

N-Benzoyl-DL-pipecolinsäure: Eine Lösung von 5 g DL-Pipecolinsäure-äthylester in 20 cm<sup>3</sup> Chloroform wurde in der Kälte tropfenweise mit 2,3 g frisch destilliertem Benzoylchlorid versetzt. Nach kurzer Zeit wurde das gallertig ausgefallene DL-Pipecolinsäure-äthylester-hydrochlorid abfiltriert und mit Chloroform nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit weiteren 50 cm<sup>3</sup> Chloroform versetzt und unter Zugabe von Eis mit verd. HCl, verd. NaOH und H<sub>2</sub>O gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Der ölige Rückstand, N-Benzoyl-DL-pipecolinsäure-äthylester, wurde 20 Min. mit 10 cm<sup>3</sup> 2-n. NaOH geschüttelt; dann wurde mit verd. HCl angesäuert, mit Essigester extrahiert, der Extrakt mit H<sub>2</sub>O gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Das zurückbleibende Öl erstarrte nach einiger Zeit und wurde aus Benzol-Ligroin umkristallisiert: 2,9 g (40%) N-Benzoyl-DL-pipecolinsäure vom Smp. 130–131°.

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N Ber. C 66,93 H 6,48 N 6,01% Gef. C 66,76 H 6,37 N 6,16%

Der Direktion der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG*, die uns in ihren Laboratorien die Durchführung von Druckhydrierungen ermöglichte, möchten wir auch an dieser Stelle unsern Dank aussprechen.

Die Mikroanalysen verdanken wir dem Mikrolabor der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel (*E. Thommen*).

#### SUMMARY.

Complex formation of substituted amino acids with Cu<sup>2+</sup> has been studied by use of ion exchangers. Acylation of the amino group results in a heavy decrease of coordination tendency.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel.

## 75. Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*: die roten Augenfarbstoffe

5. Mitteilung<sup>1)</sup>

von **M. Viscontini**<sup>2)</sup>, **E. Hadorn**<sup>3)</sup> und **P. Karrer**<sup>2)</sup>.

(8. III. 57.)

Bei der Chromatographierung der im Imaginalauge von *Drosophila melanogaster* (Wildrasse) vorhandenen Stoffe werden im Papierchromatogramm, welches man mit Propanol, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O und mit Butanol, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub>O entwickelt, zwei rotorangefarbige Flecken sichtbar, die im UV.-Licht rot bzw. orange fluoreszieren und kleine Rf-Werte besitzen. Es handelt sich hier um eine chromatographische Aufteilung des von zahlreichen Autoren beobachteten „wasserlöslichen roten Augenfarbstoffes“ der *Drosophila*<sup>4) 5) 6) 7)</sup>.

<sup>1)</sup> 3. Mitt., *Helv.* **38**, 2034 (1955); 4. Mitt., *Naturwissenschaften* **43**, 379 (1955).

<sup>2)</sup> Chemisches Institut der Universität Zürich.

<sup>3)</sup> Zoologisch vergleichend-anatomisches Institut der Universität Zürich.

<sup>4)</sup> *J. Schultz*, *Amer. Nat.* **69**, 30 (1935).

<sup>5)</sup> *F. Mainx*, *Z. Vererbungslehre* **75**, 256 (1938).

<sup>6)</sup> *B. Ephrussi & J. L. Herold*, *Genetics* **29**, 148 (1944).

<sup>7)</sup> *D. J. Nolte*, *J. of Genetics* **51**, 142 (1952).

Aus *Drosophila* hat bereits *Lederer* ein rotes Pigment in angereicherter Form isoliert und ihm den Namen Drosopterin gegeben, da er in ihm ein Pteridinderivat vermutete<sup>8)</sup>. Später haben sich *H. Heymann*, *F. L. Chan* & *C. W. Clancy* mit diesem Pigment beschäftigt und mitgeteilt, dass sie mittels Chromatographie an Silicagel 10 in ihren Spektren sehr ähnliche Substanzen aus dem Rohprodukt abgetrennt haben<sup>9)</sup>. Sowohl von *Lederer* als auch von *Heymann et al.* wurden ähnliche Analysen dieses nicht kristallisierten Pigmentes veröffentlicht.

Bei der Isolierung der fluoreszierenden Stoffe aus *Drosophila melanogaster*, über die wir in früheren Mitteilungen referierten, haben wir auch diese vorerwähnten wasserlöslichen, rotorangen Farbstoffe abzutrennen versucht, wobei wir uns der Papierchromatographie bedienten. Als bestes Entwicklungsmittel, das eine Trennung erlaubte und die Pigmente nicht veränderte, erwies sich die Mischung von 80% CH<sub>3</sub>OH und 20% H<sub>2</sub>O, mit einem Zusatz von 0,1% Ammoniumacetat. Es zeigte sich dabei, dass sich die wasserlöslichen Augenpigmente von *Drosophila* aus drei Komponenten zusammensetzen, von denen die eine dem rot fluoreszierenden Fleck entspricht, den man bei der Papierchromatographie des Augenextraktes beobachtet, und die beiden anderen in dem orange fluoreszierenden Fleck vereinigt sind.

Die drei leicht zersetzlichen Verbindungen liessen sich bisher nicht kristallisiert gewinnen, doch gelang es, wie im experimentellen Teil beschrieben wird, sie in sehr weitgehend gereinigter Form zu erhalten. Die Ausbeute an diesen Pigmenten ist sehr gering; immerhin war es möglich, die Verbindungen zu analysieren, ihre UV.-Spektren zu bestimmen und einige Abbaureaktionen mit ihnen vorzunehmen. Die Oxydation aller drei Substanzen führte zu Pteridin-8-carbonsäure, so dass ihre Zugehörigkeit zur Gruppe der Pteridine gesichert ist. *Lederer*<sup>8)</sup> hatte für das von ihm isolierte Präparat bereits den Namen Drosopterin gewählt; er soll für das eine unserer drei Pigmente beibehalten werden. Die beiden anderen werden hier als Isodrosopterin und Neodrosopterin bezeichnet.

In der Literatur fanden wir noch zwei weitere Hinweise auf Verbindungen, die möglicherweise mit den unsrigen verwandt sind. *J. Günder*<sup>10)</sup> erhielt rote Pterine aus *Rana temporaria* und konnte sie inzwischen zur Pteridin-8-carbonsäure abbauen (noch nicht veröffentlicht). *H. K. Mitchell* & *H. S. Forest*<sup>11)</sup> erwähnten ebenfalls ganz kurz, dass die roten Pigmente von *Drosophila* „2-Amino-4-hydroxypteridin-6-carbonsäure in ihrer Molekular-Struktur enthalten“.

<sup>8)</sup> Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. **15**, 273 (1940).

<sup>9)</sup> J. Amer. chem. Soc. **72**, 1112 (1950) und **73**, 5448 (1951).

<sup>10)</sup> Z. vergleich. Physiol. **36**, 78 (1954).

<sup>11)</sup> J. Amer. chem. Soc. **77**, 4865 (1955).

Herrn Dr. *M. Schoeller* danken wir bestens für die Vorversuche am Trennverfahren, Fräulein cand. chem. *E. Loeser* für einige Abbaureaktionen und unserer technischen Assistentin, Fräulein *S. Huppenbauer*, für ihre geschickte Mithilfe; bestens danken wir ferner dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* und der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich* für die materielle Unterstützung.

### Experimenteller Teil.

Im Turmix werden 400 g *Imagines* von *Dr. melanogaster*, 400 g Cellulosepulver und eine Menge von 80-proz. Methanol, die genügend ist, um die Masse homogen zu machen, verrieben. Hierauf bringt man die ganze Masse auf eine Säule von Cellulosepulver, die einen Durchmesser von 18 cm und eine Höhe von 20 cm besitzt, und entwickelt das Chromatogramm mit 80-proz. Methanol, bis sich die stark fluoreszierenden Produkte von den roten Pigmenten, welche im obersten Teil der Kolonne adsorbiert werden, vollständig getrennt haben. Dann eluiert man die letzteren, indem man bei der weiteren Elution dem Lösungsmittel 0,1% Ammoniumacetat hinzufügt. Wenn diese Elution sehr langsam und in der Weise durchgeführt wird, dass der Methanolgehalt des Eluierungsmittels allmählich etwas niedriger gewählt wird, bilden sich schliesslich 3 rote Zonen, welche sich ziemlich gut trennen lassen. Die Zwischenzonen haben wir jeweils mit einem neuen Ansatz wieder aufgearbeitet. Die drei Eluate der roten Pigmente werden im Vakuum auf ungefähr 100 ml eingeeengt. Jede dieser dunkelrot gefärbten Lösungen wird hierauf an einer zweiten Cellulosepulver-Säule von 9 cm Durchmesser und 25 cm Höhe chromatographiert und die Entwicklung des Chromatogramms mit destilliertem Wasser ausgeführt. Dadurch werden gewisse leichtlösliche Verunreinigungen durch die Cellulosesäule hindurchgewaschen, andere, in Wasser unlösliche Bestandteile bleiben im oberen Ende der Adsorptionssäule haften, während die roten Pigmente sich in der Säule verteilen und ziemlich fest von ihr adsorbiert werden. Nachdem man den obersten, Verunreinigungen enthaltenden Teil der Adsorptionssäule entfernt hat, eluiert man die roten Pterinverbindungen mit Hilfe von 0,5-proz. wässrigem Ammoniak. Diese Elution soll möglichst rasch erfolgen, weil die Verbindungen in alkalischem Milieu zersetzt sind. Man konzentriert hierauf die Eluate im Vakuum bis zur beginnenden Trübung, fügt 3 Volumen Äthanol und 4 Volumen Äther hinzu und lässt 24 Std. im Eisschrank stehen. Die roten Pterine fallen dabei amorph aus. Die erste Fällung enthält in der Regel noch 1–2% Asche. Die Mutterlaugen dieser Fällung lassen sich in derselben Weise aufarbeiten. Man erhält so eine zweite, ebenfalls amorphe Fraktion, welche aschenfrei ist. Sie wird abzentrifugiert, zuerst mit Äthanol und hierauf mit Äther gewaschen.

In dieser Weise isolierten wir 2 mg Isodrosopterin, 15 mg Drosopterin und 2 mg Neodrosopterin.

Analyse des Drosopterins: C 42,95 H 5,35 N 30,98 C—CH<sub>3</sub> 3,06%

Die Substanz enthielt weder Asche, noch Chlor, noch Phosphor, noch Schwefel. Zum Vergleich sei eine Analyse von *Heymann et al.*<sup>9)</sup> angeführt, welche ein Hydrochlorid eines solchen roten Pigmentes analysierten:

C 39,75 H 5,27 N 18,30 Asche 2,0 Cl 12,63%

Die 3 roten Pterine sind etwas löslich in Wasser (ca. 0,5–1 mg/ml), lösen sich aber bedeutend leichter in Lösungen von Elektrolyten wie Ammoniumcarbonat und Ammoniumacetat.

Die UV.-Absorptionsspektren der 3 Verbindungen sind einander sehr ähnlich (Fig. 1 und 2). Wir haben nur vom Drosopterin, der Verbindung, von welcher das meiste und das reinste Material zur Verfügung stand, ein quantitatives Absorptionsspektrum aufgenommen. Das Spektrum des Isodrosopterins ist mit demjenigen des Drosopterins praktisch identisch; in jenem des Neodrosopterins scheint das Hauptabsorptionsmaximum einige  $m\mu$  in der Richtung der längeren Wellen verschoben zu sein.

## UV.-Spektrum des Drosopterins:

in 0,1-n. HCl: Max. 265  $m\mu$  Extinktion 0,405 ( $c = 1,22$  mg/100 ml)  
 Max. 475  $m\mu$  Extinktion 0,870  
 Extinkt. 475/Extinkt. 265 = 2,15

in 0,1-n. NaOH: Max. 265  $m\mu$  Extinktion 0,495 ( $c = 1,22$  mg/100 ml)  
 Max. 505  $m\mu$  Extinktion 0,990  
 Extinkt. 505/Extinkt. 265 = 2,0

Heymann *et al.*<sup>9)</sup> beobachteten an ihrem besten Präparat folgende Absorptionsmaxima:

in Wasser Max. 265  $m\mu$  Extinktion 0,690 ( $c = 1,8$  mg/100 ml)  
 Max. 485  $m\mu$  Extinktion 1,27  
 Extinkt. 485/Extinkt. 265 = 1,84

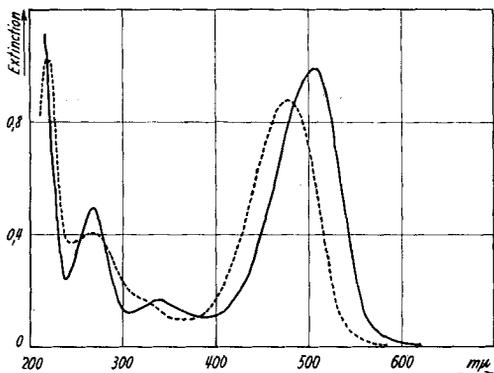


Fig. 1.

Spektrern von 0,61 mg Drosopterin in 50  $cm^3$  Lösungsmittel.

— 0,1-n. NaOH    - - - - 0,1-n. HCl

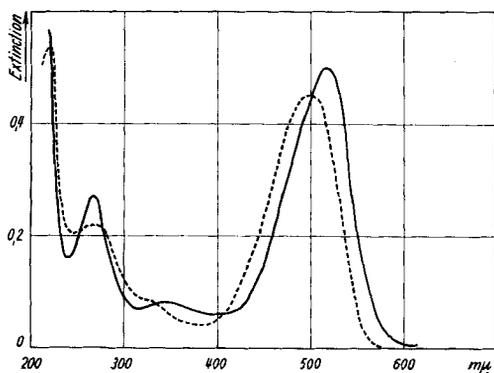


Fig. 2.

Spektrern von Neodrosopterin (die Konzentration konnte nicht genau bestimmt werden).

— 0,1-n. NaOH    - - - - 0,1-n. HCl

Die Eigenschaften der 3 Drosopterine sind sehr ähnlich, und ihre Trennung gelang einzig durch Papierchromatographie. Die folgende Tabelle enthält die Rf-Werte der 3 Substanzen in verschiedenen Lösungsmitteln:

Tabelle I.

	Butanol, Eis- essig, Wasser (20:3:7)	Propanol, 1-proz. wäss. NH <sub>3</sub> (2:1)	Pyridin, Essigester, H <sub>2</sub> O (4:4:3)	Propanol, 2-proz. wäss. CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (1:1)
Neodrosopterin .	0,05	0,07	0,035	0,11
Drosopterin . .	0,10	0,14	0,10	0,19
Isodrosopterin .	0,11	0,14	0,10	0,25

Die drei Pigmente besitzen, wie andere Pterine, amphotere Eigenschaften und sind sehr leicht in Alkali und Säuren löslich. Bei der Papier-Elektrophorese lassen sie einen ausgesprochen basischen Charakter erkennen. Die Tab. II enthält die Wanderung in Millimeter einiger Pterine nach einer Elektrophorese von 4 Std. bei einer Spannung von 230—250 Volt und der Stromstärke von 2,4—3 mA.

Tabelle II.

0,05-m. Lösungen	Essigsäure/ Natriumacetat pH 4,5		Ammonium- acetat pH 6,8		Natrium-hydro- gen-phosphat pH 8,4	
	Anode	Kathode	Anode	Kathode	Anode	Kathode
Xanthopterin . . . . .			58			
Pteridin-8-carbonsäure . . . .	60		50		20	
Isoxanthopterin . . . . .		4	13		13	
2-Amino-6-hydroxy-pterinidin .		10	0	0	8	
2-Amino-6-hydroxy-8-tetra- hydroxy-butyl-pterinidin (aus Glucose) . . . . .		8		6	1	
HB <sub>2</sub> . . . . .		8		4	2	
Neodrosopterin . . . . .		14		7	0	0
Drosopterin . . . . .		34		25		6
Isodrosopterin . . . . .		42		30		6

Die 3 roten Pigmente werden in alkalischer und in saurer Lösung schnell verändert. Diese Unbeständigkeit kann spektrophotometrisch verfolgt werden; schon nach 1 Std. ist diese Zersetzung bei Zimmertemperatur weit fortgeschritten, besonders bei alkalischer Reaktion. Um etwas über die dabei entstehenden Zersetzungsprodukte zu erfahren, haben wir 2 mg Drosopterin in 30 ml n. Natronlauge bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach 2 Wochen war die rote Farbe vollkommen verschwunden. Nach der Neutralisation der Lösungen durch Salzsäure wurden die darin befindlichen fluoreszierenden Substanzen an Tierkohle adsorbiert, dieses Adsorbat mit Wasser gut ausgewaschen und hierauf nacheinander mit 1-proz. Ammoniak und einer Mischung von Methanol-Pyridin-Wasser (1:1:1) eluiert. Das Eluat hat man im Vakuum zur Trockne eingedampft, den Rückstand in einigen ml einer Mischung von Propanol und 1-proz. Ammoniak (2:1) aufgelöst und an einer kleinen Cellulosepulversäule chromatographiert. Dabei wurden 3 blau fluoreszierende Zonen beobachtet. Die chemische Natur der zwei zuerst die Säule verlassenden fluoreszierenden Verbindungen konnte bis jetzt nicht ermittelt werden. Bei der dritten fluoreszierenden Substanz handelt es sich um die Pteridin-8-carbonsäure, die in üblicher Weise durch ihr Absorptionsspektrum (Fig. 3) und durch ihren Rf-Wert im Papierchromatogramm charakterisiert worden ist.

Isodrosopterin liefert bei derselben Behandlung mit wässriger Lauge ebenfalls Pteridin-8-carbonsäure. Auch Neodrosopterin ist unter denselben Bedingungen unbeständig, das Abbauprodukt konnte aber noch nicht genau charakterisiert werden.

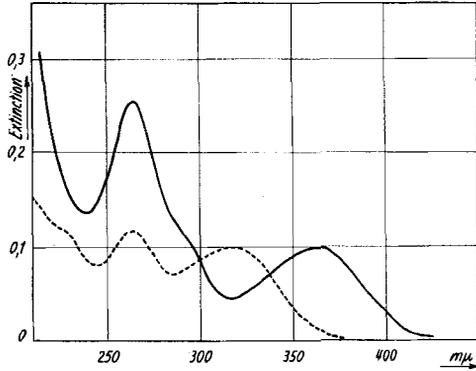


Fig. 3.

Isolierte Pteridin-8-carbonsäure aus den Abbauprodukten von Neodrosopterin, Drosopterin und Isodrosopterin.

—— 0,1-n. NaOH    - - - - - 0,5-n. HCl

In 0,1-n. Salzsäure ändern sich die Absorptionsspektren der 3 Pigmente ebenfalls, die orange Farbe der Lösungen verschwindet aber dabei selbst nach mehreren Wochen nicht. Über die dabei entstehenden Umsetzungsprodukte ist noch nichts bekannt.

Gegen Oxydationsmittel sind die 3 roten Pterine sehr empfindlich. Kaliumpermanganat wird von ihnen momentan entfärbt. Wir haben 3 mg Drosopterin in 5 ml 0,5-n. Natronlauge gelöst und dazu tropfenweise eine Lösung von 0,1-n. Kaliumpermanganat gefügt, bis die violette Farbe der Permanganatlösung beständig blieb. Der Oxydationsvorgang nahm mehrere Std. in Anspruch. Nach 24-stündigem Stehen wurden die löslichen Mangan-Salze durch eine Spur von Natriumsulfit reduziert, die Lösung filtriert und mit Salzsäure neutralisiert. Bei der Aufarbeitung dieser Lösung in der oben beschriebenen Weise konnte als Oxydationsprodukt des Drosopterins ebenfalls Pteridin-8-carbonsäure durch ihr Spektrum und durch ihr chromatographisches Verhalten nachgewiesen werden.

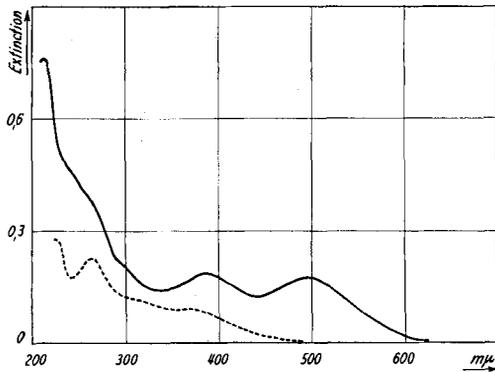


Fig. 4.

Spektrern von 0,6 mg Oxidrosopterin in 50 cm<sup>3</sup> 0,1-n. NaOH

—— Frische Lösung    - - - - - nach 12 Tagen

Unter denselben Bedingungen liessen sich auch Isodrosopterin und Neodrosopterin zu Pteridin-8-carbonsäure abbauen.

Von Natriumperjodat wird Drosopterin nur sehr langsam angegriffen. Wir liessen innerhalb 24 Std. in eine Lösung von 2 mg Drosopterin in 30 ml Wasser 2,5 ml einer 0,0077-n. Natriumperjodatlösung tropfen. Dabei bildete sich ein roter, in Wasser vollkommen unlöslicher Niederschlag. Er wurde abzentrifugiert, mit Äthanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 1,6 mg eines Produktes, das wir Oxy-drosopterin nennen wollen. Es ist löslich in Laugen und Säuren, aber diese Lösungen zeigen keine Fluoreszenz. Die Spektren dieser Verbindung sind in den Figuren 4 und 5 dargestellt. Auch diese Substanz ist in saurem und alkalischem Milieu unbeständig. Über ihre chemische Natur sind vorläufig keine Aussagen möglich.

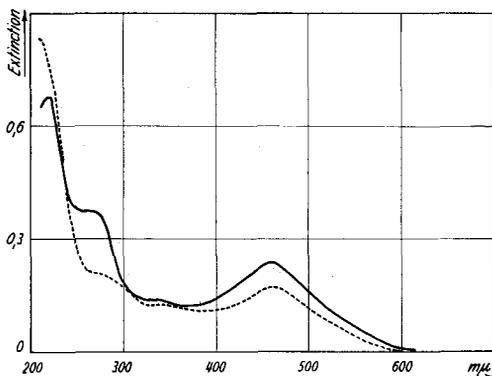


Fig. 5.

Spektren von 0,6 mg Oxydrosopterin in 50 cm<sup>3</sup> 0,1-n. HCl

—— Frische Lösung    - - - - nach 12 Tagen

Oxydiert man 1 mg Drosopterin, gelöst in 100 ml Wasser, mit einem Überschuss von Natriumperjodat, so fällt kein Niederschlag aus, sondern die Lösung entfärbt sich und bekommt eine blaue Fluoreszenz. Diese fluoreszierende Verbindung konnte als Pteridin-8-carbonsäure charakterisiert werden. Auch Isodrosopterin liess sich mit einem Überschuss von Natriumperjodat zur selben Carbonsäure abbauen.

### Zusammenfassung.

Der „wasserlösliche rote Augenfarbstoff“ von *Drosophila melanogaster* wurde isoliert und weiter untersucht. Die Papierchromatographie zeigt, dass das Pigment in Wirklichkeit eine Mischung von drei roten, gelborange fluoreszierenden Stoffen ist, deren chemische und physikalische Eigenschaften sehr ähnlich sind. Sowohl die Behandlung dieser Stoffe mit Laugen als auch die Oxydation mit  $\text{KMnO}_4$  oder  $\text{NaJO}_4$  bauen alle drei zu Pteridin-8-carbonsäure ab. Demnach ist ihre Zugehörigkeit zur Pterinklasse bewiesen. Diese drei Stoffe werden als Neodrosopterin, Drosopterin und Isodrosopterin bezeichnet.

Zürich, Chemisches Institut der Universität und  
Zoologisch vergleichend-anatomisches Institut der  
Universität.