

## 216. Richard Kuhn und Klaus Schwarz: Isolierung des Wuchsstoffes H' aus Hefe.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
(Eingegangen am 7. August 1941.)

### 1) Ausgangsmaterial.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung des Wuchsstoffes H', den das *Streptobacterium plantarum* zum Wachstum benötigt<sup>1)</sup>, diente Hefe der Löwenbrauerei A.-G., München. Die Hefe zeichnet sich, wie aus Tafel 1 hervorgeht, durch einen besonders hohen H'-Gehalt aus.

Tafel 1. H'-Gehalt verschiedener Ausgangsmaterialien.

E = H'-Menge, die in 1 ccm Nährlösung für optimales Wachstum erforderlich ist; zur Darstellung der Kochsäfte wurde jeweils mit der 5-fachen Menge Wasser 20 Min. gekocht und heiß zentrifugiert.

Molke .....	120—240	E/ccm
Hopfen-Kochsaft .....	540—1080	E/ccm
Malz-Kochsaft .....	24—48	E/g
Tomaten-Kochsaft .....	60—120	E/g frisch
Kochsaft aus frischer Löwenbräuhefe .....	2000	E/g trocken
Kochsaft aus Trockenhefe Löwenbräu .....	7700—15400	E/g trocken
Autolysat <sup>2)</sup> aus Frischhefe Löwenbräu .....	4000	E/g trocken
Hydrolysat <sup>3)</sup> aus Trockenhefe Löwenbräu .....	15400	E/g trocken

Der Kochsaft aus Frischhefe enthält nur  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{8}$  der H'-Menge, die man im Kochsaft aus Trockenhefe findet. Der Faktor H' liegt anscheinend in der Zelle in gebundener Form vor; er wird im Verlauf der Trocknung allmählich freigelegt und so durch Kochen mit Wasser extrahierbar. Es kommt darauf an, langsam zu trocknen, am besten bei  $\sim 20^\circ$  im Laufe von 5—7 Tagen. Trocknet man rasch im Luftstrom (12 Stdn.), so sinkt die Ausbeute bei der Darstellung des Kochsäftes erheblich (bis auf  $\frac{1}{8}$ ).

### 2) Extraktion.

In den Kochsaft aus richtig bereiteter Trockenhefe geht praktisch alles H'. Die Ausbeute ist, wie aus Tafel 1 ersichtlich, nahezu ebenso gut, wie wenn man die Trockenhefe der Totalhydrolyse<sup>3)</sup> mit 2-n. Schwefelsäure unterwirft. Der nach dem Abzentrifugieren des Kochsäftes verbliebene Rückstand gibt nach Hydrolyse mit 2-n. Schwefelsäure nur noch 400—800 E/g trocken, d. h. weniger als 10% der insgesamt erfaßbaren H'-Menge.

Trotz der vorzüglichen Ausbeute ist der Kochsaft aus Trockenhefe nicht das günstigste Ausgangsmaterial für Isolierungsversuche, da das Trockengewicht (150—240 mg aus 1 g Trockenhefe) recht hoch ist. Viel reinere Lösungen (10 mg aus 1 g Trockenhefe) erhält man, wenn die Extraktion mit

<sup>1)</sup> E. F. Möller u. K. Schwarz, B. 74, 1612 [1941].

<sup>2)</sup> 1 Tl. Hefe + 1 Tl. Wasser + Toluol, 48 Stdn. bei  $40^\circ$ .

<sup>3)</sup> 1 Tl. Hefe + 10 Tle. 2-n.  $H_2SO_4$  14 Stdn. unter Rückfluß gekocht, mit Baryt von Schwefelsäure genau befreit und das abzentrifugierte  $BaSO_4$  3-mal mit heißem Wasser gewaschen.

90-proz. Aceton in der Siedehitze vorgenommen wird. Methanol, 96-proz. Alkohol und  $\text{NH}_3$ -haltiges Butanol lieferten viel geringere Ausbeuten.

Methanol	(20 Min. gekocht)	3840 E/g Trockenhefe
96-proz. Alkohol	(20 Min. gekocht)	3840 E/g Trockenhefe
90-proz. Aceton	(20 Min. gekocht)	7700—15400 E/g Trockenhefe
Butanol (3.4% $\text{NH}_3$ enthaltend) <sup>4)</sup>		960 E/g Trockenhefe.

Bei etwa gleicher Ausbeute an Wirkstoff ist der Acetonextrakt für die weitere Verarbeitung viel geeigneter als der Hefekochsaft, der ein  $\sim$ 20-mal höheres Trockengewicht hat.

### 3) Gewinnung der Säurefraktion.

Der Faktor H' ist eine Säure. Verdampft man den Acetonextrakt und behandelt man den Rückstand mit gleichen Volumteilen von Butanol und  $m/2$ - $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, so bleibt aller Wirkstoff in der unteren Schicht. Auf diese Weise wird eine große Menge von Neutralstoffen abgetrennt. Nach dem Ansäuern auf  $\text{pH}$  3.5—3.8 geht der H'-Faktor aus der Bicarbonatlösung in Butanol. Diesem wird er zusammen mit anderen Carbonsäuren durch Bicarbonatlösung wieder entzogen. Bei einem Aktivitätsverlust von höchstens 10% geht das Trockengewicht auf  $1/10$  zurück.

### 4) Adsorption an Kohle.

Aus der Säurefraktion läßt sich H' zusammen mit einer Reihe von anderen Carbonsäuren an Kohle adsorbieren. Es genügen 0.5 mg Kohle für die aus 1 g Trockenhefe gewonnene H'-Menge.

Die Adsorption gelingt am besten aus saurer Lösung.

Tafel 2. Kohleadsorption bei verschiedenem  $\text{pH}$ .

Je 520 ccm Lösung mit 52 mg organischem Trockengewicht + 26 mg Carbo activatus siccus (E. Merck) 30 Min. gerührt.

$\text{pH}$ .....	8.0	7.0	6.5	5.5	5.0	4.0
E im Filtrat .....	2560	1920	1280	640	240	160

Im Adsorbat an Kohle unterliegt H' bei Zutritt von Luft leicht einer Inaktivierung. Durch Arbeiten unter reinem Stickstoff gelang es, Verluste zu vermeiden. Auch die Elution, zu der sich *n*-Ammoniak am besten eignet, wird unter reinem Stickstoff vorgenommen. Durch die Kohleadsorption steigt der Reinheitsgrad rund auf das Hundertfache an; bezogen auf Trockenhefe ist die Anreicherung fast 1:100000.

### 5) Isolierung] begleitender Carbonsäuren.

Im Kohle-Eluat findet man den Faktor H' vergesellschaftet mit verschiedenen Carbonsäuren, von denen die folgenden kristallisiert erhalten werden konnten:

I) Eine in Wasser schwer lösliche Dicarbonsäure  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4$ , farblose Nadelrosetten vom Schmp. 125—127°, die ein sehr schwer lösliches Silbersalz geben. Der Mischschmelzpunkt mit Sebacinsäure ergab keine Erniedrigung.

II) Eine in kaltem Chloroform schwer lösliche Carbonsäure  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ . Sie kristallisiert aus Wasser in rosettenförmig angeordneten Nadeln, aus Chloro-

<sup>4)</sup> 16 Stdn. bei etwa 20° geschüttelt.

form in Blättchen vom Schmp. 148°, gibt mit dem Phenolreagens von Folin-Denis intensive Blaufärbung und entfärbt Bromwasser. Der Schmelzpunkt und die sonstigen Eigenschaften stimmen auf *p*-Oxy-phenylessigsäure, die — offenbar als Abbauprodukt des Tyrosins — schon öfters in der Natur (Harn usw.) aufgefunden worden ist.

III) Eine im Hochvakuum schon bei 40—50° sublimierende, stark honigartig riechende Carbonsäure der wahrscheinlichen Bruttoformel  $C_7H_8O_2$  vom Schmp. 50—53°, die bei der katalytischen Hydrierung 2 Mol. Wasserstoff aufnimmt.

IV) Ebenfalls durch Vakuumsublimation erhielten wir Benzoesäure vom Schmp. 119° (Mischprobe).

Weitere krystallisierende Säuren, die sich im Kohle-Eluat finden, liegen in noch nicht einheitlicher Form vor.

#### 6) Eigenschaften und Isolierung des Wuchsstoffes H'.

Im Hefekochsaft ist H' bei 12-stdg. Kochen mit 2-n. Schwefelsäure oder mit 2-n. Natronlauge ganz beständig. Mit steigendem Reinheitsgrad der Präparate nimmt die Empfindlichkeit, namentlich gegenüber Alkali, zu. 3-proz. Wasserstoffperoxyd war ohne Einfluß auf die Aktivität des Kochsafts, Ozon (5-proz., 20 Min. durchgeleitet) zerstörte nur  $\frac{3}{4}$ . Höchst empfindlich ist der Faktor H' sowohl in rohen wie in hochgereinigten Lösungen gegen Salpetrige Säure (Stickoxyde) und gegen Brom (Bromwasser). Durch Diazomethan firdet Methylierung statt. Der Methylester hat im Streptobacterium-Test etwa  $\frac{1}{100}$  der Wuchsstoff-Wirkung der freien Säure.

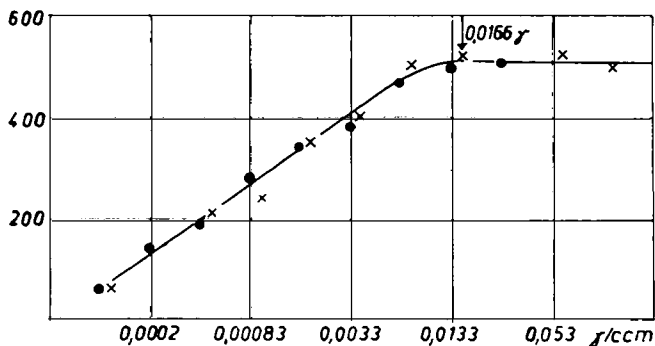
Hochgereinigte Präparate zeigen eine weitgehende, spontane Inaktivierung, wenn sie in Lösung einige Tage an der Luft stehen. Besonders nach der Abscheidung der eben beschriebenen Carbonsäuren tritt diese Inaktivierung in Erscheinung. Eine Erklärung dafür ist im Augenblick nicht möglich. Aus der Lösung hochgereinigter Fraktionen in trockenem Äther oder Chloroform läßt sich der Wirkstoff durch Einleiten von Chlorwasserstoff zum großen Teil ausfällen. Dies zeigt, daß er nicht nur saure, sondern auch basische Eigenschaften besitzt, wodurch eine Abtrennung der begleitenden N-freien Carbonsäuren möglich wird. An Stelle des Chlorwasserstoffs kann Phosphorwolframsäure in wäßriger Lösung zur Fällung benutzt werden. Es zeigte sich, daß bei hochgereinigten Lösungen die H'-Wirksamkeit dem N-Gehalt parallel geht:

Präp. S 2/973	0.48 % N	24 000 000 E/g
Präp. S 2/1000	2.50 % N	116 400 000 E/g.

Der Faktor H' ist aber nicht die einzige N-haltige Carbonsäure, die sich in diesen hochgereinigten Fraktionen findet. Nahezu  $\frac{9}{10}$  des Gesamtstickstoffs gehören zu inaktiven Verbindungen. Nimmt man die Fällung mit Phosphorwolframsäure fraktioniert vor, so fallen in der Hauptsache zunächst die N-haltigen inaktiven Begleiter. Aus dem am schwersten fällbaren Anteil wurde nach Veresterung mit Diazomethan ein Methylester erhalten, der aus Wasser in farblosen Bipyramiden krystallisierte. Die biologische Wirksamkeit dieses Krystallisats betrug 60 000 000 E/g, was einer Aktivität von 60 000 000 000 E/g für die freie Säure entspricht. Der Schmelzpunkt dieses Methylesters lag bei 107°.

Nachdem wir bereits Präparate mit einer Aktivität von 150000000 bis 200000000 E/g in Händen hatten, erhielten wir Kenntnis einer Arbeit von S. D. Rubbo und J. M. Gillespie<sup>5)</sup>, denen es gelang, *p*-Amino-benzoesäure als Benzoylverbindung aus Hefe zu isolieren und nachzuweisen, daß die *p*-Amino-benzoesäure als Wuchsstoff für *Clostridium acetobutylicum* wirkt. Daraufhin wurde im hiesigen Institut reine *p*-Amino-benzoesäure an *Streptobacterium plantarum* auf H'-Wirkung geprüft und festgestellt, daß diese Säure mit 600000000 E/g wirksam ist. Für reinen synthetischen *p*-Amino-benzoesäuremethylester wurden 60000000 E/g gefunden.

Der von uns aus Hefe isolierte Methylester vom Schmp. 107° gab mit synthetischem *p*-Amino-benzoesäuremethylester (Schmp. 110°) keine Erniedrigung des Schmelzpunktes. Die Übereinstimmung der biologischen Wirksamkeit des natürlichen und des synthetischen Esters ist aus der Abbildung ersichtlich.



Abbild. Vergleich der Wirksamkeit von aus Hefe isoliertem Methylester mit synthetischem *p*-Amino-benzoesäuremethylester.

- — ● Methylester aus Hefe; Präparat S 1016/1.  
 × — × *p*-Amino-benzoesäuremethylester (synthetisch).

Damit hat die präparative Bearbeitung des von den Milchsäure-Bakterien benötigten Faktors H' zu einem Wirkstoff geführt, der auch für andere Mikroorganismen<sup>5)</sup> sowie für die Ratte<sup>6)</sup> von Bedeutung ist, und der besonderes Interesse dadurch beansprucht, daß er die hemmende Wirkung verschiedener Sulfonamide auf Bakterien aufzuheben vermag<sup>7)</sup>.

### Beschreibung der Versuche.

1) Acetonextraktion: 10 kg bei 20° in 5—7 Tagen bereitete Trockenhefe werden in der Kugelmühle fein gemahlen und mit 40 l 90-proz. Aceton (Vol.-%) 20 Min. gekocht. Dann wird heiß abgesaugt. Der Acetonextrakt wird im Vak. bis auf 4 l abgedampft. Aus 1 g Trockenhefe erhält man 10 mg Substanz mit 7700—15400 E.

<sup>5)</sup> Nature [London] **146**, 838 [1940].

<sup>6)</sup> S. Ansbacher, Science [New York] **92**, 164 [1941].

<sup>7)</sup> D. D. Woods u. P. Fildes, 207th. Meeting Biochem. Soc. Univ. Sheffield, Febr. 17., 1940; Chem. Industries **59**, 133 [1940]; D. D. Woods, Brit. Journ. exp. Pathol. **21**, 74 [1940]; P. Fildes, Lancet **238**, 935 [1940]; J. Kimmig, Klin. Wschr. **20**, 235 [1941]; E. F. Möller u. K. Schwarz, B. **74**, 1612 [1941].

2) Butanol-Bicarbonat-Fraktionierung: Die 4 l Eindampfrückstand werden mit Hilfe von 3 l Butanol unter Erwärmen in einen Scheidetrichter gespült und nach Zugabe von 168 g  $\text{NaHCO}_3$  und Durchschütteln längere Zeit stehen gelassen. An der Phasengrenze scheidet sich eine Substanz ab, welche durch Absaugen entfernt wird. Nach der ersten Entmischung wird noch 2-mal mit je 3 l Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten Butanolauszüge werden einmal mit 500 ccm  $n/2$ - $\text{NaHCO}_3$  nachgewaschen. Die abgeschiedene Substanz und der Butanolauszug sind unwirksam. Die Bicarbonatlösung wird mit 20-proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf  $p_{\text{H}}$  3.5—3.8 eingestellt und 1-mal mit 1.5 l und 4-mal mit 0.75 l Butanol ausgezogen. Die Wirksubstanz geht jetzt in den Butanolauszug, der mit 500 ccm leicht angesäuertem Wasser nachgewaschen wird. Durch Ausschütteln mit insgesamt 1600 ccm  $m/2$ - $\text{NaHCO}_3$  (in 6 Tln.) wird sie wieder in die wäbr. Phase überführt. Ausb. aus 1 g Trockenhefe: 1 mg organ. Substanz mit 7700—15400 E.

3) Kohleadsorption und Elution<sup>\*)</sup>: Die so gewonnene Säurefraktion wird mit 2-n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf  $p_{\text{H}}$  3.5—3.8 eingestellt und durch Einengen im Vak. von Butanol befreit. Für die Kohleadsorption wurden mehrere der in 1 und 2 beschriebenen Ansätze gesammelt.

Da der Faktor *H'* im adsorbierten Zustand durch den Sauerstoff der Luft eine irreversible Inaktivierung erleidet, wurden Adsorption, Waschung des Adsorbates und Elution unter  $\text{N}_2$  bei völligem Ausschluß von  $\text{O}_2$  vorgenommen.

Versuchsordnung: An einen 3-l-Scheidetrichter (Adsorptionsraum) war eine Nutsche (Dmr. 140 mm) fest anmontiert; aus einem danebenstehenden Rundkolben mit Rückflußkühler konnte die in  $\text{H}_2\text{O}$  unter Durchleiten von  $\text{N}_2$  ausgekochte Kohle durch Überdruck in den Adsorptionsraum hineingetrieben werden. Das Adsorbat wurde nach 20 Min. — immer unter Durchperlen von  $\text{N}_2$  — auf der Nutsche abgesaugt und mit inzwischen im Vorraum frisch ausgekochtem  $\text{H}_2\text{O}$  nachgewaschen. Danach wurde mit Methanol, durch das im Vorraum einige Zeit  $\text{N}_2$  geleitet war, voreluert. Das Methanol löst aus der Kohle einen großen Teil von Verunreinigungen, jedoch nur einen Bruchteil der adsorbierten *H'*-Menge heraus. Nach dem Wechsel der unter der Nutsche stehenden Saugflasche wurde dann die Kohle-Elution mit 1-n. Ammoniak vorgenommen, welches auch wieder aus dem unter  $\text{N}_2$  stehenden Vorraum herübergepreßt war. Zur Neutralisation des Ammoniaks befand sich in der Saugflasche die ber. Menge an 4-n. Schwefelsäure.

In jedem Adsorptionsgang wurde das Konzentrat aus 45 kg Trockenhefe verarbeitet. Es wurden gebraucht: 45 g Kohle (Carbo activatus siccus, Merck Nr. 2186) in 450 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  (zum Auskochen), 900 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  zum Nachwaschen, 675 ccm Methanol zur Vorelution und 1350 ccm 1-n. Ammoniak zur Elution.

4) Butanol-Bicarbonat-Fraktionierung II: Das einzelne, auf  $p_{\text{H}}$  3.5—3.8 eingestellte Eluat wurde 8-mal mit insgesamt 1500 ccm Butanol ausgeschüttelt. Die wäbr. Phase enthielt nur noch einen Bruchteil der Aktivität und wurde verworfen. Aus insgesamt 280 kg verarbeiteter Trockenhefe erhielten wir 9.5 l Butanol-Lösung. Diese wurde 8-mal mit im ganzen 3.2 l  $m/2$ - $\text{NaHCO}_3$ -Lösung ausgezogen. Nach erneutem Einstellen des  $p_{\text{H}}$  auf 3.5—3.8 krystallisierten im Eisschrank 265 mg einer *H'*-inaktiven Substanz in Nadelrosetten aus, Substanz I (s. Abschnitt 12). Die Mutterlauge davon wurde 10-mal mit je 320 ccm Butanol ausgeschüttelt, das Butanol nach

<sup>\*)</sup> S. a. Abschnitt 1.

Filtration im Vak. abgedampft. Ausb. 3 g mit einer Aktivität von 660000000 E/g, aus 1 g Trockenhefe also  $\sim 10\gamma$  mit etwa 7700 E.

5) Äther-Ausschüttelung: Ähnlich wie mit Butanol läßt sich der Faktor H' auch mit Äther ausschütteln, besonders leicht aus konz. Salzlösungen. Der Eindampf-Rückstand nach der Butanol-Fraktionierung wurde in 50 ccm H<sub>2</sub>O gelöst, die Lösung reagierte stark sauer. Nach Halbsättigung mit Glaubersalz wurde 10-mal mit je 50 ccm gutem Äther ausgeschüttelt, der Äther nach Filtration im Vak. verdampft. Der Rückstand wurde jetzt in 30 ccm H<sub>2</sub>O gelöst und nach Halbsättigung mit Glaubersalz wieder 10-mal mit je 30 ccm Äther ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Äthers blieben 2.3 g mit 780000000 E/g (Verlust etwa 10%).

6) Abtrennung von in Äther und Chloroform unlöslichen Bestandteilen: Nach Trocknung im Vak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> wurden 2 g des unter 5) beschriebenen Stoffs in 40 ccm trockenem Äther gelöst. Dabei blieb eine geringe, rotbraune Masse zurück, welche durch Zentrifugieren abgetrennt und mit 10 ccm Äther nachgewaschen wurde. Die ätherunlösliche Masse (45 mg) war inaktiv und wurde verworfen. Die Ätherlösung wurde mit 80 ccm trockenem Chloroform versetzt und im Vak. unter mehrmaliger Erneuerung des Chloroforms so lange eingeengt, bis in der Lösung kein Äther mehr vorhanden war und das Volumen ungefähr 40 ccm betrug. Im Eisschrank krystallisierte ein großer Anteil als in Chloroform schwerlösliche Substanz aus: 1 g Rohprodukt der Substanz II (s. Abschnitt 12). Es verblieb 1 g in der Mutterlauge (s. Abschnitt 8).

7) Versuche zur Abtrennung der Wirksubstanz durch Hochvakuum-Destillation: In Nebenversuchen wurden 300 mg des aus Stufe 5 erhaltenen Materials bei etwa  $1 \times 10^{-6}$  mm destilliert. Dabei ging ein größerer Anteil schon bei 40—50° über: Substanz III (s. Abschnitt 12), schuppenförmige Krystalle von auffallend stark honigartigem Geruch. Gesamtmenge 100 mg, aus denen sich beim Umkrystallisieren aus H<sub>2</sub>O ein darin enthaltener geruchloser Stoff zuerst abscheidet: Substanz IV, 25 mg (s. Abschnitt 12). Der Wuchsstoff H' ging bei der Hochvakuum-Destillation fast völlig durch Inaktivierung verloren (95%). Die geringe verbliebene Aktivität war in einem Sublimat enthalten, welches zwischen 90° und 120° Luftbad-Temperatur übergang. Als Rückstand verblieb eine hellbraune, glasige Masse.

8) HCl-Fällung: Nach der Abtrennung der Substanz II tritt die Empfindlichkeit des Wuchsstoffes H' besonders deutlich in Erscheinung. Es ist möglich, daß die Substanz II (*p*-Oxy-phenylessigsäure) einen stabilisierenden Einfluß ausübt. Aus der trocknen Chloroform-Mutterlauge nach Abtrennung dieses Stoffes wurde durch Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff die Fraktion der N-haltigen Substanzen als Chlorhydrat ausgefällt. Die sofort auftretende milchige Trübung setzte sich als Öl ab. Dieses wurde mit wenig Chloroform nachgewaschen. Von den insgesamt 1.8 Milliarden E des Ätherextraktes aus Stufe 5 verblieben jetzt noch 180000000 E, von denen sich 70% in der HCl-Fällung befanden.

9) Äther-Fraktionierung: Die HCl-Fällung wurde in 20 ccm H<sub>2</sub>O gelöst. Dabei blieb ein unlöslicher, brauner Film zurück, der keinen Wirkstoff enthält. Nach Einstellen des p<sub>H</sub> auf 3.5 und Halbsättigung mit Glaubersalz wurde 10-mal mit je 20 ccm reirem Äther ausgeschüttelt. Nach dem Ab-

dampfen desselben wurde im Vak. über  $P_2O_5$  getrocknet. Beim Lösen in 10 ccm trockenem Äther schieden sich 0.3 mg einer unwirksamen bräunlichen Masse ab. Beim Kühlen der Lösung mit Aceton-Kohlensäure krystallisierten danach in Prismen 5 mg einer Substanz aus, welche ebenfalls inaktiv war. Nach Abdampfen des Äthers der Mutterlauge verblieben 100 mg Substanz mit einer Aktivität von insgesamt 10000000 E.

10) Fraktionierte Phosphorwolframsäure-Fällung: Diese Substanz wurde in 2 ccm 1-n. HCl gelöst, eine geringe Trübung wurde abgesaugt. Dann wurde mit 0.25 ccm einer 40-proz. wäbr. Phosphorwolframsäure-Lösung gefällt, die Fällung sofort abzentrifugiert und mit einigen Tropfen 1-n. HCl nachgewaschen. Beim Stehenlassen in der Kälte fiel aus der Mutterlauge noch eine zweite Fällung aus, welche in der Wärme leicht wieder gelöst wurde. Diese wurde unter Kühlung zentrifugiert und aus wenig  $H_2O$  ungelöst. Danach wurden die Fällungen und die Mutterlauge mit Barytwasser zerlegt und mit  $H_2SO_4$  genau von Ba befreit. In die 1. und 2. Fällung zusammen war die Hauptmenge ( $\sim 90\%$ ) der N-haltigen Verunreinigungen gegangen. Gesamtaktivität der Mutterlauge: 36000000 E.

11) Methylierung und Isolierung des aktiven Methylesters: Die Mutterlauge der Phosphorwolframsäure-Fällung wurde nach Zusatz von Natriumsulfat mit Äther ausgeschüttelt, darauf die feuchte äther. Lösung mit einem Überschuß von Diazomethan (in Äther) versetzt. Geringe  $N_2$ -Entwicklung. Danach wurde 5-mal mit je 5 ccm  $m/2$ - $NaHCO_3$  gewaschen, um unveresterte Säuren zu entfernen. Nach Filtration und Eindampfen des Äthers krystallisierte der Rückstand in gefiederten Blättchen. Er war in der Kälte schwer in  $H_2O$  löslich, löste sich jedoch mit 10 ccm  $H_2O$  bei Erwärmen auf dem Dampfbad. Im Kolben blieb ein Film einer H'-unwirksamen Verunreinigung zurück. Aus der Lösung krystallisierte nach 1-stdg. Kühlen in Eis eine Substanz (1.2 mg) aus, welche nach Umkrystallisieren aus 0.5 ccm  $H_2O$  (Fraktion S 1016/1, Ausb. 0.9 mg) eine Aktivität von 60000000 E/g aufwies. Sie zeigte genau die Aktivität des synthetischen Methylesters der *p*-Amino-benzoesäure (s. Abbild.) und ergab mit diesem im Mischschmelzpunkt keine Erniedrigung.

Substanz S 1016/1 107° (Kofler), *p*-Amino-benzoesäuremethylester 110° (Kofler), Mischschmelzpunkt (0.4 mg S 1016/1 + 0.4 mg Methylester) 108—110° (Kofler).

12) Untersuchung der isolierten unwirksamen Säuren. Substanz I (Abschnitt 4): Sehr schwer in kaltem  $H_2O$  lösliche Nadelrosetten; nach 2-maligem Umkrystallisieren aus  $H_2O$  und Trocknen im Vak. über  $P_2O_5$  Schmp. 125—127°.

3.957 mg Stbst.: 8.710 mg  $CO_2$ , 3.220 mg  $H_2O$ .

$C_{10}H_{16}O_4$ . Ber. C 59.51, H 8.96. Gef. C 59.76, H 9.06.

Das Äquiv.-Gew. (106) verhielt sich zum Mol.-Gew. wie 1:2. Eine 0.0025-proz. wäbr. Lösung gaß mit  $AgNO_3$  noch ein unlösliches Ag-Salz. Der Mischschmelzpunkt mit Sebacin säure gab keine Erniedrigung.

Substanz II (Abschnitt 6): 1 g Rohprodukt wurde mit 250 ccm reinem Chloroform gekocht und heiß filtriert. Aus der Lösung krystallisierten in der Kälte 494 mg große weiße Blättchen aus, die, nach Trocknen im Vak., über  $P_2O_5$  bei 148° schmolzen (Berl).

3.785 mg Sbst.: 8.670 mg CO<sub>2</sub>, 1.745 mg H<sub>2</sub>O. — 8.115 mg Sbst. verbr. 5.24 ccm n/100-NaOH. — 0.238 mg Sbst. in 4.910 mg Campher (Rast, K = 36): Δt = 12.2.

C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>. Ber. C 63.16, H 5.34, Mol.-Gew. 152.  
Gef. „ 62.47, „ 5.16, Äquiv.-Gew. 154.8, „ 143.

Die Substanz nimmt in H<sub>2</sub>O begierig Br auf, gibt eine sehr starke, dunkelblaue Reaktion nach Folin-Denis und eine blaßviolette FeCl<sub>3</sub>-Reaktion, die ins Grünliche umschlägt. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich um *p*-Oxy-phenyllessigsäure. Mit Benzoylchlorid in wäßr. NaOH bildete sich eine Benzoylverbindung der Zusammensetzung C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> mit dem Schmp. 154<sup>0</sup>.

3.835 mg Sbst.: 9.880 mg CO<sub>2</sub>, 1.685 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 70.29, H 5.12. Gef. C 70.26, H 4.92.

Substanz III (Abschnitt 7): Nach Abtrennung der Substanz IV kristallisierte die Substanz III in Nadelrosetten aus H<sub>2</sub>O aus. Schmp. 53<sup>0</sup> (Berl). Die Analyse ergab C 66.81%, H 6.30%, Mol.-Gew. (Rast) 129.4, Äquiv.-Gew. (titr.) 122.3. Die Substanz nahm bei der katalytischen Hydrierung 1.98 Mol. H<sub>2</sub> auf, berechnet auf ein Mol.-Gew. von 124.06 (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>). Es könnte sich um eine Dihydro-benzoessäure handeln.

Substanz IV (Abschnitt 7): Die Substanz schmolz nach Umkristallisieren aus H<sub>2</sub>O bei 118.5<sup>0</sup> (Berl), der Mischschmelzpunkt mit Benzoesäure (122<sup>0</sup>) ergab keine Erniedrigung.

3.890 mg Sbst.: 9.800 mg CO<sub>2</sub>, 1.760 mg H<sub>2</sub>O. — 5.610 mg Sbst. verbr. 4.67 ccm n/100-NaOH.

C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> (122). Ber. C 68.83, H 4.95.

Gef. „ 68.71, „ 5.06, Äquiv.-Gew. 122.7.

Wir haben Hrn. Dr. E. F. Möller für die Austestung sämtlicher Präparate, dem Werk Elberfeld der I. G. Farbenindustrie A. G. für die Aufarbeitung von Hefe in größerem Maßstabe und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung zu danken.

## 217. Friedrich Galinsky:

### Eine neue Bildungsweise des Testosterons aus Androstendiol und des Androstendions aus Dehydro-androsteron.

[Aus d. II. Chem. Laborat. d. Universität Wien.]

(Eingegangen am 15. August 1941.)

In einer kürzlich erschienenen Arbeit<sup>1)</sup> konnte ich zeigen, daß bei der Bromwasserstoff-Abspaltung mit Kollidin aus Cholesterindibromid Cholestenon als Hauptprodukt gebildet wird. Diese Reaktion, der eine innermolekulare Wasserstoffverschiebung bei der HBr-Abspaltung zugrunde liegt, hat also dasselbe Ergebnis wie eine Oxydation des Cholesterins zum Cholestenon. Da zahlreiche Steroidhormone und physiologisch wirksame Stoffe der Sterinreihe im Ring A Cholestenon-Struktur besitzen, war es von Interesse, die HBr-Abspaltung mit Kollidin bei den Dibromiden einiger ungesättigter Alkohole der Sterinreihe zu versuchen, deren Oxydation zu Hormonen und Wirkstoffen führt.

In der Androstanreihe sind es Δ<sup>5</sup>-Androsten-diol-(3.17) und *trans*-Dehydro-androsteron, die für Versuche in dieser Richtung in Betracht kamen.

<sup>1)</sup> B. 74, 1048 [1941].