

### Zusammenfassung.

Durch thermische Zersetzung von  $3\beta$ -Acetoxy- $7,,\beta^{\prime\prime}$ -oxy-cholestan-7-benzoat bzw. 7-Anthrachinon- $\beta$ -carboxylat konnte ein isomeres Cholestenol hergestellt werden, das in seinen Eigenschaften vom bekannten  $\gamma$ -Cholestenol stark abweicht. Es wird vermutet, dass in dieser Verbindung das reine  $\Delta^{7,8}$ -Cholestenol-(3) vorliegt.

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

---

### 123. Welkstoffe und Antibiotika.

9. Mitteilung<sup>1)</sup>.

#### Der hydrolytische Abbau des Lycomarasmins

von Pl. A. Plattner, N. Clauson-Kaas, A. Boller und U. Nager.

(19. III. 48.)

In einer früheren Mitteilung<sup>2)</sup> dieser Reihe wurde über die Isolierung und einige Eigenschaften eines welkeerzeugenden Stoffwechselproduktes aus *Fusarium lycopersici* Sacc. berichtet. Der Welkstoff, für den später der Name Lycomarasmin<sup>3)</sup> vorgeschlagen wurde, ist eine amphotere, peptidartige Verbindung der Bruttoformel  $(C_9H_{15}O_7N_3)_n$ , die sich leicht unter Abspaltung von Ammoniak in eine, Substanz J genannte, Verbindung  $(C_9H_{12}O_7N_2)_m$  verwandelt, welche keine Welkwirkung mehr zeigt.

Die Wirkung des Lycomarasmins auf Tomatenpflanzen und andere biologische Objekte ist inzwischen in einer Reihe von interessanten Arbeiten von Gämänn, Jaag und Mitarbeitern<sup>4)</sup> untersucht worden. Ferner konnten Woolley<sup>5)</sup> und Mitarbeiter zeigen, dass Kulturfiltrate von *Fusarium lycopersici* imstande sind, antagonistisch gegen den Wachstumsfaktor Strepogenin zu wirken, wobei diese Wirkung dem Lycomarasmin zugeschrieben wurde. Da Lycomarasmin

<sup>1)</sup> 8. Mitt. Helv. **31**, 665 (1948).

<sup>2)</sup> Pl. A. Plattner und N. Clauson-Kaas, Helv. **28**, 188 (1945); vgl. auch N. Clauson-Kaas, Pl. A. Plattner und E. Gämänn, Ber. Schweiz. Bot. Ges. **54**, 523 (1944).

<sup>3)</sup> Pl. A. Plattner und N. Clauson-Kaas, Exper. **1**, 195 (1945).

<sup>4)</sup> E. Gämänn und O. Jaag, Über das Problem der Welkekrankheiten bei Pflanzen, Exper. **2**, 215 (1946); E. Gämänn und O. Jaag, Die Grundlagen des parasitogenen Welkens, Ber. Schweiz. Bot. Ges. **57**, 5, 132, 227 (1947). E. Gämänn, O. Jaag und R. Braun, Antibiotika als pflanzliche Plasmagifte, Exper. **3**, 70 (1947).

<sup>5)</sup> D. W. Woolley, J. Exp. Med. **73**, 487 (1941); J. Biol. Chem. **162**, 383 (1946); **166**, 783 (1946); **172**, 71 (1948); H. Sprince und D. W. Woolley, J. Exp. Med. **80**, 213 (1944); Am. Soc. **67**, 1734 (1945).

Asparaginsäure<sup>1)</sup>, Strepogenin dagegen wahrscheinlich Glutaminsäure enthält, wurde vermutet, dass der Antagonismus auf einer ähnlichen Bindungsweise dieser beiden Aminosäuren in den beiden biologisch aktiven Stoffen beruhe.

Nachdem der für die Isolierung des Lycomarasmins verwendete Pilzstamm, vielleicht infolge des langandauernden saprophytischen Wachstums, seinen Stoffwechsel geändert und keine welkaktiven Kulturfiltrate mehr gebildet hatte, mussten die Untersuchungen über die Konstitution des Lycomarasmins während längerer Zeit unterbrochen werden. Wir konnten dieselben neuerdings wieder aufnehmen und haben vorerst die Hydrolyse von Lycomarasmin und Substanz J etwas eingehender untersucht.

Sowohl Lycomarasmin als auch Substanz J erweisen sich als überraschend resistent gegen salzaure Hydrolyse. Bei Substanz J konnte eine vollständige Spaltung, die durch Bestimmung des Verhältnisses *van Slyke-N* zu Total-N kontrolliert wurde, erst nach längerem Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure im Einschlussrohr auf 145° erzielt werden. Eine Probe des so erhaltenen Hydrolysates von Substanz J wurde nach dem Verfahren von *Wieland*<sup>2)</sup> an einer mit Salzsäure vorbehandelten Säule von Aluminiumoxyd in neutrale und saure Aminosäuren aufgetrennt. Die Hälfte des ursprünglich vorhandenen Stickstoffs konnte dabei im Filtrat (Amino-monocarbonsäuren) nachgewiesen werden, während die andere Hälfte sich erst mit Natronlauge eluieren liess (Amino-dicarbonsäuren). In Übereinstimmung mit diesem Befunde wurde bei der präparativen Aufarbeitung aus dem Hydrolysat Asparaginsäure als Kupfersalz und Glycin als 3,5-Dinitro-benzoat und als freie Aminosäure erhalten. Die gemäss der Bruttoformel C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> fehlenden 3 C-Atome liessen sich beim Kochen der Substanz J mit 2,4-Dinitro-phenylhydrazin und 2-n. Salzsäure in Form des Dinitro-phenylhydrazons der Brenztraubensäure, das allerdings nur in sehr geringer Ausbeute entstand, fassen.

Die in etwas abgeänderter Weise durchgeföhrte Hydrolyse von Lycomarasmin (C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>) gab ähnliche Resultate. Brenztraubensäure wurde als Dinitro-phenylhydrazone in Ausbeuten bis zu 37% isoliert, während ein Modellversuch — Behandlung von Brenztraubensäure mit Salzsäure unter gleichen Bedingungen — nur eine Ausbeute von 14% ergab. Ferner wurden 1 Mol Stickstoff als Ammoniak, 0,9 Mol als N-2,4-Dinitro-phenyl-glycin<sup>3)</sup> und 0,54 Mol als N-2,4-Dinitro-phenyl-asparaginsäure erhalten. Da wir bei der Herstellung eines Vergleichspräparates von N-2,4-Dinitro-phenyl-L-aspa-

<sup>1)</sup> *Pl. A. Plattner und N. Clauson-Kaas, Exper.* I, 195 (1945).

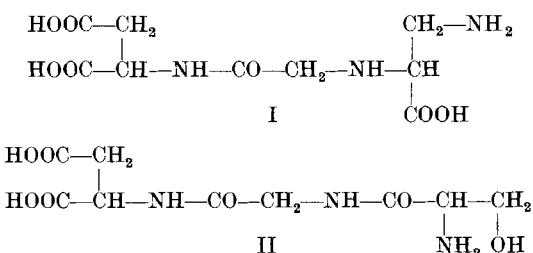
<sup>2)</sup> *Th. Wieland, Z. physiol. Ch.* 273, 24 (1942); *B.* 76, 823 (1943).

<sup>3)</sup> *F. Sanger, Biochem. J.* 39, 507 (1945).

raginsäure ebenfalls nur Ausbeuten von ca. 60% erzielen konnten, so ist anzunehmen, dass alle Spaltprodukte annähernd quantitativ erfasst wurden.

Die aus dem Hydrolysat isolierte N-2,4-Dinitro-phenyl-asparaginsäure erwies sich als praktisch vollständig racemisiert. Da ein Modellversuch zeigte, dass L-Asparaginsäure unter den eingehaltenen Hydrolysen-Bedingungen ebenfalls sehr weitgehend racemisiert wird, so muss die interessante Frage nach der Konfiguration der Asparaginsäure-Molekel im Lycomarasmin vorläufig unbeantwortet bleiben.

Wir haben früher<sup>1)</sup> auf Grund vorläufiger Befunde für Lycomarasmin die Formel I:



in Betracht gezogen. Wenn auch die vorliegende genauere Untersuchung der Hydrolyse die Entstehung der drei Spaltstücke Asparaginsäure, Glycin und Brenztraubensäure, auf welche sich diese Formel aufbaut, vollständig bestätigt hat, so gibt es doch auch manche Befunde, welche ernste Zweifel an der Richtigkeit dieser Formel aufkommen lassen. Vorläufig ist es uns jedoch nicht möglich, Formel I durch eine besser begründete zu ersetzen.

Woolley<sup>2)</sup> hat vor einiger Zeit darauf hingewiesen, dass die bei der Hydrolyse von Lycomarasmin auftretende Brenztraubensäure sekundär aus Serin entstanden sein könnte. Er hat ferner gezeigt, dass synthetische Seryl-glycyl-asparaginsäure (II), mit *Lactobacillus casei* getestet, eine gewisse Anti-Strepogenin-Wirkung aufweist. Eine der Formel II analoge Konstitution mit endständigem Seryl-Rest kommt jedoch für Lycomarasmin aus verschiedenen Gründen kaum in Frage.

Um aber wenigstens zu prüfen, ob Serin überhaupt bei der Hydrolyse von Lycomarasmin oder Substanz J auftritt, haben wir diese beiden Substanzen der Hydrolyse nach drei sehr verschieden energischen Methoden unterworfen und die Reaktionsprodukte mit der schönen Methode von Consden, Gordon und Martin<sup>3)</sup> auf Filtrierpapier chromatographisch untersucht. Dabei konnten in keinem Falle irgendwelche Anzeichen für die Anwesenheit von Serin im

<sup>1)</sup> Pl. A. Plattner und N. Clauson-Kaas, Exper. I, 195 (1945).

<sup>2)</sup> D. W. Woolley, J. Biol. Chem., 166, 783 (1946).

<sup>3)</sup> R. Consden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, Biochem. J. 38, 224 (1944); 41, 590 (1947).

Hydrolysat gefunden werden. Diese Versuche bestätigten ferner die Tatsache, dass Lycomarasmin zwar sehr rasch in Substanz J übergeht, dass diese aber gegen weitere Hydrolyse recht resistent ist. Leider zeigte sich dabei auch, dass eine partielle Hydrolyse des Lycomarasmins zu Dipeptiden wohl kaum durchführbar sein dürfte.

Wir haben uns noch bemüht, die Einheitlichkeit des Lycomarasmins, die infolge seiner polypeptidartigen Natur etwas schwierig zu beurteilen ist, besser zu stützen. Es gelang dabei, ein gut krystallisiertes Kupfersalz  $C_9H_{13}O_7N_3Cu, H_2O$  zu isolieren. Das daraus mit Hilfe von Schwefelwasserstoff regenerierte Lycomarasmin war in allen seinen Eigenschaften mit den früher beschriebenen analysenreinen Produkten identisch.

### Experimenteller Teil<sup>1)</sup>.

#### Hydrolyse von Substanz J.

a) Hydrolysengeschwindigkeit. Ca. 100 mg Substanz J wurden in 12 cm<sup>3</sup> konzentrierter Salzsäure am Rückfluss gekocht. Nach 6, 20 und 30 Stunden wurde je 1 cm<sup>3</sup> für eine Stickstoff-Bestimmung nach *Kjeldahl* und 1 cm<sup>3</sup> für eine Amino-Stickstoff-Bestimmung nach *van Slyke* (Schüttelzeit 5 Minuten bei 20°) auspipettiert. Das Verhältnis *van Slyke-N* zu Total-N war: 0,082 nach 6-stündiger Hydrolyse, 0,240 (20 Stunden) und 0,368 (30 Stunden).

b) Bestimmung der Stickstoff-Verteilung. 71,2 mg eines Präparates von Substanz J, das 10,41% Total-Stickstoff enthielt (bestimmt nach *Kjeldahl* sowie nach *Dumas*, ber. 10,77%), wurden in 2 cm<sup>3</sup> konzentrierter Salzsäure im Einschlussrohr bei 140° hydrolysiert. Die Lösung wurde schon nach kurzer Zeit gelbbraun und schied wenige, schwarze Flocken aus. Nach 53 Stunden wurde das Rohr geöffnet und die Lösung quantitativ filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum über Kaliumhydroxyd und Schwefelsäure zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit 1-n. Natriumhydroxyd neutralisiert und die Lösung mit Wasser auf 25 cm<sup>3</sup> gebracht. Zur *Kjeldahl*- und *van Slyke*-Bestimmung wurden zweimal je 2 cm<sup>3</sup> entnommen. Weitere 15 cm<sup>3</sup> wurden durch eine Säule aus 6 g Aluminiumoxyd (nach *Wieland*<sup>2)</sup> mit Salzsäure vorbehandelt) filtriert. Die Säule wurde anschliessend mit 50 cm<sup>3</sup> Wasser gespült und dann mit 20 cm<sup>3</sup> 0,5-n. Natronlauge + 30 cm<sup>3</sup> Wasser eluiert. Filtrat und Eluat wurden angesäuert, eingedampft, neutralisiert und auf je 10 cm<sup>3</sup> gebracht. Zur *Kjeldahl*- und *van Slyke*-Bestimmung wurden wieder zweimal je 2 cm<sup>3</sup> auspipettiert. Die Resultate dieser Bestimmungen sind in der Tabelle A angegeben.

Tabelle A.

	Vor der Hydrolyse mg N	Hydrolysat		Filtrat		Eluat	
		mg N	% N	mg N	% N	mg N	% N
Total-N ( <i>Kjeldahl</i> ) . . . .	7,41	7,25 7,18	97,5 3,84	3,82 51,5		3,43 3,41	46,5
Amino-N ( <i>van Slyke</i> ) . .	0	7,16 7,40	98,5 4,30	4,15 57		3,34 3,33	45

<sup>1)</sup> Alle Schmelzpunkte sind korrigiert und alle spez. Drehungen in einem Rohr von 1 dm Länge bestimmt.

<sup>2)</sup> *Th. Wieland*, B. 76, 823 (1943); Z. physiol. Ch. 273, 24 (1942).

Die Resultate sind innerhalb der Fehlergrenze der Methode in Übereinstimmung mit der Annahme, dass bei der Hydrolyse je 1 Mol Amino-dicarbonsäuren und Amino-monocarbonsäuren gebildet worden sind<sup>1)</sup>.

c) Isolierung und Identifizierung der Hydrolysen-Produkte. Zur Isolierung und Identifizierung der entstandenen Hydrolysen-Produkte mussten Hydrolysate verwendet werden, die nach späteren Erfahrungen nicht völlig hydrolysiert waren. Die nachstehend beschriebenen Resultate wurden mit einem Ansatz von ca. 180 mg Substanz J erzielt, der mit 5 cm<sup>3</sup> konzentrierter Salzsäure 18 Stunden im Einschlusserohr bei 140° behandelt worden war. Das gelbbraune Hydrolysat wurde von wenigen, schwarzen Flocken abfiltriert und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Die Hydrochloride wurden nun mit 1 g Kupfer(II)-hydroxyd und 25 cm<sup>3</sup> Wasser kurz gekocht und filtriert. Der Rückstand wurde mit kochendem Wasser mehrmals ausgewaschen und Filtrat und Waschwasser auf 10 cm<sup>3</sup> eingedampft. Durch Fällen mit 100 cm<sup>3</sup> Äthanol fielen ca. 80 mg blaues Kupfersalz aus. Dieses wurde in Wasser durch Zugabe von 1 Tropfen konzentrierter Salzsäure gelöst, die Lösung mit Kupfer(II)-carbonat gekocht und filtriert.

Asparaginsäure. Aus dem Filtrat schieden sich ca. 30 mg Kupfer-aspartat aus, welches abfiltriert und durch Lösen in viel Wasser und starkes Einengen umkristallisiert wurde. Das so erhaltene Präparat wurde abgenutscht, mit Wasser und Äthanol gewaschen und zur Analyse zwei Tage im Vakuum über Calciumchlorid getrocknet.

3,806 mg Subst. gaben 2,475 mg CO<sub>2</sub>, 1,619 mg H<sub>2</sub>O und 1,086 mg CuO  
3,511 mg Subst. gaben 0,162 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (19°, 720 mm)

C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub> NCu, 4,5 H<sub>2</sub>O Ber. C 17,42 H 5,12 Cu 23,06 N 5,08%  
Gef. „, 17,75 „, 4,76 „, 22,80 „, 5,11%

Die Ausbeute entspricht nur ca. 15% der Theorie (ber. für 1 Mol Asparaginsäure pro Mol C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>).

Glycin. Das wässrig-alkoholische Filtrat der Kupfersalzfällung wurde auf 10 cm<sup>3</sup> eingedampft. Über Nacht schieden sich feine Krystalle eines zweiten Kupfersalzes aus. Sie wurden abfiltriert (12 mg), mit wenig Wasser und Äthanol gewaschen, in Wasser gelöst und das Kupfer mit Schwefelwasserstoff gefällt. Das Filtrat wurde eingedampft und im Hochvakuum sublimiert. Das Sublimat (5,1 mg) zersetzte sich nach Braunfärbung bei 233—236°.

2,768 mg Subst. gaben 3,234 mg CO<sub>2</sub> und 1,668 mg H<sub>2</sub>O  
1,501 mg Subst. gaben 0,249 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (17°, 718 mm)  
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>N Ber. C 32,00 H 6,71 N 18,66%  
Gef. „, 31,88 „, 6,74 „, 18,45%

Die Mutterlaugen des Glycin-Kupfers wurden mit Schwefelwasserstoff behandelt, das Filtrat vom Kupfersulfid abfiltriert, eingedampft und mit 3,5-Dinitro-benzoylchlorid nach *Saunders*<sup>2)</sup> acyliert. Ausbeute 20 mg eines Dinitro-benzoyl-Derivates vom Smp. 174—175°. Zur Analyse wurde aus Wasser umkristallisiert und im Hochvakuum bei 110° 12 Stunden getrocknet. Der Schmelzpunkt betrug jetzt 174—176°, der Mischschmelzpunkt mit synthetischem 3,5-Dinitro-benzoyl-glycin 175—177,5°.

3,772 mg Subst. gaben 5,563 mg CO<sub>2</sub> und 0,887 mg H<sub>2</sub>O  
2,832 mg Subst. gaben 0,400 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (18°, 708 mm)  
C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub> Ber. C 40,16 H 2,62 N 15,61%  
Gef. „, 40,25 „, 2,63 „, 15,44%

Die Ausbeute an Glycin, als Glycin-Kupfer und Dinitro-benzoyl-glycin isoliert, entspricht ca. 25% der Theorie (ber. für 1 Mol Glycin pro Mol C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>).

Brenztraubensäure. Ca. 40 mg Substanz J wurden 14 Stunden mit der gleichen Menge 2,4-Dinitro-phenylhydrazin-hydrochlorid und 7 cm<sup>3</sup> 2-n. Salzsäure gekocht. Nach

<sup>1)</sup> Es ist darauf hinzuweisen, dass Glycin etwas zu hohe Amino-Stickstoff-Werte gibt. *G. Klein*, Handbuch der Pflanzen-Analyse, Wien 1933, Bd. IV<sub>1</sub>, S. 105.

<sup>2)</sup> *B. Ch. Saunders*, Biochem. J. **28**, 580 (1934).

12 Stunden Stehen hatten sich 2,0 mg Krystalle eines roten Dinitro-phenylhydrazons vom Smp. 210—212° gebildet. Diese wurden abfiltriert und das Filtrat nach Zugabe von 2 cm<sup>3</sup> konzentrierter Salzsäure 15 Stunden weitergekocht, wobei noch 4,5 mg Dinitro-phenylhydrazone vom Smp. 210—211° erhalten wurden. Die beiden Präparate waren in kaltem Wasser fast unlöslich. Sie lösten sich leicht in 0,01-n. Natronlauge. Die alkalische Lösung wurde mit Benzol geschüttelt, das Benzol abgetrennt und die wässrige Schicht nach Ansäuern nochmals mit Benzol geschüttelt. Die Benzol-Schicht wurde getrocknet und eingengt. Das Dinitro-phenylhydrazone schied sich dabei in Form kleiner, gelber Krystalle aus. Smp. 212—213°, Mischschmelzpunkt mit Brenztraubensäure-dinitro-phenylhydrazone 214—215°. Mit alkoholischer Natronlauge gaben beide Präparate eine starke, tiefrote Farbe.

#### Hydrolyse von Lycomarasmin.

260 mg Lycomarasmin wurden mit 10 cm<sup>3</sup> konstant siedender Salzsäure 8½ Stunden im Einschlusserohr auf 140—150° erhitzt. Anschliessend wurde das Hydrolysat unter Vorschaltung einer Vorlage mit Trockeneis im Vakuum eingedampft, zweimal mit Wasser versetzt und jeweils wieder eingengt.

a) Aufarbeitung und Identifizierung der Brenztraubensäure. Das in der tiefgekühlten Vorlage angefallene Kondensat versetzte man mit 120 mg Dinitro-phenylhydrazin, gelöst in 10 cm<sup>3</sup> heißer Salzsäure. Vom ausgeschiedenen Derivat wurde abfiltriert dieses mit wenig Wasser gewaschen und dann direkt auf dem Filter mit 5 cm<sup>3</sup> 2-n. Natriumcarbonat-Lösung gelöst. Das alkalische Filtrat wurde mit Salzsäure 1:1 angesäuert, der gelbe Niederschlag zentrifugiert und dreimal mit 2 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 70° während 3 Stunden wog der Niederschlag 70 mg. Ausbeute 28% der Theorie. Smp. 213—217° (Zers.).

Zur Analyse wurde das Hydrazon aus Essigester umkrystallisiert und im Hochvakuum über Nacht bei 65° getrocknet. Smp. 213—214° (Zers.), Mischschmelzpunkt mit synthetischem Vergleichspräparat 217°.

3,755 mg Subst. gaben	5,577 mg CO <sub>2</sub>	und 1,005 mg H <sub>2</sub> O
2,004 mg Subst. gaben	0,369 cm <sup>3</sup> N <sub>2</sub>	(16°, 726 mm)
C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	Ber. C 40,30	H 3,01 N 20,89%
	Gef. „ 40,52	„ 3,00 „ 20,77%

Andere Hydrolysen ergaben Ausbeuten von 18, 37 und 17% an Brenztraubensäure-dinitro-phenylhydrazone.

Modellversuch. 92 mg frisch destillierte Brenztraubensäure wurden mit 5 cm<sup>3</sup> konstant siedender Salzsäure 8 Stunden bei 150° im Einschlusserohr erhitzt. Die Lösung war bräunlich geworden und enthielt ebenfalls einige Flocken. Bei gleicher Aufarbeitung wie oben erhielt man 55 mg Brenztraubensäure-dinitro-phenylhydrazone. Ausbeute 14% der Theorie.

#### b) Bestimmung der Stickstoff-Verteilung.

Ammoniak: Der Hydrolysen-Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, von braunschwarzen Flocken abfiltriert und auf 25 cm<sup>3</sup> gebracht. Davon wurden 10 cm<sup>3</sup> entnommen, mit 10 cm<sup>3</sup> Wasser und 10 cm<sup>3</sup> Äthanol, 2 Tropfen Phenolphthalein-Lösung und 5 Spatelspitzen Calciumhydroxyd versetzt und das Ammoniak durch Austreiben und Absorption in 0,1-n. Salzsäure acidimetrisch bestimmt<sup>1)</sup> (Indikator Alizarin-sulfosäure). Gef. 1,06 Mol pro Mol C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>. In der restlichen Lösung (15 cm<sup>3</sup>) wurde das Ammoniak in gleicher Weise bestimmt: Gef. 1,02 Mol. Andere Hydrolysen ergaben 1,00; 1,03; 0,99 Mol NH<sub>3</sub>.

Aminosäuren: Die vereinigten, von Ammoniak befreiten Lösungen wurden mit CO<sub>2</sub> gesättigt, im Vakuum auf 10 cm<sup>3</sup> eingedampft, filtriert und auf 25 cm<sup>3</sup> gebracht. Davon wurden zweimal je 2 cm<sup>3</sup> zur van Slyke-Bestimmung verwendet (Schüttelzeit

<sup>1)</sup> G. Klein, Handbuch der Pflanzen-Analyse, Wien 1933, Bd. IV<sub>1</sub>, S. 90.

5 Minuten). Gef. 1,97 Mol Amino-Stickstoff pro Mol  $C_9H_{15}O_7N_3$ . Die restliche Lösung wurde zur Trockene eingedampft, mit Natronlauge auf pH 7 gebracht, nach *Turba*<sup>1)</sup> an 30 g Aluminiumoxyd chromatographiert und mit 120 cm<sup>3</sup> Wasser nachgewaschen. Das Filtrat, welches die neutralen Aminosäuren enthält, wurde im Vakuum eingedampft und auf 25 cm<sup>3</sup> gebracht. Davon wurden zweimal 2 cm<sup>3</sup> zur *van Slyke*-Bestimmung verwendet. Gef. 1,05 Mol Amino-Stickstoff pro Mol  $C_9H_{15}O_7N_3$ . Die Säule wurde ausgestossen und in 6 Portionen mit total 200 cm<sup>3</sup> 0,05-n. Natronlauge gewaschen. Das Eluat enthielt 0,62 Mol Amino-Stickstoff pro Mol eingesetztes Lycomarasmin. Dieser niedrige Wert ist wahrscheinlich auf eine unvollständige Elution der Amino-dicarbonsäuren zurückzuführen.

c) Identifizierung von Glycin und Asparaginsäure. 503 mg Lycomarasmin wurden mit 19 cm<sup>3</sup> konstant siedender Salzsäure 8 Stunden im Einschlusserohr auf 140—150° erhitzt, die Lösung wie oben am Vakuum eingedampft und mit Wasser auf 50 cm<sup>3</sup> gebracht. Eine Probe der schwach gefärbten Lösung wurde zur Prüfung auf optische Aktivität zweimal durch wenig Tierkohle filtriert. Es konnte jedoch keine Drehung beobachtet werden. Der Rest der Lösung wurde zuerst alkalisch eingeengt, dann angesäuert, zur Trockene eingedampft, mit Natronlauge auf pH 7 gebracht und an 40 g Aluminiumoxyd (mit Salzsäure nach *Wieland*<sup>2)</sup> vorbehandelt) chromatographiert.

Glycin. Aus dem durch Nachwaschen mit 160 cm<sup>3</sup> Wasser erhaltenen Filtrat wurde durch Umsetzung mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol nach *Sanger*<sup>3)</sup> das 2,4-Dinitro-phenyl-Derivat des Glycins erhalten. Ausbeute 380 mg = 0,9 Mol Glycin pro Mol  $C_9H_{15}O_7N_3$ . Zur Analyse wurde dreimal aus Methanol umkristallisiert und im Hochvakuum 12 Stunden bei 25° und 6 Stunden bei 65° getrocknet. Smp. 197—198° (Zers.). Mischschmelzpunkt mit einem synthetischen Vergleichspräparat 197,5—198°.

3,880 mg Subst. gaben	5,645 mg CO <sub>2</sub>	und 0,955 mg H <sub>2</sub> O
2,610 mg Subst. gaben	0,408 cm <sup>3</sup> N <sub>2</sub>	(19°, 732 mm)
C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub>	Ber. C 39,84	H 2,93 N 17,43%
	Gef. , , 39,70	, 2,76 , , 17,60%

Asparaginsäure. Die Säule wurde anschliessend mit total 200 cm<sup>3</sup> 0,5-n. Natronlauge behandelt, das Eluat angesäuert und im Vakuum eingedampft. In gleicher Weise wie oben wurde das 2,4-Dinitro-phenyl-Derivat hergestellt. Ausbeute 285 mg = 54%, während im Modellversuch (s. u.) 58% erhalten wurden. Zur Analyse wurde viermal aus Äther-Petroläther umkristallisiert und im Hochvakuum 12 Stunden bei 60° getrocknet. Smp. 194—197° (Zers.). Mischprobe mit synthetischer 2,4-Dinitro-phenyl-L-asparaginsäure Smp. 193—195° (Tabelle B, Nr. 2 und 4).

4,220 mg Subst. gaben	6,175 mg CO <sub>2</sub>	und 1,198 mg H <sub>2</sub> O
3,034 mg Subst. gaben	0,383 cm <sup>3</sup> N <sub>2</sub>	(21°, 723 mm)
C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub>	Ber. C 40,14	H 3,03 N 14,05%
	Gef. , , 39,93	, 3,18 , , 13,95%

Beim isolierten Derivat konnte keine Drehung festgestellt werden. Zum Vergleich wurde 2,4-Dinitro-phenyl-L-asparaginsäure hergestellt; Ausbeute 60%. Smp. 194—195° (Zers.) (Tabelle B, Nr. 4).

120 mg L-Asparaginsäure wurden 8 Stunden im Einschlusserohr mit 10 cm<sup>3</sup> konstant siedender Salzsäure auf 140—150° erhitzt. Dabei sank die spezifische Drehung von +28,5° auf +3,5°. Die Asparaginsäure racemisierte also weitgehend. Das wie üblich hergestellte 2,4-Dinitro-phenyl-Derivat schmolz bei 193—194° (Zers.). Ausbeute 58% (vgl. Tabelle B, Nr. 3).

<sup>1)</sup> *F. Turba* und *M. Richter*, B. 75, 340 (1942).

<sup>2)</sup> *Th. Wieland*, B. 76, 823 (1943); Z. physiol. Ch. 273, 24 (1942).

<sup>3)</sup> *F. Sanger*, Biochem. J. 39, 507 (1945).

Tabelle B.

Dinitro-phenyl-Derivat	Smp. (Zers.)	$[\alpha]_{D}^{18}$	c (in Feinsprit)
1. aus D,L-Asparaginsäure	191—193°	—	—
2. aus Hydrolyse . . .	194—197°	nicht beobachtbar	0,72
3. aus Modellversuch . .	193—194°	+ 4°	0,72
4. aus L-Asparaginsäure .	194—195°	+ 14°	0,77

## Verteilungschromatographie auf Filtrierpapier.

Die Versuche wurden nach der von *Consden* und Mitarbeitern<sup>1)</sup> beschriebenen Methode mit *Whatman* Nr. 1-Filtrierpapier ausgeführt. Als mobile Phase diente mit Wasser gesättigtes Phenol. Zur Aufrechterhaltung der Atmosphäre im abgeschlossenen System war im unteren Trog ein Zwei-Phasengemisch Wasser-Phenol, dem 1% konzentriertes Ammoniak und etwas Natriumcyanid zugesetzt worden waren, vorgelegt.

Zur Kontrolle wurden jeweils auf dem gleichen Filtrierpapierstreifen gleichzeitig die zu untersuchenden Stoffe bzw. Gemische und die zu erwartenden reinen Aminosäuren angesetzt. Die Versuche liefen über Nacht (20—22 Stunden) bei 12°, wobei die Phenol-Front ca. 25—30 cm zurücklegte.

Dann wurde das Filtrierpapier im Vakuum  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 78° getrocknet, zur Feststellung der fluoreszierenden Aminosäuren im U.V.-Licht betrachtet und anschliessend mit einer Lösung von 0,2% Ninhydrin in mit Wasser gesättigtem n-Butanol behandelt.

Substanz J, die in Wasser durch Zusatz von etwas Ammoniak gelöst aufgegeben wurde, gab einen stark braunen Fleck mit  $R_F$ <sup>2)</sup> 0,04; Lycomarasmin zeigte unter den gleichen Bedingungen auf dem Papier keine Färbung<sup>3)</sup>.

a) Versuch zur partiellen Hydrolyse von Lycomarasmin<sup>4)</sup>. 26 mg Lycomarasmin wurden in 1 cm<sup>3</sup> konzentrierter Salzsäure und 1 cm<sup>3</sup> Eisessig gelöst und im Thermostat bei 37° hydrolysiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden der Hydrolysenlösung Proben von 5 mm<sup>3</sup> entnommen, diese auf einem Objektträger mit Hohlschliff im Vakuum bei 20° über Kaliumhydroxyd eingedampft, dann mit 5 mm<sup>3</sup> Wasser versetzt und auf das Filtrierpapier gegeben. Die erste Probe (Hydrolysendauer 26 Stunden) zeigte im Verteilungchromatogramm einen deutlichen braunen Fleck mit  $R_F$  0,05 (Kontrolle: Substanz J;  $R_F$  0,04). Das gleiche Resultat wurde auch nach einer Hydrolysendauer von 17 Tagen gefunden.

<sup>1)</sup> R. Consden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, Biochem. J. **38**, 224 (1944); **41**, 590 (1947).

<sup>2)</sup>  $R_F = W_1/W_2$ ; W 1 = von der Substanz, W 2 = von der Front des Lösungsmittels zurückgelegter Weg.

<sup>3)</sup> Dies schien im Widerspruch zur Beobachtung, dass Lycomarasmin im Reagenzglas eine positive Ninhydrin-Reaktion gibt, zu stehen (*Pl. A. Plattner und N. Clauson-Kaas*, Helv. **28**, 188 (1945)). Zur Abklärung dieser Frage wurde eine wässrige Lösung von Lycomarasmin, die durch Zusatz von verdünnter Kalilauge auf  $p_H$  6,7 gebracht worden war, wie bei der Ninhydrin-Reaktion üblich,  $\frac{1}{2}$  Stunde auf 98° erwärmt. Das Verteilungchromatogramm ergab dann einen deutlichen braunen Fleck mit  $R_F$  0,05, wie er für Substanz J charakteristisch ist, und einen zweiten Fleck mit  $R_F$  0,22—0,23 mit positiver Ninhydrin-Reaktion.

<sup>4)</sup> Vgl. R. Consden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, Biochem. J. **41**, 596 (1947).

Demnach wird bei der partiellen salzsauren Hydrolyse leicht Substanz J gebildet, die unter diesen Bedingungen nicht oder nur sehr langsam weiter hydrolysiert wird.

b) Hydrolyse von Lycomarasmin mit 1-n. wässriger Salzsäure. 20 mg Lycomarasmin wurden in 20 cm<sup>3</sup> 1-n. Salzsäure gelöst und am Rückfluss gekocht. Proben zu 1 cm<sup>3</sup> wurden im Vakuum über Kalilauge eingedampft, in 0,1 cm<sup>3</sup> Wasser aufgenommen und von dieser Lösung 5 mm<sup>3</sup> auf das Filterpapier gegeben. Nach 1-stündiger Hydrolyse erhielt man im Verteilungschromatogramm einen deutlichen braunen Fleck mit R<sub>F</sub> 0,04 neben zwei schwächeren lila Flecken mit R<sub>F</sub> 0,17 und 0,46. (Kontrollen: Substanz J 0,04; DL-Asparaginsäure 0,15; Glycin 0,45). Nach 54-stündigem Kochen war der der Substanz J entsprechende Fleck (R<sub>F</sub> 0,03) fast vollständig verschwunden, während das gebildete Glycin (R<sub>F</sub> 0,43) und die Asparaginsäure (R<sub>F</sub> 0,16) deutlich in Erscheinung traten.

c) Hydrolysen von Lycomarasmin und Substanz J mit konstant siedender Salzsäure bei 150°. Je 10 mg Lycomarasmin und Substanz J wurden mit 1 cm<sup>3</sup> konstant siedender Salzsäure im Einschlusserohr während 7 1/2 Stunden bei 145—150° hydrolysiert. Nach beendeter Hydrolyse wurde die überschüssige Salzsäure im Vakuum über Kaliumhydroxyd entfernt. Die zurückgebliebenen Hydrochloride nahm man in 1 cm<sup>3</sup> Wasser auf und verwendete davon 5 mm<sup>3</sup> für das Verteilungschromatogramm.

In der nachstehenden Tabelle C sind die R<sub>F</sub>-Werte, die mit diesen Hydrolysaten mit oder ohne Zumischung von Test-Aminosäuren erhalten wurden, zusammengestellt. Es geht daraus eindeutig hervor, dass die energische salzsaure Hydrolyse der beiden Verbindungen nur zwei Aminosäuren, Asparaginsäure und Glycin, liefert.

Tabelle C.  
Verteilungschromatographie auf Filterpapier; R<sub>F</sub>-Werte.

	Aspara-ginsäure	Glutamin-säure	Serin	Glycin	$\alpha$ -Alanin
Lycomarasmin-Hydrolysat (L.-H.) . . . . .	0,15			0,41	
L.-H.+D,L-Asparaginsäure + Glycin . . . . .	0,15			0,41	
L. H.+L- $\alpha$ -Alanin + L-Glutaminsäure . . .	0,15	0,24		0,42	0,57
Substanz J-Hydrolysat (S. J.-H.) . . . . .	0,16			0,44	
S. J.-H.+D,L-Asparaginsäure + Glycin . . . . .	0,16			0,43	
S. J.-H.+D,L-Serin . . . . .	0,16		0,37	0,44	
D,L-Asparaginsäure + Glycin . . . . .	0,15			0,42	
L-Glutaminsäure + D,L-Serin + L- $\alpha$ -Alanin		0,23	0,37		0,60

#### Kupfersalz von Lycomarasmin.

277 mg Lycomarasmin und 250 mg CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O wurden mit 20 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt. Dabei trat rasch Lösung des Lycomarasmins, Bildung einer tiefblauen, etwas rotstichigen Farbe und Veränderung des p<sub>H</sub> (die Lösung wurde kongosauer) ein. Die Lösung wurde nun mit der berechneten Menge Bariumhydroxyd-Lösung versetzt, vom aus gefallenen Bariumsulfat abfiltriert und im Vakuum über Schwefelsäure eingedampft.

Dabei schieden sich 380 mg tiefblaue, prismatische Krystalle aus, die zur Analyse nochmals aus Wasser umkristallisiert (Löslichkeit ca. 100 mg pro 15 cm<sup>3</sup> Wasser) und im Hochvakuum 20 Stunden bei 55° über Phosphorpentooxyd getrocknet wurden.

3,790 mg Subst. gaben 4,204 mg CO<sub>2</sub>, 1,513 mg H<sub>2</sub>O und 0,842 mg CuO  
3,192 mg Subst. gaben 0,333 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (19°, 733 mm)

C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>Cu, H<sub>2</sub>O Ber. C 30,29 H 4,24 Cu 17,83 N 11,78%  
Gef. „ 30,28 „ 4,47 „ 17,75 „ 11,76%

Der Wassergehalt des Produktes blieb bei 3-tägigem Stehen über Calciumchlorid-Lösung konstant. Das umkristallisierte Kupfersalz wurde mit Schwefelwasserstoff zerstetzt, das Lycomarasmin zur Analyse nochmals aus Natronlauge durch Zusatz von Salzsäure umgefällt und 16 Stunden im Hochvakuum bei 60° getrocknet. Smp. 227—228° (Zers.).

[α]<sub>D</sub><sup>18</sup> = -46,6° (c = 0,48, pH 7, Phosphatpuffer<sup>1)</sup>)

3,710 mg Subst. gaben 5,295 mg CO<sub>2</sub> und 1,810 mg H<sub>2</sub>O

3,137 mg Subst. gaben 0,416 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (20°, 728 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. „ 38,95 „ 5,46 „ 14,80%

Das in dieser Weise gereinigte Lycomarasmin ist in allen seinen Eigenschaften mit dem früher beschriebenen, analysenreinen Produkt identisch.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. W. Manser und Hrn. G. Cornali ausgeführt.

### Zusammenfassung.

Die Hydrolyse des aus *Fusarium lycopersici* isolierten Welkstoffes *Lycomarasmin* liefert je 1 Mol Ammoniak, Glycin, vollständig racemisierte Asparaginsäure und Brenztraubensäure. Andere Spaltstücke konnten nicht gefunden werden, insbesondere liess sich kein Serin nachweisen, das als Vorstufe der Brenztraubensäure in Frage kam. Das unter Ammoniak-Abspaltung entstehende Inaktivierungsprodukt des Welkstoffes (Substanz J) gibt analoge Hydrolysen-Resultate.

Die früher vorgeschlagene vorläufige Formel I für Lycomarasmin ist wahrscheinlich nicht richtig.

Lycomarasmin gibt ein schön krystallisiertes Kupfer-Salz, das gut zu seiner Reinigung verwendet werden kann.

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

---

<sup>1)</sup> Pl. A. Plattner und N. Clauson-Kaas, Helv. **28**, 194 (1945).