

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. BRINER & E. DALLWIGK, *Helv.* 39, 1446 (1956); C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 243, 630 (1956).
[2] E. BRINER & M. RICCA, *Helv.* 41, 2178 (1958).
[3] E. BRINER & S. FLISZÁR, *Helv.* 42, 2063 (1959).
[4] E. BRINER, S. FLISZÁR & M. RICCA, *Helv.* 42, 749 (1959).
[5] E. DALLWIGK & E. BRINER, *Helv.* 41, 1030 (1958).
[6] S. M. GOODWIN, N. M. JOHNSON & B. WITKOP, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 4273 (1953).
[7] E. BRINER, *Helv.* 22, 591 (1939); *Bull. Soc. chim. France* 1948, 1; C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 246, 1480 (1958).
[8] E. BRINER, A. DEMOLIS & H. PAILLARD, *Helv.* 14, 794 (1931).
[9] W. RIGBY, *J. chem. Soc.* 1950, 1907.
[10] R. CRIEGEE, *Record chem. Progress* 78, 111 (1957); P. S. BAILEY, *Chem. Rev.* 58, 925 (1958); C. CRISTOL, Thèse, Montpellier, mars 1964.
[11] W. TRAUBE, *Ber. deutsch chem. Ges.* 40, 4942 (1907).

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

2. Mitteilung

Isolierung einer Riboflavin-Formicapterin-Verbindung

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

(2. IX. 64)

In unserer ersten Mitteilung [1]³⁾ über die fluoreszierenden Stoffe aus roten Waldameisen haben wir darauf hingewiesen, dass das Riboflavin, welches immer reichlich vorhanden war, teilweise in gebundener Form vorliegt. Die ausgesprochene Unbeständigkeit sowie die sehr geringe vorhandene Menge dieser Riboflavin-Verbindungen wirkten sich sehr erschwerend auf ihre Isolierung und Reindarstellung aus. In jüngster Zeit ist es uns jedoch gelungen, unter schonendster Aufarbeitung der äthanolischen Extrakte von Arbeiterinnen eine dieser Riboflavin-Verbindungen weitgehend rein darzustellen (ca. 60–80 μg), so dass wir in der Lage sind, das UV-Spektrum sowie einige Rf-Werte dieser Substanz mitzuteilen, die einer bisher unbekannteren Stoffgruppe angehört.

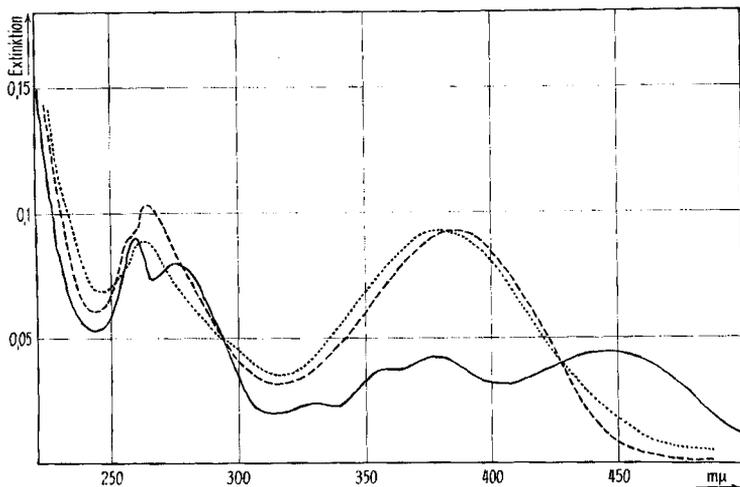
Zur Isolierung der Substanz gingen wir von 680 g *Formica rufa* L.-Arbeiterinnen aus. Nach Extraktion mit 50-proz. Äthanol und nochmaliger Behandlung des Extraktes mit reinem Wasser wurde die Verbindung mittels des bisher in unseren Laboratorien vielfach bewährten Verfahrens der Säulenchromatographie auf Cellulose isoliert. Die Unbeständigkeit der Substanz im basischen Bereich liess nur Reinigungs-

¹⁾ Institut für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg.

²⁾ Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich.

³⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2052.

prozesse unter pH 7 zu. Durch mehrfaches Wechseln des Elutionsmittels erhielten wir schliesslich ein Produkt, welches das wiedergegebene UV.-Spektrum (s. Fig.) zeigte.



UV.-Spektrum der Riboflavin-Formicapterin-Verbindung

- pH 1,5
- pH 6,5
- pH 10,5. Die Verbindung hat sich zersetzt, in der Lösung liegt eine Mischung von Riboflavin und Formicapterin vor.

Da sich dieses UV.-Spektrum im sauren Bereich durch weitere Reinigung nicht mehr verändern liess, nehmen wir an, dass die Verbindung weitgehend rein erhalten wurde. Papierchromatographisch konnten wir in *fünf* Lösungsmitteln immer nur je einen fluoreszierenden Fleck feststellen (s. Tab.).

Im sauren und neutralen Bereich gleicht das UV.-Spektrum dem eines Pteridins; im basischen Bereich jedoch (besonders wenn die Luft nicht ausgeschlossen wurde) zerfiel die Verbindung ziemlich rasch in mehrere Komponenten. Es liessen sich dann Riboflavin und Formicapterin [1] chromatographisch isolieren. Das Spektrum der wässrigen Lösung nach Einwirkung von Ammoniak (pH 10,5) (s. Fig.) ergibt eine Kurve, die einer Mischung von Riboflavin und Formicapterin entspricht.

Die wässrige Lösung der Verbindung war, auch nach Ansäuern mit Salzsäure, blassgelb gefärbt mit hellgrüner Fluoreszenz. Bei Zugabe von Ammoniaklösung färbte sie sich tiefgelb, verblasste jedoch bereits in wenigen Sekunden bis auf einen schwachen Gelbton, der auch beim Ansäuern erhalten blieb. Die Fluoreszenz der ammoniakalischen Lösung war gelb, und es war nicht mehr möglich, durch Ansäuern die hellgrüne Fluoreszenz wieder herzustellen. Auch aus diesem Verhalten wurde deutlich, dass die Riboflavin-Formicapterin-Verbindung sich zersetzt hatte. Der Zerfall trat offenbar rasch bei Zugabe von Ammoniaklösung ein.

Aus allen diesen Beobachtungen ergibt sich, dass im sauren und neutralen Bereich kein Gemisch von Riboflavin und Formicapterin vorlag wie im basischen, sondern eine reine Verbindung vorhanden war.

Die Untersuchungen wurden vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG in dankenswerter Weise unterstützt.

Experimentelles. – *Tiermaterial:* Das Tiermaterial (680 g Frischgewicht) stammte aus dem Forstamt Kitzingen bei Würzburg. Es handelte sich um zwei Einzelnester von *Formica rufa* L. [2]. Die relativ grossen Arbeiterinnen wurden in den Monaten Juni und Juli 1962 eingesammelt, mit Hilfe eines Exhaustors vom Nestmaterial befreit und in 96-proz. Äthanol konserviert. Bis zur Aufarbeitung wurde das Material im Kühlschrank bei 4° unter Lichtausschluss aufbewahrt. Die Bearbeitung begann Ende September und endete im März 1963.

Die *Gewinnung des Extraktes* erfolgte mit 50-proz. Äthanol. Das Tiermaterial wurde in einem Starmix zerkleinert und mit Cellulosepulver zu einem zähflüssigen Brei homogenisiert. Dieser Brei wurde zur Abtrennung der fluoreszierenden Stoffe von den übrigen Körperteilen auf eine gut gewaschene eingeschlammte Papiersäule (10 cm × 8 cm) gegeben und mit Äthanol: Wasser-(1:1) extrahiert. Der äthanolische Extrakt wurde mittels eines Vakuumrotationsverdampfers soweit wie möglich vom Lösungsmittel befreit. Diese und alle weiteren Operationen wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Zur Entfernung der herausgelösten Lipide wurde der dunkelbraune Rückstand in wenig destilliertem Wasser aufgenommen; diese Lösung wurde wiederum mit Cellulosepulver angedickt und über eine kurze, breite Papiersäule filtriert.

Abtrennung der Riboflavin-Verbindung: Das Filtrat wurde wiederum weitgehendst im Vakuum eingengt und der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen. Diese Lösung wurde auf eine trocken gestopfte, lange und gut gewaschene Papiersäule (30 cm × 8 cm) gegeben, die sofort mit Wasser eluiert wurde. Es liess sich eine schnell wandernde, grünlich fluoreszierende Fraktion von einer langsamer wandernden, gelb fluoreszierenden abtrennen. Die hier interessierende Substanz befand sich in der gelb fluoreszierenden Fraktion. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum liess sich der Rückstand mit Butanol:Eisessig:Wasser-(4:1:1) in 6 fluoreszierende Fraktionen auftrennen (Papiersäule, trocken gestopft: 30 cm × 6 cm). Die zweite eluierbare, grün fluoreszierende Fraktion wurde abgetrennt und nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wiederum in Wasser aufgenommen und chromatographiert (Säule, trocken gestopft: 20 cm × 4 cm). Nun trennte sich eine hellgrün fluoreszierende Substanz von einer schneller wandernden, violett fluoreszierenden ab. Die papierchromatographische Untersuchung der hellgrün fluoreszierenden Fraktion in 5 Lösungsmittelsystemen (s. Tabelle) ergab je nur einen einzigen fluoreszierenden Fleck, der in einem Gemisch von Propanol:1-proz. wäss. Ammoniak-(2:1) zersetzt wurde.

Weitere Reinigungsprozesse: Es war zu vermuten, dass die Verbindung noch mit nicht fluoreszierenden Stoffen verunreinigt war. Da die Verwendung von basischen Elutionsmitteln entfiel, wurde die grün fluoreszierende Fraktion mit Propanol:Wasser-(3:1) eluiert (Säule, trocken gestopft: 30 cm × 2 cm). Nach zwei weiteren Reinigungsprozessen über dünne Säulen (30 cm × 1 cm) mit 3-proz. wässriger Ammoniumchlorid-Lösung und mit reinem Wasser zeigte die fluoreszierende Lösung das in der Figur dargestellte UV.-Spektrum.

Eine Nachreinigung der Substanz mit Butanol:Eisessig:Wasser-(4:1:1), Propanol:1-proz. NH₄-Acetat-(3:1) sowie mit Wasser veränderte das UV.-Spektrum nicht. Wir nehmen deshalb an, dass das erhaltene Spektrum dem einer reinen Substanz entspricht.

Identifizierung von Spaltprodukten: Die Behandlung der Substanz mit Ammoniaklösung führte in zwei Stunden zu vollständiger Zersetzung (papierchromatographischer Nachweis). Die bei neutraler und saurer Reaktion hellgrüne Fluoreszenz der Lösung schlug dabei nach Gelb um. Nach dem Ansäuern blieb die gelbe Fluoreszenz bestehen. Das grün fluoreszierende Produkt war also zersetzt worden und konnte nicht wieder hergestellt werden. Papierchromatographisch konnten jetzt zwei Stoffe erkannt werden mit gelber bzw. rosa Fluoreszenz; letztere schlug im basischen Bereich in Tiefgelb um. Im papierchromatographischen Vergleich (Mischchromatogramm) mit Reinsubstanzen zeigten die beiden fluoreszierenden Stoffe gleiche Rf-Werte wie Riboflavin bzw. Formicapterin. Bereits die charakteristischen Fluoreszenzen hatten auf dieses Ergebnis hingedeutet.

Wenn es uns wegen der geringen Substanzmenge auch nicht gelungen ist, von den Spaltprodukten reine UV.-Spektren zu erhalten, so glauben wir doch auf Grund der erhaltenen Spektren in Verbindung mit den papierchromatographischen Untersuchungen und den charakteristi-

schen Fluoreszenzfarben, dass die Bildung von Riboflavin und Formicapterin als Spaltprodukte als erwiesen betrachtet werden kann.

Berechnet man auf Grund des langwelligen Riboflavinmaximums bei $446\text{ m}\mu$ den Riboflavin-gehalt der Lösung nach der ammoniakalischen Spaltung, so hatten wir aus der isolierten Menge der neuen Verbindung etwa $40\text{ }\mu\text{g}$ Riboflavin erhalten.

Rf-Werte der isolierten Riboflavin-Verbindung

Papier: SCHLEICHER & SCHÜLL 204 b mgI; aufsteigend, im Vergleich zu Riboflavin

Laufmittel	Riboflavin	Riboflavin-Verbindung
dest. Wasser	0,27	0,135
3-proz. wäss. NH_4Cl	0,31	0,14
Butanol: Eisessig: Wasser-(4:1:1)	0,22	0,43
Propanol: 1-proz. wäss. Ammoniaklösung-(2:1)	0,40	0,5-0,6 (unter N_2 !) (Schwanzbildung)
Propanol: 2-proz. wäss. NH_4 -Acetat-(1:1)	0,48	0,50

Im Gegensatz zum Formicapterin [1], aber gleich wie Riboflavin, zeigte die neue Verbindung keine Retention in wässriger Ammoniumchlorid-Lösung. Das papierchromatographische Verhalten der Riboflavin-Formicapterin-Substanz steht dementsprechend dem des Riboflavins näher als dem des Formicapterins. Durch die «Komplexbildung» wird die Löslichkeit des Riboflavins in Wasser herabgesetzt, in organischen Laufmitteln erhöht.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Arbeiterinnen der Art *Formica rufa* L. wurde ein hellgrün fluoreszierender Stoff isoliert, der nach ammoniakalischer Behandlung Riboflavin und Formicapterin als fluoreszierende Substanzen erkennen liess. Die vorliegende Riboflavin-Formicapterin-Verbindung wurde durch UV.-Spektren und Rf-Werte charakterisiert.

Institut für angewandte Zoologie der Universität Würzburg
Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, *Helv.* **45**, 1571 (1962).
[2] Vgl. K. GÖSSWALD & G. H. SCHMIDT, *Waldhygiene* **3**, 37 (1959).