

123. Welkstoffe und Antibiotika.

20. Mitteilung¹⁾.

Über induzierte Abwehrstoffe bei Orchideen. I

von A. Boller, H. Corrodi, E. Gäumann, E. Hardegger,
H. Kern und N. Winterhalter-Wild.

(18. V. 57.)

In einer früheren Arbeit²⁾ wurde gezeigt, dass der Mykorrhizenpilz *Rhizoctonia repens* Bern. in den Knollen von *Orchis militaris* L. Abwehrreaktionen auslöst: unter der Wirkung der Stoffwechselprodukte des Pilzes bilden die Knollen Abwehrstoffe, welche den Pilz im Wachstum hemmen und von den Knollen fernhalten. Die vorliegende Arbeit liefert einen ersten Beitrag zur Isolierung und zur Kenntnis der chemischen Natur dieser Abwehrstoffe.

Wir sammelten die Versuchspflanzen (*Orchis militaris*) während der Blütezeit im Freiland und pflanzten sie im Garten ein; im Winter wurden die Knollen ausgegraben und nach folgendem Schema verarbeitet.

Aufarbeitungsschema.

10 kg Knollen.	Gewaschen, desinfiziert, gewaschen, in Scheiben zerschnitten, mit <i>Rhizoctonia repens</i> beimpft, bei 27° 10—14 Tage inkubiert, dann zerschlagen und nacheinander mit Alkohol, Alkohol-Äther 2:1 und Äther extrahiert.
↓	
Vereinigte alkoholisch-ätherische Extrakte.	Eingedampft im Vakuum, bis sich Öl auszuschcheiden begann, mit Wasser verdünnt, 3mal mit Essigester ausgeschüttelt. Wässriger Teil, da praktisch unwirksam, verworfen.
↓	
Essigesterextrakt.	Zuerst mit 2-n. Kaliumhydrogencarbonat, dann mit 2-n. Soda und schliesslich mit 2-n. Natronlauge (Eiszusatz!) je 3mal ausgeschüttelt. Alkalische Lösungen angesäuert, mit Essigester extrahiert:
	a) Hydrogencarbonatlöslich: 6,0 g, Aktivität 2 E/mg.
	b) Sodalöslich: 4,2 g, Aktivität 0,5 E/mg.
	c) Laugenlöslich: 5,3 g, Aktivität 0,2 E/mg.
↓	
Neutralteil.	Eingedampft, 3mal mit kaltem Benzol digeriert, Benzollösliches durch Dekantation abgetrennt. Benzolunlöslich 9,4 g, Aktivität 4 E/mg.
↓	
Benzollöslicher Neutralteil.	Eingedampft. 21,6 g, Aktivität 30 E/mg.

¹⁾ 19. Mitt. Helv. **40**, 1016 (1957).

²⁾ E. Gäumann, R. Braun & G. Bazzigher, Phytopath. Z. **17**, 36 (1950).

Um zu prüfen, welche Inhaltsstoffe der Knollen erst unter der Einwirkung des *Rhizoctonia*-Pilzes gebildet werden, extrahierten wir einen Teil der Knollen direkt nach dem Ausgraben; eine dritte Gruppe von Knollen inkubierten wir 10 bis 14 Tage unter den im Schema genannten Bedingungen, ohne sie jedoch mit dem Pilz zu infizieren.

Die biologische Prüfung der Fraktionen erfolgte in erster Linie auf Grund der Hemmwirkung des Myzelwachstums von *Rhizoctonia solani* Kühn³). Es zeigte sich bald, dass sich die Hauptmenge der wirksamen Stoffe im benzollöslichen Neutralteil befindet; vorläufig wurde dieser allein untersucht.

Die biologische Aktivität des benzollöslichen Neutralteils blieb beim Erhitzen auf 100° sowie beim Stehenlassen mit 2-n. Säuren oder Laugen bei Zimmertemperatur voll erhalten.

Zur weiteren Auftrennung diente die Chromatographie an Aluminiumoxyd der Aktivität IV. Ein erstes, rohes Chromatogramm gab vier Hauptfraktionen, die alle biologisch aktiv waren:

a) Ein erstes, öliges Benzoleluat. Hochvakuumdestillation im Kugelrohr lieferte als erste Fraktion Cumarin, worauf der grösste Teil bei 135° überging. Ein geringer Rückstand liess sich nicht unzersetzt destillieren, war nicht mehr stark aktiv und wurde verworfen. Die mittlere Fraktion war chromatographisch einheitlich. Das IR.-Spektrum wies auf ein aliphatisches Keton, Lacton oder einen aliphatischen Ester hin ($\nu_{\text{CO}} = 1735 \text{ cm}^{-1}$). Das Präparat war optisch aktiv ($[\alpha]_{\text{D}} = +1,75^\circ$ in Alkohol).

b) Ein zweites, grösstenteils kristallisiertes Benzoleluat. Nach mehrmaliger Kristallisation und Chromatographie wurde eine vorläufig Orchinol benannte einheitliche Substanz in farblosen Prismen vom Smp. 127° erhalten, die sich unzersetzt im Hochvakuum sublimieren lassen. Die Analysen weisen auf die Formel $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_3$ hin. Es sind zwei Methoxyl-, keine C-CH₃-Gruppen, ein aktives Wasserstoffatom und eine alkoholische (?) Hydroxylgruppe vorhanden. Die Substanz ist in Benzol und in Methanol optisch inaktiv. Nach dem IR.-Spektrum liegen eine stark assoziierte OH-Gruppe ($\nu_{\text{OH}} = 3420 \text{ cm}^{-1}$) sowie ein aromatisches System ($\nu = 1610$ und 1500 cm^{-1}) vor. Orchinol bildet leicht und quantitativ Ester, zum Beispiel ein O-Acetyl- und ein O-p-Brombenzoyl-Derivat.

c) Ein Äthereluat, das nach nochmaligem Chromatographieren in minimaler Ausbeute eine kristalline Fraktion lieferte, die nach Umkristallisieren aus Methanol-Wasser bei 113° schmolz und optisch inaktiv war. Aus dem IR.-Spektrum ist eine OH-Bande ($\nu_{\text{OH}} = 3400 \text{ cm}^{-1}$) und wahrscheinlich ein aromatisches System ($\nu = 1600$ und 1520 cm^{-1}) ersichtlich. Molgewicht 141⁴).

³) A. Grosser & W. Friedrich, Z. Naturforsch. **2b**, 425 (1947).

⁴) In Campher bestimmt.

d) Ein Methanol-Eisessig-Eluat (30:1), das biologisch auch sehr aktiv war, aber noch nicht weiter untersucht wurde.

Die mit *Rhizoctonia* infizierten Knollen ergaben eine rund doppelt so hohe Ausbeute an benzollöslichem Neutralteil und an Orchinol wie die nicht infizierten, aber während 10–14 Tagen gelagerten Knollen; direkt extrahierte Knollen enthielten kein Orchinol. Die Verbindung wird offenbar erst während des Versuchs in feststellbaren Mengen gebildet, und zwar nach Infektion mit dem Pilz in wesentlich höherem Ausmass. Das Orchinol erwies sich gegenüber verschiedenen Testobjekten (Pilzen und Bakterien) als wesentlich aktiver als die übrigen Fraktionen und auch als Cumarin. Über die biologischen Wirkungen der verschiedenen Stoffe und ihre Bedeutung für die Abwehrreaktionen der Orchisknollen soll an anderer Stelle eingehend berichtet werden.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds* und der *F. Hoffmann-La Roche & Cie. AG.* in Basel für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil⁵⁾.

Infektion und Extraktion der Knollen. Die Knollen wurden unter fließendem Wasser gewaschen, nach Abtropfen gewogen, 3 Min. in 0,1-proz. Sublimatlösung desinfiziert und mit sterilem, destilliertem Wasser gewaschen. Anschliessend wurden sie unter sterilen Bedingungen in Scheiben geschnitten und in sterilisierte Glaxokolben eingefüllt. Nach Beimpfung mit einer Sporensuspension von *Rhizoctonia repens* Bern. (Stamm ETH. M 32 in Reiskultur) erfolgte die Inkubation bei 27° während 10 bis 14 Tagen. In dieser Zeit wuchs der Pilz intensiv und bildete ein weisses Myzel; die Knollen färbten sich dunkelbraun, während die Kontrollen weiss blieben.

Die inkubierten Knollenscheiben wurden einen Tag in 96-proz. Äthanol bei Zimmertemperatur belassen, nach Abgiessen des Äthanol mit frischem Äthanol im Turmix zerschlagen und nochmals bei Zimmertemperatur 3 Tage stehengelassen. Anschliessend folgten zwei Extraktionen mit Äthanol-Äther (2:1) während je 3–4 Tagen und zum Schluss eine solche mit Äther während 2–3 Tagen. Die ersten Extrakte waren intensiv braun, die letzten praktisch farblos. Alle Äthanol- und Ätherextrakte wurden vereinigt.

Aufarbeitung der Extrakte. Durch schonendes Eindampfen im Vakuum bei 40° wurde der grösste Teil des Lösungsmittels entfernt, bis sich ein braunes Öl abzuschneiden begann. Nach Zugabe von einem gleichen Volumen Wasser wurde dreimal mit Essigester ausgeschüttelt. Die wässrige Phase war praktisch unwirksam und wurde verworfen. Die vereinigten Essigesterauszüge wurden je dreimal mit 2-n. Kaliumhydrogencarbonat, 2-n. Soda und 2-n. Natronlauge (Eiszusatz!) ausgeschüttelt. (Gewicht und Aktivität der sauren Bestandteile siehe Aufarbeitungsschema.) Die Essigesterlösung wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde dreimal mit kaltem Benzol digeriert, bis die abgegossene Benzollösung farblos war. Der benzolunlösliche Teil wurde, da nur wenig aktiv, beiseite gestellt.

Die Extrakte aus nicht infizierten Knollen wurden gleich aufgearbeitet.

Beständigkeitsprüfung des benzollöslichen Neutralteils gegenüber Wärme, Säure und Lauge. 100 mg Substanz wurden in 5 cm³ Dioxan 1 Std. unter Rückfluss gekocht; je 100 mg wurden in 2-n. Salzsäure und 2-n. Natronlauge und wenig Methanol gelöst und 1 Tag bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach der Rückgewinnung der Substanz zeigte die biologische Prüfung keinen Aktivitätsverlust.

⁵⁾ Alle Smp. sind korrigiert. Die Analysenpräparate wurden im Hochvakuum bei 60° 4 Std. getrocknet.

Chromatogramm des benzollöslichen Neutralteils. 2,0 g Substanz (Aktivität 30 E/mg, Totalaktivität 60000 E) wurden an einer Säule von 75 g Aluminiumoxyd der Aktivität IV in folgende Fraktionen aufgeteilt:

1. Benzoleluat, Öl	0,54 g; Aktivität 30 E/mg, total 16200 E
2. Benzoleluat, z. T. krist.	0,55 g; Aktivität 26 E/mg, total 14300 E
Äthereluat, z. T. krist.	0,40 g; Aktivität 27 E/mg, total 10800 E
Methanol-Eisessig-(30:1)-Eluat	0,40 g; Aktivität 30 E/mg, total 12000 E
	1,89 g; total 53300 E

Beim Chromatogramm gingen 6% der Aktivität und ca. 5% der Substanz verloren.

Untersuchung der einzelnen Chromatogrammfraktionen. 1. Benzoleluat (0,36 g): Fraktionierte Destillation im Kugelrohr im Hochvakuum gab a) Badtemperatur bis 85°: 50 mg farblose, weisse Stäbchen vom Smp. 67° nach Umlösen aus Petroläther; nach Mischprobe, Aussehen und Geruch identisch mit Cumarin.

b) Badtemperatur 135°: 250 mg gelbliches, angenehm riechendes Öl, das sich beim Chromatographieren an Aluminiumoxyd der Aktivität II einheitlich verhielt. Zur Analyse wurde das Präparat nochmals im Kugelrohr bei 135° im Hochvakuum destilliert. Aktivität 28 E/mg. $[\alpha]_D = +1,75^\circ$ ($c = 2$ in Alkohol).

Gef. C 76,81; 76,63 H 11,13; 11,20%

c) Destillationsrückstand, 60 mg braunes Harz der Aktivität 17 E/mg, das nicht unzersetzt destillierbar ist und verworfen wurde.

2. Benzoleluat (0,40 g). *Isolierung von Orchinol*. Das zum grössten Teil kristallisierte 2. Benzoleluat wurde aus Benzol-Cyclohexan und aus Methanol-Wasser bis zur Smp.-Konstanz umkristallisiert. An Aluminiumoxyd der Aktivität II chromatographiert erwiesen sich die Kristalle als einheitlich; sie liessen sich mit Benzol-Äther 1:1 eluieren. Orchinol liess sich ohne Aktivitätsverlust im Hochvakuum bei 160° sublimieren. Farblose Prismen, Smp. 127°. Ausbeute 200 mg. Aktivität 25 E/mg. $[\alpha]_D = \pm 0^\circ$ ($c = 3$ in Benzol und in Methanol).

$C_{16}H_{16}O_3$	Ber. C 74,97	H 6,29	O 18,74	Mol.-Gew. 256
	Gef. ,, 74,69; 74,83	,, 6,34; 6,49	,, 18,65; 18,74%	,, ,, 233 ⁴⁾
	Ber. 2 OCH_3 24,22%; 1 „H“ 0,39%; 1 C— CH_3 5,87%			
	Gef. ,, 23,29%; 1 „ ,, 0,41%; 1 „ ,, 0,00%			

O-Acetyl-orchinol: Mit Acetanhydrid in Pyridin bei 20° gab Orchinol quantitativ O-Acetyl-orchinol; aus Methanol-Wasser, Nadeln vom Smp. 84°.

$C_{18}H_{18}O_4$	Ber. C 72,46	H 6,08	2 OCH_3 20,80%	Mol.-Gew. 298
	Gef. ,, 72,01	,, 6,10	,, 20,42%	,, ,, 300 ⁴⁾

O-p-Brombenzoyl-orchinol: Aus Orchinol und p-Brombenzoylchlorid in Pyridin bei 20°. Nach Umlösen aus Methanol Smp. 139°.

$C_{23}H_{19}O_4Br$	Ber. C 62,88	H 4,36%	Gef. C 62,65	H 4,74%
---------------------	--------------	---------	--------------	---------

Die Mutterlaugenrückstände der Orchinolkristallisation zeigten noch eine Aktivität von 17 E/mg.

Äthereluat (0,30 g): Der teilweise kristallisierte Rückstand wurde an 17 g Aluminiumoxyd der Aktivität II chromatographiert. Mit Chloroform-Methanol 1:1 wurde eine kristalline Fraktion eluiert. Umlösen aus Methanol-Wasser gab Nadeln vom Smp. 113°. Ausbeute 10 mg. $[\alpha]_D \pm 0^\circ$ ($c = 1$ in Methanol). Im Hochvakuum nicht unzersetzt sublimierbar. Aktivität 30 E/mg.

Gef. C 70,32 H 6,90% Mol.-Gew. 141⁴⁾

Die Mutterlaugen des Äthereluates sowie die Methanol-Eisessig-Eluate wurden noch nicht untersucht.

Die Mikroanalysen wurden in unserem Mikroanalytischen Laboratorium (Leitung W. Manser) ausgeführt. Herrn Obergärtner F. Humm möchten wir für die Beschaffung und Pflege der Versuchspflanzen danken.

Zusammenfassung.

Aus Knollen von *Orchis militaris* L., die mit dem Mykorrhizenpilz *Rhizoctonia repens* Bern. infiziert worden waren, wurden biologisch aktive Fraktionen isoliert, die zum Teil näher untersucht wurden. Neben Cumarin wurden zwei weitere kristalline Substanzen erhalten, von denen eine, der Formel $C_{16}H_{16}O_3$, Orchinol genannt wurde. Orchinol liess sich in frischen Knollen nicht nachweisen; es wird erst während der Inkubation der Knollen und in noch höherer Masse unter der Einwirkung des Pilzes gebildet.

Institut für spezielle Botanik
und Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

124. Der thermodynamische Nutzeffekt der Destillation

von Werner Kuhn, A. Narten und E. Peterli.

(10. IV. 57.)

1. Problemstellung.

Es sei ein Gemisch von 2 Stoffen vorgegeben, deren Sättigungsdrucke p_1 und p_s sich bei der Temperatur T et was voneinander unterscheiden. Es ist dann, wenn das Gemisch athermisch ist, die Grösse

$$\delta = \ln [p_1/p_s] \simeq (p_1 - p_s)/p_1 \quad (1)$$

der für die Trennung durch Destillation in einem zu T benachbarten Temperaturgebiet massgebende Trennparameter. Es sei weiter

$$\gamma_0 = c_1/(c_1 + c_s) \quad (2)$$

die relative Konzentration der leichter flüchtigen Komponente im Ausgangsgemisch.

Ausgehend von einer unendlich grossen Menge dieses Ausgangsgemisches werde nun durch Destillation unter Anwendung eines Fraktionieraufsatzes ohne und mit Wärmepumpe eine Grammmolekel, d. h. ein $6,06 \cdot 10^{23}$ Einzelmolekeln enthaltendes Gemisch eines Produktes hergestellt, in welchem die relative Konzentration der leicht flüchtigen Komponente gleich γ_e ist. Wir fragen nach dem thermodynamischen Nutzeffekt η dieser destillativen Trennung. Wir verstehen darunter den Quotienten aus der reversiblen Arbeit A_{rev} (d. h. der freien Energie), welche für die Herstellung einer Grammmolekel des Endproduktes bei reversibler und isothermer Führung des Trenn-