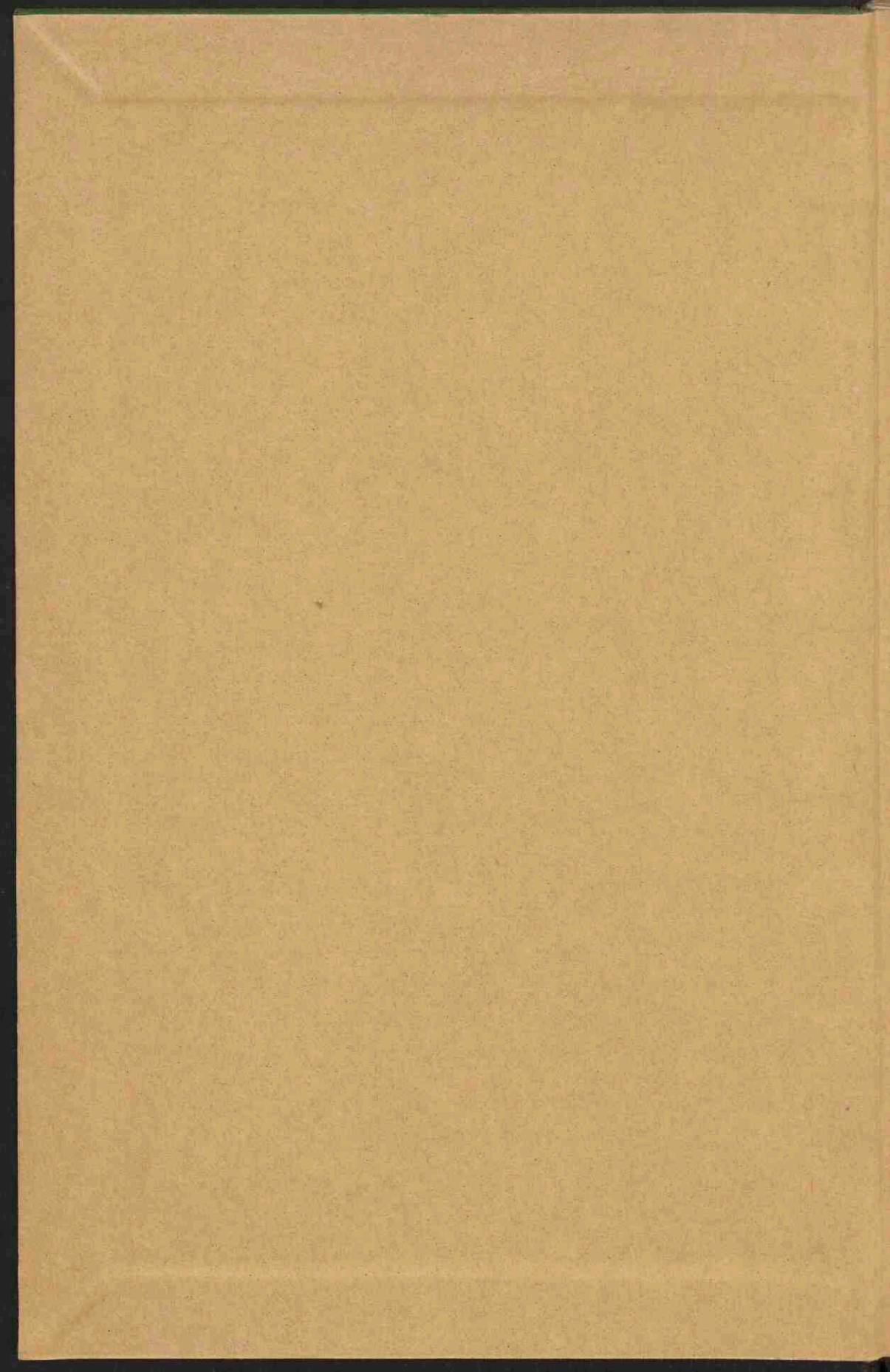




Over phomazarine, de kleurstof van *Phoma terrestris* Hansen

<https://hdl.handle.net/1874/323981>

OVER PHOMAZARINE,
DE KLEURSTOF VAN
PHOMA TERRESTRIS HANSEN



OVER PHOMAZARINE,
DE KLEURSTOF VAN PHOMA TERRESTRIS HANSEN

Duss. Utrecht 1937

OVER PHOMAZARINE, DE KLEURSTOF VAN PHOMA TERRESTRIS HANSEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
Dr. J. BOEKE, HOOGLEERAAR IN DE FA-
CULTEIT DER GENEESKUNDE, VOLGENS
BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVER-
SITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE BE-
DENKINGEN DER FACULTEIT DER WIS-
EN NATUURKUNDE OP MAANDAG 13 DE-
CEMBER 1937, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

JOHANNES SPARENBURG

GEBOREN TE UTRECHT.

N.V. DRUKKERIJ v/h L. E. BOSCH & ZOON — UTRECHT

BIBLIOTHEEK
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT

AAN MIJN OUDERS
AAN HANK

De voltooiing van dit proefschrift biedt mij een welkome gelegenheid, U, Oud-Hoogleraren, Hoogleraren en Lectoren van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, mijn hartelijken dank uit te spreken voor alles wat gij tot mijne wetenschappelijke opleiding hebt bijgedragen.

Dit geldt natuurlijk in het bijzonder U, Hooggeleerde KÖGL, Hooggeachte Promotor, voor de voortdurende belangstelling welke gij voor mijn werk hebt gehad. Dat ik nog eenigen tijd als assistent onder Uwe wetenschappelijke leiding zal mogen werken, stemt mij tot groote vreugde.

Verder dank ik al mijne collega's, die altijd bereid waren, mij met raad en daad terzijde te staan en het personeel van het Organisch-chemisch Laboratorium, waarvan ik steeds alle medewerking heb ondervonden.

INHOUD.

	Blz.
INLEIDING	1
HOOFDSTUK I. HET KWEKEN VAN PHOMA TERRESTRIS HANSEN EN DE ISOLEERING VAN PHO- MAZARINE	14
HOOFDSTUK II. DE STRUCTUUR VAN PHOMAZARINE ..	19
HOOFDSTUK III. EXPERIMENTEEL GEDEELTE	39

INLEIDING.

Tot voor een tiental jaren was over de kleurstoffen der kryptogamen nog zeer weinig bekend. In de oudere litteratuur zijn slechts pogingen tot isoleering benevens sommige physische en chemische eigenschappen der onderzochte kleurstoffen beschreven ¹⁾.

Het systematisch onderzoek van deze verbindingen werd in het jaar 1924 aangevat door F. KÖGL en zijne medewerkers. Deze auteurs hebben zich vooral bezig gehouden met de studie van de kleurstoffen uit eenige algemeen bekende paddestoelen.

Sedert 1930 zijn dan ook een reeks mededeelingen verschenen van H. RAISTRICK en medewerkers en wel hebben deze onderzoekers uit cultures van schimmels verschillende stofwisselingsproducten en daaronder ook vele kleurstoffen verkregen en bestudeerd.

Het eerste onderzoek van de school van F. KÖGL houdt zich bezig met atromentine, de kleurstof van *Paxillus atrotomentosus* BATSCH., welke reeds in het jaar 1888 door W. THÖRNER ²⁾ in gekristalliseerden vorm werd geïsoleerd. F. KÖGL en J. J. POSTOWSKY ³⁾ bewezen voor deze chinonachtige verbinding de bruto-formule $C_{18}H_{12}O_6$. Bij destillatie met zinkstof verkregen zij een koolwaterstof $C_{18}H_{14}$, welke

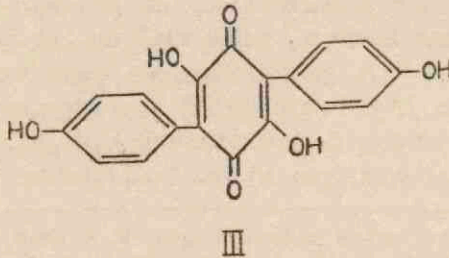
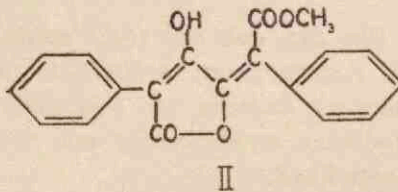
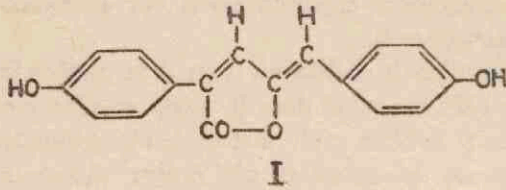
¹⁾ Zie voor oudere onderzoekingen: F. CZAPEK, Biochemie der Pflanzen, Bd. III, S. 374, 2e druk; G. FISCHER, Jena, 1921.

²⁾ W. THÖRNER, B. 11, 533 (1888); B. 12, 1630 (1889).

³⁾ F. KÖGL en J. J. POSTOWSKY, Ann. 440, 19 (1924); Ann. 445, 159 (1925); Ann. 465, 211 (1928).

geïdentificeerd kon worden als p-diphenylbenzol of terphenyl. De oxydatie van atromentine gaf atromentinezuur (I), waarvan de structuur een sterke gelijkenis vertoont met vulpinezuur (II) ⁴⁾. Deze verschillende waarnemingen hebben er toe geleid aan atromentine de formule III toe te kennen.

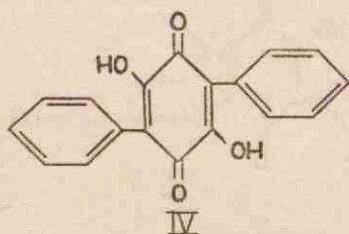
De juistheid van deze formule kon dan ook door de synthese, welke door F. KÖGL en H. BECKER ⁵⁾ werd beschreven, worden bewezen.



⁴⁾ A. SPIEGEL, Ann. 219, 1 (1883); J. VOLHARD, Ann. 282, 1 (1894).

⁵⁾ F. KÖGL en H. BECKER, Ann. 465, 243 (1928).

In 1925 publiceerde F. KÖGL⁶⁾ een onderzoek over het polyporzuur. Deze verbinding is de kleurstof van een bepaalde *Polyporus*-soort, welke aan zieke eiken groeit en voor het eerst door C. STAHLSCHMIDT⁷⁾ in het jaar 1877 geïsoleerd werd. F. KÖGL heeft dezelfde kleurstof uit *Polyporus nidulans* PERS. kunnen isoleren en vond voor polyporzuur de formule $C_{18}H_{12}O_4$. Ook hier ontstond bij destillatie met zinkstof terphenyl en bij het verdere onderzoek bleek, dat polyporzuur identiek is met het synthetisch bereide 3,6-dioxy-2,5-diphenyl-1,4-benzochinon (IV).



Eenige jaren later hebben F. KÖGL en H. ERXLEBEN⁸⁾ in muscarufine, de roode kleurstof van de vliegenzwam (*Amanita muscaria* L.), nog een derde, in de natuur voorkomend, derivaat van terphenyl gevonden.

Volgens hun onderzoekingen heeft muscarufine de samenstelling $C_{25}H_{16}O_9$; het bevat een phenolische hydroxylgroep en drie carboxylgroepen, de twee resterende zuurstofatomen behooren tot een chinonsysteem.

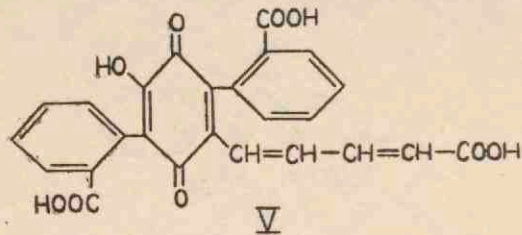
Een destillatie met zinkstof levert ook hier weer terphenyl. Bij de katalytische hydreeing neemt de kleurstof drie mol.

⁶⁾ F. KÖGL, Ann. **447**, 78 (1925).

⁷⁾ C. STAHLSCHMIDT, Ann. **187**, 177 (1877); **195**, 365 (1879).

⁸⁾ F. KÖGL en H. ERXLEBEN, Ann. **479**, 11 (1930).

waterstof op, en door oxydatie van de gehydeerde verbinding ontstaat naast adipinezuur ortho-phtaalzuur. De opbrengst van het laatste zuur (1,4 mol.) wijst er op, dat het door beide benzoïde ringen geleverd werd. Aan triacetyl-leuko-muscarufine kan maleïnezuuranhydride geaddeerd worden; deze „diëen-synthese” doet vermoeden, dat een zijketen met twee geconjugeerde dubbele bindingen aanwezig moet zijn. Dit feitenmateriaal wordt verklaard door de volgende structuurformule (V) van muscarufine:



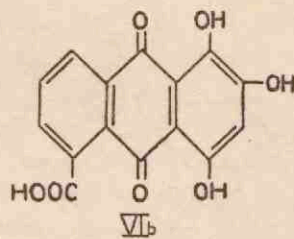
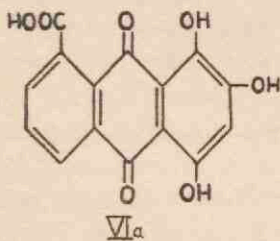
In tegenstelling tot de hier voor het eerst gevonden terphenylverbindingen zijn onder de plantaardige kleurstoffen reeds lang derivaten van anthraceen bekend.

Zoals voor het eerst uit een onderzoek van F. KÖGL en J. J. POSTOWSKY⁹⁾ bleek, zijn ook de beide kleurstoffen van *Dermocybe sanguinea* WOLF afgeleid van anthrachinon.

De gele verbinding uit deze paddestoel bleek identiek te zijn met 1,6,8-trioxy-3-methylantrachinon, het *emodine*. Voor *dermocybine*, de roode kleurstof, werd de formule $C_{16}H_{12}O_7$ gevonden. Het bleek een tetra-oxy-methoxy- β -methylantrachinon te zijn, waarbij echter de onderlinge stand der diverse substituenten wegens gebrek aan materiaal niet opgehelderd kon worden.

⁹⁾ F. KÖGL en J. J. POSTOWSKY, Ann. 447, 78 (1925).

Een ander derivaat van het anthraceen werd in het boletol, de kleurstof der blauw aanlopende boleten, gevonden. Reeds SCHÖNBEIN¹⁰⁾ heeft opgemerkt, dat de bij het doorbreken van de paddestoelen optredende blauwe kleur door de werking van enzymen ontstaat. BERTRAND¹¹⁾ isoleerde uit verschillende boletensoorten een roode, chinonachtige stof, welke hij boletol noemde. F. KÖGL en W. B. DEYS¹²⁾ verkregen het boletol uit *Boletus satanas* LENZ, *B. luridus* SCHAEFF en *B. badius* FR.; zij vonden als formule van de kleurstof $C_{15}H_8O_7$. De stof bevat drie phenolische hydroxylgroepen benevens een carboxylgroep en heeft een chinoïde structuur. Bij destillatie met zinkstof werd anthraceen gevormd. Oxydatie gaf hemi-melliethzuur. Op grond van deze en andere feiten stellen de onderzoekers de formules VIa resp. VIb voor:



Boletol kon ook synthetisch bereid worden¹³⁾, echter was het ook langs dezen weg niet mogelijk tusschen de beide genoemde formules te beslissen. De onderzoekers bewezen voorts, dat de blauwe kleur, welke ontstaat bij het doorbreken

¹⁰⁾ C. SCHÖNBEIN, Phil. Mag. **XI**, 4e serie, 137 (1856).

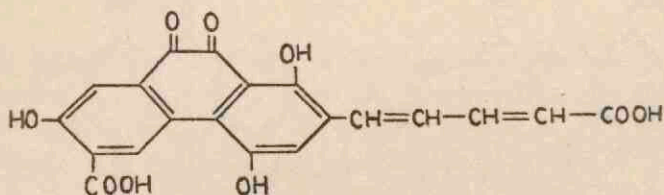
¹¹⁾ G. BERTRAND, Compt. rend. **124**, 1355 (1897).

¹²⁾ F. KÖGL en W. B. DEYS, Ann. **515**, 10 (1935).

¹³⁾ F. KÖGL en W. B. DEYS, Ann. **515**, 23 (1935).

der paddestoelen te danken is aan de vorming van een dichinon.

De tot nu toe behandelde kleurstoffen van paddestoelen zijn derivaten van terphenyl of van anthraceen geweest. In een derde groep bespreken wij nu het telephorzuur en het xylindeïne, kleurstoffen, welke afgeleid zijn van het phenanthreen. De kleurstof telephorzuur werd verkregen uit *Thelephora palmata* SCOP., *Th. flabelliformis* FR., *Th. caryophyllea* SCHAEFF, *Th. terrestris* EHRH., *Th. corraloïdes* FR. e.a. De onderzoekingen over deze kleurstof door F. KÖGL, H. ERXLEBEN en L. JÄNECKE¹⁴⁾ leidden voor telephorzuur tot een formule $C_{20}H_{12}O_9$. De stof heeft een chinoidé structuur en bevat drie phenolische hydroxyl- benevens twee carboxyl-groepen. Door de resultaten bij de afbraak verkregen, kon de structuurformule VII in alle opzichten worden bewezen.



VII

Xylindeïne, de malachietgroene kleurstof uit rottend hout werd reeds in het jaar 1874 door LIEBERMANN¹⁵⁾ geïsoleerd. De structuur van deze gecompliceerde kleurstof kon door F. KÖGL, G. VON TAEUFFENBACH en H. ERXLEBEN¹⁶⁾ niet

¹⁴⁾ F. KÖGL, H. ERXLEBEN en L. JÄNECKE, Ann. 482, 105 (1930).

¹⁵⁾ C. LIEBERMANN, B. 7, 1102 (1874).

¹⁶⁾ F. KÖGL en G. v. TAEUFFENBACH, Ann. 445, 170 (1923).
F. KÖGL en H. ERXLEBEN, Ann. 484, 65 (1930).

geheel worden opgehelderd, alhoewel verschillende bijzonderheden van de structuur bekend werden. Xylindeïne heeft de formule $C_{34}H_{26}O_{11}$; het bevat vier phenolische hydroxylgroepen, zoomede twee enol-lactongroepen en heeft een chinoïde structuur. Bij een „microzinkstof-destillatie” ontstond in goede opbrengst phenanthreen.

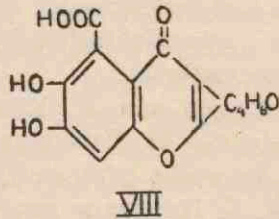
Na de onderzoeken van F. KÖGL en medewerkers dienen vervolgens die van H. RAISTRICK en medewerkers te worden genoemd. Als eerste schimmelkleurstof, welke door H. RAISTRICK en A. C. HETHERINGTON¹⁷⁾ onderzocht werd, noem ik hier het *citromycetine*, hetwelk gevormd wordt door *Citromyces*-soorten, wanneer deze gekweekt worden op glucose-houdende media. Bij al hun onderzoeken gebruiken RAISTRICK e.m. de CZAPEK-DOX-voedingsbodem, welke wat betreft de zouten, slechts in quantitatief opzicht gevarieerd werd.

Citromycetine heeft de formule $C_{14}H_{10}O_7$. De stof bevat twee hydroxylgroepen benevens een carboxylgroep en geeft met broomwaterstof een zout. Een alkalische hydrolyse in stikstofatmosfeer gaf als afbraakproducten aceton, azijnzuur en 3,5,6-trioxyphtaalzuur. Wanneer echter de dimethoxy-citromycetine-methylester op dezelfde manier behandeld werd, ontstonden naast elkaar dimethoxy-oxy-methyl- γ -benzopyron, azijnzuur en 4,5-dimethoxy-2-oxy-phtaalzuur-1,6. Op grond van deze afbraakreacties stellen RAISTRICK en HETHERINGTON de volgende formule (VIII) voor de kleurstof voor:

De functie van het zevende zuurstofatoom is nog niet vastgesteld; bovendien dient rekening te worden gehouden

¹⁷⁾ H. RAISTRICK en A. C. HETHERINGTON, Phil. Trans. Roy. Soc. London, serie B 220, 209 (1931).

met de afbraakproducten aceton en azijnzuur, welke afkomstig zullen zijn uit de nog onbekende rest (C_4H_8O).



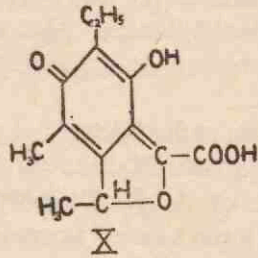
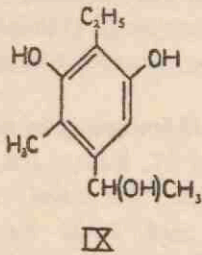
Na dit onderzoek verscheen een mededeeling van H. RAISTRICK en J. H. BIRKINSHAW¹⁸⁾, waarin zij de kleurstof beschrijven, welke zij geïsoleerd hebben uit soorten van *Penicillium spinulosum*. De kleurstof heeft de formule $C_8H_8O_5$ en bevat twee phenolische hydroxylgroepen, een methoxylgroep en een chinoïd systeem. Op deze gronden blijkt de kleurstof te zijn een dioxy-methoxy-toluchinon. De plaats der verschillende substituenten is nog niet bekend.

Vervolgens onderzochten H. RAISTRICK en A. C. HETHERINGTON¹⁹⁾ de kleurstof van *Penicillium citrinum* THOM, welke zij citrinine noemden. Zij vonden, dat deze eveneens chinoïde kleurstof de formule $C_{13}H_{14}O_5$ bezit en een hydroxylgroep alsmede een carboxylgroep bevat. Hydrolyse in zuur milieu leverde als afbraakproducten kooldioxyde, mierenzuur en een verbinding $C_{11}H_{16}O_3$. Deze bevat drie hydroxylgroepen, waarvan één alcoholisch is. Op grond van de verdere afbraak maken de auteurs het waarschijnlijk, dat het hydrolyse-

¹⁸⁾ H. RAISTRICK en J. M. BIRKINSHAW, Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., serie B **220**, 245 (1931).

¹⁹⁾ H. RAISTRICK en A. C. HETHERINGTON, ibid., serie B **220**, 269, 297 (1931).

product formule IX heeft; daaruit volgt dan voor citrinine de structuur X.



De in het vervolg bestudeerde kleurstoffen uit *Helminthosporium*-soorten behooren allen tot de anthrachinonreeks. H. RAISTRICK en J. M. BIRKINSHAW²⁰⁾, alsmede H. RAISTRICK, J. H. V. CHARLES, R. ROBINSON en A. R. TODD²¹⁾ isoleerden uit *Helminthosporium gramineum* RABENHORST twee bruine kleurstoffen, welke zij *helminthosporine* en *catenarine* noemden. Deze laatste naam is afgeleid van de schimmel *H. catenarium* DRECHSLER, uit welke groote hoeveelheden van de tweede kleurstof verkregen werden. Helminthosporine heeft de formule $C_{15}H_{10}O_5$, catenarine daarentegen de samenstelling $C_{15}H_{10}O_6$; de laatstgenoemde verbinding bevat dus slechts een zuurstofatoom meer. Helminthosporine bevat drie phenolische hydroxylgroepen en geeft bij destillatie met zinkstof β -methylanthraceen. Bij oxydatie met chroomtrioxyde ontstaat een monocarbonsuur, dat bij decarboxyleering 1,4,5-trioxy-anthrachinon levert. Op grond van

²⁰⁾ H. RAISTRICK en J. H. BIRKINSHAW, Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., serie B 220, 331 (1931).

²¹⁾ H. RAISTRICK, J. H. V. CHARLES, R. ROBINSON en A. R. TODD, Biochem. J. 27, 499 (1933).

de verdere afbraak kwamen de onderzoekers tot het resultaat, dat helminthosporine 2-methyl-4,5,8-trioxy-anthrachinon is. Catenarine blijkt een oxy-iso-helminthosporine te zijn, en wel een 4,5,8-trioxy-2-(of 6- of 7-)-oxymethylantrachinon; de plaats van de oxymethylgroep is dus niet met zekerheid bekend.

Uit een ander lid van het geslacht *Helminthosporium*, n.l. uit *H. Cynodontis* MARIGNONI isoleerden H. RAISTRICK, R. ROBINSON en A. R. TODD²³⁾ een bruine kleurstof, welke zij cynodontine noemden. De stof heeft de formule $C_{15}H_{10}O_6$ en bevat vier phenolische hydroxylgroepen. De opheldering van de structuur was in dit geval zeer gemakkelijk, omdat bij oxydatie van helminthosporine met behulp van mangaandioxyde en zwavelzuur een oxyderivaat gevormd wordt, dat identiek is met cynodontine. Cynodontine is dus een oxyhelminthosporine en wel, zooals RAISTRICK e.m. bewezen 1,4,5,8-tetra-oxy-2-methylantrachinon.

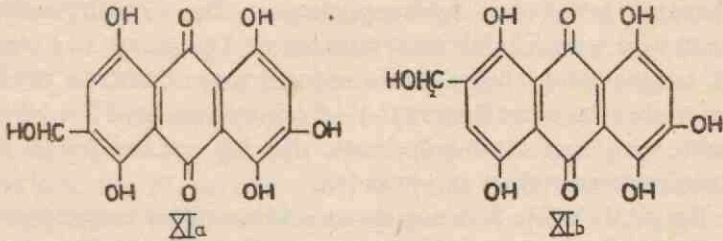
Als laatste der *Helminthosporium*-kleurstoffen volgt thans het tritisporine, hetwelk in 1934 door H. RAISTRICK, R. ROBINSON en A. R. TODD²³⁾ geïsoleerd kon worden uit *Helminthosporium tritici-vulgaris* NISIKADO. De auteurs bewezen voor tritisporine de formule $C_{15}H_{10}O_7$. De stof bevat één alcoholische en vier phenolische hydroxylgroepen. Uit afbraakreacties concludeerden de auteurs tot formule XIa resp. XIb.

Een andere groep van gekristalliseerde schimmelkleurstoffen, het flavoglaurine (geel), het auroglaurine (oranje) en het rubroglaurine (rood) hebben H. RAI-

²³⁾ H. RAISTRICK, R. ROBINSON en A. R. TODD, Biochem. J. **27**, 1170 (1933).

²³⁾ H. RAISTRICK, R. ROBINSON en A. R. TODD, Biochem. J. **28**, 559 (1934).

STRICK en B. S. GOULD²⁴⁾ uit verschillende soorten van *Aspergillus glaucus* geïsoleerd. De formules voor deze stoffen luiden resp. $C_{19}H_{28}O_3$, $C_{19}H_{22}O_3$ en $C_{16}H_{12}O_5$. Slechts enkele fysische en chemische eigenschappen van deze kleurstoffen zijn bekend, echter niets over de constitutie.



Uit²⁵⁾ *Penicillium chrysogenum* THOM verkregen H. RAISTRICK, P. W. CLUTTERBUCK en R. LOVELL²⁵⁾ een gele kleurstof, welke zij *chryso-genine* noemden. De stof heeft een formule $C_{18}H_{22}O_6$, bevat twee phenolische hydroxylgroepen en heeft vermoedelijk een chinoïde structuur. Verdere bijzonderheden over deze kleurstof zijn nog niet ontdekt.

In 1935 isoleerden H. RAISTRICK, A. E. OXFORD en P. SIMONART²⁶⁾ een nieuw geel pigment, *fulvinezuur*, uit *Penicillium-Griseo-fulvum* DIERCKX, *P. flexuosum* DALE en *P. Brefeldianum* DODGE. De stof heeft de formule $C_{14}H_{12}O_8$ en gelijkt in haar reacties op citromycetine. Ook de structuur van deze kleurstof is tot nu toe nog niet nader onderzocht.

In 1936 volgde een onderzoek van de kleurstof uit *Helmintho-*

²⁴⁾ H. RAISTRICK en B. S. GOULD, *Biochem. J.* **28**, 1640 (1934).

²⁵⁾ H. RAISTRICK, P. W. CLUTTERBUCK en R. LOVELL, *Biochem. J.* **26**, 1300 (1932).

²⁶⁾ H. RAISTRICK, A. E. OXFORD en P. SIMONART, *Biochem. J.* **29**, 1102 (1935).

sporium Ravenilii CURTIS en *H. turcicum* PASSERINI. H. RAISTRICK, R. ROBINSON en D. E. WHITE ²⁷⁾ isoleerden hieruit een gele kleurstof, welke niet verwant was met de poly-oxy-anthrachinonen, welke door de meeste soorten van *Helminthosporium* geproduceerd worden. Zij noemden deze kleurstof raveneline en stelden als formule vast $C_{14}H_{10}O_5$. De kleurstof bevat drie hydroxylgroepen. De trimethylaether geeft zeer gemakkelijk oxoniumzouten. Op grond van deze en andere feiten besluiten de auteurs voor raveneline tot de volgende structuur: 3-methyl-1,4,8-trioxy-xanthon. Dit is het eerste poly-oxy-xanthonderivaat, dat bij een schimmel als stofwisselingsproduct is gevonden.

Ten slotte wil ik hier nog de twee kleurstoffen memoreeren, welke H. RAISTRICK, J. N. ASHLEY en B. C. HOBBS ²⁸⁾ isoleerden uit *Fusarium culmorum* (W. G. SMITH) SACC. Op verschillende gronden stellen de auteurs voor één van deze kleurstoffen, welke zij rubrofusarine noemen en welke een formule $C_{15}H_{12}O_5$ heeft, de structuur van methyl-methoxy-dioxy-xanthon voor. De overeenkomstige trioxy-verbinding zou isomeer zijn met raveneline. Voor de tweede kleurstof, het aurofusarine, vonden zij de formule $C_{30}H_{20}O_{12}$. Over de structuur van deze verbinding zijn nog geen nadere gegevens bekend, men weet alleen, dat zij zes hydroxylgroepen bevat.

Het was mij uiteraard niet mogelijk, om in dit overzicht alle onderzoekers te vermelden, welke zich hebben bezighouden met de bestudeering van schimmelkleurstoffen. Verdere gegevens over onderzoekingen op dit gebied vindt

²⁷⁾ H. RAISTRICK, R. ROBINSON en D. E. WHITE, Biochem. J. **30**, 1303 (1936).

²⁸⁾ H. RAISTRICK, J. N. ASHLEY en B. C. HOBBS, Biochem. J. **31**, 385 (1937).

men echter vermeld in een verhandeling van F. KÖGL in het „Handbuch der Pflanzenanalyse” van G. KLEIN.

Het was mijn bedoeling om deze onderzoekingen over schimmelkleurstoffen verder uit te breiden door de bestudeering van de kleurstof, welke gevormd wordt door de schimmel *Phoma terrestris* HANSEN. Ik verkreeg deze schimmelsoort uit de collectie van het Nederlandsch Bureau voor Schimmelcultures te Baarn; ik betuig ook vanaf deze plaats Prof. J. WESTERDIJK daarvoor mijn hartelijken dank.

Phoma terrestris HANSEN is verantwoordelijk voor een ziekte, welke kan optreden bij uien; de schimmel behoort tot de klasse der *Fungi imperfecti*, afdeling *Hyalosporae*, familie *Sphaerioideae* en de orde *Sphaeropsidae*. H. N. HANSEN geeft in een verhandeling: „Etiology of the Pinkroot-disease of Onions”²⁹⁾ de volgende beschrijving van *Phoma terrestris* HANSEN:

„Pycnidia subglobose, ostiolate, papillate, dark brown to black, carbonaceous, 170—350 μ , may occur singly, frequently gregarious. Conidia continous, hyaline, oblong-ovoid 4,5-5,5x1,8-2,3 μ , biguttulate, vessile in pycnidium, escaping as a gelatinous mass through ruptures, rarely as a gelatinous cirrus through the ostiole. Mycelium septate, hyaline, guttulate, 1,0-4,5 μ , frequently anastomosing”.

Voor de mededeeling van bovenstaande gegevens ben ik Jhr. Dr. F. M. VAN BEYMA THOE KINGMA zeer erkentelijk.

De volgende hoofdstukken bevatten de resultaten, welke ik verkregen heb bij mijne onderzoekingen over de kleurstof van *Phoma terrestris* HANSEN.

²⁹⁾ H. N. HANSEN, *Phytopathology* 19, 691 (1929).

THEORETISCH GEDEELTE.

HOOFDSTUK I.

HET KWEEKEN VAN PHOMA TERRESTRIS HANSEN EN DE ISOLEERING VAN PHOMAZARINE.

Voor het kweken van de schimmel leek het voordeelig, een synthetische voedingsoplossing te gebruiken, d.w.z. een voedingsoplossing, welke behalve een goed gedefiniëerde organische stof als koolstofbron, slechts anorganische zouten bevat. Het spreekt vanzelf, dat onder deze omstandigheden voor de isoleering van de kleurstof minder complicaties te verwachten waren dan bij de toepassing van media als pepton, gelatine of agar-agar.

Zooals in de inleiding vermeld is, hebben H. RAISTRICK en medewerkers bij hun onderzoekingen den voedingsbodem van CZAPEK-DOX ³⁰⁾, ³¹⁾, ³²⁾ gebruikt. Deze is vooral gekarakteriseerd door de toepassing van een bepaald mengsel van anorganische zouten, terwijl als koolstofbron behalve d-glucose ook dikwijls andere suikers of zetmeel dienst doen. Ook voor mijn doel heb ik met succes van den genoemden voedingsbodem gebruik kunnen maken.

Natuurlijk was het van groot belang, die proefomstandigheden te zoeken, waarbij een groei met maximale kleurstof-

³⁰⁾ F. CZAPEK, Beitr. Chem. Physiol. Path., Vol. 3, 47 (1904).

³¹⁾ A. W. DOX, U. S. Dept. of Agric., Bull. No. 120, 37 (1914).

³²⁾ A. W. DOX en NEIDIG, J. Biol. Chem. 18, 167; 19, 235 (1914).

productie optrad. In het algemeen bleek de kleurstofproductie met den groei evenredig te zijn. De voorproeven toonden, dat de schimmel zich in zuur milieu slecht ontwikkelde; een alkalisch milieu was gunstiger, optimale groei en kleurstofproductie vond ik echter bij $p_H = 6,8$. Daar na het steriliseeren van de voedingsoplossing de waarde van de p_H ca. 5,0 bedroeg, werd een kleine hoeveelheid van een steriele vijf proc. natriumcarbonaatoplossing toegevoegd, totdat de vereischte p_H bereikt was.

Voor het kweeken op groote schaal werden vijf dagen oude cultures van *Phoma terrestris* HANSEN op CZAPEK-DOX glucose-agar *) met steriel water geschud en de ontstane schimmelsuspensie over de kolven met voedingsoplossing verdeeld. Terwijl nadere details in het experimenteel gedeelte beschreven worden, zij hier kort vermeld, dat de schimmel gedurende dertig dagen bij een temperatuur van 22° C. gekweekt werd. Over de geheele oppervlakte van de cultuurvloeistof was dan een vrij dik, viltachtig, wit, aan den onderkant donkerpaars gekleurd mycelium gevormd.

Voor de isoleering van de kleurstof werd ter verwijdering van begeleidende stoffen het gedroogde mycelium achtereenvolgens met aether en aceton geëxtraheerd. Bij de voorproeven was de behandeling met deze oplosmiddelen achterwege gebleven en in dit geval kon alle kleurstof met pyridine geëxtraheerd worden. Daarbij resulteerde een diep paarse oplossing, waaruit de kleurstof zich bij indampen als violette kristallen afscheidde. Na de bovengenoemde voorbehandeling bleek echter de kleurstof slechts in geringe mate door pyridine geëxtraheerd te worden. In de veronderstelling, dat de kleur-

*) De schimmel groeit uitstekend op CZAPEK-DOX glucose-agar, terwijl een glucose oplossing zonder agar als koolstofbron onvoldoende is.

stof in de schimmel als alkalizout aanwezig is, werd het gezuiverde mycelium gedurende twee uur behandeld met koud verdund zwavelzuur. Hierna werd het uitgewasschen, het gedroogde materiaal met pyridine in vacuo geëxtraheerd en daarbij inderdaad een donker paarsroode oplossing verkregen. Bij indampen kristalliseerden uit deze oplossing oranjegele naaldjes. Het oranjegele kristallisaat loste op in pyridine met een paarsroode kleur en was uit dit oplosmiddel ook gemakkelijk om te kristalliseeren. Daar de kleurstof in zeer verdunde loog (niet in meer geconcentreerde loog) met paarse kleur oplost, is te veronderstellen, dat zij hierin en in de pyridine-oplossing als zout aanwezig is. Uit de verdieping van de kleur was meteen te concludeeren, dat bij de zoutvorming één of meerdere phenolische hydroxylgroepen betrokken waren. Gezien het feit, dat uit de pyridine-oplossing de oranjegele kleurstof zelf uitkristalliseert, moet men tevens veronderstellen, dat in deze oplossing slechts een gedeelte als zout aanwezig is.

De in de voorproeven verkregen paarse kristallen moesten dus een alkalizout zijn, dat uit het niet-gezuiverde mycelium door pyridine geëxtraheerd kon worden. Inderdaad gaf een pyridine-oplossing van de paarse kristallen bij aanzuren een oranjekleurig, vlokkig neerslag, dat na affiltreeren uit pyridine kristalliseerde in den vorm van oranjegele naalden, die identiek bleken te zijn met de kleurstof uit de hoofdopwerking. Wanneer de paarse stof op een platinablikje verascht werd, bleef er een wit residu, waarin ik zoowel kalium als natrium kon aantoonen.

Het ruwe kristallisaat uit de hoofdopwerking bleek onder ontleding bij 196° te smelten *). Na drie maal omkristalliseeren

*) Alle smeltpunten in dit proefschrift zijn ongecorrigeerd.

uit alcohol was het smeltpunt gestegen tot 197° en bleef dit bij verder omkristalliseeren constant. Het microscopisch beeld van de kleurstof vertoont oranjegele naalden, welke soms tot bundeltjes en rozetten vereenigd zijn.

Uit de elementairanalyse bleek de aanwezigheid van stikstof. Daar het stikstofgehalte slechts ongeveer 3,5% bedroeg, dacht ik eerst aan een verontreiniging, welke afkomstig zou kunnen zijn van de als oplosmiddel gebruikte pyridine. Teneinde dit na te gaan werd de kleurstof opgelost in 0,01 n KOH. De diepviolette oplossing werd aangezuurd met verdund zwavelzuur, waarbij er oranje vlokken neersloegen, welke na affiltreeren en drogen uit alcohol kristalliseerden in den vorm van naalden. Deze hadden hetzelfde smeltpunt en mengsmeltpunt als de oorspronkelijke kristallen; wij hadden hier dus niet met een pyridinezout te doen.

Er bleef echter nog altijd de verdenking, dat de als oplosmiddel gebruikte pyridine bij de langdurige extractie met de oorspronkelijke kleurstof op de één of andere wijze gereageerd kon hebben. Teneinde dit uit te maken, isoleerde ik de kleurstof zonder gebruik te maken van een stikstofhoudend oplosmiddel. Dit gaat echter met zeer veel bezwaren gepaard. Weliswaar is de kleurstof uit het gereinigde mycelium ook met alcohol te extraheeren; deze oplossing bevat echter veel meer verontreinigingen dan het pyridineextract. Bovendien slaan uit de alcoholische oplossing bij het afkoelen naast de kleurstof vele begeleidende stoffen neer, terwijl deze in pyridine in oplossing blijven. Het gelukte mij dan ook niet, de kleurstof zonder gebruik van pyridine geheel te zuiveren. De kristalvorm en de kleur van het verkregen praeparaat geleken echter volkomen op het kristallisaat uit pyridine. Ook het smeltpunt (196°) en het mengsmeltpunt ($196,5^{\circ}$) wezen op de identiteit van beide producten. Inderdaad bleek ook het door alcohol-

extractie verkregen product stikstof te bevatten en wel 3,6%, zoodat hiermede vaststond, dat de stikstof een integreerend bestanddeel van het molecule is.

De oranjegele kristallen gelijken uiterlijk op die van chinizarine en ook de roodpaarse oplossing in loog toont eenige gelijkenis met die van chinizarine *). Ik zou daarom voor de kleurstof van *Phoma terrestris* HANSEN den naam *phomazarine* willen voorstellen; deze naam heeft ook nog het aardige, dat de lettergroep „az” in dit geval het stikstofgehalte kan aanduiden.

Er moge hier nog gewezen worden op het eigenaardige gedrag van phomazarine ten opzichte van alkaliën. Phomazarine lost op in 0,01 n KOH, maar niet in 0,1 n KOH. Bij onderzoek bleek, dat een phomazarine-oplossing in 0,01 n KOH bij doorvallend licht een sterk TYNDALL effect vertoont, m.a.w., het kaliumzout bevindt zich kolloïdaal in oplossing. De vlokkingsgrens van dit sol blijkt nu erg laag gelegen te zijn. Bij toevoeging van een meer geconcentreerde kaliumhydroxyde-oplossing vlokt dadelijk het kaliumzout uit in paarse vlokken. Met meerwaardige electrolyten gaat de uitvlokking veel sneller en wel zijn hiervan sporen al voldoende. Het is dan ook noodig, om bij het bereiden van een alkalische phomazarine-oplossing gebruik te maken van absoluut zuiver kaliumhydroxyde.

*) Een alkalische chinizarine oplossing is echter iets meer purper getint.

HOOFDSTUK II.

DE STRUCTUUR VAN PHOMAZARINE.

De elementair-analyses van het gekristalliseerde phomazarine leidden tot de formule $C_{19}H_{17}O_8N$. Het bleek, dat de kleurstof een alkoxygroep bevatte. Met behulp van de methode van W. KÜSTER en W. MAAG³³⁾ werd deze alkoxygroep geïdentificeerd als een methoxygroep. Deze methoxygroep kon zich niet in een carbomethoxygroep bevinden, omdat bij behandeling met loog, gevolgd door aanzuren weer phomazarine terug verkregen werd. Hierbij was dus de methylgroep niet afgesplitst.

Tot nu toe was het mij niet mogelijk, van phomazarine een moleculairgewichtsbepaling volgens RAST te verrichten; derivaten waren meestal onoplosbaar in de voor een RAST-bepaling geschikte oplosmiddelen, of ontleedden reeds voor het bereiken van het smeltpunt. Het eenige derivaat, hetwelk voor deze bepaling in aanmerking kwam, was het later te bespreken trimethoxy-decarboxy-phomazarine $C_{21}H_{23}O_6N$. Deze stof heeft een berekend moleculairgewicht van 385, terwijl 390 resp. 391 gevonden werd.

Als eerste derivaat van phomazarine bereidde ik een methylester. Deze ontstond bij koken van de kleurstof met absolute methylalcohol, waaraan 1,5 proc. zoutzuur was toegevoegd. Deze ester is een oranje, in naalden kristalliserende stof, welke de bruto-formule $C_{20}H_{19}O_8N$ heeft. De stof bleek

³³⁾ W. KÜSTER en W. MAAG, Z. physiol. Chem. **127**, 190 (1923).

twee methoxylgroepen te bevatten, zoodat wij hier met een mono-methylester van phomazarine te doen hebben. In tegenstelling met de methoxylgroep, welke reeds in phomazarine aanwezig is, kan de nieuw ingevoerde methylgroep met behulp van verdunde loog afgesplitst worden. Later heb ik nog een meer direct bewijs kunnen leveren voor de aanwezigheid van een carboxylgroep; zooals nog beschreven wordt, is het namelijk mogelijk, phomazarine te decarboxyleeren.

De directe acetyleering van phomazarine bleek bezwaren op te leveren. Er ontstonden bij acetyleering met azijnzuuranhydride en pyridine of met azijnzuuranhydride en een spoortje gec. zwavelzuur altijd gele vlokkige producten, welke snel donkerder kleurden en slechts moeilijk gekristalliseerd te verkrijgen waren.

Door de acetyleering van phomazarine-methylester met behulp van azijnzuuranhydride en gec. zwavelzuur, werd een product bereid, dat zonder moeite kristalliseerde.

Een micro-acetylbeplating volgens F. KÖGL en J. J. POSTOWSKY³⁴⁾ toonde de aanwezigheid van drie acetylgroepen. Ook de elementair-analyse kwam overeen met de samenstelling $C_{20}H_{16}O_5N(O.CO.CH_3)_3$.

De aanwezigheid van keton- of aldehydgroepen in phomazarine was op geenerlei wijze aan te toonen.

In totaal waren thans zes van de acht in de formule aanwezige zuurstofatomen gekarakteriseerd. De veronderstelling ligt voor de hand, dat de overige twee zuurstofatomen aan een chinon-systeem toebehooren en ik heb dan ook getracht, dit door de bereiding van een leuko-verbinding en van een „hydrochinon-diacetaat” aan te toonen. De verwachting, dat de reductie van phomazarine met behulp van natrium-

³⁴⁾ F. KÖGL en J. J. POSTOWSKY, Ann. 440, 34 (1924).

hydrosulfiet in alkalische oplossing tot een kleurloze verbinding zou leiden, ging niet in vervulling. Bij deze reactie veranderde de kleur van de oplossing niet, terwijl bij de reductie met pyridine-zink-ijszijn volgens R. KUHN en A. WINTERSTEIN³⁵⁾ de oorspronkelijke paarsroode kleur (via violet) violetblauw wordt, met een sterke, paarse fluorescentie.

Reductie van phomazarine met stannochloride in ijszijn geeft een verkleuring van de oorspronkelijk oranjerode oplossing over bronsgroen en groen naar diepblauw. Bij laten staan aan de lucht komt langzamerhand de oranje kleur terug; voegt men nu een nieuwe hoeveelheid stannochloride toe, dan wordt de oplossing weer blauw gekleurd en dit verschijnsel laat zich ad libitum herhalen.

Wordt phomazarine in alcoholische of in azijnzure oplossing gehydriseerd met behulp van platina-oxyde volgens R. ADAMS en R. L. SHRINER³⁶⁾, dan neemt het één molecule waterstof op en er ontstaat een donkergekleurd neerslag. Dit neerslag kleurt aan de lucht in korten tijd weer oranje en is dan volgens smeltpunt en mengsmeltpunt identiek met de uitgangsstof. Bij hydreeering van phomazarine in alkalische oplossing wordt eveneens één molecule waterstof opgenomen. De kleur verandert niet, maar bij aanzuren ontstaat weer een donkergekleurd neerslag, dat aan de lucht spoedig oranje kleurt, en dan weer identiek is met phomazarine.

Nu werden pogingen ingesteld, van phomazarine een leuko-di-acetylverbinding te bereiden. Door de z.g. „reducerende acetylering” met behulp van zinkstof, azijnzuuranhydride en natriumacetaat ontstond geen kleurloze verbinding, maar

³⁵⁾ R. KUHN en A. WINTERSTEIN, B. **65**, 1737, 1742 (1932); **66**, 1741 (1933).

³⁶⁾ R. ADAMS en R. L. SHRINER, J. Am. Chem. Soc. **45**, 2171 (1923).

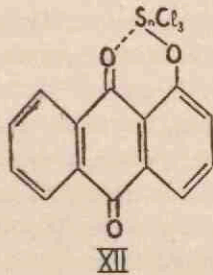
slechts een bruine amorfe stof, welke op geen manier tot kristalliseeren was te brengen. Ik trachtte vervolgens een acetylverbinding van den gehydeerden vorm van phomazarine in handen te krijgen, door het neerslag, dat gevormd werd bij hydreeren van phomazarine in alcoholische oplossing onder uitsluiting van lucht te acetyleeren met azijnzuuranhydride en gec. zwavelzuur. De stof loste bij deze bewerking niet op; indien echter tevens lucht aanwezig was, ontstond het gewone tri-acetyl derivaat van phomazarine. Overigens is het feit, dat een chinon niet in een leuko-diacetylverbinding omgezet kan worden, ook in andere gevallen geconstateerd, b.v. bij xylindine¹⁶⁾.

Hoewel al het bovenstaande wijst op het bestaan van een dihydro-verbinding, welke zich zeer gemakkelijk weer tot de uitgangsstof laat terugoxydeeren, hebben wij daarmee nog geen strikt bewijs voor een chinoïd systeem. Voor zijn aanwezigheid konden echter ook nog andere argumenten worden gevonden. Bij een oxydatie van phomazarine met chroomtrioxyde werd namelijk de vorming van een roodbruin gekleurde lak opgemerkt; deze gaf bij verassing chromioxyde en bleek dus een chroomlak te zijn. Het ontstaan van lakken is in het algemeen een typische eigenschap van orthoxy-chinonen en ik had de hoop, door een nauwkeurige studie van deze verbindingen werkelijk een bewijs te kunnen leveren voor de chinoïde structuur. Over dergelijke lakken vinden we in de litteratuur belangrijke onderzoekingen van P. PFEIFFER³⁷⁾ en van O. DIMROTH³⁸⁾. PFEIFFER vond, dat in het algemeen die oxyketonen en oxychinonen, welke de

³⁷⁾ P. PFEIFFER, B. 44, 2563 (1911); Ann. 398, 137 (1913).

³⁸⁾ O. DIMROTH, B. 54, 3020 (1921); Ann. 446, 97 (1925); 456, 177 (1927).

hydroxylgroep op een α -plaats ten opzichte van de carbonylgroep bevatten, inwendige complexe verbindingen geven met verschillende metaalzouten, zooals b.v. stannichloride. De eigenlijke tinlakken zijn dan hiervan afgeleid door vervanging van de resteerende chlooratomen door hydroxylgroepen. De complexe stannichloride verbinding van ortho-oxy-anthra-chinon zou volgens PFEIFFER de volgende constitutie hebben (XII):

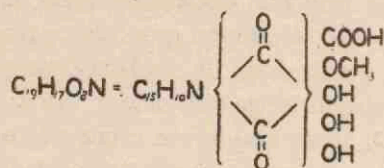


Het tinatoom is dus zoowel zoutachtig gebonden aan de hydroxylgroep, als koördinatief aan de restvalentie van één der chinonzuurstofatomen.

DIMROTH heeft bij zijn onderzoekingen vooral gebruik gemaakt van het z.g. aceto-boorzuuranhydride. Deze verbinding geeft met α -oxyketonen en ortho-oxy-chinonen complexverbindingen, welke een veel donkerder kleur hebben dan het chinon zelf. Meta-oxy-chinonen geven deze reactie niet, maar bij verwarmen wordt hier de hydroxylgroep geacetyleerd. Als typisch voorbeeld moge het gedrag van alizarine vermeld worden; dit geeft in de koude een mono-aceto-boorzure ester en bij verwarming de overeenkomstige acetylverbinding. Uit de laatste ontstaat bij verzeeping met water 1-oxy-2-acetoxy-

anthrachinon, terwijl de mono-aceto-boorzure ester bij deze behandeling alizarine terugvormt. Inderdaad geeft nu phomazarine met stannichloride in absolute benzol een onoplosbare paarse complexe verbinding, welke met water een oranjerode tinlak levert. Ook met aceto-boorzuuranhydride ontstaat een donkerpaarse oplossing.

Op zichzelf lijkt het uit de genoemde feiten wel zeer plausibel, dat phomazarine een ortho-oxy-chinon is, doch wij moeten niet uit het oog verliezen, dat ook oxyketonen soortgelijke reacties kunnen geven. Ik kon echter aantoonen, dat er twee verschillende aceto-boorzure esters bestaan, een mono- en een di-ester. Wanneer ik bij een oplossing van phomazarine in azijnzuuranhydride een hoeveelheid aceto-boorzuuranhydride voegde, overeenkomend met één mol, ontstond er een dieproode kleur, zeer veel donkerder dan de kleur van de oorspronkelijke oplossing. Zoodra ik echter twee molen aceto-boorzuuranhydride gebruikte, werd de kleur van het reactiemengsel dieppaars. Na verwarming van deze oplossing werd zij met water ontleed, waarbij phomazarine kon worden teruggewonnen. Daaruit is te concluderen, dat in de meta-positie geen hydroxylgroepen aanwezig zijn en wij dus hoogstwaarschijnlijk te maken hebben met een di-ortho-oxy-chinon. Phomazarine is dan op de volgende wijze schematisch te formuleeren (XIII):



XIII

De volgende taak was nu, de functie van het stikstofatoom in phomazarine op te helderen. Allereerst doet zich de vraag voor, of één der acetylgroepen van triacetyl-phomazarine-methylester zich aan de stikstof zou kunnen bevinden en phomazarine dus een primair of secundair amine was. Het bleek echter, dat de triacetyl-verbinding uit een aetherische oplossing met matig geconcentreerd zoutzuur uit te schudden is en dus een duidelijk basisch karakter heeft. Wij mogen hieruit de conclusie trekken, dat de drie acetylgroepen inderdaad in drie hydroxylgroepen zijn ingevoerd en dat de stikstof tertiair of eventueel quaternair gebonden is*). Hetzelfde resultaat kon ik, onafhankelijk van deze proeven, verkrijgen door het bestudeeren van de inwerking van salpeterig-zuur op phomazarine. Bij een bepaling volgens VAN SLYKE kon geen primaire aminogroep worden aangetoond en ook pogingen tot diazotering faalden; er werd altijd het onveranderde uitgangsmateriaal teruggevonden. Uit het uitblijven van een nitrosaminevorming volgt dus meteen, dat wij bij phomazarine ook niet met een secundair amine te doen kunnen hebben.

Wanneer wij de aanwezigheid van een quaternaire ammoniumverbinding voorloopig als minder waarschijnlijk buiten beschouwing laten, blijft de vraag, of het tertiaire stikstofatoom van phomazarine alkylgroepen draagt of lid van een heterocyclisch systeem is. De eerste mogelijkheid moest worden uitgesloten, omdat een alkylimid-bepaling van phomazarine een negatief resultaat opleverde.

*) In dit verband moet nog vermeld worden, dat de triacetyl-phomazarine-methylester uit de zoutzure oplossing na verloop van eenigen tijd weer met aether is uit te schudden. We hebben dit aldus te verklaren, dat hierbij de methylester in de zoutzure oplossing verzept wordt.

Indien phomazarine inderdaad een tertiair amine is, zou men dit ook nog rechtstreeks moeten kunnen bewijzen door het met behulp van methyljodide in een quaternair ammoniumzout om te zetten. Het was mij echter niet mogelijk, om met de tot nu toe beschreven phomazarine-derivaten met methyljodide een goed gekristalliseerd additieproduct te verkrijgen.

Voor de karakteriseering van de functioneele groepen en vooral ook voor de latere afbraak leek het zeer gewenscht, phomazarine in een volledig gemethyleerde verbinding om te zetten. Helaas was het nòch met behulp van diazomethaan, nòch door middel van dimethylsulfaat, mogelijk een dergelijk product te bereiden. Bij behandeling met diazomethaan ontstond een niet-kristalliseerende bruine olie met veel te lage methoxylwaarden; dimethylsulfaat gaf niet het gewenschte resultaat, omdat de kleurstof in de benodigde loog het onoplosbare alkalizout vormt, dat niet verder reageert.

Phomazarine smelt onder sterk opschuimen bij 197° , en een onderzoek van het daarbij gevormde gas leerde, dat kooldioxyde afgesplitst was. Ik heb toen getracht, van deze reactie ook in praeparatief opzicht gebruik te maken. Wanneer phomazarine bij sterk verminderde druk boven het smeltpunt verhit wordt, sublimeert een product in donkerroode blaadjes, welke een smeltpunt van $253\text{--}254^{\circ}$ hebben. De elementair-analyse stemt overeen met de samenstelling $C_{18}H_{17}O_6N$; er blijkt dus inderdaad, dat de carboxylgroep verwijderd is.

Door de bereiding van een triacetyl-verbinding van de samenstelling $C_{24}H_{23}O_9N$ werd bewezen, dat bij de thermische ontleding geen verandering aan de hydroxylgroepen optrad. De spontane wijze, waarop het phomazarine kooldioxyde afsplitst, zou er op kunnen wijzen, dat wij hier misschien te

doen hebben met een β -ketozuur. De plaats van de carboxyl-groep in het molecule zou hiermede dan vastgelegd zijn, n.l. in β -positie ten opzichte van één der chinon-carbonyl-groepen.

Het decarboxyleeringsproduct, dat wij in het vervolg decarboxy-phomazarine willen noemen, bleek zeer geschikt te zijn voor een methyleering met zilveroxyde en methyljodide volgens de methode van TH. PURDIE³⁹⁾. Er ontstonden hierbij twee producten, een dimethoxy-decarboxy-phomazarine en een trimethoxy-decarboxy-phomazarine, resp. met de formule $C_{18}H_{15}O_4N(OCH_3)_2$ en $C_{18}H_{14}O_3N(OCH_3)_3$.

Nadat dus op de hiervoor beschreven wijze de functie van de zuurstofatomen en van het stikstofatoom in het molecule was opgehelderd, moest ik trachten door middel van één of andere geschikte afbraakreactie nadere gegevens te verkrijgen voor de constitutie van phomazarine.

Een der reacties, welke het snelste tot het doel zou kunnen leiden, n.l. de destillatie met zinkstof, die in de hand van F. KÖGL en medewerkers reeds zeer vaak nuttige diensten heeft bewezen, had bij phomazarine niet het gewenschte resultaat. Hoe ik de reactie-omstandigheden ook wijzigde, steeds ontstonden slechts zeer kleine hoeveelheden van niet-kristalliseerende, geel gekleurde, olieachtige producten.

Bij pogingen om tot een hydrolytische of een oxydatieve splitsing van het molecule te komen, viel allereerst op, dat phomazarine eenerzijds een groote resistentie heeft tegen een hydrolytische afbraak in alkalisch milieu, anderzijds een geringe weerstand tegen oxydatieve invloeden. Het bleek bijvoorbeeld mogelijk de kleurstof gedurende drie uren te behandelen met zeer geconcentreerde alcoholische loog; hierna werd nagenoeg alle phomazarine onveranderd teruggevonden.

³⁹⁾ TH. PURDIE, J. Chem. Soc. 75, 157, 485 (1899); 79, 957 (1901).

Aan den anderen kant reageert een alkalische phomazarine-oplossing reeds in de koude snel met kaliumpermanganaat en verbruikt daarbij zoo veel van dit reagens, dat men niet kan hopen, belangrijke afbraakproducten te kunnen isoleeren.

Teneinde dus een inzicht te verkrijgen in den bouw van het phomazarine, was het noodzakelijk, een oxydatieve afbraak te vinden, waarbij een meer gematigde reactie optreedt.

Zooals al eerder is opgemerkt, ontstond bij oxydatie van phomazarine in azijnzure oplossing met chroomtrioxyde een onoplosbare, chroomhoudende verbinding, welke niet verder geoxydeerd werd.

Een oxydatie met waterstofperoxyde in alkalische oplossing bleek niet mogelijk te zijn, omdat het waterstofperoxyde een uitvlokkende werking had op de alkalizouten van de kleurstof. De ontstane vlokjes ontleedden dan het waterstofperoxyde katalytisch, waarbij echter de oxydatie geen voortgang vond.

Zelfs van een betrekkelijk zwak oxydatiemiddel als loodtetra-acetaat, worden bij oxydatie in ijsazijn acht moleculen door phomazarine verbruikt. Uit het reactiemengsel laat zich dan in zeer kleine hoeveelheden een bruine, olieachtige zuurfractie isoleeren. Het is mij niet gelukt, hieruit een kristallijn afbraakproduct te verkrijgen, echter bevat de olie nog kleine hoeveelheden van het onomgezette uitgangproduct. Wel had de bruine olie een sterke reuk naar vluchtige vetzuren.

Beter resultaat had ik bij een oxydatie met waterstofperoxyde in zwavelzure oplossing. Phomazarine werd opgelost in 50 proc. zwavelzuur en daarna met verdund waterstofperoxyde behandeld bij 50° gedurende 20 uren. De aanvankelijke roodoranje kleur van de oplossing heeft dan plaats gemaakt voor lichtgeel. Ook hier is het niet gelukt, uit de zuurfractie van het reactiemengsel een kristallijn

afbraakproduct te isoleeren. In dit geval was het echter mogelijk, de vluchtige vetzuren te identificeren. Deze werden met waterdamp gedestilleerd en omgezet in de overeenkomstige natriumzouten. Het zoutmengsel werd nu behandeld met ω -broom-p-phenyl-acetophenon volgens de methode van N. DRAKE en J. BRONITZKY⁴⁰⁾. Uit het aldus verkregen mengsel van p-phenyl-phenacylesters kon ik allereerst een fractie isoleeren, welke bij 97° smolt en volgens analyse, smeltpunt en mengsmeltpunt identiek bleek te zijn met de ester van n-boterzuur. Uit de moederloogen verkreeg ik nog een tweede ester, welke een veel lager smeltpunt had, n.l. 63,5°, en deze was volgens analyse, smeltpunt en mengsmeltpunt identiek met de n-valeriaanzure ester.

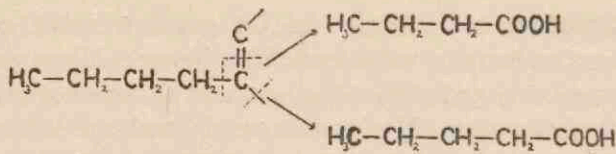
Om het ontstaan van zoowel boterzuur als valeriaanzuur te verklaren, moest ik aannemen, dat beide uit dezelfde zijketen afkomstig zijn; immers voor twee verzadigde zijketens is in het molecule van phomazarine geen plaats, zij zouden samen achttien waterstofatomen voor zich opeischen.

Voor de vorming van boterzuur naast valeriaanzuur zijn twee verklaringen mogelijk. Allereerst kan het boterzuur secundair uit het valeriaanzuur zijn gevormd. J. DAKIN⁴¹⁾ geeft aan, dat onder bepaalde omstandigheden uit valeriaanzuur door waterstofperoxyde boterzuur ontstaan kan.

Het is echter ook mogelijk, dat de oxydatie het molecule op twee punten aangrijpt, eenerzijds wordt dus het eerste koolstofatoom van de aanwezige butylzijketen tot carboxylgroep geoxydeerd, anderzijds kan ook het ring-koolstofatoom, dat de zijketen draagt, oxydatief uit den ring worden afgesplitst en tot carboxylgroep geoxydeerd worden volgens het schema:

⁴⁰⁾ N. DRAKE en J. BRONITZKY, J. Am. Chem. Soc. 52, 3718 (1928); 54, 2059 (1930).

⁴¹⁾ J. DAKIN, J. Biol. Chem. 4, 227 (1908).



Deze tweede verklaring is waarschijnlijk de juiste, omdat boterzuur in grootere hoeveelheid gevonden wordt dan valeriaanzuur.

Uit de oxydatie van phomazarine met waterstofperoxyde in zwavelzure oplossing kon ik ook nog een ander product isoleeren. Wanneer namelijk, na verwijderen van de zuurfractie, het reactiemengsel alkalisch werd gemaakt, kon ik met aether een stof extraheeren, welke in kleurlooze naaldjes kristalliseert. Deze stof werd echter slechts in zeer kleine hoeveelheden gevormd (ca. 25 mg ongezuiverd product uit 850 mg phomazarine). De verwachting, dat dit product een base zou zijn, werd niet beantwoord, het reageerde volkomen neutraal. Dat deze stof dan niet direct in de neutrale fractie van het reactiemengsel gevonden wordt, valt alleen te verklaren, wanneer wij aannemen, dat de stof pas in het alkalisch milieu (b.v. door hydrolyse) gevormd wordt. Bij het zuiveren van deze stof, dat met groote moeilijkheden gepaard ging, traden sterke verliezen op. De resterende hoeveelheid was helaas niet voldoende om een volledige elementair-analyse te verrichten. Het bleek echter, dat deze stof geen stikstof bevatte; ook de oorspronkelijke methoxylgroep van phomazarine was in dit afbraakproduct niet aanwezig.

Dit kleurlooze afbraakproduct geeft een positieve aldehyde-reactie met fuchsine-zwaveligzuur en ontkleurt langzaam FEHLING's oplossing. Om deze verbinding te identificeren zouden groote hoeveelheden phomazarine opgeofferd moeten worden.

Het blijkt dus uit deze oxydaties, dat het zeer moeilijk is, een oxydatieve afbraak van phomazarine zoo te leiden, dat er afbraakproducten ontstaan, welke ons een inzicht kunnen geven in den bouw van het ringsysteem.

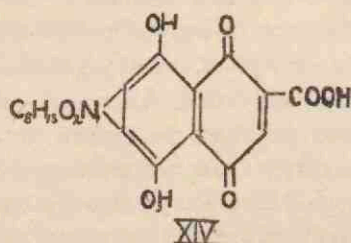
Ook oxydaties van derivaten van phomazarine hadden niet het gewenschte resultaat. Zoo kon ik uit een oxydatie van dimethoxy-decarboxy-phomazarine met chroomtrioxyde slechts oxaalzuur isoleeren naast de vluchtige vetzuren. Bovendien wordt altijd weer een groot gedeelte van het uitgangproduct onomgezet teruggevonden (in de basenfractie). Trimethoxy-decarboxy-phomazarine wordt bijna in het geheel niet aangegrepen. Het gedeelte van phomazarine en phomazarine-derivaten, dat aangegrepen wordt door oxydatie, wordt dus blijkbaar bijna volkomen verbrand.

Aan het feit, dat een n-butylzijketen in het molecule van phomazarine aanwezig is, kunnen wij thans eenige theoretische beschouwingen verbinden. Allereerst volgt uit de formule $C_{19}H_{17}O_8N$ dat wij hier te maken hebben met een onverzadigde verbinding. Daar wij reeds gezien hebben, dat bij hydreeering van phomazarine slechts één molecule waterstof opgenomen wordt, blijkt dat, afgezien van de chinoïde groepeerings, er geen alifatische dubbele bindingen in het molecule aanwezig zijn. Wij hebben hier dus te doen met een verbinding, welke thuis hoort in de aromatische (heterocyclische) reeks. Om theoretisch iets te weten te komen omtrent den aard van de stamkern van phomazarine, kan men zich elke substituent vervangen denken door een waterstofatoom. Tevens denken wij ons de chinoïde kern door hydreeering omgezet in een aromatische. Er ontstaat dan een verbinding $C_{13}H_9N$.

Het zal zonder meer duidelijk zijn, dat hier sprake is van een vrij sterk gecondenseerd aromatisch (heterocyclisch)

systeem. Tenslotte kunnen wij ons het tertiaire stikstofatoom vervangen denken door een methingroep. Uit de rest $C_{13}H_9N$ ontstaat dan een verbinding $C_{14}H_{10}$ en dit komt overeen met den graad van de condensatie van een anthraceen- of phenanthreensysteem.

Uit het feit, dat men bij phomazarine te maken heeft met een β -ketozuur en de daaruit getrokken conclusie, dat de carboxylgroep zich dan aan den chinoïden ring moet bevinden, kan men besluiten, dat de chinonring slechts aan één zijde gecondenseerd kan zijn met een anderen ring. Daar wij bovendien reeds gezien hebben, dat een di-„ortho”-oxy-chinongroepering vaststaat, kunnen wij de volgende voorloopige formuleering (XIV) opschrijven *):



Door de studie van de gemethyleerde decarboxy-phomazarine-derivaten kon nog een nader inzicht in het molecule worden verkregen.

Het was mij onmogelijk om de tot nu toe beschreven acetyl-derivaten van het phomazarine, met behulp van methyljodide om te zetten in een quaternair ammoniumzout. Na af-

*) Hierbij laat ik in het midden of de plaats naast de carboxylgroep al dan niet door een hydroxylgroep of een andere substituent bezet is.

loop der reactie vond ik steeds de uitgangsstoffen onveranderd terug. Niet-geacetyeerde derivaten van phomazarine reageerden wel met methyljodide, maar gaven reactieproducten, welke niet kristallijn te verkrijgen waren. Deze stoffen bevatten bovendien geen jodium, hetgeen toch bij de vorming van een quaternair ammoniumzout verwacht moest worden. Al deze amorfe producten bleken slecht oplosbaar te zijn in aether, maar vertoonden een vrij goede oplosbaarheid in water.

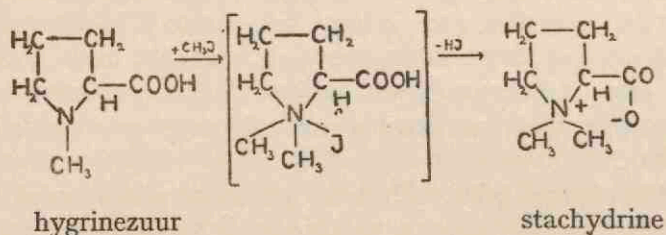
Het eenige gekristalliseerde quaternaire ammoniumzout, hetwelk ik heb kunnen verkrijgen, is afgeleid van het trimethoxy-decarboxy-phomazarine. Het kristalliseerde uit chloroform-aether in lange, oranjerode naalden, welke bij 193° smolten. Bij de elementair-analyse bleek het product de formule $C_{21}H_{23}O_6N$ te bezitten en dus geen jodium te bevatten. Daar de gele uitgangsstof dezelfde bruto-formule bezit, maar bij 160° smelt, hebben wij klaarblijkelijk met een isomeer te doen. Het isomere product bevat slechts drie methoxylgroepen, in tegenstelling met trimethoxy-decarboxy-phomazarine, waarin vier van deze groepen aanwezig zijn *).

Hierbij dient nog opgemerkt te worden, dat hetzelfde oranjerode product ook gevormd wordt, wanneer men dimethoxy-decarboxy-phomazarine en methyl-jodide met elkaar laat reageeren.

Om deze verschijnselen te verklaren, heb ik gedacht aan de reactie van hydrinezuur met methyljodide, welke als voorbeeld zou kunnen dienen voor de isomerisatie van deze phomazarine-derivaten. Bij de methyleering van hydrinezuur wordt stachydrine gevormd en wel zoodanig, dat het hydrine-

*) Een van deze methoxylgroepen is oorspronkelijk al in phomazarine voorhanden.

zuur eerst een molecule methyljodide addeert onder zoutvorming; dit quaternaire ammoniumzout splitst dan joodwaterstof af, waarbij een betaïne gevormd wordt:



In het geval van het dimethoxy-decarboxy-phomazarine zou dus ook secundair joodwaterstof afgesplitst kunnen zijn en zou dus het met trimethoxy-decarboxy-phomazarine isomere product de structuur van een betaïne bezitten.

In verband hiermede dient opgemerkt te worden, dat één der phenolische hydroxylgroepen van phomazarine een bijzondere plaats in het molecule inneemt. Bij het methyleeren van decarboxy-phomazarine volgens PURDIE worden namelijk twee methoxylgroepen snel ingevoerd, terwijl de derde hydroxylgroep veel langzamer reageert. Ook andere onderzoekingen wijzen op deze eigenaardigheid, n.l. bepalingen van het aantal actieve waterstofatomen volgens L. TSCHUGAEFF en TH. ZEREWITINOFF. De heer Drs. G. C. v. WESSEM was zoo vriendelijk, deze bepaling bij twee phomazarinderivaten volgens de nieuwe micromethode van A. SOLTYS⁴²⁾ te verrichten, waarvoor ik hem ook op deze plaats mijn harte-lijken dank betuig.

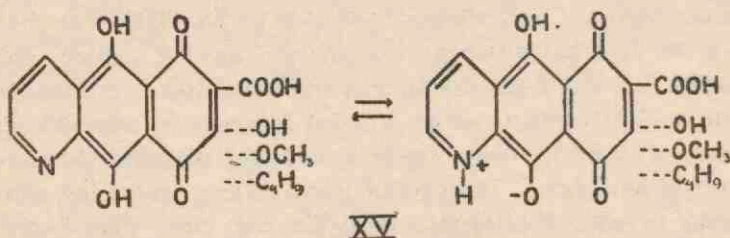
Bij phomazarine zou men vier actieve waterstofatomen

⁴²⁾ A. SOLTYS, Mikrochem. 20, 107 (1936).

verwachten, n.l. één afkomstig van de carboxylgroep en drie van de hydroxylgroepen. De analyse bewijst echter, dat slechts drie van deze vier actieve waterstofatomen reageeren. Om te onderzoeken, welke groepen hiervoor in aanmerking kwamen, werd de bepaling herhaald met dimethoxy-decarboxy-phomazarine. Hier bleek geen actieve waterstof aanwezig te zijn. Niettegenstaande dit feit moet dimethoxy-decarboxy-phomazarine toch nog een hydroxylgroep bevatten, aangezien de stof methoxyl- en acetyl-derivaten kan vormen.

Het was van belang te weten, of de oxygroep, welke dit afwijkend karakter heeft, identiek is met een der hydroxylgroepen in de „ortho”positie van de chinokern. Om dit te onderzoeken, behandelde ik dimethoxy-decarboxy-phomazarine met aceto-boorzuuranhydride. Inderdaad bewees de daarbij optredende dieproode kleur, dat één der „ortho”-oxygroepen niet gemethyleerd is. Deze groep onderscheidt zich dus van de andere hydroxylgroepen; klaarblijkelijk wordt dit door den invloed van het stikstofatoom veroorzaakt en het lag voor de hand, een samenhang tusschen de verschillende opvallende reacties, zooals isomeriseering van trimethoxy-decarboxy-phomazarine, gedrag van dimethoxy-decarboxy-phomazarine t.o.v. aceto-boorzuuranhydride en de afwijkende ZEREWITINOFF-bepaling, te zoeken. Zij zouden misschien te verklaren zijn door phomazarine te formuleeren als een phenol-betaïne (XV), waarbij dus de „bijzondere” hydroxylgroep met het tertiaire stikstofatoom onder zoutvorming gereageerd heeft.

Het lijkt mij wenschelijk, de experimentele gegevens ook in een structuurformule tot uiting te brengen; er moet hierbij echter uitdrukkelijk op gewezen worden, dat de formule XV in menig opzicht zuiver hypothetisch is en alleen als type van een mogelijke structuur beschouwd moet worden.



Dat phomazarine niet uitsluitend in den betaïnevorm voorkomt, blijkt o.a. uit de vorming van een triacetyl-derivaat. Er bestaat dus een evenwicht tusschen beide vormen.

In dit verband moge gewezen worden op de recente onderzoekingen over enolbetaïnen, welke uitgevoerd zijn door F. KRÖHNKE en medewerkers⁴³⁾, volgens welke toevoeging van alkali het evenwicht verschuift naar de zijde van het enol-betaïne, terwijl in zuur milieu het optreden van de niet-polaire verbinding begunstigd is.

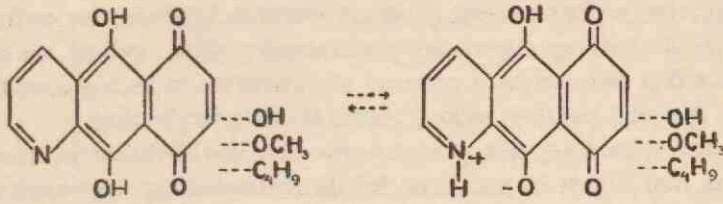
Terwijl oorspronkelijk verondersteld werd, dat de isomerisatie van trimethoxy-decarboxy-phomazarine over een intermediair additieproduct met methyljodide verloopt, lijkt het om deze redenen meer waarschijnlijk, dat de methyleering van decarboxy-phomazarine door het volgende schema aangegeven wordt *): (XVI)

De evenwichten in dit schema zullen door een alkalische reactie van het milieu steeds naar rechts verschoven worden. Dit geeft dus de verklaring voor het feit, dat bij de methyleering

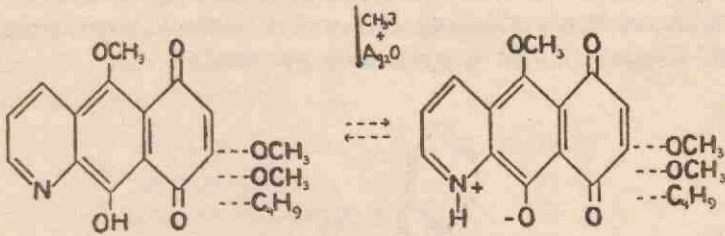
⁴³⁾ F. KRÖHNKE e.m. B. **68**, 1177 (1935); **69**, 2006 (1936).

B. **70**, 538, 543, 1114, 1720, 1728 (1937).

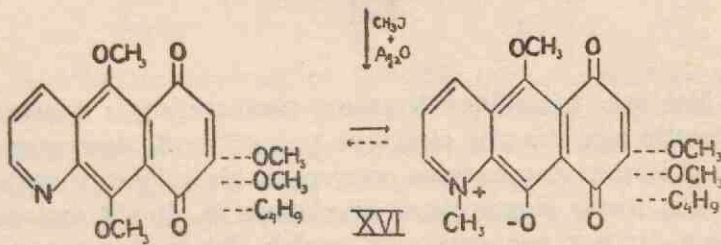
*) De met \rightleftharpoons aangeduide evenwichten moeten om de boven gemelde redenen verondersteld worden, terwijl het bij \longrightarrow om een experimenteel gerealiseerde omzetting gaat.



decarboxy-phomazarine



dimethoxy-decarboxy-phomazarine



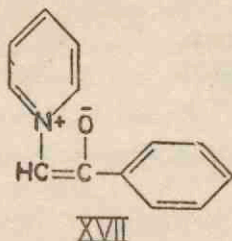
trimethoxy-decarboxy-phomazarine

tertiair amine (*geel*)betaïne (*oranjerood*)

van decarboxy-phomazarine met behulp van methyljodide en zilveroxyde slechts weinig van het gele trimethoxy-

decarboxy-phomazarine gevormd wordt en bij de methyleering van dimethoxy-decarboxy-phomazarine bijna geheel niets. Aan den anderen kant reageert phomazarine in zure oplossing in zijn niet-polairen vorm, zooals bij de acetyleering.

De opvatting, dat phomazarine een enol-betaïne is, stelt ons niet alleen in staat, de bij de methyleering opgemerkte verschijnselen te begrijpen, zij geeft ons ook een verklaring wat betreft de kleur van bepaalde phomazarine-derivaten. Volgens F. KRÖHNKE zijn de enol-betaïnen gekleurde verbindingen. Een verbinding als b.v. het phenacyl-pyridinium-enol-betaïne (XVII) is geeloranje gekleurd:



Het gele trimethoxy-decarboxy-phomazarine is overeenkomstig zijn chinoïde structuur geel gekleurd, daarentegen is de isomere betaïnevorm oranje-rood, klaarblijkelijk omdat er een nieuw chromofoor bijgekomen is. In dit verband moet dan ook nog opgemerkt worden, dat de kleur van den „leuko”-vorm van phomazarine misschien eveneens te verklaren zou zijn uit de polaire structuur van een phenol-betaïne.

Over de plaats van de buiten de structuur-formule geschreven hydroxyl-, methoxyl- en n-butylgroep valt tot nu toe niets met zekerheid te zeggen.

HOOFDSTUK III.

EXPERIMENTEEL GEDEELTE.

HET KWEEKEN VAN PHOMA TERRESTRIS HANSEN.

Om de beschikking te hebben over een voldoende hoeveelheid phomazarine, was het noodzakelijk om op groote schaal cultures van *Phoma terrestris* HANSEN aan te leggen. De voedingsbodem bestond uit:

amylum solubile	3000 g
natriumnitrat	120 g
primair kaliumphosfaat	60 g
kaliumchloride	30 g
magnesiumsulfaat (7 aq.)	30 g
ferrosulfaat (7 aq.)	0,6 g
water	60 l

In 350 Erlenmeyerkolven van 750 cm³ werden telkens 180 cm³ van deze voedingsoplossing gebracht. De kolven werden met een wattenprop gesloten en op drie achtereenvolgende dagen gedurende dertig minuten op 100° verhit. Na de sterilisatie voegde ik aan elke kolf 5 cm³ van een steriele 5 proc. natriumcarbonaatoplossing toe, de p_H bedroeg hierna 6,8—7,0. Natuurlijk werd bij alle bewerkingen de in de microbiologie gebruikelijke methodiek toegepast.

Als entmateriaal gebruikte ik vijf dagen oude cultures van *Phoma terrestris* HANSEN op CZAPEK-DOX agar (30 cm³ 2 proc. agar in kolfjes van 100 cm³ inhoud), welke gekweekt waren bij 22°. Deze werden geschud met 20 cm³ steriel

water en de ontstane schimmelsuspensie verdeeld over de kolven met voedingsoplossing. Daarna kweekte ik de schimmel gedurende dertig dagen bij 22°. Na dezen tijd was dan in iedere kolf een dik, viltachtig mycelium gevormd. De schimmelmasse werd nu in een doek uitgeperst en vervolgens in water gebracht, dat ik in den loop van vier en twintig uur twee maal ververschte. Het mycelium bracht ik dan over op een Büchnertrechter en filtreerde zoo scherp mogelijk af. Teneinde ook het resteerende water te verwijderen, behandelde ik de massa gedurende vier en twintig uur met alcohol. Nadat weer door persen de grootste hoeveelheid alcohol verwijderd was, werd de bovenbeschreven bewerking nog eens herhaald, maar nu met aether als extractiemiddel. Tenslotte werd de thans brokkelige massa bij 40° in vacuo gedroogd en daarna het mycelium gepoederd. In totaal verkreeg ik op deze wijze 620 g van een donkerpaars poeder.

ISOLEERING VAN PHOMAZARINE.

Het gedroogde mycelium werd in Soxhlet-apparaten in porties van vijftig gram eerst met aether, daarna met aceton geëxtraheerd en wel zoolang als de oplosmiddelen begeleidende stoffen opnamen. Daarna werd de wederom gedroogde massa gedurende twee uur behandeld met ca. 10 proc. zwavelzuur. Vervolgens filtreerde ik de massa scherp af en waschte zoolang met water uit, totdat het waschwater geen reactie op zwavelzuur meer gaf. Het tusschen filtreerpapier gedroogde mycelium werd nu in een vacuum-Soxhlet-apparaat, welke geheel van glas vervaardigd was, met droge pyridine bij ca. 45° geëxtraheerd. De kleurstof loste snel op met een paarsroode kleur en na eenigen tijd kristalliseerden er oranje kristallen uit. Na affiltreren en drogen werden de kristallen omgekristalliseerd uit pyridine. Er ontstonden oranje ge-

kleurde, lange, fijne naalden, welke onder ontleding bij 196° smolten.

Om deze kristallen te zuiveren, werden zij eenige malen omgekristalliseerd uit alcohol of aceton, waarbij het smeltpunt tot 197° steeg. Een verdere zuivering trachtte ik nog te bereiken door de kleurstof op te lossen in 0,01 n KOH, gevolgd door aanzuren met verdund zwavelzuur. Het phomazarine slaat dan neer in den vorm van amorf, oranje vlokjes. Deze kristalliseerden uit alcohol; het smeltpunt was echter door deze behandeling niet verhoogd. In totaal verkreeg ik uit 60 l voedingsbodem 9,8 g phomazarine.

Voor de elementair-analyse werd de stof steeds bij 80° in hoogvacuum boven P_2O_5 gedroogd.

Analyses *):

I. Praeparaat omgekristalliseerd uit pyridine en daarna vier maal uit alcohol; smpt. 197° C.

SCHOELLER: 4,437 mg stof: 9,590 mg CO_2 en 1,730 mg H_2O

3,027 mg stof: 0,108 cm^3 N_2 bij 25° en 748 mm.

II. Praeparaat als analyse I, daarna opgelost in 0,01 n KOH, neergeslagen met verd. H_2SO_4 en omgekristalliseerd uit alcohol; smpt. 197° C.

SCHOELLER: 5,415 mg stof: 11,745 mg CO_2 en 2,170 mg H_2O .

3,758 mg stof: 0,129 cm^3 N_2 bij 25,5° en 767 mm.

3,482 mg stof: 2,150 mg AgJ.

III. Praeparaat als analyse I, daarna twee maal omgekristalliseerd uit aceton; smpt. 197° C.

HUBERS: 3,777 mg stof: 8,136 mg CO_2 en 1,490 mg H_2O .

3,717 mg stof: 0,130 cm^3 N_2 bij 22° en 744 mm.

3,119 mg stof: 5,10 cm^3 n/100 thiosulfaatopl.

*) De micro-analyses werden meestal in het laboratorium van Dr. Ing. A. SCHOELLER te Berlijn, Schmargendorf, of door den heer P. HUBERS in het Org. Chem. Lab. der Universiteit te Amsterdam uitgevoerd.

Berekend voor $C_{19}H_{17}O_8N$ (387):

C 58,91%; H 4,39%; N 3,62%; OCH_3 8,01%.

Gevonden:

- I. C 58,96 %; H 4,33 %; N 3,97 %;
- II. C 59,15 %; H 4,45 %; N 3,92 %; OCH_3 8,14 %.
- III. C 58,74 %; H 4,41 %; N 3,96 %; OCH_3 8,45 %.

Alle analysewaarden wijzen dus op de samenstelling $C_{19}H_{17}O_8N$, alleen de waarde voor de stikstof werd telkens ca. 0,3 % te hoog gevonden. Zooals later zal blijken, toonen ook de analyses van phomazarine-derivaten dezelfde afwijking.

Phomazarine bezit geen karakteristiek absorptiespectrum; een alcoholische oplossing van de kleurstof vertoont een breed band, welke zich in het zichtbare spectrum uitstrekt van het groen tot aan het violet.

MOLECULAIRGEWICHTSBEPALING VAN TRIMETHOXY- DECARBOXY-PHOMAZARINE.

- I. 0,344 mg stof in 3,824 mg kamfer: smeltpuntsdepressie $9,2^\circ$
- II. 0,276 mg stof in 2,861 mg kamfer: smeltpuntsdepressie $9,9^\circ$

Berekend voor $C_{21}H_{23}O_6N$ M.G. = 385

Gevonden I. M.G. = 391

II. M.G. = 390.

PHOMAZARINE-METHYLESTER.

25 mg phomazarine werden gedurende 4 uren met 10 cm^3 $1\frac{1}{2}$ proc. methylalcoholisch zoutzuur op een waterbad gekookt. Hierbij gaat de kleurstof in oplossing; na afkoelen ontstaat een kristallisaat, dat bestaat uit oranje naalden. Het smeltpunt van deze kristallen ligt bij $212\text{--}213^\circ$ onder ontleding, na twee maal omkristalliseeren uit alcohol bedraagt het 213° , en blijkt dan bij verder omkristalliseeren constant. De stof vormt oranje naalden met een bronsachtigen glans. Opbrengst 19 mg.

Voor de analyse werd gedroogd bij 65° in hoogvacuum boven P_2O_5 .

Analyse (SCHOELLER):

4,567 mg stof: 9,995 mg CO_2 en 1,990 mg H_2O .

3,093 mg stof: 0,102 cm^3 N_2 bij 24° en 748 mm.

3,290 mg stof: 3,920 mg AgJ.

Ber. voor $C_{20}H_{19}O_8N$ of $C_{18}H_{13}O_8N(OCH_3)_2$ (401):

C 59,85 %; H 4,74 %; N 3,49 %; OCH_3 15,46 %.

Gev.: C 59,69 %; H 4,85 %; N 3,67 %; OCH_3 15,71 %.

ACETYLEERING VAN PHOMAZARINE.

25 mg phomazarine werden opgelost in 10 cm^3 droge pyridine en vervolgens 1 cm^3 azijnzuuranhydride toegevoegd. Bijna oogenblikkelijk werd de aanvankelijk donkerroode kleur lichter, totdat na enkele minuten de kleur goudgeel was. Ik bracht de oplossing daarna op stukjes ijs, waaraan zoo veel verdund zwavelzuur was toegevoegd, dat juist alle pyridine gebonden werd. Er ontstond een geel, vlokkelig neerslag, waarvan de kleur echter spoedig in oranje overging.

Betere resultaten verkreeg ik door de volgende methode: 25 mg phomazarine worden met 2 cm^3 azijnzuuranhydride, waaraan een spoor gec. H_2SO_4 is toegevoegd, zoo lang zacht verwarmd (ca. 60—70°), totdat de roode kleur heeft plaats gemaakt voor geelbruin. Na afkoelen wordt het reactiemengsel met weinig water bedeed en het azijnzuuranhydride voorzichtig bij lage temperatuur ontleed. De gevormde gele vlokjes worden in dit geval iets minder snel oranje dan bij de eerste acetylering. Na affiltreren en drogen kon de stof uit butylalcohol omgekristalliseerd worden; hierbij ontstonden gele naalden, welke zich echter na eenigen tijd steeds weer zwak oranje kleurden, ook na meerdere malen omkristalliseeren. De stof smolt onscherp bij 180—185° onder sterke ontleding. Opbrengst 9 mg.

Voor de analyse werd gedroogd in hoogvacuum bij kamertemperatuur boven P_2O_5 .

Analyse (SCHOELLER):

4,730 mg stof: 10,093 mg CO_2 en 1,933 mg H_2O .

3,719 mg stof: 0,099 cm^3 N_2 bij 22° en 744 mm.

Berekend voor $C_{25}H_{23}O_{11}N$ of $C_{19}H_{14}O_6N$ $(OCOCH_3)_3$ (513):

C 58,48 %; H 4,48 %; N 2,73 %.

Gevonden: C 58,62 %; H 4,54 %; N 2,98 %.

Een acetylbepaling werd niet uitgevoerd, omdat deze stof zeker niet geheel zuiver was.

TRIACETYL-PHOMAZARINE-METHYLESTER.

30 mg phomazarine-methylester werden zacht verwarmd met 3 cm^3 azijnzuuranhydride, waaraan een spoor gec. H_2SO_4 was toegevoegd. Spoedig maakte de oorspronkelijk roode kleur van de oplossing plaats voor geel. Na afkoelen werd het azijnzuuranhydride zeer voorzichtig met water ontleed. Hierbij kristalliseerden gele naaldjes uit, welke vaak tot rozetten vereenigd waren. De stof sinterde bij ca. 160° en smolt onder ontleding bij $168-169^\circ$. Het onzuivere acetyleringsproduct werd omgekristalliseerd uit ligroïne en vormde dan gele, in rozetten gegroepeerde naalden, welke vanaf 160° langzaam donkerder werden en bij 170° smolten. Opbrengst 22 mg.

Voor de analyse werd de stof bij 50° in hoogvacuum boven P_2O_5 gedroogd.

Analyse (SCHOELLER):

3,863 mg stof: 8,415 mg CO_2 en 1,630 mg H_2O .

3,043 mg stof: 0,079 cm^3 N_2 bij 25° en 760 mm.

3,730 mg stof: 3,370 mg AgJ.

Berekend voor $C_{26}H_{25}O_{11}N$ of $C_{18}H_{10}O_3N$ $(O.CO.CH_3)_3(OCH_3)_2$ (527).

C 59,20 %; H 4,75 %; N 2,66 %; OCH_3 11,77 %.

Gevonden: C 59,40 %; H 4,71 %; N 2,93 %; OCH_3 11,91 %.

Acetylbepalingen volgens F. KÖGL en J. J. Postowsky ⁴⁴⁾.

10,28 mg stof: 2,75 cm³ 0,0212 n NaOH.

10,40 mg stof: 2,77 cm³ 0,0212 n NaOH.

Berekend voor C₁₈H₁₀O₃N(O.CO.CH₃)₃(OCH₃)₂:

COCH₃ 24,48 %.

Gevonden: I. COCH₃ 24,75 %.

II. COCH₃ 24,27 %.

REDUCEERENDE ACETYLEERING VAN PHOMAZARINE.

10 mg phomazarine werden bedeed met 0,5 cm³ azijnzuuranhydride, 25 mg electrolytzinkstof ⁴⁴⁾ en 25 mg natriumacetaat en zacht verwarmd. De aanvankelijk roode kleur werd eerst roodbruin en ging dan langzaam in bruin over. Na afkoelen werd het azijnzuuranhydride met water ontleed, waarbij bruine vlokjes neersloegen. Deze konden uit geen enkel oplosmiddel kristallijn verkregen worden.

HYDREERING VAN PHOMAZARINE IN ALCOHOLISCHE OPLOSSING.

25 mg phomazarine werden in 20 cm³ alcohol opgelost en met 15 mg platina-oxyd-katalysator volgens ADAMS-SHRINER gehydreerd in een toestel voor microhydreering. Bij deze reactie nam de kleurstof 1,61 cm³ waterstof op, terwijl ik berekende, dat voor een dubbele binding 1,46 cm³ opgenomen moesten worden. Bij de hydreering werd de oranjegele phomazarine-oplossing langzaam donkerder en er ontstond een paarsachtig donkerbruin gekleurd neerslag. Dit werd afgefiltreerd en aan de lucht gedroogd. Na ca. 10—12 uur was de kleur weer oranje geworden. De stof smolt na omkristalliseeren uit alcohol bij 197°. Het mengsmeltpunt

⁴⁴⁾ Voor de bereiding van de electrolytzinkstof zie men het voorschrift van F. HANSGIRG, geciteerd door W. B. DEYS, diss. Utrecht (1934).

met phomazarine vertoonde geen depressie, dus was de kleurstof uit het donkere neerslag geregenereerd.

HYDREERING VAN PHOMAZARINE IN ALKALISCHE OPLOSSING.

15 mg phomazarine werden opgelost in 10 cm³ 0,01 n KOH en vervolgens op de bekende wijze gehydreerd met 15 mg platina-oxyd-katalysator. De kleurstof nam 1,15 cm³ waterstof op, terwijl de berekende hoeveelheid voor een dubbele binding 1,04 cm³ bedroeg.

De paarse kleur van het kaliumzout bleef gedurende de hydreering onveranderd. Wanneer ik de gehydreerde oplossing echter voorzichtig aanzuurde, ontstond er een donkerbruin vlokkelig neerslag, dat bij drogen aan de lucht weer oranje kleurde. Na omkristalliseeren uit alcohol was ook hier het smeltpunt en het mengsmeltpunt met phomazarine 197°.

Zowel in neutraal als in alkalisch milieu neemt phomazarine bij hydreeren met platina-oxyd dus 1 mol waterstof op, onder vorming van een donkergekleurde dihydro-verbinding. Deze dihydro-verbinding oxydeert aan de lucht weer tot phomazarine.

ACETYLEERING VAN HET DIHYDRO-PHOMAZARINE.

25 mg phomazarine werden op de bekende wijze in alcoholische oplossing gehydreerd. Het gevormde neerslag van de dihydro-verbinding werd onder uitsluiting van lucht afgefiltreerd door een Jena glasfilter G III. Het neerslag werd daarna, steeds onder uitsluiting van lucht, behandeld met warm azijnzuuranhydride, waaraan een spoor gec. H₂SO₄ was toegevoegd. Bij deze behandeling werd het dihydro-phomazarine niet geacetyleerd, tenzij ik lucht liet toetreden. De dihydro-verbinding loste dan na voorafgaande oxydatie

met roode kleur op, terwijl spoedig een kleuromslag naar geel optrad. Uit het reactiemengsel was dan het reeds eerder beschreven triacetyl-phomazarine te isoleeren.

REDUCTIE MET ZINKSTOF EN IJSAZIJN IN PYRIDINE-OPLOSSING
VOLGENS R. KUHN³⁵⁾.

5 mg phomazarine werden opgelost in 10 cm³ droge pyridine, waaraan 0,5 proc. water was toegevoegd. In deze oplossing bracht ik 100 mg zinkstof, waarbij de vloeistof violet kleurde. Vervolgens werd 0,1 à 0,2 cm³ ijsazijn toegevoegd en hierna veranderde de kleur van violet in violetblauw, terwijl tevens een sterke, paarse fluorescentie optrad. Na toevoeging van meer ijsazijn werd de kleur van de oplossing iets lichter, bij schudden met lucht kwam echter de donkere kleur weer terug.

REDUCTIE MET STANNOCHLORIDE IN IJSAZIJNOPLOSSING.

5 mg phomazarine werden opgelost in 2 cm³ ijsazijn en dan werd 0,5 cm³ van een 5 proc. stannochloride-oplossing in ijsazijn, welke een spoortje zoutzuur bevatte, toegevoegd. De oorspronkelijk oranjerode oplossing veranderde binnen 30 minuten via bronsgroen, groen en groenblauw in diepblauw. Bij staan aan de lucht kwam langzamerhand de oranjerode kleur terug, wanneer al het aanwezige stannochloride geoxydeerd was. Toevoeging van een nieuwe hoeveelheid stannochloride gaf dan weer de zoo juist beschreven verschijnselen.

VORMING VAN EEN TINLAK MET STANNICHLORIDE.

5 mg phomazarine werden opgelost in 2 cm³ absolute benzol en hierbij voegde ik een kleine overmaat van een

oplossing van stannichloride in absolute benzol. Dadelijk ontstond een paars neerslag, dat bij behandelen met water een oranje gekleurde tinlak leverde. Na affiltreeren en drogen van deze verbinding werd zij op een platinablikje verascht. Er bleef een witte aschrest van stanni-oxyde achter.

REACTIE MET ACETO-BOORZUURANHYDRIDE.

5 mg phomazarine werden opgelost in 1 cm³ azijnzuuranhydride en vervolgens werden 5 mg aceto-boorzuuranhydride, dat in azijnzuuranhydride was opgelost, toegevoegd. De oplossing kleurde langzaam donkerpaars, sneller wanneer ik korten tijd op 50° verwarmde. Nu bereidde ik een 0,1 n aceto-boorzuuranhydride-oplossing. Deze werd gesteld met behulp van 0,1 n baryt (volgens de methode van O. DIMROTH ⁴⁵) met als indicatoren neutraalrood en phenolphtaleïne). Van phomazarine werd nu een oplossing in azijnzuuranhydride bereid, welke tien maal zoo sterk verdund was als de oplossing van aceto-boorzuuranhydride. Bij 10 cm³ van deze oplossing voegde ik nu 1 cm³ van de oplossing van aceto-boorzuuranhydride, waarbij de kleur donker w i j n r o o d werd. Bij een tweede hoeveelheid van 10 cm³ phomazarine-oplossing voegde ik 2 cm³ van de oplossing van aceto-boorzuuranhydride. Bij verwarmen op 50° werd de kleur d o n k e r p a a r s. Er zijn bij de reactie van phomazarine met aceto-boorzuuranhydride dus duidelijk twee stadia te onderscheiden.

Wordt een phomazarine-oplossing, welke een overmaat van aceto-boorzuuranhydride bevat, gekookt, dan verandert de paarse kleur niet. Bij toevoeging van water ontstaat een oranje neerslag, dat na omkristalliseeren identiek blijkt te zijn met phomazarine. Volgens O. DIMROTH is er dus geen

⁴⁵) O. DIMROTH, B. 54, 3020 (1921).

hydroxylgroep in meta-positie aanwezig, daar deze geacetyleerd zou moeten zijn gedurende de beschreven bewerkingen.

DECARBOXYLEERING VAN PHOMAZARINE.

a. Aantoonen van het afgesplitste CO₂.

1 mg phomazarine bracht ik in een smeltpuntsbuisje, dat voorzien was van een wijder bovengedeelte. Nu werd het buisje geëvacueerd tot een druk van 0,001 mm, en de capillair nabij het wijde gedeelte tot een haarcapillair uitgetrokken en dichtgesmolten. Vervolgens verwarmde ik het phomazarine tot even boven het smeltpunt, waarbij onder sterk opschuiemen ontleding plaats vond. De capillair werd nu omgekeerd in een buisje geplaatst, dat een weinig baryt bevatte, en vervolgens door stooten geopend. Het ontwijkende CO₂ gaf hierbij een neerslag van bariumcarbonaat.

b. Bereiding van decarboxy-phomazarine.

50 mg phomazarine werd in een sublimeeringsapparaat bij 0,001 mm druk op 220—230° verhit. Het gevormde decarboxyleeringsproduct sublimeerde als een donkerroode kristal massa. Op den bodem van de buis bleef een geringe hoeveelheid verkoolde stof achter (ong. 4 mg). De aan de koeler hechtende kristallen werden opgelost in warmen alcohol en kristalliseerden daaruit bij afkoeling in donkerroode blaadjes. Soms ook vormde de stof eenigszins lichter gekleurde, breede, lensvormige naalden. Beide vormen kwamen naast elkaar voor. Het smeltpunt van de geheel zuivere kristallen bedroeg 254°. De opbrengst was 35 mg. Voor de analyse werd de stof bij 80° in hoogvacuum boven P₂O₅ gedroogd.

Analyse (HUBERS):

4,363 mg stof: 10,056 mg CO₂ en 2,000 mg H₂O.

4,562 mg stof: 0,169 cm³ N₂ bij 23° en 759 mm.

5,170 mg stof: 9,37 cm³ n/100 thiosulfaatopl.

Berekend voor C₁₈H₁₇O₆N (343):

C 62,97 %; H 4,96 %; N 4,08 %; OCH₃ 9,04%.

Gevonden: C 62,86 %; H 5,13 %; N 4,27 %; OCH₃ 9,37 %.

ACETYLEERING VAN DECARBOXY-PHOMAZARINE.

20 mg decarboxy-phomazarine werden met 0,5 cm³ azijnzuuranhydride, waaraan een spoor gec. H₂SO₄ was toegevoegd, zacht verwarmd. Daarbij verkleurde de aanvankelijk roodbruine oplossing spoedig naar geelbruin en bij het ontleden van het azijnzuuranhydride met water ontstonden gele vlokjes. Deze kristalliseerden als gele naaldjes uit een mengsel van gelijke deelen azijnzuuranhydride en ijsazijn. Bij 210° begon de stof zich donkerder te kleuren en smolt bij ongeveer 250°. Door de toenemende verkleuring was het smeltpunt niet scherp waar te nemen.

Voor de analyse werd bij 50° in hoogvacuum boven KOH gedroogd.

Analyse (HUBERS):

3,254 mg stof: 7,330 mg CO₂ en 1,520 mg H₂O.

3,152 mg stof: 0,093 cm³ N₂ bij 23° en 764 mm.

3,761 mg stof: 4,90 cm³ n/100 thiosulfaatopl.

4,262 mg stof: 2,60 cm³ n/100 NaOH.

Ber. voor C₂₄H₂₃O₉N of C₁₇H₁₁O₂N(O.CO.CH₃)₃(OCH₃) (469):

C 61,41 %; H 4,90 %; N 3,00 %; OCH₃ 6,61 %; COCH₃ 27,51 %.

Gev.: C 61,43 %; H 5,23 %; N 3,42 %; OCH₃ 6,74 %; COCH₃ 26,23 %.

METHYLEERING VAN DECARBOXY-PHOMAZARINE VOLGENS PURDIE.

50 mg decarboxy-phomazarine werden opgelost in 5 cm³

droge chloroform en vervolgens werden 150 mg zilveroxyde ⁴⁶⁾ benevens 0,5 cm³ gedestilleerd methyljodide toegevoegd. Deze oplossing werd gedurende 5 uur gekookt, daarna gefiltreerd en in vacuo verdampt. Het residu loste ik weer op in 5 cm³ chloroform en voegde nogmaals 100 mg Ag₂O en 0,5 cm³ CH₃J toe. Na 3 uur koken werd de oplossing weer gefiltreerd en in vacuo verdampt; er bleef een donkerroodbruin residu achter. Ik behandelde dit met 5 cm³ kokende ligroïne. Een gedeelte van de stof ging met roodbruine kleur in oplossing en na afkoelen kristalliseerden hieruit gele naalden, welke nog verontreinigd waren met oranje, olieachtige producten. Nadat dit product eenige malen was omgekristalliseerd uit ligroïne, had het een zuiver gele kleur en smolt bij 159°. De laatste sporen verontreiniging konden slechts verwijderd worden door omkristalliseeren uit alcohol. Uit dit oplosmiddel — waarin de stof in onzuiveren toestand zeer sterk oplosbaar is, maar met toenemende zuiverheid steeds minder — kristalliseerden lichtgele, tot rozetten en schoven vereenigde naaldjes, welke bij 160° smolten. Opbrengst 8 mg. Voor de analyse werd de stof bij 50° in hoogvacuum boven P₂O₅ gedroogd.

Analyse (HUBERS):

3,282 mg stof: 7,880 mg CO₂ en 1,840 mg H₂O.

2,651 mg stof: 0,078 cm³ N₂ bij 24° en 768 mm.

3,352 mg stof: 10,39 cm³ n/50 thiosulfaatopl.

Ber. voor C₂₁H₂₃O₆N of C₁₈H₁₄O₃N(OCH₃)₃ (385):

C 65,45 %; H 6,00 %; N 3,63 %; OCH₃ 32,21 %.

Gev.: C 65,48 %; H 6,27 %; N 3,42 %; OCH₃ 32,06 %.

De stof is dus een trimethoxy-decarboxy-phomazarine.

De in ligroïne onoplosbare rest was oranje gekleurd. Deze werd drie maal uit weinig benzol omgekristalliseerd. De

⁴⁶⁾ Bereid volgens Ann. 450, 225 (1926).

zuivere stof vormde dan licht oranje gekleurde naaldjes, welke meestal in rozetten gegroepeerd waren. Het praeparaat begon bij 170° te verkleuren en smolt bij $184\text{--}185^{\circ}$ onder ontleding. Volgens de methoxyl-bepaling bevatte de stof drie OCH_3 -groepen; bij de methyleering waren dus twee methoxyl-groepen ingevoerd. De stof is een dimethoxy-decarboxy-phomazarine. Opbrengst 26 mg.

Voor de analyse werd de stof bij 50° in hoogvacuum boven P_2O_5 gedroogd.

Analyse (HUBERS):

3,070 mg stof: 7,310 mg CO_2 en 1,700 mg H_2O .

4,046 mg stof: 0,122 cm^3 N_2 bij 24° en 768 mm.

3,416 mg stof: 8,12 cm^3 n/50 thiosulfaatopl.

Ber. voor $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}$ of $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}(\text{OCH}_3)_2$:

C 64,69 %; H 5,67 %; N 3,77 %; OCH_3 25,06 %.

Gev.: C 64,74 %; H 5,85 %; N 3,50 %; OCH_3 24,58 %.

DESTILLATIE MET ZINKSTOF.

10 mg phomazarine werden goed vermengd met 200 mg electrolyt-zinkstof en dan in een buisje voor „micro-zinkstof-destillatie” gebracht, zooals dat door F. KÖGL en medewerkers ⁴⁷⁾ beschreven werd. In het begin verhitte ik met een kleine vlam, daarna iets sterker. Er destilleerde een nauwelijks waarneembare nevel over, welke in het koudere gedeelte van het buisje tot kleine oliedruppeltjes condenseerde. Deze werden in aether opgelost. Uit 100 mg phomazarine verkreeg ik op deze wijze slechts 3 mg van een lichtgeel gekleurde olie, welke niet tot kristalliseeren was te brengen. Een poging, om hieruit een pikraat te bereiden, mislukte. Bovendien was de zeer kleine opbrengst een beletsel om hiermede nog verdere onderzoekingen te verrichten.

⁴⁷⁾ F. KÖGL e.m., Ann. 445, 159 (1925); Ann. 447, 78 (1925); Ann. 479, 11 (1930); Ann. 482, 105 (1930); Ann. 515, 10 (1935).

Destillaties met zinkstof van derivaten van phomazarine, zooals decarboxy-phomazarine en het later te beschrijven desmethyl-phomazarine hadden geen beter resultaat.

OXYDATIE VAN PHOMAZARINE MET LOOD-TETRA-ACETAAT.

100 mg phomazarine werden opgelost in 25 cm³ ijszijn en deze oplossing op ca. 60—70° verwarmd. Hierin bracht ik langzaam vast lood-tetra-acetaat, waarbij de kleur eerst in bruin en daarna in geel veranderde. Dit stadium werd bereikt, wanneer ongeveer 900 mg lood-tetra-acetaat toegevoegd waren, hetgeen overeenkwam met ongeveer acht molen. Ik verdunde de oplossing dan met het vijfvoudige volume water en schudde daarna de vloeistof met aether uit. Bij verdampen van de aether bleef een bruine olie achter, welke enkele kristallen bevatte. De olie had een gewicht van 20 mg en was goed oplosbaar in water in tegenstelling met de kristallen. Er bleven ca. 2 mg bruine kristallen onopgelost, welke bij 196° smolten en vermoedelijk uit onomgezet phomazarine bestonden. De olie (16 mg), welke een sterken reuk had naar vluchtige vetzuren, werd in 80 proc. alcohol opgelost en een kleine hoeveelheid calcium-acetaat-oplossing toegevoegd. Daar er geen neerslag ontstond, waren volgens H. RAISTRICK e.m.⁴⁸⁾ dus behalve vluchtige vetzuren geen andere organische zuren aanwezig.

Het met aether uitgeschudde reactiemengsel werd met behulp van 10 proc. NaOH-oplossing zwak alkalisch gemaakt en weer met aether geëxtraheerd. Na drogen en verdampen van de aether bleef 0,6 mg van een kleurlooze olie, welke

⁴⁸⁾ H. RAISTRICK: Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. serie B. 220, 1 (1931).

sporen van kristallen bevatte, achter, wat natuurlijk niet voldoende was voor een meer diepgaand onderzoek.

VERWIJDERING VAN DE METHYLGROEP UIT PHOMAZARINE.

25 mg phomazarine werden gedurende 3 uur met 3 cm³ joodwaterstof-oplossing (d. 1,7) gekookt. Na afkoelen werd de vloeistof met het viervoudige volume water verdund. Hierbij ontstond een oranje, vlokkig neerslag, dat na affiltreeren en wasschen met water blauwgroen kleurde. Waarschijnlijk is bij het koken met joodwaterstof-oplossing de kleurstof gereduceerd en treedt aan de lucht reoxydatie op, waarbij de blauwgroene stof ontstaat. Het product weegt na drogen 21 mg; het heeft een geringe oplosbaarheid in de meeste organische oplosmiddelen. Bij verwarmen met alcohol verandert de groene kleur in bruin. Het groene desmethyl-product is eveneens met groene kleur oplosbaar in verdunde loog; bij aanzuren slaan weer groene vlokjes neer. De alkalische oplossing kleurt na eenigen tijd bruin.

OXYDATIE MET WATERSTOF-PEROXYDE IN ZWAVELZURE OPLOSSING.

250 mg phomazarine werden opgelost in 20 cm³ gec. H₂SO₄ en daarna voegde ik onder koelen voorzichtig 20 cm³ water toe en vervolgens 6 cm³ van een mengsel van gelijke deelen 30 proc. H₂O₂ en gec. H₂SO₄. Deze oplossing werd gedurende 20 uur op 50° verhit; de aanvankelijk oranjerode vloeistof was dan lichtgeel gekleurd. Het reactiemengsel verdunde ik met 250 cm³ water en verkreeg dan met aether een geel gekleurd extract. De aether bevatte 33 mg van een niet-kristalliseerende bruine olie, welke een sterken reuk naar vluchtige vetzuren had (fractie A).

De kleurlooze waterige fractie werd nu met NaOH alkalisch

gemaakt en weer met aether uitgeschud. De aether bevatte 8 mg van een kleurlooze stof, welke in witte naalden en dendrieten kristalliseerde, echter nog met een hoeveelheid lichtgele olie verontreinigd was (fractie B). Op deze wijze werden 850 mg phomazarine geoxydeerd, meestal in porties van 25 mg, omdat de opbrengst aan oxydatieproducten bij verwerking van grootere hoeveelheden slechter was. In totaal verkreeg ik 106 mg van fractie A en 25 mg van fractie B.

Het eerste product kon ik in twee fracties scheiden, 95 mg van een in natriumbicarbonaat oplosbare olie, welke een sterken reuk naar vluchtige vetzuren had en 7 mg van een neutraal product, dat in kleurlooze naalden kristalliseerde, maar dat niet identiek was met fractie B. Deze hoeveelheid was te klein om het product nader te onderzoeken. De zuur reageerende oliefractie werd onderworpen aan een destillatie met waterdamp. Het destillaat neutraliseerde ik met 0,1 n NaOH, hiervan verbruikten de zuren 9,8 cm³; na verdampen van het water bleven 114 mg natriumzouten achter. Deze werden opgelost in 1,5 cm³ water en daarbij 2,5 cm³ alcohol gevoegd, vervolgens bracht ik 250 mg ω -broom-p-phenylacetophenon in deze oplossing en verhitte het mengsel gedurende 1 uur op een waterbad. Na afkoelen kristalliseerden 95 mg van een kleurlooze stof, welke echter gele olieachtige verontreinigingen bevatte. Bij indampen van de moederloog tot de helft van het volume, kristalliseerde nog een tweede esterfractie, welke 120 mg woog. Door behandelen met dierlijke kool in aetherische oplossing werden beide producten van de olieachtige verontreiniging bevrijd. Het smeltpunt van de eerste fractie lag bij 75°, dat van de tweede fractie bij 48—50°. Beide hoeveelheden kristalliseerde ik verscheidene malen om uit verdunnen alcohol; zij smolten toen bij 97°, respectievelijk 63—63,5° en deze smeltpunten bleven bij ver-

der omkristalliseeren constant. Een mengsmeltpunt van het bij 97° smeltende product met de n-boterzure p-phenylphenacylester vertoonde geen depressie. Hetzelfde vond ik bij het mengsmeltpunt van de laag smeltende verbinding met de n-valeriaanzure p-phenylphenacylester. Ook de analyses gaven waarden, welke overeenkwamen met de samenstelling van de n-boterzure resp. n-valeriaanzure p-phenylphenacylester. Beide esters werden voor de analyse in hoogvacuum boven P_2O_5 gedroogd.

Analyse I (n-boterzure ester) (HUBERS):

4,350 mg: stof: 12,178 mg CO_2 en 2,380 mg H_2O .

Ber. voor $C_{18}H_{18}O_3$ (282): C 76,24 %; H 6,03 %.

Gev.: C 76,35 %; H 6,09 %.

Analyse II (n-valeriaanzure ester) (HUBERS):

3,722 mg stof: 10,163 mg CO_2 en 2,237 mg H_2O .

Ber. voor $C_{19}H_{20}O_3$ (296): C 77,03 %; H 6,76 %.

Gev.: C 76,92 %; H 6,68 %.

Fractie B werd als volgt gezuiverd: Met behulp van laag kokende petroleum-aether (kpt. 40—60°) werd de olieachtige verontreiniging grootendeels verwijderd, de rest loste ik op in weinig benzol en voegde het tienvoudige volume laag kokende petroleum-aether toe, waarbij enkele kleurlooze vlokjes neersloegen. Het filtraat werd in vacuo verdampt, waarbij er 12 mg van een witte kristallijne stof achterbleven, welke een smeltpunt van 220° had. Nu werd omgekristalliseerd uit alcohol; opbrengst 7 mg met een smpt. van 225°. Uit dit nog onzuivere product verkreeg ik tenslotte door de stof om te kristalliseeren uit aethylacetaat 4 mg witte naaldjes, welke bij 226° smolten. Deze hoeveelheid was helaas te gering om een volledige elementair-analyse mogelijk te maken. Zoowel een stikstof- als een methoxyl-bepaling hadden bij deze stof echter een negatief resultaat.

REACTIE VAN TRIMETHOXY-DECARBOXY-PHOMAZARINE MET
METHYLJODIDE.

40 mg trimethoxy-decarboxy-phomazarine werden opgelost in 2 cm³ gedestilleerd methyljodide en in een toegesmolten buis 10 uur op 100° verhit. De oorspronkelijk goudgele kleur was dan roodbruin geworden. Het methyljodide werd nu bij verminderden druk verdampt, en het achterblijvende roodbruine residu in weinig chloroform opgelost. Nu voegde ik zooveel absoluten aether toe, dat de oplossing juist troebel werd. Bij afkoelen op 0° kristalliseerden oranjerode naalden uit. Na nogmaals omkristalliseeren uit chloroform-aether bedroeg het smeltpunt 193°, en dit bleef bij herhalen van deze bewerking constant.

Voor de analyse werd bij 65° in hoogvacuum boven P₂O₅ gedroogd.

Analyse (HUBERS):

3,861 mg stof: 9,130 mg CO₂ en 2,090 mg H₂O.

3,873 mg stof: 0,118 cm³ N₂ bij 22° en 767 mm.

3,249 mg stof: 7,63 cm³ n/50 thiosulfaatopl.

Ber. voor C₂₁H₂₃O₆N of C₁₈H₁₄O₃N(OCH₃)₃ (385):

C 65,45 %; H 6,00 %; N 3,63 %; OCH₃ 24,16 %.

Gev.: C 65,49 % H 6,06 % N 3,56 % OCH₃ 24,29 %.

De in ligroïne oplosbare fractie van de methyleering van decarboxy-phomazarine volgens PURDIE bevat behalve het gele trimethoxy-decarboxy-phomazarine nog een stof, die na verdampen van de ligroïne bij verminderden druk als een roodbruine olie achterblijft. Ook uit deze olie kon ik het geïsoomeriseerde product verkrijgen. De isoleering werd vergemakkelijkt, doordat de stof de eigenschap heeft in warm water vrij goed oplosbaar te zijn, na afkoelen kristalliseeren dan lange, fijne naalden uit. Deze werden omgekristalliseerd

uit chloroform-aether op de boven beschreven wijze en hadden dan eveneens het smeltpunt 193° . Een mengsmeltpunt met het product uit trimethoxy-decarboxy-phomazarine gaf geen depressie.

Wanneer ik dimethoxy-decarboxy-phomazarine bij 100° behandelde met methyljodide, verkreeg ik uit het reactiemengsel ook weer het geïsommeriseerde product met het smeltpunt 193° .

Zowel uit het bij de methyleering volgens PURDIE reeds gevormde trimethoxy-decarboxy-phomazarine, als uit het dimethoxy-decarboxy-phomazarine kan dus het trimethoxy-decarboxy-phomazarine-enolbetaïne gevormd worden. Dit verklaart de slechte opbrengst aan trimethoxy-decarboxy-phomazarine, dat klaarblijkelijk op de genoemde wijze verder reageeren kan.

ZEREWITINOFF-BEPALINGEN.

A. *Phomazarine*: Hetzelfde praeparaat als bij analyse II van phomazarine.

Oplosmiddel: Anisol. Blancowaarde 20° : $0,17 \text{ cm}^3 \text{ CH}_4$ *)
 95° : $0,21 \text{ cm}^3 \text{ CH}_4$

Bepaling bij 20° : 5,718 mg stof: $1,09 \text{ cm}^3 \text{ CH}_4$
 blanco: $0,17 \text{ cm}^3 \text{ CH}_4$

5,718 mg stof: $0,92 \text{ cm}^3 \text{ CH}_4$

Gevonden: aantal actieve H atomen = 2,78.

Bepaling bij 95° : 5,718 mg stof: $1,23 \text{ cm}^3 \text{ CH}_4$
 blanco: $0,21 \text{ cm}^3 \text{ CH}_4$

5,718 mg stof: $1,02 \text{ cm}^3 \text{ CH}_4$

Gevonden: aantal actieve H atomen = 3,07.

*) Alle volumina zijn gereduceerd op 0° en 760 mm.

B. *Dimethoxy-decarboxy-phomazarine* (zelfde praeparaat als bij elementair analyse).

Bepaling bij 20°: 8,837 mg stof: 0,16 cm³ CH₄
 blanco: 0,17 cm³ CH₄

8,817 mg stof: —0,01 cm³ CH₄

Gevonden: geen actieve H atomen aanwezig.

Bepaling bij 95°: 8,837 mg stof: 0,23 cm³ CH₄
 blanco: 0,21 cm³ CH₄

8,837 mg stof: 0,02 cm³ CH₄

Gevonden: geen actieve H-atomen aanwezig.

STELLINGEN.

I

De onderzoekingen van VERKADE en medewerkers over de afbraak van de verzadigde vetzuren in het dierlijk organisme hebben het bestaan van een ω -oxydatie, als een proces van groote physiologische beteekenis, naast de β -oxydatie, zeer aannemelijk gemaakt.

- P. E. VERKADE, J. v. D. LEE en A. J. S. VAN ALPHEN,
Z. physiol. Chem. 250, 47 (1937).
B. FLASCHENTRÄGER en K. BERNHARD,
Z. physiol. Chem. 238, 221 (1935).

II

Op grond van de thans bekende feiten is het onmogelijk, met eenige zekerheid uitspraken te doen over de structuur der primaire ozoniden.

- R. PUMMERER en H. RICHTZENHAIN, A. 529, 33 (1937).
C. D. HARRIES, A. 374, 303 (1910).
H. STAUDINGER, B. 58, 1088 (1925).

III

Hoewel het onderzoek van LEVENE en CHRISTMAN naar de katalytische reductie van glucosamine te wenschen overlaat, is het toch zeker een waarschuwing tegen het te eenvoudig voorstellen van het verloop eener katalytische hydreeering.

- P. A. LEVENE en C. C. CHRISTMAN, J. Biol. Chem. 120, 575 (1937).

IV

De door DIELS uit cholesterylchloride door dehydroëeren met selenium verkregen koolwaterstof $C_{18}H_{16}$ moet als identiek met het door BERGMANN en HILLEMANN synthetisch verkregen γ -methyl-1,2-cyclopenteno-phenantreen worden beschouwd.

- E. BERGMANN en H. HILLEMANN, B. 66, 1302 (1933); 68, 102 (1935);
69, 2610 (1936);
A. DIELS en medewerkers, A. 459, 1 (1927); B. 67, 113 (1934);
B. 68, 267, 325 (1935).

V

Tegen de door CASPAR bij de isoleëring van type-specifieke koolhydraten uit gonococcen gebruikte methodiek, zijn ernstige bezwaren in te brengen.

- W. A. CASPER, J. Immunology, 32, 421 (1937).
A. M. PAPPENHEIMER Jr. en J. F. ENDERS,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 31, 37 (1933).
O. T. AVERY en W. F. GOEBEL, J. Exp. Med. 58, 731 (1933).
M. HEIDELBERGER en F. E. KENDALL,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 33, 188, 445 (1935).

VI

De conclusie, welke HIRSCHLER trekt uit beschouwingen over het verband tusschen de dampspanning en de absolute temperatuur van verzadigde zoutoplossingen, is onjuist.

- A. E. HIRSCHLER, J. Am. Chem. Soc. 58, 2472 (1936).
W. W. EWING, J. Am. Chem. Soc. 59, 1292 (1937).
W. A. WEST en A. C. W. MENZIES,
J. Am. Chem. Soc. 59, 1294 (1937).

VII

Indien in de potentiaalkrommen, welke HAMAKER gebruikt in zijn theorie van de kolloïde verschijnselen, een energie-minimum optreedt bij grooten afstand van de deeltjes, zal in het algemeen coacervatie optreden en niet, zooals HAMAKER aanneemt, gelvorming.

H. C. HAMAKER, Rec. Trav. Chim. Pays Bas **55**, 1015 (1936);
 " " " " **56**, 1, 727 (1937).

VIII

Het is noodzakelijk bij het onderzoek naar de immuniseerende waarde van een anatoxine, een bepaling in vivo te verrichten, naast die in vitro.

FISCHER, Z. Immunitätsf., **74**, 423 (1932).
 W. ABG. TIMMERMAN en A. C. BRANDWIJK,
 Leeuwenhoeck, **3**, 28 (1936);
 Brit. J. Exp. Path., **17**, 423 (1936).

U

19