

wicklung nitroser Gase war dann noch nicht ganz beendet. Dann wurde im Vakuum eingedampft und dies nach jeweiligem Wasserzusatz noch mehrmals wiederholt. Der krystallisierte Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und mit einer Lösung von 5 g Bleiacetat in 25 cm³ Wasser versetzt. Das ausgefallene Bleisalz wurde abgenutscht, mit heissem Wasser dreimal gewaschen und getrocknet. Erhalten wurden 4,8 g. Diese wurden in 50 cm³ siedendem Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach Filtration wurde im Vakuum zur Trockne gebracht. Erhalten wurden 1,7 g Rückstand, der vollständig krystallisierte. Ein Teil wurde aus Dioxan umkrystallisiert. Smp. 169^o korr. Ein weiterer Teil wurde zur Bestimmung der Drehung ins saure Kaliumsalz übergeführt. 0,5 g der Säure wurden in wenig Wasser gelöst und mit einem geringen Überschuss an Kaliumacetat versetzt. Das Kaliumsalz begann sich bald auszuschcheiden. Nach Zusatz desselben Volums Alkohol wurde abgenutscht und einmal aus Wasser unter Alkoholzusatz umkrystallisiert. Ausbeute 0,5 g.

Zur Bestimmung der Drehung wurden 74,0 mg Kaliumsalz mit 2-proz. wässriger Kalilauge zu 2,526 cm³ gelöst ($c = 2,925$); $\alpha_D^{22} = -0,96^o$, also $[\alpha]_D^{22} = -32,82^o$.

Zum Vergleich wurde das saure Kaliumsalz der *d*-Weinsäure unter denselben Bedingungen gemessen. 73,5 mg *d*-Salz wie oben zu 2,526 cm³ gelöst ergaben $\alpha_D^{22} = +0,97$, also $[\alpha]_D^{22} = +33,41^o$.

Die Analyse wurde von Herrn *H. Gysel* durchgeführt.

Laboratorium für organische Chemie E. T. H. Zürich.

122. Carotinoide aus Purpurbakterien III¹⁾

von P. Karrer und U. Solmssen.

(25. VIII. 36.)

A. Einfluss der Züchtungsbedingungen für die Bakterien auf deren Carotinoidgehalt.

Wie früher haben wir auch jetzt wieder hauptsächlich mit den von Hr. Dr. *Gaffron* (Berlin) freundlichst zur Verfügung gestellten *Rhodovibrio*-Kulturen, Stamm Z., gearbeitet. Die Zusammensetzung der Nährflüssigkeit entsprach der früher²⁾ angegebenen, enthielt demnach als Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle Äpfelsäure und Asparagin. Kulturversuche auf anorganischem Nährboden (NaHCO₃, NH₄Cl, Na₂S₂O₃, MgCO₃, KH₂PO₄ und NaHS) führten zu viel langsamerem Wachstum der Bakterien-

¹⁾ II. Mitteilung Helv. **19**, 3 (1936).

²⁾ Helv. **18**, 1311—1312 (1935).

kulturen, doch schien sich die Zusammensetzung der Carotinoidmischung nicht wesentlich von jener zu unterscheiden, die aus den auf organischem Substrat gewachsenen Rhodovibriokulturen stammte.

Das Wachstum der Bakterienmasse ist im übrigen stark von Temperatur und Belichtung abhängig und die Ausbeuten an abzentrifugiertem Material und an Carotinoiden unterliegen daher gewissen Schwankungen. Auch die Zusammensetzung der den Rhodovibriokulturen entzogenen Carotinoidmischungen ist bei verschiedenen Ansätzen in qualitativer und quantitativer Hinsicht Schwankungen unterworfen; so konnte, worauf wir früher¹⁾ schon verwiesen, Flavorhodin öfters nicht festgestellt werden. Gelegentlich beobachteten wir eine Carotinoidfraktion, die mit β -Carotin identisch zu sein scheint, in anderen Ansätzen aber nicht gefunden wurde.

Das sehr komplizierte Carotinoidgemisch der Rhodovibriobakterien lässt sich auch bei Verarbeitung grosser Ansätze nur schwierig aufteilen. In Anbetracht der grossen Verluste bei den chromatographischen Trennungen können wir über das quantitative Verhältnis der verschiedenen Komponenten nichts Genaues aussagen. Es scheint aber, dass dieses unter dem Einfluss unbekannter Umstände auch etwas schwankt. Mengemässig am stärksten vertreten sind Rhodoviolascin und Rhodopin, die somit in erster Linie für die Färbung der Bakterien verantwortlich sind. Die Ausbeuten betragen für diese beiden gereinigten Pigmente je 20—30 mg pro 300 Liter reifer Nährlösung.

Thiocystisbakterien. Aus einer Fraktion eines Extraktes aus Thiocystisbakterien, den uns Herr Dr. Gaffron zur Verfügung stellte, hatten wir vor längerer Zeit²⁾ eine Carotinoidfraktion in kleiner Menge isoliert, die wir als Lycopin ansprachen. Es war uns damals nicht bekannt, dass es sich nur um eine Fraktion der Thiocystiscarotinoide handelte. Später³⁾ wurde vermutet, dass das von Gaffron als „Bakteriopurpurin“ bezeichnete Pigment ebenfalls ein Carotinoid sei. Diese Vermutung hat sich bestätigt und wir haben bereits kurz mitgeteilt⁴⁾, dass Rhodoviolascin, welches in Rhodovibriobakterien gefunden wurde, auch in Thiocystisbakterien vorkommt. Seither wurde ein Thiocystisstamm in grösserem Masstab bei uns weitergezüchtet und dessen Carotinoidgemisch untersucht. Dieses erwies sich als ebenso kompliziert zusammengesetzt wie jenes der Rhodovibriobakterien und schien letzterem auch in der Zusammensetzung nahestehen. Bei der üblichen Aufarbeitung der Schwefelkohlenstoffextrakte der Bakterienmasse lässt sich analog wie bei Rhodovibrio verhältnismässig leicht Rhodoviolascin dank

¹⁾ Helv. **18**, 1315 (1935).

²⁾ Helv. **19**, 25 (1936).

³⁾ Helv. **18**, 1309 (1935).

⁴⁾ Helv. **19**, 3 (1936).

seiner Schwerlöslichkeit in Petroläther und Benzol schon ohne chromatographische Reinigung abtrennen. Das Chromatogramm der restlichen Carotinoide gleicht demjenigen der Rhodovibrio-Carotinoide weitgehend, so dass auf die Bemerkungen über die einzelnen Farbstoffe bei Rhodovibrio verwiesen werden kann. Neben Rhodoviolascin ist Rhodopin in relativ grossen Mengen vorhanden. Ob das s. Z. als Lycopin angesprochene Pigment aus Thiocystis mit dem Tomatenfarbstoff identisch oder nur in den spektralen Eigenschaften nahe verwandt ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen; vergleiche dazu die Anmerkung Helv. 19, 3 (1936).

B. Untersuchungen an Rhodoviolascin und Rhodopin.

Um über die chemische Natur der Rhodovibrio-Carotinoide neue Aufschlüsse zu gewinnen, haben wir Rhodoviolascin und Rhodopin, die beiden Hauptpigmente, einer weiteren Bearbeitung unterworfen. Der Umstand, dass durch die Reinigung der Pigmente die Substanzmengen immer kleiner werden, erschwert die Bearbeitung. In den Schwefelkohlenstoffextrakten fand sich stets viel elementarer Schwefel, der durch Reduktionsprozesse aus dem als Nährsalz zugesetzten Magnesiumsulfat entstanden ist. Ob er innerhalb oder ausserhalb der Bakterien zur Ausscheidung gelangt, wurde nicht untersucht.

Im Calciumhydroxyd-Chromatogramm ordnen sich die Rhodovibrio-Carotinoide in folgender Weise an:

Erstes Chromatogramm:			Ergibt bei weiterer Reinigung:
Zone	Farbe	Absorpt.-Max. in CS ₂	
0 (oben)	braun		
1	rotbraun	548 510 m μ	Rhodovibrin 556 517 m μ Rhodopin 547 508 „
2	lachsrot	560 530 „	Rhodoviolascin 573 534 „
3	rot	552 512 „	Rhodopurpurin 550 511 „
4	dunkelgelb	520 487 „	β -Carotin? 521 485 „
5 (unten)	hellgelb	503 469 „	Flavorhodin 502 472 „

Anmerkung: Infolge eines Druckfehlers wurde in einer früheren Mitteilung¹⁾ die erste Absorptionsbande des Flavorhodins bei 520 m μ statt 502 m μ angegeben.

Nachdem wir von Rhodoviolascin und Rhodopin, den beiden Hauptcarotinoiden der Mischung, etwas mehr Material gesammelt hatten, konnte ihre Untersuchung weitergeführt werden. Die Schwierigkeit der Materialbeschaffung ist der Grund, warum die Bearbeitung der beiden Pigmente auch heute noch lückenhaft ist.

Rhodoviolascin. Wir haben früher mitgeteilt, dass beim Ozonabbau des Rhodoviolascins Aceton entsteht oder jedenfalls ein Keton der Formel RCOCH₃, das mit Jod und Alkali Jodoform

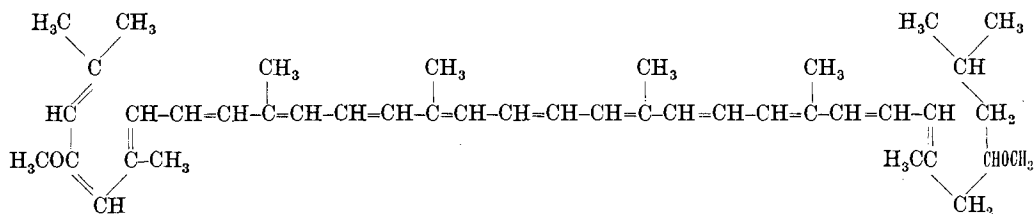
¹⁾ Helv. 18, 1311 (1935).

liefert; die Reindarstellung des p-Nitrophenylhydrazons konnte mit den zur Verfügung stehenden Mengen noch nicht ausgeführt werden.

Der Ozonabbau wurde wie bei Lycopin vorgenommen¹⁾. 50,4 mg Rhodoviolascin lieferten eine Jodoformmenge, die 3,6 mg Aceton entspricht; bei einem zweiten Versuch wurden aus 100,7 mg Rhodoviolascin 5,8 mg Aceton erhalten. Diese Mengen entsprechen 73 bzw. 60 % der für 1 Mol Aceton aus 1 Mol Rhodoviolascin berechneten. Parallelversuche mit Lycopin führten, wie früher¹⁾, zu Werten, die zwischen 1 und 2 Mol Aceton lagen. Daraus ist der Schluss zu ziehen, dass im Rhodoviolascin nicht mehr als eine Isopropylidengruppe $(CH_3)_2C=$ vorkommt. In dieser Beziehung ist es vom Lycopin scharf unterschieden.

Bei der Ozonisierung (und anderen Oxydationen) des Rhodoviolascins tritt stets ein charakteristischer, etwas ranziger, an höhere Ketone erinnernder Geruch auf. Die Verbindung ist mit Wasserdämpfen flüchtig, allerdings schwer und zwar auch aus alkalischer Lösung, so dass keine Carbonsäure, sondern wahrscheinlich ein Keton vorliegt.

Bei Berücksichtigung der Analyse, der 2 nachgewiesenen Methylgruppen, der Hydrierungszahl (13 \bar{F}), der langwelligen Absorption, die für ununterbrochene Konjugation der Äthylendoppelbindungen spricht und den Ergebnissen des Ozonabbaus könnte man versuchen, für Rhodoviolascin probeweise folgendes Bild in Betracht zu ziehen; es bedarf selbstverständlich weiterer Prüfung:



Rhodopin. Die Reinigung dieses Pigments ist schwierig und auch unsere besten Präparate sind noch nicht ganz rein und einheitlich.

Die Isolierung des Rhodopins kann entweder direkt durch Chromatographie des rohen Gemisches der Rhodovibrio-Carotinoide geschehen oder nach vorhergehender Abtrennung der Hauptmenge des Rhodoviolascins durch Krystallisation aus Petroläther. In letzterem Fall scheidet sich beim starken Abkühlen der Petrolätherflüssigkeit rohes Rhodopin in dunkelroter, mikrokristalliner Form ab. Die weitere Reinigung hat in jedem Fall durch mehrfach wiederholte

¹⁾ Karrer und Mitarbeiter, Helv. 14, 435 (1931).

Adsorptionen an Calciumhydroxyd zu geschehen, wobei wir die Entwicklung des Chromatogramms mit einer Mischung von Petroläther-Benzol (1:1 oder 1:2) vornehmen. Selbst nach dreimaliger Adsorption konnte unterhalb der Hauptmenge im Chromatogramm ein schmaler, lachsfarbener Streifen abgetrennt werden, der sich als Rhodoviolascin erwies und die Ursache eines geringen Methoxylgehaltes der betreffenden Rhodopinfractionen gewesen war. Diese geringen Beimengungen haben auf das Absorptionsspektrum des Rhodopins keinen wahrnehmbaren Einfluss, da dieses schon für unreinere Fractionen ziemlich scharf bei 547, 508, 478 $m\mu$ liegt (in CS_2).

Trennt man die Hauptzone des Chromatogramms einer weitgehend gereinigten Rhodopinfraction willkürlich in 3 gleiche Teile, so zeigt die oberste Zone (oberstes Drittel) eine um ca. 10 $m\mu$ langwelligere erste Absorptionsbande als die unterste Zone, deren Maxima bei 547, 508, 478 $m\mu$ liegen. Selbst nach wiederholter chromatographischer Reinigung enthält Rhodopin also noch ein anderes Carotinoid von sehr ähnlichen Adsorptionsverhältnissen.

Das aus dem obersten Zonenanteil des Chromatogramms erhaltene (noch nicht reine) Carotinoid wurde Rhodovibrin genannt¹⁾. Es ist Sauerstoffhaltig, krystallisiert in kleinen, dunkelroten Krystalldrusen, die sich von jenen des Rhodopins nicht unterscheiden lassen. Auch im Smp. (168°) stimmen beide Pigmente im vorliegenden Reinheitsgrad annähernd überein. Dagegen wurden für Rhodovibrin in Schwefelkohlenstoff die Absorptionsmaxima 556, 517 $m\mu$ gefunden.

Aus dem untersten Zonenanteil der oben erwähnten, willkürlichen Aufteilung des Chromatogramms in 3 Schichten wurden die bisher reinsten Rhodopinfractionen erhalten. Aus Benzol-Petroläthermischung kleine Krystalldrusen. Smp. ca. 168°.

Die Analysen verschiedener Präparate fielen in den Kohlenstoffwerten etwas verschieden aus, ein Beweis, dass die Präparate noch nicht rein sind. Die früher mitgeteilte Kohlenstoffbestimmung²⁾ war jedenfalls zu tief. Eine Bruttoformel kann für das Pigment noch nicht aufgestellt werden.

Bestimmung der aktiven H-Atome nach *Zerewitinoff*:

18,866 mg Rhodopin gaben 0,96 cm^3 CH_4 (25°, 729 mm)

Gef. 0,19% aktiver Wasserstoff. Ber. für 1 Atom aktiver H 0,17%.

Rhodopin enthält daher anscheinend 1 OH-Gruppe. Mehr als ein Hydroxyl kann im Pigment nicht vorkommen, da es epiphasisch ist, während Poly-ene mit 2 freien Alkoholgruppen in die Methanolschicht übertreten.

¹⁾ Helv. 19, 3 (1936).

²⁾ Helv. 18, 1310 (1935).

Die Verbindung bildet unter Bedingungen, unter denen Astacindioxim leicht entsteht, kein Oxim. Bei kurzer Reduktion mit Zinkstaub und Eisessig erfolgte keine Verschiebung der Absorptionsbanden. Eine Ketogruppe liess sich somit bisher nicht nachweisen. Methoxygruppen sind nicht vorhanden.

Bei der Mikrohydrierung wurden 11,93 und 11,71 Mol H_2 addiert (in einer Mischung von 3 Vol Äthanol + 2 Vol. Eisessig). Rhodopin scheint demnach 12 Doppelbindungen zu enthalten.

Zusammenfassend lassen sich über die chemische Natur der Rhodovibrio-Carotinoide bis heute folgende Aussagen machen:

Rhodopin ist ein hydroxylhaltiges Pigment mit wahrscheinlich 1 OH-Gruppe, 12 Doppelbindungen. Auch Rhodovibrin muss, was sich aus seiner Stellung im Chromatogramm ergibt, ein Polyenalkohol sein. Rhodoviolascin $C_{42}H_{30}O_2$ besitzt 2 OCH_3 -Gruppen, 13 Doppelbindungen, die sehr wahrscheinlich alle konjugiert sind; in ihm kommt höchstens 1 Isopropylidenrest vor. (Eine mögliche Formulierung siehe oben). Im Rhodopurpurin liegt ein Kohlenwasserstoff vor, der in spektraler Hinsicht dem Lycopin sehr nahe steht. Identität mit Lycopin ist fraglich, aber möglich. Gelegentlich wird auch β -Carotin im Chromatogramm gefunden. Flavorhodin ist nach der Lage im Chromatogramm voraussichtlich ein Kohlenwasserstoff, jedenfalls kein Poly-en mit freien OH-Gruppen.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

123. Hydrierungszahl des Violaxanthins

von P. Karrer und U. Solmssen.

(25. VIII. 36.)

Für Violaxanthin werden in der Literatur 11 Doppelbindungen angegeben¹⁾, obwohl der Reduktionsversuch nur zur Aufnahme von 10,5 Mol H_2 führte. Bei Versuchen, die in anderem Zusammenhang stehen, haben wir die Hydrierungszahl reiner Violaxanthinpräparate wiederholt bestimmt und dabei stets Werte erhalten, die einer Wasserstoffaufnahme von 9,5—10 Mol entsprechen.

0,119 gr Violaxanthin absorbierten in Eisessig $50,0 \text{ cm}^3 H_2$ (16,5°, 720 mm) = $44,5 \text{ cm}^3$ bei 0°, 760 mm.

3,845 mg Violaxanthin absorbierten in 3 cm^3 Äthanol + 2 cm^3 Eisessig $1,55 \text{ cm}^3 H_2$ (20,2°, 730,5 mm)

Gefunden: 1) 9,5 Mol. H_2 . 2) 9,64 Mol H_2 .

¹⁾ R. Kuhn und A. Winterstein, B. 64, 326 (1931).