

WOLFGANG PFLEIDERER

Pteridine, XXIV¹⁾Über die Isolierung und Struktur des orangeroten Schmetterlingspigmentes „Erythropterin“²⁾

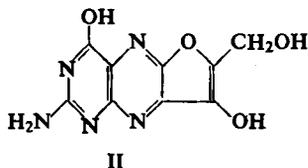
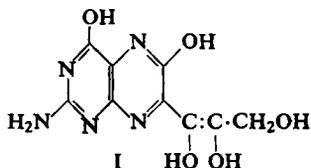
Aus dem Institut für Organische Chemie und Organisch-Chemische Technologie der Technischen Hochschule Stuttgart

(Eingegangen am 28. März 1962)

Das orangerote Flügelpigment Erythropterin konnte erstmals in reiner Form aus *Catopsilia argante* isoliert und seine Konstitution durch alkalische Hydrolyse bzw. Methylierung als Xanthopteryl-(7)-brenztraubensäure erkannt werden. Auf Grund der physikalischen und chemischen Eigenschaften dieses Naturfarbstoffes muß die Seitenkette vollständig enolisiert sein.

Im Jahre 1936 berichteten CL. SCHÖPF und E. BECKER³⁾ erstmals über das rote Schmetterlingspigment Erythropterin, das sie aus den Flügeln des Aurorafalters (*Euchloe cardamines*), des Postillons (*Colias edusa*), des Zitronenfalters (*Gonepteryx rhamni*), der südamerikanischen Pieride *Catopsilia argante* und des javanischen Falters *Appias nero* durch Fraktionieren mit verd. Salzsäure erhalten konnten. Auf Grund der wenig übereinstimmenden Analysenwerte der einzelnen Fraktionen sowie der Unkenntnis des Grundgerüsts der natürlichen Pteridine zur damaligen Zeit überhaupt, konnte das Produkt nur durch die Beschreibung verschiedener Eigenschaften, von denen vor allem der relativ niedrige Stickstoffgehalt, der saure Charakter sowie die rote bzw. orangerote Farbe besondere Beachtung verdienen, charakterisiert werden.

Der erste Konstitutionsvorschlag (I) für das Erythropterin, der sich auf Elementaranalysen des Sulfats und Perchlorats sowie auf einer oxydativen Abbaureaktion gründete, stammt von R. PURRMANN und F. EULITZ⁴⁾.



Obwohl durch die anschließend von R. TSCHESCHE und F. KORTE⁵⁾ durchgeführten Synthesen diese Struktur bestätigt zu sein schien, ließ der negativ verlaufene Nachweis⁶⁾

1) XXIII. Mittel.: W. PFLEIDERER und F. REISSER, Chem. Ber. **95**, 1621 [1962].

2) Vorgetragen auf der Hauptversammlung der GDCh am 18.–23. Sept. 1961 in Aachen; W. PFLEIDERER, Angew. Chem. **73**, 581 [1961].

3) Liebigs Ann. Chem. **524**, 49 [1936].

4) Liebigs Ann. Chem. **559**, 169 [1948].

5) Chem. Ber. **84**, 77 [1951].

6) R. TSCHESCHE und H. BARKEMEYER, Chem. Ber. **88**, 976 [1955].

der Endiol-Gruppierung erkennen, daß das Erythropterin doch kein 7-[1.2.3-Trihydroxy-propenyl]-xanthopterin (I) sein konnte.

Weitere Untersuchungen⁷⁾ führten schließlich zu der Feststellung, daß das Erythropterin aller Wahrscheinlichkeit nach ein Furanopteridin-Derivat darstellt, dem auf Grund des Syntheseweges sowie der Elementaranalyse die Struktur II zukommen soll. Da nach Angaben der Autoren⁷⁾ auch die Identität von synthetisiertem und natürlichem Material durch die übereinstimmenden UV-Absorptionsspektren, R_F -Werte und Fluoreszenzerscheinungen eindeutig gesichert war, konnte man den Eindruck gewinnen, als sei das Erythropterin-Problem gelöst.

Die Tatsache jedoch, daß hier ein Produkt als Erythropterin beschrieben wird, dessen physikalische Daten verschiedene Widersprüche in sich tragen, ließ uns an der Richtigkeit der neueren Untersuchungen zweifeln. Unverständlich ist vor allem, daß die Substanz einerseits rote Farbe besitzt, andererseits aber eine blaue Fluoreszenz zeigt und die langwelligste Absorptionsbande bei 350 $m\mu$ aufweist, während SCHÖPF und BECKER⁸⁾ bei ihrem bestimmt nicht einheitlichen Präparat immerhin schon ein Absorptionsmaximum bei 450 $m\mu$ gefunden haben.

Diese Diskrepanz veranlaßte uns zu einer nochmaligen eingehenden Untersuchung. Als Ausgangsmaterial stand uns eine größere Menge Schmetterlingsflügel der südamerikanischen Pieride *Catopsilia argante* zur Verfügung. Papierchromatographische Untersuchungen ergaben, daß in den Flügeln neben den bereits bekannten Pigmenten Xanthopterin, Isoxanthopterin, Leukopterin und Isoguanin noch eine nicht zu übersehende orangefarbene Komponente zugegen war, die, wenn es das Erythropterin überhaupt gab, den gesuchten Flügelfarbstoff darstellen mußte.

Für die Abtrennung des Erythropterins von den übrigen Flügelpigmenten versuchten wir zunächst chromatographische und papierelektrophoretische Methoden, da wir uns durch die gute Trennung auf dem Papier hiervon einen Erfolg versprachen. Als sich jedoch zeigte, daß beim Arbeiten mit etwas größeren Substanzmengen der erhoffte Trenneffekt ausblieb, haben wir den Weg von SCHÖPF und BECKER³⁾ eingeschlagen und ihn für die Isolierung des Erythropterins etwas modifiziert. Nach Extraktion der Flügel mit 0.1 n Ammoniak wurde das orangefarbene Filtrat sofort in 1 n H_2SO_4 eingetropft, da sich das Erythropterin beim Stehenlassen mit Ammoniak verändert. Der abgeschiedene Niederschlag, der hauptsächlich aus den schwach basischen Pteridinen bestand, während das Isoguanin und ein großer Teil des Xanthopterins in Lösung blieben, wurde dann mit 0.5-proz. Pyridinlösung behandelt. Das Erythropterin ging hierbei in Lösung und wurde durch Ansäuern wieder abgeschieden. Umkristallisation aus 0.5 n HCl und Wasser ergab ein mikrokristallines orangefarbenes Kristallpulver.

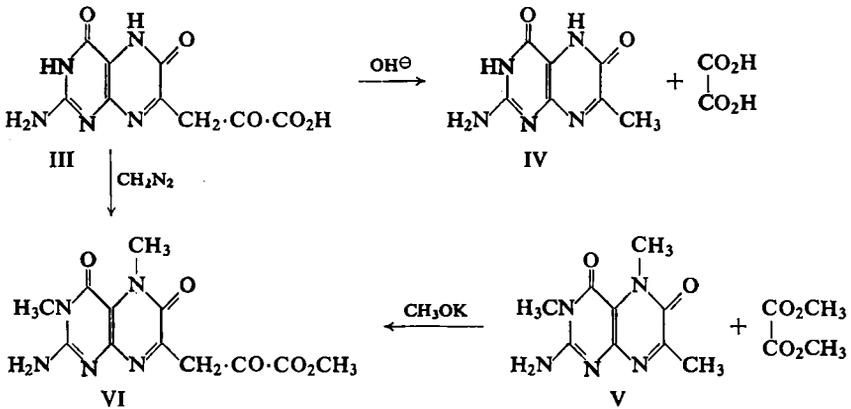
Bei der Aufarbeitung hat sich gezeigt, daß neben der papierchromatographischen Verfolgung des Prozesses die Charakterisierung sämtlicher Fraktionen durch ein UV-Absorptionsspektrum unerläßlich ist. Nur so kann die Anreicherung des Erythropterins messend verfolgt werden, während man aus dem Fluoreszenzverhalten keine Auskunft über die prozentuale Zusammensetzung der Gemische erhält.

⁷⁾ R. TSCHESCHE und H. ENDE, Chem. Ber. 91, 2074 [1958].

⁸⁾ Liebigs Ann. Chem. 524, 64 [1936].

Die Elementaranalyse des reinen Produkts lieferte Prozentzahlen, die sehr gut mit der Summenformel $C_9H_9N_5O_6$ übereinstimmten. Die Strukturaufklärung dieser Substanz begannen wir mit der spektrophotometrischen Bestimmung ihrer pK-Werte. Aus den Werten 2.45, 7.95 und 10.00 war zu ersehen, daß das Erythropterin entweder schwach basische oder aber, worauf schon SCHÖPF und BECKER³⁾ hinwiesen, relativ stark saure Eigenschaften besitzen muß. Aufschluß hierüber gaben papier-elektrophoretische Untersuchungen in Pufferlösungen von verschiedenem pH-Wert. Da das Erythropterin selbst bei pH 3 noch sehr stark zur Anode wandert und der isoelektrische Punkt erst bei etwa pH 1 liegt, war erstmals eindeutig bewiesen, daß dieses Pteridin-Derivat eine Säure darstellt und der erste pK-Wert von 2.45 das Gleichgewicht Neutralkmolekül zu Monoanion beherrscht.

Klarheit über die Struktur des Erythropterins brachte sein alkalischer Abbau mit $2n$ NaOH bei Raumtemp. zu 7-Methyl-xanthopterin (IV) und Oxalsäure. Vereinigt man diese beiden Moleküle, so kommt man zur Xanthopteryl-(7)-brenztraubensäure (III), die mit 1 Mol. Kristallwasser der gefundenen Summenformel des Erythropterins genügt.

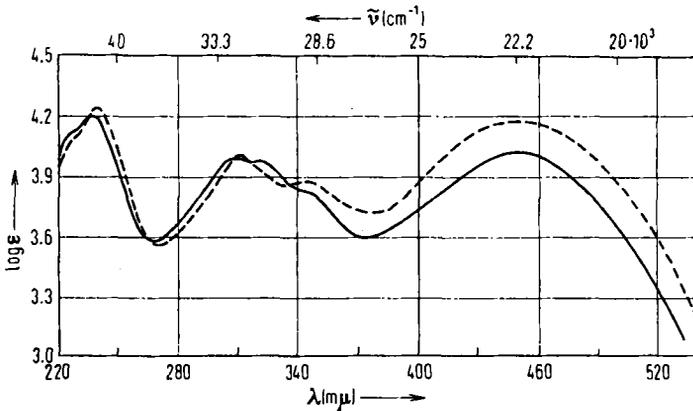


Den eindeutigen Strukturbeweis für die Konstitution III führten wir in der Weise, daß wir einmal das durch Dimethylsulfat/Alkali-Methylierung aus 3.7-Dimethyl-xanthopterin dargestellte 3.5.7-Trimethyl-xanthopterin (V) einer Claisen-Kondensation mit Oxalsäure-dimethylester unterwarfen und zum anderen das Erythropterin (III) durch Diazomethan methylierten. Aus beiden Reaktionen resultierte der orangefarbene 3.5-Dimethyl-xanthopteryl-(7)-brenztraubensäure-methylester (VI). Die Identität beider Produkte wurde durch Papierchromatogramme, UV-Spektren und Mischschmelzpunkte gesichert.

Beweisend für die übereinstimmenden Konstitutionen von Erythropterin (III) und seinem Trimethylderivat (VI) sind auch die UV-Absorptionsspektren der Neutralkmoleküle beider Verbindungen (Abbild. 1).

Die gleichartigen Kurvenverläufe bringen ferner zum Ausdruck, daß die beiden Säureamidgruppierungen in III in der energetisch begünstigten *l*-actamform vorliegen. Eine plausible Erklärung für die langwellige Absorption, die der orangefarbenen Farbe des Erythropterins entsprechend bei $450 \text{ m}\mu$ liegt, kann die einfache Formulierung

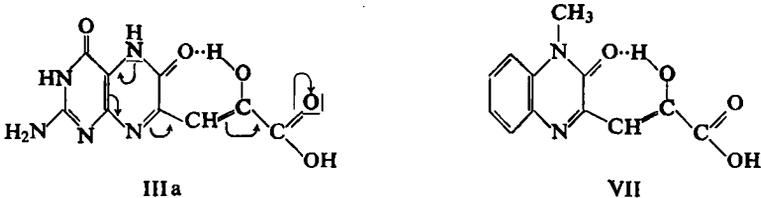
im Sinne von III allerdings nicht geben. Nimmt man jedoch an, daß die Seitenkette enolisiert ist, wobei die Enolform durch eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe in 6-Stellung stabilisiert ist, so läßt sich unschwer erkennen, daß der



Abbild. 1

UV-Absorptionsspektren der Neutramoleküle des Erythropterins (III) (pH 1,0) ——— und des 3,5-Dimethyl-xanthopteryl-(7)-brenztraubensäure-methylesters (VI) (pH 3,0) - - -

im 7-Methyl-xanthopterin (IV) vorliegende und bei 375 m μ absorbierende Chromophor eine wesentliche Verlängerung erfahren hat und sich nunmehr vom N-5-Atom bis zur Carbonylgruppe erstrecken dürfte. Mit der Struktur IIIa stehen somit sämtliche physikalischen und chemischen Eigenschaften des Erythropterins in Einklang.



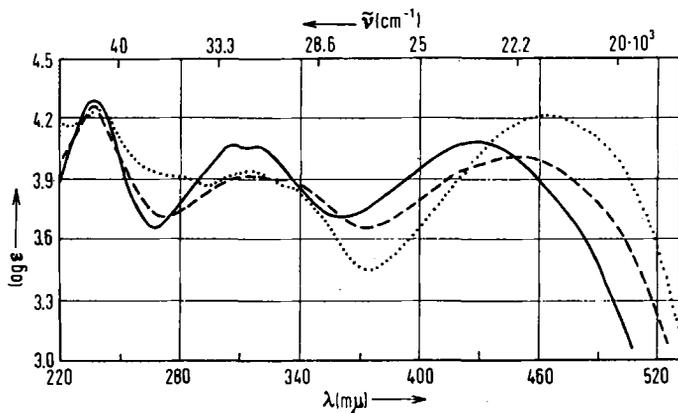
Auch die UV-Absorptionsspektren des Mono-, Di- und Trianions von IIIa zeigen in der langwelligen Bande die erwarteten Verschiebungen, denn nach Abdissoziation des Protons von der Carbonylgruppe beobachtet man infolge der bevorzugten Eigenmesomerie der Carboxylatgruppierung⁹⁾ eine Hypsochromie, die beim Übergang zum Di- und Trianion von einer Bathochromie abgelöst wird (Abbild. 2).

Als Bestätigung für den formulierten Erythropterin-Chromophor kann das optische Verhalten der 1-Methyl-2-oxo-dihydrochinoxalyl-(3)-brenztraubensäure¹⁰⁾ (VII) gewertet werden. Diese ist orangerot, besitzt im Bereich von 430–460 m μ eine starke Absorptionsbande, die im Monoanion hypsochrom verschoben ist (Abbild. 3), und weist erwartungsgemäß einen dem Erythropterin entsprechenden aciden Charakter auf (Tab. 1).

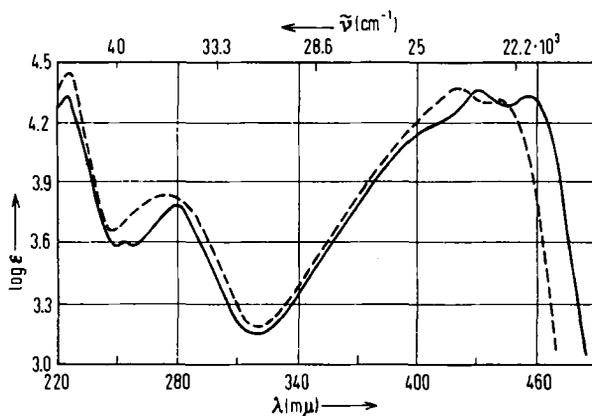
⁹⁾ W. PFLEIDERER und M. RUKWIED, Chem. Ber. **95**, 1591 [1962].

¹⁰⁾ A. H. COOK und R. F. NAYLOR, J. chem. Soc. [London] **1943**, 397.

Versucht man abschließend, die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen über das Erythropterin unter dem Gesichtspunkt der nun gefundenen Tatsachen erneut zu analysieren, so kommt man trotz des Fehlens der authentischen Materialien an



Abbild. 2. UV-Absorptionsspektren des Monoanions (pH 5.0) ———, Dianions (pH 9.0) - - - - und Trianions (pH 13.0) ····· des Erythropterins (III a)



Abbild. 3. UV-Absorptionsspektren des Neutramoleküls der 1-Methyl-2-oxo-dihydrochin-oxalyl-(3)-brenztraubensäure (VII) (pH 0.0) ——— und seines Monoanions (pH 5.0) - - - -

Hand der publizierten Daten und auf Grund verschiedener Nacharbeitungen zu folgendem Resümee: Die Produkte von SCHÖPF und BECKER³⁾ stellen angereicherte Erythropterinfraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung dar. Das Erythropterin von PURMANN und EULITZ⁴⁾ dürfte gemäß der Isolierungsvorschrift die bislang reinste Substanz gewesen sein, während die synthetischen Produkte von TSCHESCHE und Mitarbb.^{5,7)} sowie das aus *Mycobacterium lacticola* isolierte Pteridin¹¹⁾ nichts mit dem Flügelpigment gemein haben. Das Vorkommen von Erythropterin in Tuberkelbazillen¹²⁾ ist sehr wahrscheinlich, und sein Auftreten als Augenpigment in *Ephe-*

¹¹⁾ R. TSCHESCHE und F. VESTER, Chem. Ber. 86, 454 [1953].

¹²⁾ M. O'L. CROWE und A. WALKER, Science [New York] 110, 166 [1949].

Tab. 1. Physikalische Daten von Pteridinen und Chinoxalinen

	pK-Werte in Wasser (20°) Streuung	UV-Absorptionsspektren			pH-Wert	Molekülart
		λ_{\max} (m μ)	$\log \epsilon_{\max}$			
IV	2.17 \pm 0.07	231 265	358	4.13 4.04	3.87	Kation +
	7.56 \pm 0.1	233 277	375	4.18 4.11	3.76	Neutralmol. 0
	9.60 \pm 0.1	232 270	378	4.14 4.10	3.86	Monoanion —
		252 [270]	382	4.23 [4.04]	3.93	Dianion —
V	2.0	234 264	362	4.11 3.96	3.86	+ —
		232 278	386	4.17 4.12	3.71	0
IIIa	2.45 \pm 0.1	238 306 319 [340]	450	4.20 3.98 3.97 [3.84]	4.02	0
	7.95 \pm 0.1	239 309 319	430	4.29 4.07 4.06	4.08	—
	10.00 \pm 0.1	236 314 330 451		4.26 3.92 3.91 4.11	9.0	—
		238 [274] 317 [334] 470		4.24 [3.92] 3.93 3.86 4.21	13.0	Trianion —
VI		240 309	344 450	4.25 4.00	3.88 4.16	0
VI ⁽¹⁰⁾	2.67 \pm 0.1	224 254 280 [410]	431 457	4.33 3.60 3.79 [4.19]	4.36 4.33	0
		225 275	420 443	4.45 3.85	4.36 4.31	—
		224 266	[409] 428 453	4.41 3.83	[4.27] 4.39 4.30	0
		223 268	[406] 427 452	4.40 3.84	[4.28] 4.44 4.38	0

1-Methyl-2-oxo-dihydro-
chinoxalyl-(3)-brenztraubensäure-
äthylester⁽¹⁰⁾

[] Schulter

Tab. 2. R_F -Werte von Pteridinen und Chinoxalinen

	n-Butanol/5 n Essigsäure (2:1)		n-Propanol/1-proz. NH ₃ (2:1)		4-proz. Natriumcitrat		3-proz. NH ₄ Cl	
	R_F	254 m μ 365 m μ	R_F	254 m μ 365 m μ	R_F	254 m μ 365 m μ	R_F	254 m μ 365 m μ
IV	0.12	BG BG	0.11	BG BG	0.32	BG BG	0.30	BG BG
V	0.49	Gl Gl	0.58	G G	0.54	Gl Gl	0.57	G G
IIIa	0.03 ^{a)}	O O	0.02	O O	0.15	O O	0.18	O O
VI	0.40	O O	0.16	O O	0.25	O O	0.18	O O
VII	0.33	GrüG GrüG	0.41	GrüG GrüG	0.35	GrüG GrüG	0.37	GrüG GrüG
1-Methyl-2-oxo-dihydro- chinoxalyl-(3)-brenztraubensäure- äthylester Vergleichssubstanz:	0.70	B B	0.50	B B	0.50	B B	0.60	B B
1.3.6-Trimethyl-7-hydroxy- 2.4-dioxo-tetrahydropteridin	0.85	GrüG GrüG	0.82	GrüG GrüG	0.24	GrüG GrüG	0.25	GrüG GrüG

Absteigende Methode auf Schleicher & Schüll-Papier 2043b Gl. Beim Bestrahlen mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ m μ bzw. $\lambda = 365$ m μ beobachtet man folgende Fluoreszenzfärbungen: BG = blaugrau, B = blau, G = gelb, Gl = gelblich, GrüG = grüngelb und O = orange.

a) Am Startpunkt bleibt ein roter Fleck sitzen, da sich in diesem System ein Pterorhodin-Analoges bildet

stia kühniella Zeller¹³⁾ konnte nach Bekanntwerden unserer Arbeit eindeutig gesichert werden.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. CL. SCHÖPF, Darmstadt, möchte ich auch an dieser Stelle für die freundliche Überlassung der kostbaren Schmetterlingsflügel, die von ihm seinerzeit mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft beschafft werden konnten, recht herzlich danken. Ferner gilt mein Dank der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für die Unterstützung dieser Arbeit, der chem.-techn. Assistentin Fr. I. FINK für die Bestimmung der physikalischen Daten und Herrn H. FROHOFER vom Organisch-Chemischen Institut der Universität Zürich für die C,H,N-Mikrobestimmung des Erythropterins.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Isolierung von Erythropterin (IIIa): Die Aufarbeitung wurde papierchromatographisch und die Anreicherung des Erythropterins durch UV-spektrophotometrische Bestimmungen verfolgt. Jeweils 0.5 mg jeder Fraktion wurden in 50 ccm 0.1 *n* NaOH gelöst und das UV-Spektrum aufgenommen. Die ϵ -Werte der charakteristischen Absorption bei 470 μ geben Auskunft über den Gehalt an Erythropterin.

35 g Schmetterlingsflügel der südamerikanischen Pieride *Catopsilia argante* wurden im Soxhlet mit Äther entfettet. Anschließend übergießt man mit 1.5l siedendem Äthanol, knetet gut durch und saugt dann ab. Die alkoholfuchten Flügel wurden zu 700 ccm 0.1 *n* Ammoniak in den Starmix gegeben und hier im Laufe von 2 Min. zerkleinert. Man saugte durch eine große Nutsche ab. Das orangefarbene Filtrat wurde sofort in 500 ccm eisgekühlte 1 *n* H₂SO₄ unter Rühren eingetropft. Den Filtrerrückstand behandelte man erneut mit 500 ccm 0.1 *n* Ammoniak im Starmix und tropfte nach Absaugen das Filtrat zur 1 *n* H₂SO₄. Nach 2 Stdn. wurde der abgeschiedene Niederschlag abzentrifugiert, mit Wasser und Äthanol gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren im Vakuumexsikkator über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 3.2 g ($\epsilon_{470} = 0.070$).

Die 3.2 g wurden in einer Reibschale mit 100 ccm einer 50° warmen 0.5-proz. Pyridinlösung übergossen und fein pulverisiert. Die orangefarbene Lösung wurde dekantiert und der Rückstand noch 4mal mit jeweils 100 ccm 0.5-proz. Pyridinlösung in gleicher Weise behandelt. Danach wurden die Extraktionslösungen und der ungelöste Rückstand vereinigt und noch 30 Min. bei 50° Wasserbadtemp. gerührt. Man zentrifugierte, dekantierte die orangefarbene Lösung ab und säuerte nach erneutem Erwärmen auf 50° mit 5 *n* HCl bis pH 0 an. Es schied sich ein roter Niederschlag ab, der sich beim Abkühlen und 4stdg. Aufbewahren im Eisschrank vermehrte. Man saugte anschließend ab, wusch mit Wasser, Äthanol und Äther und trocknete das mikrokristalline Pulver im Vakuumexsikkator über P₂O₅. Ausb. 362 mg ($\epsilon_{470} = 0.230$).

Das Roherythropterin (362 mg) wurde dann mit 100 ccm siedender 1 *n* HCl übergossen, kurz zum Sieden erhitzt, heiß filtriert und das Filtrat sofort in den Eisschrank gestellt. Nach 4 Stdn. wurde der abgeschiedene dunkelrote Niederschlag abgesaugt, gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Ausb. 136 mg ($\epsilon_{470} = 0.443$).

Zur weiteren Reinigung wurde aus 50 ccm siedender 0.5 *n* HCl umkristallisiert, von wenig Ungelöstem abfiltriert und das Filtrat 4 Stdn. in den Eisschrank gestellt. Der abgesaugte, gewaschene und getrocknete mikrokristalline rote Niederschlag wog 80 mg ($\epsilon_{470} = 0.520$).

Die 80 mg Erythropterin wurden mit 80 ccm siedendem Wasser versetzt, zum Sieden erhitzt und nach Zugabe einer Spatelspitze Aktivkohle filtriert. Dem orangefarbenen Filtrat setzte man 5 Tropfen 1 *n* HCl zu. Im Eisschrank schied sich ein orangefarbenes mikrokristallines Pulver ab,

¹³⁾ M. VISCONTINI und H. STIERLIN, Helv. chim. Acta 44, 1783 [1961].

das nach 5 Stdn. abgesaugt wurde. Man wusch wieder mit Wasser, Äthanol und Äther und trocknete 3 Tage über P_2O_5 im Vakuumexsikkator und anschließend noch 3 Stdn. bei 100° . Ausb. 54 mg ($e_{470} = 0.578$).

$C_9H_7N_5O_3 \cdot H_2O$ (283.2) Ber. C 38.17 H 3.20 N 24.73 Gef. C 38.16 H 3.73 N 25.08

Aus den Filtraten der Umkristallisationen konnte man durch Einengen Roherythropterinfractionen zurückgewinnen.

Tab. 3. Weitere R_F -Werte des Erythropterins auf Papier Schleicher & Schüll 2043 b G1. Absteigende Methode, Temp. 20°

System	R_F -Wert	Laufzeit (Stdn.)
n-Propanol/4-proz. Natriumcitrat (1:2)	0.54 (O)	15
n-Butanol/Äthanol/Wasser (2:2:1)	0.00 (O)	15
4-proz. Ammoniumacetat	0.17 (O)	6
4-proz. Dinatriumphosphat	0.20 (O)	6
4-proz. Natriumhydrogencarbonat	0.27 (O)	6
4-proz. Dinatriumphosphat, gesättigt mit n-Butanol	0.26 (O)	8

Beim Bestrahlen mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254 \mu$ und 365μ beobachtet man eine orangefarbene Fluoreszenz (O), die bei geringer Konz. gelb erscheint.

Alkalischer Abbau des Erythropterins: 11 mg Erythropterin wurden in 2 ccm $2N$ NaOH bei Raumtemp. gelöst. Nach 24stdg. Aufbewahren hatte sich die anfänglich dunkelorange-farbene Lösung nach schwach rötlich aufgehellt. Man erhitzte zum Sieden und säuerte heiß mit Eisessig an. Es schied sich ein Niederschlag ab, der nach Abkühlen abgesaugt und getrocknet wurde. Ausb. 6.6 mg bräunlich-gelbes Kristallpulver. Das Produkt enthielt auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen Spuren Pterorhodin, sehr wenig Xanthopterin-carbonsäure (durch oxydative Hydrolyse gebildet) und 7-Methyl-xanthopterin (IV) als Hauptkomponente. Eine Unterscheidung zwischen Xanthopterin und 7-Methyl-xanthopterin, die in den meisten Systemen dieselben R_F -Werte zeigen, gelang in einem Gemisch n-Propanol/konz. NH_3 /Wasser (4:1:3). Zur eindeutigen Charakterisierung von IV lösten wir 2 mg Reaktionsprodukt in wenigen Tropfen verd. Ammoniak und chromatographierten nach Auftragen auf vier 18 cm breite Papierstreifen in 4-proz. Natriumcitrat.

Die blaugrau fluoreszierenden Bänder, R_F 0.30–0.35, wurden ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und dann durch Gefriertrocknung eingeengt. Vom Rückstand wurde ein UV-Spektrum bei pH 5.0 aufgenommen. Die Absorptionsmaxima bei 233, 277 und 375μ und ihr Extinktionsverhältnis stimmten mit den Werten eines authent. Materials vollkommen überein.

Zum Nachweis der bei der Hydrolyse entstehenden Oxalsäure wurde das essigsäure Reaktionsfiltrat mit Calciumchloridlösung versetzt. Der abgeschiedene typische Calciumoxal-niederschlag war mit dem in einem Blindversuch gleicher Konzentration hergestellten Niederschlag auch unter dem Mikroskop identisch.

3.5.7-Trimethyl-xanthopterin (V)¹⁴⁾

a) 0.46 g Natriumsalz des 3.7-Dimethyl-2-amino-4.6-dioxo-tetrahydropteridins¹⁵⁾ wurden in 40 ccm Methanol gelöst, mit 4 g Methyljodid versetzt und 4 Stdn. auf dem Wasserbad unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde i. Vak. zur Trockne eingeengt und der Rückstand aus 50 ccm Wasser unter Zusatz von Aktivkohle umkristallisiert. Ausb. 0.35 g gelbe Nadelchen, Schmp. ab 280° unter langsamer Zersetzung.

¹⁴⁾ Mitbearb. von M. RUKWIED, Dissertat. Techn. Hochschule Stuttgart 1958.

¹⁵⁾ W. PFLIEDERER und M. RUKWIED, Chem. Ber. 94, 12 [1961].

b) 0.46 g Natriumsalz des *3.7-Dimethyl-2-amino-4.6-dioxo-tetrahydropteridins* wurden in 30 ccm Wasser unter Zugabe einiger Tropfen $2n$ NaOH gelöst. Man tropfte bei 25° 0.5 ccm *Dimethylsulfat* unter Rühren zu und hielt den pH nach Absinken durch vorsichtige Zugabe von $1n$ NaOH auf 8. Man methylierte bei diesem pH zu Ende. Nach 1 Stde. wurde der gelbe Niederschlag abgesaugt. Ausb. 0.3 g gelbe Nadelchen (aus Wasser oder Äthanol), Schmp. wie bei a).

$C_9H_{11}N_5O_2$ (221.1) Ber. C 48.86 H 5.01 N 31.66 Gef. C 49.31 H 5.55 N 31.43

3.5-Dimethyl-2-amino-4.6-dioxo-tetrahydropteridyl-(7)-brenztraubensäure-methylester (VI)

a) Der Lösung von 1.5 g Kalium in 30 ccm absol. Methanol setzte man 1.1 g *Oxalsäure-dimethylester* und dann 0.65 g *3.5.7-Trimethyl-xanthopterin(V)* zu. Nach kurzer Zeit schied sich ein gallertiger Niederschlag ab. Nach 1 tägigem Stehenlassen bei Raumtemp. gab man 10 ccm Methanol zu, schüttelte gut um und bewahrte weitere 24 Stdn. bei Raumtemp. auf. Danach säuerte man mit $1n$ HCl bis pH 1 an. Der abgeschiedene Niederschlag löste sich anfänglich auf und schied sich im sauren Gebiet in orangeroten Kristallen wieder ab. Ausb. 0.7 g nach Absaugen, Waschen mit Wasser und Äther und Trocknen bei 80° . 0.2 g hiervon wurden mit 20 ccm Wasser zum Sieden erhitzt und dann abkühlen lassen. Der abgeschiedene Niederschlag wurde aus viel Wasser und schließlich aus Methanol mit Aktivkohle umkristallisiert. Ausb. 37 mg orangerote Nadeln vom Schmp. 248° (Zers.).

$C_{12}H_{13}N_5O_5 \cdot H_2O$ (325.3) Ber. C 44.31 H 4.65 N 21.53 Gef. C 44.12 H 4.55 N 21.87

b) Die Suspension von 14 mg feingepulvertem *Erythropterin* in 5 ccm Methanol versetzte man langsam tropfenweise mit verdünnter äther. *Diazomethan-Lösung*, bis die Gasentwicklung aufhörte. Überschüss. Diazomethan bewirkte eine zu weitgehende Methylierung. Nach 30 Min. wurde der ungelöste Niederschlag abgesaugt und aus relativ viel Wasser umkristallisiert. Ausb. 2.1 mg orangerote Nadeln vom Schmp. $246-247^{\circ}$ (Zers.). Die Substanz zeigte keine Schmelzpunktsdepression mit obiger Verbindung und wies dieselben R_F -Werte, das gleiche Fluoreszenzverhalten und ein identisches UV-Absorptionsspektrum auf.