

30 Min. lang oxydiert. Aufarbeitung ergab 271 mg Bariumacetat mit einem ^{18}O -Überschuss von 1,94% oder 80% des im eingesetzten Wasser vorhandenen ^{18}O -Überschusses.

B_2 . Der vorige Versuch wurde wiederholt in solcher Weise, dass der ^{18}O -Gehalt des Wassers vor und nach dem Versuch gemessen und auch der Sauerstoff vor und nach dem Passieren des Reaktionsgemisches hinsichtlich des ^{18}O -Gehaltes verglichen wurde (s. Tab.).

Das gebildete Bariumacetat enthält somit 70% vom ^{18}O -Überschuss des umgebenden Wassers.

Diese Arbeit wurde gefördert durch Zuwendungen der *Schweiz. Studienkommission für Atomenergie* (an *P. Baertschi*) und vom *Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* (durch ein Stipendium an *M. Rottenberg*). Wir danken den genannten Institutionen für die gewährte Unterstützung.

M. Rottenberg dankt auch der *Vant'Hoff-Stiftung* in Holland für einen Forschungsbeitrag.

SUMMARY.

The platinum-catalysed autoxidation of ethanol in water has been studied with ^{18}O as a tracer. The reaction product was isolated as barium acetate and converted to CO_2 for mass-spectrometric ^{18}O analysis. It is found that the ^{18}O from O_2 gas is not significantly incorporated into the product but with H_2^{18}O the barium acetate formed contains 70 to 80% of the H_2^{18}O label. The results are discussed in terms of two possible alternative mechanisms.

Physikalisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

229. Über die Biosynthese des β -Carotins bei *Mucor hiemalis* *Wehmer*. Die Beteiligung der Essigsäure am Aufbau der Carotinmolekel, insbesondere in den Stellungen 3, 4, 6 bzw. 3', 4', 6', untersucht mit Hilfe von ^{14}C -markierter Essigsäure¹⁾.

IV. Mitteilung²⁾

von **E. C. Grob** und **R. Büttler**.

(29. IX. 56.)

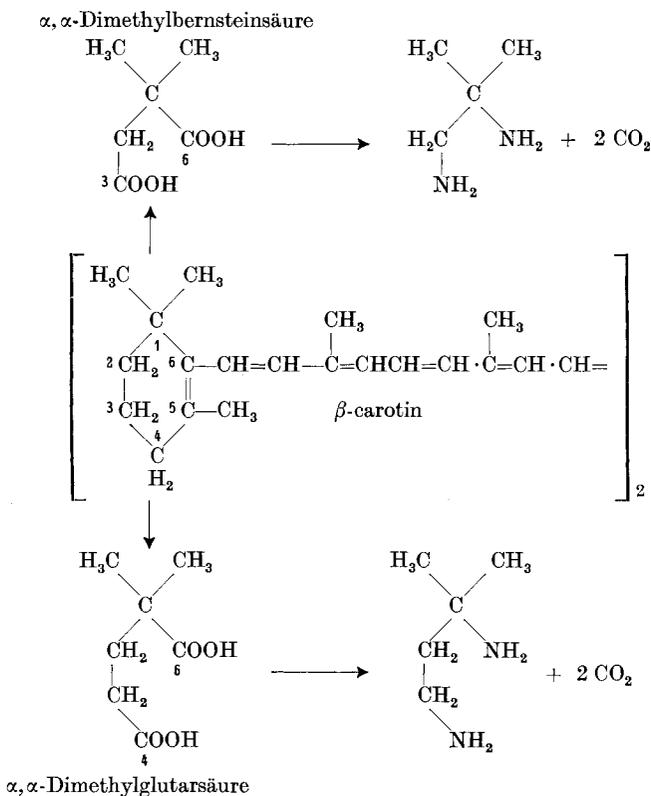
Auf verschiedenen experimentellen Wegen konnte gezeigt werden, dass der Schimmelpilz *Mucor hiemalis* *Wehmer* CBS Stamm + sein β -Carotin aus der Essigsäure – wohl in ihrer aktiven Form als Acetyl-Coenzym A (CoASH) – aufbaut³⁾. Ein näherer Einblick in den Aufbaumechanismus dieses Pigmentes kann gewonnen werden, wenn die Positionen, welche die C-Atome der Essigsäure im β -Carotin einnehmen, mit Hilfe von Methyl- bzw. Carboxyl-markierter Essigsäure bestimmt werden können. Die 20 C-Atome

¹⁾ Vorgetragen an der Sommersammlung der Schweiz. Chemischen Gesellschaft am 22. 9. 1956 in Basel.

²⁾ III. Mitt., *E. C. Grob & R. Büttler*, *Helv.* **38**, 1313 (1955).

³⁾ *E. C. Grob*, *Chimia* **10**, 73 (1956).

Im Folgenden soll über die Versuche berichtet werden, nach denen wir die Herkunft der C-Atome 3,4 und 6 bzw. 3',4' und 6' bestimmt haben. Nach der Formel II sollten C-3 von der Carboxyl- und C-4 wie auch C-6 von der Methylgruppe der Essigsäure geliefert werden. Um diese C-Atome zu erfassen, haben wir das durch *Mucor hiemalis* aus Methyl- bzw. Carboxyl-markierter Essigsäure gebildete radioaktive β -Carotin nach der von *Karrer* angegebenen Methode⁴⁾ mit Permanganat oxydiert. Als Oxydationsprodukte sind die Dimethylmalonsäure, die α,α -Dimethylbernsteinsäure und die α,α -Dimethylglutarsäure gefasst worden. Die Decarboxylierung der isolierten und gereinigten Säuren wurde wiederum nach der *Schmidt'schen* Reaktion durchgeführt:



Da die Ausbeute an CO_2 insbesondere bei der α,α -Dimethylbernsteinsäure nicht besonders gut ist (s. exper. Teil), musste die Frage geprüft werden, ob beide Carboxylgruppen abgespalten werden, oder ob die eine oder andere bevorzugt werde. Die Entscheidung hierüber konnte mit Hilfe von ^{14}C -markierter α,α -Dimethylbernsteinsäure und α,α -Dimethylglutarsäure, bei denen lediglich die α -ständige COOH -

⁴⁾ P. Karrer, A. Helfenstein, H. Wehrli & A. Wettstein, *Helv.* **13**, 1084 (1930).

Gruppe markiert war, getroffen werden. Diese Säuren sind ebenfalls durch oxydativen Abbau von synthetischem β -Carotin-(^{14}C -6,6') gewonnen worden. Dieses von *Wuersch & Schwieter*⁵⁾ hergestellte Präparat wurde uns in verdankenswerter Weise von der Firma *F. Hoffmann-La Roche*, Basel, zur Verfügung gestellt. Diese Untersuchungen, die in einer speziellen Arbeit näher beschrieben werden sollen, haben ergeben, dass beide Carboxylgruppen abgespalten werden.

Die Decarboxylierung der α,α -Dimethyldicarbonsäuren, die aus dem biosynthetisch gewonnenen β -Carotin erhalten wurden, lieferte die folgenden Ergebnisse (Tab. 1).

Tabelle 1.

	β -Carotin aus COOH -markiertem Acetat	β -Carotin aus CH_3 -markiertem Acetat
BaCO_3 aus α,α -Dimethylbernsteinsäure	A = 15,9 ipm/mg aktiv	A = 34,3 ipm/mg aktiv
BaCO_3 aus α,α -Dimethylglutarsäure	Z = $0,5 \pm 0,78$ ipm inaktiv	A = 76,8 ipm/mg aktiv

Aus dem mit carboxylmarkierter Essigsäure erhaltenen β -Carotin entstand eine α,α -Dimethylbernsteinsäure, die radioaktives CO_2 abspaltet, was bedeutet, dass sowohl C-3 als C-6 aus der Carboxylgruppe stammen könnte. Die α,α -Dimethylglutarsäure hingegen ergab ein inaktives BaCO_3 , woraus wir schliessen, dass weder C-4 noch C-6 aus der Carboxylgruppe stammen. Somit liefert die Carboxylgruppe der Essigsäure nur das C-3.

Die aus dem β -Carotin, welches aus der methyl-markierten Essigsäure gebildet wurde, entstandenen Dicarbonsäuren liefern radioaktives BaCO_3 . Die Radioaktivität des BaCO_3 aus der α,α -Dimethylglutarsäure ist doppelt so gross wie diejenige des BaCO_3 aus der α,α -Dimethylbernsteinsäure. Wir nehmen deshalb an, es sei im Falle der α,α -Dimethylbernsteinsäure nur das C-6 radioaktiv gewesen (das C-3 wird, wie gezeigt, von der Carboxylgruppe geliefert), während aus der α,α -Dimethylglutarsäure sowohl das C-4 wie auch das C-6 aktiv waren, woraus sich die verdoppelte Aktivität erklären lässt. Aus diesen Versuchen folgt, dass den Erwartungen entsprechend das C-3 des β -Carotins aus der Carboxylgruppe und die C-4 und C-6 aus der Methylgruppe der Essigsäure gebildet werden.

Experimenteller Teil.

1. Kulturbedingungen: *Mucor hiemalis* *Wehmer* CBS Stamm + wurde nach dem schon früher mitgeteilten Verfahren⁶⁾ gezüchtet.

2. Die Isolierung des radioaktiven β -Carotins aus dem Pilzmyzel wurde ebenfalls nach der schon früher beschriebenen Methode⁶⁾ vorgenommen.

⁵⁾ *J. Würsch & U. Schwieter*, *Helv.* **39**, 1067 (1956).

⁶⁾ *H. Mitt., E. C. Grob & R. Büller*, *Helv.* **37**, 1908 (1954).

3. Der oxydative Abbau des β -Carotins erfolgte im Prinzip nach den Angaben von *Karrer et al.*⁴⁾. – Das mit synthetischem β -Carotin *Roche* auf 500 mg verdünnte radioaktive β -Carotin wurde in 83 cm³ Benzol (*ad anal. Merck*) gegeben, wobei das Pigment zum grössten Teil in Lösung geht. Darauf wurde mit 333 cm³ alkalischer Permanganatlösung versetzt (12,5 g KMnO₄ + 20 g kalz. Soda + 1 l dest. Wasser) und in einer braunen Stöpselflasche 24 Std. auf der Maschine geschüttelt. Die Mischung, in welcher das gesamte Permanganat in Braunstein übergegangen ist, wurde noch 2 Std. unter Rückfluss gekocht; anschliessend wurde, nach dem vollständigen Abdestillieren des Benzols, mit 33 cm³ konz. Phosphorsäure angesäuert und der Braunstein durch tropfenweise Zugabe von H₂O₂ (30-proz.) aufgelöst.

4. Zur Isolierung der α,α -Dimethyldicarbonensäuren wurde die leicht trübe Lösung durch Passieren eines grossen Faltenfilters von Harzteilen befreit und im Vakuum auf ca. 100 cm³ eingengt. Die resultierende viskose Lösung wurde nunmehr fünfmal mit je 100 cm³ Äther ausgeschüttelt, die vereinigte Ätherlösung auf ein Drittel ihres Volumens eingengt und zweimal mit je 5 cm³ Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die vereinigte Hydrogencarbonatlösung wurde darauf mit 2-n. Salzsäure angesäuert, dann mit 150 cm³ Äther 16 Std. im *Kutscher-Steudel*-Apparat extrahiert und die so erhaltene ätherische Lösung der Dicarbonensäuren nach dem Trocknen über Natriumsulfat zur Trockene eingedampft; dabei fiel ein beim Weitertrocknen im Vakuumexsikkator teilweise erstarrendes gelbliches Öl an, das zur chromatographischen Trennung der Dicarbonensäuren in 0,8 cm³ dest. Wasser aufgenommen wurde. (Ausbeuten s. Tab. 1.)

5. Präparative papierchromatographische Trennung der α,α -Dimethyldicarbonensäuren: Auf einem mit dem Lösungsmittel der Chromatographie vorbehandelten Blatt *Whatman* Nr. 3 (45 × 40 cm) wurde die wässrige Lösung der Säuren in zwei Portionen zu 0,4 cm³ auf einer 40 cm langen Startlinie in einem Strich aufgetragen; weitere 0,4 cm³ dest. Wasser wurden zum Ausspülen des Gefässes, das das Säuregemisch enthielt, verwendet und dann als dritte Portion aufgetragen. Links und rechts der Startlinie wurde noch je ein Fleck mit gleichen Mengen Vergleichssubstanzen (Dimethylmalonsäure, α,α -Dimethylbernsteinsäure und α,α -Dimethylglutarsäure) aufgetragen. Dann wurde 6 Std. bei 20° aufsteigend chromatographiert unter Verwendung von folgendem Lösungsmittel: Chloroform / tert. Amylalkohol / 85-proz. Ameisensäure / dest. Wasser (154:6:32:72 v/v). Die bei dieser Anordnung beobachteten Rf-Werte betragen für Dimethylmalonsäure 0,28, für α,α -Dimethylbernsteinsäure 0,40 und für α,α -Dimethylglutarsäure 0,68; damit war eine gute Trennung gewährleistet. Das Chromatogramm wurde zuerst mehrere Std. im Luftstrom (Ventilator) und dann noch 1 Std. bei 80° im Trockenschrank getrocknet. Am linken und rechten Blattrand wurde nun unter Erfassung von je 1 cm Startlinie je ein vertikaler Leitstreifen abgeschnitten und mit leicht alkalischer Bromkresolpurpur-Lösung besprüht, wobei auf violetterm Grund die übereinstimmenden gelben Flecken der Vergleichssubstanzen und der entsprechenden radioaktiven Dicarbonensäuren erscheinen. Gemäss diesen Leitstreifen wurden auf dem Hauptblatt die beiden, der α,α -Dimethylbernsteinsäure bzw. der α,α -Dimethylglutarsäure entsprechenden horizontalen Zonen angezeichnet und herausgeschnitten. Radioaktive Dimethylmalonsäure aus dem Carotinabbau fällt nur in Spuren an (kaum erkennbarer Fleck auf dem Chromatogramm) und konnte daher präparativ nicht erfasst werden.

Zur Elution der Dicarbonensäuren wurden die Streifen in ca. 1 mm breite Schnitzel zerschnitten, die zuerst 24 Std. in je 50–100 cm³ dest. Wasser mazeriert, dann je 5 Min. gekocht und schliesslich noch zweimal mit den gleichen Mengen dest. Wasser ausgekocht wurden. Die jeweils siedend durch eine Glassinternutsche (G4) filtrierten wässrigen Lösungen einer Säure wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockene eingedampft, wobei die Säuren wiederum als – diesmal farblose – Öle anfallen. (Ausbeuten s. Tab. 2.)

6. Reinigung der α,α -Dimethyldicarbonensäuren: Zur Kristallisation wurden die Öle zuerst mehrmals mit kleinen Portionen Benzol ausgekocht, die vereinigten filtrierten Benzollösungen jeder Säure auf ein ganz kleines Volumen eingedampft und in der Hitze mit ebenfalls heissem Petroläther bis zur ersten Trübung versetzt; dann wurde

langsam erkalten gelassen. Nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank schieden sich die Säuren in schönen weissen schmelzpunktstreinen Kriställchen ab, die abgesaugt, mit etwas Petroläther gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet wurden.

In einigen Fällen (s. Tab. 2) wurde zur Verbesserung der Ausbeute vor dem Umkristallisieren der rohen Säure etwas reine synthetische Substanz (Präparate *Flucka*) beigelegt. (Ausbeuten s. Tab. 2.)

7. *Schmidt'sche Decarboxylierung der α,α -Dimethyldicarbonensäuren*: Je ca. 10 mg der reinen radioaktiven Säuren wurden mit den entsprechenden optimalen Mengen Natriumazid innig vermischt (20 mg NaN_3 pro 10 mg α,α -Dimethylbernsteinsäure; 22 mg NaN_3 pro 10 mg α,α -Dimethylglutarsäure) und das Gemisch innert 1 Std. in 6 bis 10 Portionen zu den entsprechenden Mengen konz. Schwefelsäure gegeben (0,45 cm³ konz. H_2SO_4 pro 10 mg α,α -Dimethylbernsteinsäure; 0,47 cm³ konz. H_2SO_4 pro 10 mg α,α -Dimethylglutarsäure), unter sorgfältiger Einhaltung der optimalen Spalttemperaturen (85° für α,α -Dimethylbernsteinsäure; 65° für α,α -Dimethylglutarsäure).

Das gebildete CO_2 wurde in Bariumhydroxyd eingeleitet, das ausgefallene Bariumcarbonat abgesaugt, mit CO_2 -freiem Wasser gewaschen und darauf zuerst mit Methanol, dann im Vakuumexsikkator getrocknet. (Ausbeuten s. Tab. 2.)

Tabelle 2.

Reaktion	β -Carotin aus COOH-markiertem Acetat	β -Carotin aus CH_3 -markiertem Acetat
<i>Oxydativer Abbau des β-Carotins</i>		
β -Carotin*	500,0 mg	500,0 mg
Säuregemisch roh	198,4 mg	182,6 mg
α,α -Dimethylbernsteinsäure roh	20,7 mg	23,5 mg
α,α -Dimethylglutarsäure roh	37,2 mg	48,4 mg
α,α -Dimethylbernsteinsäure, synth. Zusatz	5,0 mg	—
α,α -Dimethylglutarsäure, synth. Zusatz	—	—
α,α -Dimethylbernsteinsäure rein	8,2 mg	8,6 mg
α,α -Dimethylglutarsäure rein	11,4 mg	9,0 mg
<i>Schmidt'sche Decarboxylierung der Dicarbonensäuren</i>		
α,α -Dimethylbernsteinsäure eingesetzt	8,2 mg	8,6 mg
BaCO_3 aus α,α -Dimethylbernsteinsäure	10,1 mg	2,5 mg
α,α -Dimethylglutarsäure eingesetzt	11,4 mg	9,0 mg
BaCO_3 aus α,α -Dimethylglutarsäure	17,7 mg	8,2 mg

Diese Arbeit ist mit Unterstützung des *Schweiz. Nationalfonds* durchgeführt worden. Der Firma *F. Hoffmann-La Roche*, Basel, danken wir für die freundliche Überlassung von synthetischem β -Carotin-(¹⁴C-6,6').

Zusammenfassung.

Mit Hilfe von ¹⁴C-markierter Essigsäure wird festgestellt, dass bei der Biosynthese von β -Carotin bei *Mucor hiemalis Wehmer* das C-Atom 3 aus der Carboxylgruppe der Essigsäure stammt, während die C-Atome 4 und 6 von der Methylgruppe der Essigsäure geliefert werden.

Botanisches Institut der Universität Bern.