

Benzo-2,3-anthraquinone (III).

On chauffe l'acide ci-dessus, dissous dans du chlorure de benzoyle, contenant une goutte d'acide sulfurique concentré, pendant une demi-heure à 130—150^o¹). Le produit de réaction neutre cristallise dans l'alcool amylique sous forme d'aiguilles jaune paille, fondant, au bloc, à 285^o²). Cette benzanthraquinone donne une coloration violet foncé avec l'acide sulfurique concentré.

Ces travaux ont été exécutés grâce à une bourse de la «*Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie*». Nous remercions très vivement le comité de cette fondation pour l'appui généreux qu'elle nous a donné.

Nous exprimons également notre reconnaissance à Monsieur le Professeur *E. Cherbuliez* pour l'intérêt qu'il nous a témoigné.

RÉSUMÉ.

1. La dibenzo-2,3,5,6-fluorénone a été synthétisée par condensation du dialdéhyde phtalique avec la benzo-4,5-hydrindone-1. La réduction de ce dérivé a fourni le dibenzo-2,3,5,6-fluorène. La structure de la cétone a été confirmée par dégradation.

2. Le mode de synthèse ci-dessus a permis de préparer d'autres dibenzofluorénones ainsi que la benzo-3,4-anthraquinone.

Laboratoire de Chimie organique et pharmaceutique de
l'Université de Genève.

80. Stoffwechselprodukte des Mikroorganismus *Phycomyces Blakesleeanus* in glucosehaltiger Nährlösung und Untersuchungen über das Wachstum dieses Schimmelpilzes bei verschiedenen Stickstoffquellen³⁾

von Karl Bernhard und Hans Albrecht.

(11. II. 47.)

Nach Untersuchungen von *Schopfer*⁴⁾ gehört der Schimmelpilz *Phycomyces Blakesleeanus* zu den auxo-heterotrophen Organismen: er benötigt als wichtigsten Wuchsstoff das Aneurin oder an dessen Stelle äquimolekulare Mengen Thiazol und Pyrimidin.

Wir züchteten diesen Mikroorganismus in einer Nährlösung, enthaltend 50 g Glucose, 2 g *l*-Asparagin, 1 g Hefeextrakt, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 1,5 g KH₂PO₄ und 50 γ Aneurin pro 1 Liter Wasser, und versuchten, in der Kulturflüssigkeit auftretende Stoffwechselprodukte nachzuweisen.

¹⁾ *H. Waldmann*, J. pr. [2] **150**, 121 (1938).

²⁾ *C. Wermann et E. et F. Bergmann*, Soc. **1935**, 1367.

³⁾ Teilweise vorgetragen an der 27. Tagung des Schweiz. Vereins der Physiologen und Pharmakologen am 30. Juni 1945 in Bern.

⁴⁾ *W. H. Schopfer*, Arch. Mikrobiol. **5**, 511 (1934).

Nach beendigtem Wachstum trennten wir die Pilze von der Nährlösung. Letztere war gelb bis braun-gelb, wurde mit Eisen(III)-chlorid blau-violett und schliesslich schwarz. Beim Schütteln mit verdünnter Lauge färbte sie sich rotbraun. Wir haben einen Teil nach Ansäuern ausgeäthert. Die eingeeengten Extrakte ergaben einen dunkelbraunen Rückstand. Durch Behandlung mit Hydrogencarbonatlösung daraus abgetrennte saure Anteile wurden in ätherischer Lösung mit Diazomethan versetzt. Es bildete sich eine zähflüssige, schwach gelbliche Verbindung, welche wir vorsichtig mit Kalilauge erwärmten. Das Verseifungsprodukt reinigten wir durch Sublimation und mehrmaliges Umkrystallisieren aus absolutem Alkohol. Es schmolz bei 247° und erwies sich identisch mit 3-Oxy-4-methoxybenzoesäure. Die Isolierung reiner Protocatechusäure oder 3,4-Dioxybenzoesäure gelang nur in sehr kleinen Mengen.

Ferner fällten wir zur *Phycomyces*-Züchtung benützte Nährlösung mit Bleiacetat und erhielten nach Ausäthern des mit Säure zersetzten Niederschlages einen braunen Rückstand, den wir in wässriger Lösung mit Tierkohle behandelten. Es ergaben sich braune Krystalle, die aus Alkohol, dann aus absolutem Methanol und Chloroform umkrystallisiert, reine Gallussäure darstellten. Einen Teil führten wir zur Identifizierung in 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure und eine kleine Menge in den *p*-Phenylphenacylester der 3,4,5-Trioxybenzoesäure über.

Ketosäuren konnten mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin aus der Nährlösung nicht isoliert werden. Ebensovienig liess sich Citronensäure nach der Methode von *Stahre*¹⁾ nachweisen.

Protocatechusäure und Gallussäure sind somit Glucose-Stoffwechselprodukte des Schimmelpilzes *Phycomyces Blakesleeanus*. Weitere Oxybenzoesäuren, die Gentsinsäure und die 2-Oxy-6-methylbenzoesäure, haben *Raistrick* und *Simonart*²⁾ aus der *Czapek-Dox*-Nährlösung nach Züchtung von *Penicillium griseo-fulvum* *Dierckx* isoliert.

Es schien uns interessant, das Pilzwachstum in seiner Abhängigkeit von verschiedenen Stickstoffquellen zu verfolgen. Von *Schopfer*³⁾ liegen Befunde über die Ausnützung von Pepton, Harnstoff, Ammoniak, Ammoniumsulfat, Glykokoll, Alanin und Valin als N-Donatoren vor. Uracil, Alloxan und Alloxanthin werden als ungeeignet, Purine als teilweise sehr gut geeignet bezeichnet⁴⁾. *Leonian* und *Lilly*⁵⁾ beobachteten unter Verwendung von Arginin schlechtes, von *d,l*-

1) *Stahre*, cit. nach *H. Meyer*, Nachweis und Bestimmung organischer Verbindungen, Berlin 1933, Fussnote S. 162.

2) *H. Raistrick* and *P. Simonart*, *Biochem. J.* **27**, 628 (1933); *W. K. Anslow* and *H. Raistrick*, *Biochem. J.* **25**, 39 (1931).

3) *W. H. Schopfer*, *C. r.* **203**, 201 (1936).

4) *W. H. Schopfer*, *Protoplasma* **28**, 381 (1937).

5) *L. H. Leonian* and *V. G. Lilly*, *Am. J. Botany* **27**, 18 (1940).

Alanin mässiges, von Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Glykokoll gutes Wachstum. In Nährlösungen, die 2,5% Dextrose und 0,25% Ammoniumnitrat enthielten, konnte nach Zugabe von Fumar-, Citronen- oder Bernsteinsäure gleichfalls gutes Wachstum erzielt werden. Etwas weniger vorteilhaft erwiesen sich Glutar-, Wein- und Essigsäure. Versuche mit Ammoniumnitrat und den Natriumsalzen organischer Säuren (Natrium-acetat, -tartrat, -succinat und -fumarat) liegen von *Burkholder* und *McVeigh* vor¹⁾.

Phycomyces-Wachstum in Nährlösungen enthaltend Ammoniumsalze biologisch wichtiger Di- und Tricarbonsäuren usw.

Verbindung	p _H der Nährlösung nach Pilzwachstum		mittleres Gewicht der Pilze mg		Wachstum bezogen auf <i>l</i> -Asparagin = 100	
	Versuch		Versuch		Versuch	
	I	II	I	II	I	II
<i>l</i> -Asparagin	2,5	2,6	192	191	100	100
<i>d,l</i> -Asparagin	2,6	2,7	172	169	90	88
Asparaginsäure + NH ₃	2,6	2,6	176	168	92	88
<i>d</i> -Alanin	—	2,6	—	157	—	82
Ammoniumsalz der						
Fumarsäure	2,4	2,6	154	159	80	83
Bernsteinsäure	2,3	2,2	141	146	74	76
Äpfelsäure	2,3	2,5	141	150	74	78
Glutaminsäure	2,6	2,8	144	145	75	76
Weinsäure	2,3	2,3	143	143	75	75
Citronensäure	2,5	2,5	123	130	64	68
Milchsäure	2,5	2,7	119	125	62	65
Essigsäure	2,7	2,8	120	116	62	61
Aconitsäure, trans.	—	2,5	—	109	—	57
Glutarsäure	2,5	2,7	105	106	55	55
Adipinsäure	2,8	2,8	89	94	46	49
Brenztraubensäure	ca. 3	—	81	—	42	—
Malonsäure	2,7	2,7	79	93	41	48
Propionsäure	—	2,6	—	83	—	43
Maleinsäure	2,7	2,5	65	77	34	40
Citraconsäure	—	2,8	—	44	—	23
Oxalsäure	3,4	3,3	34	35	18	18
<i>d,l</i> -Leucin	—	2,9	—	49	—	26
<i>d,l</i> -Phenylalanin	—	3,4	—	29	—	15
Ammoniumcarbonat	2,6	—	44	—	23	—
Ammoniumsulfat	ca. 3	—	28	—	15	—

Wir prüften, ob auch die Ammoniumsalze biologisch wichtiger Di- und Tricarbonsäuren oder diejenigen von Oxy-

¹⁾ P. R. Burkholder and I. McVeigh, Am. J. Botany 27, 634 (1940).

säuren das *l*-Asparagin zu ersetzen vermögen, und haben daher an seiner Stelle je 2 g einer in der Tabelle genannten Verbindungen der eingangs erwähnten Nährlösung zugefügt. Von diesen verschiedenen Nährlösungen impften wir je 10 Proben nach vorangegangener Sterilisation mit frischen Sporen. Das Wachstum der 190 Kulturen der ersten Versuchsreihe erfolgte während 6 Tagen bei 19—21° und anschliessend während 5 Tagen bei 14—16°. Für die 220 Kulturen des zweiten Versuches betrug die Raumtemperatur 10 Tage einheitlich 20°. Die p_H -Werte hielten sich im Zeitpunkt der Impfung in den Grenzen von 4,8—5,1; nach beendetem Pilzwachstum waren alle Nährlösungen stärker sauer (vgl. Tabelle).

Die erhaltenen Pilze wurden auf der Nutsche abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und im Exsikkator bzw. im Trockenschrank zur Gewichtskonstanz gebracht. Sie wogen bei den Kontrollversuchen mit *l*-Asparagin durchschnittlich 192 bzw. 191 mg. Diese Werte benützten wir als Vergleichsbasis für das *Phycomyces*-Wachstum in den übrigen Nährlösungen. Letzteres ist bei Verwendung von *d,l*-Asparagin oder des Ammoniumsalzes der Asparaginsäure nur wenig geringer. Von weiteren Aminosäuren zeigen *d*-Alanin und Glutaminsäure als Ammoniumsalz günstige, *d,l*-Phenylalanin und *d,l*-Leucin ungünstige Wirkung. Bei den Ammoniumsalzen der Dicarbonsäuren erzielten wir mit der Bernsteinsäure die besten Erfolge, dann folgen Glutar-, Adipin- und Malonsäure, während Citracon- und Oxalsäure ungeeignet sind. Oxy-dicarbonsäuren wie Weinsäure und Äpfelsäure verhalten sich etwa wie die Bernsteinsäure, desgleichen von den ungesättigten Dicarbonsäuren die Fumarsäure, nicht aber das Ammoniumsalz der Maleinsäure. Von den Tricarbonsäuren ermöglicht die Citronensäure etwas besseres Wachstum als die *trans*-Aconitsäure. Die Ammoniumsalze der Essig- und Milchsäure verhalten sich untereinander etwa gleich, ebenso diejenigen der Propion- und Brenztraubensäure. Nur schlechtes Wachstum erzielten wir mit Ammoniumcarbonat und Ammoniumsulfat als Stickstoffquellen.

Experimentelles.

Eine grössere Menge Nährlösung (70 l) wurde nach beendetem Pilzwachstum im Vakuum auf 3,5 l eingengt, mit Salzsäure angesäuert und erschöpfend mit Äther extrahiert. Letzterer hinterliess 9,64 g dunkelbraune, feste Masse. Zur Abtrennung saurer Anteile behandelten wir diesen wieder in Äther aufgenommenen Rückstand mit einer wässrigen Lösung von Natriumhydrogencarbonat und schüttelten nach erfolgtem Ansäuern diese Auszüge mit Äther aus. Ein kleiner Teil dieses Extraktes wurde vom Lösungsmittel befreit und in Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von Eisen(III)-chlorid trat grün-blaue, mit Soda blaue, dann violette und schliesslich rote Färbung ein in Übereinstimmung mit dem Verhalten aus Chinasäure synthetisierter Protocatechusäure. Die Hauptmenge der ätherischen Lösung haben wir mit Natriumsulfat gut getrocknet und mit einer ätherischen Lösung von Diazomethan versetzt. Nach 20-stündigem Aufenthalt im Eisschrank und 4-stündigem Stehen bei 20° dampften wir das überschüssige Diazomethan ab. Das Methylderivat, welches mit Eisen(III)-chlorid keine charakteristische Fär-

bung ergab, erwies sich als in Wasser unlöslich und gegen Luftsauerstoff beständig. Es liess sich im Vakuum (0,01 mm Hg) bei 100—120° destillieren, ohne fest zu werden. Nach Behandlung mit 3-proz. methanolischer Kalilauge zur Verseifung eventuell vorhandenen Methylresten wurde ein festes Produkt erhalten, das im Hochvakuum bei 100—130° sublimierte, in Wasser löslich war und keine Eisen(III)-chlorid-Reaktion gab. Nach wiederholtem Umkrystallisieren aus absolutem Äther lag der Schmelzpunkt bei 246—247°.

3,763 mg Subst. gaben 7,89 mg CO₂ und 1,64 mg H₂O

C₈H₈O₄ Ber. C 57,12 H 4,80% Äquiv.-Gew. 168,1

Gef. „ 57,19 „ 4,87% „ „ 167,4

Wir haben zum Vergleich aus Chinasäure hergestellte Protocatechusäure in analoger Weise mit Diazomethan methyliert. Die erhaltene 3-Oxy-4-methoxy-benzoessäure schmolz bei 245—247°.

4,274 mg Subst. gaben 8,97 mg CO₂ und 1,86 mg H₂O

Gef. C 57,25 H 4,86%

Im Mischschmelzpunkt trat mit der aus der Nährlösung erhaltenen Verbindung keine Erniedrigung ein. Das aufgearbeitete Kulturfiltrat mochte etwa 2 g Protocatechusäure enthalten.

Nach Zugabe von 75 cm³ konz. Bleiacetatlösung zu 16,5 l von den Pilzen befreiter Nährlösung erhielten wir eine Fällung, die abfiltriert, in Wasser suspendiert mit Salzsäure zersetzt wurde. Die saure Lösung haben wir zusammen mit dem ausgefallenen Bleichlorid in einem Extraktionsapparat während 30 Stunden mit Äther ausgezogen und nach Eindampfen des Lösungsmittels 2,67 g braunen, festen Rückstand bekommen. Wir haben ihn in wässriger Lösung mit Tierkohle erwärmt und erzielten damit eine geringe Reinigung. Es ergaben sich braune Krystalle, die in Äthanol nochmals mit Kohle gereinigt und dann zweimal aus absolutem Methanol und Chloroform umkrystallisiert wurden. Vor der Analyse haben wir die Verbindung 5 Stunden in der Wasserpistole über Phosphorpentoxyd getrocknet. Feine Nadelchen, Fließpunkt 235—240° unter Zersetzung, im Mischschmelzpunkt mit Gallussäure keine Erniedrigung.

3,824 mg Subst. gaben 6,95 mg CO₂ und 1,27 mg H₂O

C₇H₆O₅ Ber. C 49,40 H 3,56%

Gef. „ 49,56 „ 3,71%

Ausbeute an Gallussäure ca. 2 g.

Methylderivat: 1,8 g Rohprodukt wurden in 16,4 cm³ 10-proz. Natronlauge gelöst, mit 5,9 g Dimethylsulfat versetzt und auf dem Wasserbad im Stickstoffstrom 3 Stunden erhitzt. Zur Zersetzung überschüssigen Dimethylsulfates fügten wir nochmals Natronlauge zu und erwärmten während einer weiteren Stunde. Nach Abkühlen schüttelten wir die alkalische Lösung mit Äther aus, säuerten mit Schwefelsäure an und extrahierten erneut mit Äther. Diese ätherische Lösung wurde mit verdünnter Säure und dann mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Den erhaltenen braunen Rückstand krystallisierten wir aus Wasser um und sublimierten die braunen Krystalle bei 130—138° und 12 mm Hg. Schmelzpunkt des Sublimates (farblose, grosse Nadeln) 145—148°, nach Umkrystallisieren aus Wasser 160—163°, aus Äther 167—168°.

Vor der Analyse wurde die Verbindung aus Chloroform-Petroläther umkrystallisiert:

4,061 mg Subst. gaben 8,42 mg CO₂ und 2,02 mg H₂O

4,511 mg Subst. gaben 14,38 mg AgJ

8,94 mg Subst. in 7 cm³ heiss neutralisiertem Wasser gelöst und bei Siedehitze titriert, verbrauchten 0,426 cm³ 0,01-n. NaOH.

C₁₀H₁₂O₅ Ber. C 56,57 H 5,70 OCH₃ 43,8% Äquiv.-Gew. 212,1

Gef. „ 56,54 „ 5,56 „ 42,1% „ „ 209,9

Schmelzpunkt der 3,4,5-Trimethoxy-benzoessäure: 169—170°¹⁾.

¹⁾ Beilstein, Ergbd. 10, 240.

p-Phenyl-phenacyl-ester der Gallussäure.

64 mg der erhaltenen Säure wurden mit 3,5 cm³ 0,1-n. Natronlauge neutralisiert, eingedampft und im Vakuum bei 100° getrocknet. Wir fügten eine Lösung von 120 mg p-Phenyl-phenacylbromid in 15 cm³ 90-proz. Alkohol (das Natriumgallat ist in absolutem Alkohol unlöslich) hinzu und erwärmten 2 Stunden am Rückflusskühler. Das Reaktionsgemisch wurde mit Tierkohle kurz aufgekocht und heiss filtriert. Zum Filtrat gaben wir bis zu leichter Trübung Wasser und liessen es im Eisschrank einige Stunden stehen. Zuerst erhielten wir eine amorphe Fällung; nach weiterer Wasserzugabe und längerem Aufenthalt im Eisschrank bildete sich ein krystallischer Niederschlag. Er konnte von der amorphen Fällung getrennt werden. Schmelzpunkt 191—193°, unter Zersetzung. Aus 85-proz. Alkohol umkrystallisiert, schmolzen die Krystalle bei 192—194° (korr. 196—198°). *Drake* und *Sweeney*¹⁾ fanden 195—198°.

Der der Nährlösung zugefügte Hefetrockenextrakt enthielt pro 1 g rund 700 mg Wasserlösliches. Zugabe von Eisen(III)-chlorid oder Lauge zur gelben Lösung bewirkte keine Farbänderung, ebensowenig das Aufkochen mit 20-proz. Salzsäure und anschliessende Versetzen mit Lauge. Damit dürfte eine Herkunft der aufgefundenen Oxybenzoesäuren aus dem verwendeten Hefextrakt auszuschliessen sein.

Wachstumsversuche: Die *Phycomyces*-Reinkulturen wurden uns in liebenswürdiger Weise vom Direktor des Botan. Gartens Bern, Herrn Prof. Dr. W. H. Schopfer, zur Verfügung gestellt. Wir haben sie nach seinen Angaben auf Malzextrakt-haltigem Agar-Agar gezüchtet. Zur Anlegung unserer Kulturen verwendeten wir die in Wasser suspendierten Sporen. Die Züchtung erfolgte in *Erlenmeyer*-Kolben, enthaltend 25 cm³ Nährlösung. Die Ammoniumsalze haben wir durch sorgfältige Pufferung der organischen Säuren mit Ammoniak erhalten.

Der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung* an der Universität Zürich danken wir für eine erhaltene Subvention.

Zürich, Physiol.-chemisches Institut der Universität.

81. Versuche zur Herstellung von 3,4-Diacetyl-*d*-chinovosan- $\alpha\langle 1,2\rangle\beta\langle 1,5\rangle$

von E. Hardegger und R. M. Montavon.

(11. II. 47.)

Vor 25 Jahren beschrieb *Percy Brigl*²⁾ ein aus verschiedenen Gründen interessantes Anhydrid der *d*-Glucose, das 3,4,6-Triacetyl-*d*-glucosan $\alpha\langle 1,2\rangle\beta\langle 1,5\rangle$ (VIIIa). Dieses sogenannte „*Brigl*-Anhydrid“ (VIIIa) ist eines der wenigen Zucker-anhydride³⁾ mit einem Äthylenoxyd-ring. Bemerkenswert ist die aussergewöhnliche Leichtigkeit, mit der das *Brigl*-Anhydrid mit primären und sekundären Carbinolen unter Bildung von Glucosiden reagiert²⁾⁴⁾. Die von *Brigl*

¹⁾ *N. L. Drake* and *J. P. Sweeney*, *Am. Soc.* **54**, 2060 (1932).

²⁾ *Z. physiol. Ch.* **116**, 1 (1921); **122**, 245 (1922).

³⁾ Nicht zu verwechseln mit den Anhydro-zuckern!

⁴⁾ Vgl. *W. J. Hickinbottom*, *Soc.* **1928**, 3140; *W. N. Haworth* und *W. J. Hickinbottom*, *Soc.* **1931**, 2847.