

- [13] M. HALMANN & S. PINCHAS, J. chem. Soc. 1958, 3264.  
[14] P. D. BOYER, D. J. GRAVES, C. H. SUELTER & M. E. DEMPSEY, Analyt. Chemistry 33, 1906 (1961).  
[15] H. DAHN & P. WYSS, travaux non publiés.  
[16] M. J. ALLAIN-LE CANU, Bull. Soc. chim. France [2] 47, 881 (1887).  
[17] E. CHAMBERS & G. W. WATT, J. org. Chemistry 6, 376 (1941).  
[18] H. E. ARMSTRONG, J. chem. Soc. 28, 522 (1875).  
[19] R. KING, J. chem. Soc. 179, 2108 (1921).  
[20] E. SAKELLARIOS, Ber. deutsch. chem. Ges. 55, 2851 (1922).  
[21] R. L. SHRINER, R. C. FUSON & D. Y. CURTIN, «The systematic Identification of Organic Compounds», 5. édit., p. 375, John Wiley, New York 1964.  
[22] W. H. HUNTER & F. E. JOYCE, J. Amer. chem. Soc. 39, 2644 (1917).  
[23] A. A. FROST & R. G. PEARSON, «Kinetics and Mechanism», 2. édit. p. 49, John Wiley, New York 1953.  
[24] A. CONTARDI & B. CIOCCA, Gazz. chim. ital. 63, 883 (1933).  
[25] H. H. HODGSON & F. H. MOORE, J. chem. Soc. 127, 2264 (1925).  
[26] H. H. HODGSON & J. NIXON, J. chem. Soc. 1930, 1087.

## 175. Naturstoffe aus Mikroorganismen

2. Mitteilung [1]

### Isolierung von L-Monapterin aus *Pseudomonas roseus fluorescens* J. C. MARCHAL 1937 und seine Konstitutionsaufklärung<sup>1)</sup>

von M. Viscontini und R. Bühler-Moor

Organisch-Chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(19. VII. 68)

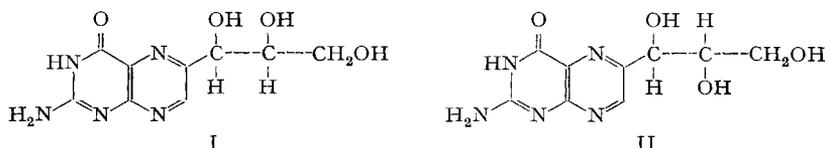
*Zusammenfassung.* Aus einer Kultur von *Pseudomonas roseus fluorescens* J. C. MARCHAL 1937 in eisenfreier, synthetischer Nährlösung wurde u. a. ein Pterin isoliert, das sich als (+)-6-(L-threo-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin erwiesen hat. – Isolierung, Eigenschaften und Konstitutionsaufklärung des Monapterins werden in dieser Arbeit beschrieben.

1937 isolierte J. C. MARCHAL aus einer Trinkwasserquelle bei Nancy (Frankreich) ein neues, chromogenes Bakterium, das er als *Pseudomonas roseus fluorescens* bezeichnet hat. Dieses *Pseudomonas* besitzt die eigentümliche Eigenschaft, in Nährlösung mit oder ohne Eisen zu wachsen, aber nach ganz verschiedenen Stoffwechselzyklen. In synthetischen, eisenfreien Nährlösungen wächst das *Pseudomonas* langsamer und scheidet im Kulturmedium zahlreiche fluoreszierende Substanzen aus, die in eisenhaltigem Kulturmedium nicht oder nur in geringen Konzentrationen zu finden sind.

In der ersten, vorläufigen Mitteilung [1] berichteten wir über die Isolierung von Monapterin, 6-Hydroxymethyl-pterin und zahlreichen Porphyrinen der Coproporphyrin-Reihe aus einer synthetischen, eisenfreien Nährlösung. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Isolierung und die Konstitutionsaufklärung des Monapterins, das sich als ein Stereoisomeres des D-Neopterins (I), und zwar als 6-[L-threo-1',2',3'-Trihydroxypropyl]-pterin (II), erwiesen hat.

<sup>1)</sup> Auszug aus der Dissertation von R. BÜHLER-MOOR, Universität Zürich 1968.

Wir haben das L-Monapterin (oder seinen Antipoden) ebenfalls aus Ameisenmännchen der Gattung *Formica rufa* – wenn auch nur in geringen Mengen – isoliert [2]. Diese Tatsache lässt vermuten, dass Monapterin sowie Biopterin und Neopterin in den Lebewesen sehr verbreitet sind.



Ganz besonders danken wir hiermit Herrn Prof. Dr. J. C. MARCHAL (Université de Nancy, Frankreich) für die freundliche Überlassung des von ihm isolierten *Pseudomonas roseus fluorescens*. Ebenfalls danken wir Frau Dr. M. POUTEAU-THOUVENOT (Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, Frankreich) für ihre Mitarbeit bei der Isolierung des Monapterins und für die Identifizierung zahlreicher fluoreszierender Stoffe aus dem Kulturmedium von *Pseudomonas roseus fluorescens*, und Herrn H. FROHOFER, Leiter der mikroanalytischen Abteilung unseres Institutes, für die Durchführung der Elementaranalysen und die Aufnahmen der IR.-Spektren. Die Arbeit wurde durch Mittel der GEIGY-JUBILÄUMSSTIFTUNG, Basel, der JUBILÄUMSPENDE FÜR DIE UNIVERSITÄT ZÜRICH und des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG unterstützt.

### Experimenteller Teil

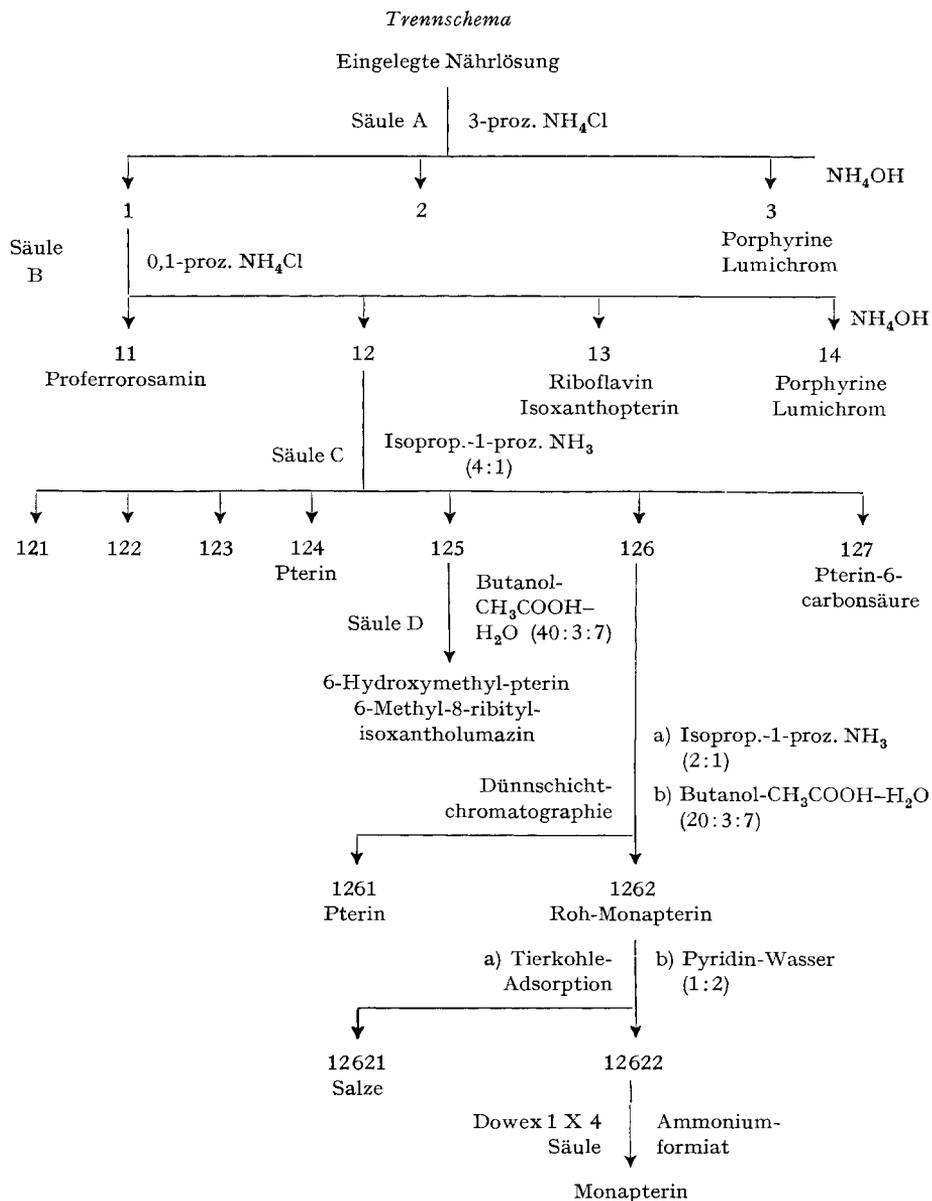
**Isolierung des Monapterins.** – *Bakterienstamm.* Zur Impfung der Nährlösung haben wir immer einen frischen Stamm von *Pseudomonas roseus fluorescens* verwendet. Zu diesem Zweck werden alle zwei Wochen 6 Reagenzgläser, die je 7 ml des unten angegebenen Wachsmilieus enthalten, neu beimpft. Diese Reagenzgläser werden im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 25° gehalten. Herstellung des synthetischen *Wachsmilieus*: 9 g Asparagin, 25 g Glycerol, 2,5 g  $K_2HPO_4$ , 2,5 g  $MgSO_4$ , 0,4 g  $CaCl_2$ , 6  $H_2O$  und 0,1 g  $FeSO_4$  werden in 1 l dest. Wasser gelöst und das pH mit HCl auf 6,8 gebracht. Diese Lösung wird in Reagenzgläser (je 7 ml) verteilt und  $\frac{1}{2}$  Std. im Autoklaven bei 115° sterilisiert.

*Nährlösung.* Die Nährlösung unterscheidet sich vom Wachsmilieu nur dadurch, dass sie kein  $FeSO_4$  enthält. Je 10 l Nährlösung werden in 2-l-Rundkolben (500 ml pro Kolben) oder noch besser – da die Oberfläche an der Luft möglichst gross sein soll – in Roux-Flaschen (je 200 ml) verteilt und anschliessend  $\frac{1}{2}$  Std. bei 115° in Autoklaven sterilisiert. Jeder Kolben bzw. jede Roux-Flasche wird mittels einer Platinöse mit der Haut einer 10-tägigen Bakterienkultur geimpft und einen Monat im Brutschrank bei 25° stehengelassen. Danach werden diese 10 l Nährlösung mit den gewachsenen Bakterien im Rotationsverdampfer im Vakuum auf 1 l eingengt.

*Trennung der Pterine vom Lumichrom und von den Porphyrinen* (siehe Trennschema). Zur Abtrennung der Bakterien wird die konzentrierte Lösung zentrifugiert. Nach Zugabe von 30 g  $NH_4Cl$  wird sie mit verdünnter Salzsäure auf ein pH von etwa 5 gebracht. Diese Lösung wird hierauf auf eine mit Cellulosepulver (WHATMAN, Normal Grade) nass vorbereitete, grosse Säule A (Durchmesser 16 cm, Höhe 15 cm), die mit 3-proz.  $NH_4Cl$  akklimatisiert worden ist, aufgetragen. Nachdem die in der Nährlösung enthaltenen, fluoreszierenden Substanzen auf der Säule absorbiert sind, wird so lange mit 3-proz.  $NH_4Cl$ -Lösung eluiert, bis eine blaugrüne Fraktion (1) und eine gelb fluoreszierende (2) durchgewandert sind. Am Start bleibt eine rot fluoreszierende Fraktion (3), in der das Lumichrom und die Porphyrine enthalten sind.

*Weitere Auftrennung der Pterine.* Das blaugrün fluoreszierende Eluat (1) aus der Säule A wird auf 300 ml eingengt, auf zwei mit Cellulosepulver trocken gestopfte Säulen B ( $9 \times 45$  cm) aufgeteilt und mit 0,1-proz.  $NH_4Cl$ -Lösung eluiert. Als erste Fraktion 11 kann ein grün fluoreszierendes Extrakt aufgefangen werden, das das Proferrorosamin enthält [3]. Die nächste, blau fluoreszierende Fraktion 12 enthält sämtliche Pterine bzw. Lumazine. Es folgt Fraktion 13 mit dem Rest von Riboflavin und Isoxanthopterin. Am Start bleiben manchmal Spuren von Porphyrinen und Lumichrom zurück, die mit verdünntem  $NH_4OH$  eluiert werden können (Fraktion 14) [4].

Das Eluat 12 wird im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft, in 30 ml Isopropanol-1-proz.  $\text{NH}_3$  (4:1) aufgenommen, nach Zugabe von 1 Löffel Cellulosepulver durch kräftiges Schütteln homogenisiert, auf eine Cellulosesäule C ( $8 \times 40$  cm) aufgetragen und mit Isopropanol-1-proz.  $\text{NH}_3$  (4:1) eluiert. Dabei wird eine Auftrennung in 7 fluoreszierende Banden erreicht: eine violette (121), eine blaue (122), eine violette (123) und vier blaue (124, 125, 126, 127) [4]. Die Bande 124 enthält Pterin, die Bande 125 6-Methyl-8-ribityl-isoxantholumazin, die Bande 126 unreines Monapterin und die Bande 127 Pterin-6-carbonsäure.



Die Rf-Werte dieser Substanzen mit dem verwendeten Eluierungsmittel unterscheiden sich nicht wesentlich, so dass eine saubere Trennung der oben erwähnten Fraktionen nie auf einmal erreicht werden kann; lässt man die Säule C rasch laufen, erfolgt keine Trennung; bei zu langsamer Durchlaufgeschwindigkeit gibt es Durchmischung durch Diffusion. Es ist also ratsam, dieselbe Trennung auf der Säule C mit der das Monapterin enthaltenden Fraktion 126 so oft zu wiederholen, bis eine genügende Trennung erreicht wird.

*Reindarstellung des Monapterins.* Die aus mehreren Trennungen erhaltenen Eluate 126 werden eingedampft. Der Rückstand wird auf Cellulosedünnschichtplatten (NM 300 MACHERY & NAGEL, Düren, Schichtdicke  $\frac{1}{4}$  mm) chromatographiert, zuerst mit Isopropanol-1-proz.  $\text{NH}_3$  (2:1), dann mit Butanol-Eisessig-Wasser (20:3:7) als Laufmittel. Dabei werden die letzten Spuren Pterin (1261) von Monapterin abgetrennt. Das rohe Manpterin 1262 (60 mg) wird in dest. Wasser durch Erwärmen auf  $60^\circ$  aufgelöst und die Lösung mit soviel gereinigter Tierkohle versetzt, bis ihre Fluoreszenz verschwindet. Dann fügt man einige Löffel Cellulosepulver zu und gibt die Suspension gesamthaft auf eine Cellulosesäule ( $4 \times 10$  cm). Nachdem die Salze und weiteren Begleitstoffe mit bidest. Wasser eluiert worden sind (Lösung 12621), wird das Monapterin durch abwechselungsweise Elution mit jeweils 20 ml Pyridin-Wasser (1:2) und 20 ml Wasser freigesetzt und zurückgewonnen (Eluat 12622). Dieses Eluat wird im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und über Dowex 1 X4 chromatographiert. Dazu wird das Monapterin (40 mg) in 0,1N  $\text{NH}_3$  gelöst, die Lösung mit verdünnter Ameisensäure auf pH 10 gebracht und auf eine kleine, mit 3N Natriumformiat akklimatisierte Dowex-Säule ( $4 \times 10$  cm) aufgetragen. Es wird so lange mit einer Pufferlösung von pH 8,5 (1 l Wasser + 2,4 ml konz.  $\text{NH}_3$  + 1,2 ml konz.  $\text{HCOOH}$ ) gewaschen, bis keine fluoreszierende Substanzen mehr erscheinen. Das Monapterin wird dann mit einer Lösung von pH 5 (5 l Wasser + 10 ml konz.  $\text{NH}_3$  + 6 ml konz.  $\text{HCOOH}$ ) eluiert. Die Lösung wird eingedampft, der Rückstand mehrmals mit Methanol gewaschen und das Monapterin aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute 25 mg weisse mikrokristalline Substanz, die sich oberhalb  $200^\circ$  ohne zu schmelzen zersetzt. – Für die Analyse wird das Monapterin im Hochvakuum (0,1 Torr,  $80^\circ$ , 10 Std.) getrocknet.

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_4$  (253,13) Ber. C 42,67 H 4,38 N 27,66% Gef. C 42,22 H 4,67 N 25,08%

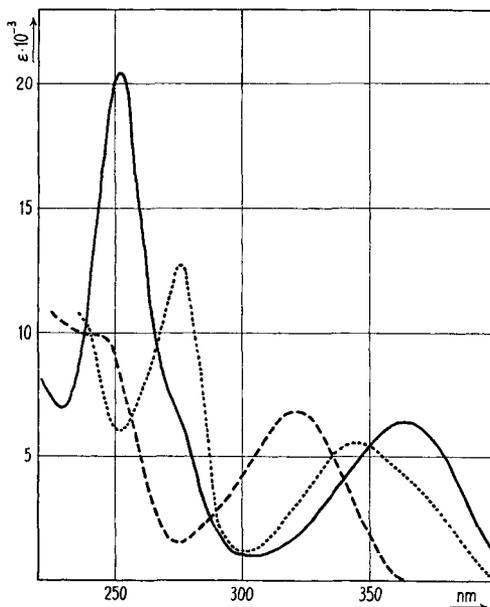


Fig. 1. UV-Absorptionsspektrum von L-Monapterin  
 ----- pH 1 (HCl); ..... pH 6,6; ——— pH 12,2 (NaOH)

Die spezifische optische Drehung des Monapterins wurde zweimal bestimmt: 8,5 (7,8) mg Monapterin in 2,78 (2,0) ml 0,1N HCl;  $c = 0,304$  (0,391):  $[\alpha]_D^{24} = +105,3^\circ \pm 5^\circ$  ( $+107,7^\circ \pm 4^\circ$ ). - Für die synthetisch hergestellten Monapterine haben wir gefunden: D-Monapterin:  $-115 \pm 5^\circ$  [5]; L-Monapterin:  $+111 \pm 5^\circ$ ). REMBOLD und Mitarb. geben für dieselben Substanzen  $-92^\circ \pm 3^\circ$  und  $+97^\circ \pm 3^\circ$  an [6].

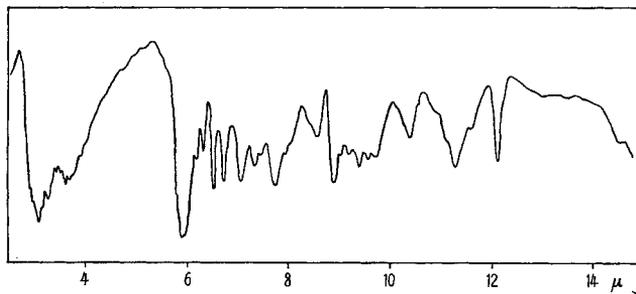


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von L-Monapterin, in KBr aufgenommen

Die UV.- (Fig. 1) und IR.-Spektren (Fig. 2) des natürlichen Monapterins aus *Pseudomonas* stimmen mit jenen der synthetischen Produkte überein.

Die Rf-Werte wurden aufsteigend auf Papier (SCHLEICHER & SCHÜLL 2043b) gemessen und mit jenen des synthetischen Neopterins verglichen:

Laufmittel	Rf-Werte	
	Synthetisches und natürliches Monapterin	Synthetisches Neopterin
Wasser	0,73	0,73
3-proz. NH <sub>4</sub> Cl	0,65	0,65
3-proz. Natriumcitrat	0,55	0,55
Isopropanol-1-proz. NH <sub>3</sub> (2:1)	0,34	0,40
Isopropanol-5-proz. Borsäure (4:1)	0,14	0,20
Butanol-Eisessig-Wasser (20:3:7)	0,16	0,16

**Konstitutionsaufklärung des Monapterins.** - a) *Photolyse.* 10  $\mu$ g Monapterin wurden direkter Sonnenbestrahlung ausgesetzt. Ein Papierchromatogramm zeigte, dass bereits nach 10 Min. das Monapterin vollständig zur Pterin-6-carbonsäure (III) abgebaut wurde.

b) *KMnO<sub>4</sub>-Oxydation.* 50  $\mu$ g Monapterin wurden in 5 ml 0,1N NaOH gelöst und mit überschüssiger KMnO<sub>4</sub>-Lösung 30 Min. auf 80° erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde das noch vorhandene KMnO<sub>4</sub> mit einigen Tropfen Äthanol reduziert und das entstandene MnO<sub>2</sub> abfiltriert. Spektren und Papierchromatogramme bestätigten die Oxydation des Monapterins zur Pterin-6-carbonsäure (III).

c) *Perjodsäure-Oxydation.* Eine Lösung von 2 mg Monapterin in möglichst wenig Wasser wurde mit 0,025M Natriumperjodat-Lösung versetzt, wobei sich ein gelber Niederschlag bildete. UV.-Spektren und papierchromatographischer Vergleich bestätigten die Identität des Niederschlags mit dem synthetischen 6-Formylpterin (IV).

d) *Formaldehyd als weiteres Abbauprodukt der Na-Perjodat-Oxydation.* Eine Lösung von 3,75 mg Monapterin in 10 ml Wasser wurde mit 10 mg festem NaJO<sub>4</sub> versetzt und in einer Mikroapparatur mit Wasserdampf destilliert. In der Vorlage der Apparatur befand sich eine Lösung von 5 mg *p*-Nitrophenylhydrazin-hydrochlorid in 2 ml Wasser. Nachdem 10 ml Destillat übergegangen

<sup>2)</sup> Noch nicht publiziertes Ergebnis aus unserem Laboratorium.

waren, wurde die Destillation abgebrochen. In der Vorlage war ein Hydrazon gleich kristallin ausgefallen. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (Laufmittel  $\text{CHCl}_3$ -Hexan-Methanol 100:10:1) bewies die Identität des ausgefallenen Hydrazons mit authentischem Formaldehydhydrazon.

e) *Quantitative Perjodat-Oxydation*. 13,5 mg (0,053 mMol) Monapterin wurden in wenig Wasser gelöst und quantitativ in einen 50-ml-Messkolben gegeben. Nach Zugabe von 10 ml 0,025 M  $\text{NaJO}_4$  wurde die Lösung mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt, homogenisiert und im Dunkeln gehalten. Von der dritten bis zur sechsten Stunde wurden in einstündigem Abstand Proben von 5 ml entnommen und mit 10 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, 5 ml 0,02 N Na-Arsenit-Lösung und 1 ml 20-proz. KJ-Lösung versetzt. Nach 5 Min. wurde 1 ml Stärkelösung zugesetzt und mit 0,02 N Jodlösung zurücktitriert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst, wobei  $a_1$  = Jodverbrauch in ml beim Blindversuch;  $a_2$  = Jodverbrauch in ml beim Oxydationsversuch;  $f$  = Faktor der Jodlösung = 1,035;  $x$  = mMole verbrauchtes Perjodat/mMol angesetztes Monapterin.

Zeit Std.	$a_1$	$a_2$	$a_2 - a_1$	mMole verbraucht, $\text{NaJO}_4$ $(a_2 - a_1) f \cdot 10^{-2}$	mMole Substrat	$x$
3	2,36	3,29	0,93	0,009627	0,00533	1,80
4	2,36	3,37	1,01	0,010460	0,00533	2,00
5	2,37	3,45	1,08	0,011180	0,00533	2,10
6	2,38	3,48	1,10	0,011390	0,00533	2,13

f) *Bestimmung der gebildeten Ameisensäure*. Nach 3 bzw. 6 Std. wurden dem Messkolben von Versuch e) jeweils 10 ml Lösung entnommen, mit 0,5 ml Äthylenglykol versetzt und 10 Min. stehengelassen (Reduktion des überschüssigen Perjodats). Danach wurde die Ameisensäure mit 0,01 N NaOH und Methylrot als Indikator titriert, wobei folgende Werte erhalten wurden:

Zeit Std.	$a_1$	$a_2$	$a_2 - a_1$	mMole Verbrauch $(a_2 - a_1) \cdot 10^{-2}$	mMole Substanz	$x$
3	0,04	0,94	0,90	0,009	0,01066	0,84
6	0,04	1,04	1,00	0,010	0,01066	0,94

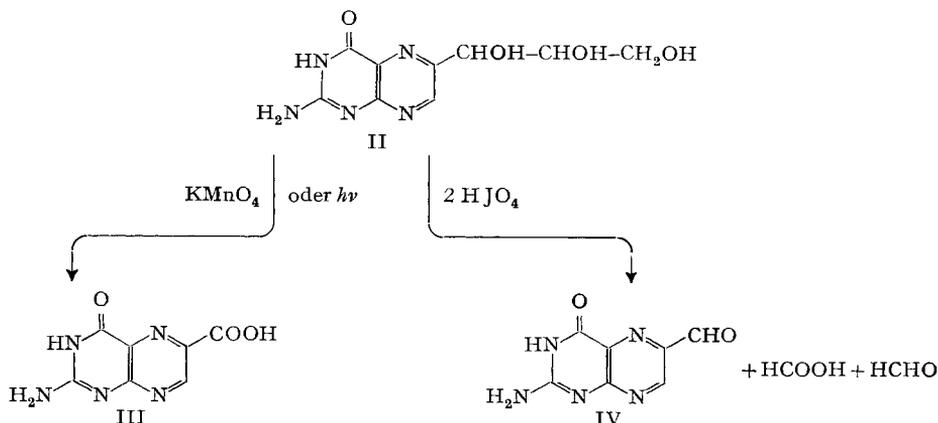
wobei  $a_1$  = ml 0,01 N NaOH beim Blindversuch;  $a_2$  = ml 0,01 N NaOH beim Oxydationsversuch;  $x$  = mMole NaOH/mMol angesetztes Monapterin.

g) *Bestimmung des gebildeten Formaldehyds*. Nach 3 bzw. 6 Std. wurden dem Messkolben von Versuch e) jeweils 2 ml Lösung entnommen; nach Zugabe eines Tropfens Methylrot wurde bis zum Farbumschlag 10-proz.  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  zutropft, danach mit 1 ml 10-proz.  $\text{NaHSO}_3$  versetzt und auf 10 ml mit Wasser aufgefüllt. Davon wurde 1 ml in ein Reagenzglas zu 10 ml Chromotropsäure-Reagens (0,5 g Natrium-1,8-dihydroxy-naphthalin-3,6-disulfonat in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 200 ml 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) gegeben und die Mischung 20 Min. auf dem Wasserbad erwärmt, wobei eine intensiv violette Färbung entstand. Nach Abkühlung wurde mit 2 ml halbgesättigter wässriger Thioharnstofflösung versetzt, die Extinktion bei 570 nm gemessen und mit einer Eichkurve, die vorher mit Serin bestimmt wurde, verglichen.

Zeit (Std.)	$E_{\lambda=570 \text{ nm}}$	$x_1$	$x_2$	$x_1/x_2$
3	0,257	3,22	3,15	1,02
6	0,306	3,75	3,15	1,19

wobei  $x_1$  =  $\mu\text{g}$  gefundenes HCHO pro ml Lösung g);  $x_2$  =  $\mu\text{g}$  theoretisches HCHO pro ml Lösung g)

h) *Schlussfolgerungen*. Auf Grund dieser Ergebnisse kann man alle Abbaureaktionen des Monapterins (II) folgendermassen formulieren:



Somit ist seine Struktur aufgeklärt und seine Konfiguration durch Vergleich mit synthetischem, in unserem Laboratorium hergestelltem Monapterin als (+)-6-(L-threo-1', 2', 3'-Trihydroxypropyl)-pterin (II) bewiesen.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 1. Mitteilung: M. VISCONTINI, M. POUTEAU-THOUVENOT, R. BÜHLER-MOOR & M. SCHROEDER, *Helv.* **47**, 1948 (1964).
- [2] G. H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, *Helv.* **49**, 344 (1966).
- [3] M. POUTEAU-THOUVENOT, A. GAUDEMER & M. BARBIER, *Bull. Soc. Chim. biol.* **47**, 2085 (1965); M. POUTEAU-THOUVENOT & M. BARBIER, *ibid.* **47**, 3238 (1965).
- [4] M. POUTEAU-THOUVENOT, *Trav. Lab. Microbiol. Nancy*, im Druck.
- [5] M. VISCONTINI & R. PROVENZALE, *Helv.* **51**, 1495 (1968).
- [6] H. REMBOLD & L. BUSCHMANN, *Chem. Ber.* **96**, 1406 (1963).

## 176. Naturstoffe aus Mikroorganismen

3. Mitteilung [1]

### Isolierung von 6-Hydroxymethyl-pterin aus Kulturen von *Pseudomonas roseus fluorescens* J. C. MARCHAL 1937

von M. Viscontini und M. Frater-Schroeder<sup>1)</sup>

Organisch-Chemisches Institut der Universität  
Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(19. VII. 68)

*Zusammenfassung.* Die Isolierung des 6-Hydroxymethyl-pterins, neben anderen Pteridinen, aus Kulturen von *Pseudomonas roseus fluorescens* in synthetischer Nährlösung wird beschrieben. Die biologische Bedeutung dieses erstmals als reiner Stoff aus natürlicher Quelle isolierten Pterins wird geschildert.

In der vorherigen Mitteilung [1] beschrieben wir die Trennung einiger fluoreszierender Substanzen aus synthetischen, eisenfreien Nährlösungen von *Pseudomonas roseus fluorescens*. Die dort erwähnte Fraktion 125, die durch Elution der Säule C mit

<sup>1)</sup> Auszug aus der Dissertation von M. FRATER-SCHROEDER, Universität Zürich 1967.