

„Norsäure“-Fraktion (Fraktion S 3). Die 4,9 g Rohprodukt wurden mit 16 cm<sup>3</sup> Methanol und 16 cm<sup>3</sup> 2-proz. methylalkoholischer Salzsäure 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Es wurden 575 mg nicht methylierte Säuren und 4,46 g Ester erhalten. Diese wurden mit 4 cm<sup>3</sup> Pyridin und 7 cm<sup>3</sup> Essigsäureanhydrid 4 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde das 4,79 g betragende Rohprodukt über 100 g Aluminiumoxyd nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Durch Nachwaschen mit Benzol-Petroläther-Gemischen sowie mit reinem Benzol wurde die Hauptmenge der Substanz eluiert, doch war keine der Fraktionen, da zur Zeit kein 3 $\alpha$ ,12 $\beta$ -Diacetoxy-nor-cholansäure-methylester zur Verfügung stand, zur Krystallisation zu bringen.

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule Zürich (Leitung *W. Manser*) ausgeführt.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

---

### 191. Ein Carotinfarbstoff von neuartigem Charakter aus roter Hefe (*Torula rubra*)

von *P. Karrer* und *J. Rutsemann*.

(13. X. 43.)

Die roten Hefen sind trotz ihrer oft intensiven Färbung verhältnismässig arm an Pigmenten. Diese Farbstoffe haben in den letzten Jahren von zwei Seiten eine orientierende Bearbeitung erfahren. *Lederer*<sup>1)</sup> hat in einer *Torula rubra*-Art aus dem Institut Pasteur 4 Carotinoide nachgewiesen und zwei davon krystallisiert erhalten. Die beiden letzteren waren  $\beta$ -Carotin und ein vorher unbekanntes Pigment *Torulin*, dessen Absorptionsspektrum vierbandig war (in Schwefelkohlenstoff Absorptionsmaxima bei 566, 522, 491 und 461 m $\mu$ ). Das dritte, nicht isolierte Pigment hatte die Eigenschaften eines Kohlenwasserstoffs und war leicht zersetzlich. Dem vierten, ebenfalls nicht isolierten Farbstoff kamen saure Eigenschaften zu; er erinnerte in seinem Verhalten an *Astacin*, absorbierte aber langwelliger, in Schwefelkohlenstoff lagen die Absorptionsmaxima bei 583, 543 und 500 m $\mu$ , in Petroläther bei 530, 494 und 460 m $\mu$ .

Eine weitere Untersuchung der *Torulapigmente* liegt von *Fink* und *Zenger*<sup>2)</sup> vor. Diese Autoren isolierten 2 Farbstoffe, einen, den sie mit *Torulin* identisch halten und einen zweiten, der mit dem

---

<sup>1)</sup> *E. Lederer*, C. r. **113**, 1015 (1933). — Recherches sur les Caroténoïdes des Animaux inférieurs et des Cryptogames. Thèse, Université de Paris 1938.

<sup>2)</sup> *Wochschr. Brauerei* **1934**, No. 12.

„sauren Pigment“ *Lederer's* übereinzustimmen scheint. Die isolierten Mengen scheinen für Analysen und eine weitere Untersuchung nicht ausgereicht zu haben, da über solche nichts mitgeteilt wird.

Das Ausgangsmaterial für unsere Untersuchung wurde im Hygiene-Institut der Universität Zürich von Hrn. Prof. *H. Mooser* kultiviert, dem wir dafür auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen. Es standen uns ca. 8 kg Torulabrei (aus 320 *Roux*-Schalen) zur Verfügung. Das Hauptpigment dieser *Torula rubra*-Art war der schon von *Lederer* und von *Fink* und *Zenger* beobachtete „saure Farbstoff“, von dem wir ca. 20 mg in krystallisierter Form isolieren konnten. Wir nennen ihn *Torularhodin*. Daneben beobachteten wir  $\beta$ -Carotin. Von anderen Pigmenten waren nur Spuren vorhanden, so dass sie nicht näher charakterisiert werden konnten.

Das *Torularhodin* besitzt von allen bisher bekannt gewordenen Carotinoiden das langwelligste Absorptionsspektrum und ist schon aus diesem Grunde von Interesse. Dazu kommt, dass es sich in verschiedenen Punkten von allen übrigen Carotinoiden wesentlich unterscheidet, so dass man annehmen muss, dass es auch in der Konstitution besondere Merkmale zeigen wird.

Schon seine grosse Zersetzlichkeit ist auffallend. Wenn man die feuchte *Torula*-Masse mit Aceton heiss extrahiert, tritt bereits weitgehende Entfärbung, also Zerstörung des Farbstoffes, ein. Wir haben daher eine Kaltextraktion angewandt, die sich bewährte.

Den Extrakt haben wir nicht verseift, sondern direkt an Zinkcarbonat chromatographiert. Hierbei wird das *Torularhodin* im obersten Teil der Adsorptionssäule so fest adsorbiert, dass es nur nach Zusatz verdünnter Essigsäure mit einer Äther-Methanollösung wieder abgelöst werden kann. Eine weitere Reinigung erfolgte durch Ausfällen des Natriumsalzes aus Methanollösung durch Zugabe kalter Natriummethylatlösung. Zusammen mit Seifen fiel dabei das Natriumsalz des *Torularhodins* momentan aus. Nach der Zerlegung mit verdünnter Essigsäure liess sich der Farbstoff ohne weitere Reinigung aus Methanol krystallisieren. Die angewandte Isolierungsmethode gibt die Gewissheit, dass das Pigment in der isolierten Form und nicht etwa als Ester in der roten Hefe vorkommt.

*Torularhodin* krystallisiert aus Äther-Methanol-Gemisch in feinen roten Nadeln. Das Krystallpulver sieht fast schwarz aus. Die Analyse ergab

C 82,16 H 10,20%.

Es ist möglich, dass der ermittelte Kohlenstoffwert noch etwas zu tief ist, da wir ein nur einmal umkrystallisiertes Präparat analysieren mussten.

In Schwefelkohlenstoff, Chloroform und Pyridin löst sich der Farbstoff leicht, schwerer in Äther, Benzol und heissem Alkohol, sehr schwer in Methanol und fast gar nicht in Petroläther.

Bei der Verteilungsprobe zwischen Petroläther und 95-proz. Methanol färbten sich beide Schichten ungefähr gleich stark.

Verdünnte methanolische Kalilauge entzieht den Farbstoff einer Petrolätherlösung vollkommen. Aus Äther fällt beim Schütteln mit wässriger Lauge das Natriumsalz des Torularhodins in der Grenzschicht aus.

Die Absorptionsmaxima des Torularhodins in verschiedenen Lösungsmitteln liegen wie folgt:

Schwefelkohlenstoff . . . . .	582 m $\mu$	541 m $\mu$	502 m $\mu$
Benzol . . . . .	557 „	519 „	485 „
Benzin . . . . .	537 „	501 „	(467) „
Pyridin . . . . .	558 „	518 „	485 „
Chloroform . . . . .	554 „	515 „	(483) „
Methanol . . . . .	529 „	493 „	(460) „
Äthanol . . . . .	532 „	495 „	463 „
Äthanol mit Natriumäthylatzusatz .	532 „	495 „	463 „

An diesen spektralen Werten fällt zunächst der grosse Unterschied in den Lagen der Absorptionsmaxima auf, wenn man die Spektren in Schwefelkohlenstoff einerseits, in Benzin oder Alkohol andererseits vergleicht. Wir finden hier Differenzen von 50 bis 45 m $\mu$  (langwelligste Banden), während sie bei anderen Carotinoiden meistens nur ca. 30–40 m $\mu$  betragen.

Hinzuweisen ist ferner auf die Tatsache, dass zwischen den Spektren des Torularhodins in Alkohol und in einer Lösung von Natriumäthylat in Alkohol, in der das Pigment als Natriumsalz vorliegt, kein Unterschied besteht. Man kann daraus die Folgerung ziehen, dass bei der Bildung des Natriumsalzes keine konstitutionelle Änderung, insbesondere keine Enolisierung aus einer Carbonylform erfolgt. Falls Torularhodin eine enolisierte Carbonylgruppe enthalten sollte, muss diese schon im freien Pigment weitgehend enolisiert vorliegen.

Ein Versuch, aus Torularhodin durch Umsatz mit Hydroxylamin in siedendem Alkohol ein Oxim darzustellen, verlief negativ. Die Eigenschaften des Farbstoffs veränderten sich hierbei nicht. Auch nach einstündigem Kochen mit alkoholischer Kalilauge (Stickstoffatmosphäre) waren die Löslichkeits- und Verteilungsverhältnisse unverändert.

Gegenüber Antimontrichlorid und starken Säuren verhält sich Torularhodin wesentlich anders als alle übrigen bekannten Carotinoide. Antimontrichlorid in Chloroform ruft im ersten Moment eine permanganatrote Färbung hervor, die aber sofort völlig ausbleicht; nach einiger Zeit nimmt die farblos gewordene Lösung eine schwach bläuliche Färbung an. Auch wasserfreie Ameisensäure und

konz. Schwefelsäure bewirken Entfärbung der gelbroten Torularhodinlösung, worauf diese nach einigem Stehen eine schwach blaue Farbe annimmt. Trichloressigsäure, zur Chloroformlösung des Farbstoffes hinzugefügt, ruft nach dem Ausbleichen schwache Grünfärbung hervor.

Ähnlich wie alle Carotinoide, deren System konjugierter Kohlenstoffdoppelbindungen durch 2 Carbonyl- oder Carboxylgruppen abgeschlossen wird (Crocetin, Bixin, Rhodoxanthin, Carotinon etc.) wird Torularhodin in Pyridinlösung durch Zusatz von etwas Zinkstaub und Eisessig schnell zu einem hellgelben Hydrierungsprodukt reduziert, das man aus Analogiegründen als Dihydroderivat auffassen darf. Dieses Reduktionsprodukt besitzt folgende Absorptionsmaxima

in Schwefelkohlenstoff . . . . .	482	453	m $\mu$
in Petroläther . . . . .	453	? <sup>1)</sup>	m $\mu$

Dieses Reduktionsprodukt gibt, im Gegensatz zum Torularhodin selbst und in Übereinstimmung mit allen anderen Carotinoiden, mit Antimontrichlorid eine ziemlich beständige Blaufärbung. Bei der Verteilung zwischen Petroläther und Methanol verhält es sich etwas hypophasischer als das Ausgangsmaterial. Wie dieses lässt es sich aus Petrolätherlösung mit verdünnter methanolischer Kalilauge quantitativ ausziehen, reagiert also sauer.

Über die Bruttoformel und die Konstitution des Torularhodins kann man sich vorerst noch keine Vorstellungen machen, dazu sind die heute vorliegenden Versuchsergebnisse noch nicht ausreichend. Immerhin lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

Der saure Charakter des Torularhodins wird wahrscheinlich in erster Linie durch eine Carboxylgruppe bedingt. Dass nicht eine enolisierende Carbonylgruppe wie im Astacin für die Acidität verantwortlich ist, kann daraus gefolgert werden, dass auch das hellgelbe Dihydro-torularhodin sauren Charakter besitzt. Als wahrscheinlich darf man annehmen, dass Torularhodin nur 1 Carboxyl enthält, denn Polyendicarbonsäuren, wie Bixin und Crocetin, verhalten sich beim Entmischungsversuch rein hypophasisch, während sich Torularhodin zwischen beide Phasen ungefähr gleichmässig verteilt.

Das sehr langwellige Absorptionsspektrum des Pigments setzt eine grosse Zahl von konjugierten Doppelbindungen voraus. Vermutlich werden diese am einen Ende durch die Carboxylgruppe begrenzt. Aus dem Reduktionsversuch mit Eisessig und Zinkstaub in Pyridin muss weiterhin gefolgert werden, dass mit den Kohlenstoffdoppelbindungen vielleicht auch eine Carbonylgruppe bzw. eine Enolgruppierung in Konjugation steht. Würde diese das andere Ende der gesamten Konjugation von Doppelbindungen begrenzen, so wäre beim Übergang des Farbstoffs in das Dihydroderivat eine Verschie-

<sup>1)</sup> Die zweite Bande ist bei visueller Bestimmung nicht wahrnehmbar und dürfte bei ca. 423 m $\mu$  liegen.

bung des langwelligsten Absorptionsmaximums in Petroläther um ca. 45  $m\mu$ , in Schwefelkohlenstoff um ca. 70  $m\mu$  zu erwarten. (Rhodoxanthin 524  $m\mu$ , Dihydro-rhodoxanthin 480  $m\mu$  in Petroläther; Bixin 522  $m\mu$ , Dihydro-bixin 452  $m\mu$  in Schwefelkohlenstoff.) Die Reduktion des Torularhodins zum Dihydroderivat ist jedoch mit einer Verschiebung des langwelligsten Absorptionsmaximums in Petroläther um ca. 84  $m\mu$ , in Schwefelkohlenstoff um 100  $m\mu$  verbunden. Dies lässt sich vielleicht so deuten, dass eine Carbonyl- bzw. Enol-Gruppe mittelständig in das gesamte konjugierte System eingebaut ist, so dass nach der Reduktion zum Dihydroderivat die Konjugation stärker verkürzt wird.

Über alle diese Fragen kann erst die weitere Untersuchung des Farbstoffs Aufschluss geben. Die geschilderten Beobachtungen lassen indessen erkennen, dass im Torularhodin ein Carotinoidpigment von besonderer Eigenart vorliegt.

#### Extraktion.

Zuerst wurde versucht, die Hefezellen durch Eintragen in Aceton-Kohlendioxyschnee aufzuschliessen und nachher durch Kochen mit Aceton zu extrahieren. Der Aufschluss war jedoch unvollständig und beim Kochen trat weitgehende Zerstörung der Farbstoffe ein. Wir sind aus diesen Gründen folgendermassen vorgegangen: Der Hefebrei wurde mit der doppelten Menge Alkohol kräftig durchgeschüttelt und unter Kohlendioxyd 3 Tage stehen gelassen. Dann nutschte man auf einem mit Sand bestreuten Filter ab, zerrieb die noch feuchte Masse gründlich mit Quarzsand und übergoss sie in einem Rundkolben mit etwa der gleichen Menge Aceton. Der Kolben wurde durch Evakuieren entlüftet und 24 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Nach dem Abnutschen der festen Anteile zerrieben wir diese erneut und wiederholten die Extraktion in derselben Weise. Nach dieser Behandlung war die Hefemasse annähernd farblos. Die vereinigten Lösungen wurden mit etwas Wasser versetzt und mit möglichst wenig Petroläther, der die Farbstoffe vollständig aufnahm, ausgezogen. Dann haben wir die Petrolätherlösung mit Wasser gewaschen, im Vakuum eingedampft und bis zur weiteren Verarbeitung den öligen Rückstand in evakuierten Ampullen aufbewahrt. In dieser Weise konnten Extrakte aus ca. 8 kg Hefebrei (320 Roux-Schalen) gesammelt werden.

#### Isolierung des sauren Farbstoffes.

Die Heferohextrakte wurden in Petroläther aufgenommen, an zwei Säulen von Zinkcarbonat ( $3 \times 45$  und  $4 \times 30$  cm) adsorbiert und die Chromatogramme mit Benzol entwickelt. Der weitaus grösste Teil des Farbstoffes haftete in den obersten Schichten mit tief violetter Farbe. Im unteren Teil traten zwei weitere, sehr schwache Streifen von violetter und gelber Farbe auf, aus denen jedoch keine Farbstoff-

lösungen mit erkennbarem Spektrum erhalten werden konnten. Ein weiterer Farbstoff wurde durchgewaschen und zeigte das Spektrum des  $\beta$ -Carotins.

Die Hauptzonen der Chromatogramme wurden abgetrennt und mit Äther, Methanol und wieder Äther gründlich ausgewaschen. Diese Lösungsmittel blieben dabei fast farblos. Dann wurde das Adsorbat mit 5 Portionen Eisessig-Methanol 1:10 eluiert und das saure Eluat mit Petroläther versetzt. Nach dem Entmischen mit Wasser haben wir den Petroläther mit ganz verdünnter Bicarbonat-Lösung und Wasser säurefrei gewaschen und eingedampft. Der dunkelrote, ölige Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen und der Farbstoff zusammen mit farblosem Material durch Zugabe von alkoholischer Natriumäthylat-Lösung als Natriumsalz ausgefällt. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit wenig Methanol, Äther und Petroläther gewaschen, getrocknet, unter Petroläther mit Eisessig zersetzt, die Petroläther-Lösung gewaschen, eingedampft und der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen. Beim allmählichen Verdünnen mit Methanol bis auf 20 cm<sup>3</sup> schied sich der Farbstoff als schwarzvioletttes Krystallpulver aus. Nach dem Umlösen aus Benzol-Methanol-Gemisch wurden 10 mg Farbstoff vom Smp. 201—203<sup>0</sup> (im evakuierten Röhrchen, unkorrr.) erhalten.

Die Krystallform war unter dem Mikroskop bei diesem Präparat nicht zu erkennen. Beim langsamen Eindunsten einer ätherischen Lösung mit etwas Methanol krystallisierte der Farbstoff in feinen roten Nadeln.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

---

## 192. Zur Frage der Wirkungsweise der Vitamine K<sub>1</sub> und K<sub>2</sub>

von P. Karrer und F. Koller.

(13. X. 43.)

Zur Frage der Wirkungsweise der Vitamine K<sub>1</sub> und K<sub>2</sub> haben *M. M. Shenikina*, *L. A. Schukina* und *J. B. Shvezov*<sup>1)</sup> eine neue Ansicht geäußert. Nach derselben beruht die Wirkung dieser Verbindungen auf die Blutgerinnung darauf, dass sie im Organismus zunächst zu Phtalsäure oxydiert werden, die dann die eigentlich wirksame Verbindung wäre. Phtalsäure-diäthylester soll nach den Angaben der genannten Autoren starke antihämorrhagische Eigenschaften besitzen. Sie betrachten daher die Phtalsäure als das eigentliche Vitamin K und die Vitamine K<sub>1</sub> (Phyllochinon) und K<sub>2</sub> als Provitamine.

<sup>1)</sup> Nature (London) 151, 585 (1943).