

L'équation de *van t'Hoff* et *Arrhénius*

$$\log k = - \frac{A}{2,303 RT} + C$$

appliquée à deux températures, permet de déduire A:

$$A = 2,303 R \frac{T_1 \cdot T_2}{T_1 - T_2} \log \frac{k_1}{k_2}$$

On choisit des températures comprises entre 0 et 20° C afin d'éviter les perturbations qui commencent à se faire sentir au-dessus de 20°, par suite de la «désactivation thermique».

Nous remercions l'Institut de chimie de l'Université de Neuchâtel, qui a mis à notre disposition le laboratoire et le matériel nécessaires à l'exécution de ce travail, ainsi que M. *Claude Favarger*, qui nous a offert les échantillons de semences.

Institut de chimie de l'Université de Neuchâtel,
décembre 1944.

28. Über den Nachweis der *l*-Ascorbinsäure als Stoffwechselprodukt von *Aspergillus niger*

von M. Geiger-Huber und H. Galli.

(28. XII. 44.)

Lässt man Konidiosporen von *Aspergillus niger* bei hohen Temperaturen auf Nährlösungen keimen, die einen hohen Gehalt an Zuckern und stark saure Reaktion aufweisen, also der Bildung organischer Säuren wie Citronensäure und Gluconsäure förderlich sind, so treten in der Kulturlösung schon nach wenigen Tagen stark reduzierende Stoffe auf, die sich mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol titrieren lassen (s. a. *Bernhauer* und Mitarb.¹⁾, *Clutterbuck* und Mitarb.²⁾).

Es entsteht daher die Frage, ob sich unter diesen Stoffen vielleicht auch *l*-Ascorbinsäure vorfindet; ist dies der Fall, so wäre offenkundig, dass niedere pflanzliche Organismen, deren Stoffwechsel infolge ihrer Kohlenstoff-Heterotrophie dem tierischen viel mehr entspricht, als derjenige chlorophyllführender, autotropher Pflanzen, auch wie diese befähigt sind, *l*-Ascorbinsäure zu bilden. Ausserdem aber wäre auch die Möglichkeit gegeben, bei solchen Schimmelpilzen wie *Aspergillus niger*, die Bedingungen der biologischen Ascorbinsäuresynthese mit mehr Aussicht auf Erfolg zu studieren, als dies bei grünen Pflanzen der Fall ist, bei denen zudem die ständige Bildung von Kohlenhydraten durch Photosynthese die Übersicht über die Ausgangsbedingungen stark erschwert.

Um diese Frage zu klären, haben wir uns dreier Methoden der Untersuchung bedient: 1. Isolierung der *l*-Ascorbinsäure aus den zuckerhaltigen Nährlösungen, 2. Isolierung der *l*-Ascorbinsäure aus zuckerfreien Nährlösungen, indem *Aspergillus niger* als Substrat

¹⁾ Bioch. Z. **286**, 60 (1936).

²⁾ Biochem. J. **27**, 654 (1933); **28**, 94 (1934); **29**, 871, 1300 (1935).

Glycerin geboten wurde, 3. Biologische Prüfung der Nährlösungen am Meerschweinchen mit dem Skorbut-Test.

Alle drei Methoden führten zum Ergebnis, dass *Aspergillus niger* tatsächlich die Fähigkeit hat, unter geeigneten Versuchsbedingungen aus Zuckern oder Glycerin *l*-Ascorbinsäure zu bilden und zwar je nach Rasse 1—5 mg/100 cm³ Kulturlösung. Der grösste Gehalt ist nach 6—10 Tagen Kulturdauer (15% Zucker, p_H 2,2, Temperatur 28—32° C) festzustellen; Dehydro-ascorbinsäure ist in der Kulturlösung nicht nachzuweisen. Die quantitative Auswertung der Kulturlösungen im Tierversuch zeigt, dass etwa 40—60% der mit *Tillman's* Reagens (2,6-Dichlorphenol-indophenol) titrierbaren Substanzen identisch sind mit *l*-Ascorbinsäure¹⁾.

Experimenteller Teil²⁾.

1. Methode: Die Kulturlösungen einer Versuchsreihe werden filtriert und vereinigt: Volumen 1500 cm³, Zuckergehalt 4,5%, Gehalt an Citronensäure 7,0%, an Gluconsäure 0,4%, an Ascorbinsäure (titr.) 40—50 mg, p_H 1,8; im Vakuum bei maximal 40° C unter Durchleiten von CO₂ auf 800 cm³ eingengt. Diese Lösung wird mit ca. 160 g Bleiacetat versetzt, vom sehr voluminösen, feinkörnigen Niederschlag, an den die Ascorbinsäure adsorbiert ist³⁾, abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen. Der Niederschlag mit der adsorbierten Ascorbinsäure wird in destilliertem Wasser aufgeschlämmt und mit H₂S zersetzt; der entstehende Bleisulfid-Niederschlag wird gut mit Wasser gewaschen, das Filtrat plus Waschwasser im Vakuum bei 40° C auf die Hälfte (250 cm³) eingengt und H₂S durch CO₂ verdrängt. Fällung der Ascorbinsäure mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin nach *R. Ammon*⁴⁾: Zu den 250 cm³ Lösung werden 40 cm³ 2-n. HCl und 0,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 50 cm³ 2-n. HCl gegeben und drei Tage bei 30° C aufbewahrt; es entsteht ein voluminöser, roter Niederschlag von 40 mg, Smp. 230—270°, mit Wasser gewaschen und aus Alkohol-Aceton umkrystallisiert: Ausbeute 20 mg, Smp. 276—279° (unkorr., unter Zers.), $[\alpha]_D^{16} = +166 \pm 20^\circ$ (c = 0,090 in Pyridin-Eisessig); nach *Ammon*⁴⁾ beträgt $[\alpha]_D = +170—250^\circ$ je nach Fällung, für Iso-ascorbinsäure dagegen $[\alpha]_D = -284^\circ$. Das erhaltene Osazon zeigt keine Schmelzpunktserniedrigung mit dem reinen Osazon aus synthetischer Ascorbinsäure. Zur Analyse wird nochmals aus Alkohol umkrystallisiert: Smp. 290° (auf *Kofler*-Block, korr.), und im Hochvakuum bei 90° C eine Stunde getrocknet:

3,294 mg Subst. gaben 4,884 mg CO₂ und 0,785 mg H₂O

2,195 mg Subst. gaben 0,408 cm³ N₂ (18°, 727 mm)

C₁₈H₁₄O₁₂N₈ (534) Ber. C 40,44 H 2,64 N 20,97%

Gef. „ 40,46 „ 2,67 „ 20,86%

2. Methode: *Aspergillus niger* wird auf Nährlösungen gezüchtet, denen Glycerin (4—15%) als Kohlenstoffquelle zugesetzt ist, dadurch wird die Isolierung der Ascorbinsäure ohne Störung durch die ihr chemisch nahe verwandten Zucker ermöglicht. 1500 cm³ Kulturlösung werden auf 280 cm³ eingengt (s. oben), mit 25 cm³ 2-n. HCl und 0,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 50 cm³ 2-n. HCl versetzt und zwei Tage bei 30° C belassen: braunroter Niederschlag, 35 mg, Smp. unscharf 130—230°, keine einheitliche Substanz.

¹⁾ Weitere physiolog. Ergebnisse der Untersuchung finden sich in: *Verh. Naturf. Ges. Basel*, **56**, 37 (1944/45).

²⁾ Über die mikrobiolog. Methoden und die physiolog. Experimente wird hier nicht berichtet, über die chem. Aufarbeitung nur auszugsweise.

³⁾ Der Grad der Adsorption ist stark abhängig von der Körnigkeit des Niederschlages, mithin also von den Versuchsbedingungen.

⁴⁾ *Bioch. Z.* **288**, 101 (1936).

Zur Reinigung wurde der Niederschlag zuerst mit eiskaltem Alkohol, dann mit Alkohol von 18° (je 5 cm³), danach mit Oxalester von 20° (5 cm³) geschüttelt und einmal mit 10 cm³ Oxalester kurz zum Sieden erhitzt, filtriert und mit eiskaltem Alkohol nachgewaschen. Braunroter Niederschlag aus Alkohol umkristallisiert: Feine, kurze Nadelchen, 6,8 mg, Smp. 278—280° (Zers.), keine Schmelzpunktserniedrigung mit reinem Osazon synthetischer Ascorbinsäure.

3. Methode: Vergleich einer Probe der Kulturlösung im Tierversuch (Meerschweinchen-Test) mit einer andern, in der die vermutete Ascorbinsäure durch H₂O₂ und Durchleiten von Luft zerstört worden war. 2400 cm³ Kulturlösung werden im Vakuum unter zwei Malen auf 160 cm³ eingedampft, Verlust an Ascorbinsäure (titr.) 10% resp. 25%¹⁾; die eingedampfte Lösung enthält pro 100 cm³ 62—64 mg Ascorbinsäure (titr.), etwa 45 g Zucker (hauptsächlich Fructose, wenig Glucose), etwa 9 g Citronensäure, sie ist gelblich, dick sirupös, etwas trüb, geruchlos, p_H etwa 1. In der einen Hälfte (80 cm³) dieser Lösung, die zum Kontrollversuch dient, wird die Ascorbinsäure zerstört (s. oben). Den entsprechend vorbereiteten Meerschweinchen (z. B. *Coward*²⁾) wurden täglich 0,5—2,0 cm³ der beiden Lösungen per os verabreicht. Die Tiere, denen die Kontrolllösung (mit H₂O₂ behandelt, durchlüftet) verfüttert worden war, starben alle nach starker Gewichtsabnahme an akutem Skorbut. Die Versuchslösung dagegen verursachte in Dosen von 2,0 cm³ maximales Wachstum, Dosen von 1,0 cm³ erzeugten Gewichtsstillstand, solche von 0,5 cm³ Gewichtsabnahme. Die ursprüngliche Kulturlösung enthält demnach *l*-Ascorbinsäure und zwar in Mengen, die etwa 40—60% des durch Titration mit *Tilman's* Reagens gefundenen Wertes entsprechen.

Der Chemischen Fabrik *F. Hoffmann-La Roche & Co., A.G.*, Basel, sind wir für die Durchführung der Tierversuche zu grossem Dank verpflichtet, ebenso danken wir Herrn Prof. Dr. *T. Reichstein*, Basel, für die Vermittlung der Mikroanalyse.

Botanisches Institut der Universität Basel.

29. Steroide und Sexualhormone.

(111. Mitteilung³⁾).

Über ein neues Stereoisomeres des Oestriols

von *V. Prelog*, *L. Ruzicka* und *P. Wieland*.

(27. X. 44.)

Von den vier stereoisomeren $\Delta^{1,3,5}$ -Oestratrien-triolen-(3,16,17) (IV₁—IV₄), die sich durch verschiedene räumliche Lage der Hydroxyl-Gruppen an den Kohlenstoffatomen 16 und 17 unterscheiden, sind bisher zwei beschrieben worden: 1. das „Oestriol“, welches aus Harn der Schwangeren⁴⁾ und aus Placenta⁵⁾ isoliert wurde, und 2. das „Iso-oestriol A“, welches *M. N. Huffman* und *H. H. Darby*⁶⁾ vor kurzem aus Oestron hergestellt haben. Die letztgenannten Autoren

¹⁾ Infolge der vom Pilz gebildeten Schutzstoffe ist die Beständigkeit der Ascorbinsäure in der Kulturlösung erheblich grösser, als in rein wässriger Lösung.

²⁾ The biological standardisation of the vitamins, London 1938.

³⁾ 110. Mitt. Helv. **28**, 173 (1945).

⁴⁾ *G. F. Marrian*, Biochem. J. **24**, 435 (1930); *E. A. Doisy* und Mitarb., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **28**, 88 (1930), J. Biol. Chem. **91**, 641 (1931); *A. Butenandt* und *F. Hildebrandt*, Z. physiol. Ch. **199**, 243 (1931).

⁵⁾ *J. S. L. Browne* nach *J. B. Collip*, Proc. Calif. Acad. Medic. **1**, 38 (1931).

⁶⁾ Am. Soc. **66**, 150 (1944).