterin (X)	Isoxanthopterin (II) neben wenig Isoxanthopterin-carbonsäure-(6) (III)

Aluminiumamalgam-Reduktion der Pteridine: 1 mg der zu untersuchenden Pteridine wurde in 5 ccm Wasser suspendiert und die Mischung halbiert. Die eine Hälfte wurde 30 Min. mit einem amalgamierten Aluminiumdraht (\varnothing 2 mm) behandelt. Danach machte man die Reaktionsmischung mit Ammoniak schwach alkalisch, ließ das Aluminiumhydroxyd absitzen und untersuchte die überstehende Lösung papierchromatographisch. Als Vergleich diente die andere Hälfte des Ansatzes.

Ausgangsprodukt	Reaktionsprodukt
7-Hydroxy-biopterin (V)	Isoxanthopterin (II)
6-[β , γ -Dihydroxy-propyl]-isoxanthopterin (XII)	unverändertes XII
6-[γ -Hydroxy-propyl]-isoxanthopterin (XIV)	unverändertes XIV
6-[α , β -Dioxo-propyl]-isoxanthopterin (X)	Isoxanthopterin (II) und 6-[β -Hydroxy-propyl]-isoxanthopterin

R_F-Werte der hergestellten Pteridine

Verbindung	Lösungsmittelsystem*) a	b	c	d
6-Acetyl-isoanthopterin (VI)	0.46	0.27	0.64	—
Isoanthopterin-aldehyd-(6) (IX)	0.24	0.12	0.36	—
6-[α -Brom-acetyl]-isoanthopterin	0.58	0.16	0.65	—
6-[α -Acetoxy-acetyl]-isoanthopterin (VIII)	0.73	0.40	0.78	—
6-[α -Hydroxy-acetyl]-isoanthopterin	0.60	0.15	0.68	—
7-Hydroxy-biopterin (V)	0.54	0.13	0.62	—
6-[α,β -Dioxo-propyl]-isoanthopterin (X)	0.71	0.31	0.76	Zers.
6-[β,γ -Dihydroxy-propyl]-isoanthopterin (XII)	0.52	0.07	0.57	0.29
α -[Isoanthopteryl-(6)]- γ -butyrolacton (XIII)	0.54	0.17	0.63	0.40
6-[γ -Hydroxy-propyl]-isoanthopterin (XIV)	0.37	0.16	0.50	0.40

*) *Lösungsmittelsysteme*: a) 3-proz. Ammoniumchloridlösung, b) *n*-Butanol/ Eisessig/ Wasser (4 : 1 : 1), c) 5-proz. Essigsäure, d) Äthanol/ *n*-Butanol/ konz. Ammoniak/ Wasser (50 : 15 : 10 : 25).

Es wurde das Papier SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 a verwendet und nach der absteigenden Methode gearbeitet. Die angegebenen *R_F*-Werte stellen Mittelwerte dar, der Isoanthopterin-aldehyd-(6) neigt in Ammoniumchloridlösung zur Schwanzbildung.

HANS-JOACHIM TEUBER und KARL SCHNEE

Zur Frage des Ringschlusses bei der Indolsynthese
nach Bischler mit *m*-Aminophenol

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

(Eingegangen am 28. Mai 1958)

Die durch Kondensation von *m*-Aminophenol oder *m*-Anisidin mit Benzoin gebildeten Derivate des 2.3-Diphenyl-indols enthalten die Hydroxy- bzw. Methoxygruppe in 4- und nicht in 6-Stellung.

Im Zusammenhang mit Versuchen zur Indolsynthese nach BISCHLER¹⁾ ergab sich für uns die Frage, ob bei der Kondensation von *m*-Aminophenol bzw. *m*-Anisidin mit α -Hydroxyketonen, wie z. B. Benzoin, 4- oder 6-Hydroxy-(Methoxy-)indole entstehen. 6-Hydroxy-indole waren für uns von Interesse, da aus ihnen bei der Oxydation mit Kalium-nitrosodisulfonat 5.6- oder 6.7-Indolchinone gebildet werden sollten.

F. BALLAUF und A. SCHMELZER²⁾ haben erstmals *m*-Aminophenol mit Benzoin kondensiert und ein Produkt vom Schmp. 168° isoliert, das sie als 6-Hydroxy-2.3-diphenyl-indol (I) ansahen, ohne diese Annahme zu begründen.

¹⁾ Vgl. z. B. P. L. JULIAN, E. W. MEYER und H. C. PRINTY, *Heterocyclic Compounds* (R. C. ELDERFIELD), Bd. 3, S. 22, John Wiley & Sons, New York 1952.

²⁾ IG-FARBENINDUSTRIE AG., Dtsch. Reichs-Pat. Nr. 533471; Friedländer 18, 639 [1931].