

Die freie Base gab bei der Oxydation mit Chromsäure nach *Kuhn-Roth* folgende Werte:

148,1; 101,2 mg Subst. verbr. 32,6; 21,5 cm<sup>3</sup> 0,0333-n. NaOH  
Gef. 1,03; 0,98 Mol Äqu. CH<sub>3</sub>COOH

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von den HH. *H. Gubser* und *W. Manser* ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

## 20. Über ein Welke erzeugendes Stoffwechselprodukt von *Fusarium lycopersici* *Sacc.*

von *Pl. A. Plattner* und *N. Clauson-Kaas*.

(23. XII. 44.)

### Einleitung

Gewisse Pilze, die als Parasiten auf Pflanzen leben, haben die Fähigkeit, ihre Wirtspflanze zum Welken und zum Absterben zu bringen. Solche Welkekrankheiten werden u. a. auch von Pilzen der Gattung *Fusarium* hervorgerufen (*Fusariosen*) und sind vor allem an wertvollen Kulturpflanzen untersucht worden, da die wirtschaftlichen Schäden, welche durch den Pilzbefall entstehen, sehr erheblich sind<sup>1)</sup>.

Dass der Pilzbefall die primäre Ursache der Welkekrankheiten ist, ist heute unbestritten. Dagegen herrscht über die Art und Weise, in welcher die schädigende Wirkung der Pilze zustande kommt, noch keineswegs Klarheit. Die von vielen Forschern vertretene Ansicht, dass in erster Linie toxische Stoffwechselprodukte der Pilze für das Welken der Pflanzen verantwortlich sind, ist noch nicht sichergestellt, und auch nicht allgemein anerkannt<sup>2)</sup>. Diese Frage wird sich erst mit Aussicht auf Erfolg bearbeiten lassen, wenn es gelingt, die giftigen Stoffwechselprodukte der Parasiten zu isolieren und für phytopathologische Versuche zur Verfügung zu stellen.

Die Toxin-Theorie der Welkekrankheiten fusst vor allem auf der Beobachtung, dass Filtrate von Kulturen pathogener Pilze, die auf künstlichen Nährböden gezüchtet wurden, imstande sind, gesunde Pflanzen zum Welken zu bringen. Da es wahrscheinlich ist, dass die in solchen Kulturfiltraten vorhandenen Toxine mit den bei parasitärem Wachstum gebildeten identisch sind, bieten die Filtrate ein

<sup>1)</sup> Vgl. z. B. *Wollenweber-Reinking*, Die Fusarien, Berlin 1935.

<sup>2)</sup> Eine umfassendere Diskussion des Problems findet sich bei *H. A. Harris*, *Phytopathology*, **30**, 625 (1940).

in beliebigen Mengen herstellbares Ausgangsmaterial, das sich für eine chemische Isolierung der toxischen Substanzen gut eignet. Wir haben deshalb einen entsprechenden Versuch an Kulturen des Erregers der Tomatenwelke (*Fusarium lycopersici* Sacc.) unternommen<sup>1)</sup>. Dieser Pilz wurde gewählt, weil sein Stoffwechsel und die Welkkraft seiner Kulturen von *G. Luz*<sup>2)</sup> bereits recht eingehend untersucht worden waren.

Es gelang uns, aus welkaktiven Kulturfiltraten eine einheitliche Verbindung mit starker Welkwirkung zu isolieren. Diese aktive Substanz wird im folgenden Substanz A genannt. Da wir derzeit noch nicht über einen quantitativ auswertbaren Test für die Welkwirkung verfügen, ist es vorläufig nicht möglich, die Welkkraft unseres Präparates in konventionellen Einheiten anzugeben. Zur Orientierung sei erwähnt, dass eine 0,03-prozentige Lösung von Substanz A bei  $p_H$  7, nach Zusatz von Spuren Eisen(III)-chlorid, abgeschnittene Tomatenblätter, die in welkstoff-freier Lösung wochenlang frisch bleiben, in 1–3 Tagen vollständig zum Welken bringt. Weitere Angaben über die verwendete Testmethode, sowie über den pflanzenphysiologischen Aspekt der Untersuchung sind anderswo gemacht worden<sup>3)</sup>.

Bereits vor längerer Zeit haben *M. Lüdtke* und *H. Achmed*<sup>4)</sup> versucht, aus Kulturen von *Fusarium vasinfectum* Atk. sowie von *Fusarium lycopersici* Sacc. welkaktive Verbindungen zu isolieren. Aus verschiedenen Gründen verzichteten wir darauf, das in der zitierten Arbeit verwendete Verfahren als Grundlage für unsere Isolierungsversuche zu verwenden. Da unsere Resultate ausserdem weitgehend von denjenigen der beiden genannten Forschern abweichen, so erübrigt sich vorläufig ein näheres Eingehen auf diese Veröffentlichung.

### Isolierung.

Der Pilz wurde auf einem Nährboden, bestehend aus Glucose und anorganischen Salzen gezüchtet. Nach 2–4 Monaten ist die maximale Welkaktivität erreicht. Auf Grund umfangreicher Vorversuche konnte folgendes Verfahren zur Isolierung des Welkstoffes ausgearbeitet werden.

Das Mycelium wurde abfiltriert und das Kulturfiltrat mit Bariumhydroxyd gefällt, um Sulfat- und Phosphat-ionen zu entfernen. Das stark nach Ammoniak riechende Filtrat der Bariumsalz-Fällung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, wobei der grösste Teil des vorhandenen Ammoniaks mit dem Wasser abdestillierte. Die

<sup>1)</sup> Wir wurden auf das Problem der Welkekrankheiten durch Prof. Dr. *E. Gäumann*, Vorstand des Instituts für spezielle Botanik der Eidg. Techn. Hochschule aufmerksam gemacht, der auch für die Beschaffung der nötigen Pilzkulturen besorgt war, wofür wir ihm bestens danken.

<sup>2)</sup> *G. Luz*, Diss. E. T. H. Zürich, Ausgeführt am Institut für spez. Botanik, Vorstand Prof. Dr. *E. Gäumann*, vgl. *Phytopatholog. Z.* **7**, 585 (1934).

<sup>3)</sup> *N. Clauson-Kaas*, *Pl. A. Plattner* und *E. Gäumann*, *Ber. schweiz. Bot. Ges.* **54**, 531 (1944).

<sup>4)</sup> *M. Lüdtke* und *H. Achmed*, *Bioch. Z.* **257**, 256 (1933).

Lösung muss nach dem Einengen neutral oder höchstens schwach sauer sein. Die Substanz A liegt jetzt im Rückstand als wasserlösliches Bariumsalz vor. Da sie die Eigenschaften einer Amino-dicarbonsäure besitzt, kann das Bariumsalz durch Umfällen aus Wasser-Methanol weiter gereinigt werden. Das Verfahren entspricht der *Foreman'schen Methode*<sup>1)</sup> zur quantitativen Bestimmung von Asparagin- und Glutaminsäure in Eiweisshydrolysaten. Das so gereinigte Bariumsalz wird in Wasser gelöst und die Lösung mit Salzsäure auf  $p_H$  2,6 eingestellt. Die freie Säure fällt hierbei sofort, oder erst nach Zusatz von Alkohol aus. Sie bildet ein weisses mikrokrystallines Pulver, feine Nadeln oder ein farbloses Gel, das sich aber nach längerem Stehen oder beim schwachen Erwärmen ebenfalls in ein weisses Pulver umwandelt.

Das so erhaltene Produkt ist fast analysenrein, kann jedoch durch Umlösen aus Natronlauge-Salzsäure noch weiter gereinigt werden. Die Substanz A zeigt einen Zersetzungspunkt von 227–229°.

Die Ausbeute betrug 80–110 mg/L Kulturfiltrat, was nach Welkversuchen ungefähr 20% der ursprünglichen Aktivität entspricht. Die Ursachen für diese scheinbar niedrige Ausbeute sind anderswo diskutiert worden<sup>2)</sup>. Hier sei nur erwähnt, dass wahrscheinlich keine anderen Verbindungen mit Welkwirkung in den Kulturfiltraten vorhanden sind, dass aber die Welkaktivität von der Konzentration der anorganischen Salze und von spezifisch, in kleinen Mengen wirkenden Aktivatoren stark abhängig ist.

Aus den alkoholisch-wässrigen Mutterlaugen der Substanz A schieden sich meistens nach längerem Stehen wechselnde Mengen einer ähnlichen, aber inaktiven Verbindung aus, die wir als Substanz I bezeichnen. Sie bildet ein körniges, schweres, weisses Pulver oder kleine Krystallrosetten vom Zersp. 273–276°. Die Ausbeute schwankte sehr, war aber in einem Versuch bis dreimal so gross wie die beste Ausbeute an aktiver Verbindung. Wenn das Kulturfiltrat während der Aufarbeitung bei alkalischer oder saurer Reaktion zu stark erhitzt wird, kann keine Substanz A, sondern nur Substanz I isoliert werden.

Die Analysen verschiedener Präparate der Substanz A gaben stets Werte, die für die Summenformel  $(C_9H_{15}O_7N_3)_n$  sprechen. Für Substanz I wurde die Zusammensetzung  $(C_9H_{12}O_7N_2)_m$  ermittelt. Demnach scheint I aus A durch Abspaltung von 1 Mol  $NH_3$  (berechnet auf die einfache Formel  $C_9H_{15}O_7N_3$ ) zu entstehen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wird nach kurzer saurer Hydrolyse von Substanz A Ammoniak in der erwarteten Menge im Hydrolysat gefunden, und das Hydrolysat zeigt keine Welkwirkung mehr. Auch

<sup>1)</sup> *F. W. Foreman*, Biochem. J. **8**, 463 (1914); vgl. auch *A. C. Chibnall*, *M. W. Rees*, *E. F. Williams*, *E. Boyland*, Biochem. J. **34**, 285 (1940).

<sup>2)</sup> *N. Clauson-Kaas*, *Pl. A. Plattner* und *E. Gäumann*, Ber. schweiz. Bot. Ges. **54**, 531 (1944).

durch Kochen der Substanz A in alkalischer Lösung tritt unter Inaktivierung Ammoniak-Abspaltung ein. Schliesslich konnte Substanz I in 50 bis 55-prozentiger Ausbeute durch Kochen von A mit Wasser erhalten werden.

Die Molekelgrösse beider Verbindungen bleibt vorläufig unbekannt<sup>1)</sup>. Es sind jedoch Anzeichen dafür vorhanden, dass die Molekulargewichte relativ niedrig sind (n und m wahrscheinlich = 1). Auch die Tatsache, dass der Welkstoff in ganze Tomatenpflanzen mit unversehrten Wurzeln eindringt und sie zum Welken bringt, spricht in diesem Sinne.

### Eigenschaften der Substanzen A und I.

Zersetzungspunkt: Beide Substanzen schmelzen nicht, sondern zersetzen sich, allerdings bei gut reproduzierbaren Temperaturen, unter starkem Schäumen. Die unten angegebenen Werte der Zersetzungspunkte sind im Schmelzpunktsröhrchen im Vakuum bestimmt worden. Sie sind korrigiert. Substanz A zersetzt sich bei 227—229° fast ohne vorheriges Sintern, Substanz I bei 273—276° nach Sintern von 250° an. Die Zersetzungspunkte verschiedener Präparate zeigten nur geringe Abweichungen ( $\pm 5^\circ$ ) von diesen Werten.

Löslichkeit. Die Substanz A ist in Wasser fast unlöslich. Die Löslichkeit der Substanz I ist etwas grösser (0,5 bis 1%), und zwar in kaltem und heissem Wasser praktisch gleich gross. Die wässerigen Lösungen beider Substanzen zeigen stark saure Reaktion. In verdünnten Laugen oder Säuren sind beide Verbindungen leicht löslich. Aus diesen Lösungen lassen sie sich durch Neutralisieren wieder unverändert ausfällen. Sowohl Substanz A als auch Substanz I sind in organischen Lösungsmitteln unlöslich.

Spez. Drehung. Die spez. Drehung des gleichen Präparates von Substanz A, nach Lösen mit verdünnter Lauge ( $p_H$  der Lösung ca. 7), zeigte relativ starke Schwankungen ( $-42$  bis  $-48^\circ$ ). Bei verschiedenen Präparaten wurden Werte für  $[\alpha]_D$  von  $-42^\circ$  bis  $-49^\circ$  gemessen. Die Messungen an Substanz I wurden in Phosphat-Puffer vom  $p_H$  7 durchgeführt und waren möglicherweise deshalb besser reproduzierbar. Die verschiedenen Präparate zeigten Schwankungen für  $[\alpha]_D$  von  $-112^\circ$  bis  $-124^\circ$ .

Ninhydrin-Reaktion und Aminostickstoff. Substanz A zeigt sofort starke Ninhydrin-Reaktion, Substanz I erst nach längerem Erhitzen. Nach saurer Hydrolyse ist bei beiden Substanzen die Reaktion stark. Weder Substanz A, noch Substanz I enthalten nach *van Slyke* bestimmbar Amino-Stickstoff.

Komplex-Bildung mit Kupfer und Eisen. Substanz A bildet in 1-n. Natronlauge gelöst mit Kupfer(II)-sulfat eine tiefblaue Komplexverbindung, von der Farbe einer Lösung von Glycin-Kupfer. Substanz I gibt nur in saurer Lösung mit Kupfer(II)-ionen eine blaue Farbe. Die Lösung scheidet schon bei  $p_H$  8—9 Kupfer(II)-hydroxyd aus.

Im Gegensatz zur inaktiven Substanz ist Substanz A im Stande, bei  $p_H$  7 Eisen(III)-ionen als farblosen Komplex in Lösung zu halten. Dies scheint bemerkenswert im Zusammenhang mit der Beobachtung, dass die Welkkraft einer wässerigen Lösung von Substanz A durch Zusatz von wenig Eisen(III)-chlorid stark gesteigert wird<sup>2)</sup>.

Die peptidartige Natur der beschriebenen Substanzen A und I bringt es mit sich, dass deren Einheitlichkeit nur schwierig zu beurteilen ist. Die Tatsache, dass aus verschiedenen Ansätzen von aktiven

<sup>1)</sup> Molekulargewichtsbestimmungen nach den gebräuchlichsten Methoden kommen wegen der chemischen Eigenschaften der beiden Substanzen nicht in Frage.

<sup>2)</sup> *N. Clauson-Kaas, Pl. A. Plattner und F. Gäumann, Ber. schweiz. Bot. Ges. 54, 531 (1944).*

Pilzkulturen stets Welkstoff-Präparate mit praktisch identischen Eigenschaften erhalten wurden, spricht jedoch sehr für die Auffassung, dass beide Substanzen chemisch einheitliche Verbindungen sind. In diesem Zusammenhange ist auch zu erwähnen, dass es uns nie gelang, aus Kulturfiltraten, die keine Welkwirkung besaßen<sup>1)</sup>, Präparate mit den chemischen Eigenschaften der Substanzen A oder I zu gewinnen. Auch dieser Befund lässt den Schluss zu, dass in der Substanz A tatsächlich das gesuchte Welk-Toxin in reiner Form vorliegt.

Dem *Otto Mönsted Fond* in Kopenhagen und der *Rockefeller Foundation* in New York danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil<sup>2)</sup>.

#### Isolierung von Substanz A.

Der Pilz (*Fusarium lycopersici Sacc.*) wurde in *Erlenmeyer-Kolben* von 400 cm<sup>3</sup> Fassungsvermögen gezüchtet<sup>3)</sup>. Jeder Kolben enthielt:

Glucose	5,0 g
Ammoniumnitrat	1,0 g
prim. Kaliumphosphat	0,5 g
Magnesiumsulfat-heptahydrat	0,25 g
Eisen(III)-chlorid-hexahydrat	0,002 g
Wasser	100 cm <sup>3</sup>

Nach 2—4 Monaten wurden die Ansätze filtriert und die Kulturfiltrate auf Welkwirkung getestet. Sowohl das Aussehen der Kulturen als auch die Welkwirkung der Filtrate sind starken Schwankungen unterworfen. Im folgenden wird die Aufarbeitung eines Ansatzes beschrieben, der gute Welkwirkung zeigte.

Der Inhalt von 50 Kolben wurde filtriert und das Kulturfiltrat (3,7 L) mit 2,85 L 0,2-n. Bariumhydroxyd-Lösung versetzt. Die ausgefallene Mischung von Bariumsulfat und Bariumphosphat liess sich nach Zugabe von 60 g Celite<sup>3)</sup> gut abnutschen. Das stark nach Ammoniak riechende Filtrat wurde nun im Vakuum bei einer Badtemperatur von 40—45° möglichst rasch zur Trockene verdampft, wobei das Ammoniak sich verflüchtigte, so dass die zurückbleibende Lösung schwach sauer wurde. Nach Auflösen des Rückstandes (20 g) in 370 cm<sup>3</sup> Wasser und Zusatz von 15 g Tierkohle wurde nach einigen Minuten Schütteln erneut filtriert. Auf Zugabe von 750 cm<sup>3</sup> Methanol zum Filtrat schied sich ein weisser, flockiger Niederschlag (6,6 g) aus, welcher das in Methanol schwer lösliche Bariumsalz der Substanz A enthielt. Der Niederschlag wurde nochmals aus 1500 cm<sup>3</sup> Wasser und 3 L Methanol umgefällt. Ausbeute 2,7 g.

Das in dieser Weise vorgereinigte Bariumsalz wurde in 200 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Die Lösung wurde durch Zusatz von 22 cm<sup>3</sup> 1-n. Salzsäure auf p<sub>H</sub> 2,6 eingestellt und dann mit 200 cm<sup>3</sup> Äthanol versetzt. Dabei schlug sich ein weisses Pulver nieder, welches abfiltriert und mit Wasser und Alkohol gewaschen wurde. Es lag jetzt schon fast reiner Welkstoff vor. Zur völligen Reinigung wurde die Substanz (330 mg) in 3 cm<sup>3</sup> 1-n. Natronlauge kalt gelöst, filtriert, mit Wasser auf 23 cm<sup>3</sup> verdünnt und durch Ansäuern mit 3 cm<sup>3</sup> 1-n. Salzsäure erneut gefällt. Nach Abfiltrieren, Waschen mit Wasser und Trocknen wurde analysiert. Die Ausbeute betrug 300 mg Substanz A.

<sup>1)</sup> Bei fortgesetzter Züchtung des Pilzes auf künstlichem Nährboden verliert er die Fähigkeit, welkeerzeugende Stoffwechselprodukte zu bilden.

<sup>2)</sup> Die Herstellung der Pilzkulturen verdanken wir Frl. *F. Speckert* vom Institut für spezielle Botanik der Eidg. Techn. Hochschule.

<sup>3)</sup> Filter-Kieselguhr der Firma *Johns-Manville*, New York, N. Y.

Präparat I. Zur Analyse wurde 2 Stunden bei 90° getrocknet. Zersp. 227—229°. 4,074; 3,764 mg Subst. gaben 5,804; 5,358 mg CO<sub>2</sub> und 1,97; 1,802 mg H<sub>2</sub>O 2,070; 2,370 mg Subst. gaben 0,286; 0,316 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (19°, 718 mm; 15°, 727 mm)

C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub> Ber. C 38,99 H 5,45 N 15,16%  
Gef. „ 38,88; 38,85 „ 5,41; 5,35 „ 15,25; 15,12%

Ein Teil des Präparates wurde zusätzlich 4 Stunden bei 100° getrocknet. Zersp. 227 bis 229°.

3,744 mg Subst. gaben 5,327 mg CO<sub>2</sub> und 1,815 mg H<sub>2</sub>O  
2,262 mg Subst. gaben 0,309 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (17°, 732 mm)

C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub> Ber. C 38,99 H 5,45 N 15,16%  
Gef. „ 38,83 „ 5,43 „ 15,49%

Bei anderen ähnlichen Versuchen enthielten die Präparate geringe Mengen von Asche (Na Cl), die für die Berechnung der Analyse von der Einwaage abgezogen wurden.

Präp. II: Zersp. 226,5—227,5°

3,793 mg Subst. gaben 5,393 mg CO<sub>2</sub> und 1,873 mg H<sub>2</sub>O und 0,010 mg Asche  
2,370 mg Subst. gaben 0,323 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (15°, 728 mm) (0,006 mg Asche)

C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub> Ber. C 38,99 H 5,45 N 15,16%  
Gef. „ 38,90 „ 5,54 „ 15,49%

Präp. III: Zersp. 221—222°

3,664 mg Subst. gaben 5,224 mg CO<sub>2</sub>, 1,729 mg H<sub>2</sub>O und 0,028 mg Asche  
1,615 mg Subst. gaben 0,228 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (18°, 722 mm) (0,012 mg Asche)

Gef. C 39,21 H 5,32 N 15,84%

Zur Messung der spez. Drehungen wurden abgewogene Mengen der Präparate in 0,1-n. NaOH durch kurzes Schütteln in Lösung gebracht (p<sub>H</sub> ca. 7,0). Dann wurde mit Wasser auf das gewünschte Volumen (Konz. 0,5—1,0%) aufgefüllt. Die in dieser Art bestimmten Drehungen zeigten auch beim gleichen Präparat gewisse Schwankungen, die möglicherweise auf eine Veränderung der Substanz beim Lösen zurückzuführen sind.

Präp. I: [α]<sub>D</sub> = -41,8°; -47,8°; -44,5°; -48,0° (wässrige Lösung, p<sub>H</sub> ca. 7 ungepuffert)

„ III: [α]<sub>D</sub> = -49,0° (wässrige Lösung, p<sub>H</sub> ca. 7, ungepuffert).

#### Inaktivierung der Substanz A bei der Aufarbeitung; Isolierung von Substanz I.

Bei einem anderen Versuch zur Isolierung des Welkstoffes aus der gleichen Menge Kulturfiltrat wurde das durch zweimaliges Umfällen vorgereinigte Bariumsalz in 1 Liter Wasser gelöst und zur Fällung des Bariumions mit 36 cm<sup>3</sup> 1-n. Schwefelsäure versetzt. Die schwach saure Lösung wurde dann bei 70° Badtemperatur auf 100 cm<sup>3</sup> eingengt. Hierbei schied sich 1,42 g rohe Substanz I aus. Diese wurde durch Kochen in 200 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und durch Zugabe von 400 cm<sup>3</sup> Äthanol wieder gefällt. Die Hauptmenge schlug sich als mikrokristallines, körniges, weisses Pulver nieder, während ein kleiner Teil sich erst nach 2 Tagen Stehen in kleinen Krystallrosetten an den Wänden des Kolbens abschied. Beide Anteile zeigten die gleichen analytischen Daten. Sowohl der mikro- als auch der makrokristalline Anteil besaßen einen geringen Aschegehalt. Das letztere Präparat wurde zur Analyse 10 Stunden bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

Präparat I: Zersp. 273—276°.

3,984 mg Subst. gaben 6,023 mg CO<sub>2</sub>, 1,688 mg H<sub>2</sub>O und 0,016 mg Asche  
3,377 mg Subst. gaben 0,324 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (20°, 722 mm) (0,013 mg Asche)

C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> Ber. C 41,54 H 4,65 N 10,77%  
Gef. „ 41,42 „ 4,76 „ 10,66%

Spez. Drehung, wie für Substanz A beschrieben, bestimmt:

[α]<sub>D</sub> = -124° (wässrige Lösung, p<sub>H</sub> ca. 7, ungepuffert).

Die Präparate von Substanz I enthielten meist 0,2—0,5% Asche. Es wurden jedoch auch aschefreie Präparate erhalten, deren Analysenwerte sich nicht wesentlich von denjenigen der aschehaltigen unterschieden. Im allgemeinen zeigten die Analysen für die angegebene Bruttoformel etwas zu tiefe C-Werte.

Präparat II:

4,163; 3,972 mg Subst. gaben 6,252; 5,931 mg CO<sub>2</sub>, 1,771; 1,754 mg H<sub>2</sub>O und 0,021; 0,010 mg Asche  
 2,138; 3,359 mg Subst. gaben 0,196; 0,317 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (18°, 737 mm; 19°, 732 mm) (0,010; 0,009 mg Asche)

C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> Ber. C 41,54 H 4,65 N 10,77%  
 Gef. „ 41,19; 40,85 „ 4,78; 4,95 „ 10,48; 10,66%

Spez. Drehung. Die Präparate wurden in 0,1-n. NaOH durch kurzes Kochen gelöst (2,5 Mol. auf C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> berechnet) und dann mit 0,66-molarem Phosphatpuffer vom p<sub>H</sub> 7,0 auf 5 cm<sup>3</sup> gebracht. Die Konzentrationen betragen 0,4—0,7%.

Präp. II; [α]<sub>D</sub> = -115,9° (wässrige Lösung, p<sub>H</sub> 7, Phosphat-Puffer)  
 „ III; [α]<sub>D</sub> = -113,8° (wässrige Lösung, p<sub>H</sub> 7, Phosphat-Puffer)  
 „ IIIa und IIIb; (durch Umfällen von III weiter gereinigt)  
 [α]<sub>D</sub> = -114,2°; -112,1° (wässrige Lösung, p<sub>H</sub> 7, Phosphat-Puffer.)

Umwandlung von Substanz A in Substanz I.

70 mg Substanz A wurden 1 Stunde im offenen *Erlenmeyer*-Kolben mit 10 cm<sup>3</sup> Wasser gekocht. Die Lösung wurde nun auf 2 cm<sup>3</sup> eingengt und mit 50 cm<sup>3</sup> Äthanol versetzt. Nach längerem Stehen hatten sich 28,6 mg Substanz I ausgeschieden. Der Zersetzungspunkt des Präparates lag bei 274°.

[α]<sub>D</sub> = -122° (wässrige Lösung, p<sub>H</sub> 7, Phosphat-Puffer)

Durch Einengen der Mutterlaugen konnten noch 5,5 mg Substanz I vom Zersp. 270 bis 273° gewonnen werden. Die Totalausbeute betrug demnach 34,1 mg oder 52% der theoretisch möglichen Menge.

Beim Eindampfen der Mutterlaugen verblieb eine sehr hygroskopische, schmierige Masse zurück, welche mit Ninhydrin eine rote Farbe gab. Mit Dinitro-benzoylchlorid nach *Saunders*<sup>1)</sup> liess sich kein kristallisiertes Derivat isolieren.

Ammoniakbildung bei der sauren Hydrolyse von Substanz A.

18,220 mg Substanz A wurden mit 2 cm<sup>3</sup> 18-proz. Salzsäure 1 Stunde am Rückfluss gekocht und dann im Mikro-*Kjeldahl*-Apparat von *Parnas-Wagner* mit einem geringen Überschuss von Natronlauge destilliert.

Verbrauch 4,525 cm<sup>3</sup> 0,0143-n. HCl

1 Mol. NH<sub>3</sub> pro 1 Mol. C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> Ber. 1,118 mg NH<sub>3</sub> Gef. 1,100 mg NH<sub>3</sub> = 98%

Bestimmung von Aminostickstoff (*van Slyke*) in Substanz A und I.

Es wurde die übliche<sup>2)</sup> Mikroapparatur benutzt. Die Substanzen wurden in neutralisierter, wässriger Lösung zugegeben. Konz. ca. 0,6%. Die bei einer Schüttelzeit von 5 Minuten bei 25° erhaltenen Stickstoff-Mengen überstiegen nicht den Blindwert.

Ninhydrin-Reaktion.

Die Ninhydrin-Reaktionen wurden in 0,067-m. Phosphat-Puffer von p<sub>H</sub> 7,0 durchgeführt.

Substanz A: 1,1 mg zeigte gleich starke Reaktion wie 0,15 mg Leucin.

<sup>1)</sup> *B. Ch. Saunders*, *Biochem. J.* **28**, 580 (1934).

<sup>2)</sup> Vgl. *Pregl-Roth*, *Die quantitative org. Mikroanalyse*, IV. Aufl., Berlin 1935, S. 206.

Substanz I: gibt anfänglich nur Gelbfärbung, die erst nach 2—6 Stunden auf dem Wasserbad durch die langsam eintretende Hydrolyse nach grün umschlägt.

Saure Hydrolyse von Substanz A bzw. I: (Kochen mit 20 proz. HCl, 15 Stunden); beide Hydrolysate geben starke Ninhydrin-Reaktionen.

Die Verbrennungsanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von den HH. W. Manser und W. Jngold ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

## 21. Zur Kenntnis der Triterpene.

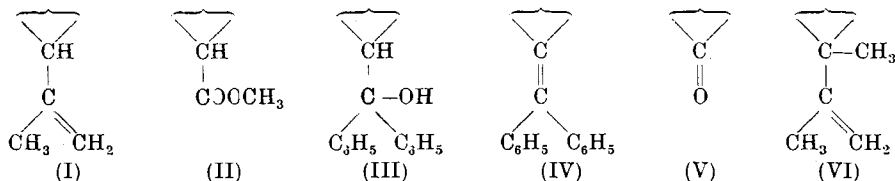
(92. Mitteilung<sup>1)</sup>).

### Abbau des Bisnor-lupansäure-methylesters zur C<sub>27</sub>-Stufe

von L. Ruzicka, W. Huber und O. Jeger.

(26. XII. 44.)

In einer früheren Mitteilung haben wir für das Lupeol und das Betulin die Anwesenheit einer Isopropenyl-Gruppe (Teilformel I) nachgewiesen<sup>2)</sup>. In dieser Arbeit berichten wir über den weiteren Abbau des Bisnor-lupansäure-methylesters (II) zur C<sub>27</sub>-Stufe (V).



Nach Umsetzung des Esters (II) mit Phenylmagnesium-bromid in benzolischer Lösung und chromatographischer Trennung der Reaktionsprodukte haben wir in guter Ausbeute das bei 265—267° schmelzende Diphenyl-carbinol (III) isoliert, das ein U. V.-Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 255 m $\mu$ , log  $\epsilon$  = 3,3 aufweist (Fig. A, Kurve 1). Durch Kochen mit Acetanhydrid-Pyridin wurde III in das Diphenylmethen-Derivat (IV) übergeführt. Das U. V.-Absorptionsspektrum der Verbindung IV mit einem Maximum bei 247 m $\mu$ , log  $\epsilon$  = 4,22 (Fig. A, Kurve 2) steht in guter Übereinstimmung mit dem U. V.-Spektrum des  $\Delta^{23-3\alpha, 12\beta}$ -Diacetoxy-24,24-diphenyl-cholens<sup>3)</sup>. Die Anwesenheit des Chromophors (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>C=C< in der Verbindung IV beweist, dass die Wasserabspaltung III  $\rightarrow$  IV ohne Umlagerungen des Gerüsts stattgefunden hat.

<sup>1)</sup> 91. Mitt. Helv. 27, 1859 (1944).

<sup>2)</sup> Helv. 23, 1311 (1940).

<sup>3)</sup> Helv. 27, 1820 (1944).