

### Zusammenfassung.

Durch Oxydation von 4-Methyl-o-benzochinon mit Phtalpersäure wurde das cis-cis- $\beta$ -Methyl-muconsäure-anhydrid und aus diesem die cis-cis- $\beta$ -Methyl-muconsäure hergestellt. Diese Verbindungen besitzen im Zusammenhang mit Erörterungen über die Existenzfähigkeit cis-trans-isomerer Formen in der Carotinoidreihe einiges Interesse.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

---

### 167. Über ein Vorkommen von Purinen und eines Pterins in einer Ascidienart (*Microcosmus polymorphus*)

von P. Karrer, C. Manunta und R. Schwyzer<sup>1)</sup>.

(9. VI. 48.)

Die inneren Organe (inklusive Muskelmasse) einer Ascidienart, *Microcosmus polymorphus*, enthalten eine Substanz, die ihnen eine hellgelbe Farbe verleiht und sich durch kochendes Wasser extrahieren lässt. Beim Abkühlen der heissen Lösungen fällt sie in mikrokristallinem Zustand aus und kann dann abgenutscht werden. Diesen Stoff haben wir aus ca. 2000 Exemplaren extrahiert und einer chemischen Untersuchung unterzogen. Von dem getrockneten Rohprodukt standen 4,0 g zur Verfügung.

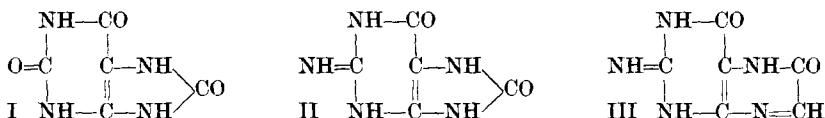
Dieses Rohprodukt ist ein Gemisch. Versuche zu dessen Zerlegung führten zur Isolierung von drei Verbindungen, zwei Purinen und einem Pterin, neben denen wir keine anderen Stoffe nachweisen konnten. Beim Ausziehen des Rohproduktes mit warmem, verdünntem Ammoniak ging ein beträchtlicher Teil des Substanzgemisches in Lösung, und diese färbte sich dabei gelb. Während die wässrige Lösung des ursprünglichen Rohproduktes im Ultraviolett starke Fluoreszenz besass, fehlte diese bei dem mit Ammoniak behandelten, nicht in Lösung gegangenen Rückstand. Der Rückstand war in verdünnter Natronlauge leicht löslich und konnte daraus durch Ansäuern mit Salzsäure wieder ausgefällt werden. So gereinigt stellte die Substanz ein farbloses, mikrokristallines Pulver dar, das sich erst oberhalb 380° zersetzte, ammoniakalische Silbernitratlösung reduzierte, die *Folin-Denis*-Probe auf Harnsäure und die Murexidreaktion zeigte. In ihren Eigenschaften und der Analyse entsprach sie dem 2-Amino-6,8-dioxy-purin (II), das vor längerer Zeit von *E. Fischer*<sup>2)</sup> dargestellt worden war. Dass

<sup>1)</sup> Die Extraktion des Rohmaterials aus den Ascidiens wurde von Fr. Prof. *Manunta* in Sassari ausgeführt, die chemische Bearbeitung von Dr. *R. Schwyzer* in Zürich. *P. Karrer*.

<sup>2)</sup> B. 59, 2067 (1926).

es sich um diese Verbindung handelt, wurde weiterhin durch ihre Desaminierung zu Harnsäure sowie durch eine Guanidinbestimmung nach der Oxydation mit Chlor<sup>1)</sup> sichergestellt.

2-Amino-6,8-dioxy-purin ist in der Natur bisher nicht beobachtet worden. Als Zwischenglied zwischen den Pterinen, denen es wegen seiner Aminogruppe in 2-Stellung nahesteht, und der Harnsäure, beansprucht es einiges Interesse. Tatsächlich erwiesen sich die beiden Substanzen, von denen 2-Amino-6,8-dioxy-purin in den Ascidien begleitet wird, als Harnsäure (I) und als Xanthopterin (III).



Harnsäure fanden wir in grosser Menge in den ammoniakalischen Auszügen des Rohproduktes. Durch Behandeln mit Salzsäure konnten wir das begleitende gelbe Pigment lösen und abtrennen. Diese Löslichkeit des gelben Farbstoffs in verdünnter Säure und seine starke, blaue Fluoreszenz führten zur Vermutung, dass es sich dabei um Xanthopterin handelt. Das Absorptionsspektrum zeigte, wenn auch zunächst nur sehr schwach, die beiden Banden des Xanthopterins<sup>2)</sup>. Durch fraktioniertes Ausziehen mit Ammoniak und Salzsäure gelang uns die Anreicherung des Xanthopterins, welche wir spektroskopisch, unter Benutzung der Absorptionsbande 375 m $\mu$  verfolgten. Mit der kleinen zur Verfügung stehenden Pterinmenge konnten wir die Reinigung allerdings nicht so weit fortführen, dass die Darstellung des Xanthopterin- $\beta$ -bariumsalzes gelang, was erst bei ungefähr 60 %igen Präparaten möglich ist<sup>3)</sup>. Hingegen gelang es uns, das gelbe Pigment nach der mikrochemischen Methode von E. Becker und C. Schöpf<sup>4)</sup> einwandfrei mit Xanthopterin zu identifizieren. Das Präparat zeigte das gleiche chromatographische Verhalten und die gleichen Fluoreszenzeigenschaften (wobei die Rotfluoreszenz in schwefelsaurer Lösung besonders charakteristisch ist), wie sie für Xanthopterin beschrieben sind.

Das Absorptionsspektrum unserer an Xanthopterin angereicherten Substanz hatte die für die Pterine typische Form und besass zwei Banden bei 281 und 372 m $\mu$ . Die Angaben in der Literatur über das Spektrum des Xanthopterins sind nicht übereinstimmend. So werden z. B. in der zusammenfassenden Arbeit von W. Jacobson und D. M. Simpson<sup>5)</sup> Maxima bei 255 m $\mu$  ( $\epsilon$  = ca. 13 000) und bei 375 m $\mu$  ( $\epsilon$  = ca. 5000) angegeben; C. Schöpf und E. Becker (loc. cit.) finden eine Bande

<sup>1)</sup> E. L. R. Stokstad et al., Am. Soc. **70**, 8 (1948).

<sup>2)</sup> C. Schöpf, E. Becker, A. **507**, 266 (1933).

<sup>3)</sup> W. Koschara, Z. physiol. Ch. **277**, 159 (1943).

<sup>4)</sup> A. **524**, 124 (1936).

<sup>5)</sup> Biochem. J. **40**, 3 (1946).

bei  $280 \text{ m}\mu (\epsilon = 10^1)$  und eine solche mit zwei Maxima bei  $270$  und  $290 \text{ m}\mu (\epsilon = 2,5 \cdot 10^2)$ , während *M. Polonorski* und *E. Fournier*<sup>1)</sup> nur die zweite Bande erwähnen, deren Maximum sie bei  $376 \text{ m}\mu$  finden. Spektroskopisch ergibt sich für unser angereichertes Xanthopterin-Präparat ( $\epsilon = 10900$  und  $2500$ ) ein Xanthopteringehalt von  $10\%$ , wenn man die langwelligere Bande, die voraussichtlich von Begleit-substanzen weniger beeinflusst wird, als Grundlage der Berechnung anwendet. Dieser Wert stimmt gut mit demjenigen überein, den wir nach der erwähnten chromatographischen Mikromethode erhielten ( $10\%$ ).

In der Rohsubstanz aus Ascidien, die wir verarbeitet haben, entfallen auf je  $150 \text{ mg}$  Harnsäure ca.  $100 \text{ mg}$  2-Amino-6,8-dioxy-purin und  $2 \text{ mg}$  Xanthopterin. In den lebenden Ascidien mag das Verhältnis der drei Stoffe ein anderes sein, da durch die Verarbeitung Verluste an den leichter löslichen Verbindungen, insbesondere Xanthopterin, eingetreten sein werden. Es ist anzunehmen, dass die drei Substanzen beim Stickstoff-Stoffwechsel im Tier eine Rolle spielen.

## Experimenteller Teil.

### Extraktion der Ascidien.

Die ganze Muskelmasse und die inneren Organe von ca.  $2000$  Exemplaren von *Microcosmus polymorphus Heller* wurden wiederholt mit Aceton extrahiert, wobei man unter anderem Carotinoide (Astaxanthin) entfernte. Hierauf haben wir den noch gelb gefärbten Organbrei mehrmals mit Wasser ausgekocht und die Extrakte heiß filtriert. Beim Abkühlen derselben schied sich ein gelb ausschender Niederschlag ab, den man abnutsche und mehrmals aus heißem Wasser umlöste. Er ist eine Mischung von Purinen und Pterinen, der in folgender Weise weiterverarbeitet wurde.

### Krystallisation der Rohsubstanz, Abbau zu Guanidin.

200 mg der Rohsubstanz behandelten wir mit  $120 \text{ cm}^3$  heißem Wasser, die  $2,5 \text{ cm}^3$  konzentriertes Ammoniak enthielten. Wenige braune Flocken wurden abfiltriert (der grösste Teil der Iminoharnsäure war wegen des grossen Volumens der Lösung gelöst worden). Die gelbe Lösung säuersten wir mit Salzsäure stark an, behandelten sie zur Entfernung einiger farbloser Flocken mit sehr wenig Kohle, filtrierten und neutralisierten sie mit Ammoniak bis  $pH = 5$ . Es stellte sich heraus, dass durch die Kohle viel Substanz adsorbiert worden war, die sich durch Auskochen nur schwer wieder eluieren liess. Aus der Lösung krystallisierten  $70 \text{ mg}$  gelber, schiffchenförmiger Krystalle. Zur Analyse trockneten wir sie während zwei Stunden im Hochvakuum bei  $100^\circ$ .

Gef. C 36,96 H 3,11 N 36,14%.

Den Abbau zu Guanidin und den Nachweis von Guanidin führten wir nach der Vorschrift von *E. L. R. Stokstad* (loc. cit.) aus. Qualitativ wurde das Vorhandensein von Guanidin bestätigt, auf eine quantitative Bestimmung verzichteten wir wegen der Uneinheitlichkeit des Ausgangsmaterials.

### Isolierung von 2-Amino-6,8-dioxy-purin.

500 mg Rohsubstanz behandelten wir mit  $50 \text{ cm}^3$  sehr verdünntem Ammoniak in der Wärme, filtrierten den braunen Rückstand ab und wuschen ihn mit verdünntem Am-

<sup>1)</sup> C. r. Soc. biol. **138**, 357 (1944).

<sup>2)</sup> Biochem. J. **40**, 3 (1946).

moniak und mit Wasser aus. Die Lösung des Rückstandes in 10 cm<sup>3</sup> verdünnter Natronlauge entfärbten wir mit Tierkohle und tropften sie in 10 cm<sup>3</sup> siedende, etwa 4-n. Salzsäure ein, wobei sich sofort ein farbloses Krystallpulver abzuscheiden begann. Dieses reinigten wir noch zweimal nach der gleichen Methode. Die nunmehr analysenreine Substanz trockneten wir zwei Stunden im Hochvakuum bei 100°.

C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> N <sub>5</sub>	Ber. C 35,93	H 3,03	N 41,91%
(167,1)	Gef. „, 35,51	„, 3,16	„, 41,82%

#### Abbau des 2-Amino-6,8-dioxy-purins zu Guanidin.

2,0 mg des analysenreinen Produktes brachten wir in 5 cm<sup>3</sup> schwachem Chlorwasser bei 30° in Lösung, verdampften hierauf die Lösung im Vakuum bei tiefer Temperatur, versetzten den Rückstand mit etwas Wasser und verdampften dieses zur vollständigen Entfernung des Chlors nochmals. Nun verseiften wir das entstandene Glykol mit 4 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Salzsäure während zwei Stunden bei 130°. Die Blaufärbung, die auf Zusatz von 0,5 cm<sup>3</sup> Nitroprussidreagens<sup>1)</sup> entstand, entsprach ungefähr derjenigen, die 0,9 mg Guanidin-carbonat unter den gleichen Bedingungen lieferten, was einer Ausbeute von ungefähr 0,8 Mol. Guanidin entspricht.

#### Desaminierung von 2-Amino-6,8-dioxy-purin zu Harnsäure.

Wir lösten 50 mg 2-Amino-6,8-dioxy-purin aus Ascidien in 1 cm<sup>3</sup> konzentrierter Schwefelsäure und fügten eine Lösung von 100 mg Natriumnitrit in 1 cm<sup>3</sup> konzentrierter Schwefelsäure hinzu. Nach 10 Minuten gossen wir die Lösung auf Eis und sammelten nach dem Schmelzen des Eises den entstandenen Niederschlag. Beim Eingießen seiner heissen alkalischen Lösung in heisse Salzsäure krystallisierte nach dem Abkühlen das Desaminierungsprodukt gleich wie Harnsäure unter denselben Bedingungen, nämlich in grossen Rosetten langer Platten. Ultraviolettspektrum<sup>2)</sup>: Minimum bei 255 mμ, Maximum bei 294 mμ (E<sub>1 cm</sub><sup>1%</sup> = 700); synthetische Harnsäure (nicht speziell gereinigt): Minimum bei 255 mμ, Maximum bei 294 mμ (E<sub>1 cm</sub><sup>1%</sup> = 600). In der Form gleichen sich die beiden Kurven in jeder Hinsicht.

C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (168)	Ber. N 33,34%	Gef. N 33,14%
---	---------------	---------------

Die Verbindung zeigte sich auch in den übrigen Eigenschaften mit Harnsäure vollkommen identisch.

#### Isolierung von Harnsäure.

Die warmen, ammoniakalischen Auszüge der Rohsubstanz aus Ascidien, die zu Beginn der Beschreibung der Isolierung von 2-Amino-6,8-dioxy-purin erwähnt sind, behandeln wir mit Tierkohle, filtrierten sie und säuersten sie mit Salzsäure bis p<sub>H</sub> = 2 an. Über Nacht schied sich Harnsäure in grossen Rosetten langer Platten fast farblos ab, während Xanthopterin in der gelben Lösung verblieb. Nach dreimaligem Umkrystallisieren aus saurer Lösung war die Harnsäure analysenrein und stimmte auch in ihrem Spektrum<sup>2)</sup> mit dem erwähnten synthetischen Präparat überein.

Minimum 255 mμ, Maximum 294 mμ (E<sub>1 cm</sub><sup>1%</sup> = 720).

C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	Ber. C 35,71	H 2,38	N 33,34%
(168)	Gef. „, 35,75	„, 2,58	„, 33,09%

#### Anreicherung von Xanthopterin.

Die salzauren Mutterlaugen, die wir bei der ersten Krystallisation der Harnsäure erhielten, neutralisierten wir und sammelten nach 24 Stunden den entstandenen gelben Niederschlag. Die überstehende Lösung war nun vollkommen farblos und enthielt kein

<sup>1)</sup> J. E. Andes, V. C. Myers, J. Biol. Chem. 118, 137 (1937).

<sup>2)</sup> In 0,1-n. NaOH.

gelbes Pigment mehr. Den amorphen Niederschlag extrahierten wir mit 5 cm<sup>3</sup> Wasser, dem zwei Tropfen konzentrierte Ammoniaklösung beigegeben worden waren, während 3 Minuten in der Kälte. Mit dem Rückstand verfuhren wir noch zweimal in der gleichen Weise. Eine qualitative spektroskopische Untersuchung ergab für den ersten Extrakt eine Absorptionsbande mit Maximum bei 370 m $\mu$  und ziemlich starker Abnahme der lg I<sub>0</sub>/I-Werte gegen kürzere und längere Wellen. Die beiden andern Extrakte wiesen in diesem Gebiete nur eine sehr schwache Absorption auf.

Den ersten Extrakt neutralisierten wir genau und extrahierten den Niederschlag mit 20 cm<sup>3</sup> 0,5-n. Salzsäure, wobei der grösste Teil der gelben Substanz in Lösung ging. Nachdem wir den schwach erwärmt Extrakt auf p<sub>H</sub> = 6 eingestellt hatten, schieden sich gelbe, mikrokristalline Nadelbüschel aus der erkalteten Lösung ab. Nach vierständigem Trocknen im Hochvakuum bei 100° wurde analysiert. Ausbeute 20 mg.

C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> N <sub>5</sub>	Ber. C 40,23	H 2,79	N 39,11%
(179)	Gef. „ 40,34	„ 3,66	„ 34,91%
	Gef. „ 38,68	„ 3,49	„ 36,84%

#### Mikrochemische Bestimmung von Xanthopterin im angereicherten Produkt.

1. Fluoreszenz: neutral: weisslich-blau  
 schwach sodaalk.. blaugrün  
 schwach essigsauer: gelbgrün  
 in 20% Schwefelsäure: schwach rot

2. Absorptionsspektrum:

Gefundene Max.	C. Schöpf	M. Polonovski	W. Jacobson
281 m $\mu$ $\epsilon = 10900$	280 m $\mu$ $\epsilon = 10^5$	—	255 m $\mu$ $\epsilon = \text{ca. } 13000$
272 m $\mu$ $\epsilon = 2500$	270 m $\mu$ } $\epsilon = 2,5 \cdot 10^4$	275 m $\mu$	375 m $\mu$ $\epsilon = \text{ca. } 5000$

3. Gehaltsbestimmung:

20  $\gamma$  lösten wir in 5 cm<sup>3</sup> 0,01-proz. methanolischer Salzsäure und chromatographierten sie an eine 1 mm dicke und 2 cm lange Säule von frisch gebrühtem Aluminiumoxyd. Wir beobachteten das Entstehen eines 1 mm dicken, schwach gelben Ringes, der unter der Analysenlampe intensiv gelb fluoreszierte. Der Raum oberhalb des Ringes fluoreszierte schwach violett, wie dies in der zitierten Arbeit von Becker und Schöpf beschrieben ist. Für einen 1 mm breiten Ring berechnen sich ungefähr 2  $\gamma$  reines Xanthopterin, was einem Gehalt unseres angereicherten Präparates von 10% entspricht. Demnach enthielt die Rohsubstanz aus Ascidien etwa 4 Promille (eventuelle Verluste nicht gerechnet) Xanthopterin.

#### Zusammenfassung.

Aus den inneren Organen einer Ascidienart (*Microcosmus polymorphus*) wurden Harnsäure, 2-Amino-6,8-dioxy-purin und Xanthopterin isoliert.

Für 2-Amino-6,8-dioxy-purin ist dies das erste nachgewiesene Vorkommen in der Natur.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.