

gefroren wird. Nachdem der größte Teil des Lösungsmittels abgedampft ist, kann man beobachten, daß sich an der Gefäßwandung mehr und mehr farbloses Dirhodan bildet, während im Innenraum die Zersetzung des Nitrosylrhodanids langsamer verläuft. Sobald die rote Farbe des Rhodanids fast vollkommen verschwunden ist, kondensiert man abermals die ursprünglich angewandte Lösungsmittelmenge ein und filtriert dann in die bisher leere Kugel II. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels bei -30° erhält man völlig farbloses Dirhodan in praktisch 100-proz. Ausbeute. (1 g KSCN enthält 0.598 g SCN.) Beim zweiten Eindampfen werden unter Umständen noch vorhandene geringe Mengen von Nitrosylrhodanid vollständig zersetzt. Das ausgefällte Kaliumchlorid bleibt auf der Fritte zurück. Infolge Benetzung an den Wandungen der ersten Kugel verbliebenes Dirhodan wandelt sich bald in orangefarbiges Polyrhodan um.

Da das Eindampfen der Nitrosylrhodanid-Lösung erhebliche Zeit erfordert (etwa 10 Stdn.), ist es zweckmäßig, mit dem Versuch am Anfang eines Arbeitstages zu beginnen. Es empfiehlt sich nicht, bereits die Lösung des Nitrosylrhodanids zu filtrieren, da sich dieses an den warmen Gefäßwandungen viel rascher in Polyrhodan umwandelt als das Dirhodan. Bei raschem, unvorsichtigem Eindampfen von Nitrosylrhodanid-Lösungen entsteht ebenfalls sofort Polyrhodan. Vor der Filtration kann der Versuch jederzeit beliebig lange unterbrochen werden, sofern das Umsetzungsgefäß in ein Kältebad genügender Kapazität eingetaucht wird. Erwähnenswert ist schließlich noch, daß sich bei der Zersetzung des Nitrosylrhodanids ein kleiner Anteil des Dirhodans verflüchtigt. Destillieren bzw. gut sublimieren läßt sich Dirhodan i. Hochvak. jedoch nicht.

Zur Bestimmung des Schmelzpunktes wurde das gebildete Dirhodan durch Umschwenken der konz. Lösung an den Wandungen der Kugel II in dünner Schicht verteilt. Durch Eintauchen in Wasserbäder bekannter Temperatur konnte festgestellt werden, daß die Substanz zwischen 15 und 16° schmilzt. Der genaue Schmelzpunkt ließ sich nicht beobachten, da sich die Substanz in der Nähe desselben bereits langsam zersetzt.

Analyse des Zersetzungsproduktes „Polyrhodan“:

(SCN)_x (58.08)_x Ber. C 20.68 N 24.12 S 55.20 Gef. C 21.02 N 24.16 S 54.93

185. Hans Brockmann und Gerhard Grothe: Über Actinomycetenfarbstoffe, II. Mitteil.: Limocrocin, ein gelber Actinomycetenfarbstoff**)

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]

(Eingegangen am 27. Mai 1953)

Aus der Kulturlösung von *Streptomyces limosus* wurde ein gelber, kristallisierter, stickstoffhaltiger Farbstoff, das Limocrocin, isoliert. Seine katalytische Hydrierung lieferte eine farblose, kristallisierte Verbindung $C_{26}H_{40}O_6N_2$.

Unter den mehr als zweitausend Actinomyceten-Stämmen, die bisher in unserem Institut aus Bodenproben verschiedener Länder isoliert wurden¹⁾, sind manche, die das Kulturmedium gelb färben. Einige davon sind Actinomycin-Bildner²⁾, bei den anderen ist über die chemische Natur der gelben Farbstoffe nichts bekannt. Ein Stamm dieser zweiten Gruppe, den W. Lindenbein in unserem Institut aus Teichschlamm abgetrennt und als neue Species

*) Herrn Prof. Dr. E. Weitz zum 70. Geburtstag gewidmet.

***) I. Mitteil. H. Brockmann, H. Pini u. O. v. Plotho, Chem. Ber. **83**, 161 [1950].

¹⁾ Die Isolierung der Stämme wurde von W. Lindenbein u. I. Olfermann durchgeführt.

²⁾ H. Brockmann u. N. Pfennig, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **292**, 77 [1953].

Streptomyces limosus genannt hat³⁾, gibt an die Kulturflüssigkeit einen gelben Farbstoff ab, der sich wie manche Polyene und wie Aureomycin mit tiefblauer, schnell vergänglicher Farbe in konz. Schwefelsäure löst. Diesen Farbstoff haben wir in kristallisierter Form isoliert und Limocrocin genannt. Über seine Untersuchung wird im folgenden berichtet.

Ausgangsmaterial für die Gewinnung des Limocrocins war die nach dreiwöchiger Bebrütung dunkelgelb gewordene Nährlösung von Oberflächenkulturen. Aus ihr läßt sich Limocrocin bei saurer Reaktion mit Chloroform, Butanol oder Amylacetat extrahieren. Dieses Verfahren ist, wenn größere Mengen verarbeitet werden, wegen der geringen Löslichkeit des Farbstoffes unständig und kostspielig. Es erübrigte sich, als wir fanden, daß das offenbar als Salz vorliegende Limocrocin nach Ansäuern der Kulturlösung, vermengt allerdings mit vielen Begleitstoffen, allmählich ausfällt. Das so aus insgesamt 360 l Kulturflüssigkeit erhaltene Rohprodukt diente nach erschöpfender Extraktion mit Äther und Methanol als Ausgangsmaterial (Rohfarbstoff I) für die weitere Arbeit.

Den Verlauf unserer Anreicherungsversuche haben wir mit dem Lange-Colorimeter verfolgt, wobei die mit Blaufilter gemessene Extinktion der in $2n$ Na₂CO₃ gelösten Fraktionen als Maß für den Limocrocin-Gehalt genommen wurde; ein Verfahren, dessen Genauigkeit durch das Vorhandensein von gelben und braunen Begleitstoffen beeinträchtigt wird. Der naheliegende Versuch, die charakteristische blaue Lösungsfarbe des Limocrocins in konz. Schwefelsäure colorimetrisch auszuwerten, scheiterte an ihrer Vergänglichkeit. Die Farbe schlug meistens schon nach Violett bzw. Braun um, ehe die Probe ganz gelöst war. Qualitativ leistet die Schwefelsäure-Reaktion dagegen gute Dienste.

Recht gut läßt sich zur colorimetrischen Bestimmung die beständige, weinrote Färbung verwenden, die in Acetanhydrid-Lösungen von Farbstoff-Rohprodukten nach Zusatz von konz. Schwefelsäure auftritt. Dieses Verfahren ist genauer als die Colorimetrie der gelben, alkalischen Farbstoff-Lösungen, weil braune und gelbe Begleitstoffe nicht stören. Seine Anwendung ist dadurch begrenzt, daß die Löslichkeit der Farbstoff-Frak-tionen in Essigsäureanhydrid mit zunehmendem Reinheitsgrad abnimmt und schließlich zu gering wird.

Wir haben zunächst versucht, den Rohfarbstoff I durch Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln weiter zu reinigen. Durch langdauernde Behandlung mit siedendem Anisol konnten dem schwerlöslichen Rohprodukt gelbe, amorphe Anteile entzogen werden, die Hauptmenge blieb jedoch ungelöst. Bemühungen, den Farbstoff durch Überführung in ein leichter lösliches Derivat handlicher zu machen, waren vergeblich; Acetanhydrid und Acetylchlorid ließen keine Einwirkung erkennen und Umsetzung mit Dimethylsulfat in Alkalilauge gab keine Produkte, die sich besser lösten als das Ausgangsmaterial. Ebenso erfolglos blieben Versuche, das Limocrocin aus ammoniakalischer Lösung als Schwermetallsalz auszufällen.

Dagegen gelang eine nicht unerhebliche Anreicherung durch Extraktion des Rohfarbstoffes mit Phosphatpuffer vom pH 8,0. Dabei hinterblieb ein beträchtlicher Rückstand, der keine Blaufärbung mit konz. Schwefelsäure mehr gab und demnach frei von Limocrocin war. Aus dem gelben Auszug fiel beim Ansäuern der Farbstoff als roter Niederschlag (Rohfarbstoff II) wieder aus. Versuche, durch fraktionierte Extraktion mit Phosphatpuffer eine weitere Anreicherung zu erzielen, waren erfolglos.

Einer Anwendung der Gegenstromverteilung oder Chromatographie steht die ungewöhnlich geringe Löslichkeit des Limocrocins im Wege. Auch während langdauernder

³⁾ W. Lindenbein, Arch. Mikrobiol. 17, 379 [1952].

Behandlung bei Siedehitze geht nur wenig Farbstoff in die zur Chromatographie oder Gegenstromverteilung geeigneten Lösungsmittel. So blieben bei einer über drei Wochen ausgedehnten Extraktion mit Chloroform rund 70% des eingesetzten Rohfarbstoffes II ungelöst. Obwohl sich somit der größte und beste Anteil des Rohfarbstoffes II den genannten Reinigungsverfahren entzieht, haben wir doch versucht, sie wenigstens auf den in Lösung gegangenen Anteil anzuwenden. Als Adsorbentien dienten Gips und Kieselsäure. Für die Gegenstromverteilung im System Chloroform-Phosphatpuffer wurde ein von Plattner⁴⁾ angegebenes Verfahren (fraktioniertes Ausschütteln aus schwach alkalischer Lösung, wobei nach jeder Extraktion das p_{H} verkleinert wird) benutzt. Keines der beiden Verfahren lieferte kristallisierten Farbstoff.

Zum Ziel kamen wir schließlich durch eine mit siedendem Eisessig im Kreisprozeß durchgeführte fraktionierte Extraktion des Rohfarbstoffes II. Dabei lösten sich zunächst braunrote, amorphe Begleitstoffe (Fraktion E_1). Als dann die Extraktion mit frischem Eisessig fortgesetzt wurde, erhielten wir einen gelbroten Auszug, aus dem sich bereits während des Extraktionsprozesses das Limocrocin in orangefarbenen, mikroskopisch kleinen Nadelchen abschied (Fraktion E_2). Auch der auf der Fritte des Extraktionsapparates verbleibende Farbstoff wurde kristallin (Fraktion E_3). E_3 ging je nach Qualität des eingesetzten Rohfarbstoffes II ganz oder nur teilweise in wäßrige Alkalilauge. Der alkaliumlösliche Anteil gab mit konz. Schwefelsäure keine Blaufärbung.

Fraktion E_2 löste sich bei erneuter Behandlung mit siedendem Eisessig nur sehr langsam und wenig, so daß zum Umkristallisieren von 23 mg im Extraktionsapparat 30 Stdn. gekocht werden mußte. Dabei tritt offenbar keine Veränderung des Farbstoffes ein, denn das auskristallisierende Limocrocin und das auf der Fritte zurückbleibende, noch nicht gelöste, zeigten den gleichen Schmelzpunkt wie das Ausgangsmaterial.

Das aus Eisessig umkristallisierte Limocrocin ist in Substanz dunkelrot, schmilzt unter Zersetzung bei 316° und löst sich in konz. Schwefelsäure mit leuchtend blauer Farbe, die schnell über Violett in Braun übergeht. Die blaue Lösung hat ein Absorptionsmaximum bei $667 \text{ m}\mu$. Limocrocin ist ungewöhnlich schwer löslich. Von den gebräuchlichen organischen Solvenzien nehmen nur Pyridin und Eisessig merkliche Mengen auf. Auch in wäßriger Alkalilauge ist die Löslichkeit gering, die Farbe dieser Lösungen ist nicht tiefer als die einer Eisessig-Lösung gleicher Konzentration.

Limocrocin enthält Stickstoff, aber keine C-Methyl-, Methoxy- oder N-Methyl-Gruppen. Seine potentiometrische Titration in Äthylendiamin mit Natrium-colaminat⁵⁾ ergab das Äquiv.-Gewicht 225.

Die kleinste mit Analysenzahlen und Äquiv.-Gewicht in Einklang stehende Formel $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}$ erschien den physikalischen Eigenschaften des Farbstoffes nach von vorneherein zu klein. Mol.-Gew.-Bestimmungen in Phenol zeigten denn auch, daß sie zu verdoppeln ist. Somit haben wir die Bruttoformel $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{N}_2$ vorläufig allen Berechnungen und Überlegungen zugrunde gelegt. Aus dem Äquiv.-Gewicht 225 ergibt sich dann die Anwesenheit von zwei sauren Gruppen. Daß es Carboxy-Gruppen sind, folgt aus der Löslichkeit des

⁴⁾ Pl. A. Plattner, E. Heilbronner u. S. Weber, *Helv. chim. Acta* **32**, 574 [1949], **33**, 1663 [1950].

⁵⁾ M. L. Moss, J. H. Elliot u. N. F. Hall, *Analytic. Chem.* **20**, 784 [1948].

Farbstoffes in Phosphatpuffer vom pH 8.0 und der Untersuchung des Perhydro-limocrocins.

Überraschend war der große Wasserstoffverbrauch bei der katalytischen Hydrierung. Da der Farbstoff in Eisessig zu wenig löslich ist (10 mg in 100 ccm bei 20°), arbeiteten wir in 0.4 n Na_2CO_3 mit großen Mengen Platinkatalysator. Dabei wurden insgesamt 7 Moll. Wasserstoff aufgenommen, und die gelbe Lösung entfärbte sich erst kurz vor der Sättigung. Das beim Ansäuern in fast theoretischer Ausbeute ausfallende Hydrierungsprodukt kristallisierte aus Methanol in farblosen Nadeln oder Blättchen, die bei 159 – 161° schmolzen.

Die Analysenzahlen des Perhydro-limocrocins, das in Eisessig und n NaOH keine optische Aktivität erkennen ließ⁶⁾, passen gut auf die Formel $C_{26}H_{40}O_6N_2$, die in Übereinstimmung mit der gemessenen Wasserstoffaufnahme (7 Moll.) 14 H mehr enthält als Limocrocin. Gleichzeitig ergibt sich aus dieser Formel, daß bei der Hydrierung weder Kohlenstoff noch Sauerstoff oder Stickstoff abgespalten wird. In Pyridin fanden wir bei 20° drei und bei 90° vier aktive Wasserstoff-Atome.

Perhydro-limocrocin läßt sich unter 10^{-3} Torr bei 180 – 200° unzersetzt destillieren und gibt, wie zu erwarten, mit konz. Schwefelsäure keine Farbreaktion. Seine Löslichkeit in Eisessig und Methanol ist erheblich größer als die des Limocrocins. Ebenso wie dieses löst es sich in Phosphatpuffer vom pH 8.0. Bei der Titration in alkoholischer Lösung fanden wir einen Verbrauch von zwei Äquiv. Base. Von konz. Salzsäure wird das Hydrierungsprodukt nicht aufgenommen; sein Stickstoff hat also wie der des Limocrocins keine oder nur sehr schwache basische Eigenschaften. Unter den bei α -Aminosäuren üblichen Bedingungen ließ sich kein Amino-Stickstoff nach *Van Slyke* nachweisen. Sodaalkalische Permanganat-Lösung wurde nach Zugabe der Perhydro-Verbindung grün und dann langsam farblos.

Aus dem in Kaliumbromid⁷⁾ gemessenen Infrarot-Spektrum des Perhydro-limocrocins, dessen Aufnahme und Auswertung wir Hrn. U. Schiedt verdanken, ergibt sich in Bestätigung und Erweiterung der chemischen Befunde folgendes: das Spektrum ist das einer weitgehend gesättigten Verbindung. Anhaltspunkte für das Vorliegen von Oxy-Gruppen und aromatischen Strukturen sind nicht vorhanden. Der saure Charakter der Perhydro-Verbindung rührt also nicht von phenolischen Oxy-Gruppen her, sondern von zwei Carboxylen, deren Anwesenheit durch die Bande bei 5.95μ angezeigt wird. Die Bande bei 6.4 – 6.5μ kann einer monosubstituierten Säureamid-Struktur zugeordnet werden (offenes Amid oder Lactam mit mehr als neun Ringgliedern). Diese Bindungsart des Stickstoffes macht das Fehlen basischer Eigenschaften verständlich.

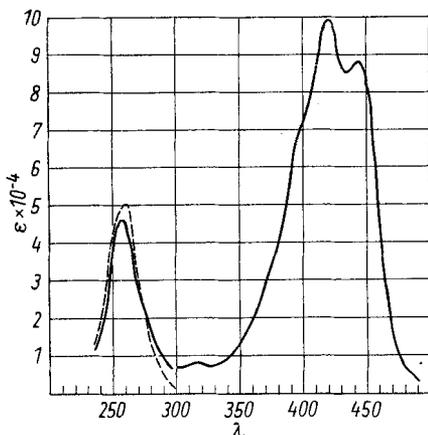
Die für Perhydro-limocrocin angenommene Formel $C_{26}H_{40}O_6N_2$ ist um 16 Wasserstoff-Atome ärmer als die einer völlig gesättigten aliphatischen Verbindung mit gleicher Anzahl Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Stickstoff-Atome.

⁶⁾ Wenn optische Aktivität vorhanden ist, müßte in Eisessig $[\alpha]_D^{20} < 7^\circ$ und $[\alpha]_D^{20}$ in n NaOH $< 3^\circ$ sein. Die Messung in konzentrierteren Lösungen war wegen der relativ geringen Löslichkeit des Perhydro-limocrocins nicht möglich.

⁷⁾ U. Schiedt u. H. Reinwein, Z. Naturforsch. 7 b, 270 [1952].

Von diesem Defizit kommen vier Wasserstoff-Atome auf die beiden Carboxygruppen und, falls zwei Säureamid-Gruppen vorhanden sind, vier Wasserstoffe auf diese. Es bliebe also noch ein Defizit von acht Wasserstoff-Atomen.

Daß Perhydro-limocrocin keine völlig gesättigte Verbindung ist, zeigt die Absorptionskurve seiner methanolischen Lösung (Abbild.).



Abbild. Lichtabsorption von Limocrocin in 0.4n Na_2CO_3 ———, Perhydro-limocrocin in Methanol - - - - -

Auf Grund der bisher vorliegenden Befunde läßt sich über das Grundgerüst des Farbstoffes folgendes aussagen: Limocrocin kann kein Oxy-chinon-Farbstoff sein, da es keine Oxy-Gruppen enthält und in alkalischer Lösung nicht tiefer gefärbt ist als in saurer. Wenn seine gelbe Farbe von einem kondensierten aromatischen Chinon-System herrührte, würde sich bei der Hydrierung in wäßrig-alkalischer Lösung sicher nicht so leicht und schnell eine Perhydro-Verbindung ohne aromatische Struktur bilden,

wie es der Fall ist. Für wahrscheinlicher halten wir es daher, daß Limocrocin seine gelbe Farbe einem System konjugierter aliphatischer Doppelbindungen verdankt und demnach ein Polyen-Farbstoff ist. Dafür spricht nicht nur seine tiefblaue, vergängliche Farbe in konz. Schwefelsäure und seine hohe Extinktion im langwelligen Gebiet⁸⁾, sondern vor allem auch die Tatsache, daß der Farbstoff in festem Zustand 7 Moll. Brom anlagert⁹⁾.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie danken wir für die großzügige Förderung unserer Arbeiten.

Beschreibung der Versuche

Kultur von *Streptomyces limosus*: Die zur Oberflächenkultur von *Streptomyces limosus* verwendete Nährlösung enthält in 80 l Regenwasser: 1.6 l Glycerin, 200 g Glykokoll, 80 g Natriumchlorid, 80 g Dikaliumhydrogenphosphat, 8 g Eisensulfat, 8 g Magnesiumsulfat und 1 g Calciumcarbonat. Sie wurde auf 60 P-Kolben verteilt, bei 120° sterilisiert, mit einer Vorkultur des Stammes beimpft und durchschnittlich 24 Tage bei 28° bebrütet. Nach dieser Zeit hatte sich auf der gelbbraun gewordenen Kulturlösung eine dichte Mycel-Decke gebildet.

Rohfarbstoff I: Die durch ein Sieb von der Hauptmenge des Mycels befreite Kulturlösung klärte sich beim Stehen und wurde vom Bodensatz abgehebert. Das Filtrat der zurückbleibenden Mycel-Suspension vereinigte man mit der abgeheberten Kulturlösung und stellte durch 8-proz. Salzsäure auf p_{H} 4.0 ein. Dabei färbte sich die gelbe Lösung rot, und es fiel ein braunroter Niederschlag aus, der i. Vak. über Kaliumhydroxyd getrock-

⁸⁾ Wegen der geringen Löslichkeit des Farbstoffes in Eisessig und in Pyridin wurde die Absorptionskurve in wäßrig-alkalischer Lösung gemessen.

⁹⁾ Verfahren von E. Rossmann, Ber. dtsh. chem. Ges. 65, 1847 [1932].

net und erschöpfend mit Äther und dann mit Methanol ausgezogen wurde. Der in der Extraktionshülse verbleibende Rückstand, getrocknet ein braunrotes Pulver, diente als Ausgangsmaterial (Rohfarbstoff I) für die weiteren Anreicherungsversuche; Ausb. 52 g aus 360 l Kulturlösung.

Rohfarbstoff II: 5 g Rohfarbstoff I extrahierte man sechsmal mit je 200 ccm m_{15} Phosphatpuffer vom p_H 8,0, wobei jedesmal 1 Stde. gerührt und das ungelöst gebliebene abzentrifugiert wurde. Aus den vereinigten, gelben Auszügen fiel nach Ansäuern auf p_H 4,0 ein Niederschlag, der getrocknet ein rotbraunes Pulver bildete (Rohfarbstoff II); Ausb. etwa 35% des Ausgangsmaterials.

Kristallisiertes Limocrocin: Zur fraktionierten Extraktion von Rohfarbstoff II diente ein Extraktionsapparat, dessen Einsatz im Dampf des Lösungsmittels stand und mit einem Jenaer Glasfrittenfilter G 2 versehen war. In folgender Weise wurden drei Fraktionen gewonnen: 1.) Extraktion bis der zuerst rotbraun ablaufende Eisessig gelb abtropfte; aus dem Extrakt schied sich die Fraktion E_1 aus. 2.) Nachdem der Apparat mit frischem Eisessig beschickt war, setzte man die Extraktion fort, bis sich praktisch kein Farbstoff mehr löste; aus dem so erhaltenen Auszug kristallisierte die Fraktion E_2 aus. 3.) Während dieser Extraktion wurde der auf der Fritte verbleibende Anteil kristallin (Fraktion E_3). Ausbeuten bezogen auf Ausgangsmaterial: Fraktion E_1 : 9%, Fraktion E_2 nach 24stdg. Extraktion: 24%, Fraktion E_3 : 21%.

$C_{20}H_{26}O_6N_2$ (462.5) Ber. C 67.52 H 5.66 O 20.76 N 6.06

Gef.*) C 66.74 H 5.61 O 20.61 N 5.87 Mol.-Gew.**) 460

*) Fraktion E_2 bei 60° i. Hochvak. über P_2O_5 getrocknet.

**) Nach Beckmann in Phenol.

Potentiometrische Titration: 5.704 mg Limocrocin wurden in 3 ccm Äthylendiamin mit 0.0394 Natrium-columinat potentiometrisch titriert. Gef. Äquiv.-Gew. 230; bei drei weiteren Bestimmungen wurde gefunden 234, 220, 218.

Katalytische Hydrierung: Zur Messung der Wasserstoff-Aufnahme diente eine Mikro-Apparatur, in der als Blindversuch die gleiche Menge Katalysator in der gleichen Menge Lösungsmittel geschüttelt wurde. Die Hydriergefäße befanden sich in einem auf 0,3° konstant gehaltenen Wasserbad. Ablesegenauigkeit der Wasserstoffbürette 0.01 ccm. Zur Hydrierung wurden 2.650 mg kristallisiertes Limocrocin in 5 ccm 0,4n Na_2CO_3 gelöst und mit 3 ccm der gleichen Lösung in das Hydriergefäß gespült, in dem vorher 18.6 mg PtO_2 (suspendiert in 5 ccm 0,4n Natriumcarbonat) aushydriert worden waren. Das Kontrollgefäß enthielt 18.8 mg Platinoxid in 10 ccm n Na_2CO_3 . Gesamtaufnahme: 0.91 ccm H_2 b. 0°/760 Torr; gef. 7 Moll. H_2 .

Perhydro-limocrocin. Man gab eine Lösung von 630 mg Limocrocin (Fraktion E_2) in 700 ccm 0,4n Na_2CO_3 zu einer vorher aushydrierten Suspension von 1 g Platinoxid in 150 ccm 0,4n Na_2CO_3 und schüttelte 18 Stdn. unter Wasserstoff. Die vom Katalysator abfiltrierte farblose Lösung säuerte man an und extrahierte das ausgefallene, amorphe Hydrierungsprodukt (600 mg) im Extraktionsapparat mit 50 ccm siedendem Methanol. Beim Erkalten fiel das Perhydro-limocrocin in glänzenden, schwach gelblichen Blättchen aus (461 mg). Umkristallisieren aus Methanol unter Zusatz von Tierkohle lieferte farblose, glänzende Blättchen, die bei 159–161° schmolzen.

$C_{20}H_{40}O_6N_2$ (476.6) Ber. C 65.52 H 8.46 O 20.14 N 5.88 4 akt. H 0.85

Gef.*) C 65.60 H 8.38 O 20.06 N 5.87 akt. H 0.85**)

*) Mittelwert aus vier Analysen von zwei verschiedenen bei 60° i. Hochvak. getrockneten Präparaten.

**) Bei 90° in Pyridin.

Bromierung des Limocrocins: Die auf einem Objektträger fein zerriebenen Substanzproben wurden in einem braunen, mit Bromdämpfen gefüllten Exsiccator 12 Stdn. aufbewahrt. Darauf brachte man die Proben in einem mit festen Natriumhydroxyd beschickten Exsiccator zur Gewichtskonstanz. 1.190 mg Limocrocin hatte nach 12stdg. Aufbewahren in Bromdampf und anschließendem 40stdg. Aufenthalt über Natriumhydroxyd 2.866 mg Brom aufgenommen; gef. 7 Moll. Br_2 . Das Bromierungsprodukt war ein farbloses, amorphes Pulver.