

nung die Wasserstoffionenkonzentration in der dritten Potenz eingeht. Der Behauptung der amerikanischen Autoren, dass die Schwermetalle keine bimetallischen Assoziate bilden würden, können wir nicht beipflichten.

SUMMARY

Diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA) forms with metal cations M^{v+} the complexes MZ^{v-5} ; MHZ^{v-4} , M_2Z^{2v-5} , where Z^{5-} stands for the anion of DTPA. Complexes $MM'Z^{v_1+v_2-5}$ containing two different metals are also formed. The stability constants of these species with Ca, Mn, Fe^{II} , Fe^{III} , Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg, Ce have been determined, using 7 methods. The DTPA-complexes are considerably more stable than the corresponding EDTA-complexes which makes DTPA a considerably better titrant in complexometry.

Laboratorium für anorganische Chemie
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

91. Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*

12. Mitteilung¹⁾

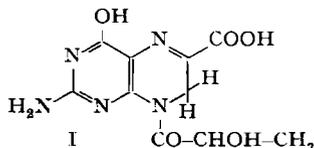
Die gelb fluoreszierenden Pterine: Sepiapterin und Iosepiapterin

von M. Viscontini und E. Möhlmann

Herrn Prof. Dr. P. KARRER zum 70. Geburtstag gewidmet

(11. III. 59)

Schon bei den ersten chromatographischen Untersuchungen der fluoreszierenden Stoffe in *Drosophila melanogaster* von E. HADORN & H. MITCHELL²⁾ wurden zwei gelb fluoreszierende Stoffe Fl 5 und Fl 7 gefunden, die neben Riboflavin auftreten. Diese gelben Produkte kommen in der Wildform nur in geringer Menge vor, sind jedoch in der Mutante *sepia* stark angereichert. H. S. FORREST & H. K. MITCHELL³⁾ konnten im Jahre 1954 den einen dieser gelben Stoffe (Fl 5) isolieren. Sie glaubten, ihm folgende Strukturformel zuschreiben zu können:



I. ZIEGLER-GÜNDER & E. HADORN⁴⁾ nannten dieses isolierte Produkt Sepiapterin. Wir haben diesen Namen in der vorliegenden Arbeit beibehalten und im Einverständnis mit Prof. HADORN den zweiten gelben Stoff (Fl 7) auf Grund seiner chemischen

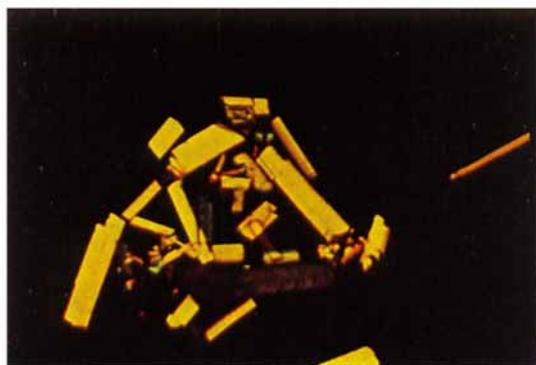
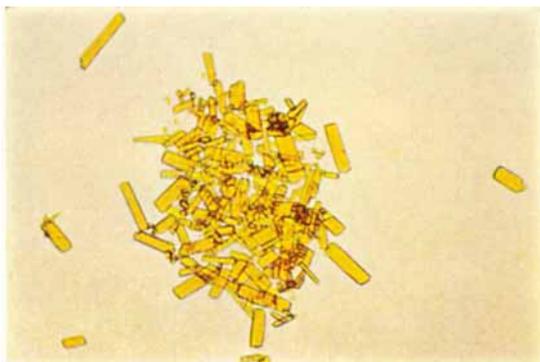
¹⁾ 11. Mitteilung: M. VISCONTINI & H. R. WEILENMANNS Helv. **41**, 2170 (1958).

²⁾ Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **37**, 650 (1951).

³⁾ J. Amer. chem. Soc. **76**, 5656, 5658 (1954).

⁴⁾ Zeitschr. Vererbungs. **89**, 235 (1958).

Tafel

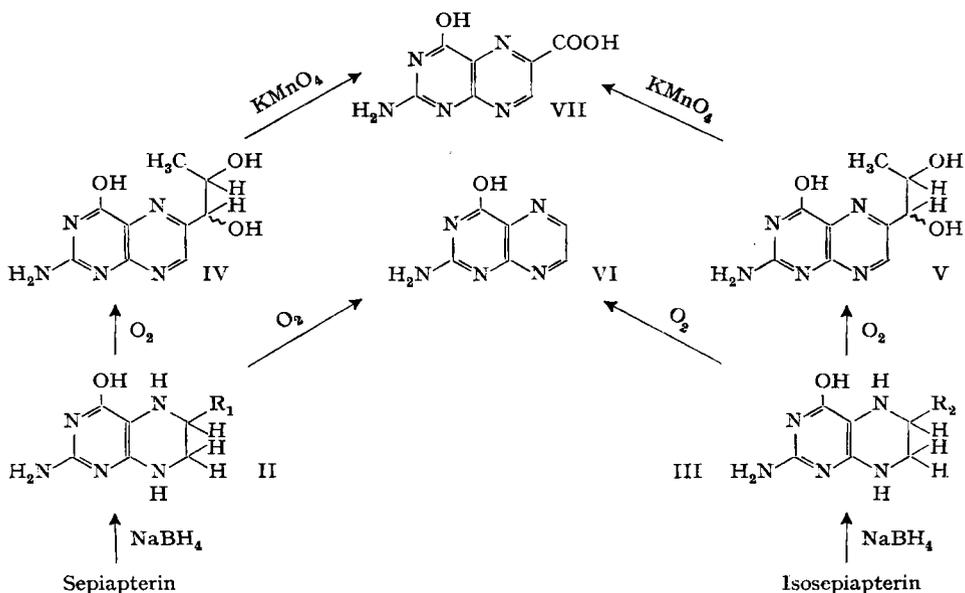


Isosepiapterin (etwa 1000 \times)
oben in gewöhnlichem Licht
unten in polarisiertem Licht

Eigenschaften entsprechend als Iosepiapterin bezeichnet. Da bei vermehrtem Auftreten der beiden Sepiapterine in der Mutante *sepia* die Drosopterine⁵⁾ vollkommen fehlen, kann man annehmen, dass zwischen diesen beiden Gruppen von Pigmenten eine enge chemische Beziehung besteht. Um einer Aufklärung dieser Probleme näherzukommen, haben wir diese Sepiapterin-Untersuchungen unternommen.

Zur Isolierung der Pterine führten wir die in unserem Laboratorium gebräuchlichen Methoden durch. Sie werden im experimentellen Teil dieser Arbeit eingehend beschrieben. Wir erhielten beide Pterine in kristallinem Zustand. Sepiapterin kristallisiert drusenförmig, Iosepiapterin hingegen in Form dünner Stäbchen (Tafel⁶⁾). Zur Durchführung zuverlässiger Elementaranalysen war die bisher isolierte Pterinmenge zu gering.

Nach unseren chemischen Untersuchungen erweisen sich die beiden Sepiapterine als Isomere, vergleichbar den Isomeren Drosopterin und Isodrosopterin. Sie entsprechen sich weitgehend in ihren chemischen Eigenschaften und unterscheiden sich nur in ihrer Löslichkeit und ihrer spezifischen Drehung. Beide Substanzen sind unbeständig, photolabil und werden zu Pteridin-8-carbonsäure (VII) abgebaut. Ihre UV.-Spektren sind auch identisch (Fig. 1). Die Sepiapterine sind wie die Drosopterine basische Substanzen. Ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 8 (Fig. 2). Schon hieraus ist zu entnehmen, dass diese Pterine in teilweise hydriertem Zustand vorliegen. Diese Annahme wird weiter dadurch unterstützt, dass man bei der Reduktion der beiden Sepiapterine mit NaBH₄ Substanzen erhält (II und III), deren UV.-Spektren (Fig. 3) mit demjenigen des 2-Amino-6-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-pterins¹⁾ grosse Ähnlichkeit aufweisen. Die Überlegungen, die bei den entsprechenden Drosopterin-Reduktionen zur



⁵⁾ M. VISCONTINI, *Helv.* **41**, 1299 (1958).

⁶⁾ Wir möchten an dieser Stelle der Firma J. R. GEIGY A.G., Basel, die die Druckkosten der Farbphotos übernommen hat, bestens danken.

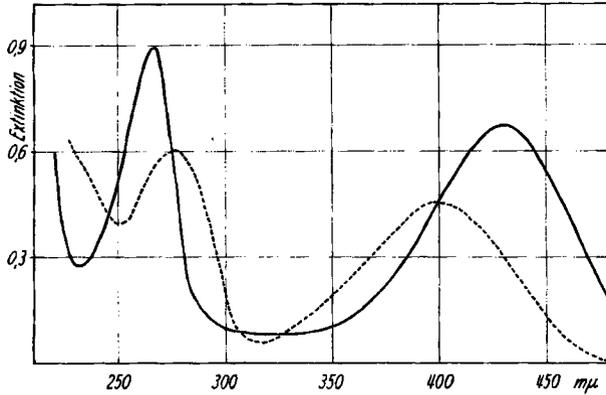


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektrum von Iosepiapterin (und Sepiapterin)
 ----- in 0,1-n. HCl ——— in 0,1-n. NaOH

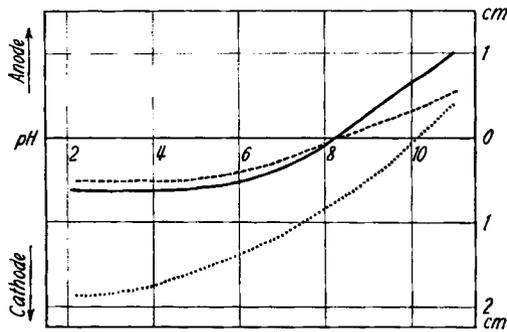


Fig. 2. Elektrophoretische Kurven von Pterinen
 Isodrosopterin - - - - - Iosepiapterin ——— Sepiapterin
 (Nähere Erklärungen im experimentellen Teil)

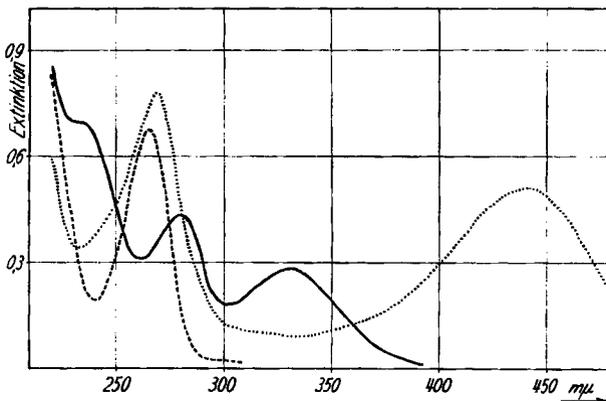


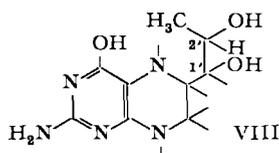
Fig. 3. UV.-Spektren von Sepiapterin (und Iosepiapterin) nach NaBH₄-Reduktion
 Sepiapterin pH 12 ——— Reduziertes Sepiapterin pH 12
 ----- Reduziertes Sepiapterin pH 2

Auffassung führten, dass die NaBH_4 -Reduktion nicht am Pteringerüst, sondern an der Seitenkette stattfindet⁵⁾, scheinen auch für die Sepiapterine Gültigkeit zu haben. Wir nehmen deshalb an, dass die beiden gelben Sepiapterine einen hydrierten Pyrazinring besitzen.

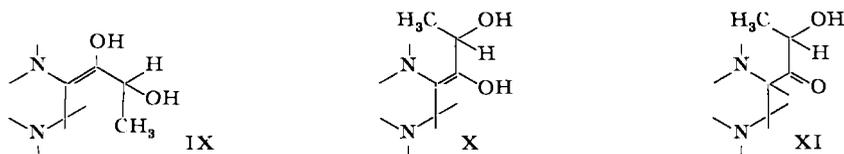
Ebenso wie die hydrierten Pterine werden auch die mit NaBH_4 hydrierten Sepiapterine an der Luft zurückoxydiert. Dabei entsteht jedoch nicht, wie bei den Dihydrodrosopterinen, wieder das Ausgangsprodukt, sondern zwei vom HB_2 -Pterin⁷⁾ nicht zu unterscheidende Pterine (IV und V, *threo*, *erythro*?), neben einer geringen Menge 2-Amino-6-hydroxy-pteridin (VI). Alle in diesen Experimenten entstandenen Pterine wurden jedesmal chromatographisch isoliert und durch UV.-Spektren, Papierchromatographie und Vergleich mit synthetischen oder reinen natürlichen Produkten charakterisiert. Die Pterine IV und V wurden ausserdem mit KMnO_4 oxydiert, wobei jeweils Pteridin-8-carbonsäure (VII) entstand, die ebenfalls durch UV.-Spektren und vergleichende Papierchromatographie mit synthetischer Carbonsäure identifiziert wurde.

Sepiapterin und Iseosepiapterin sind, wie Drosopterin und Isodrosopterin⁸⁾, optisch aktiv. Ihre spezifischen Drehungen sind gleich gross, aber entgegengesetzt: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +100^\circ$ für Sepiapterin und -100° für Iseosepiapterin.

Es ist auf Grund unserer experimentellen Ergebnisse bis jetzt noch nicht möglich, eine endgültige Konstitution dieser Pterine darzustellen. Es scheint jedoch, dass sie das Pteringerüst VIII des HB_2 -Pterins besitzen.



In der an C-8 gebundenen Seitenkette dieser Pterine befindet sich ein asymmetrischer Kohlenstoff C-2' und eine Carbonylgruppe an C-1'. Diese Carbonylgruppe bildet entweder ein Enol in *cis*- oder in *trans*-Stellung (IX oder X) (Sepiapterin, Iseosepiapterin, Drosopterin, Isodrosopterin) oder sie liegt als Keton (XI) (Neodrosopterin) vor.



Die charakteristischen UV.-Spektren dieser Pterine könnten durch die Konjugation der exocyclischen Doppelbindung der Seitenkette mit einem Stickstoff-Atom oder einer endocyclischen Doppelbindung des hydrierten Pyrazinkernes erklärt werden⁹⁾.

⁷⁾ Bedeutung von HB_2 siehe M. VISCONTINI, E. LOESER & P. KARRER, *Helv.* **41**, 440 (1958).

⁸⁾ M. VISCONTINI & P. KARRER, *Helv.* **40**, 968 (1957).

⁹⁾ Dr. H. S. FORREST nimmt jetzt an, dass das Sepiapterin kein N-10-Lactyl-pterin ist, sondern ein 2-Amino-6,8-dihydroxy-8,9-dihydro-pterin mit einer Lactyl-Kette in Stellung 8. Dr. H. S. FORREST und Mitarbeiter haben ebenfalls ein zweites gelbes Pterin isoliert, das wahrscheinlich unserem Iseosepiapterin entspricht. Wir danken Dr. FORREST, dass er uns seine Ergebnisse noch vor der Veröffentlichung in *Nature* mitgeteilt hat (Einsendungstermin 22. 1. 1959).

Es soll hier noch darauf hingewiesen werden, dass die Bezeichnungen Sepiapterin, Isosepiapterin, Drosoppterin, Isodrosoppterin zunächst willkürlich gewählt wurden. Wir behalten uns die Möglichkeit vor, die Namen Drosoppterin und Isodrosoppterin auszutauschen, sobald wir die direkten sterischen Beziehungen zwischen allen diesen Pterinen gelöst haben.

Herrn Prof. Dr. E. HADORN, Zoologisches Institut der Universität Zürich, danken wir bestens für sein ständiges Interesse an dieser Arbeit und für die Beschaffung grösserer Mengen der Mutante *sepia*. Ferner danken wir auch Herrn Dr. G. ANDERS, Zoologisches Institut der Universität Zürich, für die Aufnahme der Farbphotos und dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* für die finanzielle Unterstützung.

Experimentelles. – *Isolierung der Sepiapterine.* Je 200 g *Drosophila*-Fliegen der Mutante *sepia* wurden im Turmix mit 500 ml Äthanol und etwas Papierpulver vermischt, zerkleinert und auf einer kurzen und breiten Papiersäule (10 cm Durchmesser, 12 cm Höhe) mit Propanol-1-proz. Ammoniumacetat-Lösung (1/1) chromatographiert. Die gelbfluoreszierenden Eluate wurden nach Einengen im Vakuum auf 30–50 ml je auf einer langen Säule (10 cm Durchmesser, 60 cm Höhe) zuerst mit Propanol-Ammoniumacetat und dann mit Butanol-Eisessig-Wasser (20/3/3) chromatographiert. Durch das erste Solvens werden vor allem die blaufluoreszierenden Stoffe abgetrennt, während durch das zweite Lösungsmittel eine Trennung der gelbfluoreszierenden Produkte in Isepiapterin, Sepiapterin und Riboflavin stattfindet. Zur Entfernung von Butanol und Salzen und zur Abtrennung noch vorhandener blaufluoreszierender Stoffe wurde anschliessend mit reinem Wasser chromatographiert. Vor dieser Chromatographie wurde das Butanol-Eisessig-Eluat neutralisiert, weil in saurer Lösung eine Zersetzung der gelben Pterine eintrat.

Da die gelben Pterine nach diesem Trennungsprozess noch nicht rein genug sind, wurde der Vorgang noch ein zweites Mal durchgeführt. Die neutralen Wasserextrakte von *Sepia*- und Isepiapterin wurden danach im Vakuum fast bis zur Trockne eingengt, wobei die Pterine kristallin ausfielen.

In der folgenden Tab. geben wir die Rf-Werte der gelbfluoreszierenden Produkte in verschiedenen Lösungsmitteln an:

	Butanol/Eisessig/ Wasser 20:3:3	Propanol/1-proz. wässriges NH ₃ 2:1	3-proz. wässrig. NH ₄ Cl-Lösung	Propanol/2-proz. wässriges Ammonium- acetat 1:1
Riboflavin . . .	0,11	0,40	0,33	0,59
Sepiapterin . . .	0,22	0,42	0,33	0,60
Isepiapterin . .	0,43	0,52	0,25	0,65

Papierelektrophoresis. Die Elektrophoresen wurden in 0,05-m. Pufferlösungen bei einer Spannung von 120 Volt und 6 Std. Dauer durchgeführt. Als Pufferlösungen wurden verwendet: Ameisensäure; Pyridinformiat; CH₃COONH₄; Na₂HPO₄; Äthylendiamin.

Photolabilität des Isepiapterins. 10 ml einer neutralen Lösung, die ungefähr 2 mg Isodrosoppterin pro 100 ml enthielt, wurden 1 Std. lang UV.-Licht ausgesetzt. Chromatographic der entstandenen Produkte in einer schmalen Säule (1 cm Durchmesser, 30 cm Höhe) mit Wasser als Lösungsmittel zeigte, dass neben noch unzersetztem Isepiapterin Pteridin-8-carbonsäure und Xanthoppterin entstanden waren.

Reduktion mit NaBH₄. Zu einer wässrigen Lösung der Sepiapterine wurde bei pH 8 soviel NaBH₄ zugegeben, dass die gelbe Farbe und Fluoreszenz verschwanden. Danach wurde sofort ein UV.-Spektrum bei pH 12 aufgenommen. Anschliessend wurde auf pH 2 angesäuert und auch hierbei die UV.-Absorption gemessen.

Rückoxydation. Die Lösung des Reduktionsproduktes wurde nach der sauren UV.-Messung neutralisiert und dann 1–2 Tage stehengelassen, wobei eine Rückoxydation an der Luft stattfand, erkennbar an der nach einiger Zeit auftretenden stark blauen Fluoreszenz. Nach Chromatographic in einer schmalen Säule (1 cm Durchmesser, 30 cm Höhe) mit 3-proz. NH₄Cl-Lösung er-

reichten wir eine Trennung in zwei Reaktionsprodukte. Nach einer zweiten Chromatographie in Wasser konnten von diesen beiden reinen Substanzen UV.-Spektren aufgenommen werden. Diese erwiesen sich als identisch mit denen von 2-Amino-6-hydroxy-pteridin und von HB₂-Pterin.

Beide bei der Luftyoxydation entstandenen Produkte wurden in NaOH-Lösungen mit KMnO₄ oxydiert. Die dem HB₂ gleichenden Pterine entfärbten die KMnO₄-Lösungen schnell und ergaben Pteridin-8-carbonsäure. 2-Amino-6-hydroxy-pteridin dagegen reagierte nicht mit KMnO₄.

Zusammenfassung

Sepiapterin und Iosepiapterin, die aus *Drosophila melanogaster*, Mutante *sepia*, kristallin erhalten wurden, erwiesen sich als Isomere. Beide sind hydrierte Pterine, die nach NaBH₄-Reduktion ein Tetrahydropyrazingerüst besitzen und nach Rückoxydation an der Luft HB₂-Pterin-ähnliche Pterine liefern. Ihre spezifischen Drehungen sind gleich gross, aber entgegengesetzt. Ein chemischer Zusammenhang zwischen HB₂-Pterin, Sepiapterinen und Drosopterinen wurde diskutiert.

Zürich, Chemisches Institut der Universität

92. Synthesen in der Carotinoid-Reihe

13. Mitteilung¹⁾

Synthese von Canthaxanthin

von P. Zeller, F. Bader, H. Lindlar, M. Montavon, P. Müller,
R. Rüegg, G. Ryser, G. Saucy, S. F. Schaeren, U. Schwieter, K. Stricker,
R. Tamm, P. Zürcher und O. Isler

Herrn Professor Dr. P. KARRER zum 70. Geburtstag gewidmet

(13. III. 59)

Canthaxanthin (4,4'-Diketo- β -carotin) (I) wurde erstmals von HAXO²⁾ aus dem essbaren Pilz *Cantharellus cinnabarinus* isoliert. Die von ZECHMEISTER und KARRER partialsynthetisch aus β -Carotin erhaltene Verbindung³⁾ war mit dem Naturprodukt identisch⁴⁾. Eine Totalsynthese, ausgehend von Crocetindialdehyd wurde kürzlich von WARREN & WEEDON⁵⁾ beschrieben. Wir haben vor einiger Zeit eine Synthese von Canthaxanthin mitgeteilt⁶⁾, welche nach dem Aufbauschema C₁₉ + C₂ + C₁₉ = C₄₀ verläuft. Im folgenden wird über die Verbesserungen und Vereinfachungen des Verfahrens berichtet, welche die präparative Herstellung des Canthaxanthins erlauben.

Der als Zwischenprodukt benötigte Dehydro-retro-C₁₉-aldehyd VII wird in vier Stufen gewonnen. Zuerst kondensiert man β -Jonon (II) mit Lithiumacetylid in

¹⁾ 12. Mitteilung vgl. Helv. **40**, 1256 (1957).

²⁾ F. HAXO, Botan. Gaz. **112**, 228 (1950).

³⁾ F. J. PETRACEK & L. ZECHMEISTER, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1427 (1956); R. ENTSCHEL & P. KARRER, Helv. **41**, 402 (1958).

⁴⁾ F. J. PETRACEK & L. ZECHMEISTER, Arch. Biochemistry Biophysics **61**, 137 (1956).

⁵⁾ C. K. WARREN & B. C. L. WEEDON, J. chem. Soc. **1958**, 3986.

⁶⁾ O. ISLER, M. MONTAVON, R. RÜEGG, G. SAUCY & P. ZELLER, Verh. Naturforsch. Ges. Basel **67**, 379 (1956).