

Den Herren Prof. Dr. H. GÜNTHARD und PD Dr. P. BAERTSCHI danken wir für die wohlwollende Förderung dieser Arbeit. Sie wurde von der SCHWEIZERISCHEN KOMMISSION FÜR ATOMWISSENSCHAFT (Projekt A 151) unterstützt, was wir auch hier bestens verdanken möchten.

SUMMARY

The products of the pyrolysis of light and heavy biphenyl are molecular hydrogen (or deuterium respectively), benzene, terphenyl and quaterphenyl. Several kinetic ways are discussed to explain the activation energy of 66 ± 8 kcal/mole for the decomposition of biphenyl, its isotope effect and the isomeric distribution of the terphenyls (10% *o*, 48% *m*, 42% *p*) and quaterphenyls (1% *oo'*, 11% *om'*, 8% *op'*, 29% *mm'*, 39% *mp'*, 9,12% *pp'*) produced. There are not enough data to allow a clearcut decision of their way of formation.

Physikalisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich
und
Eidg. Institut für Reaktorforschung,
Würenlingen

183. Fluoreszierende Stoffe aus Roten Waldameisen der Gattung *Formica* (Ins. Hym.)

1. Mitteilung

Isolierung von Riboflavin, 2-Amino-6-hydroxy-pteridin,
Isoxanthopterin, Biopterin und einer neuen, als «Formicapterin»
bezeichneten Substanz

von G. H. Schmidt¹⁾ und M. Viscontini²⁾

(5. VI. 62)

Mit papierchromatographischen Methoden konnten bei *Formica* bisher 35 in ihren Rf-Werten verschiedene fluoreszierende Stoffe festgestellt werden^{3) 4)}. Jedoch sind nicht alle aufgefundenen Substanzen in allen Waldameisennestern vorhanden. Es konnten deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Kolonieverbänden⁵⁾ und einzelnen Arten aufgezeigt werden^{4) 6)}.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von HADORN^{7) 8)} an *Drosophila* und KÜHN⁹⁾ an *Ephestia* sowie AUTRUM & LANGER¹⁰⁾ an *Calliphora* fanden sich in den Köpfen der

¹⁾ Institut für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg.

²⁾ Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich.

³⁾ G. SCHMIDT, Zool. Anz. 161, 304 (1958).

⁴⁾ K. GÖSSWALD & G. SCHMIDT, Waldhygiene 3, 37 (1959).

⁵⁾ K. GÖSSWALD, Die Rote Waldameise im Dienste der Waldhygiene. Meta Kinau-Verlag, Lüneburg 1951.

⁶⁾ K. GÖSSWALD & G. SCHMIDT, Umschau 59, 265 (1959); Entomophaga 5, 13 (1960).

⁷⁾ E. HADORN & H. K. MITCHELL, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 37, 650 (1951).

⁸⁾ E. HADORN, Arch. Julius-Klaus-Stiftung 26, 470 (1951).

⁹⁾ E. HADORN & A. KÜHN, Z. Naturforsch. 8b, 582 (1953).

¹⁰⁾ H.-J. AUTRUM & H. LANGER, Biol. Ztrbl. 77, 196 (1958).

untersuchten Waldameisen keine nennenswerten Mengen an fluoreszierenden Stoffen. Sie sind bei *Formica*, wie bei vielen anderen Insekten ^{7) 11) 12) 13)}, im Thorax und Gaster (Abdomen) angereichert. Reich an fluoreszierenden Substanzen sind das Aussenskelett, die Muskulatur und der Darmtrakt der Ameisen. Diese Feststellungen brachten es mit sich, dass für die Analysen dieser Produkte der gesamte Körper verwendet wurde.

An *Drosophila* ^{7) 8) 14)} sowie an *Ephesia* ¹²⁾ konnte papierchromatographisch gezeigt werden, dass das Auftreten von fluoreszierenden Stoffen im Körper in spezifischer Weise durch einzelne Genmutationen gefördert oder verhindert wird. Demnach war zu vermuten, dass auch bei anderen Insekten solche Genabhängigkeit der Bildung von fluoreszierenden Stoffen besteht. Andererseits ist heute bekannt, dass fluoreszierende Stoffe nicht nur als Endprodukte des Stoffwechsels zu betrachten sind, die abgelagert oder abgeschieden werden, sondern dass sie auch im Metabolismus bestimmte Funktionen zu erfüllen haben. Diese beiden Gesichtspunkte veranlassten uns, bei Ameisen eine nähere Analyse und Identifizierung der mittels Papierchromatographie aufgetrennten fluoreszierenden Stoffe vorzunehmen.

Für die Isolierung dieser fluoreszierenden Stoffe musste von grösseren Tiermengen ausgegangen werden. Es wurden insgesamt etwa 2 kg (Frischgewicht) von drei *Formica*-Arten (*Formica rufa* LINNÉ, *Formica polyctena* FOERSTER, *Formica cordieri* BONDROIT) ⁴⁾ verarbeitet. Im Folgenden teilen wir unsere ersten Isolierungs- und Identifizierungsergebnisse mit, die mit Hilfe bekannter chromatographischer Verfahren an Säulen aus Cellulosepulver gewonnen wurden ^{15) 16)}.

1. **Riboflavin:** Die untersuchten Waldameisen sind relativ reich an Riboflavin. Von allen fluoreszierenden Stoffen ist hiervon fast immer am meisten vorhanden. Es konnten etwa 20 mg reines Riboflavin erhalten werden, das durch UV.-Spektrum und Papierchromatogramme eindeutig identifiziert werden konnte.

Mit 96-proz. Äthanol lässt sich aus dem zerkleinerten Gewebe mehr Riboflavin herauslösen als mit einem Gemisch von Methanol:1-proz. wässrigem Ammoniumhydroxid (3:1). Bereits diese Feststellung führte zu der Annahme, dass nicht alles Riboflavin in freier Form im Körper vorhanden ist, sondern mit anderen Stoffen bisher nicht näher bekannte Verbindungen eingeht. Diese Vermutung bestätigte sich in vollem Umfange durch die säulenchromatographischen Untersuchungen. Riboflavin trat in den verschiedensten grün fluoreszierenden Zonen auf, aus denen es teilweise durch Säure, teilweise durch Alkali oder Ammoniumhydroxid frei gemacht werden konnte. Mit der sehr schwierigen Reinigung dieser Riboflavinkomplexe sind wir noch beschäftigt, so dass von einer näheren Charakterisierung hier Abstand genommen werden soll.

¹¹⁾ C. SCHÖPF & E. BECKER, *Liebig's Ann.* 507, 266 (1933); B. DE LERMA & M. DE VINCENTIIS, *Boll. Zool.* 22, 1 (1955); S. NAWA & T. TAIRA, *Ann. Rep. nat. Inst. Genet. Japan* 6, 36 (1955); B. SAKAGUCKI & M. TSUJITA, *Ann. Rep. nat. Inst. Genet. Japan* 6, 33 (1955).

¹²⁾ M. VISCONTINI, A. KÜHN & A. EGELHAAF, *Z. Naturforsch.* 11b, 501 (1956).

¹³⁾ G. MÜLLER, *Z. Naturforsch.* 11b, 221 (1956); A. H. BARTEL, B. W. HUDSON & R. CRAIG, *J. Inst. Physiol.* 2, 348 (1958); B. W. HUDSON, A. H. BARTEL & R. CRAIG, *ibid.* 3, 63 (1959).

¹⁴⁾ E. REISENER-GLASEWALD, *Z. Vererbungsl.* 87, 668 (1956); M. VISCONTINI, *Industria chim. belge* 10, 1181 (1960).

¹⁵⁾ M. VISCONTINI, E. LOESER & P. KARRER, *Helv.* 41, 440 (1958).

¹⁶⁾ M. VISCONTINI & E. MÖHLMANN, *Helv.* 42, 836 (1959).

2. *2-Amino-6-hydroxy-pteridin*: Einige Hundert γ dieser Substanz wurden bisher nur bei der untersuchten *F. cordieri*-Probe gefunden. Sie konnte durch ihr UV.-Spektrum sowie mittels Vergleichssubstanzen papierchromatographisch identifiziert werden (Tabelle).

3. *Isoxanthopterin*: Weitverbreitet in der Gattung *Formica* ist dieses mit Hilfe von Xanthinoxidase aus 2-Amino-6-hydroxy-pteridin entstehende Pterin. Es ist im Tierreich als Exkretstoff vielfach gefunden worden. Etwa 2 mg konnten isoliert und mit Hilfe des UV.-Spektrums, sowie papierchromatographisch in fünf Lösungsmittelsystemen identifiziert werden (Tabelle).

4. *Biopterin*: Dieses 2-Amino-6-hydroxy-8-dihydroxypropyl-pteridin ist bei *Formica* in verhältnismässig geringen Mengen vorhanden. Durch die langen und schwierigen Reinigungsprozesse¹⁵⁾ ging gewöhnlich nahezu die Hälfte verloren, so dass das schliesslich erhaltene Reinprodukt für die Aufnahme eines eindeutigen UV.-Spektrums nicht mehr ausreichte¹⁷⁾. Die Identität dieser hellblau fluoreszierenden Substanz mit Biopterin konnte jedoch papierchromatographisch in 5 Lösungsmittelsystemen mit Hilfe von Vergleichssubstanz festgestellt werden (Tabelle).

Rf-Werte der isolierten fluoreszierenden Stoffe

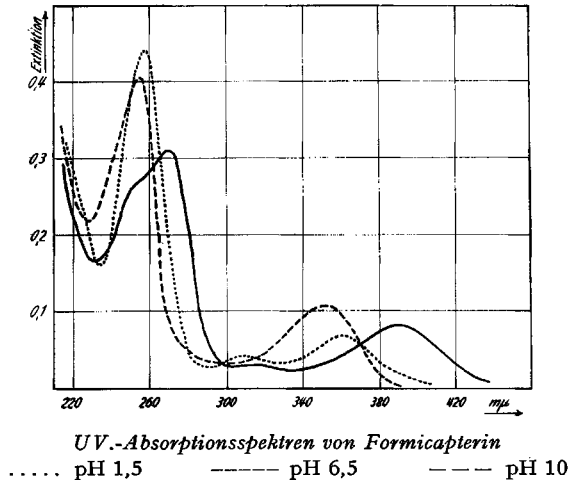
Substanzen	Papiersorte	Laufmittel				
		H ₂ O dest.	3% NH ₄ Cl wässer.	But.: Eis.:H ₂ O (4:1:1)	Prop./1-proz. wässer. NH ₄ OH (2:1)	Prop./2-proz. wässer. NH ₄ -acetat (1:1)
Riboflavin	WHATMAN Nr. 1	0,27	0,30	0,26	0,44	0,54
	S. & S. 2043 bmgI	0,31	0,32	0,23	0,39	0,52
2-Amino-6- hydroxy-pteridin	WHATMAN Nr. 1	0,56	0,50	0,35	0,35	0,51
	S. & S. 2043 bmgI	0,48	0,50	0,32	0,36	0,55
Isoxanthopterin	WHATMAN Nr. 1	0,41	0,29	0,23	0,18	0,36
	S. & S. 2043 bmgI	0,28	0,27	0,21	0,18	0,37
Biopterin	WHATMAN Nr. 1	0,72	0,67	0,28	0,41	0,57
	S. & S. 2043 bmgI	0,65	0,67	0,30	0,40	0,65
Formicapterin	WHATMAN Nr. 1	0,60	0,20	0,44	0,50	0,66
	S. & S. 2043 bmgI	0,79	0,21	0,45	0,43	0,64

5. «*Formicapterin*»: In Alkohol-Extrakten von *F. rufa* und *F. polycytena* fanden wir insgesamt etwa 1 mg eines neuen Stoffes mit rosafarbener Fluoreszenz in saurem und neutralem Milieu, die im alkalischen in einen intensiven Gelbton umschlägt. Die salzsaure Lösung des Stoffes ist farblos, die alkalische gelblich gefärbt. Die Substanz ist sowohl im Sauren als auch im Alkalischen relativ beständig und lässt sich leicht rein darstellen. Nach 2stündiger intensiver UV.-Bestrahlung (Lampe Modell 581-Pl 327 der Firma HERAEUS, Hanau) auf Filtrierpapier konnten papierchromatographisch keine fluoreszierenden Zersetzungsprodukte und keine Abnahme der Fluoreszenz festgestellt werden. Auch hier erweist sich die Substanz als relativ stabil. Sie

¹⁷⁾ Anmerkung bei der Korrektur (7. 7. 1962): Inzwischen ist es uns gelungen, ein reines Spektrum von Biopterin zu messen. Reines Biopterin erhielten wir in grosser Menge aus Geschlechtstieren.

ist hingegen mit KMnO_4 in alkalischer Lösung leicht oxydierbar. Auf Grund dieser Eigenschaften und der aufgenommenen UV.-Spektren (Figur) scheint es sich um ein Pterin, entweder um ein *p*-Dihydro-pteridin oder um ein Xanthopterin-Derivat zu handeln. Die Rf-Werte dieses Pterins sind in der Tabelle enthalten. Wir setzen unsere Versuche mit diesem Produkt fort.

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.



Experimentelles. – 1. *Tiermaterial:* Die verwendeten Ameisen stammten aus Nestern in der Umgebung von Würzburg. Die Tiere wurden vom Nestmaterial befreit und nach einer 48stündigen Hungerperiode in 96-proz. Alkohol konserviert. Es wurden Arbeiterinnen und schwärmende Geschlechtstiere untersucht. Für eine Analyse wurden jeweils etwa 500 g Frischgewicht verarbeitet.

2. *Gewinnung des Extraktes:* Um die fluoreszierenden Stoffe von den nicht löslichen Organen zu befreien, wurden die Tiere zunächst im Starmix in Alkohol zerkleinert und mit etwas Cellulosepulver zu einem Brei homogenisiert. Auf einer 10 cm breiten, 8 cm langen Cellulosesäule wurden dann die löslichen fluoreszierenden Stoffe anfangs mit einem Gemisch aus Propanol/2-proz. wässrigem Ammoniumacetat (1:1), später mit 80-proz. Alkohol eluiert. Nach vorsichtiger Entfernung des Alkohols mit Hilfe eines Vakuum-Rotationsverdampfers bei 26° im abgedunkelten Raum wurde der Rückstand in wenig Wasser gelöst und mittels einer 8 cm breiten und 30 cm langen Papiersäule (WHATMAN Nr. 1 oder SCHLEICHER & SCHÜLL, Nr. 214) chromatographiert. Als Elutionsmittel diente reines destilliertes Wasser. Auf diese Weise konnten zwei Fraktionen F_1 und F_2 erhalten werden. Die langsamere laufende F_1 -Fraktion enthält Riboflavin und Isoxanthopterin. Aus der schneller wandernden Fraktion F_2 konnten 2-Amino-6-hydroxy-pteridin, Biopterin und eine neue rosa-gelb fluoreszierende Substanz, genannt Formicapterin, isoliert werden. Die Identifizierung der isolierten Verbindungen wurde papierchromatographisch durch Vergleich mit Reinstanzen, wie üblich, vorgenommen. Alle chromatographischen Arbeiten wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt.

3. *Trennung von Riboflavin und Isoxanthopterin:* Die schmutzig-gelb fluoreszierende Fraktion F_1 wird zunächst über einer 5 cm breiten und 15 cm langen Papiersäule mit Butanol:Essig:Wasser (4:1:1) weiter gereinigt, dabei werden gleichzeitig beide fluoreszierenden Stoffe voneinander getrennt erhalten. Neben diesen beiden fluoreszierenden Hauptbestandteilen finden sich in dieser Fraktion noch kleine Mengen von gelb und blau fluoreszierenden Stoffen, die relativ leicht während des Arbeitsganges zerstört werden und deshalb bisher nicht isoliert werden konnten.

Reinigung von Riboflavin: Nach vorsichtiger, unter Eiskühlung vorgenommener Neutralisierung des Butanol: Eisessig: Wasser-Eluats wird im Vakuum unter Lichtausschluss das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen. Zur Entfernung der Salze wird zunächst an einer 15 cm langen Säule (Papier: S. & S., Nr. 214; die Breite der Säule wird der Riboflavinmenge angepasst) mit Wasser chromatographiert. Die gelbfluoreszierende Riboflavin-Fraktion wird wiederum bis zur Trockne eingedampft und wiederholt mit Propanol: 1-proz. wässrigem NH_4OH (2:1) und Wasser-Äthanol-Gemischen sowie reinem Wasser so lange chromatographiert, bis ihr UV.-Spektrum ganz rein erhalten wird.

Reinigung von Isoxanthopterin: Auch hierzu wird zunächst neutralisiert und das Lösungsmittel wie bei der Riboflavin-Reinigung abgedampft sowie mit Wasser chromatographiert. Nochmalige Chromatographie an 15 cm langer Papiersäule mit Wasser sowie Alkohol-Wassergemischen ergibt ein weitgehend reines Produkt.

4. *Trennung von 2-Amino-6-hydroxy-pteridin, Biopterin und Formicapterin:* Hierzu wird die blaugrün fluoreszierende Fraktion F_2 zunächst mit 96-proz. Äthanol an einer dünnen (2,5 cm \varnothing), aber langen Säule (20 cm) chromatographiert. Man erhält jetzt drei Fraktionen (Fluoreszenz: grün, bläulich und gelb), von denen die mittlere die zu isolierenden Stoffe enthält. Die schnell wandernde grüne Fraktion ist ein Riboflavinkomplex, mit dessen Reinigung und Analyse wir beschäftigt sind. Die langsam wandernde Fraktion enthält Riboflavin, das während der Aufbereitung aus Komplexverbindungen frei geworden ist. Die mittlere, bläulich fluoreszierende Fraktion wird mit 3-proz. Ammoniumchlorid-Lösung chromatographiert. Auf einer Säule von 20 cm Länge aus SCHLEICHER & SCHÜLL-Papier lassen sich aus dieser mittleren Fraktion drei Stoffe einwandfrei voneinander trennen.

a) *Biopterin*^{1b}): Der erste Stoff stellt Biopterin dar. Sehr schwierig ist seine Reindarstellung aus Waldameisen. Da uns nur geringste Mengen zur Verfügung standen, haben wir zunächst das Salz durch Chromatographie mit Wasser entfernt und dann das noch unreine Produkt papierchromatographisch aufsteigend mit Butanol: Eisessig: Wasser (4:1:1) gereinigt. Dazu diente ein WHATMAN-Papierbogen (30 \times 30 cm), auf den die Substanz auf die Startlinie linienförmig aufgetragen und eindimensional chromatographiert wurde. Nach Elution des Biopterins aus dem getrockneten Papier mit Wasser stimmten die Rf-Werte der so erhaltenen Substanz mit denjenigen eines reinen Biopterinpräparates überein (Tabelle).

b) *2-Amino-6-hydroxy-pteridin:* Nach Entfernung des Ammoniumchlorids bei der zweiten aufgefangenen fluoreszierenden Zone durch Chromatographie mit Wasser wird mit Propanol: 1-proz. wässrigem Ammoniumhydroxid (2:1) chromatographiert und anschliessend mit Äthanol-Wasser-Mischungen weiter gereinigt bis ein reines UV.-Spektrum erhalten wird.

c) *Formicapterin:* Verhältnismässig leicht ist die neu beschriebene Substanz wegen ihrer relativ hohen Stabilität zu reinigen. Sie kann nahezu ohne Verlust nach Entfernung des Ammoniumchlorids mit basischen und sauren Lösungsmitteln chromatographiert werden. Nach letzter Elution mit Wasser erhält man das in der Figur gezeigte Spektrum. Durch Wechsel der gewöhnlich benutzten Elutionsmittel sowie Veränderung des pH-Wertes auf der Säule war das Spektrum der Substanz nicht mehr zu verändern. Wir nehmen deshalb an, dass Formicapterin rein erhalten werden konnte und dass die wiedergegebenen UV.-Spektren der reinen Substanz entsprechen.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Waldameisen dreier Arten der Gattung *Formica* wurden mit Hilfe chromatographischer Verfahren an Cellulosepulver mehrere fluoreszierende Substanzen isoliert und ihre UV.-Spektren sowie Rf-Werte auf verschiedenen Papiersorten in fünf Lösungsmittelsystemen bestimmt. Es konnten Riboflavin, 2-Amino-6-hydroxy-pteridin, Isoxanthopterin und Biopterin als bereits bei Insekten bekannte Stoffe isoliert werden. Weiterhin wird die Isolierung eines Riboflavinkomplexes und einer weiteren bisher nicht gefundenen, in ihrer chemischen Struktur unbekanntes Substanz beschrieben. Sie wird als Formicapterin bezeichnet.

Institut für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg
Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich