

## Die Struktur des Urothions\*

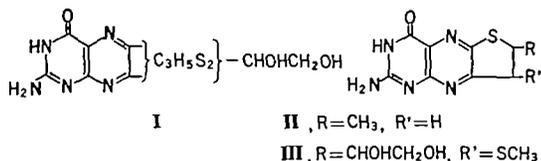
By MIKI GOTO, ATSUSHI SAKURAI, KYUJI OHTA und HIROSHI YAMAKAMI

(Aus dem Chemischen Institut, Gakushuin Universität, Toshima-ku, Tokyo)

(Der Schriftleitung zugegangen am 27. September 1968)

Für den Harnfarbstoff Urothion wurde durch Abbaureaktionen und die Synthese einer Modellverbindung die Struktur eines 7-Amino-2-( $\alpha$ ,  $\beta$ -dihydroxyäthyl)-3-methylthio-5-hydroxythieno[3,2-g]pteridins vorgeschlagen.

Im Jahre 1940 berichtete KOSCHARA über die Isolierung eines orange-roten Farbstoffes aus menschlichem Harn, dem er die Struktur eines Pteridin-Derivates zuschrieb (1). Die Zusammensetzung wurde als  $C_{11}H_{13}N_5O_3S_2$  ermittelt. Er stellte für das Urothion die Teilformel I auf, in der vor allem der schwefelhaltige Teil des Moleküls ungeklärt blieb (2-3).

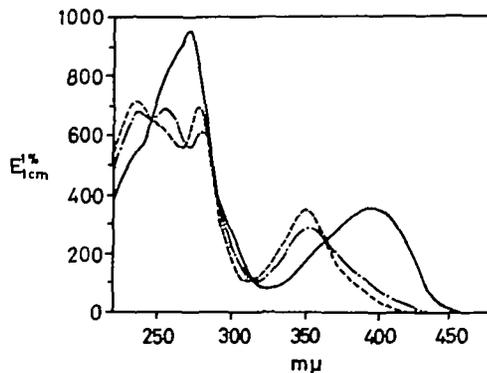


Im Jahre 1955 synthetisierten TSCHESCHE *et. al.* 6-Amino-8-hydroxy-2-methyl-2,3-dihydrothieno[2,3-g]pteridin (II), und sie schlugen durch den Vergleich der Eigenschaft mit der des Urothions die Struktur eines 6-Amino-2-( $\alpha$ ,  $\beta$ -dihydroxyäthyl)-8-hydroxy-3-methylthio-2,3-dihydrothieno[2,3-g]pteridins (III) vor (4).

Wir isolierten aus 1,000 Liter vom menschlichen Harn 20 mg Urothion in Kristallen (UV- und IR-Spektren Abbild. 1-2). Beim Erhitzen mit Acetanhydrid lieferte das Urothion gelbe Nadeln des Triacetyl-Derivats  $C_{17}H_{17}N_5O_6S_2$ . Das Massenspektrum (Abbild. 3) zeigt ein Molekül-Ion der Masseneinheit  $m/e=451.064$  (Ber. 451.062). Das sich daraus ergebende Molekulargewicht von 325 für das Urothion stimmt mit der Summenformel

$C_{11}H_{11}N_5O_3S_2$  überein. Bei der katalytischen Hydrierung des Urothions mit Raney-Nickel als Katalysator ließ sich, wie KOSCHARA berichtete, das Auftreten von Methylmercaptan beobachten, und bei der Perjodat-Oxydation lieferte es Formaldehyd und rotbraunen Urothionaldehyd. Das Protonenresonanz-Spektrum zeigt ein Signal um  $\tau=7.35$  ( $SCH_3$ -Protonen).

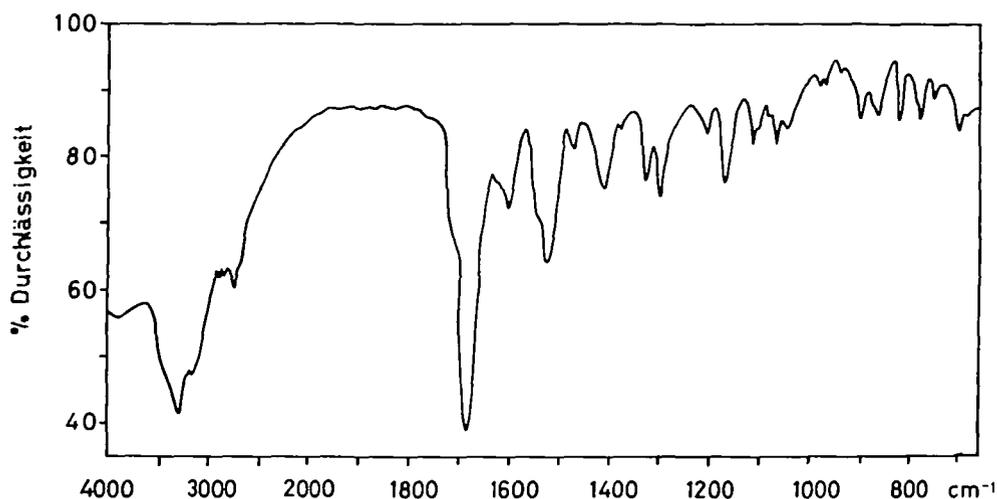
Wir haben dann das Dihydrothienopteridin II (4) aus 7-( $\beta$ -hydroxypropyl)Xanthopterin durch Erhitzen mit Diphosphorpentasulfid in Thioacetamid synthetisiert und die Eigenschaften mit denen des Urothions verglichen. Es wurde gefunden, daß die Permanganat-Oxydation von II in alkalischer Lösung eine blau-fluoreszierende, stark saure Verbindung (IVa) liefert, während das Urothion eine grün-fluoreszierende, stark saure Verbindung (Va) ergibt. Obwohl IVa und Va die gleichen *Rf*-Werte und gleiche Wanderung bei der



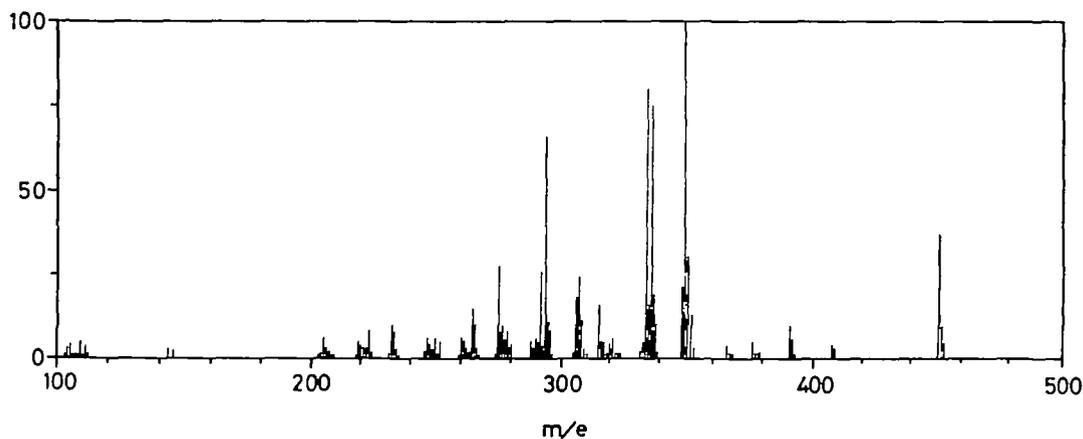
ABBILD. 1. UV-Spektren von Urothion.

— in 0.1 N NaOH,  
 --- in Wasser,  
 ---- in 0.1 N HCl.

\* II. Mitteil. über Pteridine; I. Mitteil.: K. Sugiura und M. Goto, *J. Biochem.*, 64, 657 (1968). Die vorläufige Mitteil. dieses Artikels wurde in *Tetrahedron Letters*, 1967, 4507 veröffentlicht.

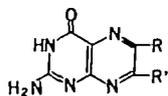


ABBILD. 2. IR-Spektrum von Urothion (KBr).



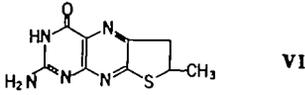
ABBILD. 3. Massenspektrum von acetyliertem Urothion.

Elektrophorese zeigen, sind sie jedoch nicht identisch, denn IVa lieferte nach Hydrierung mit  $\text{PtO}_2$  Pterincarbon säure-(7)\*, nach Erhitzen mit [Natronlauge Xanthopterin-carbonsäure und nach Erhitzen mit Salzsäure Xanthopterin, während Va dementsprechend Pterincarbon säure-(6), Isoxanthopterin-carbonsäure und Isoxanthopterin lieferte.

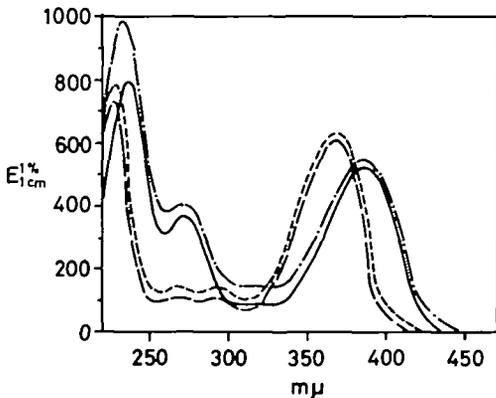
IV, R =  $\text{SO}_3\text{H}$ , R' =  $\text{CO}_2\text{H}$ V, R =  $\text{CO}_2\text{H}$ , R' =  $\text{SO}_3\text{H}$ 

\* 2-Amino-4-hydroxypteridin wird in diesem Artikel einfach als "Pterin" bezeichnet.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß beide Verbindungen IVa und Va Isomere sind, und zwar 7-Carboxypterin-sulfonsäure (IV) und 6-Carboxypterin-sulfonsäure (V). Zum Vergleich wurde V durch die Permanganat-Oxydation von 7-Mercaptopterin-carbonsäure hergestellt, die aus 7-Chloropterincarbon säure durch Einwirkung von Natriumhydrogensulfid erhalten wurde. Die Identität von Va mit dem synthet. Material wurde durch den Vergleich von UV-Spektren,  $R_f$ -Werten, elektrophoretischem Verhalten sowie der Abbaureaktionen festgestellt.



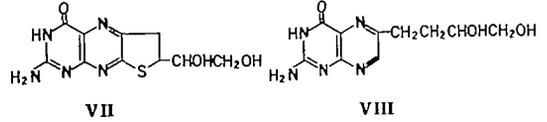
Als nächsten Schritt haben wir 7-Amino-5-hydroxy-2-methyl-2,3-dihydrothieno[3,2-g]pteridin (VI) (ein Isomeres von II) durch Ringschluß von 6-( $\beta$ -hydroxypropyl)Isoxanthopterin mit Diphosphorpentasulfid/Thioacetamid synthetisiert. Es zeigte erwartungsgemäß ganz verschiedene UV-Spektren (Abbild. 4). Wir haben nun als eine mögliche Struktur für das Urothion das Vorhandensein eines Thienopteridin-Gerüsts angenommen. Eine Stütze für die Richtigkeit dieser Annahme wurde aus folgendem Ergebnis erhalten: Durch die partielle Hydrierung mit Raney-Nickel als Katalysator entstand aus Urothion ein blau-fluoreszierender Stoff  $C_{10}H_{11}N_5O_3S \cdot H_2O$  (VIIa). Die UV-Spektren von VIIa stimmen im Verlauf der Kurve weitgehend mit denen von VI überein (Abbild. 4). Aus Substanz VIIa ließ sich durch Permanganat-Oxydation V erhalten und durch die starke Hydrierung mit Raney-Nickel ein blau-fluoreszierender Stoff (VIIIa), der die gleichen UV-Spektren (Abbild. 5) wie die der 6-Alkyl-pterine zeigt und durch die Permanganat-Oxydation zur Pterin-carbonsäure-(6) abgebaut wurde. Das Vorhandensein einer Glykol-Gruppe in VIIa wurde durch die Perjodat-Oxydation



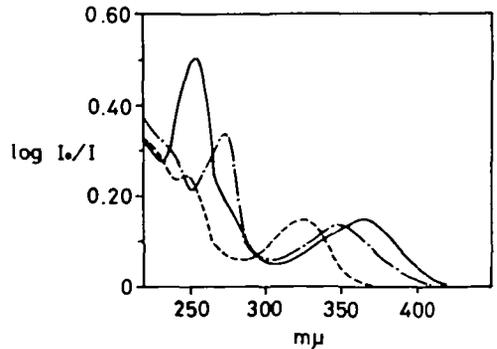
ABBILD. 4. UV-Spektren von VI.

— in 0.1 N NaOH,  
 - - - - in 0.1 N HCl, und von VIIa,  
 — in 0.1 N NaOH,  
 - - - - in 0.1 N HCl.

festgestellt. Die Strukturen von 7-Amino-2-( $\alpha$ ,  $\beta$ -dihydroxyäthyl)-5-hydroxy-2,3-dihydrothieno[3,2-g]pteridin (VII) und 6-( $\gamma$ ,  $\delta$ -Dihydroxybutyl)pterin (VIII) (s. unten) entsprechen sehr wahrscheinlich VIIa und VIIIa.



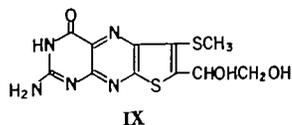
Nimmt man das Vorliegen eines Thienopteridins im Urothion an, so bleiben für die Angliederung der Seitenketten  $-SCH_3$  und  $-CHOHCH_2OH$  nur zwei Möglichkeiten übrig (IX—X). Wenn das Urothion die Formel IX hätte, müßte es durch die Hydrierung mit Raney-Nickel 6-( $\gamma$ ,  $\delta$ -Dihydroxybutyl)pterin (VIII), und danach durch die Perjodat- und Luft-Oxydation  $\beta$ -(Pterinyl-6)propionsäure (XI) geben. Aber wenn das Urothion die Formel X hätte, müßte es nach den gleichen Behandlung  $\alpha$ -(pterinyl-6)propionsäure (XII) geben. XI wurde durch Kondensation (Decarboxylierung) von 2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin-sulfat und Äthyl- $\alpha$ -diäthoxyacetylsuccinat, und XII durch Kondensation von 2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin-sulfat und Äthyl- $\alpha$ -diäthoxyacetylpropionat synthetisiert. Es wurde durch Papierchromatographie und Elektrophorese festgestellt, daß XI tatsächlich aus dem Urothion entsteht. Wir können also die Formel IX als den wahrscheinlichsten Ausdruck für das Urothion betrachten. Die



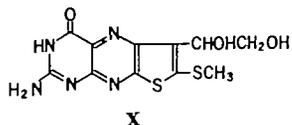
ABBILD. 5. UV-Spektren von VIIIa.

— in 0.1 N NaOH,  
 - - - - in Wasser,  
 - - - - in 0.1 N HCl.

Formel des Urothions zeigt dann 1 asymmetrisches C-Atom.

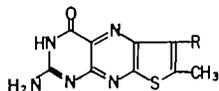


IX



X

Zur Sicherung der angenommenen Struktur haben wir als eine Modell-Verbindung 7-Amino-3-äthylthio-5-hydroxy-2-methylthieno[3,2-g]pteridin (**XIII**) durch Bromierung und danach Äthanthiolierung aus 7-Amino-5-hydroxy-2-methylthieno[3,2-g]pteridin (**XIV**) synthetisiert, welches aus **VI** durch Erhitzen mit Selenioxyd aufgebaut wurde. Das erhaltene Thienopteridin **XIII** zeigt fast gleiche UV-Spektren wie die des Urothions und erweist sich auch in seinen sonstigen Eigenschaften mit diesem Farbstoff identisch. Damit wurde die Struktur des Urothions als **IX** bewiesen.

XIII, R = SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

XIV, R = H

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

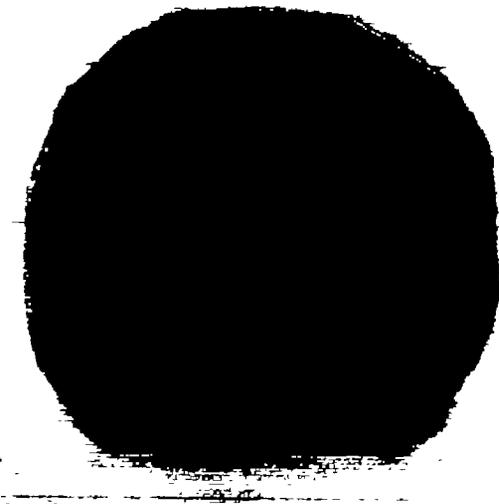
*Die Schmelzpunkte wurden nicht korrigiert.*

Die Messung der Spektren im sichtbaren und im UV erfolgte mit dem Spektrophotometer Hitachi EPS-3. Das Massenspektrum wurde mit dem Gerät JEO-JMS-01SG und das NMR-Spektrum mit dem Gerät JEOL-JNM-C-60-H mit einem J.R.A-1-Spektrum-Integrator in Wiederholung der Messung aufgenommen.

*Papierchromatographischer Nachweis (4)*—Zur Sichtbarmachung des Urothions und der thiolierten Pteridine auf dem Papier besprüht man den Streifen mit 0.1 N schwefelsaurer Permanganat-Lösung. Man läßt 3 Min. einwirken und zerstört das überschüss. Permanganat durch Besprühen mit verd. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. Unter der UV-Lampe (Blak-Ray UVL 22) ist jetzt der Ort, an dem sich das Urothion auf dem Papier befunden hat, durch

eine intensive moosgrüne Fluoreszenz (Pm-Reaktion) zu erkennen. Bei den sonstigen Pteridinen in diesem Artikel bemerkte man starke Fluoreszenz durch Bestrahlung mit UV-Licht.

*Isolierung des Urothions*—1,000 Liter männlichen Harns wurden mit konz. Salzsäure versetzt (pH 3–4) und eine Nacht bei 4° stehengelassen; der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert. Das Filtrat (50 Liter) wurde auf eine Florisil-Säule (2 kg, 60–100 mesh) gebracht, die Säule mit 15 Liter Wasser gewaschen und das Urothion mit 5 Liter 50-proz. Aceton eluiert; das Eluat wurde i. Vak. auf 150 ccm eingengt. Durch dieses Verfahren wurden aus 1,000 Liter Harn 3 Liter Urothion-Lösung erhalten. Ein Zehntel der Lösung wurde auf eine Cellulose-Säule (Avicel, 150×400 mm) gebracht und die Chromatogramme mit 4-proz. Na-Citrat-Lösung entwickelt. Das Urothion-Eluat wurde mit Salzsäure gesäuert (pH 3–4) und, nach Behandlung mit einer Florisil-Säule (150 g) wie oben, die Lösung i. Vak. auf 50 ccm eingengt; die Lösung wurde auf eine Cellulose-Säule (90×300 mm) gebracht, die Chromatogramme mit Isopropylalkohol/1-proz. Ammoniak (2:1) entwickelt und das Eluat i. Vak. zur Trockne eingedampft. Weitere



ABBILD. 6. Kristalle von Urothion.

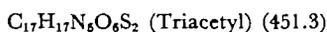
Reinigung erfolgte durch mehrmalige Chromatographie an Cellulose-Säulen; entwickelt wurden die Chromatogramme mit Isopropylalkohol/1-proz. Ammoniak (2:1) und wassergesätt. Butanol. Abdestillieren des Eluats lieferte 5 mg Roh-Urothion; wir isolierten aus 1,000 Liter Harn insgesamt 50 mg Roh-Urothion. Es ließ sich, wie von KOSCHARA beschrieben, aus 0.1 N Natronlauge/0.1 N Salzsäure umkristallisieren: 20 mg Urothionin in Sternchen angeordneten Kristallaggregaten (Abbild. 6). UV-Spektren: s. Abbild. 1; NMR ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ):  $\tau = 7.35$  (3H-s,  $\text{SCH}_3$ ). Zur Analyse wurde 12 Std. bei  $110^\circ/12$  Torr über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet.



Ber. C 40.62 H 3.41 N 21.53 S 19.68

Gef. C 40.90 H 3.91 N 21.43 S 19.03

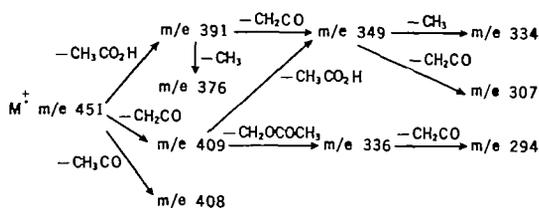
*Acetylierung des Urothions*—Das Urothion (3.5 mg) wurde mit Essigsäureanhydrid (2 ccm) 1 Std. bei  $140\text{--}150^\circ$  erhitzt, hierauf, nach Abfiltrieren durch eine Glasfritte, das Filtrat i. Vak. zur Trockne eingedampft, der Rückstand in wenig Essigester gelöst, die Lösung mit Äther/Petroläther versetzt und 24 Std. bei  $4^\circ$  stehengelassen; es erfolgte Kristallisation. Die Kristalle wurden in wenig Aceton gelöst und nochmals mit Äther/Petroläther auskristallisiert. Nach Trocknen bei  $90^\circ$  i. Vak. wurden 2 mg gelbliche Nadeln erhalten, Schmp.  $198\text{--}199^\circ$  (Zers.).



Ber. C 45.24 H 3.80 N 15.52

Gef. C 46.04 H 4.31 N 15.49

Massenspektrum (Abbild. 3): Es ergab sich folgendes Fragmentierungsschema (s. Tab. I).



*Permanganat-Oxydation des Urothions*—1 mg Urothion in 1 ccm 0.1 N NaOH wurde mit 10 mg  $\text{KMnO}_4$  im verschlossenen Reagenzglaschen bei  $90^\circ$  50 Min. erhitzt. Danach wurde das überschüss. Permanganat durch wenig Äthanol zersetzt; das entstandene Mangandioxyd wurde abzentrifugiert. Das Produkt wurde durch Papierchromatographie gereinigt; als Papiere dienten 10 Bogen der Whatman Nr. 1 Papiere ( $30 \times 30$  cm) und als Lösungsmittel Isopropylalkohol/1-proz. Ammoniak (2:1). Die grün fluoreszierenden Bänder wurden ausgeschnitten, die Substanzen aus dem Papier mit Wasser eluiert und das Eluat mit einem Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Die Identität des Oxydationsprodukts mit der synthet. 2-Amino-4-hydroxy-7-sulfoxypteridin-carbonsäure-(6) wurde durch Papierchromatographie, UV-Spektrum-Messung und Abbaureaktionen festgestellt (s. Synthese).

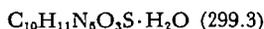
*Hydrierung des Urothions*—8 mg Urothion in 1 ccm 0.1 N NaOH wurden 13 Std. bei

TABELLE I

Hauptfragmente des Massenspektrums von acetyliertem Urothion  
(Elektronenenergie 75 eV, b.  $170^\circ$ ).

Fragmente	m/e	
	Gef.	Ber.
1 $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$ ( $M^+$ )	451.064	451.062
2 $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$ ( $M^+ - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ )	391.041	391.041
3 $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$ ( $2 - \text{CH}_2\text{CO}$ )	349.032	349.030
4 $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$ ( $M^+ - \text{CH}_2\text{CO} - \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ )	336.023	336.022
5 $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$ ( $3 - \text{CH}_3$ )	334.008	334.008
6 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_5\text{O}_2\text{S}_2$ ( $4 - \text{CH}_2\text{CO}$ )	294.010	294.011

Raumtemp. unter  $H_2$  mit ca. 25 mg Raney-Nickel (feucht) hydriert (5), die Lösung vom Katalysator abgetrennt, der Katalysator 5 mal mit je 5 ccm 0.1 N NaOH gewaschen und die Lösung durch Chromatographie an Dowex 1×8 ( $HCO_3^-$ -Form; Säule 40×150 mm) gereinigt. Entwickelt wurde mit 0.03 M Ameisensäure/Ammoniak; der pH-Wert wurde dabei allmählich von 9.0 bis 7.2 geändert. Zwei blau fluoreszierende Zonen wurden beobachtet. Die erste Zone wurde eluiert; das Eluat (250 ccm) zeigte das gleiche UV-Spektrum wie das 2-Amino-4-hydroxy-6-alkylpteridin (Abbild. 5), und das Produkt ergab durch Behandlung mit alkalischem Permanganat (erhitzt) 2-Amino-4-hydroxypteridin-carbonsäure-(6); dies wurde durch Papierchromatographie und Elektrophorese festgestellt. Das Eluat (750 ccm) der zweiten Zone wurde mit konz. Ammoniak neutralisiert (pH 8) und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Das Amm. Format wurde i. Vak. bei 80° durch Sublimation möglichst entfernt. Man löste den Rückstand in 10 ccm Wasser; das unlösliche Material wurde abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und getrocknet: ca. 4 mg Rohprodukt. Es wurde in 1 ccm 0.1 N NaOH gelöst, die Lösung durch eine Fritte filtriert, 1.2 ccm 0.1 N Essigsäure zugetropft und kurz erhitzt. Nach Stehenlassen im Kühlschrank über Nacht entstanden schwach gelbliche Kristalle, die abgesaugt, mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und i. Vak. bei 50° getrocknet wurden. Ausb. 1.8 m. UV-Spektren: s. Abbild. 4.



Ber. C 40.14 H 4.38 N 23.41

Gef. C 41.37 H 4.35 N 23.17

*Identifizierung des durch Hydrierung (Raney-Nickel) und Perjodat-Abbau entstandenen Pteridins*—Wie oben geschrieben, gibt das Urothion durch Hydrierung mit Raney-Nickel zwei fluoreszierende Abbauprodukte, die man durch Chromatographie an Dowex 1×8 trennen kann. Das Eluat der ersten Zone (250 ccm; auf pH 9–10 mit Ammoniak eingestellt) wurde auf eine Dowex 1×8-Säule gegeben. Das Produkt wurde adsorbiert, mit 1 Liter Wasser gewaschen und mit 0.3-proz. Ameisensäure

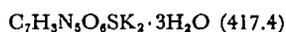
eluiert. Das Eluat (120 ccm) wurde mit Aktivkohle gereinigt. Nach Absorbieren des Produkts an Aktivkohle wurde mit Wasser gewaschen und danach 5 mal mit je 25 ccm 50-proz. Äthanol/4-proz. Ammoniak (1:1) desorbiert. Die Eluate wurden auf 20 ccm eingeeengt, durch eine Fritte filtriert und zur Trockne eingedampft: ca. 1 mg schwach gelbliches Produkt. 0.1 mg des Materials wurde in 0.1 ccm 0.1 N NaOH gelöst, 2 Tage mit einer Lösung von 2 mg Kaliumperjodat in 0.1 ccm Wasser bei Raumtemp. gehalten und das Produkt durch Papierchromatographie wie folgt nacheinander gereinigt: 1. Papier: Toyo-Roshi Nr. 514 (Dicke 4 mm); Lösungsmittel: Isopropylalkohol/1-proz. Ammoniak (2:1), und 2. Papier: Whatman Nr. 1; Lösungsmittel: Wasser. Das erhaltene Produkt wurde durch Papierchromatographie und Elektrophorese mit authent.  $\beta$ -(2-Amino-4-hydroxypteridinyl-6)-propionsäure verglichen und die Identität festgestellt (Tab. II).

*2-Amino-6-carboxy-4-hydroxy-7-mercaptopteridin*—Eine Lösung von 1.85 g 2-Amino-7-chloro-4-hydroxypteridin-carbonsäure-(6) (6) und 2 g NaSH in 200 ccm 0.1 N  $NaHCO_3$ -Lösung wurde 3 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Behandlung mit Aktivkohle und Filtrieren wurde die Lösung mit Essigsäure angesäuert, mit 200 ccm Äthanol versetzt und auf 5° gekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen: Ausb. 900 mg (39.2%).

*2-Amino-6-carboxy-4-hydroxypteridin-7-sulfonsäure (V)*—240 mg 2-Amino-6-carboxy-4-hydroxy-7-mercaptopteridin wurde 15 Min. bei 100° mit einer Lösung von 320 mg  $KMnO_4$  in 10 ccm 0.1 N KOH oxydiert, überschüss.  $KMnO_4$  mit Äthanol zersetzt und die Lösung vom entstandenen  $MnO_2$  abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 60 ccm Äthanol versetzt und der entstandene Niederschlag mit Äthanol und Äther gewaschen: Ausb. 245 mg (58.3%).

UV:  $\lambda_{max}^{0.1N NaOH}$  ( $\epsilon$ ), 263, 379  $m\mu$ , (22,300, 7,510).

$\lambda_{max}^{0.1N HCl}$  ( $\epsilon$ ), 283, 333  $m\mu$ , (6,580, 7,960).



Ber. C 20.14 H 2.17 N 16.78 S 7.68

Gef. C 20.24 H 2.38 N 16.25 S 7.78

Die Säure V lieferte nach Hydrierung mit  $\text{PtO}_2$  2-Amino-4-hydroxypteridin-carbonsäure-(6). Nach Erhitzen mit Natronlauge (2 N, 90°, 2 Stdn.) Isoxanthopterin-carbonsäure. Nach Behandlung mit Salzsäure (4 N, 90°, 2 Stdn.) Isoxanthopterin.

V wurde auch synthetisiert entweder durch die Permanganat-Oxydation des 7-Amino-5-hydroxy-2-methyl-2, 3-dihydrothieno [3, 2-g]pteridin, oder durch die Permanganat-Oxydation des 2-Amino-7-mercapto-4-methoxypteridin-carbonsäureester-(6), welches durch Erhitzen von 2-Amino-7-hydroxy-4-methoxypteridin-carbonsäureester-(6) mit  $\text{P}_2\text{S}_5/\beta$ -Picolin synthetisiert. Die Ausbeuten waren jedoch geringer.

*Äthyl-diäthoxyacetylsuccinat*—25 g Äthyl-diäthoxyacetat und 37.5 g Äthylsuccinat wurden auf 80° erhitzt und langsam (20 Min.) mit 3.25 g Natrium versetzt. Nach 1 stdigem Erhitzen auf dem Wasserbad wurde die Lösung nochmals mit 37.5 g Äthylsuccinat und 3.25 g Natrium versetzt. Nach 3 stdigem Erhitzen und nach Abkühlen wurde es auf die Mischung von 40 g Eis und 40 ccm konz. HCl gegossen. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, die organische Phase mit Äther extrahiert, der Extrakt mit 10-proz.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung und danach mit Wasser gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Die nach Einengen hinterbleibende Flüssigkeit destillierte beim Sdp.<sub>2.0</sub> 147—153°, Ausb. 30.5 g (70.4%).

$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_7$  (304.3) Ber. C 55.25 H 7.95  
Gef. C 55.67 H 8.03

*$\beta$ -(2-Amino-4-hydroxypteridinyl-6)-propionsäure (XI)*—3.6 g 2, 4, 5-Triamino-6-hydroxypyrimidin-sulfat in 40 ccm Wasser wurden mit 3.6 g  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  versetzt und 10 Min. bei 100° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das entstandene  $\text{BaSO}_4$  abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 4.4 ccm Morpholin, 5.4 g Äthyl-diäthoxyacetylsuccinat und 5 ccm Äthanol versetzt, 1 Stde. unter Rückfluß gekocht und anschließend mit 10 ccm konz. HCl 1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung vom Niederschlag befreit, mit 7.6 ccm 10 N NaOH versetzt und bei 5° gekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert

und mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen. Das Rohprodukt (2.1 g; Ausb. 59%) wurde in 16 ccm 1 N NaOH gelöst, nach dem Filtrieren mit 10 N NaOH neutralisiert und abgekühlt. Diese Reinigung wiederholte sich noch 2 mal. Man löste das erhaltene Na-Salz in Wasser, acidifizierte mit Essigsäure, zentrifugierte den entstandenen Niederschlag ab und wusch mit Wasser, Äthanol und Äther. Ausb. 94 mg.

UV:  $\lambda_{\text{max}}^{0.1\text{N NaOH}}$  ( $\epsilon$ ), 251, 360 m $\mu$ , (22,700, 8,650).  
 $\lambda_{\text{max}}^{0.1\text{N HCl}}$  ( $\epsilon$ ), 245, 318 m $\mu$ , (11,300, 7,550).

$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_3$  (235.2)

Ber. C 45.96 H 3.86 N 29.78

Gef. C 45.37 H 4.13 N 30.61

*Äthyl- $\alpha$ -diäthoxyacetylpropionat*—8.8 g Äthyl-diäthoxyacetat wurden mit 8.4 g Äthylpropionat und 1.15 g Natrium versetzt und 1 Stde. bei 80° erhitzt. Dazu wurden 8.4 g Äthylpropionat und 1.15 g Natrium gegeben und bei 80° 3 Stdn. erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde in ein Gemisch von 15 g Eis und 15 g konz. HCl gegossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit Äther extrahiert; der Äther-Extrakt wurde mit 10-proz.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung und Wasser gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Abdestillieren des Äthers i. Vak. filtrierte man den entstandenen Rückstand ab und destillierte erneut i. Vak.; Sdp.<sub>4.0</sub> 121—123°, Ausb. 7.5 g (66%).

$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_6$  (232.3) Ber. C 56.88 H 8.12  
Gef. C 56.87 H 8.44

*$\alpha$ -(2-Amino-4-hydroxypteridinyl-6)-propionsäure (XII)*—400 mg 2, 4, 5-Triamino-6-hydroxypyrimidin-sulfat in 5 ccm Wasser wurden mit 400 mg  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  versetzt und 10 Min. auf 100° erhitzt. Nach Abkühlen wurde das entstandene  $\text{BaSO}_4$  abfiltriert, das Filtrat mit 0.5 ccm Morpholin, 600 mg Äthyl- $\alpha$ -diäthoxyacetylpropionat und 5 ccm Äthanol versetzt und 1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen saugte man den schwach braun gefärbten Niederschlag ab, wusch mit Wasser, Äthanol und Äther und trocknete bei 80°. Ausb. 240 mg (71%). Zur Analyse wurde das Produkt aus heißem Wasser unter Zusatz von

wenig Äthanol umkristallisiert.

UV:  $\lambda_{\max}^{0.1\text{ N NaOH}}$  ( $\epsilon$ ), 252, 361 m $\mu$ , (24,100, 9,120).

$\lambda_{\max}^{0.1\text{ N HCl}}$  ( $\epsilon$ ), 246, 319 m $\mu$ , (11,300, 7,550).

$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_3$  (235.2)

Ber. C 45.96 H 3.86 N 29.78

Gef. C 45.21 H 3.98 N 29.54

6-( $\beta$ -Hydroxypropyl)isoxanthopterin—4 g 6-Acetylnisoxanthopterin (7) in 1.2 Liter 0.1 N NaOH wurden 24 Std. unter Rühren bei Raumtemperatur mit 1 g NaBH<sub>4</sub> behandelt. Man setzte weitere Portion von 1 g NaBH<sub>4</sub> zu und rührte 12 Std. Nach Neutralisieren mit Eisessig (pH 6) wurde die Lösung bei 60–70° erwärmt und bei Raumtemperatur stehenlassen. Die abgeschiedenen Kristalle wurden abzentrifugiert. Nach Waschen mit Wasser wurden sie in 600 ccm 0.5 N NaOH gelöst, mit 1 g Aktivkohle behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde mit 600 ccm 0.5 N Essigsäure neutralisiert und bei 60–70° erwärmt. Beim Abkühlen schieden sich die Kristalle ab (2.8 g). Zum Analysieren kristallisierte man 3 mal aus heißem Wasser um.

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3$  (237.2)

Ber. C 45.57 H 4.67 N 29.53

Gef. C 45.89 H 4.69 N 29.39

7-Amino-5-hydroxy-2-methyl-2,3-dihydrothieno[3,2-g]pteridin (VI)—1.3 g 6-( $\beta$ -Hydroxypropyl)isoxanthopterin wurden mit 20 g Thioacetamid verrieben und unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre und Rühren bei 135° geschmolzen. Nach 10–15 Min. wurde 800 mg P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> zugesetzt und die Schmelze 10 Min. unter langsamem Rühren bei 130–135° gehalten; dabei entwickelte sich H<sub>2</sub>S. Die Schmelze wurde nochmals mit 800 mg P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> versetzt, unter Rühren bei 125–130° 10 Min. erhitzt, darauf 400 mg P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> zugegeben und unter kräftigem Rühren bei 120° 10 Min. erhitzt. Die Schmelze wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in eine Schale gegossen, nach dem Abkühlen zerkleinert, 5 mal mit je 100 cm Wasser und 3 mal mit je 100 ccm Aceton gewaschen und i. Vak. getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wurde in 800 ccm N/10 NaOH gelöst und die Lösung in 240 ccm 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingetragen. Dabei

schieden sich größere Mengen dunkelbrauner Flocken aus, die abzentrifugiert und mit 100 ccm Wasser gewaschen wurden. Die wäbr. Lösung wurde mit 3 mal 100 ccm Äther ausgeschüttelt und danach 10 N NaOH bis zur alkalischen Reaktion (pH 9) zugegeben. Man chromatographierte an Dowex 1×8 (HCO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 90×150 mm, 200–400 mesh). Der Ausgangsmaterial wurde zuerst mit 0.05 M wäbr. HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub> (pH 6.8) und dann der gesuchte Stoff mit 0.05 M wäbr. HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub> (pH 5–3) eluiert. Das gewünschte Eluat (25 Liter) (mit Ammoniak, pH 12) wurde auf eine Säule von 55 mm Durchmesser und 100 mm Länge mit Dowex 1×8 (HCO<sub>2</sub><sup>-</sup>) gegeben. Nach dem Waschen mit 5 Liter Wasser wurde der Stoff mit 5 Liter 0.2-proz. wäbr. Ameisensäure eluiert. Das Eluat (4 Liter) wurde mit Ammoniak neutralisiert (pH 8) und i. Vak. bis zu 250 ccm eingedampft. Der entstandene Niederschlag wurde einmal durch kurzes Erwärmen (70°) gelöst und über Nacht im Kühlschrank stehengelassen. Die abgeschiedenen Kristalle wurden abzentrifugiert, in 100 ccm 0.1 N NaOH gelöst, nach Filtrieren mit Salzsäure neutralisiert (pH 6) und wie oben auskristallisiert. Man wusch mit Wasser, Äthanol und Äther und trocknete i. Vak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 350 mg (25%) gelbe Kristalle.

$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_5\text{OS}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (253.2)

Ber. C 42.69 H 4.38 N 27.67

Gef. C 42.48 H 4.13 N 27.48

Acetylierung—25 mg 7-Amino-5-hydroxy-2-methyl-2,3-dihydrothieno[3,2-g]pteridin wurden mit 15 ccm siedenden Acetanhydrid versetzt. Es wurde 1 Stde. unter Rückfluß aufgekocht, von Ungelöstem heiß abfiltriert und das überschüss. Acetanhydrid bei 12 Torr abdestilliert. Der Rückstand wurde in heißem Methanol aufgenommen, durch eine Fritte filtriert und i. Vak. auf 2 ccm eingeeengt. Zusatz von Petroläther (10 ccm) und Stehenlassen bei –30° über Nacht ergab 18 mg gelbe Kristalle, die mit Petroläther gewaschen und i. Vak. bei 105° 12 Std. getrocknet wurden. Schmp. 299–301° (Zers.).

Massenspektrum: Molekular Peak b. m/e 277.

$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$  (277.2)

Ber. C 47.65 H 4.00 N 25.26

Gef. C 47.34 H 3.85 N 25.09

7-Amino-5-hydroxy-2-methylthieno [2, 3-g] pteridin (XIV)—362 mg 7-Amino-5-hydroxy-2-methyl-2, 3-dihydrothieno[2, 3-g]pteridin in 40 ccm Eisessig wurden bei 80° 2 Stdn. mit 140 mg SeO<sub>2</sub> erhitzt und nach Abkühlen mit einer berechneten Menge Wasser versetzt. Man zentrifugierte den entstandenen Niederschlag ab, wusch mit Wasser und löste in 60 ccm 0.1 N NaOH. Nach Abfiltrieren wurde das Filtrat auf eine Säule von 55 mm Durchmesser und 55 mm Länge mit Florisil gegeben. Die Säule wurde mit verdünnter Essigsäure, danach mit Wasser gewaschen und die Substanz mit Aceton/1-proz. Ammoniak (1:1) eluiert. Das Eluat (500 ccm) wurde i. Vak. zur Trockne abdestilliert, der Rückstand in 40 ccm 0.1 N NaOH gelöst, das Ungelöste abfiltriert und das Filtrat mit 1 N Essigsäure neutralisiert. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen. Ausb. 154 mg (42.6%).

UV:  $\lambda_{\max}^{0.1 N NaOH}$  ( $\epsilon$ ), 240, 268, 396 m $\mu$ ,  
(19,100, 25,600, 9,480).  
 $\lambda_{\max}^{0.1 N HCl}$  ( $\epsilon$ ), 250, 275, 340, 367 m $\mu$ ,  
(20,800, 26,100, 7,960, 8,500).

C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>OS · H<sub>2</sub>O (251.2)

Ber. C 43.03 H 3.61 N 27.88  
Gef. C 44.36 H 3.06 N 27.87

7-amino-3-bromo-5-hydroxy-2-methylthieno [3, 2-g] pteridin—Zu einer Suspension von 22 mg 7-Amino-5-hydroxy-2-methylthieno[3, 2-g] pteridin in 15 ccm Eisessig wurde überschüss. Brom gegeben und nach 14 stdg. Rühren bei Raumtemp. der Niederschlag abzentrifugiert. Ausb. 18 mg (61.9%). Zur Analyse wurde das Produkt 2 mal aus Äthanol umkristallisiert.

C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>N<sub>5</sub>OSBr (312.1) Ber. Br 25.60  
Gef. Br 26.50

7-Amino-3-äthylthio-5-hydroxy-2-methylthieno[3, 2-g]pteridin (XIII)—Zu einer Lösung von Äthylmercaptan (22.5 ccm) in absol. Methanol (40 ccm) wurden 2 g Natrium und 200 mg 7-Amino-3-bromo-5-hydroxy-2-methylthieno[3, 2-g]pteridin gegeben und die Mischung im Bombenrohr 1 1/2 Stdn. bei 110° erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Lösung auf eine Säule von 75 mm Durchmesser und 200 mm Länge mit Cellulose gegeben. Entwickelt wurden die Chromatogramme mit Isopropylalkohol/1-proz. Ammoniak (2:1). Das gelbe Band wurde eluiert, das Eluat i. Vak. auf 5 ccm eingengt und mit Essigsäure angesäuert. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Wasser und mit heißem Äthanol gewaschen und i. Vak. getrocknet (Ausb. 53 mg). Das Rohprodukt wurde in 30 ccm

TABELLE II

Die Rf-Werte (Elektrophorese) von Urothion, seinen Abbauprodukten und synthet. Verbindungen.

Verbindung	Laufmittel <sup>1)</sup>			
	A	B	C	D
Urothion	0.41	0.38	0.14	—
nach KMnO <sub>4</sub> -Oxydation Va	0.02	0.05	0.86	43
nach Raney-Ni-Hydrierung VIIa	0.21	0.25	0.27	—
nach Raney-Ni-Hydrierung VIIIa	0.18	0.32	0.60	—
nach KJO <sub>4</sub> -Abbau von VIIIa	0.22	0.20	0.59	16
6-Carboxypterin-sulfonsäure V	0.02	0.05	0.86	43
7-Carboxypterin-sulfonsäure IV	0.02	0.05	0.85	42
$\alpha$ -(Pterinyl-6)-propionsäure XII	0.24	0.22	0.65	23
$\beta$ -(Pterinyl-6)-propionsäure XI	0.22	0.20	0.59	16
2-Methyldihydrothienopterin VI	0.55	0.30	0.23	—
6-Carboxypterin	0.15	0.14	0.47	26

1) Lösungsmittelsysteme: A=n-Butanol : Eisessig : Wasser (4 : 1 : 1), B=Isopropylalkohol : 1-proz. Ammoniak (2 : 1), C=4-proz. Na-citrat-Lösung, D=Wanderung der Pteridine zur Anode (in mm) nach 1 stdg. Elektrophorese bei 22.5 V/cm, Puffer: 0.05 M Essigsäure : 0.05 M Na-Acetat (1 : 1) (pH 4.65).

0.1 N NaOH gelöst, nach Abfiltrieren mit verd. Essigsäure neutralisiert und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert. Dieses Reinigungsverfahren wiederholte sich noch 2 mal. Ausb. 41 mg (21.8%).

UV:  $\lambda_{\max}^{0.1N \text{ NaOH}}$  ( $\epsilon$ ), 266, 398 m $\mu$ , (25,600, 9,000).  
 $\lambda_{\max}^{0.1N \text{ HCl}}$  ( $\epsilon$ ), 236, 278, 348 m $\mu$ ,  
 (24,100, 26,700, 10,100).

C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub> (293.2)

Ber. C 45.05 H 3.78 N 23.88 S 21.87

Gef. C 45.43 H 3.75 N 23.83 S 21.92

Das erhaltene Thienopteridin zeigte fast gleiche UV-Spektren wie das Urothion (Abbild. 1) und erwies sich auch in seinen sonstigen Eigenschaften mit dem Urothion als identisch (Pm-Reaktion, Dihydrothienopteridin-Bildung durch Behandlung mit Raney-Nickel, 6-Carboxy-7-sulfonylpterin-Bildung durch Permanganat-Oxydation (erhitzt)). Die R<sub>f</sub>-Werte von Urothion, seinen Abbauprodukten und synthet. Verbindungen sind in Tabelle II gezeigt.

Herrn Prof. Dr. T. Kobayashi und der Matsunaga Science Foundation, Tokyo, danken wir für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit recht herzlich. Ferner gilt unser Dank Herrn Professor Dr. F. Korte für seine stimulierende Diskussion und Herrn K. Ono, Sankyo AG., für die Mikroanalysen.

#### BIBLIOGRAPHIE

- (1) W. Koschara, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **263**, 78 (1940)
- (2) W. Koschara, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **277**, 284 (1943)
- (3) W. Koschara, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **279**, 44 (1943)
- (4) R. Tschesche, F. Korte, und G. Heuschkel, *Chem. Ber.*, **88**, 1251 (1955)
- (5) D.J. Brown, *J. Soc. Chem. Ind.*, **69**, 353 (1950)
- (6) J.H. Mowat, J.H. Boothe, B.L. Hutchings, E.L.R. Stokstad, C.W. Waller, R.B. Angier, J. Semb, D.B. Cosulich, und Y. SubbaRow, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 14 (1948)
- (7) R. Tschesche und A. Glaser, *Chem. Ber.*, **91**, 2081 (1958)