

150. Fluoreszierende Stoffe aus Roten Waldameisen der Gattung *Formica* (INS. HYM.)

6. Mitteilung [1]

Einige chemische Eigenschaften des Formicapterins

von M. Viscontini und M. Konishi

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

(7. VI. 69)

Zusammenfassung. Formicapterin wurde aus *Formica rufa* und *F. polyctena* isoliert. Die Ergebnisse der physikalisch-chemischen Messungen und der Abbaureaktionen, die am verfügbaren Material ausgeführt wurden, erlauben noch keine endgültige Aussage über die Struktur des Formicapterins, das vermutlich ein polyhydroxyliertes Lumazin ist.

Vor sieben Jahren isolierten SCHMIDT & VISCONTINI [2] aus *Formica*-Arbeiterinnen einige μg eines neuen Stoffes, der in saurem und neutralem Milieu rosaviolett, in alkalischem Milieu intensiv gelb fluoresziert.

Die Substanz erwies sich als relativ stabil, nur mit KMnO_4 wurde sie leicht in alkalischer Lösung oxydiert. Da es sich nach den aufgenommenen UV.-Spektren um ein Pterinderivat handeln musste, bezeichneten die Autoren die Substanz als Formicapterin.

Das Produkt gewann an Interesse, als gezeigt wurde, dass im Ameisenkörper das Formicapterin mit Riboflavin einen Komplex bildet, der isoliert werden konnte [3]. Dieser Komplex ist unterhalb von pH 7 beständig, zersetzt sich jedoch oberhalb pH 7 sehr rasch in die beiden Komponenten.

Seither beschäftigt sich G.H. SCHMIDT mit der biologischen Bedeutung dieser Substanz. Er hat schon wichtige Ergebnisse erhalten [4], und wir selbst fanden das Formicapterin nicht nur in *Formica*-Arbeiterinnen, sondern auch in *Lasius fuliginosus* LATR. Vielleicht ist es im Insektenreich sehr verbreitet.

Wegen der zunehmenden Bedeutung des Formicapterins entschlossen wir uns, eine grössere Menge der Substanz zu isolieren, um ihre chemische Struktur aufzuklären zu versuchen. Von 2 kg *Formica-rufa*- und *Formica-polyctena*-Arbeiterinnen ausgehend und gestützt auf die Erfahrungen unserer früheren Arbeiten, haben wir die Extraktions- und Reinigungsmethoden verbessert (siehe Trennschema im exp. Teil). Auf diese Weise erhielten wir ca. 2 mg Formicapterin, das leider mit 40–50% NH_4Cl verunreinigt war. Immerhin konnten wir mit dieser kleinen Menge folgende Ergebnisse erzielen:

1. Das Formicapterin ist stark sauer, etwa wie eine Pterincarbonensäure oder ein Xantho- bzw. Isoxantholumazin.

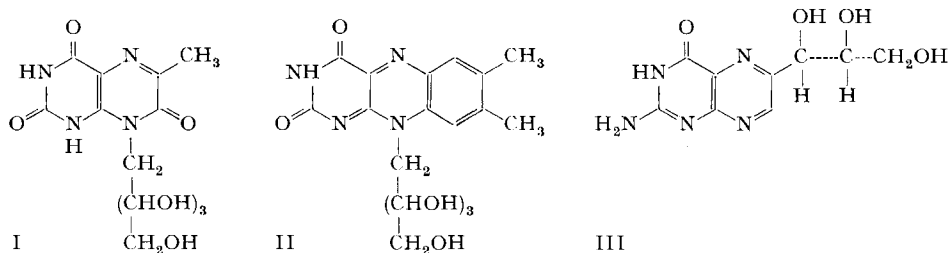
2. Formicapterin wird von KMnO_4 rasch oxydiert. Aus den Abbauprodukten lassen sich weder Pterin- noch Lumazin-carbonsäuren isolieren. Unseres Wissens reagie-

ren ähnlich: Xanthopterin-, Isoxanthopterin-, Xantholumazin-, Isoxantholumazin- und N(8)-substituierte 7,8-Dihydropteridin-Derivate.

3. Formicapterin lässt sich weder katalytisch noch mit NaBH_4 reduzieren. Ebenso beständig gegenüber Reduktionsmitteln sind Isocanthopterin- und Isoxantholumazin-Derivate.

4. Formicapterin besitzt eine Polyhydroxygruppe, die durch NaJO_4 abgebaut wird. Der Abbau lässt sich papierchromatographisch verfolgen. Beim Abbau ändert sich das UV.-Spektrum nicht, so dass angenommen werden kann, dass sich die Polyhydroxygruppe in einer Seitenkette befindet. Leider konnten wir kein Oxydationsprodukt charakterisieren.

5. Weder Sonnen- noch UV.-Licht zersetzen das Formicapterin. Dann kann also die Seitenkette weder in 6-Stellung eines Pteridin- bzw. Lumazin- noch am N(8)-Atom eines Isoalloxazin-Gerüsts haften. – Wir fanden ein ähnliches Verhalten beim N(8)-Ribityl-6-methyl-isoxantholumazin (I).



6. Das NMR.-Spektrum des mit NH_4Cl verunreinigten Formicapterins (Fig. 1) lässt sich schwer interpretieren. Als Vergleich geben wir das NMR.-Spektrum des ähnlich verunreinigten Riboflavins (II) an, in dem die zwei CH_3 -Reste und die beiden aromatischen Protonen deutlich zu erkennen sind (Fig. 2). Das Formicapterin besitzt vielleicht einen oder zwei Methylreste, aber kein Vinyl- bzw. aromatisches Proton. Die Signale zwischen 4 und 5 ppm können vom (C)-H der polyhydroxylierten Kette herrühren.

7. Das Massenspektrum (Fig. 3) ist noch schwieriger zu deuten. Als Vergleich geben wir die entsprechenden Spektren von synthetischem Ribityl-methyl-isoxantholumazin I (Fig. 4) und von synthetischem D-Neopterin (III) (Fig. 5) wieder. In keinem der beiden letzteren Spektren befindet sich der für Formicapterin so charakteristische Pik bei 155. Dieser Pik ist jedoch im Massenspektrum des aus *Mycobacterium smegmatis* isolierten polyhydroxylierten Pterins [5] vorhanden.

Aus diesen Resultaten lassen sich für Formicapterin bestimmte Strukturen wohl ausschliessen, aber keine sicheren vorschlagen. Vom Massenspektrum kann auch kein Molekulargewicht eruiert werden, da Pteridine mit Polyhydroxyketten selten das richtige Signal des Ions M^+ zeigen. Die erhaltenen Ergebnisse erlauben höchstens, ein N-substituiertes Lumazin als hypothetisches Gerüst des Produktes in Betracht zu ziehen. Von drei solchen möglichen Strukturen (IV, V und VI), wo R wahrscheinlich eine polyhydroxylierte Kette wäre, können IV und V eliminiert werden, da IV lichtempfindlich ist [6] und V ein ganz anderes UV.-Spektrum als das Formicapterin besitzen muss. Vielleicht wäre ein Gerüst wie VI denkbar.

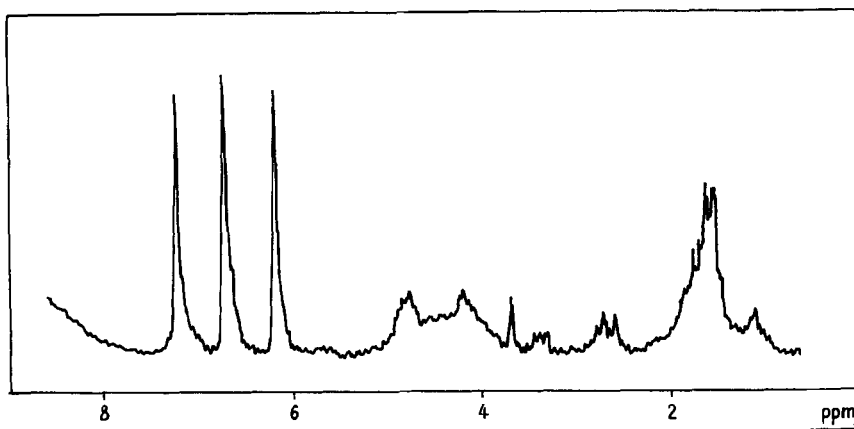


Fig. 1. NMR.-Spektrum des mit NH_4Cl verunreinigten Formicapterins
(Bedingungen siehe exp. Teil)

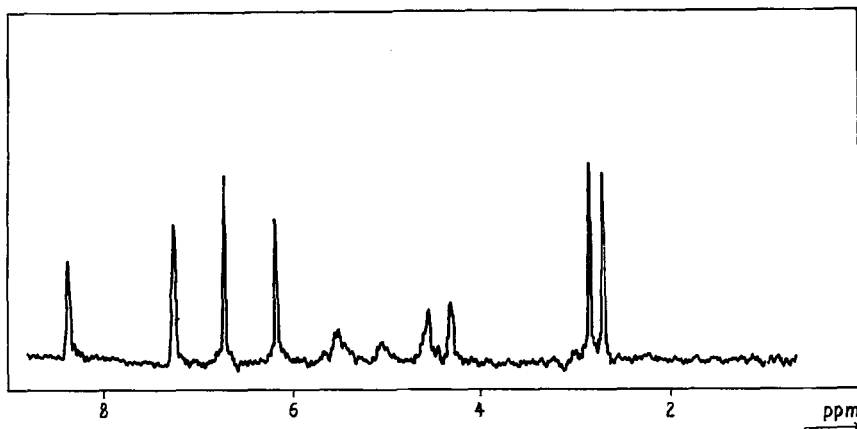


Fig. 2. NMR.-Spektrum von mit NH_4Cl verunreinigtem Riboflavin
(gleiche Bedingungen wie für Fig. 1)

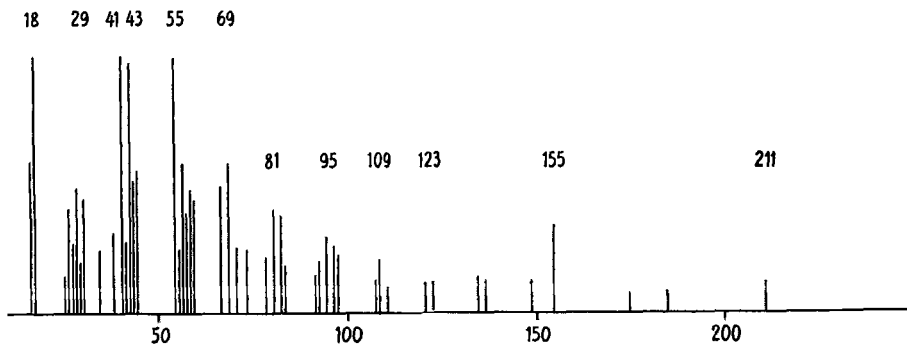


Fig. 3. Massenspektrum des Formicapterins

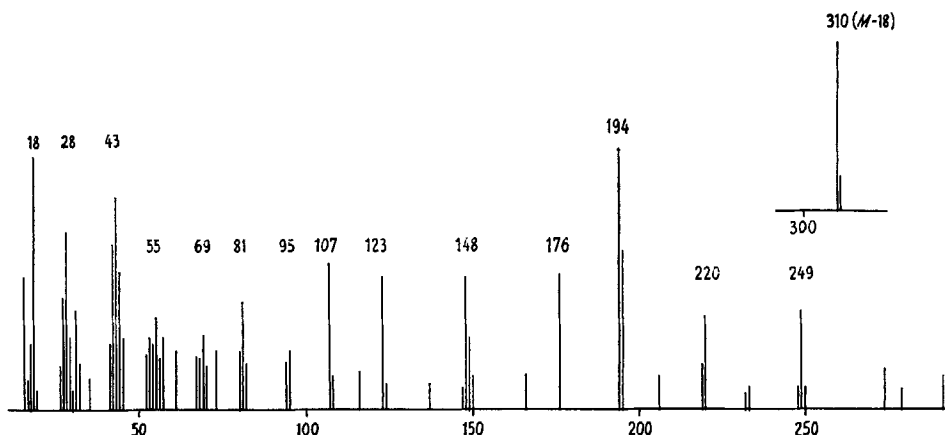


Fig. 4. Massenspektrum des Ribityl-methyl-isoxantholumazins (I)

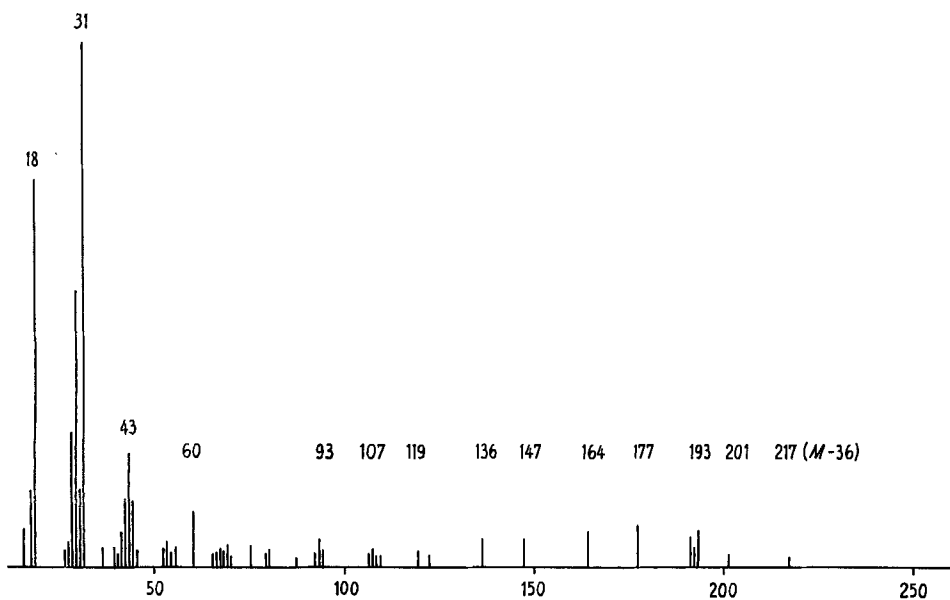
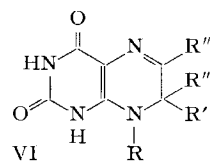
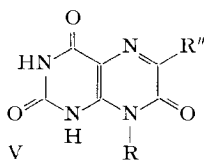
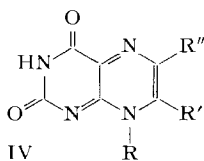


Fig. 5. Massenspektrum des D-Neopterin (III)



Ähnliche Produkte wurden schon synthetisiert [7], sie zeigen jedoch ganz andere Eigenschaften als das Formicapterin. Wir setzen unsere Arbeiten zur Strukturaufklärung des Formicapterins fort.

Wir danken den Herren PD Dr. G. H. SCHMIDT, Universität Würzburg, für die Überlassung der Ameisen, Dr. U. SCHEIDEGGER, VARIAN-Forschungslaboratorium, Zürich, für die Aufnahme der NMR.-Spektren, Prof. Dr. W. VON PHILIPSBORN und PD Dr. M. HESSE von unserem Institut für die Diskussion der NMR.- bzw. Massenspektren. Die Arbeit wurde vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG unterstützt.

Experimenteller Teil

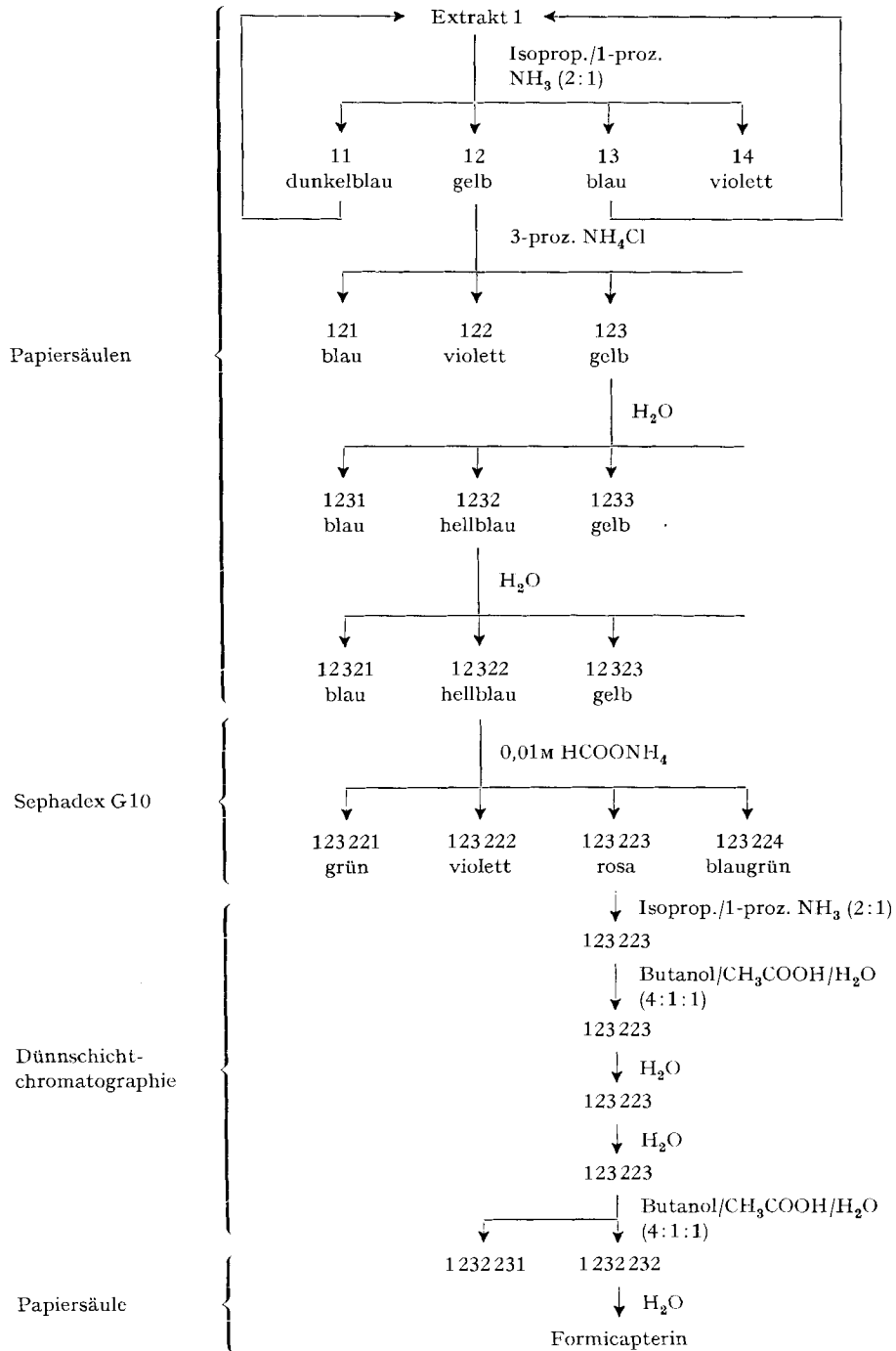
1. *Isolierung von Formicapterin aus Formica-Arbeiterinnen.* – a) *Tiermaterial:* Die verwendeten Ameisen stammen aus Nestern in der Umgebung von Würzburg. Es wurden insgesamt 2 kg Arbeiterinnen der Arten *Formica polyctena* FOERSTER und *F. rufa* LINNE verarbeitet. Für jede Aufarbeitung wurden etwa 500 g Frischgewicht verbraucht.

b) *Gewinnung des Extraktes:* Um die fluoreszierenden Stoffe von den nicht löslichen Körperteilen abzutrennen, wurden die Arbeiterinnen zunächst in einem Homogenisator mit 50-proz. Äthanol zerkleinert, dann wurde das Homogenisat mit etwas Cellulosepulver zu einem Brei verdickt. Die fluoreszierenden Stoffe wurden auf einer Papiersäule (9 × 8 cm) anfangs mit Äthanol/Wasser (1:1), später mit Äthanol/Wasser/konz. NH_3 (10:10:1) eluiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer (Vakuum) wurde der braune Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und diese Lösung über eine Papiersäule (9 × 5 cm) filtriert. Die Säule wurde anschliessend mit 1,5 l Wasser gewaschen. Diese Filtration-Elution dient zur Abtrennung der Fette. Das Filtrat wurde wiederum im Vakuum eingedampft. Der gewonnene Extrakt 1 enthält das Formicapterin, das aus dem Komplex Riboflavin-Formicapterin mit der oben erwähnten NH_3 -Behandlung freigesetzt wurde.

c) *Gewinnung des rohen Formicapterins* (siehe Trennschema): Der Extrakt 1 wurde in wenig Wasser aufgenommen, und zu dieser Lösung gab man Cellulosepulver, bis ein Brei entstand. Der Brei wurde im Rotationsverdampfer eingedampft und der Rückstand pulverisiert. Das Pulver wurde auf eine Papiersäule gebracht und mit Isopropanol/1-proz. NH_3 (2:1) eluiert. Das Endeluat der dunkelblau fluoreszierenden Fraktion 11 und das Anfangseluat der blau fluoreszierenden Fraktion 13 wurden vereinigt, eingengt und auf gleiche Weise wieder chromatographiert. Die gelb fluoreszierenden Fraktionen 12 der beiden Chromatographien wurden aufgefangen, im Vakuum eingedampft, in wenig Wasser aufgenommen, wiederum mit Cellulose verdickt, getrocknet und pulverisiert. Erneute Chromatographie auf Papiersäule (6 × 15 cm) und Elution mit 3-proz. NH_4Cl . Die gelb fluoreszierende Fraktion 123 enthält das Formicapterin. Sie wurde aufgefangen, teilweise eingengt, mit Cellulose vermischt, getrocknet und pulverisiert. Diese Fraktion enthält sehr viel NH_4Cl , und das Problem besteht nun darin, das Formicapterin vom NH_4Cl zu befreien. Dazu wurde das Pulver 123 auf einer Cellulosesäule (6 × 20 cm) mit Wasser chromatographiert, wobei die einzelnen Fraktionen auf Formicapterin dünnschichtchromatographisch kontrolliert wurden. Die das Formicapterin enthaltenden Fraktionen wurden zum Eluat 1232 vereinigt, eingedampft und nochmals mit Wasser auf Cellulosesäule chromatographiert. Das Eluat 12322, befreit vom grössten Teil NH_4Cl , wurde abgedampft. Der Rückstand wurde in wenig 0,01M HCOONH_4 -Lösung gelöst und auf einer Sephadex G10-Säule (1,5 × 20 cm) chromatographiert. Das Formicapterin zeigt nun seine typische rosa-violette Fluoreszenz und kann leicht als Fraktion 123223 aufgefangen werden. Eine Dünnschichtchromatographie zeigt jedoch, dass das Produkt noch nicht rein ist, sondern von Salzen und fluoreszierenden Stoffen begleitet ist.

d) *Reinigung des Formicapterins durch präparative Dünnschichtchromatographie.* Die aus den 2 kg Arbeiterinnen stammenden, vereinigten rosa fluoreszierenden Fraktionen 123223 wurden im Rotationsverdampfer eingedampft und das Formicapterin an Cellulose-Dünnschichtplatten (Cellulosepulver MN 300 MACHREY, NÄGEL & Co., Platten 20 × 20 cm) nacheinander mit Isopropanol/1-proz. NH_4Cl (2:1), Butanol/-Eisessig/Wasser (4:1:1), zweimal mit H_2O und zuletzt mit Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) als Lösungsmittel getrennt. Die zum Schluss erhaltenen rosa fluoreszierenden Zonen wurden an einer kleinen Cellulosesäule (2 × 5 cm) mit Wasser eluiert, die Lösung eingedampft, der Rückstand in wenig 1-proz. NH_3 gelöst, die Lösung durch Glasfilter Nr. 4 filtriert und eingedampft. Für eine letzte Reinigung wurde diese Fraktion 1232232 auf einer sehr sorgfältig gereinigten Papiersäule (1 × 30 cm) mit dest. Wasser chromatographiert. Nach Abdampfen des Wassers erhielt man 2 mg Formicapterin, das noch 40–50% NH_4Cl enthielt. Um grössere Verluste

Trennschema



an Substanz zu vermeiden, wurde auf weitere Reinigung verzichtet. Das so erhaltene Formicapterin ist frei von anderen fluoreszierenden Substanzen und zeigt das typische, schon publizierte UV.-Spektrum [2].

2. *Eigenschaften des angereicherten Formicapterins.* – a) *Elektrophorese:* Die Papierelektrophorese zeigt eindeutig den sauren Charakter des Formicapterins, dessen isoelektrischer Punkt dem des 6-Methyl-isoxantholumazins und des Isoxantholumazins I gleicht (s. Tabelle).

b) *Wirkung des Sonnen- bzw. UV.-Lichtes.* Nach Bestrahlung einiger μg Formicapterin und Isoxantholumazin I auf Filterpapier mit UV.-Licht (365 nm, 4 Std., Abstand der Lichtquelle 50 cm) wurde keine Zersetzung beobachtet.

Wässrige Lösungen beider Substanzen, die 8 Std. dem Sonnenlicht ausgesetzt waren, zeigten ebenfalls keine Veränderung.

c) *Hydrierungen.* Mikrohydrierungen mit H_2/Pd oder NaBH_4 verliefen bei beiden Substanzen immer negativ.

d) *KMnO₄-Oxydation.* In einem Röhrchen (\varnothing 3 mm) versetzte man bei Zimmertemperatur eine 50 μg Formicapterin enthaltende wässrige Lösung mit einem Tropfen KMnO_4 in 0,1N NaOH.

Papierelektrophorese; u-Werte verschiedener Pteridinderivate

$u = s/t \cdot 1/V \cdot \text{cm}^{-1}$, wobei s/t den zurückgelegten Weg in $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ bedeutet

	pH = 2,9 $V \cdot \text{cm}^{-1}: 20$	pH = 4,4 $V \cdot \text{cm}^{-1}: 20$	pH = 9,2 $V \cdot \text{cm}^{-1}: 27$
Formicapterin	+ 0,208	+ 0,26	+ 0,31
Pterin-6,7-dicarbonsäure	+ 0,26	+ 0,36	+ 0,42
Lumazin		0	
Lumazin-6-carbonsäure		+ 0,36	
6-Methyl-isoxantholumazin		+ 0,26	
Isoxantholumazin I		+ 0,25	

Verwendete Lösungsmittel: pH 2,9: 75,3 ml 0,1M Citronensäure + 24,7 ml 0,2M NaH_2PO_4 ; pH 4,4: 50 ml 0,1M Essigsäure + 50 ml 0,1M CH_3COONa ; pH 9,2: 0,01M Borax

Die Lösung verfärbte sich innerhalb weniger Min. braun. Das überschüssige KMnO_4 wurde mit wenig Äthanol reduziert. Das MnO_2 wurde abzentrifugiert, die überstehende Lösung mit CH_3COOH neutralisiert und auf Dünnschichtpapierplatte analysiert. Es konnten weder fluoreszierende noch UV.-absorbierende Substanz nachgewiesen werden.

e) *NaJO₄-Oxydation.* In einem Röhrchen (\varnothing 3mm) versetzte man eine 50 μg Formicapterin enthaltende wässrige Lösung mit einem Tropfen einer gesättigten Lösung von NaJO_4 , worauf die Fluoreszenz der Lösung von rosaviolett nach blau umschlug. Nach 30 Min. zeigte die Papierchromatographie der Mischung mit Isopropanol/1-proz. NH_3 (2:1) als Lösungsmittel ein Hauptprodukt mit $R_f = 0,75$ neben Spuren anderer Produkte (R_f : 0,2, 0,45, 0,63), die alle blau bis blaugrün fluoreszieren (keines dieser Abbauprodukte konnte identifiziert werden). Während der Oxydation änderte sich die Lage der Maxima (260 und 350 nm) nicht (UV.-Spektrophotometrie in einer Quarzküvette).

f) *NMR.-Spektrum:* In Trifluoressigsäurelösung (interner Standard: Tetramethylsilan) mit einem VARIAN-HA-100-Apparat mit Hilfe eines C 1024 time averaging computer gemessen, wobei 100 scans aufgenommen wurden. Im Spektrum erscheinen weder Banden von aromatischen noch von Vinyl-Protonen; auch das sonst breite Signal der 2'-Amino-Protonen zwischen 8 und 9 ppm fehlt. Anscheinend ist Formicapterin demnach kein Pterin, sondern ein Lumazin.

g) *Massenspektrum:* Mit dem HITACHI-PERKIN-ELMER-RMU-6D-Gerät (direkte Injektion, 300°) aufgenommen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 5. Mitteilung: G. H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, *Helv.* 50, 34 (1967).
 [2] G. H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, *Helv.* 45, 1571 (1962).
 [3] G. H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, *Helv.* 47, 2049 (1964).
 [4] G. H. SCHMIDT, *Insectes sociaux* 15, 251 (1968).
 [5] M. GOTO, K. KOBAYASHI, H. SATO & F. KORTE, *Liebigs Ann. Chem.* 689, 221 (1965).
 [6] T. MASUDA, *Chem. pharmaceut. Bull.* 4, 375 (1956); T. MASUDA, T. KISHI, M. ASAI & S. KUWADA, *ibid.* 7, 361 (1959).
 [7] W. PFLEIDERER, J. W. BUNTING, D. D. PERRIN & G. NÜBEL, *Chem. Ber.* 101, 1072 (1968); T. ROWMAN & H. C. S. WOOD, *J. chem. Soc. [C]* 1968, 452.

151. Katalytische Cyclisierung von Acetylen und substituiertem Acetylen zu aromatischen Kohlenwasserstoffen

von G. Dändliker

CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel

(11. VI. 69)

Summary. The pentahalogenides of niobium and tantalum and some tungsten chlorides catalyze the cyclotrimerization of acetylenic hydrocarbons to form aromatic compounds. Acetylene is converted into benzene at atmospheric pressure and temperatures between -20 and 130°C . Under similar conditions methylacetylene and but-1-yne respectively yield a mixture of the corresponding 1,2,4- and 1,3,5-substituted benzenes while with but-2-yne hexamethyl benzene is obtained. Cocyclization between acetylene and substituted acetylenes or diacetylene is possible; in this case mono- and disubstituted benzenes or biphenyl, terphenyl, and polyphenyls are formed.

Die Trimerisierung von Acetylen zu Benzol unter Normaldruck und nichtpyrolytischen Bedingungen gelingt einerseits an einem Kontakt aus Aluminiumsilikat, der mit Diboran aktiviert wurde [1]. Andererseits eignen sich dazu auch gewisse metallorganische Verbindungen vom Typus der sog. ZIEGLER-Katalysatoren [2]. Diese scheinen allerdings auf Kosten der Benzolausbeute eher die Bildung von Hochpolymeren zu fördern. Mit Mono- und vor allem mit disubstituiertem Acetylen sind die Verhältnisse wesentlich günstiger [3].

Mit den Halogeniden von Niob und Tantal haben wir eine Klasse von Katalysatoren gefunden, die sowohl Acetylen wie auch substituierte Acetylene in beachtlicher Ausbeute zu Benzol und den entsprechend substituierten Benzolen cyclotrimerisieren, ohne dabei grössere Anteile an Hochpolymeren zu erzeugen. Auch Wolframhalogenide zeigen gegenüber acetylenisch ungesättigten Kohlenwasserstoffen – wenn auch in bescheidenerem Umfange – eine ähnliche Aktivität [4].

Ergebnisse. – Die Cyclisierungsreaktion von Acetylen an Niob- und Tantalpentahalogeniden unter Bildung von Benzol verläuft unter Normaldruck und bei Temperaturen oberhalb -20° . Die Reaktion erfolgt am besten durch Einleiten des Acetylens in eine Aufschlammung des Katalysators in einem inerten organischen Lösungsmittel, setzt aber auch ein zwischen gasförmigem Acetylen und trockenem Pentahalogenid.

Auch einige Koordinationsverbindungen der Niob- und Tantalpentahalogenide, z. B. sog. Doppelsalze mit Alkalihalogeniden, sowie Wolframhexachlorid und Wolframoxytetrachlorid vermögen Acetylen zu Benzol umzuwandeln.