

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

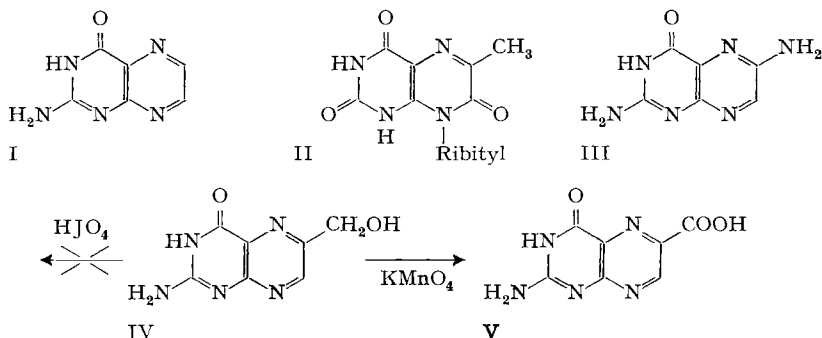
(19. VII. 68)

*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.

Isopropanol - 1-proz.  $\text{NH}_4\text{OH}$  gewonnen wird, ist ein Gemisch mehrerer Stoffe, die wir papierchromatographisch getrennt haben (s. exper. Teil). Folgende Produkte wurden rein erhalten: Pterin (I), 6-Methyl-8-ribityl-isoxantholumazin (II), 6-Aminopterin (III) und 6-Hydroxymethyl-pterin (IV). Die Produkte I und II sind schon früher in der Natur gefunden worden und werden hier nicht näher behandelt. Hingegen stellt die Isolierung des 6-Aminopterin (III) aus *Pseudomonas roseus* ein Problem, das wir kurz erörtern wollen. Diese Substanz wurde, angeblich als Naturstoff, mehrmals isoliert, nämlich aus *Drosophila melanogaster*, sowie aus den Algen *Nostoc*



*muscorum* G und *Anacystis nidulans* [2]. Wir glauben jedoch, dass es sich jedesmal - wie auch in der vorliegenden Arbeit - um ein Artefakt handelt, das sich während der Aufarbeitung der Extrakte aus Dihydropterin und  $\text{NH}_4\text{OH}$  bildet (siehe z. B. unsere vorangegangene Mitteilung [1]: Isopropanol-1-proz.  $\text{NH}_4\text{OH}$  als Elutionsmittel der Säule C).

Viel interessanter erweist sich die Gewinnung des 6-Hydroxymethyl-pterins (IV) als Naturstoff. Wir hatten schon 1948 die Vermutung ausgesprochen, dieses Pterin könne eine Vorstufe der Folsäure-Biosynthese sein [3]. Mehrere Autoren schlossen sich später dieser Vermutung an und entwickelten sie zur Theorie der Folsäure-Biosynthese weiter [4]. Infolgedessen wurde immer versucht, das 6-Hydroxymethyl-pterin selbst oder wenigstens eine seiner möglichen aktivierten Formen (z. B. 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin-phosphat) aus Lebewesen zu isolieren. In der Literatur berichteten erstmals FORREST und Mitarb. [5] über das Vorhandensein eines Glucosides in blaugrünen Algen, welches durch saure Hydrolyse in Glucose und 6-Hydroxymethyl-pterin (IV) gespalten wird. Letzteres konnte papierchromatographisch nachgewiesen werden. Neuerdings teilte FORREST die papierchromatographische Identifizierung desselben Pterins in einer *Pseudomonas*-Art mit [6]. KRUMDIECK und Mitarb. [7] haben ihrerseits einen *Corynebacterium*-Stamm, der Folsäure aus Guanin synthetisieren kann, mit  $[2-^{14}\text{C}]$ -Guanin gefüttert, worauf radioaktives 6-Hydroxymethyl-pterin aus Bakterium-Extrakt ebenfalls papierchromatographisch nachgewiesen werden konnte; aber das Produkt selbst wurde bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit (1964) [8] als reiner Stoff noch nicht isoliert.

Die hier beschriebene Isolierung dieses Pterins aus Kulturen von *Pseudomonas roseus fluorescens*, seine Analyse und Identifizierung mit synthetischem Material (s. exper. Teil) beantwortet somit die lange umstrittene Frage nach seinem Vorhandensein in der Natur endgültig und positiv.

Herrn Prof. Dr. J. C. MARCHAL (Université de Nancy, France) danken wir sehr 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, France) für ihre Mitarbeit bei der Isolierung der einzelnen Pterine aus dem Kulturmedium von *Pseudomonas roseus fluorescens*, und Herrn H. FROHOFER, Leiter der mikroanalytischen Abteilung unseres Institutes, für die Durchführung der Elementaranalysen und die Aufnahme der IR-Spektren. – Die Arbeit wurde durch Mittel der GEIGY-JUBILÄUMSSTIFTUNG in Basel und des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG unterstützt.

**Experimentelles.** – Das in [1] erwähnte Eluat 125 wird eingengt, der Rückstand in Butanol-Eisessig-Wasser (40:3:7) aufgenommen und auf einer Cellulosesäule D (trocken gestopft;  $6,5 \times 20$  cm) mit dem gleichen Lösungsmittel chromatographiert (siehe Trennschema). Dabei wird eine Auftrennung in drei blau fluoreszierende Banden erreicht: das Eluat 1251 enthält wiederum etwas Pterin, das in Fraktion 124 nicht vollständig eluiert war; in Fraktion 1252 sind 6-Hydroxymethylpterin und 6-Aminopterin vorhanden, und aus der Fraktion 1253 lässt sich 6-Methyl-8-ribityl-isoxantholumazin (II) isolieren. Die Fraktion 1252 wird nach Chromatographie an einer Cellulosesäule E (trocken gestopft;  $4 \times 20$  cm) mit Isopropanol-0,2-proz.  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (4:1) in eine blau fluoreszierende (12521) und eine grün fluoreszierende (12522) Fraktion getrennt. Fraktion 12522 wird auf Cellulosesäule F ( $2 \times 15$  cm) mit Aceton-Wasser (3:1) in 6-Aminopterin (III) und eine unbekannte Substanz getrennt. Dieses 6-Aminopterin ist mit synthetischem Material identisch.

Fraktion 12521 enthält noch ein wenig Riboflavin (Fraktion 125211), das durch Chromatographie auf der Säule G ( $2 \times 20$  cm) mit 0,1-proz.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  von rohem 6-Hydroxymethylpterin (Fraktion 125212) abgetrennt wird. Auf diese Weise werden 200 l Bakterienkultur aufgearbeitet.

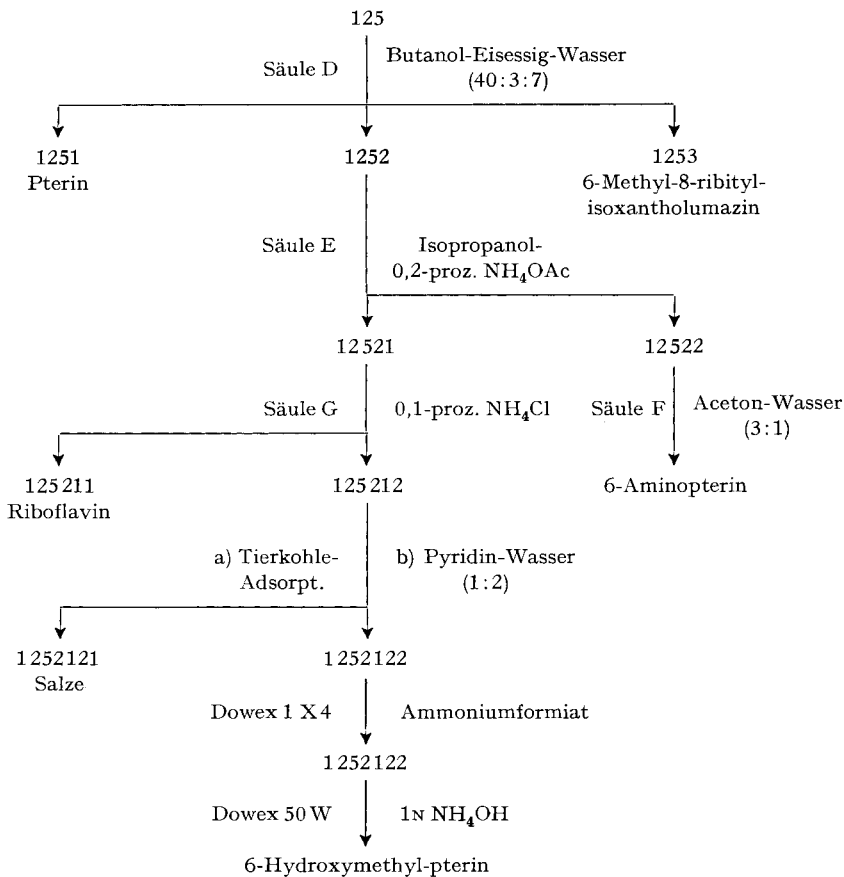
*Reindarstellung des 6-Hydroxymethyl-pterins (IV).* Die vereinigten Fraktionen 125212 werden eingedampft, der Rückstand in dest. Wasser durch Erwärmen auf  $60^\circ$  aufgelöst und die Lösung mit gereinigter Tierkohle bis zum Verschwinden der Fluoreszenz versetzt (2–3 g). Man fügt einige Löffel Cellulosepulver zu und gibt die Suspension gesamthaft auf eine Cellulosesäule ( $5 \times 6$  cm). Nach Elution der Salze und weiterer Begleitstoffe mit Wasser (Fraktion 1252121) wird das 6-Hydroxymethylpterin durch abwechselungsweises Durchlaufenlassen von je 20 ml Pyridin-Wasser (1:2) und 20 ml Wasser eluiert (Fraktion 1252122). Dieses Eluat wird im Rotationsverdampfer abgedampft. Der Rückstand (10 mg Rohprodukt IV) wird über Dowex 14 X chromatographiert. Dazu wird er in 0,1N  $\text{NH}_4\text{OH}$  gelöst, die Lösung mit verdünnter Ameisensäure auf pH 8,5 gebracht und auf eine kleine, mit 3N Natriumformiat klimatisierte Dowex-Säule ( $2,5 \times 20$  cm) aufgetragen. Nun wird mit einer wässrigen Lösung von pH 8,5 (1 l Wasser + 2,4 ml konz.  $\text{NH}_4\text{OH}$  + 1,2 ml  $\text{HCOOH}$ ) bis zum Verschwinden der Fluoreszenz gewaschen. Das Produkt 1252122 wird dann mit einer Ammoniumformiat-Pufferlösung von pH 7 eluiert. Nach Eindampfen des Eluats wird der Rückstand in 0,1N  $\text{HCl}$  gelöst und auf eine Dowex 50 W-Säule ( $\text{H}^+$ -Form;  $2,5 \times 20$  cm) gebracht. Durch Waschen mit 2 l Wasser wird das adsorbierte Produkt von Anionen befreit und darauf mit 1N  $\text{NH}_4\text{OH}$  eluiert. Die ammoniakalische Lösung wird abgedampft, der Rückstand mit Äthanol aufgerührt, abzentrifugiert, einmal mit Äthanol, zweimal mit Äther gewaschen und getrocknet (10 Std.;  $60^\circ$ ; 0,01 Torr): 7 mg weisse Substanz, die sich ohne Schmelzen oberhalb  $200^\circ$  zersetzt.

$\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_5\text{O}_2$  (193,17) Ber. C 43,52 H 3,65 N 36,26% Gef. C 42,92 H 3,78 N 35,87%

*Oxydation der Substanz 1252122.* – a) Mit  $\text{KMnO}_4$ . 0,5 mg Substanz 1252122 wurde in 2 ml 0,2N  $\text{NaOH}$  gelöst und mit überschüssiger  $\text{KMnO}_4$ -Lösung 5 Min. auf  $100^\circ$  erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde das noch vorhandene  $\text{KMnO}_4$  mit Spuren Na-Dithionit reduziert, das ausgefallene  $\text{MnO}_2$  abfiltriert und das Filtrat mit 5N  $\text{HCl}$  auf pH 2 gebracht, worauf eine leicht gelb gefärbte Substanz ausfiel und abzentrifugiert werden konnte. Nach Waschen mit Äthanol und Äther wurde diese Substanz durch Vergleich mit synthetischer Pterin-6-carbonsäure (V) als solche identifiziert (UV.-Spektrum, Rf-Werte in fünf Laufmitteln).

b) Mit Perjodsäure. Eine Lösung von 0,5 mg Substanz 1252122 in 0,2 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gelöst wurde mit 0,4 ml 0,0225N  $\text{NaJO}_4$ -Lösung versetzt und auf 5 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Nach 24 Std. war kein neues Produkt entstanden und es wurde keine Perjodsäure verbraucht.

Trennschema



Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Substanz 1252122 mit synthetisch hergestelltem 6-Hydroxymethyl-pterin (IV) [9] verglichen und damit identisch gefunden (UV-, IR-Spektren, Papierchromatographie in *fünf* Laufmitteln).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 2. Mitteilung: M. VISCONTINI & R. BÜHLER-MOOR, *Helv.* 51, 1548 (1968).
- [2] C. VAN BAALEN & H. S. FORREST, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 1770 (1959).
- [3] M. VISCONTINI, R. GAVARD & J. MILLET, *Ann. Inst. Pasteur* 74, 113 (1948).
- [4] L. JAENICKE & C. CHAN, *Angew. Chem.* 72, 752 (1960); T. SHIOTA & M. N. DISRAELY, *Biochim. Biophysica Acta* 52, 467 (1961); T. SHIOTA, M. N. DISRAELY & M. P. MCCANN, *J. biol. Chemistry* 239, 2259 (1964).
- [5] D. L. HATFIELD, C. VAN BAALEN & H. S. FORREST, *Plant Physiol.* 36, 240 (1961).
- [6] K. KOBAYASHI & H. S. FORREST, *Biochim. Biophysica Acta* 141, 642 (1967).
- [7] C. L. KRUMDIECK, C. M. BAUGH & E. N. SHAW, *Biochim. Biophysica Acta* 90, 573 (1964).
- [8] M. VISCONTINI, M. POUTEAU-THOUVENOT, R. BÜHLER-MOOR & M. SCHROEDER, *Helv.* 47, 1948 (1964).
- [9] C. W. WALLER, A. A. GOLDMAN; R. B. ANGIER, J. H. BOOTHE, B. L. HUTCHINGS, J. H. MOWAT & J. SEMB, *J. Amer. chem. Soc.* 72, 4630 (1950).