131. Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*

14. Mitteilung [1]

Eine Synthese des Biopterins[1])

von **M. Viscontini** und **R. Provenzale**

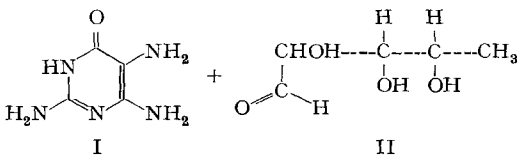
Organisch-Chemisches Institut der Universität
Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(12. V. 69)

Zusammenfassung. 2,4,5-Triamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin wird mit 1-(Benzylphenylhydrazino)-5-desoxy-L-ribulose in wässrigem Methanol unter N_2 kondensiert. Die Mischung der gebildeten Tetrahydropterine wird zu den entsprechenden Pterinen oxydiert, wobei die polyhydroxyalkylierte Kette teilweise abgespalten wird. Diese Pterine stellen eine Mischung von Biopterin, wenig seines 7-Isomeren und viel Pterin *sensu stricto* dar. Aus dieser Mischung lässt sich reines Biopterin durch Chromatographie an Dowex 1 × 8 gewinnen. Das synthetische und das aus *Drosophila melanogaster* isolierte Biopterin sind völlig identisch.

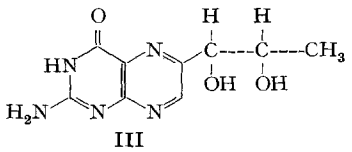
Das Biopterin (III) wurde 1955 gleichzeitig in drei Laboratorien isoliert. STOKSTAD *et al.* [2], von einigen tausend Litern Harn ausgehend, erhielten einige Milligramme des Produktes, welchem sie den Namen gaben; FORREST & MITCHELL [3] erkannten das Biopterin in *Drosophila melanogaster*, während es uns gelang, ebenfalls aus *Drosophila melanogaster*, einige Milligramm dieses Stoffes zu isolieren, den wir damals als HB_2 bezeichneten [4] [5].

In Anbetracht der biologischen Bedeutung dieser Substanz wurde ihre Synthese mehrmals versucht, und zwar stets nach dem gleichen Prinzip: Man kondensierte die 5-Desoxy-L-arabinose (II) mit dem 2,4,5-Triamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin (I)



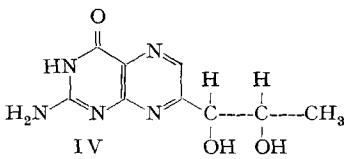
I

II



III

+

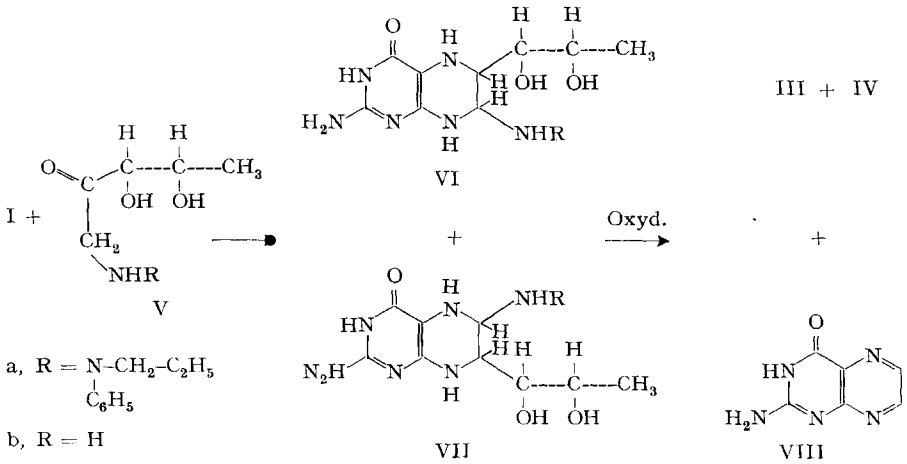


IV

unter verschiedenen Bedingungen, jedoch erhielt man stets eine Mischung aus L-Biopterin (III) und seinem Isomeren, dem 7-(L-*erythro*-1′,2′-Propyl)-pterin (IV), beide mit so ähnlichen chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften, dass eine Trennung nur mühsam zu erreichen war. Für diese Trennung hat REMBOLD [6] eine besondere Chromatographie an phosphorylierter Cellulose beschrieben.

[1]) Schweiz. Patent-Anmeldung Nr. 4979/67 vom 7. 4. 1967.

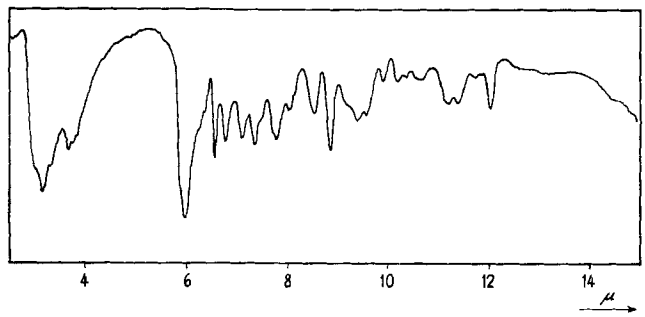
In Anlehnung an unser Verfahren zur Herstellung von 6-(Polyhydroxylalkyl)-pterinen [7], welches von 1-Amino-2-ketosen anstatt von Aldosen oder Ketosen ausgeht, haben wir eine Reihe von 1-Amino-5-desoxy-L-ribulosen (V) hergestellt und sie mit dem Pyrimidin I unter N_2 kondensiert. Dabei wurden die erwarteten Tetrahydropterine VI gebildet, welche nur von minimalen Mengen vom 7-Isomeren VII begleitet sind.



Die besten Ausbeuten werden bei der Kondensation der 1-(Benzyl-phenyl-hydrazino)-5-desoxy-L-ribulose (Va) mit I erhalten. Leider wird bei der Oxydation des Tetrahydropterins VIa zu Biopterin die Seitenkette sehr leicht abgespalten, so dass immer beträchtliche Mengen Pterin (VIII) gebildet werden und die Ausbeute an reinem Biopterin bescheiden bleibt.

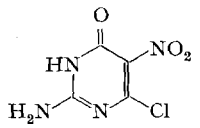
Zur Trennung des Gemisches III + IV + VIII benützen wir mit Erfolg die Chromatographie an Dowex 1 X8. Die so gewonnene Substanz III ist mit dem aus *Drosophila melanogaster* isolierten Biopterin völlig identisch.

Als diese Arbeit abgeschlossen war, teilten ANDREWS *et al.* [8] eine andere eindeutige Synthese reinen Biopterins mit, die von 1-Amino-5-desoxy-L-ribulose (Vb) ausgeht. Diese Amino-ketose wird mit 2-Amino-4-chlor-5-nitro-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin (IX) kondensiert, das gebildete Produkt wird reduziert und das ent-



IR.-Spektrum des synthetischen Biopterins, in KBr aufgenommen

standene 7,8-Dihydrobiopterin wiederum oxydiert (in der Mitteilung sind weder IR.-Spektrum noch $[\alpha]_D$ angegeben).



IX

Wir danken Herrn H. FROHOFER, Leiter unserer mikroanalytischen Abteilung, für die IR.-Spektren und Mikroanalysen. Diese Arbeit wurde vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG WISSENSCHAFTLICHER FORSCHUNG unterstützt.

Experimentelles. – *Benzyl-phenyl-hydrazon von 5-Desoxy-L-arabinose.* Nach ZINNER *et al.* synthetisiert [9]. Smp. 99°.

(1-Benzyl-phenyl-hydrazino)-5-desoxy-L-ribulose (Va). 314 mg (1 mMol) Benzyl-phenylhydrazon von 5-Desoxy-L-arabinose werden mit 90 mg (1 mMol) wasserfreier Oxalsäure in 10 ml sauerstofffreiem Methanol versetzt. Nach einigen Min. Kochen ist die AMADORI-Umlagerung beendet. Die Desoxy-ribulose Va wird nicht isoliert, sondern in der erhaltenen Lösung direkt weiter verwendet.

L-Biopterin (III). Eine sauerstofffreie Lösung von 214 mg (1 mMol) Dihydrochlorid des Triamino-oxo-pyrimidins (I), 381,5 mg (1 mMol) Natriumborat [bzw. 136 mg (1 mMol) Natriumoxalat oder 164 mg (1 mMol) Natriumacetat] und 3 Tropfen 2-Thio-äthanol in 15 ml Wasser und 5 ml Methanol wird mit der oben erhaltenen Lösung von Va versetzt. Das Gemisch wird 2–3 Std. unter Rückfluss und Durchleiten von sauerstofffreiem Stickstoff gekocht, wobei zunächst die Suspension vollständig in Lösung geht und dann Verunreinigungen langsam ausfallen [Verschwinden des Pyrimidins I im Reaktionsgemisch mit Papierchromatographie verfolgen! Lösungsmittel: Butanol-Eisessig-Wasser (20:3:7)]. Die Lösung wird warm filtriert und das klare Filtrat im Rotationsverdampfer abgedampft. Der Rückstand wird mit Aceton gewaschen und in 10 ml 5-proz. Essigsäure gelöst. Durch diese Lösung, welche viel Tetrahydropterin VIa neben ein wenig VIIa enthält, wird bei Raumtemperatur während 10–15 Std. Sauerstoff geleitet. Das Gemisch wird danach 48 Std. stehengelassen. Nach Zugabe von 10–15 ml Aceton werden die ausgefallenen Pterine III, IV und VIII (Papierchromatographie!) abzentrifugiert, in 1-proz. Ammoniaklösung gelöst und die Lösung vom Ungelösten abfiltriert. Das Filtrat wird auf eine mit Dowex 1 X8 beschickte Säule (1 × 7 cm) gebracht, und hierauf werden die adsorbierten Pterine mit 0,03 M Ammoniumformiatpuffer vom pH 7,2 eluiert. Die blau fluoreszierenden Fraktionen werden papierchromatographisch geprüft (Lösungsmittel wie oben) und die Elution unterbrochen, sobald kein Biopterin im Eluat mehr erscheint. Ein grösserer Teil des begleitenden Pterins VIII wird somit abgetrennt. Die das Biopterin enthaltenden Fraktionen werden im Rotationsverdampfer abgedampft. Der Rückstand, welcher mit Äthanol vom Ammoniumformiat befreit wird, wiegt ca. 30–50 mg und enthält viel Biopterin (III) neben wenig 7-Isomerem (IV) und Pterin (VIII). Er wird in 1-proz. wässriger Ammoniaklösung gelöst und an einer mit Dowex 1 X8 beschickten Säule (3 × 25 cm) chromatographiert. Zur Elution wird 0,03 M Ammoniumformiatlösung vom pH 8 verwendet. Nach einiger Zeit beobachtet man die Trennung des 7-(Dihydroxypropyl)-pterins (IV) (erste laufende, blau fluoreszierende Bande, sehr wenig) vom Biopterin (III) selbst (zweite blau fluoreszierende Bande) und Pterin (VIII) (dritte blau fluoreszierende Bande). Hierauf wird das pH der Ammoniumformiatlösung auf 7,5 gebracht, um die Elution zu beschleunigen. Fraktionen von 200 ml werden aufgefangen und durch Dünnschichtchromatographie (Cellulose, 3-proz. NH_4Cl-Lösung) auf ihren Inhalt an Pterin (VIII) geprüft. Die von Pterin und 7-Dihydroxypropyl-Verbindung freien Fraktionen werden vereinigt, auf 2 ml eingeengt und mit 10–15 ml absolutem Äthanol versetzt. Das Biopterin fällt aus, wird abzentrifugiert, mit Äthanol und Äther gewaschen und aus heissem Wasser umkristallisiert, wobei man 24–35 mg (10–15%) Reinsubstanz erhält, deren IR.-Spektrum (Fig.) mit demjenigen des aus *Drosophila melanogaster* isolierten Biopterins [5] identisch ist. $[\alpha]_D^{22} = -60° \pm 4°$ ($c = 0{,}124$ in 0,1N HCl).

$C_9H_{11}N_5O_3$ (237,09) Ber. C 45,56 H 4,68 N 29,52% Gef. C 45,87 H 4,35 N 29,69%

LITERATURVERZEICHNIS

[1] 13. Mitteilung: M. VISCONTINI & E. MÖHLMANN, Helv. *42*, 1679 (1959).
[2] E. L. PATTERSON, H. P. BROQUIST, A. M. ALBRECHT, H. M. VON SALTZA & E. L. R. STOKSTAD, J. Amer. chem. Soc. *77*, 3167 (1955); *78*, 5868, 5871 (1956).
[3] H. S. FORREST & H. K. MITCHELL, J. Amer. chem. Soc. *77*, 4865 (1955).
[4] M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER & E. HADORN, Helv. *38*, 397 (1955); M. VISCONTINI, Ind. chim. belge *1960*, 1181.
[5] M. VISCONTINI, E. LOESER & P. KARRER, Helv. *41*, 440 (1958).
[6] H. REMBOLD & H. METZGER, Chem. Ber. *96*, 1395 (1963); B. GREEN & H. REMBOLD, *ibid. 99*, 2162 (1966).
[7] M. VISCONTINI & R. PROVENZALE, Helv. *51*, 1495 (1968).
[8] K. J. M. ANDREWS, W. E. BARBER & B. P. TONG, Chem. Comm. *1968*, 120.
[9] H. ZINNER, K. WESSELY & H. KRISTEN, Chem. Ber. *92*, 1623 (1959).

132. Homoberbine, eine neue Klasse heterocyclischer Verbindungen

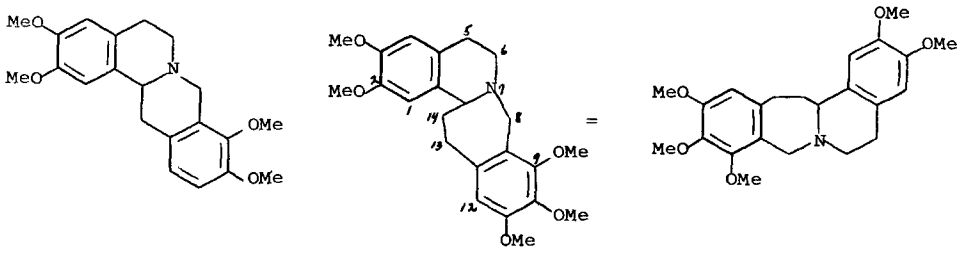
von **A. Brossi** und **S. Teitel**

Chemische Forschungsabteilung der HOFFMANN-LA ROCHE INC.,
Nutley, New Jersey, USA

(13. V. 69)

Summary. A number of rac. and optically active homoberbines have been synthesized from substituted 1-phenethyltetrahydroisoquinolines and formaldehyde by an acid catalyzed cyclization. These homoberbines represent a new class of heterocyclic compounds which are isomeric with the homoaporphine alkaloids.

Es kommt immer häufiger vor, dass Verbindungen, die zuerst im Laboratorium synthetisiert wurden, später in der Natur aufgefunden werden. Dies könnte auch für gewisse tetracyclische Hexahydro-isochinobenzazepine zutreffen, für die wir wegen ihrer chemischen Verwandtschaft mit den Berbinen (z.B. Tetrahydropalmatin) den Trivialnamen Homoberbine gewählt haben. Über die Darstellung, Struktur und Eigenschaften des unten abgebildeten Homoberbins **5** und verwandter Homoberbine haben wir kürzlich zusammen mit SHAMMA *et al.* summarisch berichtet [1].



Tetrahydropalmatin **5**

In der vorliegenden Mitteilung beschreiben wir die Darstellung und Eigenschaften der von unserer Arbeitsgruppe synthetisierten rac. Homoberbine **4–7** und der später dargestellten optisch aktiven Homoberbine **5**, **11** und **12** im Detail.