

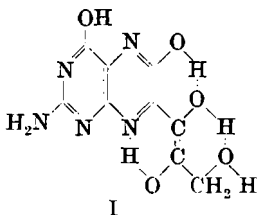
# 68. Rudolf Tschesche und Frédéric Vester: Über Pteridine, VIII. Mitteil.: Erythropterin aus *Mycobacterium lacticola*

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität Hamburg]

(Eingegangen am 6. November 1952)

Erythropterin wurde aus *Mycobacterium lacticola* in sehr kleinen Mengen gewonnen und durch UV-Spektrum,  $R_f$ -Wert, Verteilungskoeffizient, Pterorhodin-Bildung und andere Merkmale als solches gekennzeichnet. Es hat den Anschein, daß das Pteridin an Glucose gebunden vorkommt.

M. O'L. Crowe und A. Walker<sup>1)</sup> berichteten 1949, daß sie aus Tuberkelbazillen vom Typ humanus ein pterinähnliches Pigment isoliert hätten, das sie für Erythropterin (I)<sup>2)</sup> ansahen. Die erhaltenen Befunde waren aber nicht ausreichend, um diese Annahme völlig einwandfrei zu sichern. Als wir durch die Freundlichkeit von Herrn Dr. Damm<sup>3)</sup> in den Besitz von 350 g feuchter Bakterienmasse — 180 g Trockensubstanz von *Mycobacterium lacticola*<sup>4)</sup> kamen, beschlossen wir, den Versuch zu machen, auch in diesem nicht pathogenen Material nach Erythropterin zu fahnden. Dabei bestand von vornherein wenig Aussicht, aus dieser Menge so viel von diesem Pteridin zu gewinnen, daß es in Substanz rein isoliert werden könnte, aber es schien doch möglich, u.U. zu den von Crowe und Walker gefundenen Kriterien einige weitere hinzuzufügen, um so deren Annahme zu stützen, daß Mycobakterien Erythropterin enthalten\*).



Die Aufarbeitung der Bakterien geschah in Anlehnung an die Arbeiten von R. J. Anderson<sup>5)</sup> an Tuberkelbazillen. Nach Entfernung der lipidlöslichen Anteile wurde ein Auszug mit  $n/2$  wäßriger Ammoniak-Lösung hergestellt. Dieser wurde einer Hydrolyse mit  $n/100$  Salzsäure unterworfen, um u.U. vorhandene Eiweiß-Komplexe zu zerlegen. Nach Neutralisation wurde die Lösung eingedampft und der in wasserfreiem Äthanol unlösliche Teil mit verd. Ammoniak-Lösung extrahiert. Die Lösung wurde nach F. Giral<sup>6)</sup> an Pflanzenkohle adsorbiert. Das Adsorbat behandelte man nacheinander mit verschiedenen Elutionsmitteln; die einzelnen Eluate wurden papierchromatographisch untersucht (s. die Tafel). Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf fluoreszierende Verbindungen gerichtet, und zwar zunächst auf Stoffe, deren  $R_f$ -Wert kleiner als 0.7 war. Solche

<sup>1)</sup> Science [New York] 110, 166 [1949].

<sup>2)</sup> R. Tschesche u. F. Korte, Chem. Ber. 85, 139 [1952].

<sup>3)</sup> Wir möchten auch an dieser Stelle der Firma Henkel & Cie. Düsseldorf, insbesondere Hrn. Dr. Damm für die Überlassung dieses Materials vielmals danken.

<sup>4)</sup> Die Bakterien waren auf einem modifizierten Sauton-Nährboden (mit B bezeichnet) in Oberflächenkultur gezüchtet worden; s. H. Bartram, Zbl. Bakteriologie 155, 338 [1950].

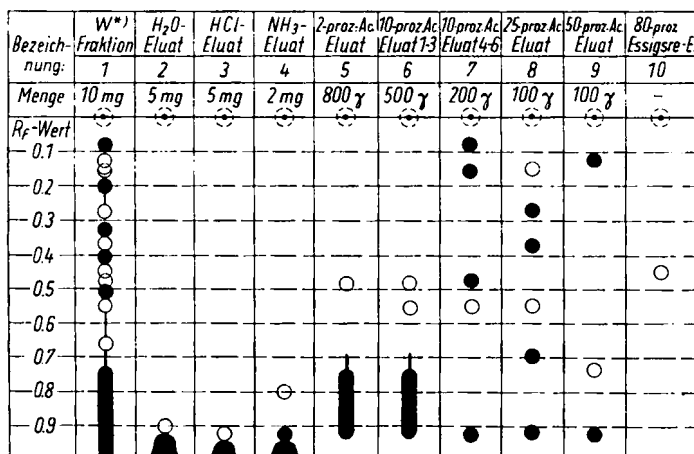
\* Anm. b. d. Korrektur: Erythropterin wurde zuerst aus Pieriden isoliert (C. Schöpf u. E. Becker, Liebigs Ann. Chem. 524, 55 [1936]), die Konstitution wurde von R. Purrmann u. F. Eulitz (Liebigs Ann. Chem. 559, 169 [1948]) ermittelt.

<sup>5)</sup> Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] III, 145 [1939].

<sup>6)</sup> An. Real. Soc. españ. Física Quím. XXXIV, 667 [1936].

Werte wurden besonders bei den 10-, 25- und 50-proz. ammoniakalischen Acetonextrakten gefunden. Die Eluate mit 10- und 25-proz. Aceton wurden vereinigt und an Stärke chromatographiert. Dabei ließen sich 14 unter der Quarzlampe fluoreszierende Zonen unterscheiden. Diejenigen, die im UV-Licht eine Absorption  $> 300 \text{ m}\mu$  aufwiesen, wurden weiter untersucht, da in ihnen vornehmlich Pteridine zu erwarten waren. Es handelte sich dabei vor allem um die Zone 11 des Stärkechromatogramms, aus der später pteridin-ähnliche Verbindungen isoliert werden konnten.

Tafel 1. Papierchromatogramm der Eluate aus der Kohle; dunkle Flecke stark, helle schwächer fluoreszierend



\*) W = ammoniakal.-wäbr. Auszug der Bakterienmasse vor der Kohleadsorption.

Die starke Fluorescenz jedoch der Zone 13 ( $R_F$ -Wert  $> 0.8$ ) brachte uns auf den Gedanken, daß ihr fluoreszierender Bestandteil ein in Glykosid-Form vorliegendes Pteridin sein könnte, denn papierchromatographisch waren in ihr weder fluoreszierende Zucker, noch Aminosäuren nachweisbar. Dadurch würde ihre große Wanderungsgeschwindigkeit verständlich werden. Darin wurden wir weiter bestärkt durch die Feststellung des einen von uns, daß Xanthopterin und 6-Oxy-2-amino-pteridinaldehyd-(8) nur in glykosidischer Form bei *Strept. faecalis* R als Wachstumsfaktor wirken<sup>7)</sup>. Diese Fraktion wurde daher einer Nachhydrolyse durch Erhitzen mit  $n/5$  Salzsäure unterworfen (20 Stdn.). Danach ließ sich im Hydrolysat Glucose, die vorher nicht festzustellen war, papierchromatographisch nachweisen. Beim Abstumpfen der sauren Lösung auf  $p_H$  3.5 fiel ein braunroter Niederschlag aus, der bei der Papierchromatographie 2 fluoreszierende Flecke mit den  $R_F$ -Werten 0.27 und 0.33 lieferte. Nachdem sich herausgestellt hatte, daß eine Trennung der beiden fluoreszierenden Stoffe an Cellulosepulver nicht möglich war, wurde eine Gegenstromverteilung mit  $n$ -Butanol —  $n/10$  Salzsäure über 13 Stufen vorgenommen<sup>8)</sup>. Dabei sammelte sich die Substanz mit dem  $R_F$ -Wert 0.33 (fernerhin mit F bezeichnet) in den Gefäßen 8—10 an, die mit dem  $R_F$ -Wert 0.27 erschien vornehmlich in den Gläsern 2 und 3. Auf Grund des UV-Spektrums gehört die letztgenannte Verbindung sicher nicht zu den Pteridinen.

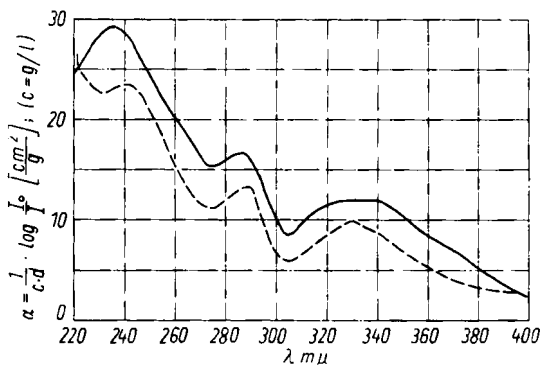
Da Erythropterin unter den gewählten Bedingungen (3-proz. Ammoniumchlorid-Lösung zum Entwickeln) bei der Papierchromatographie den  $R_F$ -Wert 0.33 zeigt<sup>9)</sup> und in Soda-Lösung ebenfalls graublau fluoresciert, schien eine

<sup>7)</sup> R. Tschesche, F. Korte u. I. Korte, Z. Naturforsch. 6b, 304 [1951].

<sup>8)</sup> H. M. Rauen u. M. Waldmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 286, 180 [1950].

<sup>9)</sup> R. Tschesche u. F. Korte, Chem. Ber. 84, 641 [1951].

Identität unserer Substanz F mit diesem Pteridin möglich. Für diese Annahme sprachen bei den erhaltenen 1.8 mg folgende weitere Kriterien: Das UV-Spektrum (s.d.) stimmte im Verlauf der Kurve mit der von synthet. Erythropterin sehr weitgehend überein<sup>10)</sup>, nur liegt der gesamte Verlauf etwas tiefer, vermutlich weil die Substanz F noch nichtabsorbierende Verunreinigungen (Zucker, Salze ?) enthält. Der Verteilungskoeffizient von F und von Erythropterin in  $n_{10}$  Salzsäure –  $n$ -Butanol wurde in beiden Fällen zu etwa 2.3 bestimmt. Die Färbung der Lösung von F in Säure und verd. Alkalilauge entspricht der von analogen Lösungen von Erythropterin. Da dieses mit Xantho-pterin in saurer Lösung erhitzt Pterorhodin ergibt<sup>2)</sup>, haben wir diesen Versuch auch mit der Substanz F durchgeführt. Nach kurzer Zeit bildete sich ein rotvioletter Niederschlag, der bei der papierchromatographischen Untersuchung einen Fleck mit dem  $R_F$ -Wert des Pterorhodins (0.25) zeigte. Schließlich haben wir, da Erythropterin eine Endiol-Gruppierung aufweist, einen Versuch mit dem Titantrichlorid-Reagens nach Weygand<sup>11)</sup> gemacht. Während auf dem Papier Färbungen nicht festzustellen waren, ergab eine direkte Titration der Lösungen von authentischem Erythropterin und der Substanz F in Methanol-Pyridin-Wasser (65 : 20 : 15) mit Titantrichlorid in beiden Fällen nach 2 Min. einen gelben Niederschlag, während dieser in den Ansätzen ohne Pteridin bläulich bis farblos ausfiel. Obwohl das Material für weitere Identifizierungsversuche nicht mehr ausreichte, möchten wir doch glauben, daß die Substanz F im wesentlichen aus Erythropterin besteht<sup>12)</sup>.



Abbild. UV-Spektren von reinem Erythropterin ——— und von Substanz F - - - - .  
Lösungsmittel  $n_{10}$  NaOH,  $d = 1$  cm

Außer F konnten weitere 5, u.U. auch als Pteridine anzusehende Stoffe ermittelt werden, die verschiedene  $R_F$ -Werte zeigten, fluorescierten und im UV Absorptionen jenseits von 300  $m\mu$  aufwiesen. Obwohl 3 von ihnen kristallisiert werden konnten, war eine Identifizierung wegen der kleinen erhaltenen Mengen vorerst nicht möglich.

Substanz A: Dieser Stoff von gelblich-weißer Farbe wurde aus der Zone II des Stärkechromatogramms in der Weise erhalten, daß er erneut an Cellulosepulver chromatographiert wurde. Der oberste fluoreszierende Ring wurde eluiert und das Eluat

<sup>10)</sup> R. Tschesche u. F. Korte, Chem. Ber. 84, 77 [1951].

<sup>11)</sup> F. Weygand u. E. Csendes, Chem. Ber. 85, 45 [1952].

<sup>12)</sup> In Butanol-Wasser wurde für Substanz F und synthet. Erythropterin der  $R_F$ -Wert 0.085 gefunden.

gegen  $n_{50}$  Salzsäure—*n*-Butanol über 20 Stufen verteilt. In den Gefäßen 5–7 fand sich eine himmelblau fluoreszierende Substanz (1.24 mg) mit dem  $R_F$ -Wert 0.60, die sich kristallisiert erhalten ließ. Beim Erhitzen mit 9-Methyl-xanthopterin in saurer Lösung lieferte sie Pterorhodin ( $R_F$ -Wert 0.25). Das UV-Spektrum der Kristalle zeigte Maxima bei 272, 320 und 395  $m\mu$ .

Substanz B: Ebenfalls von gelblich-weißer Farbe fand dieser Stoff sich vorwiegend in den Gefäßen 9–11 der Gegenstromverteilung vor, während A aus 5–7 erhalten worden war. Er zeigte im UV Maxima der Absorption bei 269 und 322  $m\mu$ , fluorescierte blau und konnte bisher nicht kristallisiert erhalten werden. Ausb. 2.87 mg,  $R_F$ -Wert 0.47 mit 3-proz. Ammoniumchlorid-Lösung, 0.33 in Butanol.

Substanz C: Dieser mehr dunkelgelb gefärbte Stoff entstammte der 3. Zone von oben des Cellulosepulver-Chromatogramms der Zone 11 der Stärkesäule. Bei der Gegenstromverteilung in  $n_{20}$  Salzsäure—*n*-Butanol über 20 Stufen sammelte er sich in den Gefäßen 5–9 an. Der  $R_F$ -Wert wurde zu 0.07 bestimmt. Die Substanz fluorescierte grün und kristallisierte bisher nicht. Im UV-Spektrum zeigten sich Maxima der Absorption bei 236, 280 und 415  $m\mu$ .

Substanz D: Sie findet sich in der gleichen Fraktion wie C vor, nur läßt sie sich im Gegensatz zu C kristallisieren. Sie fluoresciert blau und zeigt den  $R_F$ -Wert 0.12. Im UV-Spektrum zeigen sich Maxima bei 240, 285 und 345  $m\mu$ . Das Gemisch der Verbindungen C und D ergab beim Erhitzen mit Xanthopterin in saurer Lösung Pterorhodin ( $R_F$ -Wert 0.25); Menge von C und D zusammen 4.16 mg.

Substanz E: Dieser Stoff stammte aus dem 50-proz. Aceton-Eluat von der Kohle. Bei einer Gegenstromverteilung in  $n_{10}$  Salzsäure—*n*-Butanol sammelte er sich nach der Fluoreszenz in den Gefäßen 8–12 an. Von der gelblich-weißen Substanz wurden 2 mg gcfäßt; Fluoreszenz hellblau. Bei der Papierchromatographie mit 3-proz. Ammoniumchlorid-Lösung fand sich ein  $R_F$ -Wert von 0.18, während die Substanz in Butanol nicht wanderte. Die Verbindung konnte kristallisiert erhalten werden und zeigte Maxima der Absorption im UV-Licht bei 255, 278 und 325  $m\mu$ . Wie bei Substanz B konnte mit ihr keine Pterorhodin-Bildung erzielt werden.

Die Auffindung einer Reihe von Kristallisaten aus *Mycobacterium lacticola*, von denen außer F sehr wahrscheinlich auch die Verbindungen A, C(?) und D Pteridine sind, läßt eine erneute Untersuchung dieses oder eines ähnlichen Materials wünschenswert erscheinen. Nachdem jetzt das Isolierungsverfahren in den Grundzügen feststeht, sollte es möglich sein, nach Beschaffung wesentlich größerer Mengen Bakterien, die chemische Natur auch dieser bisher nicht identifizierten Kristallisate zu ermitteln.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

### Beschreibung der Versuche

181 g Trockensubstanz von *Mycobacterium lacticola* wurden erschöpfend mit Äther, dann mit Aceton und schließlich mit Chloroform im Soxhlet-Apparat extrahiert. Der zurückbleibende Teil wurde 20mal mit je 500 ccm  $n_{12}$   $NH_3$  unter Schütteln bei Zimmertemperatur je 20 Min. ausgezogen. Die vereinigten Ammoniak-Extrakte wurden i. Vak. zur Trockne gedampft, nachdem vorher noch einmal mit Äther und mit Chloroform extrahiert worden war. Der Rückstand wog 21.9 g. Er wurde mit 1000 ccm Äthanol + Wasser (1:1) extrahiert, danach blieben 14.1 g ungelöst zurück.

Diese Menge wurde mit 200 ccm  $n_{100}$  HCl 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde die Lösung annähernd neutralisiert und i. Vak. wieder zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 250 ccm Äthanol aufgeschwemmt und das Gemisch 1 Stde. zum Sieden erhitzt. Der unlöslich gebliebene Teil wurde mit 600 ccm  $n_{12}$   $NH_3$  in der Kälte ausgezogen und unter Druck durch eine Berkefeld-Kerze filtriert. In Lösung

befanden sich nunmehr noch 11.8 g. Sie wurden an 48 g Pflanzenkohle Norit aus 1200 ccm Wasser durch 10 Min. Schütteln adsorbiert; die Mischung blieb noch weitere 20 Min. stehen. Eluiert wurde nunmehr durch Verrühren des Kohleadsorbats:

a) 9mal mit je 500 ccm Wasser; es wurden 2.738 g blaßblau fluoreszierendes Material eluiert.

b) 14mal mit je 500 ccm  $n_{100}$  HCl; Trockenrückstand der Eluate zusammen 2.406 g.

c) 4mal mit je 500 ccm  $n_3$   $\text{NH}_3$ ; Eluat 506 mg.

d) 7mal mit je 300 ccm einer 2% Aceton enthaltenden  $n_3$  wäßr.  $\text{NH}_3$ -Lösung; Rückstand der Eluate 547 mg, etwas stärker fluoreszierend.

e) 6mal mit je 300 ccm Aceton—Wasser— $n_3\text{NH}_3$  (1:7:2). Dabei wurde zwischen je 2 Elutionen 2mal eine Wasserelution mit je 150 ccm eingeschaltet; 895 mg.

f) 7mal mit je 200 ccm Aceton—Wasser— $n_3\text{NH}_3$  (1:2:1); 2366 mg.

g) 11mal mit je 400 ccm Aceton—Wasser—Ammoniak (2:1:1); 812 mg. Diese Fraktion fluorescierte stark blaugrün.

h) 13mal mit je 200 ccm 80-proz. Essigsäure. Es wurde eine rotbraune Schmiere erhalten, etwa von der gleichen Menge wie nach g.

### Chromatographie an Stärke

2.5 g Substanz, gewonnen aus den Eluaten 4—6 der 10-proz., zusammen mit allen Eluaten der 25-proz. Aceton—Wasser—Ammoniak-Elution (e und f), wurden an einer Stärke-Säule von 3.5 cm Durchmesser und 90 cm Länge aus 45 ccm  $n_2\text{NH}_3$  chromatographiert. Die Stärke war 30 Stdn. gequollen und dann mit Wasser eingeschlämmt worden. Entwickelt wurde mit Wasser. Es wurden 14 unter der UV-Lampe fluoreszierende Zonen erhalten. Während die drei letzten Zonen mit Wasser durchlaufend eluiert wurden, kamen die Zonen 1—11 erst nach Zerschneiden der Säule zur Elution.

### Chromatographie an Cellulosepulver

Benutzt wurde Whatmans „Ashless Cellulose-Powder“, und zwar die 120fache Menge der zu adsorbierenden Substanz. Das Pulver wurde trocken in eine Säule gefüllt (Durchmesser/Länge 1:30). Das Aufbringen der Substanz erfolgte in der Weise, daß sie in möglichst wenig  $n_2\text{NH}_3$  gelöst und die Lösung mit  $1/20$  der Gesamt-Cellulosemenge vermischt wurde. Die Masse wurde getrocknet, zerrieben und oben auf die Säule gebracht. Entwickelt wurde das Chromatogramm mit Wasser, wobei die Ausbildung der Zonen unter der UV-Lampe kontrolliert wurde. Die Elution mit Wasser wurde so lange fortgesetzt, bis die unterste Zone ausgetreten war. Dann wurde die Säule in die einzelnen Zonen zerlegt und jede für sich eluiert.

### Gegenstromverteilung

Diese wurde in allen Fällen zwischen *n*-Butanol und wäßr. Salzsäure wechselnder Stärke vorgenommen. Mengen von 1.2—3 ccm pro Phase erwiesen sich als am vorteilhaftesten. Als Gefäße dienten rechtwinklig zu einer Capillare ausgezogene Reagensgläser. Beim Schütteln zeigten die Capillaren nach oben und die Öffnung des Reagensglases wurde mit dem Daumen unter Zwischenschaltung eines Blättchens Stanniol verschlossen. Zur Überführung zeigte die Capillare schräg nach unten in das nächste Gefäß, wobei die Auslaufgeschwindigkeit durch geringes Lüften des Daumens reguliert werden konnte. Es war so möglich, die Phasen genau zu trennen und den Ausfluß durch rechtzeitiges Heben der Capillare zu stoppen. Zum Absetzenlassen wurden die Reagensgläser in eine Haltevorrichtung eng nebeneinandergestellt, wobei unter der UV-Lampe leicht die Fluoreszenzmaxima in den Gläsern erkannt werden konnten.

### Kristallisation

Sämtliche bei der Papierchromatographie einheitlich erscheinenden Stoffe wurden in heißem Wasser gelöst, die Lösung durch eine G4-Glasfritte filtriert und abkühlen gelassen. Auf diese Weise wurden die Substanzen A, D und E in deutlichen Kristallen erhalten; sie zersetzten sich oberhalb 300°, ohne zu schmelzen.

## Zur Pterorhodin-Bildung

Jeder der Stoffe A—F wurde in 1 ccm  $n_{100}$  HCl gelöst und dieselbe Menge etwa gleichstark fluoreszierender Xanthopterin- und in einem zweiten Gefäß 9-Methyl-xanthopterin-Lösung in  $n_{100}$  HCl hinzugegeben; die Gemische wurden beide jeweils 10 Min. zum Sieden erhitzt. Bei den Pterorhodin gebenden Stoffen ließ sich spätestens nach 45 Min. ein dunkler Niederschlag erkennen, der beim Absaugen mit einer Glasfritte G4 als leuchtend rotvioletter Belag zurückblieb. Die Papierchromatographie erfolgte in der früher beschriebenen Weise<sup>9)</sup> ( $R_F$ -Wert des Pterorhodins 0.25).

---