

~~2.135/III~~
~~ox.~~

P.76/50/I

HELVETICA CHIMICA ACTA

EDENDA CURAT SOCIETAS CHIMICA HELVETICA



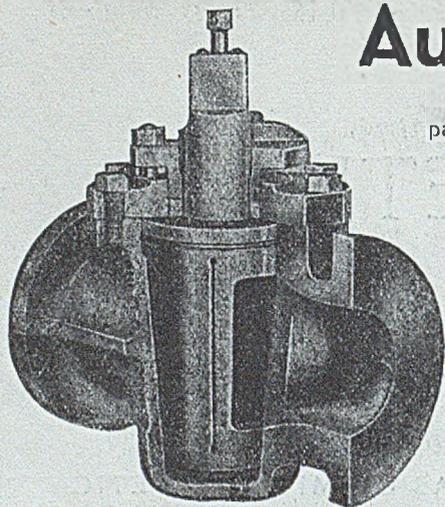
VOLUMEN XXXIII
FASCICULUS SECUNDUS

VERLAG - EDITIONS - EDIZIONI
HELVETICA CHIMICA ACTA, BASEL 7 (SCHWEIZ)

1950

Audco-Hahnen

für aggressive Flüssigkeiten
patentiert in allen Industrieländern



Unerreichte Vorzüge:

- Dauernde Dichtigkeit · Kein Festsitzen
- Keine Betriebsunterbrechung
- Leichte Handhabung
- Größte Sicherheit
- Lange Lebensdauer
- Größte Wirtschaftlichkeit

Verlangen Sie bitte Prospekt C
oder Vertreterbesuch

BALDUIN WEISSER AG. · BASEL

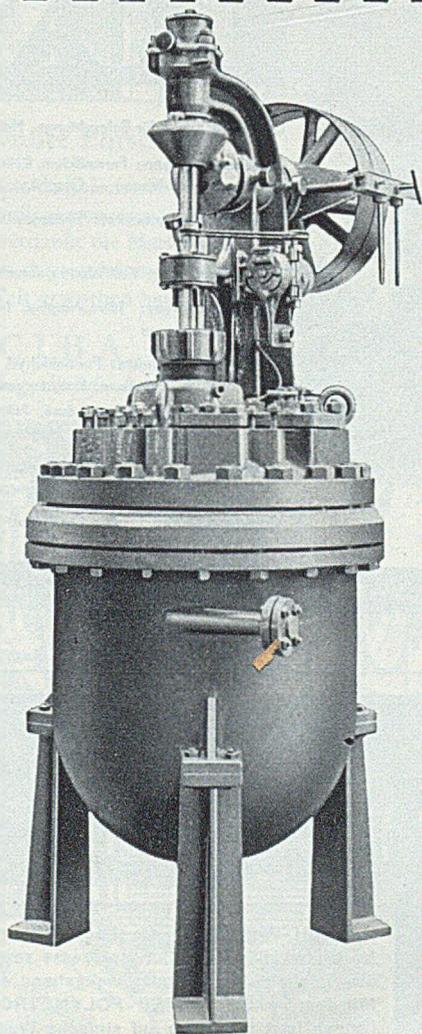
Telefon (061) 39990

Maschinenfabrik

Burckhardt

Akt. Ges. Basel

Kompressoren
Vakuumpumpen
Wasserringpumpen
Zentrifugen
Kondensatoren
Presspumpen
Autoklaven
Rührwerke
Vakuum-Trockenschränke
Filterpressen



Autoklaven

Wir bauen:

Rührkessel, Autoklaven,
Filterpressen, Trockenschränke
Trommeln,



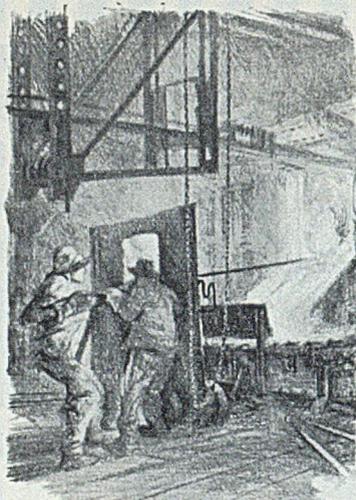
Spezialitäten:

Säurefest emallierte Apparate
Apparate aus hochlegiertem
Spezialguss

Eisenwerk Klus / Klus

Gesellschaft der Ludw. von Roll'schen Eisenwerke AG.

821



Karbidabstich im Werk Vieg (Wälzli)

LONZA

Calcium-Carbid für Beleuchtungs-, Heiz- und Schweisszwecke

Metalllegierungen: Ferrosilicium, Reinsilicium, Silico-Aluminium, Silico-Aluminium-Mangan — Graphit.

Künstliche Schleifmittel: Siliciumcarbid, Lonsicar (Siliciumcarbid) für Hartbeton

Stickstoff-Dünger: Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Ammonsulfat, Kalkstickstoff

Komplex-Dünger: Nitrophosphat, Nitrophosphatkali, Volldünger, Composto Lonza

Chemische Produkte: Formaldehyd, Acetaldehyd, Crotonaldehyd, Paraldehyd, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Natriumacetal, Dicyandiamid, Ammoniak, Salpetersäure, Nitriersäure, Natriumnitrit, Natriumnitrat, Harnstoff, Ammonnitrat, Nitrobenzol, Anilinöl, Acetanilid

Organische Lösungsmittel: Aceton, Aethylacetal, Methyl- und Butylalkohol und deren Acetate, Speziallösungsmittel

Cellulose-Acetat in allen Qualitäten

LONZA ELEKTRIZITÄTWERKE UND CHEMISCHE FABRIKEN · AKTIENGESELLSCHAFT · BASEL

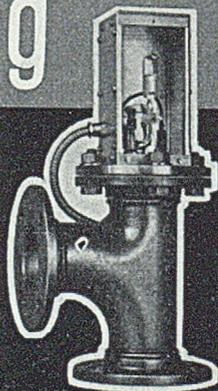
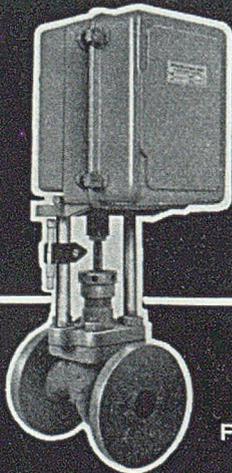
pH - Regulierung

Vom pH-Wert hängt die Raschheit und Ausbeute vieler Herstellungsprozesse sowie die Reinheit der Produkte weitgehend ab. Mit dem System SAUTER-POLYMETRON können jetzt pH-Werte auf einfache Weise vollautomatisch geregelt werden.

Unterbreiten Sie uns Ihre pH-Probleme; wir beraten Sie gern und ganz unverbindlich.

SAUTER

FR. SAUTER AG., FABRIK ELEKTR. APPARATE, BASEL

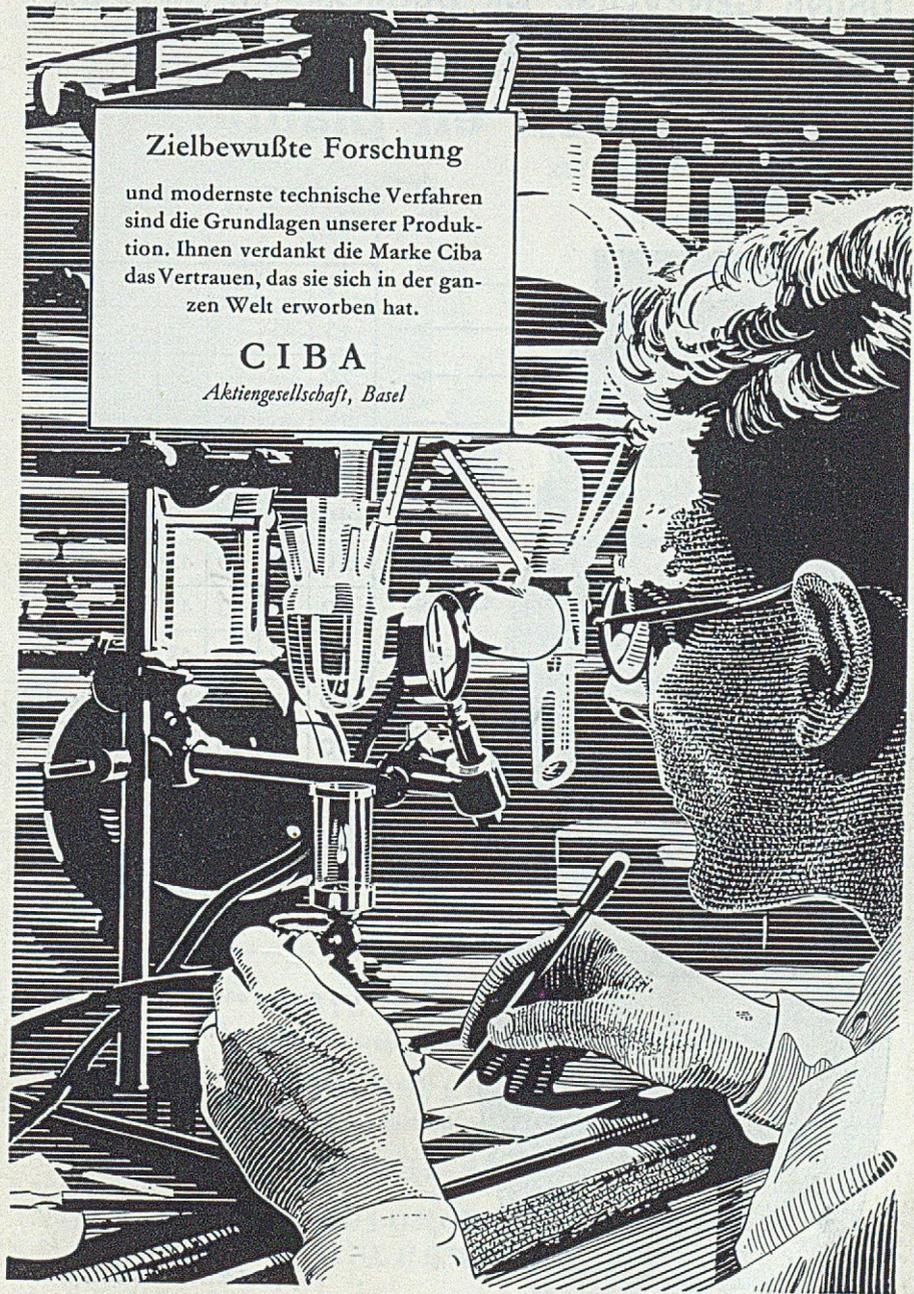


Zielbewußte Forschung

und modernste technische Verfahren
sind die Grundlagen unserer Produktion.
Ihnen verdankt die Marke Ciba
das Vertrauen, das sie sich in der ganzen
Welt erworben hat.

CIBA

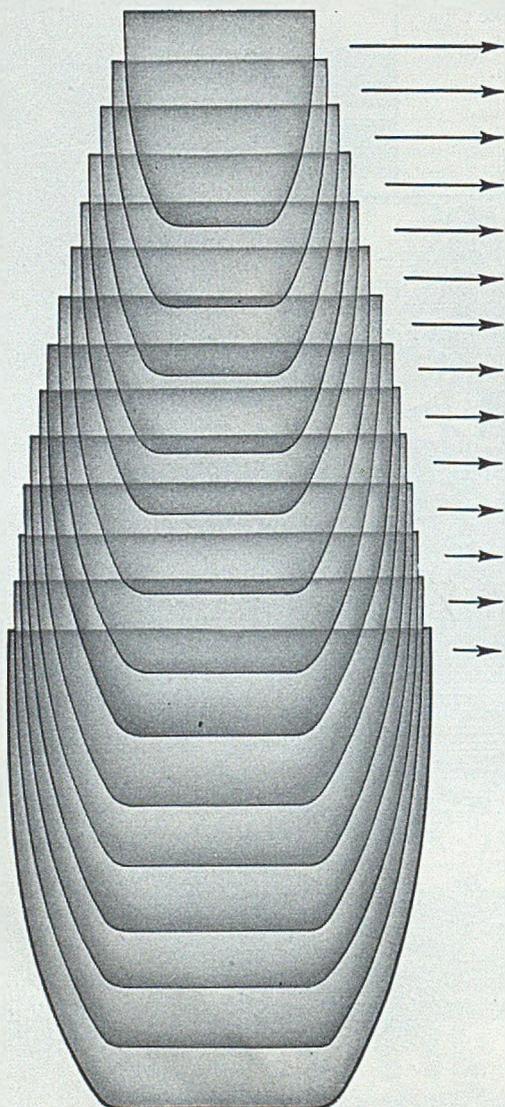
Aktiengesellschaft, Basel



USINE GENEVOISE DE DÉGROSSISSAGE D'OR
GENÈVE

† Creusets en platine †

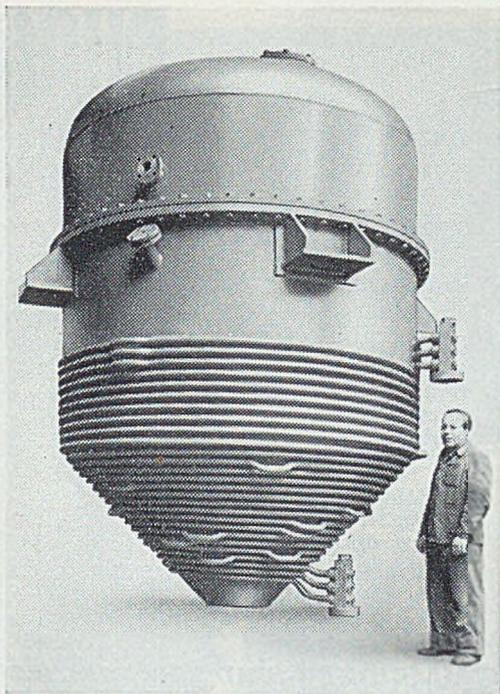
Ech. 1 : 1



N ^o	Poids en gr.	Vol. en cm ³	φ ₁	φ ₂	h
10	10	10	25	14	28
15	15	15	28	16	32
20	20	20	31	18	35
25	25	25	34	19	39
30	30	30	36	20	41
40	36	40	39	22	45
50	43	50	42	23	49
60	53	60	45	25	51
70	62	70	47	26	54
80	69	80	49	27	56
90	75	90	51	28	58
100	80	100	52	29	59
110	110	110	53	29,5	61
120	120	120	55	30	62

Les poids s'entendent couvercle compris

Capsules
Electrodes
Appareils divers
livrables rapidement



NICKELPLATTIERTER KESSEL

zur Konzentration von KOH
mit Hochdruck-
heisswasserheizung
(Thermosyphon)

**HCH. BERTRAMS
AG.
Basel 13**



SANDOZ A.G.

BASEL

ANILINFARBSTOFFE

für alle Fasern, in allen Echtheitsgraden

HILFSPRODUKTE

für die Färberei und Ausrüstung von Textilien, Leder und Papier

PHARMAZEUTISCHE SPEZIALPRÄPARATE

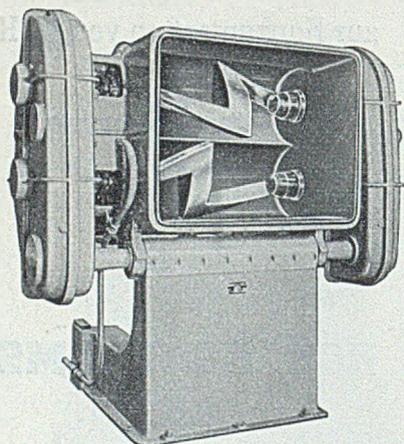
**ALKALOIDE, CHLOROPHYLL UND ANDERE
FEINCHEMIKALIEN**

SCHÄDLINGSBEKÄMPFUNGSMITTEL

für Obst-, Wein-, Garten- und Feldbau

MISCH- UND KNETMASCHINEN

BUSS

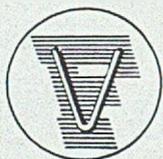


DOPPELMULDENKNETER
KO-KNETER (kontinuierlich)
DISPERSIONS-MIXER FÜR FARBEN UND LACKE

VAKUUM-EINDAMPFANLAGEN
ZERSTÄUBUNGSANLAGEN
IMPRÄGNIERANLAGEN

EXTRAKTOREN · DREHÖFEN · AUTOKLAVEN
ROHRKESSEL · TROCKENSCHRÄNKE
TROCKENMISCHER · SCHAUFELTROCKNER
DAMPFKESSEL · AZETYLEN-TROCKENENTWICKLER
ROSTFREIE APPARATE

BUSS AG. BASEL - ABTEILUNG MASCHINEN- UND APPARATEBAU



Sämtliche Verpackungsgläser aus
Leichtglas für die chemisch-
pharmazeutische Industrie.

FORMA VITRUM AG. - ST. GALLEN

Tel. (071) 2 91 31

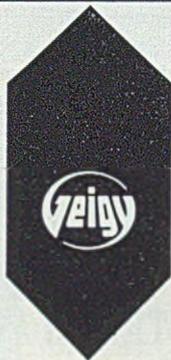
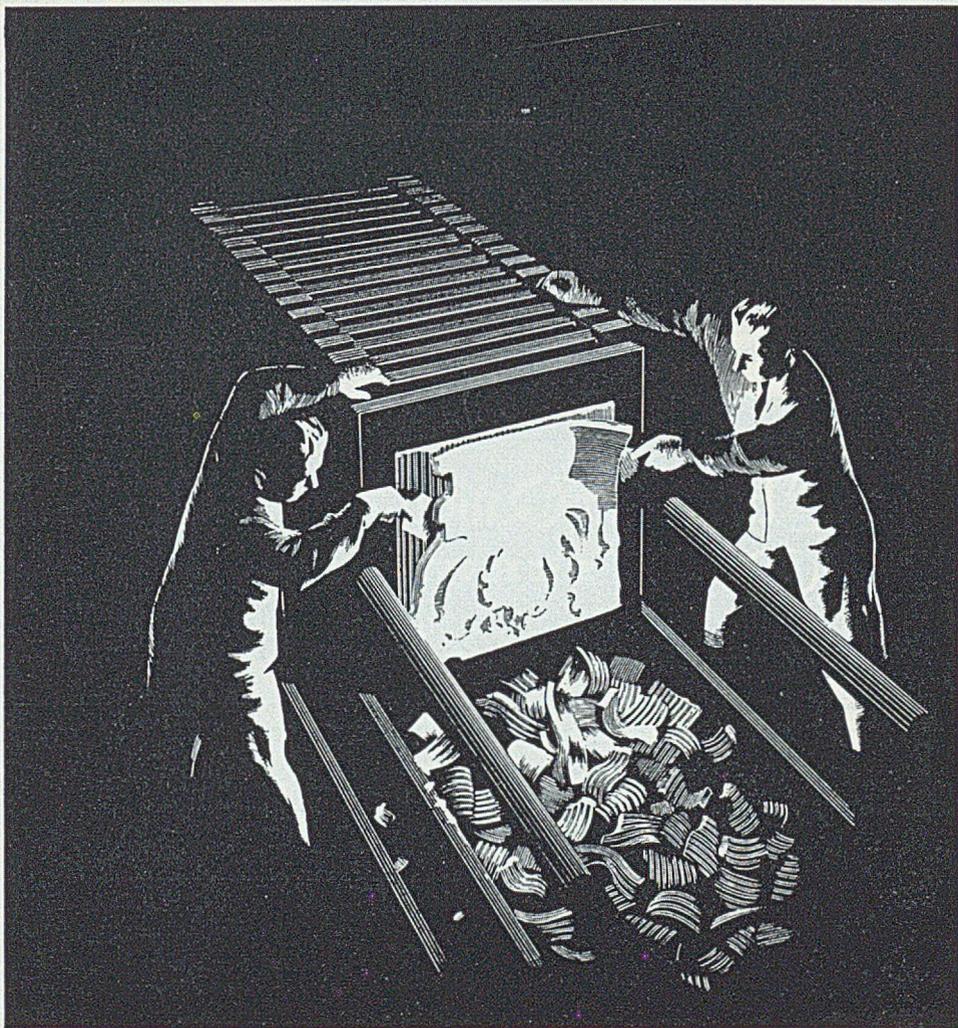


*Die von der Industrie besonders bevorzugte
Qualitätslampe.*

Fabrikation von Speziallampen jeder Art.

Verkauf von Fluoreszenzröhren!

GLÜHLAMPENFABRIK AG.
FRIBOURG Postfach 259



Türkischrot,

lange Zeit ein Geheimnis orientalischer Färber, wurde von Geigy zu Anfang des 19. Jahrhunderts aus Krapp, Kalk, Tonerde und fettsauren Verbindungen hergestellt und bildete während Jahrzehnten eine der Grundlagen des jungen Betriebes. Heute freilich ist das Türkischrot wie auch das natürliche Indigo vergessen. Dafür haben sich echte synthetische Geigy-Farbstoffe, darunter die Solophenyl- und Cuprophenylfarbstoffe, den Markt erobert und zeugen von der gewaltigen Entwicklung der Farbstoffindustrie im Laufe der letzten hundert Jahre.

J . R . G E I G Y A . G . B A S E L

Aktiengesellschaft
Stehle & Gutknecht

Sulzer-Zentralheizungen

Bärenfelsenstr. 40-47

Basel

Telephon 24.952

Spezialfabrik für Zentralheizungen aller Systeme: Warmwasserheizungen, Fernheizungen, Pumpenheizungen, Etagenheizungen, Nieder- und Hochdruck-Dampfheizungen, Abwärmeverwertungsanlagen, Ventilatoren, Warmluftheizungen, Trocknereien, Trockenschrankfabrikation, Warmwasserbereitungen, Heisswasserheizungen für Industrie, Hotels, Restaurants und Krankenhäuser etc.

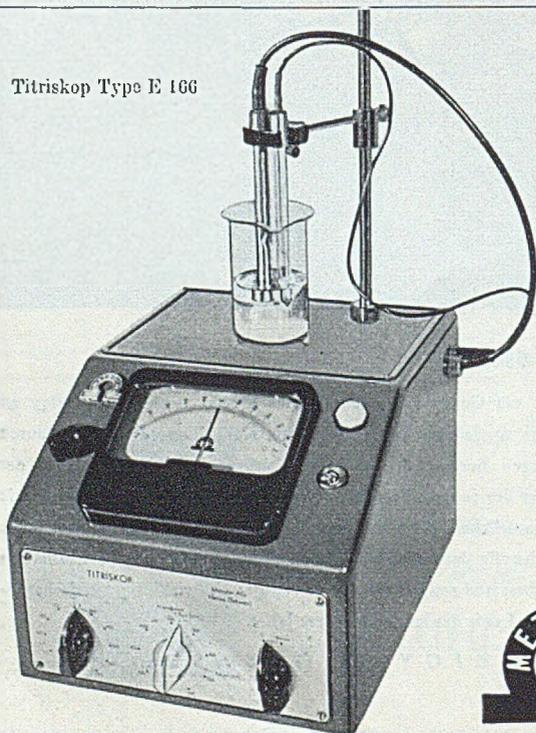
Feuerungen für Koks, Koksgrüss, Oel oder Gas • Grosse Neuheit: „Strahlungsheizung“

Sicheres für Qualitätsdrucke

SCHWITTER A.G.

BASEL / ZÜRICH

Titriskop Type E 166



Mit dem

TITRISKOP

können alle potentiometrischen Aufgaben des Chemikers gelöst werden.

Grosse Ablesegenauigkeit

Höchster Eingangswiderstand

Einfache Bedienung

Betriebssichere Konstruktion

Stabilisierter Voll-Netzanschluss

sind einige seiner vorzüglichen Betriebsigenschaften.

Als Zubehör liefern wir auch vollständige Titriereinrichtungen modernster Konstruktion, einschliesslich magnetische Rührwerke, Glas-, Bezugs- und Metallelektroden aller Art.

Wir beraten Sie gerne unverbindlich über die Praxis der Potentiometrie.

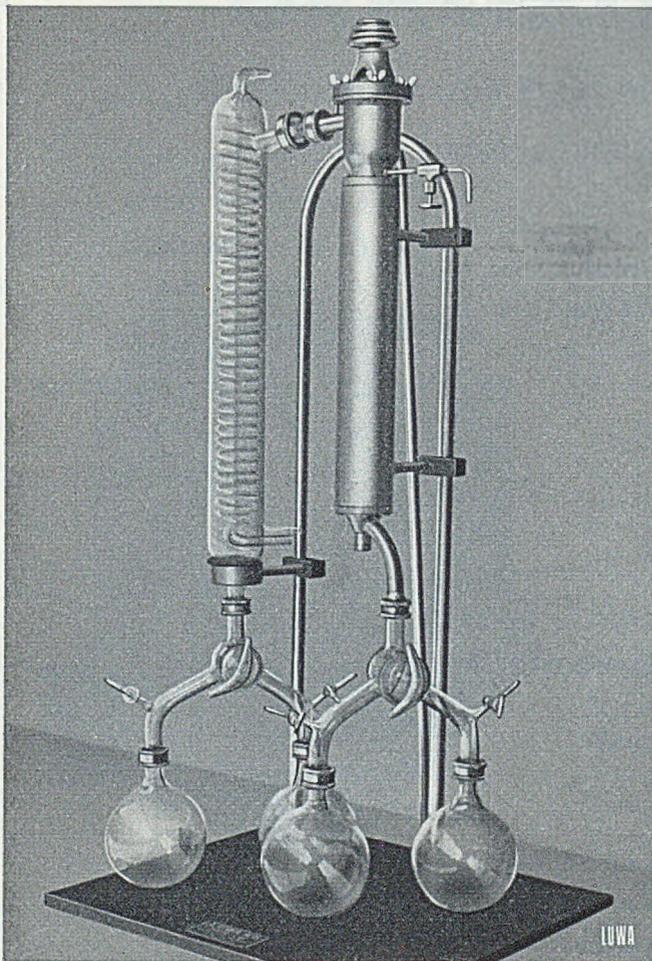


METROHM AG.

HERISAU (Schweiz)



Labor-Eindampfer



Die umwälzende Neuerung auf dem Gebiete der Labor-Dünnschichteneindampfer.

Der kleine Apparat mit der grossen Leistung und den grossen Vorteilen.

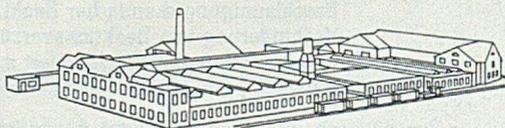
Maximale Schonung des Eindampfgutes, welches nur ca. 30 Sek. der Verdampfungstemperatur ausgesetzt ist.

Schnellste Anreicherung von kleinen Mengen empfindlicher Stoffe aus sehr verdünnten Lösungen.

Pat. Labor-Dünnschichten-Eindampfer, Verdampfungsleistung ca. 15 kg Wasser/h.

Verlangen Sie Spezialprospekte.

LUWA AG ZÜRICH



LUWA AG., Spezialfabrik für Luft- und Wärmetechnik
Zürich-Albisrieden, Anemonenstr. 40. Tel. 27 33 35 / 36
Maschinenfabrik

LUWA



DURAND & HUGUENIN S. A.
BÂLE (SUISSE)

Colorants et produits spéciaux pour
l'impression et la teinture grand teint

Indigosols (marque déposée)

Colorants au chrome

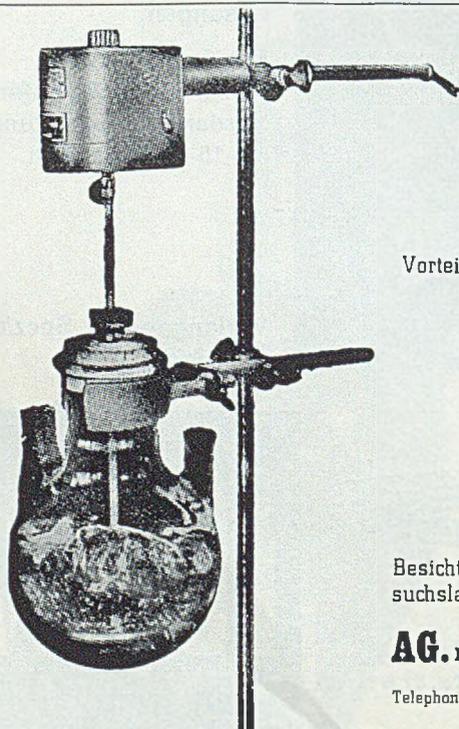
Colorants Perchrome

Colorants Acétyles

Colorants Polyacétyles

Colorants pour Aluminium

Produits auxiliaires



Vibro-Mischer

Mod. E 1 Patente Dr. Ing. Hans Müller, Zürich

Neues Rühr- und Emulgierwerk
für Laboratorien

Vorteile: Keine rotierenden Teile
keine Führungen und Lager
keine Stopfbüchsen
keine Quecksilberschlüsse
keine Überhitzungen an Heizflächen
Intensive Mischung und Rührung
Homogene Verteilung ungelöster Stoffe
Beschleunigung chemischer Reaktionen
Verhinderung von Reaktionsverzügen
Enorme Zeitersparnis, da sofort montiert
Umwälzung in axialer u. radialer Richtung

Besichtigung und Demonstration in unserem Ver-
suchslaboratorium

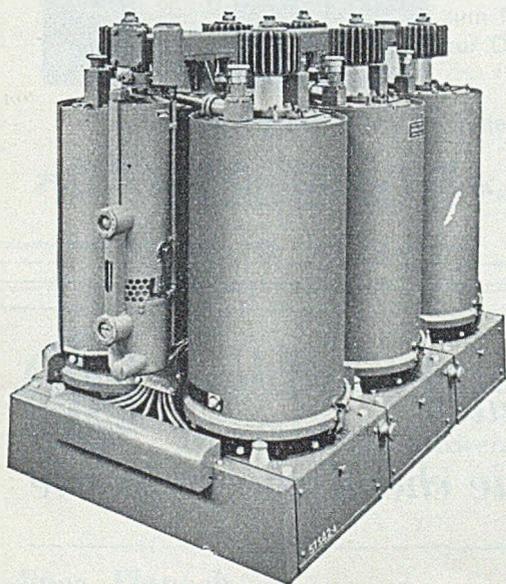
AG. FÜR CHEMIE-APPARATEBAU
ZÜRICH

Telephon 284918

Scheuchzerstr. 71

OERLIKON

Gleichrichter und Elektrolyseure
für die chemische Industrie



Einanoden-Gleichrichterblock 2300 kW, 3650 A, 630 V,
für einen elektrochemischen Betrieb

Gleichrichter

Normale Typen und Hochstrom-Gleichrichter in Einanoden-Bauart bis 10 000 A

Elektrolyseure

für die Herstellung von Wasserstoff und Sauerstoff, für Leistungen bis 500 m³ H₂ pro Stunde

Spezialantriebe

für die chemische Industrie

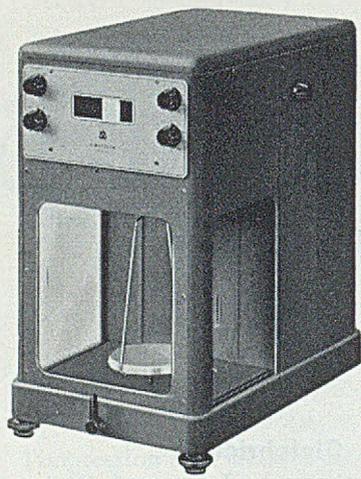
Mittelfrequenz-Generatoren

Dampf- u. Gasturbinen

Komplette thermo- und hydroelektrische Kraftwerke

MASCHINENFABRIK OERLIKON
ZÜRICH 50 **TEL. (051) 468530**

Bureaux in Zürich, Bern und Lausanne



E. METTLER, Zürich 1

Fabrik für Analysenwaagen

Pelikanstrasse 19 - Tel. 051 / 25 25 70

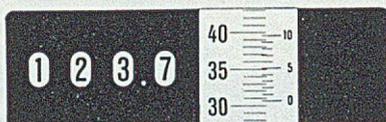
Der anspruchsvolle Chemiker bevorzugt
die bestbewährte

METTLER - Analysenwaage

Schweizer-Fabrikat

mit den besondern Vorzügen:

- automatische Gewichtsauflage bis 200 g
- grosser optischer Bereich von 115 mg
- konstante Belastung des Waagbalkens, d. h. gleichbleibende Empfindlichkeit im ganzen Wägebereich
- Ablesung des Resultates von einer einzigen Skala



Gewicht = 123,7306 g

- **genau - schnell - sicher - einfach**

- erstklassiger Service-Dienst

Verlangen Sie Offerte oder unverbindliche Demonstration

Unsere Spezialitäten

für die chemische Industrie

Kesselbeschickungs-Anlagen

Kohlensilos

Pneumatische und mechanische

Transport - Anlagen

Brech- und Sieb - Anlagen

Kleinmühlen

DAVERIO & C^{IE}, AG.

ZÜRICH



Feinchemikalien
Wissenschaftliche Präparate

Analysen-Reagenzien

Einige interessante Beispiele und deren Anwendung:

Aethylenmercaptan purum	zur Darstellung von Thioglykolacetalen
Anthron puriss. z. A.	zum Kohlehydratnachweis
Bleitetraacetat stab. purum	für spezifische Oxydationen
Cupferron purum z. A.	zur Bestimmung von Kupfer
Dioxyweinsäure purum z. A.	zum Nachweis von Natrium
Hydroxylaminhydrochlorid	zur Darstellung von Oxymen
pract. 95/98%	

Verlangen Sie unsern Katalog mit Preisliste.

Flück & Co., Chemische Fabrik, St. Gallen Tel. (071) 28989



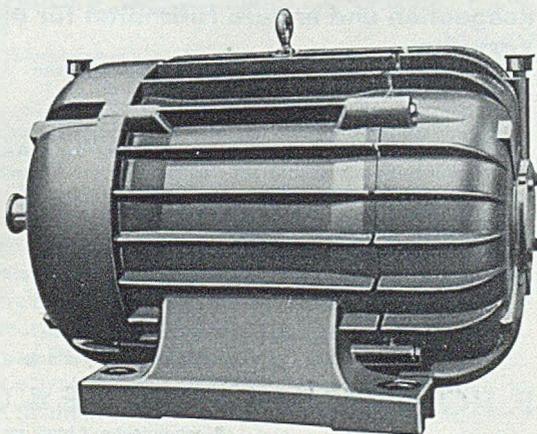
E.M.B. Elektromotorenbau AG.
Birsfelden (Schweiz)

Fuss-, Flansch- und Getriebemotoren

für erhöhte Ansprüche
der chemischen Industrie

ventilierte oder
geschlossene Bauart

**Spezial feuchtigkeits-
und säurebeständige
Imprägnierung**



BIOCHEMICA „ROCHE“

Aminosäuren · Di- und Tripeptide · Peptone · Protamine · Proteine · Biogene Amine

Purinderivate

Adenin, Adenosin, Adenosinphosphorsäure, Allantoin, Alloxan, Alloxantin, Coffein, Cytidin, Cytidinphosphorsäure, Guanin, Guanosin, Harnsäure, Hypoxanthin, Nucleinsäure, Theobromin, Thymin, Uracil, Xanthin, Xanthopterin

Sterine und Gallensäuren

Cholesterin, Ergosterin, Sitosterin, Stigmasterin, Cholsäure, Desoxycholsäure, Glykocholsaures Na, Taurocholsaures Na

Zucker, Zuckeralkohole und Zuckersäuren

Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Sorbose, Arabinose, Xylose, Fucose, Rhamnose, Diglucose, Maltose, Lactose, Trehalose, Raffinose, Glykogen, Inulin, Glucosamin- - Sorbit, Mannit, Inosit. - L-Ascorbinsäure, Galactonsäurelacton, Galacturonsäure, Glucuronsäurelacton, Glucuron, Ribonsäurelacton, Chinasäure, Brenztraubensaures Na

Kristallisierte, herzwirksame Glucoside

Convallatoxin, Diglotoxin, Digitalinum verum, Gitoxin, Hellebrin

Kristallisierte Hormone

Oestron
Equilin
Equilenin
Thyroxin
Acetylcholin
Dijodtyrosin

Vitamine

Vitamin A: β -Carotin crist. (Provitamin A)

Vitamin B-Komplex:

Vitamin B₁ (Aneurin) crist. synthet.

Vitamin B₂ (Lactoflavin) crist. synthet.

Nicotinsäure, Nicotinsäureamid

Pantothensaures Na und Ca

Vitamin B₆ (Pyridoxin) crist. synthet.

Vitamin C: L-Ascorbinsäure crist. synthet.

Vitamin E: DL- α -Tocopherol und DL- α -Tocopherolacetat synt.

(+)-Biotin synthet.

Vitamin K-Grundkörper: 2-Methyl-1,4-naphthochinon

Wuchsstoffe

Hetero-auxin (Indolyl-3-essigsäure), Meso-Inosit, β -Alanin, β -Indolyl-propionsäure

Krebserregende Substanzen

Aminoazotoluol, Benzpyren, 1,2,5,6-Dibenzanthracen, Methylcholanthren

Blutgerinnungshemmende und -fördernde Substanzen

(biologisch standardisiert)

Liquoid, Dicumarol, Liquemin (Heparin Roche), Thrombin, Thrombokinase

Reagentien und andere Hilfsmittel für biologische und klinische Versuche

«Numal-Roche» und Chloralose für Tiernarkosen

Curare aus Calebassen (biologisch geprüft)

Jodessigsäure für Gewebstoffwechselversuche

Pyocyanin und Phthiocol für biologische Oxydoreduktionsversuche

Dichlorphenolindophenol zur Bestimmung der L-Ascorbinsäure

Dichlorchinonchlorimid zur Bestimmung von Vitamin B₆

α, α' -Dipyridyl zur Bestimmung von Fe⁺⁺

Naphthoresorcin zum Nachweis der Glucuronsäure

Dimedon zum Aldehydnachweis

Digitonin zum Cholesterinnachweis

Xanthidrol zur Bestimmung von Harnstoff und Ureiden

Reineckesalz, Flaviansäure und Rufiansäure zur Fällung von Aminen, Aminosäuren und Peptiden

Ninhydrin zum Nachweis von α -Aminosäuren

Preisliste auf Verlangen

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO, A.-G., BASEL

Biochemische Abteilung



HELVETICA CHIMICA ACTA XXXIII

FASCICULUS II

herausgegeben am

publié le
15. III. 1950

pubblicato il

INHALT

SOMMAIRE

SOMMARIO

Kürz' tüchtig, ehe es abgeschickt,
Sonst droht der Rotstift, schon gezückt!

Messieurs, prenez le soin d'être concis et brefs,
Ou craignez les ciseaux du rédacteur en chef!

35. R. Krueger: Über die Bildung von Glykokoll aus Brenztraubensäure in vivo und in vitro 233
36. B. Stahlberger und A. Guyer: Die Messung von Oberflächenspannungen nach der Ringmethode mit neuen apparativen Hilfsmitteln 243
37. Domenico La Face: Contributo alla conoscenza dell'essenza concreta di gaggia farnese (*Acacia farnesiana Willd.*) 249
38. G. Brubacher und E. Suter: Systematische Untersuchungen über tuberkulostatisch wirksame primäre Amine 256
39. A. F. Müller und F. Leuthardt: Biologische Citrullinsynthese. II. Mitteilung 262
40. A. F. Müller und F. Leuthardt: Die Umwandlung der Glutaminsäure in Asparaginsäure in den Mitochondrien der Leber (mit Bemerkung über das Vorkommen einer Transaminase in *Clostridium Welchii*) 268
41. C. A. Grob und P. Ankl: Derivate des α -Aminopyrrols. 1. Mitteilung. Sterische Resonanzbeeinflussung 273
42. A. Stoll und J. Renz: Der enzymatische Abbau des Scillirosids zum Scillirosidin. 22. Mitteilung über Herzglykoside 286
43. P. Karrer und O. Rüttner: Zur Kenntnis des Dehydroemetins 291
44. P. Karrer, L. Szabo, H. J. V. Krishna und R. Schwyzer: N-Methyl-o-dihydrophenanthridin und Umwandlungsprodukte 294
45. P. Karrer, C. H. Eugster und M. Faust: Über das Auftreten von Carotinoiden in Pollen und Staubbeuteln verschiedener Pflanzen 300
46. P. Karrer und G. Aman: Über einige vom L-Cystein sich ableitende Sulfide und Sulfoxide 302
47. H. v. Babo und B. Prijs: Zur Kenntnis von Nitrothiazolverbindungen III 306
48. A. Stoll, B. Becker und A. Helfenstein †: Die Konstitution der Sennoside. 6. Mitteilung über Anthraglykoside 313
49. E. Hardegger und D. Spitz: Herstellung und Derivate des β -Methyl-D-glucopyranosids 337
50. Th. Posternak et W. H. Schopfer: Recherches dans la série des cyclitols XI. Sur l'identité du viburnitol de *Viburnum tinus L.* avec le l-quercitol de *Gymnema sylvestre Br.* 343
51. Théodore Posternak: Recherches dans la série des cyclitols XII. Sur la configuration du viburnitol 350
52. V. Prelog, P. Barman und M. Zimmermann: Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes. 53. Mitteilung. 3,4-Dimethyl-2,6-polymethylen-phenole 356
53. V. Prelog, M. Fausy El-Newehy und O. Häfliger: Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes. 54. Mitteilung. Vielgliedrige Cycloalkyl-amine 365
54. H. Heusser, K. Eichenberger und Pl. A. Plattner: Über Steroide und Sexualhormone. 167. Mitteilung. Eine neue Synthese des $\Delta^{5;17,20}$ -3 β -Oxy-pregnadien-21-als 370
55. A. Stoll, J. Rutschmann und W. Schlientz: Synthese der optisch aktiven Dihydrolysergsäuren. 18. Mitteilung über Mutterkornalkaloide 375

56. J. R. Billeter und K. Miescher: Über Steroide. 96. Mitteilung. Über einige Abkömmlinge des tricyclischen Oxyketons aus Cholesterin	388
57. Emile Cherbuliez und Pierre Baudet: Recherches sur la caséine V. Sur les constituants de la caséine	398
58. R. Mory und H. Schenkel: Zur Kenntnis der Thiazol-essigsäuren	405
59. Edmond Pongratz: Le rôle du cuivre dans la réaction de «Nadi» et modèles non protidiques d'oxydases et de catalase	410
60. R. Casanova und T. Reichstein: Methoxyketone aus Diazoketonen. Steroide, 5. Mitteilung	417
61. M. Vest und O. Wiss: Über die Ausscheidung freier Aminosäuren beim Alloxan-diabetes	422
62. R. Krueger: Über das freie Glykokoll in tierischen Organen	429

INDEX AUCTORUM

Aman, G.	302	Faust, M.	300	Mory, R.	405	Schopfer, W. H.	343
Ankli, P.	273	Grob, C. A.	273	Müller, A. F.	262, 268	Schwyzer, R.	294
v. Babo, H.	306	Guyer, A.	243	Plattner, Pl. A.	370	Spitz, D.	337
Barman, P.	356	Häfliger, O.	365	Pongratz, Edm.	410	Stahlberger, B.	243
Baudet, Pierre	398	Hardegger, E.	337	Posternak, Th.	343, 350	Stoll, A.	286, 313, 375
Becker, B.	313	Helfenstein, A. †	313	Prelog, V.	356, 365	Suter, E.	256
Billeter, J. R.	388	Heusser, H.	370	Prijs, B.	306	Szabo, L.	294
Brubacher, G.	256	Karrer, P. 291, 294, 300, 302	302	Reichstein, T.	417	Vest, M.	422
Casanova, R.	417	Krishna, H. J. V.	294	Renz, J.	286	Wiss, O.	422
Cherbuliez, Emil	398	Krueger, R.	233, 429	Rutschmann, J.	375	Zimmermann, M.	356
Eichenberger, K.	370	La Face, Domenico	249	Rüttner, O.	291		
El-Newehy, M. Fausi	365	Leuthardt, F.	262, 268	Sehenkel, H.	405		
Eugster, C. H.	300	Miescher, K.	388	Schlientz, W.	375		

Ausgabe der nächsten
Hefte:

Les prochains fascicules
paraîtront les:

I prossimi fascicoli
saranno pubblicati li:

2. V. 1950 (Fasc. III); 15. VI. 1950 (Fasc. IV)

Letzte Termine für Manuskripte:

Derniers délais pour les manuscrits

Dienstag, den 21. März 1950, 18^h und

les mardi 21 mars 1950, 18^{hes} et

Donnerstag, den 4. Mai 1950, 18^h

jeudi, 4 mai 1950, 18^{hes}

(für Manuskripte von höchstens 6 Seiten Garmond, ohne Figuren: *Dienstag, den 28. März 1950, 18^h bzw. Samstag, den 13. Mai 1950, 18^h*).

(pour manuscrits de 6 pages Garmond au maximum, sans figures, respectivement *les mardi 28 mars 1950, 18^{hes} et samedi 13 mai 1950, 18^{hes}*).

REDAKTIONS-KOMITEE — COMITÉ DE RÉDACTION — COMITATO DI REDAZIONE

E. CHERBULIEZ, Président
Laboratoire de Chimie pharm. de
l'Université, Genève.

W. D. TREADWELL, Vize-Präsident
Lab. für anorganische Chemie, Eidg. Techn.
Hochschule, Zürich.

E. BRINER, Lab. de Chim. techn., théor. et
d'Electrochimie de l'Université, Genève.

P. KARRER, Chem. Institut der Universität,
Zürich.

H. DE DIESBACH, Institut de chimie de l'Uni-
versité, Fribourg.

L. RUZICKA, Labor. für organische Chemie,
Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

35. Über die Bildung von Glykokoll aus Brenztraubensäure in vivo und in vitro¹⁾

von R. Krueger.

(21. XII. 49.)

*Wiechowski*²⁾ und *Magnus-Levy*³⁾ haben zuerst erkannt, dass der Tierkörper zur Synthese von Glykokoll fähig ist. Sie fanden, dass nach Verfütterung von Benzoesäure mehr Glykokoll in Form von Hippursäure im Harn ausgeschieden wird, als im umgesetzten Körper-eiweiss vorhanden ist oder mit der Nahrung zugeführt wird. *Osborne & Mendel*⁴⁾ sowie *McCoy & Rose*⁵⁾ haben später festgestellt, dass auch wachsende Tiere von der Zufuhr von Glykokoll unabhängig sind, dass sie die Aminosäure also in grossem Umfang synthetisieren können. Die Frage, von welchen Substanzen diese Synthese ausgeht, wurde lange diskutiert. Es seien hier nur einige Verbindungen aufgezählt, die im Laufe der Zeit als mögliche Vorstufen angesehen worden sind: Leucin, Ornithin, Glutamin und Glutaminsäure, Serin, Harnsäure, Sarkosin, Essigsäure und Glyoxylsäure. Es handelte sich also vor allem um Aminosäuren, an stickstofffreie Vorstufen ist aber ebenfalls gedacht worden. Erst 1946 gelang es *Shemin*⁶⁾ mit Hilfe der Isotopenmethode eine Bildung von Glykokoll aus Serin sicherzustellen. L-Serin wird vom tierischen Organismus unter Abspaltung von Ameisensäure direkt in Glykokoll übergeführt. Andere Möglichkeiten der Glykokollentstehung im Organismus sind bisher nicht bekannt.

Durch Fütterungsversuche⁷⁾ stellten wir vor einiger Zeit fest, dass sich die Konzentration des freien Glykokolls in der Rattenleber durch die Ernährung stark beeinflussen lässt. So verursacht sowohl fettreiches als auch kohlehydratreiches Futter ein erhebliches Ansteigen der Glykokollwerte der Leber. Auffälligerweise verhält sich das Serin in der gleichen Versuchsanordnung anders, der Seringehalt der Leber wird allein durch fettreiches Futter in die Höhe getrieben. Wenn das Glykokoll ausschliesslich aus Serin entstände, hätte man eine gleichartige Beeinflussung der Konzentration beider Aminosäuren erwarten müssen. In diesem Zusammenhang gewann ein Neben-

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der *Emil-Barell-Stiftung* ausgeführt, wofür auch an dieser Stelle herzlich gedankt sei.

²⁾ *W. Wiechowski*, Hofm. Beitr. 7, 204 (1905).

³⁾ *A. Magnus-Levy*, Bioch. Z. 6, 502 (1907), und ebendort S. 523.

⁴⁾ *T. Osborne & L. Mendel*, J. Biol. Chem. 20, 351 (1915).

⁵⁾ *R. McCoy & W. C. Rose*, J. Biol. Chem. 117, 581 (1937).

⁶⁾ *D. Shemin*, J. Biol. Chem. 162, 297 (1946).

⁷⁾ *R. Krueger & O. Wiss*, Helv. 32, 1341 (1949).

befund *Shemin's* (loc. cit.) an Bedeutung. Er hatte gefunden, dass das Meerschweinchen Ammoniumchlorid in höherem Masse für die Glykokollsynthese ausnutzen kann, als die Ratte. Da das Meerschweinchen als Pflanzenfresser ein Kohlehydratverwerter ist, schien mir dieser Umstand für die Aminierung einer stickstofffreien Glykokollvorstufe zu sprechen. Aus den Fütterungsversuchen und dieser Tatsache ergab sich mit einiger Wahrscheinlichkeit, dass dieses stickstofffreie Spaltprodukt im Kohlehydratstoffwechsel entstand. Da neuerdings eine spezifische Mikromethode¹⁾ zur Bestimmung des Glykokolls zur Verfügung steht, sollte versucht werden, dieses Spaltprodukt herauszufinden. In Experimenten mit Leberhomogenat konnten anfänglich keine Erfolge erzielt werden. Erst eine fortlaufende Bestimmung des freien Glykokolls in der Leber des lebenden Tieres ergab, dass offenbar die Brenztraubensäure die gesuchte Substanz darstellte. Gestützt auf diese Versuche gelang es dann, eine Bildung von Glykokoll aus Brenztraubensäure auch *in vitro* an Leberschnitten nachzuweisen. Das nötige Ammoniak musste dabei als Ammoniumchlorid zugegeben werden.

Experimenteller Teil.

Die Glykokollbildung im Leberhomogenat.

Methodik. Ausgewachsene Albinoratten werden durch Dekapitieren getötet und entblutet. Die Leber wird gleich nach der Entnahme gewogen und (meist von 3 Tieren zusammen) im vorgekühlten Mörser mit Quarz- oder Seesand 3 Minuten lang verrieben. Der Brei wird mit Phosphatpuffer von 5° (pH 7,4 m/15 nach *Sorensen*) zu homogener Flüssigkeit verrührt und kurz zentrifugiert. Die flüssige Phase wird vom Niederschlag abgossen und 2 cm³ davon in gewöhnliche *Warburg*-Gefässe von ca. 27 cm³ Inhalt pipettiert. Die Substrate werden möglichst schnell in einem weiteren cm³ Puffer zugegeben.

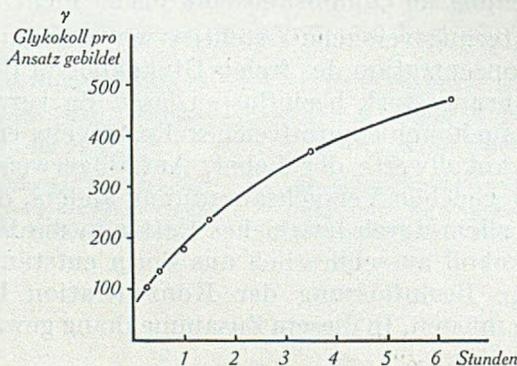


Fig. 1.

Nach Füllung mit O₂ oder N₂ werden die Gefässe 4 Stunden bei 38° im Thermostaten geschüttelt (100 Ausschläge/Minute). Der Sauerstoffverbrauch der Homogenate wurde nur selten gemessen; ein so hergestelltes Homogenat verbraucht durchschnittlich 1000 mm³ Sauerstoff pro Stunde. Nach Beendigung des Versuches wird der Gefässinhalt mit Wasser

¹⁾ R. Krueger, Helv. 32, 238 (1949).

quantitativ ausgespült und nach *Folin & Wu*¹⁾ mit Wolframsäure enteiweisst. Für die Glykokollbestimmung (*loc. cit.*) werden die Ansätze vor der Kohleadsorption endgültig auf 1:48 bis 1:70 verdünnt. Mit sofort enteiweisssten, nicht digerierten Proben wird ebenso verfahren, sie dienen als Ausgangswerte.

Ergebnisse. Wird Rattenleberhomogenat wie beschrieben hergestellt und mehrere Stunden bei 38° im Thermostaten geschüttelt, bildet sich auch ohne Zusatz von Substrat eine grosse Menge Glykokoll. Die Kurve (Fig. 1) zeigt den Verlauf der Glykokollneubildung während 6 Stunden.

Ein aus Schweineleber in gleicher Weise hergestelltes Homogenat, das mit Pufferlösungen verschiedener pH-Werte angesetzt war, zeigte Maxima der Glykokollbildung bei pH 5,0 und 7,4. In den folgenden Versuchen wurde daher bei pH 7,4 gearbeitet. 12stündige Dialyse des Homogenats (Ratten) im Eisschrank bei 5° gegen Phosphatpuffer, oder Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 6000 T/Min schränkt die Neubildung von Glykokoll stark ein. Sie sinkt in so behandelten Ansätzen bis auf etwa $\frac{1}{10}$ derjenigen des ursprünglichen Homogenats. Durch Zugabe von m/50 DL-Serin liess sich die Anhäufung von Glykokoll vermehren, wofür ein Beispiel gegeben sei:

	In Sauerstoff	In Stickstoff
	γ Glykokoll pro Ansatz	
Sofort enteiweisst	222	
4 ^h bei 38° ohne Substrat	460	643
Dito mit m/50 DL-Serin	590	781

Da *Artom, Fishman & Morehead*²⁾ gezeigt haben, dass D-Serin toxisch wirken kann und nach *Shemin* aus D-Serin kein Glykokoll gebildet wird, ist anzunehmen, dass hier nur die L-Form, deren Konzentration m/100 betrug, wirksam war. Des weiteren wurden folgende Substanzen auf ihre Fähigkeit, die Glykokollbildung im Homogenat zu steigern, untersucht: Brenztraubensäure, Fumarsäure, α-Ketoglutaräure, Oxalessigsäure, Acetessigsäure, Citronensäure, Bernsteinsäure, Milchsäure, Glycerin, Glykogen, Essigsäure, Hippursäure, L-Ornithin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Prolin und L-Leucin.

Die Substanzen wurden wenn nötig als Natriumsalze und in Konzentrationen von m/50—m/100 (pro Gefäss) zugefügt. Waren sie stickstofffrei, wurde auch Ammoniak in Form von Ammoniumchlorid dargeboten. Alle diese Versuche sind negativ verlaufen. Geringe Steigerungen der Glykokollproduktion, die hier und da auftraten, konnten nicht regelmässig reproduziert werden und gingen kaum über die Fehlergrenze der Methode hinaus. Auch Verwendung anderer Tierarten (Schwein, Meerschweinchen) und anderer Organe (Niere) brachten nur negative Resultate. An diesem Punkt schien ein Wechsel der Methode angezeigt. Dafür waren vor allem zwei Gründe massgebend. Einmal konnte die gesuchte Glykokollbildung von oxydativen Vorgängen abhängen oder selbst oxydativ verlaufen und war dann mindestens besser in intaktem Gewebe nachzuweisen, vielleicht sogar auf intaktes Gewebe beschränkt. Zum andern hatte sich herausgestellt, dass im Homogenat nicht nur eine erhebliche Glykokollbildung stattfand, sondern auch andere Aminosäuren stetig ihre Konzentration vermehrten. Überraschenderweise wurde das auch für das Serin gefunden (mikrobiologisch nach *Dunn* und Mitarbeitern³⁾ bestimmt). Da nach den bekannten Vorstellungen aber das Glykokoll aus dem Serin stammen sollte, hätte man eher das Gegenteil erwarten sollen. Das Ansteigen noch anderer Aminosäuren (Alanin) liess den Verdacht aufkommen, dass es sich bei diesen Vorgängen wenigstens zum Teil um autolytische Abspaltung der Aminosäuren aus präformiertem Eiweiss handle. Es wurde daher auf weitere *Warburg*-Versuche verzichtet und die Untersuchung an lebenden Tieren fortgeführt.

¹⁾ *O. Folin & H. Wu*, *J. Biol. Chem.* **38**, 81 (1919), und **41**, 367 (1920).

²⁾ *C. Artom, W. Fishman & R. Morehead*, *Federation Proc.* **4**, 81 (1945).

³⁾ *M. S. Dunn, S. Shunkman, M. Camien, W. Frankl & L. Rockland*, *J. Biol. Chem.* **156**, 703 (1944).

Bildung von freiem Glykokoll in der Leber lebender Tiere.

In den Ernährungsversuchen hatten wir die beachtlichen Mengen freier Aminosäuren in der Leber genauer kennen gelernt. Es war sehr wahrscheinlich, dass diese in freier Form vorliegenden Substanzen zuerst auf Änderungen der Stoffwechsellage reagieren würden. Es bestand die Hoffnung, dass sich vor allem hier vorübergehende Einflüsse durch von aussen zugeführte Substanzen würden fassen lassen. Wenn injizierte Stoffe auf ihren Einfluss untersucht werden sollen und es sich nicht um Blut, sondern um schwerer zugängliche Organe handelt, ist die Gewinnung eines Ausgangswertes und die fortlaufende Beobachtung einer bestimmten Komponente im Organ nur durch operative Methoden zu erreichen. Das bedeutete in unserem Falle, dass Leberstückchen in bestimmten Zeitabständen herausgenommen und auf ihren Glykokollgehalt untersucht werden mussten. Nach Exzision der ersten Probe konnten die fraglichen Substanzen injiziert werden, die Beeinflussung der folgenden Werte war vielleicht geeignet, Rückschlüsse auf die Glykokollsynthese zuzulassen. Nach einigen orientierenden Vorversuchen stellte sich heraus, dass es möglich ist, die Leber von narkotisierten Tieren durch 4—5maliges Entfernen von Lappenstücken sukzessive bis auf etwa $\frac{2}{3}$ der ursprünglichen Grösse zu reduzieren, ohne dass die Tiere dabei unmittelbaren Schaden nehmen. Die Konzentration von freiem Glykokoll und Alanin in den jeweils noch unversehrten Leberanteilen zeigte in den Kontrollexperimenten indessen einen langsamen, kontinuierlichen Abfall.

Entnahme von Leberstücken am lebenden Tier. Die Methodik sei hier nur kurz angedeutet, sie wird an anderem Ort ausführlich beschrieben werden.

Kaninchen oder Katzen werden mit Numal (*Hoffmann-La Roche*) narkotisiert. Die Injektion des Narkotikums kann intravenös oder intramuskulär erfolgen. Ist volle Narkosewirkung eingetreten, wird das Tier so auf dem Rücken gelagert, dass die Leber leicht zugänglich ist. Das Fell wird abrasiert und die Bauchhöhle von links her breit eröffnet. Ein Leberlappen wird vorgeholt und etwa 3 cm von seiner Spitze mit einem Faden umschlungen. Nach Knüpfen eines Knotens kann der abgeschnürte Leberteile abgetrennt werden. Er wird sanft ausgepresst und nach genauer Wägung im Mörser mit Seesand gründlich verrieben. Nach Verrühren des Breies mit Wasser wird zentrifugiert und mit Wolframsäure enteiweiss. Im Extrakt wird das Glykokoll wie üblich bestimmt. Ist auf diese Weise ein Ausgangswert gesichert, wird die zu untersuchende Substanz in eine Mesenterialvene injiziert und damit durch den Pfortaderkreislauf der Leber zugeführt. 15, 30, 45 und 60 Minuten nach der Injektion wird die Spitze eines neuen Leberlappens abgeschnitten und ebenso auf ihren Glykokollgehalt untersucht. Am Ende des Versuches wird das Tier durch Dekapitieren getötet.

Versuche über Glykokollbildung aus Serin in der Kaninchenleber.

Zunächst wurde die Verwendbarkeit der beschriebenen Methode geprüft, denn es war ja noch nicht sicher, ob sich durch intravenöse Gabe von Vorläufersubstanzen die Konzentration der freien Aminosäuren der Leber würde beeinflussen lassen. Vier Kaninchen von etwa 2 kg Körpergewicht wurde daher DL-Serin eingespritzt und die Menge freien Glykokolls in den nacheinander abgenommenen einzelnen Leberstückchen bestimmt. Die Tiere hatten vor dem Versuch einen Tag gehungert. Die Verdünnung der Extrakte für die Glykokollbestimmung war 1:48. Das Glykokoll ist in mg/100 g frische Leber berechnet. (Siehe obere Tabelle S. 237.)

Während also im Kontrollversuch, wo die entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung eingespritzt wurde, kontinuierlicher Abfall der Glykokollwerte auftrat, liess sich durch die Serininjektion eine Steigerung verursachen, die ihr Maximum nach ca. 30 Minuten erreichte und sich nach einer Stunde wieder ausgeglichen hatte. Die Erhöhung des Glykokollgehalts über den Ausgangswert betrug 20—45%. Damit war eine Bestätigung der *Shemin*'schen Versuche gewonnen und zugleich die Brauchbarkeit der Methode bewiesen.

Tier Nr.	1	2	3	4	5
DL-Serin injiziert . . .	100 mg	100 mg	150 mg	150 mg	2 cm ³
	Glykokoll in mg %				0,9% NaCl
Leberstück vor Injektion	27,2	37,0	31,2	53,5	30,0
nach Injektion 15 Min.	39,0	44,2	38,5	68,5	28,0
nach Injektion 30 Min.		40,5	30,4	67,3	25,3
nach Injektion 45 Min.		41,5	43,7	66,0	25,7
nach Injektion 60 Min.		39,7		57,6	20,0
nach Injektion 75 Min.		31,9			

Versuche über Glykokollbildung aus Brenztraubensäure in der Katzenleber.

Verglichen mit der Leber anderer Tiere enthält die Katzenleber besonders wenig Glykokoll. Obwohl es sich um junge Tiere handelte (meist von 1–2 kg) fanden wir weniger als die Hälfte des in Meerschweinchen- oder Kaninchenlebern enthaltenen. Als Endverdünnung des Leberextraktes für die Glykokollbestimmung wurde deshalb 1:12,6 gewählt. Ausser dem Glykokoll wurde teilweise noch das Alanin¹⁾ mitbestimmt, um sicher zu sein, dass die gefundenen Reaktionen nicht nur für eine Aminosäure Gültigkeit hätten, den Befunden also allgemeinere Bedeutung zukäme. Zuerst seien einige Kontrollversuche mit Injektion von physiologischer Kochsalzlösung beschrieben, damit deutlich wird, was unter einem negativen Versuch zu verstehen ist:

Tiergewicht	2 kg	1,4 kg	2 kg	1,5 kg	1,5 kg	1,2 kg	
cm ³ 0,9% NaCl-Lösung eingespritzt	2	1,4	2	1,5	1,2	1	
	Glykokoll in mg%				Alanin mg%		
Leberstück vor Injektion	17,0	13,8	16,3	21,0	13,4	6,5	6,9
nach Injektion 15 Min.	15,1	—	14,8	17,0	—	7,0	5,1
nach Injektion 30 Min.	13,6	14,2	14,3	15,1	13,8	7,0	6,0
nach Injektion 45 Min.	12,6	11,8	12,2	16,3	11,4	7,2	6,9
nach Injektion 60 Min.	11,3	12,4	11,7	13,6	12,0	7,2	6,6

Eine sehr erhebliche Zunahme des Glykokolls konnte dagegen durch Injektion des Natriumsalzes der Brenztraubensäure hervorgerufen werden (ich habe mich noch besonders davon überzeugt, dass das Präparat (*Hoffmann-La Roche*) kein Glykokoll enthält). Interessanterweise ist dieser Effekt im Verlaufe der Untersuchungen eine Zeitlang ausgeblieben und selbst Erhöhung der Brenztraubensäuredosis brachte ihn nicht wieder hervor. Wie sich herausstellte, sind die Katzen in dieser Zeit versichtlich gefüttert worden. Offenbar ist ein geringer Glykogengehalt der Leber eine Vorbedingung für den positiven Ausgang der Versuche. Bei Tieren, die zwei Tage gehungert hatten, wurde nach Brenztraubensäuregabe ausnahmslos eine starke Vermehrung der Glykokollkonzentration der Leber (von 18–118%) beobachtet. Kontrollversuche mit Injektionen von Kochsalzlösung ergaben im Hunger und bei normalem Ernährungszustand keine Unterschiede. Dass der Glykogengehalt der Ansätze die Glykokollbestimmung nicht stört, habe ich schon früher (*loc. cit.*) gezeigt. Die folgende Tabelle enthält die Versuche mit Brenztraubensäureinjektion. Die Unterschiede zwischen den gefütterten und den hungernden Tieren fallen sofort ins Auge:

¹⁾ Das Alanin bestimmte freundlicherweise Herr Dr. O. Wäss nach seiner Methode (*Helv.* 31, 22 (1948)).

Tiergewicht	Hungertiere				
	1,6 kg	1,8 kg	1,5 kg	1,7 kg	
Brenztraubensäure injiziert . .	200 mg 1,5 cm ³	220 mg 1,6 cm ³	200 mg 1 cm ³	200 mg 1,5 cm ³	
	Glykokoll in mg%				
Leberstück vor Injektion . . .	11,7	7,5	9,4	19,2	
nach Injektion 15 Min. . . .	14,6	5,2	10,5	23,4	
nach Injektion 30 Min. . . .	19,5	11,3	12,7	22,6	
nach Injektion 45 Min. . . .	15,9	10,0	9,8	19,2	
nach Injektion 60 Min. . . .	15,5	8,8	8,3	15,8	
	Tiere gefüttert				
Tiergewicht	1,3 kg	1,3 kg	1 kg	2,2 kg	2,8 kg
Brenztraubensäure injiziert . .	60 mg 1 cm ³	200 mg 1,5 cm ³	400 mg 1,5 cm ³	300 mg 2 cm ³	700 mg 3 cm ³
	Glykokoll in mg%				
Leberstück vor Injektion . . .	19,9	11,1	9,2	17,9	12,4
nach Injektion 15 Min. . . .	18,8	10,5	9,1	14,8	8,9
nach Injektion 30 Min. . . .	—	9,6	9,7	14,3	8,0
nach Injektion 45 Min. . . .	15,8	10,3	9,9	14,2	7,6
nach Injektion 60 Min. . . .	14,6	—	10,0	10,2	7,5

Eine weitere Bestätigung der Brauchbarkeit der verwendeten Methode ergaben die Fälle, wo nach der Injektion der Brenztraubensäure das Alanin zugleich mit dem Glykokoll bestimmt wurde. Bekanntlich wird Brenztraubensäure vom Organismus in Alanin übergeführt, es war nach der Injektion also Anstieg des freien Alanins zu erwarten. Wie die nachstehenden Experimente beweisen, wurde diese Erwartung bestätigt, die Alaninbildung drückt sich durch Zunahme des freien Alanins in der Leber aus:

Tiergewicht	1,3 kg		1,1 kg	
Brenztraubensäure injiziert . .	200 mg in 1,2 cm ³		200 mg in 1,2 cm ³	
	Glykokoll in mg %	Alanin in mg %	Glykokoll in mg %	Alanin in mg %
Leberstück vor Injektion . . .	7,2	14,9	16,3	13,6
nach Injektion 15 Min. . . .	16,0	29,8	14,7	15,2
nach Injektion 30 Min. . . .	14,0	—	24,4	27,7
nach Injektion 45 Min. . . .	15,8	33,7	19,1	—
nach Injektion 60 Min. . . .	13,3	21,2	17,3	21,6

Durch Beigabe von Co-carboxylase oder äquivalenter Mengen Ammoniumchlorid zur Injektionsflüssigkeit konnte die Glykokollbildung in der Leber nicht mehr gesteigert werden. Erwähnt sei noch, dass Versuche mit L-Arginin, L-Ornithin, L-Glutaminsäure, r.-Alanin und Acetessigsäure bisher negativ ausgingen. Untersuchungen über die Glykokollbildung aus Essigsäure und Oxalessigsäure sind noch nicht abgeschlossen.

Versuche mit Gewebeschnitten.

Aus den oben dargestellten Versuchen am lebenden Tier konnte gefolgert werden, dass die Brenztraubensäure bei der Glykokollbildung eine erhebliche Rolle spielt, man konnte sogar annehmen, dass Glykokoll aus Brenztraubensäure entsteht. Eine solche Reaktionsweise mag auf den ersten Blick unwahrscheinlich anmuten, da das Kohlenstoffskelett der Brenztraubensäure drei C-Atome besitzt, das des Glykokolls dagegen nur zwei. Von den verschiedensten Seiten sind aber Beweise dafür beigebracht worden, dass die Brenztraubensäure im biologischen Abbau in einen 2-C-Körper umgewandelt werden kann. Die Versuche am ganzen Tier hatten in unserem Falle die Richtung gewiesen, der Beweis für die Richtigkeit der Annahme musste durch die Verifizierung der Ergebnisse mit einer bekannten Methode angestrebt werden. Dafür kam vor allem die *Warburg-Methode* in Frage. Wegen der früheren Misserfolge mit der Homogenattechnik wurde jetzt an Schnitten gearbeitet.

Methodik. Die Versuchstiere hungerten am Anfang einen Tag, später immer zwei Tage vor dem Versuch. Die Tiere werden durch Dekapitieren getötet und entblutet. Katzen werden durch Kopfschlag betäubt, die *V. jugularis* wird durchschnitten und das Blut aufgefangen. Die Lebern werden entnommen und sofort mit dem Rasiermesser auf einer eisgekühlten Platte zu feinem Brei zerhackt. Die entstandenen Würfelchen Lebergewebe sollen 0,2—0,6 mm Kantenlänge haben. Als Schwimmflüssigkeit für die Schnittchen wird *Krebs-Ringer-Phosphat* vom pH 7,4 benutzt, der Brei wird vor dem Abfüllen in die Gefässe 3mal damit gewaschen. Je Gefäss wird 2 cm³ der Suspension pipettiert. Das Substrat wird in einem weiteren cm³ des Puffers zugegeben, die Gefässe werden nach der Gasfüllung 4 Stunden bei 38° im Thermostaten geschüttelt. Im allgemeinen wird der Gaswechsel nicht bestimmt, eine solche Suspension (3 cm³) braucht durchschnittlich 800—900 mm³ Sauerstoff pro Stunde. Nach dem Versuch werden die Schnitte mit 5 cm³ Wasser aus den Gefässen herausgespült und der Ansatz wird zum Herauslösen des freien Glykokolls aus den Schnitten kurz aufgeköcht. Es folgt Abkühlen unter fließendem Wasser und Fällung des noch in Lösung befindlichen Eiweisses mit 1 cm³ 10-proz. Natriumwolframatlösung und 1 cm³ 2/3-n. Schwefelsäure. Nach der Filtration kann sich die Glykokollbestimmung anschliessen.

Glykokollbildung in Schnitten, die in Puffer suspendiert waren.

Alle in der beschriebenen Art angesetzten Versuche verliefen negativ, wie der hier gezeigte mit Hackbrei von Meerschweinchenleber, der zugleich die Verlässlichkeit der Doppelbestimmungen erkennen lässt:

	Glykokoll in γ/cm^3 Ansatz	
Sofort enteweisst	88	
Puffer allein	95,	103
m/100 Brenztraubensäure . . .	95,	99
m/100 BTS + NH ₄ Cl	98,	95
m/100 BTS + Glutamin	95,	98
m/100 BTS + Cocarboxylase . .	98,	95
m/100 BTS + Glutamin + Cocarboxylase	96,	97

} 4 Stunden
bei 38° in O₂

Die Brenztraubensäure wurde als Natriumsalz zugegeben, das Glykokoll ist in γ/cm^3 Ansatz berechnet, gilt also für Schnittchen und Suspensionsflüssigkeit zusammen. In sämtlichen Versuchen trat eine ziemlich hohe Glykokollbildung aus präformiertem Substrat auf, wie aus der Differenz der sofort enteweissten und nach 4 Stunden enteweissten Ansätze zu ersehen ist. Versuche mit Schnitten von Rattenleber und Taubenbrustmuskel

verliefen ebenso unbefriedigend. Da die Tierversuche an der Katzenleber positiv gewesen waren, wurden Katzenlebern untersucht. Hier zeigte sich das erste Mal eine geringe Glykokollzunahme (5%), wenn Brenztraubensäure zugegeben wurde:

	Glykokoll in γ/cm^3 Ansatz	
Puffer allein	40,5	39,25
m/50 Brenztraubensäure . . .	41,3	42,0
m/50 Brenztraubensäure + Glutamin	39,7	39,4

} 4 Stunden
bei 38° in O₂

Dass auch bei der Katze, wo die Versuche in vivo so bedeutende Steigerungen ergeben hatten, in vitro nur so wenig Glykokoll gebildet wurde, musste an der Verschlechterung der Reaktionsbedingungen liegen.

Glykokollbildung aus Brenztraubensäure.

Um die Reaktionsbedingungen wieder möglichst physiologisch zu gestalten, wurde der Leberhackbrei nicht mehr ausgewaschen und statt in Puffer im Serum des gleichen Tieres suspendiert. Statt die Schnittchen mit dem Rasiermesser herzustellen, wurde als praktisch erkannt, die *Latapie*-Mühle zu verwenden und beim Schneiden des Lebergewebes die konvexe zweite Scheibe aus der Mühle zu entfernen, wie es *Szent-György*¹⁾ vorgeschlagen hat. Die Katzenleber wird bei schnellem Drehen in saubere kleine Schnittchen von 0,2—0,4 mm Länge zerschnitten, da sie sehr festes Stützgewebe besitzt. Die schwer zerreisbaren Gefässstränge bleiben vor der rotierenden Scheibe hängen. Sämtliche Manipulationen wurden unter Eiskühlung und mit eisgekühlten Instrumenten ausgeführt. Während des Pipettierens wurde die Schnittpension mit einem kleinen Motor schnell umgerührt, die Gleichmässigkeit der Doppelbestimmungen liess sich dadurch noch verbessern. Das Trockengewicht eines Gefässinhaltes mit nicht ausgewaschenem Leberbrei und Serum war durchschnittlich 450 mg. Das Serum wurde aus geronnenem Blut des Versuchstieres durch 15 Minuten langes Zentrifugieren bei 3000 T/Min hergestellt. Vergleicht man die Glykokollsynthese von Katzenleberschnitten in Serum und Puffer, so erhält man folgendes Bild:

	Glykokoll in γ/cm^3 Ansatz	
Sofort enteweisst	41,5	
Serum allein	56,0	} In Serum
Brenztraubensäure m/100 . . .	66,5	
Brenztraubensäure m/50 . . .	75,2	
	Nach 4 Stunden bei 38° in O ₂	
Puffer allein	57,7	} In Pufferlö- sung
Brenztraubensäure m/100 . . .	58,5	
Brenztraubensäure m/50 . . .	56,5	

Der Vergleich zwischen den beiden Reihen zeigt, dass mit dem Serum offenbar ein Faktor zugeführt wird, der für die Reaktion notwendig ist und durch das Suspendieren in Pufferlösung zu sehr verdünnt wird. Da vom Serum immer nur verhältnismässig kleine Mengen zur Verfügung stehen, auch der hohe Eiweissgehalt beim Verarbeiten störend wirkt, wurde ein Kochsaft aus Muskulatur hergestellt. Dieser enthielt den in der Pufferlösung fehlenden Faktor ebenfalls.

¹⁾ *A. Szent-György*, Z. physiol. Ch. 236, 1 (1935).

Glykokollbildung aus Brenztraubensäure und Ammoniumchlorid.

Zur Bereitung des Kochsaftes wurde die gut zugängliche Muskulatur der Katze abgesehnt und mit der Schere zerkleinert. Die Stückchen wurden mit *Krebs-Ringer*-Phosphat überdeckt und 15 Minuten am Rückflusskühler gekocht. Nach dem Filtrieren erhielt man eine klare, gelbliche Flüssigkeit, die durchschnittlich 22 γ Glykokoll im cm^3 enthält. In solchem Kochsaft suspendierter ungewaschener Hackbrei (*Latapie-Mühle*) bildete nach Zusatz von m/60 Brenztraubensäure 13% mehr Glykokoll als ohne Zusatz:

	Glykokoll in γ/cm^3 Ansatz	
Kochsaft allein	62, 63	} 4 Stunden bei 38° in O ₂
Kochsaft mit m/60 Brenztraubensäure	71, 73	

Durch Zugabe von m/50 DL-Serin und m/100 L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Leucin, L-Alanin und L-Prolin zu den Brenztraubensäureansätzen liess sich keine zusätzliche Steigerung erreichen. Diese Verbindungen kommen daher wohl nicht als Ammoniakdonatoren für die Reaktion in Frage. Dagegen lässt sich durch Beimischung äquivalenter Mengen Ammoniumchlorid die Glykokollsynthese selbst in stark ausgewaschenen Schnitten noch erheblich steigern. Die folgende Tabelle enthält Versuche mit 5mal ausgewaschenen Schnitten. Die Waschflüssigkeit war Pufferlösung, die Schnitte wurden 8mal 2 Minuten mit einem Rührwerk schnell darin bewegt. Ein *Warburg*-Gefäss enthielt in 3 cm^3 durchschnittlich 150 mg Trockensubstanz, pro Ansatz und Stunde war der Sauerstoffverbrauch 400 mm^3 .

	in Sauerstoff		in Stickstoff	
	Glykokoll in γ/cm^3 Ansatz			
Sofort enteiweisst	32,5		32,5	
4 Stunden bei 38°:				
Kochsaft allein	38,5	37,5	49,5	51,0
m/60 NH ₄ Cl	41,5	—		
m/60 Brenztraubensäure	32,0	34,5	36,0	33,5
m/60 Brenztraubensäure + m/60 NH ₄ Cl	50,0	47,2		
Sofort enteiweisst	37,5		37,5	
4 Stunden bei 38°:				
Kochsaft allein	45,0		61,0	
NH ₄ Cl m/50	44,0		60,0	
Brenztraubensäure m/50	40,5		58,5	
m/50 Brenztraubensäure + m/50 NH ₄ Cl	51,5		55,0	

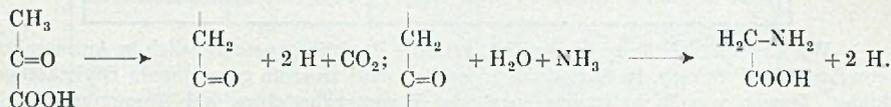
Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, geht die Reaktion ausschliesslich in Anwesenheit von Sauerstoff vor sich. In Stickstoffatmosphäre wird zwar im ganzen mehr Glykokoll gebildet, Zugabe von Brenztraubensäure oder Brenztraubensäure und Ammoniumchlorid steigert die Synthese aber nicht. Das anaerob entstehende Glykokoll muss also aus anderen Quellen stammen. Nach Zugabe von m/1000 Adenosinriphosphorsäure wurde Hemmung der Glykokollbildung beobachtet; alle Ansätze, die ATP enthielten, blieben hinter denen mit reinem Kochsaft zurück. Es sei hier noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, dass positive Versuche nur mit Lebern von Tieren erhalten wurden, die ausgiebig (2 Tage) gehungert hatten. Sobald in den enteiweisssten Extrakten Glykogen als milchige Trübung sichtbar war, wie oft nach einem Tag Hunger, war kaum Glykokollbildung aus Brenztraubensäure nachzuweisen. Das ist erklärlich, da in den Schnitten rege Glykolyse vor sich geht und dabei aus präformiertem Glykogen das 10 bis 20fache der zugesetzten Brenztraubensäure gebildet werden kann.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Exzision kleiner Leberstücke ist für die Untersuchung des Kohlehydratstoffwechsels schon von *Cori & Pucher*¹⁾ und *Molitor & Pollak*²⁾ herangezogen worden. Der Aminosäurestoffwechsel wurde meines Wissens in dieser Art noch nicht untersucht. Dass es sich bei der Beeinflussung des Aminosäuregehalts der Leber durch die injizierten Substanzen nicht um Artefakte handelt, geht aus den Kontrollexperimenten mit Kochsalzlösung und den Versuchen, wo sich die bekannte Alaninbildung aus Brenztraubensäure nachweisen liess, einwandfrei hervor. Ausserdem spricht gegen eine solche Annahme, dass eine Bildung von Glykokoll aus Brenztraubensäure auch mit der *Warburg*-Methode in Leberschnitten nachgewiesen werden konnte.

In den Versuchen mit Katzenleberschnitten hat sich herausgestellt, dass zur Glykokollsynthese aus Brenztraubensäure *in vitro* folgende Bedingungen erfüllt sein müssen: 1. Die Tiere müssen vor der Leberentnahme 2 Tage hungern. 2. Die Gasatmosphäre muss Sauerstoff enthalten. 3. Ein noch nicht definierter, in Serum und Muskelkochsaft enthaltener Faktor muss zugegen sein. 4. Zu stark ausgewaschenen Schnitten muss Ammoniumchlorid als Ammoniakdonator zugegeben werden.

Zum Reaktionsmechanismus kann folgendes gesagt werden: Unwahrscheinlich ist, dass aus Brenztraubensäure zuerst Serin entsteht und dieses dann in Glykokoll umgewandelt wird. Gegen eine solche Reaktionsweise sprechen vor allem unsere Ernährungsversuche. Fanden wir doch nach Fettfütterung für das Glykokoll der Rattenleber durchschnittlich 28,6 mg%, für das Serin 25,7 mg%, bei der Kohlehydratfütterung aber für Glykokoll 28,5 mg% und für Serin nur 17,6 mg%. Würde die Brenztraubensäure zuerst in Serin übergehen und dieses dann Glykokoll liefern, wäre eine solche Differenz der Werte nicht möglich. Viel grösser ist die Wahrscheinlichkeit für die Aminierung eines aus Brenztraubensäure gebildeten 2-C-Körpers. So liesse sich die Anlagerung von Ammoniak an das von *Martius*³⁾ postulierte Radikal vorstellen:



Die Reaktion würde einen Wasserstoffacceptor benötigen.

Untersuchungen über die Fähigkeit von Essigsäure, Acetylphosphat und Acetaldehyd zur Glykokollbildung sind im Gange. Ausserdem soll versucht werden, die Reaktionsbedingungen im *Warburg*-Versuch besser kennen zu lernen und günstiger zu gestalten.

¹⁾ C. F. Cori & G. Pucher, J. Pharmacol. exp. Therap. **21**, 377 (1923).

²⁾ H. Molitor & L. Pollak, A. exp. Pharmac. **154**, 280 (1930).

³⁾ C. Martius, Z. physiol. Ch. **279**, 96 (1943).

Zusammenfassung.

1. In Rattenleberhomogenat wird aus zugesetztem DL-Serin aerob und anaerob Glykokoll gebildet.

2. Es wird eine Methode beschrieben, die Konzentration von freien Aminosäuren der Leber während einer Stunde am lebenden Tier zu messen. Die Aminosäuren werden in nacheinander exzidierten Leberstückchen bestimmt. Der Einfluss injizierter Substanzen auf den Aminosäuregehalt des Organes kann auf diese Weise festgestellt werden.

3. In der Leber von lebenden Katzen kann die Konzentration von freiem Glykokoll durch Injektion von Brenztraubensäure auf über das Doppelte erhöht werden. Gleichzeitig verdoppelt sich der Alaningehalt. In Kontrollexperimenten sinkt der Glykokoll- und Alaningehalt langsam und kontinuierlich ab.

4. Nicht ausgewaschene Schnitte von Katzenleber vermögen aus Brenztraubensäure Glykokoll zu bilden. Werden sie ausgewaschen, so tritt die Glykokollsynthese erst auf, wenn noch Ammoniumchlorid hinzugefügt wird.

5. Für die Glykokollbildung ist ein in Serum und Muskelkochsaft enthaltener Faktor notwendig. Sie ist ausserdem an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden und kann bei höherem Glykogengehalt der Leber nicht nachgewiesen werden.

Fräulein *N. Karlen* danke ich für ihre Hilfe bei den Versuchen.

Physiologisch-chemisches Institut
der Universität Basel.

36. Die Messung von Oberflächenspannungen nach der Ringmethode mit neuen apparativen Hilfsmitteln

von **B. Stahlberger** und **A. Guyer**.

(26. XII. 49.)

Die Messung von Oberflächenspannungen wird bei vielen physikalisch-chemischen Untersuchungen zum nützlichen Hilfsmittel, wenn es Erscheinungen zu erfassen und zu beurteilen gilt, die von den Oberflächeneigenschaften der beteiligten Stoffe abhängig sind. In vielen Fällen handelt es sich bei diesen Stoffen um reine Flüssigkeiten oder Lösungen. Um ihre Oberflächenspannung zu bestimmen, steht eine ganze Reihe von Methoden zur Verfügung, deren eingehende Besprechung man im Buche von *A. Weissenberger*¹⁾ findet.

¹⁾ *A. Weissenberger*, *Physical Methods of Organic Chemistry*, Vol. I (1945).

Die Ringabreissmethode ist die heute wohl am meisten angewendete. Sie ist für die Messung von Oberflächenspannungen, weniger aber für Grenzflächenspannungen, universell anwendbar. Mit geeigneten apparativen Mitteln ausgeführt, ist sie sehr zuverlässig und rasch. Voraussetzung ist, dass zur sorgfältigen Messung die nötigen Korrekturen nach der von *Harkins*¹⁾ gründlich studierten und ausgearbeiteten Theorie berücksichtigt werden. Wie kaum bei einer andern Messmethode, ist die Wartung und Reinigung der mit den zu messenden Flüssigkeiten in Kontakt kommenden Apparateile leicht und mühe-los. Vor allem aber liefert die Ringmethode aus den Messdaten absolute Werte der Oberflächenspannung.

Bei der Entwicklung der Ringmethode bot die apparative Gestaltung am meisten Schwierigkeiten. Es stellt sich das Problem, den Ring unter langsam und kontinuierlich zunehmender messbarer Spannung von der Flüssigkeitsoberfläche abzuziehen, um den maximalen Zug vor dem Abreissen des Ringes festzustellen. Durch eine spezifische Formänderung des hochgehobenen Flüssigkeitsvolumens erreicht die Spannung ihr Maximum nicht bei jener Ringhöhe, bei welcher dieser abreisst, sondern stets und oft bedeutend früher. Diese Erscheinung rührt von der ständigen Formänderung der hochgehobenen Flüssigkeitssäule unter dem Einfluss der Oberflächenspannung her. Der geometrischen und mathematischen Erfassung dieser Vorgänge widmete *Harkins* volle Aufmerksamkeit.

Für die apparative Lösung des Problems ergeben sich die folgenden Forderungen:

1. Die maximale Spannung vor dem Abreissen des Ringes muss messbar sein.
2. Die Spannungszunahme hat langsam, dauernd und gleichmässig zu erfolgen.
3. Das Erzeugen der Spannung durch Senken des Flüssigkeitsspiegels oder Heben des Ringes muss erschütterungsfrei vor sich gehen.

Um diesen Bedingungen zu genügen, hat *Harkins* ein Präzisionsinstrument geschaffen, unter Zuhilfenahme einer hochempfindlichen Kettenwaage mit beträchtlichem Aufwand an zusätzlichen mechanischen Einrichtungen. Aus seinen eigenen Ausführungen geht aber hervor, dass das Arbeiten mit diesem Apparat ausserordentlich heikel ist. Darnach scheint es ein wahres Kunststück, die maximale Spannung messbar zu erfassen. Doch waren auf diesem Wege Resultate zu erreichen, deren Fehler unter $\pm 0,25\%$, bei ganz sorgfältigem Arbeiten unter $\pm 0,1\%$ liegen sollen.

Das verbreitetste Instrument für Oberflächenspannungsmessungen nach der Ringmethode ist das Tensiometer nach *Du Noüy*. Zur

¹⁾ *W. D. Harkins*, *Am. Soc.*, **52**, 1751 (1930); *A. Weissenberger*, loc. cit., Seite 149.

Erzeugung und Messung der Spannung wird an Stelle der Waage ein Torsionsdraht verwendet. Sowohl bei dem rein manuell bedienten, wie bei dem halbmechanisierten *Du Noüy*-Tensiometer wird vermutlich nicht die maximale Spannung erfasst, weil die Kraftmessung im Moment des Abreissens des Ringes erfolgt. Meist ist durch die manuelle Bedienung keine genügende Koordination der zweifachen Bewegung — Horizontalhalten des Waagebalkens bzw. des Hebelarmes der Torsionswaage und Senken oder Heben des Flüssigkeitsspiegels — gewährleistet. Das System gerät in Schwingungen, und eine sehr genaue Messung scheint nicht möglich. *Harkins* empfiehlt daher das Instrument nur für Messungen mit kleineren Ansprüchen an Genauigkeit.

Im Verlaufe eigener Bemühungen, neue apparative Mittel zu finden zur raschen und zuverlässigen Messung von Oberflächenspannungen nach der Ringmethode, fiel unsere Aufmerksamkeit auf eine neue Analysenwaage, wie sie von der Firma *Mettler* hergestellt wird. Diese ist nach neuen Prinzipien konstruiert und gestattet in einem gewissen Bereich eine kontinuierliche Wägung. Bei der optischen Ablesevorrichtung erscheint auf einer Mattscheibe eine gleitende Skala von 100 Teilstrichen, die je nach Einstellung der Empfindlichkeit der Waage 1 g bzw. 100 mg umfassen. Die Milligramme bzw. die Zehntelmilligramme lassen sich zwischen den Teilstrichen leicht schätzen.

Diese Waage erschien uns nach gewissen Anpassungen als das zweckmässige Instrument zur Messung von Oberflächenspannungen nach der Ringmethode. Die Waagschale wurde dazu ersetzt durch einen genau gleich schweren Ringsatz, bestehend aus Kompensationsgewicht, Ring und Aufhängevorrichtung. Als Zusatzapparat musste ein Messtisch, der das Gefäss mit der zu messenden Flüssigkeit trägt, geschaffen werden, der ein absolut erschütterungsfreies Absenken ermöglicht. Dazu eignete sich eine Vorrichtung nach Art einer Glycerinbremse, wobei sich der Kolben, der den Messtisch trägt, unter dem Einfluss der Schwerkraft sehr langsam und regelmässig senkt. Die Schmierung der Gleitlager durch die Bremsflüssigkeit selbst gewährleistet eine völlig vibrationsfreie Bewegung. Das Heben des Messtisches bis zum Eintauchen des Ringes geschieht dank des im Kolben eingebauten selbsttätigen Ventils sehr leicht von Hand. Der ganze Zusatzapparat findet in der für die Messung vollständig abgeschlossenen Waage Platz (siehe Fig. 1).

Die Messung selbst läuft ohne jede Bedienung des Apparates ab, und der Beobachter hat lediglich auf der optischen Ablesevorrichtung die im Verlaufe der Messung auftretende maximale Spannung in Milligrammen abzulesen. Die Messwerte werden durch die im folgenden gegebene Rechnung in die Oberflächenspannung von der Dimension Dyn/cm übergeführt.

Ist die Waage auf hohe Empfindlichkeit eingestellt, wo die optische Skala nicht für den ganzen Messbereich genügt, so müssen vor der Messung die notwendigen, evtl. in einem Vorversuch ermittelten automatisch betätigten Gewichte abgehoben werden.

Auf den Einbau eines Thermostaten für Messungen bei anderer als Raumtemperatur wurde bis anhin verzichtet, wenn gleich dies ohne Schwierigkeit möglich ist.

Der Messring erheischt besondere Sorgfalt bei der Handhabung und Reinhaltung. Seine exakteste Ausmessung ist Voraussetzung für genaue Bestimmungen. Er besteht aus einer Legierung von Platin mit 10% Iridium, wobei das letztere dem Platin eine gewisse Härte verleiht. Die Drahtdicke wurde unter dem Mikroskop ausgemessen und ein Durchschnittswert ermittelt. Der Ringdurchmesser wurde vermittelst einer Präzisionsschublehre

bestimmt. Die Aufhängung am Ringbügel aus derselben Legierung muss eine genau horizontale Lage der Ringebene gewährleisten.

Die Messung einer vorbereiteten Lösung dauert mit Einschluss der Reinigung von Ring und Gefäss kaum länger als fünf Minuten. Die als Tensiometer eingerichtete Waage wird durch einfachen Ersatz des Ringsystems und des Messtisches durch die Waagschale wieder für analytische Wägungen benützbar.

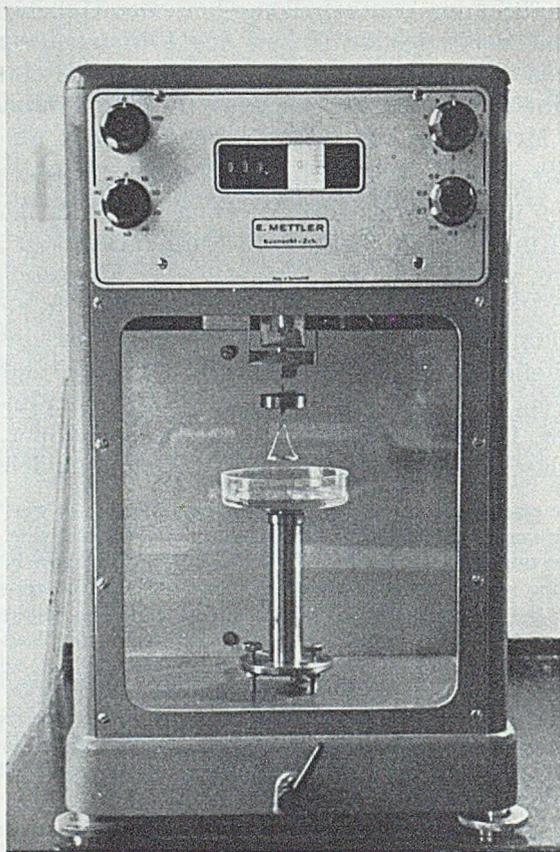


Fig. 1.

Zur Messung von Oberflächenspannungen eingerichtete Analysenwaage.

Auf eine ausführliche Besprechung der Auswertung der Messungen unter Berücksichtigung des in der Formel auftretenden Korrekturfaktors soll hier verzichtet werden (siehe hiezu *Weissenberger*, loc. cit.). Eine knappe Darstellung des Rechnungsganges für einige eigene Bestimmungen dürften zum Verständnis der Methode beitragen.

Die Berechnung erfolgt nach der folgenden Formel

$$\sigma = \frac{g}{4\pi} \cdot \frac{GF}{R};$$

- dabei bedeuten σ = Oberflächenspannung in Dyn/cm
 g = Erdbeschleunigung, 980 g cm sec⁻²
 G = Maximale Spannung in Grammen
 R = Mittlerer Ringradius in Zentimeter
 F = Korrekturfaktor nach *Harkins*

Der Korrekturfaktor F berücksichtigt die Abweichung der geometrischen Form der gehobenen Flüssigkeitsmenge vom Zylinder, für den die Gleichung ohne den Faktor F genügen würde. Der Faktor F ist abhängig von der Höhe des Ringes über dem Flüssigkeitsspiegel, der Spannung bzw. dem Gewicht der gehobenen Flüssigkeitssäule, sowie den Ringdimensionen.

$$F = f(R^3/V, R/r), \text{ oder } f(R^3 \rho/G, R/r),$$

- Dabei bedeuten ρ = Spezifisches Gewicht der Flüssigkeit
 r = Halbmesser des Ringdrahtes in Zentimeter

Für die Funktion F hat *Harkins* umfangreiche Tabellen für Ringe verschiedener Dimensionen aufgestellt, deren Werte für den Ring unserer Messungen in Tabelle 1 zusammengefasst sind:

Tabelle 1.

Werte des Korrekturfaktors F für den Ring mit den Daten

$$R = 0,968 \text{ cm, } r = 0,0335 \text{ cm, } R/r = 28,90; V = \frac{G}{\rho}.$$

R ³ /V	F						
0,30	1,008	0,52	0,932	0,88	0,882	1,80	0,814
31	1,002	53	930	90	880	85	811
32	0,997	54	928	92	877	90	809
33	992	55	926	94	875	95	806
34	987	56	924	96	873	2,00	804
35	982	57	923	98	871	10	800
36	978	58	921	1,00	869	20	795
37	974	59	920	05	865	30	791
38	970	60	918	10	860	40	787
39	967	62	915	15	856	50	784
40	963	64	912	20	852	60	780
41	960	66	909	25	848	70	776
42	957	68	906	30	844	80	772
43	954	70	903	35	840	90	768
44	951	72	900	40	837	3,00	765
45	948	74	898	45	834	10	761
46	945	76	895	50	831	20	758
47	942	78	893	55	828	30	754
48	940	80	890	60	825	40	751
49	938	82	888	65	822	50	747
50	936	84	886	70	819	—	—
51	934	86	884	75	816	—	—

Zur Prüfung der Messmethode wurden die Oberflächenspannungen einer Reihe von Lösungen wässriger Äthylalkohols gemessen und Literaturwerten gegenüber gestellt. Die Alkoholkonzentration wurde pyknometrisch bestimmt, wodurch gleichzeitig das spezifische Gewicht für die Berechnung des Korrekturfaktors zur Verfügung stand. Die Messdaten und die daraus berechneten Oberflächenspannungen sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Oberflächenspannung wässriger Lösungen von Äthylalkohol (bei 25°).

$$\begin{aligned} \text{Ringdimensionen: } R &= 0,968 \text{ cm} & R^3 &= 0,907 \text{ cm}^3 \\ r &= 0,0335 \text{ cm} & R/r &= 28,90 \end{aligned}$$

$$\text{Formel: } \sigma = \frac{g}{4 \pi R} G \cdot F = 80,65 \cdot G \cdot F$$

Alkohol- gehalt	Spezi- fisches Gewicht	Maximale Spannung	Korrekt- urfaktor	Oberflächen- spannung		Abweichung vom Literaturwert	
				gemessen	Litera- tur*)		
				σ Dyn/cm	σ Dyn/cm	Dyn/cm	%
Wasser (25° C)	0,998	1,026	0,882	73,1	72,9	+ 0,2	0,27
(19° C)	0,997	1,012	0,880	71,8	71,9	- 0,1	0,14
2,15	0,996	0,896	0,869	62,8	62,7	+ 0,1	0,16
5,0	0,991	0,800	0,858	55,3	55,5	- 0,2	0,36
8,9	0,985	0,713	0,848	48,7	48,5	+ 0,2	0,41
16,0	0,975	0,658	0,841	44,6	44,7	- 0,1	0,22
18,0	0,972	0,5905	0,831	39,5	39,5	± 0	± 0
29,1	0,955	0,498	0,816	32,7	33,0	- 0,3	0,9
37,65	0,941	0,4625	0,811	30,4	30,0	+ 0,4	1,3
56,8	0,897	0,4206	0,807	27,3	27,0	+ 0,3	1,1
75,5	0,855	0,3913	0,804	25,3	25,0	+ 0,3	1,2
93,7	0,806	0,3616	0,803	23,4	23,0	+ 0,4	1,7

*) Die Literaturvergleichswerte stammen aus Internat. Crit. Tables, Bd. IV, Seite 467, zitiert aus *Bircumshaw*, Soc. 121, 887 (1922).

Die Werte für die Maximalspannung stellen den Durchschnitt von jeweils 5 Messungen dar. Eine Fehlbestimmung von 1 mg ergibt in der daraus errechneten Oberflächenspannung eine Differenz von ca. 0,1 Dyn/cm.

Die Literaturwerte, die zum Vergleich herangezogen wurden, messen sich eine Genauigkeit bei von $\pm 0,3$ Dyn/cm. Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, gehen nur zwei von den zwölf ermittelten Oberflächenspannungen um 0,1 Dyn/cm über diese Fehlergrenzen hinaus. Die beschriebene, apparativ modifizierte Ringabreissmethode zur Ermittlung von Oberflächenspannungen dürfte für betriebstechnische Zwecke allgemein geeignet sein und auch für viele wissenschaftliche Bestimmungen genügen.

Zusammenfassung.

Zur Ermittlung von Oberflächenspannungen wurde die Ringabreissmethode studiert. Ein zweckmässiges Instrument zur Erfassung der dabei zu messenden sog. maximalen Spannung wurde in einer speziellen Analysenwaage gefunden, die nach dem Prinzip

der Gewichtskompensation konstruiert ist und eine kontinuierliche Wägung über einen genügend grossen Gewichtsbereich mit der geforderten Genauigkeit gestattet. Mit Hilfe eines einfachen Zusatzgerätes gestaltet sich die Oberflächenspannungsmessung automatisch und recht genau. Die Brauchbarkeit der Methode wird durch eine Reihe von Messungen belegt.

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

37. Contributo alla conoscenza dell'essenza concreta di gaggia farnese (*Acacia farnesiana Willd.*)

di Domenico La Face.

(6 I 50)

La profumeria utilizza le essenze concrete — raramente le pomate — dei fiori della gaggia farnese (*Acacia farnesiana Willd.*) e della gaggia romana (*Acacia cavenia Hook. et Arn.*), Mimosacee arbustive le cui culture da profumeria si sono estese nell'Europa Meridionale durante il XIX secolo¹). Nonostante l'interesse destato dal loro profumo ed il costo di esse, queste essenze sono state solo sommariamente esaminate.

Walbaum ha studiato la pomata di gaggia preparata in India per digestione nei grassi fusi e l'essenza concreta di fabbricazione provenzale ottenuta per estrazione eteropetrolica²).

Altri dati sono stati esposti in pubblicazioni del Bollettino *Schimmel & C.*³) e da *Kerschbaum* che nella stessa epoca ha scoperto nella gaggia la presenza del farnesolo⁴), ma senza pubblicare, al riguardo, alcuna prova sperimentale.

La porzione di essenza volatile contenuta nei fiori è molto bassa, dell'ordine di 40—50 g per 100 kg, e la quantità di fiori trattata annualmente nel Mondo è di circa 15 tonnellate, il che corrisponde ad una produzione totale compresa tra 6 e 7,5 kg di essenza distillabile in corrente di vapore d'acqua.

Le essenze della gaggia farnese si differenziano da quelle della gaggia romana per il fatto che nelle une è assente l'eugenolo che, viceversa, costituisce il 40—50% delle altre; ma, secondo *Walbaum*, ambedue conterrebbero il salicilato di metile. È stata inoltre svelata, nei prodotti della gaggia farnese, la presenza dell'aldeide benzoica, dell'alcool benzilico, del paracresolo, dell'aldeide anisica, di un'aldeide a odore caprico dal semicarbazone F. 97°, di un chetone a odore di violetta dal semicarbazone F. 143° e dal p-bromofenilidrazone F. 103—107°, di un chetone a odore di menta dal semicarbazone F. 177—178° e, infine, di un'aldeide a odore cuminico dal semicarbazone F. 200—201°.

Sembrava pure verosimile la presenza del linalolo et del geraniolo, e *Kerschbaum* aveva isolato dall'essenza il farnesolo.

¹) Per quanto riguarda la produzione e i caratteri analitici di queste essenze, confrontare: *Naves & Mazuyer*, *Les Parfums naturels*, p. 199—202, Paris 1939, e *Natural Perfume Materials*, p. 165—168, New York 1947.

²) J. pr. [2] 68, p. 249 (1903).

³) Ber. *Schimmel*, ott. 1899, 58; apr. 1901, 16; apr. 1903, 17; apr. 1904, 21.

⁴) *Haarmann & Reimer*, Br. Tedesco 149.603 (1902); Frdl. 7, 762 (1905); Br. Francese 328.146 (1902); Br. U.S.A. 735.978 (1903).

Io ho studiato l'assoluta, cioè la parte solubile nell'alcool, di una concreta di gaggia farnese ottenuta a Reggio Calabria (Italia) con un rendimento di 0,45 %.

I caratteri di essa, I, differiscono sensibilmente da quelli delle essenze assolute prodotte sulla costa Ligure, III, descritte da G. *Rovesti*¹⁾. Essi sono invece più vicini a quelli di una assoluta di origine provenzale, II, descritta da Y. R. *Naves*²⁾.

I. D_4^{20} : 0,9725	n_D^{20} : 1,5033	$[x]_D$: +12,92°	I. acidi: 45,9	I. esteri: 19,1
II. D_4^{20} : 0,984	—	—	I. acidi: 62,8	I. esteri: 33,5;
			I. esteri dopo formilazione a freddo: 181,3	
III. D_4^{20} : 1,0165—1,066				
	n_D^{20} : 1,514—1,521	—	I. acidi: 18—55	I. esteri: 97—243 ³⁾

Egualmente molto differenti da quelli di I e II, sono i caratteri della maggior parte delle assolute commerciali⁴⁾.

Allo scopo di sottrarre i prodotti acidi ed i derivati fenolici agli inconvenienti dell'idrolisi e dell'alcoolisi, non ho seguito la tecnica abituale di studio delle assolute, che consiste nell'isolare direttamente le frazioni volatili per distillazione in corrente di vapore d'acqua o per codistillazione con un poliolo. Ho estratto, invece, il complesso dei prodotti acidi o fenolici ed almeno una parte dei costituenti lattonici, trattando l'assoluta con una soluzione acquosa di idrato di sodio: soltanto dopo ho effettuato la distillazione in corrente di vapore d'acqua surriscaldato, a pressione ridotta, per isolare i composti odoranti neutri. Ed infine, poichè nelle essenze concrete l'esistenza dei derivati degli alcoli e dei fenoli non è sempre limitata ad esteri volatili di acidi inferiori, ho saponificato la frazione neutra non volatile nell'intento di ottenere, eventualmente, nuove porzioni di alcoli o di fenoli allo stato libero.

Questo studio mi ha condotto alle constatazioni che saranno esposte più avanti, rimaste in gran parte incomplete malgrado la forte quantità di essenza presa in esame ed i mezzi di indagine estesi alle tecniche microchimiche.

Il fatto più notevole è l'assenza del salicilato di metile, sebbene sia stato trovato, in piccola quantità, l'acido salicilico. L'assenza del salicilato di metile, che *Walbaum* ha invece trovato nell'assoluta di origine provenzale, può attribuirsi a caratteri stagionali, o piuttosto

¹⁾ Profumi Italici 3, 277 (1925).

²⁾ *Naves & Mazuyer*, Les Parfums naturels 198, (1939).

³⁾ Nessun altro autore ha osservato indici di esteri così alti (*Naves & Mazuyer*, op. cit. p. 201); neppure nel caso dell'assoluta di gaggia romana, che si può sospettare mescolata all'assoluta di gaggia farnese.

⁴⁾ Il prezzo di vendita delle essenze di gaggia — come si è stabilito comunemente — corrisponde alla metà del costo della materia prima; il che deve indurre a fare delle riserve nell'interpretazione dei caratteri analitici e della costituzione chimica dei prodotti commerciali.

al fatto che la gaggia romana, la cui essenza è particolarmente ricca in esteri, non è coltivata nella regione di Reggio Calabria, mentre le due specie crescono vicine in Provenza e fioriscono ambedue in ottobre-novembre.

Un altro fatto importante è la presenza, accanto ai ceridi abituali dei prodotti dei fiori, di forti quantità di acido palmitico libero (circa il 50% degli acidi liberi dell'assoluta).

Degli altri acidi presenti ho potuto identificare l'acido isobutirrico, l'acido benzoico, l'acido salicilico.

L'essenza contiene inoltre un cresolo ed uno o più etilfenoli.

La presenza della cumarina è stata osservata più volte nel corso dello studio.

Sembra, comunque, che l'odore della gaggia sia in gran parte dovuto al complesso odorante: cresolo, etilfenolo, cumarina.

Non ho riscontrato il chetone a odore di menta, la cui presenza è stata segnalata dai chimici della Ditta *Schimmel*; ho invece isolato, sotto forma di fenilsemicarbazoni, un ossiacetofenone ed un chetone idroaromatico a odore di violetta.

Sebbene le microanalisi del derivato di quest'ultimo non siano state soddisfacenti, e nell'impossibilità di purificare maggiormente il prodotto, ottenuto in piccolissima quantità, secondo i dati esposti nella parte sperimentale, sono indotto a supporre che si tratti dell' α -ionone otticamente attivo, costituente già incontrato in svariati prodotti odoranti vegetali da *Y. R. Naves & G. R. Parry*¹⁾ e da *Y. R. Naves*²⁾.

Accanto ai chetoni, la frazione neutra volatile dell'assoluta di gaggia contiene in quantità rilevante il n-eicosano³⁾, C₂₀H₄₂, l'alcool benzilico ed i suoi esteri, il linalolo, l' α -terpineolo e il nerolidolo o il farnesolo (o tutti e due).

Questo lavoro ha potuto essere effettuato grazie all'appoggio del *Consiglio Nazionale delle Ricerche di Roma* e del *Centro di studio per le essenze di Reggio Calabria* (Dir. Prof. *Fr. La Face*), e della Ditta *L. Givaudan & Cie S.A.*, Vernier-Genève, che ha messo i suoi laboratori a disposizione. Esso è stato ispirato e guidato dal Dr. *Yves-René Naves*.

Parte sperimentale.

Le microanalisi sono state eseguite da Mlle *D. Hohl* (*L. Givaudan & Cie*, Vernier).

I punti di fusione sono corretti. An equivale a $(n_D - n_C) \times 10^4$.

Essenza concreta di gaggia farnese. Essa è stata prodotta nei dintorni di Reggio Calabria nell'ottobre 1948 con tutte le garanzie di autenticità. L'assoluta, da me preparata nel modo abituale con un rendimento del 36%, si presentava come un prodotto brunoverdastro, della consistenza del miele e dall'odore possente, tenace e caratteristico.

$$d_4^{20}: 0,9725; n_D^{20}: 1,5033; An: 121,6; [\alpha]_D: +12,92^\circ (CCl_4; c = 10,02)$$

I. acidi: 45,9; I. esteri: 19,1

¹⁾ *Helv.* **30**, 421 (1947).

²⁾ *Helv.* **32**, 1065 (1949).

³⁾ Il n-eicosano è stato ricordato da *Prophète* tra i costituenti delle cere di rosa (Bl. [4] **39**, 1607 (1926)); ma secondo *Chibnal* e coll. (*Biochem. J.* **28**, 2189 (1934)) questo complesso non sarebbe che un miscuglio di paraffine.

Isolamento dei fenoli. 519 g di assoluta sono stati trattati con $4 \times 1250 \text{ cm}^3$ di soluzione di idrato di sodio al 3%, in presenza di etere. Le soluzioni alcaline riunite sono state estratte con etere in un percolatore per 45 ore. Si sono così ottenuti 9 g della frazione fenolica che, rettificata, ha dato:

- 0,4 g; $E_{2,8} = 70-75^\circ$, a odore cresolico;
 2,15 g; $E_{2,8} = 80-95^\circ$, a odore che richiama quello del p-etilfenolo;
 0,75 g; $E_{2,8} = 106-128^\circ$, a odore di cuoio di Russia e di castoreo;
 5,0 g; di residuo ceroso, dall'odore debole di cuoio.

Le due prime frazioni, trattate col cloruro di dinitro-3-5-benzoile e piridina, hanno dato dei nitrobenzoati. Della prima frazione si sono ottenuti 0,3 g di estere che, dopo ricristallizzazione dall'alcool, fondeva a $103,5-104^\circ$.

$C_{14}H_{10}O_6N_2$	Calc.	C 55,63	H 3,335	N 9,27%
(302,236)	Trov. ,,	55,66	,, 3,30	,, 9,20%

La seconda frazione ha dato 0,4 g di un estere fondente, dopo eguale trattamento, a $85-86^\circ$.

$C_{15}H_{12}O_6N_2$	Calc.	C 56,96	H 3,82	N 8,86%
(316,262)	Trov. ,,	56,94	,, 3,41	,, 8,56%

Isolamento degli acidi e dei lattoni. La soluzione alcalina che, dopo 45 ore, non cedeva più quantità apprezzabili di prodotto all'etere, è stata saturata con anidride carbonica e quindi sottoposta alla percolazione prolungata a freddo, separando ogni 8-9 ore l'estratto ottenuto e saturando di nuovo con anidride carbonica dopo 3-4 operazioni. L'estrazione si è protratta per 43 giornate di 8-9 ore, sino a quando, cioè, l'entità del prodotto estratto è divenuta insignificante.

Sin dal principio gli estratti emanavano odore di cumarina e presentavano un aspetto ceroso; poichè vari saggi preliminari avevano dimostrato che la loro composizione non differiva sensibilmente, sono stati riuniti. Il totale pesava 108 g. Il prodotto, distillato, ha dato:

- 8,25 g liquido, $E_{2,7} = 56-125^\circ$;
 58,65 g butirroso, $E_{2,7} = 180-197^\circ$; F. $55-58^\circ$;
 32,4 g residuo a odore di acidi grassi.

La seconda frazione era costituita essenzialmente da acido palmitico, identificato con la preparazione del palmitato di benziltiuronio che, ricristallizzato dall'alcool a 95%, fondeva a $139-139,5^\circ$ e dell'anilide fondente, dopo analogo trattamento, a $89-90^\circ$.

$C_{24}H_{42}O_2N_2S$	Calc.	C 68,20	H 10,02	N 6,63	S 7,57%
(422,653)	Trov. ,,	68,48	,, 9,75	,, 6,54	,, 7,69%

$C_{22}H_{37}ON$	Calc.	C 79,70	H 11,25	N 4,23%
(345,532)	Trov. ,,	79,87	,, 11,19	,, 4,21%

La prima frazione era solo parzialmente solubile in una soluzione di idrogeno-carbonato di sodio al 10%: la parte solubile pesava 4,8 g, la parte insolubile 3,3 g.

La parte insolubile, a odore di fieno tagliato e di grassi, è stata trattata con l'ammoniacca¹⁾. Si è ottenuto 0,55 g di prodotti insolubili, che sono stati ripresi con pentano, a $-15/-20^\circ$. Sono rimasti insolubili 0,11 g di un prodotto semicristallino, semiceroso a forte odore di cumarina e di foglie di fico da cui non è stato possibile estrarre un prodotto definito, nè per cristallizzazione, nè per sublimazione sotto vuoto elevato. 0,5 g sono stati disciolti a $+5^\circ$ circa in $1,2 \text{ cm}^3$ di acido nitrico di $d = 1,42$ e, dopo un quarto d'ora, il prodotto è stato precipitato su ghiaccio, asciugato, ricristallizzato in alcool a 50%. Si è ottenuto 0,12 g di un miscuglio eutectico di nitro-6 e di nitro-8-cumarina, fondente a $140-141^\circ$ ²⁾.

$C_9H_5O_4N_4$ (191,138)	Calc.	N 7,33%	Trov.	N 7,51%
--------------------------	-------	---------	-------	---------

¹⁾ Dean, Ind. Eng. Chem. 7, 519 (1915).

²⁾ Dey & Krishnamurti, J. Indian Chem. Soc. 4, 197 (1927).

Isolamento degli acidi. La soluzione scaricata dal percolatore è stata acidificata con acido fosforico sino al viraggio del rosso congo, e gli acidi liberati sono stati estratti con l'etere.

Si sono ottenuti 43 g di un prodotto vischioso e semicristallino a forte odore butirrico e caprilico. Questo miscuglio è stato esterificato a riflusso per 5 ore insieme con 250 cm³ di alcool metilico preventivamente addizionato di 4,6 g di acido solforico. Si sono ottenuti, così, con qualche perdita nelle frazioni più volatili, 39 g di esteri e, dalle loro acque di lavaggio, si sono isolati 2,4 g di acidi a odore predominante di acido acetico (reazione del cacodile affermativa).

Gli esteri sono stati quindi frazionati per distillazione tralasciando i prodotti distillabili al disotto di 130°/3 mm, debolmente odoranti.

Le prime frazioni, più abbondanti (38%), erano costituite da isobutirrato di metile.

L'acido è stato identificato, dopo saponificazione, mediante la preparazione dell'isobutirrato di fenilfenacile F. 89—90°, dopo ricristallizzazione dall'alcool.

C₁₈H₁₆O₃ (282,324) Calc. C 76,57 H 6,43% Trov. C 76,70 H 6,45%

Le frazioni superiori, a odore di benzoato e salicilato di metile, dall'indice di esteri 361,5, sono state trattate con una soluzione di idrato di sodio al 3%.

Sono stati ottenuti 2,25 g di una frazione I costituita prevalentemente da benzoato di metile e 1,4 g di una frazione II ricca di salicilato di metile.

I. $D_4^{20} = 1,0773$; $n_D^{20} = 1,5182$; $\Delta n = 168$

II. $D_4^{20} = 1,1650$; $n_D^{20} = 1,5340$; $\Delta n = 211$

L'acido benzoico è stato identificato per saponificazione e per sublimazione, F. 121,5—122° (in tubo saldato), nonchè per preparazione del benzoato di benziltiuronio F. 166,5—167° (saggio del miscuglio).

L'acido salicilico è stato identificato, dopo saponificazione, mediante la preparazione del salicilato di benziltiuronio, F. 146—147°¹⁾, dopo ricristallizzazione nell'alcool acquoso al 50%.

C₁₅H₁₆O₃N₂S (304,354) Calc. N 9,20 S 10,53% Trov. N 9,13 S 10,12%

La frazione che distillava dopo il benzoato ed il salicilato di metile (E₃ = 125°) e del peso di 2,0 g fondeva a 153—157°. Essa non è stata studiata.

Studio dei costituenti neutri. La frazione di essenza assoluta insolubile nella soluzione di idrato di sodio, del peso di 325 g, è stata sottoposta all'azione di una corrente di vapore surriscaldato a 140° sotto 40—45 mm.

Si sono ottenuti 76 g di distillato ricco di cristalli traslucidi di paraffine. Questo distillato è stato deparaffinato per trattamento con l'alcool etilico a 80% alla temperatura tra -5° et 0°, ottenendo 56 g di prodotti solubili.

La frazione paraffinica ricristallizzata dall'alcool assoluto, a F. 35,5—36,5°, risponde alla composizione centesimale del n-ecosano.

C₂₆H₄₂ (282,53) Calc. C 85,03 H 14,98% Trov. C 84,75 H 15,27%

Crisocopia nella canfora, trovato: P.M. 285; nel ciclopentadecanone, trovato P.M. 292.

Il prodotto deparaffinato aveva i seguenti caratteri: $D_4^{20} = 0,9564$; $\alpha_D = +3,37^\circ$; $n_D^{20} = 1,4951$; $\Delta n = 146$; I. acidi = 11,1; I. esteri = 69,7; alcoli combinati (espressi in alcool benzilico) = 13,45%; alcoli primari (e secondari) liberi, per acetilazione piridinica²⁾ = 23,45%.

Il residuo non volatile presentava: I. acidi = 10,3; I. esteri = 58,25.

52,7 g della frazione deparaffinata sono stati frazionati per distillazione:

¹⁾ Donleavy, Am. Soc. 58, 1005 (1936); Veibel & Lilekund, Bl. [5] 5, 1157 (1938).

²⁾ Naves, Helv. 30, 1613 (1947).

N°	E/mm	Peso	distillato %	D ₄ ²⁰	n _D ²⁰	Δn (Abbe)	α _D
1	40—45/2,5	1,20	2,27	0,8511	1,4840	139	- 0,70
2	45—74/2,8	1,05	4,26	0,9434	1,4948	130	in.
3	74—80/2,8	3,00	9,95	1,0216	1,5071	152	in.
4	80—83/2,8	1,30	12,41	0,9962	1,5031	148	+ 0,40
5	83—90/2,8	0,70	13,73	—	1,4992	153	+ 1,00
6	90—96/2,7	2,40	18,26	1,0065	1,5010	158	+ 2,20
7	96—102/2,7	1,95	21,96	1,0464	1,5065	156	+ 7,70
8	102—104/2,7	3,10	27,84	1,0552	1,5160	171	+ 12,60
9	104—109/2,7	3,35	34,11	1,0627	1,5208	172	+ 10,00
10	109—116/2,7	1,15	36,23	1,0336	1,5191	179	+ 4,25
11	116—140/2,7	1,32	38,73	1,0095	1,5105	165	+ 2
12	140—150/2,7	1,28	41,19	0,9594	1,5028	136	in.
13	150—156/2,7	3,40	47,59	0,9346	1,4965	122	in.
14	156—158/2,7	1,80	51,00	0,9268	1,4950	124	in.
15	158—165/2,7	1,80	54,41	0,9384	1,4979	124	in.
16	165—172/2,7	1,90	58,01	0,9492	1,5000	130	in.
17	172—182/2,7	1,60	61,04	0,9534	1,5029	127	in.
18	182—192/2,7	1,00	62,92	0,9603	1,5060	140	in.
19	192—205/2,7	0,95	64,71	—	1,5089	141	in.
20	205—213/2,7	2,50	69,45	0,9631	1,5119	125	in.
	Res.	13,35	Totale	50,08			

8,1 g delle frazioni 1—6 riunite sono state saponificate per ebollizione di 30 minuti in presenza di 65 cm³ di soluzione alcoolica normale di idrato di sodio. La frazione neutra risultante (5,9 g) è stata trattata per 72 ore, alla temperatura del laboratorio, con 5 g di anidride ftalica et 30 cm³ di piridina anidra. Dopo saponificazione degli esteri ftalici isolati come sali di sodio, si è ottenuto 2,7 g di alcoli ftalizzabili in queste condizioni e 1,8 g di una frazione contenente gli alcoli terziari. I due prodotti sono stati frazionati in palloni di *Widmer*. Il prodotto ftalizzabile ha dato 1,8 g di alcool benzilico quasi puro:

$$E_{1,6} = 75-76^{\circ}; D_4^{20} = 1,0412; n_D^{20} = 1,5392; \Delta n = 175,8;$$

che è stato identificato per preparazione del suo alfofanato, F. 191° (saggio del miscuglio¹⁾), nonché per ossidazione in aldeide benzoica (odore).

Il prodotto non ftalizzabile ha dato una frazione principale (0,9 g) E_{2,2} = 60—62°; D₄²⁰ = 0,8762; n_D²⁰ = 1,4644; Δn = 105,5; α_D²⁰ = +6,42°, a odore di essenza di petit grain saponificata, e di cui 0,5 g trattati con 0,65 g di isocianato di xenile hanno dato, dopo ricristallizzazioni nel benzene, 0,22 g di xeniluretano di linalolo, F. 90—91° (saggio del miscuglio).

$$\begin{array}{l} C_{23}H_{27}O_2N \quad \text{Calc. C } 79,01 \quad H \ 7,81 \quad N \ 4,01\% \\ (349,454) \quad \text{Trov. ,, } 78,86 \quad \text{,, } 7,92 \quad \text{,, } 3,90\% \end{array}$$

Il residuo di distillazione della frazione non ftalizzabile (contenuto nel pallone e nella colonna di distillazione), del peso di 0,44 g, è stato trattato con 0,5 g di isocianato di p-nitrofenile, per 96 ore alla temperatura del laboratorio e poi per un ora a bagno maria, in presenza di 3 cm³ di tetracloruro di carbonio. È stato ottenuto, dopo ricristallizzazione

¹⁾ Vedi *Naves & Grampoloff*, *Helv.* 25, 1508 (1942).

nell'etere di petrolio e nel benzene, 0,16 g di p-nitro-feniluretano dell' alfa-terpinolo, F. = 120—120,5° (saggio del miscuglio).

$C_{17}H_{23}O_4N_2$	Calc. C 63,93	H 7,26	N 8,77%
(319,370)	Trov. ,, 64,28	,, 7,21	,, 8,77%

Le frazioni 7—11 (7,5 g; I. acidi = 8,3; I. esteri = 204,6) che emanavano odori di acetofenone e di lampone, sono state saponificate con una soluzione alcoolica di idrato di sodio a refluxo.

La frazione neutra è stata trattata con 5 g di reattivo P di *Girard & Sandulesco* (cloruro di aceto-idrazide-piridinio). I chetoni rigenerati alla temperatura del laboratorio in ambiente di acido cloridrico 2-n., pesavano 1,1 g e la frazione neutra 4,3 g.

La frazione chetonica, liquido spesso di colore scuro, è stata trattata con 1 g di fenil-4-semicarbazide in presenza di 15 cm³ di alcool metilico e di 1 cm³ di acido acetico.

La miscela grezza dei fenilsemicarbazoni ottenuti, magma vischioso e colloidale, è stato purificato per mezzo di cristallizzazioni nell'alcool metilico ottenendo delle frazioni definite.

I. 0,1 g, F. 172—173°, poco solubile.

$C_{15}H_{16}O_2N_3$	Calc. C 66,9	H 5,62	N 15,6%
(269,294)	Trov. ,, 66,74	,, 5,45	,, 15,43%

Alcuni cristalli, al contatto di una soluzione acquosa bollente di acido ossalico, hanno sviluppato un odore aromatico del tipo di quello dell'acetofenone.

II. 0,03 g, F. = 182—182,5°, più solubile.

$C_{19}H_{25}ON_3$ (311,314)	Cal. C 73,28	H 8,09	N 13,49%
$C_{20}H_{27}ON_3$ (325,547)	.. ,, 73,79	.. 8,37	.. 12,92%
$C_{21}H_{29}ON_3$ (339,466)	.. ,, 74,28	.. 8,62	.. 12,39%
	Trov.,, 73,07	.. 8,15	.. 13,61%

La miscela con il fenilsemicarbazone del *d*- α -ionone F. = 181—181,5°¹⁾, non ha mostrato differenza del punto di fusione.

Alcuni cristalli messi a contatto di una soluzione acquosa bollente di acido ossalico, hanno sviluppato odore di violetta.

I prodotti che non avevano reagito con il reattivo P (4,3 g) sono stati rettificati in corrente di vapore d'acqua surriscaldato a pressione ridotta, nell'apparecchio di *Naves*. Sono stati isolati 3,4 g di prodotti volatili ($D_4^{20} = 0,9281$; $n_D^{20} = 1,5180$) che sono stati frazionati per distillazione in un pallone di *Widmer*.

Le teste (2,1 g) contenevano principalmente dell'alcool benzilico, identificato mediante ossidazione cromica in aldeide benzoica, mescolato probabilmente con alcoli terpenici e con sesquiterpeni.

La frazione seguente (0,45 g), $n_D^{20} = 1,4940$, ossidata con il miscuglio cromatico, ha dato 0,32 g di una frazione aldeidica a odore citrino, da cui si è ottenuto 0,08 g di semicarbazone del farnesal, ricristallizzato dall'alcool metilico, F. 133—134° (saggio del miscuglio). Il prodotto conteneva dunque del nerolidolo, o del farnesolo, o tutti e due.

RIASSUNTO.

Lo studio dell'essenza assoluta preparata a partire dall'essenza concreta della gaggia farnese, *Acacia farnesiana*, fabbricata in Calabria, ha dimostrato l'assenza dell'eugenolo e del salicilato di metile che sono dei costituenti importanti delle essenze della gaggia romana, *Acacia cavenia*.

¹⁾ *Naves*, Helv. 30, 770 (1947).

Sono stati isolati e caratterizzati i composti seguenti: un miscuglio di cresoli, una miscela di etilfenoli, gli acidi butirrico, palmitico, benzoico e salicilico, l'eicosano, un ossiacetofenone, un chetone — dalla formula degli iononi (probabilmente l' α -ionone otticamente attivo). È dimostrata la presenza della cumarina, dell'alcool benzilico, del linalolo, dell' α -terpineolo, del nerolidolo o del farnesolo (o tutti e due) in parte esterificati.

Laboratori di Ricerche di *L. Givaudan & Cie S.A.*,
Vernier-Genève;
Centro di Studio per le essenze, Reggio Calabria (Italia).

38. Systematische Untersuchungen über tuberkulostatisch wirksame primäre Amine

von *G. Brubacher* und *E. Suter*.

(12. IX. 49.)

In Ergänzung zu einer früheren Mitteilung¹⁾, in der über die tuberkulostatische Wirkung von einigen Verbindungen, die unter dem Gesichtspunkt der Strukturähnlichkeit²⁾ ausgewählt worden waren, berichtet wurde, bringen wir im folgenden Angaben über entsprechende Untersuchungen mit einer Reihe von Verbindungen, die als isoster mit der p-Aminobenzoesäure (PAB) bzw. mit dem p-Aminobenzoesäure-äthylester zu formulieren sind.

Die in Oberflächenkulturen von *Vallée* auf *Lockemann*-Nährlösung ermittelten tuberkulostatischen Wirkungen der mit p-Aminobenzoesäure zu vergleichenden Verbindungen: 2-(p-Aminophenyl)propen und p-Amino-benzamidin zeigt Tabelle 1, oberer Teil, der noch zur Ergänzung die früher ermittelten Werte von Verbindungen dieser Reihe enthält.

2-(p-Aminophenyl)propen, eine bereits von *J. v. Braun*³⁾ beschriebene Verbindung, wurde von uns durch Bromierung von p-Nitroeu-mol, anschliessende Halogenwasserstoffabspaltung und Reduktion bereitet.

Die recht hohe Wirksamkeit des 2-(p-Aminophenyl)propens wird in Kulturen, die 10% Serum enthalten, sehr stark reduziert.

¹⁾ *H. Bloch, G. Brubacher, H. Erlenmeyer & E. Suter*, *Helv.* **30**, 540 (1947).

²⁾ Siehe *H. Erlenmeyer*, Les composés isostères et le problème de la ressemblance en chimie, *Bl. Soc. chim. biol.* **30**, 792 (1948).

³⁾ *A.* **472**, 39 (1929).

Tabelle 1.

Tuberkulostatische Wirkung von Verbindungen, isoster mit PAB oder isoster mit p-Aminobenzoesäure-äthylester.

Isoster mit	Formel $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R};$ $\text{R} =$	Oberflächenkultur in <i>Lockemann-Nährlösung</i>	
		Mol/l	SZ
PAB	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{OH} \end{array}$	$4 \cdot 10^{-4}$	0,5
	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$	$< 0,2$
	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,2
	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{NH} \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$> 2 \cdot 10^{-4}$	< 1
	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$2 \cdot 10^{-5}$	10
p-Amino- benzoesäure- äthylester	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{OCH}_2\text{CH}_2 \end{array}$	$5 \cdot 10^{-6}$	40
	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{NHCH}_2\text{CH}_3 \end{array}$	$2 \cdot 10^{-4}$	1
	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	80
	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{NH} \\ \text{NHCH}_2\text{CH}_3 \end{array}$	$> 2 \cdot 10^{-4}$	< 1
	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array}$	$2 \cdot 10^{-6}$	100

Weiterhin wurde noch die Wirkung dieser Verbindung auf *Staphylococcus aureus* und *Bacterium coli* geprüft¹⁾. Auch in einer Konzentration von 1 : 1000 war hier keinerlei bakteriostatische oder baktericide Wirkung zu beobachten, so dass dieser Verbindung keine antagonistische Wirkung zur p-Aminobenzoesäure zukommt.

Die tuberkulostatische Wirkung der mit dem p-Aminobenzoesäureäthylester isosteren Verbindungen: 2-(p-Aminophenyl)-penten-(1) und N₁-Äthyl-p-amino-benzamidin enthält Tabelle 1, unterer Teil,

¹⁾ Wir möchten auch an dieser Stelle der *CIBA Aktiengesellschaft* für die Durchführung dieser biologischen Prüfungen unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

der noch ergänzend die entsprechenden Werte der früher untersuchten Verbindungen dieser Reihe wiedergibt.

Zur Darstellung von 2-(p-Aminophenyl)-penten-(1) wurde β -Propylzimtsäure nitriert. Die so erhaltene β -Propyl-p-nitro-zimtsäure, deren Konstitution durch oxydativen Abbau zur p-Nitrobenzoesäure bewiesen wurde, wurde zum 2-(p-Nitrophenyl)-penten-(1) decarboxyliert und dieses mit SnCl_2 und Salzsäure zum entsprechenden Amin reduziert.

N_1 -Äthyl-p-aminobenzamidin wurde aus p-Nitrobenzoesäure-imino-äthylester durch Umsetzung mit Äthylamin und darauffolgende Reduktion gewonnen.

Herrn Prof. H. Erlenmeyer danken wir bestens für die Anregung zu dieser Arbeit und seine wertvollen Ratschläge.

Experimenteller Teil¹⁾.

Darstellung von 2-(p-Aminophenyl)-propen²⁾.

2-(p-Nitrophenyl)-2-brompropan.

5,86 g p-Nitrocumol, bereitet nach R. D. Haworth & L. Barker³⁾, wurden in 16 cm³ Tetrachlorkohlenstoff gelöst und nach Zugabe von 6,38 g N-Bromsuccinimid und 41 mg frisch bereitetem Dibenzoylperoxyd 6½ Stunden am Rückfluss in gelindem Sieden erhalten. Das nach der Aufarbeitung erhaltene, gelb gefärbte Öl (8,5 g) kristallisierte auch nach monatelangem Stehen nicht. Bei 110° beginnt sich die Verbindung unter HBr-Entwicklung zu zersetzen.

2-(p-Nitrophenyl)-propen.

a) Aus 2-(p-Nitrophenyl)-2-brompropan durch Destillation: 23 g rohes 2-(p-Nitrophenyl)-2-brompropan wurden der Hochvakuumdestillation unterworfen. Die bei 105—109°/1—2 mm (130—140° Badtemperatur) siedenden Anteile (6 g) kristallisierten und lieferten nach dem Umkristallisieren aus Petroläther 2,2 g 2-(p-Nitrophenyl)-propen vom Smp. 52—55°. Eine bei 54—55° schmelzende Analysenprobe wurde im Hochvakuum bei 45° getrocknet.

4,350 mg Subst. gaben 10,58 mg CO_2 und 2,26 mg H_2O

3,16 mg Subst. gaben 0,237 cm³ N_2 (21°, 747 mm)

$\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$ Ber. C 66,25 H 5,56 N 8,59%

Gef. „ 66,37 „ 5,81 „ 8,56%

b) Aus 2-(p-Nitrophenyl)-2-brompropan mittels alkoholischer Kalilauge: 9,4 g rohes 2-(p-Nitrophenyl)-2-brompropan wurden mit 50 cm³ 10-proz. alkoholischer Kalilauge (ca. 2 Mol.) drei Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die vom Kaliumbromid befreite Lösung wurde zur Hälfte im Vakuum eingedampft, mit 50 cm³ Wasser versetzt und zweimal ausgeäthert. Die gewaschene und getrocknete ätherische Lösung wurde unter Zusatz weniger Körnchen Hydrochinon eingedampft und der Rückstand im Vakuum (0,7 mm) fraktioniert. Die bei 80—95° übergehende Fraktion (2,92 g) erstarrte in der Kälte und schmolz bei 46—51°. Nach Umkristallisieren aus Petroläther erhielt man 1,5 g (25% der Theorie) vom Smp. 51—54°.

¹⁾ Sämtliche Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

²⁾ Vgl. J. v. Braun, loc. cit.

³⁾ Soc. 1939, 1302.

2-(p-Aminophenyl)-propen.

400 mg 2-(p-Nitrophenyl)-propen wurden unter Eiskühlung in eine Lösung von 2,8 g kristallisiertem Zinn(II)-chlorid in 3 g konz. Salzsäure eingetragen. Es wurde etwas Äther hinzugefügt und das Reaktionsgemisch zwei Tage lang geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde nun in Wasser gelöst und die Lösung unter Wasserkühlung mit 10-proz. Sodalösung neutralisiert. Anschließend wurde vorsichtig mit 20-proz. Kalilauge bis zur Auflösung des gebildeten Zinnhydroxyds versetzt. Das als Emulsion ausgeschiedene 2-(p-Aminophenyl)-propen wurde sofort in Äther aufgenommen, mit Wasser gewaschen und mit 2-n. HCl ausgeschüttelt. Die salzsaure Lösung wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur auf ein kleines Volumen eingeeengt und mit konz. HCl versetzt. Es fielen 100 mg eines mikrokristallinen Pulvers vom Smp. 231–233° aus (*v. Braun* gibt 230–235° an). Das salzsaure Salz wurde durch wiederholtes Umfällen aus Wasser mit konz. HCl in schönen mikrokristallinen Rhomboedern erhalten.

Zur Analyse wurde die Substanz über KOH und Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz und anschließend 24 Stunden bei 40° im Hochvakuum getrocknet.

4,049 mg Subst. gaben 9,44 mg CO₂ und 2,61 mg H₂O
 C₉H₁₂NCl Ber. C 63,71 H 7,13% Gef. C 63,62 H 7,21%

p-Amino-benzamidin-dihydrochlorid.

Diese Verbindung wurde nach den Angaben von *A. P. T. Easson & F. L. Pyman*¹⁾ aus p-Nitrobenzamidin-hydrochlorid durch Reduktion mit salzsaurem Zinn(II)-chloridlösung und granuliertem Zinn oder durch katalytische Hydrierung mit *Raney-Nickel* erhalten, jedoch fanden wir stets den Smp. 284–286° (Lit. 320°).

Zur Analyse wurde 2 Stunden bei 60° im Hochvakuum getrocknet.

2,100 mg Subst. gaben 0,379 cm³ N₂ (23°, 744 mm)
 C₇H₁₁N₃Cl₂ Ber. N 20,20% Gef. N 20,36%

Darstellung von 2-(p-Aminophenyl)-penten-(1).
β-Propyl-p-nitrozimtsäure.

1 g β-Propyl-zimtsäure wurde innerhalb einer halben Stunde unter mechanischem Rühren bei 0° in ein Gemisch von 9 cm³ konz. Salpetersäure und 4,5 cm³ konz. Schwefelsäure eingetragen und das Reaktionsgemisch noch anderthalb Stunden bei 0° mechanisch gerührt. Anschließend wurde der Kolbeninhalt auf Eis gegossen und der ausgeschiedene Kristallbrei abgesaugt, mit Wasser gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. Man erhielt so 1,16 g (52% der Theorie) eines gelbstichigen Kristallpulvers vom Smp. 87–104°. Mehrmaliges Umkrystallisieren aus Benzol ergab 650 mg β-Propyl-p-nitrozimtsäure.

Die Verbindung kristallisiert aus Benzol in sehr hellen, gelbgrünstichigen Rhomboedern vom Smp. 108–110°. Nach dem Schmelzen wird sie wieder fest und schmilzt endgültig bei 119,5°. Durch längeres Erhitzen auf 90° wird die niederschmelzende Form in die höher schmelzende übergeführt.

Zur Analyse wurde eine Probe nochmals aus wässrigem Alkohol umkrystallisiert und zwei Stunden im Hochvakuum bei 60° getrocknet.

5,386 mg Subst. gaben 12,03 mg CO₂ und 2,52 mg H₂O
 4,62 mg Subst. gaben 0,238 cm³ N₂ (22°, 741 mm)
 C₁₂H₁₃O₄N Ber. C 61,27 H 5,57 N 5,96%
 Gef. .. 60,95 .. 5,24 .. 5,81%

¹⁾ Soc. 1931, 2994.

Oxydativer Abbau.

100 mg β -Propyl-p-nitrozimtsäure wurden in eine Lösung von 1 g Kaliumdichromat in 4 cm³ konz. Schwefelsäure und 3 cm³ Wasser eingetragen und 5 Minuten im Sieden gehalten. Nach dem Erkalten wurde mit 10 cm³ Wasser verdünnt. Die ausgeschiedenen Kristalle erwiesen sich als p-Nitrobenzoesäure.

2-(p-Nitrophenyl)-penten-(1).

250 mg β -Propyl-p-nitrozimtsäure wurden in 1 g Chinolin gelöst und unter Zugabe von 0,03 g Kupferpulver auf 185° erhitzt. Bei dieser Temperatur setzte eine lebhafte Gasentwicklung ein. Die Temperatur wurde innerhalb 20 Minuten auf 195° gesteigert. Nach dem Erkalten wurde vom Kupferpulver abfiltriert, in Äther aufgenommen, mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen und getrocknet. Das nach dem Verdampfen des Äthers zurückgebliebene Öl wurde im Vakuum destilliert. Bei 140° gingen 130 mg (67% der Theorie) über. Zur Analyse wurde nochmals im Vakuum destilliert. Sdp.₁₃ 135—137°.

4,383 mg Subst. gaben 11,11 mg CO₂ und 2,71 mg H₂O

3,280 mg Subst. gaben 0,222 cm³ N₂ (25°, 736 mm)

C₁₁H₁₃O₂N Ber. C 69,09 H 6,87 N 7,33%

Gef. „ 69,17 „ 6,92 „ 7,51%

2-(p-Nitrophenyl)-penten-(1) hat einen charakteristischen, sehr intensiven, etwas an Nitrobenzol erinnernden Geruch.

2-(p-Aminophenyl)-penten-(1)-hydrochlorid.

340 mg 2-(p-Nitrophenyl)-penten-(1) wurden mit etwas Äther in die Lösung von 2 g kristallisiertem Zinn(II)-chlorid in 1,8 cm³ konz. HCl eingetragen und 1 ½ Tage geschüttelt. Darauf wurde das Reaktionsgemisch wie beim Aminophenyl-propen beschrieben aufgearbeitet. Das hierbei erhaltene Hydrochlorid, 160 mg (46% der Theorie), beginnt sich bei 180° zu zersetzen und schmilzt endgültig bei 210°.

Zur Analyse wurde das salzsaure Salz noch einigemal aus Wasser mit konz. Salzsäure umgefällt, im Vakuum über KOH und H₂SO₄ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschliessend im Hochvakuum bei 40° 2 Stunden nachgetrocknet.

4,038 mg Subst. gaben 9,85 mg CO₂ und 2,96 mg H₂O

C₁₁H₁₆NCl Ber. C 66,82 H 8,16% Gef. C 66,57 H 8,20%

Darstellung von N₁-Äthyl-p-aminobenzamidin.
N₁-Äthyl-p-nitrobenzamidin.

4,6 g p-Nitrobenzoesäure-iminoäthylester-hydrochlorid wurden in die Lösung von 2 cm³ Äthylamin in 8 cm³ Methanol eingetragen. Die entstandene klare Lösung wurde nach 12 Stunden mit 40 cm³ 2-n. NaOH versetzt, worauf sich ein gelbes Öl abschied, welches nach dem Anreiben erstarrte. Der Kristallbrei gab, zweimal aus Benzol und Petroläther umkristallisiert, 2,2 g N₁-Äthyl-p-nitrobenzamidin (57% der Theorie).

Die Verbindung bildet gelb gefärbte Kristalle, die aus Benzol umkristallisiert bei 82—84° schmelzen und sich beim Stehen in eine höher schmelzende Form vom Smp. 105—107° umwandeln.

Zur Analyse wurde eine kleine Probe wiederholt aus Benzol umkristallisiert und 4 Stunden bei 70° im Hochvakuum getrocknet.

4,182 mg Subst. gaben 8,54 mg CO₂ und 2,12 mg H₂O

3,00 mg Subst. gaben 0,575 cm³ N₂ (21°, 742 mm)

C₉H₁₁O₂N₃ Ber. C 55,95 H 5,74 N 21,75%

Gef. „ 55,73 „ 5,67 „ 21,73%

Hydrochlorid: Aus Alkohol-Äther, Smp. 210–212° (Zers.).

4,938 mg Subst. gaben 8,56 mg CO₂ und 2,29 mg H₂O

4,31 mg Subst. gaben 0,691 cm³ N₂ (19°, 735 mm)

C₉H₁₂O₂N₃Cl Ber. C 47,06 H 5,27 N 18,30%

Gef. „ 47,31 „ 5,19 „ 18,16%

Pikrat: Aus Alkohol-Wasser, Smp. 165,5–167°.

3,050 mg Subst. gaben 0,530 cm³ N₂ (23°, 741 mm)

C₁₅H₁₄O₉N₆ Ber. N 19,93% Gef. N 19,54%

N₁-Äthyl-p-aminobenzamidin-monohydrochlorid.

1,15 g N₁-Äthyl-p-nitrobenzamidin-hydrochlorid wurden in 30 cm³ Alkohol gelöst und mit Raney-Nickel als Katalysator hydriert. Es resultierten 920 mg schneeweisser, äusserst hygroskopischer Kristalle vom Smp. 221–223°. Nach viermaligem Umkristallisieren aus Alkohol und anschliessendem Trocknen im Hochvakuum über Phosphor-pentoxyd war die Substanz analysenrein.

3,050 mg Subst. gaben 6,034 mg CO₂ und 1,958 mg H₂O

1,630 mg Subst. gaben 0,314 cm³ N₂ (28°, 738 mm)

C₉H₁₄N₃Cl Ber. C 54,01 H 7,07 N 21,05%

Gef. „ 53,81 „ 7,16 „ 21,21%

N₁-Äthyl-p-aminobenzamidin-monohydrochlorid-monohydrat.

Beim Stehen an der Luft nimmt die oben beschriebene Verbindung eine Molekel Kristallwasser auf und verändert sich dann nicht mehr weiter. Über Schwefelsäure wird das Kristallwasser wieder abgegeben.

4,910 mg Subst. gaben 8,918 mg CO₂ und 3,223 mg H₂O

C₉H₁₆ON₃Cl Ber. C 49,65 H 7,41% Gef. C 49,57 H 7,35%

N₁-Äthyl-p-amino-benzamidin-dihydrochlorid.

250 mg des Monohydrochlorids wurden in wenig Alkohol gelöst und mit konz. alkoholischer Salzsäure gefällt. Es fielen 250 mg schneeweisser Kristalle aus, welche nach dem Trocknen im Vakuum über H₂SO₄ den Smp. 265–266° (Zers.) zeigten.

5,249 mg Subst. gaben 8,816 mg CO₂ und 3,133 mg H₂O

C₉H₁₃N₃Cl₂ Ber. C 45,78 H 6,41% Gef. C 45,83 H 6,68%

Das Dihydrochlorid ist nicht hygroskopisch.

Die Analysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium der CIBA Aktiengesellschaft (Dr. H. Gysel).

Zusammenfassung.

Es wurde eine Reihe von z. T. neu dargestellten Verbindungen, die als isoster mit p-Aminobenzoesäure bzw. mit p-Aminobenzoesäure-äthylester zu formulieren sind, auf ihre tuberkulostatische Wirkung geprüft.

Universität Basel,

Anstalt für anorganische Chemie und Hygienische Anstalt.

39. Biologische Citrullinsynthese.

II. Mitteilung¹⁾

von A. F. Müller und F. Leuthardt.

(23. I. 50.)

Wir haben in früheren Arbeiten den Einfluss des Glutamins und der Ureidoglutarsäure auf die biologische Citrullinsynthese im Leberhomogenat untersucht und den Nachweis geleistet, dass das Ferment-system, welches die Synthese bewirkt, in den Mitochondrien lokalisiert ist²⁾³⁾. In der vorliegenden Mitteilung beschreiben wir weitere Versuche über die Citrullinsynthese in Mitochondriensuspensionen, die aus Leber der Ratte gewonnen wurden.

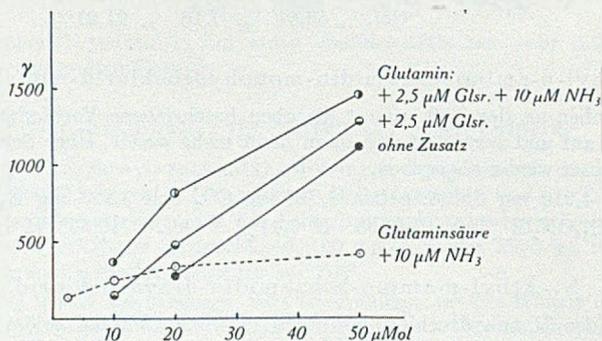


Fig. 1.

Mitochondriensuspension (0,5 cm³). Ratte mit Fleisch gefüttert, 24 Stunden auf Hunger. Versuchsdauer: 15 Minuten bei 38°. Gasatmosphäre 95% O₂+5% CO₂. Gesamtvolumen 3,0 cm³. Ornithin 0,0033-m., Phosphatpuffer (pH 7,0) 0,004-m., NaHCO₃ 0,013-m., Mg⁺⁺ 0,01-m., A.T.P. 0,00066-m., KCl bis zur Isotonie zugesetzt. Abszisse: Glutaminsäure (gestrichelt) oder Glutamin (ausgezogen), μMol in 3 cm³. Ordinate: Citrullinbildung in γ.

Wir haben in der genannten Arbeit²⁾ gezeigt, dass bei höheren Konzentrationen (oberhalb etwa 7–10 μMol/cm³) Glutamin bedeutend mehr Citrullin liefert als die gleiche Menge Glutaminsäure in Gegenwart von Ammoniumionen. Bei kleinen Konzentrationen ist Glutaminsäure unter allen Bedingungen wirksamer. Wir konnten nun weiter feststellen, dass eine kleine Menge Glutaminsäure für die Reaktion unentbehrlich ist. Bei hohen Konzentrationen von Glutamin

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Hilfe der Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz ausgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

²⁾ F. Leuthardt, A. F. Müller & H. Nielsen, *Helv.* **32**, 744 (1949).

³⁾ F. Leuthardt & A. F. Müller, *Exper.* **4**, 478 (1948).

entsteht durch Hydrolyse der Säureamidgruppe genügend Glutaminsäure. Bei niederen Konzentrationen ist das nicht der Fall, daher sinkt die Aktivität des Glutamins unterhalb etwa 20–30 $\mu\text{Mol}/3\text{ cm}^3$ Ansatz rasch auf kleine Werte ab. Man kann aber durch Zusatz von geringen Mengen Glutaminsäure (2,5 $\mu\text{Mol}/3\text{ cm}^3$) zum Glutamin die Citrullinbildung stark erhöhen, besonders dann, wenn noch Ammoniumionen zugesetzt werden. Wie Figur 1 zeigt, sind 15 μMol Glutamin + 2,5 μMol Glutaminsäure (in 3 cm^3 Ansatz) ohne Ammoniak ebenso wirksam wie 15 μMol Glutaminsäure + 10 μMol Ammoniumchlorid. Die Wirksamkeit des Glutamins kann aber nicht durch die hydrolytische Spaltung seiner Säureamidgruppe erklärt werden. Wenn nämlich zum Glutamin ausser der kleinen Menge Glutaminsäure noch Ammoniumchlorid zugesetzt wird, tritt eine weitere Steigerung der Citrullinsynthese ein. Die Menge von etwa 10 μMol $\text{NH}_4^+/3\text{ cm}^3$ stellt bereits das Optimum der Ammoniakkonzentration dar (vgl. Tabelle 1). Die Citrullinbildung könnte also nicht mehr steigen, wenn einfach durch Hydrolyse des Glutamins die Ammoniakkonzentration weiter vermehrt würde. Man muss daher eine direkte Reaktion der Säureamidgruppe annehmen. Das Glutamin ist die einzige bisher bekannte Verbindung, welche nicht nur das Ammoniak ersetzen kann, sondern ihm bei Gegenwart kleiner Mengen Glutaminsäure auch bedeutend überlegen ist. Es handelt sich hier offenbar um eine spezifische Reaktion des Glutamins, denn Asparagin ist völlig unwirksam, trotzdem es ebenso leicht desaminiert wird wie Glutamin.

Tabelle 1.

Konzentration des Ammoniumsalzes	Glutaminsäure in 3 cm^3	
	50 μMol	20 μMol
	γ Citrullin	γ Citrullin
10 $\mu\text{Mol}/3\text{ cm}^3$	930	610
20 $\mu\text{Mol}/3\text{ cm}^3$	870	550

Mitochondriensuspension (0,5 cm^3). Ratte mit Fleisch gefüttert, 24 Stunden auf Hunger. Versuchsdauer: 15 Minuten bei 38°. Gasatmosphäre 95% O_2 + 5% CO_2 . Gesamtvolumen 3,0 cm^3 . Ornithin, Phosphatpuffer, NaHCO_3 , Mg^{++} , A.T.P., KCl, vgl. Text zu Figur 1.

In einigen Versuchen wurde am Schluss nicht nur das Citrullin, sondern auch die Menge der noch vorhandenen Substrate (Glutamin und Glutaminsäure), sowie das freie Ammoniak bestimmt. Glutamin und Glutaminsäure wurden nach den Angaben von *Krebs*¹⁾ mit Hilfe des *Clostridium Welchii* bestimmt. Es wird am Schluss fast die gesamte Menge des zugesetzten Glutamins oder der Glutaminsäure als Glutaminsäure wieder gefunden (*Clostridium Welchii* decarboxyliert sowohl die Säure als auch das Amid). Das Defizit (2–3 μMol

¹⁾ H. A. Krebs, *Biochem. J.* 43, 51 (1948).

auf 50 μMol) übersteigt kaum die Fehlergrenze der Methode und ist sicher kleiner als die gebildete Menge Citrullin, besonders bei Gegenwart von Glutamin. In Versuch 3 von Fig. 2 wurden 10 μMol Citrullin synthetisiert; es fehlen aber am Schluss nur etwa 2,5 μMol Glutaminsäure. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Glutaminsäure bei der Reaktion mit dem Ornithin nicht verbraucht wird. Das Defizit ist durch unvollständige Decarboxylierung oder durch Nebenreaktionen zu erklären. Bei einer Glutaminkonzentration von 20 $\mu\text{Mol}/3\text{ cm}^3$ sind nach 15 Minuten etwa 75% des Säureamids noch vorhanden, bei 50 μMol etwa 40%. Bei der letzten Konzentration haben wir am Versuchsende zwischen 10 und 17 μMol Ammoniumsalz gefunden. Wie oben bereits erwähnt, ist diese Konzentration optimal und genügt nicht, den Unterschied zwischen der Citrullinbildung aus Glutaminsäure + NH_4^+ einerseits und Glutamin andererseits zu erklären. In den Versuchen mit Glutaminsäure verschwindet ein Teil des zugesetzten Ammoniaks, und zwar wird mehr verbraucht, als dem entstandenen Citrullin entspricht. Auch hier sind Nebenreaktionen anzunehmen, die Ammoniak fixieren.

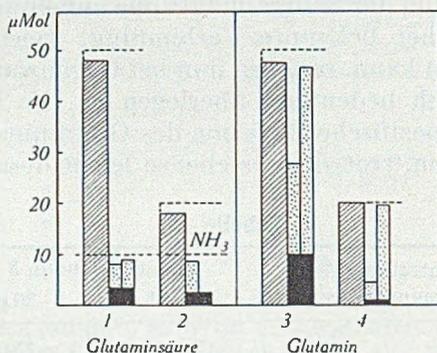


Fig. 2.

Mitochondriensuspension (0,5 cm^3). Ratte mit Fleisch gefüttert, 24 Stunden auf Hunger. Versuchsdauer: 15 Minuten bei 38°. Gasatmosphäre 95% O_2 + 5% CO_2 . Gesamtvolumen 3,0 cm^3 . Ornithin, Phosphatpuffer, NaHCO_3 , Mg^{++} , A.T.P., KCl vgl. Text zu Figur 1. Am Versuchsende wurde Citrullin und (nach Enteweißen durch 1 Minute langes Erhitzen im siedenden Wasserbad) Glutaminsäure, Glutamin und Ammoniak bestimmt. Die gestrichelten horizontalen Linien geben die Menge der zugesetzten Substrate an (pro 3 cm^3). Versuch 1: 50 μMol Glutaminsäure + 10 μMol NH_3 ; Versuch 2: 20 μMol Glutaminsäure + 10 μMol NH_3 ; Versuch 3: 50 μMol Glutamin; Versuch 4: 20 μMol Glutamin. Schraffierte Säulen: Gesamtmenge Glutaminsäure am Versuchsende (im Versuch 3 und 4: Glutaminsäure + Glutamin). Schwarze Säulen: Citrullin. Punktierte Säulen: Ammoniak, und zwar Säule links vor Desamidierung mit Cl. Welchii, Säule rechts nach Decarboxylierung. In Versuch 3 und 4 gibt die Differenz die Menge des am Versuchsende vorhandenen Glutamins.

Wie wir bereits in früheren Arbeiten¹⁾ mitgeteilt haben, reagiert die α -Ureidoglutarsäure nur dann mit Ornithin, wenn ein Substrat

¹⁾ F. Leuthardt, A. F. Müller & H. Nielsen. Helv. 32, 744 (1949).

wie Fumarat zugegen ist, welches die oxydative Phosphorylierung und damit die Resynthese des A.T.P. unterhält¹⁾. Die Glutaminsäure kann diesen Prozess selbst in Gang halten, ist also von anderen Atmungssubstraten unabhängig. Im Gegensatz zum Glutamin liefert die Ureidosäure auch bei höheren Konzentrationen nur dann Citrullin, wenn Ammoniumionen zugegen sind. Wir beobachteten unter diesen Bedingungen aber auch hier eine starke Steigerung durch kleine Mengen Glutaminsäure (2 μ Mol/3 cm^3) (Fig. 3).

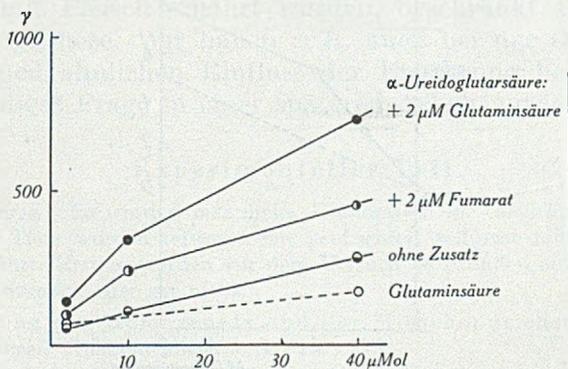


Fig. 3.

Mitochondriensuspension (0,5 cm^3). Ratte mit Fleisch gefüttert, 24 Stunden auf Hunger. Versuchsdauer: 12 Minuten bei 38°. Gasatmosphäre 95% O_2 + 5% CO_2 . Gesamtvolumen 3,0 cm^3 . Ornithin 0,005-m., Mg^{++} 0,0066-m., A.T.P., NaHCO_3 , Phosphatpuffer und KCl wie im Versuch von Figur 1. Ordinate: Citrullinbildung in γ pro 3 cm^3 . Abszisse: Menge der z-Ureidoglutaric acid (ausgezogene Linien) oder Glutaminsäure (punktierter Linie) in 3 cm^3 . Alle Ansätze enthalten NH_4Cl . Die Ansätze mit 2 und 10 μ Mol Ureidoglutaric acid oder Glutaminsäure enthalten 10 μ Mol NH_4Cl /3 cm^3 , die übrigen 20 μ Mol NH_4Cl . • Ureidoglutaric acid + NH_4Cl ; ◦ Ureidoglutaric acid + NH_4Cl + 2 μ Mol Fumarat; ● Ureidoglutaric acid + NH_4Cl + 2 μ Mol Glutamat.

Alle diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Glutaminsäure bei der Citrullinsynthese katalytisch wirkt, d. h. dass sie durch eine zyklisch verlaufende Reaktion immer wieder regeneriert wird.

Sehr aktive Mitochondriensuspensionen bilden auch ohne Zusatz von Glutaminsäure bei Gegenwart von Ammoniak beträchtliche Mengen Citrullin. Setzt man zu solchen Suspensionen kleine Mengen Glutaminsäure zu, so wird mehr Citrullin gebildet, als der zugesetzten Menge Glutaminsäure entspricht (Fig. 4). Dies zeigt, dass die Bildung des zusätzlichen Citrullins zum grössten Teil auf Kosten des vorhandenen Ammoniaks erfolgt und dass offenbar die Glutaminsäure diesen Prozess beschleunigt. Man erhält derartig aktive Suspensionen aus den Lebern von Tieren, die vor dem Versuch während ca. 10 Tagen

¹⁾ Nur in sehr aktiven Suspensionen (Tiere mit Fleisch gefüttert und während der Verdauung getötet) ist die Ureidoglutaric acid gelegentlich ohne Fumaratzusatz wirksam. (Vgl. die Bemerkung über Einfluss der Ernährung auf S. 267.)

mit Fleisch ernährt und während der Verdauung (d. h. ohne die übliche Hungerperiode) getötet wurden. Der hohe Leerwert (ohne Zusatz von Glutaminsäure) ist entweder dadurch zu erklären, dass die Mitochondrien bereits genügend Glutaminsäure aus dem Eiweiss der Nahrung aufgenommen haben, um die Synthese in Gang zu

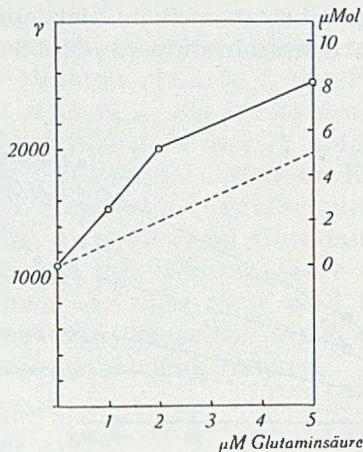


Fig. 4.

Mitochondriensuspension ($0,5 \text{ cm}^3 = 1,88 \text{ mg N}$). Ratte mit Fleisch gefüttert, während der Verdauung getötet. Versuchsdauer: 30 Minuten bei 38° . Gasatmosphäre $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$. Gesamtvolumen $3,0 \text{ cm}^3$. Ornithin $0,0066\text{-m.}$, Phosphatpuffer (pH 7,0) $0,004\text{-m.}$, NaHCO_3 $0,013\text{-m.}$, Mg^{++} $0,0066\text{-m.}$, A.T.P. $0,00033\text{-m.}$, KCl bis zur Isotonie, NH_4Cl $0,0066\text{-m.}$ Ordinate: links Citrullinbildung in γ , rechts Citrullinbildung in μMol nach Abzug des Leerwertes ohne Glutaminsäure. Die punktierte Linie gibt die Citrullinmenge an, die der zugesetzten Glutaminsäure äquivalent ist. Abszisse: μMol Glutaminsäure in 3 cm^3 .

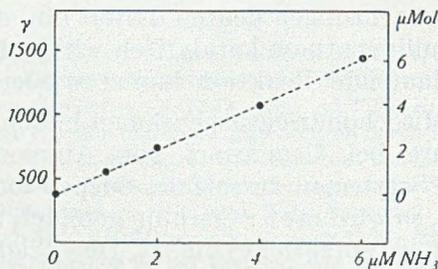


Fig. 5.

Mitochondriensuspension ($0,5 \text{ cm}^3 = 2,25 \text{ mg N}$). Ratte mit Fleisch gefüttert und während der Verdauung getötet. Versuchsdauer: 30 Minuten bei 38° . Gasatmosphäre $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$. Gesamtvolumen $3,0 \text{ cm}^3$. Ornithin, Phosphatpuffer NaHCO_3 , Mg^{++} , A.T.P., KCl wie im Versuch von Figur 4. Glutaminsäure $0,01\text{-m.}$ Abszisse: μMol $\text{NH}_4\text{Cl}/3 \text{ cm}^3$. Ordinate: links Citrullinbildung in γ , rechts Citrullinbildung in μMol nach Abzug des Leerwertes ohne NH_4Cl . Die punktierte Linie gibt die Citrullinmenge an, die dem zugesetzten Ammoniumsalz äquivalent ist.

halten, oder dass aus einem noch unbekanntem Grunde das Ferment-system derart aktiviert worden ist, dass auch die normalerweise in den Geweben vorhandene Menge Glutaminsäure genügt.

In solchen Suspensionen wird das zugesetzte Ammoniak (bei Gegenwart von Glutaminsäure) vollständig in Citrullin übergeführt. Die gebildete Menge Citrullin ist äquivalent der zugesetzten Menge Ammoniak (Fig. 5).

Die oben erwähnte starke Erhöhung der Fermentaktivität bei Tieren, die mit Fleisch ernährt wurden, beschränkt sich nicht auf die Citrullinsynthese. Wir haben z. B. auch bei der Oxydation des Pyruvats einen ähnlichen Einfluss der Ernährung beobachtet und werden auf diese Frage in einer späteren Arbeit zurückkommen.

Experimenteller Teil.

Tiermaterial. Es wurden männliche Albinoratten im Gewicht von 100–180 g verwendet. Die Tiere wurden teilweise mit gemischter, teilweise mit ausschliesslicher Fleischkost ernährt. Erstere wurden vor dem Versuch 48 Stunden auf Hunger gesetzt, letztere nur 24 Stunden oder gar nicht.

Herstellung des Homogenats und der Mitochondriensuspension. Wir verweisen auf unsere früheren Mitteilungen¹⁾²⁾.

Milieu. Dazu diente, wenn nichts anderes bemerkt ist, 0,017-m. Phosphatpuffer und KCl, das bis zur Isotonie der Gesamtlösung zugesetzt wurde. Gesamtvolumen 3,0 cm³, Gasatmosphäre 95% O₂ + 5% CO₂.

Substanzen. Die meisten verwendeten Produkte wurden von *F. Hoffmann-La Roche*, Basel, bezogen. Glutamin wurde aus Rübensaft nach *Vickery* und Mitarbeitern³⁾, α -Ureidoglutarsäure aus L-(+)-Glutaminsäure und Kaliumcyanat nach bekannten Methoden dargestellt. A.T.P. wurde nach *Needham* unter Berücksichtigung der Angaben von *Le Page* bereitet⁴⁾.

Analytische Methoden.

Citrullinbestimmung nach Archibald⁵⁾.

Glutamin und Glutaminsäure wurden mit *Clostridium Welchii* S.R. 12 nach den Angaben von *Gale*⁶⁾ und *Krebs*⁷⁾ bestimmt. Glutaminsäure wie auch Glutamin werden spezifisch decarboxyliert, wobei letzteres bei Gegenwart eines Detergens (Cetyl-trimethylammoniumbromid, „Cetavlon“) vorgängig noch desaminiert wird. Die Einzelheiten sind am angegebenen Ort beschrieben⁸⁾. Wir bestimmten einerseits die CO₂-Entwicklung bei Zugabe des *Clostridium*s manometrisch, andererseits das Ammoniak vor und nach Einwirkung der Bakterien nach der Methode von *Sobel* und Mitarbeitern⁹⁾.

¹⁾ *F. Leuthardt, A. F. Müller & H. Nielsen, Helv. 32, 744 (1949).*

²⁾ *F. Leuthardt & A. F. Müller, Exper. 4, 478 (1948).*

³⁾ *H. B. Vickery, G. W. Pucher & H. E. Clark, J. Biol. Chem. 109, 39 (1935).*

⁴⁾ *D. M. Needham, Biochem. J. 36, 113 (1942); G. A. Le Page in W. W. Umbreit, R. H. Burris & J. F. Stauffer, Manometric techniques and related methods, Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1945.*

⁵⁾ *R. M. Archibald, J. Biol. Chem. 156, 121 (1944).*

⁶⁾ *E. F. Gale, Biochem. J. 39, 46 (1945).*

⁷⁾ *H. A. Krebs, Biochem. J. 43, 51 (1948).*

⁸⁾ *J. Frei & F. Leuthardt, Helv. 32, 1137 (1949).*

⁹⁾ *A. E. Sobel, M. Mayer & S. P. Gottfried, J. Biol. Chem. 156, 355 (1944).*

Zusammenfassung.

Aus den bisher bekannten Tatsachen über die biologische Citrullinsynthese in der Leber geht soviel mit Sicherheit hervor, dass die Glutaminsäure unentbehrlich ist. Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, dass sie während des Prozesses wieder regeneriert wird, also katalytisch wirkt. Glutamin ist sicher keine Zwischenstufe der Synthese. Dies geht schon daraus hervor, dass in der Leber das Ferment, welches die Reaktion zwischen Glutaminsäure, Ammoniak und Adenosintriphosphat katalysiert, nicht in den korpuskulären Elementen (Mitochondrien, Mikrosomen) lokalisiert ist, sondern sich unter den löslichen Substanzen findet¹⁾. Andererseits aber ist Glutamin bei Gegenwart einer kleinen Menge Glutaminsäure viel wirksamer als Ammoniak, und zwar muss angenommen werden, dass die Säureamidgruppe ohne vorangehende Hydrolyse direkt reagiert.

Die Bedeutung der α -Ureidoglutarsäure ist noch nicht abgeklärt. Sie liefert zwar im hydrogencarbonatfreien Milieu mehr Citrullin als die Glutaminsäure, aber nur bei Gegenwart von Ammoniak, und ausserdem erfährt ihre Wirksamkeit bei allen Konzentrationen eine bedeutende Steigerung durch Zusatz kleiner Mengen Glutaminsäure. Ausser dem Citrullin sind bisher keine Ureidosäuren sicher als Produkte des tierischen Stoffwechsels bekannt. Die Verbindungen, die man aus dem Urin isoliert hat, sind sehr wahrscheinlich Kunstprodukte. Das Auftreten der α -Ureidoglutarsäure bei der Citrullinsynthese wäre das erste Beispiel dieser Art. Es kann aus den bisher bekannten Tatsachen noch nicht geschlossen werden, dass sie unter natürlichen Bedingungen als Zwischenprodukt auftritt.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

40. Die Umwandlung der Glutaminsäure in Asparaginsäure in den Mitochondrien der Leber²⁾

(mit Bemerkung über das Vorkommen einer Transaminase in Clostridium Welchii)

von A. F. Müller und F. Leuthardt.

(23. I. 50.)

*Ratner & Pappas*³⁾ haben aus der Leber ein Fermentsystem isoliert, welches die folgende Reaktion katalysiert: Citrullin + Asparaginsäure \rightarrow Arginin + Äpfelsäure. Die Asparaginsäure kann nicht

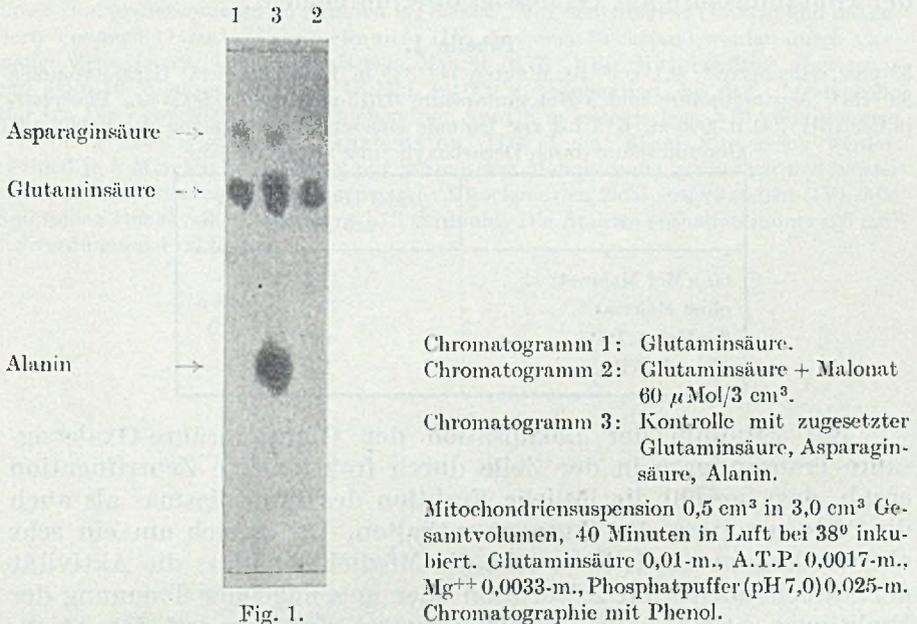
¹⁾ J. Frei & F. Leuthardt, im Druck.

²⁾ Diese Arbeit wurde mit Hilfe der Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz ausgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

³⁾ S. Ratner & A. Pappas, J. Biol. Chem. 179, 1183, 1199 (1949).

durch die Glutaminsäure ersetzt werden. Die Autorin nimmt daher im Gegensatz zur bisherigen Auffassung¹⁾ an, dass bei der Argininsynthese die Asparaginsäure und nicht die Glutaminsäure den Stickstoff liefert. Da aber im kompletten Homogenat die Glutaminsäure sehr wirksam ist, muss man annehmen, dass im Gewebe eine rasche Umwandlung der Glutaminsäure in Asparaginsäure möglich ist. Bei Zusatz von Asparaginsäure geht die Argininsynthese im Leberhomogenat sogar langsamer vor sich als mit Glutaminsäure, weil die erstere die oxydative Resynthese des Adenosintri-phosphats (A.T.P.) nicht zu unterhalten vermag. Erst bei Zusatz von Succinat oder Fumarat erhält man mit Asparaginsäure gleiche Werte wie mit Glutaminsäure, nie aber höhere Werte²⁾.

In dieser Arbeit zeigen wir, dass die Mitochondrien der Leber die Glutaminsäure tatsächlich in Asparaginsäure überführen und dass sie eine sehr intensiv wirkende Transaminase enthalten. Die Asparaginsäure wurde durch Papierchromatographie identifiziert.



Die Mitochondrien enthalten die gesamten Fermente des Tri-carbonsäurezyklus³⁾. Es ist also anzunehmen, dass nach Desaminierung der Glutaminsäure zur Ketoglutarinsäure Oxalessigsäure entsteht, welche mit der überschüssigen Glutaminsäure unter Bildung

¹⁾ H. Borsook & J. W. Dubnoff, J. Biol. Chem. 141, 717 (1941); P. P. Cohen & M. Hayano, J. Biol. Chem. 166, 251 (1946).

²⁾ H. Fahrländer, P. Favarger & F. Leuthardt, Helv. 31, 942 (1948).

³⁾ J. Mauron & F. Leuthardt, unveröffentlichte Untersuchungen.

von Asparaginsäure reagiert. Der Zusatz von Malonat hemmt, wie zu erwarten, die Bildung der Asparaginsäure, weil durch Malonat die Dehydrierung der Bernsteinsäure verhindert wird.

Figur 1 zeigt die Bildung der Asparaginsäure aus Glutaminsäure in einer Mitochondriensuspension im Papierchromatogramm. Bei Gegenwart von Malonat in einer Konzentration von $60 \mu \text{ Mol}/3 \text{ cm}^3$ Ansatz ist die Asparaginsäure im Chromatogramm nicht mehr sichtbar.

Nach den Untersuchungen von *Ratner* ist die Argininsynthese eine A.T.P.-abhängige Reaktion. Erfolgt die Synthese in Gegenwart von Glutaminsäure, so muss dieselbe zuerst in Asparaginsäure verwandelt werden. Die letzte Stufe dieser Reaktion, die Transaminierung, ist vom A.T.P. unabhängig und wird durch Malonat nicht gehemmt. Dies wird durch den Versuch in Tabelle 1 bestätigt. Da sich Glutaminsäure spezifisch durch *Clostridium Welchii* bestimmen lässt¹⁾ und da die Transaminierung zwischen Glutaminsäure und Oxalessigsäure umkehrbar ist²⁾, haben wir die Gegenreaktion, Bildung der Glutaminsäure aus Oxalessigsäure, untersucht.

Tabelle 1.

33-proz. Homogenat: $0,1 \text{ cm}^3$ 10 Minuten bei 38° in Luft inkubiert. Gesamtvolumen $3,0 \text{ cm}^3$. Asparaginsäure und α -Ketoglutar säure $0,013\text{-m.}$, Mg^{++} $0,0033\text{-m.}$. Phosphatpuffer (pH 7.4) $0,0066\text{-m.}$ KCl bis zur Isotonie zugesetzt. Bestimmung der gebildeten Glutaminsäure durch Decarboxylierung mit *Cl. Welchii*.

	$\mu \text{ Mol}$ Glutaminsäure pro Ansatz
$60 \mu \text{ Mol}$ Malonat	7,1
ohne Malonat	7,2
$3 \mu \text{ Mol}$ A.T.P.	6,6
ohne A.T.P.	7,2

Das Studium der Lokalisation der Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase in der Zelle durch fraktionierte Zentrifugation ergab, dass sowohl die lösliche Fraktion des Protoplasmas als auch die Mitochondrien das Ferment enthalten. Da es sich um ein sehr aktives Enzym handelt, besteht die Möglichkeit, dass die Aktivität der Mitochondrien auf Adsorption oder ungenügender Trennung der Fraktionen beruht. Die Fermentaktivität, bezogen auf den Stickstoff, bleibt aber auch nach zweimaligem kurzem Auswaschen der Mitochondrien nahezu konstant (Tabelle 2). Wir dürfen daher annehmen, dass das Ferment tatsächlich ein Bestandteil der Mitochondrien ist. Die Bedingungen für die Messung der Fermentaktivität sind offenbar im kompletten Homogenat nicht optimal, sonst dürfte, wenn man die Umsätze in den Fraktionen auf das ursprüngliche

¹⁾ *H. A. Krebs*, *Biochem. J.* **43**, 51 (1948).

²⁾ *A. E. Braunstein & M. G. Kritzmann*, *Enzymologia* **2**, 129 (1937/38).

Homogenat bezieht, in Tabelle 2 die Summe von II und III nicht grösser sein als I.

Tabelle 2.

Ansätze 40 Minuten bei 38° in Luft inkubiert. Gesamtvolumen 3,0 cm³. Asparaginsäure, Ketoglutarsäure 0,013-m.; Phosphatpuffer (pH 7,4) 0,0066-m.; Mg⁺⁺ 0,0033-m. KCl bis zur Isotonie zugefügt. Bestimmung der Glutaminsäure mit Cl. Welehi.

Fraktionen: (siehe Erklärung)	Glutaminsäure durch Transaminierung entstanden:	
	$\mu\text{Mol/mg N}$	$\mu\text{Mol/cm}^3$ ursprgl. Homogenat
I. Homogenat	30	132
II. Überstehendes	50	134
III. Mitochondriensuspension .	73	42
IV. Mitochondrien 2 \times ausgew.	70	29

Fraktionierung: Alle Operationen bei 0°. 2 g Leber werden 1 Minute in isotonischem KCl homogenisiert. Gesamtvolumen 15,0 cm³: Homogenat (I). 12 cm³ dieses Homogenats werden 25 Minuten bei 3600 U./Min. zentrifugiert (1500 g) und dekantiert, Volumen 11 cm³: Überstehendes (II). Aus dem Rückstand werden durch viermalige Zentrifugation mit isotonischem Mannit (5,75%) die Mitochondrien abgetrennt und dann 10 Minuten bei 18000 U./Min. (24000 g) sedimentiert, bis das Überstehende klar ist. Die abzentrifugierten Mitochondrien werden in isotonischem KCl aufgenommen (Vol. 6 cm³): Mitochondriensuspension (III). 3 cm³ dieser Suspension werden zweimal je 5 Minuten bei 24000 g mit isotonischer Mannitlösung gewaschen und wieder mit 3 cm³ isotonischem KCl aufgenommen: Mitochondrien 2mal ausgewaschen (IV). Alle Fraktionen 10mal mit isotonischem KCl verdünnt. Die Ansätze enthalten immer 0,5 cm³ der verdünnten Fraktionen.

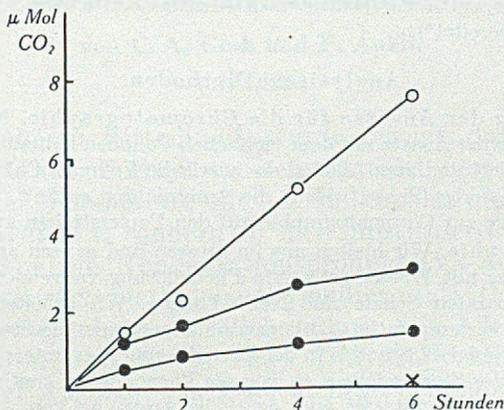


Fig. 2.

Asparaginsäure und α -Ketoglutarsäure: 50 Mol/2,6 cm³. Suspension von Cl. Welehi 0,3 cm³ pro Ansatz. Gesamtvolumen 2,6 cm³. Inkubation in Warburg-Gefässchen während 6 Stunden. Acetatpuffer pH 4,2 nach Krebs.

Abzisse: Zeit in Stunden. Ordinate: Decarboxylierung in $\mu\text{Mol CO}_2$. • Ansätze mit Asparaginsäure. o Ansatz mit Asparaginsäure + α -Ketoglutarsäure. x CO₂-Menge nach 6 Stunden bei Zusatz von „Cetavlon“.

Stickstoff pro Ansatz: Homogenat 224 γ , Überstehendes 145 γ , Mitochondrien-suspension 57 γ , Mitochondrien ($2 \times$ ausgewaschen) 42 γ .

Bei der Glutaminsäurebestimmung beobachteten wir, dass die Decarboxylierung der Glutaminsäure mit Cl. Welchii nur dann spezifisch verläuft, wenn das von Krebs¹⁾ empfohlene Detergens („Cetavlon“, Cetyl-trimethylammoniumbromid), 6 mg/2,6 cm³ Ansatz, zugesetzt wird. Asparaginsäure und in vermehrtem Masse Asparaginsäure bei Gegenwart von α -Ketoglutarinsäure werden durch unseren Stamm von Cl. Welchii langsam decarboxyliert, wenn kein „Cetavlon“ zugesetzt ist. Da α -Ketoglutarinsäure ohne Zusatz durch den Organismus nicht decarboxyliert wird, liegt die Vermutung nahe, dass Cl. Welchii einerseits die Asparaginsäure langsam decarboxyliert, andererseits aber eine Transaminase enthält, die aus Asparaginsäure und α -Ketoglutarinsäure Glutaminsäure bildet. Dadurch lässt sich die vermehrte CO₂-Entwicklung bei Gegenwart der Asparaginsäure und der Ketosäure erklären (vgl. Fig. 2).

Experimenteller Teil.

Methodik.

Tiermaterial. Es wurden männliche Albinoratten im Gewicht von 150–200 g verwendet. Die Tiere wurden optimal ernährt und vor dem Versuch 48 Stunden auf Hunger gesetzt.

Herstellung des Homogenats und der Mitochondriensuspension. Wir verweisen auf unsere früheren Mitteilungen²⁾³⁾ und auf die Anmerkung bei den einzelnen Versuchen.

Substanzen. Die meisten verwendeten Produkte wurden von F. Hoffmann-La Roche, Basel, bezogen. A.T.P. wurde nach Needham unter Berücksichtigung der Angaben von Le Page⁴⁾ bereitet⁴⁾.

Analytische Methoden.

Vorbereitung der Ansätze für die Chromatographie. Nach den Angaben von Awapara⁵⁾ wurde der Ansatz mit dem vierfachen Volumen kaltem Alkohol vermischt, zentrifugiert, dekantiert und zum Alkohol das vierfache Volumen Chloroform zugegeben. Die überstehende wässrige Phase, welche die Aminosäuren enthält, wurde abpipettiert und eine kleine Menge zur Chromatographie auf den Papierstreifen aufgetragen.

Chromatographie. Wir hielten uns im grossen und ganzen an die Angaben von Dent⁶⁾. Es wurde eine mit Wasser gesättigte Phenollösung verwendet. Das Standgefäss enthielt in einer separaten Schale eine NaCN-Lösung. Wir arbeiteten mit Whatman-Papier Nr. 1 bei Zimmertemperatur und liessen im allgemeinen die Streifen zur Trennung der Aminosäuren während 48 Stunden in der Phenollösung; das untere Ende des Streifens berührte den Boden des Standgefässes, so dass die Phenollösung kontinuierlich abfliessen konnte. Diese Anordnung gestattet eine deutliche Trennung von Asparaginsäure und

¹⁾ H. A. Krebs, Biochem. J. **43**, 51 (1948).

²⁾ F. Leuthardt, A. F. Müller & H. Nielsen, Helv. **32**, 744 (1949).

³⁾ F. Leuthardt & A. F. Müller, Exper. **4**, 478 (1948).

⁴⁾ G. A. Le Page in W. W. Umbreit, R. H. Burris & J. F. Stauffer, Manometric techniques and related methods, Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1945.

⁵⁾ J. Awapara, Arch. Biochem. **19**, 173 (1949).

⁶⁾ C. E. Dent, Biochem. J. **43**, 169 (1948).

Glutaminsäure, die auf den gewöhnlichen 12 Stunden-Chromatogrammen sehr nahe beieinander liegen. Als Reagens zum Nachweis der Aminosäuren bedienen wir uns einer 0,1-proz. Ninhydrinlösung in iso-Propylalkohol.

Glutaminsäure wurde mit Cl. Welchii S.R. 12 nach den Angaben von Gale¹⁾ und Krebs²⁾ bestimmt. Die Einzelheiten sind a.a.O. beschrieben³⁾.

Zusammenfassung.

1. Homogenat oder Suspensionen von Mitochondrien aus Rattenleber bilden aus Glutaminsäure Asparaginsäure. Die Asparaginsäure wurde durch Papierchromatographie nachgewiesen. Malonat hemmt die Reaktion.

2. Die Lebermitochondrien enthalten eine sehr wirksame Transaminase (Glutaminsäure-Oxalessigsäure).

3. Da die Mitochondrien alle Fermente des Tricarbonsäurecyclus enthalten, wird angenommen, dass nach der Desaminierung der Glutaminsäure zur α -Ketoglutarinsäure Oxalessigsäure entsteht, welche mit der überschüssigen Glutaminsäure unter Bildung von Asparaginsäure reagiert.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

41. Derivate des α -Aminopyrrols.

I. Mitteilung.

Sterische Resonanzbeeinflussung

von C. A. Grob und P. Ankli.

(27. I. 50.)

In einer früheren Mitteilung⁴⁾ wurde gezeigt, dass das Kondensationsprodukt I aus Formylbernsteinsäure-äthylester und Alanin-äthylester bei der Behandlung mit Alkaliäthylat nicht in das Dihydropyridin-Derivat IIa, sondern in das substituierte α -Pyrrolon III übergeht. Das analoge Kondensationsprodukt IVa aus Formylbernsteinsäure-dinitril (Oxymethylen-äthylendicyanid) (V, R = H) und Alanin-äthylester ergab bei der Behandlung mit Alkaliäthylat ein ähnliches Resultat. An Stelle eines Dihydropyridin-Derivates IIb entstand in guter Ausbeute ein Derivat des α -Aminopyrrols, nämlich die bicyclische Verbindung VIIIa. In der Folge zeigte es sich, dass diese Reaktion auch auf andere Derivate des Aminomethylen-bernsteinsäure-dinitrils (IV) anwendbar ist. Die so erhältlichen substi-

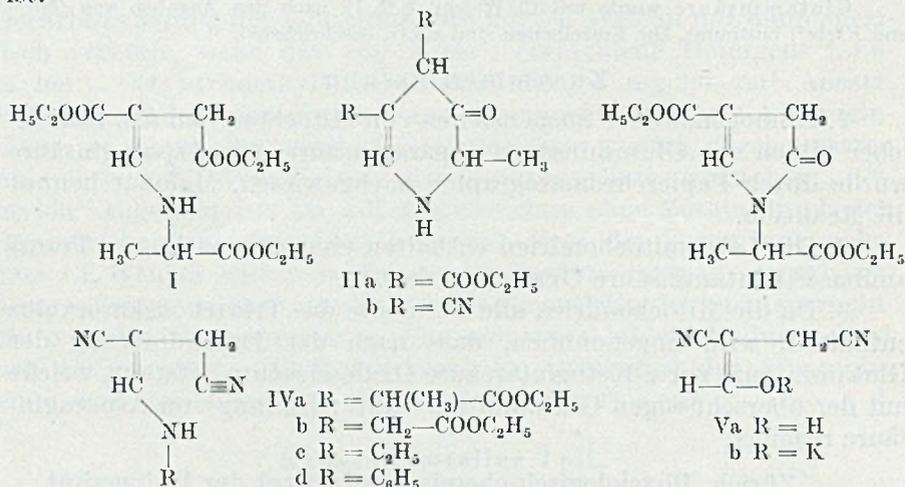
¹⁾ E. F. Gale, Biochem. J. **39**, 46 (1945).

²⁾ H. A. Krebs, Biochem. J. **43**, 51 (1948).

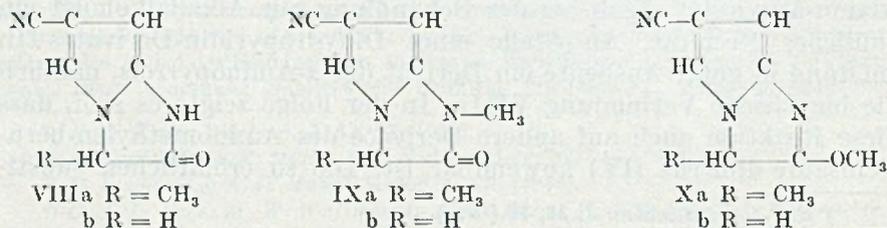
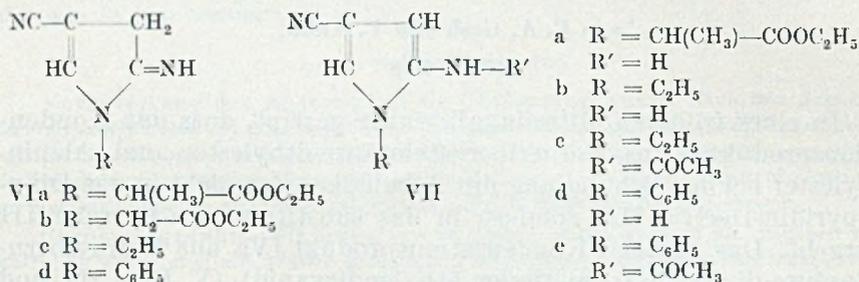
³⁾ J. Frei & F. Leuthardt, Helv. **32**, 1137 (1949).

⁴⁾ C. A. Grob & P. Ankli, Helv. **32**, 2010 (1949).

tuierten α -Aminopyrrole zeigen in mancher Hinsicht ein interessantes Verhalten, wovon in dieser und in einer weiteren Mitteilung die Rede ist.



Das noch nicht beschriebene Oxymethylen-äthylendicyanid (Va), welches nur als Salz beständig ist, wurde durch Kondensation von Äthylendicyanid mit Ameisensäure-äthylester in Gegenwart von Kalium-tert.Amylat erhalten. Das Kaliumsalz Vb lieferte mit Alanin-äthylester das (α -Carbäthoxy-äthylaminomethylen)-bernsteinsäure-dinitril (IVa). Mit Glycin-äthylester, Äthylamin und Anilin wurden die analogen Verbindungen IVb bis d erhalten¹⁾.



¹⁾ Die Kondensationsprodukte mit Glycin- und Alanin-ester sind seither von F. Bergel & A. Cohen beschrieben worden: U.S. 2384068; Chem. Abstr. 40, 2853 (1946).

Das Kondensationsprodukt IVa, ein Derivat des β -Aminoacrylonitrils, ging in Gegenwart von Alkalialkoholaten in guter Ausbeute in eine kristalline Verbindung der Zusammensetzung $C_8H_7ON_3$ über. Da sie sich mit den üblichen Mitteln nicht dehydrieren liess, mit Eisen(III)-chlorid keine Färbung erzeugte und in wasserfreiem Milieu kein Salz bildete, konnte es sich nicht um das Dihydropyridin-Derivat IIb handeln. Vielmehr war unter Addition des Iminwasserstoffatoms an die Cyanogruppe Ringschluss zu einem nicht fassbaren α -Pyrrolimin VIa eingetreten. Letzteres isomerisiert spontan zum α -Aminopyrrolderivat VIIa und erleidet unter Alkoholabspaltung Ringschluss zum bicyclischen Lactam VIIIa¹⁾. Das Kondensationsprodukt IVb lieferte in analoger Reaktionsfolge das bicyclische Lactam VIIIb. Dass diesen Verbindungen nicht die ebenfalls denkbare Imidazolstruktur XI (R = CH₃ oder H) zukommen kann, wird weiter unten begründet.

Die intermediäre Bildung von α -Aminopyrrolen kann an Hand des Äthylaminomethylen-bernsteinsäure-dinitrils (IVc) gezeigt werden. Die Behandlung dieser Verbindung mit Kaliumäthylat führt zu einer luftempfindlichen Base, dem 2-Amino-1-äthyl-4-cyano-pyrrol (VIIb).

In der Literatur werden diese wenig stabilen, basischen Pyrrol-derivate durchwegs als echte α -Amino-pyrrole formuliert²⁾, obschon die α -Pyrrolimin-formen VIa bis d, über welche sie in unserem Falle zweifellos entstehen, diskutierbar wären; dies um so mehr, als sich für die analogen Oxyverbindungen, z. B. die Verbindung III, die α -Pyrrolonform als zutreffend erwiesen hat³⁾. Da aber diese Verbindungen relativ starke Basen sind und weder in saurem noch in alkalischem Milieu Ammoniak abspalten, ziehen wir ebenfalls die Formulierung als α -Aminopyrrole vor.

Mit Acetanhydrid liefert das 2-Amino-1-äthyl-4-cyano-pyrrol (VIIb) ein beständiges N-Acetylderivat VIIc, welches mit Ehrlich's Reagenz die für Pyrrol-derivate mit freier α -Stellung charakteristische Rotfärbung gibt. Ausgehend vom Oxymethylen-äthylen-dicyanid (V) und Anilin werden in einer analogen Reaktionsfolge das 2-Amino-1-phenyl-4-cyano-pyrrol und sein N-Acetylderivat (VII d und e) erhalten. Es ist bemerkenswert, dass das primäre Kondensationsprodukt IVd nicht einheitlich ist⁴⁾. Anscheinend liegt die Form IVd in Gemisch mit der isomeren Schiff'schen Base vor, in der sich die Doppelbindung in Konjugation zum Benzolring befindet. Es würde sich somit um einen Fall von prototroper Tautomerie handeln, der aber nicht weiter untersucht wurde.

¹⁾ Wie uns privat mitgeteilt wurde, sind Ringschlüsse dieser Art fast gleichzeitig auch in den Laboratorien der Firma *Hoffmann-La Roche & Cie. AG.*, Basel und Welwyn Garden City, beobachtet worden.

²⁾ *H. Fischer & H. Orth*, Die Chemie des Pyrrols, Bd. I, S. 110, Leipzig 1934; ferner *H. Fischer, H. Guggemos & A. Schäfer*, A. 540, 30 (1939).

³⁾ *C. A. Grob & P. Ankli*, loc. cit.

⁴⁾ Siehe Experimenteller Teil.

Das bicyclische Lactam VIIIa ist eine relativ saure Verbindung und löst sich schon in verdünnten Alkalicarbonaten. Während Eisen(III)-chlorid keine Farbe erzeugt, fällt die Reaktion mit *Ehrlich's* Reagenz positiv aus. Mit Dimethylsulfat wird die N-Methylverbindung IXa gebildet. Diazomethan liefert neben 80% obiger N-Methylverbindung 20% des isomeren Methyläthers Xa. Beide sind unlöslich in verdünnten Alkalihydroxyden und Mineralsäuren. Die Methylierung des Lactams VIIIb verlief analog, indem ausser dem N-Methylderivat IXb der Methyläther Xb entstand. Diese Reaktionen sprechen gegen die Formulierung der Lactame VIIIa und b als Imidazol-4-Derivate XI ($R = CH_3$ bzw. H), welche in der Literatur als schwache Basen beschrieben werden¹⁾. Ebenso können die Methyläther Xa und b nicht als Imidazolderivate XII formuliert werden, da diese deutlich basischen Charakter haben müssten. Im übrigen ist die Entstehung einer neutralen N-Methylverbindung aus einem Imidazolonderivat wie XI nicht ohne Umlagerung möglich.

Eindeutig widerlegt werden die alternativen Formeln XI und XII durch die Infrarot- und Ultraviolett-Spektren. Das IR.-Spektrum des Lactams VIIIa weist die für die NH- und CO-Gruppe charakteristischen Banden bei 2,93 bzw. 5,80 μ auf. Im Spektrum des N-Methylderivates IXa ist die NH-Bande abwesend. In demjenigen der O-Methylverbindung Xa fehlt sowohl die NH-Bande als auch die CO-Bande; dafür ist eine neue bei 6,29 μ vorhanden, welche der N=C-Doppelbindung entspricht.

Wie aus Fig. 1 hervorgeht, liefern das Lactam VIIIa und sein N-Methylderivat IXa fast identische UV.-Spektren. Andererseits sind in bezug auf Lage der Maxima und Minima die Spektren des dem Lactam VIIIa entsprechenden Anions XV sowie des Methyläthers Xa sehr ähnlich und nur durch eine geringe Rotverschiebung von den beiden obigen Spektren verschieden. Man muss deshalb annehmen, dass in allen vier Verbindungen eine ähnliche Elektronenverteilung besteht. Da für den Methyläther die Iminoätherstruktur X durch die chemischen Befunde und das IR.-Spektrum gesichert ist, müssen im Lactam VIIIa und in seinem N-Methylderivat IXa die Elektronen weitgehend in Richtung auf die zwitterionische Grenzform XIIIa verschoben oder verschiebbar sein. Diese Mesomerie, die schon in der gewöhnlichen Carbonamidgruppe eine gewisse Rolle spielt²⁾, wird im vorliegenden System um so ausgeprägter sein, als hier Konjugation der π -Elektronen der Carbonamidgruppe zum Pyrrolring möglich ist. Daneben spielen sicher noch Grenzformeln wie XIIIb beim Lactam bzw. XIV beim Methyläther eine gewisse Rolle.

¹⁾ Siehe z. B. H. Finger, J. pr. [2], 76, 93 (1907).

²⁾ F. Arndt & B. Eistert, B. 71, 2040 (1938).

Die Mesomerie in Richtung auf die zwitterionischen Strukturen XIIIa und b hat zur Folge, dass das Wasserstoffatom der Amidgruppe relativ leicht als Proton ablösbar wird, was die bereits in verdünnter Sodalösung eintretende Salzbildung erklärt. Ein weiterer Anstoß zur Stabilität des Anions XV wird durch die Ausbreitungsmöglichkeit der negativen Ladung auf die benachbarte Carbonylgruppe und den Pyrrolring gegeben.

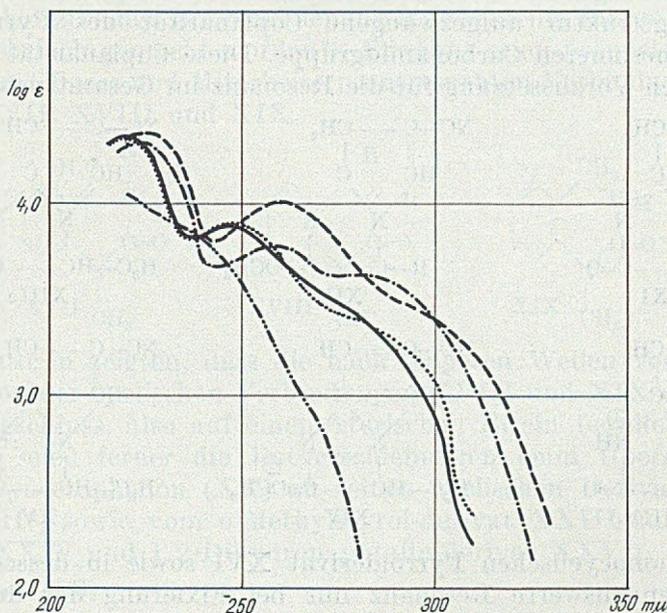
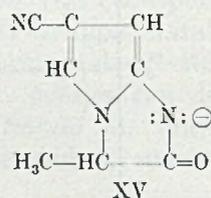
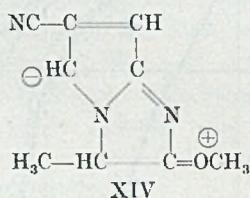
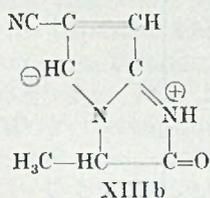
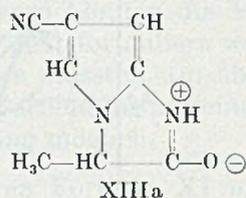
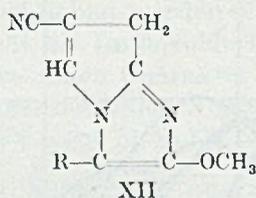
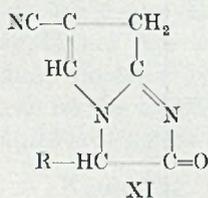


Fig. 1.

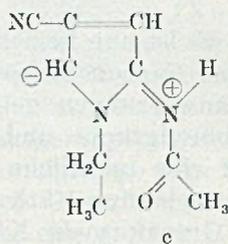
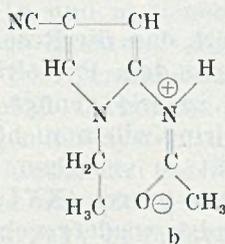
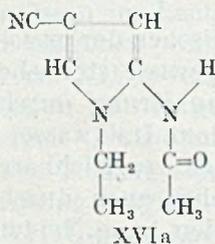
- Bicyclisches Lactam VIII a in Äthanol. λ_{\max} 220 und 246 $m\mu$; $\log \epsilon$ 4,35 bzw. 3,9.
- Bicyclisches Lactam VIII a in 0,1-n. NaOH. λ_{\max} 225 und 260 $m\mu$; $\log \epsilon$ 4,37 bzw. 4,01.
- N-Methylderivat IXa in Äthanol. λ_{\max} 220 und 247 $m\mu$; $\log \epsilon$ 4,35 bzw. 3,9.
- · — · O-Methylderivat Xa in Äthanol. λ_{\max} 223 und 255 $m\mu$; $\log \epsilon$ 4,32 bzw. 3,78.
- · · · · 2-Acetamino-1-äthyl-4-cyano-pyrrol (VIIc oder XVIa) in Äthanol.

Es ist nun bemerkenswert, dass die Resonanz zwischen der mesomeren Carbonamidgruppe und dem Pyrrolring an gewisse sterische Voraussetzungen gebunden ist. So genügt die Flankierung durch Carbonylgruppe und Pyrrolring allein nicht, um dem Imidwasserstoff eine merkliche Acidität zu verleihen, denn das vergleichbare 2-Acetyl-amino-1-äthyl-4-cyano-pyrrol (XVIa), welches auch durch die Grenzformeln XVIIb und c wiedergegeben werden kann, bildet auch in Natronlauge kein Salz. Ferner ist sein UV.-Spektrum (Fig. 1) deutlich von demjenigen des bicyclischen Lactams verschieden. Während dieses zwei deutliche Maxima bei 220 μ und 246 μ aufweist,

besitzt das einfache Pyrrolderivat XVI oberhalb 220μ überhaupt kein Maximum bei allgemein niedrigerer Extinktion. Daraus ist zu schliessen, dass in dieser Verbindung die Elektronen der mesomeren Carbonamidgruppe gar nicht oder nur in untergeordnetem Masse nach Grenzformel XVIc mit dem π -Elektronensystem des Pyrrolringes in Wechselwirkung treten. Das unterschiedliche chemische und optische Verhalten der beiden Verbindungen kann nur auf einen sterischen Faktor zurückgeführt werden, nämlich auf die im Lactam durch die Doppelringstruktur aufgezwungene Coplanarität des Pyrrolringes und der mesomeren Carbonamidgruppe. Diese Coplanarität ist aber bekanntlich Voraussetzung für die Resonanz im Gesamtsystem.



Im monocyclischen Pyrrolderivat XVI sowie in dessen Anion könnte nennenswerte Resonanz nur bei Fixierung der drehbaren Acetamidgruppe in der Ebene des Pyrrolringes eintreten. Die Betrachtung von Kalottenmodellen¹⁾, welche wenigstens ein angenähertes Bild des wahren Sachverhaltes geben, zeigt nun, dass die in Frage kommenden planaren Grenzstrukturen wie XVIb und c infolge Hinderung durch den ortho-Substituenten nicht ohne Spannung realisierbar sind²⁾. Daraus dürfte geschlossen werden, dass die Resonanz zwischen Carbonamidgruppe und Pyrrolring gehindert ist. Da im all-

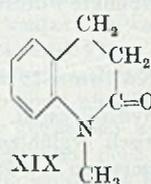
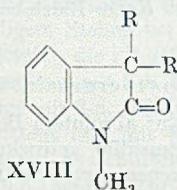
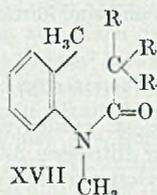


¹⁾ Es wurden *Fisher-Hirschfelder-Modelle* benützt.

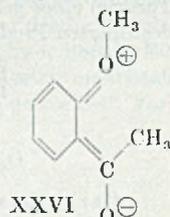
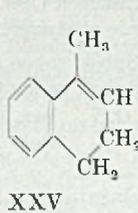
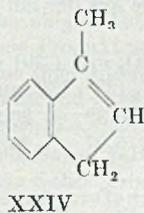
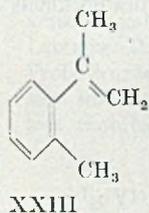
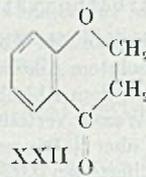
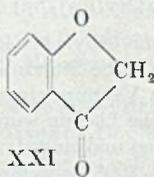
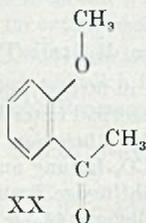
²⁾ Das gilt auch dann, wenn die Seitenkette um 180° um die C—N-Bindung gedreht wird.

gemeinen die Farbe mit der Grösse der Resonanz zwischen polaren Grenzformen vertieft wird, muss die Absorption der offenen Verbindung XVI relativ kurzwellig ausfallen¹⁾.

Im Gegensatz dazu ist im bicyclischen Lactam XIII die Coplanarität des konjugierten Systems durch den Ringschluss erzwungen und die Resonanz dadurch in höchstem Masse begünstigt, was sich in der erhöhten Acidität und in der längerwelligen UV.-Absorption äussert. Die Beobachtung, dass Ringschluss bei sonst gleichem Chromophor zu einer Rotverschiebung im Spektrum führen kann, ist schon mehrfach gemacht worden²⁾. Erwähnt seien beispielsweise die von *Ramart-Lucas* und Mitarbeitern untersuchten Verbindungen vom Typus XVII, XVIII und XIX.



Diese Autoren zeigten, dass die nach längeren Wellen verschobene Absorption der cyclischen Verbindungen XVIII und XIX einzig auf dem Ringschluss, also auf einem sterischen Effekt beruhen kann³⁾. Erwähnt seien ferner die Rotverschiebungen beim Übergang von *o*-Methoxyacetophenon (XX) zu seinen cyclischen Derivaten XXI und XXII⁴⁾ sowie vom *o*-Methylstyrol-derivat XXIII zum Inden-derivat XXIV und 1,2-Dihydronaphthalin-derivat XXV⁵⁾.



¹⁾ Siehe *L. N. Ferguson*, *Chem. Reviews* **43**, 385 (1948).

²⁾ Siehe z. B. *Mme Ramart-Lucas*, *Bl. [5]* **9**, 850 (1942), **10**, 13 (1943).

³⁾ *Mme Ramart-Lucas & Mlle Biguard*, *Bl. [5]* **2**, 1383 (1935).

⁴⁾ *Mme Ramart-Lucas & M. J. Hoch*, *Bl. [5]* **2**, 1381 (1935).

⁵⁾ *Mme Ramart-Lucas & M. J. Hoch*, *Bl. [5]* **5**, 848 (1938).

Die oben gegebene Erklärung dürfte auch hier gültig sein, da bei diesen nicht ringgeschlossenen Verbindungen ein Teil der für die Resonanz (und damit für die Lichtabsorption) massgebenden polaren Grenzformen, wie z. B. XXVI, sterisch etwas gehindert sind. In den analogen cyclischen Verbindungen dagegen ist die Resonanz infolge der erzwungenen Coplanarität sehr begünstigt.

Der eine von uns (C.A.G.) dankt der *Haco-Gesellschaft AG.*, Gümligen, für die Unterstützung dieser Arbeit. Wir möchten ferner auch an dieser Stelle Herrn Prof. *R. B. Woodward*, Cambridge, USA., für die Aufnahme und Interpretation der IR.-Spektren, sowie Herrn Prof. *Sune Bergström*, Lund, für einen Teil der UV.-Spektren bestens danken.

Experimenteller Teil.

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze $\pm 2^\circ$.

Kaliumsalz des Formylbernsteinsäure-dinitrils (Vb).

50 g Äthylendicyanid, in 500 cm³ absolutem Benzol gelöst, wurden während zwei Tagen über frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Zur filtrierten Lösung wurde nach dem Vermischen mit 52 g trockenem Ameisensäure-äthylester unter Feuchtigkeitsausschluss, N₂-Atmosphäre und Turbinieren die abgekühlte Lösung von 26 g Kalium in einer Mischung von 180 cm³ absolutem tert. Amylalkohol und 500 cm³ absolutem Benzol in dünnem Strahle zufließen gelassen. Nach zweistündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde das gelbe, mikrokristalline Kaliumsalz abgenutscht, mit einer Mischung gleicher Teile absolutem Alkohol und absolutem Äther gewaschen und im Vakuum während vier Stunden bei ca. 80° getrocknet. Ausbeute an rohem Kaliumsalz 82 g. Aus absolutem Alkohol kristallisierte eine Probe des pulverigen, hellgelben Produktes in bräunlichen, flachen Nadeln, die bei 205–210° schmolzen. Die Substanz ist sehr hygroskopisch und zersetzt sich bereits beim Umkristallisieren. Sie ist für die weiteren Umsetzungen rein genug.

(α -Carbäthoxyäthylaminomethylen)-bernsteinsäure-dinitril (IVa).

38 g Kaliumsalz Vb, 40 g DL-Alanin-äthylester-hydrochlorid in 60 cm³ Eisessig und 140 cm³ absolutem Alkohol wurden eine halbe Stunde auf dem Wasserbad unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand zwischen Äther und Wasser verteilt. Die ätherische Lösung wurde mit KHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der zähflüssige, braune Rückstand destillierte bei 0,02 mm und 195–200° Badtemperatur und lieferte 44,5 g (82% der Theorie) eines gelben, zähflüssigen Öles. Eine Probe aus der Mittelfraktion des nochmals destillierten Produktes wurde analysiert.

2,563 mg Subst. gaben 5,456 mg CO₂ und 1,391 mg H₂O

1,995 mg Subst. gaben 0,359 cm N₂ (23°, 739 mm)

C ₁₀ H ₁₃ O ₂ N ₃	Ber. C	57,95	H	6,32	N	20,28%
(207,23)	Gef. „	58,09	„	6,07	„	20,18%

Carbäthoxymethylaminomethylen-bernsteinsäure-dinitril (IVb)¹⁾.

20 g Kaliumsalz Vb und 19 g Glycin-äthylester-hydrochlorid wurden mit 70 cm³ absolutem Alkohol und 30 cm³ Eisessig eine halbe Stunde auf dem Wasserbad unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde wie oben aufgearbeitet. Das Rohprodukt destillierte bei 0,02 mm und 195–205° Badtemperatur und lieferte 19,8 g (75% der Theorie)

¹⁾ Die Versuche mit Glycinester wurden von Dr. *E. Sorkin* ausgeführt.

eines gelben, zähflüssigen Öles, das nach einigen Tagen kristallisierte. Umlösen aus Alkohol-Wasser gab farblose, rhombische Blättchen vom Smp. 57°. Zur Analyse wurde im Hochvakuum während zwölf Stunden bei Zimmertemperatur getrocknet.

4,010 mg Subst. gaben 8,175 mg CO₂ und 2,031 mg H₂O

1,939 mg Subst. gaben 0,372 cm³ N₂ (18°, 730 mm)

C₉H₁₁O₂N₃ Ber. C 55,95 H 5,74 N 21,75%
(193,20) Gef. „ 55,63 „ 5,67 „ 21,62%

Die Substanz löst sich gut in Äthanol, Methanol und Chloroform, weniger gut in Äther.

2-Oxo-3-methyl-6-cyano-1,2,3,4-tetrahydro-imidazo-[1,2-a]-pyrrol¹⁾
(bicyclisches Lactam) (VIIIa).

Zur abgekühlten Lösung von 8,3 g Kalium in einer Mischung von 60 cm³ absolutem tert. Amylalkohol und 150 cm³ absolutem Benzol wurde unter Feuchtigkeitsausschluss, N₂-Atmosphäre und Turbinieren eine Lösung von 40 g IVa in 200 cm³ absolutem Benzol zufließen gelassen. Unter Wärmeentwicklung schied sich sofort ein bräunlichgelber Niederschlag aus. Nach dreistündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde unter Turbinieren mit 200 cm³ Eiswasser versetzt, die rot gefärbte, wässrige Phase abgetrennt und die Benzol-Amylalkohol-Lösung zweimal mit 2-n. NaOH nachgewaschen. Beim Ansäuern der vereinigten, alkalischen Auszüge mit 2-n. HCl fiel das Produkt als gelblicher kristalliner Niederschlag aus, der abgenutscht und mit Eiswasser gewaschen wurde. Ausbeute 22,8 g. Aus dem Filtrat konnten durch Ausschütteln mit Chloroform noch 2,4 g gewonnen werden, total also 25,2 g (81,0% der Theorie). Zur Reinigung wurde das Produkt in heissem Chloroform unter Zugabe von wenig Methanol gelöst und durch Zusatz von Petroläther zur Kristallisation gebracht. Zur Analyse wurde noch zweimal umkristallisiert und im Hochvakuum zwei Stunden bei 80° getrocknet. Farblose Nadeln, Smp. 165—166° (bei ca. 140° Umwandlung in rhombische Blättchen).

3,664 mg Subst. gaben 8,018 mg CO₂ und 1,463 mg H₂O

2,957 mg Subst. gaben 0,681 cm³ N₂ (18°, 733 mm)

C₈H₇ON₃ Ber. C 59,62 H 4,38 N 26,08%
(161,16) Gef. „ 59,70 „ 4,44 „ 26,05%

Die Reaktion wurde in etwas geringerer Ausbeute auch mit Na-Methylat und Na-Äthylat im entsprechenden Alkohol ausgeführt.

Die Substanz ist gut löslich in Äthanol und Methanol, weniger gut in Chloroform und Äther, unlöslich in Petroläther und kaltem Wasser. Eine äthanolische Lösung gibt mit *Ehrlich's* Reagenz nach einigen Minuten eine hellrote Färbung.

2-Oxo-6-cyano-1,2,3,4-tetrahydro-imidazo-[1,2-a]-pyrrol¹⁾
(bicyclisches Lactam) (VIIIb).

15 g IVb, in 50 cm³ absolutem Benzol gelöst und mit der Lösung von 3,3 g Kalium in einer Mischung von 22,0 cm³ absolutem tert. Amylalkohol und 60 cm³ absolutem Benzol versetzt, gaben nach der obigen Aufarbeitung 10,4 g (91% der Theorie) des bicyclischen Lactams. Das gelbbraune Produkt war in allen Lösungsmitteln sehr schwer löslich. Eine Probe wurde dreimal aus einer Mischung gleicher Teile Methanol und Aceton umkristallisiert und zur Analyse während zwei Stunden bei 80° im Hochvakuum getrocknet. Farblose, rhombische Blättchen, Zers. ab 280° (Umwandlung bei ca. 250°).

3,909 mg Subst. gaben 8,214 mg CO₂ und 1,129 mg H₂O

1,690 mg Subst. gaben 0,428 cm³ N₂ (22°, 737 mm)

C₇H₅ON₃ Ber. C 57,14 H 3,43 N 28,56%
(147,13) Gef. „ 57,34 „ 3,23 „ 28,57%

Die äthanolische Lösung der Substanz gibt mit *Ehrlich's* Reagenz nach einigen Minuten eine hellrote Färbung.

¹⁾ Ringbezeichnung nach *Patterson & Capell*, The Ringindex of Organic Compounds, New York 1940.

Äthylaminomethylen-bernsteinsäure-dinitril (IVc).

5 g Kaliumsalz Vb und 2,8 g Äthylamin-hydrochlorid wurden mit 15 cm³ absolutem Alkohol und 5 cm³ Eisessig während 15 Minuten unter Rückfluss auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde im Vakuum eingeeengt und der Rückstand zwischen Wasser und Äther unter Zusatz von wenig Chloroform verteilt. Die ätherische Lösung wurde mit KHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Die Destillation des zähflüssigen Rückstandes bei 0,02 mm und 140—145° Badtemperatur gab 3,3 g (71% der Theorie) eines schwach gelb gefärbten Öles, das beim Anreiben kristallisierte. Nach dem Umkristallisieren aus Chloroform-Petroläther schmolzen die farblosen Nadeln bei 102—103°. Zur Analyse wurde im Hochvakuum während drei Stunden bei 50° getrocknet.

3,992 mg Subst. gaben 9,087 mg CO₂ und 2,380 mg H₂O

1,269 mg Subst. gaben 0,359 cm³ N₂ (24°, 734 mm)

C₇H₉N₃ Ber. C 62,20 H 6,71 N 31,09%

(135,16) Gef. „ 62,12 „ 6,67 „ 31,40%

Die Substanz ist gut löslich in Äthanol, Methanol und Chloroform, weniger gut in Benzol und Äther.

2-Amino-1-äthyl-4-cyano-pyrrol (VIIb).

2 g IVc wurden in 10 cm³ absolutem Alkohol gelöst und unter Feuchtigkeitsausschluss und N₂-Atmosphäre zu einer Lösung von 0,63 g Kalium in 10 cm³ absolutem Alkohol gegeben. Das braun gefärbte Reaktionsgemisch wurde während zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeeengt, mit Wasser verdünnt und ausgeäthert. Die ätherische Lösung wurde wiederholt mit kleinen Portionen 2-n. HCl ausgeschüttelt und die vereinigten Auszüge unter Eiskühlung bis zur alkalischen Reaktion mit 2-n. NaOH versetzt, wobei sich das Aminopyrrol als Öl ausschied. Dieses wurde in Äther aufgenommen, die ätherische Lösung neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand, in einem Kragenkölbchen bei 0,02 mm und 130—140° Badtemperatur destilliert, gab 1,7 g (85% der Theorie) eines farblosen Öles, das sich nach kurzer Zeit rot färbte. Zur Analyse wurde eine Probe im Hochvakuum destilliert und sofort verbrannt.

3,987 mg Subst. gaben 9,086 mg CO₂ und 2,453 mg H₂O

C₇H₉N₃ (135,16) Ber. C 62,20 H 6,71% Gef. C 62,19 H 6,89%

Die Substanz ist sehr unbeständig und färbt sich auch im Vakuum nach einigen Stunden dunkelrot. Ein Teil der Substanz wurde mit einem Tropfen Methanol versetzt und gut verschlossen bei -15° aufbewahrt. Nach einigen Tagen hatten sich wenige Kristalle gebildet. Nach nochmaliger Destillation kristallisierte das Produkt aus Chloroform-Petroläther beim Impfen in farblosen, abgeschnittenen Pyramiden, die bei 34—35° schmolzen und sich nach kurzer Zeit gelbbraun färbten.

2-Acetamino-1-äthyl-4-cyano-pyrrol (VIIc).

200 mg frisch destilliertes VIIb wurden mit 5 cm³ Essigsäureanhydrid unter Feuchtigkeitsausschluss während 10 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt, im Vakuum zur Trockene verdampft und der kristalline Rückstand im Molekularkolben bei 0,01 mm und 130° Badtemperatur sublimiert. Aus Chloroform-Petroläther kristallisierte das farblose Produkt in sehr feinen, verfilzten Nadeln, Smp. 154°. Zur Analyse wurde im Hochvakuum während zwei Stunden bei 80° getrocknet.

3,635 mg Subst. gaben 8,165 mg CO₂ und 2,068 mg H₂O

1,006 mg Subst. gaben 0,215 cm³ N₂ (24°, 734 mm)

C₉H₁₁ON₃ Ber. C 61,00 H 6,26 N 23,72%

(177,20) Gef. „ 61,30 „ 6,37 „ 23,72%

Die Substanz löst sich gut in Äthanol, Methanol, Aceton und Chloroform, weniger gut in Benzol und Äther.

Phenylaminomethylen-bernsteinsäure-dinitril (IVd), bzw. Anil
des Formylbernsteinsäure-dinitrils.

2,92 g Kaliumsalz Vb wurden in 3 cm³ Wasser gelöst, mit 2,4 g Anilin versetzt und zur Lösung des Anilins 3 cm³ Eisessig zugetropft. Nach kurzem Erwärmen auf dem Wasserbad wurde mit Wasser verdünnt und abkühlen gelassen, wobei sich 2,1 g Anilid abschieden. Durch Umlösen aus verdünntem Methanol wurden Nadeln vom Smp. 148—155° erhalten. Zur Analyse wurde noch zweimal aus demselben Lösungsmittel umkristallisiert, wobei sich der Schmelzpunkt nicht änderte, und 30 Minuten bei 0,03 mm und 90° getrocknet. Das Präparat stellt vermutlich ein Gemisch der obigen Isomeren dar.

C₁₁H₉N₃ Ber. C 72,11 H 4,95 N 22,94%
(183,20) Gef. „ 72,04 „ 4,71 „ 22,74%

Das Isomerengemisch ist löslich in Methanol, Aceton, weniger gut in Chloroform, schwer in Äther.

Nach dem Sublimieren im Hochvakuum bei 0,03 mm und 140° Badtemperatur schmolz die Substanz bei 148—149°. Nach einstündigem Kochen in Xylol und Umkristallisieren aus wässrigem Methanol wurden dünne Blättchen erhalten, welche bei 139—140° schmolzen. Zur Analyse wurde zwei Stunden bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

3,810 mg Subst. gaben 10,059 mg CO₂ und 1,682 mg H₂O
1,974 mg Subst. gaben 0,398 cm³ N₂ (13°, 726 mm)

C₁₁H₉N₃ Ber. C 72,11 H 4,95 N 22,94%
(183,20) Gef. „ 72,05 „ 4,94 „ 22,98%

Es dürfte hier eines der beiden Isomeren vorliegen.

2-Amino-1-phenyl-4-cyano-pyrrol (VIId) und
2-Acetamino-1-phenyl-4-cyano-pyrrol (VIIE).

1,8 g des obigen Isomerengemisches wurden mit der Lösung von 1,04 g Kalium in 25 cm³ absolutem Alkohol versetzt und zwei Stunden bei 20° stehen gelassen. Dann wurde am Vakuum eingeeengt, mit Wasser versetzt und zweimal ausgeäthert. Die ätherische Lösung wurde wiederholt mit kleinen Portionen 2-n. HCl extrahiert, die sauren Auszüge alkalisch gemacht und erschöpfend ausgeäthert. Nach dem Trocknen und Abdestillieren des Äthers hinterblieben 1,8 g Base als bräunlicher Sirup. Dieser färbte sich an der Luft rot, liess sich jedoch bei 0,03 mm unzersetzt bei 120° Badtemperatur destillieren. Mit HCl-Gas in Äther wurde ein unbeständiges Hydrochlorid gebildet.

1,8 g rohe Base wurden mit 5 cm³ Acetanhydrid während 10 Minuten auf 90° erwärmt und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (2,2 g), der nach einiger Zeit kristallisierte, wurde aus Chloroform-Hexan umgelöst. Farblose, zugespitzte Stäbchen, Smp. 171°. Zur Analyse wurde eine Probe aus Alkohol-Wasser umkristallisiert und im Hochvakuum drei Stunden bei 80° getrocknet.

3,950 mg Subst. gaben 10,030 mg CO₂ und 1,725 mg H₂O
6,378 mg Subst. gaben 1,078 cm³ N₂ (22°, 734 mm)

C₁₃H₁₁ON₃ Ber. C 69,32 H 4,92 N 18,66%
(225,24) Gef. „ 69,29 „ 4,89 „ 18,89%

Die Reaktion mit *Ehrlich's* Reagenz war positiv.

Methylierung des bicyclischen Lactams VIIIA zu IXa und Xa.

a) Mit Diazomethan. 2 g der Verbindung VIIIA wurden in 15 cm³ Methanol gelöst und unter Eiskühlung und Umschütteln in kleinen Portionen ätherische Diazomethanolung zugegeben. Nach Abklingen der N₂-Entwicklung wurde mit einem Überschuss von Diazomethan während einer Stunde bei -15° stehen gelassen, dann mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt und im Vakuum zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde in Äther unter Zusatz von Chloroform gelöst, die Lösung mit 2-n. NaOH und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt lieferte aus Aceton-Petroläther umgelöst 1,3 g des N-Methylderivates IXa. Die Mutterlauge wurde im Va-

kuum eingedampft und der Rückstand (760 mg) an 23 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Petroläther-Benzol-Gemischen bis zum Verhältnis 4:1 eluierten Fraktionen gaben 540 mg des O-Methylderivates Xa. Mit Petroläther-Benzol 1:4 und Benzol wurden noch 200 mg N-Methylderivat eluiert. Die N-Methylverbindung (total 1,5 g) kristallisierte aus Aceton-Petroläther in farblosen Nadeln, Smp. 178—79°. Eine Probe wurde zur Analyse noch zweimal umkristallisiert und während zwei Stunden im Hochvakuum bei 70° getrocknet.

4,073 mg Subst. gaben 9,240 mg CO_2 und 1,900 mg H_2O

1,518 mg Subst. gaben 0,326 cm^3 N_2 (27°, 744 mm)

4,058 mg Subst. verbrauchten 7,115 cm^3 0,02-n. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (NCH_3 -Best.)

$\text{C}_9\text{H}_9\text{ON}_3$ Ber. C 61,70 H 5,18 N 23,99 — CH_3 8,58%
(175,18) Gef. „ 61,91 „ 5,22 „ 23,92 „ 8,79%

Die Substanz löst sich gut in Chloroform und Aceton, etwas weniger gut in Äthanol und Methanol, schlecht in Äther. In verdünntem NaOH ist sie unlöslich. Die äthanolische Lösung gibt mit Ehrlich's Reagenz eine hellrote Färbung.

Die O-Methylverbindung kristallisierte aus Aceton-Petroläther in farblosen, rechtwinkligen Blättchen vom Smp. 133—134°. Eine noch zweimal umkristallisierte Probe wurde zur Analyse im Hochvakuum zwei Stunden bei 70° getrocknet.

4,205 mg Subst. gaben 9,553 mg CO_2 und 1,992 mg H_2O

1,742 mg Subst. gaben 0,373 cm^3 N_2 (26°, 743 mm)

3,514 mg Subst. verbrauchten 5,994 cm^3 0,02-n. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Zeisel-Vieböck)

$\text{C}_9\text{H}_9\text{ON}_3$ Ber. C 61,70 H 5,18 N 23,99 — OCH_3 17,71%
(175,18) Gef. „ 61,99 „ 5,30 „ 23,90 „ 17,64%

Die Substanz löst sich in allen Lösungsmitteln etwas besser als die N-Methylverbindung. In 2-n. HCl und 2-n. NaOH ist sie unlöslich. Die äthanolische Lösung gibt mit Ehrlich's Reagenz eine kirschrote Färbung.

b) Mit Dimethylsulfat. Zu einer Lösung von 500 mg der Verbindung VIIIa in 2 cm^3 2-n. NaOH und 8 cm^3 Wasser wurden unter Umschütteln 400 mg Dimethylsulfat zugetropft. Nach kurzer Zeit begann das Methylderivat in feinen Nadeln auszukristallisieren. Das Reaktionsgemisch wurde noch eine Stunde geschüttelt, dann die Kristalle abgenutscht und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt (420 mg) schmolz bei 176—178°. Nach dem Umkristallisieren aus Aceton-Petroläther schmolzen die farblosen Nadeln bei 178—179° und gaben mit dem unter a) beschriebenen N-Methylderivat keine Depression.

Methylierung des bicyclischen Lactams VIIlb zu IXb und Xb.

a) Mit Diazomethan. 1 g der Verbindung VIIIb wurde fein verrieben, in 30 cm^3 Methanol aufgeschwemmt und unter Eiskühlung und Turbinieren im Verlaufe von sechs Stunden mit kleinen Portionen ätherischer Diazomethanolösung versetzt. Dann wurde nach Zugabe einiger Tropfen Essigsäure im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand unter gelindem Erwärmen mit ca. 10 cm^3 2-n. NaOH ausgezogen und abgenutscht. Aus dem alkalischen Filtrat konnten durch Ansäuern 530 mg Ausgangsmaterial zurückgewonnen werden. Das methylierte, in 2-n. NaOH unlösliche Gemisch (460 mg) wurde an 14 g Al_2O_3 chromatographiert. Die ersten mit Petroläther-Benzol eluierten Fraktionen gaben 105 mg der O-Methylverbindung Xb. Die nächsten Fraktionen lieferten 350 mg der N-Methylverbindung IXb. Das N-Methylderivat kristallisierte aus Aceton-Petroläther in farblosen Nadeln vom Smp. 210° (ab ca. 160° Umwandlung). Eine noch zweimal umkristallisierte Probe wurde im Hochvakuum während zwei Stunden bei 80° getrocknet und analysiert.

3,364 mg Subst. gaben 7,320 mg CO_2 und 1,267 mg H_2O

1,454 mg Subst. gaben 0,338 cm^3 N_2 (24°, 742 mm)

8,528 mg Subst. verbrauchten 15,420 cm^3 0,02-n. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (NCH_3 -Best.)

$\text{C}_8\text{H}_7\text{ON}_3$ Ber. C 59,62 H 4,38 N 26,08 — CH_3 9,33%
(161,16) Gef. „ 59,38 „ 4,32 „ 26,18 „ 9,24%

Die Substanz ist wenig löslich in Äthanol, Methanol, Aceton und Chloroform.

Das O-Methylderivat IXb kristallisierte aus Aceton-Petroläther in farblosen Nadeln vom Smp. 151°. Eine mehrmals umkristallisierte Probe wurde zur Analyse zwei Stunden bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

3,685 mg Subst. gaben 8,060 mg CO₂ und 1,406 mg H₂O

1,983 mg Subst. gaben 0,456 cm³ N₂ (23°, 745 mm)

2,624 mg Subst. verbrauchten 5,140 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃ (Zeisel-Vieböck)

C₈H₇ON₃ Ber. C 59,62 H 4,38 N 26,08 – OCH₃ 19,26%

(161,16) Gef. „ 59,69 „ 4,27 „ 25,99 „ 19,48%

Die Substanz löst sich in den oben angegebenen Lösungsmitteln etwas besser als die N-Methylverbindung.

b) Mit Dimethylsulfat. 500 mg der Verbindung VIIIb wurden in 2 cm³ 2-n. NaOH und 8 cm³ Wasser gelöst und mit 400 mg Dimethylsulfat wie die Verbindung VIIIa methyliert. Ausbeute 440 mg des N-Methylderivates IXb vom Smp. 210°.

Die Mikroanalysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium ausgeführt (Leitung E. Thommen).

Die UV.-Absorptionsspektren wurden mit einem Beckman-Quarz-Spektrograph, Modell DU, aufgenommen.

Zusammenfassung.

N-substituierte Aminomethylen-bernsteinsäure-nitrile der allgemeinen Formel IV gehen unter der Einwirkung von Alkalialkoholaten in α -Aminopyrrolderivate VII über. Die in gleicher Weise erhältlichen Derivate des 1-Carbäthoxymethyl-2-amino-pyrrols (VIa und b) erleiden spontan einen weiteren Ringschluss und bilden bicyclische Lactame VIII. Letztere unterscheiden sich deutlich vom analog gebauten α -Acetyl-amino-pyrrol (XV) durch ihre stark erhöhte Acidität und längerwellige Absorption im UV.

Ein Vergleich der Eigenschaften und Spektren des bicyclischen Lactams VIIIa mit jenen des entsprechenden N- und O-Methyläthers legt es nahe, für das Lactam einen mesomeren Zustand anzunehmen, der sich durch die Grenzformeln VIIIa, XIIIa und b beschreiben lässt. Die Resonanz zwischen diesen Grenzformeln ist durch den ebenen Bau des Lactams besonders begünstigt und wirkt sich auf die Acidität und die UV.-Absorption in charakteristischer Weise aus. Diese Tatsache tritt besonders beim Vergleich mit dem analog gebauten, jedoch monocyclischen 1-Äthyl-2-acetyl-amino-4-cyano-pyrrol (XV), in welchem die Resonanz eher gehindert ist, deutlich hervor.

Es werden andere in der Literatur beschriebene Fälle, in denen Ringschlüsse ohne weitere Veränderung des Chromophors bathochrom wirkten, erwähnt und darauf hingewiesen, dass die Änderung der UV.-Absorption wahrscheinlich auch eine Folge sterischer Resonanzbeeinflussung ist.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

42. Der enzymatische Abbau des Scillirosids zum Scillirosidin.

22. Mitteilung über Herzglykoside¹⁾

von A. Stoll und J. Renz.

(27. I. 50.)

Aus der roten Varietät der Meerzwiebel (*Scilla* (= *Urginea*) *maritima* (Baker) L., Fam. Liliaceae), die seit langem zur Vertilgung von Ratten verwendet wird, haben wir vor acht Jahren das Scillirosid²⁾, den Hauptträger der spezifischen Wirkung auf Ratten isoliert und beschrieben. Das Scillirosid ist ein Glykosid; es besteht aus dem Aglykon und 1 Mol Glucose und besitzt wie das chemisch nahe verwandte Scillaren A auch eine sehr starke Wirkung auf das Herz.

Die Untersuchungen über seine Konstitution³⁾ waren dadurch erschwert, dass das Aglykon als solches bisher nicht isoliert werden konnte, so dass die Abbaureaktionen vom Glykosid aus durchgeführt werden mussten. Die Zucker-Aglykonbindung von Herzglykosiden, bei denen der Zuckeranteil aus Glucose besteht, ist ganz allgemein mit Säuren schwer verseifbar, so dass hierzu meist Bedingungen notwendig sind, die eine Veränderung bzw. weitgehende Zerstörung des Aglykons mit sich bringen. Die in letzter Zeit bei schwer spaltbaren Herzglykosiden mehrfach mit Erfolg angewandte Verseifungsmethode mit Aceton-Salzsäure nach *Mannich*⁴⁾ führte beim Scillirosid zu keinem brauchbaren Ergebnis. Bei der sauren Hydrolyse des Scillirosids entstanden neben 1 Mol Glucose nur dunkelgefärbte, amorphe Produkte, aus denen keine kristallisierten Fraktionen gewonnen werden konnten. Wie aus der Untersuchung über die Konstitution des Scillirosids hervorgeht, sind die besonders empfindlichen Stellen des Aglykons eine Kerndoppelbindung, die sehr wahrscheinlich zwischen C₈ und C₉ lokalisiert ist, eine dazu benachbarte tertiäre Hydroxylgruppe an C₁₄, ferner ein acetyliertes Enol-Hydroxyl in α -Stellung zur Carboxylgruppe des doppelt ungesättigten, 6gliedrigen Lactonringes.

Bis vor kurzem war es in keinem Fall möglich gewesen, bei den Herzglykosiden die Bindung zwischen Aglykon und Zucker auf dem schonenden, enzymatischen Wege zu lösen. Auch die rote Meerzwiebel enthält kein Ferment, das die glykosidische Bindung des Scillirosids aufzuspalten vermöchte.

¹⁾ 21. Mitt., Helv. **32**, 293 (1949).

²⁾ A. Stoll & J. Renz, Helv. **25**, 43 (1942).

³⁾ A. Stoll & J. Renz, Helv. **25**, 377 (1942); A. Stoll, J. Renz & A. Helfenstein, Helv. **26**, 648 (1943).

⁴⁾ C. Mannich & G. Siewert, B. **75**, 750 (1942).

Die Untersuchung der Herzglykoside der Samen von *Coronilla glauca* L. (Fam. Papilionaceae)¹⁾ führte zu der Feststellung, dass die genuinen, nur mit Glucose verbundenen Aglykone von einem Enzymsystem der Samen bis zu den Aglykonen abgebaut werden. Es gelang, vier verschiedene, neue Aglykone zu identifizieren, die einerseits zum Strophanthidin, andererseits zu gewissen *Digitalis*-Aglykonen in näherer Beziehung stehen. Neu war die Beobachtung, dass Enzyme der *Coronilla* Samen Glucosereste von Glykosiden, denen übrigens verschiedene Aglykone zugrunde liegen, gleicherweise bis zur zuckerfreien Stufe abzuspalten vermögen. Das Enzymsystem der *Coronilla* Samen erweist sich insofern als spezifisch, als es mit Hilfe der α -Glucosidase der Hefe oder der β -Glucosidase des Emulsins nicht gelingt, die *Coronilla*glykoside zu spalten.

Dieser Befund veranlasste uns, auch auf das *Scillirosid* der Meerzwiebel, das wie erwähnt nur aus Glucose und Aglykon besteht, die Enzyme der *Coronilla* einwirken zu lassen. Das Ergebnis war positiv; es konnte mit guter Ausbeute eine kristallisierte, zuckerfreie Verbindung isoliert werden, die sich auf Grund ihrer Eigenschaften und der Analysen als intaktes Aglykon des *Scillirosids* erwies. Für diesen Abbau eignen sich nicht nur die zerkleinerten, nicht vorbehandelten Samen, sondern besonders auch Enzympräparate, die z. B. durch Extraktion der *Coronilla* Samen mit Fettlösungsmitteln oder durch Vorextraktion mit Alkohol oder Methanol erhalten werden. Die Herzglykoside und das *Furocumaringlykosid* der Samen werden so entfernt, ohne dass die enzymatische Aktivität leidet. Die Enzyme können auch mit Wasser oder Pufferlösungen aus dem Pflanzenmaterial extrahiert und aus diesen Auszügen mit Alkohol gefällt werden. Solche Enzympräparate sind wasserlöslich und eignen sich für die Glykosidspaltung unter Bedingungen, die für die präparative Aufarbeitung des Aglykons günstig sind.

Auf der Suche nach leichter zugänglichem Enzymmaterial für die fermentative Spaltung des *Scillirosids* fanden wir, dass auch *Luzernesamen* (*Medicago sativa* L.) befähigt sind, den Glucoserest des *Scillirosids* abzuspalten. Diese Beobachtung ist insofern bemerkenswert, als sowohl die Samen als auch die übrigen Teile der *Luzerne*pflanze frei von Herzglykosiden sind. Über die interessanten Enzymsysteme, die sich in *Coronilla*- und in *Luzernesamen* vorfinden, werden wir in einer besonderen Arbeit später berichten.

Das Aglykon des *Scillirosids*, das wir *Scillirosidin* nennen, besitzt die Zusammensetzung $C_{26}H_{34}O_7$. Wie aus den Analysen und der Lactontitration hervorgeht, enthält das Aglykon die Acetylgruppe noch, die nach den früheren Untersuchungen im Lactonring sitzt. Das *Scillirosidin* kristallisiert aus wässrigem Methanol in bis

¹⁾ A. Stoll, A. Pereira & J. Renz, *Helv.* **32**, 293 (1949).

1 cm langen Nadeln, die bei 173–175⁰¹) schmelzen. Der Drehwert liegt bei $-22,6^{\circ}$ ($[\alpha]_D^{20}$ in Methanol). Als charakteristische Merkmale sind in Fig. 1 die im Laboratorium von Prof. *T. Reichstein*, Basel, neu aufgenommenen UV.-Spektren von Scillirosid und Scillirosidin abgebildet.

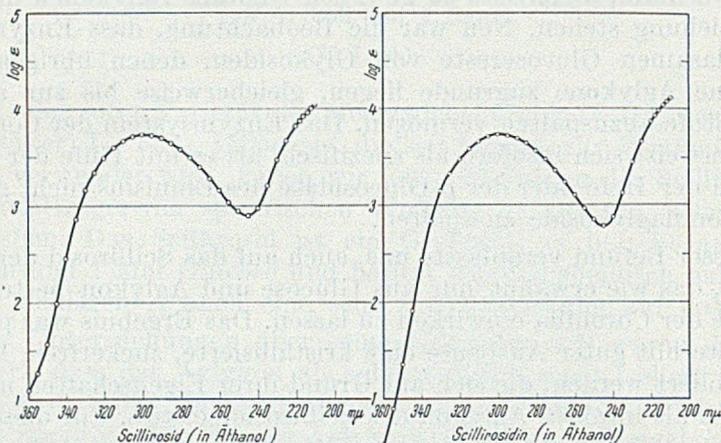


Fig. 1.

Aus der Identität der beiden Spektren geht hervor, dass das Aglykon bei der enzymatischen Hydrolyse, insbesondere in bezug auf den die Acetylgruppe tragenden Lactonring intakt geblieben ist.

Das Scillirosidin löst sich bei Zimmertemperatur bereits in der 20fachen Menge Methanol. Bei der Acetylierung entsteht ein Monoacetyl-scillirosidin, $C_{28}H_{36}O_8$, das aus Methanol in glasklaren, meist viereckigen Plättchen kristallisiert und bei 256^o schmilzt. Das reine Acetylderivat löst sich erst in der ca. 100fachen Menge siedendem Methanol.

Das Scillirosidin ist ausgezeichnet durch eine sehr hohe Herzwirksamkeit. Die Toxizität nach *Hatcher*²⁾ liegt bei 0,057 mg. Unseres Wissens steht damit das Aglykon des Scillirosids an der Spitze aller bis jetzt bekannten Herzgifte. Erst kürzlich ist im Hellebrigenin³⁾ ein Aglykon bekannt geworden, das sich durch eine sehr hohe Wirksamkeit auszeichnet und dessen Acetylierung mit einer Steigerung der Toxizität einhergeht. Die Acetylverbindung des Scillirosidins ist dagegen weniger wirksam. Das Hellebrigenin und das Scillirosidin sind die einzigen bisher bekannt gewordenen Aglykone, die gegenüber ihren Glykosiden eine erhöhte Toxizität aufweisen. In der folgenden Ta-

1) Alle Schmelzpunkte dieser Arbeit sind korrigiert.

2) Die Werte, die an der Katze bestimmt wurden und sich auf 1 kg Tier bei intravenöser Infusion beziehen, verdanken wir einer Privatmitteilung von Prof. *E. Rothlin*, Basel.

3) *J. Schmutz*, *Helv.* **32**, 1442 (1949).

belle sind vergleichbare Toxizitätswerte einiger Aglykone und ihrer dazugehörigen Glykoside zusammengestellt.

Tabelle 1.
Toxizitätswerte einiger Glykoside und Aglykone

Substanz	Formel	M.G.	Toxizität nach <i>Hatcher</i>	
			mg/kg	10 ⁻³ Millimol/kg
Scillirosid	C ₃₂ H ₄₁ O ₁₂	620	0,120 ¹⁾	0,194
Scillirosidin	C ₂₆ H ₃₄ O ₇	458	0,057 ¹⁾	0,124
Acetyl-scillirosidin	C ₂₈ H ₃₆ O ₈	500	0,152 ¹⁾	0,304
Hellebrin	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₅	734	0,104 ²⁾	0,142
Desgluco-hellebrin	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₀	562	0,087 ²⁾	0,155
Hellebrigenin	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	416	0,077 ²⁾	0,185
Acetyl-hellebrigenin	C ₂₆ H ₃₄ O ₇	458	0,064 ²⁾	0,140
k-Strophanthosid	C ₄₂ H ₆₁ O ₁₉	872	0,126 ³⁾	0,144
Cymarin	C ₃₀ H ₄₄ O ₉	548	0,111 ³⁾	0,202
Strophanthidin	C ₂₈ H ₃₂ O ₆	404	0,285 ³⁾	0,705

In der letzten Spalte der Tabelle ist vergleichsweise die letale Infusionsdosis nach *Hatcher* in Millimolen angeführt; daraus geht besonders deutlich die Wirksamkeitssteigerung hervor, die bei der Überführung des Glykosids Scillirosid in das Aglykon Scillirosidin eintritt.

Experimenteller Teil.

Darstellung von Scillirosidin. Um Raum zu sparen, beschreiben wir im folgenden nur ein Beispiel für die enzymatische Spaltung des Scillirosids mit Coronillasamen. Bei der Verwendung von Luzernesamen oder des aus Samen herausgelösten Enzyms verfährt man ganz analog.

Eine Aufschwemmung von 400 g mit Äther und Methanol vorextrahierten Samen der *Coronilla glauca*⁴⁾ in 2,5 Liter Wasser, zu der man die Lösung von 5 g Scillirosid in 125 cm³ Alkohol zuzusetzt, wird nach Zugabe von etwas Toluol während 3 Tagen bei 35° schwach gerührt, wobei das pH des Versuchsansatzes zwischen 5,7 und 6 schwankt. Dann wird das Reaktionsgemisch mit 6 Litern Alkohol verdünnt, nach kurzem Rühren die Samenmasse von der wässrig-alkoholischen Lösung abfiltriert und noch zweimal mit Alkohol extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden im Vakuum auf 1 Liter konzentriert, worauf man das gebildete Aglykon mit Chloroform extrahiert. Der Eindampfrückstand der Chloroformlösung wird in 2 Litern 50-proz. Methylalkohol aufgenommen, diese Lösung mit Bleiacetat behandelt und das Filtrat der Bleifällung im Vakuum konzentriert. Darauf wird das Genin erneut in Chloroform übergeführt und die Chloroformlösung zur Trockne eingedampft. Den Eindampfrückstand (4,3 g) löst man in Benzol-Chloroform (1:1) und filtriert durch eine Säule aus Aluminiumoxyd. Die mit Benzol-Chloroform gewonnenen Fraktionen enthalten das in den Coronillasamen nach der Vorextraktion zurückgebliebene Furocumarin (Smp. 163°)⁵⁾. Die mit reinem und mit 0,5% Methanol-haltigem

¹⁾ Bestimmung von Prof. *E. Rothlin*, Pharmakol. Labor der *Sandoz AG.*, Basel.

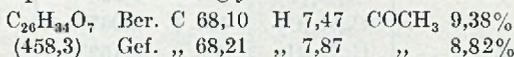
²⁾ *J. Schmutz*, *Helv.* **32**, 1442 (1949).

³⁾ *E. Rothlin*, *Schweiz. med. Wschr.* **70**, 577 (1940).

⁴⁾ Die Samen stammen aus der Umgebung von Lissabon. Für die Einsammlung sind wir Herrn Dr. *A. Pereira* in Lissabon zu bestem Dank verpflichtet.

⁵⁾ Vgl. *A. Stoll, A. Pereira & J. Renz*, *Helv.* **32**, 293 (1949).

Chloroform eluierten Anteile kristallisieren rasch beim Anreiben mit Methanol in langen Nadeln und geben eine starke *Liebermann'sche* Farbreaktion. Die Kristalle werden vereinigt und mit wenig Methanol gewaschen. Die Ausbeute an diesen weissen Kristallen beträgt 2,2 g, was einer Ausbeute von 60% entspricht. Zur weiteren Reinigung wird das Präparat in der 5fachen Menge heissen Methanols gelöst und durch Zugabe des gleichen Volumens heissen Wassers umkristallisiert. Beim Abkühlen bildet sich zuerst eine farblose ölige Abscheidung, die beim Stehen vollständig in grosse, schön ausgebildete Drusen, die aus Nadeln und Spiessen bestehen, übergeht (2 g). Aus verdünnter Lösung kristallisiert das Scillirosidin in Blättchen ohne vorherige ölige Ausscheidung und schmilzt bei 173—175°. Bei Zimmertemperatur wird das Aglykon von der 20fachen Menge Methanol gelöst.



Optische Drehung: 0,2102 g im Hochvakuum bei 80° getrocknete Substanz in 25 cm³ Methanol, 2 dm-Rohr.

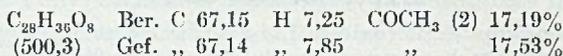
$$\alpha = -0,38^\circ \quad [\alpha]_D^{20} = -22,6^\circ$$

Lactontitration: 0,1638 g hochvakuumtrockene Substanz, gelöst in 10 cm³ Methanol, werden nach Zugabe von 10,00 cm³ 0,1-n. Schwefelsäure während 15 Minuten im Dampfbad erwärmt und nach 2stündigem Stehen bei Zimmertemperatur gegen Phenolphthalein mit 0,1-n. Natronlauge titriert. Die gelblich verfärbte Lösung verbrauchte 6,65 cm³ Lauge.

Äquivalentgewicht: Ber. 229 Gef. 245

Die Lauge (2 Mol) wurde vom Lactonring und der Acetylgruppe verbraucht.

Die Acetylverbindung des Scillirosidins. 0,50 g des Aglykons werden in Pyridin gelöst und mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Beim Eingiessen der Reaktionslösung in Wasser scheidet sich ein weisses Pulver (0,50 g) ab, das nach dem Aufnehmen in 35 cm³ siedendem Methanol in glasklaren Plättchen (0,46 g) kristallisiert. Nach dem Umkristallisieren aus der 100fachen Menge siedenden Methanols schmilzt die Acetylverbindung bei 256°.



Optische Drehung: 0,0841 mg Substanz in 25 cm³ Methanol gelöst, 2 dm-Rohr, $\alpha = -0,41^\circ$.

$$[\alpha]_D^{20} = -61,0^\circ$$

Alkalische Titration: 52,1 mg der Acetylverbindung wurden in 5 cm³ Methanol und 5,00 cm³ 0,1-n. Natronlauge gelöst. Die Lösung wurde im Dampfbad kurz erwärmt und nach einigem Stehen bei 20° mit 0,1-n. Schwefelsäure gegen Phenolphthalein titriert. Laugenverbrauch 3,12 cm³.

Äquivalentgewicht: Ber. 166,4; Gef. 167,0.

Das entspricht 3 Mol Alkali, 1 Mol für den Lactonring, 2 Mol für 2 Acetylgruppen.

Zusammenfassung.

Das Scillirosid, das sehr aktive rätizide und herzwirksame Hauptglykosid aus der roten Meerzwiebel, wird durch Enzyme der Coronilla- und der Luzernesamen, welche die Bindung zwischen Aglykon und Glucose angreifen, in das Aglykon Scillirosidin und Glucose zerlegt. Das erst durch diese enzymatische Spaltung zugänglich gewordene Scillirosidin besitzt eine gegenüber Scillirosid gesteigerte, sehr hohe Wirksamkeit auf das Herz.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium
„Sandoz“, Basel.

43. Zur Kenntnis des Dehydroemetins

von P. Karrer und O. Rüttner.

(28. I. 50.)

Quartäre Ammoniumsalze cyclischer Basen lassen sich, wie kürzlich gezeigt wurde¹⁾, mit Lithiumaluminiumhydrid zu *o*-Dihydroderivaten reduzieren; die Reduktion schreitet nicht weiter. In gleicher Weise wird Dehydro-emetinbromid (Rubremetin-bromid) $C_{29}H_{33}O_4N_2Br$ durch $LiAlH_4$ zu einem Dihydro-dehydroemetin $C_{29}H_{34}O_4N_2$ reduziert, das aus Analogiegründen ein *o*-Dihydroderivat sein muss. Die farblose, kristallisierte Verbindung schmilzt bei 157–158° und ist sehr empfindlich gegen Oxydationsmittel, auch gegen Sauerstoff, durch den sie in rote Oxydationsprodukte übergeführt wird. Bei der katalytischen Hydrierung nimmt sie 1 Mol H_2 auf und geht in ein Gemisch zweier Substanzen über. Die eine derselben, die das Hauptprodukt der Reaktion ist, erwies sich mit dem früher auf andere Weise dargestellten Tetrahydro-dehydroemetin²⁾ identisch:

Tetrahydro-dehydroemetin (nach neuer Methode erhalten)

Smp. 134° (nach Sintern) $[\alpha]_D^{18} = +42,0^\circ$ (Alkohol);

Tetrahydro-dehydroemetin (nach früherer Methode²⁾ gewonnen)

Smp. 134° $[\alpha]_D^{18} = +41,5^\circ$ (Alkohol).

Auch die Absorptionsspektren der beiden Präparate zeigten keine Unterschiede (Fig. 1).

Die zweite Substanz, welche nach der Hydrierung neben Tetrahydro-dehydroemetin erhalten wurde, scheint isomer mit Tetrahydro-dehydroemetin zu sein. Die Verbindung, welche vorläufig als Isotetrahydro-dehydroemetin bezeichnet werden soll, schmilzt bei 194° und ist in Äther schwerer löslich als Tetrahydro-dehydroemetin. Durch die verschiedene Löslichkeit in Äther konnten die beiden Substanzen getrennt werden.

Dihydro-dehydroemetin reduziert neutrale Silbernitratlösung beim leichten Erwärmen sehr stark. Tetrahydro-

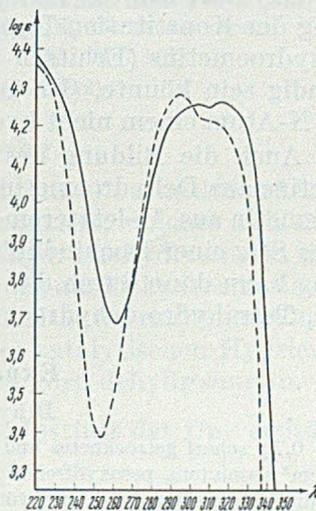


Fig. 1.

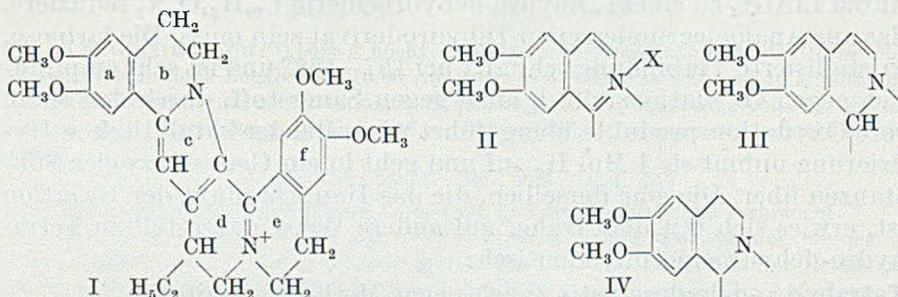
— Iso-tetrahydro-dehydroemetin.
 - - - Tetrahydro-dehydroemetin.

¹⁾ H. Schmid & P. Karrer, *Helv.* **32**, 960 (1949).

²⁾ P. Karrer, C. H. Eugster & O. Rüttner, *Helv.* **31**, 1219 (1948).

dehydroemetin lässt erst bei längerem Kochen mit neutraler Silbernitratlösung eine schwache Reduktionswirkung erkennen; noch schwächer ist dieses Reduktionsvermögen beim Iso-tetrahydro-dehydroemetin vorhanden.

Die Konstitution des Dehydroemetins (Rubremetin) ist noch nicht bekannt. *A. R. Battersby, H. T. Openshaw & H. C. S. Wood*¹⁾ haben kürzlich für diese Verbindung Formel I vorgeschlagen; die gelbe Farbe der Substanz soll ihre Ursache darin haben, dass I ein Resonanzhybrid darstellt, in dem, ähnlich wie in den Cyaninfarbstoffen, die positive Ladung zwischen den beiden Stickstoffatomen wechseln kann.



Diese Formel I enthält zwei ortho-Dihydropyridinringe (d und e). Bei der bekannten Empfindlichkeit der o-Dihydropyridin-Derivate gegen Oxydationsmittel ist es wenig wahrscheinlich, dass eine Verbindung der Konstitution I unter den Bedingungen der Darstellung des Dehydroemetins (Erhitzen mit Überschuss von Brom oder Jod) beständig sein könnte. (Im Berberin und ähnlichen Alkaloiden gehört das N-Atom einem nicht hydrierten Pyridinring an.)

Auch die Bildung des oben beschriebenen o-Dihydro-dehydroemetins aus Dehydroemetin und LiAlH_4 schliesst Formel I für Dehydroemetin aus. In letzterem muss vielmehr eine Gruppierung II (quartäres Salz einer Isochinolinbase) enthalten sein. Die o-Dihydroverbindung kann dann durch das partielle Strukturbild III dargestellt werden, Tetrahydro-dehydroemetin durch IV.

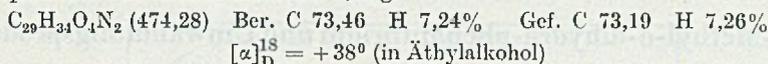
Experimenteller Teil.

Dihydro-dehydroemetin.

0,7 g scharf getrocknetes und fein pulverisiertes Dehydroemetin-bromid wurden in 100 cm³ absolutem, peroxydfreiem Äther aufgeschlämmt und mit 150 mg Lithiumaluminiumhydrid versetzt. Nach zweistündigem Rühren und Erwärmen auf 35° war die Reaktionsmasse fast farblos. Das überschüssige Lithiumaluminiumhydrid wurde mit feuchtem Äther zersetzt, die ätherische Lösung vom anorganischen Rückstand getrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen dieser Lösung im Vakuum kristallisierte das Dihydro-dehydroemetin in gelblichen Drusen, die durch nochmaliges Umkristallisieren

¹⁾ Exper. 5, 114 (1949).

aus absolutem Äther einen Smp. von 157–158° besaßen. Die gesamte Aufarbeitung dieser Substanz wurde unter Stickstoff durchgeführt, da andernfalls sofort rote Oxydationsprodukte entstanden. Ausbeute 0,42 g.

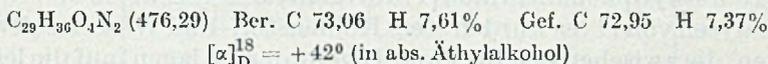


Getrocknet wurde im Hochvakuum bei 70° und 0,001 mm Hg.

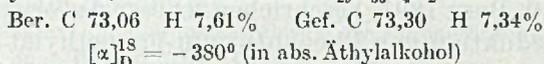
Die Mikrohydrierung von Dihydro-dehydroemetin mit Platin in Eisessig ergab die Aufnahme von 1 Mol Wasserstoff.

Tetrahydro-dehydroemetin und Iso-tetrahydro-dehydroemetin.

830 mg Dihydro-dehydroemetin wurden in Eisessig gelöst und mit 100 mg vorhydriertem Platinoxyd und Wasserstoff 8 Stunden geschüttelt. Es wurde fast genau die berechnete Menge (40,5 cm³) Wasserstoff aufgenommen. Durch erneutes Zufügen von Platin und längeres Schütteln konnte keine Wasserstoffaufnahme mehr festgestellt werden. Die vom Platin getrennte Eisessiglösung wurde im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand mit Sodalösung versetzt und mehrere Male mit Äther (400 cm³) ausgeschüttelt. Man trocknete die Ätherlösung über Natriumsulfat und dampfte sie zur Trockne ein. Der amorphe Rückstand wurde aus Äther kristallisiert. Da die so erhaltenen Kristalle nicht einheitlich schmolzen, wurden sie in ätherschwerlösliche und ätherleichtlösliche Anteile getrennt. Die letzteren schmolzen bei 134° und gaben mit dem früher erhaltenen Tetrahydro-dehydroemetin¹⁾ keine Schmelzpunktsdepression. Auch in den UV.-Spektren sowie in ihrer Fähigkeit Silbernitratlösung beim Kochen schwach zu reduzieren, erwiesen sich die beiden Stoffe identisch.



Die in Äther schwerlösliche Fraktion wurde zweimal aus viel Äther umkristallisiert und schmolz hernach bei 194°. Sie wirkte in der Hitze auf Silbernitratlösung ebenfalls schwach reduzierend. Das bei 40° im Hochvakuum getrocknete Iso-tetrahydro-dehydroemetin ergab Analysenwerte, die mit der Formel C₂₉H₃₆O₄N₂ übereinstimmten.



Zusammenfassung.

Dehydroemetin-bromid (Rubremetinbromid) wurde durch LiAlH₄ zu Dihydro-dehydroemetin C₂₉H₃₄O₄N₂ reduziert, welches sich durch weitere katalytische Reduktion in Tetrahydro-dehydroemetin überführen liess, identisch mit der entsprechenden aus Dehydroemetin-bromid durch Reduktion mit Zink und Schwefelsäure erhaltenen Verbindung. Als zweites Produkt entsteht bei der katalytischen Hydrierung des Dihydro-dehydroemetins ein Iso-tetrahydro-dehydroemetin.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

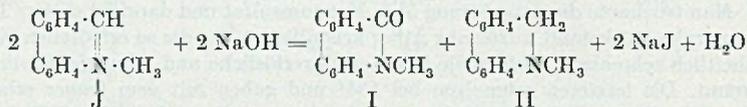
¹⁾ Helv. 31, 1219 (1948).

44. N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin und Umwandlungsprodukte

von P. Karrer, L. Szabo, H. J. V. Krishna und R. Schwyzer.

(28. I. 50.)

*Amé Pictet & E. Patry*¹⁾ liessen vor langer Zeit Natronlauge auf Phenanthridin-jodmethylat einwirken und erhielten dabei zwei verschiedene Verbindungen vom selben Smp. 108°; die eine war mit Wasserdampf nicht flüchtig und erwies sich als N-Methyl-phenanthridon (I), die zweite war wasserdampfflüchtig und wurde als o-Dihydrophenanthridin angesprochen (II). Die Bildung der beiden Substanzen wurde von den Autoren in folgender Weise gedeutet:

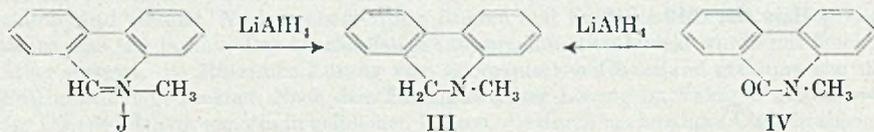


Pictet & Patry beobachteten auch, dass die Verbindung II allmählich in N-Methyl-phenanthridon (I) übergeht, und sie führten die schlechten Analysen von II (es wurden stets Kohlenstoff- und Wasserstoffwerte erhalten, die zwischen den für I und II geforderten lagen) auf die leichte Oxydierbarkeit der Verbindung II zum N-Methyl-phenanthridon zurück.

Dieselbe Verbindung II vom Smp. 108° findet sich als „Dihydrophenanthridin“ in einer Dissertation von *H. J. Ankersmit*, „Über das Phenanthridin“, Bern 1891, beschrieben. Dieser Autor erhielt die Substanz durch Reduktion von Phenanthridin-jodmethylat mit Zinn und Salzsäure und durch Behandlung des Dihydrophenanthridins mit Jodmethyl bei 100°. Stimmende Analysen werden auch hier nicht mitgeteilt.

Die Nachprüfung dieser Untersuchung hat folgendes ergeben: Wenn man Phenanthridin-jodmethylat mit Zinn und Salzsäure reduziert und bei der Aufarbeitung allen Sauerstoff peinlichst ausschliesst, so erhält man das wirkliche o-Dihydroderivat in Form farbloser, bei 48° schmelzender Kristalle. Das Absorptionsspektrum dieser Verbindung ist in Figur 1 ersichtlich; die Analysen stimmen scharf auf die Formel $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}$, diejenige eines N-Methyl-dihydrophenanthridins.

Die Substanz ist das ortho-Dihydroderivat III, denn wir konnten sie auch aus N-Methylphenanthridon IV durch Reduktion mit LiAlH_4 erhalten:

¹⁾ B. 35, 2534 (1902).

Ferner stellten wir sie aus Phenanthridin-jodmethylat durch Reduktion mit LiAlH_4 her¹⁾.

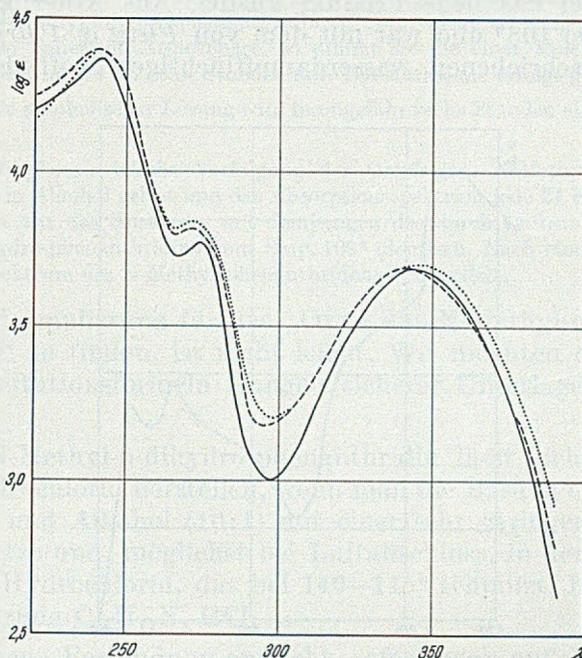


Fig. 1.

- N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin aus Phenanthridin-jodmethylat + LiAlH_4 (in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
- - - N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin aus Phenanthridin-jodmethylat + $\text{Sn} + \text{HCl}$ (in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
- N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin aus N-Methyl-phenanthridon + LiAlH_4 (in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

Gegenüber Luftsauerstoff verhalten sich die Präparate von N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin, die durch Reduktion von Phenanthridin-jodmethylat mit Zinn und Salzsäure dargestellt wurden, verschieden von jenen Präparaten, die man aus N-Phenanthridon oder N-Methyl-phenanthridin-jodmethylat durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid erhält. Während die nach den beiden letzteren Verfahren gewonnenen Produkte in Berührung mit Luftsauerstoff während längerer Zeit unverändert haltbar sind, erwiesen sich die aus Phenanthridin-jodmethylat mit Zinn und Salzsäure erzeugten N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin-Präparate meistens sehr autoxydabel. Liess man sie mit Luft in Berührung, so wurden sie nach kurzer Zeit braun und schmierig und waren nach einigen Stunden in eine neue Substanz verwandelt. Diese liess sich am besten in der Weise

¹⁾ Vgl. dazu die Reduktion anderer quartärer Ammoniumsalze mit LiAlH_4 , *H. Schmid & P. Karrer, Helv. 32, 960 (1949)*.

reinigen, dass man sie mit Wasser befeuchtete, hierauf konz. Salzsäure bis zur Lösung zusetzte und diese Lösung sofort mit Wasser verdünnte, wobei das neue Produkt ausfiel. Aus Äther kristallisiert, schmolz es bei 108° und war mit dem von *Pictet & Patry* sowie von *Ankersmit* beschriebenen, wasserdampflichten Stoff identisch.

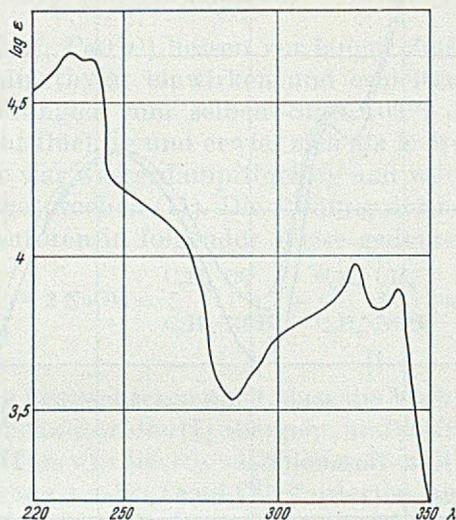


Fig. 2.

Diese Substanz, die wir „Oxyd aus N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin“ nennen, besitzt die Zusammensetzung $C_{14}H_{11}ON$, d. h. zwei H-Atome des N-Methyl-dihydro-phenanthridins sind durch Sauerstoff ersetzt worden. Sie wirkt auf Silbernitratlösung auch noch reduzierend, wenn auch etwas schwächer als die Dihydroverbindung. Bei längerem Stehen an der Luft geht sie, was schon *Pictet & Patry* feststellten, in N-Methyl-phenanthridon über (Spektrum Fig. 2). In einzelnen Versuchen konnten wir das „Oxyd aus N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin“ nicht fassen, indem aus Dihydro-phenanthridin direkt N-Methyl-phenanthridon entstand.

Das Verhalten des N-Methyl-dihydro-phenanthridins zu Sauerstoff haben wir auch manometrisch bei verschiedener Acidität der Lösung untersucht. Hierbei liess sich folgendes feststellen:

a) In Anwesenheit einer Spur von Alkali. Wird eine alkoholische Lösung von N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin mit einer Spur Natriumalkoholat versetzt und die Lösung in Sauerstoff-Atmosphäre geschüttelt, so färbt sich die Lösung etwas gelb, doch wird zunächst kein Sauerstoff aufgenommen. Setzt man zu dieser Lösung einen Tropfen Salzsäure, so beginnt eine langsame Sauerstoff-Aufnahme, die nach dem Verbrauch eines Atoms Sauerstoff pro Mol Dihydroverbindung fast zum Stillstand kommt.

b) In Anwesenheit einer Spur von Säure. Wird eine alkoholische Lösung von N-Methyl-dihydro-phenanthridin mit einer Spur Salzsäure versetzt und in Sauerstoff-

Atmosphäre geschüttelt, wird in ungefähr einer Stunde die einem Atom entsprechende Menge Sauerstoff absorbiert.

c) In Anwesenheit von einem Äquivalent Salzsäure. Setzt man einer alkoholischen Lösung von N-Methyl-dihydro-phenanthridin ein Äquivalent wässrige Salzsäure zu und schüttelt sie in Sauerstoff-Atmosphäre, so nimmt sie die einer Molekel entsprechende Menge Sauerstoff innert ca. zehn Stunden auf. Die Aufnahme erfolgt gleichmässig.

d) In rein alkoholischer Lösung wird in ungefähr sechs Stunden ein Atom Sauerstoff absorbiert.

e) Spektrophotometrische Verfolgung der Oxydation. N-Methyl-dihydro-phenanthridin wurde in Alkohol gelöst und das Absorptionsspektrum jede 24 Stunden bestimmt. Nach 3 Tagen war das Spektrum mit demjenigen des durch Luftsauerstoff oxydierten N-Methyl-dihydro-phenanthridins vom Smp. 108° identisch. Nach einer Woche hatte es sich in das Spektrum des N-Methyl-phenanthridons verwandelt.

Eine Formulierung für das „Oxyd aus N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin“ zu finden, ist nicht leicht. Wir möchten auf evtl. mögliche Konstitutionsformeln mangels sicherer Unterlagen heute nicht eintreten.

Aus N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin lässt sich ein kristallisiertes Hydrochlorid herstellen, wenn man die Base in einem Gemisch von Äther und Alkohol (10:1) mit einer sehr geringen Menge Salzsäure versetzt und, möglichst bei Luftabschluss, in der Kälte stehen lässt. Das Hydrochlorid, das bei $140\text{--}145^{\circ}$ schmilzt, besitzt die Zusammensetzung $C_{14}H_{13}N$, HCl.

Eine neue Verbindung entsteht, sofern man auf das „Oxyd aus N-Methyl-dihydro-phenanthridin“ oder auf N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin bei Gegenwart von Luftsauerstoff in ätherisch-alkoholischer Lösung wenig Salzsäure einwirken lässt. Die Umwandlung lässt sich spektrophotometrisch verfolgen. Das Reaktionsprodukt ist ein Chlorid der Zusammensetzung $C_{14}H_{12}ONCl$ und schmilzt bei $213\text{--}215^{\circ}$; es soll im folgenden als „Chlorid aus N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin-oxyd“ bezeichnet werden. Die gut kristallisierte Verbindung ist in Wasser leicht, in Alkohol wenig und in Äther praktisch nicht löslich und reduziert neutrale Silbernitratlösung nicht. Die Lösungen zeigen im UV.-Licht nur unbedeutende Fluoreszenz.

Die Tatsache, dass die N-Methyl-phenanthridin-Präparate, die durch Reduktion von Phenanthridin-jodmethylat mit Zinn und Salzsäure hergestellt wurden, autoxydabel sind, während sich dieselbe Substanz, die durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid aus N-Methyl-phenanthridon oder N-Methyl-phenanthridin-jodmethylat gewonnen wurde, viel beständiger ist, muss darauf beruhen, dass die erstgenannten Präparate noch Spuren einer katalytisch wirkenden Substanz enthalten, welche die Autoxydation begünstigt. Vermutlich sind es Spuren von Säure, die, wie die vorbeschriebenen Versuche zeigen, die Aufnahme des Sauerstoffs durch N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin beschleunigen.

Experimenteller Teil.

Darstellung von Phenanthridin-jodmethylat.

Es ist nicht nötig, das Phenanthridin mit Methyljodid im Bombenrohr bei 100° reagieren zu lassen: wird Phenanthridin mit Methyljodid im Überschuss auf dem Wasserbade 2—3 Stunden erhitzt, bildet sich das Jodmethylat in quantitativer Ausbeute.

Darstellung von N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin aus Phenanthridin-jodmethylat mittels Zinn und Salzsäure.

1 g reines Phenanthridin-jodmethylat (F. 202°) wird in 30 cm³ konzentrierter Salzsäure (d = 1,19) gelöst und ungeachtet evtl. ungelöster Anteile mit 1,5 g Zinnpulver in kleinen Portionen auf dem Wasserbade versetzt. Die Lösung entfärbt sich momentan, die Reduktion dauert aber 1—1½ Stunden, nach welcher Zeit eine wasserklare Lösung entstanden ist. Diese wird abgekühlt und mit 80—100 cm³ Wasser verdünnt, wobei ein öliges Niederschlag ausfällt. Man lässt über Nacht bei 1—2° stehen und filtriert dann den gesamten Niederschlag eines Zinndoppelsalzes ab. Er wird in ungefähr 150 cm³ Wasser und 5 cm³ Salzsäure auf dem Wasserbade gelöst; in die warme Lösung wird 2—3 Stunden lang Schwefelwasserstoff eingeleitet. Dann wird die Lösung nochmals erwärmt und erneut eine Stunde lang H₂S eingeleitet. Den aus Zinnsulfid bestehenden Niederschlag haben wir abfiltriert, mit wenig heissem Wasser gewaschen und die auf 0° abgekühlte, klare Lösung mit eiskalter 2-n. NaOH alkalisch gemacht. Es bildete sich ein Niederschlag, den man im Kühlschrank bei möglichst tiefer Temperatur in einem gut geschlossenen Gefäss sich sammeln lässt, dann ebenfalls im Eisschrank möglichst rasch abfiltriert und mit ausgekochtem, eiskaltem Wasser alkalifrei wäscht. Das Auswaschen muss so geschehen, dass der Niederschlag stets mit Wasser bedeckt ist und nur zum Schluss darf das Wasser abgesogen werden. Nun wird der Niederschlag noch im Eisschrank in einem mit P₂O₅-beschiekten Trockenapparat gebracht, das Gefäss evakuiert und die Verbindung bei Zimmertemperatur einen Tag getrocknet. Zum Umkristallisieren haben wir das Präparat in Petroläther (Sdp. 30—60°) kalt aufgelöst, die Lösung kalt filtriert, auf 3—4 cm³ eingedampft, von einem evtl. entstandenen Niederschlag durch Dekantieren (nicht Filtrieren) befreit, das Gefäss schnell geschlossen und zum Kristallisieren in den Eisschrank gestellt. Farblose Nadeln vom Smp. 48°. Ausbeute 0,2—0,3 g.

Das so hergestellte N-Methyl-dihydro-phenanthridin ist gegen Luftsauerstoff sehr empfindlich und verwandelt sich in Berührung mit diesem in eine braune, schmierige Masse. Seine alkoholische Lösung fluoresziert stark mit blauer Farbe und reduziert Silbernitrat in der Kälte momentan. Absorptionsspektrum siehe Figur 1.

C₁₄H₁₃N Ber. C 86,21 H 6,71 N 7,17% Gef. C 86,32 H 7,02 N 7,37%

Reduktion von Phenanthridin-jodmethylat mit Lithiumaluminiumhydrid zu N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin.

1,4 g Phenanthridin-jodmethylat wurden in kleinen Mengen innerhalb einer halben Stunde zu einer Aufschlammung von 0,6 g Lithiumaluminiumhydrid in 30 cm³ Äther bei Zimmertemperatur hinzugefügt. Die gelbe Farbe des Phenanthridin-jodmethylats verschwand augenblicklich. Das Reaktionsgemisch hat man während 2 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, hierauf durch Zugabe von 5 cm³ Wasser den Überschuss von LiAlH₄ zerstört und Ätherschicht und Wasserschicht getrennt. Hierauf wurde der wässrige Anteil durch eine Schicht von Hyflo-supercell filtriert, das Filtrat mit Kalilauge alkalisch gemacht und 1—2 g Kaliumchlorid eingetragen. Den durch Filtration abgetrennten Niederschlag hat man mit peroxydfreiem Äther ausgekocht und diesen Äther zur Extraktion der alkalisch gemachten wässrigen Schicht verwendet. Hierauf wurden die beiden Ätherlösungen vereinigt, kurz getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand von N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin kristallisierte aus Petroläther (Sdp. 30—60°).

C₁₄H₁₃N Ber. C 86,21 H 6,71 N 7,17%
Gef. „ 86,50 „ 6,83 „ 7,25%

Smp. 48°. Im Gemisch mit einem N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin-Präparat, welches durch Reduktion von Phenanthridin-jodmethylat mit Zinn und Salzsäure hergestellt worden war, fand keine Schmelzpunktsdepression statt. Auch die Absorptionsspektren der beiden Präparate sind, wie Figur 1 zeigt, praktisch identisch.

Gegenüber Luftsauerstoff war das Präparat viel unempfindlicher als das mit Zinn und Salzsäure hergestellte.

Reduktion von N-Methyl-phenanthridon mit Lithiumaluminiumhydrid zu N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin.

1 g nach Graebe¹⁾ hergestelltes Methyl-phenanthridon wurde in kleinen Mengen zu einer Aufschlammung von 2 g LiAlH₄ in 200 cm³ trockenem Äther eingetragen und das Reaktionsgemisch während 8 Stunden am Rückflusskühler unter Rühren gekocht. Am folgenden Tag zersetzten wir den Überschuss an LiAlH₄ durch 6 cm³ Wasser, filtrierten den entstandenen Niederschlag ab und extrahierten ihn mit peroxydfreiem Äther. Nach der Abtrennung der wässrigen Schicht des Filtrates wurden die beiden Ätherlösungen vereinigt, getrocknet und im Vakuum abgedampft. Der kristalline Rückstand von N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin liess sich aus Petroläther umkristallisieren und schmolz dann bei 48°. Auch dieses Präparat zeigte in Mischung mit den nach den beiden vorherbeschriebenen Methoden dargestellten Präparaten von N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin keine Schmelzpunktsdepression und besass dasselbe Absorptionsspektrum (Fig. 1).

C ₁₁ H ₁₃ N	Ber. C 86,12	H 6,71	N 7,17%
	Gef. ,, 86,60	„ 6,72	„ 7,10%

Umwandlungsprodukte des mittels Zinn und Salzsäure aus Phenanthridin-jodmethylat gewonnenen N-Methyl-o-dihydro-phenanthridins.

a) Oxyd des N-Methyl-o-dihydro-phenanthridins.

Man lässt 0,2 g N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin in einem offenen Gefäss über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, befeuchtet dann die braune, schmierige Masse mit einem Tropfen Wasser und gibt soviel konz. Salzsäure hinzu, bis sich alles aufgelöst hat. Dazu sind ca. 10–15 cm³ nötig. Die hellgelbe Lösung wird nun mit Wasser so lange versetzt, bis sich bei weiterer Verdünnung kein Niederschlag mehr bildet. Man schliesst das Gefäss und lässt den Niederschlag über Nacht im Eisschrank. Der kristallin gewordene Niederschlag wird abgenutscht, mit Wasser gewaschen und über P₂O₅ im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet. Zur Reinigung haben wir ihn in Äther gelöst, vom Unlöslichen durch Filtrieren befreit, die Lösung auf 1–2 cm³ eingedampft und im Eisschrank mehrere Tage lang stehengelassen. Die Ausbeute ist bescheiden, 20–30 mg. F. 108°.

Die reine Substanz ist gegen Luftsauerstoff ziemlich beständig. Ihre alkoholische Lösung reduziert Silbernitrat.

C ₁₄ H ₁₃ ON	Ber. C 79,62	H 6,16	N 6,63%
C ₁₄ H ₁₁ ON	Ber. ,, 80,38	„ 5,26	„ 6,7%
	Gef. ,, 80,05	„ 5,56	„ 6,79%

b) N-Methyl-phenanthridon.

0,2 g nicht umkristallisiertes N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin vom F. 48° wurden ungefähr sechs Wochen lang bei Zimmertemperatur (25°) in einem offenen Gefäss aufbewahrt. Die sich anfangs verflüssigende Masse wurde langsam wieder fest. Wir haben die Substanz mit 20 cm³ konz. Salzsäure in der Kälte verrieben, den unlöslichen Teil abgenutscht, mit Wasser sorgfältig ausgewaschen und aus verdünntem Alkohol (ca. 3 bis 4 cm³) zweimal umkristallisiert. Farblose Nadeln vom F. 108°. Ausbeute 0,1 g. Das Absorptionsspektrum ist mit demjenigen des N-Methyl-phenanthridons identisch. Auch der Mischmelzpunkt der beiden Substanzen liegt nicht tiefer als der Schmelzpunkt jedes der beiden Präparate.

¹⁾ Ann. 276, 252 (1893).

e) N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin-hydrochlorid.

Die Verbindung wurde auf folgende Weise dargestellt: 0,1 g N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin wurde in 100 cm³ kaltem Äther gelöst und nach Zugabe von 10 cm³ Alkohol mit einem Tropfen konz. Salzsäure versetzt. Da sich nach 24stündigem Stehen im Eisschrank nichts ausgeschieden hatte, wurde der Äther und die Hälfte des Alkohols ohne Erwärmen im Vakuum abgedampft und die erhaltene Lösung mit 20 cm³ Äther versetzt. Über Nacht schieden sich im Eisschrank Kristalle ab, die im Eisschrank möglichst rasch abfiltriert, mit Äther gewaschen und über Paraffin und P₂O₅ im Vakuum getrocknet wurden. Zur Reinigung hat man die Verbindung in wenig Alkohol gelöst, vom Unlöslichen durch Dekantieren (nicht Filtrieren) befreit, mit Äther versetzt und in den Eisschrank zum Kristallisieren hingestellt. Ausbeute 0,07 g farblose Kristalle, die sich bei 140—145° ohne zu schmelzen zersetzen.

C₁₄H₁₃N, HCl Ber. C 72,51 H 6,04% Gef. C 72,02 H 6,19%

Zusammenfassung.

Durch Reduktion von Phenanthridin-jodmethylat mit LiAlH₄ oder Zinn und Salzsäure, ferner durch Reduktion von N-Methylphenanthridon mit LiAlH₄ entsteht dasselbe N-Methyl-o-dihydrophenanthridin vom Smp. 48°. Die unter diesem Namen in der Literatur früher erwähnte Substanz ist ein Oxydationsprodukt des N-Methyl-o-dihydrophenanthridins und geht allmählich in N-Methylphenanthridon über. Diese Oxydationsvorgänge wurden näher verfolgt.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

45. Über das Auftreten von Carotinoiden in Pollen und Staubbeuteln verschiedener Pflanzen

von P. Karrer, C. H. Eugster und M. Faust.

(28. I. 50.)

Das reichliche Vorkommen von Antheraxanthin in den Staubbeuteln von *Lilium tigrinum*¹⁾ und von cis-Antheraxanthin in jenen von *Lilium candidum*²⁾ veranlasste uns, Pollen einer Reihe von Pflanzen auf das Vorhandensein von Carotinoiden, besonders Carotinoid-epoxyden qualitativ zu prüfen³⁾. Ausser Pollen wurden auch Staubblätter einiger Pflanzen untersucht⁴⁾. Auf die Isolierung der oft geringen Mengen von Carotinoidpigmenten wurde verzichtet; die folgenden Angaben sind daher nur als eine erste Orientierung gedacht⁵⁾.

¹⁾ P. Karrer & A. Osswald, Helv. 18, 1303 (1935).

²⁾ G. Tappi & P. Karrer, Helv. 32, 50 (1949).

³⁾ Über Carotinoide in Pollen von *Verbascum thapsiforme* L. siehe G. Bertrand & Poirault, C. r. 115, 828 (1892).

⁴⁾ Über Vorkommen von Lycopin in Staubbeuteln von Dahlien vgl. W. Gugelmann, Dissertation, Zürich 1938.

⁵⁾ Der qualitative Nachweis der verschiedenen Carotinoide erfolgte spektrometrisch, meistens nach vorheriger chromatographischer Trennung. Carotinoid-epoxyde (Xanthophyll-epoxyd, cis-Antheraxanthin) wurden ausserdem durch die Salzsäure-Reaktion und durch die Umwandlung in furanoides Oxyd erkannt.

	Carotinoide	Carotinoidepoxyde	Wahrscheinl. Natur der Pigmente
Pollen			
<i>Zea Mays</i> L. (Sorte Rheintaler)	geringe Mengen	keine	Xanthophyll-ester, sehr wenig Carotin
<i>Helianthus annuus</i> L.	grosse Mengen	spurenweise	Xanthophyll-ester, sehr wenig Carotin
Aster, einfach blühende, niedrige Var.	bedeutende Mengen	keine	Xanthophyll-ester, sehr wenig Carotin
<i>Helianthus tuberosus</i> L.	bedeutende Mengen	keine	Xanthophyll-ester, sehr wenig Carotin
<i>Ahhus glutinosa</i> (Schwarzerle) .	fast keine	keine	—
<i>Pinus Mugo</i> (Legföhre)	fast keine	keine	—
<i>Narcissus exsertus</i> (Bergnarzisse)	geringe Mengen	?	?
<i>Tilia platyphyllos</i> (Sommerlinde)	fast keine	—	—
<i>Chrysanthemum Leucanthemum</i>	grosse Mengen	keine	?
<i>Chrysanthemum coronarium</i> .	grosse Mengen	keine	?
Staubbeutel			
<i>Colchicum autumnale</i> L.	bedeutende Mengen	vorhanden	Xanthophyll-ester, Xanthophyll-epox. und wenig Carotin
<i>Ranunculus alpestris</i>	bedeutende Mengen	vorhanden	?
<i>Antirrhinum majus maximum</i> .	vorhanden	keine	?
<i>Lilium umbellatum</i>	bedeutende Mengen	bedeut. Mengen	cis-Antheraxanthin, wenig Carotin
<i>Lilium regale</i>	bedeutende Mengen	bedeut. Mengen	cis-Antheraxanthin, wenig Carotin
<i>Lilium Willmottiae unicolor</i> . .	bedeutende Mengen	bedeut. Mengen	cis-Antheraxanthin, wenig Carotin
<i>Lilium Maxwill</i>	bedeutende Mengen	bedeut. Mengen	cis-Antheraxanthin, wenig Carotin Capsanthin ?

Die kleine Übersicht lässt erkennen, dass die untersuchten Pollen unterschiedliche Mengen von Carotinoiden enthielten. Carotinoidepoxyde fehlten in vielen Fällen; oft scheinen Xanthophyllester und etwas Carotin die Carotinoidegemische zu bilden. Die Hauptpigmente vieler Pollen sind jedoch Flavon- bzw. Flavonolfarbstoffe.

Die untersuchten Staubbeutel erwiesen sich reich an Carotinoiden. In jenen mehrerer Lilienarten wurde cis-Antheraxanthin gefunden, das für diese Pflanzen charakteristisch zu sein scheint. In Staubbeuteln zweier anderer Pflanzen liessen sich andere Epoxyde nachweisen.

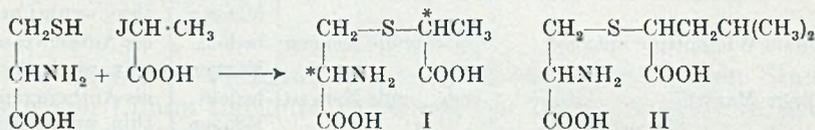
46. Über einige vom L-Cystein sich ableitende Sulfide und Sulfoxyde

von P. Karrer und G. Aman.

(28. I. 50.)

In neuerer Zeit sind verschiedene Sulfoxyde als antibiotisch wirksam befunden worden, so Allein¹⁾ und Sulforaphen²⁾; Sulfoxyde und Sulfone, die sich von Methionin und Methioninhomologen ableiten, können als Antagonisten der Glutaminsäure wirken³⁾. Diese und andere Gründe veranlassten uns, Sulfoxyde von Sulfiden darzustellen, die man aus L-Cystein und α -Halogen-carbonsäuren erhält.

So wurden aus L-Cystein und *d*, *l*- α -Jodpropionsäure sowie aus L-Cystein und *l*(-)- α -Brompropionsäure zwei [1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cysteine (I) erhalten. Während beide in bezug auf ihre Cystein-hälfte optisch einheitlich sind (L-Konfiguration), ist die Propionsäurekomponente im ersteren Fall voraussichtlich racemisch, im zweiten Fall vielleicht teilweise racemisch, indem sich nicht bestimmen lässt, ob bei der Kondensationsreaktion teilweise *Walden*'sche Umkehrung erfolgt. Das aus L-Cystein und *d*, *l*- α -Jodpropionsäure gewonnene [1-Carboxyäthyl-(1)]-L-S-cystein ist daher sehr wahrscheinlich ein Gemisch zweier Diastereomeren, die aus L-Cystein und *l*(-)- α -Brompropionsäure synthetisierte Verbindung kann vielleicht zwei solche Diastereomeren enthalten.



In analoger Weise stellten wir aus L-Cystein und *l*- α -Brom-isocaprinsäure [1-Carboxy-3-methyl-butyl-(1)]-L-S-cystein (II) her, für das bezüglich der konfigurativen Einheitlichkeit dasselbe gilt wie für I.

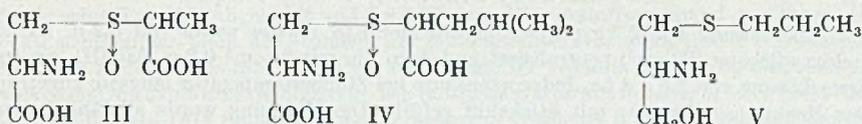
Durch Oxydation mit Hydrogenperoxyd gewann man aus [1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein (I) und [1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein (I) sowie aus [1-Carboxy-3-methyl-butyl-(1)]-L-S-cystein (II) die entsprechenden Sulfoxyde III und IV. In ihnen tritt ein neues Asymmetriezentrum auf, die Sulfoxydgruppe. Daher werden die iso-

¹⁾ C. J. Cavallito & J. H. Bailey, Am. Soc. 66, 1950 (1944); C. J. Cavallito, J. S. Buck & C. M. Suter, Am. Soc. 66, 1952 (1944).

²⁾ H. Schmid & P. Karrer, Helv. 31, 1017 (1948); G. Ivánovics & St. Horváth, Nature 160, 297 (1947).

³⁾ E. Borek & H. Waelsch, J. Biol. Chem. 177, 135 (1949).

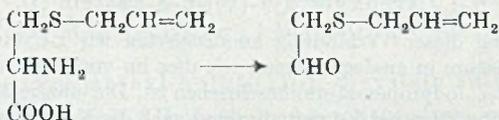
lierten, gut kristallisierten Sulfoxyde III und IV voraussichtlich Mischungen von diastereomeren Formen sein.



Wir versuchten, Verbindung IV durch fraktionierte Kristallisation in die Diastereomeren zu zerlegen. Es gelang auch, Fraktionen mit verschiedenen optischen Drehungen zu isolieren, doch waren diese wahrscheinlich nicht optisch einheitlich.

Schliesslich haben wir noch L-S-Propyl-cysteinol (V) hergestellt, indem wir L-S-Propyl-cystein¹⁾ in den Äthylester überführten und hierauf mit LiAlH₄ reduzierten.

Versuche zur pyrogenen Decarboxylierung des L-S-Propyl-cystein-sulfoxyds¹⁾ in Fluoren bei 115–120° verliefen unbefriedigend. Es fand wohl CO₂-Abspaltung statt, aber das erwartete Amin H₂NCH₂CH₂S(O)CH₂CH₂CH₃ konnte nicht isoliert werden. Ebenso wenig gelang es uns, L-S-Allyl-cystein durch Erhitzen mit Alloxan in Wasser zum S-Allyl-thioglykolaldehyd abzubauen:



Herr Prof. A. Grumbach, Hygiene-Institut der Universität Zürich, hatte die Freundlichkeit, folgende acht Verbindungen auf entwicklungshemmende Wirkung bei *Pyococcus aureus*, *S. cerevisiae* und *B. Coli* zu prüfen:

- [d,l-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein (I).
- [l-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein (I).
- [l-1-Carboxy-3-methyl-butyl-(1)]-L-S-cystein (II).
- [d,l-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein-sulfoxyd (III).
- [l-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein-sulfoxyd (III).
- [l-1-Carboxy-3-methyl-butyl-(1)]-L-S-cystein-sulfoxyd (IV).
- DL-Crotylglycin CH₃CH=CHCH₂CH(NH₂)COOH.
- L-Crotylglycin CH₃CH=CHCH₂CH(NH₂)COOH.

Alle diese Substanzen zeigten in den geprüften Dosen keine entwicklungshemmende Wirkung (10 mg Substanz in 1 cm³ aq. dest., davon 0,1 cm³ in Röhrechen auf Agarplatten bzw. 2,5 mg Substanz in 5 cm³ Anaerobenagar). Nach K. Dittmer, H. L. Goering, J. Goodman & St. J. Cristol²⁾ soll Crotylglycin bei *E. coli* und *S. cerevisiae* schwach antibiotisch wirksam sein.

Für die Durchführung dieser Prüfungen auf antibiotische Wirkung danken wir Herrn Prof. Grumbach bestens.

¹⁾ A. Stoll & E. Seebeck, Helv. 31, 210 (1948).

²⁾ Am. Soc. 70, 2499 (1948).

Experimenteller Teil.

[d,l-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein (I).

Die Lösung von 2,3 g L-Cysteinhydrochlorid in Wasser wurde mit 0,2-n. Bariumhydroxydlösung (80 cm³) neutralisiert und dazu die mit 85 cm³ 0,2-n. Ba(OH)₂ neutralisierte Lösung von 2,8 g *d,l*-α-Jodpropionsäure bei Zimmertemperatur langsam zugetropft. Das Reaktionsgefäß war mit Stickstoff gefüllt. Die Mischung wurde allmählich sauer, weshalb man von Zeit zu Zeit etwas 0,2-n. Barytlaug, im ganzen ca. 30 cm³, zusetzte. Hierauf engten wir die Flüssigkeit im Vakuum auf ca. die Hälfte ihres Volumens ein, setzten absoluten Alkohol hinzu und liessen über Nacht stehen. Es hatte sich ein farblos Niederschlag gebildet, der grösstenteils aus dem Bariumsalz des Reaktionsproduktes bestand, während BaJ₂ in der alkoholischen Flüssigkeit gelöst blieb. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, in ca. 180 cm³ Wasser aufgenommen und durch 2-n. H₂SO₄ das Bariumion in der Hitze quantitativ gefällt (ca. 4 cm³ 2-n. H₂SO₄). Nach der Entfernung des Bariumsulfatniederschlages durch Filtration oder Zentrifugieren hat man die Lösung im Vakuum eingengt, bis sich ein Niederschlag zu bilden begann. Dessen Menge vermehrte sich im Laufe der nächsten zwölf Stunden. Er wurde abgutscht, aus heissem Wasser umkristallisiert und bei 100° im Vakuum getrocknet. Die Verbindung, das *[d,l*-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein, schmolz unter Zersetzung bei 169–171° (unkorr.).

C ₆ H ₁₁ O ₄ NS	Ber. C 37,3	H 5,69	N 7,25	S 16,58%
	Gef. „ 37,27	„ 5,36	„ 7,42	„ 16,69%

Ausbeute ca. 36% der Theorie.

[l-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein (I).

Zur Darstellung dieser Verbindung kondensierten wir L-Cysteinhydrochlorid mit *l*(-)-α-Brompropionsäure in analoger Weise, wie dies im vorhergehenden Beispiel (unter Verwendung von *d,l*-α-Jodpropionsäure) beschrieben ist. Die einzige Modifikation bestand darin, dass man die Reaktion bei 50° vornahm und nach der Vereinigung der beiden Komponenten das Reaktionsgemisch noch drei Stunden bei dieser Temperatur hielt.

Die verwendete *l*(-)-α-Brompropionsäure haben wir aus L-Alanin und Nitrosylbromid dargestellt¹⁾. Ihre optische Drehung war $[\alpha]_D^{19} = -25^\circ$. In der Literatur¹⁾ werden für die Substanz spezifische Drehungen vom $[\alpha]_D^{17} = -26^\circ$ bis $[\alpha]_D^{25} = -28,1^\circ$ angeführt.

Die Ausbeute an *[l*-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein betrug, ausgehend von 6,3 g *l*-α-Brompropionsäure und 6 g L-Cystein 1,7 g. Smp. 178–179°. Spezifische Drehung in Wasser $[\alpha]_D^{20} = +74,50^\circ$.

[d,l-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein-sulfoxyd (III).

1,6 g *[d,l*-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein wurden in 16,58 cm³ 0,5-n. Natronlauge unter schwachem Erwärmen gelöst und nach dem Abkühlen mit 1,4 g 30-proz. Wasserstoff-superoxyd versetzt. Die klare Lösung wurde 48 Stunden in den Eisschrank gestellt, filtriert und mit 16,58 cm³ 0,5-n. Salzsäure neutralisiert. Diese Lösung haben wir im Vakuum zum Sirup eingengt, worauf dieser nach einiger Zeit kristallin erstarrte. Die Verbindung, das *[d,l*-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein-sulfoxyd, liess sich aus wenig heissem Wasser umkristallisieren und schmolz nach dem Trocknen bei 100° im Vakuum unter Zersetzung bei 153–154° (unkorr.). Ausbeute 0,9 g, d. h. ca. 52% der Theorie.

C ₆ H ₁₁ O ₅ NS	Ber. C 34,45	H 5,26	N 6,7	S 15,31%
	Gef. „ 34,61	„ 5,19	„ 7,15	„ 15,06%

In gleicher Weise wurde aus *[l*-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein das entsprechende Sulfoxyd erhalten (aus 0,85 g Sulfid 0,4 g Sulfoxyd).

C ₆ H ₁₁ O ₅ NS	Ber. C 34,45	H 5,26%	Gef. C 34,47	H 5,16%
--	--------------	---------	--------------	---------

¹⁾ E. Fischer, A. 340, 171 (1905); E. Fischer & K. Raske, B. 39, 3995 (1906).

[d,l-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein-sulfon.

1 g *[d,l-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein* wurde in 12 cm³ heissem Wasser gelöst, die Lösung schnell auf 15° abgekühlt und 5,8 g 30-proz. Wasserstoffsuperoxyd zugegeben. Die Reaktionsmischung blieb 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen; ein Niederschlag schied sich nicht ab. Hierauf haben wir die Lösung im Vakuum zum Sirup eingedampft, der nach einigen Stunden kristallisierte. Die Substanz wurde aus heissem Wasser umkristallisiert. Smp. 160–161° (unkorr., unter Zersetzung). Ausbeute 0,162 g. Nach der Analyse handelt es sich um das Sulfon.

C ₆ H ₁₁ O ₆ NS	Ber. C 32,00	H 4,88	N 6,22	S 14,22%
	Gef. „ 32,06	„ 5,00	„ 6,67	„ 14,09%

[l-1-Carboxy-3-methyl-butyl-(1)]-L-S-cystein (II).

Die zur Darstellung der vorgenannten Verbindung notwendige *l-α-Brom-isocaproensäure* stellten wir aus *L-Leucin* und Nitrosylbromid her¹⁾. Ihre spezifische Drehung (ohne Lösungsmittel) betrug $[\alpha]_D^{18} = -38,91^\circ$.

Die Kondensation des *L-Cysteins* mit *l-α-Brom-isocaproensäure* wurde wie diejenige mit *α-Brompropionsäure* ausgeführt (siehe vorstehend). Die Überführung der *α-Brom-isocaproensäure* in ihr Bariumsalz musste wegen der geringen Löslichkeit der Säure in Wasser in der Wärme ausgeführt werden.

Das nach Umkristallisation aus Wasser erhaltene *[l-1-Carboxy-3-methyl-butyl-(1)]-L-S-cystein* schmolz bei 160–162° (unkorr.).

C ₉ H ₁₇ O ₄ NS	Ber. C 45,95	H 7,24	N 5,95	S 13,61%
	Gef. „ 45,68	„ 7,05	„ 6,67	„ 14,00%

$$[\alpha]_D^{18} = -23,56^\circ \text{ (in Wasser + 1 Mol NaOH pro Mol Substanz)}$$

[l-1-Carboxy-3-methyl-butyl-(1)]-L-S-cystein-sulfoxyd (IV).

Das vorbeschriebene Sulfid II wurde in 0,5-n. Natronlauge gelöst, wobei wir pro Mol Sulfid zwei Äquivalente NaOH anwandten. Hierauf oxydierte man mit H₂O₂ in derselben Weise, wie dies bei der Darstellung des *[d,l-1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cystein-sulfoxyds* beschrieben wurde; auch die Aufarbeitung des Ansatzes erfolgte analog. Aus 0,83 g *[l-1-Carboxy-3-methyl-butyl-(1)]-L-S-cystein* gewannen wir 0,57 g des Sulfoxyds. Smp. 130–132° (unkorr. unter Zersetzung).

C ₉ H ₁₇ O ₅ NS	Ber. C 43,02	H 6,77%	Gef. C 42,88	H 6,86%
			$[\alpha]_D^{18} = +26,81^\circ$	(in Wasser)

Da dieses Sulfoxyd (infolge der Neubildung eines Asymmetriezentrums der Sulfoxydgruppe) ein Gemisch von Diastereomeren sein kann, haben wir es aus Wasser fraktioniert zu kristallisieren versucht. Dabei wurden Fraktionen von etwas verschiedenen optischen Drehungen erhalten, doch waren sie sehr wahrscheinlich optisch nicht einheitlich.

L-S-Propyl-cysteinol (V).

*L-S-Propyl-cystein*²⁾ wurde in der für Aminosäuren üblichen Methode³⁾ in den Äthylester übergeführt, den wir ohne Destillation mit LiAlH₄ reduzierten.

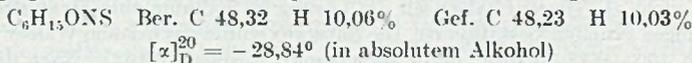
In einem 500 cm³ Rundkolben, versehen mit Rückflusskühler, Rührer (Quecksilberschluss) und Tropftrichter suspendierte man 3,3 g LiAlH₄ in 180 cm³ absolutem Äther und liess unter Rühren 11 g *L-S-Propyl-cystein-äthylester*, gelöst in 80 cm³ absolutem Äther, langsam Zutropfen. Nachdem man eine weitere halbe Stunde turbinert hatte, wurde der Überschuss an LiAlH₄ durch etwas Essigester zersetzt, hierauf das Reaktionsprodukt durch vorsichtige Zugabe von 7 cm³ H₂O zerlegt, die ätherische Schicht vom

¹⁾ E. Fischer, B. 39, 2929 (1906).

²⁾ A. Stoll & E. Seebeck, Helv. 31, 210 (1948).

³⁾ E. Fischer, B. 34, 433 (1901).

Niederschlag getrennt und eingedampft. Das zurückgebliebene Öl haben wir in Chloroform aufgenommen und auch den Niederschlag mit Chloroform ausgewaschen. Die Chloroformauszüge wurden vereinigt, filtriert und eingedampft. Hierauf hat man den öligen Rückstand im Hochvakuum (0,03 mm) in der Kugelhöhre destilliert. Das L-S-Propylcysteinol ging bei 88—95° Luftbadtemperatur über. Ausbeute 5,2 g.



Zusammenfassung.

Aus L-Cystein und *d, l*- α -Jodpropionsäure bzw. *l*(-)- α -Brompropionsäure wurden zwei diastereomere [1-Carboxy-äthyl-(1)]-L-S-cysteine und aus L-Cystein und *l*- α -Brom-isocaproensäure [1-1-Carboxy-3-methyl-butyl-(1)]-L-S-cystein hergestellt und aus diesen Verbindungen die entsprechenden Sulfoxyde bereitet. Ausserdem wurde L-S-Propylcysteinol synthetisiert.

Die genannten Verbindungen besaßen bei den geprüften Mikroorganismen keine antibiotische Wirkung, ebensowenig DL-Crotylglycin und L-Crotylglycin.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

47. Zur Kenntnis von Nitrothiazolverbindungen III

von H. v. Babo und B. Prijs.

(26. I. 50.)

In unserer ersten und zweiten Mitteilung¹⁾ beschrieben wir die Darstellung der bis dahin unbekannt 2-Nitrothiazolverbindungen. Wir unternahmen nun Versuche, um den Einfluss der Nitrogruppe auf die Reaktivität anderer Substituenten am Thiazolkern zu ermitteln.

Zunächst wurden die Eigenschaften von 2-Brom-5-nitrothiazol (IV)²⁾ untersucht und mit denen des isomeren, noch nicht beschriebenen 2-Nitro-5-bromthiazols (VIII) verglichen.

Zur Darstellung des ersteren nitrierten wir zunächst 2-Aminothiazol (I)³⁾ nach *Ganapathi*²⁾ zu 2-Amino-5-nitrothiazol (II). Hierbei konnte — vor allem bei niedriger Temperatur — ein Nebenprodukt isoliert werden, bei dem es sich nach der Analyse um 2-Nitramino-5-nitrothiazol (III)⁴⁾ handeln dürfte. Es verpufft bei 162°, grössere

¹⁾ B. Prijs, J. Ostertag & H. Erlenmeyer, *Helv.* **30**, 1200, 2110 (1947).

²⁾ K. Ganapathi & A. Venkataraman, *Proc. Ind. Acad. Sci.* **22**, A 343, 362 (1945).

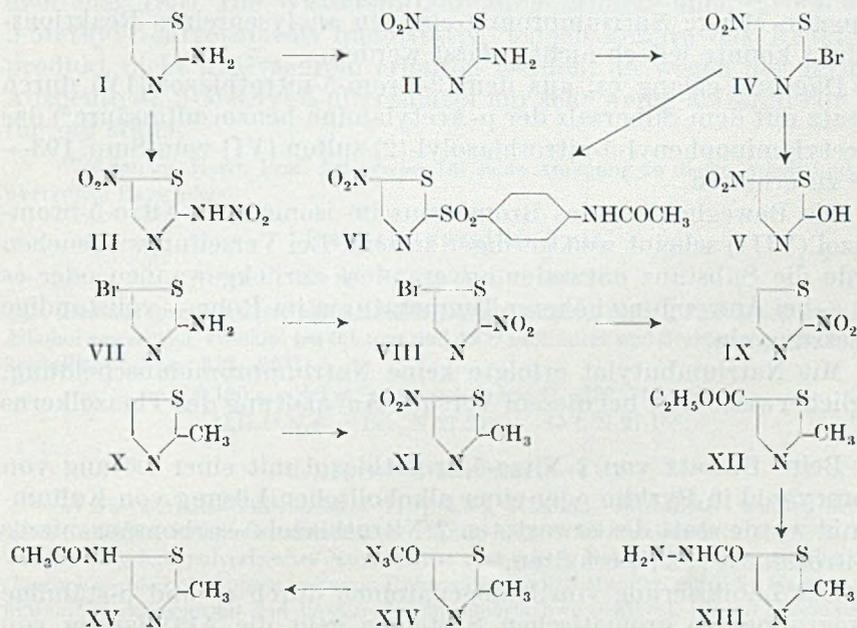
³⁾ 2-Aminothiazol bildet ein bisher in der Literatur nicht beschriebenes Monopikrat vom Smp. 222—223° (siehe Experimenteller Teil).

⁴⁾ Über das homologe 2-Nitramino-4-methyl-5-nitrothiazol mit ähnlichen Eigenschaften berichten E. Ochiai & F. Nagasawa, *J. Pharmac. Soc. Japan* **59**, 43 (1939); *C.* 1941 I, 1805.

Mengen explodieren beim Berühren mit einem heissen Draht unter starker Rauchentwicklung. Der Körper zeigt auch eine für Nitramine typische Farbreaktion¹⁾.

2-Brom-5-nitrothiazol (IV) wurde aus 2-Amino-5-nitrothiazol (II) nach *Ganapathi* oder auch nach *Craig*²⁾ — durch Diazotierung in konz. Bromwasserstoffsäure unter Zusatz von Brom ohne Verwendung von Kupfersulfat — erhalten.

Das isomere 2-Nitro-5-bromthiazol (VIII) gewannen wir aus 2-Amino-5-bromthiazol (VII), das seinerseits am besten nach *J. P. English* und Mitarbeitern³⁾ zu erhalten ist. Die Überführung der Amino- in die Nitrogruppe erfolgte nach dem in der 1. Mitteilung⁴⁾ angegebenen Verfahren. 2-Nitro-5-bromthiazol zeigt beim Lösen in Alkali eine intensive Rotfärbung, die beim Ansäuern wieder verschwindet.



Bei unseren Versuchen mit den beiden isomeren Brom-nitrothiazolen gingen wir von folgenden Tatsachen aus.

Bereits im Jahre 1890 bemerkte *Wohmann*⁵⁾, dass das Chloratom der 2-Chlor-4-methylthiazol-5-carbonsäure sehr labil und daher leicht hydrolysierbar ist. Später stellten *Erlenmeyer, Buchmann & Schenkel*⁶⁾

¹⁾ *J. Thiele & A. Lachmann*, A. **288**, 269 (1895).

²⁾ *L. C. Craig*, Am. Soc. **56**, 231 (1934).

³⁾ *J. P. English, J. H. Clark, J. W. Clapp, D. Seeger & R. H. Ebel*, Am. Soc. **68**, 453 (1946).

⁴⁾ *B. Prijs, J. Ostertag & H. Erlenmeyer*, loc. cit.

⁵⁾ *M. Wohmann*, A. **259**, 277 (1890).

⁶⁾ *H. Erlenmeyer, P. Buchmann & H. Schenkel*, Helv. **27**, 1432 (1944).

in analogen Fällen Aktivierung des 2-ständigen Chloratoms durch eine 5-ständige Carboxylgruppe fest. Es war daher von Interesse, festzustellen, ob auch der Nitrogruppe ein aktivierender Einfluss zukommt. Daneben wäre es für die Aufklärung der Struktur des Thiazols von Bedeutung, nachzuweisen, wieweit 2,5-substituierte mit den reziproken 5,2-substituierten Thiazolverbindungen zu vergleichen sind. Nachdem uns nun die beiden isomeren Brom-nitro-thiazole (IV und VIII) zur Verfügung standen, unternahmen wir verschiedene Versuche, um den Einfluss der Nitrogruppe auf die Beweglichkeit des Bromatoms in den beiden Verbindungen festzustellen.

2-Brom-5-nitrothiazol (IV) liess sich durch Kochen mit 25-proz. Salzsäure zu 2-Oxy-5-nitrothiazol (V) verseifen¹⁾.

Beim Versetzen einer Lösung von 2-Brom-5-nitrothiazol (IV) mit einer Lösung von Natriumbutylat²⁾ trat sofort Ausscheidung der berechneten Menge Natriumbromid ein; ein analysenreines Reaktionsprodukt konnte jedoch nicht gefasst werden.

Dagegen gelang es, aus dem 2-Brom-5-nitrothiazol (IV) durch Umsatz mit dem Silbersalz der p-Acetylamino-benzolsulfinsäure³⁾ das p-Acetylamino-phenyl-5-nitrothiazolyl-(2)-sulfon (VI) vom Smp. 193—194° zu erhalten.

Die Beweglichkeit des Bromatoms im isomeren 2-Nitro-5-bromthiazol (VIII) scheint weit geringer zu sein. Bei Verseifungsversuchen wurde die Substanz entweder unverändert zurückgewonnen oder es trat — bei Anwendung höherer Temperaturen im Rohr — vollständige Zersetzung ein.

Mit Natriumbutylat erfolgte keine Natriumbromidabscheidung. Möglicherweise tritt bei diesem Versuch Aufspaltung des Thiazolkerns ein.

Beim Umsatz von 2-Nitro-5-bromthiazol mit einer Lösung von Cuprocyanid in Pyridin oder einer alkoholischen Lösung von Kaliumcyanid wurde statt des erwarteten 2-Nitrothiazol-5-carbonsäurenitrils 2-Nitrothiazol (IX)⁴⁾ erhalten.

Der Labilisierung von Halogenatomen durch o- und p-ständige Nitrogruppen in aromatischen Systemen geht die Aktivierung von Methylgruppen durch solche Nitrogruppen parallel. Es lag daher nahe, als weiteres zu untersuchendes Verbindungspaar 2-Nitro-5-methylthiazol⁵⁾ und 2-Methyl-5-nitrothiazol zu wählen. In der Absicht, zum noch unbekanntem 2-Methyl-5-nitrothiazol (XI) zu gelangen, wurde daher die Nitrierung von 2-Methylthiazol (X) untersucht. Es wurde

¹⁾ 2-Bromthiazol lässt sich auf diese Weise nicht zu 2-Oxythiazol verseifen (Versuche von J. Ostertag).

²⁾ Über die analoge Reaktion in der Pyridinreihe vgl. H. L. Friedmann et al., Am. Soc. 69, 1204 (1947).

³⁾ Org. Synth., Coll. Vol. I, S. 7.

⁴⁾ Vgl. D.T. Mowry, Chem. Rev. 42, 203 (1948).

⁵⁾ B. Prijs, J. Ostertag & H. Erlenmeyer, loc. cit.

hierbei ein Mononitroderivat vom Smp. 131—133° erhalten. Die Ausbeute erreichte jedoch trotz Verwendung von Kaliumnitrat in 20-proz. Oleum oder in 100-proz. Schwefelsäure höchstens 3—4%.

Da zu vermuten war, dass es sich bei diesem Nitrierungsprodukt um 2-Methyl-5-nitrothiazol (XI) handelt, wurde zu Vergleichszwecken 2-Methyl-5-acetylaminothiazol (XV) aus 2-Methylthiazol-5-carbonsäureäthylester (XII)¹) durch Abbau nach *Curtius* über das Hydrazid XIII und das Azid XIV dargestellt.

Wir versuchten nun, die Verbindung XV zum Vergleich durch Hydrierung des vermutlichen 2-Methyl-5-nitrothiazols (XI) mit *Raney* Nickel in Essigsäureanhydrid darzustellen, eine Methode, die uns gestattete, ausgehend von anderen Nitrothiazolderivaten direkt zu den entsprechenden Acetylaminoverbindungen zu gelangen (siehe Experimenteller Teil). Die Wasserstoffaufnahme erfolgte auch im Falle des 2-Methyl-5-nitrothiazols quantitativ, jedoch konnte das Reaktionsprodukt nicht analysenrein erhalten werden, da wegen der geringen Ausbeute an 2-Methyl-5-nitrothiazol nur sehr wenig Material zur Verfügung stand.

Wir danken Herrn Prof. *Erlenmeyer* für seine Anregung zu dieser Arbeit und seine wertvollen Ratschläge.

Experimenteller Teil.

Pikrat von 2-Aminothiazol.

Das aus konzentrierter alkoholischer Lösung gefällte, gelbe Pikrat wurde mit etwas Alkohol gewaschen, zweimal bei 0,1 mm und 120° sublimiert und dreimal aus Alkohol umkristallisiert. Smp. 222—223°.

2,180 mg Subst. gaben 0,407 cm³ N₂ (22°, 744 mm)

C₉H₇O₇N₅S Ber. N 21,27% Gef. N 21,15%

2-Brom-5-nitrothiazol (IV).

a) Aus 2-Amino-5-nitrothiazol (II)²). 4,5 g 2-Amino-5-nitrothiazol wurden bei –5° unter kräftigem Rühren in kleinen Portionen in 45 cm³ Schwefelsäure (1:2) gelöst. Dann wurden 15 g fein pulverisiertes Kupfersulfat und 6,18 g Natriumbromid zugegeben. Das Gemisch wurde bei 0° unter weiterem Rühren innerhalb 5 Minuten mit 2,5 g Natriumnitrit in 6 cm³ Wasser versetzt und die saure Lösung mehrfach ausgeäthert. Die mit Natriumsulfat getrockneten Ätherauszüge ergaben bräunlich-weiße Kristalle, die mit Wasserdampf destilliert und dann aus Äther umkristallisiert wurden. Man erhielt so 2,5 g 2-Brom-5-nitrothiazol (IV) vom Smp. 91° (Lit. 91—92°). Die Substanz kann Hautätzungen hervorrufen.

b) Aus 2-Aminothiazol (I)²). 30 g 2-Aminothiazol wurden in kleinen Portionen unter schnellem Rühren bei 15° in 75 cm³ konz. H₂SO₄ gelöst. Dann wurden unter weiterem Rühren vorsichtig 15 cm³ rauchende Salpetersäure (d = 1,51) zugetropfelt. Nach 12 Stunden wurde das Gemisch bei 15° unter gleichzeitigem Zusatz von 32 g *Gattermann*-Kupfer in eine Lösung von 95,4 g Natriumbromid in 375 cm³ Wasser gegossen. Nun wurde unter Rühren innerhalb 20 Minuten bei 10—15° mit einer Lösung von 25,2 g Natriumnitrit in 60 cm³ Wasser diazotiert. Es wurde sodann mit Wasserdampf destilliert und das so erhaltene 2-Brom-5-nitrothiazol (IV) im Vakuum sublimiert. Man erhielt so 33 g IV vom Smp. 90°. Der Sublimationsrückstand bestand hauptsächlich aus 2-Nitramino-5-nitrothiazol (III).

¹) *A. Schöberl & M. Stock*, B. 73, 1240 (1940).

²) Vgl. *K. Ganapathi & A. Venkataraman*, loc. cit.

c) Aus 2-Amino-5-nitrothiazol (II) nach *L. C. Craig*¹⁾. 2,3 g 2-Amino-5-nitrothiazol wurden spatelweise unter Röhren in 8 cm³ 63-proz. HBr gelöst. Sodann wurden 3 cm³ Brom zugetropft. Nun wurde unter Kühlung mit Eis-Kochsalz innerhalb 7 Minuten mit 2,5 g Natriumnitrit, gelöst in 15 cm³ Wasser, diazotiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 200 g Eis gegossen und dann mit Äther extrahiert. Die Ätherschicht wurde mit verdünnter Natriumthiosulfatlösung ausgeschüttelt, getrocknet und eingedampft. Nach zweimaligem Umkristallisieren des Rückstandes aus Alkohol-Aceton erhielt man 1,4 g 2-Brom-5-nitrothiazol (IV) vom Smp. 92°.

2-Nitramino-5-nitrothiazol (III).

30 g reines 2-Aminothiazol (I) wurden unter Röhren und Kühlung mit Eis-Kochsalz spatelweise in 80 cm³ konz. Schwefelsäure gelöst. Anschliessend wurde mit 16 cm³ rauchender Salpetersäure ($d = 1,51$) nitriert, wobei die Temperatur konstant bei 10° gehalten wurde. Nach 12 Stunden wurde auf 500 g Eis gegossen. Der entstandene braune Niederschlag wurde abgenutscht. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser unter Zusatz von Aktivkohle erhielt man in guter Ausbeute 2-Nitramino-5-nitrothiazol (III) in gelben Kristallen vom Smp. 162° (unter Verpuffung).

1,927 mg Subst. gaben 0,495 cm³ N₂ (20°, 741 mm)

C₃H₂O₄N₄S Ber. N 29,47% Gef. N 29,18%

Eine Probe der Substanz wurde mit Ferrosulfatlösung versetzt und die Lösung mit konz. Schwefelsäure unterschichtet. Nach einiger Zeit bildete sich an der Grenzfläche ein brauner Ring²⁾.

2-Nitro-5-bromthiazol (VIII).

3,5 g 2-Amino-5-bromthiazol-hydrobromid (VII) vom Smp. 160° wurden in verdünnter Salzsäure (4 cm³ konz. HCl + 40 cm³ Wasser) gelöst. Die Lösung wurde ziemlich schnell unter Röhren zu einem Gemisch von 1,6 g Natriumnitrit, gelöst in 60 cm³ Wasser, 2 g Kupfer(I,II)-sulfit und 2 g Natriumhexanitrocobaltat(III) getropft, wobei die Temperatur auf 25° gehalten wurde. Nachdem die Hälfte der Aminlösung zugegeben war, wurden nochmals je 2 g des Cu- und des Co-Komplexes hinzugefügt. Die Diazotierung war nach ca. 20 Minuten beendet. Nun wurde mit etwas Aktivkohle aufgekocht und ausgeäthert. Die Ätherlösung lieferte gelbliche Kristalle, die aus Petroläther umkristallisiert den Smp. 82° zeigten.

2,87 mg Subst. verbrauchten 1,93 cm³ AgNO₃ ($f = 0,568$)

C₃HO₂N₂BrS Ber. Br 38,23% Gef. Br 38,21%

Der Nitrokörper kann auch aus der sauren Reaktionslösung direkt durch Destillation mit Wasserdampf isoliert werden. In konz. Natronlauge löst er sich mit gelber Farbe, die nach einiger Zeit nach rot umschlägt.

2-Oxy-5-nitrothiazol (V).

7 g 2-Brom-5-nitrothiazol (IV) wurden mit 175 cm³ 25-proz. Salzsäure 5 Stunden am Rückfluss auf 130—150° erhitzt, wobei allmählich Lösung eintrat. Nach dem Erkalten wurde mit 175 cm³ Wasser verdünnt und dreimal mit Äther extrahiert. Aus der Ätherlösung erhielt man 4,1 g (82% der Theorie) 2-Oxy-5-nitrothiazol (V) in gelben Kristallen, die nach dreimaligem Umkristallisieren aus Benzol bei 136° schmolzen und sich bei 142° zersetzten. Die Substanz kann auch bei 120° und 0,1 mm sublimiert werden.

2,983 mg Subst. gaben 0,498 cm³ N₂ (20°, 740 mm)

C₃H₂O₃N₂S Ber. N 19,17% Gef. N 18,94%

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ Vgl. *J. Thiele & A. Lachmann*, loc. cit.

Silber-p-acetylamino-benzolsulfinat.

Zur Lösung von 0,17 g Natriumcarbonat und 0,4 g reiner p-Acetylamino-benzol-sulfinsäure¹⁾ in 25 cm³ destilliertem Wasser fügte man eine Lösung von 0,34 g Silbernitrat in 20 cm³ destilliertem Wasser. Die entstandene Suspension wurde einige Minuten geschüttelt, das Silbersalz abfiltriert, mit destilliertem Wasser gewaschen und im Vakuum bei 65° getrocknet.

p-Acetylamino-phenyl-5-nitrothiazolyl-(2)-sulfon (VI).

In eine Lösung von 0,62 g reinem 2-Brom-5-nitrothiazol (IV) in 60 cm³ verdünntem Dioxan (35 cm³ Dioxan + 25 cm³ Wasser) wurden 0,9 g Silber-p-acetylamino-benzolsulfinat eingetragen. Das Gemisch wurde 90 Minuten am Rückfluss zum Sieden erhitzt. Vom entstandenen Silberbromid (0,5 g; ber. 0,55 g) wurde heiss filtriert und das Filtrat mit Wasser verdünnt. Das ausgeschiedene gelbliche Sulfon VI wurde dreimal aus Methanol umkristallisiert und bei 183–185°/0,1 mm sublimiert. Es schmilzt bei 193–194° unter Zersetzung.

3,318 mg Subst. gaben 4,86 mg CO₂ und 0,81 mg H₂O

3,273 mg Subst. gaben 0,368 cm³ N₂ (20°, 735 mm)

C₁₁H₉O₅N₃S₂ Ber. C 40,35 H 2,77 N 12,82%

Gef. „ 39,97 „ 2,73 „ 12,67%

2-Nitrothiazol (IX) aus 2-Nitro-5-bromthiazol (VIII).

1,3 g 2-Nitro-5-bromthiazol wurden in 12 cm³ wasserfreiem Pyridin gelöst. Die dunkelrote Lösung wurde am Rückfluss zum Sieden erhitzt und innert 30 Minuten wurden 0,9 g Cuprocyanid in kleinen Portionen eingetragen. Nach 2stündigem Kochen wurde die Lösung abgekühlt und unter Rühren in eisgekühlte verdünnte Salzsäure (10 cm³ konz. HCl + 30 cm³ Wasser) eingetropft. Nun wurde mehrfach ausgeäthert. Die aus der Ätherlösung erhaltene Substanz schmolz nach Sublimation bei 80–100°/20 mm bei 76°; Mischprobe mit 2-Nitrothiazol (IX)²⁾ vom Smp. 76° ebenso.

1,678 mg Subst. gaben 0,317 cm³ N₂ (23°, 748 mm)

C₃H₂O₂N₂S Ber. N 21,53% Gef. N 21,44%

2-Methyl-5-nitrothiazol (XI).

6,0 g 2-Methylthiazol (X) wurden in einem Schliffl Kolben mit Kühler und einem Tropftrichter, der zu einer auf den Boden des Gefäßes reichenden Kapillare ausgezogen war, unterhalb 0° vorsichtig in 22 cm³ Monohydrat gelöst. Dann wurde bei 150° innerhalb 90 Minuten eine Lösung von 40 g Kaliumnitrat in 40 cm³ Salpetersäure (d = 1,5) zufließen gelassen. Anfangs trat heftige Reaktion ein, wobei die Temperatur auf ca. 330° stieg. Nach 12stündigem Stehen wurde mit 100 g Eis versetzt, mit Soda bis zur schwach sauren Reaktion abgestumpft und zweimal mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand, ein gelbliches Öl, erstarrte beim Abkühlen zu gelblichen, scharf riechenden Kristallen. Diese wurden in heissem Methanol gelöst und die Lösung wurde mit Äther-Trockeneis abgekühlt. Die sich bildenden weissen Kristalle wurden schnell abgenutscht und getrocknet. Smp. 131–133°. Der Nitrokörper kann auch aus saurer Lösung mit Wasserdampf destilliert werden und lässt sich bei 12 mm und 110–120° sublimieren. Auch lässt er sich aus viel Petroläther umkristallisieren. Reinausbeute ca. 300 mg (4% der Theorie).

4,639 mg Subst. gaben 5,68 mg CO₂ und 1,08 mg H₂O

1,790 mg Subst. gaben 0,306 cm³ N₂ (22°, 737 mm)

C₄H₄O₂N₂S Ber. C 33,33 H 2,79 N 19,43%

Gef. „ 33,41 „ 2,60 „ 19,18%

Der Nitrokörper zeigt beim Lösen in warmer 2-n. Natronlauge Gelbfärbung, die beim Stehen über Nacht nach rot umschlägt. Die Farbe verschwindet wieder beim Neutralisieren mit 2-n. Salzsäure.

¹⁾ Org. Synth., Coll. Vol. I, S. 7.

²⁾ B. Priejs, J. Ostertag & H. Erlenmeyer, loc. cit.

2-Methylthiazol-5-carbonsäure-hydrazid (XIII).

Zu einer siedenden Lösung von 1 g Hydrazinhydrat in 5 cm³ Methanol wurden während 35 Minuten 2 g 2-Methylthiazol-5-carbonsäure-äthylester (XII), gelöst in 6 cm³ Methanol, getropft. Nach dem Abdestillieren der flüssigen Anteile im Vakuum blieben weisse Kristalle zurück, die, aus Methanol umkristallisiert, den Smp. 159° zeigten. Ausbeute ca. 250 mg. Das unreine Hydrazid färbt sich an der Luft rot.

5,004 mg Subst. gaben 7,02 mg CO₂ und 1,92 mg H₂O

2,113 mg Subst. gaben 0,500 cm³ N₂ (21°, 742 mm)

C₅H₇ON₃S Ber. C 38,20 H 4,49 N 26,73%
Gef. „ 38,28 „ 4,29 „ 26,82%

2-Methylthiazol-5-carbonsäureazid (XIV).

0,5 g des Hydrazids XIII wurden bei 0° in 10 cm³ verdünnter Salzsäure* (3 cm³ konz. HCl + 7 cm³ Wasser) gelöst, auf -15° abgekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 0,3 g Natriumnitrit in 5 cm³ Wasser versetzt, wobei die Temperatur zwischen -10° und -5° gehalten wurde. Die Lösung wurde zweimal ausgeäthert; der Ätherrückstand bestand aus weissen, pulvrigen Kristallen vom Smp. 60°. Eine Probe verpuffte bei schnellem Erhitzen unter Gasentwicklung und Bildung eines roten Öls. Die Substanz wurde ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet.

2-Methyl-5-acetylaminothiazol (XV).

0,2 g des Azids XIV wurden in einer Mischung von 1,5 g Eisessig und 6 g Essigsäureanhydrid gelöst und die Lösung 2 Stunden am Rückfluss zum Sieden erhitzt, wobei sie sich intensiv braun färbte. Nach Abdestillieren der Lösungsmittel im Vakuum verblieb ein braunes Öl, das beim Abkühlen in Eis-Kochsalz zu Kristallen erstarrte. Diese wurden in etwas heissem Wasser aufgenommen, die Lösung zum Sieden erhitzt, filtriert und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde aus Benzol-Petroläther umkristallisiert. Smp. 141—143°.

3,580 mg Subst. gaben 6,081 mg CO₂ und 1,628 mg H₂O

C₆H₈ON₂S Ber. C 46,15 H 5,16% Gef. C 46,35 H 5,09%

Acetylierende Hydrierung von Nitrothiazolverbindungen.

450 mg reines 2-Nitro-5-methylthiazol¹⁾ vom Smp. 60°, gelöst in 30 cm³ Essigsäureanhydrid, wurden bei Zimmertemperatur mit Raney-Nickel hydriert. Die Wasserstoffaufnahme (235 cm³; ber. 240 cm³) war nach 40 Minuten beendet. Der Katalysator wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und die Lösung im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst. Nach 12 Stunden wurden die erhaltenen Kristalle, die noch Spuren von Nickelsalzen enthielten, in absolutem Alkohol gelöst und 15 Minuten mit Aktivkohle gekocht. Beim Einengen und Abkühlen der filtrierten Lösung fielen weisse Kristalle aus, die, noch zweimal aus absolutem Alkohol umkristallisiert, bei 224° schmolzen (Smp. des bekannten²⁾ 2-Acetyl-amino-5-methylthiazols 224°).

Das 2-Acetyl-amino-5-methylthiazol bildet in methylalkoholischer Lösung ein Pikrat, das zweimal aus Alkohol umkristallisiert wurde; Smp. 187°.

3,742 mg Subst. gaben 0,608 cm³ N₂ (23°, 729 mm)

C₁₂H₁₁O₈N₃S Ber. N 18,23% Gef. N 17,97%

Aus 2-Nitrothiazol (IX) erhielt man in ähnlicher Weise 2-Acetylaminothiazol vom Smp. 202°.

Die Mikroanalysen verdanken wir z.T. dem mikroanalytischen Laboratorium der CIBA Aktiengesellschaft (Dr. H. Gysel), z.T. dem mikroanalytischen Laboratorium der Chemischen Anstalt.

¹⁾ B. Prijs, J. Ostertag & H. Erlenmeyer, loc. cit.

²⁾ F. Nagasawa, J. pharmac. Soc. Japan 60, 219 (1940); C. 1941 II, 199.

Zusammenfassung.

Es wurde 2-Nitro-5-bromthiazol synthetisiert und die Eigenschaften und Reaktionen dieses Körpers wurden mit denjenigen des isomeren 2-Brom-5-nitrothiazols verglichen. Ferner wurde 2-Methyl-5-nitrothiazol dargestellt und andererseits durch Abbau der 2-Methylthiazol-5-carbonsäure 2-Methyl-5-acetylaminothiazol gewonnen.

Universität Basel, Anstalt für anorganische Chemie.

48. Die Konstitution der Sennoside.

6. Mitteilung über Anthraglykoside

von A. Stoll, B. Becker und A. Helfenstein †.

(31. I. 50.)

A. Einleitung.

In unserer 3. Mitteilung über Anthraglykoside¹⁾ beschrieben wir die Isolierung und die Eigenschaften der Sennoside A und B, der Hauptwirkstoffe der Folia Sennae. In einer weiteren Mitteilung²⁾ berichteten wir über die Bestimmung des Molekulargewichtes der Sennoside. Da diese und ihre Aglykone, die Sennidine A und B, sich als solche für eine Molekulargewichtsbestimmung nicht eigneten, ermittelten wir die Molekulargewichte an Hand von Derivaten, von Estern und Äthern der Glucoside und der Aglykone, wobei uns die Methode der isothermen Destillation nach *Barger-Signer* gute Dienste leistete. Die damit gewonnenen Resultate lieferten den Beweis für die bimolekulare Struktur der Sennoside und ihrer Aglykone und gestatteten uns die Aufstellung der Bruttoformeln $C_{12}H_{38}O_{20}$ für die beiden isomeren Sennoside und von $C_{30}H_{18}O_{10}$ für die beiden Sennidine.

Vor kurzem berichteten wir in der 5. Mitteilung dieser Reihe³⁾ über die Stellung des Zuckers in den Sennosiden. Durch Vergleich der Acetylierungs- und Methylierungsprodukte der Sennoside A und B und ihrer Aglykone stellten wir zunächst fest, dass in den Glucosiden die D-Glucose mit einem α -Hydroxyl des Anthracengerüstes verknüpft sein muss. Das bei der Oxydation der Dimethyläther-diester der Sennoside A und B erhaltene Anthrachinonderivat war identisch mit dem totalsynthetisch hergestellten 1-Methoxy-8-oxy-anthrachinon-3-car-

¹⁾ A. Stoll, B. Becker & W. Kussmaul, *Helv.* **32**, 1892 (1949).

²⁾ A. Stoll & B. Becker (4. Mitteilung), *Festschrift Prof. P. Casparis*, Bern, S. 221, Schw. Apoth.-Verein, Zürich 1949.

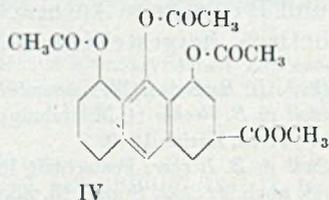
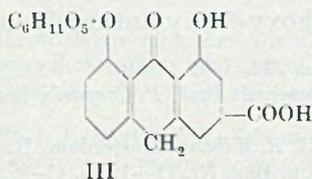
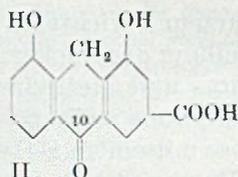
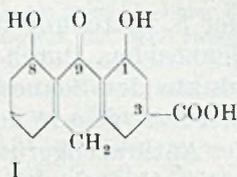
³⁾ A. Stoll & B. Becker, *Festschrift Prof. J. R. Wibaut*, Amsterdam, R. **69** (1950), im Druck; vgl. auch A. Stoll, *Suppl. Bl. Soc. Chim. Biol.* Nr. 11–12, p. 41–62 (1948).

bonsäure-methylester. Damit war der Beweis erbracht, dass in beiden Sennosiden der Zuckerrest mit der 8-Oxygruppe des Anthracengerüstes verbunden ist.

Durch die vorliegende Arbeit ist es möglich geworden, die Strukturformel der Sennoside aufzustellen und diese durch Synthese zu bestätigen.

B. Die reduktive Spaltung der Sennoside und der Sennidine.

In früheren Mitteilungen dieser Reihe zeigten wir, dass die Sennoside sich von einem im Anthrachinonkern reduzierten Rhein ableiten, über dessen Oxydationsgrad wir aber keine genaueren Angaben machen konnten. Versuche, die qualitativ leicht durchführbare Oxydation zur Anthrachinonstufe quantitativ zu gestalten, führten nicht zu reproduzierbaren Resultaten, weshalb wir das Verhalten der Sennoside bei der Einwirkung von Reduktionsmitteln untersuchten und dabei hofften, den Verbrauch an Reduktionsmitteln bis zur Anthracenstufe erfassen zu können. Das Ergebnis war überraschend: selbst unter sehr milden Bedingungen, z. B. bei katalytischer Hydrierung mit Palladium bei Zimmertemperatur, zerfällt die Sennosidmolekel unter Aufnahme von 1 Mol Wasserstoff in zwei gleiche Hälften; das entstehende neue Glucosid mit halbem Molekulargewicht, das sich unter bestimmten Bedingungen kristallisieren lässt, musste auf Grund seiner Eigenschaften und seiner Entstehungsweise ein 8-Glucosido-rheinanthron (III) sein. Auch sein ebenfalls kristallisierbares Aglykon zeigte alle Eigenschaften eines Anthrons; so färbte sich seine Lösung in Alkali bei Luftzutritt rasch rot, im Gegensatz zu den Sennidinen, die ja erst beim Erhitzen mit einem Oxydationsmittel die *Bornträger*-Reaktion zeigen. Beim üblichen Acetylieren mit Essigsäureanhydrid in Pyridin und Verestern der Carboxylgruppe mit Diazomethan erhielt man einen gut kristallisierenden Triacetoxy-anthracen-3-carbonsäure-methylester (IV), dessen Elementaranalyse und Molekulargewichtsbestimmung, zusammen mit der grellen Fluoreszenz im Ultraviolett,



den Beweis für die Anthranolstruktur der erhaltenen Verbindung erbrachten.

Die Frage, ob die durch reduktive Spaltung der Sennoside erhaltenen Rheinanthronderivate sich vom 9- oder 10-Anthron, (I) oder (II), ableiten, konnte, wie in Abschnitt D gezeigt wird, eindeutig im Sinne von Formel I entschieden werden.

Ein weiteres wichtiges Resultat lieferte die reduktive Spaltung durch die Feststellung der Identität der Spaltstücke aus Sennosid A und B; so zeigten die durch Reduktion aus beiden Sennosiden gewonnenen Anthronglucosidpräparate z. B. auch die gleiche optische Drehung.

Da bei der katalytischen Hydrierung neben der reduktiven Spaltung noch wasserstoffverbrauchende Nebenreaktionen liefen, betrug die Gasaufnahme gewöhnlich 1,2—1,5 Mol. Durch Verwendung von Natriumdithionit als Reduktionsmittel gelangten wir nicht nur zu einer bequemen präparativen Reduktionsmethode, sondern es gelang uns auch, die Wasserstoffaufnahme schärfer quantitativ zu verfolgen, indem wir in Anlehnung an die Versuche von *O. Warburg*¹⁾ die CO₂-Menge massen, die sich aus Natriumhydrogencarbonat durch das bei der Reduktion entstehende Natriumhydrogensulfit entwickelte. Der Wasserstoffverbrauch lag zwischen 0,9—1,05 Mol pro Mol Sennosid, bei einer Ausbeute von 75—85% kristallisiertem Anthron-glucosid.

Zur Bestätigung dieser Befunde unterwarfen wir auch die Methylester der Sennoside A und B, die wir durch Entacetylieren der entsprechenden Deca-acetyl-ester²⁾ gewonnen hatten, der Reduktion mit Natriumdithionit. Die erhaltenen monomolekularen 8-Glucosid-rheinanthron-methylester waren in allen ihren Eigenschaften, wie Schmelzpunkt, Löslichkeit, Drehwert und Molekulargewicht identisch. Durch saure Hydrolyse entstand daraus der Rheinanthron-methylester, der beim Acetylieren in Essigsäureanhydrid/Pyridin den schon erwähnten Triacetoxy-anthracen-carbonsäure-methylester (IV) lieferte.

Auch die Einwirkung von Natriumdithionit auf eine wässrige Lösung der Sennidinsalze führte in glatter Reaktion zum Rheinanthron, das wiederum als Triacetylverbindung (IV) identifiziert wurde.

Nach diesen Versuchen können in den Sennidinen die beiden Rheinanthronmolekeln (I) entweder direkt, d. h. durch eine —C—C— Bindung, oder über eine —O— oder —O—O—Brücke miteinander verbunden sein³⁾. Andere Möglichkeiten kommen nicht in Frage, da von

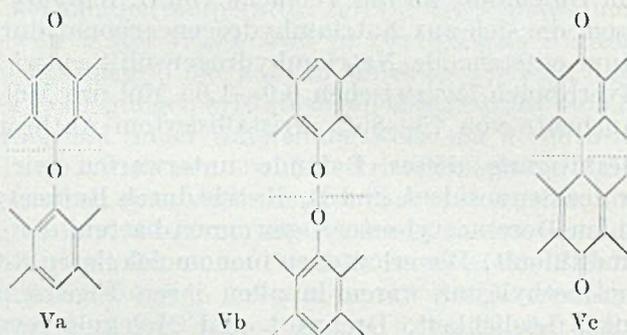
¹⁾ *O. Warburg, W. Christian & A. Griese, Bioch. Z.* **282**, 191 (1935); vgl. *P. Karrer und Mitarbeiter, Helv.* **20**, 57 (1937).

²⁾ 4. Mitteilung, l. c.

³⁾ Vgl. *A. Stoll, Suppl. Bl. Soc. Chim. Biol. No.* 11—12, S. 41—62 (1948).

den beiden sonst noch denkbaren Verknüpfungsstellen bei den Sennosiden das Hydroxyl am C1 nachweisbar frei liegt, während dasjenige am C8 durch den Zucker besetzt ist.

Bei der Annahme einer —O—Brücke (Va), d. h. einer einfachen Ätherbindung, würde die Molekel unsymmetrisch, könnte aber bei einer reduktiven Aufspaltung trotzdem zwei identische Hälften liefern, da ja Anthron und Anthranol tautomer reagieren. Es ist bekannt¹⁾, dass Aryläther des Benzylalkohols, im einfachsten Fall also Phenyl-benzyläther, bei Zimmertemperatur in Gegenwart von Palladium katalytisch unter Aufnahme eines Mols Wasserstoff glatt in Phenol und Toluol gespalten werden, also unter Bedingungen, bei denen auch die Sennoside zerfallen. Gegen die Annahme einer einfachen Ätherbrücke spricht aber die Resistenz der Sennidine beim Erhitzen mit starken Säuren, z. B. konz. Salzsäure. Auch ist es uns nie gelungen, irgendein „unsymmetrisches“ Derivat, bei dem der durch die Brücke nicht beanspruchte zweite Anthronsauerstoff bzw. dessen Enol in Reaktion getreten wäre, zu fassen.



Die wenigen in der Literatur beschriebenen Substanzen mit einer Brückenbindung aus zwei Sauerstoffatomen (Vb)²⁾ zeigen keinerlei Peroxydecharakter und verhalten sich fast wie normale Äther; durch Reduktionsmittel werden sie unter Aufnahme von einem Mol Wasserstoff in symmetrische Hälften gespalten. Gegen Säuren sind solche Verbindungen jedoch sehr empfindlich, so dass die Annahme einer —O—O—Brücke im Formelbild der Sennidine unwahrscheinlich ist.

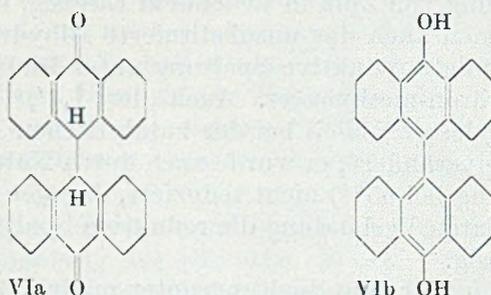
Stabilität gegenüber Säureeinwirkung ist hingegen bei einer —C—C—Bindung (Vc) sicher zu erwarten, ihre Aufspaltung durch Wasserstoff aber auf den ersten Blick schwierig zu erklären. Schon Eder³⁾ hat für den „Dehydro-emodin-anthranol-monomethyläther“

¹⁾ Vgl. A. Lültringhaus, Z. angew. Chem. **51**, 915 (1938).

²⁾ A. v. Baeyer, B. **33**, 3387 (1900); R. Pummerer & A. Rieche, B. **59**, 2161 (1926); St. Goldschmidt, B. **55**, 3194 (1922).

³⁾ R. Eder & F. Hauser, Arch. Pharm. **263**, 436 (1925).

aus Chrysarobin eine Formel vom Typ des Dihydro-dianthrons (VIa) bzw. Dianthranols (VIb) diskutiert¹⁾, doch war er der Ansicht, wohl auf Grund der irrtümlichen Angaben von *Eckert*²⁾, dass solche Verbindungen durch Wasserstoff nicht spaltbar seien.



*Barnett*³⁾ beschrieb hingegen eine gute Darstellungsmethode des (monomolekularen) Anthrons durch Reduktion des Dihydro-dianthrons mit Zinn in Eisessig, Salzsäure und Platinchlorid als Katalysator. Wir wandten eine von *Perkin*⁴⁾ für die Reduktion von Anthrachinonen zu Anthronen ausgearbeitete Methode (mit Zinnchlorür in Eisessig/Salzsäure, ohne Katalysator) auch auf Dihydro-dianthron an und erhielten ebenfalls Anthron. Sogar mit Zink in Eisessig gelang uns die Sprengung der $-C-C-$ Bindung des Dihydro-dianthrons, wobei wir aus dem erhaltenen Gemisch von Reduktionsprodukten mit Hilfe eines Aluminiumoxyd-Chromatogramms ca. 30% Anthracen isolieren konnten.

Grundsätzlich war somit die Aufspaltbarkeit der $-C-C-$ Bindung durch Reduktionsmittel bewiesen, aber es galt noch zu erklären, weshalb die Spaltung der Sennidine mit ausgesprochen milden Reduktionsmitteln gelingt, während für die Spaltung von Dihydro-dianthron viel energiereichere Bedingungen notwendig sind. Die vergleichende reduktive Spaltung einer Reihe von Senninderivaten gab darüber Aufschluss.

1,1'-Dimethyl-sennidin-dimethylester, mit einem freien α -Hydroxyl pro Anthronrest, liess sich wie das unsubstituierte Sennidin mit Wasserstoff in Gegenwart von Pd-Katalysator reduktiv zum 1-Methyl-rheinanthronester aufspalten; 1,1',8,8'-Tetramethyl-sennidin-

¹⁾ Es sei hier daran erinnert, dass nach *K. H. Meyer*, A. 379, 39 (1911) Anthron und Anthranol tautomer reagieren, Dianthron (heute als Dihydro-dianthron bezeichnet, während die Bezeichnung Dianthron für die früher unter dem Namen „Bianthron“ beschriebene Substanz verwendet wird) und Dianthranol dagegen nicht, da sie sich nur durch stärkere chemische Eingriffe ineinander überführen lassen. Für Dihydro-dianthron wird auch die Bezeichnung 10,10'-Bianthronyl verwendet, vgl. Elsevier's Encyclop. Vol. 13, 766.

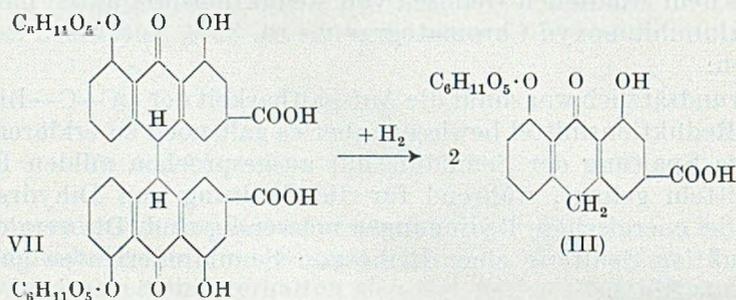
²⁾ *A. Eckert & A. Hofmann*, M. 36, 497 (1915).

³⁾ *E. de B. Barnett & M. A. Matthews*, Soc. 123, 380 (1923).

⁴⁾ *E. J. Cross & A. G. Perkin*, Soc., 1930, 292.

dimethylester¹⁾ hingegen blieb unter ähnlichen Bedingungen, wie auch bei der üblichen Einwirkung von Natriumdithionit, unverändert. Selbst bei dreifacher Reaktionszeit und Steigerung der Temperatur wurden noch gegen 80% Ausgangsmaterial zurückgewonnen. Erst bei der Einwirkung von Zink in siedendem Eisessig, unter Bedingungen also, bei denen auch das unsubstituierte Dihydro-dianthron gespalten wird, erfolgte reduktive Spaltung unter Bildung von 1,8-Dimethyl-rheinanthron-methylester. Auch der 1,1',8,8'-Tetra-acetylsennidin-dimethylester²⁾ blieb bei der katalytischen Hydrierung mit Pd in Eisessig unverändert; er wurde auch durch Natriumdithionit in essigsaurer Lösung bei 65°³⁾ nicht reduziert, dagegen gelang auch bei dieser bimolekularen Verbindung die reduktive Spaltung mit Zink in siedendem Eisessig.

Voraussetzung für eine Spaltung unter milden Bedingungen bildet somit das Vorhandensein von mindestens einer freien Hydroxylgruppe in α -Stellung des Anthronkerns; sind beide α -Hydroxyle blockiert und die Molekel damit dem Dihydro-dianthron-Modell ähnlich, so erfolgt eine Sprengung der —C—C—Bindung nur unter schärferen Reduktionsbedingungen. Die Lücke in der Beweiskette der reduktiven Spaltung liess sich also weitgehend schliessen, und damit war für die Sennoside die Formel (VII) vom Typ des Dihydro-dianthrons (10,10'-Bianthronyl) und die reduktive Spaltung nach folgendem Schema sehr wahrscheinlich gemacht.



C. Die Meso-Verbindungen.

Der endgültige Beweis für die —C—C—Bindung war erbracht, als es gelang, kristallisierte Derivate herzustellen, bei denen beide meso-Sauerstoffe Acetylgruppen tragen. Damit war jede Möglichkeit einer Ätherbindung zwischen den beiden Hälften der Sennosidmolekel ausgeschlossen.

Mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von etwas Schwefelsäure gewonnene Tetra-acetyl-Produkte der Sennidine sind bereits in der 5. Mitteilung (loc. cit.) beschrieben worden; die vier Acetylgruppen

¹⁾ 4. Mitteilung, l. c.

²⁾ 5. Mitteilung, l. c.

³⁾ K. Zahn, B. 67, 2063 (1934).

besetzen die vier α -Stellungen, während die meso-Sauerstoffatome nicht reagiert haben. Beim Umsatz der Sennidine und ebenso auch der Tetra-acetyl-sennidine mit Essigsäureanhydrid in Pyridin dagegen bildete sich eine Hexa-acetyl-Verbindung, indem offenbar unter der Einwirkung des Pyridins eine Enolisierung und damit die Acetylierung der entstandenen meso-Hydroxyle eintrat. Auch in diesem Fall konnte Analogie zum Verhalten von Dihydro-dianthron festgestellt werden, denn dieses lässt sich in Essigsäureanhydrid/Schwefelsäure ebenfalls nicht acetylieren, dagegen gelingt die Acetylierung zum Dianthranol-diacetat beim Umsatz mit Essigsäureanhydrid in siedendem Pyridin.

Die Bildung der Hexa-acetyl-Verbindung der Sennidine ist also mit einer Umwandlung des chinoiden in das benzoide Ringsystem verknüpft, was mit einer stark gesteigerten Fluoreszenz und vermehrter Sauerstoffempfindlichkeit einhergeht. Durch Verestern der Carboxylgruppen kann die Stabilität allerdings beträchtlich erhöht werden.

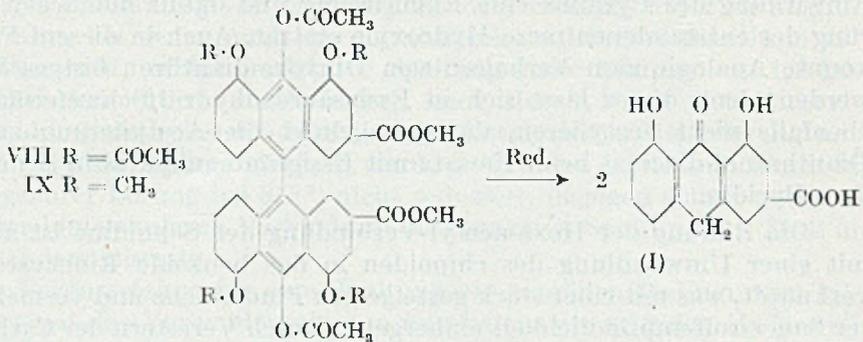
Die Hexa-acetyl-Verbindungen aus Sennidin A und aus Sennidin B erwiesen sich übrigens als identisch. Diese für die Konstitutionsaufklärung wichtige Feststellung versuchten wir noch an einem weiteren Sennidinderivat zu erhärten, indem wir die meso-Diacetylverbindung der Tetra-methyl-sennidin-dimethylester¹⁾ herstellten. Unter üblichen Bedingungen trat keine Reaktion ein, ganz in Übereinstimmung mit vergeblichen Acetylierungsversuchen, die *Perkin*²⁾ mit Tetramethoxy-dihydro-dianthron unternahm. Erst durch vielstündiges Erhitzen der Substanz in einem Pyridin-Essigsäureanhydrid-Gemisch gelang es uns schliesslich, die durch die α -Methoxygruppen offenbar stark erschwerte Enolisierung zu erzwingen und damit wenigstens einen Teil des Ausgangsmaterials in die meso-Diacetylverbindung zu verwandeln. Der Tetramethyl-9,9'-diacetyl-sennidin-dimethylester aus Sennidin A, wie auch die entsprechende Verbindung aus Sennidin B, die im ultravioletten Licht wiederum grelle Fluoreszenz zeigten, erwiesen sich in allen ihren Eigenschaften als identisch.

Wir prüften nun das Verhalten dieser meso-Acetylverbindungen gegenüber Reduktionsmitteln und fanden sie erwartungsgemäss völlig stabil gegenüber katalytisch erregtem Wasserstoff, Natriumdithionit und auch gegenüber Zink in Eisessig. Erst unter den scharfen Bedingungen der Reduktion nach *Perkin* (loc. cit.) zerfielen diese benzoide Verbindungen unter gleichzeitiger Spaltung aller Ester- und Äthergruppen, d. h. sowohl aus dem Hexa-acetyl-sennidin-dimethylester (VIII) als auch aus dem Tetramethyl-meso-diacetyl-sennidin-dimethylester (IX) entstand unsubstituiertes Rheinanthron. Die Parallelität mit dem Verhalten der Modells substanz ist auch bei dieser

¹⁾ 4. Mitteilung, l. c.

²⁾ *G. F. Attree & A. G. Perkin, Soc. 1931, 144.*

Reaktion eine vollständige, wird doch Dianthranol-diacetat durch Zink in Eisessig ebenfalls nicht angegriffen, wohl aber bei der Reduktion nach *Perkin*, bei der sich unter entsprechender Eliminierung der meso-Acetylgruppen das einfache Anthron bildet.



D. Die Stellung des Anthronsauerstoffs.

Unseres Wissens sind bisher weder 9- noch 10-Anthrone des Rheins in der Literatur beschrieben worden. Die Reduktion eines Oxyanthrachinons zum Anthron wird wohl am häufigsten mit Zink in Eisessig vorgenommen, lässt sich aber auch mit einer Reihe anderer Reduktionsmittel durchführen. Ob dabei der Sauerstoff jeweils in 9- oder in 10-Stellung entfernt wird, muss von Fall zu Fall zu entscheiden versucht werden.

Nun haben *A. G. Perkin* und Mitarbeiter in einer Reihe von Arbeiten¹⁾ gezeigt, dass sich bei der Reduktion von α -Oxy-anthrachinonen unter bestimmten Bedingungen die Reduktion so steuern lässt, dass wahlweise 9- oder 10-Anthrone erhalten werden. Nach *Perkin* bildet jede freie α -Oxygruppe mit dem benachbarten Keto-Sauerstoff einen Chelatring und schützt ihn dadurch vor der Einwirkung des Reduktionsmittels, d. h. es wird das der α -Oxygruppe entferntere liegende Sauerstoffatom herausreduziert. Wird nun aber das α -Hydroxyl durch Acetylierung verschlossen und damit die Chelatbildung verunmöglicht, so fällt der Reduktionsschutz weg. In diesem Falle wird der Sauerstoff, welcher der acetylierten Hydroxylgruppe benachbart ist, herausreduziert, unter gleichzeitiger Abspaltung der Acetylgruppe, wobei das isomere unsubstituierte Anthron entsteht. Die Reduktion von Rhein, d. h. 1,8-Dioxy-anthrachinon-3-carbonsäure musste also unter den von *Perkin* angegebenen Bedingungen ein 9-Anthron (I), die Reduktion von Diacetylrhein ein 10-Anthron (II) liefern. Es wurden tatsächlich zwei verschiedene Anthrone erhalten, die wir als Triacetyl-methylester charakterisierten. Das 9-Anthron sowie der daraus hergestellte 1,8,9-Triacetoxy-anthracen-3-carbonsäure-methyl-

¹⁾ z. B. Soc. 1930, 292.

ester (IV) erwiesen sich mit den aus den Sennosiden erhaltenen entsprechenden Verbindungen identisch, womit die Formel (VII) der Sennoside und aller davon abgeleiteten Verbindungen bestätigt ist.

Es schien uns angezeigt, die Konstitution der beiden erhaltenen Rhein-anthrone noch auf einem andern Wege zu überprüfen. Bekanntlich lassen sich α -Oxyanthrachinone nur schwer alkylieren. *C. Graebe*¹⁾ hat gezeigt, dass diese Erschwerung durch die benachbarte meso-Ketogruppe bedingt ist; wird durch Reduktion zum Anthron ein meso-Sauerstoff entfernt, so lassen sich die α -Hydroxyle, sofern sie nicht dem zweiten meso-Sauerstoff benachbart sind, mit Dimethylsulfat und Alkali glatt methylieren. Wir haben bereits früher gezeigt²⁾, dass sich die Sennidine in Dioxanlösung mit einem grossen Überschuss von Diazomethan trotz der benachbarten Ketogruppe in α -Stellung methylieren lassen, doch war anzunehmen, dass unter gleichen Bedingungen bei den einfachen Anthronen des Rheins die von *Graebe* festgestellte Erschwerung der Alkylierung durch die benachbarte Ketogruppe stärker in Erscheinung treten werde. Das 9-Anthron (I) sollte sich also schwerer methylieren lassen als das entsprechende 10-Anthron (II). Die unter gleichen Bedingungen durchgeführte Alkylierung der beiden Anthrone mit Diazomethan in Dioxan lieferte in beiden Fällen ein Gemisch verschiedener Alkylierungsstufen, aus denen sich nach der mit Chromsäure in Eisessig durchgeführten Oxydation mit Hilfe der chromatographischen Adsorptionsanalyse sowohl 1,8-Dimethyl-rhein-methylester als auch 1-Methyl-rhein-methylester isolieren liessen. Aus 10-Anthron wurde in wiederholten Versuchen regelmässig drei- bis viermal mehr Dimethylverbindung isoliert als aus 9-Anthron, was mit unserer Annahme im Einklang steht.

E. Die Beziehung zwischen Sennosid A und Sennosid B.

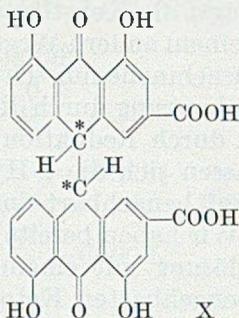
Noch ungeklärt blieb schliesslich die Frage, inwiefern sich Sennosid A und Sennosid B voneinander unterscheiden. Ein Vergleich von Derivaten der beiden Glucoside zeigt, dass sie in ihren Eigenschaften, z. B. im Aussehen, in der Löslichkeit, in der Lage des Schmelzpunktes, in der Haltbarkeit usw. sehr ähnlich sind. Ein exakter Vergleich aber lässt doch unverkennbare Unterschiede hervortreten, indem die B-Verbindungen z. B. etwas höher schmelzen, schwerer löslich sind und besser kristallisieren als die entsprechenden A-Derivate. Schmelzpunktsvergleiche sind bei den Sennosiden und ihren Derivaten allerdings nicht sehr aufschlussreich, da es sich nicht um eigentliche Schmelzpunkte, sondern durchwegs um Zersetzungspunkte handelt, deren Höhe von der Geschwindigkeit des Erhitzens beeinflusst wird.

Die Formel X zeigt, dass die Sennidine in 10- und in 10'-Stellung je ein asymmetrisches C-Atom aufweisen und sich somit aus zwei

¹⁾ A. 349, 223 (1906).

²⁾ 4. Mitteilung, I. c.

strukturidentischen asymmetrischen Systemen zusammensetzen. Es sind also theoretisch vier Isomere möglich: eine (+)- und eine (-)-Form, ein Racemat und eine Mesoform.



Eine Untersuchung der Sennidine und ihrer Derivate im polarisierten Licht, die früher nur an einigen Vertretern der besser kristallisierenden B-Reihe vorgenommen worden war, ergab tatsächlich eine stark positive Drehung von Sennidin A und seinen Derivaten, während Sennidin B und seine Abkömmlinge keinerlei Drehung des polarisierten Lichtes aufweisen.

In der chemischen Literatur sind mehrere aus Drogen isolierte Verbindungen, bei denen man Dihydrodianthron-Struktur vermutete, beschrieben, deren Konstitution ebenfalls optische Aktivität erwarten liesse. Als Beispiel sei das Ararobinol genannt, dem *Eder*¹⁾ die Konstitution eines 3,3'-Dimethyl-1,8,1',8'-tetraoxy-10,10'-bianthronyls zuschreibt. Als weiteres Beispiel erwähnen wir den ebenfalls von *Eder*¹⁾ untersuchten „Dehydro-emodin-anthranol-monomethyläther“, die 6,6'-Dimethoxy-Verbindung des Ararobinols. Eine optische Aktivität wurde bei diesen Verbindungen bis jetzt nie festgestellt, wofür folgende Beobachtung vielleicht eine Erklärung liefert: Optische Aktivität wurde von uns erstmals an einem amorphen Sennidin-A-Präparat festgestellt; bei wiederholtem Umkristallisieren aus organischen Lösungsmitteln, wie z. B. Eisessig oder Äther, sinkt der Drehwert rasch, so dass schliesslich optisch inaktive Präparate entstehen. Bei den in der Literatur beschriebenen Derivaten des 10,10'-Bianthronyls handelt es sich um kristallisierte Stoffe; die Möglichkeit ist daher nicht von der Hand zu weisen, dass eben durch das Umkristallisieren ursprünglich optisch aktive Verbindungen racemisiert worden sind.

Unter Berücksichtigung all dieser Überlegungen ist der Unterschied zwischen Sennidin A und Sennidin B rein stereochemisch bedingt; Sennidin A stellt dann die optisch aktive rechtsdrehende Form, Sennidin B die intramolekular kompen-sierte Mesoform dar. Wäre Sennidin B ein Racemat, so müsste

¹⁾ R. Eder & F. Hauser, Arch. Pharm. **263**, 436 (1925).

Sennosid B als Verbindung eines Racemates mit D-Glucose in D-Glucosido-(+)-sennidin (d. h. Sennosid A) und D-Glucosido(-)-sennidin zerlegbar sein. Sennosid B erwies sich aber unter allen bisher geprüften Versuchsbedingungen als einheitlich¹⁾.

In voller Übereinstimmung mit dieser Formulierung steht das Verschwinden der optischen Aktivität bei der reduktiven Spaltung von Sennidin A sowie die Identität der monomolekularen Spaltstücke aus Sennosid A und aus Sennosid B, da mit dem Wegfall der optischen Asymmetrie am C10-Atom nur noch die durch den Zucker bedingte Drehung in Erscheinung tritt. Auch die Identität der Hexa-acetylsennidine A und B (VIII) und diejenige der Tetramethyl-9,9'-diacetyl-sennidine A und B (IX) lässt sich nun zwanglos erklären, indem bei der Umwandlung des chinoiden in das benzoide Ringsystem die Asymmetriezentren verschwinden, so dass A- und B-Derivate identisch werden.

Damit ist es u. W. zum ersten Mal gelungen, in der für Pharmazie und Medizin wichtigen Körperklasse der Anthraglykoside ein optisch aktives Aglykon aufzufinden. Wir halten es wohl für möglich, dass Sennidin A nicht einen Einzelfall, sondern einen Prototyp optisch aktiver Verbindungen mit Dihydro-dianthron-Struktur darstellt.

F. Synthesen.

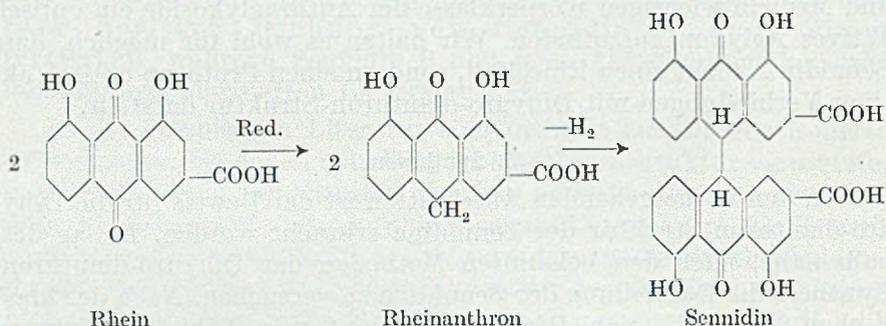
In den vorhergehenden Abschnitten ist der Beweis für die Dihydro-dianthron-Struktur der Sennidine erbracht worden. Es lag deshalb nahe, nach den bekannten Methoden der Dihydro-dianthron-Synthese die Darstellung der Sennidine zu versuchen. Nach der klassischen Vorschrift von *Dimroth*²⁾ gewinnt man Dihydro-dianthron durch milde Oxydation von Anthron mit Eisen(III)-chlorid in Eisessig. Diese Methode versagt häufig³⁾ bei substituierten Anthronen, sei es, dass diese nicht angegriffen werden, sei es, dass die Oxydation bis zu Chinonen fortschreitet. Die Oxydation des 9-Rheinanthrons mit Eisenchlorid gelang wohl, doch lag die Ausbeute an dem als Tetraacetyl-dimethylester isolierten Sennidin unter 10%. Bei der Oxydation des stabileren 1,8-Dimethyl-rheinanthron-methylesters dagegen konnten wir Tetramethyl-sennidin-dimethylester in einer Ausbeute von 50—60% der Theorie gewinnen.

¹⁾ Bei der Aufarbeitung grösserer Mengen von Fabrikations-Mutterlaugen gelang es einmal, eine kleine Menge eines schwach drehenden Glucosids zu isolieren, das bei der Spaltung ein stark linksdrehendes Aglykon lieferte, dessen Tetraacetyl-dimethylester (Smp. 210—215°) den Drehwert $[\alpha]_D^{20} = \text{ca.} -210^\circ$ (in Chloroform) aufwies. Diesem Sennosid lag daher vermutlich das optisch aktive linksdrehende Sennidin zugrunde. Ob das Glucosid schon in der Droge enthalten war oder erst im Laufe der Aufarbeitung durch partielle Racemisierung entstanden ist, kann auf Grund dieser einmaligen Beobachtung nicht entschieden werden.

²⁾ *O. Dimroth*, B. **34**, 219 (1901).

³⁾ Siehe z. B. *Attree & Perkin*, l. c.

Im Bestreben, weitergehende Oxydationen zu verhindern und so die Ausbeute an Dehydrierungsprodukt durch ein genau begrenztes Angebot von Sauerstoff zu steigern, verwendeten wir zur Dehydrierung gasförmigen Sauerstoff in Gegenwart von Palladiumkatalysator. In der gleichen Apparatur, in der wir die reduktive Spaltung der Sennidine mit Wasserstoff und Palladium zum Anthron vorgenommen hatten, führten wir nun die Synthese des unsubstituierten Sennidins aus 9-Rheinanthron mit Sauerstoff in Gegenwart von Palladium durch. Die Lösung des Anthrons in der berechneten Menge Natronlauge nahm dabei begierig Sauerstoff auf; nach Verbrauch von genau einem halben Atom Sauerstoff pro Anthronmolekel trat in der Gasaufnahme ein fast völliger Stillstand ein. Als einziges Dehydrierungsprodukt liess sich alsdann Sennidin als solches oder als Tetra-acetyldimethylester in einer Ausbeute von 60—70% gewinnen. Rhein ist bekanntlich synthetisch zugänglich; somit ist also die Totalsynthese eines Sennidins, natürlich in optisch inaktiver Form, gelungen.



Die katalytische Dehydrierung in überschüssigem Alkali bewirkte den Verbrauch von mehreren Mol Sauerstoff, und als einziges Reaktionsprodukt konnte etwas Rhein nachgewiesen werden. Mit dem Dimethyl-rheinanthron-methylester gelang die katalytische Dehydrierung auch in Eisessiglösung; der Sauerstoffverbrauch betrug 100%, die Ausbeute an kristallisiertem Tetramethyl-sennidin-dimethylester etwa 80% der Theorie.

Auch bei diesen Synthesen liess sich wiederum die völlige Analogie zwischen der Bildung von Dihydro-dianthron und unseren Sennidin-Derivaten feststellen; das unsubstituierte Anthron liefert bei der katalytischen Dehydrierung sowohl in alkalisch-wässriger Lösung als auch in Eisessig in guter Ausbeute Dihydro-dianthron.

Für die Partialsynthese der Sennoside selbst kam eine Dehydrierung mit Eisenchlorid in heissem Eisessig wegen der Gefahr einer Abspaltung des Zuckers nicht in Frage, doch zeigten schon orientierende Versuche mit Kaliumferricyanid in wässrig-alkalischer Lösung oder mit frisch gefälltem Silberoxyd in Dioxan die prinzipielle

Durchführbarkeit einer Rückbildung der Sennoside aus den monomolekularen Spaltstücken. Da die optisch aktive Zuckerkomponente die Möglichkeit einer asymmetrischen Synthese schuf, durfte mit dem Auftreten von optischen Isomeren gerechnet werden.

Die bei den Sennidinen erfolgreiche katalytische Dehydrierung führte auch bei den Glucosiden zum Ziel: unter rascher Aufnahme der berechneten Menge Sauerstoff entstand aus einer alkalischen Lösung von 8-Glucosido-rheinanthron in kurzer Zeit ein Sennosidgemisch, aus dem beim Ansäuern zunächst Sennosid A, später Sennosid B kristallisierte. Diese synthetischen Sennoside stimmten in allen ihren Eigenschaften, also auch im Drehwert, mit den natürlichen, aus Sennadrogen isolierten Sennosiden überein. Das theoretisch ebenfalls zu erwartende D-Glucosido-(—)-sennidin konnte in den Mutterlaugen bis jetzt nicht gefunden werden.

Selbst beim blossen Hindurchsaugen von Luft durch eine alkalische Lösung des Glucosido-rheinanthrons bildeten sich in etwa einer Stunde — leichter in Gegenwart von Pd-Katalysator — Sennosid A und Sennosid B.

Die Möglichkeit, dass die Sennoside in der Pflanze sich im Sinne eines Redox-Systems, d. h. durch Übergang der Dihydro-dianthronglykoside in Anthronglykoside und umgekehrt am Zellstoffwechsel beteiligen, ist daher wohl in Betracht zu ziehen.

Experimenteller Teil.

Übersicht.

I. Die reduktive Spaltung.

1. Die Reduktion der Sennoside.
 - a) mit Natrium-dithionit (präparativ und quantitativ);
 - b) mit Wasserstoff + Palladium;
 - c) Hydrolyse des Spaltproduktes.
2. Die Reduktion der Sennosid-dimethylester.
Darstellung, Reduktive Spaltung, Hydrolyse.
3. Die Reduktion der Sennidine.
4. Die Reduktion von Dihydro-dianthron.
 - a) nach *Perkin*;
 - b) mit Zink/Eisessig.
5. Die Reduktion des 1,1'-Dimethyl-sennidin-dimethylesters.
Darstellung, reduktive Spaltung (H_2/Pd).
6. Die Reduktion des Tetramethyl-sennidin-dimethylesters.
Mit Zink/Eisessig, Acetylierung und Reduktion mit Essigsäure-anhydrid/Zn.
7. Die Reduktion des Tetra-acetyl-sennidin-dimethylesters.

II. Die Meso-Verbindungen.

1. Der Hexa-acetyl-sennidin-dimethylester.
2. Der Tetramethyl-9,9'-diacetyl-sennidin-dimethylester.
3. Die Reduktion der Meso-Verbindungen nach *Perkin*.
 - a) Diacetyl-dianthranol;
 - b) Hexa-acetyl-sennidin-dimethylester;
 - c) Tetramethyl-meso-diacetyl-sennidin-dimethylester.

III. Die Stellung des Anthronsauerstoffs.

1. Die Darstellung von 9-Rheinanthron (I).
2. Die Darstellung von 10-Rheinanthron (II).
3. Die vergleichende Methylierung der Rheinanthrone.

IV. Die optische Aktivität.

V. Die Synthesen.

1. des Sennidins;
2. des Tetramethyl-sennidin-dimethylesters;
3. der Sennoside A und B.
 - a) mit Sauerstoff/Pd;
 - b) mit Luft/Pd;
 - c) mit Luft allein.

I. Die reduktive Spaltung.

1. Die Reduktion der Sennoside.

a) mit Natrium-dithionit: 1,0 g Sennosid A wurde in 20 cm³ 0,1-n. Natriumhydrogencarbonat gelöst, mit 1,0 g Na₂S₂O₄ versetzt und auf dem Dampfbad erhitzt. Zur rot-orangen Lösung gab man nach 10 Minuten erneut 1,0 g Natrium-dithionit, worauf gewöhnlich Kristallisation einsetzte. Man erwärmte weitere 20 Minuten auf dem Dampfbad, kühlte, saugte nach einigen Stunden ab und wusch mit Wasser nach. Das kristallisierte braun-orange 8-Glucosido-rheinanthron (III) wog nach dem Trocknen über Phosphor-pentoxyd 0,8 g.

Die Substanz ist besonders in Lösung gegen Luftsauerstoff empfindlich. Eine befriedigende Umkristallisation gelingt bei genauer Befolgung der nachstehenden Vorschrift. Man löst 0,1 g in 25—30 cm³ Aceton-Wasser (2:1) in der Wärme und destilliert die Hauptmenge des Acetons aus einem Bad von mindestens 80° ohne Vakuum ab, bis spontan Kristallisation eintritt. In kurzer Zeit ist dann das ganze Gefäß mit einem Brei gelbbrauner Nadeln erfüllt. Gelegentlich treten auch dunkelbraune, metallisch glänzende, klotzige hexagonale Prismen auf.

Die Substanz zersetzt sich zwischen 220—250°; sie ist unlöslich in Wasser, Chloroform und Benzol, löslich in Methanol, Äthanol, Aceton, Glykol-monoäthyläther, Dioxan, gut löslich in 70-proz. Aceton, spielend löslich in 70-proz. Dioxan. In neutraler und in saurer Lösung zeigt sie im UV.-Licht grünliche, in Alkali intensiv gelbe Fluoreszenz. Die zunächst hellgelbe alkalische Lösung färbt sich an der Luft schon bei Zimmertemperatur im Verlauf mehrerer Stunden rot.

Wird Sennosid B reduziert, so verläuft die Reaktion analog, und das Endprodukt stimmt in allen seinen Eigenschaften mit dem aus Sennosid A gewonnenen Reduktionsprodukt überein.

Zur Analyse wurde die Substanz im Hochvakuum bei 110° getrocknet.

C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ (432,16)	Ber. C 58,31	H 4,67%
	Gef. „ 58,27; 58,26	„ 5,08; 5,06%

$$[\alpha]_D^{20} = -70^\circ \text{ (c = 0,2 in 70-proz. Dioxan)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = -120^\circ \text{ (c = 0,1 in 70-proz. Aceton)}$$

Quantitative Methode: Wir verwendeten eine Schüttelapparatur mit zwei schwenkbaren Birnen und einer Vorrichtung zur Gasmessung. Da die Reduktion mit Natrium-dithionit für präparative Zwecke bei 100° vorgenommen worden war, musste zunächst festgestellt werden, ob die Reaktion auch bei tieferer Temperatur glatt und rasch genug verlaufe. Es zeigte sich, dass die Reduktion bei 55° schon in 20 Minuten beendet war, so dass sich bei dieser Temperatur in unserer Apparatur bequem arbeiten liess.

In der einen Schüttelbirne wurde überschüssiges Natrium-dithionit in 5-proz. Hydrogencarbonat gelöst, in der anderen die zu reduzierende Substanz, d. h. Sennosid A

oder B, ebenfalls in 5-proz. Hydrogencarbonat. Hierauf wurde die Luft durch Kohlendioxyd verdrängt und die beiden Lösungen bis zur Sättigung mit Kohlendioxyd geschüttelt. Nach der Prüfung der Apparatur auf Gasdichtigkeit bei Zimmertemperatur und 55° wurde der Inhalt der Birnen zusammengegossen und während 20 Minuten bei 55° geschüttelt. Entsprechend der sofort einsetzenden Reaktion entwickelte sich Kohlendioxyd, dessen Volumen nach Ablauf einer Stunde bei Zimmertemperatur gemessen wurde. Dann säuerte man die Reaktionslösung mit Eisessig an und saugte nach einigen Stunden das auskristallisierte Reduktionsprodukt ab, wusch mit Wasser und trocknete über Phosphor-pentoxyd.

Die in 4 Versuchen gewonnenen Ergebnisse sind im folgenden tabellarisch zusammengestellt; es ist zu beachten, dass auf ein Mol verbrauchten Wasserstoffs zwei Mol Kohlendioxyd freigesetzt werden.

Substanz	Gemessenes CO ₂ cm ³ (0°)	H ₂ -Verbrauch Mol	Krist. Red. Prod.	
			mg	% d. Th.
100 mg Sennosid A	5,39	1,04	85	85
200 mg Sennosid A	9,40	0,91	170	85
100 mg Sennosid B	4,77	0,92	80	80
200 mg Sennosid B	9,36	0,90	150	75

Die Sennoside werden somit unter Aufnahme von 1 Mol Wasserstoff in das monomolekulare Anthroglucosid gespalten.

b) mit Wasserstoff + Palladium: In einer Hydrierapparatur wurden 150 cm³ eines Gemisches von Glykol-monoäthyläther und Wasser (1:1) und 200 mg Palladiummohr mit Wasserstoff gesättigt und darauf mit 862 mg (1/1000 Mol) Sennosid A versetzt. Mit fortschreitender Wasserstoffaufnahme ging die Substanz allmählich in Lösung; nach zwei Stunden zeigte die nun völlig klare Lösung eine grüngelbe Fluoreszenz und nach drei Stunden begann die Kristallisation des Reduktionsproduktes. Von da an verlangsamte sich die Gasaufnahme, ohne je ganz zum Stillstand zu kommen. Nach total vier Stunden wurde die Hydrierung unterbrochen, die Kristallsuspension vom Palladium durch Dekantieren abgetrennt und die Kristallisation durch Zugabe von 200 cm³ Wasser vervollständigt. Man erhielt 600 mg goldbraune, kurze hexagonale Prismen; der Wasserstoffverbrauch betrug 1,38 Mol.

Führte man die Hydrierung in 70-proz. Dioxan, in dem sich das Sennosid A von Anfang an klar löste, durch, so erfolgte die Wasserstoffaufnahme viel rascher, doch wurden unter diesen Bedingungen die Nebenreaktionen begünstigt; der Wasserstoffverbrauch stieg bis gegen zwei Mol an, während die Ausbeute an kristallisiertem Spaltprodukt auf 300 bis 400 mg zurückging.

Glatter verlief die Hydrierung beim Sennosid B. Im Versuchsansatz mit 862 mg Sennosid B in 100 cm³ Glykol-monoäthyläther-Wasser (1:1) und 200 mg Palladium nahm die klare Lösung rasch Wasserstoff auf. Schon nach 45 Minuten begann die Kristallisation des Spaltproduktes; nach einer Stunde waren bereits 21 cm³ H₂ verbraucht. Der Versuch wurde nach drei Stunden bei einem totalen Wasserstoffverbrauch von 22,5 cm³ = 1,01 Mol. unterbrochen; die Ausbeute betrug 560 mg.

Noch rascher erfolgte die Wasserstoffaufnahme in 70-proz. Dioxan. Schon nach 5 Minuten waren über 80% der berechneten Menge Wasserstoff aufgenommen, die restlichen 20% nach weiteren 5 Minuten. Wurde der Versuch in diesem Zeitpunkt unterbrochen, so konnte aus der vom Katalysator dekantierten und stark konzentrierten Lösung das kristallisierte Spaltprodukt in einer Ausbeute von 75% gewonnen werden.

c) Hydrolyse des Spaltproduktes: Man löste 200 mg kristallisiertes 8-Glucosido-rheinanthron (III) in 40 cm³ heissem Eisessig, gab 5 cm³ konz. Salzsäure hinzu und hielt die Lösung 30 Minuten im Sieden. Beim Abkühlen kristallisierten 80 mg 1,8-Dioxy-9-oxo-

dihydro-anthracen-3-carbonsäure (I) in braungelben, schief abgeschnittenen Platten. Zersetzung zwischen 250—280°.

Die Substanz löst sich in verdünnter Lauge mit gelber Farbe, die an der Luft schon in der Kälte bald von orange nach rot übergeht, noch rascher in der Hitze.

Acetylierung und Veresterung: Eine Aufschlammung dieses 9-Rheinanthrons (I) in Essigsäureanhydrid ging beim Eintauchen eines mit konz. Schwefelsäure benetzten Glasstabes rasch in Lösung. Nach 12 Stunden wurde mit Wasser versetzt, der ausfallende Niederschlag abgenutscht und gründlich mit Wasser gewaschen. Die Triacetylverbindung zeigte im UV.-Licht die den Anthranolderivaten eigene starke Fluoreszenz.

Zum Verestern löste man den getrockneten Niederschlag in Aceton und versetzte mit ätherischem Diazomethan, dampfte nach 12 Stunden zur Trockne ein, nahm in wenig Chloroform auf, verdünnte mit Methanol und engte vorsichtig bis zur beginnenden Kristallisation ein. Die schweren, gelben Polyeder fluoreszieren in Lösung grell blau und schmelzen bei 220—222° unter Zersetzung.

Der 1,8,9-Triacetoxy-anthracen-3-carbonsäure-methylester (IV) wurde zur Analyse bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{22}H_{18}O_8$	Ber. C 64,38	H 4,42	CH_3CO 31,46	CH_3O 7,56%
(+10,14)	Gef. „ 64,74	„ 4,48	„ 31,20	„ 7,66%

Molekulargewicht gef. 405 (in Chloroform, vgl. 4. Mitt., l. c.)

2. Die Reduktion der Sennosid-dimethylester.

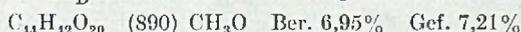
Darstellung des Sennosid-A-dimethylesters: 1,0 g Decaacetyl-sennosid-A-dimethylester (s. 4. Mitt.) in 10 cm³ Methanol aufgeschlammmt und mit 9 cm³ (ber. 7,6 cm³) methanolischer n.KOH in Lösung gebracht, blieben über Nacht stehen. Nach Zusatz von 9 cm³ 2-n. Salzsäure schied sich das entacetylierte Produkt kristallin ab. Es wurde abgesaugt, mit Wasser, Alkohol und Chloroform gewaschen (645 mg, ber. 685 mg), in Aceton-Wasser (2:1) heiss gelöst und mit Wasser bis zum Mischungsverhältnis 1:1 versetzt, worauf der Sennosid-A-dimethylester in leuchtend gelben Platten vom Smp. 206 bis 208° kristallisierte.

$$[\alpha]_D^{20} = -90^\circ \quad (c = 0,2 \text{ in } 70\text{-proz. Dioxan})$$



Darstellung des Sennosid-B-dimethylesters: Durch Entacetylierung des Deca-acetyl-sennosid-B-dimethylesters konnte diese Verbindung in analoger Weise gewonnen werden. Das aus Aceton-Wasser in flachen Prismen kristallisierende Produkt zeigte einen Smp. von 196—198°.

$$[\alpha]_D^{20} = -48^\circ \quad (c = 0,2 \text{ in } 70\text{-proz. Dioxan})$$



Reduktive Spaltung: Eine Lösung von 200 mg Sennosid-A-dimethylester in 6 cm³ 70-proz. Dioxan wurde mit 200 mg Natrium-dithionit in 2 cm³ Wasser versetzt. Nach wenigen Minuten begann die Kristallisation des Spaltproduktes. Man fügte nochmals 200 mg Natrium-dithionit hinzu und hielt die Mischung im ganzen 10 Minuten bei 70°, kühlte dann ab und wusch die ausgeschiedenen goldbraunen Kristalle mit Wasser und anschließend mit Aceton. Ausbeute 90% der Theorie. Der Schmelzpunkt der frisch aus wässrigem Aceton umkristallisierten Substanz lag bei 208—210°; die Molekulargewichtsbestimmung in 90-proz. Dioxan ergab einen Wert von 468 (ber. 446; vgl. 4. Mitt., l. c.).

$$[\alpha]_D^{20} = -170^\circ \quad (c = 0,1 \text{ in } 70\text{-proz. Aceton})$$

$$[\alpha]_D^{20} = -104^\circ \quad (c = 0,2 \text{ in } 70\text{-proz. Dioxan})$$

Die Reduktion des Sennosid-B-dimethylesters lieferte unter gleichen Bedingungen in ähnlicher Ausbeute ein Kristallinat, das in allen seinen Eigenschaften, z. B. Schmelzpunkt, Löslichkeit, Drehwert und Molekulargewicht mit dem aus dem A-Derivat gewonnenen S-Glucosido-rheinanthron-methylester übereinstimmte.

Hydrolyse des Spaltproduktes: Wir lösten 200 mg des Methylresters in 10 cm³ Wasser und etwas Natronlauge, gaben 5 cm³ konz. Salzsäure hinzu und erhitzen zur Abspaltung des Zuckers 20 Minuten auf dem Dampfbad. Das ausgeschiedene Aglykon, der 1,8-Dioxy-9-oxo-dihydro-anthracen-3-carbonsäuremethylrest, kristallisierte aus Chloroform-Methanol in hellgelben, flachen, parallel schief abgeschnittenen Prismen vom Smp. 188—191°.

In Natronlauge zeigte der Ester infolge Enolisierung der 9-Oxogruppe die Eigenschaften eines Anthranols, indem die im ersten Moment hellgelbe Lösung bei ruhigem Stehen durch den Luftsauerstoff von der Oberfläche her oxydiert und damit rot gefärbt wurde; beim Umschütteln oder Erhitzen trat die Rotfärbung sofort auf. In neutraler Lösung wies die Verbindung im Lichte der Quarzlampe kaum Fluoreszenz auf; es lag also, wie erwartet, ein Anthron vor. Bei der Acetylierung in Pyridin/Essigsäureanhydrid bei Zimmertemperatur entstand der bereits beschriebene, stark fluoreszierende 1,8,9-Triacetoxy-anthracen-3-carbonsäure-methylrest (IV).

3. Die Reduktion der Sennidine.

200 mg Sennidin A oder B wurden in Wasser suspendiert und mit möglichst wenig n. Natronlauge in Lösung gebracht. Zu der gelbbraunen Lösung trug man unter gleichzeitiger Erwärmung auf dem Dampfbad in 30 Minuten 400 mg Natrium-dithionit in mehreren Portionen ein. Nach dem Erkalten wurde der entstandene gelbbraune Niederschlag abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen, in 60 cm³ siedendem 90-proz. Aceton gelöst und die filtrierte Lösung bei geringem Unterdruck auf 10 cm³ konzentriert. Das Reduktionsprodukt kristallisierte in braungelben, schief abgeschnittenen Platten in einer Ausbeute von 130 mg. Aus Essigester oder Eisessig wurden Kristalle gleicher Art vom Zersetzungsbereich 250—280° erhalten.

Die Identität mit 9-Rheinanthron (I) wurde in üblicher Weise durch Überführung in den 1,8,9-Triacetoxyanthracen-3-carbonsäuremethylrest (IV) bewiesen.

4. Die Reduktion des Dihydro-dianthrone.

a) Nach Perkin¹⁾: Zu 200 mg fein gepulvertem Dihydro-dianthron in 15 cm³ siedendem Eisessig gab man 5 cm³ einer 40-proz. Lösung von Zinnchlorür in Salzsäure und hielt das Gemisch während einer Stunde in gelindem Sieden (Steigrohr, Ölbad 145°). Das Dihydro-dianthron ging dabei bis auf einen kleinen Rest in Lösung. Nun fügte man 20 cm³ Wasser hinzu und kühlte ab, worauf Kristallisation eintrat. Die abfiltrierten Kristalle wurden in Chloroform aufgenommen, diese schwach trübe Lösung durch Filtration geklärt, eingengt und mit Methanol versetzt, worauf das monomolekulare Anthron vom Smp. 151—153° in einer Ausbeute von 60—70% auskristallisierte. Zur weiteren Charakterisierung führten wir das Anthron in üblicher Weise mit Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure in das bekannte Acetylanthranol vom Smp. 131—132° über.

b) Mit Zink/Eisessig: Setzte man Dihydro-dianthron während kurzer Zeit der Einwirkung von Zink in siedendem Eisessig aus, so wurde das Dihydro-dianthron teilweise verändert und es entstand ein Gemisch verschiedener Substanzen, aus dem sich, abgesehen von etwas Ausgangsmaterial, kein einheitliches Produkt gewinnen liess. Bei längerer Versuchsdauer dagegen wurde Anthracen gebildet.

Wir erhitzen nun 500 mg reinstes Dihydro-dianthron in 50 cm³ Eisessig mit 200 mg Zinkpulver und hielten das Gemisch während 3—4 Stunden in gelindem Sieden, wobei wir stündlich frisches Zink zusetzten. Nach dem Eindampfen der Lösung zur Trockne nahm man den Rückstand in Chloroform auf und chromatographierte die mit Wasser gewaschene Lösung an einer Aluminiumoxydsäule. Aus der im UV.-Licht grell blau fluoreszierenden Spitzenfraktion liess sich reines Anthracen in einer Ausbeute von ca. 30% der Theorie kristallisieren. Die bei 120° und 12 mm sublimierte Substanz zeigte im Misch-Schmelzpunkt mit frisch sublimiertem Anthracen keinerlei Depression (Smp. 213—214°).

¹⁾ E. J. Cross & A. G. Perkin, Soc. 1930, 292.

5. Die Reduktion des 1,1'-Dimethyl-sennidin-dimethylesters.

Darstellung des Sennidin-Derivates: Aus dem bereits früher¹⁾ beschriebenen Dimethyl-sennosid-B-dimethylester liess sich das Aglykon in gut kristallisierter Form wie folgt gewinnen: Man löste 1,0 g des kristallisierten Sennosid-Derivates in 10 cm³ Wasser, gab 10 cm³ 8-n. Schwefelsäure hinzu und erhitzte die Lösung auf dem Dampfbad. Nach kurzer Zeit begann die Abscheidung des orange gefärbten Aglykons, das nach einer Stunde abgenutscht und mit Wasser gründlich gewaschen wurde. Den Niederschlag löste man in 100 cm³ siedendem Aceton, filtrierte von einem schwer löslichen Nebenprodukt ab und engte das klare Filtrat auf ca. 10 cm³ ein, worauf der 1,1'-Dimethyl-sennidin-B-dimethylester in leuchtend gelben Prismen kristallisierte. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus Aceton schmolz er bei 183—185°.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 70° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{31}H_{20}O_{10}$	Ber. C 68,68	H 4,41	CH_3O 20,86%
(594,2)	Gef. „ 68,74; 68,96	„ 4,99; 4,81	„ 19,70; 19,50%

Die Oxydation dieses Aglykons mit Chromsäure in Eisessig führte, analog der bereits früher beschriebenen Oxydation des entsprechenden Glucosids (vgl. 5. Mitt.) zum 1-Methoxy-8-oxo-anthrachinon-3-carbonsäuremethylester, die Oxydation mit Chromsäure in Essigsäureanhydrid zum entsprechenden 8-Acetylderivat.

Reduktive Spaltung: In Vorversuchen wurde der Dimethyl-sennidin-dimethylester in verschiedenen Lösungsmitteln der katalytischen Reduktion mit Palladium unterworfen. Der Wasserstoffverbrauch sank jedesmal nach Aufnahme von 1 Mol beträchtlich ab, was sich in einem deutlichen Knick in der Hydrierungskurve zeigte. Zum Stillstand kam die Hydrierung indessen erst nach Aufnahme von 2 bis 3 Mol Wasserstoff. Neben der reduktiven Spaltung, für die 1 Mol H₂ verbraucht wurde, liefen somit noch andere Reduktionsvorgänge, was sich bei der Isolierung des Spaltproduktes erschwerend auswirkte; wir haben daher im folgenden Versuch die Reduktion nach der Aufnahme von 1 Mol H₂ unterbrochen.

200 mg Dimethyl-sennidin-B-dimethylester löste man in 15 cm³ reinem, mit Wasserstoff und 100 mg Palladium vorbehandeltem Dioxan und schüttelte bis zur Aufnahme von genau 1 Mol Wasserstoff. Die vom Katalysator abgegossene Lösung dampfte man zur Trockne und acetylierte den Rückstand in 4 cm³ Pyridin mit 2 cm³ Essigsäureanhydrid, da das Spaltprodukt als solches sich nur schwer kristallisieren liess. Nach 12 Stunden nahm man das zur Trockne eingedampfte Acetylierungsprodukt in Chloroform auf und kristallisierte es aus Chloroform-Methanol. Wir erhielten auf diesem Wege den monomolekularen 1-Methoxy-8,9-diacetoxy-anthracen-3-carbonsäuremethylester in gelben Prismen vom Smp. 214—216°. Die in Chloroform gelöste Substanz zeigte im UV.-Licht grell blaue Fluoreszenz.

Zur Analyse wurde die Verbindung bei 70° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{21}H_{18}O_7$	Ber. C 65,94	H 4,74	CH_3O 16,23	CH_3CO 22,51%
(382)	Gef. „ 66,03; 65,82	„ 4,56; 4,90	„ 16,12	„ 21,71%

Die Oxydation mit Chromsäure in Eisessig lieferte den bereits in der 5. Mitteilung dieser Reihe beschriebenen 1-Methoxy-8-acetoxy-anthrachinon-3-carbonsäuremethylester.

6. Die Reduktion des Tetramethyl-sennidin-dimethylesters.

Mit Zink/Eisessig: Eine Lösung von 500 mg Tetramethyl-sennidin-B-dimethylester (vgl. 4. Mitt.) in 15 cm³ Eisessig hielten wir mit etwas Zinkpulver während 40 Minuten in einem Ölbad von 135—140° im Sieden. Die klare, gelbe Lösung wurde nun im Vakuum zur Trockne eingedampft, mit Wasser digeriert und in Chloroform aufgenommen. Nach dem Trocknen der Lösung mit CaCl₂ wurde sie stark eingengt und mit Methanol versetzt, worauf in 70-proz. Ausbeute der monomolekulare 1,8-Dimethoxy-9-oxo-dihydro-

¹⁾ 4. Mitt., l. c. S. 227.

anthracen-3-carbonsäure-methylester in langen, goldgelben Prismen kristallisierte. Gelegentlich erhielten wir die Substanz auch in ockergelben Blättchen. Ihr Schmelzpunkt lag bei 201—202°.

Entsprechend verlief die reduktive Spaltung des Tetramethyl-sennidin-A-dimethylesters; es entstand das identische Spaltprodukt vom Smp. 201—202°.

Zur Analyse trockneten wir die Substanz im Hochvakuum bei 80°.

$C_{18}H_{16}O_5$ (312) Ber. C 69,21 H 5,16% Gef. C 69,00 H 5,31%

Zum Beweis der Konstitution dieser Verbindung wurden folgende Versuche durchgeführt:

Oxydation: Erhitzte man die Substanz in üblicher Weise mit Chromsäure in Eisessig und reinigte das in Chloroform übergeführte Oxydationsprodukt mit Hilfe einer kurzen Säule von Aluminiumoxyd, so erhielt man in guter Ausbeute 1,8-Dimethyl-rhein-methylester (vgl. 5. Mitt.) vom Smp. 206—207°.

Acetylierung: 200 mg der vorstehend beschriebenen Anthronverbindung wurden in einer Mischung von 3 cm³ Pyridin und 2 cm³ Essigsäureanhydrid während zwei Stunden bei 70° und anschliessend über Nacht bei Zimmertemperatur gehalten, völlig zur Trockne verdampft, in Chloroform aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Aus der getrockneten und stark eingeeengten Chloroformlösung kristallisierten auf Zugabe von Methanol 200 mg 1,8-Dimethoxy-9-acetoxy-anthracen-3-carbonsäure-methylester in gelben Polyedern, aus Aceton in hexagonalen Platten, vom Smp. 205—206° aus.

Zur Analyse wurde die Substanz im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$C_{20}H_{18}O_6$ Ber. C 67,78 H 5,11 CH_3CO 12,15 CH_3O 26,27%
Gef. „ 67,50 „ 5,47 „ 11,50 „ 26,64%

Acetylierung und Reduktion mit Essigsäureanhydrid/Zn. Die 9-Acetylverbindung konnte auch direkt bei der mit einer Reduktion einhergehenden Acetylierung der bimolekularen Verbindung mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Zink erhalten werden. Zu diesem Zwecke wurden 100 mg Tetramethyl-sennidin-B-dimethylester in 3 cm³ Essigsäureanhydrid mit Zink in einem Ölbad bei 155° in gelindem Sieden gehalten, wobei die Substanz langsam in Lösung ging. Nach einer Stunde dampfte man zur Trockne, behandelte den Rückstand mit Chloroform und Wasser und dampfte die gewaschene und getrocknete Chloroformlösung auf ein kleines Volumen ein. Auf Zugabe von Methanol kristallisierte die 9-Acetylverbindung vom Smp. 205—206° aus.

Ihre Oxydation führte zum bereits früher beschriebenen Dimethyl-rhein-methylester vom Smp. 206—207°. Ein Misch-Schmelzpunkt des Ausgangsmaterials (206°) mit dem Oxydationsprodukt (207°) ergab eine Depression von 20°.

7. Die Reduktion des Tetra-acetyl-sennidin-dimethylesters.

Man löste 500 mg Tetra-acetyl-sennidin-dimethylester (A oder B) in 15 cm³ siedendem Eisessig am Rückfluss, gab 200 mg Zinkpulver hinzu und hielt die Mischung im Ölbad bei 140—150° während 40 Minuten im Sieden. Die heisse Eisessiglösung wurde von Zink abfiltriert, zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und der beim Eindampfen der gewaschenen und getrockneten Chloroformlösung im Vakuum erhaltene Rückstand aus Chloroform-Methanol kristallisiert; Ausbeute 250 mg. Nach wiederholtem Umkristallisieren lag der Schmelzpunkt des in glänzenden, malsgelben Blättchen kristallisierenden 1,8-Diacetyl-rheinanthron-methylesters (1,8-Diacetoxy-9-oxo-dihydro-anthracen-3-carbonsäuremethylester) etwas unscharf bei 194—197°.

Seine Konstitution wurde bewiesen einerseits durch Oxydation mit Chromsäure in Eisessig, die zum 1,8-Diacetyl-rhein-methylester führte, andererseits durch schonende Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin, die den bereits beschriebenen 1,8,9-Triacetoxy-anthracen-3-carbonsäuremethylester vom Smp. 220—222° lieferte.

II. Die Meso-Verbindungen.

1. Der Hexa-acetyl-sennidin-dimethylester.

1,0 g Sennidin A liess man mit 6 cm³ Pyridin und 3 cm³ Essigsäureanhydrid während 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und dampfte hierauf die Lösung im Vakuum völlig zur Trockne. Beim Aufnehmen des Rückstandes in 5 cm³ Dioxan trat spontan Kristallisation ein. Die grüngelben Kristalle wurden abgentscht, mit wenig Dioxan und Äther gewaschen und aus wenig Dioxan umkristallisiert. So erhielt man in einer Ausbeute von etwa 70% Hexa-acetyl-sennidin in schweren kanariengelben Platten, die auch in fester Form im UV.-Licht gelbgrüne Fluoreszenz zeigten. Aus den Mutterlauge liess sich auch etwas Tetra-acetyl-sennidin gewinnen. Die Substanz ist sauerstoffempfindlich und wurde deshalb in evakuierten Ampullen aufbewahrt.

Zur Erhöhung ihrer Stabilität veresterten wir sie, indem wir sie in Dioxan lösten und mit einer Lösung von Diazomethan in Dioxan versetzten. Schon nach wenigen Minuten begann die Kristallisation des Esters. Man dampfte nach einer halben Stunde zur Trockne, nahm den Rückstand in Chloroform auf, filtrierte mit etwas Tierkohle und versetzte die eingeeengte Lösung mit Methanol, worauf der Hexa-acetyl-sennidin-dimethylester in kanariengelben, hexagonalen Platten kristallisierte. Die Kristalle bräunten sich beim Erhitzen von 255° an, wurden bei etwa 280° schwarz und flossen bei 302—303° zusammen.

Verwendeten wir als Ausgangsmaterial Sennidin B, so stimmte der daraus erhaltene Hexa-acetyl-sennidin-dimethylester in allen seinen Eigenschaften mit dem aus Sennidin A gewonnenen Präparat überein. Damit war erstmals ein identisches binokulares Derivat aus den beiden Sennidinen gewonnen.

Die in Chloroform durchgeführte Molekulargewichtsbestimmung (vgl. 4. Mitt.) ergab einen Wert von 827 (ber. 818).

Zur Analyse wurde die Substanz im Hochvakuum bei 70° getrocknet.

C ₄₄ H ₃₁ O ₁₈	Ber. C 64,50	H 4,19	CH ₃ CO 31,52	CH ₃ O 7,93%
	Gef. „ 64,43	„ 4,41	„ 31,43	„ 8,22%

Der gleiche Hexa-acetyl-sennidin-dimethylester entstand in glatter Reaktion beim Erhitzen von Tetra-acetyl-sennidin-dimethylester mit Essigsäureanhydrid in Pyridin, wobei das zunächst dunkel gefärbte rohe Acetylierungsprodukt zur Reinigung in Chloroformlösung durch eine 1 cm hohe Schicht Aluminiumoxyd filtriert wurde.

2. Der Tetramethyl-9,9'-diacetyl-sennidin-dimethylester.

1,0 g fein gepulverter Tetramethyl-sennidin-A-dimethylester wurde in einer Mischung von 20 cm³ Pyridin und 10 cm³ Essigsäureanhydrid während 6 Stunden unter Stickstoff am Rückfluss im Sieden gehalten, wobei der grösste Teil der Substanz langsam in Lösung ging. Nach dem Abkühlen wurde von einer geringen Menge ungelöstem Ausgangsmaterial abfiltriert, das Filtrat zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit alkoholfreiem Chloroform, das Nebenprodukte herauslöste, behandelt. Die aus der 9,9'-Diacetylverbindung bestehende Hauptmenge (60—70%) der Substanz blieb ungelöst. In einem siedenden Gemisch von 90 Vol.-Proz. Chloroform und 10 Vol.-Proz. Methanol liess sich die meso-Diacetylverbindung in Lösung bringen und kristallisierte daraus beim Einengen und nach Zugabe von Methanol in grell gelb leuchtenden, schief abgeschnittenen Prismen, die sich ab 310° verfärbten, gegen 335° sinterten und bei 338—340° schwarz zusammenflossen.

Tetramethyl-sennidin-B-dimethylester löste sich in Pyridin-Essigsäureanhydrid noch viel schwerer und lieferte dementsprechend geringere Ausbeuten an meso-Diacetylverbindung. So wurden nach sechsständigem Erhitzen aus dem Acetylierungsansatz noch gegen 60% unverändertes Ausgangsmaterial zurückgewonnen, während aus dem zur Trockne eingedampften Filtrat in einer Ausbeute von etwa 20% der Tetramethyl-meso-diacetyl-sennidin-dimethylester gewonnen werden konnte. Er stimmte in allen seinen Eigenschaften mit dem aus Tetramethyl-sennidin-A-dimethylester erhaltenen Produkt überein.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 90° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{40}H_{31}O_{12}$ (706,3) Ber. CH_3CO 12,18 CH_3O 26,33% Gef. CH_3CO 11,28 CH_2O 26,07%

Die Bestimmung des Molekulargewichtes in einem Lösungsmittelgemisch von 90 Vol.-Proz. Chloroform + 10 Vol.-Proz. Methanol (vgl. 4. Mitt.) ergab einen Wert von 703 (ber. 706).

3. Die Reduktion der Meso-Verbindungen nach Perkin.

a) Diacetyl-dianthranol: 100 mg Diacetyl-dianthranol vom Smp. 270° löste man in 3 cm³ Eisessig und versetzte mit 2 cm³ einer 40-proz. Zinnchlorürlösung in konz. Salzsäure. Der zunächst ausfallende Kristallbrei ging innert 15 Minuten wieder in Lösung. Nach einstündigem Sieden am Rückfluss wurde mit 1 cm³ Wasser versetzt, worauf monomolekulares Anthron vom Smp. 152—154° auskristallisierte. Die reduktive Spaltung erfolgte somit unter Eliminierung der meso-Acetylgruppen.

b) Hexa-acetyl-sennidin-dimethylester: In gleicher Weise liess man auf 200 mg Hexa-acetyl-ester in 3 cm³ Eisessig 2 cm³ Zinnchlorür-Salzsäure einwirken. Die beim Abkühlen ausfallende Substanz löste sich recht schwer in Chloroform, leichter dagegen in Aceton, Essigester oder Eisessig. Offenbar war unter den angewandten Bedingungen nicht nur reduktive Spaltung, sondern auch noch Entacetylierung und Verseifung eingetreten. Wir dampften deshalb die Reaktionslösung gesamthaft zur Trockne ein, acetylierten den Rückstand erneut mit Pyridin-Essigsäureanhydrid und veresterten mit Diazomethan in Dioxan. Auf Zusatz von Methanol zu einer konz. Lösung in Chloroform kristallisierte in guter Ausbeute der 1,8,9-Triacetoxy-anthracen-3-carbonsäuremethylester (IV).

c) Tetramethyl-9,9'-diacetyl-sennidin-dimethylester: Bei der Reduktion von 200 mg dieses meso-Acetates in 6 cm³ Eisessig + 4 cm³ Zinnchlorürlösung während einer Stunde bei 150° trat gleichzeitig Spaltung aller Äther- und Estergruppen ein. Das beim Abkühlen ausfallende Reduktionsprodukt war somit identisch mit dem aus Hexa-acetat-ester erhaltenen Rheinanthron (I), was auch in diesem Fall durch Überführung in den Triacetoxy-ester IV gezeigt wurde.

III. Die Stellung des Anthronsauerstoffs.

1. Die Darstellung des 9-Rheinanthrons (I).

Man löste 1,0 g Rhein in 200 cm³ siedendem Eisessig, versetzte mit 35 cm³ einer 40-proz. Lösung von SnCl₂ in konz. Salzsäure und hielt die Mischung während zwei Stunden am Rückfluss im Sieden. Im Verlauf einiger Stunden kristallisierte das Anthron in grossen glänzenden Blättchen (700 mg) von tief weinroter Farbe aus. Durch Umkristallisieren aus Eisessig, Aceton oder aus Essigester unter Zusatz von Tierkohle konnte die offenbar vom Reduktionsmittel herrührende rote Färbung beseitigt werden, und man erhielt das 9-Rheinanthron in parallel schief abgeschnittenen Prismen von ockergelber Farbe. Die Substanz zersetzte sich unter teilweisem Zerfliessen zwischen 260 und 280°.

Zur Identifizierung stellten wir auf bereits beschriebenem Wege den 1,8,9-Triacetoxy-anthracen-3-carbonsäuremethylester (IV) her.

Recht bequem lässt sich das 9-Rheinanthron aus den Sennosiden direkt herstellen, indem unter den Versuchsbedingungen sowohl die Molekel reduktiv gespalten als auch der Zucker entfernt wird: 1,0 g Sennosid erhitzt man in 100 cm³ Eisessig zum Sieden und gibt 17 cm³ 40-proz. Zinnchlorür-Salzsäure hinzu, worauf die Substanz bis auf eine geringe Trübung in Lösung geht. Nach 10 Minuten Sieden filtriert man die heisse Lösung durch eine Sinternutsche und kann aus dem abgekühlten Filtrat nach 4 Stunden 430 mg (70% der Theorie) kristallisiertes 9-Rheinanthron absaugen.

2. Die Darstellung des 10-Rheinanthrons (II).

1,0 g Diacetyl-rhein erhitzten wir mit 30 cm³ Eisessig zum Sieden und fügten 15 cm³ einer heissen 40-proz. Lösung von Zinnchlorür in konz. Salzsäure hinzu, worauf innert 2 Minuten vollständige Lösung eintrat. Nach 5 Minuten langem Sieden kühlte man ab und

konnte nach 12 Stunden von 710 mg braunen Kristallen abnutschen, die sich beim Erhitzen zwischen 240 und 260° zersetzten. Zur Charakterisierung acetylierten wir in Pyridin mit Essigsäureanhydrid und veresterten das erhaltene Triacetat in Dioxan mit Diazomethan. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus Chloroform-Methanol erhielten wir den 1,8,10-Triacetoxo-anthracen-3-carbonsäuremethylester in blass gelblichen, flachen Prismen vom Smp. 215—217°. Der Misch-Schmelzpunkt mit dem entsprechenden Produkt aus 9-Rheinanthron (Smp. 220—222°) lag bei 190—195° und zeigte somit die erwartete Depression.

Das gleiche 10-Anthranderivat erhielten wir auch direkt bei der mit der Reduktion einhergehenden Acetylierung von Rhein-methylester. Wir erhitzen zu diesem Zweck 100 mg Rhein-methylester vom Smp. 178° in 2 cm³ Essigsäureanhydrid + 0,5 cm³ Pyridin zum Sieden und gaben portionenweise Zink hinzu. Nach 1stündigem Sieden wurde vom Zink abgossen, die Lösung im Vakuum stark eingengt, das überschüssige Essigsäureanhydrid mit Wasser zerlegt und das Reaktionsprodukt in Chloroform aufgenommen. Aus der eingengten Chloroformlösung kristallisierte bei Methanolzusatz die 1,8,10-Triacetoxo-anthracenverbindung vom Smp. 215—217°.

Auch aus Diacetyl-rhein-methylester liess sich das 10-Rhein-anthranderivat gewinnen, indem der Ester mit Natrium-dithionit in essigsaurer Lösung (analog den Angaben von Zahn¹) zunächst in eine Monoacetylverbindung des 1,8-Dioxy-10-oxo-dihydro-anthracen-3-carbonsäure-methylesters verwandelt wurde, die sich, aus Chlorbenzol umkristallisiert, bei etwa 235° zersetzt. Bei der Acetylierung in Pyridin und der üblichen Aufarbeitung gewannen wir daraus die oben beschriebene Triacetylverbindung vom Smp. 215—217°.

Zur Analyse wurde die Substanz im Hochvakuum bei 70° getrocknet.

C₂₂H₁₈O₈ (410,14) Ber. CH₃CO 31,46 CH₃O 7,56% Gef. CH₃CO 30,09 CH₃O 7,69%

3. Die vergleichende Methylierung der Rheinanthrone.

500 mg 9-Rheinanthron bzw. 10-Rheinanthron wurden in kleinen Portionen in eine konz. Lösung von Diazomethan (hergestellt aus 1,5 g Nitrosomethylharnstoff) in Dioxan eingetragen. Nach 24 Stunden dampfte man die klare Lösung zur Trockne und oxydierte den Rückstand wie üblich mit Chromsäure in Eisessig. Die nach dem Einengen der Oxydationslösung auf Zugabe von Wasser ausfallenden Chinone nahm man in Chloroform auf und chromatographierte die gewaschene und konz. Chloroformlösung an einer Säule von 100 g Aluminiumoxyd. Der hellgelbe Dimethyl-rhein-methylester wurde am wenigsten adsorbiert und konnte mit Chloroform in bereits sehr reinem Zustand eluiert werden. Aus der höhergelegenen ziegelroten Zone liess sich mit methanolhaltigem Chloroform 1-Methyl-rhein-methylester eluieren.

Aus 9-Rheinanthron (I) erhielten wir in wiederholten Versuchen nur 20 bis höchstens 50 mg kristallisierten 1,8-Dimethyl-rheinmethylester, aus 10-Rheinanthron dagegen mindestens 110 bis 150 mg. Umgekehrt waren die Ausbeuten an 1-Methyl-rheinmethylester etwas grösser beim 9-Rheinanthron als beim 10-Rheinanthron.

IV. Die optische Aktivität.

Die Drehwerte der Sennidine und mehrerer ihrer Derivate, die schon früher beschrieben, z. T. damals aber nicht auf ihre optische Aktivität geprüft wurden, sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Wegen der meist starken Färbung dieser Substanzen musste oft mit sehr verdünnten Lösungen gearbeitet werden, was die Genauigkeit der Drehwerte beeinträchtigte.

Es ist auffallend, dass der Drehwert des unsubstituierten Sennidins in organischen Lösungsmitteln abnimmt, so dass z. B. nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äther keine Drehung mehr zu beobachten ist. Dagegen bleibt der Drehwert von Verbindungen, in denen die vier α -Hydroxylgruppen substituiert sind, beim Umkristallisieren unverändert. Wegen der leichten Racemisierbarkeit des Sennidins A ist es wohl möglich, dass die bis jetzt untersuchten Präparate in bezug auf ihre optische Drehung noch nicht ganz einheitlich sind.

¹) K. Zahn, B. 67, 2063 (1934).

Substanz	Konz. %	Lösungs- mittel	$[\alpha]_D^{20}$	
			A-Reihe	B-Reihe
Sennidin	0,1	D.oxan- Wasser 7:3	ca. + 180°	0°
Tetra-methyl- sennidin- dimethylester	0,6	Chloroform- Methanol 9:1	+ 59°	0°
Tetra-acetyl- sennidin- dimethylester	0,6	Chloroform	+ 210°	0°
Tetra-methyl-9,9'- diacetyl-sennidin- dimethylester	0,2	Chloroform- Methanol 9:1	0°	
Hexa-acetyl- sennidin- dimethylester	0,2	Chloroform		

V. Die Synthesen.

1. Die Synthese des Sennidins.

In der im Abschnitt I, 1 beschriebenen Schüttelapparat besetzte man die eine Schüttelbirne mit 540 mg 9-Rheinanthron in 10 cm³ Wasser, die andere mit 100 mg Palladiummohr in 10 cm³ 0,2-n. NaOH und sättigte mit Sauerstoff, wozu wenige Minuten ausreichten. Nach dem Zusammenkippen nahm die gelbbraune Lösung sehr rasch Sauerstoff auf und wurde braunrot; im Verlauf von etwa 20 Minuten war die berechnete Menge Sauerstoff aufgenommen, worauf der Gasverbrauch beinahe zum Stillstand kam. Nach 30 Minuten wurde die Lösung vom Palladium abfiltriert, das gebildete Sennidin durch Ansäuern ausgefällt, abgesaugt, getrocknet, wie üblich mit Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure acetyliert und das Acetylierungsprodukt in Aceton mit Diazomethan verestert. Der kristallisierte Tetra-acetyl-sennidin-dimethylester wog 475 mg und schmolz unter Zersetzung zwischen 225–230°; Ausbeute 64%.

In einem andern Ansatz wurden aus 430 mg 9-Rheinanthron durch Dehydrierung 310 mg unsubstituiertes Sennidin, d. h. 72% der Theorie isoliert und dessen Reinheit nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äther durch kolorimetrischen Vergleich¹⁾ mit natürlichem Sennidin, dessen Kristallisation inzwischen ebenfalls gelungen war, bestätigt.

2. Die Synthese des Tetramethyl-sennidin-dimethylesters.

Entsprechend vorstehenden Versuchen löste man einerseits 210 mg Dimethyl-rheinanthron-methylester in 10 cm³ Eisessig, andererseits suspendierte man 100 mg Palladium in 10 cm³ Eisessig, sättigte mit Sauerstoff und schüttelte nach dem Zusammenkippen der Flüssigkeiten bis zum Abklingen der Gasaufnahme, was nach etwa 30 Minuten der Fall war. Der Gasverbrauch betrug 3,9 cm³, berechnet 3,8 cm³.

Die vom Katalysator befreite Lösung dampfte man zur Trockne und kristallisierte den Rückstand unter Verwendung von Tierkohle aus Chloroform-Methanol (9:1) um. Das rohe Kristallisat wog 170 mg, was einer Ausbeute von 81% entspricht. Nach dem Waschen des rohen Tetramethyl-sennidin-dimethylesters mit etwas kaltem Aceton schied sich dieser aus Chloroform-Methanol in typischen, hellbeigefarbigem Kristallen aus, die sich bei ca. 300° zersetzten.

¹⁾ Vgl. 2. Mitt., Helv. 30, 59 (1946).

3. Die Partialsynthese der Sennoside A und B.

a) Mit Sauerstoff/Pd. 1,0 g 8-Glucosido-rheinanthron wurde in einer Schüttelbirne in 10 cm³ Wasser suspendiert und das zweite Schüttelgefäß mit 200 mg Palladium, 3 cm³ n.NaOH und 7 cm³ Wasser beschickt. Beide Suspensionen wurden mit Sauerstoff gesättigt und dann vereinigt. Bei weiterem Schütteln wurde innerhalb 10 Minuten die berechnete Menge (12,9 cm³), in den folgenden 20 Minuten nur noch 1,5 cm³ Sauerstoff aufgenommen; dann kam die Gasaufnahme völlig zum Stillstand. Die vom Katalysator abgegebene Lösung wurde nun mit Salzsäure angesäuert, worauf nach kurzer Zeit die Kristallisation von Sennosid A begann und nach etwa 4 Stunden beendet war. Umkristallisieren aus Aceton-Wasser lieferte 390 mg leuchtend gelbes, wohlkristallisiertes Sennosid A, das in allen seinen Eigenschaften, auch in der optischen Drehung, mit natürlichem Sennosid A übereinstimmte.

$$[\alpha]_D^{20} = -145^{\circ}$$

$$(c = 0,1 \text{ in } 70\text{-proz. Aceton})$$

Die salzsaure Mutterlauge von Sennosid A lieferte nach zweitägigem Stehen eine weitere Kristallisation, aus der beim Umkristallisieren aus Aceton-Wasser 200 mg hellgelbes Sennosid B gewonnen wurden, dessen optische Aktivität auf seinem Gehalt an Glucose beruht.

$$[\alpha]_D^{20} = -95^{\circ}$$

$$(c = 0,2 \text{ in } 70\text{-proz. Aceton})$$

b) Mit Luft/Pd. In einem Becherglas löste man 1,0 g 8-Glucosido-rheinanthron in 30 cm³ 0,1-n. NaOH, gab 200 mg Palladium hinzu und presste unter Rühren während einer Stunde einen kräftigen Luftstrom durch die dunkle Lösung. Die Aufarbeitung erfolgte wie im Versuch a) und ergab wiederum 390 mg umkristallisiertes Sennosid A und 160 mg umkristallisiertes Sennosid B.

c) Mit Luft allein. In einem weiteren Ansatz erfolgte die Dehydrierung von 1,0 g 8-Glucosido-rheinanthron wie im Versuch b), aber ohne jeden Katalysator; die Aufarbeitung lieferte 170 mg Sennosid A und 90 mg Sennosid B.

Zusammenfassung.

Die Konstitution der Sennoside A und B als Derivate des Dihydro-dianthrone wird bewiesen durch ihre reduktive Spaltung zu 9-Rheinanthron-Derivaten und durch Darstellung von 9,9'-Diacetylverbindungen mit Dianthranol-Struktur.

Es gelingt, die Sennidine als stereoisomere 1,1',8,8'-Tetraoxy-10,10'-dihydro-dianthron-3,3'-dicarbonsäuren zu charakterisieren und zu zeigen, dass Sennosid A sehr wahrscheinlich das 8,8'-Diglucosid des optisch aktiven (+)-Sennidins, Sennosid B das 8,8'-Diglucosid der entsprechenden optisch inaktiven Mesoform darstellt. Damit wird erstmals ein natürliches optisch aktives Dihydro-dianthron-Derivat nachgewiesen.

Die vorgeschlagenen Konstitutionsformeln werden durch Totalsynthese des Sennidins und Partialsynthese der Sennoside A und B bestätigt.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium
„Sandoz“, Basel.

49. Herstellung und Derivate des β -Methyl-D-glucuro-pyranosids

von E. Hardegger und D. Spitz.

(31. I. 50.)

Wie wir vor kurzem zeigen konnten¹⁾ gelingt es nach *K. Maurer & G. Drefahl*²⁾ im α -Methyl-glucosid in beschränktem Ausmass die primäre Oxygruppe mit Distickstofftetroxyd selektiv zum Carboxyl zu oxydieren und aus den Oxydationsprodukten kristallisierte Derivate des α -Methyl-D-glucuro-pyranosids zu bereiten³⁾.

In der vorliegenden Arbeit wurde in analoger Weise die Oxydation des β -Methyl-D-glucuro-pyranosids⁴⁾ durchgeführt, um zu β -Methyl-D-glucuro-pyranosid (VII) und den der α -Reihe entsprechenden, mit Ausnahme von II noch unbekanntem Derivaten zu gelangen. Die Einwirkung von Distickstofftetroxyd auf β -Methyl-glucosid (I) führte erwartungsgemäss und in Ausbeuten von durchschnittlich 70% zu sauren Oxydationsprodukten, deren Bariumsalze auf Grund ihrer Unlöslichkeit in Alkohol isoliert und auf diese Weise von Neutralkörpern abgetrennt werden konnten.

Zur weiteren Aufarbeitung wurden die amorphen, sehr hygroskopischen Bariumsalze wie in der α -Reihe¹⁾ entweder mit methanolischer Salzsäure in die Methylester umgewandelt⁵⁾ oder zunächst mit dem Kationen-Austauscher Wofatit KS zerlegt, worauf die freien Säuren in methanolischer Lösung mit Diazomethan verestert wurden. Die rohen, mit Acetanhydrid-Pyridin acetylierten Methylester lagen

¹⁾ *E. Hardegger & D. Spitz, Helv. 32, 2165 (1949).*

²⁾ *B. 80, 94 (1947).*

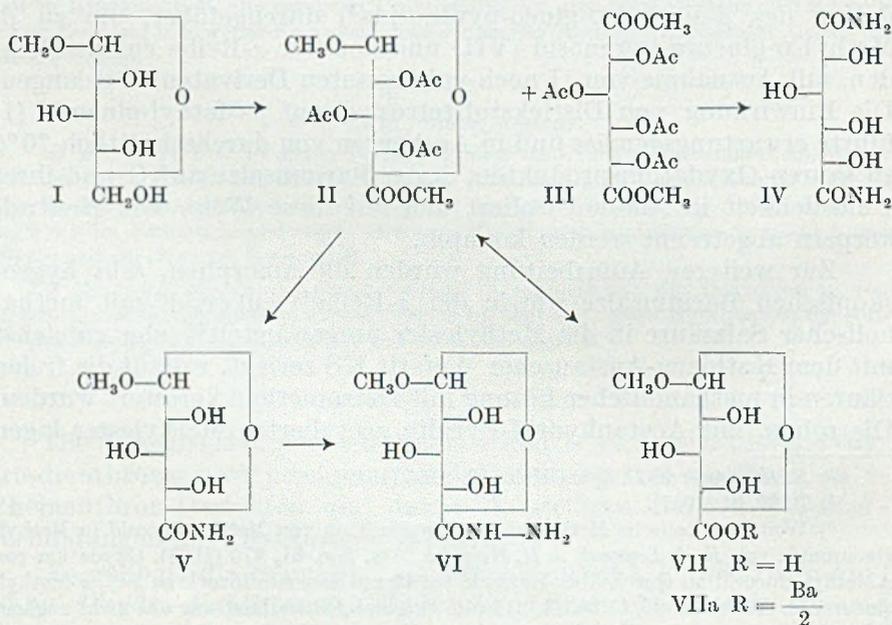
³⁾ Weitere chemische Methoden zur Umwandlung von Methyl-glucosid in Methyl-glucuronid: vgl. *R. A. Leutgoeb & H. Heinrich, Am. Soc. 61, 870 (1939)*, Oxydation von α -Methyl-glucosid an Quecksilber-Kathode bei 11 atü Sauerstoffdruck zu 20% α -Methyl-glucuronid. *K. Smolenski, C. 24, II, 317* (die Original-Abhandlung war uns nicht zugänglich), Oxydation von α -Methyl-glucosid mit Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart von Eisen(III)-hydroxyd soll in 20-proz. Ausbeute zu α -Methyl-glucuronid führen. — Für präparative Zwecke geeignet erscheint die noch nicht durchgeführte Oxydation des α - bzw. β -Methyl-glucosid-2,3,4-triacetats mit Kaliumpermanganat nach der an β -1,2,3,4-Tetraacetyl-glucose ausgearbeiteten Methode von *M. Stacey, Soc. 1939, 1529*. — Bemerkenswerterweise gelang es nicht, α -Methyl-glucosid mit Natriumhypobromit in α -Methyl-glucuronid umzuwandeln, während aus α -Menthol-glucosid auf gleiche Weise α -Menthol-glucuronid hergestellt werden konnte, *M. Bergmann, B. 56, 1060 (1923)*.

⁴⁾ In ca. 70-proz. Ausbeute aus β -Pentaacetyl-glucose über die Acetobrom-glucose herstellbar; für grössere Ansätze ist die Methylierung von Glucose mit Dimethylsulfat und Alkali nach *M. L. Maquenne, Bl. [3] 33, 469 (1905)*, einfacher und billiger durchzuführen, trotzdem auf diese Weise nur etwa 20% Ausbeute an β -Methyl-glucosid erzielt werden.

⁵⁾ Vgl. dazu die Veresterung von 2,3,4-Trimethyl-methylglucuronid, *J. I. Cunneen & F. Smith, Soc. 1948, 1145*; reiner α -Methyl-glucuro-pyranosid-methylester wurde von *L. N. Owen, S. Peat & W. J. G. Jones, Soc. 1941, 339*, als Öl beschrieben.

als stark dunkle, sehr viskose Masse vor, die nur zu etwa $\frac{2}{3}$ in Benzol löslich war. Filtration der benzolischen Lösung durch Aluminiumoxyd der Aktivität II—III führte nacheinander zu 2 farblosen, kristallisierten Eluaten im Gewicht von 15%¹⁾ der eingebrachten Substanz.

Die zuerst und in grösserer Menge eluierte, bei 105° schmelzende Verbindung III der Bruttozusammensetzung $C_{16}H_{22}O_{12}$ wurde als D-Zuckersäure-dimethylester-tetraacetat²⁾ erkannt, da sie sich mit methanolischem Ammoniak in das bekannte Zuckersäure-diamid (IV) vom Smp. 168° (u. Zers.) ($[\alpha]_D = +16,7^\circ$ in Wasser)³⁾ überführen liess. Das stete Vorkommen von D-Zuckersäure in den Oxydationsprodukten des β -Methyl-glucosids (I) ist bemerkenswert, weil in der mehrmals und analog durchgeführten Oxydation des α -Methyl-glucosids keine oder höchstens Spuren von Zuckersäure auftraten⁴⁾.



Das in den späteren Fraktionen eluierte, kristallisierte Präparat II der Formel $C_{14}H_{20}O_{10}$ schien nach Schmelzpunkt (154°) und optischer Drehung ($[\alpha]_D = -29^\circ$ in Chloroform) identisch mit dem von *W. F. Goebel & F. H. Babers*⁵⁾ hergestellten, als Pyranosid formulierten β -Methyl-glucuronid-methylester-triacetat. In Über-

¹⁾ Ca. 65% der eingefahrenen Substanz liessen sich erst mit Methanol als dunkles, nicht kristallisiertes und nicht weiter untersuchtes Produkt vom Aluminiumoxyd ablösen.

²⁾ In der Literatur noch nicht beschrieben.

³⁾ *C. S. Hudson & S. Komatsu*, Am. Soc. 41, 1141 (1919), fanden für ein Präparat vom Smp. 172—173° $[\alpha]_D = 13,3^\circ$ in Wasser; *M. Bergmann*, B. 54, 2651 (1921), bestimmte den Smp. zu 170° (u. Zers.), *R. E. Reeves*, Am. Soc. 61, 664 (1939), zu 176—178°.

⁴⁾ Vgl. *Helv.* 32, 2169 (1949).

⁵⁾ *J. Biol. Chem.* 111, 347 (1935).

einstimmung mit dieser Annahme liess sich das in Äther sehr schwerlösliche Methylester-triacetat II mit Ammoniak in Methanol in β -Methyl-glucuronid-amid (V)¹⁾ umwandeln, unter Eliminierung der drei Acetylgruppen als Acetamid. Für die Pyranosid-Struktur von II spricht der negative Ausfall des *Weerman*-Tests²⁾ mit dem Amid V. Zur Charakterisierung des Amids V stellten wir durch Kochen mit Hydrazinhydrat in quantitativer Ausbeute das schwer lösliche Hydrazid VI dar.

Die alkalische Verseifung des Methylester-triacetats II führte, nach Entfernen der Natrium-ionen mit Wofatit KS, zum β -Methyl-glucuronid VII. Die nur schwierig kristallisierende Säure VII wurde als unscharf bei 78–82° schmelzendes Präparat, sowie als amorphes Bariumsalz zur Analyse gebracht. Durch aufeinanderfolgende Einwirkung von Diazomethan und Acetanhydrid-Pyridin konnte die Säure VII wieder in das Methylester-triacetat II zurückverwandelt werden. Wie zu erwarten war, verbrauchte die Säure VII als Pyranose-Derivat 2 Mol Perjodsäure. Von der durch die Oxydation entstandenen Ameisensäure konnten 52% der 1 Mol entsprechenden Menge als Benzyl-thiuroniumsalz gefasst und identifiziert werden.

Wir danken der *Rockefeller Foundation* in New York für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil³⁾.

Oxydation von β -Methyl-glucosid (I) mit Distickstoff-tetroxyd.

20 g β -Methyl-glucosid (I) vom Smp. 105° wurden, wie früher für das α -Methyl-glucosid beschrieben⁴⁾, mit Distickstofftetroxyd⁵⁾ oxydiert. Die aus den Oxydationsprodukten isolierten trockenen, sehr hygroskopischen, gelblichen Bariumsalze wogen 21 g. Aus je 10 g Bariumsalz wurden, ebenfalls nach früher gegebener Vorschrift⁴⁾, sowohl mit methanolischer Salzsäure wie über die freien Carbonsäuren mit Diazomethan je 6,5–7 g⁶⁾ rohe, dunkel gefärbte Methylester erhalten⁷⁾.

¹⁾ Ausser V und dem entsprechenden ebenfalls kristallisierten Amid der α -Reihe (vgl. Fussnote ⁴⁾ S. 338) ist noch das nicht kristallisierende β -Methyl-glucuro-furanosid-amid (vgl. *L. N. Owen, S. Peat & W. J. G. Jones, Soc. 1941, 339*) bekannt.

²⁾ Vgl. dazu z. B. *R. A. Weerman, A. 401, 1 (1913); Rec. 37, 1, 16 (1918); W. N. Haworth, S. Peat & J. Whetstone, Soc. 1938, 1975; R. G. Ault, W. N. Haworth & E. L. Hirst, Soc. 1934, 1722; C. C. Barker, E. L. Hirst & J. K. N. Jones, Soc. 1946, 783*. Vgl. dagegen *F. Micheel & K. Kraft, B. 67, 841 (1934)*. Die Ergebnisse der Untersuchung von *F. Micheel & K. Kraft* wurden von *W. N. Haworth* und *Mitarb. (1938)* teilweise widerlegt.

³⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

⁴⁾ *Helv. 32, 2167 (1949)*.

⁵⁾ Die Oxydationen wurden teils mit technischem, teils mit frisch im Sauerstoffstrom destilliertem und über Phosphorperoxyd getrocknetem Distickstofftetroxyd vorgenommen; Einflüsse auf die Ausbeuten an II und III wurden nicht festgestellt.

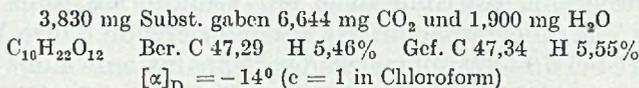
⁶⁾ Gegen ca. 3,2–3,5 g in der α -Reihe (vgl. Fussnote ⁴⁾).

⁷⁾ Wie nachträglich angestellte Versuche zeigten, kann das Auftreten gefärbter Verunreinigungen, welche schon bei der Neutralisation mit Bariumcarbonat auftraten, vermieden werden, wenn die Oxydationsprodukte des β - bzw. α -Methyl-glucosids, nach Entfernen der überschüssigen Stickoxyde im Vakuum, in wässriger Lösung mit *Raney-Nickel* z. B. 6 Stunden bei 150° und 150 at hydriert werden. Neutralisation des hydrierten Ansatzes mit BaCO₃ und Ausfällen mit Alkohol führt dann zu rein weissen Bariumsalzen, bzw. in den späteren Stufen zu rohen, aber beinahe farblosen Acetyl-methylestern.

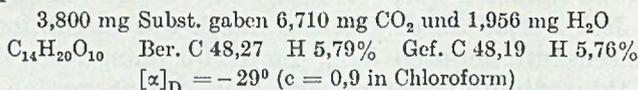
Isolierung von Zuckersäure-dimethylester-tetraacetat (III) und β -Methylglucuronid-methylester-triacetat (II).

16 g roher Methylester wurden bei 0° mit 100 cm³ Pyridin und 25 cm³ Acetanhydrid im Verlauf von 24 Stunden acetyliert. Das im Vakuum zur Trockene eingedampfte Acetylierungsgemisch wurde bis zum Verschwinden des Geruchs nach Pyridin bzw. Acetanhydrid mehrere Male mit Toluol im Vakuum zur Trockene gesaugt. Der Rückstand (21 g) wurde mit Benzol digeriert, wobei 14 g Substanz in Lösung gingen. Die dunkle Lösung (ca. 100 cm³) wurde an Aluminiumoxyd II—III chromatographiert.

Mit 300 cm³ Benzol wurden 1,5 g Zuckersäure-dimethylester-tetraacetat (III) eluiert. Das aus Chloroform-Äther umkristallisierte Präparat (1,4 g) schmolz bei 105°. Zur Analyse wurde eine Probe bei 100° im Hochvakuum sublimiert.



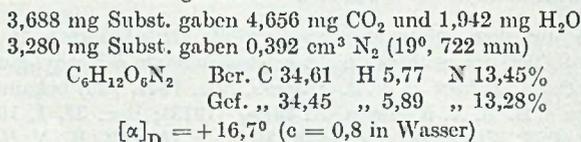
Die folgenden Benzol-Eluate (300 cm³) enthielten 550 mg β -Methylglucuronid-methylester-triacetat (II) vom Smp. 148°. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Chloroform-Äther konnte der Schmelzpunkt von II bis auf 154° gebracht werden. Das Analysenpräparat wurde bei 140° im Hochvakuum sublimiert.



Mit 300 cm³ Benzol-Chloroform (1:1) wurden aus dem Aluminiumoxyd 0,35 g einer nicht krist., gelben Substanz, mit 300 cm³ Methanol 9 g dunkles, nicht kristallisierendes Harz eluiert, das nicht weiter untersucht wurde.

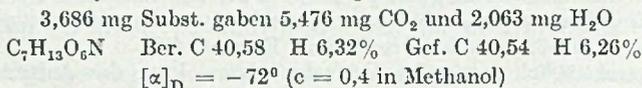
Zuckersäure-diamid (IV aus III).

200 mg Zuckersäure-dimethylester-tetraacetat (III) wurden in 20 cm³ Methanol gelöst und bei 0° mit Ammoniak gesättigt. Nach 12 Stunden wurde die Lösung im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde aus Wasser-Methanol umkristallisiert, wobei 70 mg des bei 168° (u. Zers.) schmelzenden Zuckersäure-diamids (IV) anfielen. Das in Wasser gut, in Alkohol und Methanol schwer lösliche Präparat wurde zur Analyse 2 Tage bei 70° im Hochvakuum getrocknet.



β -Methylglucuronid-amid (V aus II).

200 mg β -Methylglucuronid-methylester-triacetat (II) wurden in 20 cm³ Methanol gelöst und bei 0° mit Ammoniak gesättigt. Nach dem Absaugen der flüchtigen Anteile im Vakuum kristallisierte der Rückstand aus Methanol. Das bei 198° schmelzende Präparat wog 70 mg. Zur Analyse wurde die Verbindung V bei 180° im Hochvakuum sublimiert.



Weerman-Test: 52 mg (1/4 Millimol) β -Methylglucuronid-amid (V) wurden in 1 cm³ Wasser gelöst, bei 0° mit 0,5 cm³ kalter NaOCl-Lösung¹⁾ versetzt und 2 Tage bei 0° stehen gelassen. Mit einigen Tropfen 0,1-n. Natriumthiosulfat wurde das überschüssige Hypochlorit zerstört und 0,1 cm³ konz. Semicarbazid-acetat-Lösung (hergestellt durch Ver-

¹⁾ Hergestellt nach R. A. Weerman, A. 401, 5 (1913).

reiben von 2 g Semicarbazid-hydrochlorid mit 3 g kristallisiertem Natriumacetat und Abfiltrieren des flüssigen Anteils vom ungelösten Natriumchlorid) zugegeben. Nach 2 Tagen bei 20° erschien die Mischung nur leicht getrübt.

Ein in gleicher Weise mit 50 mg Glucensäure-amid angesetzter Test zeigte unmittelbar nach Zugabe der Semicarbazid-acetat-Lösung eine Trübung und nach 3 Stunden einen reichlichen Niederschlag von Hydrazodicarbonamid, welches durch Schmelzpunkt (248°) und Mischprobe identifiziert wurde.

β -Methyl-glucuronid-hydrazid (VI aus V).

100 mg β -Methyl-glucuronid-amid (V) wurden mit 0,5 g Hydrazinhydrat eine halbe Stunde am Rückfluss gekocht und nach dem Abkühlen mit 2 cm³ Alkohol versetzt, wobei das Hydrazid VI sofort auskristallisierte. Das Präparat wurde bis zum Smp. 238° aus Wasser-Alkohol umkristallisiert und zur Analyse bei 230° im Hochvakuum sublimiert.

3,738 mg Subst. gaben 5,209 mg CO₂ und 2,176 mg H₂O

C₇H₁₁O₆N₂ Ber. C 37,84 H 6,35% Gef. C 38,03 H 6,51%

$[\alpha]_D = -50^\circ$ (c = 0,5 in Wasser)

β -Methyl-glucuronid (VII aus II).

348 (350) mg β -Methyl-glucuronid-methylester-triacetat (II) vom Smp. 154° wurden in 4 cm³ Methanol gelöst, mit 41 (39,9) cm³ wässriger 0,1-n. Natronlauge 3 Minuten zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen auf Naphtholphtalein titriert, wozu 2 (2) cm³ 0,1-n. Essigsäure verbraucht wurden. Die Lösung wurde durch 15 cm³ Wofatit KS filtriert, der Wofatit zweimal mit je 40 cm³ Wasser gewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum über eine gekühlte Vorlage zur Trockene eingedampft. Der ölige Rückstand (VII) wog 228 (228) mg (Ber. 208 mg). Das in der Vorlage gesammelte Destillat verbrauchte 30,5 (29,8) cm³ (Ber. 32 cm³) 0,1-n. Natronlauge.

Das β -Methyl-glucuronid (VII) kristallisierte aus Aceton-Chloroform in Gegenwart von 2 Tropfen Wasser. Ohne Zusatz von Wasser wurde kein kristallisiertes Präparat erhalten. Die Kristalle schmolzen unscharf bei 78–82° und röteten blaues Lackmuspapier.

Das Analysenpräparat wurde 24 Stunden im Hochvakuum bei 70°, dann 2 Tage über Phosphorpentoxyd getrocknet, im Schweinchen eingewogen und vor dem Verbrennen bei 100° geschmolzen.

4,198 mg Subst. gaben 6,195 mg CO₂ und 2,216 mg H₂O

C₇H₁₂O₇ Ber. C 40,39 H 5,81% Gef. C 40,27 H 5,91%

*Bariumsalz VIIa*¹⁾: Die aus dem Methylester-triacetat II mit 0,1-n. Natronlauge und Wofatit KS frisch hergestellte wässrige Lösung der Säure VII wurde mit überschüssigem Bariumcarbonat aufgekocht, filtriert und das Filtrat in das doppelte Volumen Alkohol eingetropfelt. Das amorphe Bariumsalz wurde zur Analyse 48 Stunden bei 70° im Hochvakuum getrocknet.

3,737 mg Subst. gaben 4,101 mg CO₂, 1,593 mg H₂O und
1,182 mg Rückstand

(C₇H₁₁O₇)₂ Ba, 1 H₂O Ber. C 29,51 H 4,24 Ba 24,11%
Gef. „ 29,95 „ 4,77 „ 24,58%

Umwandlung des β -Methyl-glucuronids (VII) in das
Methylester-triacetat II.

Eine frisch hergestellte Lösung von 20 mg β -Methyl-glucuronid (VII) in 1 cm³ Wasser wurde mit 10 cm³ Methanol und 10 cm³ verdünnter ätherischer Diazomethan-Lösung kurz durchgeschüttelt und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde mit einigen Tropfen Pyridin und Acetanhydrid kurz aufgekocht, im Vakuum zur

¹⁾ Pb, Bi, Ni, Co-Salze waren ölig, Cd- und Zn-Salze waren fest aber amorph, ein offenbar Hg⁺⁺-Salz wurde einmal kristallin erhalten; das Salz konnte nicht umkristallisiert werden und die Herstellung war nicht reproduzierbar.

Trockene verdampft und im Hochvakuum sublimiert. Das kristallisierte Sublimat zeigte die für das Methylester-triacetat II charakteristische Schwerlöslichkeit in Äther. Das Präparat schmolz nach einmaligem Umkristallisieren aus Chloroform-Äther bei 148° und gab in der Mischprobe mit Methylester-triacetat II vom Smp. 153° keine Schmelzpunkts-erniedrigung.

Oxydation des β -Methyl-glucuronids (VII) mit Perjodsäure.

Eine wässrige Lösung, deren Gehalt an VII durch Eindampfen im Vakuum und Trocknen des Rückstandes bis zur Gewichtskonstanz im Hochvakuum bei 20° über Phosphorperoxyd bestimmt wurde, enthielt in 4,61 g Lösung 209 mg (= 1,0 Millimol β -Methyl-glucuronid¹). Zu dieser Lösung wurden bei 16–17°, 5,60 cm³ Perjodsäure-Lösung gegeben, die 2,88 Milliäquivalente aktiven Sauerstoff enthielt, also ca. 0,5 molar war. Der Verlauf der Oxydation wurde in Proben von 0,50 cm³ titrimetrisch verfolgt²). Die Glykospaltung war nach 3 Stunden beendet. Die Probe verbrauchte dann 0,87 cm³ 0,1-n. Arsenit, woraus sich eine Verminderung des Gehalts an aktivem Sauerstoff von 2 Milliäquivalenten ($\pm 1\%$) berechnet. Nach 4 Stunden war gemäss dem Arsenit-Verbrauch von 0,85–0,86 cm³ die Oxydation nicht weiter fortgeschritten, obwohl die Lösung sich inzwischen gelblich gefärbt hatte³). Die Oxydation wurde nun durch Zugabe von 25 cm³ 1-n. Kaliumjodid-Lösung abgebrochen.

Zur Aufarbeitung wurde die Mischung mit 7 g Kaliumcarbonat 15 Stunden geschüttelt, wobei sich die Gelbfärbung stark aufhellte. Dann wurde der Ansatz mit 100 cm³ Wasser und 120 cm³ Wofatit KS unter zeitweisem Schütteln 5 Minuten stehengelassen, durch wenig frischen Wofatit KS filtriert und mit Wasser nachgewaschen. Die Filtrate wurden mit 14 g Silbercarbonat geschüttelt, filtriert, mit Schwefelwasserstoff behandelt und eingedampft⁴). Das mit Bariumhydroxyd auf Phenolphthalein neutralisierte Destillat wurde im Vakuum auf ca. 5 cm³ eingengt, mit einer konz. Lösung von 250 mg Benzylthiuroniumsulfat versetzt, von ausgeschiedenem Bariumsulfat abfiltriert und im Vakuum zur Trockene verdampft. Der Rückstand wog nach dem Umkristallisieren aus Wasser 110 mg. Das bei 145° schmelzende Präparat gab mit Benzylthiuronium-formiat (Smp. 148°) keine und mit Benzylthiuronium-acetat (Smp. 140–141°) eine starke Schmelzpunkts-erniedrigung.

Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. W. Manser ausgeführt.

Zusammenfassung.

β -Methyl-D-glucopyranosid wurde mit Distickstofftetroxyd oxydiert. Aus den Oxydationsprodukten konnten kristallisierte Derivate der D-Zuckersäure und des β -Methyl-D-glucopyranosids isoliert werden. Das kristallisierte β -Methyl-glucuronid wurde als Amid und Hydrazid charakterisiert und mit Perjodsäure abgebaut. Die Pyranosid-Struktur des β -Methyl-glucuronids wurde sichergestellt.

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

¹) Gehaltsbestimmungen durch Titration mit 0,01-n. Natronlauge führten zu ca. 6% höheren Werten; die durch Wägung gefundenen Werte scheinen uns zuverlässiger.

²) Die Proben wurden mit 10 cm³ Wasser verdünnt und nach Zugabe von 1,5 cm³ 1-m. Dikaliumhydrogenphosphat und 0,5 cm³ 1-n. Kaliumjodid das ausgeschiedene Jod mit 0,1-n. Arsenit titriert.

³) Erst längeres Stehen bei 17° führte unter Ausscheidung von Jod zu weitergehender Oxydation.

⁴) Aus dem Rückstand konnten mit Strontiumhydroxyd nur wenig Kristalle isoliert werden, deren Menge für eine weitere Untersuchung nicht ausreichte.

50. Recherches dans la série des cyclitols XI.
Sur l'identité du viburnitol de *Viburnum tinus* L. avec le
***l*-quercitol de *Gymnema sylvestre* Br.**

par Th. Posternak et W. H. Schopfer.

(I II 50)

A côté des cyclohexane-hexols $C_6H_{12}O_6$ (inositols), il existe dans la nature des cyclohexane-pentols $C_6H_{12}O_5$ qui, jusqu'à présent, n'ont d'ailleurs été trouvés que dans le règne végétal.

Leur représentant le plus anciennement connu est le *d*-quercitol ($[\alpha]_D = +24^0$) que Braconnot¹⁾ découvrit en 1849 dans les glands de chêne et qui a été retrouvé dans un grand nombre d'autres plantes. Sa constitution²⁾ et sa configuration³⁾ sont actuellement bien établies.

En 1904, Power & Tutin⁴⁾ isolèrent des feuilles d'une asclépiadacée originaire de l'Hindoustan, *Gymnema sylvestre* Br., une substance lévogyre, de formule $C_6H_{12}O_5$, contenant 5 groupes hydroxyles. A l'instar du *d*-quercitol, elle est dégradée par oxydation, au moyen du permanganate, en acide malonique, ce qui constitue un sérieux argument en faveur de la constitution de cyclohexane-pentol que lui attribuèrent Power & Tutin. Ces auteurs nommèrent leur substance «*l*-quercitol», appellation fort mal choisie d'ailleurs, car ce composé n'est pas l'antipode optique du *d*-quercitol.

En 1936, Hérissey & Poirot⁵⁾ retirèrent des feuilles et des fruits de *Viburnum tinus* L. un principe lévogyre répondant à la formule $C_6H_{12}O_5$ qu'ils nommèrent *viburnitol*. Sa rotation spécifique différait de celle que Power & Tutin avait indiquée pour leur substance (tableau I). Le viburnitol contient 5 groupes hydroxyle; il consomme la même quantité d'acide periodique que le *d*-quercitol. Hérissey & Poirot en conclurent qu'il représente un cyclohexane-pentol. Cette conclusion ne semble pas avoir retenu l'attention; toujours est-il que le viburnitol n'est pas mentionné dans les revues récentes sur la chimie des cyclitols⁶⁾.

Grâce à la grande obligeance de M. le Dr T. M. Sharp, des *Wellcome Laboratories of Tropical Medicine*, Londres, nous avons pu obtenir un échantillon de la substance de Power & Tutin. D'autre part,

¹⁾ H. Braconnot, Ann. chim. phys. [3] 27, 392 (1849).

²⁾ J. Kanonnikof, J. pr. [2] 32, 497 (1885).

³⁾ Th. Posternak, Helv. 15, 948 (1932).

⁴⁾ F. B. Power & F. Tutin, Soc. 85, 624 (1904).

⁵⁾ H. Hérissey & G. Poirot, J. pharm. chim. [8] 26, 385 (1937).

⁶⁾ J. K. N. Jones, Ann. Reports Chem. Soc. 43, 167 (1947); H. G. Fletscher Jr., Adv. Carb. Chem. 3, 45 (1948); W. Pigman & R. M. Goep, Chemistry of the Carbohydrates, Academic Press, New-York (1948).

M. le Prof. *Hérissey*, Paris, a mis très aimablement à notre disposition un échantillon de viburnitol. Par la suite, nous en avons préparé de plus grandes quantités à partir des feuilles et des fruits de *Viburnum tinus*; nous avons modifié et simplifié quelque peu le procédé de *Hérissey & Poirot* ce qui nous a permis d'améliorer considérablement les rendements. Comme nous l'avons constaté, le viburnitol est accompagné dans les feuilles de quantités notables de méso-inositol; ce dernier est également présent dans les fruits, mais en quantités plus faibles¹⁾.

En possession d'échantillons de ces 2 cyclitols, nous avons comparé le viburnitol avec le «*l*-quercitol». Comme nous l'indiquons plus bas, leurs constantes sont tellement voisines que l'identité des deux substances devenait très probable. Toutefois une étude microbiologique révéla des différences qu'il s'agissait d'expliquer.

Nous avons examiné leur action sur deux micro-organismes qui ont besoin de méso-inositol comme facteur de croissance vitaminique, *Eremothecium Ashbyii* Guill. et le mutant «inositolless» de *Neurospora crassa* Shaer & B. O. Dodge; le «*l*-quercitol» s'est montré sans action alors que tous les échantillons de viburnitol étaient actifs.

En raison des grandes ressemblances que présentent par ailleurs les deux substances, on pouvait alors se demander si l'activité biochimique du viburnitol ne provenait pas de la présence de petites quantités de méso-inositol (environ 4%) retenues tenacement. Nous avons cherché à les éliminer. Il était difficile, sinon impossible, de les déceler par les critères habituels (analyse élémentaire, pouvoir rotatoire, point de fusion) qui dans le cas particulier ne sont que fort peu affectés. Pour suivre les progrès de la purification nous avons dosé le méso-inositol, dans nos préparations, par les méthodes microbiologiques (voir partie expérimentale). Le viburnitol se laisse purifier le plus commodément par recristallisation dans l'alcool de son dérivé acétylé. On peut employer aussi le tri-acétate de l'isopropylidène-viburnitol²⁾, mais la purification par son intermédiaire s'accompagne de grandes pertes. Par le premier procédé, nous avons obtenu un échantillon de viburnitol qui n'était guère plus actif dans nos tests que le «*l*-quercitol». La différence entre les comportements biologiques des deux substances se trouve ainsi éliminée.

Comme le montre le tableau I, les caractères indiqués dans la littérature pour le *l*-quercitol et son penta-acétate d'une part, pour le viburnitol et son penta-acétate d'autre part, sont assez voisins à l'exception des pouvoirs rotatoires qui diffèrent considérablement. Or, nous avons constaté que la rotation spécifique $[\alpha]_D = -73,9^\circ$ indiquée pour le *l*-quercitol par *Power & Tutin* est erronée; nous trouvons $[\alpha]_D = -49,5^\circ$, soit une valeur très proche de celle du viburnitol.

¹⁾ *Hérissey & Poirot*, loc. cit., ne mentionnent pas la présence de méso-inositol.

²⁾ *Th. Posternak*, Helv. 33, 350 (1950).

D'autre part, d'après nos déterminations, les points de fusion des deux substances et de leur mélange sont identiques; il en est de même des points de fusion des penta-acétates et de leur mélange. *Le viburnitol est donc identique au «quercitol lévogyre» de Gymnema sylvestre.*

Tableau I.

	<i>l</i> -Quercitol		Viburnitol	
	<i>Power & Tulin</i>	Nos déterminations	<i>Hérissey & Poirot</i>	Nos déterminations
Cyclitol libre:				
Eau de cristallisation	1 mol.	—	1 mol.	—
F.	174°	180–181° (corr.)	180–181° (corr.)	180–181° (corr.)
[α] _D dans l'eau ¹⁾ .	– 73,9° (c = 4,035)	– 49,5° ± 1,3° (t = 19°, c = 0,539)	– 49,5° (t = 18°, c = 2,0)	– 47,3° ± 1,3° (t = 19°, c = 0,551)
Penta-acétate:				
F.	124–125°	126° (corr.)	125,7° (corr.)	126° (corr.)

Bien que l'appellation de «*l*-quercitol» soit plus ancienne que celle de viburnitol, il conviendrait de ne plus l'employer en raison de son caractère erroné que nous avons signalé plus haut. Actuellement on ne connaît donc que deux cyclohexane-pentols naturels distincts, le *d*-quercitol et le viburnitol.

Viburnum tinus est une des rares plantes dans lesquelles on ait constaté la présence simultanée de deux cyclitols (viburnitol et inositol). Il nous a paru intéressant d'isoler les composés phospho-organiques acido-solubles de ses fruits pour voir s'il ne s'y trouverait pas des esters phosphoriques du viburnitol. Par hydrolyse acide, ces substances, qui sont localisées avant tout dans les graines, ne nous ont fourni que du méso-inositol. Chez *Viburnum tinus*, comme chez les autres plantes vertes examinées auparavant, ces composés phospho-organiques acido-solubles consistent donc essentiellement en esters inosito-phosphoriques²⁾.

Nous remercions vivement M. le Prof. *A. U. Däniker*, directeur du Jardin botanique de Zurich, pour l'envoi de feuilles fraîches de *Viburnum tinus*.

Partie expérimentale.

Extraction du viburnitol de Viburnum tinus.

A partir des feuilles. Cette extraction comporte d'après *Hérissey & Poirot*, les opérations suivantes pour les détails desquelles nous renvoyons au mémoire de ces auteurs: a) traitement des feuilles fraîches finement hâchées par l'eau bouillante; b) hydrolyse de l'extrait par trois heures d'ébullition en présence de 3% d'acide sulfurique; c) après élimination de l'acide sulfurique comme sulfate de calcium, fermentation des sucres par la

¹⁾ Rapportée au monohydrate C₆H₁₂O₅, H₂O.

²⁾ Ce qui n'exclut évidemment pas la présence de petites quantités de phosphates de viburnitol que nous n'aurions pu déceler.

levure de boulanger; d) défécation par l'acétate neutre de plomb; e) précipitation du viburnitol par le sous-acétate de plomb ammoniacal; f) décomposition du précipité par l'acide sulfurique; g) évaporation à sec de la solution aqueuse résultant de l'opération précédente et reprise par l'alcool fort à chaud; h) l'extrait alcoolique précédent additionné de sulfate de sodium est traité sous forme pulvérulente par l'acétone anhydre qui abandonne le viburnitol à l'état cristallin.

Nous avons renoncé à la dernière opération h) après avoir constaté qu'elle ne fournit que très difficilement tout le viburnitol présent, en raison de la solubilité insuffisante de la substance dans l'acétone anhydre. Par évaporation de l'alcool, après l'opération g), on obtient un sirop qui cristallise, parfois spontanément, et à coup sûr, si l'on amorce avec des cristaux de viburnitol. Après un repos de quelques jours au frais, on reprend par un peu d'alcool à 90% et on essore les cristaux. On les traite à l'ébullition par 80 parties d'alcool à 96% contenant 0,4% d'acide chlorhydrique et sépare par filtration, à chaud, de l'insoluble qui consiste essentiellement en méso-inositol. Les liqueurs filtrées déposent par refroidissement le viburnitol en belles aiguilles d'un aspect homogène qui, après recristallisation dans l'alcool à 96%, ont un point de fusion constant de 180—181° (corr.).

Le poids du méso-inositol séparé par filtration à chaud représente en général 10 à 15% de celui des cristaux primitifs, mais cette quantité ne constitue qu'un minimum, l'extraction par l'alcool lors de l'opération g) ne solubilisant qu'une partie du méso-inositol. Après recristallisation par dissolution dans l'eau suivie d'addition d'alcool, la substance fond à 223° (corr.); il en est de même du mélange avec un échantillon authentique de méso-inositol.

A partir de 1 kg de feuilles fraîches fournies en juin par les Jardins botaniques de Berne et de Zurich, nous avons obtenu 1,5—2,0 g de viburnitol. Des feuilles récoltées en juillet et octobre dans le voisinage de Lugano nous ont fourni 3,2—3,5 g par kg. Le rendement indiqué par *Hérissey & Poirot* (0,5 g par kg) est considérablement inférieur.

Nous n'avons pas trouvé de viburnitol dans les feuilles d'un autre représentant du genre, *Viburnum lantana*.

A partir des fruits. Nous sommes partis de fruits frais recueillis en octobre et novembre dans le voisinage de Lugano. Après passage à la machine à hâcher, ils furent chauffés 30 min. à l'ébullition à reflux avec 1 partie d'alcool à 96%. L'insoluble fut séché à l'air, puis finement moulu et extrait encore trois fois durant 30 min. par l'alcool à 96% à l'ébullition. Les liqueurs alcooliques réunies furent ensuite traitées comme indiqué par *Hérissey & Poirot*. De même que lors de l'extraction des feuilles, nous avons renoncé à l'opération h) et nous avons pu isoler le viburnitol par cristallisation directe. A partir de 1 kg de fruits frais nous avons obtenu 1,25 g de viburnitol.

Principes phospho-organiques acido-solubles des fruits.

L'insoluble restant après l'extraction des fruits par l'alcool chaud est séché à l'air, on le moule de nouveau et on l'extrait durant 10 heures à l'éther de pétrole dans un appareil à extraction continue. A partir de 1 kg de fruits frais contenant 0,10% P on obtient finalement 380 g d'une poudre à 0,21% P.

170 g de cette poudre sont agités trois heures, à la machine, avec 2500 cm³ d'acide pierique à 0,4%. L'extrait qui contient 97% du P primitif est précipité par l'acétate neutre de plomb. Après décomposition du précipité plombique par l'hydrogène sulfuré, filtration et aération, on neutralise par la soude caustique et précipite par l'acétate de baryum la majeure partie des composés phosphorés. Le précipité barytique contient 36% de phosphates minéraux. On l'en débarrasse par dissolution dans la quantité minimum d'acide chlorhydrique à 20% suivie de reprécipitation par l'alcool. On obtient ainsi 0,7 g d'une substance contenant 15,0% P. Sans chercher à en isoler des composés phospho-organiques définis, nous l'avons hydrolysée. 0,3 g ont été chauffés 8 heures en tube scellé, à 130°, avec 2 cm³ H₂SO₄ 0,65-n.; on alcalinise par l'hydroxyde de baryum, filtre, élimine les ions Ba⁺⁺ en excès par la quantité strictement nécessaire d'acide sulfurique et évapore à sec. Le résidu repris par l'alcool cristallise presque intégralement et fournit 32 mg de méso-inositol (F. et F. de mélange 223° corr.).

Purification du viburnitol.

Les méthodes microbiologiques décrites plus loin nous ont montré que tous nos échantillons de viburnitol, retirés aussi bien des feuilles que des fruits, contenaient 4–5% de méso-inositol; il en était de même d'un échantillon fourni par M. le Prof. *Hérissey*. Nous avons procédé à de nombreux essais afin d'éliminer le méso-inositol. La recrystallisation, dans diverses conditions, du viburnitol libre n'amena pas de purification notable. Les meilleurs résultats ont été obtenus par l'intermédiaire du penta-acétate. Ce dernier (F. 124° corr.) préparé d'après les indications de *Hérissey & Poirot*, est recrystallisé par dissolution dans 4 parties d'alcool bouillant suivie de refroidissement à 20°. Après 6 recrystallisations, le produit (F. 126° corr.) est désacétylé, dans les conditions habituelles, par l'hydroxyde de baryum méthylalcoolique. Le viburnitol ainsi obtenu a pratiquement le même F. qu'avant la purification, mais n'est guère plus actif, dans nos tests microbiologiques, que le «*l-querцитол*».

Une purification notable s'effectue également par l'intermédiaire du triacétate d'isopropylidène-viburnitol décrit dans un autre mémoire¹⁾; ce produit s'obtient malheureusement avec un rendement médiocre. Après plusieurs recrystallisations par dissolution dans l'éther acétique suivie d'addition de ligroïne, on chauffe 3 heures à reflux avec 20 parties d'un mélange de 3 vol. alcool et 1 vol. HCl concentré. On évapore ensuite à sec et recrystallise le viburnitol dans l'alcool à 96%.

Expériences microbiologiques.

Le méso-inositol est facteur de croissance essentiel ou complémentaire pour divers microorganismes (*Levures* ou *Champignons filamenteux*).

Grâce aux divers cyclitols préparés par l'un de nous (*Posternak*), une étude détaillée a pu être faite de la spécificité d'action de ce facteur vitaminique sur *Rhizopus suinus Nielsen* (= *Rh. Cohnii Berl. et de Toni*), *Champignon Phycomycète*²⁾, sur *Eremothecium Ashbyii Guill.*³⁾ et *Neurospora crassa Shaer et B. O. Dodge*, mutant «inositolless» de *Beadle*⁴⁾. Ces deux derniers sont des *Champignons Ascomycètes*.

Nous avons admis que la présence de 3 hydroxyles voisins en position *cis*, caractérisant le méso-inositol, est l'une des conditions de l'action vitaminique.

Le seyllo-méso-inosose (inosose biochimique obtenu par l'action d'*Acetobacter suboxydans* sur le méso-inositol) agit sur *Eremothecium*, mais pas sur *Neurospora*; nous admettons que seul le premier est capable de réduire le groupe C=O de l'inosose et de le transformer en méso-inositol. Le monophosphate d'inositol agit sur *Eremothecium* qui peut le déphosphoryler. *Neurospora* ne réagit à la présence du monophosphate d'inosite que si ce dernier a été stérilisé à chaud, l'autoclavage déterminant la déphosphorylation.

L'épi-méso-inosose (inosose chimique) et le québrachitol agissent faiblement sur les deux organismes.

D'une manière générale, le test *Neurospora* est plus spécifique que le test *Eremothecium*; nous avons utilisé ce dernier selon les prescriptions que nous avons établies, et *Neurospora* selon les données de *Beadle*⁵⁾, qui a isolé le mutant «inositolless». Le test *Saccharomyces cerevisiae* n'a pas été employé.

Le premier échantillon de viburnitol, du professeur *Hérissey*, étudié en 1945, s'est montré nettement actif comme facteur de croissance. Sa constitution étant différente de celle du méso-inositol, il faut admettre, ou bien que le test utilisé n'est pas spécifique, ou bien que le viburnitol est contaminé par du méso-inositol. L'expérience a montré que cette seconde possibilité doit être envisagée.

Nous indiquons ici quelques expériences caractéristiques, parmi de nombreuses autres.

¹⁾ *Th. Posternak*, *Helv.* **33**, 350 (1950).

²⁾ *W. H. Schopfer*, *Helv.* **27**, 468 (1944).

³⁾ *W. H. Schopfer*, *Helv.* **27**, 1017 (1944); *W. H. Schopfer*, *Th. Posternak & Mlle M. Guilloud*, *J. Microbiology and Serology*, **12**, 133 (1947).

⁴⁾ *W. H. Schopfer*, *Th. Posternak & Mlle M. L. Boss*, *Rev. int. de vitaminologie*, **20**, 121 (1948).

⁵⁾ *G. W. Beadle*, *J. Biol. Chem.*, **156**, 683 (1944).

1. *Examen de la substance de Gymnema sylvestre et du viburnitol II. Test Eremothecium Ashbyii.* Milieu de culture: par litre d'eau distillée, glucose 20 g, tartrate de NH_4 5 g, KH_2PO_4 1,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, vitamine B_1 400 γ , biotine 0,4 γ , L(+)-arginine et L(-)-leucine, chacune 10 mg. Sur ce milieu l'organisme se développe, mais faiblement; en présence de méso-inositol la production de matière vivante est considérablement augmentée. Les cultures sont récoltées au 9^e jour, pesées et les poids des contrôles sans méso-inositol déduits de ceux obtenus avec méso-inositol, viburnitol et substance de *G. sylvestre*.

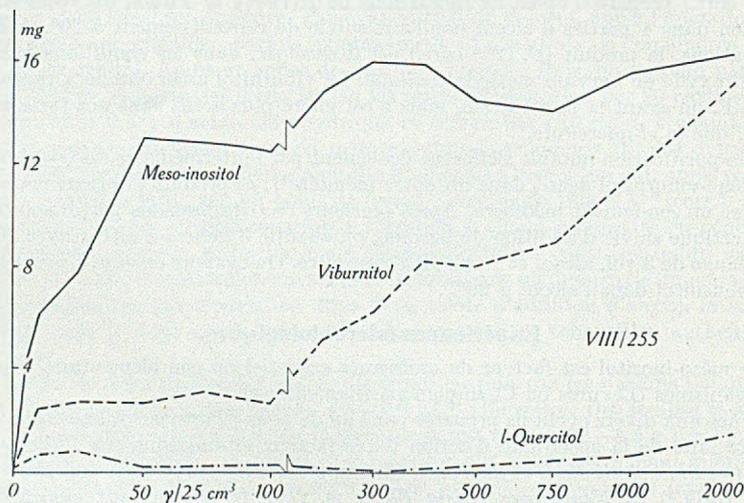


Fig. 1.

Action du méso-inositol, du viburnitol impur et du l-quercitol (de *Gymnema sylvestre*) sur *Eremothecium Ashbyii*.

Le graphique 1 indique l'effet marqué du viburnitol II, encore impur, et l'action extrêmement faible de la substance de *G. sylvestre*. L'irrégularité de la courbe ne permet pas de déterminer son taux éventuel en méso-inositol.

Le test *E. Ashbyii* donnant des résultats moins fidèles que le test *Neurospora*, nous avons dans la suite utilisé exclusivement ce dernier.

Remarquons, en passant, que la substance de *G. sylvestre*, sans agir sur le développement du microorganisme, augmente pourtant la production de riboflavine, caractéristique pour *E. Ashbyii*.

2. Examen de la substance de *G. sylvestre*. Test *Neurospora*; milieu de Beadle.

Le rapport entre la dose de cette substance et celle de méso-inositol produisant le même effet sur le champignon est de 245; la substance de *G. sylvestre* agit donc comme si elle contenait 0,41% de méso-inositol.

3. *Examen comparatif du viburnitol II, du viburnitol A (purifié comme penta-acétate¹) et B (purifié comme tri-acétate de l'acétone-viburnitol²).* Test *Neurospora*. Le graphique 2 indique que les échantillons A et B sont plus purifiés que l'échantillon II.

Viburnitol II:

250 γ	agissent comme 11,5 γ de méso-inositol; rapport	21,7
500 γ	agissent comme 24,5 γ de méso-inositol; rapport	20,4
	moenne	21,05

L'échantillon II contient 4,75% de méso-inositol.

¹) Recristallisé une fois dans l'eau et une fois dans l'alcool.

²) Recristallisé 2 fois (mélange éther acétique-ligroïne).

Viburnitol A:

500 γ agissent comme 11,5 γ de méso-inositol; rapport 43,4
 1000 γ agissent comme 20 γ de méso-inositol; rapport 50
 moyenne 46,7

L'échantillon A contient 2,14% de méso-inositol.

Viburnitol B:

500 γ agissent comme 7,5 γ de méso-inositol; rapport 66,7
 1000 γ agissent comme 15 γ de méso-inositol; rapport 66,7
 moyenne 66,7

L'échantillon B contient 1,5% de méso-inositol.

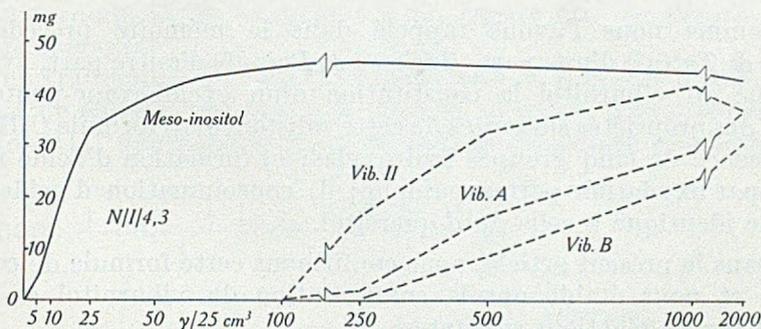


Fig. 2.

Action du méso-inositol et de trois échantillons de viburnitol à divers degrés de pureté sur *Neurospora crassa* «inositolless».

4. *Examen comparatif des viburnitols α et β* , le premier purifié comme penta-acétate¹⁾, le second comme tri-acétate de l'acéto-viburnitol²⁾. Test *Neurospora*.

L'échantillon α atteste un taux en méso-inositol de 0,45%, l'échantillon β de 0,875%. Ces échantillons sont donc hautement purifiés; les taux qu'ils fournissent sont de l'ordre de grandeur de celui livré par la substance de *G. sylvestre*.

En l'absence d'une réaction spécifique permettant de déceler de très petites quantités de substance, le test microbiologique, sensible et spécifique, contribue à la résolution d'un problème d'ordre chimique. Il rend évident la contamination de divers échantillons de viburnitol par du méso-inositol. Il contribue indirectement à démontrer l'identité du *l*-quercitol et du viburnitol. Son emploi s'impose lors de l'extraction du viburnitol de *Viburnum tinus* chez lequel la présence simultanée du viburnitol et du méso-inositol a été constatée, le second seul agissant sur nos tests.

RÉSUMÉ.

Le viburnitol extrait de *Viburnum tinus* L. est identique au *l*-quercitol de *Gymnema sylvestre* Br. A l'état dûment purifié il ne peut remplacer le méso-inositol comme facteur de croissance pour *Bremothecium Ashbyi* et pour le mutant «inositolless» de *Neurospora crassa*. Les composés phospho-organiques acido-solubles des fruits de *Viburnum tinus* consistent essentiellement en esters inosito-phosphoriques.

Lausanne, Laboratoire de Chimie organique de l'Université.
 Berne, Institut de Botanique et Jardin botanique de l'Université.

¹⁾ Recristallisé 6 fois dans l'alcool.

²⁾ Recristallisé 6 fois dans le mélange éther acétique-ligroïne.

51. Recherches dans la série des cyclitols XII.

Sur la configuration du viburnitol

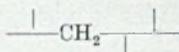
par Théodore Posternak.

(I II 50)

Comme nous l'avons rappelé dans le mémoire précédent¹⁾, *Power & Tutin*²⁾ d'une part, *Hérissey & Poirot*³⁾ d'autre part, avaient attribué au viburnitol la constitution d'un cyclohexane-pentol en raison des propriétés suivantes de cette substance: a) formule $C_6H_{12}O_5$; b) présence de cinq groupes hydroxyles; c) formation d'acide malonique par oxydation permanganique; d) consommation d'acide périodique identique à celle du *d*-quercitol.

Dans le présent article, nous confirmons cette formule de constitution et nous établissons la configuration du viburnitol en nous basant sur les réactions suivantes:

Après oxydation ménagée du viburnitol au moyen du permanganate alcalin, nous avons pu isoler de l'acide α -galacto-méta-saccharonique (I)⁴⁾. Nous l'avons caractérisé, entre autres, par son sel neutre de *S*-benzyl-thiuronium qui n'avait pas encore été décrit. Sa formation indique la présence dans le viburnitol du groupement



Le viburnitol se laisse oxyder facilement en un composé réducteur par *Acetobacter suboxydans*. Lorsqu'on agite une solution du cyclitol, dans une atmosphère d'oxygène, avec des bactéries lavées, on observe la consommation d'une demi molécule d'oxygène. Le cétose ainsi formé s'altère facilement lorsqu'on cherche à l'isoler. Nous l'avons réduit, à l'état brut, par l'amalgame de sodium en milieu acétique. Il se forme ainsi, avec un rendement de plus de 40%, une substance optiquement inactive identique au désoxy-scyllitol (VII)⁵⁾. Ce dernier avait été obtenu autrefois par hydrogénation du scyllo-ms-

¹⁾ *Th. Posternak & W. H. Schopfer*, *Helv.* **33**, 343 (1950).

²⁾ *F. B. Power & F. Tutin*, *Soc.* **85**, 624 (1904).

³⁾ *H. Hérissey & G. Poirot*, *J. pharm. chim.* [8] **26**, 385 (1937).

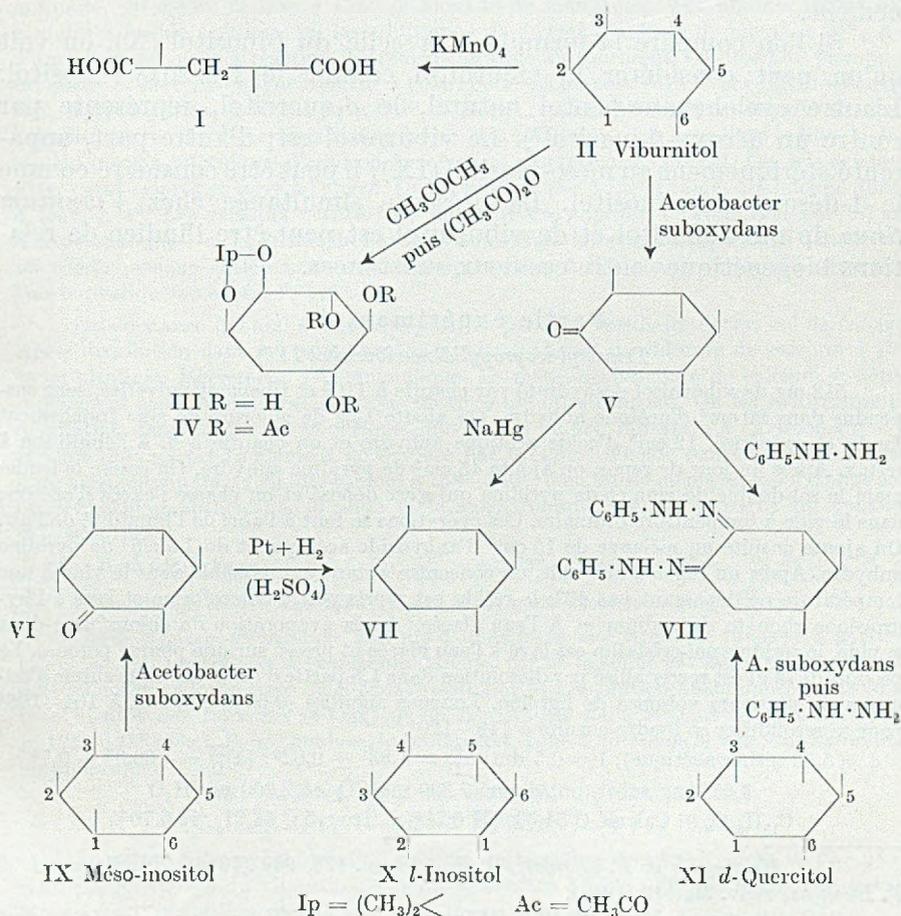
⁴⁾ Le même acide se forme par oxydation permanganique du *d*-quercitol (*Th. Posternak*, *Helv.* **15**, 948 (1932)).

⁵⁾ *Th. Posternak*, *Helv.* **24**, 1045 (1941). Dans cet article la substance était désignée sous le nom de désoxy-inositol; le terme de désoxy-scyllitol est préférable parce qu'univoque: la configuration du scyllitol est en effet telle qu'il n'existe qu'un seul désoxy-scyllitol.

inosose (VI) en milieu fortement acide; dans ces conditions le groupe carbonyle du cyclose est réduit en groupe méthylène. Vu son nouveau mode de formation, le désoxy-scyllitol ne peut différer du viburnitol que par la configuration d'un seul carbone. La formation d'acide méta-saccharonique (I) par oxydation du viburnitol n'est alors compatible qu'avec la formule II qui, en notation de *Lespiau-Maquenne*, est celle du 2,3,5/4,6-cyclohexane-pentol. Le cyclose obtenu par oxydation biochimique doit alors être représenté par la formule V (2,4/3,5-tétrahydroxy-cyclohexanone).

La formule II du viburnitol a pu encore être confirmée de la manière suivante:

Par traitement au moyen de l'acétone en présence d'acide acétique et de chlorure de zinc¹⁾ on obtient un mono-isopropylidène-viburnitol (III) que nous avons isolé comme triacétate cristallisé IV.



¹⁾ H. Meerwein, A. 455, 227 (1927); G. Dangschat, Naturwiss. 30, 146 (1942); H. E. Stavely, O. Wintersteiner, J. Fried, H. L. White & M. Moore, Am. Soc. 69, 2746 (1947).

Sa formation confirme la présence de deux hydroxyles vicinaux *cis*. Après désacétylation au moyen du méthylate de sodium, la substance consomme 2 molécules de periodate, ce qui est en accord avec la formule III qui contient 3 groupes hydroxyles voisins.

Par une action prolongée, à basse température, de la phénylhydrazine, le cyclose V fournit une osazone identique à celle qu'on obtient à partir du produit d'oxydation du *d*-quercitol (XI) par *Acetobacter suboxydans*¹⁾. L'identité des deux osazones a été établie par le F. de mélange, par la comparaison des rotations spécifiques et enfin par la comparaison des vitesses d'oxydation par l'acide periodique. La consommation finale est d'environ 2 molécules d'acide periodique. L'osazone en question ne peut répondre qu'à la formule VIII; cette dernière est identique à celle que *Magasanik & Chargaff* avaient déduite, pour le dérivé du *d*-quercitol, par un tout autre mode de raisonnement.

Si l'on compare la formule II à celle du *l*-inositol (X), on voit qu'on peut considérer le viburnitol comme le 1-désoxy-*l*-inositol. L'autre cyclohexane-pentol naturel, le *d*-quercitol, représente par contre un désoxy-*d*-inositol²⁾. Le viburnitol est, d'autre part, apparenté stériquement au méso-inositol (IX); il peut être considéré comme le 1-désoxy-méso-inositol. La présence simultanée chez *Viburnum tinus* de méso-inositol et de viburnitol est peut-être l'indice de relations biogénétiques entre ces deux substances.

Partie expérimentale.

*Triacétyl-isopropylidène-viburnitol IV*³⁾.

512 mg de viburnitol déshydraté par chauffe à 110° et finement pulvérisé, sont suspendus dans 90 cm³ d'acétone anhydre. On ajoute 12 g de chlorure de zinc fraîchement fondu et pulvérisé, 12 cm³ d'acide acétique anhydre et on chauffe 5 h. à l'ébullition à reflux. Après un jour de repos, on ajoute 45 cm³ de pyridine anhydre. On essore le lendemain le sel double de zinc et de pyridine qui s'est déposé et on chasse l'excès d'acétone dans le vide à température ordinaire. Ces opérations se font à l'abri de l'humidité de l'air. On ajoute ensuite un mélange de 15 cm³ d'anhydride acétique et de 7,5 cm³ de pyridine anhydre. Après un repos d'une nuit, on concentre autant que possible dans le vide à une température ne dépassant pas 40°; le résidu est repris par le chloroforme et lavé à l'hydrogencarbonate de sodium et à l'eau glacée. Après évaporation du chloroforme dans le vide, le résidu semi-cristallin est lavé à l'eau glacée et pressé sur une plaque poreuse. Le produit (0,78 g) est recristallisé par dissolution dans 1,5 partie d'éther acétique suivie d'addition de plusieurs volumes de ligroïne. Longues aiguilles (0,60 g) fondant à 104–105° pour se resolidifier et fondre ensuite à 118–120°.

$c = 5,52$ (éther acétique); $l = 0,5$ dm; $\alpha_D^{26} = 1,83^0 \pm 0,02^0$; $[\alpha]_D^{26} = -66,3^0 \pm 0,7^0$

3,675 mg subst. ont donné 7,300 mg CO₂ et 2,200 mg H₂O

C₁₅H₂₂O₈ Calculé C 54,53 H 6,71% Trouvé C 54,21 H 6,76%

¹⁾ *B. Magasanik & E. Chargaff*, J. Biol. Chem. **175**, 939 (1948); *Th. Posternak & F. Ravenna*, Helv. **30**, 442 (1947).

²⁾ *Th. Posternak*, Helv. **19**, 1008 (1936).

³⁾ Cf. *H. E. Stavely, O. Wintersteiner, J. Fried, H. L. White & M. Moore*, Am. Soc. **69**, 2746 (1947).

Désacétylation et oxydation périodique. Des quantités de l'ordre de 15 mg de triacétyl-isopropylidène-viburnitol sont chauffées 5 min. à l'ébullition à reflux avec 0,4 cm³ d'une solution 0,1-n. de méthylate de sodium dans l'alcool méthylique absolu. On reprend par 3 cm³ d'eau et ajoute 1 cm³ de méta-periodate de sodium 0,3-m. On laisse un temps déterminé à température ordinaire, puis on ajoute 2 cm³ d'hydrogénocarbonate de sodium 1-m. et un peu d'iode de potassium solide, et on titre l'excès de periodate par de l'arsenite de sodium 0,05-n.

Durée d'oxydation en minutes	30	60	150
Periodate consommé en mol. par mol. de substance	1,83	1,89	1,92

Acide méta-saccharonique (I) par oxydation du viburnitol.

2 g de viburnitol anhydre sont dissous dans 200 cm³ d'eau. On ajoute 0,6 cm³ de potasse caustique à 50% et refroidit dans un mélange réfrigérant jusqu'à début de formation de glace. En agitant continuellement, on introduit goutte à goutte, en l'espace de 2 h., 110 cm³ de permanganate de potassium à 3,2% (2,8 at. O actif); la température est maintenue à 0° durant toute cette opération. Après un repos de quelques heures à température ordinaire, on essore et lave à l'eau le bioxyde de manganèse. Les liquides réunis sont acidulés à l'acide acétique; on les additionne de 25 cm³ d'acétate de plomb à 25% puis d'ammoniaque jusqu'à réaction légèrement alcaline au tournesol. Le précipité plombique est essoré et lavé très soigneusement à l'eau; on le décompose ensuite par l'hydrogène sulfuré. Après aération, le filtrat du sulfure de plomb (volume 100 cm³) est chauffé 45 min. à l'ébullition avec 3 g de carbonate de calcium. Après filtration, on concentre le liquide dans le vide jusqu'à un volume d'environ 3 cm³ et on ajoute 6 cm³ d'alcool. Les sels calciques (0,9 g) sont essorés et lavés à l'alcool. On les reprend par 5 cm³ d'eau et abandonne durant 4 jours à 4°. Les cristaux séparés (95 mg) sont décomposés à l'ébullition par 0,7 cm³ d'acide oxalique 1-n. Le filtrat de l'oxalate de calcium laisse par évaporation dans le vide un résidu presque entièrement cristallisé qu'on lave à l'acétone pour le débarrasser de l'acide oxalique en excès. F. 145°.

La substance (20 mg) est ensuite purifiée par l'intermédiaire de son sel de calcium. Après dissolution dans 1,7 cm³ d'eau on ajoute 0,15 cm³ de chlorure de calcium à 10% et on alcalinise légèrement à l'ammoniaque. Le méta-saccharonate de calcium se sépare rapidement sous forme caractéristique de fines aiguilles centrées. On les recristallise par dissolution dans l'acide chlorhydrique dilué suivie de neutralisation à l'ammoniaque. Le produit (25 mg) est finalement décomposé par 0,74 cm³ d'acide oxalique 0,2-n. L'acide libre ainsi obtenu fond (chauffe rapide) à 158–160°; il en est de même de son mélange avec un échantillon authentique d'acide méta-saccharonique préparé à partir du galactose (F. 160–162°).

$$c = 3,03 \text{ (dans l'eau); } l = 0,5 \text{ dm; } \alpha_D^{20} = +0,33^\circ \pm 0,02^\circ; [\alpha]_D^{20} = +21,8^\circ \pm 1,3^\circ$$

Nous avons trouvé autrefois¹⁾ pour l'acide méta-saccharonique $[\alpha]_D^{15} = +23,1^\circ$.

Sel de S-benzyl-thiuronium. 23,4 mg d'acide méta-saccharonique préparés à partir du galactose sont neutralisés, à la phénolphthaléine, par de la soude caustique 0,5-n. On introduit 49 mg de chlorhydrate de S-benzyl-isothiourée. La solution abandonnée au froid dépose bientôt des tablettes (40 mg) qu'on recristallise dans 20 parties d'alcool à 80%. F. 176–178° (déc.). Pour l'analyse, le produit est séché à 80°, dans le vide, sur l'anhydride phosphorique.

3,960 mg subst. ont donné 0,372 cm³ N₂ (23°, 739 mm)

C₂₂H₃₀O₇N₄S₂ Calculé N 10,63% Trouvé N 10,53%

Le sel de S-benzyl-thiuronium préparé de la même manière à partir de l'acide obtenu par oxydation du viburnitol, fondait également à 176–178°, de même que son mélange avec l'échantillon précédent.

¹⁾ Th. Posternak, Helv. 15, 953 (1932).

Obtention et réduction en désoxy-scyllitol de la 3,5/4,6-tétrahydroxy-cyclohexanone V.

On prépare une culture d'Acetobacter suboxydans sur le milieu habituel d'eau de levure contenant 5% de sorbitol. Au bout de 3 jours, le liquide (volume 240 cm³) est centrifugé. Les bactéries sont lavées deux fois au moyen d'une solution glacée de chlorure de sodium à 0,9%¹⁾. Pour finir, on les remet en suspension dans 3 cm³ de chlorure de sodium et on les introduit dans une poire à hydrogène reliée à un réservoir gradué contenant de l'oxygène. On ajoute 100 mg de viburnitol et agite dans un bain, à 30°, après avoir déplacé l'air de l'appareil par de l'oxygène. Au bout de 8 h. la consommation d'oxygène qui atteint 7 cm³ (vol. réduit), soit environ 0,5 mol., a pratiquement cessé. On centrifuge et clarifie le liquide par filtration sur une couche de noir animal; il réduit la liqueur de *Fehling* à froid.

La solution de cyclose V ainsi obtenue (vol. 5 cm³) est additionnée de 1,1 cm³ d'acide acétique 1-n. et agitée jusqu'à cessation du dégagement d'hydrogène avec 0,9 g d'amalgame de sodium à 2,7%. Cette opération est répétée encore 4 fois. La solution, qui est restée continuellement acide, ne réduit plus la liqueur de *Fehling*. On l'évapore à sec; le résidu est introduit dans une éprouvette et desséché dans le vide à 100°. On ajoute 1,5 cm³ d'anhydride acétique et un morceau de chlorure de zinc anhydre et on maintient 5 min. à l'ébullition. On verse ensuite dans l'eau. Le précipité cristallin formé (140 mg; F. 175—180°) fournit par recristallisation dans l'alcool 90 mg d'aiguilles fondant à 188—189°; leur mélange avec du penta-acétate de désoxy-scyllitol²⁾ fond à la même température.

Ce dérivé acétylé fournit par saponification au moyen de l'hydroxyde de baryum méthylalcoolique, dans des conditions déjà décrites, du désoxy-scyllitol de F. et F. de mélange 233—235°. Examinée en solution à 4,4%, dans un tube de 0,5 dm, la substance se montre optiquement inactive.

3,865 mg subst. ont donné 6,200 mg CO₂ et 2,520 mg H₂O

C₆H₁₂O₅ Calculé C 43,90 H 7,37% Trouvé C 43,78 H 7,30%

Une solution du cyclose V s'obtient également lorsque Acetobacter suboxydans se développe sur un milieu formé d'eau de levure contenant 2,5% de viburnitol et 0,2% de sorbitol³⁾. Au bout de 8 jours le liquide de culture, qui réduit fortement la liqueur de *Fehling* à froid, est filtré sur du noir animal. Réduit par l'amalgame de sodium dans les conditions indiquées plus haut, il fournit du désoxy-scyllitol avec un rendement analogue au précédent.

Osazone VIII.

A partir du viburnitol. Un liquide de culture de 8 jours obtenu, comme nous l'avons indiqué ci-dessus, à partir de 100 mg de viburnitol est additionné de 0,8 cm³ d'un mélange de 1 vol. de phénylhydrazine et de 2 vol. d'acide acétique à 50%. Il se dépose immédiatement une matière résineuse suivie d'un précipité cristallin. Nous avons trouvé avantageusement de laisser le produit se former lentement à 4°. Au bout de 3 jours le poids des cristaux était de 80 mg; on ajoute 0,5 cm³ de la solution acétique de phénylhydrazine et abandonne encore une semaine; il se sépare encore 50 mg. Le produit est dissous dans 5 cm³ d'alcool bouillant; on concentre ensuite dans le vide à environ un tiers ce qui amène la séparation de longues et fines aiguilles jaunes (60 mg) qu'on recristallise de la même manière. F. 210—212° (déc.).

$c = 1,0$ (mélange de 1 vol. pyridine + 1 vol. alcool); $l = 0,5$ dm.

Après 15 min.: $\alpha_D = +0,48^\circ \pm 0,02^\circ$; $[\alpha]_D = +96^\circ \pm 4^\circ$

Après 7 heures: $\alpha_D = +0,33^\circ \pm 0,02^\circ$; $[\alpha]_D = +66^\circ \pm 4^\circ$.

3,795 mg subst. ont donné 8,840 mg CO₂ et 2,00 mg H₂O

2,690 mg subst. ont donné 0,402 cm³ N₂ (24°, 732 mm)

C₁₈H₂₀O₃N₄ Calculé C 63,51 H 5,92 N 16,46%

Trouvé „ 63,57 „ 5,90 „ 16,54%

¹⁾ Cf. B. Magasanik & E. Chargaff, J. Biol. Chem. 174, 183 (1948).

²⁾ Th. Posternak, Helv. 24, 1045 (1941).

³⁾ Cf. Th. Posternak & F. Ravenna, Helv. 30, 445 (1947).

Oxydation périodique. Des quantités d'osazone de l'ordre de 10 mg sont dissoutes dans 10 cm³ d'alcool à 60%. On ajoute 10 cm³ d'acide périodique 0,012-m. et laisse à l'étuve, à 30°. Après un temps déterminé on introduit 3 cm³ d'hydrogénocarbonate de sodium 1-m. et un peu d'iodeure de potassium solide et on titre l'excès de periodate par l'arsénite de sodium 0,05-n.

Durée d'oxydation en minutes 40 60 210

Acide périodique consommé en mol. par mol. d'osazone 2,1 2,2 2,3

A partir du d-quercitol. Le *d*-quercitol a été soumis à l'action d'Acetobacter suboxydans dans les conditions indiquées pour le viburnitol. La préparation de l'osazone à partir d'une culture de 8 jours a été effectuée de la même manière et avec des rendements analogues. Fines aiguilles jaunes fondant à 208—210° (déc.); leur mélange avec l'osazone obtenue à partir du viburnitol fond à la même température.

$c = 0,8$ (mélange de 1 vol. pyridine + 1 vol. alcool); $l = 0,5$ dm.

Après 15 min.: $\alpha_D = +0,42^\circ \pm 0,02^\circ$; $[\alpha]_D = +105^\circ \pm 5^\circ$.

Après 7 heures: $\alpha_D = +0,25^\circ \pm 0,02^\circ$; $[\alpha]_D = +62,5^\circ \pm 5^\circ$ 1).

2,790 mg subst. ont donné 0,419 cm³ N₂ (19°, 712 mm)

C₁₈H₂₀O₃N₄ Calculé N 16,46% Trouvé N 16,49%

Nous avons comparé les vitesses d'oxydation par l'acide périodique des osazones des deux origines dans des conditions analogues à celles décrites par *Magasanik & Chargaff*; ces vitesses ont été trouvées identiques dans les limites d'erreurs expérimentales. On introduit 1,0 mg d'osazone dissous dans 2 cm³ d'alcool dans un mélange de 60 cm³ H₂SO₄ 0,2-n. et de 1 cm³ NaIO₄ 0,013-m. Après un temps déterminé, on ajoute 12 cm³ d'une solution saturée de KHCO₃ et un peu de KI solide et on titre par l'arsénite de sodium 0,01-n.

Température	Durée d'oxydation en min.	Quantité d'acide périodique en mol. consommée par mol. d'osazone dérivée du	
		Viburnitol	<i>d</i> -Quercitol
18°	5	0,66	0,66
18°	30	1,04	1,04
18°	1110	1,47	1,53
30°	1320	2,37	2,28 ²⁾

RÉSUMÉ.

L'auteur décrit diverses réactions montrant que le viburnitol représente le 2,3,5/4,6-cyclohexane-pentol.

Lausanne, Laboratoire de Chimie organique
de l'Université.

1) *B. Magasanik & E. Chargaff*, *J. Biol. Chem.* 175, 939 (1948), qui indiquent $[\alpha]_D = +62^\circ$, n'ont probablement observé que la rotation finale.

2) *B. Magasanik & E. Chargaff*, loc. cit., qui n'indiquent pas la température, observèrent une consommation de 2,35 mol. HIO₄ au bout de 24 heures.

52. Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes.

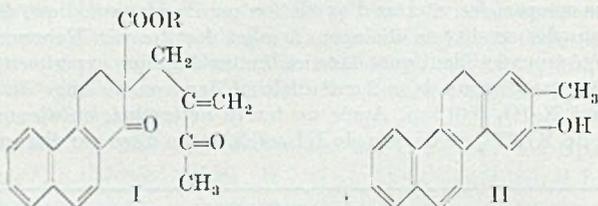
53. Mitteilung¹⁾.

3,4-Dimethyl-2,6-polymethylen-phenole

von V. Prelog, P. Barman und M. Zimmermann.

(I. II. 50.)

Nach A. J. Wilds & C. H. Shunk²⁾ entsteht durch Kondensation von 2-Carbomethoxy-1-keto-tetrahydro-phenanthren mit der quaternären Base aus 1,1-Bis-(diäthylamino-methyl)-aceton der ungesättigte δ -Diketo-carbonsäure-ester I, der durch Cyclisierung mit Alkalien oder Säuren in das Phenol II übergeht.



Als wir die analoge Reaktion mit einer vielgliedrigen Verbindung, dem Cyclopentadecanon-(2)-carbonsäure-(1)-ester (III, $n = 15$) durchführten, erhielten wir ein Phenol, dem die Formel V ($n = 15$) zukommt³⁾. Die Reaktion verlief also verschieden, je nachdem ob der als Ausgangsmaterial dienende cyclische β -Keto-ester 6gliedrig oder 15gliedrig war. Im ersten Falle reagierte die im Ring sitzende Carbonyl-Gruppe mit der reaktiven Methyl-Gruppe in der Seitenkette unter Bildung eines 1,2-kondensierten Systems, im zweiten das Carbonyl der Seitenkette mit dem reaktiven Methylen im Ring, wobei ein in 1,3-Stellung überbrücktes Benzol-Derivat entstand.

Es stellte sich nun die Frage, welches die kleinste Brücke ist, mit der man in diesem besonderen Falle die *m*-Stellung noch überbrücken kann. Zur Beantwortung dieser Frage kondensierten wir die Cyclanon-(2)-carbonsäure-(1)-ester III mit 6, 7, 8, 9 und 13gliedrigem Ring auf gleiche Weise mit der quaternären Base aus 1,1-Bis-(diäthylamino-methyl)-aceton wie das höhere Ringhomologe mit 15gliedrigem Ring und cyclisierten die erhaltenen monocyclischen ungesättigten δ -Diketo-carbonsäure-ester IV mit Salzsäure in Eisessig.

Wenn das monocyclische Ausgangsprodukt 6 oder 7gliedrig war, entstanden dabei bicyclische Endprodukte, deren Eigenschaften mit

¹⁾ 52. Mitt. Helv. 32, 2088 (1949).

²⁾ Am. Soc. 65, 471 (1943).

³⁾ V. Prelog, M. M. Wirth & L. Ruzicka, Helv. 29, 1429 (1946).

der Konstitution VI im besten Einklang stehen. Das Absorptionsspektrum im UV. (vgl. Fig. 1, Kurve 2) zeigt die für Phenole charakteristische Absorptionsbande. Die Verbindungen sind löslich in Natronlauge und geben mit 3,5-Dinitro-benzoylchlorid kristalline Ester. Bei der Oxydation nach *Kuhn-Roth* konnte etwa 0,8 Mol. Essigsäure gefunden werden.

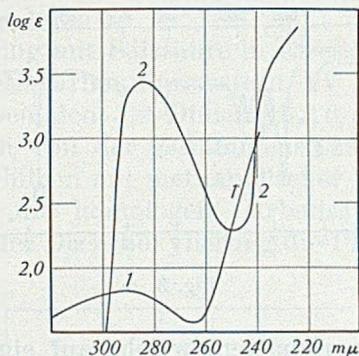


Fig. 1.

Die Eigenschaften der Cyclisierungsprodukte mit 8, 9 und 13gliedrigem Ring sind dagegen ähnlich denjenigen der früher hergestellten 15gliedrigen Verbindung. Es handelt sich demnach um 3,4-Dimethyl-2,6-polymethylen-phenole (V). Die für Phenole charakteristische Absorptionsbande im UV. (vgl. Fig. 2, Kurve 2) ist

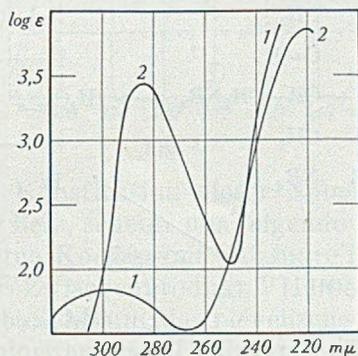


Fig. 2.

ebenso wie im Absorptionsspektrum der niedrigeren Homologen vorhanden, die für die Hydroxyl-Gruppe und für den Benzol-Kern charakteristischen Absorptionsbanden sind auch im IR.-Absorptionsspektrum (vgl. Fig. 3) sichtbar. Die Verbindungen sind dagegen in Natronlauge unlöslich und lassen sich nicht acylieren. Für die Konstitution V spricht insbesondere das Ergebnis der Oxydation nach *Kuhn-Roth*, wobei 1,5 Mol Essigsäure entstehen.

Die kleinste m-Brücke ist in diesem Falle 5gliedrig, der entsprechende grosse Ring 8gliedrig. Bei früheren Versuchen, die in m-Stellung überbrückten 2,6-Polymethylen-4-nitrophenole¹⁾ herzustellen, war die kleinste m-Brücke 6gliedrig, der grosse Ring 9gliedrig. Das niedrigere Ringhomologe liess sich zwar herstellen,

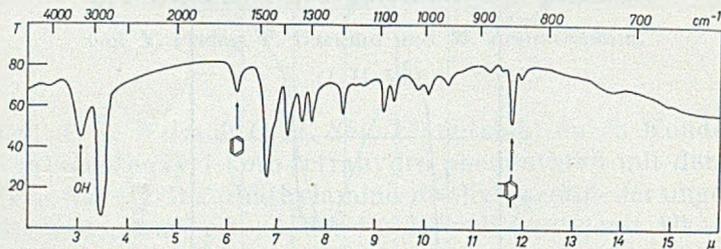
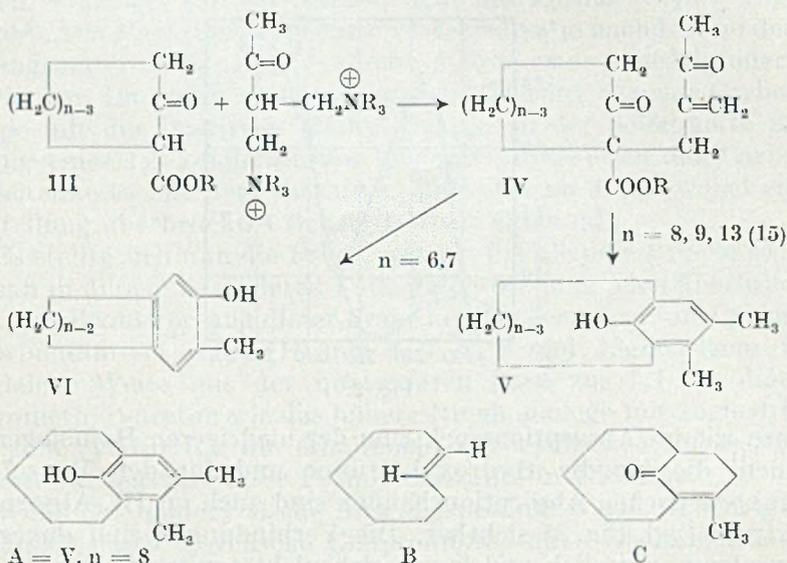


Fig. 3.

es besitzt jedoch Eigenschaften, welche auf eine nicht aromatische tautomere Konstitution hinweisen. Es scheint, dass bei den 2,6-Polymethylen-4-nitrophenolen eine nicht aromatische Struktur wegen Mesomerie viel stabiler ist als bei den 3,4-Dimethyl-2,6-polymethylenphenolen, so dass nur im ersteren Falle die auf Modellen feststellbare Ringspannung, welche durch die 5gliedrige m-Brücke erzeugt wird, genügt, um das System zu desaromatisieren und dadurch zu entspannen.



¹⁾ V. Prelog & K. Wiesner, *Helv.* **30**, 1465 (1947); V. Prelog, K. Wiesner, W. Ingold & O. Häfliger, *Helv.* **31**, 1325 (1948).

Wir möchten noch daran erinnern, dass in letzter Zeit zwei weitere Verbindungen bekannt geworden sind, bei welchen ähnliche Spannungsverhältnisse herrschen wie bei dem 3,4-Dimethyl-2,6-pentamethylenphenol (A). *K. Ziegler*¹⁾ ist es gelungen, das trans-Cyclo-octen (B) herzustellen, und in unserem Laboratorium wurde festgestellt, dass man im formellen Widerspruch zur *Bredt'schen* Regel das ungesättigte Keton C noch erhalten kann²⁾.

Bei der Behandlung mit Salzsäure in Eisessig entstehen aus den ungesättigten δ -Diketo-carbonsäure-estern IV mit einem 8 bzw. 9gliedrigen Ring neben den 3,4-Dimethyl-2,6-polymethylenphenolen (V) Verbindungen von der Zusammensetzung $C_{15}H_{21}O_3Cl$ bzw. $C_{16}H_{23}O_3Cl$. Durch Erhitzen mit methanolischer Kalilauge bilden sich aus diesen letzteren die homologen Carbonsäuren $C_{14}H_{20}O_4$ bzw. $C_{15}H_{22}O_4$, welche bei der Decarboxylierung die Phenole $C_{13}H_{20}O_2$ bzw. $C_{14}H_{22}O_2$ liefern.

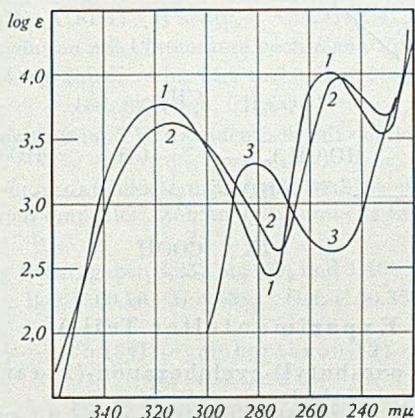


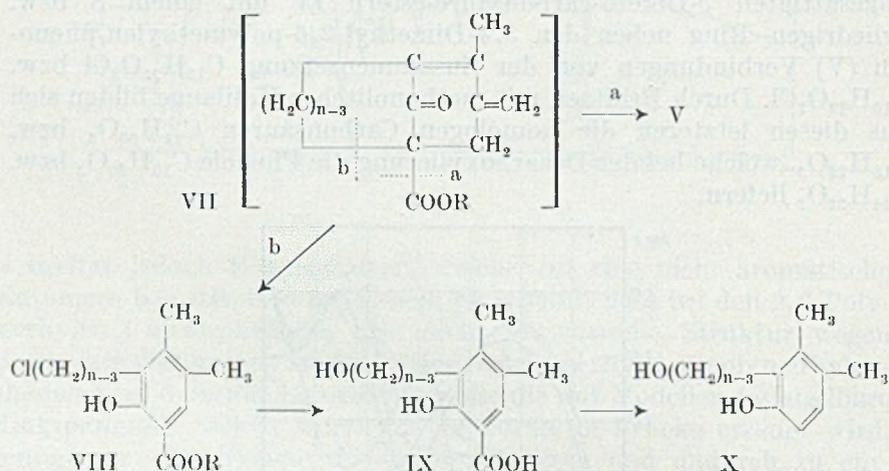
Fig. 4.

Obwohl sich die Konstitution dieser Nebenprodukte nicht mit Sicherheit bestimmen liess, scheint uns folgende Interpretation wahrscheinlich zu sein. Durch Kochen mit Salzsäure in Eisessig bildet sich aus IV ein bicyclisches Zwischenprodukt VII, welches entweder unter Verseifung und Decarboxylierung das bicyclische Phenol V liefert oder unter Ringöffnung Chlorwasserstoff anlagert und in einen monocyclischen Phenol-o-carbonsäure-ester VIII von der allgemeinen Bruttoformel $C_nH_{2n-9}O_3Cl$ übergeht. Diese letztere ungewöhnliche Reaktion findet anscheinend nur dann statt, wenn das bicyclische System gespannt ist. Beim 6, 7, 13 und 15gliedrigen Ausgangsmaterial konnten analoge Nebenprodukte nicht beobachtet werden. Den Carbon-

¹⁾ Vortrag vor der Zürcher Chem. Gesellschaft, Dezember 1949. Vgl. auch *W. Hückel*, Theoretische Grundlagen der organischen Chemie, 6. Aufl., Leipzig 1949, S. 87.

²⁾ *V. Prelog, L. Ruzicka, P. Barman & L. Frenkiel*, Helv. 31, 92 (1948); *V. Prelog, P. Barman & M. Zimmermann*, Helv. 32, 1284 (1949).

säuren, welche aus den chlorhaltigen Nebenprodukten durch methanolische Kalilauge entstehen, würde demnach die Formel IX und den Phenolen die Formel X zukommen. Im Einklang mit einer solchen Interpretation stehen die Absorptionsspektren im UV. (vgl. Fig. 4). Die Absorptionsspektren der Verbindungen, welchen wir die Formeln VIII und IX zuschreiben, weisen auf o-Phenol-carbonsäure-ester bzw. o-Phenol-carbonsäuren hin, während die Decarboxylierungsprodukte die für Phenole typischen Absorptionsbanden zeigen.



Experimenteller Teil¹⁾.

1-(β -Methylen- γ -oxo-butyl)-cyclohexanon-(2)-carbonsäure-(1)-methylester (IV, $n = 6$).

10 g Cyclohexanon-(2)-carbonsäure-(1)-äthylester wurden durch kurzes Erwärmen mit einer Lösung von 1,35 g Natrium in 50 cm³ absolutem Methanol und 50 cm³ absolutem Benzol in das Natrium-Derivat übergeführt und in der Kälte mit dem Jodmethylat aus 20 g 1,1-Bis-(diäthylamino-methyl)-aceton in 50 cm³ absolutem Methanol versetzt.

Das 1,1-Bis-(diäthylamino-methyl)-aceton wurde nach *A. L. Wilds & C. H. Shunk*²⁾ hergestellt. Das erhaltene Produkt zeigte einen Sdp._{12mm} 122° und ein $n_D^{20} = 1,466$. Im Hochvakuum ging es als farblose Flüssigkeit vom Sdp._{0,1mm} 84—86° über. Das Jodmethylat wurde durch Mischen von 1 Teil 1,1-Bis-(diäthylamino-methyl)-aceton mit 2 Teilen Methyljodid auf gleiche Weise wie das Jodmethylat des 4-Diäthylamino-butanons-(2) hergestellt, das Reaktionsgemisch wurde jedoch 24 Stunden statt 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Nachdem man das Reaktionsgemisch über Nacht stehen gelassen hatte, wurde es 6 Stunden am Rückfluss gekocht und darauf wie gewöhnlich aufgearbeitet. Neben 3,5 g des nicht reagierten β -Keto-esters erhielt man 6,94 g eines dicken, bald erstarrenden Öles vom Sdp._{0,1mm} 106—110°. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther

¹⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert. Die Absorptionsspektren im UV. wurden in alkoholischer Lösung mit dem *Beckman*-Spektrophotometer gemessen. Das Absorptionsspektrum im IR. ist in Nujol-Suspension mit dem *Baird*-Spektrographen aufgenommen.

²⁾ *Am. Soc.* 65, 472 (1943).

zeigte das Produkt einen Smp. von 84,5°. Zur Analyse wurde 24 Stunden bei 50° im Hochvakuum getrocknet.

3,998 mg Subst. gaben 9,652 mg CO₂ und 2,722 mg H₂O

3,458 mg Subst. verbr. 4,346 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃

C₁₃H₁₈O₄ Ber. C 65,53 H 7,61 OCH₃ 13,02% Gef. C 65,84 H 7,62 OCH₃ 13,00%

Es liegt demnach der Methylester vor, welcher sich durch Umesterung während der Kondensation in Methanol bildete.

Das Absorptionsspektrum im UV. war mit demjenigen des nächsthöheren Homologen (n = 7) praktisch identisch.

6-Methyl-3,4-tetramethylen-phenol [6-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-naphthol-(7)] (VI, n = 6).

4 g der Verbindung IV (n = 6) wurden mit 150 cm³ Eisessig und 35 cm³ konz. Salzsäure 30 Stunden am Rückfluss im Stickstoffstrom gekocht. Bei der Aufarbeitung erhielt man aus den Natronlauge-Auszügen 0,41 g eines Phenols, welches nach zweimaligem Umlösen aus Äther-Petroläther bei 87° schmolz. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 70° sublimiert.

3,776 mg Subst. gaben 11,266 mg CO₂ und 2,940 mg H₂O

C₁₁H₁₄O Ber. C 81,44 H 8,70% Gef. C 81,42 H 8,71%

Oxydation mit Chromsäure nach *Kuhn-Rohr*:

45,4 mg Subst. verbr. 21,9 cm³ 0,01-n. NaOH

Gef. 0,78 Äqu. CH₃COOH

Das Absorptionsspektrum im UV. war identisch mit demjenigen des nächsthöheren Homologen.

Das 3,5-Dinitro-benzoat bildete nach Umkristallisieren aus Chloroform-Petroläther farblose Kristalle vom Smp. 192°. Zur Analyse wurde 24 Stunden bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

3,734 mg Subst. gaben 8,257 mg CO₂ und 1,465 mg H₂O

C₁₈H₁₆O₆N₂ Ber. C 60,66 H 4,53% Gef. C 60,36 H 4,39%

1-(β-Methylen-γ-oxo-butyl)-cycloheptanon-(2)-carbonsäure-(1) (IV, n = 7).

Methylester: Aus 5 g Cycloheptanon-(2)-carbonsäure-(1)-äthylester erhielt man nach der bei der Herstellung des niedrigeren Homologen angegebenen Vorschrift 4,7 g eines dickflüssigen Öles vom Sdp._{0,1 mm} 110–115° (*Hickman*-Kolben). Das Produkt kristallisierte nach mehreren Tagen und wurde durch Umlösen aus Petroläther gereinigt; Smp. 51°. Zur Analyse wurde 48 Stunden bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet.

3,902 mg Subst. gaben 9,466 mg CO₂ und 2,792 mg H₂O

3,370 mg Subst. verbr. 4,050 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃

C₁₄H₂₀O₄ Ber. C 66,64 H 7,99 OCH₃ 12,30%

Gef. „ 66,40 „ 8,01 „ 12,42%

Es hatte demnach auch hier eine Umesterung stattgefunden. Das Absorptionsspektrum im UV. ist in Figur 1, Kurve 1, dargestellt.

Äthylester: Mit absolutem Äthylalkohol als Lösungsmittel liess sich ein Öl gewinnen, welches in einem *Widmer*-Kolben rektifiziert wurde: Sdp._{0,08 mm} 106–110°; n_D²⁰ = 1,505.

3,657 mg Subst. gaben 9,035 mg CO₂ und 2,642 mg H₂O

C₁₅H₂₂O₄ Ber. C 67,64 H 8,33% Gef. C 67,42 H 8,08%

6-Methyl-3,4-pentamethylen-phenol (VI, n = 7).

4,45 g der Verbindung IV (n = 7) wurden mit 160 cm³ Eisessig und 40 cm³ konz. Salzsäure 30 Stunden im Stickstoffstrom am Rückfluss gekocht. Die Aufarbeitung ergab

0,78 g eines öligen Phenols, welches über 20 g Aluminiumoxyd (Aktivität II—IV) chromatographiert wurde. Aus den Benzol-Eluaten liessen sich 0,58 g einer kristallinen Verbindung gewinnen, die nach zweimaligem Umlösen aus Äther-Petroläther bei 80° schmolz. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 70° sublimiert; Smp. 82°.

3,543 mg Subst. gaben 10,597 mg CO₂ und 2,886 mg H₂O
 C₁₂H₁₀O Ber. C 81,77 H 9,15% Gef. C 81,62 H 9,12%

Oxydation mit Chromsäure nach *Kuhn-Roth*:

56 mg Subst. verbr. 25,8 cm³ 0,01-n. NaOH
 Gef. 0,81 Äqu. CH₃COOH

Das Absorptionsspektrum im UV. ist in Figur 1, Kurve 2, dargestellt.

Das 3,5-Dinitrobenzoat schmolz nach dreimaligem Umkristallisieren aus Chloroform-Petroläther bei 151°. Zur Analyse wurde 24 Stunden im Hochvakuum bei 90° getrocknet.

3,801 mg Subst. gaben 8,626 mg CO₂ und 1,640 mg H₂O
 C₁₉H₁₈O₆N₂ Ber. C 61,61 H 4,90% Gef. C 61,93 H 4,83%

1-(β-Methylen-γ-oxo-butyl)-cyclooctanon-(2)-carbonsäure-(1)-methylester (IV, n = 8).

Aus 8 g Cyclooctanon-(2)-carbonsäure-(1)-methylester konnten neben 0,85 g des Ausgangsproduktes, 6,5 g eines nach einigem Stehen erstarrenden Öles vom Sdp._{0,1 mm} 116—121° erhalten werden. Zur Analyse wurde dreimal aus Petroläther bei niedriger Temperatur (Trockeneis) umgelöst. Die kleinen, farblosen Nadeln vom Smp. 57° wurden 30 Stunden im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

3,970 mg Subst. gaben 9,822 mg CO₂ und 2,952 mg H₂O
 C₁₅H₂₂O₄ Ber. C 67,64 H 8,33% Gef. C 67,52 H 8,32%

Absorptionsspektrum im UV.: Figur 2, Kurve 1.

3,4-Dimethyl-2,6-pentamethylen-phenol (V, n = 8).

3,62 g der Verbindung IV (n = 8) gaben nach 30stündigem Kochen im Stickstoffstrom mit 140 cm³ Eisessig und 35 cm³ konz. Salzsäure nach der Aufarbeitung 2,5 g eines Öles, welches über 80 g Aluminiumoxyd (Aktivität II) chromatographiert wurde. Aus den ersten Benzol-Eluaten konnten 0,91 g einer kristallinen, in Natronlauge nicht löslichen Verbindung isoliert werden, welche nach zweimaligem Umkristallisieren aus Petroläther bei 124° schmolz. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 100° sublimiert.

3,969 mg Subst. gaben 11,913 mg CO₂ und 3,430 mg H₂O
 C₁₃H₁₈O Ber. C 82,06 H 9,54% Gef. C 81,91 H 9,67%

Oxydation mit Chromsäure nach *Kuhn-Roth*:

18,6 mg Subst. verbr. 12,9 cm³ 0,01-n. NaOH
 Gef. 1,32 Äqu. CH₃COOH

Absorptionsspektrum im UV.: Figur 2, Kurve 2.

Absorptionsspektrum im IR.: Figur 3.

Die Verbindung gab unter üblichen Bedingungen kein 3,5-Dinitrobenzoat.

Verbindung C₁₅H₂₁O₃Cl (VIII, n = 8).

Bei einem weiteren Ansatz erhielt man aus 5 g der Verbindung IV (n = 8) 3,45 g eines Öles vom Sdp._{0,1 mm} 110—125°, welches über 80 g Aluminiumoxyd (Aktivität III) chromatographiert wurde. Aus den öligen Petroläther-Eluaten (2,56 g) konnte man bei niedriger Temperatur (Trockeneis) feine, farblose Kristalle vom Smp. 60° isolieren. Zur Analyse wurde 48 Stunden im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

3,720 mg Subst. gaben 8,609 mg CO₂ und 2,474 mg H₂O
 3,640 mg Subst. gaben 1,870 mg AgCl

C₁₅H₂₁O₃Cl Ber. C 63,26 H 7,43 Cl 12,45% Gef. C 63,16 H 7,44 Cl 12,70%

Absorptionsspektrum im UV.: Figur 4, Kurve 1.

Verbindungen $C_{14}H_{20}O_4$ (IX, $n = 8$) und $C_{13}H_{20}O_2$ (X, $n = 8$).

202 mg der Verbindung VIII ($n = 8$) wurden 4 Stunden mit 15 cm^3 10-proz. methanolischer Kalilauge unter Stickstoff gekocht. Bei der Aufarbeitung erhielt man 161 mg einer Säure, die nach dreimaligem Umlösen aus Petroläther farblose Kristalle vom Smp. 96° bildete. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 80° sublimiert.

3,955 mg Subst. gaben 9,670 mg CO_2 und 2,910 mg H_2O
 $C_{14}H_{20}O_4$ Ber. C 66,64 H 7,99% Gef. C 66,72 H 8,23%

Absorptionsspektrum im UV.: Figur 4, Kurve 2.

600 mg dieser Verbindung wurden mit 2 cm^3 Chinolin bei 240° decarboxyliert. Die übliche Aufarbeitung gab 455 mg eines Rohproduktes, aus welchem durch chromatographische Reinigung 208 mg eines kristallisierten Phenols gewonnen werden konnten. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 60° sublimiert; Smp. 66° .

3,891 mg Subst. gaben 10,744 mg CO_2 und 3,508 mg H_2O
 $C_{13}H_{20}O_2$ Ber. C 74,96 H 9,68% Gef. C 75,35 H 10,09%

Absorptionsspektrum im UV.: Figur 4, Kurve 3.

1-(β -Methylen- γ -oxo-butyl)-cyclononanon-(2)-carbonsäure-(1)-methylester (IV, $n = 9$).

Die auf gleiche Weise wie bei dem niedrigeren Homologen durchgeführte Kondensation ergab aus 5 g Cyclononanon-(2)-carbonsäure-(1)-methylester 4,85 g eines Öles vom Sdp. $_{0,1\text{ mm}}$ $135\text{--}139^\circ$, welches bei niedriger Temperatur (Trockeneis) aus Petroläther kristallisierte. Zur Analyse wurde das Produkt dreimal umgelöst und 36 Stunden bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet; Smp. 58° .

3,716 mg Subst. gaben 9,343 mg CO_2 und 2,897 mg H_2O
 $C_{16}H_{24}O_4$ Ber. C 68,54 H 8,63% Gef. C 68,61 H 8,72%

3,4-Dimethyl-2,6-hexamethylen-phenol (V, $n = 9$).

2,35 g der Verbindung IV ($n = 9$) wurden mit 100 cm^3 Eisessig und 25 cm^3 konz. Salzsäure im Stickstoffstrom 30 Stunden am Rückfluss gekocht. Das rohe Reaktionsprodukt, 1,68 g, wurde in Petroläther gelöst und über 50 g Aluminiumoxyd (Aktivität III—IV) chromatographiert. Die Petroläther-Eluate lieferten aus demselben Lösungsmittel bei niedriger Temperatur (Trockeneis) 0,88 g der Verbindung $C_{16}H_{23}O_3Cl$ (siehe weiter unten).

Die Benzol-Eluate gaben 0,72 g einer kristallinen, in Natronlauge nicht löslichen Verbindung, die nach Umkristallisieren aus Petroläther bei 102° schmolz. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 80° sublimiert.

3,674 mg Subst. gaben 11,083 mg CO_2 und 3,256 mg H_2O
 $C_{14}H_{20}O$ Ber. C 82,30 H 9,87% Gef. C 82,32 H 9,92%

Das Produkt besass ein für Phenole charakteristisches Absorptionsspektrum, das mit dem Absorptionsspektrum des niedrigeren Homologen praktisch übereinstimmte. Mit 3,5-Dinitro-benzoyl-chlorid konnte keine Reaktion festgestellt werden.

Verbindung $C_{16}H_{23}O_3Cl$ (VIII, $n = 9$).

Die bei der Herstellung von 3,4-Dimethyl-2,6-hexamethylen-phenol erhaltenen farblosen Kristalle wurden noch dreimal aus Petroläther bei niedriger Temperatur (Trockeneis) umgelöst; Smp. 38° . Zur Analyse wurde 48 Stunden im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

3,871 mg Subst. gaben 9,113 mg CO_2 und 2,718 mg H_2O
 $C_{16}H_{23}O_3Cl$ Ber. C 64,31 H 7,76% Gef. C 64,24 H 7,85%

Das Absorptionsspektrum im UV. war mit demjenigen des niedrigeren Homologen praktisch identisch.

Verbindungen $C_{15}H_{22}O_4$ (IX, $n = 9$) und $C_{14}H_{22}O_2$ (X, $n = 9$).

1,02 g der Verbindung VIII ($n = 9$) wurden 4 Stunden mit 30 cm³ 10-proz. methanolischer Kalilauge unter Stickstoff gekocht. Das Reaktionsgemisch lieferte nach der Aufarbeitung 0,81 g einer Säure, die nach Umkristallisation und Sublimation im Hochvakuum bei 105° schmolz.

3,558 mg Subst. gaben 8,803 mg CO₂ und 2,612 mg H₂O
 $C_{15}H_{22}O_4$ Ber. C 67,64 H 8,33% Gef. C 67,52 H 8,22%

560 mg der Säure wurden mit 2 cm³ Chinolin während 15 Minuten auf 240° erhitzt. Das Decarboxylierungsprodukt wurde wie üblich aufgearbeitet. Es liessen sich dabei 210 mg Kristalle gewinnen, welche aus Petroläther umgelöst und zur Analyse im Hochvakuum bei 70° sublimiert wurden; Smp. 88°.

3,939 mg Subst. gaben 10,892 mg CO₂ und 3,478 mg H₂O
 $C_{14}H_{22}O_2$ Ber. C 75,63 H 9,98% Gef. C 75,46 H 9,88%

Die in alkoholischer Lösung aufgenommenen Absorptionsspektren der beiden Verbindungen waren praktisch identisch mit denjenigen der niedrigeren Homologen.

3,4-Dimethyl-2,6-decamethylen-phenol (V, $n = 13$).

Das Natriumsalz aus 6 g Cyclotridecanon-(2)-carbonsäure-(1)-methylester wurde wie gewöhnlich mit dem Jodmethylat aus 8 g 1,1-Bis-(diäthylamino-methyl)-aceton kondensiert und aufgearbeitet. Es liessen sich dabei neben 0,75 g Ausgangsprodukt, 4,7 g eines gelben, dickflüssigen Öles vom Sdp._{0,1 mm} 145—150° gewinnen, welches auch nach mehrmaligem Destillieren nicht analysenrein war.

2,98 g dieses Öles wurden mit 120 cm³ Eisessig und 30 cm³ konz. Salzsäure 30 Stunden unter Stickstoff gekocht. Die mit verdünnter Natronlauge, verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschenen Benzolanszüge hinterliessen beim Eindampfen 2,2 g eines dunkelbraunen Öles vom Sdp._{0,05 mm} 135—138° (Hickman-Kolben). 1,1 g davon wurden in Petroläther gelöst und an 35 g Aluminiumoxyd (Aktivität III—IV) chromatographiert. Die kristallinen Petroläther-Eluate, 575 mg, liessen sich bei niedriger Temperatur (Trockeneis) aus Petroläther umkristallisieren und wurden zur Analyse im Hochvakuum bei 40° sublimiert; Smp. 45,5°.

3,664 mg Subst. gaben 11,131 mg CO₂ und 3,549 mg H₂O
 $C_{18}H_{28}O$ Ber. C 83,02 H 10,84% Gef. C 82,90 H 10,84%

Oxydation mit Chromsäure nach *Kuhn-Roth*:

37 mg Subst. verbr. 21,65 cm³ 0,01-n. NaOH
 Gef. 1,51 Äqu. CH₃COOH

Das Absorptionsspektrum im UV. war praktisch identisch mit den Absorptionsspektren der niedrigeren Homologen.

Die Analysen wurden in unserer mikro-analytischen Abteilung von Herrn W. Manser ausgeführt.

Zusammenfassung.

Durch Kondensation von Cyclanon-(2)-carbonsäure-(1)-estern mit der quaternären Base aus 1,1-Bis-(diäthylamino-methyl)-aceton wurden ungesättigte δ -Diketo-carbonsäure-ester IV mit 6, 7, 8, 9 und 13gliedrigem Ring erhalten. Diese cyclisierte man mit Salzsäure in Eisessig, wobei sich aus den 6 und 7gliedrigen monocyclischen Ausgangsprodukten 3,4-Polymethylen-phenole VI, aus denjenigen mit 8, 9 und 13 Ringgliedern dagegen 2,6-Polymethylen-phenole V bildeten.

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

53. Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes.

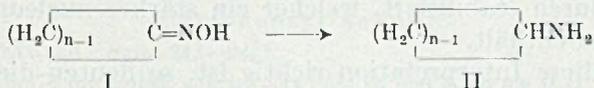
54. Mitteilung¹⁾.

Vielgliedrige Cycloalkyl-amine

von V. Prelog, M. Fausy El-Newehy und O. Häfliger.

(1. II. 50.)

Um einen weiteren Beitrag zur Kenntnis des Einflusses der Ringgrösse auf chemische Eigenschaften der vielgliedrigen Ringverbindungen zu liefern²⁾, stellten wir die Reihe der ringhomologen Cycloalkyl-amine (II) mit 6 bis 18 Ringgliedern her und bestimmten ihre Dissoziationskonstanten in 80-proz. Methylcellosolve.



Die ringhomologen Cycloalkyl-amine, von welchen früher die Vertreter mit 6, 7, 8 und 15 Ringgliedern bekannt waren³⁾, wurden durch Reduktion der Cyclanon-oxime (I) mit Natrium und absolutem Alkohol bereitet und in Form ihrer Hydrochloride verwendet. Zur Charakterisierung hat man von höheren Ringhomologen von Cyclooctyl-amin aufwärts die Pikrate hergestellt.

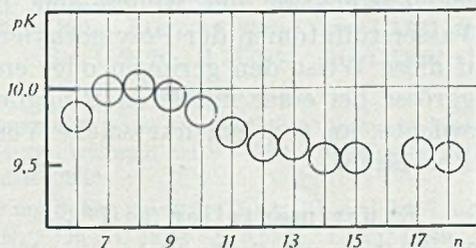


Fig. 1.

Die in Figur 1 wiedergegebenen Dissoziationskonstanten pK'_A wurden durch elektrometrische Mikrotitration der Cycloalkyl-ammonium-chloride in 80-proz. Methylcellosolve mit Hilfe einer Glaselektrode gemessen⁴⁾. Als Titrationslösung diente eine etwa 0,1-n. Tetramethylammoniumhydroxyd-Lösung. Die Ringgrösse besitzt bei Cycloalkyl-aminen einen nur geringen Einfluss auf die Basizität.

¹⁾ 53. Mitt. Helv. 33, 356 (1950).

²⁾ Vgl. Helv. 31, 877, 1325 (1948); 32, 256, 544, 1187, 2088 (1949).

³⁾ Vgl. L. Ruzicka, M. W. Goldberg & M. Hürbin, Helv. 16, 1340 (1933).

⁴⁾ W. Ingold, Helv. 29, 1929 (1946).

Am stärksten basisch sind die 7 bis 9gliedrigen Ringhomologen. Sie unterscheiden sich jedoch von den am wenigsten basischen höheren Cycloalkyl-aminen mit mehr als 12 Ringgliedern nur um 0,5 pK-Einheiten.

Wir haben in früheren Mitteilungen¹⁾ den oft erstaunlich grossen Einfluss der Ringgrösse auf Reaktionsgleichgewichte, bei welchen vielgliedrige Verbindungen mit einer mittleren Ringgliederzahl (8—12) beteiligt sind, folgendermassen zu deuten versucht. Es wurde auf Grund theoretischer Überlegungen und Modellbetrachtungen angenommen, dass bei den letzterwähnten Verbindungen gewisse Konstellationen bevorzugt sind, bei welchen die Wasserstoffatome der Polymethylenkette und die nucleophilen Reaktionsstellen räumlich sehr nahe stehen und deshalb in Wechselwirkung treten. Wenn die vielgliedrigen Verbindungen als Ausgangs- und Endprodukte an einem Reaktionsgleichgewicht beteiligt sind, so wird derjenige Reaktionspartner dadurch stabilisiert, welcher ein stärker nucleophiles Reaktionszentrum enthält.

Wenn diese Interpretation richtig ist, so deuten die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung darauf hin, dass eine solche Beeinflussung des Gleichgewichtes nur dann stattfindet, wenn das nucleophile Zentrum an einem koordinativ dreiwertigen Ringatom sitzt, wie z. B. der Sauerstoff der Carbonyl-Gruppe in Cyclanonon, oder selbst ein Ringglied ist, wie der Stickstoff in Polymethylen-aminen. Sitzt dagegen das nucleophile Zentrum an einem koordinativ vierwertigen Ringatom, wie der Stickstoff in Cycloalkyl-aminen, so kann es bei jeder Konstellation des Ringes eine Lage annehmen, welche von den Wasserstoffatomen der Polymethylen-Kette entfernt ist. Man kann auf diese Weise den geringen oder entgegengesetzten Einfluss der Ringgrösse bei einer mittleren Ringgliederzahl auf die Reaktionsgleichgewichte, an welchen nur solche Verbindungen teilnehmen, plausibel erklären.

Experimenteller Teil²⁾.

Herstellung von Cycloalkyl-aminen³⁾.

Zu einer siedenden Lösung von Cyclanon-oxim⁴⁾ in abs. Alkohol (entsprechend 10- bis 15facher Menge an verwendetem Natrium; aquametrisch⁵⁾ 99,98-proz.) wurden 12 bis 18 Äquivalente Natrium rasch zugegeben. Nach dem Abklingen der heftigen Reaktion erhitzte man das Gemisch unter Rückfluss im Ölbad bis zur Auflösung des Natriums.

Zur Isolierung der Amine wurde mit verdünnter Salzsäure auf Kongorot angesäuert und der Alkohol im Vakuum abdestilliert. Bei den niedrigeren Ringhomologen bis etwa zum Cycloundecyl-amin waren die Hydrochloride in kaltem Wasser so gut löslich, dass man zur Entfernung des unreduzierten Oxims die wässrige Lösung mit Äther ausschütteln

¹⁾ Vgl. besonders *Helv.* **32**, 1187 (1949).

²⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

³⁾ Vgl. *Helv.* **16**, 1340 (1933).

⁴⁾ Vgl. *Helv.* **32**, 547 (1949).

⁵⁾ Vgl. *J. Mitchell jr.* und *D. M. Smith*, *Aquametry*, New York und London 1948.

konnte, worauf die Base aus der wässrigen Lösung des Hydrochlorids mit 40-proz. Natronlauge in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen wurde. Die Hydrochloride der höheren Ringhomologen vom Cyclododecyl-amin aufwärts fielen beim Ansäuern zusammen mit dem Ausgangsmaterial aus und wurden abgenutscht. Den Niederschlag kochte man mit Äther aus und vereinigte ihn dann mit der wässrigen Lösung, worauf wieder durch Zusatz von 40-proz. Natronlauge die freie Base erhalten wurde. Die niedrigeren Cycloalkyl-amine, welche nach dem Eindampfen der mit Natriumsulfat getrockneten ätherischen Lösung zurückblieben, wurden destilliert, die höheren von Cyclotridecyl-amin aufwärts führte man direkt in die Salze über.

Die Hydrochloride stellte man durch Eindampfen einer mit methanolischer Salzsäure neutralisierten methanolischen Lösung der Base her. Sie wurden, wenn nichts anderes vermerkt, aus Methanol-Äther umkristallisiert.

Einzelne Verbindungen.

Cyclohexyl-amin¹⁾.

Hydrochlorid: Smp. 206—207°.

3,794 mg Subst. gaben 7,384 mg CO₂ und 3,507 mg H₂O
 C₆H₁₄NCl Ber. C 53,13 H 10,40% Gef. C 53,11 H 10,34%

Cycloheptyl-amin¹⁾.

Hydrochlorid: Smp. 242—246°.

3,874 mg Subst. gaben 7,944 mg CO₂ und 3,706 mg H₂O
 C₇H₁₆NCl Ber. C 56,17 H 10,75% Gef. C 55,96 H 10,70%

Cyclooctyl-amin²⁾.

Aus 3 g Cyclooctanon-oxim erhielt man 1,8 g Amino-cyclooctan (67% d. Th.), das im Wasserstrahlvakuum bei 80—90° (Badtemperatur) destillierte.

Pikrat: Smp. 193—194°.

3,645 mg Subst. gaben 6,316 mg CO₂ und 1,900 mg H₂O
 C₁₄H₂₀O₇N₄ Ber. C 47,19 H 5,66% Gef. C 47,29 H 5,83%

Hydrochlorid: Smp. 242—244°. Aus Alkohol-Essigester-Äther umkristallisiert.

3,646 mg Subst. gaben 7,819 mg CO₂ und 3,561 mg H₂O
 C₈H₁₈NCl Ber. C 58,70 H 11,08% Gef. C 58,52 H 10,93%

Cyclononyl-amin.

Aus 1,8 g Cyclononanon-oxim wurden 1,0 g Amino-cyclononan (61% d. Th.) erhalten, das im Wasserstrahlvakuum bei 80—100° (Badtemperatur) destillierte.

Pikrat: Smp. 219—221°.

4,770 mg Subst. gaben 8,477 mg CO₂ und 2,457 mg H₂O
 C₁₅H₂₂O₇N₄ Ber. C 48,64 H 5,99% Gef. C 48,49 H 5,76%

Hydrochlorid: Smp. 197—201°.

Cyclododecyl-amin.

1,5 g Cyclododecanon-oxim gaben 1,0 g Amino-cyclododecan (73% d. Th.), das im Wasserstrahlvakuum bei 100—130° (Badtemperatur) übergang.

Pikrat: Smp. 239° (Zers.).

3,748 mg Subst. gaben 6,870 mg CO₂ und 2,116 mg H₂O
 C₁₆H₂₄O₇N₄ Ber. C 49,99 H 6,29% Gef. C 50,02 H 6,31%

Hydrochlorid: Smp. 177—178°.

3,742 mg Subst. gaben 8,581 mg CO₂ und 3,815 mg H₂O
 C₁₀H₂₂NCl Ber. C 62,64 H 11,57% Gef. C 62,59 H 11,41%

¹⁾ Vgl. *Beilstein*, Handbuch IV. Aufl., Bd. XII, S. 5.

²⁾ Vgl. *Helv.* 16, 1340 (1933).

Cycloundecyl-amin.

2 g Oxim gaben 1,1 g Base (60% d. Th.), die im Wasserstrahlvakuum bei 130—140° (Badtemperatur) destillierte.

Pikrat: Smp. 237—239°.

3,864 mg Subst. gaben 7,271 mg CO₂ und 2,295 mg H₂O
 C₁₇H₂₆O₇N₄ Ber. C 51,25 H 6,58% Gef. C 51,35 H 6,65%

Hydrochlorid: Aus Alkohol-Essigester-Äther umkristallisiert, Smp. 212—214°.

3,827 mg Subst. gaben 8,992 mg CO₂ und 4,007 mg H₂O
 C₁₁H₂₄NCl Ber. C 64,20 H 11,76% Gef. C 64,12 H 11,72%

Cyclododecyl-amin.

Aus 1,85 g Oxim wurden 1,3 g Base (76% d. Th.) erhalten, die im Wasserstrahlvakuum bei 140—150° (Badtemperatur) destillierten.

Pikrat: Smp. 232—234°.

3,706 mg Subst. gaben 7,120 mg CO₂ und 2,252 mg H₂O
 C₁₈H₂₈O₇N₄ Ber. C 52,42 H 6,84% Gef. C 52,43 H 6,80%

Hydrochlorid: Smp. 274—275° (aus Alkohol umgelöst).

3,740 mg Subst. gaben 8,970 mg CO₂ und 3,938 mg H₂O
 C₁₂H₂₆NCl Ber. C 65,57 H 11,92% Gef. C 65,45 H 11,78%

Cyclotridecyl-amin.

1,85 g Cyclotridecanon-oxim gaben 0,8 g Base, die direkt in das Pikrat und Hydrochlorid übergeführt wurden.

Pikrat: Smp. 197—199°.

3,786 mg Subst. gaben 7,420 mg CO₂ und 2,409 mg H₂O
 C₁₉H₃₀O₇N₄ Ber. C 53,49 H 7,09% Gef. C 53,54 H 7,12%

Hydrochlorid: Smp. 285—286°.

3,754 mg Subst. gaben 9,179 mg CO₂ und 4,022 mg H₂O
 C₁₃H₂₈NCl Ber. C 66,71 H 12,06% Gef. C 66,73 H 11,99%

Cyclotetradecyl-amin.

Aus 1,8 g Cyclotetradecanon-oxim wurden 1,0 g (60% d. Th.) Amin erhalten.

Pikrat: Smp. 194,5—197,5°.

3,748 mg Subst. gaben 7,499 mg CO₂ und 2,445 mg H₂O
 C₂₀H₃₂O₇N₄ Ber. C 54,53 H 7,32% Gef. C 54,62 H 7,29%

Hydrochlorid: Zersetzung bei 300°.

3,676 mg Subst. gaben 9,146 mg CO₂ und 3,972 mg H₂O
 C₁₄H₃₀NCl Ber. C 67,84 H 12,20% Gef. C 67,90 H 12,09%

Cyclopentadecyl-amin¹⁾.

Aus 2,2 g Cyclopentadecanon-oxim wurden 1,2 g Amin (57% d. Th.) erhalten.

Pikrat: Smp. 171—173°.

3,660 mg Subst. gaben 7,437 mg CO₂ und 2,455 mg H₂O
 C₂₁H₃₄O₇N₄ Ber. C 55,49 H 7,54% Gef. C 55,45 H 7,51%

Hydrochlorid: Smp. gegen 300° (Zersetzung).

3,762 mg Subst. gaben 9,485 mg CO₂ und 4,130 mg H₂O
 C₁₅H₃₂NCl Ber. C 68,79 H 12,32% Gef. C 68,81 H 12,26%

¹⁾ Helv. 16, 1341 (1933).

Cycloheptadecyl-amin.

1,8 g Cycloheptadecanon-oxim gaben 0,85 g Base (50% d. Th.).

Pikrat: Smp. 162—164°.

3,664 mg Subst. gaben 7,680 mg CO₂ und 2,600 mg H₂O

C₂₃H₃₈O₇N₄ Ber. C 57,24 H 7,94% Gef. C 57,20 H 7,94%

Hydrochlorid: Smp. 270—280°.

3,749 mg Subst. gaben 9,665 mg CO₂ und 4,166 mg H₂O

C₁₇H₃₆NCl Ber. C 70,42 H 12,52% Gef. C 70,35 H 12,44%

Cyclooctadecyl-amin.

Pikrat: Smp. 156—157°.

3,962 mg Subst. gaben 8,438 mg CO₂ und 2,936 mg H₂O

C₂₄H₄₀O₇N₄ Ber. C 58,04 H 8,12% Gef. C 58,12 H 8,29%

Hydrochlorid: Smp. gegen 260° (Zersetzung, aus Alkohol oder Alkohol-Äther unkristallisiert).

3,789 mg Subst. gaben 9,889 mg CO₂ und 4,201 mg H₂O

C₁₈H₃₈NCl Ber. C 71,12 H 12,60% Gef. C 71,22 H 12,41%

Die Dissoziationskonstanten der Cycloalkyl-amine
in 80-proz. Methyl-cellosolve.

Verbindung	(Ringglieder- zahl, n)	pK'
Cyclohexyl-amin	(6)	9,8 ₂
Cycloheptyl-amin	(7)	9,9 ₀
Cyclooctyl-amin	(8)	10,0 ₁
Cyclononyl-amin	(9)	9,9 ₅
Cyclodecyl-amin	(10)	9,8 ₅
Cycloundecyl-amin	(11)	9,7 ₁
Cyclododecyl-amin	(12)	9,6 ₂
Cyclotridecyl-amin	(13)	9,6 ₃
Cyclotetradecyl-amin	(14)	9,5 ₁
Cyclopentadecyl-amin	(15)	9,5 ₁
Cycloheptadecyl-amin	(17)	9,5 ₇
Cyclooctadecyl-amin	(18)	9,5 ₁

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

Zusammenfassung.

Durch Reduktion der Cyclanon-oxime mit Natrium und absolutem Alkohol wurden Cycloalkyl-amine mit 6 bis 18 Ringgliedern hergestellt. Von den hergestellten ringhomologen Cycloalkylaminen wurden die Dissoziationskonstanten in 80-proz. Methylcellosolve gemessen. Der Einfluss der Ringgrösse auf die Basizität der Cycloalkyl-amine ist gering.

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

54. Über Steroide und Sexualhormone.

167. Mitteilung¹⁾.Eine neue Synthese des $\Delta^{5,17,20}$ - 3β -Oxy-pregnadien-21-als

von H. Heusser, K. Eichenberger und Pl. A. Plattner.

(I. II. 50.)

Pregnan-Derivate, deren Seitenkette am Kohlenstoffatom 17 als α, β -ungesättigte Aldehyd-Gruppierung (vgl. Formel V) vorliegt, sind schon öfters beschrieben und nach verschiedenen Methoden bereitet worden. *Miescher, Wettstein & Scholz*²⁾ erhielten Aldehyde von diesem Typus (vgl. V) durch Oxydation von Allylalkoholen der Formel I mit Dichromat-Schwefelsäure oder Chromtrioxyd-Eisessig. Die gleichen Autoren²⁾ konnten die Verbindung Va auch durch Abspaltung von Wasser aus dem Oxy-aldehyd II oder durch Ozonisation des $\Delta^{5-17\alpha}$ -Allyl-androsten-diols-($3\beta, 17\beta$) (III), unter vorübergehendem Schutz der Kerndoppelbindung, bereiten. *Reich*³⁾ zeigte, dass Allylbromide der Konstitution IV nach der Methode von *Kröhnke*⁴⁾⁵⁾ ebenfalls in α, β -ungesättigte Aldehyde (Va) verwandelt werden können. Schliesslich gelang es *Fuchs & Reichstein*⁶⁾, dieselbe Verbindung Va durch Oxydation der am Kohlenstoffatom 21 isomeren Glykole VI bzw. VIa mit Perjodsäure zu bereiten. Alle diese Methoden führen zwar zum gewünschten Ziel, sind jedoch zur Herstellung grösserer Mengen des Aldehyds V nicht sehr bequem, hauptsächlich weil die als Ausgangsmaterial verwendeten Verbindungen (I—IV und VI) z. T. nur auf Umwegen und relativ schwer zugänglich sind.

Neuere Versuche⁷⁻¹¹⁾ auf dem Gebiet des Vitamins A haben gezeigt, dass die Umsetzung von Äthoxy-acetylen bzw. dessen *Grignard*-Verbindung mit Ketonen in guter Ausbeute Äthoxy-äthynyl-carbinole liefert. Aus diesen können α, β -ungesättigte Aldehyde — durch selektive Hydrierung zu Äthoxyvinyl-carbinolen und anschliessende saure Hydrolyse — leicht gewonnen werden.

1) 166. Mitt. Helv. 32, 2475 (1949).

2) K. Miescher, A. Wettstein & C. Scholz, Helv. 22, 894 (1939).

3) H. Reich, Helv. 23, 219 (1940).

4) F. Kröhnke & E. Bröner, B. 69, 2006 (1936).

5) F. Kröhnke, B. 71, 2583 (1938).

6) H. G. Fuchs & T. Reichstein, Helv. 24, 804 (1941).

7) D. A. van Dorp & J. F. Arens, Nature 160, 189 (1947).

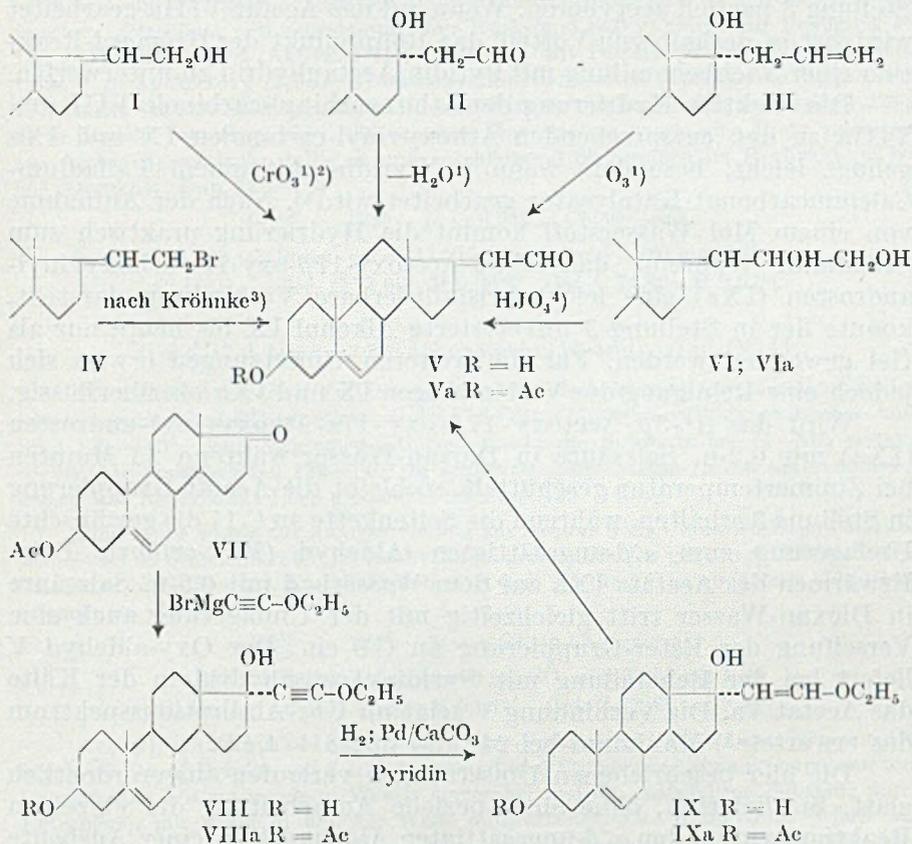
8) J. F. Arens & D. A. van Dorp, R. 68, 604 (1949).

9) W. Graham, D. A. van Dorp & J. F. Arens, R. 68, 609 (1949).

10) J. Heilbron, E. R. M. Jones, M. Julia & B. C. L. Weedon, Soc. 1949, 1823.

11) Vgl. auch Th. L. Jacobs, R. Cramer & J. E. Hanson, Am. Soc. 64, 223 (1942).

Unseres Wissens ist die Umsetzung von Steroid-Ketonen mit Äthoxy-acetylen bisher nicht beschrieben worden. Es ist uns nun gelungen, diese Reaktion auch mit solchen Ketonen durchzuführen.



Äthoxy-acetylen, welches nach der Vorschrift von Heilbron⁵⁾ leicht zugänglich ist, wurde mit Äthylmagnesiumbromid zur entsprechenden Grignard-Verbindung umgesetzt und mit $\Delta^{5-3\beta}$ -Acetoxy-17-keto-androsten (VII) in Reaktion gebracht. Das Rohprodukt der Umsetzung besteht aus einem Gemisch von $\Delta^{5-3\beta}$, 17 β -Dioxy-17 α -äthoxyäthynyl-androsten (VIII)⁶⁾ und dessen Acetat VIIIa.

¹⁾ K. Miescher, A. Wettstein & C. Scholz, Helv. **22**, 894 (1939).

²⁾ Diese Reaktion wurde mit dem im Ring A α, β -ungesättigten Keton vom Typus des Progesterons durchgeführt.

³⁾ H. Reich, Helv. **23**, 219 (1940).

⁴⁾ H. G. Fuchs & T. Reichstein, Helv. **24**, 804 (1941).

⁵⁾ J. Heilbron, E. R. M. Jones, M. Julia & B. C. L. Weedon, Soc. **1949**, 1823.

⁶⁾ Da in allen bis heute untersuchten Fällen die Umsetzung von 17-Keto-Steroiden mit Grignard-Verbindungen in der Hauptreaktion zu 17 β -Oxy-17 α -alkyl-Derivaten führt [vgl. z. B. L. F. Fieser & M. Fieser, Exper. **4**, 285 (1948)] wird auch der Verbindung VIII die Konfiguration eines 17 β -Oxy-Steroids zugeteilt.

Die beiden Verbindungen lassen sich auf chromatographischem Wege leicht trennen und können in einer Gesamtausbeute von über 65% gewonnen werden. Die 3,17-Dioxy-Verbindung VIII lässt sich in Stellung 3 partiell acetylieren. Wenn auf das Acetat VIIIa gearbeitet wird, ist es deshalb von Vorteil, das Rohprodukt der *Grignard*-Reaktion einer Nachbehandlung mit Pyridin-Acetanhydrid zu unterwerfen.

Die selektive Hydrierung der Äthoxyäthynyl-carbinole VIII und VIIIa zu den entsprechenden Äthoxyvinyl-carbinolen IX und IXa gelingt leicht, besonders wenn in Pyridin mit einem Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator gearbeitet wird¹⁾. Nach der Aufnahme von einem Mol Wasserstoff kommt die Hydrierung praktisch zum Stillstand. Während das Δ^5 -3 β -Acetoxy-17 β -oxy-17 α -äthoxyvinyl-androsten (IXa) eine leicht kristallisierbare Verbindung darstellt, konnte der in Stellung 3 unveresterte Alkohol IX bis heute nur als Gel gewonnen werden. Für die weiteren Umsetzungen erwies sich jedoch eine Reinigung der Verbindungen IX und IXa als überflüssig.

Wird das Δ^5 -3 β -Acetoxy-17 β -oxy-17 α -äthoxyvinyl-androsten (IXa) mit 0,2-n. Salzsäure in Dioxan-Wasser während 25 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt, so bleibt die Acetat-Gruppierung in Stellung 3 erhalten, während die Seitenkette an C 17 die gewünschte Umlagerung zum α,β -ungesättigten Aldehyd (Va) erfährt. Beim Erwärmen des Acetats IXa auf dem Wasserbad mit 0,5-n. Salzsäure in Dioxan-Wasser tritt gleichzeitig mit der Umlagerung auch eine Verseifung der Ester-Gruppierung an C 3 ein. Der Oxy-aldehyd V liefert bei der Behandlung mit Pyridin-Acetanhydrid in der Kälte das Acetat Va. Die Verbindung V zeigt im UV.-Absorptionsspektrum das erwartete²⁾ Maximum bei 244 m μ (log ϵ = 4,42).

Die hier beschriebenen Umsetzungen verlaufen ausserordentlich glatt. Sie lieferten, ohne eine spezielle Ausarbeitung der einzelnen Reaktionsstufen, den α,β -ungesättigten Aldehyd V in einer Ausbeute von 40%, bezogen auf das Ausgangsmaterial Δ^5 -3 β -Acetoxy-17-keto-androsten (VII). Damit ist das Ziel dieser Arbeit, nämlich eine präparativ günstige Synthese von α,β -ungesättigten Aldehyden des Typus V, erreicht.

Der *Rockefeller Foundation* in New York und der *CIBA Aktiengesellschaft* in Basel danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil³⁾.

Δ^5 -3 β -Acetoxy-17 β -oxy-17 α -äthoxyäthynyl-androsten (VIIIa).

Zu einer *Grignard*-Lösung — bereitet aus 2,18 g Magnesiumspänen, 9,81 g Äthylbromid und 50 cm³ Äther — wurden unter gutem Umrühren innerhalb von 30 Minuten 6,3 g Äthoxyacetylen in 50 cm³ Äther zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde

¹⁾ Unter diesen Bedingungen gelang es *L. Ruzicka* & *P. Müller* (Helv. 22, 755 (1939)) Äthynyl-testosteron zu Vinyl-testosteron zu hydrieren.

²⁾ Vgl. *K. Miescher*, *A. Wettstein* & *C. Scholz*, Helv. 22, 894 (1939).

³⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert und im evakuierten Röhrchen bestimmt.

bei Zimmertemperatur weiter gerührt und anschliessend tropfenweise mit einer Lösung von 3 g Δ^5 -3 β -Acetoxy-17-keto-androsten (VII) in 50 cm³ abs. Äther versetzt. Die Mischung wurde 1 Stunde zum Sieden erhitzt, dann auf 0° abgekühlt und in 100 cm³ eiskühlte 20-proz. Ammonchlorid-Lösung eingeführt. Die wässrige Lösung wurde mit Äther extrahiert, die ätherische Schicht mit 10-proz. Ammonchlorid-Lösung und Eiswasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (4,0 g) wurde zur Reinigung an 130 g Aluminiumoxyd (Aktivität III) adsorbiert. Mit Petroläther-Benzol 1:1 konnten 1,684 g Δ^5 -3 β -Acetoxy-17 β -oxy-17 α -äthoxyäthynyl-androsten (VIIIa) vom Smp. 136—137° eluiert werden. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Aceton-Hexan wurden 1,275 g derbe Nadeln vom Smp. 138—139° erhalten. Zur Analyse wurde eine Probe nochmals aus Aceton-Hexan umkristallisiert und anschliessend 60 Stunden im Hochvakuum bei 65° getrocknet. Smp. 139—140°.

$$[\alpha]_D^{10} = -122^{\circ} \quad (c = 0,942 \text{ in Chloroform})$$

4,090 mg Subst. gaben 11,213 mg CO₂ und 3,280 mg H₂O
 C₂₅H₃₆O₄ Ber. C 74,96 H 9,06% Gef. C 74,82 H 8,97%

Δ^5 -3 β , 17 β -Dioxy-17 α -äthoxyäthynyl-androsten (VIII).

Die Benzol-Äther-(8:2)-Fraktionen des oben beschriebenen Chromatogramms lieferten zusammen 1,629 g rohes Δ^5 -3 β , 17 β -Dioxy-17 α -äthoxyäthynyl-androsten vom Smp. 139—140°. Beim langsamen Erhitzen sintert die Substanz bei 74—84°, erstarrt wieder, um endgültig bei 139—140° zu schmelzen. Aus Aceton-Hexan umkristallisiert lieferte das Rohprodukt 1,045 g Nadeln vom Smp. 139—140°.

Eine Probe wurde zur Analyse viermal aus Aceton-Hexan umkristallisiert und anschliessend 60 Stunden bei 65° im Hochvakuum getrocknet. Die gut ausgebildeten Nadeln schmolzen bei 140—141°. Die Mischprobe mit dem Acetat VIIIa vom Smp. 139—140° schmolz bei 110—112°.

$$[\alpha]_D^{10} = -124^{\circ} \quad (c = 0,985 \text{ in Chloroform})$$

4,283 mg Subst. gaben 12,090 mg CO₂ und 3,666 mg H₂O
 C₂₅H₃₄O₃ Ber. C 77,05 H 9,56% Gef. C 77,03 H 9,58%

Acetylierung zu VIIIa. 152 mg Dioxy-Verbindung VIII wurden in einem Gemisch von 2 cm³ Pyridin und 2 cm³ Acetanhydrid 5 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Lösung wurde in Wasser eingerührt und die ausgefallene Substanz durch Extrahieren mit Äther in üblicher Weise aufgearbeitet. Das Rohprodukt lieferte aus Aceton-Hexan umkristallisiert 140 mg des weiter oben beschriebenen Acetats VIIIa vom Smp. 139—140°.

Δ^5 -3 β -Acetoxy-17 β -oxy-17 α -äthoxyvinyl-androsten (IXa).

300 mg Δ^5 -3 β -Acetoxy-17 β -oxy-17 α -äthoxyäthynyl-androsten (VIIIa) wurden in 7 cm³ Pyridin gelöst und mit 90 mg eines 2,5-proz. Palladium-Calciumcarbonat-Katalysators unter Wasserstoff geschüttelt. Die Wasserstoffaufnahme setzte nach 6 Minuten ein und war nach weiteren 11 Minuten beendet, nachdem die für eine Doppelbindung berechnete Wasserstoffmenge verbraucht war. Die Pyridin-Lösung wurde filtriert und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand lieferte aus Äther-Hexan umkristallisiert 250 mg feine Blättchen, die bei 135—136° schmolzen. Die Mischprobe mit Ausgangsmaterial vom Smp. 139—140° schmolz bei 110—111°. Zur Analyse wurde eine Probe noch viermal aus Äther-Hexan umkristallisiert und anschliessend 73 Stunden im Hochvakuum bei 20° getrocknet. Smp. 138,5—139,5°.

$$[\alpha]_D^{10} = -56,0^{\circ} \quad (c = 0,750 \text{ in Chloroform})$$

3,648 mg Subst. gaben 9,974 mg CO₂ und 3,124 mg H₂O
 C₂₅H₃₈O₄ Ber. C 74,59 H 9,52% Gef. C 74,61 H 9,58%

Δ^5 -3 β , 17 β -Dioxy-17 α -äthoxyvinyl-androsten (IX).

100 mg Δ^5 -3 β , 17 β -Dioxy-17 α -äthoxyäthynyl-androsten (VIII) wurden in 5 cm³ Pyridin mit 30 mg eines Palladium-Calciumcarbonat-Katalysators unter Wasserstoff geschüttelt. Wie beim Acetat VIIIa setzte die Wasserstoffaufnahme nach 6 Minuten ein und war nach weiteren 11 Minuten beendet, nachdem ein Mol Wasserstoff verbraucht war. Das erhaltene Rohprodukt lieferte aus Aceton-Hexan ein Gel. Die Verbindung wurde roh weiterverarbeitet.

 Δ^5 ; 17, 20-3 β -Oxy-pregnadien-21-al (V).

a) Aus Δ^5 -3 β , 17 β -Dioxy-17 α -äthoxyvinyl-androsten (IX).

94 mg rohes Δ^5 -3 β , 17 β -Dioxy-17 α -äthoxyvinyl-androsten (IX) wurden in 6 cm³ Dioxan gelöst und mit 2 cm³ 2-n. Salzsäure 30 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde in Äther aufgenommen, die ätherische Lösung mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der kristallisierte Rückstand (90 mg) wurde zur Reinigung an 2,7 g Aluminiumoxyd (Akt. IV) adsorbiert. Mit Benzol und Äther wurden 61 mg reiner Oxyaldehyd V vom Smp. 178—179° eluiert. Zur Analyse wurde eine Probe (13 mg) noch zweimal aus Äther-Hexan umkristallisiert und anschliessend 48 Stunden im Hochvakuum bei 70° getrocknet. Smp. 178—179°.

$$[\alpha]_D^{19} = -64,8^{\circ} \quad (c = 0,988 \text{ in Chloroform})$$

3,698 mg Subst. gaben 10,818 mg CO₂ und 3,137 mg H₂O

C₂₁H₃₀O₂ Ber. C 80,21 H 9,62% Gef. C 79,83 H 9,49%

Das UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit zeigt ein Maximum bei 244 m μ (log ϵ = 4,42).

b) Aus Δ^5 -3 β -Acetoxy-17 β -oxy-17 α -äthoxyvinyl-androsten (IXa).

150 mg Δ^5 -3 β -Acetoxy-17 β -oxy-17 α -äthoxyvinyl-androsten (IXa) wurden in 6 cm³ Dioxan mit 2 cm³ 2-n. Salzsäure 1 Stunde auf dem Wasserbad auf 90° erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Äther verdünnt, die ätherische Lösung mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (120 mg) schmolz roh bei 170—172°. Nach chromatographischer Reinigung wurden 75 mg Oxyaldehyd V erhalten, der nach dem Umlösen aus Äther-Hexan bei 180—181° schmolz. Die Mischprobe mit dem oben beschriebenen Präparat von V schmolz bei 179—180°.

 Δ^5 ; 17, 20-3 β -Acetoxy-pregnadien-21-al (Va)¹⁾²⁾³⁾.

a) Aus Δ^5 -3 β -Acetoxy-17 β -oxy-17 α -äthoxyvinyl-androsten (IXa).

150 mg Δ^5 -3 β -Acetoxy-17 β -oxy-17 α -äthoxyvinyl-androsten wurden in 8 cm³ Dioxan gelöst und mit 2 cm³ 1-n. Salzsäure 25 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde in Äther aufgenommen und die ätherische Lösung in üblicher Weise aufgearbeitet. Das Rohprodukt (150 mg) lieferte aus Äther-Hexan 100 mg Nadeln vom Smp. 184—185°. Zur Analyse wurde eine Probe noch dreimal aus Aceton-Hexan umkristallisiert und anschliessend 76 Stunden im Hochvakuum bei 95° getrocknet. Smp. 184—185°⁴⁾.

$$[\alpha]_D^{19} = -60,0^{\circ} \quad (c = 0,799 \text{ in Chloroform})$$

3,834 mg Subst. gaben 10,895 mg CO₂ und 3,123 mg H₂O

C₂₃H₃₂O₃ Ber. C 77,49 H 9,05% Gef. C 77,55 H 9,11%

¹⁾ K. Miescher, A. Wettstein & C. Scholz, Helv. 22, 894 (1939).

²⁾ H. Reich, Helv. 23, 219 (1940).

³⁾ H. G. Fuchs & T. Reichstein, Helv. 24, 804 (1941).

⁴⁾ Die Mischprobe mit authentischem Material (vgl. Fussnote¹⁾) ergab keine Schmelzpunktniedrigung. Herrn Dr. K. Miescher danken wir für den Vergleich der beiden Präparate.

Das UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit zeigte ein Maximum bei 244 $m\mu$ ($\log \epsilon = 4,44$).

b) Durch Acetylierung von V.

60 mg roher Oxy-aldehyd V wurden in 5 cm^3 Pyridin gelöst und mit 0,5 cm^3 Acetanhydrid 5 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser eingerührt und durch Extraktion mit Äther in üblicher Weise aufgearbeitet. Der Rückstand (60 mg) lieferte nach einmaligem Umkristallisieren aus Aceton-Hexan 35 mg Nadeln, die bei 182–183° schmolzen und in der Mischung mit dem weiter oben beschriebenen Präparat von Va keine Depression gaben.

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

Zusammenfassung.

Die Übertragung, der aus synthetischen Versuchen auf dem Gebiet des Vitamins A bekannt gewordenen Reaktionsfolge —Keton \rightarrow Äthoxyäthynyl-carbinol \rightarrow Äthoxyvinyl-carbinol \rightarrow α, β -ungesättigter Aldehyd— auf Dehydro-epi-androsteron, führte zu einer neuen, präparativ günstigen Synthese des $\Delta^{5,17,20}$ -3 β -Oxy-pregnadien-21-als (V).

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

55. Synthese der optisch aktiven Dihydro-lysergsäuren.

19. Mitteilung über Mutterkornalkaloide¹⁾

von A. Stoll, J. Rutschmann und W. Schlientz.

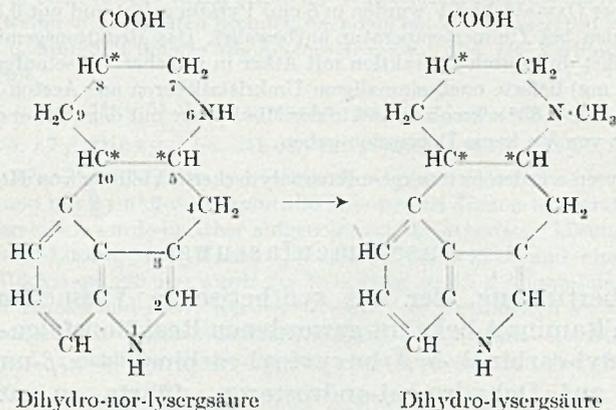
(1. II. 50.)

A. Einleitung.

In der 17. Mitteilung dieser Reihe beschrieben wir die Synthese von drei stereoisomeren, racemischen Dihydro-nor-lysergsäuren, die sich den drei bekannten isomeren Dihydro-lysergsäuren natürlicher Herkunft sterisch zuordnen liessen und somit als rac. Dihydro-nor-lysergsäure, rac. Dihydro-nor-isolysergsäure(I) und rac. Dihydro-nor-isolysergsäure(II) bezeichnet werden konnten. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Überführung der beiden erstgenannten Nörsäuren in die rac. Dihydro-lysergsäure bzw. die rac. Dihydro-isolysergsäure(I) durch Methylierung am Stickstoffatom 6 (s. die Formeln) und mit der Auflösung der DL-Dihydro-lysergsäure in die optisch aktiven Antipoden.

¹⁾ 18. Mitteilung: Helv. 33, 108 (1950).

Der linksdrehende Antipode war identisch mit der D(-)-Dihydro-lysergsäure, die bei der alkalischen Hydrolyse der Dihydroderivate der natürlichen linksdrehenden Mutterkornalkaloide erhalten wird¹⁾.



Die Totalsynthese der D-Dihydro-lysergsäure, des Grundkörpers der in den letzten Jahren therapeutisch wichtig gewordenen dihydrierten Mutterkornalkaloide, ist damit verwirklicht und der strenge Beweis ihrer Konstitution erbracht.

B. Die Ummethylierung der Dihydro-nor-lysergsäure-methylester in die Dihydro-lysergsäuren.

Es ist bekannt, dass die Alkylierung von sekundären, aliphatischen oder zyklischen Aminen zu den tertiären Basen manchmal auf Schwierigkeiten stösst. Die Verwendung der Halogenalkyle und Alkylsulfate führt meistens vorwiegend oder ausschliesslich zu den quaternären Ammoniumsalzen. Die für viele einfach gebaute Basen mit Erfolg verwendete Methylierungsmethode mit Formaldehyd und Ameisensäure oder einem anderen Reduktionsmittel liefert bei komplizierteren Verbindungen meist unbefriedigende Ergebnisse.

Diese Schwierigkeiten zeigten sich auch im vorliegenden Fall, als wir versuchten, die Dihydro-nor-lysergsäuren, die als kompliziert substituierte Piperidinderivate betrachtet werden können, mit einem der erwähnten Reagenzien zu den Dihydro-lysergsäuren zu methylieren. Die Methylierung am Stickstoffatom 6 gelang dagegen mit Hilfe einer merkwürdigen Reaktion, die unseres Wissens in der chemischen Literatur noch nicht beschrieben ist. Wir fanden nämlich, dass rac. Dihydro-lysergsäure auf einfachste Weise und in guter Ausbeute durch blosses Erhitzen des rac. Dihydro-nor-lysergsäuremethylesters über seinen Schmelzpunkt entsteht. Bei Temperaturen um 220° entstehen aus dem Norester in ca. 15 Minuten 70—80% der

¹⁾ A. Stoll & A. Hofmann, Helv. 26, 2070 (1943).

Theorie an freier rac. Dihydro-lysergsäure. Die Methylgruppe wandert also unter diesen Bedingungen vom Carboxyl an den Stickstoff. Wir werden im Abschnitt E auf diese interessante Reaktion, die im folgenden „Ummethylierung“ genannt wird, näher eingehen.

Die Ummethylierung wurde auch mit dem rac. Dihydro-nor-isolysergsäure(I)-methylester versucht, und zwar mit Erfolg. Doch erhielt man die entsprechende methylierte Säure, die rac. Dihydro-isolysergsäure(I), in bedeutend geringerer Ausbeute.

C. Vergleich der synthetischen mit den natürlichen Dihydro-lysergsäure-Racematen.

Die einheitliche rac. Dihydro-lysergsäure und die rac. Dihydro-isolysergsäure(I) natürlicher Herkunft, die wir für den Vergleich mit unseren synthetischen Racematen benötigten, waren bis anhin nicht bekannt. Wohl haben *R. G. Gould, J. C. Craig & W. A. Jacobs*¹⁾ eine rac. Dihydro-lysergsäure beschrieben, die sie durch Reduktion von rac. Lysergsäure²⁾ mit Natrium und Butylalkohol hergestellt hatten, doch kann es sich bei ihrem Präparat nicht um einheitliche DL-Dihydro-lysergsäure gehandelt haben, weil sich die Lysergsäure bei chemischen Reaktionen besonders in alkalischem Medium teilweise isomerisiert.

Wir haben nach dem Verfahren der genannten Autoren rac. Lysergsäure reduziert und das Reduktionsprodukt nach der Veresterung mit methylalkoholischer Salzsäure chromatographisch in seine Bestandteile zerlegt. Dabei konnten tatsächlich drei verschiedene Racemate festgestellt werden. Von der Untersuchung der optisch aktiven Dihydro-lysergsäure-Derivate her ist bekannt, dass sich die drei Stereoisomeren durch ihr Haftvermögen an der Aluminiumoxydsäule charakteristisch unterscheiden. Am leichtesten werden die Derivate der Dihydro-isolysergsäure(I) eluiert, dann folgen die Dihydro-lysergsäure-Derivate und zuletzt die Abkömmlinge der Dihydro-isolysergsäure(II)³⁾.

Das Chromatogramm des veresterten Reduktionsproduktes der rac. Lysergsäure lieferte drei entsprechende Fraktionen. Die zuerst im Filtrat erscheinende Substanz, der rac. Dihydro-isolysergsäure(I)-methylester, und der etwas fester haftende rac. Dihydro-lysergsäuremethylester liessen sich in kristallisierter Form gewinnen, während der an der Säule fest haftende Rest, in dem wahrscheinlich rac. Dihydro-isolysergsäure(II)-methylester enthalten war, nicht kristallisiert werden konnte.

Der so gewonnene rac. Dihydro-lysergsäure-methylester natürlicher Herkunft kristallisierte, wie das synthetische aus der Norsäure dargestellte Präparat, aus Benzol mit Kristalllösungsmittel und

¹⁾ *J. Biol. Chem.* **145**, 487 (1942).

²⁾ *A. Stoll & A. Hofmann, Z. physiol. Ch.* **250**, 7 (1937).

³⁾ *A. Stoll, A. Hofmann & Th. Petrzilka, Helv.* **29**, 650 (1946).

schmolz unter Abgabe desselben schon bei 90—100°. Nach dem Trocknen im Hochvakuum besitzen beide Substanzen den Smp. 148—150⁰¹). Bei der Mischprobe zeigten sie keine Depression. Die freien Säuren, die synthetische und die natürliche rac. Dihydro-lysergsäure, kristallisieren aus Wasser in glitzernden, rhombenförmigen Blättchen, die 1 Mol Kristallwasser enthalten, das auch im Hochvakuum bei 130° nicht abgegeben wird, und die bei ungefähr 310° unscharf unter Zersetzung schmelzen. In dieser Eigenschaft, Kristallwasser so fest zu binden, unterscheidet sich die rac. Dihydro-lysergsäure charakteristisch von der optisch aktiven D-Dihydro-lysergsäure.

Der synthetische und der natürliche rac. Dihydro-isolysergsäure(I)-methylester kristallisieren aus Methylalkohol in Nadeln, die sich bei 90° unter Abgabe von Lösungsmittel verflüssigen, während sorgfältig im Hochvakuum getrocknete Proben bei 156—158° schmelzen. Die Mischprobe ergab keine Depression der Schmelzpunkte.

Der rac. Dihydro-isolysergsäure(I)-methylester wurde auch noch durch die Überführung in rac. Dihydro-lysergsäure identifiziert, indem der Ester in das Hydrazid umgewandelt und dieses durch Kochen mit Kalilauge verseift wurde. Diese Isomerisierungsreaktion ist charakteristisch für Derivate der Dihydro-isolysergsäure(I)-Reihe²).

D. Die Auflösung der synthetischen rac. Dihydro-lysergsäure in die optischen Antipoden.

Die Spaltung der totalsynthetischen DL-Dihydro-lysergsäure in die optischen Antipoden bildet den letzten Schritt in der langen Reihe von Operationen, die schliesslich zur D-Dihydro-lysergsäure als dem Hauptbestandteil der hochwirksamen Dihydroderivate der natürlichen Mutterkornalkaloide führten. Sie gelang nach dem gleichen Verfahren, mit dem seinerzeit die Spaltung der rac. Lysergsäure in die optischen Antipoden durchgeführt werden konnte, nämlich über das Säure-amid mit L-Norephedrin³).

Synthetisches rac. Dihydro-lysergsäure-azid, das auf übliche Weise aus dem Ester über das Hydrazid bereitet worden war, wurde mit L-Norephedrin säureamidartig verknüpft. Das resultierende partielle Racemat liess sich an einer Aluminiumoxydsäule mit Essigester und Aceton als Lösungsmittel in die beiden Komponenten zerlegen. Das weniger gut haftende Isomere zeigte ein spez. Drehvermögen von $[\alpha]_D^{20} = -114^{\circ}$ (in Pyridin) und kristallisierte aus Aceton in massiven Prismen und Polyedern vom Smp. 240—241°. Es war identisch mit dem aus D-Dihydro-lysergsäure-azid natürlicher Herkunft und L-Norephedrin hergestellten Säureamid. Das fester haftende Isomere,

¹) Alle Schmelzpunkte dieser Arbeit sind im evakuierten Röhrchen bestimmt und korrigiert.

²) A. Stoll, A. Hofmann & Th. Petrzilka, *Helv.* **29**, 650 (1946).

³) A. Stoll & A. Hofmann, *Z. physiol. Ch.* **250**, 7 (1937).

das L-Norephedrid der L-Dihydro-lysergsäure, wies einen spez. Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +107^\circ$ (in Pyridin) auf und kristallisierte aus Essigester in feinen Nadeln, die bei $252\text{--}253^\circ$ schmolzen.

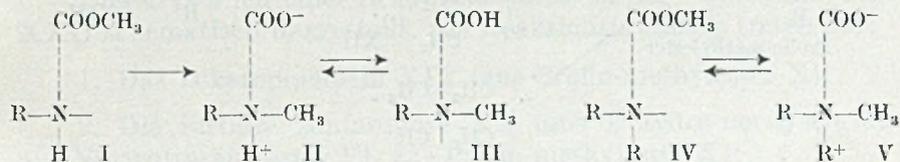
Die genau gleich ausgeführte Zerlegung der rac. Dihydro-lysergsäure natürlicher Herkunft lieferte zwei Isomere, die mit den beschriebenen Norephedriden der synthetischen Dihydro-lysergsäuren in jeder Hinsicht übereinstimmen.

Durch energische alkalische Hydrolyse der Norephedride wurden die optisch aktiven Dihydro-lysergsäuren erhalten. Der Antipode mit dem spez. Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -120^\circ$ (in Pyridin) war identisch mit D(-)-Dihydro-lysergsäure, die den dihydrierten natürlichen, linksdrehenden Mutterkornalkaloiden¹⁾ zu Grunde liegt. Sein Antipode mit dem spez. Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +120^\circ$ (in Pyridin) ist als L(+)-Dihydro-lysergsäure aufzufassen. Die optisch aktiven synthetischen Präparate kristallisierten aus Wasser wie die natürlichen Dihydro-lysergsäuren in den charakteristischen rhombenförmigen oder sechseckigen Blättchen.

E. Zum Mechanismus der Ummethylierung.

Die Bildung der Dihydro-lysergsäuren aus den Norsäure-methylestern erscheint auf den ersten Blick als einfache, intramolekulare Wanderung der Ester-Methylgruppe an das sekundäre Stickstoffatom. Offensichtlich ist diese Reaktion verwandt mit der vor allem durch ausgedehnte Untersuchungen von R. Willstätter²⁾ bekanntgewordenen Umwandlung der Methylester von N,N-Dialkylamino-säuren in Betaine. Beispielsweise entstehen beim Erhitzen von Dimethyl-aminoessigsäure-methylester auf 200° 80—90% der Theorie an Betain. Aus β -Dimethylamino-propionsäure-methylester erhält man zu ca. 30% das entsprechende Betain.

In den Formeln I—III ist die Umlagerung des Dihydro-norlysergsäure-methylesters in Dihydrolysergsäure und in den Formeln IV und V die entsprechende Umwandlung der tertiären Aminosäureester in Betaine nach Willstätter schematisch dargestellt. Die gebrochenen Linien bedeuten dabei eine unbestimmte Anzahl von Kohlenstoffatomen zwischen der Carboxyl- und der Aminogruppe.

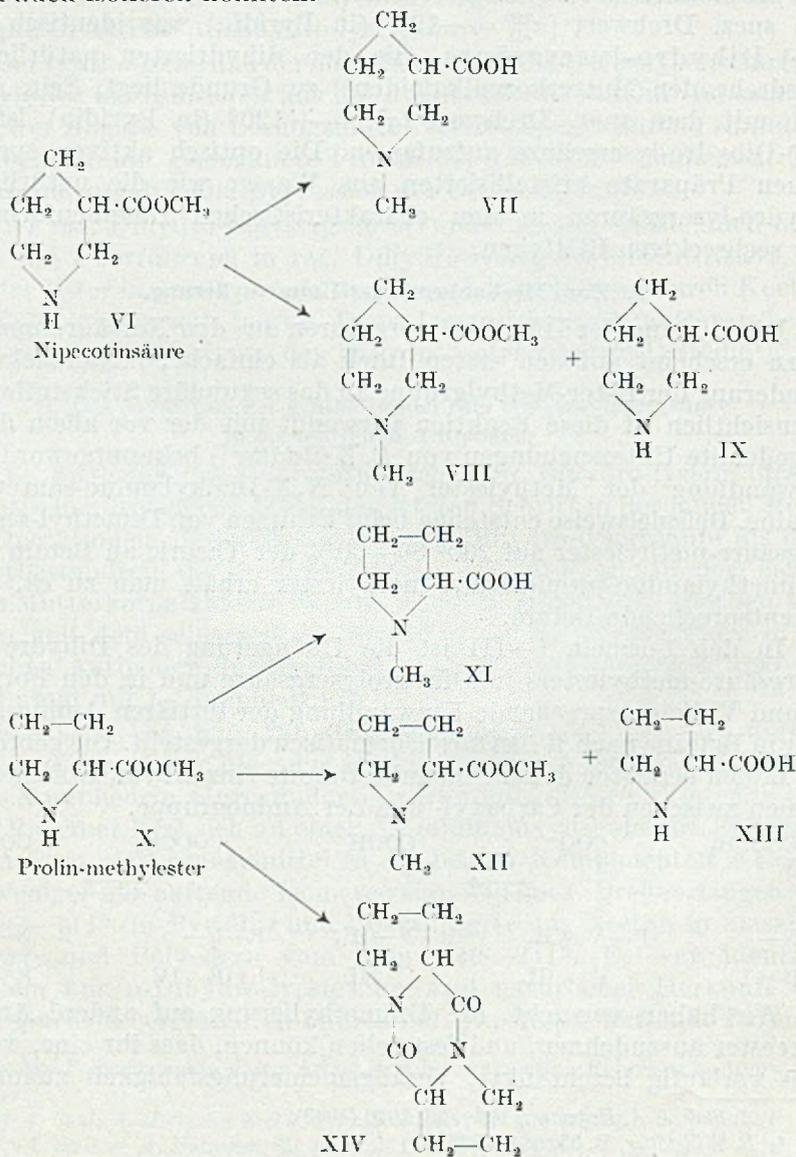


Wir haben versucht, die Ummethylierung auf andere Aminosäureester auszudehnen, und feststellen können, dass ihr eine, wenigstens vorläufig beschränkte, Verallgemeinerungsfähigkeit zukommt.

¹⁾ A. Stoll & A. Hofmann, Helv. 26, 2070 (1943).

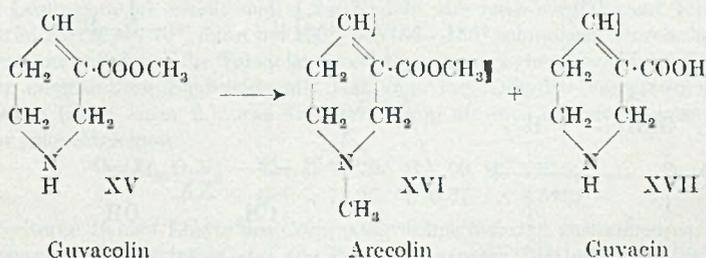
²⁾ R. Willstätter, B. 35, 584 (1902).

Als erste, dem Dihydro-nor-lysergsäure-methylester am nächsten verwandte Modellsubstanz wählten wir den Nipecotinsäure-methylester (VI). Beim Erhitzen desselben erhielten wir neben viel unverändertem Ausgangsmaterial eine geringe Menge N-Methyl-nipecotinsäure (VII). Überraschenderweise aber war das Hauptprodukt der Reaktion der N-Methyl-nipecotinsäure-methylester (VIII). Es mussten also aus zwei Molekeln des Ausgangsmaterials je eine Molekel methylierter Ester und freie Nipecotinsäure (IX) entstanden sein, die wir denn auch isolieren konnten.



Ähnliche Verhältnisse stellten wir bei der Ummethylierung des Prolin-methylesters (X) fest. Neben wenig freier Hygrinsäure (XI) entstand hier deren Methylester (XII) und etwas Prolin (XIII). Das Hauptprodukt war in diesem Falle das Prolin-diketopiperazin (XIV), das ja auch aus Prolin-methylester bei Zimmertemperatur allmählich entsteht.

In weiteren Versuchen stellten wir beim Erhitzen von Guvacolin (XV) die Bildung von geringen Mengen Arecolin (XVI) neben Guvacin (XVII) fest, während wir bei der Prüfung des β -Alanin-methylesters keine N-methylierten Produkte finden konnten.

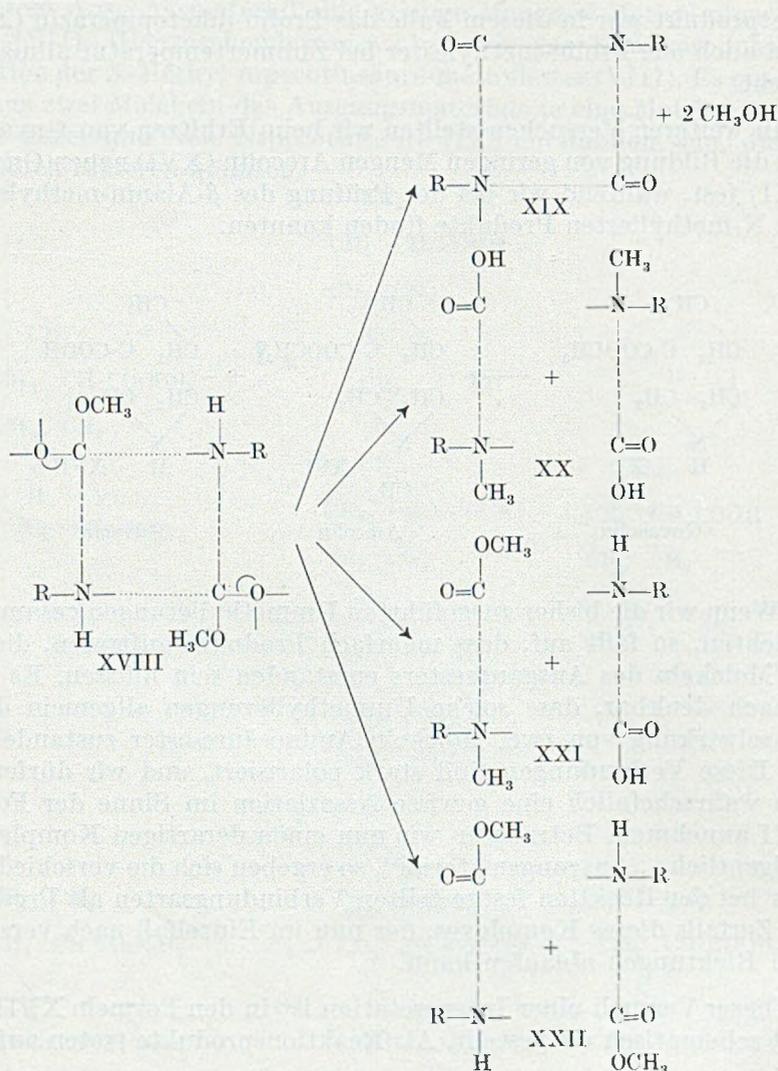


Wenn wir die bisher ausgeführten Ummethylierungen gesamthaft betrachten, so fällt auf, dass mehrfach Produkte auftreten, die aus zwei Molekeln des Ausgangsesters entstanden sein müssen. Es wäre demnach denkbar, dass solche Ummethylierungen allgemein durch Wechselwirkung von zwei Molekeln Aminosäure-ester zustandekommen. Diese Verbindungen sind stark polarisiert, und wir dürfen bei ihnen wahrscheinlich eine gewisse Assoziation im Sinne der Formel XVIII annehmen. Betrachten wir nun einen derartigen Komplex als das eigentliche „Ausgangsmaterial“, so ergeben sich die verschiedenen bisher bei der Reaktion festgestellten Verbindungsarten als Produkte eines Zerfalls dieses Komplexes, der nun im Einzelfall nach verschiedenen Richtungen ablaufen kann.

Dieser Versuch einer Interpretation ist in den Formeln XVIII bis XXII schematisch dargestellt. Als Reaktionsprodukte treten auf:

1. Das Diketopiperazin XIX (aus Prolin-methylester X);
2. Die tertiäre Aminosäure XX (aus Dihydro-nor-lysergsäure, aus Nipecotinsäureester VI, aus Prolin-methylester X);
3. Der methylierte Ester zusammen mit unmethylierter Säure XXI (aus Prolin-methylester X, Nipecotinsäureester VI und Guvacolin XV);
4. Formal betrachtet der unveränderte Ausgangs-Ester XXII.

Die reversible Umlagerung der tertiären Aminosäureester in die Betaine nach *R. Willstätter*¹⁾ liesse sich in ein solches Schema zwanglos einordnen.



Experimenteller Teil.

Die Versuche 1. und 2. lieferten die racemischen Vergleichssubstanzen natürlicher Herkunft.

1. *rac.* Dihydro-lysergsäure-methylester und *rac.* Dihydro-isolysergsäure(I)-methylester aus *rac.* Lysergsäure. Wir folgten für die Reduktion der Lysergsäure der Arbeitsweise von *R. G. Gould, J. C. Craig & W. A. Jacobs*²⁾. Eine Auf-

¹⁾ *R. Willstätter*, B. 35, 584 (1902).

²⁾ *J. Biol. Chem.* 145, 487 (1942).

schlammung von 15 g rac. Lysergsäure¹⁾ in 500 cm³ 98-proz. n-Butanol wurde in einem mit Rührer und Rückflusskühler versehenen Kolben zum Sieden erhitzt und unter kräftigem Rühren möglichst rasch mit 40 g Natrium versetzt, wobei die Lysergsäure sich alsbald auflöste. Nach Beendigung der Reaktion verdünnte man mit Wasser und dampfte die Lösung im Vakuum ein, bis kein Butanol mehr überging und das Volumen ca. 400 cm³ betrug. Beim Neutralisieren mit starker Salzsäure und etwas Eisessig auf pH 6 kristallisierte die rohe Dihydro-lysergsäure aus. Sie wurde nach einigem Stehen im Eisschrank abgenutscht, mit Eiswasser und Äthanol gründlich gewaschen und getrocknet. Ausbeute 10,5 g.

Das rohe Reduktionsprodukt lieferte nach der Veresterung mit methanolischer Salzsäure 9,4 g eines amorphen Estergemisches, das nun in benzolischer Lösung auf 500 g Aluminiumoxyd chromatographiert wurde.

Die ersten Fraktionen der durchlaufenden Lösung hinterliessen beim Eindampfen einen Rückstand, der aus Methanol leicht kristallisierte. Nach dem Umkristallisieren aus demselben Lösungsmittel erhielt man 1,2 g Nadeln, die nach sorgfältigem Trocknen im Hochvakuum, zuerst bei 70°, dann bei 100°, bei 156–158° schmolzen. Durch die Lage im Chromatogramm und durch die Tatsache, dass bei der energischen Verseifung des aus dem Methylester hergestellten Hydrazids mit Kalilauge rac. Dihydro-lysergsäure gewonnen werden konnte (siehe unter 2.), war die Verbindung als rac. Dihydro-isolysergsäure(I)-methylester gekennzeichnet.

$C_{17}H_{20}O_2N_2$	Ber. C 71,79	H 7,09	N 9,85%
	Gef. „ 71,96	„ 6,87	„ 9,84%

Die weiteren Benzol-Eluate des Chromatogramms lieferten zusammen ca. 4,5 g rac. Dihydro-lysergsäure-methylester, der aus Benzol in grossen Blättern kristallisierte. Das Präparat verlor beim Trocknen im Hochvakuum bei 50–100° die einem Mol entsprechende Menge Kristallbenzol und schmolz dann bei 148–150°. Vor dem Trocknen verflüssigte es sich schon bei 90–100°.

Die in der Säule zurückgehaltene Substanz bestand wahrscheinlich wenigstens zum Teil aus rac. Dihydro-isolysergsäure(II)-methylester, der jedoch nicht isoliert werden konnte. Es ist uns bisher noch nicht gelungen, ein kristallisiertes Derivat der rac. Dihydro-isolysergsäure(II) zu fassen.

2. Überführung von rac. Dihydro-isolysergsäure(I)-methylester in rac. Dihydro-lysergsäure. 500 mg rac. Dihydro-isolysergsäure(I)-methylester wurden 30 Minuten mit 3 cm³ wasserfreiem Hydrazin gekocht. Das Hydrazid, das zum Teil schon auskristallisiert war, wurde durch Zusatz von Wasser zur noch heissen Lösung vollständig ausgefällt, nach einigem Stehen abgenutscht und aus viel Methanol umkristallisiert. Es war darin sehr schwer löslich und bildete beim langsamen Abkühlen der Methanollösung polygonale Platten, Smp. 296°.

$C_{16}H_{20}ON_4$	Ber. C 67,56	H 7,09	N 19,72%
	Gef. „ 67,45	„ 7,12	„ 20,04%

450 mg Hydrazid wurden mit 5 cm³ 25-proz. Kalilauge und 5 cm³ Äthanol 15 Stunden am Rückfluss zum kräftigen Sieden erhitzt. Dann neutralisierte man mit starker Salzsäure und etwas Eisessig (auf pH 6), nutschte die Fällung nach einigem Stehen im Eisschrank ab und wusch mit Wasser und Äthanol nach. Die Kristallisation erfolgte alsdann aus verdünntem Ammoniak durch Eindampfen über freier Flamme bis zu beginnender Kristallbildung. Man erhielt so 370 mg freie Säure, deren Kristalle die für Dihydro-lysergsäure typische rhombische Blättchenform zeigten. Smp. ca. 300° unter Zersetzung.

Die Säure wurde nun wie üblich mit methanolischer Salzsäure verestert, der Ester (350 mg) in Benzol gelöst und auf 20 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Die durchlaufende Lösung enthielt von der ersten Fraktion an reinen rac. Dihydro-lysergsäure-methylester, der nach dem Umkristallisieren aus Benzol und Trocknen den Smp. 148–150° zeigte. Ausbeute 300 mg.

¹⁾ A. Stoll & A. Hofmann, Z. physiol. Ch. 250, 7 (1937).

3. rac. Dihydro-lysergsäure aus rac. Dihydro-nor-lysergsäure-methylester. 500 mg rac. Dihydro-nor-lysergsäure-methylester wurde in ein Präparatenröhrchen eingefüllt, das 5 cm über der Substanz zu einer dickwandigen Kapillare ausgezogen und an die Hochvakuumpumpe angeschlossen wurde. Unter Erhitzen auf 120° evakuierte man das Röhrchen (ca. 10⁻⁴ mm Hg) und schmolz dann die Kapillare zu. Die so getrocknete und vor Luftsauerstoff geschützte Substanz wurde nun durch Untertauchen des Röhrchens in ein Bad von 210° geschmolzen und dann auf 220° erhitzt. Nach wenigen Minuten begann die Schmelze kristallinisch zu erstarren. Man belies noch 10—15 Minuten bei 220°, kühlte dann schnell ab und öffnete das Röhrchen, wobei ein schwacher Trimethylamin-Geruch festzustellen war. Die spröde, violettbräunlich gefärbte Masse wurde nun in verdünntem Ammoniak gelöst und die Lösung, die einen sehr geringen, flockigen Niederschlag aufwies, mit etwas Kohle geklärt. Beim Verjagen des Ammoniaks über freier Flamme trat bald reichliche Kristallisation ein. Nach einigem Stehen in der Kälte wurde die rac. Dihydro-lysergsäure abgenutscht, mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute ca. 400 mg. Zur Analyse kristallisierte man das Rohprodukt aus reinem Wasser um. Es wurden die glitzernden rhombischen Blättchen erhalten, die für die Dihydro-lysergsäure typisch sind. Smp. ca. 310° unter Zersetzung. Das Präparat enthielt 1 Mol Kristallwasser, das sich auch beim Trocknen im Hochvakuum bei 130° nicht entfernen liess.

$C_{16}H_{18}O_2N_2, H_2O$	Ber. C 66,63	H 6,99	N 9,72%
	Gef. ,, 67,04	„ 7,40	„ 10,12%

150 mg rac. Dihydro-lysergsäure wurde wie üblich mit methanolischer Salzsäure verestert. Man erhielt 145 mg rohen Methylester, der nach Filtration seiner Lösung in Methylenchlorid durch etwas Aluminiumoxyd aus Benzol sofort kristallisierte. Die blättrigen Kristalle zeigten dieselben Eigenschaften wie das Vergleichspräparat natürlicher Herkunft und hatten nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 50° und 90° den Smp. 148—150°. Die Mischprobe ergab keine Depression. Zur Analyse wurde das Präparat aus Essigester umkristallisiert, da sich die Kristalle aus Benzol nur unvollständig von den letzten Spuren dieses Lösungsmittels befreien liessen.

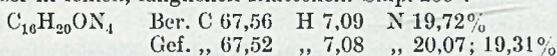
$C_{17}H_{20}O_2N_2$	Ber. C 71,79	H 7,09	N 9,85%
	Gef. ,, 71,64	„ 7,42	„ 9,96%

4. rac. Dihydro-isolysergsäure(I)-methylester aus rac. Dihydro-nor-isolysergsäure(I)-methylester. 400 mg rac. Dihydro-nor-isolysergsäure(I)-methylester wurden wie im Beispiel 3 in ein evakuiertes Glasröhrchen eingeschmolzen und 30 Minuten auf 210° erhitzt. Der Inhalt des Röhrchens wurde dann mit methanolischer Salzsäure verestert und die Lösung des Esters in Benzol auf 25 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Die ersten Fraktionen der Lösung lieferten beim Eindampfen 160 mg eines Präparates, das aus Methanol leicht kristallisierte. Das Produkt war in allen seinen Eigenschaften identisch mit rac. Dihydro-isolysergsäure(I)-methylester natürlicher Herkunft. Smp. 155—157°. Der Misch-Schmelzpunkt mit authentischem Material (Smp. 156—158°) zeigte keine Depression. Die Ausbeute an reinem kristallisiertem Methylester betrug indessen nur 80 mg.

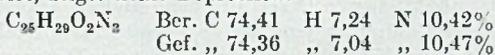
5. Die Spaltung der rac. Dihydro-lysergsäure in die Antipoden. Die Auflösung in die optisch aktiven Formen wurde in zwei parallelen Versuchsreihen mit synthetischer und zum Vergleich mit natürlicher rac. Dihydro-lysergsäure durchgeführt. Im folgenden ist nur die Spaltung des synthetischen Racemates beschrieben, da der Parallelversuch vollkommen analog verlief. Die sich entsprechenden Substanzen aus beiden Versuchen wurden miteinander verglichen und zeigten in allen Fällen eine vollständige Übereinstimmung der Eigenschaften. Die Misch-Schmelzpunkte ergaben keine Depression.

a) rac. Dihydro-lysergsäure-hydrazid. 1,0 g synthetischer rac. Dihydro-lysergsäure-methylester wurde mit 3 cm³ wasserfreiem Hydrazin 1 Stunde am Rückfluss gekocht. Das gebildete Hydrazid kristallisierte bei langsamem Zugeben von Wasser zu der noch warmen Lösung und wurde nach einigem Stehen im Eisschrank abgenutscht. Eine Probe des in fast quantitativer Ausbeute erhaltenen Hydrazids wurde in einigen Tropfen

heissem Methanol gelöst und kristallisierte bei allmählichem Verdünnen der filtrierten Lösung mit Wasser in feinen, länglichen Blättchen. Smp. 259°.

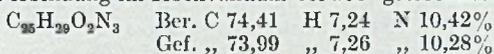


b) *D*-Dihydro-lysergsäure-*L*-norephedrid und *L*-Dihydro-lysergsäure-*L*-norephedrid. 930 mg rac. Dihydro-lysergsäure-hydrazid wurden auf bekannte Weise¹⁾ mit salpetriger Säure umgesetzt und das Azid aus der mit Natriumhydrogencarbonat alkalisch gemachten Lösung ausgeäthert. Man engte die ätherischen Lösungen ohne Erwärmen im Vakuum etwas ein und vereinigte sie mit einer Lösung von 1,2 g *L*-Norephedrin in Äther. Im Verlauf von einigen Stunden bildete sich ein harziger Niederschlag. Die Lösung blieb über Nacht im Eisschrank stehen und wurde dann im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der in Chloroform gelöste Rückstand wurde wiederholt mit Wasser und etwas Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt, die Chloroformlösung mit Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne verdampft. Man erhielt 1,18 g eines gelblichen Harzes, das in Essigester aufgenommen und zur Trennung in seine Komponenten an einer Säule von 250 g Aluminiumoxyd chromatographiert wurde. Die durchlaufende Lösung fing man in Fraktionen von je 150 cm³ auf. Die Eindampfrückstände der ersten sechs Fraktionen kristallisierten beim Erwärmen mit einigen Tropfen Aceton und wurden gemeinsam aus diesem Lösungsmittel umkristallisiert. Man erhielt 350 mg *D*-Dihydro-lysergsäure-*L*-norephedrid in Form massiver Prismen und Polyeder. Für die Bestimmung der spez. Drehung und die Analyse wurde das Präparat noch dreimal aus Aceton umkristallisiert. Smp. 240–241°. Die Mischprobe mit einem Vergleichspräparat, das aus kristallisiertem *D*-Dihydro-lysergsäure-azid natürlicher Herkunft hergestellt worden war und die gleichen Eigenschaften aufwies, zeigte keine Depression.



$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -114^\circ \quad (c = 0,3 \text{ in Pyridin})$$

Die weiteren Fraktionen, die durch Waschen des Chromatogramms mit Essigester und dann mit Aceton erhalten wurden, kristallisierten aus Essigester. Sie wurden gemeinsam aus diesem Lösungsmittel umkristallisiert und ergaben 230 mg rohes *L*-Dihydro-lysergsäure-*L*-norephedrid. Das aus feinen Nadeln bestehende Produkt wurde noch mehrmals aus Essigester umkristallisiert, bis der Smp. bei 252–253° konstant blieb. Zur Analyse wurde die Verbindung im Hochvakuum bei 100° getrocknet.



$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +107^\circ \quad (c = 0,3 \text{ in Pyridin})$$

c) *D*(-)-Dihydro-lysergsäure. 130 mg *D*-Dihydro-lysergsäure-*L*-norephedrid wurde mit 3 cm³ 25-proz. Kalilauge und 3 cm³ Äthanol 9 Stunden am Rückfluss gekocht. Die Verseifung war nach dieser Zeit noch nicht vollständig; es musste deshalb das unveränderte Ausgangsmaterial durch Ausschütteln der mit etwas Wasser verdünnten Lösung mit Chloroform abgetrennt werden. Die wässrig-alkalische Lösung wurde darauf mit 15-proz. Salzsäure vorsichtig neutralisiert und durch Zusatz von Eisessig auf pH 6 eingestellt. Beim Einengen kristallisierte die *D*(-)-Dihydro-lysergsäure aus. Nach dem Umkristallisieren aus reinem Wasser zeigte sie die richtige spez. Drehung und zersetzte sich beim Erhitzen von 300° an ohne richtig zu schmelzen. Die Kristalle hatten die charakteristische Form rhombischer oder sechseckiger Blättchen.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -120^\circ \quad (c = 0,2 \text{ in Pyridin})$$

d) *L*(+)-Dihydro-lysergsäure. 90 mg *L*-Dihydro-lysergsäure-*L*-norephedrid wurde durch Kochen mit je 3 cm³ 25-proz. Kalilauge und Äthanol verseift und die *L*-Dihydro-lysergsäure auf die gleiche Art isoliert, wie die *D*-Form. Die Säure zeigte dieselben Eigenschaften wie ihr Antipode, indessen natürlich das entgegengesetzte spez. Drehvermögen.

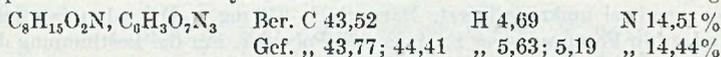
$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +120^\circ \quad (c = 0,2 \text{ in Pyridin})$$

¹⁾ A. Stoll, A. Hofmann & Th. Petrzilka, *Helv.* **29**, 650 (1946).

6. Die Ummethylierung des Nipecotinsäure-methylesters. 2 g Nipecotinsäure-methylester wurde in ein auf 0,01 mm Hg evakuiertes Röhrchen eingeschmolzen und eine Stunde auf 150° erhitzt.

a) Nipecotinsäure (IX). Die ursprünglich farblose Flüssigkeit war nach dem Erhitzen leicht gelb gefärbt und mit Kristallen durchsetzt, die abfiltriert und mit Aceton gewaschen wurden. Es konnten so 165 mg farblose Substanz vom Smp. 260° abgetrennt werden, die sich als Nipecotinsäure erwies. Eine Mischprobe mit Nipecotinsäure zeigte keine Schmelzpunktserniedrigung.

b) N-Methyl-nipecotinsäure-methylester (VIII). Der Rest des Reaktionsproduktes wurde bei 80—90° und 12 mm destilliert. Es liess sich so 1,2 g farbloses Öl gewinnen, das in Chloroform gelöst und an einer Aluminiumoxydsäule chromatographiert wurde. In Vorversuchen war festgestellt worden, dass sich Nipecotinsäure-methylester und N-Methyl-nipecotinsäure-methylester im Aluminiumoxydchromatogramm voneinander trennen lassen, da das methylierte Produkt weniger fest haftet und sich deshalb in den ersten Fraktionen vorfindet. Von 1,2 g Destillat wurden so 150 mg Substanz erhalten die ein kristallisiertes Pikrat vom Smp. 132° gab. Es handelte sich um N-Methyl-nipecotinsäure-methylester-pikrat; ein Misch-Schmelzpunkt mit Vergleichssubstanz zeigte nämlich keine Depression. Für die Analyse wurde das Pikrat im Hochvakuum bei 60° getrocknet.



c) Nipecotinsäure-methylester (VI). Aus der Säule liess sich noch 1,05 g Ausgangsmaterial eluieren, das durch das Pikrat vom Smp. 155° und das Chlorhydrat vom Smp. 241° charakterisiert wurde.

d) N-Methyl-nipecotinsäure (VII). In einem andern Versuch wurden 900 mg Nipecotinsäure-methylester 15 Minuten lang auf 180° erhitzt. Das Reaktionsprodukt enthielt nach dem Abkühlen keine Kristalle von Nipecotinsäure. Dagegen liessen sich durch fraktionierte Sublimation im Kugelrohr bei 80—90° und 12 mm Hg 115 mg Estergemisch abdestillieren und darauf bei 120—130° und 0,005 mm Hg 90 mg Kristalle vom Smp. 158° sublimieren. Dieses Sublimat konnte als N-Methyl-nipecotinsäure identifiziert werden, da sowohl der Schmelzpunkt als auch der Misch-Schmelzpunkt mit der Vergleichssubstanz übereinstimmten. Die Ausbeute an durch Ummethylierung entstandener N-Methylverbindung war also mit Nipecotinsäure-methylester als Ausgangsmaterial relativ gering.

7. Ummethylierung von Guvacolin. Noch weniger ausgiebig war die Bildung des Arecolins aus Guvacolin. 900 mg kristallisiertes Guvacolin wurde im Hochvakuum in ein Röhrchen eingeschmolzen und 15 Minuten lang auf 170° erwärmt. Schon nach 5 Minuten begann die Reaktionsflüssigkeit teilweise zu kristallisieren. Nach dem Abkühlen war beim Öffnen des Röhrchens leichter Überdruck festzustellen; es entwichen flüchtige Amine infolge teilweiser Zersetzung der Base.

a) Guvacin (XVII). Der Inhalt des Röhrchens wurde mit Chloroform herausgespült und von den unlöslichen Kristallen (90 mg) abfiltriert, die nach dem Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol als Guvacin, Smp. 265°, identifiziert wurden.

b) Arecolin (XVI). Die Chloroformlösung wurde an einer Aluminiumoxydsäule chromatographiert. Vorversuche mit einem Gemisch von Guvacolin und Arecolin hatten ergeben, dass Arecolin zuerst durchwandert. Aus den ersten Fraktionen des Chromatogramms konnten nur 10 mg farbloses Öl erhalten werden, das ein Pikrat vom Smp. 112° gab. Es musste sich um Arecolinpikrat handeln, da die Mischprobe mit Arecolinpikrat keine Schmelzpunktserniedrigung zeigte.

8. Ummethylierungsversuche mit β -Alanin-methylester. 1 g β -Alanin-methylester wurde bei 12 mm im Röhrchen eingeschmolzen und 30 Minuten auf 95° erwärmt. Die Flüssigkeit war dabei teilweise fest geworden. Der Rohrinhalt wurde mit Äther versetzt und filtriert, wobei ein kristallines, farbloses Pulver zurückblieb, das bei 145° sinterte und dessen Zersetzungspunkt oberhalb 340° lag. Diese Eigenschaft schloss das Vorliegen eines Ummethylierungsproduktes aus, weshalb die Substanz nicht weiter untersucht wurde. Das ätherische Filtrat wurde eingedampft, in Chloroform aufgenommen

und an Aluminiumoxyd chromatographiert. Auf diese Weise konnten 480 mg Ausgangsmaterial, das als Chlorhydrat vom Smp. 107° charakterisiert wurde, zurückgewonnen werden. Auch in den ersten Fraktionen des Chromatogramms konnte keine Spur einer andern Substanz nachgewiesen werden. Bei Versuchen mit höheren Reaktionstemperaturen trat im Reaktionsgefäß Überdruck auf, und es wurden ausser Ausgangsmaterial lediglich grössere Mengen der ätherunlöslichen Substanz gefunden. In keinem Versuch konnte irgendein Ummethylierungsprodukt gefasst werden.

9. Ummethylierung von L-Prolin-methylester. 1,54 g L-Prolin-methylester wurden in ein auf 0,005 mm Hg evakuiertes Röhren eingeschmolzen und 15 Minuten lang auf 170° erhitzt, wobei teilweise Kristallisation eintrat.

a) Prolin-methylester (X) und Hygrinsäure-methylester (XII). Aus der Reaktionsflüssigkeit wurden zuerst die vorhandenen Ester abdestilliert. Es gingen bei 12 mm zwischen 80 und 90° 350 mg farbloses Öl in die Vorlage über. Durch Kochen mit Kupferhydroxyd wurde das Destillat verseift und in das Kupfersalz übergeführt, woraus sich mit Chloroform 310 mg Substanz extrahieren liessen.

Der in Chloroform unlösliche Rückstand betrug 90 mg und wurde in eine alkohol-lösliche und eine alkoholunlösliche Fraktion getrennt. Aus dem alkohollöslichen Kupfersalz liess sich nach dem Zerlegen mit Schwefelwasserstoff L-Prolin, $[\alpha]_D^{20} = -80^\circ$ ($c = 0,19$ in Wasser), isolieren. Sein Pikrat schmolz bei 152°. Das schwerlösliche Kupfersalz gab nach dem Zerlegen DL-Prolin. Schmelzpunkt des Pikrates 136°.

Das chloroformlösliche Kupfersalz lieferte nach dem Behandeln mit Schwefelwasserstoff einen farblosen, kristallinen Rückstand, der aus absolutem Alkohol nach Zusatz von Äther in langen, dünnen Prismen kristallisierte. Smp. 116°, $[\alpha]_D^{20} = -81^\circ$ ($c = 0,8$ in Wasser). Es musste sich um das Monohydrat der L-Hygrinsäure handeln. Die L-Hygrinsäure wurde zur Analyse im Exsikkator über Calciumchlorid getrocknet.

$C_6H_{11}O_2N, H_2O$	Ber. C 48,97	H 8,85	N 9,52%
	Gef. „ 49,15; 49,18	„ 8,87; 8,68	„ 9,64%

Aus den Mutterlaugen der L-Hygrinsäure kristallisierte dann die DL-Hygrinsäure vom Smp. 169—171° aus, die durch das Chlorhydrat vom Smp. 187—189° und das Goldsalz vom Smp. 190—195° charakterisiert werden konnte.

b) Prolin-diketo-piperazin (XIV). Der nach dem Abdestillieren des Prolin- und des Hygrinsäure-esters verbleibende Rückstand wurde mit Essigester extrahiert. Beim Einengen der Lösung kristallisierten farblose Prismen vom Smp. 135°. Nach mehrfachem Umkristallisieren war der Smp. 156°. Die Substanz gab kein Kupfersalz. Zur Analyse wurde die Verbindung im Hochvakuum bei 70° getrocknet.

$C_{10}H_{14}O_2N_2$	Ber. C 61,82	H 7,27	N 14,42%
	Gef. „ 61,50	„ 7,47	„ 14,41%

Die Analysenwerte stimmen gut für Prolin-diketo-piperazin. Durch die Hydrolyse des Präparates konnte diese Annahme bestätigt werden, da dabei ausschliesslich Prolin erhalten wurde:

500 mg der Substanz vom Smp. 156° wurden 10 Stunden mit 10 cm³ konz. Salzsäure gekocht, darauf die überschüssige Salzsäure abgedampft und das Halogen mit Silberoxyd entfernt. Der beim Eindampfen zur Trockne verbleibende Rückstand kristallisierte aus absolutem Alkohol nach dem Impfen mit L-Prolin. Es konnten 130 mg L-Prolin isoliert werden. Smp. 215°, $[\alpha]_D^{20} = -75,5^\circ$ ($c = 0,66$ in Wasser). Das Pikrat schmolz bei 147°. Die Mutterlaugen des L-Prolins wurden in das Kupfersalz übergeführt und mit absolutem Alkohol behandelt. Dabei blieben 130 mg Kupfersalz ungelöst. Nach dem Zerlegen desselben mit Schwefelwasserstoff wurden daraus 50 mg DL-Prolin vom Smp. 209° erhalten. Ein Teil des Prolins war also racemisiert worden. Der Schmelzpunkt des Pikrates war 135°.

Aus der alkohollöslichen Fraktion liessen sich nach dem Zerlegen des Kupfersalzes noch 150 mg L-Prolin gewinnen. Pikrat Smp. 147°.

c) Prolin (XIII). Die nach dem Extrahieren des Prolin-diketo-piperazins verbleibende Substanz der Ummethylierungsreaktion wurde nun portionenweise mit Chloroform

versetzt und mit DL-Prolin geimpft. Bald setzte Kristallisation ein, und nach einiger Zeit konnten aus der Chloroformlösung 90 mg DL-Prolin abgetrennt werden. Smp. 209—211°. Schmelzpunkt des Pikrates 137°.

d) Hygrinsäure (XI). Die Prolinmutterlauge wurden nun eingedampft und der Trockenrückstand der Hochvakuumsublimation unterworfen. Bei 0,005 mm Hg sublimierten zwischen 90 und 100° 30 mg farblose Kristalle vom Smp. 165—170°, die mit DL-Hygrinsäure keine Schmelzpunktserniedrigung zeigten. Die Substanz gab ein chloroformlösliches blaues Kupfersalz. Das Sublimat war also DL-Hygrinsäure.

Zusammenfassung.

Es wird die Herstellung von rac. Dihydro-lysergsäure aus rac. Dihydro-nor-lysergsäure-methylester und von rac. Dihydro-isolysergsäure(I) aus rac. Dihydro-nor-isolysergsäure(I)-methylester mit Hilfe einer neuartigen Ummethylierungsreaktion beschrieben und der Mechanismus dieser Ummethylierung an Hand weiterer Beispiele erörtert.

Die auf diese Weise gewonnene, synthetische rac. Dihydro-lysergsäure konnte über das L-Norephedrid in die optischen Antipoden aufgelöst werden. Damit ist die Totalsynthese der D-Dihydro-lysergsäure, des Hauptbestandteils der therapeutisch wichtig gewordenen Dihydro-Mutterkornalkaloide, verwirklicht und dessen Konstitution einwandfrei bewiesen.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium
„Sandoz“ Basel.

56. Über Steroide.

96. Mitteilung¹⁾.

Über einige Abkömmlinge des tricyclischen Oxyketons aus Cholesterin

von J. R. Billeter und K. Miescher.

(21. XII. 49.)

Es wurde schon verschiedentlich beobachtet, dass bei energischen oxydativen Eingriffen an Steroiden, unter Aufspaltung des Ringes D, tricyclische Ketone entstehen können. So erhielt *Achtermann*²⁾ bei der Pyrolyse des Ozonisierungsproduktes des β -Ergosterol-acetats ein Acetoxyceton, welchem er die Konstitution eines 7 β -Acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthrons-(1) (IV) zuschrieb. Ein Jahr später konnte *Laucht*³⁾ durch Dehydrierung des entsprechenden Oxyketons III zum bekannten 2-Methyl-phenanthren⁴⁾ die Richtigkeit dieser Annahme beweisen. 1940 isolierten *Köster & Logemann*⁵⁾ aus den

¹⁾ 95. Mitteilung, Helv. **33**, 178 (1950).

²⁾ *T. Achtermann*, Z. physiol. Ch. **225**, 141 (1934).

³⁾ *F. Laucht*, Z. physiol. Ch. **237**, 236 (1935).

⁴⁾ *R. D. Haworth*, Soc. **1932**, 1125.

⁵⁾ *H. Köster & W. Logemann*, B. **73**, 298 (1940).

Oxydationsprodukten des Cholesterin-acetat-dibromids nach *Ruzicka*¹⁾ ein ungesättigtes tricyclisches Keton, das $\Delta^{14,9-7\beta}$ -Oxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthron-(1)²⁾ (I), welches sie in das Oxyketon von *Achtermann* (III) überführen konnten. Fünf Jahre darauf gelang es *Reich*³⁾, aus den Abbauprodukten des Desoxy-cholsäure-methylester-diacetats mit Chromsäure ein zu I isomeres tricyclisches Oxyketon, das $\Delta^{2,3-7\alpha}$ -Oxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthron-(1) (XXIV) mit cis-Stellung der Ringe A und B⁴⁾ zu gewinnen und dieses in das gesättigte 2,13-Dimethyl-perhydro-phenanthren-dion-(1,7) (XIII) überzuführen. Letzteres wurde kürzlich von *Cornforth & Robinson*⁵⁾ einerseits totalsynthetisch, andererseits aber auch aus dem Oxyketon I über das bereits von *Köster & Logemann* beschriebene $\Delta^{8,14-2,13}$ -Dimethyl-dodecahydro-phenanthren-dion-(1,7) (XV) hergestellt.

Als regelmässiges Nebenprodukt der Cholesterinoxidation mit Chromsäure ist das Oxyketon von *Köster & Logemann* ein relativ gut zugänglicher Körper geworden, dessen Herstellung wir noch wesentlich vereinfachen konnten. Im Bestreben, alle Nebenprodukte der Oxydation zu verwerten, haben wir es einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Über unsere ersten Ergebnisse möchten wir hier berichten.

I. Darstellung isomerer Hydrophenanthren-oxyketone und -diketone.

Köster & Logemann erhielten durch katalytische Hydrierung des Acetats ihres Oxyketons (II) mit Platin in essigsaurer Lösung und anschliessende Rückoxydation lediglich das 7β -Acetoxy-2,13-Dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (IV) vom Smp. 144—145°, das mit dem von *Achtermann* aus β -Ergosterol erhaltenen Acetat identisch war und somit sicher trans-Verknüpfung der Ringe A und B aufwies.

Wir wiederholten diese Reduktion und fanden nun neben dem Acetoxyketon IV in ungefähr gleicher Ausbeute eine zweite Verbindung vom Smp. 116—118°, die mit der ersten eine starke Schmelzpunktserniedrigung ergab. Dass es sich um das isomere „cis“- 7β -Acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (XII) handelte, wurde durch Verseifung zum „cis“-Oxyketon XI und Oxydation zum „cis“-2,13-Dimethyl-perhydro-phenanthren-dion-(1,7) (XIII) bewiesen. Oxydation des Oxyketons I nach *Oppenauer* ergab das 4,5-ungesättigte Diketon XV⁶⁾. Anschliessende Hydrierung der Doppelbindung mit Palladiummohr als Katalysator in Ätherlösung⁷⁾ führte ebenfalls zum gesättigten Diketon XIII. Durch Mischprobe wurde seine Identität

¹⁾ *L. Ruzicka & A. Wettstein*, Helv. 18, 986 (1935).

²⁾ Über die Bildung dieser Verbindung siehe *J. R. Billeter & K. Miescher*, Helv. 30, 1414 (1947).

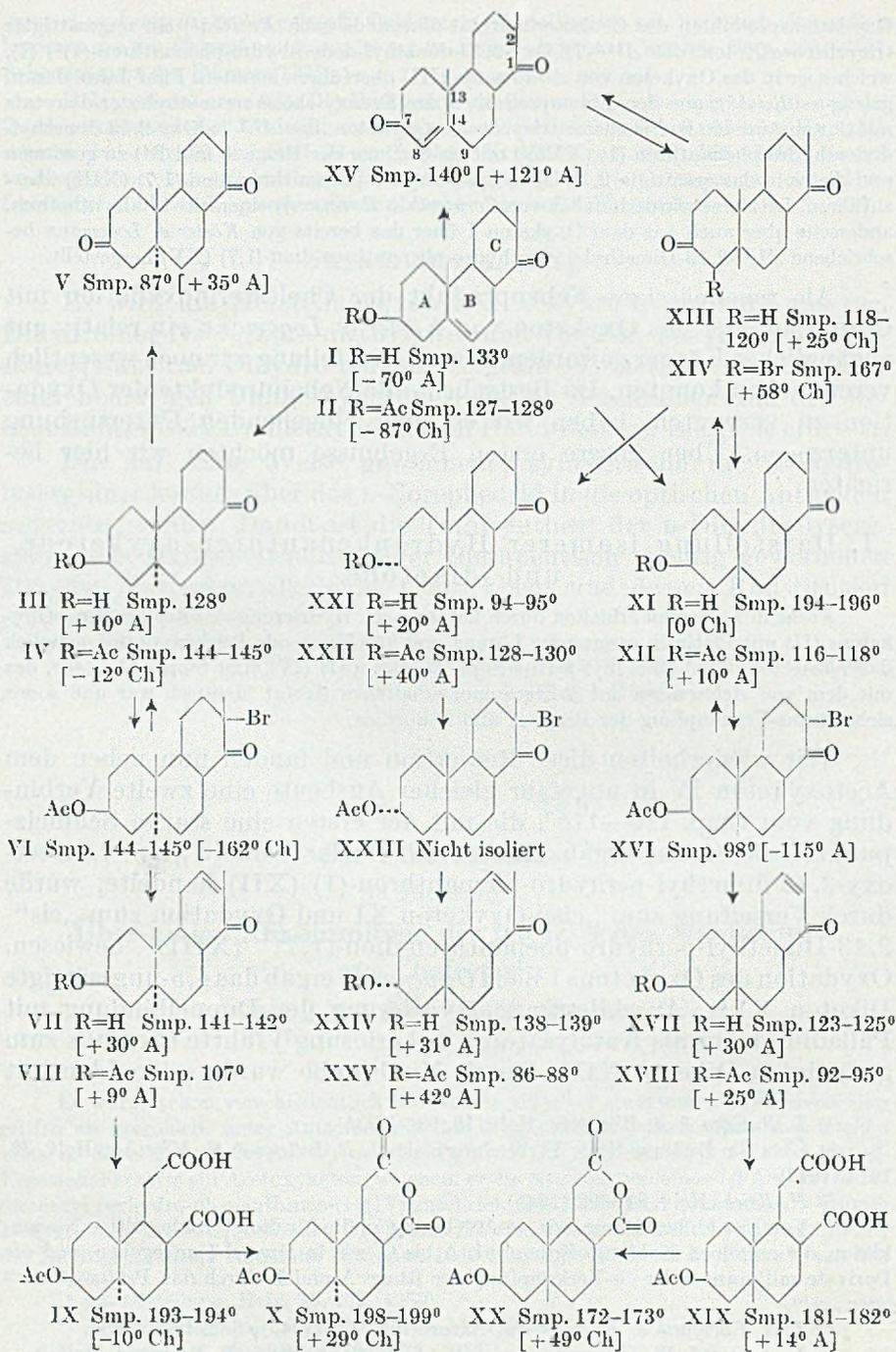
³⁾ *H. Reich*, Helv. 28, 892 (1945).

⁴⁾ Von hier ab bezeichnen wir, in Anlehnung an die für die Steroide gültige Nomenklatur, die einzelnen Kohlenstoffringe mit A bis C, wie in Formel I angegeben, und die Derivate mit trans- oder cis-Verknüpfung der Ringe A und B durch das Präfix „trans“ oder „cis“.

⁵⁾ *J. W. Cornforth & R. Robinson*, Nature 160, 737 (1947); Soc. 1949, 1855.

⁶⁾ *H. Köster & W. Logemann*, loc. cit.; *J. W. Cornforth & R. Robinson*, loc. cit.

⁷⁾ *H. Grasshof*, Z. physiol. Ch. 223, 25 (1934); *L. Ruzicka, H. Brüngger, E. Eichenberger & J. Meyer*, Helv. 17, 1414 (1934).



mit dem Diketon von *Reich* festgestellt¹⁾, welches ja seinerseits mit demjenigen von *Cornforth & Robinson* übereinstimmte. Dem zweiten Hydrierungsprodukt XI kommt somit sicher cis-Konfiguration der Ringe A und B zu. Die Hydrierung des $\Delta^{14,9}$ -7 β -Acetoxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthrols-(1) (II) verläuft also sterisch anders als bei den meisten bekannten Beispielen²⁾ der katalytischen Absättigung in essigsäurem Medium einer in 5,6-Stellung stehenden Doppelbindung von Steroiden.

Um den Vergleich zwischen der cis- und trans-Reihe zu ergänzen, stellten wir noch das „trans“-2,13-Dimethyl-perhydro-phenanthren-dion-(1,7) (V) her, indem wir das „trans“-Acetoxy-keton IV verseiften und das Oxyketon III oxydierten. Wie die Oxyketone sind auch die Diketone verschieden.

Die cis-Konfiguration des Diketons XIII erlaubte, in Umkehrung der Reaktion von *Cornforth & Robinson*³⁾, die Einführung einer Doppelbindung in 4,5-Stellung. Dazu wurde XIII in essigsaurer Lösung bromiert. Kochen des 4-Brom-diketons XIV mit Pyridin lieferte wieder das $\Delta^{8,14}$ -2,13-Dimethyl-dodecahydro-phenanthren-dion-(1,7) (XV).

Das beschriebene „cis“-7 β -Oxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (XI) war auch durch partielle Hydrierung des „cis“-Diketons XIII in alkoholischer Lösung in Gegenwart von Nickelkatalysator nach *Rupe* zugänglich. Nach Aufnahme von 1 Mol Wasserstoff blieb dabei die Reduktion stehen. Aus dem Reaktionsgemisch liess sich ferner das in 7-Stellung epimere „cis“-7 α -Oxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (XXI) dank seiner abweichenden Löslichkeit in Äther gewinnen. Die α - und β -Verbindungen entstanden im Verhältnis von ungefähr 3 zu 1. Auch das aus dem so erhaltenen 7 β -Carbinol XI dargestellte Acetat XII erwies sich mit dem früher beschriebenen Präparat als identisch. Das 7 α -Carbinol XXI lieferte bei der Acetylierung das neue Acetat XXII.

II. Überführung der Perhydrophenanthren-acetoxyketone in 2,3-ungesättigte Derivate.

Nach der von *Mosettig & Burger*⁴⁾, sowie *Wilds*⁵⁾ angegebenen Methode der Bromierung von Ketonen in ätherischer Lösung mit Brom gelang es uns, ein Atom Brom in die drei gesättigten Acetoxy-

¹⁾ Die Mischproben wurden im Laboratorium von Herrn Prof. *Reichstein* ausgeführt, wofür wir auch hier unseren Dank aussprechen möchten.

²⁾ Vgl. aber auch *T. Reichstein & A. Lardon*, *Helv.* **24**, 955 (1941), sowie *V. Wenner & T. Reichstein*, *Helv.* **27**, 24 (1944), die bei der katalytischen Hydrierung von 3 β -Dehydroandrosteron-acetat in Eisessig auch das 3 β -Acetoxy-ätio-cholanon-(17) in bedeutender Menge erhielten.

³⁾ *J. W. Cornforth & R. Robinson*, *Nature* **160**, 737 (1949); *Soc.* **1949**, 1855.

⁴⁾ *E. Mosettig & A. Burger*, *Am. Soc.* **57**, 2191 (1935).

⁵⁾ *A. L. Wilds*, *Am. Soc.* **64**, 1424 (1942).

ketone IV „trans“, XII „cis“ und XXII „cis“ einzuführen¹⁾). Die erhaltenen Bromide VI und XVI sind gut kristallisierende, aber nicht unbegrenzt haltbare Verbindungen, während das Bromid XXIII nicht kristallisiert gewonnen werden konnte. Um die Lage der Bromatome zu ermitteln, spalteten wir aus den drei Bromiden zuerst durch kurzes Kochen mit Pyridin ein Mol Bromwasserstoff ab und erhielten die drei entsprechenden ungesättigten $\Delta^{2,3,7}$ -Acetoxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthrone-(1) (VIII „trans“, XVIII „cis“ und XXV „cis“). Verseifung mit Pottasche in wässrig-methanolischer Lösung lieferte die freien ungesättigten Oxyketone VII „trans“, XVII „cis“ und XXIV „cis“. XXIV sowie sein Dinitrobenzoat erwiesen sich durch ihre praktisch übereinstimmenden Schmelzpunkte und das Ausbleiben von Schmelzpunktserniedrigungen im Gemisch als identisch mit den Verbindungen von Reich²⁾. Dieser Autor hatte allerdings das entsprechende Acetat, das in unseren Versuchen bei 86—88° schmolz, nur amorph erhalten. Die angegebene Lage der Doppelbindung in XXIV scheint aber genügend gesichert.

Zur weiteren Abklärung der Konstitution der Acetoxyketone VIII und XVIII wurden diese mit Chromsäure oxydiert, wobei wir zwei unter Verlust von zwei C-Atomen entstandene isomere Dicarbonsäuren gewinnen konnten. Sie gaben mit Acetanhydrid in Pyridin-Lösung Anhydride und lieferten keine Ketone beim Destillieren über Bleicarbonat. Bei den beiden Säuren muss es sich also um 1,5-Dicarbonsäuren handeln, denen in Übereinstimmung mit den gefundenen Summenformeln die Konstitution der „cis“- und der „trans“-[2-Carboxy-6-acetoxy-9-methyl-decalyl-(1)]-essigsäure (IX und XIX) zukommt. Ihre Anhydride sind dann gemäss X und XX zu formulieren. Die Doppelbindung in VIII und XVIII lag demnach ebenfalls in 2,3-Stellung. Durch die obigen Ergebnisse wird ferner die 2-Stellung des Bromatoms in VI, XVI und XXIII bewiesen. Dass die Bromierung ohne Walden'sche Umkehrung verlief, zeigte die reduktive Entfernung des Broms aus VI und XVI mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladiumkohle, wobei die Ausgangsketone IV und XII praktisch quantitativ zurückgewonnen wurden.

Experimenteller Teil³⁾.

1. Hydrierung des tricyklischen Ketons aus Cholesterin.

„trans“- und „cis“-7 β -Acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthrone-(1) (IV und XII).

200 g $\Delta^{14,9,7\beta}$ -Acetoxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthron-(1) (II) wurden in 2 l Eisessig in Gegenwart von 5 g Platinoxid hydriert. Nach Aufnahme von 23,5 l Wasserstoff (ber. für 2 Mol H₂ 30,9 l) blieb die Hydrierung stehen. Wir filtrierten vom Katalysator ab, spülten mit 500 cm³ Eisessig nach und tropften unter Wasserkühlung innerhalb

¹⁾ Amerikanische Patentanmeldung, Serial Number 117955 vom 26. 9. 1949.

²⁾ H. Reich, loc. cit., siehe auch ¹⁾ Seite 391.

³⁾ Sämtliche Schmelzpunkte sind korrigiert.

2 Stunden eine Lösung von 60 g Chromtrioxyd in 660 cm³ 90-proz. Essigsäure zu. Nach 2 weiteren Stunden zersetzten wir die überschüssige Chromsäure mit Natriumhydrogensulfit, dampften im Vakuum bis auf beginnende Kristallisation ein und versetzten mit 2 l Wasser. Das rohe Reaktionsprodukt wurde abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Trennung der beiden Epimeren erfolgte durch Umlösen aus 500 cm³ Methanol, wobei das schwer lösliche „trans“-7- β -Acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (IV) bei mehrstündigem Stehenlassen der Lösung auf Raumtemperatur zu harten, dicken Prismen kristallisierte und das „cis“-7- β -Acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (XII) durch Abkühlen der von IV abdekantierten Lösung auf -5° als Nadeln erhalten wurde. Nach nochmaligem Umlösen aus Methanol erhielten wir 93,5 g IV mit dem Smp. 144–145 $^{\circ}$ und 83 g XII mit dem Smp. 116–118 $^{\circ}$. Die Gesamtausbeute betrug somit 88%.

C₁₈H₂₈O₃ Ber. C 73,93 H 9,65% IV Gef. C 73,85 H 9,76% XII Gef. C 73,69 H 9,68%

IV $[\alpha]_D^{20} = -12^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (c = 1,041 in Chloroform)

XII $[\alpha]_D^{22} = +10^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (c = 1,460 in Alkohol)

Die Semicarbazone wurden aus Chloroform-Methanol umkristallisiert. Sie schmolzen bei 237 $^{\circ}$ (IV) und 233 $^{\circ}$ (XII).

C₁₉H₃₁O₃N₃ Ber. C 65,30 H 8,94 N 12,03%

IV Gef. „ 65,10 „ 8,88 „ 11,98%

XII Gef. „ 65,04 „ 9,00 „ 12,11%

„trans“- und „cis“-7- β -Oxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthrone-(1) (III und XI).

Die beiden Carbinole III und XI erhielten wir durch halbstündiges Kochen der Acetate IV und XII in 10 Teilen Methanol mit 0,5 Teilen Pottasche und 1 Teil Wasser. Nach starkem Konzentrieren wurden die Lösungen mit Wasser versetzt und die ausgefallenen Verseifungsprodukte abgenutscht. Das „trans“-7- β -Oxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (III) zeigte nach Umlösen aus verdünntem Methanol einen Smp. von 128 $^{\circ}$; das „cis“-7- β -Oxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (XI), aus Hexan oder Methanol umkristallisiert, schmolz bei 194–196 $^{\circ}$.

C₁₆H₂₆O₂ Ber. C 76,75 H 10,43% III Gef. C 76,83 H 10,35% XI Gef. C 76,72 H 10,65%

III $[\alpha]_D^{21} = +10^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (c = 1,020 in Alkohol)

XI $[\alpha]_D^{22} = 0^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (c = 1,074 in Chloroform)

2. Abkömmlinge des „trans“-Oxyketons III.

„trans“-2,13-Dimethyl-perhydro-phenanthren-dion-(1,7) (V).

2 g des Oxyketons III, in 50 cm³ Eisessig gelöst, wurden tropfenweise mit der Lösung von 0,8 g Chromtrioxyd in 11 cm³ 90-proz. Essigsäure versetzt. Wir liessen über Nacht stehen, zersetzten die überschüssige Chromsäure mit Natriumhydrogensulfit, engten im Vakuum stark ein und nahmen in Äther und Wasser auf. Aus der neutral gewaschenen und getrockneten Äther-Lösung erhielten wir 1,8 g „trans“-2,13-Dimethyl-perhydro-phenanthren-dion-(1,7) (V), das zweimal aus Pentan umgelöst wurde. Es kristallisierte zuerst zu dünnen Nadeln, die sich langsam in flache Täfelchen umwandelten. Smp. 87 $^{\circ}$.]

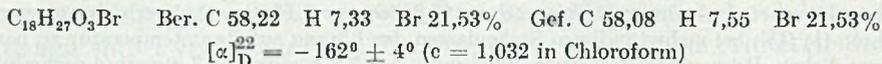
C₁₆H₂₄O₂ Ber. C 77,37 H 9,74% Gef. C 77,13 H 10,03%

$[\alpha]_D^{27} = +35^{\circ} \pm 3^{\circ}$ (c = 1,755 in Alkohol).

„trans“-2-Brom-7- β -acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (VI).

10 g des Acetoxyketons IV wurden bei Raumtemperatur in 250 cm³ Äther gelöst und vorsichtig mit 1,75 cm³ Brom versetzt. Sobald die ersten Tropfen sich entfärbt hatten,

kühlte man mit Eiswasser ab. Die Bromierung verlief dann schnell und jeder Tropfen entfärbte sich momentan. Wir setzten Eiswasser zu, trennten die farblose Äther-Lösung, wuschen sie mit Natriumhydrogencarbonat neutral und dampften sie nach Trocknen unter Vakuum ein. Der kristallinische Rückstand wurde aus Methanol schnell umgelöst. Bei längerem Kochen kann Zersetzung eintreten. Smp. 144—145°.

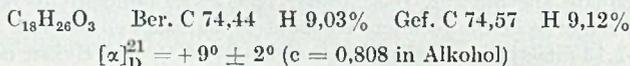


„trans“-3 β -Acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1)
(IV aus VI).

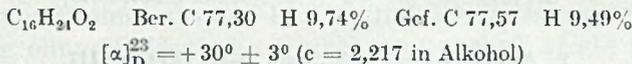
Wir hydrierten 5 g VI in Gegenwart von 2 g 10-proz. Palladiumkohle in 100 cm³ Alkohol. Nach 1½ Stunden blieb die Hydrierung stehen und die Wasserstoffaufnahme betrug 373 cm³, wovon 270 cm³ innerhalb 10 Minuten verbraucht worden waren (berechnet 301 cm³). Wir filtrierten vom Katalysator ab, konzentrierten stark im Vakuum und versetzten tropfenweise mit Wasser. Das „trans“-3 β -Acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (IV) kristallisierte aus. Nach einmaligem Umlösen aus Methanol war es in Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und Drehung mit dem oben beschriebenen Acetoxketon IV identisch. Ausbeute 3,9 g.

„trans“-1^{2,3}-3 β -Acetoxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthron-(1)
(VIII).

Wir kochten 10 Minuten 6 g des Bromids VI mit 30 cm³ Pyridin, kühlten ab, gossen in 200 cm³ 2-n. Salzsäure und nahmen in Äther auf. Nach Trocknen und Eindampfen der Äther-Lösung erhielten wir 4,5 g „trans“-1^{2,3}-3 β -Acetoxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthron-(1) (VIII), das nach Umlösen aus verdünntem Methanol oder Hexan bei 107° schmolz. Es gab keine Färbung mit Tetranitromethan und bildete kein Semicarbazon.



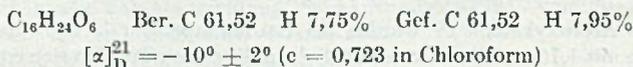
Das „trans“-1^{2,3}-3 β -Oxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthron-(1) (VII) erhielten wir durch Verseifung von 2 g des Acetats VIII in 20 cm³ Methanol mit 1 g Pottasche und 2 cm³ Wasser. Es zeigte nach Umlösen aus verdünntem Methanol einen Smp. von 141—142°.



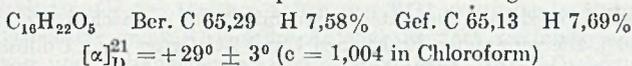
Verzichtete man auf die Isolierung des Bromids, so betrug die Ausbeute von VIII aus IV 85%.

„trans“-[2-Carboxy-6-acetoxy-9-methyl-decalyl-(1)]-essigsäure (IX).

Wir lösten 4,6 g VIII in 100 cm³ Eisessig und tropften innerhalb 1½ Stunden eine Lösung von 8,5 g Chromtrioxyd in 8,5 cm³ Wasser und 85 cm³ Eisessig zu. Wir liessen über Nacht stehen und erhitzen anschliessend 1 Stunde auf 40°. Nun zersetzten wir die überschüssige Chromsäure mit Natriumhydrogensulfid, dampften im Vakuum ein, nahmen in Äther und Wasser auf und trennten die sauren Anteile mit Natriumcarbonat-Lösung ab. Die übliche Aufarbeitung ergab 2,4 g Rohsäuren, die nach Umlösen aus Essigester-Hexan die reine „trans“-[2-Carboxy-6-acetoxy-9-methyl-decalyl-(1)]-essigsäure (IX) mit dem Smp. 193—194° lieferten. Die Säure sublimierte unverändert bei 190°/0,03 mm und gab kein Keton beim Erhitzen mit Bleicarbonat bis auf 300° im Hochvakuum.



Das Anhydrid X bildete sich beim Stehenlassen über Nacht einer Lösung von 500 mg IX in 4 cm³ Pyridin und 2 cm³ Acetanhydrid. Aus Essigester-Hexan umkristallisiert, schmolz es bei 198–199°. Die Mischprobe mit der Säure zeigte eine starke Depression.

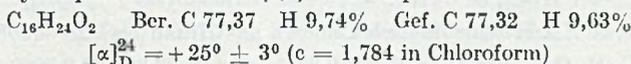


3. Abkömmlinge des „cis“-Oxyketons XI.

„cis“-2,13-Dimethyl-perhydro-phenanthren-dion-(1,7) (XIII).

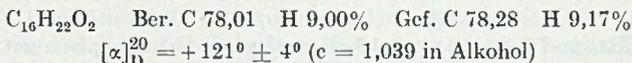
1. Aus dem gesättigten Oxyketon XI.

Die Oxydation des „cis“-Oxyketons XI geschah analog der Oxydation von III. Ausgehend von 13 g XI erhielten wir 10,1 g aus Äther-Pentan umkristallisiertes „cis“-2,13-Dimethyl-perhydro-phenanthren-dion-(1,7) vom Smp. 118–120°.



2. Aus dem ungesättigten Oxyketon I über XV.

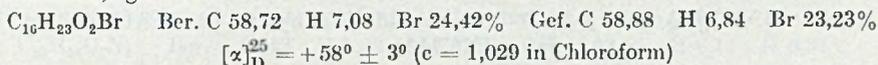
Wir stellten zuerst das $\Delta^{8,14}$ -2,13-Dimethyl-dodecahydro-phenanthren-dion-(1,7) (XV) nach den Angaben von Köster & Logemann¹⁾ her. Aus Methanol umgelöst, schmolz es bei 140°.



4,5 g XV wurden in 200 cm³ Äther gelöst und in Gegenwart von 0,5 g Palladiummohr hydriert. Nach Aufnahme von 452 cm³ Wasserstoff (berechnet 409 cm³) blieb die Reduktion stehen. Wir filterten und dampften ein. Das aus der eingedampften Ätherlösung erhaltene und aus Äther-Pentan umkristallisierte Diketon XIII schmolz bei 118–120° und gab keine Depression mit dem unter 1. erhaltenen sowie mit dem von Reich dargestellten Präparat vom Smp. 119°.

$\Delta^{8,14}$ -2,13-Dimethyl-dodecahydro-phenanthren-dion-(1,7) (XV)
aus XIII über XIV.

Wir lösten 5 g des Diketons XIII in 50 cm³ Eisessig, versetzten mit 0,1 cm³ einer konzentrierten Bromwasserstoffsäure-Lösung in Eisessig und tropften bei Raumtemperatur 3,2 g Brom in 20 cm³ Essigsäure ein. Nach erfolgter Bromierung fällten wir langsam mit Eiswasser, wobei das „cis“-8-Brom-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthren-dion-(1,7) (XIV) auskristallisierte. Nach wiederholtem Umlösen aus Äthanol schmolz es bei 167°. Ausbeute 2,7 g.



1,5 g des Bromids XIV wurden 6 Stunden mit 20 cm³ Pyridin gekocht. Nach Abkühlen gossen wir in 150 cm³ 2-n. Salzsäure und nahmen in Äther auf. Nach Trocknen und Eindampfen erhielten wir aus der Äther-Lösung 0,7 g $\Delta^{8,14}$ -2,13-Dimethyl-dodecahydro-phenanthren-dion-(1,7) (XV), das nach Hochvakuum-Sublimation bei 110°/0,05 mm und Umlösen aus Äther-Hexan bei 140° schmolz und sich in Mischschmelzpunkt und Drehung mit dem aus I dargestellten Diketon als identisch erwies.

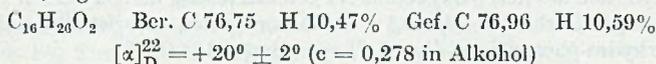
Darstellung der isomeren „cis“-7 α - und -7 β -Oxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthrone-(1) (XXI und XI).

13,1 g XIII wurden in 125 cm³ Alkohol in Gegenwart von 5 g Nickel-Katalysator nach Rupe hydriert. Nach erfolgter Aufnahme von 1,189 l Wasserstoff (ber. 1,183) blieb die Reduktion stehen. Wir filterten ab und dampften die Lösung ein. Der Rückstand

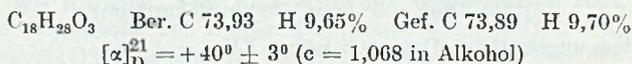
¹⁾ Köster & Logemann, loc. cit.; vgl. J. W. Cornforth & R. Robinson, loc. cit.

wurde mit 100 cm³ Äther kurz aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurde vom ungelösten Anteil abgenutzt (Fraktion 1: 2,2 g, Smp. 187°, sintert bei 165°). Die Mutterlauge wurde auf die Hälfte konzentriert. Nach mehrstündigem Stehen bei 0° hatten sich neue Kristalle gebildet. Es wurde wiederum abgenutzt und mit Äther gewaschen (Fraktion 2: 1,02 g Smp. 130—140°). Die vereinigten Fraktionen 1 und 2 lieferten nach Umlösen aus Methanol 2,8 g XI vom Smp. 194—195°, das keine Depression mit dem aus II über XII erhaltenen „cis“-7-β-Oxyketon XI gab.

Die ätherische Mutterlauge wurde eingedampft und der ölige Rückstand mit Hexan verrührt. Er kristallisierte sofort und lieferte nach Umlösen aus dem gleichen Lösungsmittel das „cis“-7-α-Oxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (XXI) vom Smp. 94—95°. Ausbeute 8,27 g.



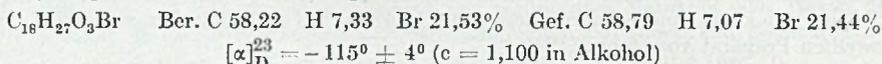
Das Acetat XXII schmolz nach Umlösen aus Hexan bei 128—130°.



Das aus XI dargestellte Acetat schmolz bei 116°. Es gab keine Schmelzpunktniedrigung mit dem aus II hergestellten Acetat vom Smp. 116—118°.

„cis“-2-Brom-7-β-acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1)
(XVI).

Das Bromid XVI wurde wie das Bromid VI hergestellt. Ausgehend von 10 g XII erhielten wir 9,8 g aus Hexan umkristallisiertes „cis“-2-Brom-7-β-acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) vom Smp. 98°.

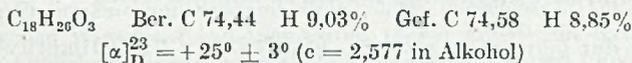


„cis“-7-β-Acetoxy-2,13-dimethyl-perhydro-phenanthron-(1) (XII)
aus XVI.

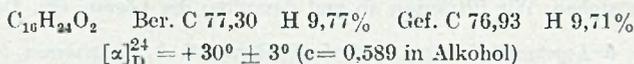
Man hydrierte 11 g XVI in 150 cm³ Alkohol in Gegenwart von 2,5 g 5-proz. Palladiumkohle. Nach Aufnahme von 705 cm³ Wasserstoff (ber. 663 cm³) arbeitete man wie für die Enthalgeneierung von VI auf. Es wurden 7,8 g XII vom Smp. 116° erhalten, die im Gemisch mit einem aus II hergestellten Präparat keine Depression ergaben.

„cis“-1^{2,3}-7-β-Acetoxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthron-(1)
(XVIII).

28 g XVI wurden mit 140 cm³ Pyridin 15 Minuten gekocht. Man arbeitete wie bei der Darstellung von VIII auf. Das rohe Reaktionsprodukt bildete ein Öl, das destilliert wurde. Kp_{0,05} 162—164°. Das Destillat erstarrte kristallinisch. Nach Umlösen aus Hexan schmolz das „cis“-1^{2,3}-7-β-Acetoxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthron-(1) (XVIII) bei 92—95° nach kurzem Sintern. Es bildete kein Semicarbazon und gab keine Färbung mit Tetra-nitromethan.

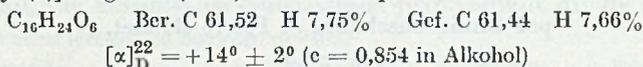


Das ungesättigte „cis“-Oxyketon XVII erhielten wir durch Verseifung von XVIII mit Pottasche in wässrig-methanolischer Lösung. Smp. 123—125° nach Umkristallisieren aus Hexan.

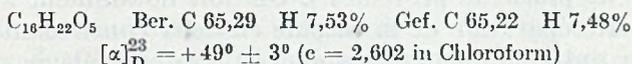


„cis“-[2-Carboxy-6-acetoxy-9-methyl-decalyl-(1)]-essigsäure (XIX).

10 g XVIII wurden in 100 cm³ Eisessig gelöst und mit 14 g Chromsäure in 154 cm³ 90-proz. Essigsäure unter den für den Abbau von VIII angegebenen Bedingungen oxydiert. Die Aufarbeitung ergab 6,3 g saure Anteile, die nach zweimaligem Umlösen aus Essigester-Hexan und Sublimieren bei 160°/0,03 mm die „cis“-[2-Carboxy-6-acetoxy-9-methyl-decalyl-(1)]-essigsäure (XIX) mit dem Smp. 181—182° lieferten.



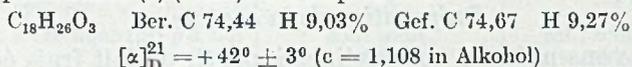
Das Anhydrid XX bildete sich beim Stehenlassen über Nacht einer Lösung von 0,5 g XIX in 3 cm³ Pyridin und 1 cm³ Acetanhydrid. Smp. 172—173° nach Umlösen aus Essigester-Hexan.



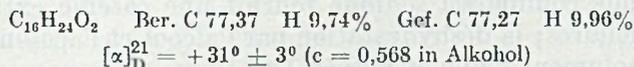
4. Abkömmlinge des „cis“-Oxyketons XXI.

„cis“-1^{2,3}-7 α -Acetoxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthron-(1) (XXV).

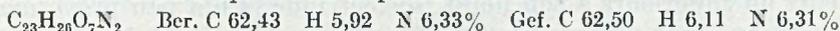
5,4 g XXII wurden in 100 cm³ Äther mit 0,9 cm³ Brom bromiert. Die Durchführung der Reaktion und die Aufarbeitung geschahen analog wie oben beschrieben. Das nicht kristallisierbare rohe Bromid XXIII (6,94 g) wurde 15 Minuten mit 70 cm³ Pyridin gekocht und die Lösung nach Abkühlen in 500 cm³ 2-n. Salzsäure gegossen. Das Reaktionsprodukt wurde mit Äther ausgezogen. Nach Trocknen und Eindampfen der Lösung sowie Umkristallisieren aus Hexan erhielten wir 3,6 g „cis“-1^{2,3}-7 α -Acetoxy-2,13-dimethyl-dodecahydro-phenanthron-(1) (XXV) vom Smp. 86—88°.



Das 2,3-ungesättigte 7 α -Oxyketon XXIV wurde durch Verseifung von XXV mit Pottasche in wässrig-methanolischer Lösung erhalten und aus Äther umkristallisiert. Es schmolz bei 138—139°. Die Mischprobe mit dem Oxyketon von Reich (Smp. 141°) ergab keine Depression.



Das nach Reich hergestellte 3,5-Dinitrobenzoat schmolz bei 194°, die Mischprobe mit dem Reich'schen Präparat vom Smp. 194° ebenso.



Die Analysen und die Bestimmung der Drehungen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn Dr. Gysel durchgeführt.

Zusammenfassung.

Ausgehend vom tricyclischen Oxyketon von Köster & Logemann wurde eine Reihe verwandter, gesättigter und ungesättigter Oxyketone und Diketone der Phenanthrenreihe hergestellt.

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Pharmazeutische Abteilung.

57. Recherches sur la caséine V¹).

Sur les constituants de la caséine

par Emile Cherbuliez et Pierre Baudet.

(10 X 49)

On sait depuis assez longtemps que la caséine du lait de vache est un mélange de plusieurs protéines²). On doit notamment à Warner³) un procédé de séparation de la caséine en deux constituants désignés par α et β ; antérieurement, Mellander⁴) avait révélé par l'examen électrophorétique que la caséine devait contenir au moins trois protides.

En reprenant l'étude des constituants de la caséine, nous nous sommes inspirés du mode de séparation mis au point par Warner. Cet auteur précipite la caséine dissoute sous forme de sels sodiques, à son point isoélectrique à basse température (2°); la fraction α précipite, tandis que β reste en solution pour flocculer à son tour lorsqu'on élève la température à 40°; reprécipitée, la caséine β s'est révélée homogène à l'électrophorèse, tandis que α s'est montrée dédoublable dans certaines conditions de pH et de concentration.

Préparation de la caséine.

Nous avons préparé nos caséines à partir de lait frais écrémé par centrifugation⁵), par précipitation isoélectrique entre 15 et 20°. Une précipitation à température plus basse conduirait à la perte d'une certaine quantité de la fraction β . Une triple reprécipitation du produit redissous comme sel sodique fournit une caséine extrêmement pauvre en cendres; la déshydratation par l'alcool et l'acétone livre un produit absolument blanc et pulvérulent.

La caséine ainsi préparée se dissout intégralement aux pH inférieurs ou supérieurs à son point isoélectrique (4,6 à peu près), mais ces solutions sont nettement troubles. Ce trouble est dû à un constituant qu'on peut éliminer par filtration d'une solution à 1—2% de caséinate de sodium sur de la silice. Cette dernière retient le constituant responsable de la turbidité, à côté d'un peu de caséine α . Un traitement de l'adsorbant par de la soude très diluée suivi d'une acidulation du filtrat au pH 4,6 fournit un précipité qui cède à l'acétone tiède un phospholipide qui est responsable du trouble des solutions

¹) IVème communication: Cherbuliez & Jeannerat, Helv. **22**, 959 (1939).

²) Bibliographie voir par ex. Helv. **15**, 597 (1932).

³) R. C. Warner, Am. Soc. **66**, 1725 (1944).

⁴) Bioch. Z. **300**, 240 (1939).

⁵) Nous remercions vivement les Laiteries Réunies à Genève qui ont bien voulu mettre à notre disposition un lait frais centrifugé à son arrivée.

de la caséine primitive. Le résidu insoluble dans l'acétone est constitué par de la caséine α .

La caséine débarrassée de ce lipide (que nous n'avons pas examiné de plus près) ne se distingue pas du produit primitif dans son comportement vis-à-vis de la présure. Voilà pourquoi nous ne considérons pas ce phospholipide comme un constituant proprement dit de la caséine.

Voici les caractéristiques de notre caséine:

humidité	13%	tyrosine	6,5 %
P (par hydrolyse alcaline ménagée)	0,86%	tryptophane	1,68%

Fractionnement de la caséine.

Par un fractionnement¹⁾ inspiré à la fois des indications de Warner²⁾ et de Cherbuliez & Meyer³⁾, nous avons pu retirer de la caséine purifiée les 4 fractions suivantes:

α environ 60% (décomposable en α_1 et α_{II})
β environ 25%
γ environ 10%
δ environ 5% (= protéose de Hammarsten ⁴⁾)

Les caséines α et β . Voici un tableau des principales propriétés de ces deux constituants:

	α	β
Point isoélectrique	4,5	4,9
Solub. du sel sodique (pH 5 à 7,5)	sol.: solut. claire	sol.: solut. claire ou trouble selon âge
Solub. du sel calcique (pH 5 à 7,5)	soluble	insoluble
Solub. dans tampon lactique de pH = 3, de $\mu = 0,1$	0,5%	insoluble
Tyrosine	8,4%	2,6%
Tryptophane	1,7%	0,85%
Phosphore total	1,1%	0,60%
Phosphore minéralisé par hydrolyse alcaline ménagée	1,1%	0,60%
Mobilité électrophorétique	$7,8 \cdot 10^{-5}$ $\text{cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ (pH 7,8; $\mu = 0,1; 3,08 \text{ volt/cm}$)	$2,9 \cdot 10^{-5}$ $\text{cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ (pH 7,6; $\mu = 0,1; 2,91 \text{ volt/cm}$)
Poids moléculaire minimum ⁵⁾	130000	48000

L'insolubilité du β -caséinate de calcium et sa solubilité en présence d' α -caséinate de calcium mettent en évidence le rôle de colloïde protecteur exercé par α vis-à-vis de β . Cette constatation confirme les idées émises en 1928 déjà par Linderström-Lang⁶⁾ au sujet de l'intervention probable d'un phénomène de ce genre dans le cas de la caséine.

¹⁾ V. partie expérimentale.

²⁾ Loc. cit.

³⁾ Helv. 16, 600 (1933).

⁴⁾ Cherbuliez & Jeannerat, Helv. 22, 959 (1939).

⁵⁾ Déterminé d'après les teneurs en tyrosine, tryptophane et phosphore.

⁶⁾ Z. physiol. Ch. 76, 176 (1928); C. r. Lab. Carlsberg 17.

L'existence de relations particulières entre caséines α et β est révélée également par leur comportement particulier au cours de leur séparation, comme on va le voir plus loin.

Caséine α . La séparation de cette fraction est basée sur le fait qu'au pH 4,6 et à 2°, cette fraction précipite, tandis que β , etc. restent en solution. Par répétition de cette opération, on obtient un produit qui ne contient plus qu'un peu de γ et la δ , dont on le débarrasse par reprecipitation au point isoionique en présence de sulfate d'ammonium à 5%; $\gamma + \delta$ restent alors en solution.

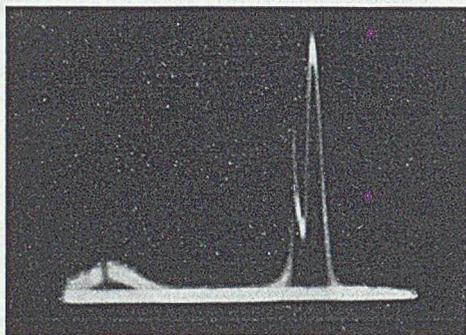


Fig. 1.

Diagramme électrophorétique de caséine α , conc. 0,75%, tampon de *Michaelis*, pH 7,8, $\mu = 0,1$, 3,08 volt/cm, 4° C, durée 180 min. Gradient ascendant, montrant le dédoublement en α_I et α_{II} .

Cette caséine se montre homogène à l'électrophorèse (tampon de *Michaelis* au véronal, de pH 7,8 à $\mu = 0,1$) à des concentrations supérieures à 1%; mais à des concentrations plus faibles (p. ex. 0,75%), on voit apparaître dans les mêmes conditions 2 gradients (voir Fig. 1). On peut du reste séparer α en deux fractions α_I et α_{II} par précipitation en présence de sulfate d'ammonium de $\mu = 2,2$ (5%) au pH 6, par chauffe à 40°.

Propriétés des caséines α_I et α_{II}

	α_I	α_{II}
Solub. du sel calcique (pH 7)	sol.; solut. laiteuse	sol.; solut. laiteuse
Solub. ds. sol. sal. de $\mu = 2,2$ à pH 6 et à 40°	soluble	insoluble
Tyrosine	8,2%	8,6%
Tryptophane	1,6%	1,7%
Phosphore minéralisé par hydrolyse alcaline ménagée	1,1%	1,0%

Caséine β . Si l'obtention d' α exempte de β est relativement aisée, il n'en est pas de même pour β qui retient toujours de l' α à côté d'un

peu de γ (comme le montre l'examen électrophorétique). Comme Warner l'avait déjà remarqué, seule une reprecipitation à très faible concentration (0,05%) au pH 4,6, d'abord à 2°, où seul α précipite, puis à 20°, où β pur est obtenu (tandis que γ reste en solution) conduit au but.

Une interaction entre α et β apparaît encore dans le fait qu'une hydrolyse alcaline ménagée d'un mélange de β avec 20% de α ne minéralise pas la totalité du phosphore, comme c'est le cas pour chaque fraction séparée. C'est ainsi que dans un mélange contenant 20% de α d'après les teneurs en tyrosine et en tryptophane, le phosphore minéralisé facilement n'atteignait que 64% du phosphore total. Il se forme probablement une combinaison entre α et β , peut-être avec intervention des groupes phosphorylés; l'existence d'une combinaison de ce genre pourrait expliquer aussi la constatation paradoxale, faite déjà par Warner, que la mobilité électrophorétique de β «brute» (c'est-à-dire contenant α), est inférieure à celle de β pur, malgré cette présence de α , plus mobile pourtant que β .

Examinée au microscope, la caséine β apparaît comme formée de petites particules arrondies, toutes de même forme et de même diamètre; elle est donc dans un état de précristallisation.

Caséine γ . Nous appelons ainsi une fraction séparée des filtrats de la précipitation soit de α soit de β , par addition de 2 vol. d'acétone à pH 6—6,3. Cette fraction — qui n'a pas encore été examinée de plus près — se différencie de α et de β notamment par son point isoélectrique de 5,2 (pH où elle ne précipite cependant qu'à des températures supérieures à 40° et en solution pas trop diluée), par ses teneurs en tyrosine (3,4%) et en tryptophane (1,3%), ainsi que par sa mobilité électrophorétique, un peu inférieure à celle de β . Son sel calcique ressemble à celui de la caséine β par son insolubilité à 40° entre les pH de 6 et de 7,5. Elle est aussi précipitée par l'acide trichloracétique 10% à.

Caséine δ . Cette fraction avait déjà été trouvée par nous¹⁾, et son identité probable avec la protéose de Hammarsten constatée²⁾.

Partie expérimentale.

Caséine.

Caséine brute: du lait frais, écrémé par centrifugation, est additionné à 15—25° de ClH 0,1-n. goutte à goutte sous agitation mécanique modérée jusqu'à floculation (pH 4,6); papier Lyphan). L'approche de la floculation se signale par l'aspect porcelainique que prend le lait et par l'augmentation de la tension superficielle. La caséine précipitée est séparée par centrifugation de 20 minutes à 3000 t/min. à une température qui ne doit pas être inférieure à 15°.

Elimination des sels: la caséine brute est suspendue dans 100 parties d'eau et dissoute sous agitation mécanique par addition progressive de NaOH 0,1-n., de manière que le pH ne dépasse jamais 7. La solution, diluée par addition d'eau à 200 parties, est reprecipitée comme plus haut par ClH 0,1-n. Trois opérations de ce genre suffisent.

¹⁾ Cherbuliez & Meyer, Helv. 16, 600 (1933); Cherbuliez & Jeannerat, Helv. 22, 959 (1939).

²⁾ Cherbuliez & Jeannerat, Helv. 22, 959 (1939).

Traitement par des solvants organiques: le produit centrifugé de l'opération précédente est traité par de l'acétone sous agitation mécanique pendant 3 heures; après centrifugation, le culot est traité de la même manière par de l'alcool à 95%.

Délipidation: on prépare une solution de caséine à 1—2% dans de la soude très diluée comme plus haut et filtre la liqueur trouble sur un *Büchner* garni d'une couche de Supercell Standard sur du papier filtre. Le filtrat doit être à peine opalescent. La silice est suspendue dans de l'eau, la suspension, agitée, est amenée au pH 7 par NaOH 0,1-n. comme plus haut. Après centrifugation à 3000 t/min. pendant 20 min., on sépare la liqueur très opalescente et précipite la caséine α qu'elle contient, par acidulation par ClH 0,1-n. au pH 4,6. Le culot est traité directement à 30° par 1 vol. d'acétone pour 1 partie de caséine primitive pendant 1 heure. Après centrifugation et lavage à l'acétone, la caséine α récupérée est ajoutée à la caséine purifiée, retirée du filtrat aqueux par précipitation au point isoélectrique, et traitée à l'acétone et à l'alcool comme plus haut.

Les phospholipides précipitent de leur solution acétonique tiède par abaissement de la température à 0°.

Dessiccation: la caséine purifiée est portée encore humide dans un dessiccateur à chlorure de calcium ou à silicagel, qu'on évacue. Le produit est pulvérisé de temps en temps; on obtient ainsi une matière très pulvérulente. — Les lipides retirés de la fraction adsorbée sur le Supercell par traitement acétonique n'ont pas été examinés de plus près; ils contiennent du phosphore.

Fractionnement (voir schéma).

Caséine α : une solution de caséinate de sodium à 0,4% est portée brusquement au pH 4 par addition, d'un coup et sous forte agitation, de ClH 0,1-n. La solution claire est refroidie à 2° et maintenue à cette température pendant l'addition, goutte à goutte avec agitation, de NaOH 0,1-n. jusqu'au pH 4,6 (papier Lyphan). Après un accroissement progressif de l'opalescence, il y a précipitation de α brut; on laisse déposer le précipité pour vérifier si une prise décantée est limpide; sinon, on ajoute prudemment encore un peu de soude caustique. Par centrifugation à la chambre froide (4°), on obtient une caséine α qui contient un peu de β à côté de γ et de δ (protéose) et avec laquelle on répète la manipulation décrite, ce qui élimine pratiquement β . Cette opération est répétée encore 3 fois.

Cette caséine α est débarrassée des restes de γ et de protéose par dissolution, au pH 6, comme caséinate de sodium (concentration 0,5%). La solution est additionnée de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à raison de 5%, puis portée au point isoionique par addition, sous agitation, de ClH 0,1-n., à la température ordinaire: α précipite pur; γ et restent dans les eaux-mères.

Fractionnement de la caséine α : α_I et α_{II} . Une solution de caséinate α de sodium de 0,3% au pH 6 est additionnée de sulfate d'ammonium (force ionique 2,2) et chauffée à 40°. La solution se trouble progressivement; après 1 heure à cette température, on centrifuge le flocculat (α_{II} brut). La liqueur claire est portée à pH 4,5 par ClH 0,1-n. et fournit ainsi un précipité de α_I . Le filtrat ne contient presque plus d'azote protéique.

Le culot de α_{II} brut est suspendu dans de l'eau distillée où il est solubilisé au pH 6, à la concentration de 0,1% et à la force ionique de 2,2 (sulfate d'ammonium). En portant cette solution (devenue déjà trouble par addition de sel minéral) à 40°, on obtient α_{II} pur.

Caséine β : la solution obtenue après centrifugation de la caséine β brute, filtrée éventuellement rapidement à froid, est placée dans une étuve à 40°. Une fois arrivée à cette température, elle s'est troublée avec production d'un précipité de caséine β brute qu'on centrifuge entre 20° et 30°. Les solutions obtenues lors de la reprécipitation de β sont traitées chaque fois de la même manière.

Pour éliminer les derniers restes d' α que β brut contient toujours, il faut travailler en solution beaucoup plus diluée: β brut est solubilisé au pH 6 à l'aide de soude caustique, à une concentration finale de 0,05%. On passe rapidement au pH 4 par addition de ClH 0,1-n., refroidit la solution claire à 2° et précipite le reste d' α par addition de NaOH 0,1-n. goutte à goutte. Après centrifugation à froid, la liqueur claire est portée à 40°, et β pur précipite alors.

Caséine γ : les centrifugeats de la précipitation de la caséine β à 40° contiennent une certaine quantité de caséine γ . Ces solutions sont portées au pH 6 puis additionnées de

Schéma de fractionnement

I. Caséines α et β brutes.

Caséine, sol. à 0,4 - 0,5% au pH 4,0, portée à 2° au pH 4,6

Précipité, dissous à pH 6, porté brusquement à pH 4, dilué à 0,4% et précipité à 2° au pH 4,6

Solution, portée au pH 4,9 à 40°

Précipité, dissous à pH 6, etc. comme plus haut (3 répétitions)

Solution, portée à pH 4,9 à 40°
Précipité:
caséine β brute

Caséine β brute

Caséine α brute

Fractions successives de caséine β brute

II. Purification des fractions brutes

Caséine α brute dissoute à 0,5% au pH 6, add. de 5% de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, portée au pH 4,2

Caséines β brutes (ttes fractions réunies), diss. à 0,05% au pH 6, portées à pH 4,9 à 2°

Précipité:
caséine α pure

Solution $\gamma + \delta$, add. de Cl_3COOH 10%

Précipité:
(caséine α)

Solution, chauffée à 40°

Précipité:
caséine γ

Solution, pptée par $\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_2$ 5%

Précipité:
caséine β pure

Solution, add. au pH 6,0 de 2 vol. d'acétone

Caséine δ

Précipité, dissous H_2O , + $\text{Cl}_2 \text{Ca}$ 0,1-m. à pH 6,5 à 50°

Solution contient caséine δ

Précipité:
caséine γ

III. Séparation de α en α_I et α_{II}

α dissous à 0,3% au pH 6, add. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 5% ($\mu = 2,2$), porté à 40°

Solution, portée à pH 4,6

Précipité:
caséine α_{II} (brute), suspendu dans eau dist., où il est dissout à pH 6, conc. 0,1%, $\mu = 2,2$, porté à 40°

Précipité:
caséine α_I

Solution (mélange de α_I et α_{II})

Précipité:
caséine α_{II}

2 volumes d'acétone; il se produit un trouble, puis un précipité qu'on filtre et égoutte sans le sécher, pour le suspendre dans de l'eau distillée. La suspension est amenée au pH 6,5; la solution légèrement opalescente obtenue est additionnée d'une certaine quantité de chlorure de calcium 0,1-m. et portée à 50°, ce qui provoque la précipitation du γ -caséinate de calcium. La suspension de ce sel dans de l'eau distillée est dissoute par addition progressive de NaOH 0,1-n. puis précipitée à 40° au point isoélectrique (5,2) par ClH 0,1-n.

Caséine δ (protéose): le filtrat de la dernière purification de caséine α est additionné de 2 volumes d'acétone. Le précipité filtré et égoutté est repris dans de l'eau distillée et la solution additionnée d'acide trichloracétique à 10%, ce qui précipite le reste de γ ; la caséine δ peut alors être précipitée par exemple par du molybdate d'ammonium à 5%.

Méthodes analytiques.

Dosage de l'azote *protéique*: par colorimétrie au biuret selon *Baudet & Giddey*¹).

Dosage du *phosphore*: a) phosphore total: la prise (solution) est évaporée presque à sec dans un matras de 50 cm³ (un produit solide y est introduit tel quel) et désagrégée par 2 cm³ d'acide perchlorique à 60% à chaud. La solution refroidie est portée à 50 cm³. Sur une partie aliquote on dose le phosphore par colorimétrie au bleu de molybdène selon *King*²), sauf que nous avons remplacé l'acide perchlorique à 60% par de l'acide chlorhydrique 5-n. b) Phosphore facilement hydrolysé: le produit examiné est traité en solution dans NaOH 0,75-n. à 40° pendant 12 heures. On précipite ensuite les protides par addition d'un volume d'acide trichloracétique à 20%. On filtre sur une triple couche de papier-filtre. Dans le filtrat qui doit être limpide, on dose le phosphore selon *King* (comme plus haut) dans une partie aliquote.

Humidité: elle a été déterminée indirectement par dosage colorimétrique de l'azote dans une prise de matière séchée à la température ordinaire à l'air. Pour les protides anhydres nous avons admis une teneur en azote de 16,0%.

Dosage de la *tyrosine* et du *tryptophane*: ces acides aminés ont été dosés par spectrophotométrie (spectrophotomètre DU de *Beckman*) selon *Goodwin & Morton*³).

Electrophorèses: elles ont été effectuées sur des solutions obtenues par dissolution directe du protide dans le tampon véronal/ClH de force ionique de 0,1, de pH 7,8 ou 7,6, dialysées trois jours à 4° contre le tampon, avec un appareil à système optique *Philpot-Svensson*.

Nous remercions vivement M. P. *Bernfeld*, privatdocent à l'Université de Genève, de l'aide précieuse apportée dans l'examen électrophorétique de nos produits.

RÉSUMÉ.

Dans le mélange constituant la caséine du lait de vache, nous distinguons à côté des fractions α et β , décrites déjà par *Warner*, encore une fraction γ et une fraction δ (cette dernière identique à la protéose de *Hammarsten*). La fraction α se dédouble en α_1 et α_{11} par précipitation à 40° en présence de sulfate d'ammonium.

Les sels calciques de β et de γ , insolubles aux pH respectivement de 5 et de 6, jusqu'au delà de la neutralité, sont maintenus en solution par le sel calcique de α ; ce dernier agit donc comme colloïde protecteur, ce qui confirme une hypothèse déjà ancienne de *Linderstrom-Lang*. Par ailleurs, des arguments sont donnés qui rendent probable l'existence d'une combinaison entre caséines α et β .

Laboratoire de chimie pharmaceutique
de l'Université de Genève.

¹) *Helv.* **31**, 1879 (1948).

²) *Biochem. J.* **26**, 292 (1932).

³) *Biochem. J.* **40**, 628 (1946).

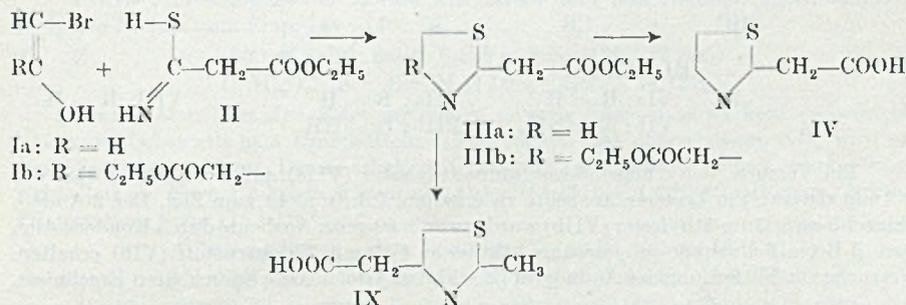
58. Zur Kenntnis der Thiazol-essigsäuren

von R. Mory und H. Schenkel.

(23. I. 50.)

Von den drei möglichen Thiazol-essigsäuren ist bisher nur die Thiazol-4-essigsäure¹⁾ beschrieben worden, während von der Thiazol-2-²⁾ und der Thiazol-5-essigsäure³⁾ nur anderweitig substituierte Derivate bekannt geworden sind. Da uns diese Säuren im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Bindungsverhältnisse im Thiazol interessierten, wobei wir speziell aus dem Studium der Decarboxylierungsreaktion der verschiedenen Säuren des Thiazols Anhaltspunkte zu gewinnen hofften⁴⁾, haben wir die Thiazol-2-essigsäure und die Thiazol-5-essigsäure hergestellt. Weiterhin beschreiben wir im folgenden noch die Synthese von Derivaten der Thiazol-2,4-diessigsäure.

Die Darstellung des Äthylesters der Thiazol-2-essigsäure (IIIa) erfolgte nach dem üblichen Verfahren der Thiazolkondensation mit Bromacetaldehyd (Ia)⁵⁾ und dem Äthylester-thioamid der Malonsäure (II) als Komponenten. Die Vorschrift zur Darstellung des letzteren aus Cyanessigester und Schwefelwasserstoff⁶⁾ wurde vereinfacht, indem



man Cyanessigester und verflüssigten Schwefelwasserstoff mit wenig Diäthylamin im Autoklaven auf 65—70° erhitzte und das erhaltene Öl von dem durch Zersetzung entstandenen Schwefel und vom verbleibenden Schwefelwasserstoff befreite. Die Kondensation des so er-

¹⁾ H. Erlenmeyer & Ch. J. Morel, *Helv.* **28**, 362 (1945); E. R. H. Jones, F. A. Robinson & M. N. Strachan, *Soc.* **1946**, 87.

²⁾ Über 4-Methylthiazol-2-essigsäure vgl. H. Erlenmeyer, J. Junod, W. Guez & M. Erne, *Helv.* **31**, 1342 (1948).

³⁾ Vgl. z. B. E. B. Knott, *Soc.* **1945**, 455.

⁴⁾ H. Schenkel & R. Mory, *Helv.* **33**, 16 (1950).

⁵⁾ H. Hibbert & H. S. Hill, *Am. Soc.* **45**, 741 (1923).

⁶⁾ Diss. W. Guez, Basel 1946; s. auch H. Erlenmeyer, J. Junod, W. Guez & M. Erne, *loc. cit.*

Das Diamid der Thiazol-2,4-diessigsäure, aus dem Ester IIIb, wie oben beschrieben dargestellt, schmilzt bei 218—219°.

Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Erlenmeyer für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine wertvollen Ratschläge.

Experimenteller Teil¹⁾.

Thiazol-2-essigsäure.

Malonsäure-äthylester-thioamid (II). 20 g Cyan-essigester werden mit 0,5 g Diäthylamin versetzt, mit Trockeneis-Äther gekühlt und dann H₂S eingeleitet, bis das Volumen 40 cm³ beträgt. Das Reaktionsgemisch wird im Autoklaven 2 Stunden auf 65—70° erhitzt und dann über Nacht abkühlen gelassen. Das resultierende orangegelbe, zähflüssige Öl wird von wenig kristallinem Schwefel abgenutselt und am Vakuum vom überschüssigen H₂S befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wird direkt zur Kondensation verwendet.

Thiazol-2-essigsäure-äthylester (IIIa). Das rohe Thioamid aus 20 g Cyan-essigester wird in 100 cm³ absolutem Äther aufgenommen und mit 25 g depolymerisiertem Bromacetaldehyd (Ia) versetzt, wobei der Äther ins Sieden gerät und teilweise Verharzung eintritt. Nach Abklingen der Reaktion werden zwei Drittel des Äthers vorsichtig auf dem Wasserbad abdestilliert. Der Rückstand wird dann mit 200 cm³ 2-n. HCl kräftig ausgeschüttelt, die salzsäure Lösung durch Extrahieren mit Äther von Verunreinigungen befreit und mit Äther überseht. Nun wird der Ester durch Zugabe von festem NaHCO₃ in Freiheit gesetzt und mehrmals mit Äther extrahiert. Die vereinigten, mit Na₂SO₄ getrockneten Ätherlösungen werden eingedampft; der braune, ölige Rückstand, im Vakuum destilliert, liefert 2 g Thiazol-2-essigsäure-äthylester (IIIa) als gelbes Öl vom Sdp. 120—122° (15 mm).

3,21 mg Subst. gaben 0,226 cm³ N₂ (24°, 752 mm)

C₇H₉O₂NS Ber. N 8,18% Gef. N 8,01%

Pikrat, in alkoholischer Lösung dargestellt und aus Alkohol umkristallisiert: goldgelbe Nadeln vom Smp. 144—146°.

4,05 mg Subst. gaben 0,508 cm³ N₂ (19°, 732 mm)

C₁₃H₁₂O₉N₄S Ber. N 14,00% Gef. N 14,12%

Amid: Man lässt den Ester mit einem grossen Überschuss an konz. wässrigem NH₃ unter gelegentlichem Umschütteln 1 Tag stehen. Das überschüssige NH₃ wird auf dem Wasserbad entfernt. Das so erhaltene Öl erstarrt beim Erkalten zu einer bräunlichen Kristallmasse. Nach Umkristallisieren aus absolutem Alkohol erhält man lange, farblose Prismen vom Smp. 115—116°.

3,784 mg Subst. gaben 5,880 mg CO₂ und 1,436 mg H₂O

C₅H₆ON₂S Ber. C 42,25 H 4,23% Gef. C 42,40 H 4,25%

Hydrazid: 550 mg des Esters erwärmt man kurz mit 140 mg Hydrazinhydrat unter Schütteln auf dem Wasserbad, bis das Gemisch homogen ist. Beim Kühlen und Reiben kristallisiert das Hydrazid aus. Aus Methanol farblose, verfilzte Nadeln vom Smp. 116 bis 117°.

2,026 mg Subst. gaben 0,489 cm³ N₂ (22°, 727 mm)

C₅H₇ON₃S Ber. N 26,73% Gef. N 26,71%

Thiazol-2-essigsäure (IV). 2 g Äthylester werden unter Eiskühlung ca. 10 Minuten mit 20 cm³ 10-proz. wässriger KOH geschüttelt und dann wenig Unverseifbares durch Ausäthern entfernt. Die freie Säure wird sodann vorsichtig unter Eiskühlung mit gekühlter konz. HCl ausgefällt. Zur Reinigung wird die Säure in 2-n. Na₂CO₃ gelöst, Verunreinigungen werden durch Ausäthern entfernt, die Säure wird wie oben ausgefällt, abfiltriert, mit wenig kaltem Äther gewaschen und im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet. Man erhält so farblose Nadeln, die bei 109—110° unter Zerfall in CO₂ und 2-Methylthiazol schmelzen. Auch bei Zimmertemperatur zerfällt die Säure im Verlauf von

¹⁾ Alle Schmelzpunkte sind auf dem Kofler-Block bestimmt und korrigiert.

einigen Wochen vollständig unter Entstehung von 2-Methylthiazol (durch Vergleich seines Pikrates vom Smp. 152—153°¹⁾ mit einem authentischen Präparat identifiziert).

4,991 mg Subst. gaben 7,65 mg CO₂ und 1,68 mg H₂O

2,220 mg Subst. gaben 0,195 cm³ N₂ (23°, 751 mm)

C₅H₅O₂N₂S Ber. C 41,95 H 3,52 N 9,78%

Gef. ,, 41,83 ,, 3,77 ,, 10,01%

Thiazol-2-essigsäure ist leicht löslich in Alkohol, Aceton und Essigester, löslich in Wasser, wenig löslich in Äther, Chloroform und Benzol und unlöslich in CCl₄, Ligroin, Petroläther und Schwefelkohlenstoff.

Erwärmt man eine alkoholische Lösung der Säure mit gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung kurze Zeit zum Sieden, so fällt beim Abkühlen das Pikrat des 2-Methylthiazols aus.

Methylester: 0,3 g Säure werden mit 10 cm³ absolutem Äther und dann unter Eiskühlung portionenweise mit einem reichlichen Überschuss gekühlter ätherischer Diazo-methanlösung versetzt. Die Säure löst sich allmählich und es entwickelt sich Stickstoff. Nach einer Stunde wird vom harzigen Rückstand abgessen, der Äther verdampft und der rötliche, ölige Rückstand im Vakuum destilliert. Der Methylester geht bei 95° (14 mm) als schwach gelbliches Öl über.

5,100 mg Subst. gaben 0,412 cm³ N₂ (25°, 733 mm)

C₆H₇O₂NS Ber. N 8,92% Gef. N 8,93%

Thiazol-5-essigsäure.

Thiazol-5-essigsäure-äthylester (VIIa) wurde nach der Vorschrift von *M. Aeberli*²⁾ aus β-Brom-β-aldehydo-propionsäure-äthylester (V) und Thioformamid (VIa) dargestellt. Er bildet in alkoholischer Lösung ein Pikrat vom Smp. 110—111°.

1,755 mg Subst. gaben 0,217 cm³ N₂ (24°, 739 mm)

C₁₃H₁₂O₉N₄S Ber. N 14,00% Gef. N 13,82%

Durch Schütteln von 3,15 g des reinen Esters mit der 10fachen Menge 10-proz. wässriger KOH und Ansäuern mit konz. HCl erhält man 2,35 g (90% der Theorie) der freien Säure VIII. Sie bildet farblose Nadeln, welche bei 153—154° unter teilweiser Sublimation unzersetzt schmelzen. Die Säure ist in Wasser und Benzol wenig löslich, besser in Alkohol. Zur Reinigung wird sie aus viel Benzol umkristallisiert oder bei 130—140° (12 mm) sublimiert.

3,864 mg Subst. gaben 5,93 mg CO₂ und 1,28 mg H₂O

3,500 mg Subst. gaben 0,309 cm³ N₂ (24°, 742 mm)

C₅H₅O₂NS Ber. C 41,95 H 3,52 N 9,78%

Gef. ,, 41,88 ,, 3,71 ,, 9,91%

2-Aminothiazol-5-essigsäureäthylester (VIIb). 1,4 g Thioharnstoff (VIb) werden mit einer Lösung von 5,2 g β-Brom-β-aldehydo-propionsäureäthylester (V) in 25 cm³ Alkohol versetzt und die gelbliche Lösung wird auf dem Wasserbad 3 Stunden im Sieden gehalten. Dann wird der Alkohol abdestilliert (zuletzt im Vakuum). Der kristallinisch erstarrte Rückstand wird in verdünntem HCl (2 cm³ konz. HCl + 25 cm³ H₂O) gelöst, die Lösung zweimal mit je 5 cm³ Äther ausgeschüttelt und dann mit fester Soda alkalisch gemacht, wobei man 3,1 g (90% der Theorie) 2-Aminothiazol-5-essigsäureäthylester (VIIb) erhält. Er bildet, aus Benzol-Petroläther oder Chloroform-Petroläther umkristallisiert, weisse Blättchen vom Smp. 100—101°. Der Ester ist gut löslich in Wasser, Äther, Alkohol, Benzol und Chloroform, unlöslich in Petroläther.

4,480 mg Subst. gaben 7,44 mg CO₂ und 2,24 mg H₂O

2,730 mg Subst. gaben 0,362 cm³ N₂ (25°, 751 mm)

C₇H₁₀O₂N₂S Ber. C 45,11 H 5,41 N 15,11%

Gef. ,, 45,32 ,, 5,59 ,, 15,01%

¹⁾ *J. McLean & G. D. Muir*, Soc. 1942, 383.

²⁾ Wird später publiziert.

Pikrat, in alkoholischer Lösung gewonnen und aus absolutem Alkohol umkristallisiert: lange, haarförmige, gelbe Nadeln vom Smp. 204—205° (Zers.).

5,080 mg Subst. gaben 7,05 mg CO ₂ und 1,55 mg H ₂ O
2,385 mg Subst. gaben 0,353 cm ³ N ₂ (23°, 747 mm)
C ₁₃ H ₁₃ O ₉ N ₅ S Ber. C 37,59 H 3,16 N 16,86%
Gef. .. 37,87 .. 3,41 .. 16,78%

Pikrolonat, analog dargestellt und aus absolutem Alkohol umkristallisiert: goldgelbe Blättchen vom Smp. 216—218° (Zers.).

3,801 mg Subst. gaben 6,31 mg CO ₂ und 1,43 mg H ₂ O
2,420 mg Subst. gaben 0,392 cm ³ N ₂ (23°, 747 mm)
C ₁₇ H ₁₈ O ₇ N ₆ S Ber. C 45,33 H 4,03 N 18,66%
Gef. .. 45,30 .. 4,21 .. 18,36%

Zur Darstellung des Amids werden 0,3 g des Esters mit 10 cm³ konz. wässrigem NH₃ unter gelegentlichem Umschütteln bei Zimmertemperatur stehengelassen, bis der Ester vollständig in Lösung gegangen ist. Das überschüssige NH₃ wird auf dem Wasserbad abgedampft, wobei man eine bräunliche Kristallkruste erhält. Zur Reinigung kann das Amid bei 140—150° (0,05 mm) sublimiert oder bei 180° (0,5 mm) unter teilweiser Zersetzung destilliert werden. Es bildet weisse Kristalle vom Smp. 174—175° (Zers.) und ist in Wasser leicht, in allen anderen gebräuchlichen Lösungsmitteln schwer löslich.

4,144 mg Subst. gaben 5,81 mg CO ₂ und 1,63 mg H ₂ O
1,912 mg Subst. gaben 0,453 cm ³ N ₂ (22°, 751 mm)
C ₅ H ₇ ON ₃ S Ber. C 38,20 H 4,49 N 26,73%
Gef. .. 38,26 .. 4,40 .. 27,10%

Thiazol-2,4-diessigsäure.

Diäthylester. Aus 20 g Cyanessigester dargestelltes, rohes Malonsäure-äthylesterthioamid (II) wird in 100 cm³ absolutem Äther aufgenommen und mit 20 g γ -Bromacetessigester (Ib) versetzt. Der Äther gerät hierbei ins Sieden und wird während einer Stunde im Sieden gehalten, wobei sich ein hellgelbes Öl abscheidet. Das Reaktionsgemisch wird nun mit 200 cm³ 2-n. HCl kräftig geschüttelt, die wässrige Lösung mit festem NaHCO₃ alkalisch gemacht und mit 200 cm³ Äther in mehreren Portionen ausgezogen. Die Ätherlösung wird mit Natriumsulfat getrocknet, der Äther abdestilliert und der Rückstand im Vakuum destilliert. Man erhält so 4,5 g (18% der Theorie, bezogen auf Ib) Thiazol-2,4-diessigsäure-diäthylester (IIIb) als gelbliches Öl vom Sdp. 143—147° (20 mm).

4,362 mg Subst. gaben 8,05 mg CO ₂ und 2,32 mg H ₂ O
C ₁₁ H ₁₅ O ₄ NS Ber. C 51,35 H 5,88% Gef. C 50,36 H 5,95%

Diamid: Man schüttelt den Diäthylester 1 Stunde bei Zimmertemperatur mit einem Überschuss von konz. wässrigem NH₃ und dampft das überschüssige NH₃ auf dem Wasserbad ab. Man erhält ein gelbes Öl, das beim Abkühlen und Reiben kristallinisch erstarrt. Rohausbeute ca. 80%. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol erhält man das Diamid in farblosen Tafeln, Smp. 218—219° unter Braunfärbung.

4,450 mg Subst. gaben 6,92 mg CO ₂ und 1,82 mg H ₂ O
1,584 mg Subst. gaben 0,294 cm ³ N ₂ (22°, 744 mm)
C ₇ H ₉ O ₂ N ₃ S Ber. C 42,20 H 4,55 N 21,09%
Gef. .. 42,43 .. 4,58 .. 21,02%

Verseifung des Diäthylesters. 2 g des Esters IIIb werden unter Eiskühlung mit 1 g KOH, gelöst in 10 cm³ Wasser, versetzt und 1 Stunde geschüttelt, wobei eine homogene Lösung entsteht. Es wird mit konz. HCl angesäuert, wobei keine Fällung eintritt, zur Reinigung mit Äther ausgeschüttelt, mit NaHCO₃ stark abgestumpft und die noch schwach saure Lösung mit Äther extrahiert. Beim Abdunsten der ätherischen Lösung erhält man 0,4 g gelbes Öl, welches im Vakuumexsikkator im Laufe von einigen Tagen teilweise erstarrt. Nach zweimaligem Umkristallisieren der abgenutzten und getrockneten Substanz aus Benzol erhält man dicke Nadeln vom Smp. 124°.

Nach Schmelzpunkt¹⁾ und Analyse liegt nicht die gesuchte Thiazol-2,4-diessigsäure, sondern die 2-Methylthiazol-4-essigsäure vor.

3,887 mg Subst. gaben 6,53 mg CO₂ und 1,62 mg H₂O

3,415 mg Subst. gaben 0,267 cm³ N₂ (25°, 750 mm)

C₆H₇O₂NS Ber. C 45,84 H 4,49 N 8,91%

Gef. „ 45,84 „ 4,66 „ 8,82%

Die Mikroanalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium der *CIBA Aktiengesellschaft* (Dr. H. Gysel).

Zusammenfassung.

Es wird die Synthese der Thiazol-2-essigsäure und der Thiazol-5-essigsäure sowie einiger Derivate dieser Verbindungen beschrieben.

Der ebenfalls neu synthetisierte Diäthylester der Thiazol-2,4-diessigsäure ergab beim Verseifen nicht die erwartete Thiazol-2,4-diessigsäure, sondern deren primäres Decarboxylierungsprodukt, die 2-Methylthiazol-4-essigsäure.

Universität Basel,
Anstalt für anorganische Chemie.

59. Le rôle du cuivre dans la réaction de «Nadi» et modèles non protidiques d'oxydases et de catalase

par Edmond Pongratz.

(1 II 50)

Première partie.

Au cours de nos recherches sur le mécanisme de l'action fongistatique et antimélanique de la thio-urée, nous avons utilisé la réaction colorée dite de «Nadi» pour mettre en évidence diverses oxydases. L'analyse que nous avons faite du mécanisme de cette réaction nous a révélé différents faits importants consignés dans cette note préliminaire.

C'est en 1885 que *P. Ehrlich*²⁾ découvrit qu'un mélange d' α -naphtol et de diméthyl-p-phénylènediamine (Nadi) mis au contact de tissus animaux, donnait naissance au bleu d'indophénol. On remarqua bientôt le caractère fermentaire de la réaction et on appela «indophénoloxydase», l'enzyme que l'on croyait responsable de cette réaction. C'est à *Keilin* que revient le mérite d'avoir compris le parti que l'on peut tirer de la Nadi-réaction pour l'étude de la respiration cellulaire. Il devint par la suite de plus en plus évident que l'indophénoloxydase n'oxydait que le cytochrome c, qui lui, en deuxième échelon, oxyde le réactif Nadi. L'enzyme fut débaptisé et prit le nom de «cytochrome-oxydase» actuellement adopté.

¹⁾ *M. Steude*, A. 261, 40 (1891) gibt für 2-Methylthiazol-4-essigsäure 121° an, *E. R. H. Jones, F. A. Robinson & M. N. Strachan*, loc. cit., 124°. Die isomere 4-Methylthiazol-2-essigsäure schmilzt bei 90—91°. Vgl. *H. Erlenmeyer, J. Junod, W. Guex & M. Erne*, loc. cit.

²⁾ Cf. *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, Bd. 2, S. 1759 (1926).

Recherches personnelles.

La thermostabilité (relative) de la cytochrome-oxydase (ex indo-phénol-oxydase) d'*Aspergillus niger* que nous utilisons, a éveillé notre attention. Des essais nous ont montré que cette «autoxydation» du Nadi que l'on observe en présence du ferment chauffé, ou en l'absence de ferment, ne pouvait pas être expliquée par l'addition, au titre d'inducteur, de substances organiques oxydées ou d'indophénol. Nous nous sommes aperçu que les ions Cu^{+2} jouaient un rôle spécifique dans ce phénomène.

Conditions expérimentales.

On ajoute à 10 cm³ de solution tampon phosphate (pH = 7,3) 50 γ de Cu^{+2} et env. 0,2 cm³ du mélange Nadi (mélange équimoléculaire de p-phénylène-diamine M/20 et d' α -naphтол M/20 dans l'éthanol). On agite violemment afin de bien aérer la solution et on laisse reposer à la température ordinaire: estimation colorimétrique, selon les cas, généralement après quelques minutes, parfois après une ou deux heures.

Nous avons fait appel tantôt à la p-phénylène-diamine (Nadi I), tantôt à la diméthyl-p-phénylène-diamine (Nadi II). La réaction Nadi positive se manifeste dans le premier cas par une coloration rose, dans le deuxième cas par une coloration bleue. Les observations qui suivent sont valables pour les deux cas.

Des essais avec des sels de cuivre nous ont révélé que l'on pouvait substituer les ions de ce métal à l'enzyme fongique et obtenir ainsi le même colorant indophénolique. Nous avons remplacé le cuivre par les cations et anions suivants (dans des concentrations ioniques identiques) dont aucun n'a donné (dans les conditions d'examen décrites) une réaction de coloration.

Fe^{+3} , Fe^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} , MoO_4^{-2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} , Bi^{+3} , Hg^{+2} , Sn^{+2} ,
 Cd^{+2} , Ti^{+4} , Al^{+3} , Au^{+3} , Tl^{+1} , WO_4^{-2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+1} ,
 K^{+1} , AsO_3^{-3} , Sb^{+3} , F^{-1} , Cl^{-1} , Br^{-1} , I^{-1} , PO_4^{-3} , SO_4^{-2} , NO_3^{-1} , BO_3^{-3} .

L'argent (NO_3Ag) oxyde le Nadi, cette réaction (coloration instantanée gris-violet) n'a cependant pas le caractère catalytique (coloration progressive) de celle fournie par le cuivre.

Le vanadium (vanadate d'ammonium) catalyse faiblement l'oxydation du Nadi.

Le fer (Fe^{+3} et Fe^{+2}) que l'on soupçonne souvent d'intervenir, n'a pas d'action catalytique sur la formation du bleu d'indophénol, contrairement à ce qu'affirme *Gräff*¹⁾. Dans certaines conditions (milieu non tamponné) le Fe^{III} peut oxyder la diamine (un des constituants du Nadi) en des corps quinimériques de couleur variable, mais jamais rose ou bleue.

Toutes ces observations attestent la spécificité du Cu^{II} comme catalyseur de la Nadi-réaction.

Nous avons ensuite cherché les substances capables d'inhiber cette réaction, en envisageant successivement:

- 1^o Les corps précipitant le cuivre,
- 2^o Les substances formant avec le cuivre des complexes,
- 3^o Les corps oxydables qui entrent en compétition avec le réactif Nadi et le protègent ainsi provisoirement contre son oxydation.

1^o L'hydrogène sulfuré, les sulfures solubles, le thiocyanate de potassium et l'acide oxalique empoisonnent la réaction d'oxydation du Nadi, en bloquant le catalyseur cuivre respectivement comme sulfure pratiquement insoluble, comme thiocyanate de cuivre(II et I) ou comme oxalate de cuivre.

1) Cf. *C. Oppenheimer*, loc. cit.

2° Les réactifs organiques caractéristiques du cuivre ont une action inhibitrice particulièrement marquée sur notre réaction catalytique. Nous avons vérifié l'inhibition due aux corps suivants: acide rubéanique, salicylaldoxime, hydroxy-8-quinoléine, Kupferon, benzoïneoxime, diéthylthiocarbamate de sodium, diphénylthiocarbazone (= dithlzone), thio-urée, thiouracyl, glyecocolle, α -alanine, D-sérine, acide aspartique.

Il faut ajouter à ces substances encore l'acide cyanhydrique (cyanures) et l'oxyde de carbone, qui, dans les recherches enzymologiques jouent un rôle prépondérant. Ces deux poisons respiratoires annihilent presque complètement le pouvoir catalytique du cuivre. Pour l'oxyde de carbone, il faut incriminer la formation de carbonyles de cuivre dont nous avons vérifié la photostabilité. En ce qui concerne le cyanure, il doit son pouvoir inhibiteur à sa propriété de former avec le cation cuivre diverses combinaisons, plus particulièrement le cyanure de cuivre(II) et cuivre(I) et l'anion complexe tétracyano-cuivrique(I).

Nous désirons attirer une attention toute particulière sur l'affinité du cyanure pour le cuivre, car l'on envisageait jusqu'à présent surtout une action de blocage du cyanure s'exerçant sur le fer cellulaire (hématine).

Fort de ces constatations, nous pouvons généraliser et admettre que tout corps organique susceptible de former un complexe interne stable avec le cuivre peut être considéré comme un poison de la catalyse due à ce métal, et dans la mesure où ces corps organiques ont la même réactivité «in vivo», on peut les assimiler à des inhibiteurs des enzymes cupriques.

3° A part les substances que nous venons de voir qui se combinent à l'élément catalyseur et qui de ce fait l'inactivent, il existe toute une série de corps plus ou moins facilement oxydables qui exercent durant un certain temps un effet protecteur sur l'oxydation du Nadi. Parmi les corps d'intérêt biologique, citons l'acide ascorbique, la cystéine, le glutathion... les sels ferreux. Selon nous, il est probable que le cytochrome c réduit entre de la même manière en compétition avec les constituants du réactif Nadi. L'hydroxylamine, réactif très utilisé en enzymologie, n'a pas d'action sur notre réaction catalytique. Dans certains cas cependant, s'il y a présence simultanée de cuivre et d'une substance réductible par l'hydroxylamine (Fe^{+3} par ex.), le corps réduit formé peut entrer en concurrence avec le réactif Nadi.

Il ressort des observations faites ci-dessus qu'un rapprochement doit être fait entre notre réaction catalytique et certaines réactions enzymatiques de caractère oxydatif.

Voici les arguments justifiant ce rapprochement:

1° Les inhibiteurs mentionnés ci-dessus, sous 1, 2 et 3, sont en général ceux des oxydases vraies.

2° Les inhibiteurs habituels des deshydrases (acide monoiodacétique, uréthane, narcotiques, FNa) sont sans action sur l'oxydation catalytique du Nadi.

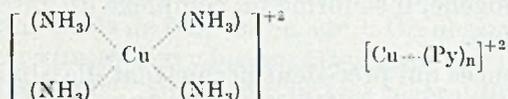
Nous tirons en conséquence les conclusions résumées sous A) p. 416.

Deuxième partie.

Cherchant ensuite les activateurs du catalyseur ionique Cu^{+2} , pour la Nadi-réaction, nous avons observé que de nombreux composés organiques contenant un atome d'azote tertiaire ou quaternaire principalement, ont la propriété d'exalter le pouvoir oxydant de ce métal. Parmi les corps actifs, il y a des composés aliphatiques et des composés hétérocycliques.

Il se forme des systèmes organo-métalliques qui sont principalement du type complexe d'addition (syn. complexe de superposition) ou complexe d'interposition.

Les systèmes les plus représentatifs sont le complexe cuivre-tétramine, bien connu, et le complexe cuivre-pyridine



où n (nombre de coordination du cuivre) peut prendre différentes valeurs (général. les valeurs 2 et 4). Ces complexes peuvent être plus ou moins hydratés.

L'addition de ces substances azotées à la solution cuivrique en modifie visiblement la teinte; de bleu clair elle devient verte, bleu azur plus ou moins foncé, bleu-indigo. Ces virages font immédiatement présumer la formation d'ions complexes et l'apparition d'importantes modifications corrélatives: état ionique particulier du cuivre et ses répercussions sur le spectre d'absorption.

Les adjuvants du cuivre les plus actifs que nous ayons trouvés sont: l'ammoniaque, la pyridine, l'iminazole, la pyrimidine et nombre de leurs dérivés; nous citerons comme exemple: la triméthylamine, la chloramine, la choline... l'acide nicotique, la nicotylamide, la nicotyl-diéthylamide (coramine), l'aneurine... le biuret, l'uracil, des barbituriques (luminal), la guanine et d'autres bases puriques, des alcaloïdes, des sulfamidés, des bactéricides, des fongicides, etc.

L'accroissement d'oxydation dû aux activateurs sus-mentionnés évoque le mécanisme suivant: il y a augmentation du potentiel rédox lorsqu'il y a liaison par covalence entre l'ion métallique (ici le Cu^{+2}) et la molécule organique; il se formerait donc des complexes d'addition et d'interposition (*Werner*: An- und Einlagerungsverbindungen).

Le cyanure, précédemment signalé comme inhibiteur, fonctionne comme activateur lorsque sa concentration est inférieure à une molécule de CNK par atome de cuivre. L'importance de cette activation est grande lorsqu'on ajoute le cuivre au substrat oxydable préalablement cyanuré ou lorsqu'on ajoute le CNK au mélange de substrat oxydable et de cuivre (complexe à l'état naissant). L'importance de cette activation est moindre lorsqu'on ajoute le substrat oxydable au mélange cuivre-cyanure préalablement préparé (complexe préformé).

Cette inversion des propriétés du cyanure permettra d'expliquer certaines réactions biochimiques exaltées par ce poison classique.

Le pouvoir activateur du cyanure en faible concentration sur l'effet catalytique d'oxydation du cuivre est dû à une augmentation du potentiel rédox du système Cu-cyanure par rapport à celui du couple $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+1}$. Cet artifice est exploité en microchimie analytique pour la mise en évidence de CNH^1 .

¹) P. Wenger & R. Duckert, Traité de chimie analytique qualitative minérale, 1946, p. 316.

Par contre, les phénomènes d'inhibition décrits précédemment suggèrent l'interprétation suivante: des liaisons simultanées par covalence et valence entre l'ion Cu^{+2} et la substance organique, déterminent un abaissement du pouvoir oxydant du métal. Dans l'hydroxy-8-quinoléine par exemple, où il y a voisinage du groupement salifiable et de l'azote ionogène, il se forme un complexe dit interne qui n'a pas d'effet catalytique.

Les expériences qui précèdent permettent d'assimiler le complexe organo-métallique à un modèle d'enzyme. Pour obtenir des résultats plus constants, il est avantageux d'utiliser des complexes préformés.

Influence du pH sur l'activité des complexes cuivriques.

La vitesse d'oxydation du Nadi et des autres substrats par les complexes cuivriques, décroît très rapidement lorsque le pH diminue. Ce phénomène très général (également vrai pour les réactions enzymatiques) peut être facilement interprété par la dissociation du complexe en milieu acide: le cuivre ainsi plus ou moins libéré de son «support» organique (de caractère faiblement basique) perd en même temps son état d'exaltation, soit les propriétés catalytiques particulières que lui avait conférées la molécule organique.

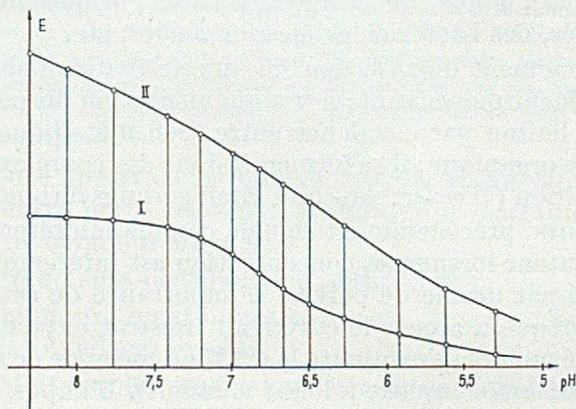


Fig. 1.

Variation de l'intensité d'oxydation du Nadi II, en fonction du pH
(température constante = 18°).

Courbe I: catalyse par 50 γ de Cu^{+2} ionique (obs. après 5 min.)

Courbe II: catalyse par le complexe Cu-pyridique (20 γ Cu^{+2}) (obs. après 2 min.)

En ordonnée, nous avons porté directement les valeurs colorimétriques (cuves de 1 cm; filtre jaune S 50).

Au-dessus du pH 7,2 environ, on remarque une certaine constance de vitesse d'oxydation du Nadi II lors de la catalyse par les ions Cu^{+2} seuls (courbe I). La réaction d'oxydation catalysée par le complexe Cu-pyridine (courbe II) ne présente pas cette constance dans cet

intervalle de pH. Cette particularité est due à la dissociation plus ou moins forte du complexe.

Influence de la température.

Nous avons étudié l'influence de la température sur diverses réactions d'oxydation catalysées par des complexes cupriques (dans des conditions standards de pH, durée, etc.). On observe une accélération notable de la vitesse d'oxydation, atteignant son maximum à une température de 80—90°. Au-dessus, la très légère diminution de vitesse de réaction doit être attribuée à une moindre solubilité de l'oxygène nécessaire plutôt qu'à une dissociation ou précipitation du complexe.

Poussant nos investigations plus loin, nous avons cherché jusqu'à quel point il est permis d'assimiler l'activité de nos complexes cuivriques à celle des oxydases et peroxydases, ainsi que de la catalase. Nous avons fait agir des complexes contenant 20 γ de Cu^{+2} sur des substrats variés à pH = 7,3 tantôt en l'absence, tantôt en présence de peroxyde d'hydrogène; nous avons observé les effets suivants.

1° *Effet oxydasique.* Les effets oxydasiques dus au cuivre ionique, sont amplifiés par l'emploi du complexe organo-métallique (modèle d'enzyme). Parmi les complexes étudiés, le Cu-iminazole s'est révélé comme étant l'un des plus actifs; il catalyse l'oxydation des di et polyphénols. L'hydroquinone, le pyrogallol et la teinture de gaïac, sont oxydés presque instantanément, le gaïacol, le catéchol, le résorcinol, l'orcinol, l'acide protocatéchique, l'adrénaline, l' α -naphтол, etc. le sont plus lentement. La tyrosine résiste, tandis que la dihydroxyphénylalanine (DOPA) est oxydée en mélanine. Les monophénols, le p-crésol, le réactif de *Chodat*¹⁾, ne sont pas oxydés dans les conditions que nous nous sommes fixées.

L'identité des substrats oxydables par nos modèles et par les enzymes naturels, montre la grande similitude d'action de ces complexes avec celle des ferments cellulaires.

2° *Effet peroxydasique.* Dans nos expériences, l'effet peroxydasique des complexes du cuivre chevauche souvent sur l'effet simplement oxydasique. La présence d'eau oxygénée ne fait que renforcer dans la plupart des cas la vitesse d'oxydation.

Le complexe Cu-iminazole en présence d'eau oxygénée, catalyse l'oxydation d'un grand nombre de substances, particulièrement des phénols et amines aromatiques. Ainsi, sont oxydés presque instantanément le pyrogallol, le gaïacol, l'hydroquinone, la phloroglucine, le catéchol, les o-, m- et p-crésols, la m- et la p-phénylènediamine, la benzidine, etc.

Dans certains cas toutefois, l'action oxydante du complexe de cuivre ne s'exerce pas sans le concours de H_2O_2 .

1) Mélange de p-crésol et de glycocole.

3^o *Effet catalasique.* L'effet catalytique du cuivre sur la décomposition de l'eau oxygénée est bien connu, mais cette décomposition est lente. En présence de divers complexes, en particulier du Cu-tétramine, la décomposition de l'eau oxygénée diluée devient vive. Lorsqu'on combine le pouvoir catalytique du complexe ci-dessus avec un effet de surface, on obtient un bon modèle de catalase. Nous avons adsorbé les complexes sur divers supports inertes de réaction neutre ou légèrement basique. La craie s'est révélée très favorable.

Le cuivre n'est pas le seul élément pouvant donner des complexes à activité catalasique; nous avons trouvé par exemple que le manganèse(II) donne avec la nicotine un complexe qui, adsorbé sur de la craie, décompose fortement l'eau oxygénée.

Conclusions.

A) La Nadi-réaction ne constitue donc pas un test spécifique de la cytochrome-oxydase; une Nadi-réaction négative «in vivo» peut résulter non seulement de l'absence de cytochrome-oxydase, mais aussi de la présence massive d'un système oxydo-réducteur à l'état réduit. L'effet cytochrome-oxydasique du Cu^{+2} se distingue de celui de l'enzyme de *Keilin* par le fait qu'il n'exige pas, pour parachever l'oxydation du Nadi, le concours du cytochrome c.

Etant donné la grande similitude de comportement de notre réaction catalytique spécifique à base de cuivre avec certaines réactions enzymatiques (pour la plupart oxydatives), ne doit-on pas incriminer plus souvent le cuivre d'être l'élément actif de ces systèmes? Nous pensons en particulier à la cytochrome-oxydase. Cette hypothèse élargit singulièrement la conception de *Keilin*, à savoir assimilation de l'indophénoloxydase à la cytochrome-oxydase.

B) Nous avons réalisé divers modèles de ferments oxydants actifs «in vitro», dépourvus de protéine. Les complexes actifs que nous venons de mettre en évidence n'ont en définitive rien de très aberrant au point de vue biochimique si l'on songe aux édifices dans lesquels est incorporé par exemple le fer des hématines.

C) Ces modèles d'enzyme se distinguent les uns des autres par leur propriété dominante qui peut servir à les classer en trois catégories: type oxydase (polyphénoloxydase), type peroxydase, type catalase. Nos expériences montrent cependant que les différences entre ces trois types sont plutôt d'ordre quantitatif. Les frontières, déjà si fragiles, établies par l'enzymologie classique, tendent encore à s'effacer ici.

Une classification plus logique des ferments oxydants, devrait être fondée, selon nous, sur la valeur du potentiel normal d'oxydo-réduction de chacun d'entre eux. On subordonnerait donc à ce caractère fondamental ceux, d'ailleurs non négligeables, du métal, de la molécule activante, de la protéine et du substrat oxydable.

La fréquence dans l'organisme des molécules activatrices que nous avons éprouvées, suggère enfin l'hypothèse suivante: ces molécules ou fragments de macromolécules (adénine, guanine, xanthine, etc.) ne jouent-ils pas le rôle de lien entre le métal et la molécule protéinique des enzymes naturels?

D) Les activateurs éprouvés comprennent un nombre élevé de substances réputées pharmacodynamiques (alcaloïdes, coramine, etc.). On peut se demander alors si l'activité de ces médicaments n'est pas, en partie, due à leur fonction d'auxiliaire des oxydations biologiques.

E) Vu la grande sensibilité et spécificité du réactif Nadi, aux ions Cu^{+2} , nous préconisons son utilisation à des fins analytiques (dans certaines conditions on pourra même faire appel à des activateurs pour augmenter encore la sensibilité du Nadi vis-à-vis du Cu^{+2}).

Ces recherches sont effectuées sous la direction de M. le Professeur *F. Chodat*, à qui j'exprime ici ma vive reconnaissance pour les précieux conseils prodigués, pour le grand intérêt qu'il porte à mes travaux et pour sa bienveillante sollicitude.

Institut de botanique générale
de l'Université de Genève.

60. Methoxyketone aus Diazoketonen.

Steroide, 5. Mitteilung¹⁾2)

von *R. Casanova* und *T. Reichstein*.

(6. II. 59.)

Kürzlich teilten wir mit, dass beim Kochen von 21-Diazo-allopregnanon-(20) (I) mit CuO^3) in Methanol nicht der erwartete Allopregnan-21-säure-methylester (III)^{c)}, sondern ein isomerer Stoff entsteht, der unter Vorbehalt als 21-Methoxy-allopregnanon-(20) (II) formuliert wurde. Analog reagierten die Diazoketone IV, VIII und 21-Diazo-pregnanol-(3 β)-on-(20)-acetat; sie lieferten die Ketone V, IX und VI. Das letztgenannte VI ist inzwischen von *Heusser, Engel & Plattner*^{e)} auf demselben Wege bereitet und seine Konstitution durch Überführung in Desoxycorticosteron-methyläther⁵⁾ bewiesen worden. Methoxyketone des Typus II konnten bisher nur auf dem von *Meystre & Wettstein*⁴⁾5) beschriebenen Umweg bereitet werden. Die Ketonnatur von II ergibt sich aus der Tatsache, dass der Stoff leicht ein Semicarbazon liefert, hingegen auch bei sehr energischem Erwärmen mit

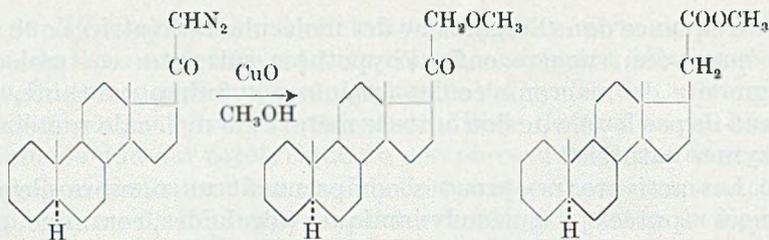
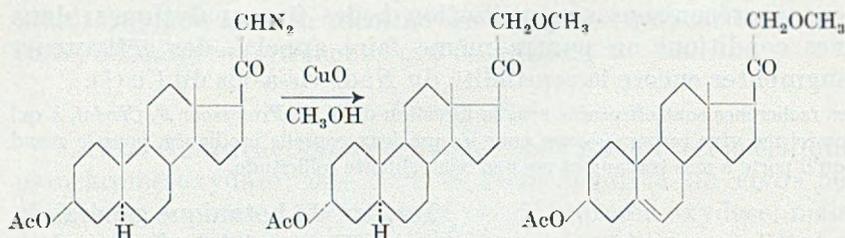
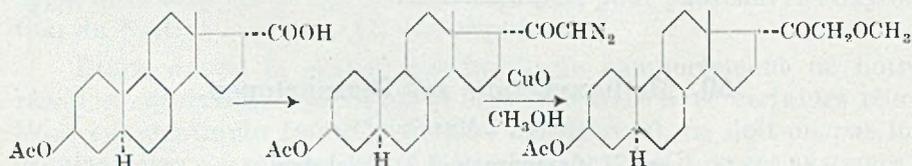
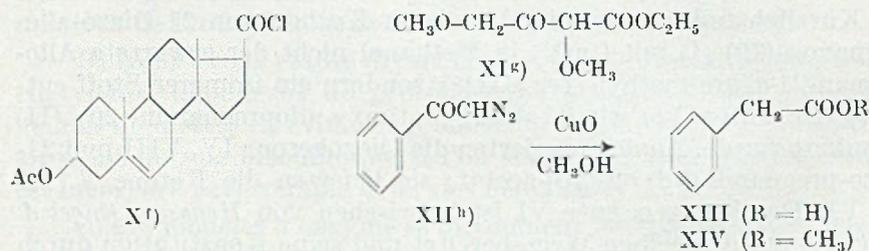
1) 4. Mitt., *A. Lardon & T. Reichstein*, *Helv.* **32**, 2003 (1949).

2) Die mit Buchstaben bezeichneten Fussnoten siehe Formelseite.

3) *H. Erlenmeyer & M. Aeberli*, *Helv.* **31**, 28 (1948).

4) *Ch. Meystre & A. Wettstein*, *Helv.* **30**, 1037 (1947), vgl. *Exper.* **3**, 185 (1947).

5) *Ch. Meystre & A. Wettstein*, *Helv.* **30**, 1256 (1947).

I F. 124° (Zers.) [+152]^{a)}II F. 66° [+95]^{a)}III F. 47°/66° [+8]^{c)}Semicarbazon F. 214° (Zers.) [+48]^{b)}IV F. 137° (Zers.) [+136]^{d)}V F. 110° [+76]^{b)}VI F. 110° [+14]^{e)}VII F. 260°^{b)}VIII F. 145° (Zers.) [-90]^{b)}IX F. 120° [-58]^{b)}X^{f)}XII^{g)}

XIII (R = H)

XIV (R = CH₃)

Ac = CH₃CO—. Die Zahlen in den eckigen Klammern geben die auf ganze Grade auf- oder abgerundete spez. Drehung in Chloroform an.

^{a)} R. Casanova & T. Reichstein, Helv. 32, 647 (1949).

^{b)} Exp. Teil dieser Arbeit.

^{c)} Pl. A. Plattner, H. Bucher & E. Hardegger, Helv. 27, 1177 (1944).

^{d)} T. Reichstein & J. v. Euw, Helv. 22, 1209 (1939).

^{e)} H. Heusser, Ch. R. Engel & Pl. A. Plattner, Helv. 32, 2475 (1949).

^{f)} M. Steiger & T. Reichstein, Helv. 20, 1164 (1937).

^{g)} D. D. Pratt & R. Robinson, Soc. 127, 166 (1925).

^{h)} F. Arndt & J. Amende, B. 61, 1122 (1928).

KOH in Methanol nicht zu einer Säure verseift wird. — Wir versuchten zuerst, II durch Einwirkung von HCl in Eisessig ins 21-Chlorketon überzuführen, doch gelang dies bisher nicht. Auch ein Versuch das Methoxyketon VI durch Umsetzung von 3 β -Acetoxy- Δ^4 -cholesterin-(5)-säure-chlorid mit 2,4-Dimethoxy-acetessigester (XI)²⁾ und anschließende Verseifung zu gewinnen, schlug fehl. Da die Konstitution von VI inzwischen von *Plattner* und Mitarb.⁴⁾ bewiesen wurde und da die Bildung des Semicarbazons aus II in Verbindung mit seinen Eigenschaften kaum eine andere Formel zulässt, wurde auf weitere Konstitutionsbeweise verzichtet. — Hingegen stellten wir fest, dass *o*-Diazo-acetophenon (XII) beim Kochen mit CuO in Methanol im wesentlichen in der von *Erlenmeyer & Aeberli*¹⁾ beschriebenen Weise reagiert, also in guter Ausbeute den Phenylessigsäure-methylester liefert. Ob daneben kleine Mengen Methoxyketon entstehen, wurde nicht untersucht.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass Diazoketone beim Erhitzen mit Methanol (oder anderen Alkoholen) in Gegenwart von Ag₂O in allen bisher untersuchten Fällen nach *Arndt & Eistert*²⁾ die normalen Säureester lieferten. Wird dieselbe Reaktion in Gegenwart von CuO ausgeführt, so kommt es auf den Bau des Diazoketons an, in manchen Fällen entstehen Säureester, in anderen fast ausschliesslich Methoxyketone.

Wir danken Herrn P. D. Dr. *K. Meyer* für seine Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

Experimenteller Teil.

Alle Schmelzpunkte sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze $\pm 2^\circ$. Substanzproben zur Drehung wurden 1 Stunde im Hochvakuum bei 60–70° getrocknet. „Übliche Anarbeitung“ bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Äther, Waschen mit verdünntem HCl, Sodalösung und Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen.

21-Methoxy-allopregnanon-(20)-semicarbazon (III).

50 mg Semicarbazid-hydrochlorid mit 70 mg Kaliumacetat gut verrieben, nach Verflüssigung mit 1,5 cm³ Methanol versetzt und filtriert. Im Filtrat 50 mg 21-Methoxy-allopregnanon-(20) (II)³⁾ vom Smp. 59–62° gelöst und 16 Stunden bei 18° stehen gelassen. Kristallabscheidung durch Wasserzusatz vervollständigt, Kristalle abgenutscht, mit Wasser gewaschen. Aus Methanol verfilzte, farblose Nadeln, Smp. 214–215° (Zers.); $[\alpha]_D^{16} = +47,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,327$ in Chloroform).

13,311 mg Subst. zu 1,0029 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{16} = +0,63^\circ \pm 0,02^\circ$

3,460 mg Subst. gaben 8,996 mg CO₂ und 3,138 mg H₂O (OAB)

3,020 mg Subst. gaben 0,289 cm³ N₂ (25°, 738 mm) (OAB)

C ₂₃ H ₃₉ O ₂ N ₃	Ber. C 70,91	H 10,09	N 10,79%
(389,57)	Gef. „ 70,95	„ 10,15	„ 10,65%

¹⁾ *H. Erlenmeyer & M. Aeberli*, *Helv.* **31**, 28 (1948).

²⁾ *F. Arndt & B. Eistert*, *B.* **68**, 200 (1935).

Versuche zur Abspaltung der Methoxylgruppe.

a) 50 mg 21-Methoxy-allopregnanon-(20) (II) vom Smp. 59—62° wurden mit 1,5 cm³ Eisessig, der vorher mit HCl-Gas gesättigt worden war, versetzt und 6 Stunden bei 18° stehen gelassen. Übliche Aufarbeitung lieferte 49 mg Neutralprodukt. Nach Chromatographic 42 mg Kristalle, Smp. 63—66°, die sich als unverändertes Ausgangsmaterial erwiesen.

b) 50 mg 21-Methoxy-allopregnanon-(20) (II) vom Smp. 59—62° in 1,5 cm³ Äther mit trockenem HCl-Gas gesättigt und 34 Stunden bei 18° stehen gelassen. Aufarbeitung wie oben gab 34 mg Kristalle, Smp. 62—65°, die sich als unverändertes II erwiesen.

21-Diazo-allopregnanol-(3 β)-on-(20)-acetat (IV)¹⁾.

Das chromatographisch gereinigte Diazoketon gab aus Äther-Petroläther blassgelbe Nadeln, Smp. 138—139° (Zers.); $[\alpha]_D^{22} = +136,0^0 \pm 2^0$ ($c = 1,5660$ in Chloroform).

15,705 mg Subst. zu 1,0029 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{22} = +2,13^0 \pm 0,02^0$.

Zur Analyse 2 Stunden im Hochvakuum bei 50° getrocknet.

3,576 mg Subst. gaben 9,417 mg CO₂ und 2,923 mg H₂O (OAB)

3,973 mg Subst. gaben 0,271 cm³ N₂ (25°, 736 mm) (OAB)

C ₂₃ H ₃₄ O ₃ N ₂	Ber. C 71,47	H 8,86	N 7,25%
(386,51)	Gef. ,, 71,86	„ 9,14	„ 7,57%

21-Methoxy-allopregnanol-(3 β)-on-(20)-acetat (V).

400 mg 21-Diazo-allopregnanol-(3 β)-on-(20)-acetat (IV) vom Smp. 136—138° wurden in 6 cm³ absolutem Methanol unter Rückfluss gekocht und unter ständigem mechanischem Rühren innerhalb 2 Stunden mit 200 mg CuO in 4 Portionen versetzt. Dann wurde noch 2 Stunden gekocht. Filtration und übliche Aufarbeitung gab 390 mg kristallines Rohprodukt, das an 8 g Al₂O₃ chromatographiert wurde. Die mit Benzol und Benzol-Äther (1:1) eluierten Anteile (343 mg) schmolzen roh bei 106—110°. Sie wurden im Hochvakuum (Molekularkolben) bei 120—130° Badtemperatur destilliert. Aus Äther-Petroläther farblose Drusen Smp. 110—111°; $[\alpha]_D^{14} = +75,8^0 \pm 2^0$ ($c = 1,4253$ in Chloroform).

14,387 mg Subst. zu 1,0094 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{14} = +1,08^0 \pm 0,02^0$.

Zur Analyse 2 Stunden im Hochvakuum bei 60° getrocknet.

3,717 mg Subst. gaben 10,070 mg CO₂ und 3,275 mg H₂O (OAB)

4,383 mg Subst. verbr. 3,3948 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃ (Zeisel-Vieböck)

C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ber. C 73,80	H 9,81	-OCH ₃ 7,97%
(390,54)	Gef. ,, 73,93	„ 9,86	„ 8,01%

3 β -Acetoxy-17-iso-ätioallocholensäure (VII).

150 mg 3 β -Oxy-17-iso-ätioallocholensäure¹⁾ vom Smp. 277—279° wurden in 2 cm³ absolutem Pyridin und 1 cm³ Acetanhydrid 24 Stunden bei 18° stehen gelassen. Dann wurde mit 1 cm³ Wasser versetzt und 1 Stunde auf 100° erhitzt, im Vakuum eingedampft, mit verdünntem HCl versetzt und in Äther aufgenommen. Die mit verdünntem HCl gewaschene Ätherlösung wurde bei 0° nochmals mit stark verdünnter NaOH ausgeschüttelt und diese Auszüge sofort angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Die mit verdünntem HCl und Wasser gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Ätherlösungen gaben beim Eindampfen 140 mg rohe Säure vom Smp. 250—260°. Nach Sublimation im Molekularkolben bei 0,02 mm und 230—250° Badtemperatur aus Methanol farblose Platten, Smp. 260—263°.

¹⁾ M. Sorkin & T. Reichstein, Helv. 29, 1209 (1946).

21-Diazo-17-iso-allopregnanol-(3 β)-on-(20)-acetat (VIII).

110 mg rohe 3 β -Acetoxy-17-iso-ätioallocholansäure (VII) vom Smp. 250–260° wurden im Hochvakuum getrocknet, bei 0° in 5 cm³ reinstem Thionylchlorid gelöst und 15 Stunden bei +8° unter H₂O-Ausschluss stehen gelassen. Nach Eindampfen im Vakuum wurde in wenig absolutem Benzol gelöst, dieses nochmals im Vakuum abgedampft und der kristalline Rückstand $\frac{1}{2}$ Stunde im Vakuum bei 40° getrocknet. Dann wurde in absolutem Äther gelöst und bei –10° in die trockene ätherische Diazomethanlösung aus 5 g Nitrosomethylharnstoff eingetragen und unter H₂O-Ausschluss 2 $\frac{1}{2}$ Stunden bei 20° stehen gelassen. Nach Eindampfen im Vakuum wurde der Rückstand an 3 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Benzol-Petroläther (1:1) und reinem Benzol eluierten Anteile gaben 87 mg Diazoketon vom Smp. 144–146° (Zers.). Zur Analyse wurde eine Probe aus Methanol und aus Petroläther umkristallisiert und 2 Stunden im Hochvakuum bei 50° getrocknet. Blassgelbe Nadeln, Smp. 145–146° (Zers.); $[\alpha]_D^{22} = -90,3^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 0,4978$ in Chloroform).

5,025 mg Subst. zu 1,0094 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{22} = -0,45^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$.

2,981 mg Subst. gaben 0,188 cm³ N₂ (24°, 736 mm) (OAB)

C₂₃H₃₁O₃N₂ (386,51) Ber. N 7,25% Gef. N 7,02%

21-Methoxy-17-iso-allopregnanol-(3 β)-on-(20)-acetat.

70 mg 21-Diazo-17-iso-allopregnanol-(3 β)-on-(20)-acetat (VIII) vom Smp. 144–146° (Zers.) wurden wie bei V beschrieben behandelt. Das Rohprodukt (65 mg) wurde an 3 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Benzol und Benzol-Äther (1:1) eluierbaren Anteile (42 mg) gaben aus Methanol 33 mg Kristalle vom Smp. 117–121°. Zur Analyse wurde im Molekularkolben bei 0,02 mm und 110° Badtemperatur destilliert und aus Petroläther umkristallisiert. Smp. 120–123°; $[\alpha]_D^{18} = -58,2^{\circ} \pm 3^{\circ}$ ($c = 0,7385$ in Chloroform).

7,406 mg Subst. zu 1,0029 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{18} = -0,48^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$.

Zur Analyse wurde im Vakuum kurz geschmolzen.

2,948 mg Subst. gaben 7,982 mg CO₂ und 2,555 mg H₂O (OAB)

C₂₁H₃₈O₄ (390,54) Ber. C 73,80 H 9,81% Gef. C 73,89 H 9,70%

Versuch zur Umsetzung von 3 β -Acetoxy-ätiocholen-(5)-säurechlorid (X) mit α, γ -Dimethoxy-acetessigsäure-äthylester.

150 mg Dimethoxy-acetessigester (XI)^g (1,2 Mol. auf 250 mg X berechnet) in 10 cm³ absolutem Äther wurden unter H₂O-Ausschluss mit 18 mg Natrium in dünnen Scheibchen versetzt und bis zur Beendigung der Umsetzung stehen gelassen. Dann wurden 250 mg frisch bereitetes trockenes 3 β -Acetoxy-ätiocholen-(5)-säurechlorid (X)^f eingetragen und 3 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Eindampfen wurde der Rückstand mit der Lösung von 375 mg KOH (10 Mol.) in 15 cm³ Methanol-Wasser (2:1) 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Dann wurde mit HCl knapp kongosauer gemacht und nochmals 2 Stunden gekocht. Die übliche Aufarbeitung lieferte 215 mg öliges Rohprodukt, das an 6 g Al₂O₃ chromatographiert wurde. Die mit Benzol und Benzol-Äther (4:1) eluierten Anteile (99 mg farbloses Öl) konnten auch nach Destillation im Hochvakuum und Impfen mit VI nicht zur Kristallisation gebracht werden.

Phenyllessigsäure-methylester (XIV) aus XII mit CuO + Methanol.

200 mg ω -Diazo-acetophenon in 2 cm³ Methanol mit 100 mg CuO versetzt. Schon bei schwachem Erwärmen trat starke N₂-Entwicklung und Farbumschlag von gelb nach orange ein. Zweistündiges Kochen und übliche Aufarbeitung lieferte 185 mg rohen, leicht gelblichen Ester. Dieser wurde direkt mit 100 mg KOH in 1 cm³ Wasser und 7 cm³ Methanol 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Übliche Trennung in neutrale und saure Anteile

lieferte fast nur Säure. Smp. roh 65—72°. Aus Wasser farblose Plättchen. Smp. 74—76°. Authentische Phenylelessigsäure sowie die Mischprobe schmolzen gleich.

Die Mikroanalysen wurden im Mikrolabor der Organ.-chem. Anstalt, Basel (Leitung *E. Thommen*), ausgeführt.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Es wurden einige weitere Beispiele angeführt, wo das Verkochen von 21-Diazo-pregnanon-(20)-derivaten mit CuO in Methanol zu 21-Methoxy-20-ketonen führt. Bei ω -Diazo-acetophenon liefert dasselbe Verfahren jedoch zur Hauptsache Phenylelessigsäure-methylester, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von *Erlenmeyer* und *Aeberli*.

Bürgerspital-Notlaboratorium
der Organ.-chem. Anstalt der Universität Basel.

61. Über die Ausscheidung freier Aminosäuren beim Alloxandabetes¹⁾

von M. Vest und O. Wiss²⁾.

(I. II. 50.)

Es ist seit den Versuchen von *Minkowski*³⁾ am pankreaslosen Hund bekannt, dass der Eiweissumsatz beim Diabetes erhöht ist. Die Stickstoffausscheidung kann dabei nach den Untersuchungen von *Falta, Grote & Staehelin*⁴⁾ und *Grafe*⁵⁾ und anderen am diabetischen Hund bis viermal so hohe Werte annehmen wie beim normalen Tier, woraus auf die gesteigerte Bildung von Glucose aus Protein geschlossen wurde. Das Verhalten des Aminostickstoffes nach Pankreasexstirpation wurde 1925 von *Falkenhäusen*⁶⁾ untersucht. Er konnte am Hund einen vorübergehenden Anstieg der Aminostickstoffausscheidung im Urin nachweisen, während der Reststickstoff- und der Aminostickstoffgehalt des Blutes dauernd leicht erhöht blieben. In neuerer Zeit massen *Frankl, Martin & Dunn*⁷⁾ die Ausscheidung von freiem Tryptophan, Histidin und Cystin bei verschiedenen Krankheiten mit mikrobiologischen Methoden. Eine Steigerung der Ausscheidung einer

¹⁾ Mit Unterstützung der *Emil-Barcell-Stiftung zur Förderung der medizinisch-wissenschaftlichen Forschung*.

²⁾ Teilweise vorgetragen an der 35. Tagung des Schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen am 22./23. Oktober 1949 in Fribourg.

³⁾ *O. Minkowski*, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **31**, 85 (1893).

⁴⁾ *W. Falta, F. Grote & R. Staehelin*, Beitr. chem. Physiol. u. Path. **10**, 199 (1907).

⁵⁾ *E. Grafe*, Erg. d. Physiol. **21/11**, 321 (1923).

⁶⁾ *M. von Falkenhäusen*, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **109**, 249 (1925).

⁷⁾ *W. Frankl, H. Martin & M. S. Dunn*, Arch. Biochem. **13**, 103 (1947).

oder mehrerer dieser Aminosäuren fand sich neben Leberkrankheiten vor allem in einzelnen Fällen von Diabetes mellitus; in anderen Fällen waren aber die Werte auch erniedrigt.

*Hall*¹⁾ untersuchte die Aminosäureausscheidung bei 80 Diabetesfällen mit Hilfe der Verteilungschromatographie. Er konnte in 25% der Fälle eine etwa dreimal höhere Ausscheidung als beim Gesunden feststellen. Eine genaue quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren war aber nicht möglich.

Aus den gemachten Angaben geht hervor, dass fast ausnahmslos nur die Gesamtausscheidung von Aminosäuren beim Diabetes untersucht worden ist. Es ist wenig über das Verhalten der einzelnen Aminosäuren bekannt. Gerade dieses Problem schien uns von besonderem Interesse, da die einzelnen Aminosäuren in sehr verschiedener Weise mit dem Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel verknüpft sind.

In der folgenden Untersuchung wurde deshalb die Ausscheidung der wichtigsten Aminosäuren beim Diabetes gemessen und mit Normalwerten verglichen.

Experimenteller Teil.

Als Versuchstiere wählten wir Albinoratten. Der Diabetes wurde durch subcutane Injektion von 15–17 mg Alloxan pro 100 g Körpergewicht in 5-proz. wässriger Lösung erzeugt (*Gomori & Goldner*²⁾). Nur Tiere, bei denen sich in der Folgezeit eine deutliche Glykosurie oder Hyperglykämie entwickelte, wurden in den Versuchen verwendet, und zwar in Gruppen von 5–6 Ratten: gleichviel gesunde, gleich gehaltene Tiere dienten als Kontrollen.

Die Ratten erhielten ein Futter aus 30% Casein, 30% Cocosfett, 25% Maisstärke, 10% Trockenhefe, 5% Salzmischung nach *McCollum*³⁾ und ein paar Tropfen Lebertran sowie Wasser ad libitum. Obwohl es die Beurteilung der Aminosäureausscheidung erleichtert hätte, sahen wir davon ab, vollständig eiweissfreies Futter zu verabreichen, weil bei längerer Versuchsdauer der Eiweissmangel zusätzliche Störungen zur Folge haben könnte.

Der hohe Fettgehalt des Futters, den wir gewählt haben, wirkt sich nach den Untersuchungen von *Burn*⁴⁾, *Janes & Prosser*⁵⁾ und *Abelin*⁶⁾ günstig auf den Allgemeinzustand der alloxandiabetischen Ratten aus.

Die Ratten wurden in Stoffwechsellkäfigen gehalten. Der Urin wurde für je 24 Stunden gesammelt und dann unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt. Am Ende einer Versuchsperiode, im allgemeinen nach 4 Tagen, wurde der Gesamturin jeder Ratte auf ein geeignetes Volumen verdünnt. Dieses betrug im allgemeinen 100–150 cm³ für die diabetischen, 50–60 cm³ für die Kontrolltiere, die bedeutend weniger Urin ausschieden. Einige Messungen wurden auch an einzelnen 24 Stunden-Urinportionen ausgeführt.

Da nach *Pearson & Panzer*⁷⁾ die Aminosäureausscheidung im Kot, auf die Tagesmenge bezogen, 2–5mal so gross ist, wie im Urin, so muss man bei solchen Versuchen darauf achten, dass der Urin nicht mit den Faeces in Berührung kommt. Man erhält sonst zu hohe Werte. Es erwies sich deshalb als notwendig, die Käfige täglich zu reinigen.

¹⁾ *D. A. Hall*, Biochem. J. **43**, Proc. Biochem. Soc. LVIII (1948).

²⁾ *G. Gomori & M. G. Goldner*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **54**, 287 (1943).

³⁾ *E. V. McCollum & N. Simmonds*, J. Biol. Chem. **33**, 55 (1918).

⁴⁾ *I. H. Burn, T. H. C. Lewis & F. D. Kelsey*, Brit. Med. J. **1944/II**, 752.

⁵⁾ *R. G. Janes & M. Prosser*, Am. J. Physiol. **151**, 581 (1947).

⁶⁾ *I. Abelin*, Helv. physiol. pharmacol. acta **7**, 79 (1949).

⁷⁾ *P. B. Pearson & F. Panzer*, J. Nutrition **38**, 257 (1949).

Methoden.

Alanin und Glykokoll wurden nach den im hiesigen Institut üblichen chemischen Methoden¹⁾ bestimmt, die übrigen Aminosäuren mikrobiologisch:

Cystin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin, Methionin, Serin und Prolin nach der Methode von *Dunn* und Mitarbeitern²⁾ mit *Leuconostoc mesenteroides* P-60 8042.

Glutaminsäure nach *Hac* und Mitarbeitern³⁾ mit *Lactobacillus arabinosus* 17/5 8014.

Asparaginsäure nach *Hac & Snell*⁴⁾ mit *Leuconostoc mesenteroides* P-60 8042.

Die übrigen nach *Stokes* und Mitarbeitern⁵⁾ mit *Streptococcus faecalis* 9790.

Für jede Bestimmung wurden verschiedene Urinkonzentrationen verwendet. Sie lagen normalerweise zwischen 0,1 und 1,0 cm³ des verdünnten Urins pro Ansatz. Die bei den verschiedenen Konzentrationen erhaltenen, auf 1 cm³ umgerechneten Werte zeigten meist eine befriedigende Übereinstimmung. Gelegentlich war der errechnete Gehalt des Urins an einer Aminosäure, bezogen auf einen Kubikzentimeter des unverdünnten Harns, bei den Ansätzen mit höheren Urinkonzentrationen kleiner als bei denen mit niedriger Konzentration; hieraus muss auf eine Hemmung des Wachstums der verwendeten Bakterien durch Begleitsubstanzen im Urin geschlossen werden, die bei höheren Konzentrationen deutlicher wird. Eine solche Hemmung haben auch *Dunn* und Mitarbeiter⁶⁾, *Thompson & Kirby*⁷⁾ und *Sauberlich & Baumann*⁸⁾ bei mikrobiologischen Bestimmungen im Urin festgestellt. Nach *Woodson* und Mitarbeiter⁹⁾ ist vor allem der Harnstoff für diese Hemmung verantwortlich. *Dunn* erhielt aber nach Spaltung des Harnstoffs mit Urease gegenüber dem unbehandelten Urin keine wesentlich veränderten Werte. Die Hemmung kann nach *Dunn* und anderen (loc. cit.) am besten durch Hydrolyse des Harns mit Salzsäure beseitigt werden, wodurch aber auch die Peptide gespalten und neben den „freien“ auch die „gebundenen“ Aminosäuren mikrobiologisch mitbestimmt werden. Wir haben deshalb von einer Hydrolyse abgesehen und versucht, durch starke Verdünnung des untersuchten Urins den Einfluss der betreffenden Substanzen möglichst auszuschalten.

Eine Stimulation des Wachstums der Testorganismen durch Stoffe, die der zu untersuchenden Substanz verwandt sind, ist seltener. Nach *Hegsted*¹⁰⁾ können einige Aminosäuren in der Nährlösung durch die entsprechenden α -Oxy- und α -Ketoverbindungen bis zu einem gewissen Grad ersetzt werden. Diese sind durch Äther extrahierbar. Da nach *Frankl & Dunn*¹¹⁾ unbehandelte und mit Äther extrahierter Urin ungefähr den gleichen Gehalt an Aminosäuren aufweist, spielen sie vermutlich nur eine geringe Rolle. Immerhin wird man auch aus Rücksicht auf eine evtl. Stimulation den Urin für die Bestimmung möglichst verdünnen.

¹⁾ *O. Wiss*, *Helv.* **31**, 22 (1948); *R. Krueger*, *Helv.* **32**, 238 (1949).

²⁾ *M. S. Dunn*, *S. Shankman*, *M. N. Camien*, *W. Frankl & L. B. Rockland*, *J. Biol. Chem.* **156**, 703 (1944).

³⁾ *L. R. Hac*, *E. E. Snell & R. J. Williams*, *J. Biol. Chem.* **159**, 273 (1945).

⁴⁾ *L. R. Hac & E. E. Snell*, *J. Biol. Chem.* **159**, 291 (1945).

⁵⁾ *J. L. Stokes*, *M. Gunness*, *J. M. Dwyer & M. C. Caswell*, *J. Biol. Chem.* **160**, 35 (1945).

⁶⁾ *M. S. Dunn*, *M. N. Camien*, *S. Shankman & H. Bloch*, *Arch. Biochem.* **13**, 207 (1947).

⁷⁾ *R. C. Thompson & H. M. Kirby*, *Arch. Biochem.* **21**, 210 (1949).

⁸⁾ *H. E. Sauberlich & C. A. Baumann*, *J. Biol. Chem.* **166**, 417 (1946).

⁹⁾ *H. W. Woodson*, *S. W. Hier*, *J. D. Solomon & O. Bergeim*, *J. Biol. Chem.* **172**, 613 (1948).

¹⁰⁾ *D. M. Hegsted*, *J. Biol. Chem.* **157**, 741 (1945).

¹¹⁾ *W. Frankl & M. S. Dunn*, *Arch. Biochem.* **13**, 93 (1947).

Der Zucker im Harn wurde qualitativ und quantitativ nach *Benedikt*¹⁾ bestimmt. Blutzuckermessungen wurden nach *Hagedorn-Jensen*, modifiziert von *Fujita & Iwatake*²⁾ durchgeführt.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde nach dem t-Test von *Fisher*³⁾ berechnet. Signifikanz wurde angenommen, wenn das errechnete t grösser war, als der für $P = 0,01$ angegebene Wert.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Es handelt sich um Durchschnittswerte von 10—50 Einzelbestimmungen.

Tabelle 1.

Tagesausscheidung der einzelnen Aminosäuren in γ pro 100 g Körpergewicht.

Aminosäure	Diab. Tiere	Gesunde Tiere	P <
Alanin	2400	590	0,001
Serin	842	343	0,001
Asparaginsäure	230	75	0,001
Methionin	688	222	0,001
Glykokoll	627	277	0,001
Prolin	307	183	0,01
Cystin	355	118	0,01
Tyrosin	148	92	0,02
Leucin	185	116	0,05
Valin	159	99	0,05
Isoleucin	215	112	0,1
Phenylalanin	129	68	0,1
Lysin	254	174	0,1
Tryptophan	103	79	0,2
Glutaminsäure	679	419	0,2
Arginin	25,2	34,2	0,2
Threonin	396	459	0,5
Histidin	81	79	1,0

Es ist ersichtlich, dass sich die einzelnen Aminosäuren beim Diabetes verschieden verhalten.

Die einen zeigen im Diabetes eine deutliche Mehrausscheidung. Hicher gehören im wesentlichen die häufig als glykoplatisch bezeichneten Aminosäuren, also diejenigen, welche im tierischen Organismus in Zucker übergeführt werden. Mit Ausnahme des Methionins handelt es sich um entbehrliche Aminosäuren. Besonders auffallend ist das starke Ansteigen des Alanins auf den vierfachen Wert des normalen, von 0,6 auf 2,4 mg pro die.

¹⁾ S. R. Benedikt, J. Biol. Chem. 5, 485 (1908/09) und 9, 57 (1911).

²⁾ A. Fujita & D. Iwatake, Bioch. Z. 242, 43 (1931).

³⁾ R. A. Fisher, Statistical Methods for Research Workers, 1946.

Bei den andern findet sich zwar eine gewisse Mehrausscheidung im Diabetes, jedoch sind die Unterschiede zwischen gesunden und kranken Tiere nicht eindeutig signifikant. Die Mengen, die die Ratten von den Aminosäuren dieser Gruppe pro Tag ausscheiden, sind mit Ausnahme der Glutaminsäure kleiner, als bei den vorigen. Die meisten Aminosäuren, die hierher gehören, sind essentiell, d. h. sie werden vom Organismus nicht synthetisiert.

Schliesslich sind noch drei Aminosäuren zu nennen, bei denen im Diabetes keine Steigerung oder sogar eine gewisse Verminderung der Ausscheidung gegenüber den Kontrolltieren auftritt. Es sind dies das Histidin, das Threonin und das Arginin.

Die Gesamttagesausscheidung der untersuchten Aminosäuren beträgt 7,8 mg bei den diabetischen, 3,5 mg bei den gesunden Tieren, bezogen auf 100 g Körpergewicht.

Im Zusammenhang mit der auffallenden Mehrausscheidung von Alanin im Urin bestimmten wir den Alaningehalt des Blutes, der Leber und der Niere bei Ratten, die während mindestens 3 Tagen Glykosurie zeigten, und gleichzeitig bei gesunden Kontrolltieren, um wenn möglich einen Hinweis auf die Ursache und Lokalisation der Störung zu erhalten. Die Versuchstechnik wurde früher beschrieben¹⁾. Die Resultate sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.
Alaningehalt der Rattenorgane, in mg%

Zustand der Tiere	Leber			Niere			Blut		
	Extremwerte (Zahl der Tiere)	Mittel	P	Extremwerte (Zahl der Tiere)	Mittel	P	Extremwerte (Zahl der Tiere)	Mittel	P
Normal	85,8-99,8 (4)	90,5		76,0-117,9 (6)	94,8		5,92-10,5 (5)	8,73	
Diabetisch	60,6-72,0 (5)	67,9	<0,001	42,3- 82,8 (5)	68,9	<0,05	3,10- 9,8 (5)	5,06	<0,05
Coma diab.	28,5-42,0 (7)	34,7	<0,001	25,9-61,2 (7)	42,5	<0,001	3,20-5,83 (7)	4,46	<0,001

Es ergibt sich, dass der Alaningehalt von Leber, Niere und Blut bei den kranken Tieren erniedrigt ist. In der Leber ist diese Abnahme eindeutig. Bei den Tieren, die spontan im Coma diabeticum ad exitum kommen, ist dieses Absinken, wie ersichtlich, noch stärker ausgeprägt. Die Unterschiede zu den normalen Ratten sind dabei in Leber, Niere und Blut signifikant.

¹⁾ O. Wiss & R. Krueger, Helv. 32, 527 (1949).

Diskussion der Ergebnisse.

Überblickt man die Ausscheidung der untersuchten Aminosäuren, so fällt auf, dass sich die einzelnen verschieden verhalten. Zum Teil werden sie deutlich vermehrt ausgeschieden, zum Teil ist nur eine geringe oder überhaupt keine Mehrausscheidung feststellbar. Die Mehrausscheidung der einzelnen Aminosäuren kann durch verschiedene Ursachen bedingt sein. Sie könnte zustandekommen durch eine toxische Schädigung der Niere durch das Alloxan. Alloxan verursacht tatsächlich (*Duff*¹⁾) in hohen Dosen verabreicht eine Schädigung der Tubulusepithelien. Die Tiere sterben dabei in wenigen Tagen an Uraemie. Immerhin ist der Unterschied zwischen der Dosis, welche Diabetes und derjenigen, welche Uraemie erzeugt, bei den Ratten verhältnismässig gross (*Goldner*²⁾). Wir haben Alloxandosin verabreicht, die im allgemeinen keine Nierenschädigung verursachen; zudem wäre zu erwarten, dass bei einer toxischen Wirkung die Ausscheidung aller Aminosäuren gleich beeinflusst würde, das heisst, dass alle in vermehrtem Masse ausgeschieden würden, denn die Menge des mit der Nahrung zugeführten Eiweisses ist, verglichen mit den ausgeschiedenen Aminosäuren, so gross, dass die Unterschiede der Ausscheidung nicht auf mangelnde Zufuhr einzelner Aminosäuren zurückgeführt werden können. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der Mehrausscheidung wäre die Annahme einer vermehrten Glomerulusfiltration. Diese Annahme fällt jedoch ausser Betracht, da der Aminosäuregehalt im Plasma nicht erhöht ist. Es bleibt noch die Möglichkeit, dass beim Diabetes die Rückresorption der Aminosäuren gestört ist. Dies könnte durch Überbelastung des Resorptionssystemes durch die vermehrt filtrierte Glucose zustandekommen. Nach Untersuchungen von *Pitts*³⁾ wird aber die Resorption von Glycin durch gleichzeitige Infusion von Glucose nicht beeinflusst; auch im Phloridzindiabetes steigt die Aminostickstoffausscheidung trotz der Glucosurie nicht an. Nach den Untersuchungen von *Pitts*⁴⁾, *Eaton*⁵⁾, *Beyer*⁶⁾, *Goetsch*⁷⁾ und *Wright*⁸⁾ und Mitarbeitern an normalen Hunden werden von der Niere pro Zeiteinheit verschiedene Mengen der einzelnen Aminosäuren aus dem Glomerulusfiltrat zurückresorbiert, das heisst, der Schwellenwert der einzelnen Aminosäuren ist verschieden. Er ist hoch für Gly-

¹⁾ *G. L. Duff*, Am. J. Med. Sci. **210**, 381 (1945).

²⁾ *M. G. Goldner*, Bl. New York Acad. Med. **21**, 44 (1945).

³⁾ *R. F. Pitts*, Am. J. Physiol. **140**, 156 (1943/44).

⁴⁾ *R. F. Pitts*, Am. J. Physiol. **140**, 535 (1943/44).

⁵⁾ *A. G. Eaton*, *F. P. Ferguson* & *F. T. Byer*, Am. J. Physiol. **145**, 491 (1946).

⁶⁾ *K. H. Beyer*, *L. D. Wright*, *H. F. Russo*, *H. R. Skeggs* & *E. A. Patch*, Am. J. Physiol. **146**, 330 (1946).

⁷⁾ *E. Goetsch*, *J. D. Lyttle*, *W. M. Grim* & *P. Dunbar*, Am. J. Physiol. **140**, 688 (1943/44).

⁸⁾ *L. D. Wright*, *H. F. Russo*, *H. R. Skeggs*, *E. A. Patch* & *K. H. Beyer*, Am. J. Physiol. **149**, 130 (1947).

kokoll, Alanin, Methionin, Leucin, Isoleucin, Histidin und Tryptophan, niedrig für Glutaminsäure, Lysin und Arginin. Trotz dieser Unterschiede werden aber Alanin, Glykokoll, Glutaminsäure und Arginin offenbar durch denselben Mechanismus zurückresorbiert (*Pitts*). Werden nämlich diese Aminosäuren zusammen mit Kreatin infundiert, so nimmt mit steigender Konzentration der Aminosäuren im Plasma die Rückresorption von Kreatin immer mehr ab und wird schliesslich auf Null zurückgedrängt, so dass das Kreatin vermehrt ausgeschieden wird. Nach unseren Versuchen werden nun im Diabetes von den genannten 4 Aminosäuren Alanin und Glykokoll eindeutig vermehrt ausgeschieden, Glutaminsäure und Arginin trotz gleichem Resorptionsmechanismus aber nicht. Es scheint also denkbar, dass im Diabetes eine gewisse Störung der Rückresorption einiger Aminosäuren vorliegt. Endgültig kann die Frage nur durch Untersuchung der Clearance der Aminosäuren bei diabetischen Tieren gelöst werden.

Die engen Beziehungen des Alanins zum Kohlehydratstoffwechsel, der beim Diabetes vor allem gestört ist, kommen auch in dieser Versuchsanordnung zum Ausdruck, zeigt das Alanin doch von allen Aminosäuren beim Diabetes sowohl absolut wie relativ den grössten Anstieg. Die Ergebnisse stimmen überein mit früheren Untersuchungen¹⁾ über die Bildung von Alanin aus Kohlehydraten. Es konnte damals gezeigt werden, dass bei Kohlehydratverabreichung am gesunden Tier in erster Linie das Alanin in Blut und Leber angereichert wird.

Zusammenfassung.

1. Es wurde die Ausscheidung von 18 verschiedenen Aminosäuren im Harn gesunder Ratten mit derjenigen alloxandiabetischer Tiere verglichen.

2. Die Ausscheidung von Alanin, Serin, Methionin, Glykokoll, Asparaginsäure, Prolin und Cystin ist bei den diabetischen Tieren signifikant erhöht.

Bei Tyrosin, Leucin, Valin, Isoleucin, Phenylalanin, Lysin, Glutaminsäure und Tryptophan ist eine Erhöhung vorhanden; sie ist jedoch nicht signifikant.

Bei Histidin, Threonin und Arginin findet sich sicher keine Erhöhung im Diabetes.

3. Auffallend ist die intensive Mehrausscheidung beim Alanin. Sie ist sowohl absolut als auch relativ, bezogen auf die normalen Vergleichswerte, höher als diejenige der übrigen Aminosäuren.

4. Der Alaningehalt von Leber, Nieren und Blut ist im Diabetes erniedrigt, besonders deutlich im Coma diabeticum.

5. Die Bedeutung der Befunde wird diskutiert.

Physiol.-chemische Anstalt der Universität Basel.

¹⁾ *O. Wiss*, Helv. **32**, 153 (1949); *O. Wiss & R. Krueger*, Helv. **32**, 527 (1949).

62. Über das freie Glykokoll in tierischen Organen¹⁾

von R. Krueger.

(I. II. 50.)

Die hier mitgeteilten Bestimmungen des freien Glykokolls in den Organen vielgebrauchter Laboratoriumstiere (Ratte, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Taube) und in menschlichem Blut wurden unternommen, um die Verteilung der Aminosäure in den verschiedenen Geweben festzustellen. Ausserdem sollte der Glykokollgehalt in Organen von Tierarten, die sich von Kohlehydraten ernähren, mit solchen verglichen werden, die auf Eiweissnahrung eingestellt sind. Diesem Vergleich kommt insofern Bedeutung zu, als sich neuerdings herausgestellt hat, dass im Tierkörper Glykokoll aus Brenztraubensäure²⁾ entstehen kann.

In der Literatur finden sich quantitative Angaben über das freie Glykokoll in Blut und Geweben nur vereinzelt. *Gutman & Alexander*³⁾ untersuchten den Glykokollgehalt des menschlichen Blutes, *Christensen* und Mitarbeiter⁴⁾ teilten Werte für menschliches Blut und einige Organe des Meerschweinchens, der Ratte und des Kaninchens mit. Diese Autoren bedienten sich alle der Bestimmungsmethode von *Alexander* und Mitarbeitern⁵⁾. Ausserdem haben wir⁶⁾ das Glykokoll mit meiner Methode⁶⁾ in der Rattenleber nach verschiedener Ernährung bestimmt. In der vorliegenden Arbeit ist ebenfalls unsere eigene Methode benutzt worden, da die Bestimmung nach *Alexander* (loc. cit.), wie ich früher zeigte⁷⁾, durch die Anwesenheit anderer Aminosäuren erheblich gestört werden kann. *Christensen* und Mitarbeiter⁸⁾ haben das vor einiger Zeit bestätigt. Die mikrobiologische Methode von *Dunn* und Mitarbeitern⁹⁾ ist für die Bestimmung des freien Glykokolls wenig geeignet, da die Mikroorganismen auch glykokollhaltige Peptide spalten können und daher gebundenes Glykokoll mitbestimmt wird.

Experimenteller Teil.

Im Blut wurde das Glykokoll nach Hämolyse, also im Gesamtblut, bestimmt. Zur Hämolyse wurde das Blut in destilliertes Wasser pipettiert und die Enteiweissung gemäss *Folin & Wu*¹⁰⁾ mit Wolframsäure vorgenommen. Die endgültige Verdünnung des Filtrates war meist 1:8, bei der Katze 1:6 und bei der Taube 1:10. Die Entnahme des Blutes erfolgte am Morgen nach 12stündigem Fasten; in allen Fällen verwendeten wir 5 cm³ Blut.

¹⁾ Die Arbeit wurde mit Unterstützung der *Emil-Barell-Stiftung* durchgeführt.

²⁾ R. Krueger, *Helv.* **33**, 233 (1950).

³⁾ E. Gutman & B. Alexander, *J. Biol. Chem.* **168**, 527 (1947) und **171**, 821 (1947).

⁴⁾ H. Christensen, J. Streicher & R. Elbinger, *J. Biol. Chem.* **172**, 515 (1948);
H. Christensen, J. Rothwell, R. Sears & J. Streicher, *J. Biol. Chem.* **175**, 95 und 101 (1948).

⁵⁾ B. Alexander, G. Landwehr & A. M. Seligman, *J. Biol. Chem.* **160**, 51 (1945).

⁶⁾ R. Krueger & O. Wiss, *Helv.* **32**, 1341 (1949).

⁷⁾ R. Krueger, *Helv.* **32**, 238 (1949).

⁸⁾ H. Christensen, M. Cushing & J. Streicher, *Arch. Biochem.* **23**, 96 (1949).

⁹⁾ M. S. Dunn, S. Shankman, M. N. Camien, W. Frankl & L. B. Rockland, *J. Biol. Chem.* **156**, 703 (1944); S. Shankman, M. N. Camien & M. S. Dunn, *J. Biol. Chem.* **168**, 51 (1947).

¹⁰⁾ O. Folin & H. Wu, *J. Biol. Chem.* **38**, 81 (1919) und **41**, 367 (1920).

Tabelle 1.
Freies Glykokoll in tierischen Organen.

Tier	Organ	Glykokoll in mg%								Mittel
Ratte	Blut	3,6	3,4	3,0	2,8	3,3	3,4	3,6	3,8	3,3
	Leber	24,0	31,2	32,3	25,2	21,0	27,4	18,6	14,4	24,3
	Niere	56,4	44,0	54,6	53,7	38,0	48,2	51,4	47,5	49,2
	Milz	27,7	19,8	32,2	27,7	27,3	33,5	29,5	27,7	28,2
	Herz	8,8	7,8	7,5	8,4	10,4	7,2	8,5	11,4	8,8
	Lunge	44,5	49,5	41,5	61,5	43,0	48,2	52,5	56,5	49,7
	Muskel	30,0	28,0	33,0	18,9	22,8	27,4	29,8	23,7	26,7
	Gehirn	21,5	14,0	25,4	14,3	15,0	21,4	23,4	23,1	19,8
Katze	Blut	1,7	2,0	2,1	2,2	1,9				2,0
	Leber	17,3	13,2	12,9	17,2	11,3	11,1	9,4	15,8	13,5
	Niere	21,8	15,6	20,4	24,9	21,0	25,8	23,6	21,6	21,8
	Milz	20,1	19,2	28,6	22,3	13,2	26,8			21,7
	Herz	8,4	4,8	5,5	3,9	6,0	3,9			5,4
	Lunge	39,4	34,0	39,8	34,0	26,2				34,7
	Muskel	15,6	18,8	19,8	10,5	9,7	8,7	15,7	17,6	14,6
	Gehirn	8,3	9,0	4,8	3,6	8,2				6,8
Kaninchen	Blut	8,1	9,6	8,5	6,4	8,6	8,7	8,7	8,5	8,4
	Leber	51,5	61,2	60,0	31,2	33,0	55,5	35,8	49,0	47,2
	Niere	48,0	57,5	48,7	36,3	29,4	51,0	37,9	53,5	45,4
	Milz	33,6	24,0	25,8	24,0	17,4				25,0
	Herz	9,4	5,1	4,4	9,4	12,7	9,1	13,7		9,1
	Lunge	27,0	29,1	23,4	26,8	39,4	26,4	24,8		28,2
	Muskel	18,9	17,0	18,0	10,2	27,0				18,2
	Gehirn	9,0	8,8	12,0	7,5	8,0	7,0	9,2		8,9
Meerschweinchen	Blut	6,3	5,5	7,3	6,2	5,4	6,6	4,9	4,8	5,9
	Leber	80,0	112,0	162,0	73,0	136,0	57,5	146,0	61,5	103,3
	Niere	108,0	116,5	112,4	133,2	122,0	127,0	126,0	108,4	119,2
	Milz	56,0	41,5	53,5	66,0	41,5	40,5			50,0
	Herz	18,0	17,3	15,5	14,3	13,8	13,2			15,3
	Lunge	45,0	42,0	54,7	67,2	55,0	57,5	41,0	46,0	51,1
	Muskel	40,0	37,8	39,4	41,7	37,2	32,8	37,0	33,6	37,5
	Gehirn	21,6	16,5	21,2	13,6	22,8	20,2	11,5	10,5	17,5
Tauben	Blut	11,0	10,7	14,6	15,2	13,5				13,0
	Leber	27,4	29,4	24,8	32,2	26,4	31,9	25,8	29,2	28,4
	Niere	37,8	49,5	36,2	25,2	43,5	21,8	36,6	26,1	51,8
	Herz	6,0	7,2	10,6	8,3	8,7	8,3	8,2	5,8	7,9
	Lunge	40,7	51,5	41,8	24,6	40,7	44,7	44,0	35,0	40,4
	Muskel	12,0	9,6	17,6	9,6	10,2	9,6	7,8	12,1	10,9
	Gehirn	11,8	12,8	9,8	17,6	15,6	12,1	12,9		13,2

Die Werte für das Menschenblut stammen von 11 gesunden männlichen und weiblichen Versuchspersonen im Alter von 19—54 Jahren. Die Gewichte der Versuchstiere betragen: Ratten 250—300 g, Meerschweinchen 500—600 g, Tauben 350—450 g, Katzen 1,5—2,5 kg, Kaninchen 2,5—3 kg. Es wurden Tiere beiderlei Geschlechts verwendet. Die Tiere wurden durch Dekapitieren getötet und das zuerst ausfliessende Blut aufgefangen. Gleich darauf wurden die Organe entnommen, gewogen und im vorgekühlten Mörser mit Seesand zu homogenem Brei verrieben. Nach Zugabe der für die Eiweissfällung nötigen Wassermenge und gründlichem Verrühren wurde kurz zentrifugiert und die flüssige Phase mit Wolframsäure enteiweisst. Der filtrierte, enteiweiste Extrakt wurde dann mit Wasser so verdünnt, dass in 1 cm³ etwa 5—10 γ Glykokoll enthalten waren. Um diese Konzentration zu erreichen, war es bei einigen Tierarten nötig, zwei gleiche Organe von verschiedenen Tieren zu vereinigen. Bei der Ratte und dem Meerschweinchen wurden 2 Milzen und 2 Herzen für eine Bestimmung zusammengenommen, bei der Taube die Nieren und das Gehirn von 2 Tieren. Schloss sich die Bestimmung des Glykokolls nicht direkt an den Versuch an, so wurden die enteiweisten Extrakte über Nacht unter Luftabschluss im Eisschrank aufbewahrt. Die in den folgenden Tabellen unter „Muskel“ aufgeführten Zahlen bedeuten die Werte für die Skelettmuskulatur der Hinterbeine, nur bei den Tauben ist darunter der Brustmuskel zu verstehen. Das Glykokoll wurde mit der eigenen Methode (loc. cit.) bestimmt.

Tabelle 2.

Freies Glykokoll in menschlichem Blut.

Glykokoll in mg%										Mittel
2,9	3,2	2,9	3,5	2,7	2,9	2,6	3,7	2,6	2,6	3,1
2,9	3,0	3,6	3,5	3,6	2,8	3,0	3,3	2,8	2,5	

Besprechung der Ergebnisse.

Bei allen untersuchten Tierarten fanden sich erhebliche Mengen freien Glykokolls in den Organen. Die höchsten Anteile waren regelmässig in der Niere, der Leber und der Lunge enthalten. Auch die Milz besass hohen Glykokollgehalt. Die Muskulatur wies mittlere Konzentrationen auf, während im Gehirn und im Herzen die geringsten Glykokollmengen angetroffen wurden. Die hohen Konzentrationen in Leber und Niere sind wegen der regen Stoffwechsellätigkeit dieser Organe verständlich. Überraschend ist dagegen der hohe Glykokollgehalt der Lunge. Vielleicht hat er für die Bildung des Elastins Bedeutung, da dieser Eiweisskörper, aus dem die elastischen Fasern der Lunge bestehen, besonders glykokollreich ist. Interessant ist die bei allen Tierarten vorhandene Differenz zwischen Skelett- und Herzmuskel, auch hierin kommt offenbar die Verschiedenheit des Stoffwechsels der beiden Gewebe zum Ausdruck.

Um zwischen dem Glykokollgehalt der Organe von Carnivoren und Herbivoren vergleichen zu können, wurde der Durchschnitt der in der Tabelle 1 angegebenen Mittelwerte aller untersuchten Organe je einer Tierart für Katze, Kaninchen und Meerschweinchen berechnet. Die Zahlen haben ausschliesslich relative Bedeutung. Die Ratte wurde aus dem Vergleich fortgelassen, da sie omnivor ist und wir früher

(loc. cit.) zeigten, dass dort der Glykokollgehalt der Leber von der Art des Futters abhängt. Ebenso wurde die Taube nicht mitverglichen, da sie einer anderen Tierklasse angehört. Die resultierenden Zahlen sind: Katze 15,1 mg%, Kaninchen 23,8 mg%, Meerschweinchen 50,0 mg%. Es besteht also in unserem Falle ein sehr deutlicher Unterschied zwischen der Katze, die sich vor allem von Eiweiss ernährt, und dem Kaninchen und Meerschweinchen, die sich von Kohlehydraten ernähren; beide Kohlehydrat verwertenden Tierarten besitzen einen höheren Glykokollgehalt ihrer Organe. Dieser Befund stimmt gut zu der Feststellung (loc. cit.), dass das Glykokoll im Tierkörper aus Brenztraubensäure, einem Hauptabbauprodukt des Kohlehydratstoffwechsels, entstehen kann.

Zum Schluss noch eine Bemerkung zur Methodik. Vergleicht man die Zahlen für das menschliche Blut, die *Alexander* (loc. cit.) angab, mit den hier angeführten, so ergibt sich, dass seine Werte durchschnittlich um etwa 30% niedriger sind, als die in Tabelle 2. Meine frühere Angabe, dass bei Anwendung der Glykokollbestimmungsmethode *Alexander's* (loc. cit.) auf das Blutfiltrat ein Fehler von 25—35% zu erwarten sei, wird dadurch bestätigt. Wie am Anfang schon erwähnt, wird diese Bestimmung durch verschiedene andere Aminosäuren gestört. In den Organen ist die Relation Glykokoll/Störende Aminosäuren teilweise günstiger, so dass in manchen Fällen eine Bestimmung des Glykokolls auch ohne vorherige Entfernung der störenden Aminosäuren durch Kohleadsorption möglich ist.

Zusammenfassung.

1. Bei der Ratte, Katze, dem Kaninchen, Meerschweinchen und der Taube wurde das freie Glykokoll in folgenden Organen bestimmt: Blut, Leber, Niere, Milz (ausser bei der Taube), Herz, Lunge, Muskel und Gehirn. Ausserdem wurden Werte für das menschliche Blut angegeben.

2. Bei drei der untersuchten, vergleichbaren Tierarten ist der Glykokollgehalt der Organe von Herviboren erheblich höher, als der von Carnivoren.

Fräulein *N. Karlen* danke ich für ihre Hilfe bei den Versuchen.

Physiol.-chemische Anstalt der Universität Basel.

ABKÜRZUNGEN

ABRÉVIATIONS

ABBREVIAZIONI

A.	Liebig's Annalen der Chemie
Am.	American chemical Journal
Am. Soc.	Journal of the American chemical Society
Anal. chim. acta	Analytica Chimica Acta
Ann. chim.	Annales de chimie
Ann. physique	Annales de physique
Ann. Physik	Annalen der Physik
Arch. Sci. phys. nat.	Archives des Sciences physiques et naturelles
Arch. Pharm.	Archiv der Pharmazie
B.	Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft
Bl.	Bulletin de la Société chimique de France
Biochem. J.	The Biochemical Journal
Bioch. Z.	Biochemische Zeitschrift
C.	Chimisches Zentralblatt
C. r.	Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris
Chim.	Chimia
Exper.	Experientia
Frdl.	Friedländer's Fortschritte der Teerfarbenfabrikation
G.	Gazzetta chimica italiana
Helv.	Helvetica chimica acta
Helv. med. acta	Helvetica medica acta
Helv. phys. acta	Helvetica physica acta
Helv. physiol. pharmacol. acta	Helvetica physiologica et pharmacologica acta
J. Biol. Chem.	Journal of Biological Chemistry
J. Chim. phys.	Journal de chimie physique
J. Org. Chem.	Journal of Organic Chemistry
J. pr.	Journal für praktische Chemie
J. Soc. Chem. Ind.	Journal of the Society of Chemical Industry
Koll. Z.	Kolloid-Zeitschrift
M.	Monatshefte für Chemie
Mikroch.	Mikrochemie vereinigt mit Microchimica Acta
Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.	Mitt. a. d. Gebiete d. Lebensmitteluntersuchung u. Hygiene
Pharm. acta Helv.	Pharmaceutica acta Helvetiae
R.	Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas
Soc.	Journal of the chemical Society of London
Trans. Faraday Soc.	Transactions of the Faraday Society
Z. anal. Ch.	Zeitschrift für analytische Chemie
Z. angew. Ch.	Zeitschrift für angewandte Chemie (Die Chemie)
Z. anorg. Ch.	Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie
Z. El. Ch.	Zeitschrift für Elektrochemie
Z. Kr.	Zeitschrift für Krystallographie
Z. physikal. Ch.	Zeitschrift für physikalische Chemie
Z. physiol. Ch.	Zeitschrift für physiologische Chemie
Ž. obšč. Chim.	Journal de Chimie générale (russe)
Ž. prikl. Chim.	Journal de Chimie appliquée (russe)
Ж	Journal de la Société physico-chimique russe

Die Autoren sind dringend gebeten, bei allen Literaturzitaten anzugeben:

1. Titel der Zeitschrift in obenstehender Abkürzung.
2. Evtl. Serienzahl in eckiger Klammer.
3. Bandzahl unterstrichen.
4. Seitenzahl.
5. Jahreszahl in runder Klammer.

Les auteurs sont instamment priés d'indiquer leurs sources comme suit:

1. titre abrégé du périodique selon liste ci-dessus.
2. numéro éventuel de la série entre crochets.
3. numéro du volume, souligné.
4. page.
5. année, entre parenthèses ordinaires.

Gli autori sono espressamente pregati di fare le citazioni nel seguente modo:

- 1° titolo della rivista secondo abbreviazioni sopra indicati.
- 2° event. numero della serie fra parentesi quadra.
- 3° numero del volume, sottolineato.
- 4° pagina.
- 5° annata in parentesi com.

Zum Beispiel:

Par exemple:

Per esempio:

J. pr. [2] 22, 476 (1880); Bl. [3] 17, 474 (1897).

Neue ordentliche Mitglieder der Schweiz. Chemischen Gesellschaft

I. Chemisches Laboratorium der Universität Wien, Währingerstr. 42. Wien IX, Oesterreich
Dolejs, Dr. Ladislav, Zborovska 18, Praha 16, CSR.
Fisch, Dr. Willy, c/o Ciba Aktiengesellschaft, Basel
Huang-Minlon, Dr., Research Chemist, Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, USA.
Kade, Charles F., c/o McNeil Laboratories, Inc., Philadelphia 32, Pa., USA.
Labler, Ludvik, Ing., Kamenicka ul. 41, Praha VII, CSR.
Max, Dr. Fritz, c/o Ciba States Ltd., 350 Fifth Av., New York, USA.
Neher, Dr. Robert, c/o Ciba Aktiengesellschaft, Basel
Perrotet, Dr. E., 8, rue Gust. Moynier, Genf
Seyhan, Dr. M., Bellerivestrasse 3, Zürich 8
Sieber Peter, Gütliweg 11, Schaffhausen
Taylor, Edward C., Lab. für org. Chemie der ETH., Zürich

Mikroanalysen

Bestimmung von: Kohlenstoff und Wasserstoff - Stickstoff (gasvolumetrisch und massanalytisch) - Halogene - Schwefel - Phosphor - Methoxyl-, Aethoxyl- und Acetylgruppen - Doppelbindungszahl (Mikrohydrierung) - aktiver Wasserstoff (Mikro-Zerewitinoff) - Molekulargewicht (kryoskopische Methode)

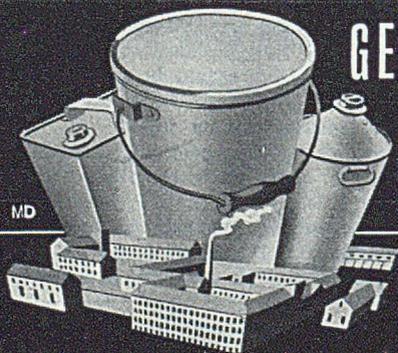
Modernste apparative Ausrüstung - vieljährige Erfahrung

MIKROANALYTISCHES LABORATORIUM BRUGG
(Schweiz)

Stäblistrasse 25

Aug. Peisker-Ritter

Tel. (056) 4 17 01



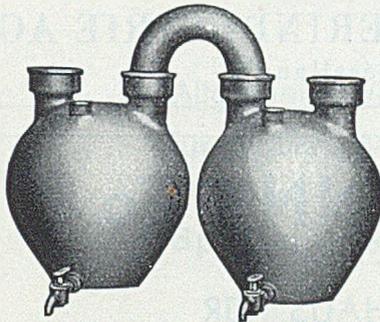
GEBR. HOFFMANN THUN

Tel. 23436 Thun

Blechpackungen in jeder Grösse
und Ausführung — Kartonnagen —
Blechersatz METALLO-Dosen

STEINZEUG EMBRACH

Gefäße, Apparate, Auskleidungen
aus säurefesten, dichten, keramischen Materialien



CHEMISCHES STEINZEUG

für stärkste chemische Beanspruchung bei
Temperaturen bis ca. 40–50° C.

EMBRACHIT

Spezialmasse mit erhöhter Temperaturwechselbeständigkeit, bewährt bis über 100° C.

THERMOSIL

wärmeleitende Spezialmasse mit 3–10facher
Wärmeleitfähigkeit von Porzellan.

STEINZEUGFABRIK EMBRACH AG.

Embrach (Kt. Zürich)

Telefon: 96 23 21

Soeben ist erschienen

Dr. med. RUDOLF ABDERHALDEN, Basel

Grundriß der Allergie

Theorie und Praxis

178 Seiten mit 8 Abbildungen. Leinen Fr. 14.50

Die Zunahme der allergischen Erkrankungen sowie die Entdeckung der Antihistamin-körper haben das Problem der Allergie heute stark in den Vordergrund des Interesses gestellt. Zwar sind in den letzten Jahren bereits eine ganze Anzahl von Büchern, hauptsächlich amerikanischen Ursprungs, über die Allergie erschienen. Wegen ihres großen Umfangs (700 bis 1000 Seiten und mehr) kommen diese Werke jedoch für den praktischen Gebrauch nicht in Frage.

Um so willkommener wird das neue Buch von Rudolf Abderhalden sein, das als erstes deutschsprachiges Werk nach dem Kriege die großen auf dem Gebiet der Allergie erzielten Fortschritte knapp und doch vollständig zusammenfaßt, um allen an diesen Fragen Interessierten eine schnelle Orientierung zu ermöglichen. Besonderer Wert wurde auch auf die Angabe von Literatur gelegt, deren Studium im Bedarfsfall jederzeit ein tieferes Eindringen in die nicht einfache Materie ermöglicht.

In jeder Buchhandlung erhältlich

BENNO SCHWABE & CO · VERLAG · BASEL

Wir liefern

COLLIDIN

für Papierchromatographic nach Consden (Biochem. J. 38, 244—1944)

SCHWEIZERISCHE TEERINDUSTRIE AG.
PRATTELN (Baselland)

WERTHEMANN & Co.

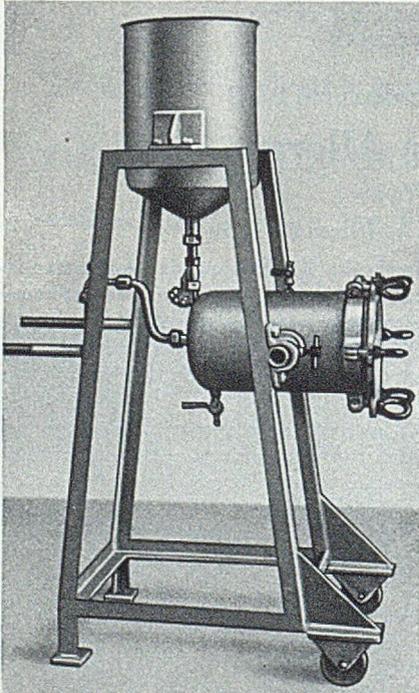
(vorm. Werthemann, Botty & Co.)



SPEZIALHAUS FÜR
LABORATORIUMSBEDARF

BASEL 12

neues Domizil: **MITTLERE STRASSE 190**
neue Telefon-Nummer (061) 208 44



KOEHLER, BOSSHARDT & CIE.

APPARATE UND KESSELBAU
KUPFERSCHMIEDE

BASEL 19

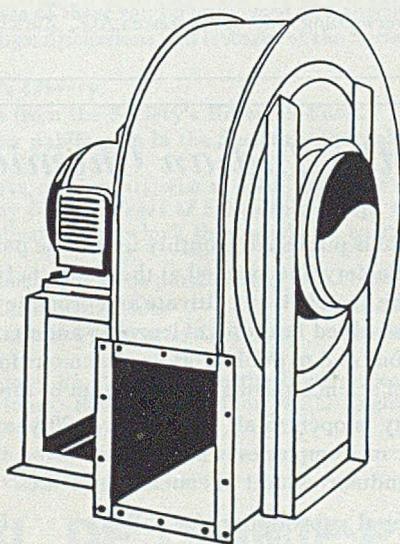
FABRIKATION
VON APPARATEN
FÜR DIE CHEMISCHE UND
PHARMAZEUTISCHE
INDUSTRIE

SPIRALFILTER PAT. KBC

SPEZIAL-VENTILATOREN FÜR DIE CHEMISCHE INDUSTRIE

Allgemeine Ventilationsanlagen
für jegliche Verwendungszwecke

Spezialitäten: Klima-Anlagen
Trockenschränke
Elektrofilteranlagen



VENTILATOR AG, STÄFA

TELEPHON 930136

(ZÜRICH)

CHIMIA

Herausgeber: Schweizerischer Chemiker-Verband, Zürich

Die Fachzeitschrift für den Chemiker

Aktuelle Veröffentlichungen über Forschung und Fortschritte
in Wissenschaft und Technik

Redaktionskommission

Prof. E. Cherbuliez, Dr ès sc.,
Genève

Prof. Dr. W. Feitknecht, Bern

Dr. E. Jaag, Biel

Dr. O. Kaiser, Basel

Dr. A. Küng, Attisholz

G. Malet, Dr ès sc.,

Petit-Lancy (GE)

Prof. Dr. H. Mohler, Zürich

Prof. Dr. H. Pallmann, Zürich

Dr. Ch. Schweizer, Gersau

Dr. E. Stirnemann, Basel

Prof. Dr. A. v. Zeerleder,
Neuhausen

Alle Zuschriften an die Redaktion sind erbeten an den Präsidenten: Prof. Dr. H. Mohler,
Milchbuckstr. 54, Zürich

Abonnementspreis

Fr. 20.— pro Jahr; für Mitglieder Fr. 15.—; Einzelheft Fr. 2.50

Zu beziehen durch den Schweizerischen Chemiker-Verband, Milchbuckstrasse 54, Zürich,
durch die Firma H. R. Sauerländer & Co., Aarau, oder durch den Buchhandel

Anzeigenverwaltung: Mosse-Annoncen AG., Zürich-Basel

Journal of the Indian Chemical Society

Founded in 1924

This Journal is published monthly under the patronage of the Indian Chemical Society and printed at the Calcutta University Press. The object of the Society is to cultivate and promote the cause of chemical science and allied branches of learning and to co-operate with other organisations and to publish original memoirs in chemistry and allied branches of science through the medium of the Society's organ.

The Society is open to all persons over 20 years of age or partnership firms or companies who are interested in or connected with chemical industries and chemical researches.

Annual subscription for Fellows

Rs. 16/-

Annual subscription for non-Fellows

Rs. 18/- (inland)

Rs. 20/- (foreign)

The Journal publishes the majority of research work in both pure and applied chemistry carried out in various laboratories in India. 12 Issues of the Journal are published annually.

Since 1938 the Society publishes a quarterly industrial supplement "Industrial & News Edition", devoted to topics related to Chemical Industries. Annual subs. Rs. 8/-

All communications should be addressed to the Secretary, Indian Chemical Society, 92, Upper Circular Road, (P. O. Box No. 10857) Calcutta (India).

THE CHEMICAL SOCIETY

BURLINGTON HOUSE, LONDON W. 1.

President: Professor C. N. Hinshelwood Sc. D., F. R. S.

The Chemical Society was founded in 1841 in London and Fellowship is open to all men and women who are interested in Chemistry and wish to keep in touch with its advances.

Its chief object is to foster original research in Chemistry and to facilitate the discussion and dissemination of new knowledge in all branches of the Science.

Fellows are elected by Council on the recommendation, from personal knowledge, of not less than three Fellows of the Society, but in the case of a candidate not resident in Great Britain and Northern Ireland who is unable to obtain signatures of three Fellows of the Society, the Council is empowered to accept a form signed from personal knowledge by one Fellow of the Society.

Fellows who have paid the annual subscription of £3.0.0 have the following privileges:

1. To receive any three of the following publications without extra charge
 - (a) Monthly Journal of The Chemical Society
 - (b) British Abstracts AI, General, Physical and Inorganic Chemistry
 - (c) British Abstracts AII, Organic
 - (d) British Abstracts AIII, Physiology and Biochemistry including Anatomy
 - (e) Annual Reports on the Progress of Chemistry
 - (f) Reprints of Lectures, published in the Journal.
2. To attend all meetings, discussions and lectures of the Society and to introduce two guests.
3. To use the Society's Library.
4. To apply for grants from the Society's Research Fund.
5. To submit papers for publication in the Society's Journal.

Fellows under the age of 25 years who so wish may pay the annual subscription of £ 1.10s.0d. and enjoy full privileges of Fellowship except that there is a reduction in the number of publications to which they would be entitled.

Publications of the Society may be purchased by non Fellows at the following rates:

Journal of The Chemical Society	£ 3.15s.0d.	p. a.	post free
Annual Reports on the Progress of Chemistry	15s.0d.		post free

Further particulars may be obtained from the General Secretary of The Chemical Society, Burlington House, Piccadilly, London W. 1, England.

JOURNAL DE CHIMIE-PHYSIQUE

FONDÉ EN 1903

par PH. A. GUYE

Par suite d'une entente entre les Helvetica Chimica Acta et la Société de Chimie-Physique, les abonnés des Helvetica Chimica Acta bénéficient de la réduction suivante sur le prix de l'abonnement:

Frs. frçs. 144. — au lieu de Frs. frçs. 180. —.

Les abonnés désireux de bénéficier de ces conditions particulières, sont priés de joindre le montant de leur abonnement à l'abonnement aux Helvetica Chimica Acta.

Mikroanalysen Med. chem. Analysen

prompte und zuverlässige Ausführung

Gegründet 1930

Mikroanalytisches und
Med. chem. Laboratorium

Dr. R. Dietrich
Zürich 2, Gartenstrasse 14

ARMATURENWERK HANDSCHIN AG. BASEL

TELEPHON (061) 5 32 34

Armaturen für die chemische Industrie

in V. S. M. - Legierungen und Grauguss

Hartblei-Ventile · Jenkins-Ventile · Reiber- und Stopfbüchs-Hahnen etc.
für schweflige Säure · Schieberhahnen · Schlauchhahnen

Reparieren sämtlicher Hahnen und Ventile

ACTA CHEMICA SCANDINAVICA

Published by Chemical Societies in Denmark, Finland, Norway and Sweden

Editorial Committees:

Denmark: J. A. Christiansen (Pres.), N. Bjerrum, S. K. Hagen, K. A. Jensen, A. Langseth, K. Linderstrom-Lang, K. J. Pedersen.

Finland: A. I. Virtanen (Pres.), K. Buch, P. Ekwall, S. Kilpi, N. J. Toivonen, E. Tommila.

Norway: O. Hassel (Pres.), A. Fölling, M. G. Raeder, N. A. Sörensen.

Sweden: K. Myrbäck (Pres.), H. Erdtman, J. A. Hedvall, L. Smith, The Svedberg, H. Theorell, A. Tiselius.

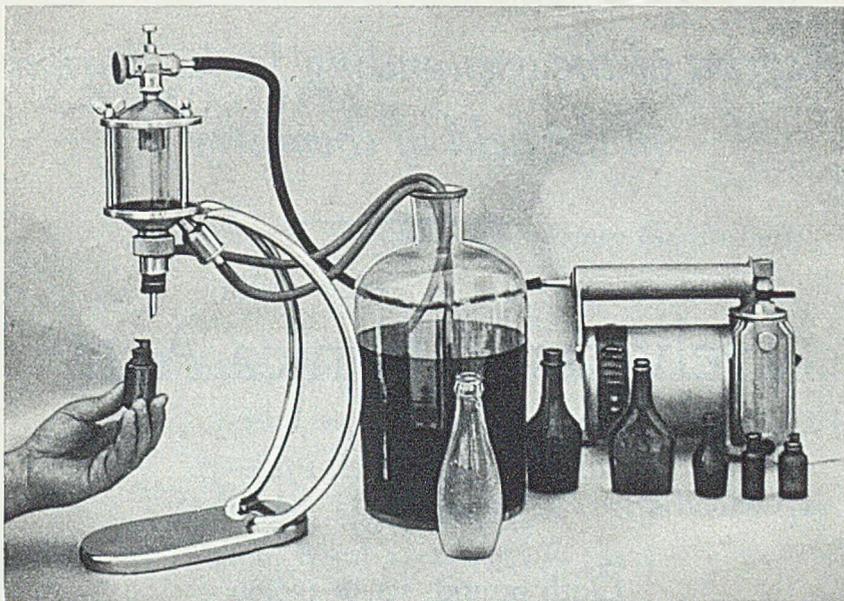
Acta Chemica Scandinavica publishes the majority of scientific work in general, physical, inorganic, organic chemistry and biochemistry carried out in Denmark, Finland, Norway and Sweden. 10 issues are published annually. The yearly volume contains about 1200 pages.

Annual subscription: Scandinavian countries, 30 swedish crowns or the local equivalent. Other countries; \$ 8:50+ postage. Orders should be placed with Einar Munksgaard, Norregade 6, Copenhagen, Denmark, or any bookseller all over the world.

Editor-in-chief: Professor Karl Myrbäck, Biokemiska Institutet, Stockholm 6, Sweden.

Executive secretary: Fil. lic. Håkan Winberg, R 581, Södertälje, Sweden.

Der „VAMPIR“ Vacuum-Abfüller



E. FRIEDERICH & FILS Fabrik für Abfüll-Maschinen **MORGES**

Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas.

Fondé en 1882 par

W. A. van Dorp, A. P. N. Franchimont, S. Hoogewerff,

E. Mulder et A. C. Oudemans

publié par la Société Chimique Néerlandaise.

Le « Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas » n'accepte en général à l'impression que les communications des membres de la Société Chimique Néerlandaise, qui sont en même temps abonnés au Recueil. Pour faire partie de cette Société s'adresser au Secrétariat: Lange Voorhout 5, La Haye.

Le Recueil contient des travaux rédigés en français, anglais ou allemand et paraît autant que possible tous les mois (le 15 de chaque mois), sauf août et septembre, en livraisons de grandeur variable. On s'abonne chez les éditeurs D. B. Centen's Uitgeversmaatschappij, Sarphatikade 12, Amsterdam, et chez tous les librairies des Pays-Bas et de l'étranger. Le prix de l'abonnement est de 25.— florins pour les Pays-Bas et de 26.50 florins pour l'étranger. Les auteurs reçoivent gratis 75 tirés à part de leurs travaux.

Bureau de la Rédaction: Lange Voorhout 5, La Haye.

*Reprint of the outstanding Swiss Journal
in the field of chemistry*

Helvetica Chimica Acta

Volumes 1—14 / Basel, 1918—31
15,264 pages

Cloth bound, set, \$ 350.00

Single volumes, paper bound, \$ 25.00 each

Volumes 15—24 / Basel, 1932—41

Single volumes, paper bound, \$ 25.00 each

To be reprinted with the permission of the Swiss Chemical Society
provided sufficient orders are received

JOHNSON REPRINT CORPORATION

125 East Twenty-Third Street

New York 10, New York

Zu verkaufen

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft,
1880—1926

Beilstein, Organische Chemie, Band I—XIII
inkl. erstes Ergänzungswerk, Band I—VI

Friedländer, Fortschritte der Teerfarbenfabrika-
tion, Band 1—15 (1877—1927)

Chemical Abstracts, 1946—1949

Chemical and Engineering News, 1946—1949

Industrial and Engineering Chemistry inkl.
Analytical Edition, 1946—1949

Chemisches Zentralblatt, komplett, 1940—1949

Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta inkl.
Supplementum I—V

Experientia, 1945—1949

Aktiengesellschaft Verblendsteinfabrik Lausen

Säurefeste Steine und Platten für Auskleidung von Behältern, Rührwerken, Standen. - **Säurefeste Klinker** für Fabrikböden. - **Röhren und Rinnen aus Steinzeug** für Kanalisationen, Kappenabzüge etc. - **Säurefeste Filterplatten** porös und gelocht. - **Chamottesteine und Mörtel** bester Qualität für alle Verwendungszwecke. - **Hochfeuerfeste Steine** aus Abrasit und Carborundum. - **Säure- und feuerfeste Steine**. - **Glasierte Verblendsteine** für Badeanlagen, Toiletten, Fabrikationslokale. - **Füllringe jeder Art und Grösse**.

LEHRBÜCHER UND MONOGRAPHIEN
AUS DEM GEBIETE DER EXAKTEN WISSENSCHAFTEN
Chemische Reihe --- Band IV

Die theoretischen Grundlagen der analytischen Chemie

von GUNNAR HÄGG
Professor der Chemie an der Universität Uppsala

*200 Seiten mit 26 Abbildungen
In Ganzleinenband Fr. 22.-, broschiert Fr. 18.-*

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

VERLAG BIRKHÄUSER · BASEL (SCHWEIZ)

Literatur für den Chemiker

- W. Bladergroen: Physikalische Chemie in Medizin und Biologie**
2. Auflage 1949, 699 Seiten mit 193 Abbildungen, Leinen Fr. 45.—
- F. L. Breusch: Lehrbuch der gesamten Chemie**
1948, 608 Seiten mit 86 Figuren, Leinen Fr. 45.—
- W. Kuhn: Physikalische Chemie**
3. Auflage 1947, 385 Seiten mit 29 Figuren, Leinen Fr. 15.—
- M. Lüthi: Tabellen (mit Logarithmen) für Chemiker und Physiker**
für theoretische und praktische Arbeiten. 1948, 237 Seiten, handliches Taschenbuch
mit Griffregister in biegsamem Kunstledereinband Fr. 18.—
- H. Staudinger: Makromolekulare Chemie und Biologie**
1947, 168 Seiten mit 16 Tabellen und 34 Abbildungen im Text und auf 16 Kunst-
drucktafeln, Leinen Fr. 18.—

WEPF & CO. Verlag, Eisengasse 5 **BASEL**

Einige Produkte aus unserem Fabrikationsprogramm:

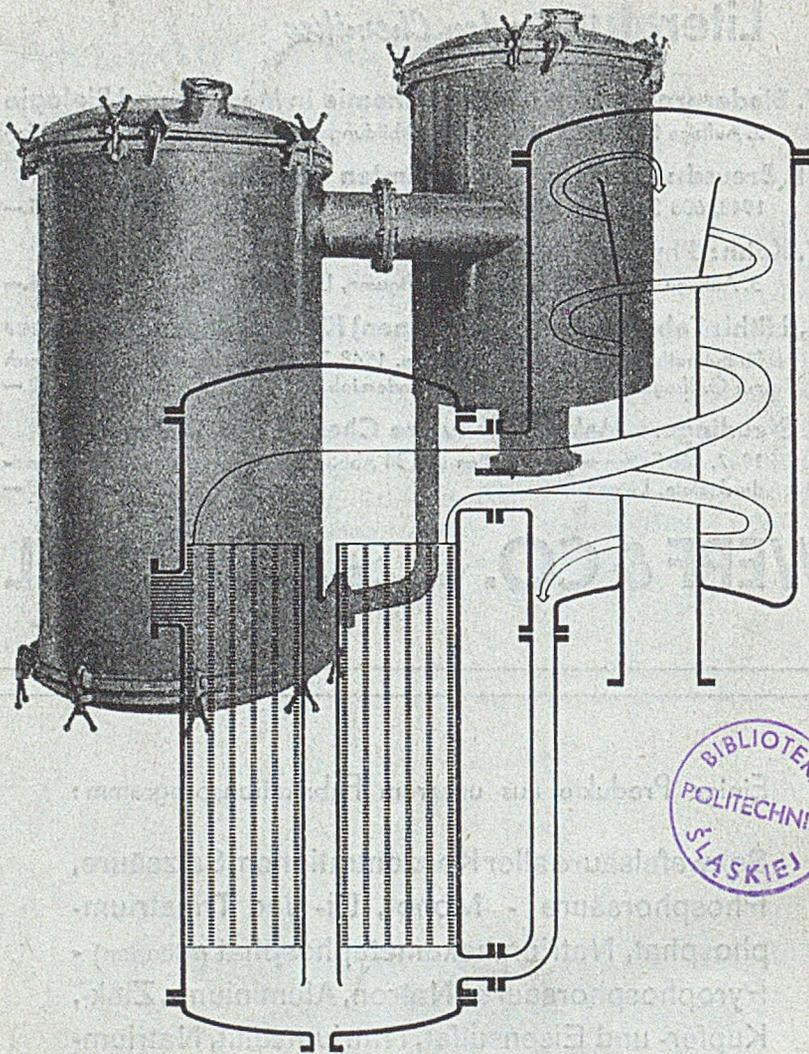
Schwefelsäure aller Konzentrationen, Salzsäure,
Phosphorsäure - Mono-, Di- und Trinatrium-
phosphat, Natriumhexametaphosphat (Alcoxon) -
Pyrophosphorsaures Natron, Aluminium-, Zink-,
Kupfer- und Eisensulfat, Natriumsulfit, Natrium-
bisulfit, Silicagel, das neuzeitliche Trockenmittel

CHEMISCHE FABRIK UETIKON

Gegründet 1818



Tel. (051) 92 93 01



BIBLIOTEKA
POLITECHNIKI
SLASKIEJ

SULZER Schnellumlauf-Eindampfanlagen

aus rostfreien und anderen Stählen, für kontinuierlichen oder Chargen-Betrieb, mehrstufig oder mit Wärmepumpe (Turbo- oder Dampfstrahl-Verdichter) arbeitend.

GEBRÜDER SULZER, AKTIENGESELLSCHAFT, WINTERTHUR (SCHWEIZ)