

Pteridine, LXV<sup>1)</sup>

## Ein neuer Strukturvorschlag für die roten Augenpigmente Drosopterin und Isodrosopterin aus *Drosophila melanogaster*

Norbert Theobald<sup>\*)</sup> und Wolfgang Pfeleiderer<sup>\*</sup>

Fachbereich Chemie der Universität Konstanz,  
Postfach 7733, D-7750 Konstanz

Eingegangen am 26. Januar 1978

---

Aufgrund neuer spektroskopischer Daten wird für die roten Augenpigmente Drosopterin und Isodrosopterin aus *Drosophila melanogaster* die neue Konstitution **6** vorgeschlagen. Sie basiert hauptsächlich auf <sup>1</sup>H-NMR-Spektren spezifisch methylierter Drosopterine, die analog dem Iso/Drosopterin synthetisiert wurden. UV-, CD- und Massenspektren der enantiomeren Pigmente stehen ebenso in Einklang mit der Konstitution **6**, wie ihr chemisches Verhalten und die pK<sub>a</sub>-Werte.

Pteridines, LXV<sup>1)</sup>

## A New Proposal for the Structure of the Red Eye Pigments Drosopterin and Isodrosopterin of *Drosophila melanogaster*

On the basis of new spectral data structure **6** is proposed for the red eye pigments drosopterin and isodrosopterin from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. This conclusion is mainly derived from <sup>1</sup>H-NMR spectra of specifically methylated drosopterins which were synthesized analogously to iso/drosopterin. All spectra of the enantiomeric pigments are in agreement with structure **6**, as are their chemical behavior and pK<sub>a</sub>-values.

---

Das Problem der Strukturaufklärung der Drosopterine – der roten Augenpigmente der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* – wird seit einigen Jahren in unserem Arbeitskreis untersucht<sup>2-7)</sup>. Von den vier bisher bekannten Pigmenten – Drosopterin, Isodrosopterin, Neodrosopterin und Aurodrosopterin – sind die beiden ersten als Enantiomerenpaar synthetisch zugänglich<sup>4)</sup>. Aufgrund der Synthese war für diese Pigmente eine Konstitution vorgeschlagen worden<sup>2-5)</sup>, die Drosopterin und Isodrosopterin als Atropisomere ausweist. Sowohl die Farbe als auch die hohen Rotatorstärken der CD-Spektren konnten sehr gut mit diesem Konstitutionsvorschlag (**10**) erklärt werden. Wegen ihrer Schwerlöslichkeit und -flüchtigkeit war es bisher jedoch nicht gelungen, brauchbare NMR- und Massenspektren der Drosopterine zu erhalten. Dies veranlaßte uns, das Problem trotz

<sup>\*)</sup> Teil der Dissertation N. Theobald, Univ. Konstanz 1976.

<sup>1)</sup> LXIV. Mitteil.: I. W. Southon und W. Pfeleiderer, Chem. Ber. **111**, 971 (1978).

<sup>2)</sup> H. Schlobach und W. Pfeleiderer, Helv. Chim. Acta **55**, 2518 (1972).

<sup>3)</sup> H. Schlobach und W. Pfeleiderer, Helv. Chim. Acta **55**, 2525 (1972).

<sup>4)</sup> H. Schlobach und W. Pfeleiderer, Helv. Chim. Acta **55**, 2533 (1972).

<sup>5)</sup> H. Schlobach und W. Pfeleiderer, Helv. Chim. Acta **55**, 2541 (1972).

<sup>6)</sup> W. Pfeleiderer, H. Schlobach und K. Rokos, Chimica **27**, 656 (1973).

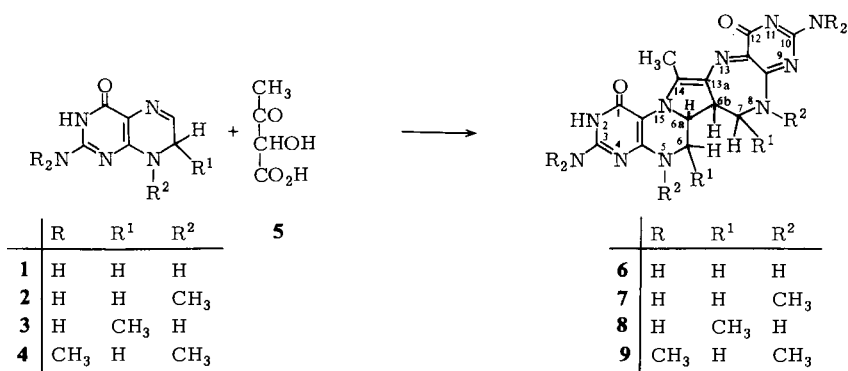
<sup>7)</sup> K. Rokos und W. Pfeleiderer, Chem. Ber. **108**, 2728 (1975).

der gelungenen Synthese weiter zu untersuchen, zumal Goto zeigen konnte, daß der Reaktionsablauf nicht eindeutig abgeklärt ist<sup>8)</sup>. Um zu besser löslichen und leichter flüchtigen Drosopterinen zu gelangen, wurden einerseits intakte Pigmente derivatisiert und andererseits spezifisch *N*-methylierte Drosopterine neu synthetisiert<sup>9)</sup>.

### Synthese der Drosopterine

Wie bereits berichtet<sup>4)</sup>, erfordert die Synthese des Iso-/Drosopterin-Gemisches (6) aus 7,8-Dihydropterin (1) und 2-Hydroxy-3-oxobuttersäure (5) die Einhaltung sehr spezieller pH-Bedingungen. Wir fanden, daß es vorteilhaft ist, nicht nur den pH-Wert mittels einer Glaselektrode zu kontrollieren, sondern ihn auch mittels eines pH-Statens genau zu regeln, da im Verlauf der Reaktion infolge unterschiedlicher *pK*-Werte der Ausgangsterpine und der Drosopterine Protonen verbraucht werden.

Bei der chromatographischen Untersuchung der Reaktionslösung konnten wir neben den Enantiomeren Drosopterin (6a) und Isodrosopterin (6b) auch das dritte Drosophila-Pigment Neodrosopterin in kleiner Menge entdecken. Dieses ist zu ca. 5% der Gesamtpigmentmenge vorhanden. Infolge seines sehr labilen Charakters<sup>7)</sup> gelingt seine Isolierung jedoch nur mit 1% Ausbeute, was trotzdem noch günstiger und einfacher ist als die Isolierung aus natürlichem Material.



Die Synthese der methylierten Drosopterine 7, 8 und 9 erfolgte analog der Stammsubstanz, indem von den entsprechend methylierten 7,8-Dihydropterinen (2, 3 und 4) ausgegangen wurde.

Die Darstellung des 5,8-Dimethyldrosopterins (7) aus 8-Methyl-7,8-dihydropterin (2)<sup>10)</sup> verlief ohne große Schwierigkeiten, wenn auch mit etwas geringerer Ausbeute als beim unmethylierten Drosopterin. 5,8-Dimethyldrosopterin und -isodrosopterin (7a und 7b) zeigten erwartungsgemäß größere *R<sub>F</sub>*-Werte bei der Chromatographie auf Cellulose und sind nur etwas besser löslich als die Stammsubstanz.

Sehr gute Löslichkeitseigenschaften besitzt hingegen das Hexamethyldrosopterin (9), dessen Gewinnung und Handhabung aufgrund einer gewissen Instabilität allerdings

<sup>8)</sup> K. Sugiura und M. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 1187.

<sup>9)</sup> N. Theobald und W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 841.

<sup>10)</sup> W. Pfeleiderer und R. Mengel, *Chem. Ber.* **104**, 2293 (1971).

Schwierigkeiten bereitete. Die Ausgangsverbindung, das  $N^2,N^2,8$ -Trimethyl-7,8-dihydropterin (**4**), synthetisierten wir durch elektrolytische Reduktion von  $N^2,N^2,8$ -Trimethylpterin in alkalisch-wäßriger Lösung. Die präparative Reduktion verlief jedoch nicht so glatt, wie dies die polarographischen Untersuchungen<sup>11)</sup> erhoffen ließen. Die Reaktion läßt sich noch recht gut im 0.1-g-Maßstab durchführen, jedoch nehmen bei Vergrößerung des Ansatzes die Nebenreaktionen stark zu. Dihydropterin **4** wurde wegen seiner Sauerstoffempfindlichkeit nicht isoliert und gereinigt, sondern sofort zur Synthese von **9** eingesetzt, das nach Säulenchromatographie an Cellulose zu 10% anfiel. Dieses Produkt erwies sich als das instabilste Derivat dieser Reihe. Es ist wesentlich oxidationsempfindlicher als die übrigen, so daß eine längere Lagerung nur bei  $-80^\circ\text{C}$  unter Schutzgas möglich ist.

Für die Darstellung des 6,7-Dimethyldrosopterins (**8**) wurde vom 7-Methyl-7,8-dihydropterin (**3**) ausgegangen, das in Analogie zum 7,8-Dihydropterin (**1**) nach Wood<sup>12)</sup> hergestellt wurde und als Racemat vorlag.

Trotz vielfältiger Bemühungen gelang es nicht, das 7,7-Dimethyl-7,8-dihydropterin<sup>13)</sup> zum entsprechenden Tetramethyldrosopterin umzusetzen, was vermutlich auf sterische Effekte durch die beiden 7-Methyl-Substituenten zurückzuführen ist.

### NMR-Spektren der Drosopterine

Trotz der FT-Technik bereitete die Wahl des Lösungsmittels für die NMR-Spektren immer noch große Schwierigkeiten.  $\text{D}_2\text{O}$  und  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  bewährten sich am besten, sind jedoch keineswegs ideal. Durch Verwendung der besser löslichen HCl-Salze anstelle der freien Basen gelang es dann erstmals, brauchbare NMR-Spektren der Drosopterine

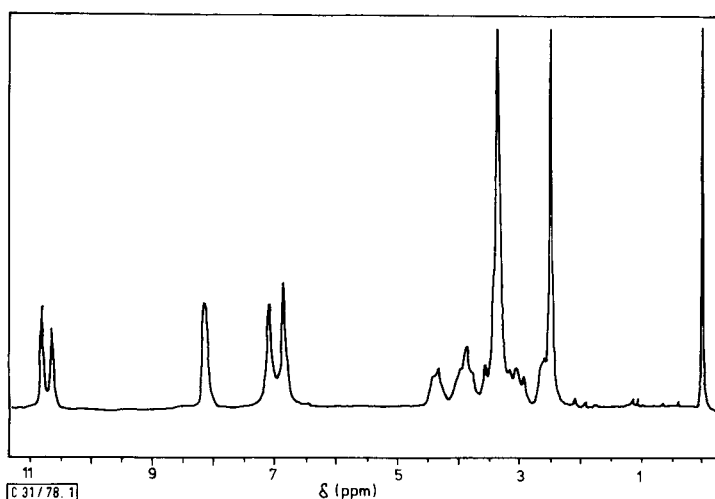


Abb. 1.  $^1\text{H}$ -FT-NMR-Spektrum des Isodrosopterins und Drosopterins (**6**) in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$

<sup>11)</sup> H. Braun und W. Pfeleiderer, Liebigs Ann. Chem. **1973**, 1082 und 1099.

<sup>12)</sup> A. Stuart, H. C. S. Wood und D. Duncan, J. Chem. Soc. C **1966**, 285.

<sup>13)</sup> Wellcome Foundation Ltd. (Erf. H. C. S. Wood, A. Stuart, A. C. W. Curran und S. Al Hassan), Brit. Pat. 1 363 067 (14. 8. 1974) [Chem. Abstr. **82**, 3771 f (1975)].

zu erhalten. Alle übrigen Lösungsmittel (DCI, Trifluoressigsäure, DMF, HMPT) führten zu teilweiser Zersetzung oder lösten die Drosopterine nicht gut genug. Pyridin konnte nur für das sehr gut lösliche Hexamethyldrosopterin (**9**) benutzt werden.

Das in Abb. 1 wiedergegebene NMR-Spektrum des Iso-/Drosopterins (**6**) in  $[D_6]$ DMSO zeigt hauptsächlich die N–H-Signale der Pigmente. Durch die Integration und den Vergleich mit bekannten Pteridin-NMR-Spektren der Literatur können die Signale bei  $\delta = 8.2$  zwei N-8-Protonen und die bei 6.9 und 7.1 zwei  $NH_2$ -Gruppen der ursprünglichen Pterinringe zugeordnet werden. Während die Anzahl der Protonen eindeutig das Vorliegen von zwei Pterineinheiten in **6** anzeigt, weisen die kleinen Differenzen in den chemischen Verschiebungen auf eine nicht symmetrische Struktur hin. Es liegt nahe, die beiden Signale bei  $\delta = 10.7$  und  $10.9$  den noch fehlenden N-3-Amidprotonen der Pyrimidin-Ringe zuzuordnen. Da jedoch im alten Strukturvorschlag ein cheliertes N-5-Proton formuliert ist, muß zunächst auch eine solche Zuordnung in Betracht gezogen werden.

Wie Philipsborn am Beispiel des Erythropterins zeigen konnte<sup>14)</sup>, ist eine Unterscheidung zwischen einem chelierten und einem unchelierten Proton möglich, wenn man eine Spur Trifluoressigsäure zu der NMR-Probe gibt. Im Falle des Drosopterins werden die Signale bei  $\delta = 11$  nach Zugabe von  $1 \mu l$  Trifluoressigsäure stärker als alle anderen Protonen verbreitert, was stark gegen das Vorliegen eines chelierten Protons spricht.

Die Zugabe einer Spur Säure zeigte einen weiteren sehr nützlichen Effekt: das intensive Wassersignal bei  $\delta = 3.4$  wird nach 6.2 verschoben, und die vorher zum größten Teil verdeckten C–H-Signale zwischen 2.7 und 4.5 können nun beobachtet werden. Das äußerst komplexe Aufspaltungsmuster läßt sich jedoch nicht ohne weitere Informationen analysieren.

Die Schärfe des Signals bei  $\delta = 2.55$  läßt vermuten, daß es sich hier nicht nur um das  $[D_6]$ DMSO-Signal handelt, sondern daß dieses von einem intensiveren Singulett über-

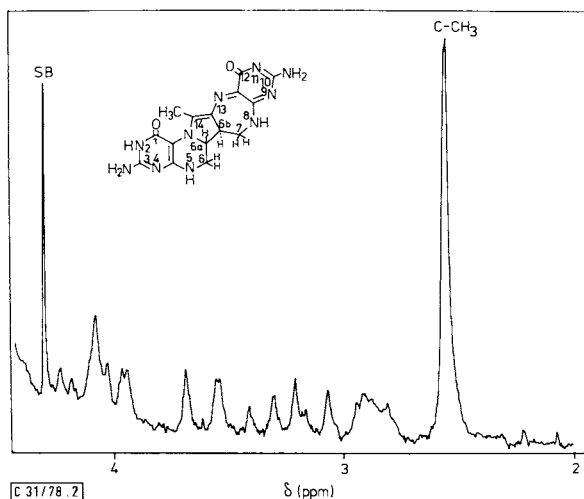


Abb. 2. FT-NMR-Spektrum von Iso-/Drosopterin (**6**) in  $D_2O$

<sup>14)</sup> W. v. Philipsborn, H. Stierlin und W. Traber, *Helv. Chim. Acta* **46**, 2596 (1963).

lagert ist. Das Spektrum in  $D_2O$  bestätigt dies. Die Frage, ob es sich hierbei um eine Methyl-Gruppe handelt, kann anhand der Integration nicht beantwortet werden, da eine genaue Signalzuordnung nicht möglich ist.

Anders liegt der Fall jedoch bei den *N*-methylierten Drosopterinen **7** und **9**, da hier aus dem Syntheseweg bekannt ist, daß diesen Verbindungen eine bestimmte Anzahl *N*-Methylgruppen zu eigen ist, die als interner Integrationsstandard benutzt werden können. Auf diese Weise ergibt sich, daß das Singulett bei  $\delta = 2.55$  drei Protonen, d. h. einer Methylgruppe, entspricht.

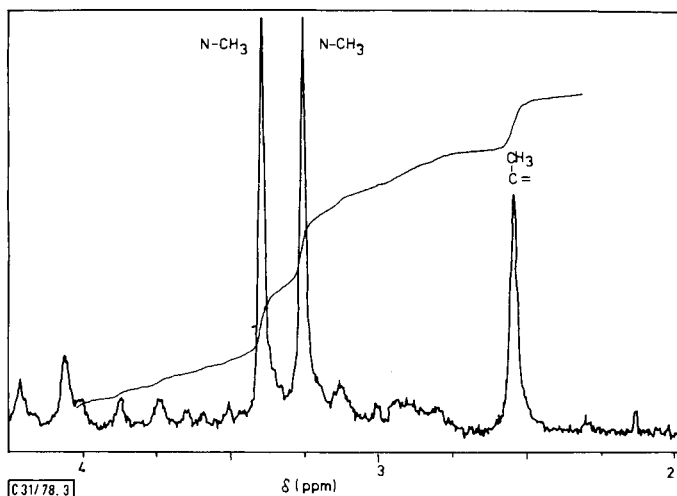


Abb. 3. FT-NMR-Spektrum von 5,8-Dimethyldrosopterin/-isodrosopterin (**7**) in  $D_2O$

Der Grund dafür, daß diese Methylgruppe bei früheren Arbeiten nicht gefunden wurde<sup>5)</sup>, liegt in ihrer erstaunlichen Acidität. So erfolgt ein H/D-Austausch in  $D_2O$  bereits bei pH 8 und Raumtemp. und in schwach saurer Lösung beim Erwärmen auf  $50^\circ C$ . Um das intensive Wassersignal im NMR-Spektrum möglichst klein zu halten, war das Drosopterin bei der früheren Arbeit zuvor mit verdünntem DCl behandelt und im Rotationsverdampfer eingengt worden<sup>5)</sup>.

Sowohl die chemische Verschiebung als auch die Acidität sprechen für eine Methylgruppe in Nachbarschaft einer Ketogruppe oder einer anderen stark elektronenziehenden Gruppierung vom Typ  $H_3C-C=X$ .

Während die *N*-Methylgruppen der Drosopterine **7** und **9** für die Identifizierung der Methylgruppe äußerst brauchbar waren, erwiesen sie sich bei der Analyse der übrigen C-H-Signale infolge Überlappung als sehr hinderlich.

Da wir vermuteten, daß an dem komplexen Aufspaltungsmuster der C-H-Signale die ursprünglichen C-7-Protonen als AB-Systeme beteiligt sind, konzentrierte sich unser Interesse ganz besonders auf das 6,7-Dimethyldrosopterin (**8**), in dem die AB-Systeme nun durch AX-Systeme der  $CH-CH_3$ -Gruppierung ersetzt sind. Wie Abb. 4 zeigt, ist das NMR-Spektrum klar strukturiert und das Aufspaltungsmuster ist recht gut analysierbar.

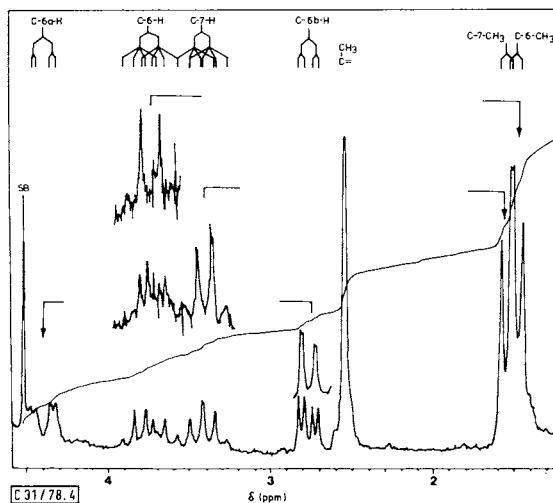
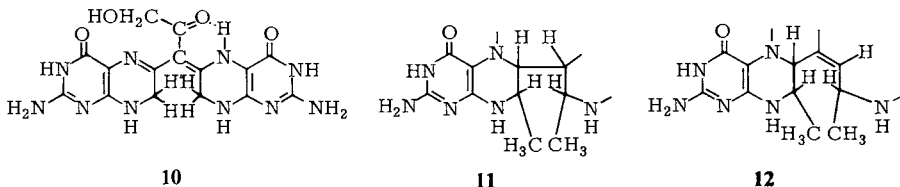


Abb. 4. FT-NMR-Spektrum des 6,7-Dimethylhydropterins (**8**) in  $D_2O$

Überraschenderweise sind neben den erwarteten Signalen bei  $\delta = 1.5$  und  $3-4$  ( $CH-CH_3$ ) zwei weitere Protonen bei  $2.77$  und  $4.40$  sichtbar, welche nach der früher vorgeschlagenen Konstitution **10** überzählig sind. Aus dem Kopplungsmuster und Doppelresonanzexperimenten geht hervor, daß diese beiden Protonen mit den Wasserstoffen bei  $\delta = 3-4$  ( $CH-CH_3$ ) koppeln. Da sie ferner mit kleiner Kopplungskonstanten ( $J_{6a,6b} = 3.3$  Hz) auch untereinander koppeln, müssen die entsprechenden C-Atome entweder direkt verknüpft oder aber durch eine Doppelbindung getrennt sein, wie dies in den Teilstrukturen **11** und **12** zum Ausdruck kommt.



Das Auftreten von zwei C-6-Protonen der Pteridinskelette hat nun entscheidende Konsequenzen für die Struktur der Drosopterine. Während nach dem alten Strukturvorschlag **10** diese C-Atome Bestandteil des chromophoren Systems waren, hat dieses jetzt jedoch mit zwei zusätzlichen Protonen an diesen Stellen seinen eigentlichen Sinn verloren.

Neue Informationen über den wirklichen Chromophor waren schließlich nach katalytischer Hydrierung mit  $PtO_2/H_2$  erhältlich, bei der die Drosopterine zu Tetrahydroverbindungen reduziert werden. Da bei dieser Reaktion das Pigment entfärbt wird<sup>15)</sup>, war anzunehmen, daß die Reduktion am Chromophor stattfindet, was Einblick in den

<sup>15)</sup> H. Schlobach, Dissertation, Univ. Konstanz 1972, S. 103.

bislang unbekanntem Teil des Moleküls erhoffen ließ. Wir reduzierten zunächst das 6,7-Dimethylhydropterin (**8**) mit Deuterium und  $\text{PtO}_2$ , um ein möglichst einfaches Spektrum zu erhalten und die Änderungen der chemischen Verschiebungen beobachten zu können, die die vorhandenen Protonen bei der Reduktion erfahren.

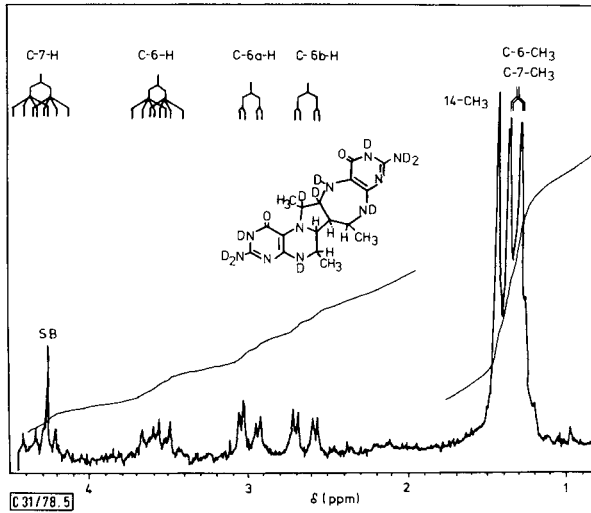


Abb. 5. FT-NMR-Spektrum von Tetradeuterio-6,7-dimethylhydropterin/-isodropterin in  $\text{D}_2\text{O}$

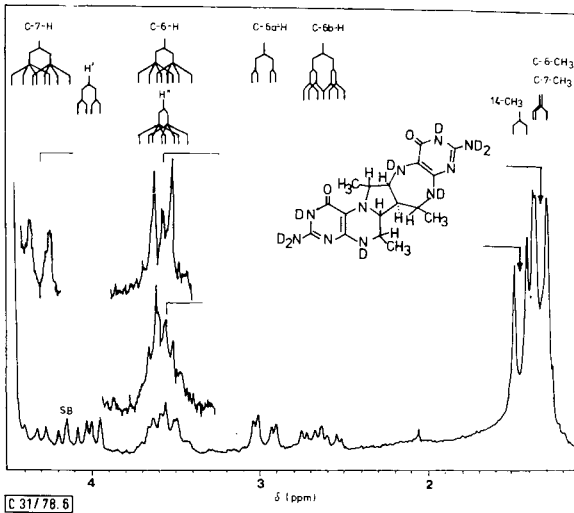
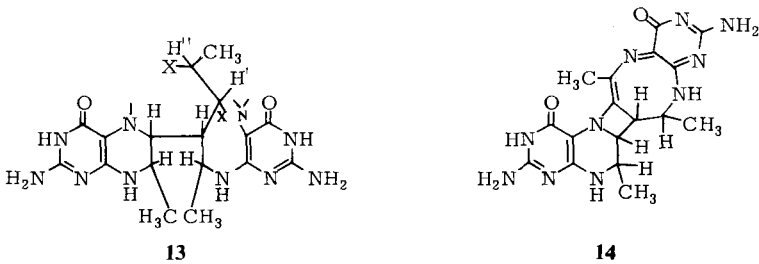


Abb. 6. FT-NMR-Spektrum von Tetrahydro-6,7-dimethylhydropterin/-isodropterin in  $\text{D}_2\text{O}$

Wie Abb. 5 zeigt, treten z. T. sehr große Hochfeldverschiebungen ein, doch bleiben die Kopplungsverhältnisse bestehen. Aus diesem Grunde kann eine vinyliche Kopplung der C-6a,6b-Protonen ausgeschlossen werden. Zusammen mit der Tatsache, daß beim oxidativen Abbau des Drosopterin Pterin-6-carbonsäure<sup>4,8)</sup> entsteht, kann damit die Teilstruktur **11** für das 6,7-Dimethyldrosopterin (**8**) als gesichert gelten.

Nach der Reduktion mit H<sub>2</sub> treten zwei neue Protonen im NMR-Spektrum in D<sub>2</sub>O auf. Da jedoch 2 Moleküle Wasserstoff bei der Hydrierung verbraucht werden, müssen formal zwei Heteroatom-Kohlenstoff-Doppelbindungen reduziert worden sein. Die chemischen Verschiebungen der neu zu beobachtenden Protonen bei  $\delta = 5.37$  und  $4.02$  bestätigen das Vorliegen von CH-X-Protonen (X = O oder N).

Der wohl augenfälligste Unterschied zwischen den beiden Spektren in Abb. 5 und 6 ist das verschiedene Kopplungsmuster des Protons bei  $\delta = 2.64$ . Aus Abb. 6 folgt unmittelbar, daß dieses Proton einem der neuen Wasserstoffatome H' benachbart sein muß, das bei  $\delta = 4.02$  erscheint und weiterhin mit 4.6 Hz mit dem anderen neuen Proton H'' koppelt. Das zum Oktett aufgespaltene H'' ist von dem C-6-Wasserstoff überlagert und läßt so das sehr komplexe Multipllett bei  $\delta = 3.57$  entstehen. Die C-14-Methylgruppe wird erwartungsgemäß im Hochfeldbereich bei  $\delta = 1.45$  als Dublett gefunden. Anhand dieser Daten läßt sich die Teilstruktur **11** weiter zu **13** ergänzen.



Unklar ist jetzt nur noch die Frage nach der weiteren Verknüpfung und der Natur der Heteroatome X, für die Sauerstoff oder Stickstoff diskutiert werden müssen. Letzterem muß dabei der Vorzug gegeben werden, da die massenspektroskopischen Untersuchungen<sup>\*)</sup> am Iso-/Drosopterin eine Molekülmasse von 368 ergeben und für das Vorliegen von nur 2 Sauerstoffatomen und eine Summenformel C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>10</sub>O<sub>2</sub> sprechen. Es bleiben somit nur die Strukturen übrig, in denen die X-Atome in **13** die ursprünglichen N-5-Atome der bei der Synthese verwendeten Pterine darstellen, wodurch schließlich nur noch die beiden Möglichkeiten **14** und **8** denkbar sind. Anhand der bekannten physikalischen Daten ist es nicht leicht, zwischen diesen beiden Strukturen zu unterscheiden, doch erscheint uns aus sterischen und energetischen Gründen die Kombination 4- und 8-gliedriger Ring weniger günstig als die Ausbildung eines kondensierten Systems aus Pyrrolin- und Dihydrodiazepinring. Wir schlagen aus diesen Gründen für das Drosopterin und das enantiomere Isodrosopterin nunmehr die Konstitution **6** vor, die sämtlichen bis jetzt ermittelten physikalischen und chemischen Fakten gerecht wird.

Da diese dissymmetrische Struktur **6** keine zwei gleichen Pterinringe mehr aufweist, findet sich nun leicht eine Erklärung für die unterschiedlichen Verschiebungen der N-

<sup>\*)</sup> N. Theobald und W. Pfeleiderer, in Vorbereitung.



Protonen beim Drosopterin, bzw. der N-Methylgruppe der methylierten Derivate, und es ist ferner unmittelbar einzusehen, warum die C-6a- und C-6b-Protonen ein sehr komplexes NMR-Spektrum zeigen. Erklärt werden können ferner die großen Unterschiede in der chemischen Verschiebung dieser Protonen im 6,7-Dimethyldrosopterin (**8**). Das C-6a-Proton ( $\delta = 4.40$ ) wird durch seine Nachbarschaft zum N-15 stark entschirmt, da dieser im neutralen pH-Bereich Teil eines positiv geladenen Amidin-Systems ist; das C-6b-Proton hingegen weist in  $\alpha$ -Stellung nur Kohlenstoffatome auf und erscheint daher bei höherem Feld ( $\delta = 2.77$ ). Die Reduktion des mesomeren Chromophors führt erwartungsgemäß zu einer starken Hochfeldverschiebung des C-6a-Protons, das dann bei  $\delta = 2.98$  auftritt.

Aufgrund der zwei asymmetrischen C-Atome sind zwei Enantiomerenpaare denkbar, in denen die Wasserstoffatome der Verknüpfungsstellen jeweils *cis* oder *trans* zueinander stehen. Wie Molekülmodelle mit ebenem Fünfring zeigen, beträgt der Torsionswinkel der beiden Wasserstoffatome von C-6a und C-6b für die *cis*-Verknüpfung  $0-10^\circ$ , während sich für die *trans*-Stellung  $120^\circ$  ergeben. Die aus dem 6,7-Dimethyldrosopterin (**8**) ermittelte Kopplungskonstante von 3.3 Hz spricht recht eindeutig für *trans*-Verknüpfung.

Beim 6,7-Dimethyldrosopterin (**8**) sind aufgrund der beiden weiteren chiralen Zentren an C-6 und C-7 insgesamt 16 Isomere (8 Enantiomerenpaare) möglich, von denen jedoch nur ein Enantiomerenpaar bei der Synthese entstand bzw. abgetrennt wurde. Die große Kopplung von 10.8 Hz zwischen C-6 und C-6a ist nur mit einer *trans*-axialen Stellung dieser Wasserstoffatome erklärbar, so daß die C-6-Methylgruppe pseudoäquatorial steht. Die Größe der Kopplung zeigt ferner, daß der Sechsring recht starr sein muß<sup>16)</sup>, was auch das Dreiding-Modell bestätigt. Im Gegensatz dazu ist der Siebenring dem Modell nach sehr flexibel und kann sehr leicht Konformationsumwandlungen eingehen. Aus diesem Grund kann man aus der Kopplungskonstanten von 7.5 Hz zwischen C-6b-H und C-7-H keine Aussage über die Konfiguration von C-7 in **8** machen.

## UV- und CD-Spektren

Die Flexibilität des Siebenringes wird auch durch die UV-VIS-Spektren der Drosopterine bestätigt, da die langwellige Absorptionsbande sehr breit ist (Abb. 7).

SCF-Rechnungen zeigen, daß das beobachtete Elektronenspektrum mit der vorgeschlagenen Struktur **6** vereinbar ist. Das berechnete Absorptionsspektrum ist stark von der Verdrillung des Moleküls abhängig<sup>17)</sup>. Die UV-VIS-Spektren der methylierten Drosopterine unterscheiden sich nur durch eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Bathochromie von den natürlichen Pigmenten. Erwartungsgemäß ist sie beim 6,7-Dimethyldrosopterin (**8**) mit 3–4 nm sehr gering und beim Hexamethyldrosopterin (**9**) mit 20 nm am größten (Tab. 1).

Aus der pH-Abhängigkeit der UV-VIS-Spektren lassen sich auch die  $pK$ -Werte der Drosopterine ermitteln, die zwanglos durch die vorgeschlagene Konstitution erklärt werden. Beim Iso-/Drosopterin (**6**) liegen zwei Paare überlappender  $pK_a$ -Werte im sauren bzw. schwach alkalischen pH-Bereich vor, so daß eigentlich nur die definierten Spektren der reinen Tri- (pH  $-1.5$ ) und Monokationen (pH  $3.5-6$ ) sowie des instabilen

<sup>16)</sup> R. Weber und M. Viscontini, Helv. Chim. Acta **58**, 1772 (1975).

<sup>17)</sup> E. Daltrozzo, Univ. Konstanz, priv. Mitteilung.

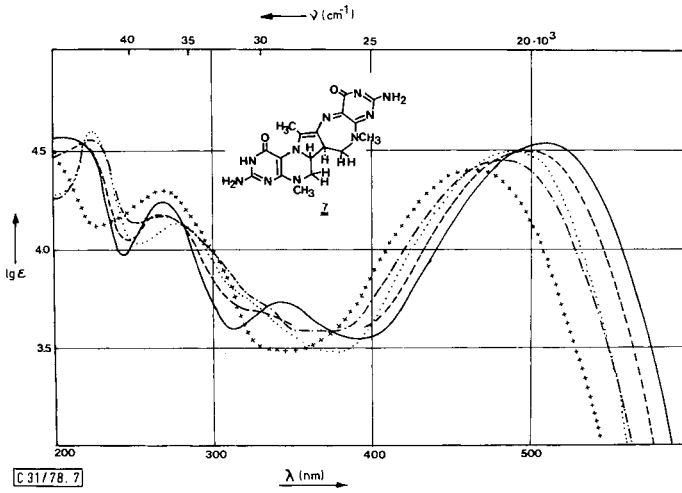
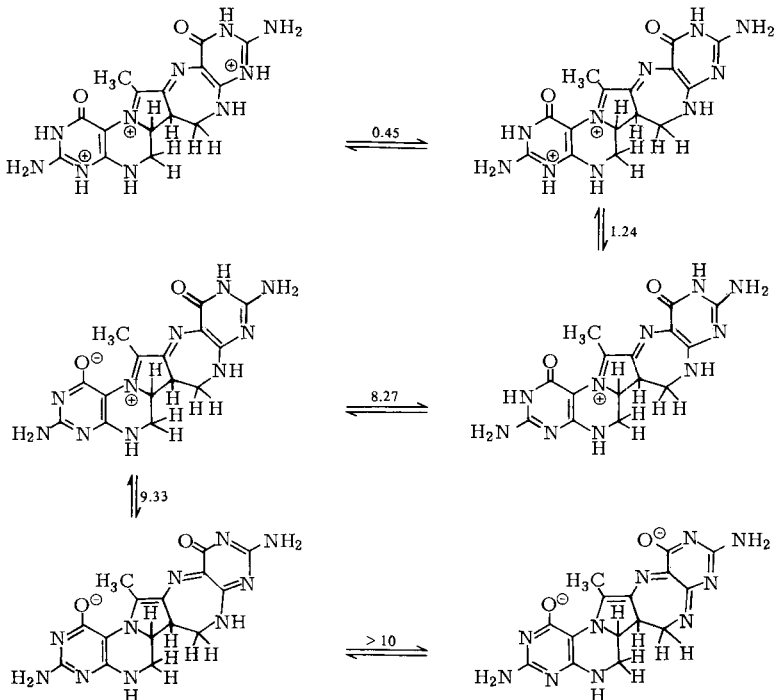


Abb. 7. UV-VIS-Spektrum des 5,8-Dimethylhydropterins (7) bei pH  $-2.0^{+++}$ , pH 0.7  $-\cdot-\cdot-\cdot-$ , pH 7  $\cdots\cdots\cdots$ , pH 9.5  $-----$  und pH 12  $————$



Tab. 1. Physikalische Daten von Iso- und Drosopterin und ihren Methyl-Derivaten

Isodrosopterin/ Drosopterin	pK- Wert in H <sub>2</sub> O	UV-Absorptionsspektren		pH- Wert	Mole- kürlart	$\lambda_{(nm)}$	CD-Spektren ** in Wasser						
		$\lambda_{max}$ (nm)	lg $\epsilon^*$				Isodrosopterin	Drosopterin					
6	0.45	262	[295] 455	4.24	[3.94]	4.34	-1.5	++	208	225	+68 500	-65 000	
	1.24	219	[325] 470	4.45	[3.64]	4.36	0.8	++	248	270	+13 800	-14 000	
	8.27	220	[324] 478	4.55	[3.72]	4.42	5.0	+	286	320	+7 000	-6 500	
	9.33	216	265 [330] 485	4.51	4.13 [3.64]	4.42	8.8	0	[385]		[-12 000]	+82 000	
	>10	210	264 [330] 493	4.55	4.16 [3.64]	4.43	10.0	-	478		+87 000	-87 000	
		210	265 337 502	4.87	4.24 3.79	4.54	13.0	-					
5,8-Dimethyl- (7)	0.41	270	[305] 465	4.30	[3.83]	4.39	-2.0	++	218	235	+56 000	-40 000	
	1.04	226	271 [330] 482	4.56	4.17 [3.75]	4.45	0.7	++	254	275	+2 000	-68 000	
	9.05	220	278 [330] 488	4.60	4.14 [3.74]	4.49	7.0	+	294	325	+6 000	-110 000	
	10.70	226	268 [325] 498	4.55	4.20 [3.70]	4.50	9.5	0	384	405	+11 000	-52 000	
		269	340 510	4.25	3.74	4.54	12.0	-	490		+8 000	-42 000	
		262	458	4.22	4.30	4.30	-1.5	++	209	225	+74 000	-103 000	
6,7-Dimethyl- (8)	0.53	234	[322] 472	4.10	[3.64]	4.33	0.8	++	248	270	+12 000	-86 000	
	9.42	235	[322] 481	4.07	3.75	4.40	5.0	+	285	318	+8 600	-57 000	
		267	[322] 486	4.06	[3.66]	4.38	8.8	0	[380]		[-14 000]	+66 000	
		265	330 497	4.11	3.68	4.41	10.0	-	483				
		265	333 504	4.14	3.70	4.42	13.0	-					
		236	[280] 468 585	4.51	[4.02]	4.28	4.23	-1.5	++	219	241	+35 000	-37 000
N <sup>3</sup> ,N <sup>10</sup> ,N <sup>10</sup> ,5,8-Hexamethyl- (9)	0.53	234	[290] 485 583	4.55	[3.95]	4.36	3.96	0.0	++	258	277	-9 000	+15 000
	9.42	235	[282] [330] 498	4.59	[4.01]	[3.81]	4.51	7.0	+	298	327	-55 000	+3 000
		226	275 [330] 521	4.49	4.03 [3.73]	4.55	10.5	0	[385]		[-10 000]	+47 000	
		273	346 529	4.08	3.75	4.57	13.0	-	500		+53 000	-48 000	

+++ = Triktion; ++ = Diktion; + = Monokation; 0 = Neutralmolekül; - = Monoanion; -- = Dianion.

\* Die lg  $\epsilon$ -Werte wurden auf der Basis der C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>-Analysen der angenommenen Dihydrate - gefundener unverbrennbarer Rückstand - berechnet.

\*\* Genauigkeit  $\pm 10\%$ .

[ ] Schulter.

Monoanions ( $\text{pH} > 11.5$ ) erhalten werden können. Das Dikation ( $\text{pH} 0.8$ ) und das Neutrale Molekül ( $\text{pH} 8.8$ ) ergeben dagegen Mischspektren mit Anteilen von weiteren Molekülformen. Die Neutralform erscheint noch in anderer Hinsicht interessant, da sie aufgrund der vorhandenen Strukturelemente sinnvollerweise als Zwitterion formuliert werden sollte, denn die Deprotonierung des Monokations wird vermutlich an N-2 und nicht an N-11 erfolgen, da der  $\text{pK}_a$ -Wert 8.27 eher einer Amidfunktion im Pteridin-System als einer Amidiniumstruktur zuzuordnen ist.

Beim 5,8-Dimethyldrosopterin (7) ist die Protonierung an den Pyrimidin-Stickstoff N-4 und N-9 sterisch etwas erschwert, was einer Verschiebung der  $\text{pK}_s$ -Werte ins Saure entspricht. Verstärkt wird dieser Effekt noch beim Hexamethyldrosopterin (9) beobachtet, denn hier ist die zweite Protonierung bereits so stark behindert, daß eine Protonierung an anderer Stelle konkurrenzfähig wird, die bei den übrigen Drosopteren nicht beobachtet werden kann. Wie Abb. 8 zeigt, verändert sich hierbei das UV-VIS-Spektrum sehr drastisch, und im langwelligen Bereich treten nun zwei Absorptionsbanden auf mit Maxima bei 468 und 585 nm. Der Grund für dieses veränderte Spektrum dürfte in der Protonierung von N-13 liegen, da SCF-Rechnungen bei Positivierung an diesem Zentrum das Auftreten von zwei Absorptionsbanden fordern<sup>17)</sup>.

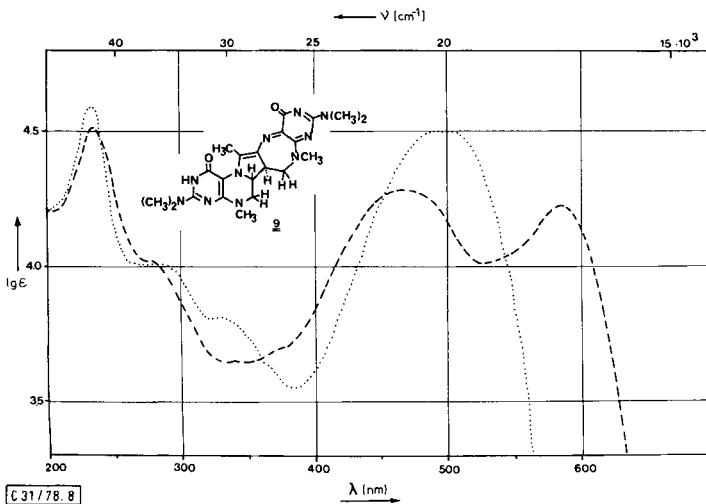


Abb. 8. UV-VIS-Spektrum des Hexamethyldrosopterins (9) bei  $\text{pH} 7 \dots\dots$  und  $\text{pH} -1.5 \text{-----}$

Durch den nicht ebenen Siebenring ist das chromophore System der Drosoptere verdrillt. Der dadurch bedingte inhärent dissymmetrische Chromophor steht ebenfalls in Einklang mit den beobachteten hohen Rotatorstärken der CD-Spektren (Abb. 9). Der Einfluß der verschiedenen Methylgruppen auf die Verdrillung und die CD-Spektren ist dabei von untergeordneter Bedeutung.

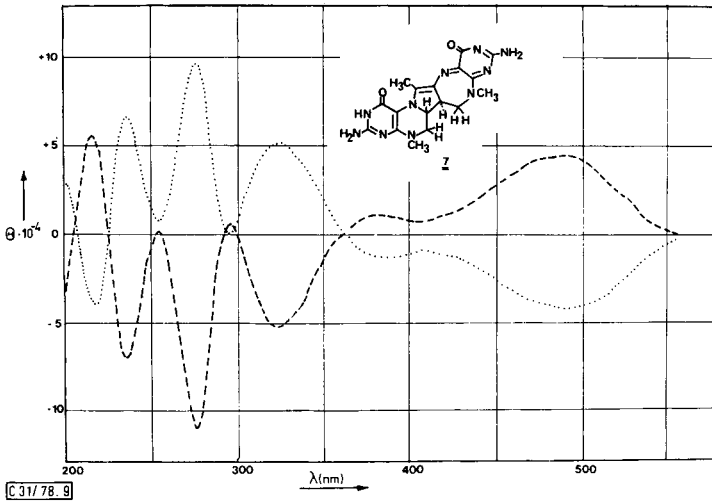


Abb. 9. CD-Spektren des 5,8-Dimethyldrosopterins (7) ..... und 5,8-Dimethylisdrosopterins (7) ----- in Wasser

Die Frage nach dem Reaktionsmechanismus der Drosopterin-Synthese kann zur Zeit nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Wegen der ungewöhnlichen Struktur des Reaktionsproduktes möchten wir jedoch einen Mechanismus zur Diskussion stellen, der die bisher bekannten Fakten recht gut erklärt. Goto<sup>8, 18, 19)</sup> beobachtete, daß bei der Reaktion von 7,8-Dihydropterin und  $\alpha$ -Hydroxy- $\beta$ -oxobuttersäure nicht nur Drosopterin und Isdrosopterin, sondern auch Sepiapterin (**16**) und das tautomere 6-(1-Hydroxy-2-oxopropyl)-7,8-dihydropterin entstehen. Bei Anwesenheit von Zn-Ionen dagegen bilden sich nur die beiden letztgenannten Verbindungen.

Der vorgeschlagene Mechanismus wird im ersten Schritt durch eine nucleophile Addition der CH-aciden  $\alpha$ -Hydroxy- $\beta$ -oxobuttersäure an die reaktive C=N-Doppelbindung des 7,8-Dihydropterins (**1**), wie sie auch aus anderen Untersuchungen<sup>20, 21)</sup> bekannt ist, eingeleitet. Auf diese Weise wird als Zwischenprodukt das 5,6-Dihydrosepiapterin (**15**) gebildet, das entweder zum Sepiapterin (**16**) oxidiert werden kann oder ein zweites Molekül 7,8-Dihydropterin zu **17** addieren kann. Über eine Halbaminbildung zum Aziridin **18** gelangt man nach Dehydratisierung und 1,5-sigmatroper Wasserstoffverschiebung zum ringerweiterten Dimeren **19**, das leicht zum Drosopterin **6** weiterreagieren sollte.

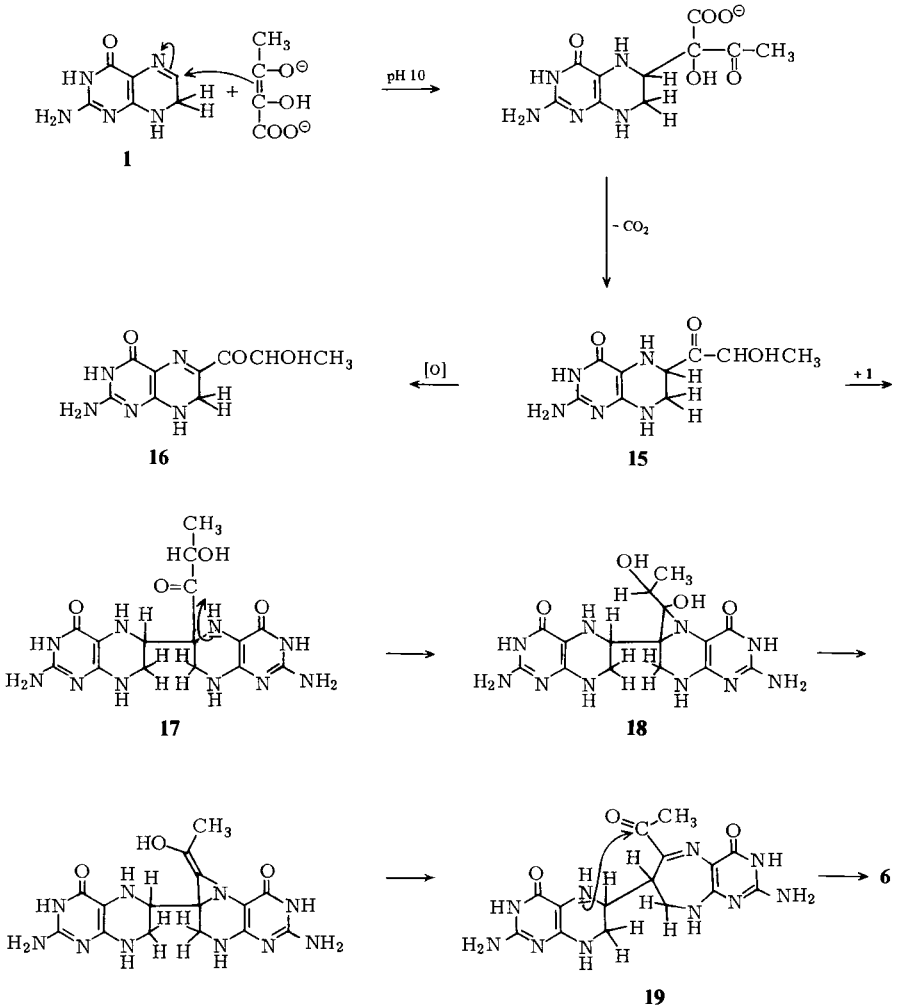
Das einzige Experiment, das bisher eine Aussage über den Reaktionsablauf gestattet, ist die Durchführung der Drosopterin-Synthese in D<sub>2</sub>O. Dabei wird das C-6b-Proton und nur dieses gegen Deuterium ausgetauscht, was sowohl den vorgeschlagenen Mechanismus stützt als auch gegen Pyrazinring-offene Ketozwischenstufen spricht. Der endgültige Beweis, der durch die Synthese ausgehend vom 5,6-Dihydrosepiapterin erbracht

<sup>18)</sup> K. Sugiura, M. Goto und S. Nawa, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2963.

<sup>19)</sup> K. Sugiura und M. Goto, *Nippon Kagaku Zasshi* **1972**, 206.

<sup>20)</sup> A. Stuart, D. W. West und H. C. S. Wood, *J. Chem. Soc.* **1964**, 4769.

<sup>21)</sup> R. Brown, M. Joseph, T. Leigh und M. L. Swain, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 1003.



werden könnte, steht allerdings noch aus, da diese Verbindung bisher nicht dargestellt werden konnte.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für finanzielle Hilfe und Frau *M. Bischler* für ihre wertvolle Mitarbeit bei den Bestimmungen der verschiedenen physikalischen Daten.

## Experimenteller Teil

UV/VIS-Spektren: Cary-15-Spektrometer; CD-Spektren: Cary-60-Spektralanalysator mit CD-Zusatz 6002 der Fa. Appl. Phys. Corp., jeweils bei Raumtemp. aufgenommen. Die Bestimmung der pK-Werte erfolgte nach der spektrophotometrischen Methode<sup>22)</sup> und wurde bereits an anderer Stelle<sup>7)</sup> ausführlich beschrieben. 100-MHz-NMR-Spektren: JEOL JNM-MH-100; Fourier-Transform-NMR-Spektren: Bruker FHX 90. DC: Fertigfolien Kieselgel F 1500 LS 254 und Cellulose F 1440 der Firma Schleicher & Schüll. Sorptionsmittel für die Säulenchromatographie: Whatman CF 11-Cellulose.

2-(2-Amino-5-nitro-6-oxodihydropyrimidin-4-ylamino)propanal-diethylacetal: 1.9 g 2-Amino-4-chlor-5-nitro-6-oxodihydropyrimidin<sup>20)</sup> werden in 200 ml Ethanol aufgeschlämmt, mit 3.0 g 2-Aminopropionaldehyd-diethylacetal<sup>23)</sup> in 25 ml Ethanol versetzt und unter Rühren 2 h rückfließend gekocht. Nach dem Abkühlen wird der gelbe Niederschlag abfiltriert, mit 20 ml Ethanol gewaschen und i. Vak. getrocknet, wobei 1.8 g (60%) chromatographisch reine, gelbe Nadelchen anfallen. Zur Analyse wird aus Ethanol umkristallisiert. Gelbe Nadeln vom Schmp. 223°C.

$C_{11}H_{19}N_5O_5$  (301.3) Ber. C 43.85 H 6.36 N 23.25 Gef. C 44.06 H 6.40 N 23.06

2-(2-Amino-5-nitro-6-oxodihydropyrimidin-4-ylamino)propanal: 1.0 g vorstehender Verbindung wird mit 10 ml konz. Salzsäure 1/2 h auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Aus der erst klaren, bräunlichen Lösung scheidet sich ein farbloser Niederschlag ab. Die Mischung wird 3 h im Eischrank gekühlt, anschließend der Niederschlag gesammelt und nach Waschen mit 5 ml Ethanol und dann mit 2 ml Ether i. Vak. bei Raumtemp. getrocknet. Ausb. 0.523 g (77%) farbloses Kristallpulver. Da sich der Aldehyd nicht umkristallisieren läßt, wurde zu seiner Charakterisierung das leicht kristallisierende Oxim dargestellt.

Zu 4.3 mg Natrium in 0.45 ml Ethanol wird eine Lösung von 13 mg Hydroxylammoniumchlorid in 1 ml Wasser gegeben und diese Mischung mit einer Suspension von 20 mg des Aldehyds in 1 ml Wasser vereinigt. Nach 20 min Erhitzen auf dem Wasserbad wird gekühlt, der farblose Niederschlag gesammelt und aus 5 ml heißem Wasser umkristallisiert, wobei 11 mg Oxim (51%) als farblose Kristalle vom Schmp. > 330°C anfallen.

$C_7H_{10}N_6O_4$  (242.2) Ber. C 34.71 H 4.16 N 34.70 Gef. C 34.97 H 4.09 N 34.73

7-Methyl-7,8-dihydropterin ·  $H_2SO_3$  (3 ·  $H_2SO_3$ ): 0.5 g 2-(2-Amino-5-nitro-6-oxodihydropyrimidin-4-ylamino)propanal werden in 60 ml Wasser suspendiert, auf dem Wasserbad erhitzt und portionsweise mit 1.2 g Natriumdithionit versetzt. Die klare, hellgrüne Lösung wird 1/2 h weiter erhitzt und anschließend ins Eisbad gestellt, wobei  $N_2$  durch die Lösung geleitet wird. Es fällt ein fast farbloser Niederschlag aus, der tags darauf unter  $N_2$  abfiltriert und mit 15 ml Ethanol und 10 ml Ether gewaschen wird. Nach Trocknen i. Vak. über  $P_2O_5$  ergeben sich 0.355 g (61%) farblose, chromatographisch reine Kristalle vom Schmp. > 330°C.

$C_7H_9N_5O \cdot H_2SO_3$  Ber. C 32.19 H 4.25 N 26.81 S 12.27  
Gef. C 32.00 H 4.32 N 26.65 S 12.41

## Synthese der Drosopterine

Die Reaktionen müssen jeweils unter Stickstoff und im Dunkeln ausgeführt werden. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird mit einer Glaselektrode gemessen und mittels eines pH-Staten konstant gehalten. Die dazu benutzte 0.1 N HCl wird zuvor mit Stickstoff von Sauerstoff befreit. Die Reaktionslösung wird auf 30°C thermostatisiert und magnetisch gerührt.

<sup>22)</sup> A. Albert und E. P. Serjeant, The Determination of Ionization Constants, S. 44, Chapman and Hall Ltd., London 1971.

<sup>23)</sup> J. H. Johnson, A. A. Larsen, A. D. Holley und K. Gerzon, J. Am. Chem. Soc. **69**, 2366 (1947).

*Drosopterin, Isodrosopterin und Neodrosopterin* (6): 50 ml 0.1 N NaOH werden 1.5 h mit  $N_2$  begast und anschließend mit 0.6 g 2-Acetoxy-3-oxobuttersäure-ethylester<sup>24)</sup> versetzt. Nach 1 h werden 0.32 g Natrium-Salz des 7,8-Dihydropterins (1)<sup>4)</sup> und 20 ml sauerstoffreies Wasser zugegeben und mit einigen Tropfen 2 N NaOH auf pH 11.7 gebracht. Nach 1 h wird mit 2 N HCl auf pH 6.05 angesäuert und auf diesen pH-Wert geregelt. Die Lösung wird schon bald zusehends stärker gefärbt, erst hell-orange, später rot-orange. Nach 22 h beträgt die optische Ausbeute an Drosopterin 0.125 g (45%) und nach 35 h ist sie auf 0.137 g (49%) gestiegen. Die Lösung wird dann auf pH 2 gebracht und am Rotationsverdampfer bei 30°C auf die Hälfte eingengt. Die rote Mischung wird 2 h ins Eisbad gestellt, wobei ein roter Niederschlag ausfällt. Dieser wird abfiltriert, mit 10 ml Eiswasser, 20 ml Ethanol und 50 ml Ether gewaschen und über  $P_2O_5$  i. Vak. getrocknet (0.083 g). Das isolierte Produkt besteht nach dem Chromatogramm aus einer Mischung von Drosopterin und Isodrosopterin sowie wenig Neodrosopterin (max. 5%). Die Mutterlauge wird über eine Cellulose-Säule (9 × 11 cm) filtriert, wobei zunächst durch Waschen mit Wasser die meisten Verunreinigungen entfernt werden und anschließend mit verd. Ammoniak (1 Teil konz. Ammoniak auf 2500 Teile bidest. Wasser) die Drosopterine gemeinsam eluiert werden. Das Eluat wird bei 30°C eingengt, wodurch weitere 0.02 g Drosopterin-Gemisch erhalten werden. Ausb. 0.103 g (37%) rotes Kristallpulver der Extinktion  $E_{478} = 0.75$  ( $c = 1$  mg/100 ml, Puffer pH 5.0).

Zur Isolierung des Neodrosopterins empfiehlt sich folgende Aufarbeitung: Die rote Reaktionslösung wird direkt auf eine Cellulose-Säule (9 × 15 cm) gegeben, mit 5 l bidest. Wasser gewaschen und durch Gradienten-Elution mit verd. Ammoniak (1/30000–1/1000) getrennt. Das Neodrosopterin (mit dem kleinsten  $R_F$ -Wert) wird zum Schluß eluiert, ist dann aber noch mit etwas Drosopterin verunreinigt. Es wird auf ca. 10 ml eingengt und erneut über eine kleine Cellulose-Säule (3.5 × 18 cm) chromatographiert. Das Neodrosopterin-Eluat wird am Rotationsverdampfer vorsichtig eingedampft (30°C), in 5 ml 0.005 N HCl gelöst, sofort eingefroren (flüssiger Stickstoff) und anschließend lyophilisiert. Ausb. 2 mg. Das Neodrosopterin muß im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden.

*5,8-Dimethyldrosopterin und -isodrosopterin* (7): 1.2 ml 2-Acetoxy-3-oxobuttersäure-ethylester<sup>24)</sup> werden in 50 ml  $O_2$ -freier 0.1 N NaOH hydrolysiert, nach 1 h 1.4 g 8-Methyl-7,8-dihydropterin (2)<sup>10)</sup>, gelöst in 200 ml entgaster 0.1 N NaOH, zugegeben und die Mischung 1 h bei pH 12.2 und Raumtemp. gerührt. Anschließend wird auf pH 6 angesäuert und mittels pH-Statens auf diesen pH-Wert geregelt. Die Lösung wird 2 Tage bei 30°C gerührt, wobei sie sich langsam orange und schließlich rot färbt und ein gelblicher Niederschlag ausfällt. Dieser (0.69 g unumgesetztes Ausgangsmaterial) wird abfiltriert. Das Filtrat wird auf ca. 70 ml eingengt (Rotationsverdampfer, 30°C) und auf eine Cellulose-Säule (9 × 30 cm) aufgetragen. Bei der Elution mit 3 l bidest. Wasser werden alle Verunreinigungen, samt Salzen, eluiert, während die Drosopterine auf der Säule adsorbiert bleiben. Ihre Elution geschieht mit 4 l sehr verdünntem Ammoniak (konz.  $NH_4OH$ /Wasser = 1/30000). Nach dem Eindampfen der roten Hauptfraktion im Rotationsverdampfer bei 30°C erhält man 0.101 g Enantiomergemisch. Das Produkt ist noch nicht ganz rein und wird daher erneut in gleicher Weise über eine Cellulose-Säule gereinigt. Die Hauptfraktion wird auf ein kleines Volumen eingengt und lyophilisiert, wobei 0.075 g (5%) roter Feststoff anfällt, der chromatographisch aus den beiden Enantiomeren besteht, sich aber nicht umkristallisieren läßt.

*Trennung der Enantiomeren und Aufnahme der CD-Spektren*: 1–2 mg Enantiomergemisch werden auf eine präp. Cellulose-Dünnschichtplatte (200 × 200 × 0.5 mm, Schleicher & Schüll) aufgetragen, zweimal mit Isopropylalkohol/1proz.  $NH_4Cl$  (1/1) und zweimal mit Wasser entwickelt. Die beiden getrennten Zonen werden abgekratzt und mit 0.1proz. Ammoniak eluiert. Während das weiterlaufende 5,8-Dimethylisodrosopterin isomerenrein ist, muß das 5,8-Dimethyldrosopterin noch einmal über eine Platte gereinigt werden. Die Eluate der getrennten Enantiomeren

<sup>24)</sup> G. Weil-Malherbe, Biochem. J. 32, 1033 (1938).



werden bei 30°C im Rotationsverdampfer eingedampft und der Rückstand in ca. 5 ml Wasser gelöst. Von diesen Lösungen werden die CD-Spektren aufgenommen und anschließend die Konzentrationen UV-spektroskopisch bestimmt.

*6,7-Dimethyldrosopterin und -isodrosopterin (8)*: 3 ml 10 N NaOH werden 1 h mit N<sub>2</sub> von O<sub>2</sub> befreit, dann 0.3 g 7-Methyl-7,8-dihydropterin · H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (entspr. 3) zugegeben und unter leichtem Erwärmen gelöst. Gleichzeitig werden 0.3 ml 2-Acetoxy-3-oxobuttersäure-ethylester<sup>24)</sup> in 30 ml O<sub>2</sub>-freier 0.1 N NaOH hydrolysiert. Nach 1 h gibt man diese beiden Lösungen zusammen und stellt mit konz. Salzsäure auf pH 12 ein. Nach einer weiteren Stunde fügt man 50 ml O<sub>2</sub>-freies Wasser hinzu und säuert mit 2 N HCl auf pH 6.1 an. Die Lösung wird auf 30°C thermostatisiert und der pH-Wert mittels pH-Statens konstant gehalten. Nach einem Tag hat sich die Lösung orange gefärbt und ein schwach rötlich gefärbter Niederschlag ist ausgefallen. Die Mischung wird 1/2 h in Eis gekühlt und der Niederschlag gesammelt. Nach Trocknen im Vakuumexsiccator erhält man 0.065 g nicht umgesetztes Ausgangsmaterial 3.

Das Filtrat wird im Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml eingeengt und auf eine Cellulose-Säule (5 × 33 cm) aufgetragen. Die Chromatographie wird unter N<sub>2</sub>-Begasung vorgenommen. Vor der Chromatographie wird hierfür die Säule mit 200 ml O<sub>2</sub>-freiem Wasser gewaschen, und sämtliche Elutionsmittel werden mindestens 1 h mit N<sub>2</sub> begast. Bei der Elution mit 700 ml Wasser bleiben die Drosopterine im oberen Drittel der Säule hängen, während die Verunreinigungen und Salze eluiert werden. Man setzt dann die Elution mit verd. Ammoniak (1/10000) fort, engt das Eluat bei 30°C im Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml ein und erhält durch Lyophilisieren 8.5 mg (3.6%) roten amorphen Feststoff. Die Auftrennung der Enantiomeren geschieht dünnschichtchromatographisch wie vorstehend beschrieben, doch wird nur das weiter wandernde 6,7-Dimethylisodrosopterin isomerenfrei abgetrennt.

*N<sup>3</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>10</sup>,N<sup>10</sup>,5,8-Hexamethyldrosopterin und -isodrosopterin (9)*: 0.11 g N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,8-Trimethylpterin<sup>25)</sup> werden in 25 ml O<sub>2</sub>-freier 0.2 N KOH gelöst und elektrochemisch reduziert. Als Arbeitselektrode wird Quecksilber, als Referenzelektrode eine gesättigte Silberchlorid/Silberlektrode verwendet und als Gegenelektrode dient ein Platindraht bzw. Kohlestab. Spannung -1.4 V; Anfangsstromstärke 39 mA. Nach ca. 1 h sind 30 Coulomb aufgenommen und die Stromstärke ist auf 2 mA abgesunken. Nach Erhöhung der Spannung auf -1.6 V steigt die Stromstärke wieder auf 10 mA an. Nach weiteren 8 h wird die Elektrolyse beendet, obwohl die aufgenommene Elektrizitätsmenge erst 64 Coulomb (73% Umsatz) beträgt, als Endstromstärke aber nur noch 0.4 mA angezeigt wird. 0.12 ml 2-Acetoxy-3-oxobuttersäure-ethylester werden in 15 ml O<sub>2</sub>-freier 0.1 N NaOH gelöst und nach 1 h Stehenlassen der Elektrolyselösung zugesetzt. Man stellt auf pH 12 ein, neutralisiert nach einer weiteren Stunde auf pH 6.1 und regelt mittels pH-Statens auf diesen Wert. Die Reaktionslösung wird 2 Tage bei 30°C unter N<sub>2</sub> gerührt und anschließend aufgearbeitet.

Die Reaktionslösungen aus 2 Ansätzen werden gemeinsam auf ca. 5 ml eingeengt, auf eine Cellulose-Säule (5 × 33 cm) aufgetragen und unter Stickstoff wie vorstehend beschrieben chromatographiert. Bei der Elution mit 800 ml bidest. Wasser bleibt das gesuchte Enantiomeregemisch in der oberen Hälfte der Säule hängen, während fast sämtliche Verunreinigungen ausgewaschen werden. Die Drosopterine werden dann mit 500 ml verd. Ammoniak (1/50000) eluiert, das Eluat bei 30°C eingeengt, in ca. 5 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhält 22 mg (10%) roten amorphen Feststoff. Die Trennung der Enantiomeren wird wie bei 7 beschrieben auf Celluloseplatten mit 0.3 M Essigsäure als Entwicklungs- und Elutionssystem durchgeführt.

*Aufnahme der NMR-Spektren*: 2–3 mg Drosopterin-hydrochlorid (Enantiomeregemisch) werden in einem 1-ml-Eppendorff-Gefäß aus Polyethylen mit 0.4 ml D<sub>2</sub>O versetzt und 1 min ins

<sup>25)</sup> W. Pfleiderer, J. W. Bunting, D. D. Perrin und G. Nübel, Chem. Ber. **101**, 1072 (1968).

Ultraschallbad gehalten. Die Mischung wird anschließend 2 min zentrifugiert, die klare überstehende Lösung in ein NMR-Röhrchen pipettiert und das Spektrum aufgenommen.

Je nach Löslichkeit der Drosopterine werden 100–500 Akkumulationen benötigt. Für die Doppelresonanzexperimente müssen 2000–4000 Spektren akkumuliert werden. Vor und nach der Aufnahme der Spektren werden die NMR-Proben dünn-schichtchromatographisch untersucht, um sicherzustellen, daß keine Zersetzung stattgefunden hat. Im Anschluß an die eigentliche Messung wird etwas Natrium-2-(trimethylsilyl)-[D<sub>4</sub>]propionat als Standard zu der Probe gegeben und erneut ein Spektrum mit wenigen Durchläufen aufgenommen, welches zur Kalibrierung dient.

*Katalytische Reduktion des 6,7-Dimethyldrosopterins (8, Enantiomergemisch) mit Deuterium bzw. Wasserstoff*

a) 2,68 mg **8** werden in 2 ml D<sub>2</sub>O und 10 µl 1 N HCl gelöst, mit 3,84 mg PtO<sub>2</sub> versetzt und in einer Mikrohydrierapparatur unter Rühren reduziert. Das Deuterium wird in einer angeschlossenen Gaserzeugungsanlage aus D<sub>2</sub>O und Natrium-Spänen hergestellt. Nachdem die ganze Apparatur mit Argon gespült worden ist, wird sie durch langsames Zutropfen des D<sub>2</sub>O zum Natrium mit Deuterium gefüllt. Nach Beendigung der Reduktion (ca. 14 h) wird die Apparatur mit Argon gespült, der Hydrierkolben unter Argon-Begasung abgenommen und sofort mit einer Serumkappe verschlossen. Mit einer 10-ml-Hamilton-Spritze wird die reduzierte Lösung von dem Kolben in die mit Argon gefüllte Filtrierapparatur übergeführt, wo der Katalysator unter Argon-Überdruck abfiltriert wird. Das klare, farblose Filtrat wird bei 30°C im Rotationsverdampfer (mit N<sub>2</sub> gespült) zur Trockne eingedampft und der Rückstand 1/2 h i. Hochvak. getrocknet. Unter Argon-Begasung werden 0,4 ml O<sub>2</sub>-freies D<sub>2</sub>O zugegeben; die so erhaltene Lösung wird mit einer Spritze unter Schutzgas in ein NMR-Röhrchen übergeführt, das anschließend sofort luftdicht verschlossen wird. Nach Aufnahme des NMR-Spektrums wird UV-spektroskopisch sichergestellt, daß während der Messung keine nennenswerte Reoxidation stattgefunden hat.

b) Die Reduktion mit Wasserstoff wird entsprechend der oben beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Der Wasserstoff wird einer Bombe entnommen und als Lösungsmittel wird 0,005 N HCl verwendet.

[31/78]