

- [6] W. FEITKNECHT, Fortschr. Chem. Forsch. 2, 670 (1953).  
 [7] W. FEITKNECHT, Werkstoffe & Korrosion 9, 156 (1958); Chemistry & Ind. 1959, 1102.  
 [8] M. SAHLI, Diss. Bern 1952.  
 [9] S. GHOSE, Acta crystallogr. 17, 1051 (1964).  
 [10] M. REINERT, Diss. Bern 1965.  
 [11] J. L. JAMBOR, Canad. Min. 8, 92 (1964).  
 [12] E. HAYEK & H. GLEISPACH, Mh. Chem., im Druck.  
 [13] W. NOWACKI & J. N. SILVERMAN, Z. Kristallogr. 115, 21 (1961).  
 [14] W. FEITKNECHT, Kolloid-Z. 136, 52 (1954).  
 [15] W. FEITKNECHT, Z. Kristallogr. (A) 84, 173 (1932).  
 [16] H. ZAUGG, Lic.-Arbeit Bern (1963).  
 [17] P. M. DE WOLFF, Acta crystallogr. 7, 207 (1948).  
 [18] H. E. SWANSON & E. TATGE, Standard X-Ray Diffr. Powder Patterns, NBS Circular 539 (1), 65 (1953).

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

3. Mitteilung

#### Isolierung von D- oder L-6-(*threo*-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin und Pterin-6-carbonsäure aus Ameisenmännchen

von G. H. Schmidt<sup>1)</sup> und M. Viscontini<sup>2)</sup>

(8. X. 65)

Unsere bisherigen Mitteilungen [1] befassten sich vorwiegend mit der Isolierung von fluoreszierenden Stoffen aus *Formica*-Arbeiterinnen. Als papierchromatographische Versuche jedoch zeigten, dass das Fluoreszenzmuster der Arbeiterinnen von dem der Geschlechtstiere erheblich abweicht, dehnten wir unsere Isolierungsversuche zunächst auf Männchen aus, über die wir nun in mehreren Mitteilungen berichten können.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir 1,5 kg Männchen (Frischgewicht) von *Formica polyctena* FOERST. Von den aus Arbeiterinnen isolierten Pterinen fanden wir hier auch Isoxanthopterin (5 mg) und ein 6-(*erythro*-1',2'-Dihydroxypropyl)-pterin (1,4 mg). Letzteres, vermutlich Biotpterin, war bei Arbeiterinnen nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Das aus Arbeiterinnen isolierte Formicapterin war nicht auffindbar, obgleich es sich als relativ stabil erwiesen hatte [1]. Auch das in Arbeiterinnen nachgewiesene Pterin (2-Amino-4-Hydroxy-pteridin) konnte aufeinanderweise in dieser Männchen-Probe nicht gefunden werden. Dafür wurden zwei weitere blafluoreszierende Pterine erhalten, über deren Isolierung wir nun berichten.

**1. D- oder L-6-(*threo*-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin.** – Die L-Form dieser Substanz wurde bisher in der Natur nur in einem Mikroorganismus (*Pseudomonas roseus fluorescenz*) nachgewiesen und als Monapterin bezeichnet [2]. REMBOLD [3]

<sup>1)</sup> Institut für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg.

<sup>2)</sup> Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich.

isolierte aus Entwicklungsstadien der Honigbiene die D-(*erythro*)-Form und nannte sie Neopterin, das nach papierchromatographischer Auftrennung in Isopropanol:5-proz. wässriger Borsäure-Lösung (4:1) eindeutig von der *threo*-Form unterschieden werden kann. Den optischen Antipoden zum Neopterin fand GOTO [4] in der Haut der Erdkröte (*Bufo vulgaris*). Die Isolierung grösserer Mengen wird zeigen, ob es sich bei der in Ameisen gefundenen Substanz um die D- oder L-Form handelt und ob nun auch das vierte Isomere dieses Polyhydroxypterins entdeckt wurde. Aus dem 80-proz. alkoholischen Extrakt der Ameisen isolierten wir ca. 0,95 mg reines Trihydroxypropyl-pterin.

**2. Pterin-6-carbonsäure.** – Dieses in der Natur häufig in geringen Mengen gefundene Produkt wurde vielfach als während der Isolierung von 6-substituierten Pterinen aus diesen entstandenes Abbauprodukt angesehen [5]. Tatsächlich entsteht es sehr leicht bei der Abtrennung von Sepia- und Iosepia-pterin [6]. Diese und ähnliche sehr leicht oxydablen Pterine konnten wir bei Ameisen trotz schonendster Aufarbeitung der Extrakte nicht finden. Obgleich wir den Männchen-Extrakt stets unter Zusatz von etwas 2-Mercapto-äthanol zur Hemmung der Oxydationsgefahr chromatographierten, fanden wir ca. 2,1 mg Pterin-6-carbonsäure, die sich leicht isolieren liess. Sie war nach dem Isoxanthopterin die am stärksten angereicherte Pterinverbindung. Da wir keinerlei Hinweise für eine eventuelle Entstehung während der Aufarbeitung des Extraktes finden konnten, nehmen wir schon wegen der grossen Menge an, dass es sich hier bei der Pterin-6-carbonsäure um ein biogenes Produkt handelt.

Alle Pterine isolierten wir mit Hilfe bekannter chromatographischer Verfahren an Säulen aus Cellulosepulver [6] [7]. Zur Identifizierung diente der papierchromatographische und elektrophoretische Vergleich mit Hilfe von synthetisch gewonnenen Reinsubstanzen, sowie die UV.-Spektren und einige Abbaureaktionen (Tabellen I und II).

Tabelle I. *Rf*-Werte von isolierten Pterinen  
auf WHATMAN-Nr. 1-Papier, aufsteigend, Laufmittelfront 20–25 cm; Temperatur: 22°

Laufmittel	Pterin	6-( <i>erythro</i> -1', 2'- Dihydroxypropyl)- pterin (D oder L)	6-( <i>threo</i> -1', 2', 3'- Trihydroxypropyl)- pterin (D oder L)	Pterin- 6-carbon- säure
Wasser, dest.	0,62	0,79	0,69	0,94–1,0
3-proz. NH <sub>4</sub> Cl	0,54	0,68	0,61	0,55
3-proz. Na-citrat	0,46	0,60	0,56	0,44
Isopr.: H <sub>2</sub> O (2:1)	0,39	0,33	0,28	0,18
Isopr.: 1-proz. NH <sub>4</sub> OH (2:1)	0,39	0,37	0,28	0,15
Isopr.: 0,2-proz. Ammoniumacetat (4:1)	0,24	0,32	0,11	0,03
Isopr.: 5-proz. Borsäure (4:1)	0,24	0,34	0,09	0,02
Isopr.: DMF: 25-proz. NH <sub>4</sub> OH (65:25:10)	0,05	0,28	0,03	0,006
Aceton: 2-proz. Ammoniumacetat (4:1)	0,36	0,48	0,25	0,08
BuOH: Eisessig: H <sub>2</sub> O (20:3:7)	0,34	0,32	0,16	0,15

Tabelle II. *Wanderungsgeschwindigkeit der isolierten Pterine im elektrophoretischen Feld*

Träger: WHATMAN-Nr. 1-Papier (6 cm breit, 28 cm lang), Leerlauf: 1 Std., Versuchsdauer: 1 Std., Raumtemperatur: 22°,  $u = sd:tV$  (cm/sec V/cm);  $u$  = elektrophoretische Beweglichkeit am Papierstreifen, wobei  $s:t$  in cm der zurückgelegte Weg in sec bedeutet,  $d$  den Elektrodenabstand (hier 30 cm) in cm und  $V$  die angelegte Potentialdifferenz in Volt

Lösungsmedium jeweils 0,05 M	pH	mA	V	Pterin		Biopterin		Monapterin		Pterin-6-carbonsäure	
				cm	$u \cdot 10^4$	cm	$u \cdot 10^4$	cm	$u \cdot 10^4$	cm	$u \cdot 10^4$
Oxalsäure	1,6	5	150	-2,9	-1,89	-2,1	-1,17	-2,2	-1,20	-0,9	-0,50
Citronensäure	2,1	5	510	-5,7	-0,93	-3,9	-0,64	-4,6	-0,75	-1,5	-0,24
Ameisensäure	2,5	4	710	-4,2	-0,49	-3,4	-0,40	-4,2	-0,49	-0,2	-0,06
Essigsäure	3,2	3	550	-3,0	-0,45	-2,8	-0,42	-2,9	-0,44	+2,1	+0,31
Pyridinformiat	4,3	5	400	-1,4	-0,29	-1,3	-0,27	-1,1	-0,23	+2,5	+0,52
Ammoniumacetat	6,8	5	270	-0,6	-0,18	-0,7	-0,22	-0,5	-0,15	+1,8	+0,57
Natriumacetat	7,4	5	400	-0,3	-0,06	-0,4	-0,08	-0,2	-0,04	+3,0	+0,62
Äthylendiamin	10,4	3	700	+3,7	+0,44	+3,0	+0,36	+2,4	+0,29	+7,5	+0,89

Auf Grund der elektrophoretischen Beweglichkeit ( $u$ ) lassen sich graphisch für die untersuchten Pterine folgende isoelektrischen Punkte ermitteln: Pterin bei pH 7,8, Biopterin bei pH 8,4, Monapterin bei pH 8,1 und Pterin-6-carbonsäure bei pH 2,7.

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, die im Rahmen eines OECD-Stipendiums der Schweiz durchgeführt werden konnte.

### Experimenteller Teil

1. *Tiermaterial.* Die verwendeten Ameisenmännchen stammten aus der ca. 60 Nester umfassenden *F. polyctena*-Kolonie in Schraudenbach bei Würzburg. Sie wurden aus der 1963 im Frühsommer durchgeführten Königinnenzucht des Instituts für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg erhalten. Sogleich nach der Begattung wurden die frisch abgestorbenen Tiere in 90-proz. Äthanol konserviert und bis zur Untersuchung im Kühlschrank bei 2-4°C unter Lichtausschluss ca. 6 Monate aufbewahrt. Es wurden 1,5 kg Frischgewicht erhalten. Die den Tieren im Begattungsraum als Nahrung dienende Zuckerlösung war für die Untersuchung bedeutungslos.

2. *Gewinnung des Extraktes.* Zur Abtrennung der Pterine von den nicht löslichen Bestandteilen wurden die Tiere im Starmix in 96-proz. Äthanol, das 0,2% 2-Mercapto-äthanol enthielt, zerkleinert und mit Papierpulver homogenisiert, bis ein dickflüssiger Brei entstand. Auf einer 6 cm hohen und 20 cm breiten Papiersäule wurden die fluoreszierenden Stoffe in drei Portionen mit 50-proz. Äthanol unter Zusatz von 2-Mercapto-äthanol solange eluiert, bis nach papierchromatographischer Prüfung der Durchlauf keine fluoreszierenden Stoffe mehr enthielt. Nach Entfernung des Lösungsmittels mit Hilfe eines Vakuumrotationsverdampfers wurde der Rückstand mit thiohaltigem Wasser aufgenommen, wiederum mit Papierpulver homogenisiert und nochmals über eine 12 cm hohe und 10 cm breite Säule in zwei Portionen mit Wasser filtriert. Diese zweite Filtration erwies sich als notwendig, da hierbei die die Trennung der Pterine störenden Lipide und Eiweisstoffe weitgehend entfernt werden.

3. *Trennung der Pterine.* Der stark eingeeengte, mit Papierpulver homogenisierte Extrakt wird nun gleichmässig auf fünf Papiersäulen (30 cm hoch, 8 cm breit) verteilt und mit Wasser chromatographiert. Man erhält auf jeder Säule zwei breite fluoreszierende Fraktionen (A und B), die getrennt aufgefangen wurden. Die langsamer laufende (B) enthielt die hier behandelten Pterine. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen der fünf Säulen und Entfernung des Lösungsmittels wurde die Fraktion B nochmals auf drei Säulen (30 cm hoch, 8 cm breit) verteilt und wiederum mit Wasser eluiert. Wieder wird auf jeder Säule eine Auftrennung in zwei Fraktionen (B1 und B2) erreicht. Die langsamer laufende Fraktion B2 enthielt an fluoreszierenden Stoffen lediglich Isoxanthopterin und Riboflavin, deren Trennung mit Isopropanol:1-proz. Ammoniak-Lösung (2:1) gelingt. Die Fraktion B1 enthielt die hier interessierenden Pterine. Sie wird nun mit

Trennschema

Homogenat

↓ 50-proz. Äthanol

1. Filtration

↓ H<sub>2</sub>O

2. Filtration

↓ H<sub>2</sub>O

Fraktion A

Fraktion B

↓ H<sub>2</sub>O

B1

B2

↓ 1-proz. NH<sub>4</sub>Cl

B11

B12

B13

B14

Isoxanthopterin

Riboflavin

↓ Isopr.: H<sub>2</sub>O (4:1)

B111

B112

B113

B114

B115

B116

↓ 0,3-proz. NH<sub>4</sub>Cl

↓ 0,3-proz. NH<sub>4</sub>Cl

B1131

B1132

B1133

Pterin-6-carbonsäure

↓ Aceton:  
0,2-proz. Ammoniumacetat (4:1)

B11311

B11312

B11313

B11314

B11315

B11316

↓ H<sub>2</sub>O

B113111

B113112

→ D- oder L-6-(*threo*-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin

B1111

B1112

B1113

B11121

B11122

↓ Isopr.: 0,2-proz. Ammoniumacetat (4:1)

→ D- oder L-6-(*erythro*-1',2'-Dihydroxypropyl)-pterin

einer 1-proz. Ammoniumchlorid-Lösung über zwei Papiersäulen (30 cm hoch, 8 cm breit) chromatographiert. Die fluoreszierenden Stoffe trennten sich auf beiden Säulen in vier Fraktionen auf, von denen sich die am schnellsten laufende (B11) mit Isopropanol: Wasser (4:1) in sechs weitere Fraktionen separieren liess (Säule: 30 cm hoch, 8,5 cm breit). Die erste, am schnellsten wandernde Fraktion (B111) enthielt das D- oder L-6-(erythro-1',2'-Dihydroxypropyl)-pterin (Biopterin oder seinen Antipoden), in der dritten Fraktion (B113) befand sich das D- oder L-6-(threo-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin und in der vierten, blau fluoreszierenden Fraktion (B114) die Pterin-6-carbonsäure (vgl. dazu das Trennschema).

4. *Reinigung und Identifizierung.* - a) D- oder L-6-(erythro-1',2'-Dihydroxypropyl)-pterin (Biopterin oder sein Antipode). Die Fraktion B111 wird mit 0,3-proz. Ammoniumchlorid-Lösung wiederum in drei fluoreszierende Fraktionen zerlegt (Säule: 25 cm hoch, 6 cm breit). Die zweite, blaugrün fluoreszierende Fraktion enthielt die Hauptmenge des Dihydroxypropyl-pterins. Mit Isopropanol: 0,2-proz. Ammoniumacetat-Lösung (4:1) liess sich die schneller laufende, grün fluoreszierende Substanz vom Dihydroxypropyl-pterin abtrennen (Säule: 25 cm hoch, 3 cm breit). Nach weiterer Reinigung mit 1. Isopropanol: 1-proz. Ammoniak-Lösung (3:1), 2. dest. Wasser, 3. Isopropanol: Wasser (2:1) und 4. dest. Wasser (Säule: 30 cm hoch, 1,5 cm breit) wurde ein Produkt erhalten, das ein reines mit Biopterin identisches UV.-Spektrum aufwies. Auch die papierchromatographische und elektrophoretische Wanderung war gleich der des Biopterins.

b) D- oder L-6-(threo-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin (Monapterin oder sein Antipode). Die Fraktion B113 enthielt noch mehrere, hier nicht interessierende fluoreszierende Stoffe, die entfernt werden mussten. Zunächst wurde durch Elution mit einer 0,3-proz. Ammoniumchlorid-Lösung (Säule: 40 cm hoch, 4 cm breit) eine Abtrennung von gelb und grün fluoreszierenden Stoffen erreicht; die am schnellsten wandernde, blauviolett fluoreszierende Fraktion wurde dann mit Aceton: 0,2-proz. Ammoniumacetat-Lösung (4:1) in sechs weitere Fraktionen zerlegt (Säule: 40 cm hoch, 4 cm breit). Nach weiterer Reinigung über Säulen von 30 cm Höhe und 1,5 cm Breite mit 1. Isopropanol: 1-proz. Ammoniak-Lösung (2:1), 2. Butanol: Eisessig: Wasser (20:3:7), 3. 0,3-proz. Ammoniumchlorid-Lösung und 4. dest. Wasser, wurde ein reines UV.-Spektrum erhalten, das mit dem von Monapterin identisch ist. Auch papierchromatographisch und elektrophoretisch konnte eine mit Monapterin identische Wanderung festgestellt werden.

c) Pterin-6-carbonsäure. Die Fraktion B114 enthielt nur eine blau fluoreszierende Substanz. Sie wurde über eine Säule von 30 cm Höhe und 4 cm Breite mit 0,3-proz. Ammoniumchlorid-Lösung weiter gereinigt und anschliessend über eine solche von 30 cm Höhe und 1,5 cm Breite nacheinander mit Isopropanol: 1-proz. Ammoniak-Lösung (3:1), Butanol: Eisessig: Wasser (20:3:7), 0,3-proz. Ammoniumchlorid-Lösung sowie dest. Wasser eluiert, bis ein reines UV.-Spektrum erhalten wurde, dazu noch papierchromatographisch und elektrophoretisch mit synthetischer Pterin-6-carbonsäure verglichen (Tabellen I und II).

Schliesslich sei noch bemerkt, dass alle Trennverfahren unter Zusatz von 0,2% 2-Mercaptoäthanol durchgeführt wurden. Erst nach vollständiger Isolierung der einzelnen Stoffe wurde der Zusatz fortgelassen. Weiterhin wurde bis zur Isolierung der einzelnen Stoffe nur mit neutralen Laufmitteln gearbeitet. Erst zur endgültigen Reinigung wurden nach Bedarf basische oder saure Elutionsmittel verwendet. Für alle Säulentrennungen wurde WHATMAN-Nr. 1-Pulver benutzt.

5. *Abbaureaktionen.* - a) *Oxydation mit Kaliumpermanganat.* Etwa 100 µg eines Pterins werden in 2 ml 0,1-proz. NaOH-Lösung gelöst, dann 3-5 Tropfen einer 1-proz. Kaliumpermanganat-Lösung hinzugegeben und auf dem Wasserbad kurz erwärmt. Parallel dazu wurde eine Probe in Natronlauge ohne Kaliumpermanganat in gleicher Weise behandelt. Nach 2 Std. werden einige Tropfen einer 1-proz. Natriumhydrogensulfid-Lösung hinzugegeben und das entstandene Mangan-dioxid abfiltriert. Das Filtrat wird nach Ansäuern mit Eisessig bis zur Trockne eingeeengt, in wenigen Tropfen Wasser aufgenommen und papierchromatographisch mit dem Ausgangsprodukt sowie mit Pterin-6-carbonsäure in mehreren Laufmitteln sowie elektrophoretisch verglichen. Als bestes Laufmittel erwies sich für die Auftrennung der 6-substituierten Pterine Aceton: 2-proz. Ammoniumacetat-Lösung (4:1).

b) *Oxydation mit Natriumperjodat.* 1. *in Lösung:* Etwa 100 µg eines Pterins werden in 3-5 Tropfen 1-proz. Natriumcarbonat-Lösung gelöst und mit 1-2 Tropfen einer 1-proz. Natriumperjodat-Lösung versetzt. Nach  $\frac{1}{2}$  Std. bei Zimmertemperatur wird in Aceton: 2-proz. Ammoniumacetat-Lösung (4:1) und 3-proz. Natriumcitrat-Lösung in Gegenwart von Vergleichssubstanzen

chromatographiert. 6-Polyhydroxypropyl-pterine werden vollständig zum Pterin-6-aldehyd oxidiert. 2. *auf Papier*: Um wertvolle Substanz zu sparen, sowie bei Vorliegen sehr geringer Mengen, lässt sich die Perjodat-Oxydation auch auf Filtrierpapier durchführen. Auf für die Chromatographie vorbereitete Papierstreifen werden 3–5  $\mu\text{g}$  eines Pterins aufgetragen. Nach Trocknung des Flecks wird er sorgfältig mit einer 5-proz. Natriumperjodat-Lösung betupft. Dabei ist darauf zu achten, dass keine allzu starke Vergrößerung des Pterinflecks eintritt. Nach einmaliger Wiederholung wurde bei den hier untersuchten Polyhydroxy-pterinen ein vollständiger Abbau zu Pterin-6-aldehyd erreicht, der mit Hilfe von Vergleichssubstanzen in den vorstehend genannten Laufmitteln nachgewiesen werden kann.

Diese Ultramikromethode macht es möglich, dass für Konstitutionsaufklärungen nun weitaus weniger der ohnehin meist nur in sehr geringen Mengen isolierbaren Pterine benötigt werden als bisher. Wir sind bestrebt, diese Methode weiter auszubauen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Aus Männchen der Art *Formica polyctena* FOERST. wurden mit Hilfe chromatographischer Verfahren an Cellulosepulver D- oder L-6-(*threo*-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin und Pterin-6-carbonsäure isoliert. Die Identifizierung erfolgte mittels ihrer UV.-Spektren, Rf-Werte, elektrophoretischen Wanderung sowie einiger Abbaureaktionen. Pterin-6-carbonsäure wird als biogenes Produkt angesehen.

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

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, *Helv.* 45, 1571 (1962); 47, 2049 (1964).
- [2] M. VISCONTINI, M. POUTEAU-THOUVENOT, R. BÜHLER-MOOR & M. SCHROEDER, *Helv.* 47, 1948 (1964).
- [3] H. REMBOLD & L. BUSCHMANN, *Liebigs Ann. Chem.* 662, 72 (1963).
- [4] T. GOTO, *Japan. J. Zoolog.* 14, 83, 91 (1963).
- [5] W. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 75, 993 (1963).
- [6] M. VISCONTINI & E. MÖHLMANN, *Helv.* 42, 836 (1959).
- [7] M. VISCONTINI, E. LOOSER & P. KARRER, *Helv.* 41, 440 (1958).

## 40. Die Konstitution von Verrucarin E

Verrucarine und Roridine, 10. Mitteilung [1]

von E. Fetz und Ch. Tamm

(8 X 65)

Die bisher aus *Myrothecium*-Arten isolierten Stoffwechselprodukte lassen sich auf Grund ihrer molekularen Zusammensetzung bzw. Struktur in drei chemische Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umfasst makrocyclische Di- und Tri-ester, die den Sesquiterpenalkohol Verrucarol [2] als gemeinsamen Baustein enthalten. Zu ihr gehören Verrucarin A [3] [4], Verrucarin B [5], Verrucarin H [6] [7], Verrucarin J [1] sowie Roridin A [7] [8], Roridin D [6] [7] und Roridin E [6] [7]<sup>1)</sup>. Sie sind die

<sup>1)</sup> Zu dieser Gruppe ist auch Roridin C [2] (= Trichodermol [9]), das die Struktur des 15-Desoxyverrucarols besitzt, zu zählen.