

### 135. Die Lipide aus *Phycomyces Blakesleeanus*

von Karl Bernhard und Hans Albrecht.

(25. III. 48.)

Von den Mikroorganismen besitzen namentlich die Schimmelpilze und Hefen unter geeigneten Kultivierungs- und Ernährungsbedingungen die Fähigkeit, erhebliche Lipidmengen zu synthetisieren und in ihren Zellen zur Ablagerung zu bringen. Diese Eigenschaft erlangte sogar im Hinblick auf die Gewinnung von Fetten ein gewisses Interesse<sup>1)</sup>.

Wir haben vor kurzem über das Wachstum des Schimmelpilzes *Phycomyces Blakesleeanus* bei verschiedenen Stickstoffquellen und über zwei in der Glucose-haltigen Nährlösung auftretende Stoffwechselprodukte berichtet<sup>2)</sup>.

Die vorliegenden Untersuchungen betreffen einen Teil der Inhaltsstoffe dieses Pilzes, die Lipide. Der Pilz wurde nach bereits mitgeteilten Angaben<sup>2)</sup> gezüchtet. Sein Wachstum ist stark temperaturabhängig und erfolgt am besten bei 20°. Es stand uns kein temperaturkonstanter Raum zur Verfügung und die Verhältnisse erlaubten uns nicht, eine grosse Anzahl von Kulturen gleichzeitig zu starten. Wir mussten uns vielmehr auf die wiederholte Anlegung von jeweilen 300 Kulturen zu 25 cm<sup>3</sup> Nährlösung beschränken. Aus der umstehenden Tabelle geht indessen hervor, dass das mittlere Gewicht des getrockneten Mycels bei den verschiedenen Ansätzen nur innerhalb geringer Grenzen variiert, so dass eine einigermaßen einheitliche Zusammensetzung desselben vorausgesetzt werden dürfte.

Tabelle 1.

Ansatz Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Dauer, Tage . . . . .	13	12	14	13	14	13	11	13
Mittleres Gewicht des Mycels in mg pro 25 cm <sup>3</sup> Nährlösung . . . . .	164,4	155,4	161,1	153,7	159,6	156,1	164,3	169,2

Das gewonnene Pilzmaterial wurde zur Isolierung der Lipide mit Äther extrahiert. Infolge der Anwesenheit von Lipoproteinen war eine vorangehende Behandlung mit Methanol notwendig<sup>3)</sup>. Aus 430 g im Vakuum bei 65° getrocknetem Mycel erhielten wir 83,7 g oder 19,5% einer dunkelbraunen, halbfesten, wachsähnlichen Masse. Nach

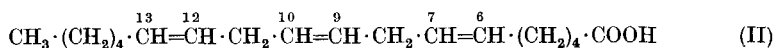
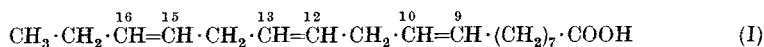
<sup>1)</sup> K. Bernhauer, *Ergebn. d. Enzymforsch.* **9**, 297 (1943).

<sup>2)</sup> K. Bernhard und H. Albrecht, *Helv.* **30**, 627 (1947).

<sup>3)</sup> H. Reichert, *Helv.* **27**, 961 (1944).

Abtrennung der Phosphatide durch wiederholtes Eintragen in Aceton verblieben 75,4 g zähflüssige, braune, acetonlösliche Lipide, die wir mit methanolischer Kalilauge im Stickstoff-Strom verseiften. Das Unverseifbare (4,46 g) besass eine intensiv rote Farbe und bestand zu 76,4% (3,41 g) aus Ergosterin. Die mit Digitonin nicht fällbaren Anteile von phenolartigem Geruch enthielten zum Teil Farbstoffe. Durch chromatographische Adsorption an Aluminiumoxyd und Calciumoxyd konnte die Anwesenheit von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin und von Lycopin wahrscheinlich gemacht werden.

Die Fettsäuren (63,9 g) trennten wir über die Bleisalze in feste und flüssige Anteile. Letztere machten 35,5 g aus. Durch Bromierung von 12,25 g derselben gelangten wir zu 1,91 g eines bei 195–196° schmelzenden Hexabromides. Die Hexabromstearinsäure aus Linolensäure ( $\Delta^{9:10, 12:13, 15:16}$ -Octadecatriensäure) (I) schmilzt bei 180–181°. *Heiduschka* und *Lüft*<sup>1)</sup> gewannen aus dem Samen Fett der Nachtkerze (*Oenothera biennis*) ein Isomeres derselben, welches ein Hexabromid vom Smp. 196° liefert und auf Grund der Oxydationsprodukte nach Untersuchungen von *Eibner*, *Widenmeyer* und *Schild*<sup>2)</sup> die  $\Delta^{6:7, 9:10, 12:13}$ -Octadecatriensäure (II) darstellt. Diese steht zur Petroselinensäure ( $\Delta^{6:7}$ -Octadecensäure) in analoger struktureller Beziehung wie die gewöhnliche Linolensäure zur Ölsäure und wurde, soweit ersichtlich ist, bis jetzt in keinem anderen Fett angetroffen.



Die flüssigen Fettsäuren aus den *Phycomyces*-Lipiden enthielten, nach dem abgetrennten Hexabromid zu schliessen, 5,7%  $\Delta^{6:7, 9:10, 12:13}$ -Octadecatriensäure. Im weiteren gelang die Isolierung von 1,98 g bei 114–114,5° schmelzender, für die *cis-cis*-Linolsäure charakteristischer Tetrabromstearinsäure, was 0,971 g oder, bezogen auf die flüssigen Säuren, 7,49% Linolsäure entspricht.

Ein Teil der in Petroläther löslichen Tetra- und Dibromide wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels mit Äthanol verestert und diese Ester nach Destillation im Vakuum mit Zinkstaub debromiert. Nach kalter Verseifung haben wir nochmals methyliert, durch anschliessende Vakuum-Destillation aber keine scharfe Trennung in Öl- und Linolsäure erhalten. Die Zusammensetzung dieses binären Gemisches liess sich indessen auf Grund der Jod-Zahlen berechnen. Aus einem anderen Teil der petrolätherlöslichen Bromide trennten wir durch AuskrySTALLISIEREN bei tiefer Temperatur das Dibromid der Ölsäure ab.

Die durch die Bleisalz-Methode gewonnenen festen Fettsäuren unterwarfen wir als Estergemisch der fraktionierten Destillation. Wir

1) *A. Heiduschka* und *K. Lüft*, Arch. Pharm. **257**, 33 (1919)

2) *A. Eibner*, *L. Widenmeyer* und *E. Schild*, Chem. Umschau **34**, 312 (1927).

erhielten dabei aus 21,48 g Methylester in 13 Fraktionen 20,54 g Destillat und 0,853 g braunen Rückstand (vgl. Tabelle I). Einzelne dieser Fraktionen wurden nochmals fraktioniert. Nach Verseifung der Methylester krystallisierten wir die Säuren aus geeigneten Lösungsmitteln um. Auf Grund des Destillationsverlaufes, der Schmelzpunkte der Ester und der Säuren, deren Mischschmelzpunkte und Äquivalentgewichte konnten in der Hauptsache Palmitinsäure, daneben Stearinsäure, Behensäure, Tricosan-carbonsäure (Lignocerinsäure) und Pentacosan-carbonsäure (Cerotinsäure) als Komponenten identifiziert werden. Laurin- und Myristinsäure waren nicht nachweisbar und allenfalls nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Für die Arachinsäure dürfte dasselbe gelten.

Die Fraktion, aus welcher die Tricosan-carbonsäure erhalten wurde, erwies sich als ungesättigt. Aus der Mutterlauge gewannen wir über das Magnesiumsalz nach den Angaben von *Klenk*<sup>1)</sup> 350 mg Fettsäure, welche nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Aceton bei 38,5–39° schmolz. Das Äquivalentgewicht betrug 367, die Jodzahl 68,0, was auf eine einfach ungesättigte Säure mit 24 C-Atomen schliessen liess (C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>, Äq.-Gew. Ber. 366,4, JZ Ber. 69). Aus zwei benachbarten Fraktionen liessen sich weitere 391 mg (weniger rein) der Verbindung abtrennen. Wir führten diese Säure mit Osmiumtetroxyd nach den Angaben *Criegee*'s<sup>2)</sup> in guter Ausbeute in die Dioxy-Verbindung über. Die Dioxy-tricosancarbonsäure, C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>, schmolz nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Alkohol bei 121–122°. Wir haben 250 mg davon mit Bleitetraacetat<sup>3)</sup> gespalten und 110 mg 1,15-Pentadecan-dicarbonsäure erhalten, die aus Alkohol-Wasser oder aus Ligroin umkrystallisiert bei 109–111° schmolzen. *Chuit*<sup>4)</sup>, welcher diese Dicarbonsäure synthetisierte, fand einen Smp. von 110°, der indessen nach mehrmaligem Umkrystallisieren grösserer Mengen aus Methanol auf 118° anstieg. Die Isolierung des Aldehyds mit Dinitrophenylhydrazin führte zu keiner einheitlichen Verbindung.

Die mitgeteilten Ergebnisse erlauben, vorausgesetzt, dass der restliche Anteil der C-Kette unverzweigt ist, diese erstmalig aufgefundene, ungesättigte Fettsäure als  $\Delta^{17:18}$ -Tricosen-carbonsäure, CH<sub>3</sub> · (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> · <sup>18</sup>CH = <sup>17</sup>CH · (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub> · COOH, zu bezeichnen.

Eine weitere ungesättigte Säure trennten wir aus den die Cerotinsäure enthaltenden Fraktionen ab. Sie schmolz aus wässrigem Alkohol umkrystallisiert bei 45–45,5°. Wir erhielten 423 mg dieser Verbindung, welcher auf Grund des Äquivalentgewichtes von 395,6 und

1) *E. Klenk*, Z. physiol. Ch. **166**, 277 (1927).

2) *R. Criegee*, *B. Marchand* und *H. Wannowius*, A. **550**, 99 (1942).

3) *R. Criegee*, B. **64**, 260 (1931); *R. Criegee*, *L. Kraft* und *B. Rank*, A. **507**, 159 (1933).

4) *P. Chuit*, Helv. **9**, 275 (1926).

der Jod-Zahl von 63,5 die Brutto-Formel  $C_{26}H_{50}O_2$  (Äq.-Gew. ber. 394,4, JZ ber. 64) zukommt. Auch diese Säure haben wir mit Osmiumtetroxyd zur Dioxysäure oxydiert, welche, aus wässrigem Alkohol mehrmals umkrystallisiert, einen Smp. von 124—125° besass. Die Ausbeute war indessen nur sehr klein und die Spaltung mit Bleitetraacetat leider nicht einwandfrei. Wahrscheinlich lag die 1,17-Heptadecan-dicarbonensäure vor. Äussere Gründe verunmöglichten die Beschaffung von neuem Lipidmaterial durch nochmalige Pilzzüchtung. Wir gedenken später auf diese Versuche zurückzukommen.

Auf Grund unserer Befunde setzten sich die Lipide aus *Phycomyces Blakesleeanus* aus 5,3% Unverseifbarem, 9,9% Phosphatiden und 76,4% Fettsäuren zusammen. Das Unverseifbare enthielt 76,4% Ergosterin und 23,6% Farbstoffe, einschliesslich anderer Verbindungen.

Die Fettsäuren bestanden zu 58,8% aus flüssigen und zu 41,2% aus festen Säuren und wiesen folgende Komponenten auf:

$C_{16}$	Palmitinsäure . . . . .	23,7%
$C_{18}$	Stearinsäure . . . . .	4,7%
$C_{18}$	Ölsäure . . . . .	29,6%
$C_{18}$	Linolsäure . . . . .	25,8%
$C_{18}$	$\gamma$ -Linolensäure . . . . .	3,4%
$C_{22}$	Behensäure . . . . .	1,7%
$C_{24}$	Tricosan-carbonsäure (Lignocerinsäure) . . . . .	2,1%
$C_{24}$	$\Delta^{17:18}$ -Tricosen-carbonsäure . . . . .	2,9%
$C_{26}$	Pentacosan-carbonsäure (Cerotinsäure) . . . . .	1,3%
$C_{26}$	Pentacosen-carbonsäure . . . . .	4,9%

## Experimentelles.

### Extraktion.

Nach Erwärmung des mit Quarzsand zerriebenen Mycels mit 4 Liter Methanol auf 40—50° während 6 Stunden haben wir dekantiert und den Rückstand dreimal je 4 Stunden mit 3 Liter Methanol auf einer Maschine geschüttelt. Dann wurde scharf abgesogen und anschliessend dreimal mit je 4 Liter Äther 4 Stunden geschüttelt. Die Alkohol- und Äther-Auszüge engten wir ein und vereinigten die Rückstände zu einem etwa 100 cm<sup>3</sup> betragenden Sirup, dem wir 100 cm<sup>3</sup> gesättigte, wässrige Kochsalzlösung zugaben. Dieses Gemisch haben wir erschöpfend mit viel Äther extrahiert, die ätherischen Auszüge mit etwas Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedunstet. Der Rückstand blieb bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum-Exsikkator.

### Abtrennung der Phosphatide.

Wir haben 83,4 g der Lipide in 130 cm<sup>3</sup> absolutem Äther unter leichtem Erwärmen gelöst, dann auf 0° abgekühlt und in 400 cm<sup>3</sup> absolutes Aceton eingetragen. Nach 15-stündigem Stehen bei etwa 4° filtrierten wir von den in braunen Flocken abgeschiedenen Phosphatiden ab, engten das Filtrat auf einen Drittel des Volumens ein und liessen es mehrere Stunden im Eisschrank stehen. Ein sich bildender, geringer Niederschlag wurde abfiltriert und mit dem bereits erhaltenen Phosphatid vereinigt. Wir haben diese Phosphatide noch dreimal aus Äther-Aceton abgeschieden. Sie wogen 8 g.

## Verseifung.

Die Aceton-löslichen Lipide brachten wir im Vakuum zur Gewichtskonstanz (75,4 g). Sie wurden in 400 cm<sup>3</sup> Methanol eingetragen, mit 40 g KOH in 80 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst versetzt und 6 Stunden auf dem Wasserbad unter Einleiten von Stickstoff verseift.

## Unverseifbares.

Die ätherische Lösung desselben blieb 15 Stunden bei 3° stehen. Es schieden sich dabei 1,8 g farblose Nadeln vom Smp. 145—150° ab. Die Mutterlauge haben wir eingedunstet, den Rückstand in 50 cm<sup>3</sup> 95-proz. Alkohol aufgenommen und in der Wärme mit einer heissen Lösung von 10 g Digitonin in 300 cm<sup>3</sup> 95-proz. Alkohol versetzt. Später wurde der Niederschlag mit wenig 95-proz. Alkohol und Äther gewaschen und anschliessend mit Pyridin zersetzt. Auf Zugabe von Äther fiel das Digitonin aus und wurde abzentrifugiert. Nach Entfernen des Pyridins vermittelt verdünnter Salzsäure konnten aus der eingeeengten ätherischen Lösung 1,61 g farblose Krystalle vom Smp. 147—152° erhalten werden. Die krystallisierten Sterine, zusammen 3,41 g, haben wir aus Methanol umkrystallisiert und durch Veresterung mit Benzoesäure gereinigt. Nach weiterem Umfällen aus Essigester und 95-proz. Alkohol betrug der Smp. 159—161°. Im Mischschmelzpunkt mit Ergosterin trat keine Depression ein.

3,891 mg Subst. gaben 11,60 mg CO <sub>2</sub> und 3,92 mg H <sub>2</sub> O		
C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O, H <sub>2</sub> O	Ber. C 81,10	H 11,19%
	Gef. „ 81,31	„ 11,27%

Die Farbreaktionen nach *Liebermann-Burchard* und *Salkowski* entsprachen denjenigen des Ergosterins. Zur Herstellung des Benzoylestere haben wir 300 mg in 1 cm<sup>3</sup> Pyridin gelöst, mit 0,5 cm<sup>3</sup> Benzoylchlorid versetzt und den erhaltenen Niederschlag abzentrifugiert. Er wurde dreimal mit 95-proz. Alkohol gewaschen und aus Essigester dreimal umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt der feinen Nadelchen betrug 169—171°.

3,483 mg Subst. gaben 10,71 mg CO <sub>2</sub> und 3,05 mg H <sub>2</sub> O		
C <sub>35</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	Ber. C 83,93	H 9,67%
	Gef. „ 83,86	„ 9,80%

## Fettsäuren.

63,7 g des Fettsäuregemisches trennten wir nach den Angaben von *Hilditch*<sup>1)</sup> in feste und flüssige Anteile.

## a) Aufarbeitung der flüssigen Fettsäuren.

31,4 g des Materials wurden mit Methanol verestert und 31,45 g dunkelbraunes Estergemisch gewonnen, von dem 25,7 g, der fraktionierten Vakuum-Destillation unterworfen, 24,3 g hellgelbes Destillat gaben.

97,5 mg Subst. verbrauchten	3,37 cm <sup>3</sup> 0,1-n. NaOH
230 mg Subst. verbrauchten	22,56 cm <sup>3</sup> 0,1-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Verseifungs-Äq.-Gew.:	Gef. 289,3 JZ.: Gef. 124,3.

13,4 g dieses Esters lieferten durch Verseifung mit 200 cm<sup>3</sup> 3,5-proz. methanolischer Kalilauge bei Zimmertemperatur während 22 Stunden 12,25 g gelbe Fettsäuren. Sie wurden in 100 cm<sup>3</sup> Petroläther gelöst und bei -10° im Verlaufe von 1 1/2 Stunden unter Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 11 g Brom in 30 cm<sup>3</sup> Petroläther versetzt. Nach 14-stündigem Stehen bei 3° wurde der Niederschlag abfiltriert, mit Petroläther und darauf zur Abtrennung von Tetrabromiden zweimal mit warmem Benzol gewaschen. Den verbleibenden Rückstand behandelten wir fünfmal mit 200 cm<sup>3</sup> kochendem Benzol und filtrierten durch eine vorgewärmte Glasnutsche. Das beim Abkühlen sofort ausfallende

1) *T. P. Hilditch*, The Chemical Constitution of Natural Fats, London 1941, S. 371.

Hexabromid schmolz bei 192—193°, nach Umkrystallisieren aus Chloroform und aus Benzol bei 195—196°. Die Schmelze war farblos, erst beim Erhitzen über 200° trat Zersetzung ein. Vor der Analyse wurden die aus Chloroform abgeschiedenen, feinen Nadelchen bei 98° über Phosphoroxoxyd getrocknet.

	3,660 mg Subst. gaben 5,428 mg AgBr
	98,3 mg Subst. verbrauchten 2,60 cm <sup>3</sup> 0,05-n. KOH
$C_{18}H_{30}O_2Br_6$	Ber. Br 63,28%    Äq.-Gew. 757,8
	Gef. „ 63,12%    Äq.-Gew. 755,1

Beim Einengen der Mutterlauge fielen noch 90 mg Hexabromid aus.

Die die Tetrabromide enthaltende Lösung engten wir ein, fügten Petroläther hinzu und liessen sie im Eisschrank während 70 Stunden stehen. Es schieden sich 1,12 g Krystalle vom Smp. 109—111° ab und aus der Mutterlauge weitere 860 mg, welche bei 106—107° schmolzen. Wir haben sie aus Petroläther umkrystallisiert, Smp. 114—114,5°. Mischschmelzpunkt mit der für die cis-, cis-Linolsäure charakteristischen Tetrabromstearinsäure 114°. Das Tetrabromid wurde vor der Analyse in der Wasserpistole getrocknet.

	6,134 mg Subst. gaben 7,706 mg AgBr
	133,3 mg Subst. verbrauchten 4,44 cm <sup>3</sup> 0,05-n. KOH
$C_{18}H_{32}O_2Br_4$	Ber. Br 53,31%    Äq.-Gew. 599,9
	Gef. „ 53,47%    „    „ 601,8

Die gut löslichen Bromide, d. h. das Gemisch der Di- und löslichen Tetrabromide, wurden vom Petroläther befreit und im Vakuum zur Gewichtskonstanz gebracht. Gewicht der zähen, braunen Schmiere 19,26 g. Ein Teil (a) wurde debromiert, ein Teil (b) zur Isolierung von Ölsäure-dibromid tiefgekühlt.

Die Debromierung (a) erfolgte nach den Angaben von Grün<sup>1)</sup>, wobei wir das Bromidgemisch zuerst durch Veresterung mit Methanol und Destillation im Vakuum reinigten. 9,75 g Bromsäureester wurden in 75 cm<sup>3</sup> Alkohol gelöst und nach Zugabe von 10 g Zinkstaub auf dem Wasserbad zum Sieden erhitzt. Im Verlaufe von 20 Minuten liessen wir 15 cm<sup>3</sup> 5-n. Salzsäure zufließen, erwärmten weiterhin 30 Minuten und extrahierten nach Abkühlen viermal mit Petroläther. Dieser hinterliess nach Auswaschen und Trocknen 5,3 g gelben, flüssigen Ester, der keine Brom-Reaktion mehr zeigte und bei Zimmertemperatur verseift wurde. Eine scharfe Trennung in Ölsäure und Linolsäure durch fraktionierte Destillation gelang nicht.

	173,8 mg Subst. verbrauchten 16,71 cm <sup>3</sup> 0,1-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	Gef. JZ. des Esters 122, der Säure 128

Daraus lässt sich die Zusammensetzung des Gemisches zu 58,2% Ölsäure und 41,8% Linolsäure berechnen.

Die Abscheidung des Dibromides der Ölsäure versuchten wir durch starke Kühlung und Zentrifugation<sup>2)</sup>. 4 g des Bromid-Gemisches (b) wurden in 30 cm<sup>3</sup> Petroläther gelöst, mit fester Kohlensäure gekühlt und unter Kühlung zentrifugiert. Wir trennten die überstehende Flüssigkeit ab, lösten den Rückstand nochmals in Petroläther und zentrifugierten nach Abkühlen erneut. Diese Prozedur wurde siebenmal repetiert. Durch Eindampfen der überstehenden Lösungen erhielten wir nach 20-tägigem Stehen des Rückstandes bei 3° eine krystallinische Masse, welche beim Erwärmen auf 10° schmolz.

	103,2 mg Subst. verbrauchten 4,65 cm <sup>3</sup> 0,05-n. NaOH
	6,346 mg Subst. gaben 5,50 mg AgBr
$C_{18}H_{34}O_2Br_2$	Ber. Br 36,16%    Äq.-Gew. 442,1
	Gef. „ 36,38%    „    „ 443,9

<sup>1)</sup> A. Grün, Analyse der Fette und Wachse, Berlin 1925, Bd. I, S. 225.

<sup>2)</sup> R. Reichert, Helv. **28**, 484 (1945).

## b) Aufarbeitung der festen Fettsäuren.

Vom Gemisch der festen Fettsäuren (24,8 g, Smp. 49–50°) haben wir 20,8 g mit Methanol verestert und 21,48 g Methylester in 3 Chargen in einer speziellen Kolonne<sup>1)</sup> fraktioniert destilliert. Der Destillations-Verlauf ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2.

Fraktion Nr.	Aussen-Temperatur	Kp°	Fp°	Gewicht mg
1	115—126	96—110	13—23	384
2	127—129	112—114	27—29	6436
3	130—132	115—118	27,5—30	2438
4	133—142	119—128	22—24	2342
5	142—146	129—134	32—34	1756
6	150—168	138—149	30—33	457
7	170—184	150—162	38—40	254
8	185—188	163—169	40—45	188
9	188—190	170—174	47—49	973
10	191—195	175—180	37—41	186
11	198—202	182—192	42—47	2306
12	203—212	194—202	25—46	1970
13	214—270	204—240	27—51	854

Tiefer siedende Anteile waren kaum vorhanden, Fraktion 2 und 3 bestanden bereits aus Palmitinsäuremethylester. Wir haben die Fraktion 5 redestilliert (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3.

Redestillation der Fraktion 5, 1,756 g.

Fraktion Nr.	Kp°	Fp°	Gewicht mg
14	126—138	26,2—28,1	249
15	139—142	35,4—36,2	1201
16	142	36,8—37,8	172
17	143—159	34—35,5	99

Desgleichen wurden die vereinigten Fraktionen 6—8 redestilliert (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4.

Redestillation der Fraktionen 6—8, 0,899 g.

Fraktion Nr.	Kp°	Fp°	Gewicht mg
18	140—144	23 —26	85
19	145—146	35,7—36,4	384
20	147—158	32 —33,6	107
21	160—174	39,5—40,8	131
22	175—180	42,2—43,7	274

<sup>1)</sup> R. Schoenheimer und D. Rittenberg, J. Biol. Chem. **120**, 155 (1937).

Ferner wurde Fraktion 9, welche als Behensäure-methylester angesprochen werden konnte, redestilliert (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5.

Redestillation der Fraktion 9, 0,973 g.

Fraktion Nr.	Kp°	Fp°	Gewicht mg
23	172—174	50 —51	656
24	178—179	50 —51	157
25	184—212	44,5—47,5	198

Schliesslich haben wir auch die Fraktion 11 nochmals destilliert (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6.

Redestillation der Fraktion 11, 2,30 g.

Fraktion Nr.	Kp°	Fp°	Gewicht mg
26	180—186	46,5—49	452
27	190	44,5—51	1268
28	192—202	43,5—50,5	558
29	203—204	28 —46,5	146

Wir verseiften nun alle einigermaßen einheitlichen Methylester mit methanolischer Kalilauge und krystallisierten die Fettsäuren bis zur Erreichung konstanter Schmelzpunkte um.

1. 8,874 g Methylester (Fraktion 2 und 3) gaben 8,370 g bei 62° schmelzender Säure. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus 75%-igem Alkohol betrug der Smp. 63°, der Mischschmelzpunkt mit Palmitinsäure 63°.

112,0 mg Subst. verbrauchten 8,80 cm<sup>3</sup> 0,05-n. KOH

C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> Äq.-Gew. Ber. 256,3 Gef. 255,3

2. 1,373 g Methylester (Fraktion 15 und 16) gaben 1,298 g Säure vom Smp. 66—67°. Dieser betrug nach zweimaligem Umkrystallisieren aus 90-proz. Alkohol 70—71°. Im Mischschmelzpunkt mit Stearinsäure trat keine Depression ein.

82,8 mg; 89,2 mg Subst. verbrauchten 5,78 cm<sup>3</sup>; 6,30 cm<sup>3</sup> 0,05-n. KOH

C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> Äq.-Gew. Ber. 284,3 Gef. 286,1; 283,5

3. 813 mg Methylester (Fraktion 23 und 24) lieferten durch Verseifung 747 mg bei 76—77° schmelzender Säure. Schmelzpunkt nach je einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol, Petroläther und Eisessig 80—81°, Mischschmelzpunkt mit Behensäure 80°.

85,6 mg Subst. verbrauchten 5,04 cm<sup>3</sup> 0,05-n. KOH

C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub> Äq.-Gew. Ber. 340,4 Gef. 340,1

4. 1,268 g Methylester (Fraktion 27) gaben 1,196 g Säure, Smp. 69—73°.

108,5 mg Subst. verbrauchten 5,88 cm<sup>3</sup> 0,05-n. KOH

103,3 mg Subst. verbrauchten 3,30 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Gef. Äq.-Gew. 369,2 JZ 40,5

Laut Jod-Zahl lag ein Gemisch von 59% ungesättigter und 41% gesättigter Säure vor. Die Hauptmenge der letzteren konnte durch Auskrystallisieren aus 95-proz. Alkohol



abgetrennt werden. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus dem gleichen Lösungsmittel und anschliessend aus Eisessig betrug der Smp. 85°. Tricosancarbonsäure schmilzt bei 87°.

56,7 mg Subst. verbrauchten 3,09 cm<sup>3</sup> 0,05-n. KOH

C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub> Äq.-Gew. Ber. 368,4 Gef. 367,0

5. 2,546 g Methyl ester (Fraktion 12 und 13) gaben 2,416 g Säure, Smp. 46—55°.

119,1 mg Subst. verbrauchten 6,11 cm<sup>3</sup> 0,05-n. KOH

102,3 mg Subst. verbrauchten 4,12 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

C<sub>26</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub> Ber. Äq.-Gew. 396,4 JZ 0

C<sub>26</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub> „ „ „ 394,4 „ 64,3

Gef. „ „ 390,5 „ 51,1

Offenbar lag hier ein Gemisch aus 79,5% ungesättigter und 20,5% gesättigter Säure vor. Letztere konnte grösstenteils durch Auskrystallisieren aus 95-proz. Alkohol erhalten werden. Nach nochmaligem Umkrystallisieren aus Eisessig schmolz die Verbindung bei 78—79°, Mischschmelzpunkt mit Cerotinsäure 78°.

51,0 mg Subst. verbrauchten 2,58 cm<sup>3</sup> 0,05-n. NaOH

C<sub>26</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub> Äq.-Gew. Ber. 396,4 Gef. 395,4

6. Die verschiedenen Mischfraktionen durften im Hinblick auf die Berechnung der procentualen Zusammensetzung des Fettsäuregemisches nicht unberücksichtigt bleiben.

Fraktion 4 (2,34 g) gab 2,194 g Säure, Smp. 54—55°.

158,4 mg Subst. verbrauchten 12,18 cm<sup>3</sup> 0,05-n. KOH

C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> Ber. Äq.-Gew. 256,3

C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> „ „ „ 284,3

Gef. „ „ 260,4

Die Zusammensetzung des Gemisches lässt sich zu 85% Palmitin- und 15% Stearinsäure berechnen.

Fraktion 19 (0,354 g) gab 0,325 g Säure, Smp. 66—67°, Mischschmelzpunkt mit Stearinsäure 68°.

107,1 mg Subst. verbrauchten 7,65 cm<sup>3</sup> 0,05-n. NaOH

C<sub>28</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub> Äq.-Gew. Ber. 284,3 Gef. 280,5

Fraktion 26 gab 0,420 g Säure, Smp. 68—73°.

87,7 mg Subst. verbrauchten 4,83 cm<sup>3</sup> 0,05-n. KOH

C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub> Ber. Äq.-Gew. 368,4

C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub> „ „ „ 366,4

Gef. „ „ 363,2

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass Fraktion 27 aus Tricosan-carbonsäure und einer offenbar dieselbe C-Zahl aufweisenden, aber ungesättigten Fettsäure bestand. Nach Abtrennung der ersteren wurde die Mutterlauge eingedampft, der 480 mg betragende Rückstand in 7,5 cm<sup>3</sup> 96-proz. Alkohol gelöst, zum Sieden erhitzt und unter Umschwenken mit einer heissen alkoholischen Magnesiumacetat-Lösung versetzt, bis keine Fällung mehr eintrat. Nach 5-stündigem Stehen wurde der nur geringe Niederschlag abgesogen, das Filtrat mit verdünnter Salzsäure angesäuert, mit Wasser verdünnt und mit Petroläther extrahiert. Letzterer hinterliess 460 mg krystallisierten Rückstand, welcher bei 35,5—36,5° schmolz. Wir lösten ihn in wenig heissem Alkohol, fügten bis zu schwach alkalischer Reaktion alkoholische Natronlauge zu und erwärmten. Nach dem Abkühlen schied sich das Natriumsalz der Säure aus. Wir haben es mit 95-proz. Alkohol ausgewaschen, aus 15 cm<sup>3</sup> 95-proz. Alkohol umkrystallisiert, zersetzt und die Säure in Petroläther aufgenommen. Sie wog 350 mg und zeigte einen Smp. von 37—38°. Letzterer betrug nach Umkrystallisieren aus Aceton-Wasser 38—38,5°, aus reinem Aceton 39°.

137,2 mg Subst. verbrauchten 7,47 cm<sup>3</sup> 0,05-n. KOH

82,6 mg Subst. verbrauchten 4,43 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

66,5 mg Subst. verbrauchten 3,55 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub> Ber. Äq.-Gew. 366,4 JZ 69,1

Gef. „ „ 367,1 „ 68,0, 67,8

Weitere 391 mg (Smp. 38—39°) dieser Säure gewannen wir aus den Fraktionen 26 und 28, ferner aus Mutterlagen.

Die Fraktionen 12 und 13 hatten neben Cerotinsäure einen ungesättigten Rückstand von 790 mg ergeben, wovon 690 mg in der oben geschilderten Weise mit Magnesiumacetat-Lösung behandelt wurden. Es ergaben sich nach Zersetzung des Mg-Salzes 310 mg Säure, Smp. 40,5—41,5°. Wir reinigten sie über das Natriumsalz und gewannen 177 mg einer bei 44° schmelzenden Verbindung. Schmelzpunkt nach Umkrystallisieren aus Aceton 45—45,5°.

57,8 mg Subst. verbrauchten	2,92 cm <sup>3</sup>	0,05-n. KOH
89,7 mg Subst. verbrauchten	4,49 cm <sup>3</sup>	0,1-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	Ber. Äq.-Gew.	394,4    JZ 64,3
	Gef. „ „	395,6    „ 63,5

Die Mutterlagen enthielten noch 246 mg dieser Säure, Smp. 40—41°, nach zweimaligem Umkrystallisieren aus wässrigem Aceton 44°.

Die geschilderte Aufarbeitung hat ergeben, dass 20,8 g des Gemisches der festen Fettsäuren der Phycomyces-Lipide aus 10,28 g Palmitin-, 1,95 g Stearin-, 0,75 g Behensäure, 0,88 g Tricosan-carbonsäure, 1,25 g Tricosen-carbonsäure, 0,55 g Pentacosan-carbonsäure (Cerotinsäure) und 2,13 g Pentacosen-carbonsäure bestanden.

### c) Identifizierung der festen ungesättigten Säuren.

Die beiden erhaltenen ungesättigten Fettsäuren mit 24 und 26 C-Atomen standen nur in geringen Mengen zur Verfügung, so dass eine Aufspaltung der Doppelbindung mit Ozon wenig aussichtsreich schien. Wir haben daher mit Hilfe von Osmiumtetroxyd die Herstellung der Oxyssäuren und anschliessend deren Spaltung mit Bleitetraacetat versucht.

Tricosen-carbonsäure: Wir lösten 380 mg (aus Fraktion 27 plus ein Teil weniger reines Material aus Fraktion 26 und 28) der Säure in 5 cm<sup>3</sup> absolutem Äther und fügten 320 mg Osmiumtetroxyd (20% Überschuss) gelöst in 5 cm<sup>3</sup> absolutem Äther hinzu. Dieses Gemisch wurde mit 0,14 cm<sup>3</sup> Pyridin (5% Überschuss) versetzt und blieb bei 0° stehen. Wir beobachteten zuerst eine gelbe, dann eine braune Färbung mit nachfolgender Trübung. Nach etwa 15 Minuten war am Boden des Kolbens eine braune, zähe Masse sichtbar, welche nach 20 Stunden durch Dekantieren von der klaren, dunkelbraunen Lösung getrennt wurde. Wir haben beide Teile gesondert aufgearbeitet. Den Äther dampften wir bis auf einige cm<sup>3</sup> ab und fügten eine Lösung von 3 g Natriumsulfit in 40 cm<sup>3</sup> 50-proz. wässrigem Alkohol hinzu. Es bildete sich sofort eine schwarzbraune Fällung, welche nach einstündigem Stehenlassen und anschliessendem, einstündigem Kochen am Rückfluss abfiltriert wurde. Wir kochten den Rückstand zweimal mit 20 cm<sup>3</sup> Wasser aus und filtrierten. Die etwas eingeeengten Filtrate ergaben auf Zusatz von wenig Salzsäure eine grauweisse Fällung. Wir extrahierten mit viel Äther und erhielten 311 mg hellbraune, feste Masse. Sie wurde in Alkohol gelöst, mit etwas Äther versetzt und 2 Tage bei 3° aufgehoben. In dieser Zeit ausgeschiedene, farblose Krystalle filtrierten wir ab. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol-Äther schmolz die Substanz scharf bei 121—122°. Den oben erwähnten, braunen Rückstand haben wir in Alkohol gelöst und analog aufgearbeitet. Es wurden 81 mg einer nach Umkrystallisieren aus Alkohol bei 116—117° schmelzenden Verbindung erhalten. Weitere geringe Anteile dieser Säure ergaben sich aus den Mutterlagen. Vor der Analyse wurde die Verbindung während 3 Stunden in der Wasserpistole über Phosphorperoxyd getrocknet.

3,463 mg Subst. gaben	9,15 mg CO <sub>2</sub>	und	3,66 mg H <sub>2</sub> O
10,55 mg Subst. verbrauchten	0,525 cm <sup>3</sup>		0,05-n. KOH
C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Ber. C 71,93	H 12,08%	Äq.-Gew. 400,4
	Gef. „ 72,04	„ 11,82%	„ „ 401,9

Zur Glykolspaltung lösten wir 250 mg der Dioxysäure in 15 cm<sup>3</sup> Eisessig und versetzten mit 320 mg (15% Überschuss) Bleitetraacetat. Nach 18-stündigem Stehen bei 25° wurde mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt, sechsmal mit je 50 cm<sup>3</sup> Äther ausgeschüttelt, der Äther-Extrakt mit verdünnter Sodalösung zur Abtrennung der sauren Anteile be-

handelt und mit Wasser gewaschen. Wir engten die Äther-Lösung der neutralen Anteile auf einige cm<sup>3</sup> ein, lösten in 5 cm<sup>3</sup> Alkohol und versetzten mit 13 cm<sup>3</sup> ca. 1-proz. alkoholischer Dinitrophenylhydrazin-Lösung. Es wurde zum Sieden erhitzt, konzentrierte Salzsäure (4 Tropfen) zugegeben und 4 Minuten leicht gekocht. Der noch warmen Lösung setzten wir bis zu schwacher Trübung etwas Wasser zu und liessen einige Stunden bei 16° stehen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und fünfmal aus wässrigem Alkohol umkrystallisiert. Die Verbindung bildete rosettenartig angeordnete, orangegelbe Nadeln vom Smp. 70—72°.

3,720 mg Subst. gaben 8,29 mg CO<sub>2</sub> und 2,70 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub> (294,1) Ber. C 53,03 H 6,17%  
Gef. ,, 60,78 ,, 8,12%

Die sauren Anteile, d. h. den Soda-Extrakt, versetzten wir in der Hitze mit verdünnter Kaliumpermanganat-Lösung, bis keine Entfärbung mehr eintrat<sup>1)</sup>. Nach dem Abkühlen wurde der gebildete Braunstein abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat extrahierten wir nach dem Ansäuern mit Äther, welcher nach erfolgtem Auswaschen eingengt wurde. Es hinterblieben 110 mg Rückstand, vom Smp. 87—90°. Letzterer betrug nach Umkrystallisieren aus Petroläther 90—92°, aus Alkohol-Wasser 104—106°, 109—111° und aus Ligroin 111°. Eine weitere Reinigung versuchten wir durch die Herstellung des Natriumsalzes, indessen konnte kein Anstieg des Schmelzpunktes erreicht werden. Vor der Analyse wurde die Rosetten-bildende Säure 2 Stunden in der Wasserpistole getrocknet.

3,631 mg Subst. gaben 9,02 mg CO<sub>2</sub> und 3,48 mg H<sub>2</sub>O

6,42 mg Subst. verbrauchten 1,365 cm<sup>3</sup> 1/30-n. KOH

5,91 mg Subst. verbrauchten 1,162 cm<sup>3</sup> 1/30-n. KOH

C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> (300,3) Ber. C 67,94 H 10,74% Äq.-Gew. 150,1  
Gef. ,, 67,75 ,, 10,73% ,, ,, 149,8; 152,2

Pentacosen-carbonsäure: Es standen uns von dieser Verbindung 330 mg zur Verfügung, deren Spaltung in der oben geschilderten Weise versucht wurde. Die Dioxysäure schmolz nach dreimaligem Umkrystallisieren aus wässrigem Alkohol bei 124—125°. Sie wurde vor der Analyse während 3 Stunden in der Wasserpistole über Phosphorperoxyd getrocknet.

3,294 mg Subst. gaben 8,79 mg CO<sub>2</sub> und 3,54 mg H<sub>2</sub>O

19,97 mg Subst. verbrauchten 0,928 cm<sup>3</sup> 0,05-n. KOH

C<sub>26</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub> (428,4) Ber. C 72,83 H 12,22% Äq.-Gew. 214,2  
Gef. ,, 72,78 ,, 12,03% ,, ,, 215,2

Zur Glykolspaltung haben wir 195 mg der Dioxysäure mit Bleitetraacetat behandelt. Die ätherische Lösung der neutralen Anteile gab mit Dinitrophenylhydrazin gefällt eine orangegelb gefärbte, bei 73—76° schmelzende Verbindung, enthaltend 58,41% C und 7,54% H an Stelle von 53,02% C und 6,17% H für C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>. Aus den sauren Anteilen erhielten wir 125 mg bei 95—100° schmelzenden Rückstand und daraus durch wiederholtes Umkrystallisieren aus Wasser-Alkohol und Ligroin eine Dicarbonsäure vom Smp. 108°.

3,100 mg Subst. gaben 7,80 mg CO<sub>2</sub> und 3,05 mg H<sub>2</sub>O

35,53 mg Subst. verbrauchten 6,545 cm<sup>3</sup> 1/30-n. KOH

13,2 mg Subst. verbrauchten 2,430 cm<sup>3</sup> 1/30-n. KOH

C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> (328,3) Ber. C 69,45 H 11,05% Äq.-Gew. 164,2  
Gef. ,, 68,61 ,, 11,01% ,, ,, 163,0; 162,9

### Zusammenfassung.

1. Als weiterer Beitrag zur Biochemie des Schimmelpilzes *Phycomyces Blakesleeanus* wird über die von diesem Mikroorganismus gebildeten Lipide berichtet.

<sup>1)</sup> C. Harries und H. Türk, A. 345, 359 (1905).

2. Wir haben 430 g durch Züchtung in Glucose-haltiger Nährlösung gewonnenes Mycel erschöpfend extrahiert und etwa 20% Lipide erhalten, die 10% Phosphatide und 5,3% Unverseifbares enthielten.

3. Letzteres erwies sich grösstenteils als Ergosterin und war von Farbstoffen, wahrscheinlich  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin und Lycopin, begleitet.

4. Die gesättigten Fettsäuren bestanden in der Hauptsache aus Palmitinsäure, daneben wurden Stearinsäure, Behensäure, Tricosan-carbonsäure (Lignocerinsäure) und Pentacosan-carbonsäure (Cerotinsäure) gefunden.

5. Von den ungesättigten Säuren waren, ausser der hauptsächlich vertretenen Ölsäure, Linolsäure und in kleinen Mengen die  $\gamma$ -Linolensäure oder  $\Delta^{6:7, 9:10, 12:13}$ -Octadecatriensäure vorhanden. Diese wurde bis anhin lediglich im Samenfett von *Oenothera biennis* nachgewiesen.

6. Wir haben erstmalig eine einfach ungesättigte Fettsäure mit 24 C-Atomen, der die Struktur einer  $\Delta^{17:18}$ -Tricosen-carbonsäure zukommen dürfte, aufgefunden.

7. Ferner konnte die Gegenwart einer nicht aufgeklärten, einfach ungesättigten Fettsäure mit 26 C-Atomen (Pentacosen-carbonsäure) erwiesen werden.

Der „Astra“ Fett- und Ölwerke AG. in Steffisburg sind wir für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

### 136. Zur Kenntnis der p-Amino-salicylsäure und strukturähnlicher Verbindungen

von H. Erlenmeyer, B. Prijs, E. Sorokin und E. Suter.

(8. IV. 48.)

Von den tuberkulostatisch wirksamen Verbindungen, über die in den letzten Jahren in der Literatur berichtet wurde, besitzt die p-Amino-salicylsäure (2-Oxy-4-aminobenzoesäure) besonderes Interesse. *J. Lehmann*<sup>1)</sup> hat als erster in seiner bedeutsamen Untersuchung auf die biologischen Wirkungen dieser Verbindung aufmerksam gemacht. Aus seinen Ergebnissen lassen sich die folgenden, besonders auffälligen Eigenschaften der p-Amino-salicylsäure ableiten:

1. Hohe tuberkulostatische Wirkung in vitro.

2. Spezifität dieser Wirkung, indem andere Vertreter der säurefesten Bakterien nicht gehemmt werden.

<sup>1)</sup> *J. Lehmann*, Lancet **250**, 14, 15 (1946); Svenska Läkartidn. **43**, 2029 (1946).