

14. Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*.

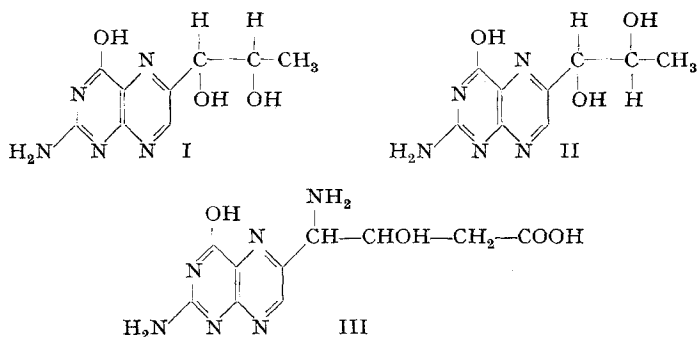
7. Mitteilung.

Synthese und Eigenschaften des *L-erythro*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridins und des *D-threo*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridins

von M. Viscontini und H. Raschig.

(10. XII. 57.)

1955 beschrieben *E. L. Patterson et al.* die Isolierung eines Polyhydroxy-pteridins aus menschlichem Harn, welches sie Biopterin nannten; sie schrieben diesem Produkt die Formel I eines *L-erythro*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridins zu¹⁾. Ausgehend von *L*-Rhamnose bewiesen sie gleichzeitig die Richtigkeit dieser Struktur durch die Synthese des Pteridins I.



Zur gleichen Zeit isolierten *H. S. Forrest & H. K. Mitchell*²⁾ aus *Drosophila melanogaster* ein Pteridin FL4A, welchem sie, nach Vergleich mit dem ebenfalls aus *L*-Rhamnose synthetisierten Pteridin I, die gleiche Konstitution zuschrieben.

Kurz vorher hatten wir selbst aus *Drosophila melanogaster* ein blau fluoreszierendes Pteridin HB₂ isoliert³⁾, dessen Identität mit dem Pteridin FL4A von *Forrest & Mitchell* sichergestellt scheint. Wir hatten die Möglichkeit, einige Milligramme dieses Produktes zu erhalten; für dieses könnte u. a. entweder eine Formel der 4 isomeren *D-erythro*-, *L-erythro*-, *D-threo*- oder *L-threo*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridine oder aber die Struktur einer der 4 iso-

¹⁾ *E. L. Patterson, H. P. Broquist, A. M. Albrecht, M. H. von Saltza & E. L. R. Stokstad*, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3167 (1955); *E. L. Patterson, M. H. von Saltza & E. L. R. Stokstad*, *ibid.* **78**, 5871 (1956); *E. L. Patterson, R. L. Milstrey & E. L. R. Stokstad*, *ibid.* **78**, 5868 (1956).

²⁾ J. Amer. chem. Soc. **77**, 4865 (1955).

³⁾ *M. Viscontini, M. Schoeller, E. Loeser, P. Karrer & E. Hadorn*, Helv. **38**, 397 (1955); *M. Viscontini, E. Loeser, P. Karrer & E. Hadorn*, Helv. **38**, 1222 (1955); *M. Viscontini, E. Loeser, P. Karrer & E. Hadorn*, Helv. **38**, 2034 (1955).

meren D-*erythro*-, L-*erythro*-, D-*threo*- oder L-*threo*-2-Amino-6-hydroxy-pteridin-8-(4-amino-3-hydroxy-buttersäuren) (III) in Erwägung gezogen werden. Wir haben daher HB₂ mit einigen synthetisch hergestellten Verbindungen verglichen. In dieser Mitteilung beschreiben wir Synthese und Eigenschaften des L-*erythro*-Pteridins I und des D-*threo*-Pteridins II.

Für die Synthese des L-*erythro*-Pteridins I haben wir die schon beschriebene Methode von *Forrest & Mitchell* angewandt. Das erhaltene Rohprodukt, welches neben I L-*erythro*-2-Amino-6-hydroxy-9-dihydroxypropyl-pteridin und andere Begleitstoffe enthält, wurde auf einer Papierpulversäule mehrmals chromatographiert. Auf diese Weise konnte I nach Umkristallisation analysenrein erhalten werden.

Die chemischen Eigenschaften dieses Produktes stimmen im ganzen mit den von den amerikanischen Autoren ¹⁾²⁾ beschriebenen überein. Das Pteridin I verbraucht für seine Oxydation 1 Mol Perjodsäure, und es bildet sich 1 Mol Acetaldehyd, welchen man durch sein p-Nitrophenyl-hydrason charakterisiert hat. Die alkalische Oxydation mit KMnO₄ liefert die Pteridin-8-carbonsäure. Letztere enthält, wenn sie aus weniger reinem Pteridin hergestellt wurde, Spuren von Pteridin-9-carbonsäure, welche von der Oxydation des gleichzeitig entstandenen L-*erythro*-9-Dihydroxypropyl-pteridins herrühren. Die durch eine spektrophotometrische Methode bestimmten pK betragen 2,40 und 7,77⁴⁾. Die polarimetrischen Dispersionskurven in alkalischen und sauren Lösungen sind in Fig. 4 wiedergegeben. Die spezifischen Drehungen sind folgende: $[\alpha]_D^{22} = -29^\circ$ (0,1-n. HCl, c = 0,95) und $[\alpha]_D^{22} = -32^\circ$ (0,2-n. NaOH, c = 0,94). *Patterson et al.*¹⁾ geben in ihrer Arbeit $[\alpha]_D^{26} = -52^\circ$ (0,1-n. HCl, c = 0,54) an.

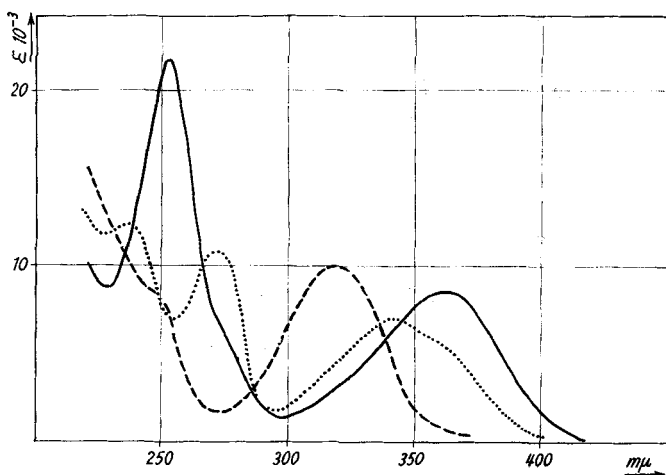


Fig. 1.

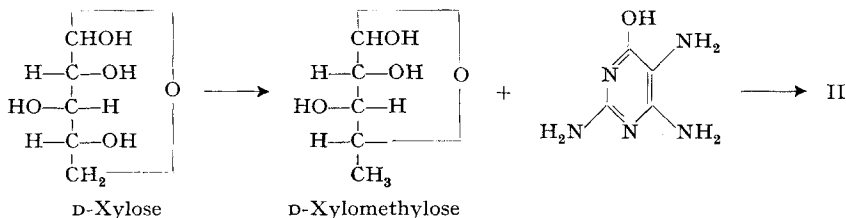
Spektren des L-*erythro*-2-Amino-5-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridins.

----- pH 1,2 6,0 ——— 12,0

⁴⁾ Die detaillierten Messungen der Spektren bei verschiedenen pH werden in der Dissertation von Herrn H. Raschig publiziert.

Das synthetische Pteridin I ist, wie alle von uns studierten Pteridine mit polyhydroxylierten Ketten, photolabil. Von den Abbauprodukten der Photooxydation haben wir die Pteridin-8-carbonsäure isoliert, die wir durch ihr UV.-Spektrum und die Rf-Werte in den üblichen Lösungsmitteln identifiziert haben.

Für die Synthese des *D-threo*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridins (II) sind wir von *D*-Xylose ausgegangen und haben dabei folgenden Weg beschritten:



Wir konnten für die Synthese der *D*-Xylomethylose die Angaben von *Levene* und Mitarb. benutzen, die dieses Produkt schon erhalten haben⁵⁾. Die Kondensation mit Triamino-hydroxy-pyrimidin sowie die Reinigung erfolgen unter den gleichen Bedingungen wie beim Pteridin I. Die chemischen Eigenschaften des so erhaltenen Pteridins II sind denjenigen des Pteridins I sehr ähnlich. Es scheint jedoch, dass seine Photolabilität kleiner ist; wir glauben aber, dass nur präzise quantitative Experimente zeigen würden, ob die vicinalen Hydroxygruppen in *threo*-Konfiguration beständiger sind als in *erythro*-Stellung. Die IR.-Spektren beider Pteridine zeigen nur kleine Abweichungen (Fig. 2 und 3),

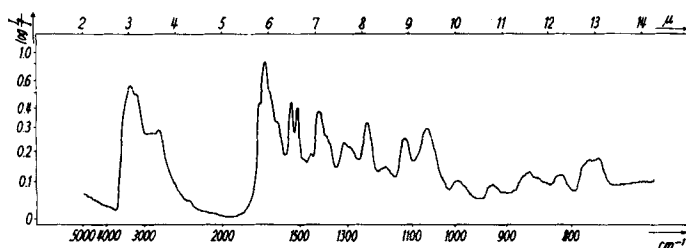


Fig. 2.

IR.-Spektrum des *L-erythro*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridins.

die Rotations-Dispersionskurven jedoch sind ganz verschieden (Fig. 4). Wir haben folgende spezifische Drehungen gemessen:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -56^\circ \text{ (0,1-n. HCl, } c = 0,89); \quad [\alpha]_{\text{D}}^{22} = -63^\circ \text{ (0,2-n. NaOH, } c = 1,0)$$

Der grösste Unterschied zwischen I und II besteht jedoch in ihrer biologischen Wirkung. Betrachtet man im Wachstumstest des Protozoons *Crithidia fasciculata*¹⁾ die Wirkung des *L-erythro*-2-Amino-6-hydroxy-8-trihydroxypropyl-pteridins als 100%, so erreicht das *L-erythro*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxy-

⁵⁾ P. A. Levene & A. L. Raymond, J. biol. Chem. **102**, 317 (1933); P. A. Levene & J. Compton, *ibid.* **111**, 325, 335 (1935).

propyl-pteridin (I) eine Aktivität von 100%, das *D-threo*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridin (II) hingegen nur eine solche von 0,5%.

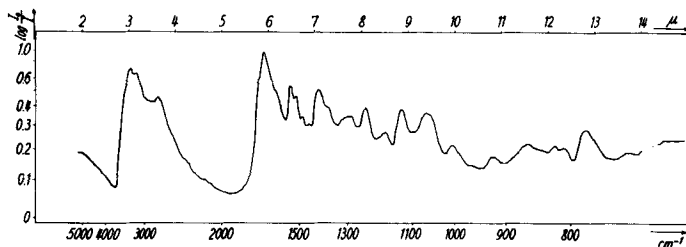


Fig. 3.

IR.-Spektrum des *D-threo*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridins.

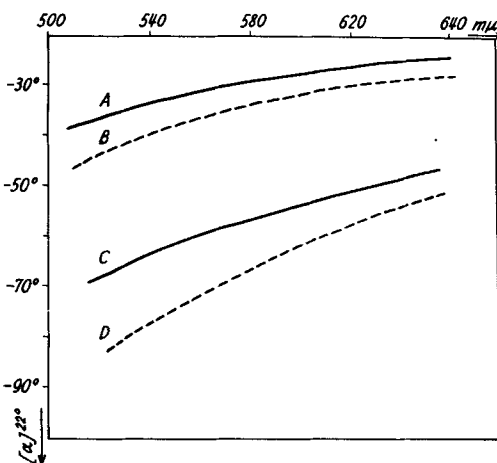


Fig. 4.

Rotations-Dispersionskurven ($[\alpha]^{22}$: spezifische Drehung).

- A *L-erythro*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridin; $c = 0,95$ (0,1-n. HCl).
- B *L-erythro*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridin; $c = 0,94$ (0,2-n. NaOH).
- C *D-threo*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridin; $c = 0,89$ (0,1-n. HCl).
- D *D-threo*-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridin; $c = 1,0$ (0,2-n. NaOH).

Dr. E. L. R. Stokstad und Dr. Kidder hatten die Freundlichkeit, die *Crithidia fasciculata*-Teste in den Laboratorien der *American Cyanamide Company* durchzuführen. Wir möchten ihnen an dieser Stelle recht herzlich danken.

Ferner danken wir Fräulein cand. chem. E. Loeser und unserer technischen Assistentin, Fräulein S. Huppenbauer, für ihre Mithilfe bei einigen Abbaureaktionen.

Experimenteller Teil.

L-erythro-Pteridin I. Nach der Vorschrift von A. Wohl⁶⁾ haben wir 5 g *L*-Rhamnose-diacetamid (0,0214 Mol) mit Schwefelsäure zu *L*-Tetrose umgesetzt. Die Entfernung der überschüssigen Schwefelsäure wurde mit Bariumcarbonat so vorgenommen, dass die Lösung dabei immer schwach sauer blieb. Nachdem das Bariumsulfat abfiltriert und ausgewaschen war, haben wir 3,2 g Hydrazinhydrat (0,0642 Mol), 3,85 g Eisessig (0,0642 Mol), 5,11 g Triamino-hydroxy-pyrimidin-sulfat (0,0214 Mol) und 8,75 g Natriumacetat,

⁶⁾ Ber. deutsch. chem. Ges. **26**, 730 (1893).

3 H₂O (0,0642 Mol) zugesetzt und dann 3 Std. auf dem Wasserbad erwärmt. Das Rohprodukt wurde nach dem Abkühlen filtriert, mit wenig Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 3,6 g. Papierchromatographisch wurde bewiesen, dass zwei blau fluoreszierende Substanzen den Hauptbestandteil des Rohproduktes bildeten. Die alkalische Oxydation mit KMnO₄ lieferte Pteridin-8- und -9-carbonsäure. Daraus schliessen wir, dass es sich bei den beiden Substanzen um die zwei isomeren *L-erythro*-8- bzw. -9-Dihydroxypropyl-pteridine handelte. Nachdem Papierchromatogramme gezeigt hatten, dass mit Hilfe von 3-proz. NH₄Cl-Lösung eine Trennung der beiden isomeren Pteridine möglich war, haben wir Säulen von 8–9 cm Durchmesser und 80 cm Höhe mit Papierpulver gefüllt. Pro Säule wurden 400 mg rohes Produkt mit diesem Lösungsmittel chromatographiert. Die ausfliessende Flüssigkeit (50 ml/Std.) wurde in Fraktionen von je 100 ml aufgeteilt und jede Fraktion papierchromatographisch auf ihre Reinheit untersucht. So gewannen wir aus jeder Säulenfüllung etwa 1 l Lösung des 8-Dihydroxypropyl-Isomeren. Der Rest bestand aus einem 8- und 9-Isomeren-Gemisch, welches mit der nachstehend beschriebenen Reinigungsmethode erneut chromatographiert wurde.

Das 8-Isomere haben wir an Tierkohle adsorbiert, die Kohle auf dem Filter chloridfrei gewaschen und das Pterin in einer teilweise mit Papier gefüllten Säule eluiert. Dazu verwendeten wir abwechselnd 3-proz. Ammoniak und ein Pyridin-Methanol-Wasser-Gemisch (1/1/1). Wir haben die Eluate im Vakuum auf kleinstes Volumen eingengt, worauf das Pteridin ausfiel. Dieses wurde in möglichst wenig Ammoniak gelöst, mit Tierkohle entfärbt und filtriert. Man hat das Filtrat mit verdünnter Salzsäure neutralisiert. Im Kühlschrank fiel das gereinigte Pteridin aus. Nach der vollständigen Aufarbeitung des Rohproduktes erhielten wir 850 mg Pteridin I.

C ₉ H ₁₁ O ₃ N ₅	Ber. C	45,56	H	4,68	N	29,52%
(237,09)	Gef. „	46,13	„	6,23	„	26,98%

Zur weiteren Reinigung wurde die Substanz in 200 ml 5-proz. Ammoniak gelöst und die Lösung mit etwas Tierkohle behandelt, filtriert und im Vakuum eingengt, bis sie sich zu trüben begann; ein Teil des Pteridins wurde dann durch Neutralisieren mit HCl in der Hitze gefällt. Nach dem Abkühlen erhielt man durch Zentrifugieren, Waschen des Niederschlags mit Wasser, Äthanol und Äther, nach dem Trocknen im Exsikkator 480 mg noch nicht analysenreines Pteridin. 180 mg davon wurden aus Eisessig umkristallisiert. Das reine Pteridin I zeigt in den üblichen Lösungsmitteln³⁾ die gleichen Rf-Werte wie HB₂ aus *Drosophila melanogaster*.

C ₉ H ₁₁ O ₃ N ₅	Ber. C	45,56	H	4,68	N	29,52	C—CH ₃	6,3%
(237,09)	Gef. „	45,46	„	4,99	„	29,19	„	4,87%

Belichtung des Pteridins mit UV.-Licht. 5 mg des synthetischen Pteridins I wurden in verdünntem Ammoniak gelöst und auf Whatman-Papier aufgetragen. Nach 5 Std. Belichtung hatte die Pteridin-8-carbonsäure nach den Papierchromatogrammen in verschiedenen Lösungsmitteln fast die gleiche Konzentration erreicht wie das Ausgangsprodukt. Alle Substanzen wurden mit verdünntem Ammoniak eluiert und auf ein grosses, gewaschenes Papier als Streifen aufgetragen. Dann chromatographierte man in Propanol/1-proz. wäss. NH₃ (2/1), schnitt den Streifen, welcher die Carbonsäure enthielt, aus und eluierte ihn mit verdünntem Ammoniak. Die Eluate wurden eingengt und ihre UV.-Spektren in saurer und in alkalischer Lösung aufgenommen. Man bekam die für die Pteridin-8-carbonsäure sehr charakteristischen Kurven. Auch papierchromatographisch wurde gegenüber synthetischer Pteridin-8-carbonsäure kein Unterschied beobachtet.

Oxydation des synthetischen Pteridins I mit Perjodsäure und Nachweis des dabei gebildeten Acetaldehyds³⁾. Man wog 5,0 mg des Pteridins (0,0212 mMol) ein, löste in 10 ml verdünntem Ammoniak und engte im Vakuum ein, bis die Lösung neutral reagierte. Dann versetzte man mit 5 ml 0,027-n. Natriumperjodat-Lösung und füllte auf 50 ml auf. Nach 15, 30 und 60 Min. wurden Proben von je 5 ml entnommen und mit 0,0127-n. Arsenit-Lösung titriert. Bei allen 3 Proben wurden 0,75 ml Arsenit verbraucht, für 0,0212 mMol Pteridin also $5 \times 0,027 - 10 \times 0,75 \times 0,0127 = 0,135 - 0,095 = 0,040$ Äquivalent Perjodsäure, oder 1,90 Äquivalent Perjodsäure pro Mol Pteridin.

Man löste 9 mg des 8-Dihydroxypropyl-pteridins I in 7 ml Wasser, gab 17 mg Natriumperjodat zu und destillierte bei ca. 140° Badtemperatur. Die Vorlage enthielt 10 mg p-Nitrophenylhydrazin-hydrochlorid, gelöst in 2 ml Wasser. Man setzte die Destillation fort, bis 5 ml Wasser übergegangen waren. Kristalle bildeten sich in der Vorlage, die man aus Äthanol umkristallisierte: Smp. 122–123°, Misch-Smp. mit authentischem p-Nitrophenylhydrazon 123–124°.

D-threo-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridin (II). Wir haben die durch Hydrolyse von 2 g D-Xylomethylose-monoacetonid (0,0105 Mol) gewonnene D-Xylomethylose mit 5 g (0,021 Mol) Triamino-hydroxy-pyrimidin-sulfat, wie oben beschrieben, kondensiert. Wir erhielten etwa 400 mg eines Gemisches der 8- und 9-Isomeren des *L-threo*-Derivates II, das wir nach dem gleichfalls schon bei den *L-erythro*-Isomeren angewandten Verfahren an Papiersäulen trennten. Die Aufarbeitung ergab 48 mg Pteridin II.

$C_9H_{11}O_3N_5, H_2O$	Ber. C 42,35	H 5,14	N 27,44%
(255,23)	Gef. „ 43,07	„ 5,32	„ 26,60%

Zusammenfassung.

Die Synthesen von *L-erythro-2-Amino-5-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridin* und *D-threo-2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridin* werden beschrieben und die Eigenschaften dieser beiden Verbindungen mit denjenigen des *Drosophila*-Pteridins HB₂ verglichen.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

15. Reduktionen mit LiAlH₄ in der Isatin-Reihe

3. Mitteilung.

Zur Darstellung von N-Methyl-3-hydroxy-indolin

von E. Giovannini und Th. Lorenz

(2. XI. 1957.)

Den Ergebnissen bereits beschriebener Versuche¹⁾ gemäss war bei der Reduktion von N-Methylisatin (I) mit LiAlH₄ unter bestimmten Bedingungen die Bildung von N-Methyl-3-hydroxy-indolin (II) zu erwarten. Die Reduktionen wurden in der umgekehrten Arbeitsweise²⁾ ausgeführt, die Aufarbeitung der Reaktionsgemische erfolgte bei den Versuchen 1–3 nach *Julian & Printy* (Methode A, s. ³⁾), im übrigen nach eigenem Verfahren⁴⁾. Neben N-Methylindol (III) konnte jedoch in allen Fällen (s. Tabelle) nur noch N,N'-Dimethylindigo isoliert werden, der als solcher durch sein Absorptionsmaximum⁵⁾ identifiziert wurde (Fig. 1).

¹⁾ Siehe 1. und 2. Mitt. Helv. **40**, 1553, 2287 (1957).

²⁾ Helv. **40**, 1553, (1957), Fussnote 6

³⁾ Helv. **40**, 1560 (1957).

⁴⁾ Helv. **40**, 1561 (1957), Methode B.

⁵⁾ L. Ettinger & P. Friedländer, Ber. deutsch. chem. Ges. **45**, 2077 (1912).