

Umsetzung von Benzolsulfinsäure mit Trimethylamin und Benzolsulfochlorid: 2.8 g Benzolsulfinsäure löste man in 10 ccm Wasser, gab 4 g 33-proz. wäbr. Trimethylamin-Lösung zu und ließ unter Eiskühlung 3.5 g Benzolsulfochlorid zutropfen. Dabei schied sich ein farbloses Öl ab, das nach kurzer Zeit erstarrte. Das Rohprodukt wurde mit Äther und Wasser ausgewaschen und mehrmals aus Benzol umkristallisiert. Es konnten 2 g *Diphenyldisulfon*, Schmp. 190--192°, isoliert werden.

WOLFGANG PFLEIDERER

Über die Umwandlung von Purinen in Pteridine, I

Über den Abbau von Harnsäure mit Wasser unter Druck¹⁾

Aus dem Institut für Organische Chemie und Organisch-Chemische Technologie
der Technischen Hochschule Stuttgart

(Eingegangen am 19. März 1958)

Bei 6 stg. Erhitzen von Harnsäure mit Wasser im Bombenrohr auf 220° entsteht ein Gemisch von mindestens 12 fluoreszierenden Verbindungen, hauptsächlich Pteridinderivaten, von denen 6 durch Isolierung bzw. Abtrennung in ihrer Struktur eindeutig charakterisiert werden konnten. Durch den indirekten Nachweis von 4.5-Diamino-uracil wurde auch die Schlüsselsubstanz bei der Umwandlung der Harnsäure in die Pteridinderivate gefunden.

Im Jahre 1942 berichtete F. G. HOPKINS²⁾ im Zusammenhang mit seinen Untersuchungen in der Pteridinreihe über gelbgrün fluoreszierende Lösungen, die er bei der Umsetzung von Harnsäure mit Wasser im Bombenrohr bei 195–200° erhalten hatte. Durch fraktioniertes Einengen ließen sich daraus gelbe Produkte in unreiner Form isolieren, die sich in Substanz und Lösung nahezu analog verhielten wie die Schmetterlingspigmente Xanthopterin und 7-Methyl-xanthopterin. Eine Umwandlung der Harnsäure in diese Pteridinderivate wurde noch durch die Tatsache gefestigt, daß die gelbgrün fluoreszierenden Lösungen unter den Bedingungen der Pterorhodinbildung (Erhitzen der sauren Lösung auf dem Wasserbad unter Durchleiten von Luft) ein dem Pterorhodin³⁾ entsprechendes, violett gefärbtes Reaktionsprodukt lieferten. Trotz dieser charakteristischen Reaktion und der spektralen Ähnlichkeit der isolierten mit den natürlichen Produkten kamen Hopkins doch Zweifel an der völligen Identität dieser Verbindungen, denn er schreibt: „It is scarcely possible that

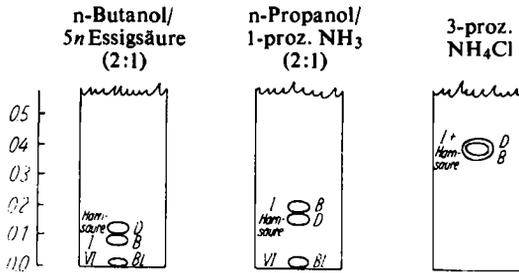
¹⁾ Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde auf dem Ciba Foundation Symposium „Chemistry and Biology of Purines“ am 8.–10. 5. 1956 in London vorgetragen. W. PFLEIDERER in „G. E. W. WOLSTENHOLME und C. M. O'CONNOR, Chemistry and Biology of Purines“, S. 77, Verlag J. & A. Churchill, London 1957.

²⁾ Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B 130, 359 [1941–1942].

³⁾ P. B. RUSSELL, R. PURRMANN, R. SCHMITT und G. H. HITCHINGS, J. Amer. chem. Soc. 71, 3412 [1949].

such a product from uric acid can be identical with pterorhodin, but it would seem that there must be close relations between them“.

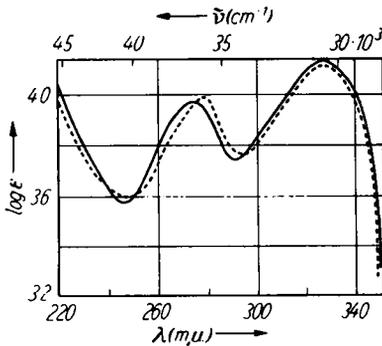
Wir haben nun die Versuche von Hopkins in etwas erweiterter Form neu bearbeitet und zur Klärung der Verhältnisse vor allem die Papierchromatographie zu Hilfe genommen. Im ersten Versuch wurde eine wäßrige Suspension von Harnsäure im Bombenrohr auf 190° erhitzt, wobei neben unumgesetztem Ausgangsprodukt eine schwach bläulich fluoreszierende Reaktionslösung resultierte. Die papierchromatographischen Untersuchungen dieser Lösung führten zu folgendem Ergebnis (Abbild. 1): Neben etwas Harnsäure enthält die Reaktionslösung hauptsächlich 2.4.7-Trihydroxy-



Abbild. 1. Papierchromatogramme

Absteigende Methode auf Schleicher & Schüll-Papier 2043 b Gl. BL = bläulich und B = blau geben die Fluoreszenzfarben wieder, die beim Bestrahlen mit UV-Licht von $\lambda = 254 \mu$ beobachtet werden. D = Absorptionsfleck

pteridin (I), während der zweite, sehr schwache bläuliche Fluoreszenzfleck mit einiger Sicherheit dem 2.4.5.7-Tetrahydroxy-pyrimido[5.4-g]pteridin (VI) zugeordnet werden kann. Die quantitative Bestimmung von I ergab einen Gehalt von 5.74 mg. Aus $\frac{4}{5}$ dieser Lösung konnten 2.4 mg I isoliert werden, wobei jedoch eine vollständige Abtrennung der Harnsäure, wie Abbild. 2 zeigt, nicht erreicht wurde.



Abbild. 2

UV-Absorptionsspektren von authent. (—) 2.4.7-Trihydroxy-pteridin (I) und einem isolierten Präparat (-----) bei pH 3.5

Im zweiten Bombenrohrversuch haben wir die Harnsäure mit Wasser auf 220° erhitzt. Unter diesen Bedingungen erhält man eine vor dem Öffnen des Bombenrohres hell gelbliche bis schwach grünliche Lösung, deren Farbe sich selbst bei mehrwöchigem Aufbewahren des geschlossenen Rohres nicht verändert. Öffnet man dagegen das Rohr und läßt die filtrierte, nahezu neutrale Lösung (pH 7.6) bei Raumtemp. stehen, so setzt nach kurzer Zeit schon eine deutliche Farbvertiefung ein, und nach etwa

einem Tag ist die von HOPKINS²⁾ beschriebene stark gelbgrün fluoreszierende Reaktionslösung entstanden.

Die damit durchgeführten papierchromatographischen Untersuchungen ließen erkennen, daß die Reaktion bei 220° im Gegensatz zu Umsetzung bei 190° sehr komplexer Natur geworden ist, denn durch die Auswertung der Chromatogramme in vier verschiedenen Systemen und in Wasser konnte die Entstehung von mindestens zwölf fluoreszierenden Substanzen festgestellt werden.

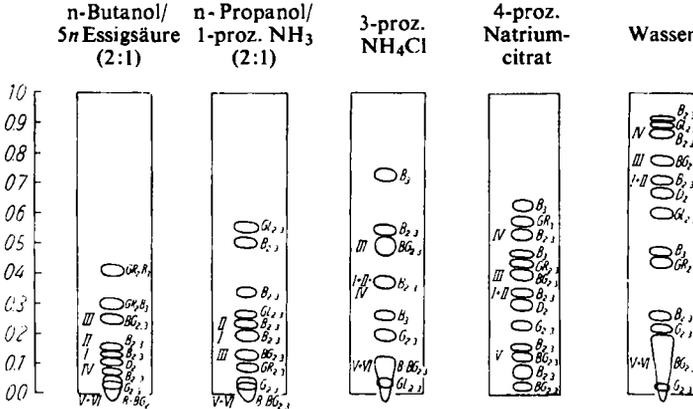


Abbildung 3. Papierchromatogramme

Absteigende Methode. G = gelb, GL = gelblich, B = blau, BG = blaugrau und GR = grau sind die Fluoreszenzfarben beim Bestrahlen mit UV-Licht $\lambda = 254 \mu\text{m} = 2$ bzw. $366 \mu\text{m} = 3$. D = Absorptionsfleck

Die besten Trennungen wurden bei den Papierchromatogrammen in n-Propanol/Ammoniak und Natriumcitratlösung erzielt, während in Ammoniumchlorid stets verwaschene Flecken resultierten.

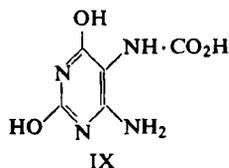
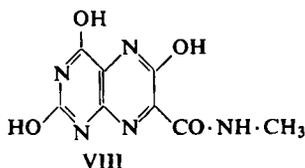
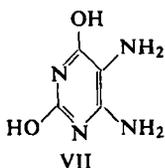
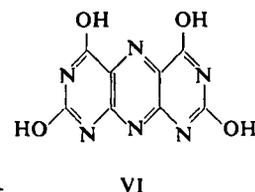
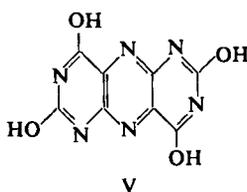
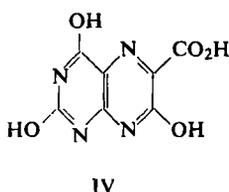
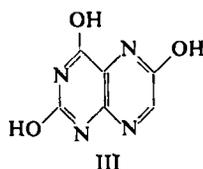
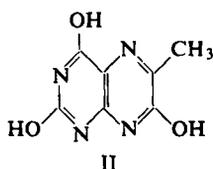
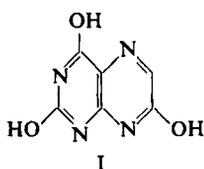
Eine Zuordnung der erhaltenen Fluoreszenzflecken zu bestimmten Pteridinderivaten konnte nach zahlreichen vergleichenden Versuchen mit authentischen Materialien auf rein papierchromatographischem Wege in fünf Fällen verwirklicht werden. Es wurde gefunden, daß in der Reaktionslösung mit großer Wahrscheinlichkeit 2.4.7-Trihydroxy-(I), 2.4.7-Trihydroxy-6-methyl-(II), 2.4.6-Trihydroxy-pteridin (III), 2.4.7-Trihydroxy-pteridin-carbonsäure-(6) (IV) und 2.4.6.8-Tetrahydroxy-pyrimido-[4.5-g]pteridin (V) enthalten sind.

Zum eindeutigen Nachweis dieser Pteridinderivate haben wir als erstes I und II von den übrigen Reaktionsprodukten abgetrennt und durch ihre UV-Absorptionsspektren charakterisiert. Aus den Extinktionswerten wurde der Gehalt an I zu 18.0 mg und II zu 5.7 mg errechnet.

III konnte aus dem Reaktionsgemisch in einer Menge von 2.1 mg isoliert und durch ein UV-Absorptionsspektrum sowie R_F -Werte eindeutig in seiner Konstitution bestätigt werden.

Als nächste Substanz wurde die 2.4.7-Trihydroxy-pteridin-carbonsäure-(6) (IV) auf papierchromatographischem Wege abgetrennt und durch Vergleich mit authentischem Material ihre Struktur gesichert.

Beim Versuch, die Natur des fünften Pteridinderivates, das in der Reaktionslösung erkannt worden war, durch Isolierung in Substanz zu sichern, zeigte es sich, daß die isomere Verbindung, das blau fluoreszierende 2.4.5.7-Tetrahydroxy-pyrimido[5.4-g]-pteridin (VI), ebenfalls ein Reaktionsprodukt darstellt. Es gelang uns, 5.6 mg VI in Form weißlicher Kristalle zu erhalten, die wieder spektrophotometrisch und papierchromatographisch identifiziert wurden.

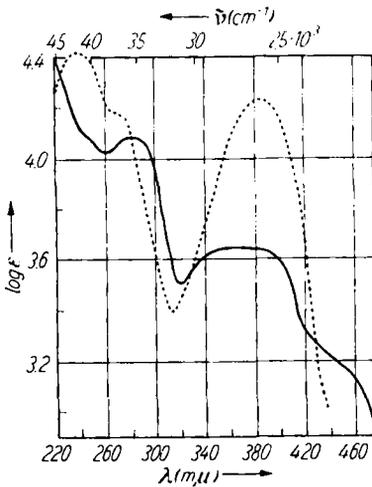


Das 2.4.6.8-Tetrahydroxy-pyrimido[4.5-g]pteridin (V) konnte nicht in reiner Form isoliert werden. Es war jedoch möglich, ein gelb bis gelborangefarbenes Produkt in einer Menge von 14.2 mg abzutrennen und nachzuweisen, daß es aus einem Gemisch der beiden Isomeren V und VI bestand, in dem letzteres mengenmäßig überwog.

Nach E. C. TAYLOR und Mitarbb.⁴⁾ wird das [5.4-g]-Isomere durch ein Absorptionsmaximum im Bereich 380–390 μ angezeigt, während das Auftreten einer Schulter bei 430–440 μ die Gegenwart des 2.4.6.8-Tetrahydroxy-pyrimido[4.5-g]-pteridins (V) beweist. Aus dem Papierchromatogramm konnte das Vorliegen eines Isomerengemisches nicht erkannt werden, da infolge der gleichen R_F -Werte beider Isomeren V mit seiner starken blaugrauen Fluoreszenz die Anwesenheit von VI, wie in der Reaktionslösung, nicht sichtbar werden ließ. Nachdem es gelungen war, aus dem Reaktionsgemisch 6 Verbindungen abzutrennen und ihre Struktur zu beweisen, war es auch möglich, für einen Teil der Beobachtungen Hopkins' einleuchtende Erklärungen zu geben. Die von ihm isolierten gelben Produkte sind unserer Ansicht nach sehr wahrscheinlich verunreinigte Isomerengemische von V und VI gewesen, denn derartige Mischprodukte liefern durch die Anwesenheit von V gelbgrün fluoreszierende Lösungen und lassen darüber hinaus auf Grund der Maxima bei 270–280 μ und 360–380 μ eine Ähnlichkeit zum UV-Absorptionsspektrum des

⁴⁾ E. C. TAYLOR, H. M. LOUX, E. A. FALCO und G. H. HITCHINGS, J. Amer. chem. Soc. 77, 2243 [1955].

Xanthopterins erkennen. Ferner stellen die Verbindungen V und VI die schwerst-löslichen Komponenten des Reaktionsgemisches dar, so daß ihre Abtrennung am ehesten möglich erscheint.



Abbild. 4
UV-Absorptionsspektren
von authent. VI (.....)
und isoliertem Isomeren-
gemisch V und VI (—) in $n/_{10}$ NaOH

Durch systematische Weiterbearbeitung der Reaktionslösung auf papierchromatographischem Wege waren schließlich noch weitere Aussagen möglich, von denen der eindeutige Nachweis über die Abwesenheit von Xanthopterin und 7-Methyl-xanthopterin als Reaktionsprodukte wohl die wichtigste ist. Die blau fluoreszierende Substanz vom R_F -Wert 0.70 in 3-proz. NH_4Cl bzw. 0.91 in Wasser ist vermutlich ein Pyrazinderivat, das durch sekundäre Spaltung eines Pteridins entstanden ist. Es gelang jedoch noch nicht, seine Struktur aufzuklären.

Ein weiteres Reaktionsprodukt ist wahrscheinlich das 2.4.6-Trihydroxy-7-methyl-pteridin, da einerseits der blaugraue Fluoreszenzpunkt von 0.30 in n -Butanol/5 n Essigsäure (2:1) mit der authentischen Verbindung übereinstimmt und andererseits der verhältnismäßig große Fleck von 0.47–0.52 in 3-proz. NH_4Cl auf ein Gemisch von 2.4.6-Trihydroxy- (R_F 0.47) und 2.4.6-Trihydroxy-7-methyl-pteridin (R_F 0.52) hindeutet. Ein exakter Nachweis dieses Pteridinderivates ist uns aber bis jetzt noch nicht gelungen.

Auch von der zweiten gelb fluoreszierenden Substanz, die neben dem 2.4.6.8-Tetrahydroxy-pyrimido[4.5-g]pteridin (V) für die Farbe der Reaktionslösung verantwortlich gemacht werden muß, können wir außer den R_F -Werten keine näheren Angaben machen (Tab. unter B).

Die Untersuchungen, die wir im Zusammenhang mit der beobachteten Verfärbung der Reaktionslösung, beim Stehenlassen an der Luft, durchgeführt haben, ergaben, daß auf den Papierchromatogrammen die unmittelbar nach dem Öffnen des Bombenrohres angefertigt wurden, die in der Tabelle unter A aufgeführten Fluoreszenzflecken fehlten.

Die in ihrer Konstitution noch nicht erkannte Verbindung der Tabelle sowie das 2.4.6.8-Tetrahydroxy-pyrimido[4.5-g]pteridin (V) bilden sich also erst sekundär unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs. Da diese beiden Substanzen nicht nur in der nahezu neutralen Reaktionslösung, sondern bevorzugt in ammoniakalischem, nicht aber in essigsäurem Medium auftreten, ist anzunehmen, daß V durch oxydative Selbstkon-

densation⁴⁾ von 4.5-Diamino-uracil (VII) entsteht. Letzteres, dessen Nachweis für das Verstehen der Umwandlung der Harnsäure in die Pteridinderivate von größter Bedeutung ist, konnten wir trotz zahlreicher papierchromatographischer Versuche in den verschiedensten Systemen nicht als solches im Reaktionsgemisch auffinden.

Zusammenstellung der R_F -Werte, die auf den Papierchromatogrammen unmittelbar nach dem Öffnen der Bombenrohre fehlen und erst sekundär unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs auftreten (A). Daneben (B) die R_F -Werte der neben V durch Luftoxydation gebildeten Verbindung unbekannter Konstitution

	A	B
n-Butanol/5 n Essigsäure (2:1)	0.04 (G), 0.00–0.06 (BG)	0.04 (G)
n-Propanol/1-proz. NH ₃ (2:1)	0.04 (G), 0.00–0.06 (BG)	0.04 (G)
3-proz. NH ₄ Cl	0.00–0.12 (BG), 0.21 (G)	0.21 (G)
4-proz. Natriumcitrat	0.00–0.13 (BG), 0.23 (G)	0.23 (G)
Wasser	0.04 (G), 0.00–0.20 (BG), 0.23 (G)	0.24 (G)

Wir waren daher gezwungen, sein Vorhandensein auf indirektem Wege in Form eines charakteristischen Sekundärproduktes nachzuweisen. Wir wählten hierzu die Umsetzung mit 1.3-Dimethyl-alloxan, das, wie erwartet, mit einer frisch bereiteten Reaktionslösung das intensiv gelbgrün fluoreszierende 2.4.6-Trihydroxy-pteridin-carbonsäure-(7)-methylamid (VIII)⁵⁾ liefert.

Durch diesen indirekten Nachweis von VII war auch die Entstehung der Pteridinderivate gemäß folgendem Reaktionsschema gesichert:

Unter den extremen Reaktionsbedingungen erfolgt primär eine hydrolytische Spaltung des Imidazolringes der Harnsäure zu 4-Amino-5-carboxyamino-uracil (IX). Nach Decarboxylierung dieses Carbamidsäurederivates resultiert dann als Schlüsselsubstanz das 4.5-Diamino-uracil (VII), das schließlich durch Selbstkondensation die beiden möglichen Pyrimidopteridine V und VI und durch Reaktion mit seinen weiteren Hydrolysenprodukten die übrigen Pteridinderivate liefert.

Diese Ringerweiterung steht in schönem Einklang mit den Untersuchungen A. ALBERTS⁶⁾, der zeigen konnte, daß die Überführung von Purinen in Pteridine z. T. schon unter physiologischen Bedingungen gelingt. Im Hinblick auf die natürlichen Pteridinderivate stellen die hier beschriebenen Ergebnisse ein weiteres Beispiel für die Möglichkeit eines analogen Reaktionsablaufes bei der Biosynthese der Pteridine dar.

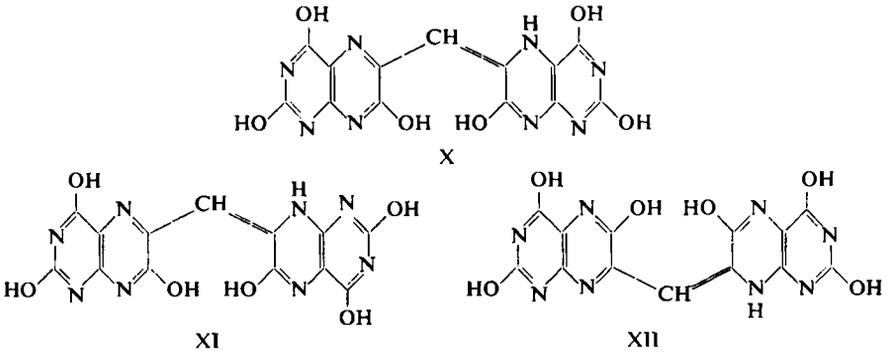
VERSUCHE ZUR BILDUNG VON PTERORHODIN-ANALOGA

Unterwirft man die bei 220° erhaltene, gelbgrün fluoreszierende Lösung den Bedingungen der Pterorhodinbildung³⁾, so scheidet sich gemäß den Angaben HOPKINS²⁾ nach mehrstündigem Erhitzen auf dem Wasserbade allmählich ein purpurfarbenes, schwerlösliches Produkt ab. Durch die Kenntnis der oben geschilderten Reaktionsprodukte stand für uns außer Zweifel, daß es sich bei dieser purpurfarbenen Substanz nur um ein Gemisch der drei isomeren 2-Desimino-pterorhodine handeln konnte. Zum Beweis dieser Behauptung haben wir aus 2.4.7-Trihydroxy- (I) und 2.4.7-Trihydroxy-6-methyl-pteridin (II) X, aus II und 2.4.6-Trihydroxy-pteridin (III) XI und aus III und 2.4.6-Trihydroxy-7-methyl-pteridin XII synthetisiert.

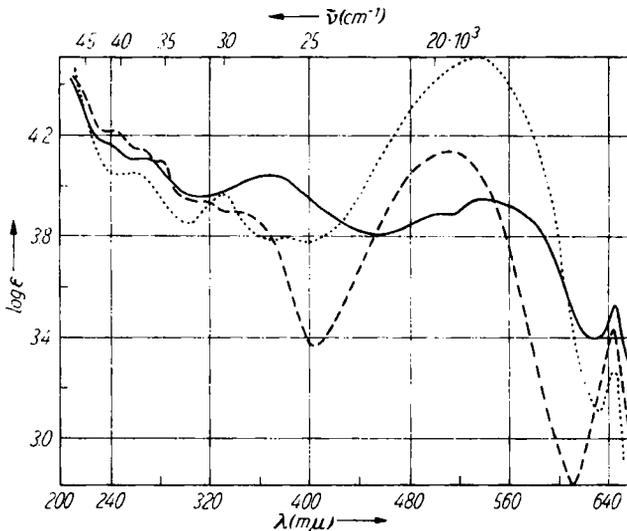
⁵⁾ W. PFLIEDERER, Chem. Ber. 90, 2624 [1957].

⁶⁾ Biochem. J. 65, 124 [1957].

Diese Dipteridylmethinderivate bilden sich unter analogen Bedingungen wie die entsprechenden Pterorhodine. Der einzige Unterschied besteht lediglich in der bedeutend langsamer verlaufenden Umsetzung, einer Tatsache, die Hopkins bei der



Darstellung seiner purpurfarbenen Produkte aus den Harnsäurehydrolysaten aufgefallen war. Auch die geringere Löslichkeit der 2-Desimino-pterorhodine in Schwefelsäure konnte bestätigt werden, was auf das Fehlen der 2-Amino-Gruppen zurückgeführt werden muß. Die außergewöhnliche Schwerlöslichkeit wirkte sich auch bei den papierchromatographischen Untersuchungen nachteilig aus, da es in keinem Fall gelang, eine Wanderung zu erzielen. Das Vorliegen eines Reaktionsgemisches war deshalb nur auf spektrophotometrischem Wege nachweisbar.



Abbild. 5. UV-Absorptionsspektren des 2-Desimino-pterorhodins (XII) (.....) des 2-Desimino-isopterorhodins (XI) (---) und des isolierten Produktes (—) in konz. Schwefelsäure

Wie Abbild. 5 zeigt, muß im Reaktionsprodukt neben XI und XII auch noch das 2-Desimino-allopterorhodin (X) vorliegen, das bei 370 mμ ein ausgeprägtes Maximum aufweist. Ein quantitatives UV-Absorptionsspektrum konnten wir von dieser Ver-

bindung jedoch nicht aufnehmen, da sie selbst in heißer konz. Schwefelsäure nur zum Teil löslich war.

Abschließend muß noch darauf hingewiesen werden, daß die Entstehung von XII keinen Beweis für die Existenz des im Papierchromatogramm vermuteten 2.4.6-Trihydroxy-7-methyl-pteridins darstellt. P. B. RUSSELL und Mitarbb.³⁾ konnten nämlich zeigen, daß die Methinbrücke in den Pterorhodinen auch aus anderen Molekülen mit aktivierter Methylgruppe stammen kann.

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. ALBERT vom Department of Medical Chemistry der Australian National University, Canberra, recht herzlich für die Überlassung des Themas sowie die zahlreichen wertvollen Diskussionen und Herrn Prof. Dr. H. BREDERECK für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden nach der absteigenden Methode auf Schleicher & Schüll Papier 2043 b G1 durchgeführt. Folgende Lösungsmittelsysteme wurden verwendet:

n-Butanol/5 n Essigsäure (2:1) = B/A, n-Propanol/1-proz. NH₃ (2:1) = P/NH₃, 3-proz. NH₄Cl, 4-proz. Natriumcitrat = Ci und Wasser = H₂O.

Isolierung von 2.4.7-Trihydroxy-pteridin (I): Die Suspension von 2 g Harnsäure in 20 ccm Wasser wurde im Bombenrohr 6 Stdn. auf 190° erhitzt. Nach Öffnen des Rohres versetzt man mit 20 ccm 0.1 n NH₄OH, erwärmte leicht und filtrierte das ungelöste Ammoniumurat ab. Nach Trocknen wog der Rückstand 1.7 g.

Aus dem schwach hellblau fluoreszierenden Filtrat, das in einem 50-ccm-Meßkolben entsprechend verdünnt worden war, wurden 40 ccm entnommen und im Trockenschrank bei 110° auf die Hälfte eingengt. Nach Ansäuern mit Essigsäure und Stehenlassen über Nacht wurde der abgeschiedene Niederschlag (Harnsäure) abgetrennt und das Filtrat bis auf 3 ccm weiter eingengt. Es schieden sich 2.4 mg fast farbloses I ab.

Zur quantitativen Bestimmung von I haben wir 0.1 ccm der Reaktionslösung dem Meßkolben entnommen und mit einer Agla-Mikrometerspritze als Band für ein Papierchromatogramm aufgetragen. Anschließend wurde mit n-Propanol/1-proz. NH₃ (2:1) chromatographiert und das blau fluoreszierende Band (*R_F* 0.18) nach Ausschneiden mit Wasser eluiert. Die Lösung wird auf 5 ccm eingengt und dann ein UV-Absorptionsspektrum aufgenommen. Aus den Extinktionswerten errechnet sich ein Gehalt von 5.74 mg 2.4.7-Trihydroxy-pteridin für die gesamte Reaktionslösung.

Der Harnsäureabbau bei 220° wurde genau so durchgeführt. Rückstand 1.3 g Ammoniumurat. Es erwies sich als zweckmäßig, vor Öffnen des Rohres mit einer Eis/Kochsalz-Mischung zu kühlen, da im Inneren durch die CO₂- und NH₃-Bildung ein starker Druck herrschte.

Das gelbgrün fluoreszierende Filtrat wurde auf 50 ccm aufgefüllt und für die papierchromatographischen Untersuchungen im Dunkeln aufbewahrt. Nach mehreren Tagen schieden sich aus dieser Lösung langsam 80 mg eines braunen Niederschlags ab.

Die papierchromatographischen Untersuchungen dieses Niederschlags ließen erkennen, daß es sich in der Hauptsache um ein Gemisch der isomeren Pyrimidopteridine V und VI handelte, dem noch weitere fluoreszierende Substanzen in geringer Menge anhaften.

Quantitative Bestimmung von 2.4.7-Trihydroxy- und 2.4.7-Trihydroxy-6-methyl-pteridin: 0.1 ccm vorstehender Reaktionslösung wurden mit Hilfe einer Agla-Mikrometerspritze als

Band für ein Papierchromatogramm aufgetragen. Zur Abtrennung der Pteridinderivate I und II von den übrigen Reaktionsprodukten wurde in Äthanol/1-proz. NH_3 (2:1) chromatographiert und das blau fluoreszierende Band mit R_F 0.33–0.37 nach Ausschneiden mit Wasser eluiert. Nach vorsichtigem Einengen auf ein sehr kleines Volumen wurde die gesamte Lösung erneut als Band aufgetragen und zur Trennung der beiden homologen Verbindungen nun in *n*-Butanol/5*n* Essigsäure (2:1) gearbeitet, wodurch eine sehr schöne Aufspaltung in zwei Bänder mit R_F 0.09 und 0.14 eintrat. Nach erneutem Eluieren mit Wasser konnte daraufhin der Gehalt aus den UV-Absorptionsspektren für I mit 18.0 mg und für II mit 5.7 mg errechnet werden.

Die quantitative Bestimmung von I und II haben wir durchgeführt, um eine ungefähre Vorstellung von den gebildeten Pteridinmengen zu erhalten.

Isolierung von 2.4.6-Trihydroxy-pteridin (II'): Das bei 220° erhaltene Reaktionsgemisch wurde ohne Ammoniakbehandlung durch Absaugen getrennt, der gewaschene Rückstand danach mit 15 ccm Wasser zum Sieden erhitzt und nach 5 Min. erneut heiß filtriert. Aus dem Filtrat, das mit einigen Tropfen Essigsäure angesäuert wurde, schied sich beim Abkühlen ein hellbrauner Niederschlag ab, der aus Harnsäure und einem Gemisch verschiedener Pteridinderivate bestand. Nach eintägigem Stehenlassen wurde abgesaugt und das Filtrat auf die Hälfte eingeeengt, wodurch die Abscheidung von 9 mg leicht gelblich gefärbter Kristalle gelang. Nach Umkristallisation aus wenig Wasser unter Zusatz von wenig Aktivkohle wurden daraus 2.1 mg III gewonnen.

R_F -Werte: B/A = 0.23 (BG), P/ NH_3 = 0.10 (BG), NH_4Cl = 0.47 (BG), Ci = 0.42 (BG), H_2O = 0.77 (BG) und 5*n* Essigsäure = 0.65 (BG). Auch das UV-Absorptionsspektrum bei p_H 3.5 war mit dem eines authent. Präparats identisch. λ_{\max} 223 $m\mu$, 251 $m\mu$, 365 $m\mu$.

Identifizierung der 2.4.7-Trihydroxy-pteridin-carbonsäure-(6) (IV): Ein Teil der Reaktionslösung wurde auf ein kleineres Volumen eingeeengt und nach Auftragen als Band mit 4-proz. Natriumcitrat-Lösung chromatographiert. Der blau fluoreszierende Streifen vom R_F -Wert 0.55 zeigte sich nach Eluieren mit Wasser und Gefriertrocknen mit authent. Material identisch.

R_F -Werte: B/A = 0.05, P/ NH_3 = 0.40, NH_4Cl = 0.40, Ci = 0.54 und H_2O = 0.88. UV-Absorptionsspektrum bei p_H 0: λ_{\max} 270 $m\mu$, 339 $m\mu$.

Isolierung von 2.4.5.7-Tetrahydroxy-pyrimido[5.4-g]pteridin (VI): Die vereinigten Reaktionsgemische aus vier Ansätzen von je 2 g Harnsäure (bei 220° umgesetzt) wurden mit 80 ccm $n/10$ NH_3 unter Erwärmen behandelt und filtriert. Aus dem gelb fluoreszierenden Filtrat schied sich nach Ansäuern mit 5*n* H_2SO_4 über Nacht ein brauner Niederschlag ab, der nach Waschen mit Wasser und Trocknen bei 110° 0.3 g wog. Nach dem Papierchromatogramm lag ein Gemisch von 5–6 fluoreszierenden Substanzen vor.

Dieses Gemisch wurde anschließend mit 50 ccm Wasser zum Sieden erhitzt und heiß filtriert. Als Rückstand blieben 110 mg, während sich aus dem Filtrat 95 mg braunrote Kristalle allmählich abschieden.

Der ungelöste Rückstand wurde erneut mit 100 ccm Wasser aufgeköcht und heiß filtriert. Der so erhaltene neue Rückstand war noch nicht rein und wog jetzt noch 35 mg. Durch zweimaliges Umfällen aus verd. Kalilauge und verd. Salzsäure in der Siedehitze und in Gegenwart von etwas Tierkohle wurden dann schließlich 5.6 mg weißlichgraue Kristalle von VI erhalten.

R_F -Werte: B/A = 0.06 (B), P/ NH_3 = 0.05 (B), NH_4Cl = 0.00–0.13 (B), Ci = 0.00–0.09 (B) und H_2O = 0.05–0.18 (B).

Isolierung des Isomergemisches V und VI: Die bei vorstehendem Versuch angefallenen 95 mg braunrote Kristalle wurden noch zweimal aus Wasser, das wenig Essigsäure enthielt,

umkristallisiert. Das gelborangefarbene Produkt konnte dadurch in einer Ausb. von 14.2 mg erhalten werden.

R_F -Werte: B/A = 0.00–0.06 (BG), P/NH₃ = 0.00–0.06 (BG), NH₄Cl = 0.00–0.12 (BG), Ci = 0.08–0.14 (BG) und H₂O = 0.00–0.18 (BG).

Nachweis des 4.5-Diamino-uracils (VII): 10 ccm einer frisch bereiteten Reaktionslösung (220°) wurden sofort nach Öffnen des Bombenrohres mit einer Lösung von 50 mg 1.3-Dimethyl-alloxan in 5 ccm Wasser versetzt und 5 Min. unter Rückfluß gekocht. Die hellgelbe Fluoreszenz der Lösung schlug hierbei nach intensiv Grün gelb um. Das gebildete 2.4.6-Trihydroxy-pteridin-carbonsäure-(7)-methylamid (VIII) wurde durch Vergleich mit authent. Material auf papierchromatographischem Wege eindeutig identifiziert.

R_F -Werte: B/A = 0.14 (G), P/NH₃ = 0.08 (G), NH₄Cl = 0.37 (G) und Ci = 0.31 (G).

Darstellung von Pterorhodinanaloga

Die gelbgrün fluoreszierende Reaktionslösung wurde mit der gleichen Menge 0.5 n H₂SO₄ versetzt und unter Durchleiten von Sauerstoff 6 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach etwa 1 Stde. begann die Dunkelfärbung der Lösung und die Abscheidung eines Niederschlages. Nach beendeter Reaktion wurde heiß abgesaugt und nach Waschen mit Wasser bei 110° im Trockenschrank getrocknet. Ausb. 12 mg dunkelvioletter bis schwarzer Kristalle. Man kochte diese mit 10 ccm Wasser auf und filtrierte in der Hitze. Anhaftende Belegsubstanzen wurden dadurch abgetrennt. Ausb. 6.4 mg.

2-Desimino-allopterorhodin (X): Je 1 g 2.4.7-Trihydroxy- (I) und 2.4.7-Trihydroxy-6-methyl-pteridin (II) wurden in 200 ccm konz. Salzsäure auf dem siedenden Wasserbad unter Durchleiten von Sauerstoff 6 Stdn. erhitzt. Während der Reaktion wandelten sich die farblosen Kristalle langsam in rote um. Man saugte nach beendeter Reaktion heiß ab und kochte den Rückstand zur Abtrennung von umgesetztem Ausgangsprodukt mit der 1000fachen Menge Wasser unter Rückfluß. Man saugte heiß ab und trocknete die ziegelrote Substanz bei 110°. Ausb. 0.9 g. Für die Analyse wurde 3 Tage bei 150° in der Trockenpistole über P₂O₅ getrocknet.

C₁₃H₈N₈O₆·H₂O (390.3) Ber. C 40.00 H 2.58 N 28.72 Gef. C 40.12 H 3.08 N 28.85

2-Desimino-isopterorhodin (XI) wurde analog aus je 1 g 2.4.6-Trihydroxy- (III) und 2.4.7-Trihydroxy-6-methyl-pteridin (II) in purpurroten Kristallen erhalten. Ausb. 0.85 g.

C₁₃H₈N₈O₆·H₂O (390.3) Ber. C 40.00 H 2.58 N 28.72 Gef. C 39.60 H 3.02 N 28.85

2-Desimino-pterorhodin (XII) wurde ebenso aus je 1 g 2.4.6-Trihydroxy- (III) und 2.4.6-Trihydroxy-7-methyl-pteridin in dunkelvioletten Kristallen erhalten. Ausb. 1.4 g.

C₁₃H₈N₈O₆·H₂O (390.3) Ber. C 40.00 H 2.58 N 28.72 Gef. C 40.06 H 3.25 N 28.42