

Wasser zerrieben und getrocknet. Das orangegelbe Pulver wurde mehrmals aus Methanol-Äther umgefällt und dann in heissem Acetonitril gelöst und abkühlen gelassen. Dabei schieden sich 710 mg XIIb (58%) in Form eines festen Pulvers aus. Smp. 143–148°; $[\alpha]_D^{25} = -57,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,795$ in Methanol).

$C_{80}H_{128}O_{22}N_{22}$ (1750,08) Ber. N 17,61% Gef. N 17,58%

Das Produkt war nach Dünnschichtchromatographie einheitlich, Rf-Wert = 0,65 (Chloroform-Methanol 8:2); = 0,73 (Methanol) (REINDEL-HOPPE-Reagens, UV-Fluoreszenz).

Hydrierung unter den bei XIV angegebenen Bedingungen entfernte aus XIIb die PZ- und die beiden Nitro-Gruppen. Zur Aufarbeitung wurde vom Katalysator abgenutscht, das Filtrat eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und die Lösung zur Entfernung des bei der Hydrierung (aus der PZ-Gruppe) gebildeten Anilins und *p*-Toluidins mehrmals mit Äther extrahiert. Dann wurde mit der wässrigen Phase wie bei XIV beschrieben verfahren. Das dabei erhaltene Nonapeptidderivat XIV war identisch mit dem aus XIIa dargestellten Produkt.

Herrn Dr. H. ZUBER sei für die Ausführung der Papierelektrophoresen und quant. Aminosäurebestimmung gedankt; die Mikroanalysen, Bestimmung der optischen Drehungen und Titrationen wurden in unseren Speziallaboratorien unter der Leitung der Herren Dres. W. PADOWETZ, H. HÜRZELER und H. MAJER ausgeführt.

SUMMARY

The synthesis of derivatives of the nonapeptide sequence β^{11-19} -corticotropin (Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro) which have been used for the preparation of a nonadecapeptide, β^{1-19} -corticotropin, displaying corticotropic activity¹⁾, is described in detail. Combination of acid-labile protecting groups (BOC-, OtBu- and Trityl-) were found to be especially useful for this and subsequent work, as they can be cleaved in a very specific manner under very mild conditions.

The nonapeptide derivatives XII–XIV have been obtained as optically pure entities despite the fact that some racemisation had apparently occurred in step VIII \rightarrow IX.

Whereas paper chromatography of protected peptide derivatives usually gives bad separations, thin layer chromatography has been found to be very valuable for assessing the purity of intermediates and products.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

280. β^{1-16} -Corticotropin-methylester

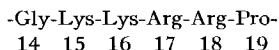
von Robert Schwyzer, Werner Rittel und Antigone Costopanagiotis

(29. IX. 62)

Die von unserem Arbeitskreise ausgearbeiteten Methoden zur Darstellung von komplizierten Polypeptiden der Corticotropin- und Melanotropin-Reihe¹⁾ haben wir u. a. auch zur Synthese eines Polypeptids mit den ersten sechzehn N-terminalen Aminosäureresten des Corticotropins benützt. Dieses Polypeptid ist insofern interes-

¹⁾ Als Lit.-Quelle vgl. R. SCHWYZER, A. COSTOPANAGIOTIS & P. SIEBER, *Chimia (Schweiz)* 16, 295 (1962).

sant, als es nur die Hälfte der auffälligen Sequenz 14 bis 19 (I), welche vier aufeinanderfolgende, basische Aminosäurereste in sich vereinigt, enthält:



I: Sequenz 14–19 des Corticotropins

Die Feststellung seiner biologischen Wirkungsqualitäten soll über den für die hormonalen Eigenschaften nötigen Informationsgehalt dieser offenbaren Schlüsselposition Auskunft geben.

Die Synthese geht von dem wichtigen, kristallisierten Decapeptidderivat II aus²⁾, welches mittels der Carbodiimid-Methode mit dem Hexapeptidderivat III kondensiert wurde (Formelschema 1). Zur Reinigung des entstandenen Hexadecapeptidderivates IV leistete die Gegenstromverteilung in der automatischen Apparatur nach HIETALA³⁾ ausgezeichnete Dienste. Die Abspaltung der Schutzgruppen verlief wie gewohnt mit hervorragender Ausbeute in Gegenwart von 90-proz. Trifluoressigsäure. Nach Austausch der Trifluoracetat- gegen Acetat-Ionen wurde das β^{1-16} -Corticotropin-methylester-tetraacetat (V) an Carboxymethylcellulose mittels eines Puffergradienten von 0,05M \rightarrow 0,3M Ammoniumacetat (pH = 6) chromatographiert (Fig. 1).

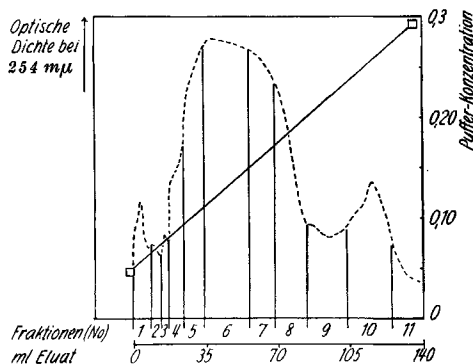


Fig. 1. Chromatographie von β^{1-16} -Corticotropin-methylester an Carboxymethylcellulose^{3a)}
Optische Dichte des Eluats (-----); Konzentrationsverlauf des Puffergradienten, welcher durch Mischen von je 70 ml 0,05M und 0,3M Ammoniumacetat, pH = 6,0 hergestellt wurde (\square — \square)

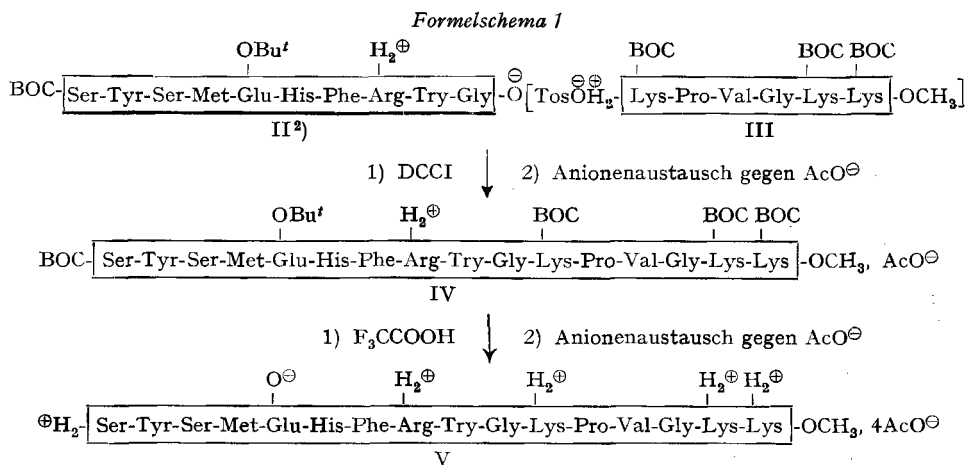
Die sehr hygroskopische Substanz erwies sich bei der Elektrophorese als einheitlich, ebenso im Dünnschichtchromatogramm an Silicagel. Bei der Totalhydrolyse entstanden die einzelnen Aminosäuren im erwarteten molaren Verhältnis. Das Verhältnis Tyr/Try ergab sich aus dem UV.-Spektrum zu 0,907. Der Abbau des Totalhydrolysates mit L-Aminosäureoxydase verlief gleich wie derjenige eines aus L-Aminosäuren hergestellten Testgemisches; auch diejenigen Aminosäuren, welche langsam abgebaut werden, nämlich Gly, Pro, Glu und Ser, wurden gleich stark angegriffen wie die entsprechenden des Testgemisches. Es kann daraus und aus dem Verlaufe der Synthese geschlossen werden, dass alle optisch aktiven Reste in der L-Konfiguration vorliegen.

²⁾ R. SCHWYZER & H. KAPPELER, *Helv.* **44**, 1991 (1961).

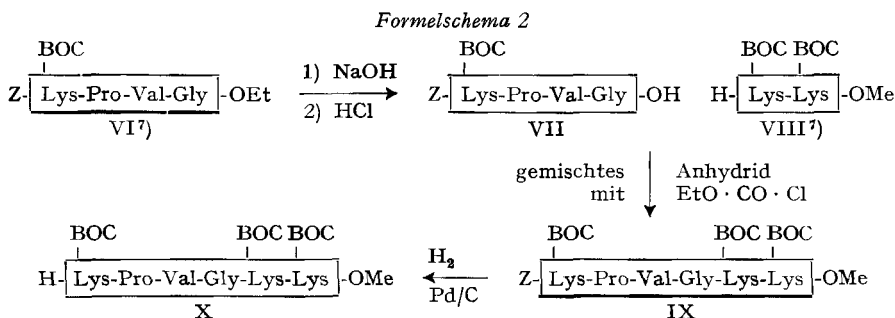
³⁾ P. K. HIETALA, *Acta chem. scand.* **14**, 212 (1960).

^{3a)} E. A. PETERSON & H. A. SOBER, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 751 (1956).

Biologisch zeigt die Verbindung praktisch keine ACTH-Aktivität. *In vitro* nach SAFFRAN & SCHALLY⁴⁾ wurden 5–10 Einheiten/mg gefunden (verglichen mit einem Standard-Präparat von 95 USP-E/mg). *In vivo* nach SAYERS⁵⁾ ergab sich eine Aktivität von weniger als 1 USP-E/mg. Als Vergleichspräparat diente ACTH, welches mittels Oxycellulose gereinigt worden war und einen Gehalt von 95 USP-Einheiten aufwies⁶⁾.



Als Ausgangsmaterialien für die Synthese des Hexapeptides N^ε-*t*-Butoxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-(N^ε-*t*-butoxy-carbonyl)-L-lysyl-(N^ε-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysin-methylester (III) dienten das Tetrapeptidderivat VI und das Dipeptidderivat VIII⁷⁾, entsprechend dem Formelschema 2. Alkalische Verseifung von VI ergab die amorphe, freie Carbonsäure VII, welche mittels der Methode der gemischten Anhydride mit dem Dipeptidderivat VIII kondensiert wurde. Das entstandene, vollständig geschützte Hexapeptidderivat IX liess sich aus Acetonitril kristallisieren,



- 4) M. SAFFRAN, A. V. SCHALLY & B. G. BENFELY, *Endocrinology* 57, 399 (1957); in verdankenswerter Weise ausgeführt von Frau Dr. B. SCHÄR und Dr. H. KAPPELER.
 5) M. A. SAYERS, G. SAYERS & L. A. WOODBURY, *Endocrinology* 42, 379 (1948); in verdankenswerter Weise ausgeführt von Prof. Dr. W. SCHULER.
 6) Von der Firma WILSON & Co. Inc., Chicago, Ill., in freundlicher Weise überlassen, wofür wir auch hier bestens danken möchten.
 7) R. SCHWYZER & W. RITTEL, *Helv.* 44, 159 (1961).

wodurch auch die Einheitlichkeit des daraus durch katalytische Hydrierung gewonnenen Amins X gewährleistet war. Dieses wurde durch Umsatz mit der berechneten Menge *p*-Toluolsulfonsäure in Pyridin (zur Vermeidung saurer Reaktion, welche die *t*-Butoxycarbonylgruppen gefährden würde) in das *p*-Toluolsulfonat III übergeführt, welches ohne weitere Reinigung zur Kondensation gemäss Formelschema 1 verwendet wurde.

Experimenteller Teil

1. [$H_2^{\oplus} \cdot Lys(BOC)\text{-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC) \cdot OCH_3, TosO^{\ominus}$] (III): 1,104 g des Carbo-benzyloxy-hexapeptid-Derivates IX wurden in 30 ml MeOH durch leichtes Erwärmen gelöst und in Gegenwart von 100 mg 10-proz. Palladium-Kohle bei Zimmertemperatur hydriert. Nach 35 Min. war die Wasserstoffaufnahme beendet. Nach Abtrennen des Katalysators wurde das Filtrat i. V. zur Trockne eingedampft. Das Eindampfen wurde mit Benzol noch zweimal wiederholt: farbloses Harz (X), 933 mg (96,1%). Dünnschichtchromatogramme auf Silicagel im System $CHCl_3$: MeOH (9:1 Vol.) und in MeOH alleine ergaben nur *einen* Substanzfleck ($R_f = 0,2$, resp. 0,5) beim Entwickeln mit REINDEL-HOPPE-Reagens und mit Ninhydrin.

930,5 mg dieses Produktes X wurden in 5 ml Pyridin gelöst und mit 182,9 mg *p*-Toluolsulfonsäurehydrat versetzt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit Äther verrieben: 1,043 g (95,5%), farbloses, amorphes Salz.

2. $BOC \cdot Ser\text{-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu)}\text{-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys(BOC)\text{-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC) \cdot OCH_3, AcOH}$ (IV): 351 mg des Decapeptidderivates II wurden mit einem 50-proz. Überschuss (414 mg) des Hexapeptid-toluolsulfonates (III) in 2 ml Pyridin mit 148 mg Dicyclohexyl-carbodiimid (200-proz. Überschuss) während $5\frac{1}{2}$ Tagen bei ca. 20° unter Feuchtigkeitsausschluss gerührt. Dabei löste sich das Decapeptidderivat langsam auf und es entstand ein gallertiger Niederschlag. Dieser wurde, ohne vorher das Pyridin zu entfernen, mehrmals mit ca. 20–50 ml Essigester-Äther (1:1 Vol.) verrieben und dann abgenutscht. Das Produkt wurde auf der Nutsche zur Entfernung unreaktierten Hexapeptides mit wenig 0,5 N Essigsäure und Wasser nachgewaschen: 758 mg rohes Toluolsulfonat.

Dieses rohe Salz wurde in wenig 50-proz. MeOH gelöst und durch eine kleine Säule von Amberlite IRA-400 (Acetat-Form) filtriert. 708 mg des entstandenen rohen Acetats wurden in einem Verteilungsapparat nach HETALA⁸⁾ verteilt. Das Lösungsmittelgemisch bestand aus 2 l $CHCl_3$, 1,142 l CCl_4 , 4,571 l MeOH und 2,284 l Pufferlösung, pH = 4,5 (28,5 ml Eisessig und 19,25 g Ammoniumacetat zu 1 l). Das Volumenverhältnis Oberphase zu Unterphase in der Apparatur betrug 1:1, wobei sich in jedem der 240 (= N) Elemente 6,6 ml (= V_b) Unterphase und 6,6 ml (= V_t) Oberphase befanden. Bei stationärer Unterphase wurden 1,5 ml Oberphase pro Minute durchgepumpt. Die Oberphase wurde bei ihrem Austritt aus der Apparatur in Fraktionen zu 18 ml (265 Fraktionen) aufgefangen. Die Reinsubstanz befand sich in den Fraktionen 215–262; die bis zum Substanzmaximum ausgeflossene Menge Oberphase betrug 4050 ml (= v_t). Der Verteilungskoeffizient der gereinigten Substanz ergibt sich zu

$$K = \frac{N \cdot V_b}{v_t - N \cdot V_t} = \frac{240 \times 6,6}{4050 - 240 \times 6,6} = 0,64.$$

3. $H \cdot Ser\text{-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys} \cdot OCH_3, 4AcOH$ (V): 277 mg geschütztes IV wurden in 1 ml 90-proz. F_3CCOOH gelöst und während 1 Std. bei ca. 20° belassen. Die Trifluoressigsäure wurde darauf i. V. verdampft und der Rückstand in wässriger Lösung durch eine kleine Säule ($l = 20,5$; $\varnothing = 0,9$ cm) von Amberlite IRA-400 (Acetat-Form) filtriert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels verblieben 250 mg V. Dieses Produkt wurde an einer Säule von 1,3 g Carboxymethylcellulose ($l = 10$, $\varnothing = 1$ cm) mittels eines Puffergradienten chromatographiert. Der Lösungsmittelgradient wurde in zwei offenen Gefässen mit Rührer aus 70 ml 0,05 M Ammoniumacetat (pH = 6) und 70 ml 0,3 M Ammoniumacetat (pH = 6) hergestellt. Der Verlauf des Chromatogrammes wurde durch kontinuierliche Messung der UV.-Absorption des Eluates bei 254 $m\mu$ ⁸⁾ verfolgt (Fig. 1). Die Fraktionen 6 und 7 enthielten 230 mg

⁸⁾ Mittels eines «Uvicord» der Firma LKB, Stockholm.

(ca. 90%, bezogen auf IV) reines V. – $[\alpha]_D^{25} = -43,7^\circ \pm 2,5^\circ$ ($c = 1$ in 10-proz. Essigsäure); UV.-Absorption vgl. Fig. 2. Daraus ergibt sich das Tyr/Try-Verhältnis zu⁹⁾:

$$\frac{M_{\text{Tyr}}}{M_{\text{Try}}} = \frac{0,592 \cdot D_{294,4} - 0,263 \cdot D_{280}}{0,263 \cdot D_{280} - 0,17 \cdot D_{294,4}} = 0,907$$

$$D_{294,4} = 0,320 - 0,016 \text{ (Basisabsorption)} = 0,304$$

$$D_{280} = 0,470 - 0,018 \text{ (Basisabsorption)} = 0,452$$

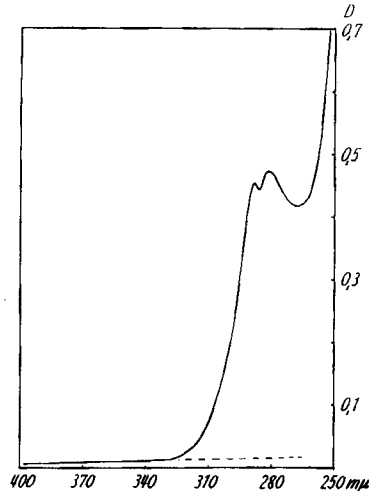


Fig. 2. UV.-Absorption von β^1 - 16 -Corticotropin-methylester in 0,1N NaOH

Die Einheitlichkeit der Fraktion wurde durch Behandeln kleiner Proben mit F_3CCOOH und Elektrophorese der Produkte auf Papier (ca. 7 V/cm, 4,5 Std., 1N Essigsäure) nachgewiesen; das Hexadecapeptid V liess sich von andern Peptiden durch Wanderungsgeschwindigkeit und Farbreaktionen (Ninhydrin, PAULY-, SAKAGUCHI- und EHRLICH-Reagens) leicht unterscheiden.

Im Dünnschichtchromatogramm auf Silicagel in System 101¹⁰⁾ verhielt sich die Substanz einheitlich mit $R_f = 0,49$ (Anfärbung mit PAULY- und Ninhydrin-Reagens).

Die quantitative Aminosäureanalyse ergab: His 0,96; Lys 2,85; Arg 0,82; NH_3 2,65; Ser 1,44; Glu 0,83; Pro 0,66; Gly 1,87; Val 1,00; Met 0,76; Tyr 0,88; Phe 0,96; (molare Verhältnisse bezogen auf Val \equiv 1). Aus der Zahl von Tyr-Resten und Tyr/Try = 0,907 ergibt sich Try = 0,80; 1 μ Mol des für die Analyse verwendeten Hydrolysats wurde in 0,3 ml Trispuffer bei pH = 7,5 gelöst und die Lösung halbiert: die eine Hälfte wurde mit 0,05 ml Trispuffer (1), die andere mit 0,05 ml einer 10-proz. Enzymlösung (L -Aminosäureoxydase)¹¹⁾ in Trispuffer (pH = 7,5) versetzt (2). Ein aus reinen Aminosäuren bereitetes Testgemisch wurde in gleicher Weise vorbereitet (3, 4). Alle 4 Proben wurden nach Zugabe von 1 Tropfen Toluol mit O_2 begast und in geschlossenen Gefässen 24 Std. bei 37° unter langsamem Rühren aufbewahrt. Je 19 μ l dieser Lösungen wurden auf 4 Papierbogen aufgetragen und in der 1. Richtung mittels Elektrophorese (ca. 50 V/cm, pH = 1,9), in der 2. Richtung chromatographisch (BuOH/AcOH/ H_2O = 4:1:1 Vol.) aufgetrennt. Nach Entwickeln mit Ninhydrin bieten die Chromatogramme 1 und 3 (ohne Enzym) dasselbe Bild: alle Aminosäuren ausser Try sind vorhanden. Bei 2 und 4 (mit Enzym) lassen sich Gly, Pro, Glu und Ser, die nicht vollständig abgebaut werden, in ungefähr gleicher Menge nachweisen.

⁹⁾ Vgl. G. H. BRAVAN & E. R. HOLIDAY, *Advances Protein Chemistry* 7, 319 (1952).

¹⁰⁾ Papierchromatogramme und Dünnschichtchromatogramme wurden im Labor der Herren Dr. R. NEHER und E. VON ARX (CIBA A.G.) ausgeführt. Das System 101 besitzt die Zusammensetzung: n -BuOH-Pyridin-AcOH- H_2O (30:20:6:24 Vol.).

¹¹⁾ L -Aminosäureoxydase der Firma MANN Research Laboratories, New York, N.Y.

4. *Z·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly·OH (VII)*: Zu einer Lösung von 26,76 g (40,4 mMol) *Z·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly·OEt (VI)*⁷⁾ in 500 ml Äthanol gab man unter Eiskühlung 50 ml 1N Natronlauge und liess 2 Std. bei 2° stehen. Hierauf versetzte man mit 700 ml Wasser und neutralisierte die über-schüssige Lauge mit festem CO₂. Der Alkohol wurde im Vakuum bei 40° Badtemperatur abdestil- liert, wobei aus der verbleibenden wässrigen Lösung ein Teil des Natriumsalzes von VII als gallertiger Niederschlag ausfiel. Er wurde durch leichtes Erwärmen in Lösung gebracht, eine Spur unlösliches Material abfiltriert, das Filtrat auf 0° gekühlt und das Tetrapeptidderivat durch Zu- gabe von 30 ml eiskalter, 2N HCl ausgefällt. Der feinkörnige Niederschlag wurde abgenutscht, mit Eiswasser gewaschen und über H₂SO₄ getrocknet: 22,2 g (87%), amorphes Pulver, Smp. ca. 72–95°. Zur weiteren Verarbeitung ist das Rohprodukt genügend rein; zur Analyse fällte man aus Aceton- Äther um.

C₃₁H₄₇O₉N₅ (633,73) Ber. C 58,75 H 7,48 N 11,05% Gef. C 58,38 H 7,47 N 10,75%

5. *Z·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)·OMe (IX)*: In eine Lösung von 23,26 g (36,8 mMol) *Z·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly·OH (VII)* (24 Std. bei 40° und 0,01 Torr getrocknet) und 5,65 ml (40,5 mMol) abs. Triäthylamin in 200 ml abs. Tetrahydrofuran liess man bei –15° unter Rühren 3,63 ml (38,2 mMol) Chlorkohlensäure-äthylester eintropfen. Nach 20 Min. Rühren bei –15° wurde bei dieser Temperatur eine Lösung von 17,60 g (35,9 mMol) *H·Lys(BOC)-Lys(BOC)·OCH₃*⁷⁾ in 80 ml abs. Tetrahydrofuran zugegeben. Hierauf wurde 24 Std. bei Raumtemperatur belassen, wobei ein gallertiger Niederschlag ausfiel. Dessenungeachtet dampfte man das Reak- tionsgemisch im Vakuum bei 40° Badtemperatur auf ein kleines Volumen ein und nahm den gallertigen Rückstand in viel Essigester und Wasser auf. Die Essigesterlösung wurde unter Eis- kühlung mit verdünnter Zitronensäurelösung, Wasser, NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, die wässrigen Phasen mit viel Essigester nachgewaschen, die Essigesterlösungen vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Den Eindampfrückstand zerrieb man zur Reinigung mehrmals mit viel Äther und dann dreimal mit je 1 l Tetrahydrofuran-Äther-Gemisch (1:4). Die ungelösten Anteile wurden getrocknet (31,3 g), in 300 ml heissem Acetonitril gelöst und dann langsam abkühlen gelassen, wobei das Hexapeptidderivat in feinen Nadeln zu kristallisieren begann. Neben den Kristallen schied sich anfänglich auch gallertiges Material aus. Der Kolben- inhalt wurde dann jeweils wieder auf 50–60° erwärmt, wobei die amorphen Anteile in Lösung gingen und die Kristalle ungelöst blieben. Nach mehreren Tagen war das gesamte Produkt durch- kristallisiert. Abnutschen der Kristalle und Waschen mit viel Acetonitril gab 30,12 g (76%) reines X, Smp. 119–126°. Zur Analyse wurde aus Methanol und aus Acetonitril umkristallisiert: Smp. 121–126°; $[\alpha]_D^{25} = -50,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,885$ in Methanol).

C₅₄H₈₉O₁₅N₉ (1104,38) Ber. C 58,73 H 8,12 N 11,42% Gef. C 58,43 H 8,19 N 11,39%

Aus dem geschützten Hexapeptid werden durch konz. HCl bei 40° innert weniger Sekunden die BOC-Gruppen und innert 1 Std. die Carbobenzyloxy- und Methylester-Gruppe abgespalten. Das dabei entstehende, freie Hexapeptid *H·Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys·OH* zeigt bei Papier- chromatographie die Rf-Werte 0,04 (System 45¹²⁾) und 0,05 (System 87¹³⁾), sowie eine Laufstrecke von 5 cm (System 45, 40 Std. Laufzeit). Bei diesen Hydrolysen tritt aber schon nach 15 Min. eine geringe, bei längeren Hydrolysezeiten merklich zunehmende Spaltung der Peptidbindungen ein.

SUMMARY

The synthesis of β^{1-16} -corticotropin methyl ester is described¹⁴⁾. As in previous work from these laboratories, *t*-butyl- and *t*-butoxycarbonyl groups were employed for the protection of side chain carboxyl and amino groups, respectively. This warrants excellent yields in the critical last step of the synthesis of large polypeptides: the removal of blocking groups. The compound was shown to be pure by thin layer

¹²⁾ System 45: *sec.*-BuOH + 3-proz. wässrige NH₃-Lösung (100:44 Vol.).

¹³⁾ System 87: Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (20:1:5 Vol.).

¹⁴⁾ Nach Einreichung dieses Manuskripts erfahren wir, dass K. HOFMANN & H. Yajima, Recent Progress in Hormone Research 78, 41 (1961), β^{1-16} -Corticotropin (ohne Ester-Gruppe) her- gestellt haben.

chromatography on silicagel, by electrophoresis on paper, by amino-acid analysis, and by digestion of the total hydrolysate with L-amino-acid oxidase of snake venom. The ACTH-activity displayed was 5–10 U/mg in the *in vitro* assay of SAFFRAN & SCHALLY⁴⁾ and less than 1 USP-U/mg in the subcutaneous test according to SAYERS⁵⁾ (solution in 1% gelatin).

Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich, und
Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

281. Fluoreszierende Stoffe aus *Ephestia kühniella* ZELLER

3. Mitteilung¹⁾

Isolierung und Strukturen von Erythropterin, Ekapterin und Lepidopterin

von M. Viscontini und H. Stierlin

(1. X. 62)

Nachdem bei früheren Untersuchungen²⁾ an *Ephestia kühniella* ZELLER (Mehlmotte) das Vorkommen verschiedener Pterine nachgewiesen und vier dieser Pterine als Xanthopterin, Isoxanthopterin, 2-Amino-6-hydroxy-pteridin (Hb₁) und Bioppterin (Hb₂) identifiziert werden konnten, erschien es in Fortsetzung dieser Arbeiten wünschenswert, die übrigen bisher in ihrer Struktur noch nicht aufgeklärten Pterine zu untersuchen. Es handelt sich hauptsächlich um das bereits erwähnte, voraussichtlich mit Xanthopterin verwandte Pterin G₁, sowie um eine in unserer ersten Arbeit erwähnte orange-fluoreszierende Substanz. Damals wurde zur Isolierung der Substanzen mit den ganzen Tieren gearbeitet, wir konnten aber in der Zwischenzeit feststellen, dass die uns interessierenden Pterine in annehmbarer Menge in den Köpfen der Mehlmotten vorkommen. Wir verwendeten daher in der vorliegenden Arbeit die abgetrennten Köpfe, was den grossen Vorteil hat, dass bei der Säulenchromatographie unerwünschte Begleitstoffe wie Proteine, Lipide usw. weitgehend fehlen.

Als tierisches Material wurden die schwarzbraunäugige Wildform *a*⁺ und die rotäugige Mutante *a* von *Ephestia kühniella* verwendet. Beide Stämme wurden uns in sehr freundlicher Weise von Herrn Prof. A. KÜHN, MAX-PLANCK-Institut für Biologie, Tübingen, überlassen.

Zunächst prüften wir mit Hilfe der üblichen zweidimensionalen Papierchromatographie das genaue Muster der in den *Ephestia*-Köpfen vorhandenen fluoreszierenden Substanzen nach.

Bei der Verwendung ammoniakhaltiger Laufmittel stellte sich heraus, dass *Ephestia*-Pterine während der Aufarbeitung teilweise zersetzt werden; es wurde

¹⁾ Vorläufige Mitteilung: M. VISCONTINI & H. STIERLIN, Helv. 44, 1783 (1961).

²⁾ M. VISCONTINI, A. KÜHN & A. EGELHAAF, Z. Naturforsch. 11b, 501 (1956).