

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] XXIV. Mitteilung: L. MAIER, *Helv.* 49, 1119 (1966).
- [2] G. PETERS, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 4751 (1960); *J. org. Chemistry* 27, 2198 (1962).
- [3] L. MAIER, «Preparation and Properties of Primary and Secondary Phosphine Sulfides, their Thioacids and Thioanhydrides, and Tertiary Phosphine Sulfides», in «Topics in Phosphorus Chemistry», M. GRAYSON & E. J. GRIFFITH ed., Interscience Publ. Inc., New York 1965, Vol. 2, S. 43.
- [4] L. MAIER, *Helv.* 47, 2129 (1964).
- [5] K. A. PETROV, V. P. EVDAKOV, L. I. MIZRAKH & V. P. ROMODIN, *Ž. obšč. Chim.* 32, 3062 (1962); *Chem. Abstr.* 58, 11395 (1963).
- [6] K. D. BERLIN & G. B. BUTLER, *Chem. Rev.* 60, 243 (1960).
- [7] T. A. MASTRYUKOVA, A. E. SHIPOV & M. I. KABACHNIK, *Ž. obšč. Chim.* 37, 507 (1961); *Chem. Abstr.* 55, 22101f (1961).
- [8] M. M. RAUHUT & H. A. CURRIER, *J. org. Chemistry* 26, 4628 (1961).
- [9] H. NIEBERGALL, *Makromolekulare Chem.* 52, 218 (1962).
- [10] L. MAIER, «Preparation and Properties of Primary, Secondary and Tertiary Phosphines in Progress in Inorganic Chemistry», F. A. COTTON ed., Interscience Publ. Inc., New York 1963, Vol. 5, Seite 185.
- [11] E. K. FIELDS, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 1528 (1952).
- [12] R. G. LAUGHLIN, *J. org. Chemistry* 30, 1322 (1965).

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

4. Mitteilung [1]

Isolierung von Isoalloxazin-Derivaten aus Ameisenmännchen

von M. Viscontini¹⁾ und G. H. Schmidt²⁾

(17. III. 66)

Im Rahmen der Untersuchungen über fluoreszierende Stoffe aus Ameisenmännchen haben wir in der 3. Mitteilung [1] die Isolierung und Konstitutionsaufklärung von Pterinen dieser Insektenarten beschrieben. In der vorliegenden 4. Mitteilung berichten wir über Flavinsubstanzen, die die Ameisenpterine stets begleiten. Bei roten Waldameisen (Arbeiterinnen) ist Riboflavin (I) sicher die am stärksten vertretene fluoreszierende Substanz [2]. Es liegt nicht nur frei, sondern auch gebunden vor, ohne dass wir bis jetzt genauere Angaben über die Art der Bindung Riboflavin-Substrat und über das Substrat selbst machen können. Es ist uns nur die Isolierung einer einzigen solchen Riboflavin-*Formica*-Verbindung gelungen [3].

Auch die hier untersuchten Geschlechtstiere sind reich an freiem und an gebundenem Riboflavin. Flavin-mononucleotid (FMN) und Flavinadenin-dinucleotid (FAD) konnten wir nicht finden. Dagegen konnten eine Riboflavinverbindung (Produkt B 11312) trotz ihrer beschränkten Haltbarkeit papierchromatographisch und elektro-phoretisch rein sowie ein sich leicht zersetzender Riboflavinkomplex (Produkt B 116) isoliert werden.

¹⁾ Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich.

²⁾ Institut für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg.

Neben diesen gelb fluoreszierenden Riboflavin-derivaten haben wir, ebenfalls nach Zersetzung eines Komplexes, einen tiefgelb fluoreszierenden Stoff (B1332) isoliert, der auf Grund seines UV.-Spektrums auch ein Isoalloxazinderivat sein sollte, jedoch von Riboflavin deutlich verschieden ist. Wir schlagen vor, das Produkt B1332 in Analogie zum Riboflavin als Formicaflavin zu bezeichnen.

Schliesslich wurde aus den Ameisenmännchen noch ein weiteres, grün fluoreszierendes Produkt (B1422) gewonnen, dessen Konstitution noch aufzuklären ist.

Bei der Isolierung dieser vier Substanzen gingen wir von 1,5 kg Ameisenmännchen (Frischgewicht) der Art *Formica polyctena* FOERST. aus. Die genannten Substanzen

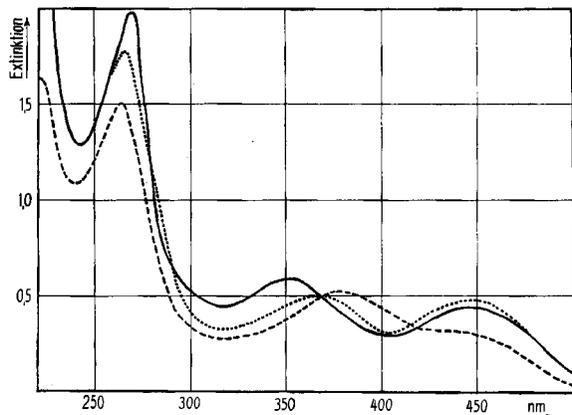


Fig. 1. UV.-Spektrum der Riboflavin-Verbindung B11312
 ----- pH 1,5 ······ pH 6 ——— pH 11

Tabelle 1. *R_f*-Werte der isolierten Verbindungen
 Papier: WHATMAN Nr. 1, aufsteigend; Temperatur: 22–25°C

Laufmittel	Riboflavin	FAD	FMN	Riboflavin- verbindung B11312	Formicaflavin B1332	Substanz B1422
H ₂ O	0,35	0,94	0,94	0,91	0,89	0,58
3-proz. NH ₄ Cl	0,35	0,43	0,48	0,48	0,65	0,11
3-proz. Na-Citrat	0,33	0,40	0,52	0,41	0,54	0,08
60-proz. Äthanol	0,49	0,33	0,50	0,62	0,52	0,68
Isopr.: H ₂ O (2:1)	0,42	0,13	0,16	0,52	0,29	0,61
Isopr.: 1-proz. NH ₃ (2:1)	0,34	0,15	0,34	0,27	0,30	0,59
Isoprop.: 2-proz. NH ₄ ⁺ -Acetat (1:1)	0,53	0,38	0,45	0,48	0,48	0,62
Isopr.: 0,2-proz. NH ₄ ⁺ -Acetat (4:1)	0,27	—	—	0,10	0,09	0,37
Butanol: Eisessig: H ₂ O (20:3:7)	0,27	0,02	0,06	0,07	0,12	0,52
Aceton: 1-proz. Essigsäure (2:1)	0,56	0,39	0,49	0,65	0,28	0,63
Aceton: 2-proz. NH ₄ ⁺ -Acetat (4:1)	0,34	0,02	0,02	0,11	0,08	0,44

wurden mit Hilfe bekannter chromatographischer Verfahren an Cellulosepulversäulen abgetrennt und rein dargestellt.

1. *Riboflavinverbindung (B11312)*. Neben ca. 20 mg oxydiertem Riboflavin und 5 mg reduziertem Riboflavin – letzteres wird nur in Gegenwart von Thiolen erhalten – konnten wir etwa 3 mg dieser Riboflavinverbindung rein isolieren, die sich in wässriger Lösung leicht zersetzt. Als Spaltprodukt trat unter unseren Arbeitsbedingungen stets Riboflavin auf. Das UV.-Spektrum der Verbindung gleicht dem des Riboflavins (Fig. 1) sehr; lediglich im kurzwelligen Bereich treten Abweichungen in der Höhe der Extinktionen auf, die sich besonders im basischen Milieu bemerkbar machen. Die Substanz ist papierchromatographisch und elektrophoretisch nicht mit Riboflavin, FMN und FAD identisch, wie aus den Tabellen 1 und 2 hervorgeht. Wir haben noch nicht feststellen können, an welche Substanz Riboflavin in dieser Verbindung gebunden ist.

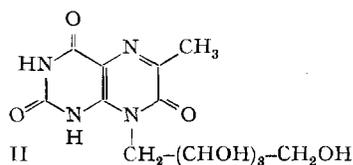
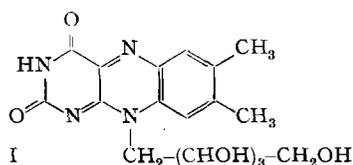
Tabelle 2. *Wanderungsgeschwindigkeit der isolierten Verbindungen im elektrophoretischen Feld*

Träger: WHATMAN-Nr.-1-Papier (6 cm breit, 28 cm lang); Vorlauf: 1 Std., Versuchsdauer: 1 Std.; Raumtemperatur: 22°C; u = Elektrophoretische Beweglichkeit an dem Papierstreifen, wobei s/t in cm der zurückgelegte Weg in Sek. bedeutet, d den Elektrodenabstand (hier 30 cm) in cm und V die angelegte Potentialdifferenz in Volt

Lösungsmedium jeweils 0,05 M	pH	mA	V	FAD		FMN		Riboflavin- Verbindung B11312		Formica- flavin B1332		Substanz B1422	
				cm	$u \cdot 10^4$	cm	$u \cdot 10^4$	cm	$u \cdot 10^4$	cm	$u \cdot 10^4$	cm	$u \cdot 10^4$
				Oxalsäure	1,6	5	160	+0,9	+0,47	+0,85	+0,44	+1,1	+0,57
Zitronensäure	2,1	5	520	+2,3	+0,37	+3,2	+0,51	+3,2	+0,51	+1,3	+0,21	0,0	0,0
Ameisensäure	2,4	3	700	+3,6	+0,43	+5,4	+0,64	+4,8	+0,57	+2,8	+0,33	+0,1	+0,12
Pyridinformiat	4,1	5	360	+2,3	+0,53	+1,8	+0,42	+2,0	+0,46	+2,3	+0,53	+0,8	+0,18
Ammoniumacetat	6,1	5	260	+1,3	+0,42	+1,8	+0,58	+1,4	+0,45	+1,4	+0,45	+0,7	+0,22
Natriumacetat	7,2	5	320	+1,5	+0,39	+2,1	+0,55	+1,5	+0,39	+1,8	+0,47	+1,0	+0,26
Äthylendiamin	11,0	3	720	+4,8	+0,55	+6,2	+0,72	+3,2	+0,37	+4,6	+0,53	+2,9	+0,34

Das hier nicht aufgeführte Riboflavin zeigte im elektrophoretischen Feld unter den vorliegenden Bedingungen keine eindeutige Wanderung. Ein isoelektrischer Punkt ist lediglich bei der Substanz B1422 bei pH 2,1 erkennbar. Bei allen anderen Verbindungen liegt er im stark sauren Bereich unter pH 1,6, und ist hier nicht bestimmbar. Die elektrophoretischen Beweglichkeiten (u) der stark sauren Substanzen sind einander auffallend ähnlich.

2. *Riboflavinkomplex (B116)*. Dieser Komplex (vgl. Trennschema) wurde nicht rein erhalten. Während der Chromatographie mit Isopropanol: 1-proz. NH_3 (2:1) trat Zersetzung ein, und es liessen sich einige 100 μg Riboflavin isolieren, die aus dem Komplex abgespalten worden waren.



3. *Formicaflavin* (B1332). Aus einer Mischung oder einer Komplexverbindung mit einem ebenfalls gelb fluoreszierenden Lumazinderivat konnte das Formicaflavin nach ammoniakalischer Behandlung abgetrennt werden. Dabei wurde das Lumazinderivat freigesetzt; es wurde als violett fluoreszierendes 6-Methyl-7-oxo-8-ribitylumazin (II) identifiziert. Daneben wurden 60 μg Formicaflavin rein erhalten. Aus wässriger Lösung kristallisiert diese Substanz in tiefgelben quadratischen Plättchen. Das UV.-Spektrum ist nur im neutralen Bereich mit dem des Riboflavins fast identisch. Im sauren und basischen Milieu ist eine Verschiebung der langwelligen Maxima zu beobachten (Fig. 2). Wie Riboflavin lässt sich auch Formicaflavin mit Natrium-

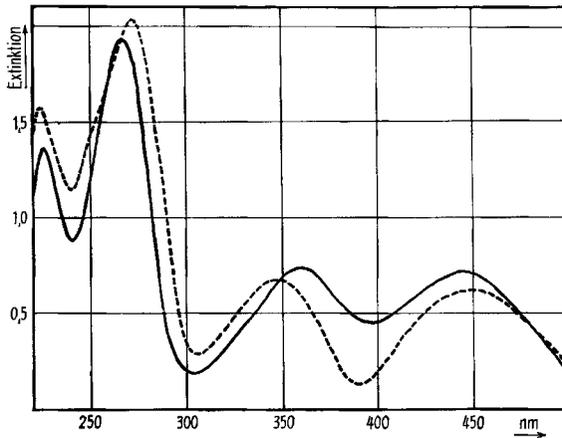


Fig. 2. UV.-Spektrn des Formicaflavins (B1332)

----- pH 1 ——— pH 12

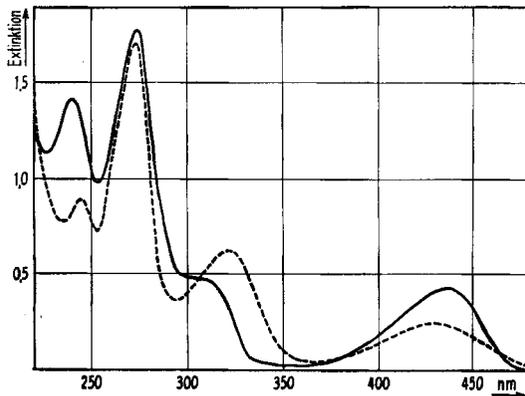


Fig. 3. UV.-Spektrn der Substanz B1422

----- pH 1 ——— pH 6-12

perjodat oxydieren. Im papierchromatographischen und elektrophoretischen Vergleich mit Riboflavin und seinen bekannten Derivaten zeigt es ein stark saures und hydrophiles Verhalten. Das Formicaflavin ist gegenüber Säuren, Basen und Licht bei

Zimmertemperatur beständig und ist vermutlich ein substituiertes N(10)-Polyol-isoalloxazin-Derivat.

4. *Substanz B1422*. Während der Isolierung der Isoalloxazinderivate fanden wir eine weitere intensiv gelbgefärbte Substanz mit allerdings nur schwacher gelbgrüner Fluoreszenz. Es konnten etwa 400 μg dieses Stoffes in feinen gelben Kristallen erhalten werden, mit einem sehr charakteristischen UV.-Spektrum (Fig. 3). Durch ihre Rf-Werte sowie ihre elektrophoretische Beweglichkeit wurde die Substanz näher charakterisiert. Während der Elektrophorese im Bereich unter pH 4 entsteht aus B1422 eine ebenfalls intensiv gelbgefärbte Substanz mit blauer Fluoreszenz und stärker sauren Eigenschaften. Zwischen pH 4 und 5 ist die Zersetzung nicht mehr vollständig, so dass beide Stoffe (grüne und blaue Fluoreszenz) vorhanden sind. Behandlung mit Natriumperjodat veränderte die Substanz B1422 nicht. Die isolierte Menge war zu gering, um weitere Hinweise auf ihre Struktur zu erhalten.

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit. Die Untersuchungen wurden im Rahmen eines OECD-Stipendiums der Schweiz durchgeführt.

Experimenteller Teil

1. *Tiermaterial*. Die hier verwendeten 1,5 kg *Formica polyctena*-Männchen wurden während der Schwarmperiode im Mai–Juni 1963 in der Kolonie «Schraudenbach» bei Würzburg abgefangen und sogleich nach der Begattung im Würzburger Institut für Angewandte Zoologie in 96-proz. Äthanol konserviert. Bis zum Beginn der Isolierungsarbeiten wurden sie ein halbes Jahr bei 2–4° im Kühlschrank unter Lichtausschluss aufbewahrt.

2. *Gewinnung des Extraktes*. Die in Äthanol konservierten Männchen wurden, wie in unserer 3. Mitteilung [1] beschrieben, aufgearbeitet und ihre Extrakte in zwei fluoreszierende Fraktionen A und B aufgetrennt.

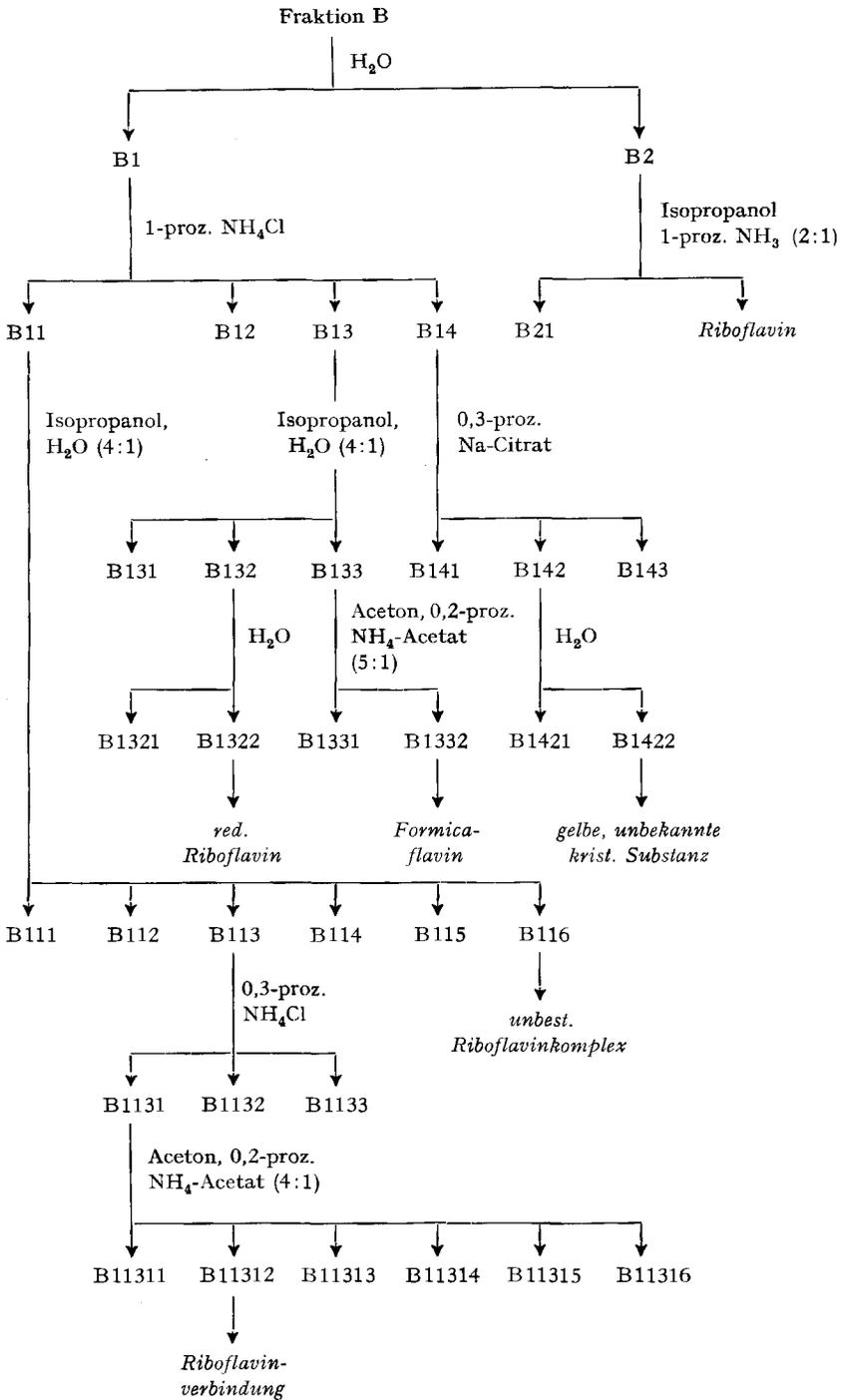
3. *Trennung der isolierten Verbindungen*. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde die Fraktion B auf drei Säulen (30 cm hoch, 8 cm breit) verteilt und mit Wasser und 2-Mercapto-äthanol (0,2-proz.) eluiert. Auf jeder Säule wurde eine Auftrennung in zwei Fraktionen B1 und B2 erreicht. Die langsamer laufende Fraktion B2 enthielt das oxydierte freie Riboflavin, dessen Menge nach weiterer Reinigung mit Isopropanol: 1-proz. NH_3 (2:1), Butanol:Eisessig:Wasser (20:3:7) und Wasser photometrisch bestimmt wurde. Die Fraktion B1 lässt sich mit 1-proz. NH_4Cl -Lösung + Thiol (0,2-proz.) in vier Fraktionen auftrennen (2 Papiersäulen: 30 cm hoch, 8 cm breit). Die hier interessierenden Stoffe verteilten sich auf die Fraktionen B11, B13 und B14 (vgl. Trennschema).

a) *Riboflavin-Verbindung (B11312)*. Die Fraktion B11 wurde mit Isopropanol: Wasser (4:1) + Thiol in 6 weitere Fraktionen aufgeteilt (Säule: 30 cm hoch, 8,5 cm breit). Die beschriebene Riboflavinverbindung fand sich in der dritten, gelb und blau fluoreszierenden Fraktion B113. Nach weiterer Trennung mit 1-proz. NH_4Cl -Lösung + Thiol (Säule: 40 cm hoch, 4 cm breit) wanderte sie in der ersten Fraktion B1131. Diese Fraktion liess sich mit Aceton: 0,2-proz. Ammoniumacetatlösung (4:1) + Thiol (Säule: 30 cm hoch, 4 cm breit) in 6 weitere zerlegen, von denen die zweite das Riboflavinderivat enthielt. Die weitere Reinigung dieser gelb fluoreszierenden Fraktion B11312 gelang ohne Thiolzusatz durch aufeinander folgende Chromatographie mit 1-proz. NH_4Cl -Lösung, Isopropanol: 2-proz. Ammoniumacetat-Lösung (4:1) und Wasser (Säulen: 30 cm hoch, 4 cm breit, bzw. 20 cm hoch, 3 cm breit).

Das UV.-Spektrum der so erhaltenen Substanz (Fig. 1) liess sich durch weitere Reinigungsprozesse nicht verändern. Nach 24stdg. Stehenlassen in wässriger Lösung unter Lichtausschluss konnte Riboflavin nachgewiesen werden. Diesen Zersetzungsprozess haben wir viermal wiederholt, das entstandene Riboflavin jeweils über eine Säule mit Wasser abgetrennt und mittels UV.-Spektrum und papierchromatographisch mit einer synthetischen Vergleichssubstanz identifiziert.

b) *Formicaflavin (B1332)*. Diese Substanz befindet sich in der gelb fluoreszierenden Fraktion B13, die mit Isopropanol:Wasser (4:1) ohne Thiolzusatz (Säule: 30 cm hoch, 5 cm breit) in drei

Trennschema



weitere Fraktionen aufgetrennt werden konnte. In der zweiten Fraktion B132 wanderte das nun oxydierte, ursprünglich reduziert vorliegende Riboflavin.

In der dritten, gelb fluoreszierenden Fraktion B133 findet sich der Formicaflavin-Lumazin-Komplex. Er erwies sich papierchromatographisch jedoch nicht einheitlich bei pH grösser als 7. Eine weitere Chromatographie mit Isopropanol: 1-proz. NH_3 (2:1) (Säule: 25 cm hoch, 3 cm breit) führte zu einer Zersetzung des vorwiegenden Komplexes. Es entstand eine Substanz mit violetter Fluoreszenz, die sich mit Aceton: 0,2-proz. Ammoniumacetatlösung (5:1) (Säule: 35 cm hoch, 1,5 cm breit) von einer tiefgelb fluoreszierenden, langsamer laufenden Verbindung abtrennen liess. Der violett fluoreszierende Stoff erwies sich als 6-Methyl-7-oxo-8-ribityl-lumazin (Näheres vgl. folgende Mitteilung).

Die tiefgelb fluoreszierende Verbindung wurde mit 0,3-proz. NH_4Cl -Lösung sowie Wasser weiter gereinigt (Säulen: 15 cm hoch, 1 cm breit). Die kristallin erhaltene Substanz zeigt die in Fig. 2 aufgeführten Spektren. Sie wird durch Rf-Werte und ihre elektrophoretische Beweglichkeit näher charakterisiert. Eine Behandlung der Substanz mit Natriumperjodat auf dem Papier [1] führt zu einer Veränderung der Substanz, die sich durch unterschiedliche Rf-Werte in 3-proz. Natriumcitratlösung zu erkennen gibt.

Riboflavin, vor Perjodatbehandlung, Rf = 0,33; nach der Behandlung 0,15.

Formicaflavin, vor der Perjodatbehandlung, Rf = 0,55; nach der Behandlung 0,32.

Die nach Perjodatoxydation entstandenen Produkte zeigen keine Fluoreszenzänderung.

Bei Stägiger Behandlung mit 0,1N HCl oder 0,1N NaOH bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluss verändert sich Formicaflavin nicht.

c) *Substanz B1422*. Zur weiteren Abtrennung wurde die Fraktion B14 mit 0,3-proz. Natriumcitratlösung chromatographiert (Säule: 20 cm hoch, 3 cm breit). Die zweite, hellgrün fluoreszierende Fraktion B142 wurde mit Wasser in eine rotgelb und eine gelbgrün fluoreszierende Substanz aufgetrennt (Säule: 25 cm hoch, 1,5 cm breit). Die gelbgrün fluoreszierende Substanz B1422 wurde mit Aceton: 2-proz. Ammoniumacetatlösung (4:1) und anschliessend mit Wasser weiter gereinigt (Säulen: 15 cm hoch, 1 cm breit). Ihr UV.-Spektrum (Fig. 3) lässt sich durch weitere Reinigungsprozesse nicht mehr verändern. Die Substanz kristallisierte bei Einengen der wässrigen Lösung. Die gemessenen Rf-Werte und die elektrophoretische Beweglichkeit sind in den Tabellen 1 und 2 eingetragen. Natriumperjodat-Behandlung auf Papier bewirkt nach Chromatographie keine Veränderung.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Männchen von *Formica polyctena* FOERST. wurden mit Hilfe von Chromatographie an Cellulosesäulen eine neue Riboflavinverbindung, ein Riboflavinkomplex, ein als Formicaflavin bezeichnetes tiefgelb fluoreszierendes Isoalloxazinderivat und eine weitere unbekannte, gelbgrün fluoreszierende Substanz isoliert. Die Verbindungen werden durch ihre UV.-Spektren, Rf-Werte sowie elektrophoretischen Beweglichkeiten charakterisiert.

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

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 3. Mitteilung: G. H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, Helv. 49, 344 (1966).
- [2] G. H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, Helv. 45, 1571 (1962).
- [3] G. H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, Helv. 47, 2049 (1964).