

Beim Abkühlen bildete sich ein braunes Öl, das bald erstarrte. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus thiophenfreiem Benzol oder aus Aceton + Wasser wurde das Osazon mit konstantem Schmelzpunkt 158° erhalten. Es ist leicht löslich in Essigester und Aceton, schwer dagegen in Wasser und Benzol.

$C_{19}H_{24}O_4N_4$ (372.41). Ber. C 61.27, H 6.50, N 15.05, OCH_3 8.33.

Gef. „ 61.36, „ 6.66, „ 14.92, „ 8.27, 8.35.

$[\alpha]_D^{20}$: $-0.31^{\circ} \times 5/1 \times 0.04794 = -32.3 \pm 2.5^{\circ}$ (absol. Alkohol, 2 Min. nach Auflösen).

$[\alpha]_D^{20}$: 0.00° (Ende, nach 17 Stdn.).

55. A. Quilico und L. Panizzi: Chemische Untersuchungen über *Aspergillus echinulatus*, I. Mitteilung*).

[Aus d. Institut f. Allgem. Chemie d. Kgl. Universität Florenz.]
(Eingegangen am 7. Dezember 1942.)

Schon 1933 konnte der eine von uns aus in Zersetzung begriffenen vegetabilischen Rückständen einen lebhaft gefärbter Schimmelpilz isolieren, der sich auf Agar-Melasse-Nährböden gut entwickelte und schöne citronengelbe Mycele bildete, die große Mengen eines durch die üblichen organischen Lösungsmittel schon in der Kälte leicht extrahierbaren Pigments enthielten.

Das Pigment befindet sich in den Perithezien, die in frischen Kulturen schon bei schwacher Vergrößerung als honiggelbe Kugeln von charakteristischem Fettglanz erscheinen, während die seltenen conidialen Bildungen, die man im allgemeinen an den Rändern der Kulturen beobachtete, deutlich graugrün gefärbt sind.

Auf Grund der mykologischen Analyse¹⁾ wurde der Pilz mit *Aspergillus echinulatus* (Delacroix, Thom und Church) identifiziert. Über seine Natur liegen bisher noch keine Literaturangaben vor.

Bei der Isolierung des Pigments im krystallisierten Zustand traten zunächst erhebliche Schwierigkeiten auf, u. a. auf Grund der angewendeten Technik der Züchtung auf festen Nährböden; es konnte jedoch festgestellt werden, daß im trocknen Mycel nach der Extraktion des Pigments erhebliche Mengen einer weißen Substanz von sterinartigem Aussehen enthalten waren, die aus siedendem Alkohol in winzigen weichen Nadeln vom Schmp. $242-243^{\circ}$ (ohne Zers.) krystallisiert.

Die Untersuchungen mußten aus verschiedenen Gründen abgebrochen werden, wurden jedoch 1940 von uns wieder aufgenommen und führten zur Isolierung zweier gut krystallisierter Pigmente: Das eine, in größerer Menge vorhandene, krystallisierte in schön goldgelben Tafelchen von der Zusammensetzung $C_{19}H_{28}O_3$ und vom Schmp. $109-110^{\circ}$, das andere in geringerer Menge

*) Diese Abhandlung war für das der Erinnerung an das 75-jährige Bestehen der Deutschen Chemischen Gesellschaft gewidmete Heft (B. 75, Heft 12 [1942]) bestimmt, konnte aber aus technischen Gründen in dieses Heft nicht mehr aufgenommen werden.

Die Redaktion.

¹⁾ 1933 ausgeführt von Prof. Gino Pollacci an der Kgl. Universität Pavia, dem wir für die uns zu wiederholten Malen gewährte freundliche Unterstützung herzlichst danken.

vorhandene von der Zusammensetzung $C_{19}H_{22}O_3$, bildete prachtvoll orange-rote Nadeln vom Schmp. 152—153°.

Wir mußten indessen bald feststellen, daß zwei Verbindungen mit denselben Bruttoformeln, die nach ihren physikalischen Eigenschaften offenbar mit den unseren identisch waren, bereits von Raistrick, Gould und Mitarbeitern²⁾ aus verschiedenen Varietäten von *Aspergillus glaucus* Link isoliert worden waren; sie treten in wechselnden Mengen neben zwei anderen Pigmenten von bekannter, vom Oxyanthrachinon abgeleiteter Struktur auf, dem sogenannten Physcion (Methyläther des Emodins) und dem Erythroglaucin.

Die genannten Autoren glaubten, die beiden ersten Pigmente, die sie Flavoglaucin und Auroglaucin nannten, als charakteristisch für die Gruppe des *Aspergillus glaucus* ansehen zu können; diese Ansicht kann offensichtlich nicht mehr aufrechterhalten werden, nachdem wir diese Pigmente in erheblichen Mengen im *Aspergillus echinulatus* entdeckt haben³⁾.

In vier zwischen 1934 und 1939 veröffentlichten Arbeiten bemühten sich jene Autoren, die Struktur des Flavoglaucins und des Auroglaucins aufzuklären. Sie kamen jedoch nicht zu endgültigen Ergebnissen, außer zu interessanten Schlußfolgerungen über die analoge Konstitution der beiden Pigmente, wonach sie sich nur durch die Anzahl ihrer Doppelbindungen unterscheiden sollten, zum Nachweis einer Keton-Carbonyl-Gruppe und einer normalen Kette von wenigstens 8 C-Atomen im Flavoglaucin (Bildung von Caprylsäure bei der Oxydation) und zur Aufstellung wohlgedachter Hypothesen über die Natur der beiden Stoffe.

In keiner der genannten Arbeiten findet sich jedoch ein Anzeichen dafür, daß neben den beiden Pigmenten der weiße Stoff von sterinartigem Aussehen vorkommt, den wir in reichlicher Menge im *Aspergillus echinulatus* angetroffen haben. Angesichts dieser Untersuchungen erscheint es uns notwendig, unsere bisherigen Versuchsergebnisse über diese weiße Substanz zu veröffentlichen, die wir wegen ihrer Herkunft Echinulin⁴⁾ nennen wollen; wir behalten uns jedoch vor, zur gegebenen Zeit auch unseren Beitrag zur Frage der Konstitution des Flavoglaucins und des Auroglaucins zu liefern.

Das Echinulin, das aus den trocknen Mycelien des *Aspergillus echinulatus* nach der Extraktion der Pigmente erhalten werden kann, stellt einen wichtigen Bestandteil derselben dar. Aus 100 g trockenem Mycel erhält man im Mittel 2 g Flavoglaucin, 1 g Auroglaucin (beide rein) und 4—5 g nur wenig verunreinigtes Roh-Echinulin. Es bildet weiße Nadelchen vom Schmp. 242—243° und destilliert beim Erhitzen größtenteils unzersetzt, wobei sich ein schwacher, charakteristischer Geruch nach unvollkommen verbranntem Stearin verbreitet. Durch rasches Erhitzen im Vakuum von 1—2 mm kann

²⁾ B. G. Gould u. H. Raistrick, *Biochem. Journ.* **28**, 1640 [1934]; H. Raistrick, R. Robinson u. A. R. Todd, *Journ. chem. Soc. London* **1937**, 80; J. H. Cruickshank, H. Raistrick u. R. Robinson, *Journ. chem. Soc. London* **1938**, 2056; J. N. Ashley, H. Raistrick u. Richard, *Biochem. Journ.* **33**, 1291 [1939].

³⁾ In ihrer letzten Arbeit (1939) haben diese Autoren bei der Untersuchung des Rohpigments aus 141 g trockenem Mycel eines Stammes von *Aspergillus echinulatus* Physcion und Erythroglaucin gefunden, über die Anwesenheit von Auroglaucin sprechen sie sich negativ aus, während sie die des Flavoglaucins für zweifelhaft ansehen.

⁴⁾ Aus der Literatur ist nicht zu entnehmen, daß dieser Name schon einer anderen Substanz zuerteilt worden sei.

es leicht zu einer rein weißen Masse vom Aussehen des Kohlensäureschnees sublimiert werden. Bei längerem Erwärmen etwas größerer Mengen geht die Verbindung z. Tl. in ein glasiges Polymeres über, das als Rückstand verbleibt.

Die Substanz scheint kein oder nur ein sehr schwaches Drehungsvermögen zu besitzen, eine 1.96-proz. Lösung in Chloroform zeigte im Polarimeter im 2-dm-Rohr keine merkbare Drehung.

Die Analysen sorgfältig gereinigter Proben aus verschiedenen Präparationen führten zu der Formel $C_{28}H_{39}O_2N_3$, die durch die Molekulargewichtsbestimmung⁵⁾ bestätigt wurde.

Echinulin ist neutral und löst sich nicht in verdünnten Laugen oder Säuren. Es gibt in Chloroform-Lösung mit konz. Schwefelsäure die umgekehrte Salkowski-Reaktion, wie das Ergosterin; das Chloroform bleibt praktisch ungefärbt, aber die Schwefelsäure-Schicht färbt sich deutlich rot. Alkoholische Salzsäure wandelt das Echinulin in der Wärme in Produkte kolloidaler Natur um, die sich schlecht zur Untersuchung eignen. Es gibt keine additionelle Verbindung mit Pikrinsäure.

Bei der trocknen Destillation mit Calciumoxyd entwickeln sich Dämpfe, die sich zu einer braunen Flüssigkeit kondensieren, und ein Gas mit starkem ammoniakalischen Geruch (Isonitrilreaktion). Die braune Flüssigkeit dagegen riecht nach Pyridin- und Chinolinbasen und ist teilweise mit Wasserdampf flüchtig. Bei der Zinkstaubdestillation bilden sich Gemische neutraler und basischer Produkte, die wir noch nicht untersucht haben.

Echinulin besitzt ungesättigten Charakter und gibt mit Brom in Eisessig quantitativ ein Hexabromid $C_{28}H_{39}O_2N_3Br_6$ ⁶⁾.

⁵⁾ Die Ergebnisse der zahlreichen Analysen würden ebensogut mit der Formel $C_{39}H_{54}O_3N_4$ übereinstimmen, wie aus der folgenden Gegenüberstellung der berechneten Werte für die Formeln C_{28} und C_{39} hervorgeht:

$C_{28}H_{39}O_2N_3$	(449.2)	Ber. C	74.78,	H	8.73,	N	9.35.
$C_{39}H_{54}O_3N_4$	(626.4)	74.71,	..	8.69,	..	8.94.

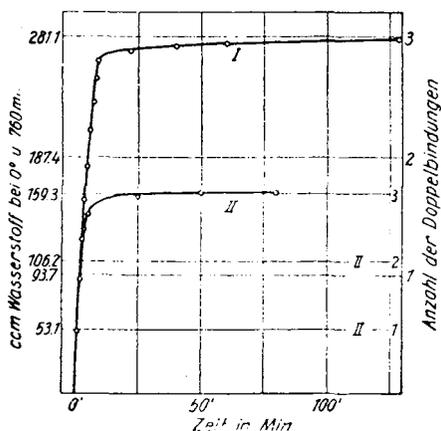
Die Abweichungen würden innerhalb der Analysenfehler liegen. Auch die quantitative katalytische Hydrierung (s. dort) gestattet keine Lösung dieser Frage, da die erhaltenen Werte ebensogut auf die Formel C_{28} mit 3 Doppelbindungen wie auf die Formel C_{39} mit 4 Doppelbindungen passen. Die Entscheidung ist allein durch eine physikalische Bestimmung des Molekulargewichts möglich. Die kryoskopischen Messungen begegnen wegen der zu geringen Löslichkeit der Substanz in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln Schwierigkeiten; die starke Verdünnung (man kann nur mit höchstens 1-proz. Lösungen arbeiten) und das hohe Mol.-Gew. machen die Bestimmungen inkonstant und unsicher.

Wir erhielten indessen in Eisessig auf kryoskopischem Wege zwischen 390 und 450 schwankende Werte für Echinulin, dagegen 400 für Hydroechinulin. Eine größere Konstanz der Versuchswerte konnte auf ebullioskopischem Wege erreicht werden (Methode Landsberger, Lösungsmittel Chloroform), da man hier mit höheren Konzentrationen (bis zu 4 %) arbeiten konnte; die erhaltenen Werte sind 412, 423 und 457.

Wenn diese Werte auch keine vollkommenen sind, so gestatten sie doch, die Formel $C_{39}H_{54}O_3N_4$ (Mol.-Gew. 626) auszuschließen zugunsten der Formel $C_{28}H_{39}O_2N_3$, die wir in der vorliegenden Arbeit unter Vorbehalt annehmen wollen.

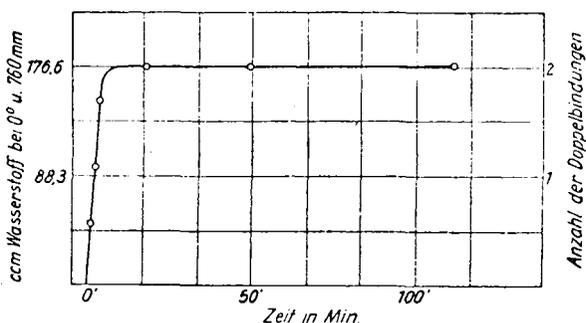
⁶⁾ Wie aus Anm. 5 hervorgeht, würde der ermittelte Bromgehalt auch mit dem eines Oktabromids $C_{39}H_{54}O_3N_4Br_8$ in Übereinstimmung stehen.

Die katalytische Hydrierung mit Platin und Wasserstoff in Eisessig nach Willstätter⁷⁾ bestätigt die Anwesenheit von wenigstens 3 Doppel-



Abbild. 1. Hydrierung von Echinulin. I: 1.8806 g, 75 ccm Eisessig, 3.2 g Platinschwarz. II: 1.0665 g, 70 ccm Eisessig, 3.5 g Platinschwarz.

bindungen, wie aus den beigegebenen Diagrammen hervorgeht; Abbild. 1 bezieht sich auf Echinulin, während Abbild. 2 einen Kontrollversuch mit reinem Carven (*d*-Limonen) darstellt.



Abbild. 2. Hydrierung von Carven (0.5359 g, 60 ccm Eisessig, 3.2 g Platinschwarz).

Das so erhaltene Hydroechinulin $C_{28}H_{45}O_2N_3$ bildet kleine weiße Nadelchen vom Schmp. 248—249° und ähnelt im Aussehen sehr dem Ausgangsstoff, ist jedoch leichter als dieser in organischen Mitteln löslich. Im Gegensatz zu Echinulin gibt es die charakteristische Farbreaktion mit Schwefelsäure nicht mehr, dadurch ist es möglich, die Anwesenheit des nicht hydrierten Produkts auch in Spuren zu erkennen.

Die Behandlung des Echinulins mit Ozon sowohl in Eisessig als auch in Chloroform führt zu Produkten kolloidaler Natur.

⁷⁾ Siehe H. Meyer, „Lehrbuch der organisch-chemischen Methodik“, 4. Aufl. [1922] S. 1109; vergl. ferner L. Zechmeister u. Mitarbb., B. 61, 566, 1534 [1928].

Kocht man Echinulin mit einer Lösung von Kaliumbichromat in verd. Schwefelsäure, so bildet sich deutlich Aceton, was die Anwesenheit von mindestens einer Gruppe $=C(CH_3)_2$ oder $-CH(CH_3)_2$ wahrscheinlich macht; es zeigt sich jedoch auch ein Geruch nach den Fettsäuren C_4 bis C_6 , deren Bildung, allerdings stets in Spuren, auch bei der Einwirkung aller anderen untersuchten Oxydationsmittel beobachtet wurde.

Orientierende Oxydationsversuche mit Permanganat führten zu einem kristallinen, gelblichen, stickstoffhaltigen Produkt von saurem Charakter (Schmp. 260—262° unter Zers.); dieses lieferte gelbe, unlösliche Silber-, Blei- und Kupfersalze; während der Oxydation entwich ein Teil des Stickstoffs als Ammoniak. Auch in diesem Falle erhielt man Spuren flüchtiger Fettsäuren, deren Geruch dem der Valeriansäure ähnelt.

Die vorläufigen chemischen Daten erlauben noch keine Vorstellung von der Konstitution des Echinulins, das sich in keine der bis jetzt bekannten Gruppen der Naturprodukte einordnen läßt⁸⁾. Der hohe Wert von C und H und die physikalischen Eigenschaften könnten auf eine komplexe cyclische Struktur hinweisen, an der auch Stickstoffatome beteiligt sind, wie die Bildung stickstoffhaltiger, saurer, nicht einfacher Verbindungen bei der Oxydation beweist. Durch die Ergebnisse der katalytischen Hydrierung und die erhaltene Bromverbindung scheint die Gegenwart von wenigstens 3 Doppelbindungen gesichert, von denen sich eine wahrscheinlich in einer Seitenkette in der Anordnung $=C(CH_3)_2$ befindet⁹⁾. Weitere Aufschlüsse erwarten wir von der noch laufenden Untersuchung.

Beschreibung der Versuche.

1) Bereitung des Untersuchungsmaterials.

Die vorläufigen Kulturversuche, die die geeignetsten Bedingungen für eine regelmäßige Entwicklung des Pilzes und für die Erzielung höherer Ausbeuten an Versuchsmaterial ermitteln sollten, wurden gleichzeitig auf flüssigen und festen Nährböden ausgeführt.

⁸⁾ Sieht man von der Anwesenheit bemerkenswerter Mengen Stickstoff ab, so erinnert die Substanz in gewisser Hinsicht an die Pflanzen- und Pilz-Sterine, besonders durch die Farbreaktionen und die Anwesenheit von ungesättigten Seitenketten, die bei der Chromsäure-Oxydation Aceton und Fettsäuren geben können.

Im Hinblick auf seine Herkunft mag die Übereinstimmung der Kohlenstoffatomzahl des Echinulins $C_{28}H_{39}O_2N_3$ mit der des Ergosterins $C_{28}H_{44}O$ nicht ganz zufällig erscheinen, das ebenfalls 3 Doppelbindungen besitzt und dieselbe Farbreaktion mit Schwefelsäure gibt.

Weniger wahrscheinlich ist eine Analogie zur Konstitution der Pilz-Cerebroside wie des Fungocerebrins der Hefe (F. Reindel, A. 480, 76 [1936], 544, 116 [1940]), die ein ganz anderes chemisches Verhalten zeigen.

⁹⁾ Das Aceton kann indessen auch von der Oxydation einer Seitenkette $-CH_2 \cdot CH(CH_3)_2$ stammen. Nach A. Windaus liefern Cholesterin, Coprosterin, Sitosterin, Cholestan, Pseudocholestan u. a., alles Verbindungen, denen die Gruppierung $R \cdot CH_2 \cdot CH(CH_3)_2$ zugrunde liegt, bei der Chromsäure-Oxydation Aceton, was seinerzeit einer der Hauptgründe dazu war, die bekannten Beziehungen zwischen den Sterinen und den Gallensäuren herzustellen (A. Windaus u. C. Resau, B. 46, 1247 [1913]; A. Windaus, Ztschr. physiol. Chem. 100, 167 [1917]; A. Windaus u. K. Neunkirchen, B. 52, 1915 [1919] usw.).

Parallelversuche mit der Chromsäure-Oxydation von Echinulin und Hydroechinulin haben in der Tat gezeigt, daß auch das letztgenannte, wenn auch schwieriger und in geringerer Ausbeute, Aceton gibt neben merklich größeren Mengen mittlerer Fettsäuren.

a) Feste Nährböden: Wir benutzten Zucker- oder Rübenmelasse-Böden unter Zusatz geeigneter anorganischer Nährsalze. Diese hatten folgende Zusammensetzung:

Agar-Zucker-Nährboden	Agar-Melasse-Nährboden
Saccharose 150 g	Rübenmelasse 300 g
NH_4NO_3 2.5 g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g	
KH_2PO_4 1.00 (2.00) g	KH_2PO_4 1.00 (2.00) g
Agar in Fäden 25.0 g	Agar in Fäden 25.0 g
Mit Leitungswasser auf 1 l aufgefüllt.	Mit Leitungswasser auf 1 l aufgefüllt.

Als Kulturgefäße dienten Petri-Schalen, besser weite Reagensgläser mit Watterverschluss, die in einem Thermostaten unter Lichtausschluß bei 30° gehalten wurden.

Auf Melasse wächst der Pilz anfangs weiß; nach etwa 2 Tagen zeigt sich eine hellgrüne Form, die bald verschwindet, um der Bildung von üppigen gelben Peritherien Platz zu machen, doch entwickeln sich an den Rändern braungrüne Conidien. Der Pilz entwickelt sich rasch und regelmäßig, besonders auf Melasse-Böden von höherem Phosphorgehalt (2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/l$); das Mycel wird am 8. bis 10. Tage durch Abkratzen entfernt. Es ist zentral stark eingesunken, von schön citronengelber Farbe und enthält sehr wenig Sporen. Von den Kulturen geht ein schwacher, charakteristischer, nicht unangenehmer Geruch aus. Die vereinigten Mycelien werden wiederholt mit warmem Wasser gewaschen, abgesaugt und schnell getrocknet, zunächst an der Luft, dann im Vak. über Schwefelsäure. Im gepulverten Zustand ist das Mycel gelbbraun. Ausb. 2.6—2.7 g trocknes Mycel/qdm Kultur.

Auf Saccharose-Böden ist die Entwicklung des Pilzes weit kümmerlicher und liefert Mycelien, die bedeutend leichter sind und mehr Sporen enthalten¹⁰⁾; wir hielten es daher nicht für zweckmäßig, eingehendere Versuche damit anzustellen.

b) Flüssige Nährböden: Auch hier wurden die Versuche sowohl auf Saccharose- als auch auf Melasse-Böden ausgeführt; die in Jenaer Bechergläsern von 300 ccm und in Roux-Flaschen von 1000 ccm enthalten waren; sie wurden mit 100 bzw. 200 ccm steriler Nährlösung beschickt und nach dem Animpfen im Thermostaten auf 30° gehalten. Auf einem flüssigen Nährboden der folgenden Zusammensetzung:

Rübenmelasse	200 g
KH_2PO_4	2.0 g

mit Leitungswasser auf 1000 ccm aufgefüllt ist das Wachstum sehr regelmäßig, und am 3. bis 4. Tage ist die Oberfläche vollständig mit gelbem Mycel bedeckt. Für eine hinreichende Entwicklung genügen 9—10 Tage, danach nimmt die grüne Sporenbildung zu. Die stark eingesunkenen, bröckligen Mycelien werden auf Gaze abfiltriert, gut mit fließendem Wasser, dann einige Male mit warmem Wasser gewaschen, schließlich getrocknet und gepulvert. Das Pulver ist gelb. Ausb. 2.6—2.7 g/qdm Kultur.

Versuche mit demselben Nährboden, der jedoch weniger Phosphor enthielt (1 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/l$), haben etwa dieselben Ausbeuten an Mycel von hellerem Gelb geliefert. Die Kulturen auf Saccharose-Böden von größerem oder kleinerem Phosphorgehalt zeigen ein sehr kümmerliches Wachstum und geringe Pigmentierung. 15 Tage nach der Impfung sind die sehr dünnen Mycelien fast ganz in strohgelb gewordene Flüssigkeit eingetaucht. Das trockne Pulver ist hellgelb. Ausb. 1.1 g/qdm Kultur.

Die Kulturflüssigkeiten zeigen sowohl bei Verwendung von Melasse als auch von Saccharose nach der Entwicklung eine schwache Acidität von noch nicht geklärter Natur; sie enthalten keine Oxalsäure und werden durch Zusatz von Ferrichlorid nicht gefärbt.

¹⁰⁾ Wir konnten schon bei anderen Gelegenheiten feststellen, daß auf 15% Zuckergehalt verdünnte Rübenmelasse nach Zusatz von 1—2%₁₀₀ KH_2PO_4 einen idealen und sehr billigen Nährboden für eine Schimmelpilz-Kultur darstellt.

Es wurden auch Versuche bei 24° und 37° durchgeführt; bei den ersten ist die Ausbeute etwa dieselbe wie bei 30°, obwohl die Entwicklung langsamer ist, bei den letztgenannten dagegen bemerkt man starke Sporenbildung und fast völlige Abwesenheit des Pigments.

Auch stärker verdünnte, statt 30% 10% Melasse enthaltende Böden wurden unter sonst gleichen Bedingungen untersucht. Das Wachstum des Pilzes nimmt einen normalen Verlauf, doch wird weniger Mycel gebildet. Ausb. an trockenem Pulver 1.15 g/qdm Kultur.

Nach diesen Ergebnissen scheint es zweckmäßig, mit einem flüssigen Nährboden mit 30% Melasse und 0.2% KH_2PO_4 zu arbeiten, den man überdies 2-mal verwenden kann. Die Mycelausbeute ist in den beiden aufeinanderfolgenden Ansätzen etwa dieselbe. Auch die Handhabung des flüssigen Nährbodens ist einfacher und die Infektionsgefahr geringer, besonders im Vergleich zu den Petri-Schalen.

2) Extraktion der Pigmente.

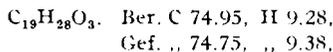
Das gut getrocknete Mycelpulver wird in einem reichlich großen Perkolator mit frisch destilliertem wasserfreiem Äther extrahiert, bis der Extrakt fast farblos abläuft. Das ursprünglich gelbe Pulver nimmt die Farbe trocknen Tons an, während die äther. Lösung stark rotbraun ist. Sie wird filtriert, vorsichtig auf dem Wasserbad eingedampft und schließlich im Vak. über Schwefelsäure getrocknet. Es bleibt eine dunkelgelbe, etwas gummiöse Masse zurück, die neben den Pigmenten harzähnliche Stoffe enthält.

Trennung und Reinigung der Pigmente: Man krystallisiert zunächst den erhaltenen Rückstand aus wenig warmem Ligroin (Sdp. 80—90°) um. Das so erhaltene hellgelbe, augenscheinlich nicht einheitliche Produkt wird von neuem in warmem Ligroin gelöst und die klare Lösung mit einem Überschuß an Lösungsmittel behandelt. Es fallen nun in Flocken große Mengen eines gelbbraunen harzigen Stoffs aus. Nach dem Absitzenlassen filtriert man und engt die klare orangefarbene Lösung im Vak. ein; beim Abkühlen gerinnt das Ganze zu einer leuchtend gelben Krystallmasse.

Das Produkt hat auch nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Ligroin keinen scharfen Schmelzpunkt (90—95°) und erscheint unter dem Mikroskop als ein Gemisch aus glänzenden gelben Blättchen und undurchsichtigen hellgelben Sphärokrystallen. Krystallisiert man dagegen aus Alkohol, so erhält man ein Gemisch einzelner gelber Blättchen und orangeroter Nadeln. Dieses Gemisch nimmt beim Umkrystallisieren aus Ligroin wieder die ursprüngliche gelbe Farbe an. Die völlige Trennung des gelben und des roten Pigments ist sehr mühsam und wird am besten durch wiederholtes Krystallisieren aus 95-proz. Alkohol erreicht, in dem das rote Pigment weniger löslich ist¹¹⁾.

Die Ausbeuten an reinen Produkten waren bis jetzt 2 g gelbes Pigment und 1 g rotes Pigment auf 100 g verarbeitetes trocknes Mycel.

a) Gelbes Pigment (Flavoglucin): Hellgelbe, glänzende Blättchen, Schmp. 109—110° (ohne Zers.).

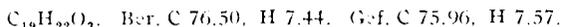


Die kryoskopische Mol.-Gew.-Best. in Benzol ergab 305.1 (ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_3$ 304).

¹¹⁾ Da die beiden Pigmente nach den Untersuchungen von Raistrick und Mitarb. dieselbe Struktur besitzen und sich nur durch die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten unterscheiden (aus beiden entsteht bei der Hydrierung dasselbe Produkt), so ist es nicht unwahrscheinlich, daß sie, wenigstens innerhalb gewisser Grenzen, feste Lösungen miteinander bilden, was die Schwierigkeiten bei der Trennung der beiden Stoffe erklären würde.

Die Löslichkeit und die chemischen Eigenschaften (z. B. die Farbreaktionen) sowie die Analysendaten zeigen die Identität mit dem von Raistrick und Mitarbeitern aus *Aspergillus glaucus* isolierten Flavoglaucin $C_{19}H_{28}O_3$. Zur weiteren Identifizierung wurden nach den Angaben dieser Autoren das Dinitrophenylhydrazon vom Schmp. 186–187° und das Kondensationsprodukt mit *o*-Phenylendiamin vom Schmp. 160–161° bereitet.

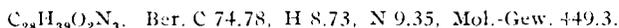
b) Rotes Pigment (Auroglaucin): Leichte, orangerote Nadelchen, die bei 152–153° zu einer gelben, nur blaßorangefarbenen Flüssigkeit schmelzen. Analyse und Eigenschaften bestätigen die Identität mit dem Auroglaucin von Raistrick.



3) Echinulin.

Das wie oben beschrieben von den Pigmenten befreite Mycelpulver wird im Perkolator 4–5 Stdn. mit Chloroform extrahiert. Der braune Extrakt erstarrt nach dem Eindampfen zu einer weißlichen, festen Masse, die abgesaugt, mit wenig Lösungsmittel gewaschen und auf Ton getrocknet wird. Das Filtrat liefert beim Einengen eine weitere Menge des Produkts. Ausb. an schmutzigweißem Rohprodukt 4–5% des verwendeten trocknen Mycelpulvers.

Die Reinigung erfolgt durch wiederholtes Umkrystallisieren aus Butylalkohol und liefert winzige, verfilzte Nadelchen, die ohne Zersetzung bei 242–243° zu einer leicht bräunlichen Flüssigkeit schmelzen.



Gef. C 74.50, 74.42, 74.86, 74.60; H 8.72, 8.78, 8.64, 8.61; N 9.16, 9.20, 9.21, 9.33¹²⁾; Mol.-G.w. (kryoskop. in Eisessig) 423, 451 (ebullioskop. in Chloroform; $K = 38.8$), 412, 423, 457.8.

Echinulin ist wenig löslich in Benzol, Äther, Ligroin, Tetrachlorkohlenstoff, Aceton und kaltem Alkohol, ziemlich leicht löslich in warmem Alkohol, leichter in warmem Butylalkohol. Die besten Lösungsmittel sind Eisessig, Chloroform, Pyridin und Dioxan.

Löslichkeiten bei 23° (g Sbst. in 100 ccm gesättigter Lösung):

$CH_3.CO_2H$	$CHCl_3$	$C_2H_5.OH$	C_6H_6
2.81	3.13	0.69	0.022

Echinulin löst sich in konz. Schwefelsäure mit intensiv rotbrauner Farbe; diese verschwindet beim Verdünnen mit Wasser und die Substanz fällt als gelatinöser Niederschlag aus, der aus unverändertem Echinulin zu bestehen scheint. Die Lösungen in alkohol. Kalilauge und in Alkalialkohol-Lösungen sind gelb.

Die Substanz kann bei vorsichtigem Erhitzen unverändert destilliert werden. Die Lösung in Eisessig entfärbt Brom und Kaliumpermanganat sofort.

¹²⁾ Die Substanz verbrennt schlecht. Eine vorläufige Mikrobestimmung ergab: C 74.24; H 8.51. Die beiden letzten Stickstoffwerte beziehen sich auf 2 im Vak sublimierte Proben. Eine Kjeldahl-Bestimmung ergab 8.59% Stickstoff.

Katalytische Hydrierung des Echinulins: Hexahydroechinulin.

Die quantitative Hydrierung wurde in Gegenwart von viel Platinschwarz, das nach Willstätter bereitet wurde, bei gewöhnlicher Temperatur in Eisessig-Lösung durchgeführt. Bei allen Versuchen wurde das Platin vor der Zugabe der Substanz im Apparat mit Eisessig in einer Wasserstoffatmosphäre bis zum Aufhören der Absorption geschüttelt. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Versuch 1.

Echinulin 1.8806 g, Platinschwarz 3.2 g, Eisessig 75 ccm, Pt/Echinulin = 1.70.

Versuchszeit	ccm absorbierter H ₂ (reduz. auf 0° und 760 mm)	Anzahl der ber. Doppelbindungen
1' 3''	49.6	---
2' 6''	90.6	---
3' 1''	122.0	---
4' 1''	153.8	---
5' 3''	181.0	---
6' 8''	208.2	---
7' 8''	230.9	---
8' 4''	248.8	---
9' 3''	262.4	2.80
22'	271.3	2.90
40'	274.6	2.93
60'	275.8	2.94
128'	279.0	2.98

Versuch 2.

Echinulin 1.0665 g, Platinschwarz 3.5 g, Eisessig 70 ccm, Pt/Echinulin = 3.28.

Versuchszeit	ccm absorbierter H ₂ (reduz. auf 0° und 760 mm)	Anzahl der ber. Doppelbindungen
1' 2''	51.4	---
2' 2''	88.9	---
3' 7''	131.2	---
5' 2''	154.0	2.90
25'	158.2	2.98
50'	160.6	3.02

Versuch 3. Vergleichsversuch mit reinem Carven unter denselben Bedingungen:

Carven 0.5359 g, Platinschwarz 3.2 g, Eisessig 60 ccm, Pt/Carven = 5.98.

Versuchszeit	ccm absorbierter H ₂ (reduz. auf 0° und 760 mm)	Anzahl der ber. Doppelbindungen
1' 3''	50.2	---
2'	98.0	---
3' 5''	150.0	---
4' 22''	170.0	1.92
8' 38''	173.6	1.96
17'	176.5	2.00
47'	179.0	2.03
120'	179.5	2.03

Die entsprechenden Absorptionskurven sind in den Abbildungen 1 und 2 wiedergegeben. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß Echinulin drei unter den gewählten Versuchsbedingungen hydrierbare Doppelbindungen enthält¹³⁾.

Die Eisessig-Lösung wird nach der Hydrierung vom Platin durch Filtrieren befreit und stark mit Wasser verdünnt, worauf sich das Hydroechinulin als leichter weißer Niederschlag abscheidet. Es wird gründlich mit verd. Essigsäure, dann mit Wasser gewaschen und auf Ton getrocknet. Ausb. quantitativ.

Man reinigt das Hydroechinulin durch wiederholtes Umkrystallisieren aus Butylalkohol, worin es in der Wärme ziemlich leicht löslich ist. Kleine, weiße, verfilzte, dem Echinulin ähnliche Nadeln, die bei 248—249° (ohne Zers.) schmelzen. Das Gemisch mit Echinulin zeigt eine schwache Schmelzpunktserniedrigung (239—240°).

$C_{28}H_{45}O_2N_3$. Ber. C 73.78, H 9.96, N 9.22. Mol.-Gew. 455.4.
Gef. C 73.85—73.96, H 9.81—9.84, N 8.89—8.90¹⁴⁾. Mol.-Gew. (kryoskop. in Eisessig) 403, 405.

Hydroechinulin unterscheidet sich deutlich von Echinulin durch das Ausbleiben der Farbreaktion mit Schwefelsäure, so daß man auch geringe Beimengungen des nicht hydrierten Produkts erkennen kann.

Einwirkung von Brom auf Echinulin: 0.5 g Echinulin werden in 25 cm Eisessig gelöst und unter Kühlung mit Eiswasser mit 1.5 cm Brom versetzt. Das Brom wird schnell absorbiert, und nach kurzer Zeit bemerkt man den Beginn einer Bromwasserstoffentwicklung. Man fällt nun mit Wasser, wäscht und trocknet den gelblichen Niederschlag schnell im Exsiccator über Phosphorpentoxyd. Ausb. 0.98—1.0 g, entsprechend 6 Atomen Brom (ber. 1.035 g).

Das Produkt scheint wenig beständig zu sein; beim Erwärmen im Röhrchen bleibt es bis 130° unverändert, dann wird es braun und verkohlt, ohne zu schmelzen. In warmem Alkohol ist die Verbindung leicht löslich. Die klare alkohol. Lösung trübt sich beim Abkühlen und scheidet eine gelbe, mikrokristalline Masse ab, die sich beim Erwärmen wie das Rohprodukt verhält.

$C_{28}H_{39}O_2N_3Br_6$. Ber. Br 51.6. Gef. Br 49.8—50.3.

Die Werte stimmen gut auf ein Hexabromid.

Oxydationsversuche mit Echinulin.

a) Chromsäure: Kaliumbichromat in mäßig starker Schwefelsäure oxydiert in der Siedhitze langsam eine Suspension von Echinulin, das unter Gasentwicklung in Lösung geht.

Führt man die Behandlung in einem Destillierkolben durch, so findet man im Vorlauf merkliche Mengen Aceton, das durch das charakteristische *p*-Nitrophenylhydrazon nachgewiesen wurde (gelbe Nadeln; Schmp. 150—151°, auch im Gemisch mit einem Kontrollpräparat). Aceton bildet sich in den ersten Augenblicken der Oxydation, die folgenden Fraktionen riechen nach Fettsäuren mittlerer Kohlenstoffzahl, die jedoch nur in Spuren vorhanden sind.

b) Alkalische Permanganat-Lösung: Orientierende Versuche wurden mit der Lösung in Aceton und mit der wäbr. Suspension angestellt.

3 g $KMnO_4$ in 600 cm reinem Aceton, wurden langsam in eine warme Lösung von 1 g Echinulin in 200 cm Aceton eingetropt (Entwicklung ammoniakalischer Dämpfe). Nach Zugabe des Oxydationsmittels filtriert man, wäscht den Mangandioxyd-Niederschlag mit Aceton aus und digeriert ihn mehrere Male mit warmem Wasser.

¹³⁾ Vergl. Fußn. 5.

¹⁴⁾ Mikro-Dumas.

Aus dem intensiv gelben, deutlich alkalischen wäbr. Filtrat scheidet sich beim Ansäuern ein saures Produkt in gelbbraunen Flocken aus. Ein weiterer Anteil wird im Gemisch mit unverändertem Echinulin erhalten, wenn man die Aceton-Laugen zur Trockne dampft, den Rückstand mit Wasser aufnimmt und ansäuert.

Die Ausbeuten an roher Säure sind gering und wechselnd; aus 1 g Echinulin erhält man durchschnittlich 0.2 g des Produktes.

Man reinigt es durch langsames Eindampfen der Lösung in Aceton und erhält es so in kleinen Krystallen von mehr oder weniger intensiver, gelbbrauner Farbe, die bei 260--262° unter Zers. schmelzen. Die Analyse ergab 9.17% N.

Das Produkt ist wenig löslich in Wasser, leicht in Alkohol, Eisessig und Aceton; die wäbr. Lösung seines Natriumsalzes ist gelb und liefert Niederschläge mit löslichen Silber-, Blei-, Kupfer- und Eisensalzen.

Die Oxydation des Echinulins in wäbr. Suspension mit Kaliumpermanganat im Schüttelapparat geht bei gewöhnlicher Temperatur nur langsam vor sich. Auch hier beobachtet man die Bildung von Ammoniak und sauren, stickstoffhaltigen Produkten neben geringen Mengen flüchtiger Fettsäuren.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Zusammenfassung.

Aus dem trocknen Mycel eines Stammes von *Aspergillus echinulatus* Delecroix, Thom und Church, der auf einem Melasse-Nährboden geeigneter Zusammensetzung kultiviert wurde, wurde eine weiße krystalline Verbindung $C_{28}H_{39}O_2N_3$ vom Schmp. 242--243° isoliert, die Echinulin genannt wird. Sie wird im Pilz von gummig- und harzartigen Stoffen und von zwei wohlkrystallisierten Pigmenten begleitet, einem goldgelben, $C_{19}H_{28}O_3$, vom Schmp. 109--110° und einem orangeroten, $C_{19}H_{22}O_3$, vom Schmp. 152--153°, die nach ihrer Zusammensetzung, ihren Eigenschaften und ihrem chemischen Verhalten sich als identisch erwiesen mit den von Raistrick und Mitarbb. aus verschiedenen Varietäten von *Aspergillus glaucus* Link isolierten Pigmenten Flavoglucin und Auroglucin.

Aus 100 g trockenem Mycel erhält man 4--5 g Echinulin, 2 g gelbes Pigment und 1 g rotes Pigment in reinem Zustand.

Aus einer vorläufigen chemischen Untersuchung geht hervor, daß Echinulin drei durch Wasserstoff in Gegenwart von Platin hydrierbare Doppelbindungen enthält und mit Brom ein Hexabromid gibt. Bei der Chromsäure-Oxydation liefert es Aceton und geringe Mengen Fettsäuren von mittlerer Kohlenstoffzahl. Bei der Oxydation mit Permanganat bilden sich stickstoffhaltige, komplizierte, saure Produkte, die gelbe Salze liefern, neben Ammoniak und mittleren Fettsäuren.

56. Eugen Macovski und Julia Georgescu: Die Kondensation von 3-Nitro-4-methyl-benzonitril und 3-Nitro-4-methyl-benzamid mit Benzaldehyd.

¹Aus d. Biochem. Laborat. d. Naturwissenschaftl. Fakultät, Universität Bukarest.²

(Eingegangen am 18. Januar 1943.)

Der Verlauf der Reaktion von 5-Nitro-2-methyl-benzonitril (I; X = CN) und von 5-Nitro-2-methyl-benzamid (I; X = CO.NH₂) mit aromatischen Aldehyden hängt von den Reaktionsbedingungen und von den verwendeten Katalysatoren ab. Bei 140--160° und in Gegenwart von Piperidin bilden sich die entsprechenden substituierten 4-Nitro-2-cyan-stilbene bzw. 4-Nitro-stilben-carbonsäureamide-(2). Führt man aber die Kondensation in methyl-alkoholischer Lösung bei Zimmertemperatur und in Anwesenheit von Natrium-