



JUSTUS LIEBIGS  
ANNALEN  
DER CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON  
HEINRICH WIELAND  
ADOLF WINDAUS · RICHARD KUHN

BAND 574 · HEFT 1

VERLAG CHEMIE · GMBH · WEINHEIM / BERGSTR.

# Inhalt

Feodor Lynen, Ernestine Reichert und Luistraud Rueff, Zum biologischen Abbau der Essigsäure VI. „Aktivierte Essigsäure“, ihre Isolierung aus Hefe und ihre chemische Natur. (Mit 5 Figuren im Text)	1
Feodor Lynen, Quantitative Bestimmung von Acyl-mercaptanen mittels der Nitroprussid-Reaktion. (Mit 2 Figuren im Text)	33
Karl Freudenberg und Klaus v. Oertzen, Synthese der 3- und der 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose	37
Wilhelm Treibs, Hans-Martin Barchet, Günther Bach und Werner Kirchhof, Über bi- und polycyclische Azulene. IX. Mitteilung: Versuche zur Darstellung bi- und tricyclischer Azaazulene. (Mit 3 Figuren im Text)	54
Wilhelm Treibs, Über bi- und polycyclische Azulene. X. Mitteilung: Über ein tetraacyclisches Azulen aus Tetrahydrofluoranthren. (Mit 2 Figuren im Text)	60
Siegfried Beckmann und Roland Bamberger, Über innermolekulare Umlagerungen in der Bicyclo-[1,2,2]-heptan-Reihe I. Die Einwirkung von salpetriger Säure auf Camphenylamin	65
Siegfried Beckmann und Roland Bamberger, Über innermolekulare Umlagerungen in der Bicyclo-[1,2,2]-heptan-Reihe II. Das trans-2,3-Dimethyl-bicyclo-[1,2,2]-hepten-(5) und dessen Hydratisierung	76

---

## Für die Herren Mitarbeiter zur Beachtung

Eine wissenschaftliche Zeitschrift kann bei gleichen Herstellungskosten ihren Lesern um so mehr bringen, je knapper die einzelnen Beiträge in der Abfassung gehalten sind. Kürze der Darstellung ist dem Verständnis förderlicher als ungehemmte Weitschweifigkeit. Auf lange historische Einleitungen, wiederholte Beschreibung schon geschilderter Operationen, auf die liebevolle Charakterisierung an sich nebensächlicher Substanzen aus parallelen Reihen sollte verzichtet werden. Hier ist gedrängte Zusammenfassung im Lapidarstil am Platze.

Die Redaktion behält sich vor, Manuskripte, die den angedeuteten Grundsätzen entgegenlaufen, dem Autor zur Kürzung zurückzusenden.

Abhandlungen, deren Inhalt, wenn auch nur teilweise, schon an anderer Stelle veröffentlicht worden ist oder veröffentlicht werden soll, werden nicht aufgenommen.

Es wird besonders gebeten, die Korrekturen rasch zu erledigen. Nur dann ist das schnelle Erscheinen der Abhandlungen gewährleistet. Verzögerte Korrekturen führen zur Zurückstellung des betr. Beitrages.

Zusammengesetzte Namen sollen der Übersichtlichkeith wegen schon im Manuskript unter Anwendung von Trennungsstrichen wiedergegeben werden, z. B. Methyl-naphthyl-eton, nicht „Methylnaphthylketon“.

Formeln, die wiederkehren, werden zweckmäßig mit römischen Ziffern nummeriert, die einen einfachen Hinweis gestatten.

Bei der Wiedergabe der Analysen ist im allgemeinen von der Anführung der Bolegzahlen Abstand zu nehmen.

Zitate von Zeitschriften werden nach dem jetzt allgemein eingeführten Brauch abgekürzt.

Die Redaktion

---

Liebige Annalen erscheinen in Bänden zu je drei Heften. Die Redaktion besorgt Prof. Heinrich Wieland, (13b) Starnberg, Obb., Schießstättstraße 12. 50 Sonderabzüge werden den Verfassern kostenlos geliefert.

Abonnementspreis je Band DM 18.— zuzügl. Versandkosten. — Einzelheft DM 6.50. — Gerichtsstand und Erfüllungsort Weinheim/Bergstr. — Lieferung erfolgt auf Rechnung und Gefahr des Empfängers.

Copyright 1951 by Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/Bergstr. — Printed in Germany. — Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung, vorbehalten. — Photomechanische Wiedergabe nur mit ausdrücklicher Genehmigung des Verlages.



5



# JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE

574. Band

Mitteilungen aus dem chemischen Laboratorium  
der Universität München, Biochemische Abteilung

## Zum biologischen Abbau der Essigsäure VI.<sup>1)</sup>

„Aktivierte Essigsäure“, ihre Isolierung aus Hefe und ihre  
chemische Natur<sup>2)</sup>

Von *Feodor Lynen*, *Ernestine Reichert*<sup>3)</sup> und *Luistraud Rueff*

Mit 5 Figuren im Text

(Eingelaufen am 26. Juli 1951)

Die Essigsäure ist einer der einfachen Bausteine, aus denen die Zelle die Vielfalt ihrer organischen Substanz aufzubauen vermag. Sie genügt vielen Mikroorganismen, wie z. B. Hefen und Schimmelpilzen, als einzige Kohlenstoffquelle für gutes Wachstum und sie steht auch im höheren Organismus, dessen synthetische Leistungen, verglichen mit denen dieser Einzeller zwar schon beeinträchtigt sind, noch im Zentrum des intermediären Stoffwechsels. Dies könnte nicht eindrucksvoller bewiesen werden, als durch die vielen Versuche mit isotop markierter Essigsäure, in denen man die auf diese Weise zugeführten Deuterium- oder isotopen Kohlenstoff-Atome im Glykogen<sup>4)</sup>, in den verschiedenen Fettsäuren<sup>5)</sup>, in den Aminosäuren der Proteine<sup>6)</sup>, aber auch im Cholesterin<sup>5, 7)</sup>, in den Purinen<sup>8)</sup> und im Porphyrin des Blutfarbstoffes<sup>9)</sup> fand.

Umgekehrt leitet aber die Essigsäure, im Zuge des aeroben Abbaus aus komplizierteren organischen Molekeln entstanden, dann auch ihre vollständige Verbrennung zu Kohlendioxyd im Citronensäure-Cyclus ein<sup>10)</sup>. Dort ist eine Aldolkondensation mit Oxalacetat die Schlüsselreaktion.

<sup>1)</sup> V. Mitteilung: F. Lynen und H. Scherer, *A.* **560**, 163 (1948).

<sup>2)</sup> Vorläufige Mitteilung: F. Lynen und E. Reichert, *Ang. Ch.* **63**, 47 (1951).

<sup>3)</sup> Diplomarbeit, München 1950.

<sup>4)</sup> V. Lorber, N. Lifson und H. G. Wood, *Jl. Biol. Chem.* **161**, 411 (1945).

<sup>5)</sup> D. Rittenberg und K. Bloch, *Jl. Biol. Chem.* **160**, 417 (1945).

<sup>6)</sup> D. Rittenberg und K. Bloch, *Jl. Biol. Chem.* **157**, 749 (1945).

<sup>7)</sup> H. N. Little und K. Bloch, *Jl. Biol. Chem.* **183**, 33 (1950).

<sup>8)</sup> J. M. Buchanan, J. C. Sonne und A. M. Delluva, *Jl. Biol. Chem.* **173**, 69, 81 (1948).

<sup>9)</sup> K. Bloch und D. Rittenberg, *Jl. Biol. Chem.* **159**, 45 (1945); N. S. Radin, D. Rittenberg und D. Shemin, *Jl. Biol. Chem.* **184**, 755 (1950).

<sup>10)</sup> Vgl. C. Martius und F. Lynen, *Adv. Enzym* **10**, 167 (1950).



Wir wissen heute, daß bei dieser Kondensationsreaktion ebenso wie bei den meisten — wahrscheinlich sogar allen — andersartigen Umsetzungen von Acetat, wie etwa der Acetylierung von Cholin und Sulfonamiden, oder dem Aufbau von Acetessigsäure und höheren  $\beta$ -Ketosauren, nicht die freie Säure bzw. ihr Salz, sondern ein Derivat bisher unbekannter Konstitution<sup>10)</sup> beteiligt ist, das in unserem Laboratorium als „aktivierte Essigsäure“ bezeichnet wurde.

Die Existenz dieser „aktivierten Essigsäure“ war von uns<sup>11)</sup> bei Versuchen mit Hefe in Erwägung gezogen worden, um zu erklären, warum eine durch 15- bis 20-stündiges Schütteln unter Sauerstoff an oxydierbaren Substraten verarmte Hefe zugesetztes Acetat nicht sofort, sondern erst nach Ablauf eines längeren Zeitraums, einer „Induktionszeit“, umzusetzen imstande ist. Diese Induktionszeit läßt sich nämlich durch minimale Mengen eines dehydrierbaren Alkohols, Aldehyds oder Glucose sehr stark verkürzen, unter Umständen sogar vollständig zum Verschwinden bringen, ein Befund, der mit der Annahme einer mit dem Oxydationsvorgang gekoppelten „Aktivierung“ der Essigsäure, d. h. ihrer Vereinigung mit einem Rest R<sup>12)</sup>, eine plausible Deutung fand.

Was die chemische Natur der „aktivierten Essigsäure“ betrifft, so dachte man zunächst an ein energiereiches Anhydrid zwischen Essigsäure und Phosphorsäure<sup>13, 14)</sup> und wurde in dieser Annahme bestärkt durch den Befund F. Lipmanns<sup>14)</sup>, daß in Bakterien aus Brenztraubensäure durch Dehydrierung oder durch „phosphoroklastische“ Spaltung Acetylphosphat entsteht und nach E. R. Stadtman und H. A. Barker<sup>15)</sup> auch die Dehydrierung von Acetaldehyd oder die Spaltung der Acetessigsäure zu dieser Verbindung führt.

Im schroffen Gegensatz dazu standen aber Versuche an Hefe<sup>16)</sup> und an tierischen Geweben<sup>17, 18)</sup>. Dort waren alle Bemühungen, eine für „aktivierte Essigsäure“ charakteristische Umsetzung — wie etwa die zu Citronensäure führende Kondensation mit Oxalacetat — unter Einsatz von Acetylphosphat zu erreichen, ergebnislos. Acetylphosphorsäure, deren kristallisiertes Silbersalz im Zusammenhang mit den Versuchen an Hefe F. Lynen<sup>19)</sup> erstmals präparativ dar-

<sup>11)</sup> F. Lynen, A. **552**, 270 (1942).

<sup>12)</sup> Vgl. auch F. Lynen, A. **554**, 40 (1943).

<sup>13)</sup> F. Lynen, A. **546**, 120 (1941).

<sup>14)</sup> Adv. Enzym. **6**, 231 (1946).

<sup>15)</sup> Jl. Biol. Chem. **174**, 1039 (1946).

<sup>16)</sup> F. Lynen und N. Neciullah, unveröffentl. Versuche; vgl. N. Neciullah, Dissertation, München 1941.

<sup>17)</sup> C. Martius, H. **279**, 96 (1943).

<sup>18)</sup> F. E. Hunter und L. F. Leloir, Jl. Biol. Chem. **159**, 295 (1945).

<sup>19)</sup> B. **73**, 367 (1940).

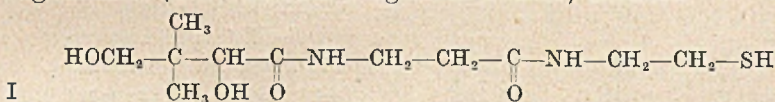


stellte, konnte demnach mit „aktivierter Essigsäure“ nicht identisch sein.

Andererseits ließ sich aber im rohen Organextrakt „aktivierte Essigsäure“ durch ein Gemisch aus Acetat und Adenosin-triphosphat (ATP) ersetzen, wie D. Nachmansohn und A. L. Machado<sup>20)</sup> beim Studium der Acetylierung von Cholin entdeckten und später F. Lipmann<sup>21)</sup> hinsichtlich der Acetylierung von Sulfonamid durch einen fermenthaltigen Extrakt aus Taubenleber bestätigten konnte.

Der Widerspruch, der sich dadurch ergab, daß ATP ja nur als Phosphatdonator für Essigsäure dienen konnte, synthetisches Acetylphosphat aber wirkungslos war, wurde erst beseitigt, als sowohl Nachmansohn<sup>22)</sup> als auch Lipmann<sup>21, 23)</sup> erkannten, daß in ihren rohen Fermentlösungen ein besonderes Coferment enthalten und die Acetylierung an die Gegenwart dieses *Coenzym A* (CoA) gebunden war. Erst die Kombination ATP, Acetat und CoA verhält sich im biologischen System wie „aktivierte Essigsäure“. Nach Ergänzung mit den spezifischen Fermenten werden nicht nur Cholin und Sulfonamid acetyliert, sondern auch Acetessigsäure<sup>24)</sup> aufgebaut und Oxalessigsäure in Citronensäure<sup>25, 26)</sup> übergeführt.

Was den chemischen Aufbau des in der belebten Natur weit verbreiteten CoA betrifft, so haben Untersuchungen der Arbeitskreise um F. Lipmann<sup>27-29)</sup> und E. E. Snell<sup>30)</sup> ergeben, daß es sich dabei um ein Dinucleotid vom Typus der Cozymase handelt, das an Stelle des Pyridin-ribosids *Pantethein* (I), einen aus Pantothen-säure und Thio-äthanolamin aufgebauten Wuchsstoff für Mikroorganismen (*Lactobacillus bulgaricus*-Faktor) enthält.



Die Verknüpfung mit Phosphorsäure und darüber mit dem Adenylsäurerest des Coferments dürfte über eine der beiden OH-Gruppen des Pantothen-säureteils gehen.

<sup>20)</sup> J. Neurophysiol. **6**, 397 (1943).

<sup>21)</sup> Jl. Biol. Chem. **160**, 173 (1945).

<sup>22)</sup> D. Nachmansohn und M. Berman, Jl. Biol. Chem. **165**, 551 (1946).

<sup>23)</sup> F. Lipmann und N. O. Kaplan, Jl. Biol. Chem. **162**, 743 (1946).

<sup>24)</sup> M. Soodak und F. Lipmann, Jl. Biol. Chem. **175**, 999 (1948).

<sup>25)</sup> J. R. Stern und S. Ochoa, Jl. Biol. Chem. **179**, 491 (1949).

<sup>26)</sup> G. D. Novelli und F. Lipmann, Jl. Biol. Chem. **182**, 213 (1950).

<sup>27)</sup> F. Lipmann, N. O. Kaplan, G. D. Novelli, L. C. Tuttle und B. M. Guirard, Jl. Biol. Chem. **186**, 235 (1950).

<sup>28)</sup> W. H. De Fries, W. M. Govier, J. S. Evans, J. D. Gregory, G. D. Novelli, M. Soodak und F. Lipmann, Am. Soc. **72**, 4838 (1950).

<sup>29)</sup> G. D. Novelli, N. O. Kaplan und F. Lipmann, Fed. Proc. **9**, 209 (1950).

<sup>30)</sup> G. M. Brown, J. A. Craig und E. E. Snell, Arch. Bioch. **27**, 473 (1950); E. E. Snell, G. M. Brown, V. J. Peters, J. A. Craig, E. L. Wittle, J. A. Moore, V. M. McGlohon und C. D. Bird, Am. Soc. **72**, 5349 (1950).



## I. Induktionszeit und Coenzym A

Als wir nach langer, durch die schwierigen Zeitumstände bedingter Unterbrechung das Problem der „aktivierten Essigsäure“ wieder aufgreifen konnten, knüpften wir an unsere frühere Untersuchung<sup>11)</sup> über die den Acetat-Abbau durch verarmte Hefe begleitende „Induktionszeit“ an. Im Hinblick auf die Unentbehrlichkeit von CoA bei der Bildung von „aktivierter Essigsäure“ erschien es uns nämlich angebracht, diese Induktionszeit mit dem Coenzym in Verbindung zu bringen, zumal G. D. Novelli und F. Lipmann<sup>26)</sup> vor kurzem zeigen konnten, daß Hefezellen, die in einer an Pantothenensäure armen Nährlösung gezüchtet wurden und infolgedessen mit 150 CoA-Einheiten/Gramm Hefe (trocken) nur wenig Coferment enthalten, die Fähigkeit zur Acetat-Oxydation weitgehend eingebüßt haben.

Unsere Vermutung bestätigte sich. Mit Hilfe der einfachen, von N. O. Kaplan und F. Lipmann<sup>31)</sup> ausgearbeiteten Bestimmungsmethode für CoA ließ sich zeigen, daß tatsächlich in verarmter Hefe mit im Mittel 116 CoA-Einheiten/Gramm Hefe etwa 25% weniger Coferment enthalten sind als in frischer Hefe, für welche 156 CoA-Einheiten/Gramm gefunden wurden (Tab. 1).

Tab. 1. CoA-Gehalt frischer und verarmter Bäckerhefe

Versuch	CoA-Einh./g Hefe (trock.)		Bemerkungen
	frisch	verarmt	
1	192	—	besonders frische Hefe
2	152	—	dieselbe Hefe nach Lagerung
3	140	108	6 Stunden bei 30° verarmt
4	128	104	24 Stunden bei 30° verarmt
5	192	144	24 Stunden bei 31° verarmt
6	136	104	24 Stunden bei 30° verarmt
Mittelwert	156	116	

Nach Zugabe von Acetat kommt es bei frischer Hefe beinahe sofort, bei verarmter dagegen erst ganz allmählich zu einer kräftigen Atmung. Gleichzeitig damit nimmt der CoA-Gehalt beträchtlich zu und erreicht im Zustand maximalen Sauerstoffverbrauchs Werte von 320—360 CoA-Einheiten/g Hefe. Verfolgt man in einem solchen Versuch die CoA-Neubildung in zeitlicher Abhängigkeit, so erkennt man (Fig. 1), daß bei frischer Hefe bereits 15 Minuten nach Zugabe des Acetats das Maximum erreicht ist, während der CoA-Gehalt der verarmten Hefe nach  $2\frac{1}{2}$  Stunden noch deutlich darunterliegt. Zu diesem Zeitpunkt ist aber, und das gibt uns den Schlüssel zum Ver-

<sup>31)</sup> Jl. Biol. Chem. 174, 37 (1948).



ständnis des ganzen Vorgangs, auch die Atmungsgröße noch unterhalb des Maximums. Es entscheidet also in unsern Versuchen nicht nur der CoA-Gehalt über die Geschwindigkeit der Acetatverbrennung — eine Beziehung, die Novelli und Lipmann<sup>26</sup>) bereits entdeckt haben —, sondern umgekehrt auch die Geschwindigkeit der Acetatverbrennung, d. h. aber die Atmungsgröße, über den CoA-Gehalt.

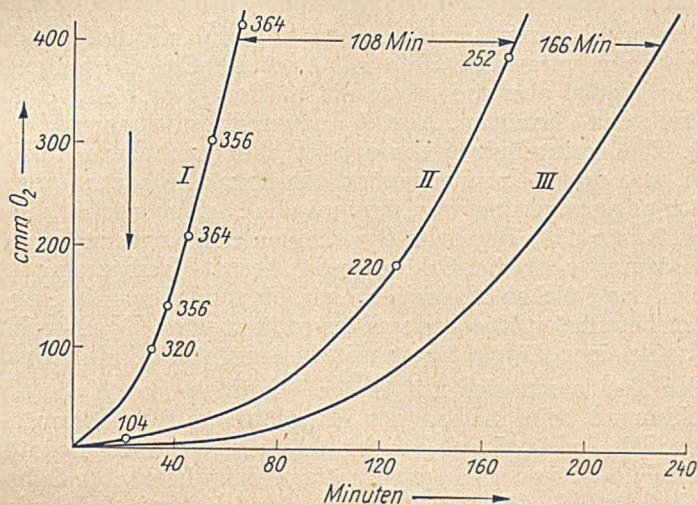
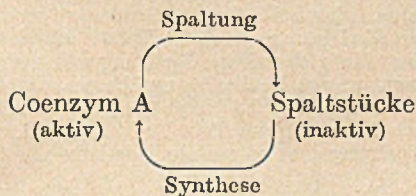


Fig. 1. CoA-Gehalt frischer und verarmter Hefe während der Oxydation von Essigsäure

Je 40 mg Bäckerhefe frisch (I) bzw. 24 Stunden verarmt (II, III) in 2 cm m/30-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. 20 Minuten nach Versuchsbeginn (↓) 1 cm m/20-Na-acetat eingekippt. T = 30°. Bei III war die Suspensionsflüssigkeit nach der Verarmung der Hefe durch frisches Wasser ersetzt worden.

Die Zahlen an den Kurven geben den CoA-Gehalt in Einheiten/g Hefe (trocken) zu den mit o markierten Zeiten an.

Zur Erklärung der zwischen Atmungsgröße und CoA-Gehalt bestehenden Beziehung müssen wir von der Annahme ausgehen, daß CoA in der lebenden Zelle im „dynamischen Gleichgewicht“ mit seinen inaktiven Spaltstücken steht.





In diesem cyclischen Prozeß geht die Spaltung des Coferments als hydrolytischer Vorgang unter allen Umständen vorstatten, während die Wiedervereinigung der Spaltstücke, wie jede Synthese in der Zelle, an die energieliefernden Dissimilationsprozesse — höchstwahrscheinlich mit ATP als Bindeglied — gekettet ist. Das muß zur Folge haben, daß Hefezellen, deren Atmung durch den Prozeß des „Verarmens“ auf einen sehr kleinen Wert gefallen ist, vornehmlich die Spaltstücke neben wenig intaktem CoA enthalten.

Wie unsere Bestimmungen ergaben, macht der Anteil der aktiven Verbindung in verarmter Hefe mit etwa 100 CoA-Einheiten/g nur mehr ein Viertel aus und ist damit so klein geworden, daß solch einer Hefe das Vermögen, Acetat anzugreifen, beinahe vollständig abgeht. Ein geringfügiger Umsatz ist aber auch dann noch vorhanden, und dieser Umsatz genügt, um über eine kaum wahrnehmbare Atmungssteigerung das „dynamische Gleichgewicht“ um einen kleinen Betrag nach der Seite des aktiven CoA zu verschieben. Die Folge davon ist aber eine Erhöhung des Acetat-Umsatzes und damit kann sich das Spiel so oft wiederholen, bis schließlich die Kapazität eines der beteiligten Enzyme voll ausgenutzt wird. Das Ergebnis ist die Kinetik einer Autokatalyse mit ausgeprägter „Induktionszeit“.

In der Tat lassen sich mit dieser Vorstellung auch die übrigen Erscheinungen beim Abbau der Essigsäure durch verarmte Hefe erklären: Die Abhängigkeit der Induktionszeit von der Leeratmung der Hefe<sup>11)</sup> oder von geringen Zusätzen dehydrierbarer Substrate, wie Äthylalkohol, Glucose, höherer Alkohole und Aldehyde<sup>32, 11)</sup>. Deren Oxydation ist nämlich im Gegensatz zu jener der Essigsäure in diesem Bereich vom CoA-Gehalt unabhängig, weshalb sie auch bei verarmter Hefe sofort kräftig einsetzen kann. Die Folge ist eine beschleunigte Resynthese von CoA und im Zusammenhang damit die Einbeziehung zugesetzter Essigsäure in den Atmungsvorgang.

Aus dem gleichen Grund setzt auch bei frischer Hefe, die auf Grund reichlicher Stoffreserven eine beträchtliche endogene Atmung zeigt, die Acetat-Oxydation sofort ein. Wenn in Tab. 1 eine Überlegenheit der frischen Hefe über die verarmte Hefe nicht recht zum Ausdruck kommt, so trägt unsere Versuchsmethodik die Schuld. Wir kochten nämlich in den betreffenden Versuchen zur CoA-Bestimmung an frischer Hefe die frisch bereitete wäßrige Suspension käuflicher Bäckerhefe, die günstigstenfalls einen Tag alt (seit der Ernte in der Fabrik), meist aber älter war, ohne weitere Vorbehandlung auf und ermittelten auf diese Weise den Gehalt der „ruhenden“ Hefe. Wurde dagegen die Hefesuspension vor dem Erhitzen 15 Minuten lang bei 30° unter Sauerstoff geschüttelt, dann fanden wir wesentlich höhere Aktivitäten als die in Tab. 1 verzeichneten. Der niedrige CoA-Gehalt „ruhender“ Hefe ist auf eine Spaltung während des Lagerens zurückzuführen. Damit stimmt unsere Beobachtung überein, daß frisch gekaufte Hefe mehr CoA enthält als dieselbe Hefe nach längerem Aufbewahren im Kühlschrank (vgl. Versuch 1 und 2 aus Tab. 1). Beim Schütteln der Hefe unter Sauerstoff wird die Spaltung des Coferments jedoch wieder rückgängig gemacht.

<sup>32)</sup> H. Wieland, O. Probst und M. Crawford, A. 536, 55 (1938).



Im Zusammenhang mit der Frage nach den Wegen der Spaltung und Resynthese von CoA in der Hefe wäre die Kenntnis der chemischen Natur jener beim Verarmungsprozeß gebildeten Spaltstücke von Interesse. Darüber können wir vorerst noch keine sichere Aussage machen. Weil wir aber beobachteten, daß die Induktionszeit bei verarmter Hefe merklich verlängert wird, wenn man das Wasser, in welchem die Zellen während des Verarmungsprozesses suspendiert waren, durch frisches Wasser ersetzt (Fig. 1, Kurve III), möchten wir vermuten, daß auch leicht permeable, phosphatfreie Spaltstücke wie Pantethin, Pantothenensäure oder gar  $\beta$ -Alanin darunter sind.

Nummehr auf die ebenfalls in unseren Versuchen zutage tretende Beziehung zwischen CoA-Gehalt und Acetat-Umsatz übergehend, ist zunächst auf den überraschenden Befund hinzuweisen, daß verarmte Hefe immer noch recht beträchtliche Mengen CoA enthält, aber trotzdem Acetat gegenüber nahezu wirkungslos ist. Erst oberhalb eines Schwellenwertes, der in recht guter Übereinstimmung mit den Angaben von Novelli und Lipmann in unseren Versuchen bei etwa 100 CoA-Einheiten/g Hefe lag, wird Essigsäure mit merklicher Geschwindigkeit angegriffen. Eine Erklärung dieses Befundes werden wir später (S. 23) geben.

Indem sich anschließenden Bereich zwischen 100 und 400 Einheiten tritt

jedoch eine direkte Abhängigkeit zwischen CoA-Gehalt und Geschwindigkeit der Acetatverbrennung in Erscheinung (Fig. 2). Da aber die Oxydationsgeschwindigkeit eigentlich nur von der Konzentration der „aktivierten Essigsäure“ ab-

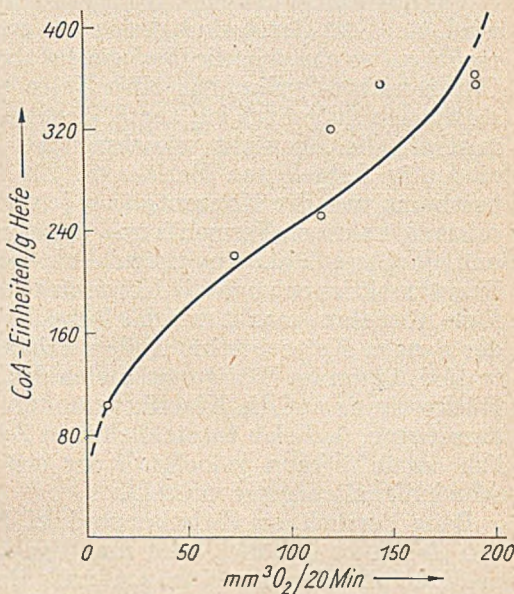


Fig. 2. Atmungsgröße und CoA-Gehalt. Die hier aufgetragenen Punkte entsprechen den Meßpunkten von Fig. 1. CoA-Einheiten direkt übertragen, die dazugehörige Atmungsgröße aus der Neigung der Tangente an Kurve I bzw. II im betreffenden Punkt ermittelt.

Daß zwei Punkte aus der Reihe fallen, ist auf einen Mangel in der Methodik zurückzuführen; tatsächlich gehörten die beiden Punkte weiter nach rechts und lägen dann auch auf der Kurve (vgl. Versuchsteil).



hängen kann, jenes Derivats der Essigsäure, das über eine Kondensation mit Oxalessigsäure die Verbrennung im Citronensäure-Cyclus einleitet, so findet die Beziehung zum CoA-Gehalt ihre einfachste Erklärung in der Annahme, daß „aktivierte Essigsäure“ eine Verbindung aus Essigsäure und CoA ist. Den Beweis dafür erbringen wir in den nächsten Abschnitten.

## II. Isolierung der „aktivierten Essigsäure“ aus Hefe

Für den Fall, daß kein Zwischenprodukt kontinuierlich angehäuft wird, steht die Geschwindigkeit einer zusammengesetzten Fermentreaktion, welche, wie die biologische Oxydation der Essigsäure im Citronensäure-Cyclus, aus einer Kette einander folgender Primärreaktionen aufgebaut ist, zur Konzentration jedes an einem dynamischen Gleichgewicht teilnehmenden Zwischenprodukts in einer eindeutig festgelegten Beziehung. Sie ist in komplizierter Weise bestimmt von der Konzentration jenes das Zwischenprodukt umsetzenden aktiven Ferments und von dessen Michaelis-Konstante und Wechsel-Zahl. Zu diesen Faktoren kommt bei reversiblen Primärreaktionen noch die Konzentration des Folgeprodukts hinzu. Eine Ausnahme macht nur das Substrat jener, die Geschwindigkeit der ganzen Kette bestimmenden Primärreaktion, dessen Konzentration, schon im Sättigungsbereich des Enzyms liegend, sich ohne Rückwirkung auf die Kinetik verändern kann. Unter unserer Voraussetzung, daß sich tatsächlich kein Zwischenprodukt kontinuierlich anhäuft, kann jedoch nur der erste Schritt in der Kette geschwindigkeitsbegrenzend sein.

Beim Versuch, ein Zwischenprodukt des Stoffwechsels aus lebenden Zellen zu isolieren, wird man den soeben dargelegten Gesetzmäßigkeiten Rechnung tragen und Bedingungen wählen, unter denen das Zwischenprodukt in maximaler Menge vorliegt. Abgesehen von einer Veränderung der äußeren Bedingungen, wie  $p_H$  oder Temperatur, deren Einfluß wegen der Rückwirkung auf Michaelis-Konstante und Wechsel-Zahl in den seltensten Fällen zu übersehen ist, gibt es nur einen Weg, dieses Ziel zu erreichen: Man muß dafür sorgen, daß die Gesamtreaktion mit möglichst großer Geschwindigkeit abläuft.

Als wir daher die Versuche zur Isolierung von „aktivierter Essigsäure“ aus atmenden Hefezellen in Angriff nahmen, machten wir uns diese Überlegungen zunutze und wählten für die Vorbehandlung der Hefe im Interesse eines hohen CoA-Gehaltes und im Zusammenhang damit einer kräftigen Oxydation im Citronensäure-Cyclus Äthylalkohol oder Zucker als Substrat. Wie aus dem ersten Abschnitt unserer Untersuchung hervorgeht, bringt die Verwendung dieser Substrate den großen Vorteil mit sich, daß bei ihnen der Abbau

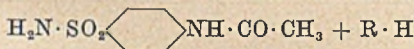
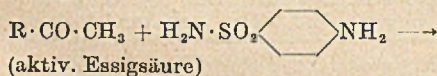


intermediär auftretender Essigsäure ohne Induktionszeit, von Anfang an mit großer Geschwindigkeit in Gang kommt.

Das nächste Problem betraf die Auswahl einer für das Aufschließen der Hefezellen und die Extraktion der „aktivierten Essigsäure“ geeigneten Methode. Wir entschlossen uns für das einfachste Verfahren, die Bereitung eines Kochsafts.

Im Gegensatz zu Vorstellungen, die man sich bisher über die Stabilitätseigenschaften der „aktivierten Essigsäure“ gemacht hatte, waren wir zu der Überzeugung gekommen, daß es sich hierbei um einen verhältnismäßig beständigen Körper handeln müsse. Andernfalls wäre nämlich nicht zu verstehen, daß lebende Zellen sich dieser Verbindung als Baustein bei den verschiedensten Synthesen bedienen können, was freien Transport dieses Bausteins vom Ort seiner Entstehung nach den verschiedensten Punkten der Zelle und damit eine gewisse Anreicherung in der Zelle erfordert. Unter diesen Umständen liefe es dem ökonomischen Prinzip des Lebens, das man gerade beim Studium der Stoffwechselvorgänge immer wieder gewahrt findet, zuwider, handelte es sich bei der „aktivierten Essigsäure“ um einen labilen Körper mit kleiner Halbwertszeit, etwa ein Acylphosphat.

Ein wesentliches Erfordernis, um die aktive Substanz aus dem Hefekochsaft isolieren zu können, war eine quantitative Bestimmungsmethode. Zu diesem Zweck bedienten wir uns der enzymatischen Acetylierung von Sulfanilamid, bei welchem Vorgang nach F. Lipmann „aktivierte Essigsäure“ die Acetylgruppe liefert.



Als Enzym diente eine Proteinfraction aus Taubenleber, die beim Versetzen eines mit Natriumbicarbonatlösung erhaltenen Extrakts aus Trockenpulver mit Aceton zwischen 40 und 60% ausfällt<sup>33)</sup>, zur quantitativen Sulfanilamid-Bestimmung die kolorimetrische Methode von A. C. Bratton und E. K. Marshall<sup>34)</sup>.

Wie Fig. 3 zeigt, ist innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs, der allein für eine quantitative Bestimmung in Frage kommt, das Ausmaß der Acetylierung von Sulfanilamid direkt proportional der Menge zugesetzter „aktivierter Essig-

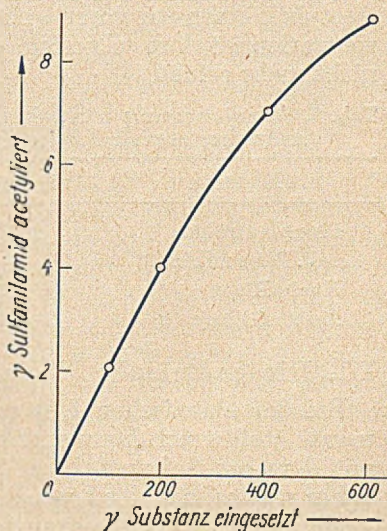


Fig. 3. Enzymatischer Test auf „aktivierte Essigsäure“

<sup>33)</sup> T. C. Chou, G. D. Novelli, E. R. Stadtman und F. Lipmann, Fed. Proc. 9, 160 (1950).

<sup>34)</sup> Jl. Biol. Chem. 128, 537 (1939).



säure“. Bei weiterem Zusatz wird schließlich ein Maximum erreicht, das nur von Menge und Aktivität des eingesetzten Enzyms abhängt, weil in diesem Bereich das Enzym während der gesamten Inkubationszeit mit „aktivierter Essigsäure“ gesättigt ist.

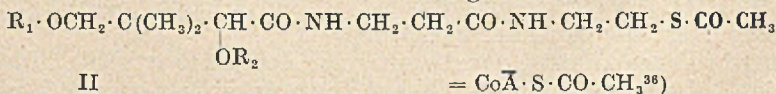
Mit Hilfe dieser Testmethode war es uns möglich, eine Anreicherung der aktiven Substanz aus Hefekochsaft durchzuführen. Sie erfolgte im wesentlichen unter Benützung der eleganten Methoden zur Isolierung nucleotidartiger Cofermente, wie sie im Laboratorium O. Warburgs<sup>35)</sup> entwickelt worden sind. Unsere Reinigungsoperation bestand aus: Extraktion der wirksamen Substanz mit Phenol aus dem mit Ammonsulfat versetzten Kochsaft, Ausfällung der in wäßrigem Alkohol unlöslichen Bariumsalze, Zerlegung mit Schwefelsäure, Adsorption an Aktivkohle, Elution mit 10-proc. Pyridin und Acetonfällung und führte schließlich zu einem Präparat, dessen Gehalt an aktivem Acetyl zwischen 1–5,5  $\gamma$   $\text{CH}_3\text{CO}/$  1 mg Substanz lag. Über Anreicherung und Ausbeute in den einzelnen Stufen, wie sie bei einer Aufarbeitung von Hefekochsaft mittels dieses Verfahrens erzielt wurden, gibt Tab. 2 Auskunft. Nur über die Menge des im rohen Hefekochsaft vorliegenden aktiven Acetyls können wir vorerst noch keine Angabe machen. Seine Konzentration ist dort so gering, daß unsere Bestimmungsmethode sie nicht mehr erfaßt.

Tab. 2. Anreicherung von „aktivierter Essigsäure“ aus Hefekochsaft  
Ausgangsmaterial: 2,25 kg Hefe, in zuckerhalt. Lösg. vorbehandelt

Fraktion	mg Subst.	$\gamma$ akt. $\text{CH}_3\text{CO}$	$\gamma$ $\text{CH}_3\text{CO}/$ mg Subst.
Phenolextrakt	20 500	1900	0,093
zerl. Bariumsalz	—	1300	—
Kohle-Eluat	355	750	2,1
Acetonfällung	188	550	2,9

### III. Die chemische Natur der „aktivierten Essigsäure“

Bei der chemischen Untersuchung unserer angereicherten Präparate stellte sich heraus, daß der wirksame Bestandteil identisch mit dem am Schwefel acetylierten Coenzym A ist. Wir sind daher nunmehr in der Lage, die allgemeine Bezeichnung „aktivierte Essigsäure“ durch das exaktere „Acetyl-CoA“ zu ersetzen und die Konstitution durch Formel II wiederzugeben.



<sup>35)</sup> O. Warburg, Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin 1948.

<sup>36)</sup> Das Symbol  $\text{Co}\bar{\text{A}}$  soll den Rest des Coenzym A ohne SH-Gruppe bezeichnen.  
Also:  $\text{Co}\bar{\text{A}} - \text{SH} = \text{CoA}$ .



Wir müssen uns vorerst noch auf eine Teilformel beschränken, weil die an den beiden OH-Gruppen des Pantetheins gebundenen Reste  $R_1$  und  $R_2$  noch nicht definitiv festgelegt sind (vgl. S. 3). Für die chemischen und physiologischen Eigenschaften des Acetyl-CoA ist aber in erster Linie die S-Acetyl-Gruppierung maßgebend, was wir durch das Symbol  $\text{Co}\bar{\text{A}}\text{-S-CO-CH}_3$ <sup>36)</sup> zum Ausdruck bringen wollen.

Den ersten Hinweis auf das Vorliegen eines Acyl-mercaptans, mit welcher Bezeichnung wir aus naheliegenden Gründen die sonst als Thioisäure-ester geführte Körperklasse belegen wollen, bekamen wir beim Studium einer Farbreaktion, die unser Präparat mit Nitroprussid-natrium gibt. Dieses Reagens liefert bekanntlich mit  $\text{H}_2\text{S}$  und ebenso mit freien Mercaptanen in alkalischer Lösung momentan eine intensive Rotfärbung, die aber ausbleibt, wenn man das Mercaptan vorher durch Oxydation, etwa durch Behandlung mit Jod in saurer Lösung, zum Disulfid oxydiert hat. Acylmercaptane geben demgegenüber eine „verzögerte“ Nitroprussid-Reaktion. Beim Versetzen mit der Reagenslösung und verdünntem Ammoniak ist im ersten Augenblick überhaupt keine Färbung zu erkennen, sie tritt aber dann ganz allmählich, nach Maßgabe der durch das Alkali erfolgenden Verseifung zum freien Mercaptan, in Erscheinung. An dieser Farbreaktion ändert sich selbstverständlich nichts, wenn das Acylmercaptan vorher mit Jod behandelt worden war, weil ja in diesem Fall die SH-Gruppe durch Acetylierung geschützt ist.

Unser angereichertes Präparat aus Hefe gibt nun in ganz typischer Weise eine verzögerte Nitroprussid-Reaktion. Um sie einwandfrei wahrzunehmen, ist es jedoch nötig, die das Acylmercaptan im rohen Kochsaft und auch noch in späteren Stufen begleitenden freien Mercaptane — in erster Linie wohl SH-Glutathion — zu oxydieren. Wir schalteten aus diesem Grunde in den Gang der Aufarbeitung regelmäßig solch eine Oxydation ein, indem wir den rohen Hefekochsaft, der eine kräftige Nitroprussid-Reaktion zeigte, mit soviel einer alkoholischen Jodlösung versetzten, bis die Farbreaktion verschwand<sup>37)</sup>.

Eine direkte Beziehung zwischen der verzögerten Nitroprussid-Reaktion und der aktiven Komponente war von vornherein dadurch gegeben, daß die im Acetylierungstest gemessene Aktivität eines Präparats und die Intensität der Farbreaktion einander parallel gingen, eine Beobachtung, die uns bei der Ausarbeitung des Isolierungsverfahrens von größtem Wert war. Um die Identität von „aktivierter Essigsäure“ mit dem Acetyl-mercaptan zu sichern,

<sup>37)</sup> Die im Hefekochsaft vorhandene Menge des Acylmercaptans ist zu gering, um eine wahrnehmbare Farbreaktion zu geben. Erst nach entsprechender Anreicherung ist eine Färbung zu erkennen.



war es aber notwendig, die Beziehung zwischen „acetylierender“ und „Farbreaktion gebender“ Komponente auch noch in quantitativer Hinsicht zu unterbauen. Zu diesem Zweck bestimmten wir die Konzentration einer Lösung an erster aus dem Sulfanilamid-Verbrauch und setzten sie in Beziehung zum Gehalt an Acyl-Schwefel, wie er sich durch Farbvergleich mit Lösungen, die abgestufte Mengen eines synthetisch bereiteten Acetyl-mercaptans

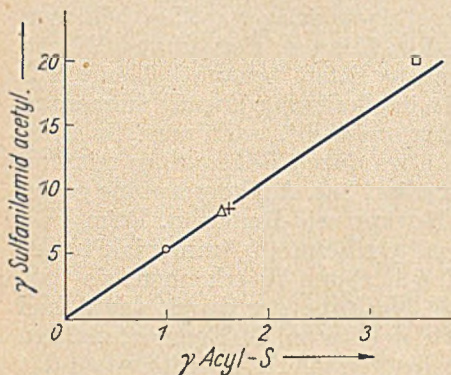


Fig. 4. Acetyl-Donator und Acyl-mercaptan

- zerlegtes Bariumsalz,
- + Elution der Aktivkohle,
- △, □ versch. Trockenpräparate (nach Acetonfällung)

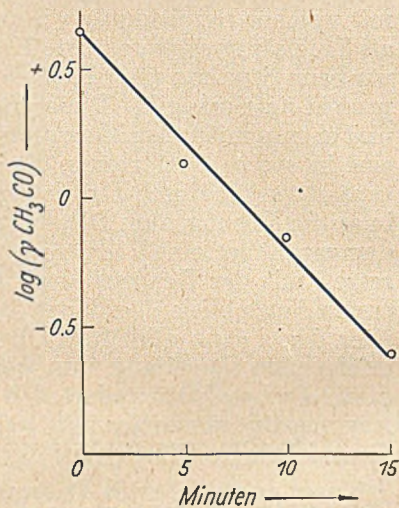


Fig. 5.  
Inaktivierung durch Lauge

enthielten, ergab<sup>38)</sup>. Das Ergebnis ist in Fig. 4 zu sehen. Die Meßpunkte, die bei der Auswertung von vier, aus verschiedenen Stufen der Aufarbeitung von Hefekochsaft stammenden Lösungen erhalten wurden, kommen tatsächlich recht genau auf die erwartete Gerade zu liegen, welche durch die Beziehung:  $172\gamma$  Sulfanilamid/ $32\gamma$  Acyl-S festgelegt ist.

In bester Übereinstimmung mit dieser, allein aus dem Studium der Farbreaktion abgeleiteten Zuordnung der „aktivierten Essigsäure“ zur Klasse der Acyl-mercaptane, stehen die chemischen Eigenschaften unserer Substanz. Hier wäre die Beobachtung zu erwähnen, daß die Fähigkeit zur Acetylierung beim Inkubieren der Substanz im alkalischen Medium sehr rasch verlorenght. Die Inaktivierung in  $n/6$ -Kalilauge wurde bei  $0^\circ$  quantitativ verfolgt und dabei eine Halbwertszeit von 210 Sekunden gefunden (Fig. 5).

<sup>38)</sup> F. Lynen, A. 574, 33 (1951).



Die sich hier abzeichnende Abspaltung des aktiven Acetyls im alkalischen Gebiet ist andererseits ja auch Anlaß für die verzögerte Nitroprussid-Reaktion.

Im Gegensatz dazu sind Acetyl-mercaptane, wie in unserem Laboratorium an einer größeren Zahl von Modellsubstanzen geprüft wurde, gegen Säuren relativ beständig. Es war daher auch nicht weiter überraschend, daß unser Präparat eine 24-stündige Aufbewahrung in  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$  ohne merkliche Inaktivierung überstand.

Eine weitere, wesentlich charakteristischere Eigenschaft der Acyl-mercaptane als die soeben besprochene Alkalilabilität ist ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber Quecksilber. Wie G. Sachs<sup>39)</sup> gefunden hat, zerfällt Essigsäure-thioläthylester (= Acetyl-mercaptoäthan) beim Versetzen mit einer Lösung von Quecksilberacetat momentan unter Abspaltung von Essigsäure und Abscheidung des Quecksilbersalzes des Äthyl-mercaptans. Dieser Spaltung unterliegen alle Acyl-mercaptane, die wir daraufhin prüften, und, was uns hier in erster Linie interessiert, auch „aktivierte Essigsäure“. Versetzt man nämlich eine Lösung unserer Substanz bei schwach saurer Reaktion mit Quecksilberacetat, dann fällt sofort ein unlösliches Quecksilbersalz aus. Nach Einleiten von  $\text{H}_2\text{S}$  zur Entfernung des Quecksilbers erhält man eine Lösung, die, wie die Nitroprussid-Reaktion zeigt, zwar wieder freie SH-Gruppen, dafür aber kein Acyl-mercaptan mehr enthält und die, im Sulfanilamid-Test geprüft, sich als vollständig inaktiv erweist.

Da es nach alledem als bewiesen gelten konnte, daß „aktivierte Essigsäure“ ein Acetyl-mercaptan ist, fehlte zur Aufstellung der Konstitutionsformel nur noch die Identifizierung der Mercaptan-Komponente. Dafür war der Weg vorgezeichnet, denn aus verschiedenen Gründen, nicht zuletzt auch auf Grund unserer im ersten Abschnitt dieser Abhandlung besprochenen Versuche über die „Induktionszeit“, konnte kaum ein Zweifel bestehen, daß es sich dabei um das schwefelhaltige Coenzym A handelt.

Unser endgültiger Identitätsbeweis ging von der Überlegung aus, daß die Aktivität von CoA beim Kaplan-Lipmann-Test<sup>31)</sup>, der Acetylierung von Sulfanilamid mittels Acetat und ATP, an die Unversehrtheit der SH-Gruppe gebunden ist (vgl. auch S. 21). Dann mußte sich aber CoA wie das Coferment der Glyoxalase, das SH-Glutathion, verhalten und durch Alkylierung mittels Jodessigsäure seine Wirksamkeit verlieren — ein Inaktivierungsvorgang, der von F. Dickens<sup>40)</sup> eingehend studiert worden ist.

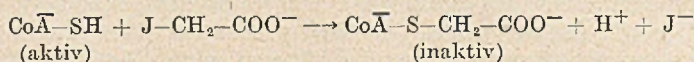
Das Experiment gab uns recht. Die Inkubation eines über das Quecksilbersalz isolierten CoA-Präparates (Reinheitsgrad 0,25) mit

<sup>39)</sup> B. 54, 1849 (1921).

<sup>40)</sup> Bioch. J. 27, 1141 (1933).



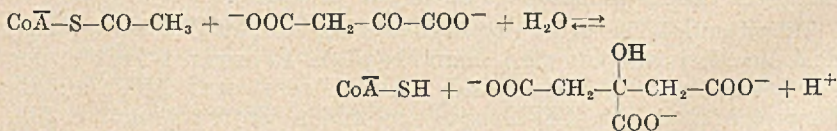
Jodacetat führte zu einem im CoA-Test von Kaplan und Lipmann praktisch inaktiven Präparat, sofern durch vorhergehende Reduktion mit Natriumamalgam das gesamte Coferment in die SH-Form übergeführt worden war.



Als wir denselben Versuch aber mit einem Präparat von „aktivierter Essigsäure“ ausführten, blieb unter genau gleichen Bedingungen die Hälfte der Aktivität erhalten. Das ist auf den Umstand zurückzuführen, daß nunmehr ein Teil des Coferments als S-Acetylverbindung vorliegt und damit die SH-Gruppe dem Zugriff des Jodacetats entzogen ist. Nur jener Anteil, der als Disulfid vorliegt, liefert beim Reduzieren das gegen Jodessigsäure empfindliche SH-Coferment; er machte hier etwa die Hälfte des vorhandenen CoA aus.

Damit ist aber endgültig bewiesen, daß jenes Acyl-mercaptan, das sich in unserem Präparat durch die Farbreaktion zu erkennen gibt und das identisch mit „aktivierter Essigsäure“ ist, nur Acetyl-CoA sein kann. Und es ist auch zu verstehen, warum bei einem CoA-Präparat, das über das Quecksilbersalz gereinigt wurde, die Inaktivierung durch Jodacetat eine vollständige ist. Wir haben ja bereits oben erfahren, daß durch  $\text{Hg}^{++}$  die S-Acetyl-Bindung gelöst wird.

Die Identität unseres Präparates mit „aktivierter Essigsäure“, die wir aus seinem Vermögen, in enzymatischer Reaktion Sulfanilamid zu acylieren, ableiten konnten, ließ sich neuerdings auch noch auf andere Weise belegen. J. R. Stern und S. Ochoa<sup>41)</sup> prüften unser Präparat unter Verwendung ihres kristallisierten, die Citronensäure-Synthese katalysierenden „condensing enzyme“<sup>42)</sup> und fanden, daß beim Inkubieren zusammen mit Oxalacetat die erwartete Menge Citrat gebildet wird.



Nachdem nunmehr die Konstitution der „aktivierten Essigsäure“ als Acetyl-CoA festgelegt ist, können wir auch eine Angabe über den *Reinheitsgrad* unserer Präparate machen. Aus dem von G. D. Novelli, R. M. Flynn und F. Lipmann<sup>43)</sup> angegebenen Molekular-

<sup>41)</sup> Persönliche Mitteilung.

<sup>42)</sup> Nature, **166**, 403 (1950).

<sup>43)</sup> Jl. Biol. Chem. **177**, 493 (1949).

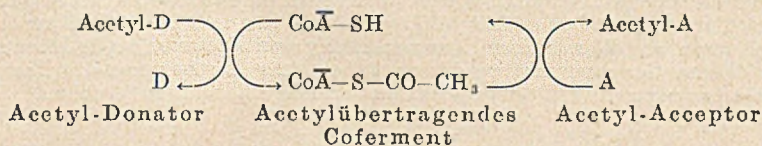


gewicht von etwa 800 für das Coferment — für ein Dinucleotid aus Adenosin, Pantethin, 2 Phosphorsäuren und Essigsäure würde sich 729 ergeben — berechnet sich für reines Acetyl-CoA ein Gehalt von  $54 \gamma \text{ CH}_3\text{CO/mg}$  Substanz. Unsere rohen Präparate dürften demnach 2–10% Acetyl-CoA enthalten<sup>44)</sup>.

Ein zweiter Bestandteil ist freies CoA, das als Disulfid vorliegt und bei manchen Präparaten bis zu 25% ausmachen kann. Seine Gegenwart hatte sich bei der Umsetzung mit Jodacetat offenbart, im übrigen aber auch schon bei der Bestimmung des CoA-Gehaltes nach Kaplan und Lipmann, wobei wir wesentlich höhere Werte fanden, als auf Grund des unabhängig davon gemessenen Acetyl-CoA-Gehaltes zu erwarten war.

#### IV. Diskussion

Die Identifizierung von „aktivierter Essigsäure“ mit  $\text{CoA-S-CO-CH}_3$  bringt eine Fülle neuartiger Erkenntnisse mit sich, deren bedeutungsvollste wir im folgenden besprechen wollen. Zunächst einmal ist damit eine Funktion des Coenzym A in der Zelle als *Co-Transacetylase* eindeutig festgelegt, ein Ergebnis, zu welchem auch die Arbeitskreise um F. Lipmann<sup>33, 45)</sup> und um S. Ochoa<sup>46)</sup> bei ihren Untersuchungen gekommen sind. Über diese Erkenntnis aber hinausgehend, können wir nunmehr auch die dem Vorgang der Transacetylierung zugrunde liegende chemische Reaktion angeben: es ist die reversible Bindung des Acetylrests an der die Wirkungsgruppe des Coferments darstellenden SH-Gruppe. Unter Mitwirkung spezifischer Proteine, der Apo-Fermente, kann auf diese Weise die Acetylgruppe von einem Donator (z. B. Acetylphosphat, Brenztraubensäure, Acetessigsäure, Citronensäure) auf einen Acceptor (z. B. Sulfanilamid, Cholin, Oxalessigsäure) übertragen werden.



Damit tritt das *acetylübertragende* Coenzym A in direkte Parallele zum wasserstoffübertragenden und zum phosphatübertragenden Coenzym, und es ist zu erwarten, daß sich die Acetylübertragung

<sup>44)</sup> In der Zwischenzeit ist es in Zusammenarbeit mit Prof. Theodor Wieland, Universität Mainz, möglich gewesen, durch weitere Fraktionierung unserer Präparate den Acetyl-CoA-gehalt auf 40% zu steigern und dabei das freie CoA vollständig abzutrennen.

<sup>45)</sup> Fed. Proc. 9, 233 (1950).

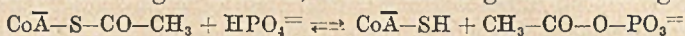
<sup>46)</sup> S. Ochoa, Physiol. Rev. 31, 56 (1951).



hinsichtlich des ihr zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus und der Reaktionskinetik dem allgemeinen Schema der Fermente mit dissoziierendem Coferment<sup>35)</sup> einfügen lassen wird.

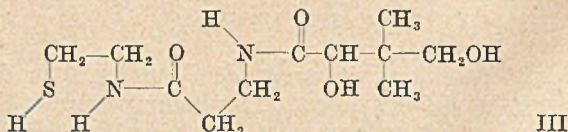
Die Grundlage einer Übertragung der Acetylgruppe ist genau so wie bei der Wasserstoff- bzw. der Phosphatübertragung die Erhaltung der Bindungsenergie. Wenn nämlich die Acetylgruppe von einem Acetyl-Donator, wie z. B. Acetylphosphat, auf CoA in reversibler Weise übertragen werden kann — was E. R. Stadtman<sup>45)</sup> einwandfrei bewiesen hat — so ist daraus zu folgern, daß die Energie der Bindung von Acetyl an die SH-Gruppe von CoA von gleicher Größenordnung ist wie jene an Phosphorsäure<sup>47)</sup>.

Damit kommen wir in erster Näherung zu einer Aussage über die freie Energie der Acetyl-S-CoA-Bindung. Sie dürfte in der Größenordnung von etwa 10 Kcal/Mol liegen, weil andernfalls Acetylphosphat, dessen Bindungsenergie nach Angaben Lipmanns<sup>14)</sup> 16 Kcal/Mol ausmacht, auf Kosten der Acetyl-mercaptan-Bindung praktisch nicht aufgebaut werden könnte. Genaueres wird man aber erst sagen können, wenn die Lage des Gleichgewichts



exakt gemessen ist.

Wenn man die quantitativen Messungen von E. M. Faber und E. E. Reid<sup>16)</sup> am System Essigsäure-Alkylmercaptan damit vergleicht, dann ist man über den hohen Energiebetrag der Acetyl-S-CoA-Bindung erstaunt. Die amerikanischen Autoren fanden nämlich bei Gleichgewichtsmessungen unter Einsatz von Äthylmercaptan 13% Thiolester bei 200° und vergleichsweise mit Essigsäure und Äthylalkohol 66,6% O-Ester bei 154°. Man würde daraus schließen, daß der Energiegehalt der S-Acetyl-Bindung nicht viel größer sein könnte als jener der O-Acetyl-Bindung. Doch ist zu bedenken, daß diese Messungen bei hohen Temperaturen ausgeführt wurden und eine Übertragung auf physiologische Verhältnisse nicht unbedingt erlaubt sein muß, und daß außerdem die Bindungsverhältnisse bei einer komplizierten Molekel wie CoA andere sein werden wie bei dem einfach gebauten Äthylmercaptan. Wenn man die Formel des Pantothins nämlich nur etwas anders schreibt (III), dann zeichnen sich bereits Mesomeriemöglichkeiten ab, die in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein können. Unter diesem Gesichtspunkt wird man daher einer Bestimmung der Dissoziationskonstanten der SH-Gruppe des CoA besondere Beachtung schenken.



In der Acetyl-S-Bindung der „aktivierten Essigsäure“ liegt somit ein neuer Typus einer in der Natur vorkommenden „energie-

<sup>47)</sup> Entsprechendes gilt selbstverständlich auch für alle anderen Transacetylierungsvorgänge, sofern sie reversibel verlaufen.

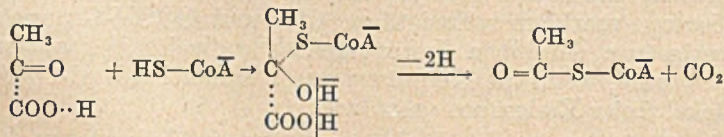
<sup>48)</sup> Am. Soc. 39, 1930 (1917).



reichen“ Bindung vor, der den energiereichen Phosphaten, insbesondere den Acylphosphaten, an die Seite gestellt werden kann. Der chemischen Natur nach handelt es sich in beiden Fällen um Säureanhydride, wobei als Partner der Carboxylgruppe schwache Säuren wie  $\text{HPO}_4^-$  oder das ungiftige Derivat des Schwefelwasserstoffs,  $\text{Co}\bar{\text{A}}\text{-SH}$ , dienen. Wir sehen darin keinen Zufall und möchten glauben, daß es einen besonderen Grund hat, wenn die Wahl der Natur gerade auf diese schwachen Säuren fiel.

Daß sich die Zelle beim Aufbau der „aktivierten Essigsäure“ nicht der Phosphorsäure — wie man so lange Zeit vermutete —, sondern des Mercaptans bedient, bietet für sie ökonomisch gesehen einen gewaltigen Vorteil, weil unter physiologischen  $\text{pH}$ - und Temperaturbedingungen Acylmercaptane absolut beständig sind, während Acylphosphate bereits einer Hydrolyse anheimfallen. Deshalb kann die Zelle zwar im Falle der 1,3-Diphosphor-glycerinsäure, deren Konzentration im Leben außerordentlich niedrig ist<sup>49)</sup>, mit Phosphorsäure auskommen, nicht aber im Falle der „aktivierten Essigsäure“. Wie wir bereits oben (Seite 9) begründet haben, muß dieser bei so vielen Synthesen Verwendung findende Baustein in der Zelle eine relativ hohe Konzentration erreichen, so daß dann bei der Verwendung eines labilen Acylphosphats dessen spontaner Zerfall schon ins Gewicht fiel.

Die Analogie zwischen Acylmercaptan und Acylphosphat besteht noch in einem zweiten Punkt. So wie 1,3-Diphosphor-glycerinsäure durch enzymatische Dehydrierung eines Addukts von  $\text{HPO}_4^-$  an die Carbonylgruppe des 3-Phosphor-glycerinaldehyds entsteht<sup>50)</sup>, so kann anscheinend auch die  $\text{S-CO-CH}_3$ -Gruppierung vom Acetyl-CoA direkt durch Dehydrierung aufgebaut werden. Hier ist als Vorstufe ein ganz analog gebautes Additionsprodukt vom SH-Coferment an die Carbonylgruppe der Brenztraubensäure, oder — was wahrscheinlicher ist — an ein mit Acetaldehyd verwandtes Folgeprodukt, das unter der Wirkung von Cocarboxylase gebildet wird, in Betracht zu ziehen.



Die Fähigkeit der Carbonylgruppe, auch im wäßrigen Medium Mercaptane zu addieren, ist eine altbekannte Tatsache. Sie wurde in neuerer Zeit durch M. P. Schubert<sup>51)</sup> eingehend studiert.

<sup>49)</sup> Vgl. Th. Bücher, *Biochim. et Biophys. Acta* **1**, 292 (1947); H. Holzer, *A.* **564**, 234 (1949).

<sup>50)</sup> O. Warburg und W. Christian, *Bio. Z.* **303**, 40 (1939).

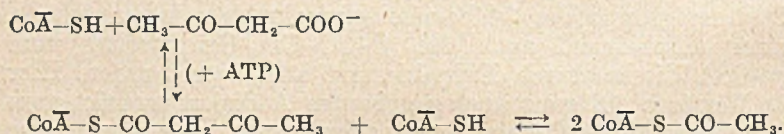
<sup>51)</sup> *Jl. Biol. Chem.* **111**, 671 (1935); **114**, 341 (1936).



Die direkte Dehydrierung von Pyruvat zu „aktivierter Essigsäure“ ist von C. Martius<sup>52)</sup> bei Versuchen über die Citronensäure-Synthese im Herzmuskel entdeckt und neuerdings von S. Korkes, J. R. Stern, I. G. Gunsalus und S. Ochoa<sup>53)</sup> bei Experimenten am Fermentsystem von *Bacterium coli* und *Streptococcus faecalis* experimentell sichergestellt worden. Wenn auch noch manches bei dieser Reaktion ungeklärt ist, so dürfte doch prinzipiell die direkte Bildung der „aktivierten Essigsäure“ durch ihre Identifizierung mit  $\text{Co}\bar{\text{A}}\text{-S-CO-CH}_3$  eine chemisch plausible Erklärung gefunden haben.

Eine Variante des Pyruvatumsatzes in gewissen Bakterien ist eine „hydroklastische“ Spaltung in Essigsäure und Ameisensäure. Da auch hierbei zunächst Acetyl-CoA entsteht<sup>54)</sup>, handelt es sich in Wirklichkeit um eine „thioklastische“ Spaltung, wobei wiederum eine Addition von  $\text{Co}\bar{\text{A}}\text{-SH}$  an die Carbonylgruppe den Vorgang einleiten dürfte. Acetylphosphat, dessen Vorkommen unter den Reaktionsprodukten dem primären Vorgang irrtümlicherweise die Bezeichnung „phosphoroklastische“ Spaltung einbrachte<sup>14)</sup>, entsteht tatsächlich erst sekundär aus Acetyl-CoA.

Ebenfalls eine „thioklastische“ Spaltung liegt nun vor allem aber der für den intermediären Fettstoffwechsel so bedeutsamen „Säurespaltung“ der Acetessigsäure und höheren  $\beta$ -Ketosäuren zugrunde. Am Beispiel der Acetessigsäure formuliert, lautet die Reaktionsgleichung folgendermaßen:



Wir kommen zu dieser Formulierung, weil allein sie erklären kann, daß:

1. Acetessigsäure aus Acetyl-CoA entsteht<sup>24)</sup> und bei Versuchen mit isotope markierter Essigsäure CO- und COOH-Gruppe der Acetessigsäure denselben Isotopengehalt aufweisen<sup>33)</sup>, was nicht möglich wäre, wenn die Ketosäure aus 1 Molekel Acetyl-CoA und 1 Molekel freier Essigsäure entstünde.

2. Acetessigsäure nicht direkt in Acetyl-CoA übergehen kann, sondern dazu ebenso wie Essigsäure der Mitwirkung von ATP bedarf<sup>25)</sup>. In beiden Fällen dient ATP für die Verknüpfung der Säure mit CoA (vgl. S. 22/23).

<sup>52)</sup> H. 279, 96 (1943).

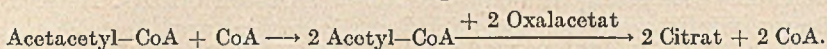
<sup>53)</sup> Nature, 166, 439 (1950).

<sup>54)</sup> H. Chantrenne und F. Lipmann, JI. Biol. Chem. 187, 757 (1951).



Die biologische Synthese von Acetessigsäure tritt demnach in völlige Analogie zur chemisch-präparativen Methode der Claisen-Kondensation. Im Zusammenhang mit dieser Feststellung verdienen Versuche von R. B. Baker und E. E. Reid<sup>55)</sup> Beachtung, in welchen die Claisen-Kondensation, ausgehend von Äthyl-acetat und Äthyl-thioacetat, vergleichend studiert und dabei die schwefelhaltige Verbindung als reaktionsfähiger erkannt wurde. Ein neues Beispiel für die alte Erfahrung, daß die Zelle keinen prinzipiell andersartigen Weg einschlägt als der präparativ arbeitende Chemiker.

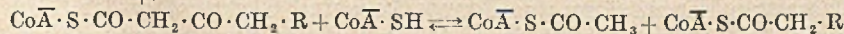
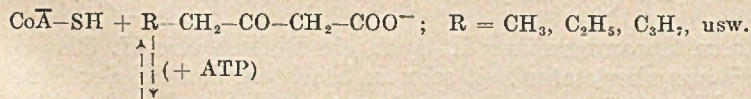
Mit unserer Formulierung der Acetessigsäure-Synthese findet nunmehr auch die Citronensäurebildung aus Acetessigsäure und Oxal-essigsäure, die gleichzeitig H. Wieland und C. Rosenthal<sup>56)</sup> in München und F. L. Breusch<sup>57)</sup> in Istanbul entdeckten, ihre endgültige Aufklärung. Wenn die Synthese im Nierenbrei an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden ist<sup>56)</sup>, dann wegen der Unentbehrlichkeit von ATP für die Bindung von Acetessigsäure an CoA. Von einem Acetacetyl-CoA ausgehend, werden dann aber zwei Acetyl-CoA und damit letztlich auch zwei Molekeln Citronensäure erhalten, wie es die quantitative Verfolgung des Reaktionsverlaufs durch Wieland und Rosenthal<sup>56, 58)</sup> ergeben hat:



Mit dem nunmehr gewonnenen Einblick in den Verlauf dieser Synthese läßt sich auch der Befund von F. E. Hunter und L. F. Leloir<sup>18)</sup> verstehen, daß m/100-Jodacetat den Vorgang vollständig unterbindet. Es dürfte die Umsetzung der Jodessigsäure mit CoA-SH sein, die dazu Anlaß gibt.

In Berücksichtigung all dieser Tatsachen dürfte ein Zweifel an der Richtigkeit unserer Formulierung der Acetessigsäurespaltung kaum mehr möglich sein. Damit werden wir aber zwangsläufig zu der weiteren Erkenntnis geführt, daß CoA im Leben eine viel universellere Bedeutung besitzt, als man bisher annahm.

Gehen wir nämlich nunmehr zur Spaltung höherer  $\beta$ -Ketosäuren über, bei welcher, wie J. R. Stern und S. Ochoa<sup>59)</sup> nachwiesen, in Gegenwart von ATP ebenfalls Acetyl-CoA entsteht, dann müssen wir diesen Vorgang in Analogie zur „thioklastischen“ Spaltung der Acetessigsäure formulieren und kommen damit zur Annahme höherer Acyl-CoA-Verbindungen:



<sup>55)</sup> Am. Soc. 51, 1567 (1929).

<sup>56)</sup> A. 554, 241 (1943).

<sup>57)</sup> Science, 97, 490 (1943).

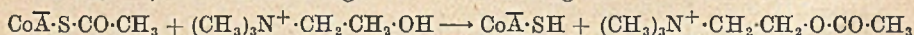
<sup>58)</sup> Vgl. auch <sup>18)</sup>

<sup>59)</sup> Fed. Proc. 9, 234 (1950).



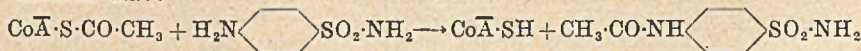
Wir sind davon überzeugt, daß diese höheren Acyl-CoA-Verbindungen existieren und die seit langem gesuchten aktiven Formen der Fettsäuren darstellen, die nicht nur den Aufbau, unter Anheftung des C<sub>2</sub>-Bausteins, sondern auch den Abbau durch  $\beta$ -Oxydation nach F. Knoop vermitteln. Macht man sich diese Annahme zu eigen, dann lassen sich viele Erscheinungen beim Abbau der Fettsäuren verstehen, insbesondere auch die seit langem bekannte Tatsache, daß man im allgemeinen bei der Oxydation höherer Fettsäuren Zwischenprodukte nicht fassen kann. Die Zwischenglieder mit 16, 14, 12, 10, 8 oder 6 C-Atomen, gesättigt, ungesättigt und mit Hydroxyl- bzw. Ketogruppe treten eben nicht frei, sondern nur in Bindung an CoA auf. Die Rolle des CoA-SH beim Fettstoffwechsel ist demnach mit der Rolle des HPO<sub>4</sub><sup>=</sup> beim Kohlenhydratstoffwechsel zu vergleichen, ein Grund mehr, Phosphorsäure und Coenzym A in Parallele zu setzen.

Des weiteren dürfen wir erwarten, daß von den höheren Acyl-CoA-Verbindungen, etwa von jenen der Stearin- und Palmitinsäure aus, auch die Veresterung mit Glycerin zu den Fetten erfolgt. Hierbei können wir uns auf das Beispiel der Biosynthese von Acetylcholin berufen, die, wie M. A. Lipton und E. S. G. Barron<sup>60)</sup> wohl als erste vermuteten, von „aktivierter Essigsäure“ ausgeht, eine Annahme, die inzwischen in unserem Laboratorium unter Einsatz des Acetyl-CoA-Präparates aus Hefe endgültig bewiesen werden konnte<sup>61)</sup>. Die Gleichung der Esterbildung lautet hier:



Was also der Chemiker vom Säurechlorid und von Säureanhydriden ausgehend bewerkstelligt, erreicht die Zelle unter Verwendung des Acyl-mercaptans.

Ob diese Regel auch für den Fall der biologischen Peptid-Synthese Gültigkeit hat, bedarf noch experimenteller Klärung. Wir können aber schon heute darauf hinweisen, daß die uns als Testreaktion dienende Synthese von Acetyl-sulfanilamid zwar kein echtes Peptid, aber immerhin eine Säureamid-Bindung zum Inhalt hat:



In diesem Zusammenhang ist auch ein Befund von H. Chantrenne<sup>62)</sup> aus allerletzter Zeit sehr zu beachten, daß bei der Synthese von Hippursäure aus Benzoessäure und Glykokoll außer ATP auch CoA unentbehrlich ist. Die Vermutung des Autors, daß bei dieser Synthese ein CoA-Derivat intermediär entsteht, glauben wir

<sup>60)</sup> JI. Biol. Chem. **166**, 367 (1946).

<sup>61)</sup> O. Wieland, unveröffentlichte Versuche.

<sup>62)</sup> JI. Biol. Chem. **189**, 227 (1951).







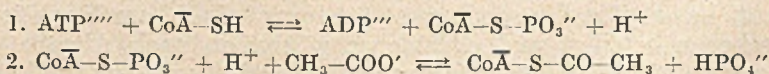
Außer als Mercaptan und als Disulfid dürfte CoA noch in mannigfacher Bindung an Carbonsäuren in der Natur vorkommen. Darum ist es nicht weiter verwunderlich, wenn beim Versuch der Isolierung des Coferments aus lebenden Zellen in verschiedenen Fraktionen Aktivität gefunden wurde<sup>66</sup>). Hinsichtlich der Vielfalt der mit ihm verbundenen Substanzen läßt sich also CoA wiederum nur mit Phosphorsäure vergleichen.

Das Problem, dem wir uns nun als letztem zuwenden wollen, ist die Frage nach dem Mechanismus der Vereinigung von Essigsäure mit der SH-Gruppe des Coferments. Da die Acylmercaptan-Bindung „energiereich“ ist (vgl. S. 16), kann ihre Bildung nur unter Energieaufwand erfolgen. Diese Energie stammt im Falle der dehydrierenden Decarboxylierung aus der freien Energie des Dehydrierungsvorgangs<sup>67</sup>), im Falle der „thioklastischen“ Spaltung aus jener der  $\beta$ -Ketosäure-Gruppierung<sup>68</sup>), im Falle der Beteiligung von ATP aber aus der Hydrolyse der energiereichen Phosphatbindung.

In welcher Weise die Spaltung von ATP den Aufbau der Acylmercaptan-Bindung vermittelt, ist für Bakterien, die Stadtmans Phospho-Transacetylase<sup>45</sup>) enthalten, zu übersehen. Hier kann eine Transphosphorylierung unter Bildung von Acetylphosphat den Vorgang einleiten, dem sich dann in zweiter Stufe eine Transacylierung anschließt:



In den meisten Zellen, so in den tierischen Geweben und in der Hefe, fehlt aber diese Phospho-Transacetylase, weshalb dort das Paar Acetylphosphat und CoA die Kombination ATP, Acetat und CoA nicht ersetzen kann. Da die Synthese von Acetyl-CoA dort also nicht über die Transphosphorylierung von ATP auf die Carbonsäure erfolgen kann, des weiteren auch eine ternäre Reaktion, bei welcher ATP, Acetat und CoA gleichzeitig miteinander reagieren würden, als ganz neuartiger Mechanismus einer enzymatischen Reaktion wenig Wahrscheinlichkeit besitzt, bleibt eigentlich nur die Möglichkeit einer primären Transphosphorylierung von ATP auf CoA und die sich daran anschließende Substitution von Phosphat durch Essigsäure bestehen:



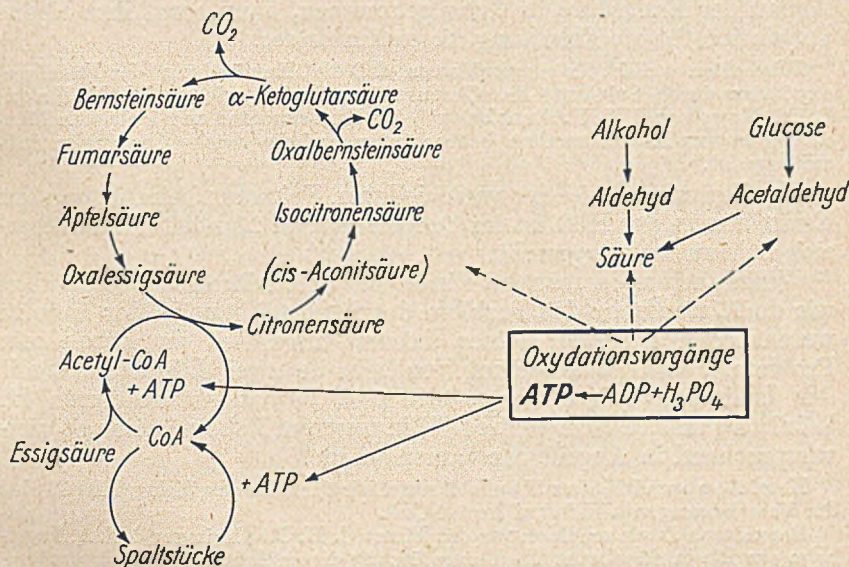
<sup>66</sup>) J. B. Neilands, H. Higgins, T. E. King, R. E. Handschumacher und F. M. Strong, *Jl. Biol. Chem.* **185**, 335 (1950).

<sup>67</sup>) Je nach dem Redoxpotential des Wasserstoffacceptors  $\Delta F = 16 - 61$  Kcal, vgl. <sup>46</sup>).

<sup>68</sup>)  $\Delta F = 16$  Kcal, vgl. Lipmann<sup>44</sup>).



Dieses Schema<sup>2)</sup>, für dessen Gültigkeit wir bereits experimentelle Beobachtungen anführen könnten<sup>69)</sup>, hat den großen Vorzug, daß sich damit auch die Bindung höherer Carbonsäuren ohne weiteres erklären läßt, indem eben in der zweiten Phase an die Stelle der Essigsäure Acetessigsäure, höhere Fettsäuren, Benzoesäure u. a. treten.



Der Acetatabbau durch Hefe  
(Die Umrandung umschließt die gekoppelte Reaktion)

Im übrigen führt dieses Schema zu einer Konsequenz, die uns wieder in Beziehung zu unseren Versuchen über die Induktionszeit beim Abbau der Essigsäure durch verarmte Hefe bringt. Wie die reversible Bilanzgleichung:



erkennen läßt, ist die Konzentration an Acetyl-CoA in der Zelle nicht nur vom Gehalt an CoA und Acetat, sondern daneben auch noch vom Gehalt an ATP und anorganischem Phosphat abhängig.

Wir glauben, darin den Grund sehen zu dürfen, daß verarmte Hefe, die mit 100 CoA-Einheiten/g immer noch relativ viel Coferment enthält, Acetat gegenüber nahezu völlig wirkungslos ist. Es ist der große Überschuß an anorganischem Phosphat<sup>13)</sup>, verbunden mit einem Mangel an ATP, der in diesen nur mehr schwach atmenden Zellen die Bildung von Acetyl-CoA und damit die Oxydation der Essigsäure nahezu vollständig verhindert. Die „Entzündung“

<sup>69)</sup> H. Hilz, unveröffentlichte Versuche.



des Acetatabbaus durch geringe Mengen eines oxydierbaren Alkohols usw. ist demnach nicht nur über eine Resynthese von CoA aus den Spaltstücken (vgl. S. 6), sondern auch über eine mit dem Oxydationsvorgang verknüpfte Erniedrigung des Phosphatniveaus unter Neubildung von ATP zu verstehen. Ist aber erst einmal der Abbau der Essigsäure in Gang gekommen, dann sorgt ihre eigene Oxydation für die Erhaltung dieses Zustandes.

Wir halten es nicht für ausgeschlossen, daß die „Entzündung“ der Fettsäureoxydation durch Substrate des Citronensäure-Cyclus, wie sie W. E. Knox, B. N. Noyce und V. H. Auerbach<sup>70)</sup> bei Experimenten mit isolierten Mitochondrien aus Kaninchenniere beobachteten, auf die gleiche Ursache zurückzuführen ist.

Das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren beim Abbau der Essigsäure in der Hefe ist im Schema auf S. 23 noch einmal übersichtlich zusammengestellt.

Wenn auch noch manche Einzelheit aufzuklären ist, so glauben wir doch, nunmehr das Problem des Acetatabbaus in der Hefe in wesentlichen Punkten seiner Lösung zugeführt zu haben, ein Problem, dessen Bearbeitung vor beinahe zwei Jahrzehnten mit der Isolierung von Citronensäure und Bernsteinsäure durch H. Wieland und R. Sonderhoff<sup>71)</sup> in unserem Laboratorium so vielversprechend in Angriff genommen wurde.

Karl Zopp und Heinz Hauff danken wir für sehr geschickte Mithilfe bei der Verarbeitung von Hefe auf Acetyl-CoA.

Besonderen Dank schulden wir der Firma C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim am Rhein, für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft für die Gewährung einer Sachbeihilfe.

Bei der Suche nach geeigneten Aktivkohlen hat uns die Gesellschaft für Adsorptionstechnik, Bad Homburg, durch die Bereitstellung von Kohleproben wertvolle Hilfe geleistet, wofür wir auch an dieser Stelle bestens danken möchten.

## Beschreibung der Versuche

### I. Induktionszeit und Coenzym A

Die quantitative Bestimmung von CoA erfolgte nach Kaplan und Lipmann<sup>31)</sup>. Im Interesse einer größeren Materialersparnis wurde bei einem Teil der Messungen der von den amerikanischen Autoren angegebene Ansatz auf ein Viertel vorkleinert. In diesem Fall wurde in kleine, mit Gummistopfen verschlossene Zentrifugengläser (lichte Weite 0,8 cm):

a ccm der auf CoA zu prüfenden Lösung,

(0,08—a) ccm Wasser,

0,04 ccm m/10-Cystein-hydrochlorid-lösg.,

0,02 ccm einer frisch bereiteten m-NaHCO<sub>3</sub>-lösg.,

0,075 ccm der „Reaktionsmischung“ (10 Teile 0,004m-Sulfanilamid,

2,5 Teile m-Na-acetat, 8 Teile 0,05m-K<sub>4</sub>-ATP und 10 Teile 0,2m-Na-citrat<sup>31)</sup>,

0,06 ccm gealtertes Leberferment<sup>31)</sup>

<sup>70)</sup> Jl. Biol. Chem. **176**, 117 (1948).

<sup>71)</sup> A. **499**, 213 (1932).



vereinigt und 2 Stunden bei 35° inkubiert. Enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1 ccm 5-proc. Trichloressigsäure abgestoppt, denaturiertes Eiweiß abzentrifugiert und anschließend in 1 ccm der klaren Lösg. das noch vorhandene freie Sulfanilamid nach Bratton und Marshall kolorimetrisch bestimmt (vgl. Fußnote <sup>21</sup>). Unter diesen Bedingungen entspricht jene Menge CoA, welche den Halbwert der maximalen Acetylierung bewirkt, 0,25 CoA-Einheiten nach Kaplan und Lipmann.

Das für den Test benötigte, etwa 80–90-proc. ATP wurde durch Phosphorylierung von Adenosin mittels gärender Hefe bereitet. Eine Mischung aus 120 g frisch bezogener, gewaschener und abgepreßter Bierhefe<sup>72</sup>, 100 ccm einer 1-proc. Adenosin-lösg., 22 ccm K-hexosediphosphat-lösg. mit 23,7 mg org. PO<sub>4</sub><sup>'''</sup>/ccm, 100 ccm 0,4m-Phosphatpuffer, pH = 6,4, 10 ccm 10-proc. Acetaldehyd-lösg. (frisch destilliert!), 8 ccm m-MgSO<sub>4</sub>-lösg., 25 ccm Leitungswasser und 25 ccm Toluol wird in einem geräumigen Kolben unter häufigem Schütteln 1½ Stunden bei 35° inkubiert. Das Gemisch wird nach Einstellen in Eis mit 550 ccm kalter 10-proc. Trichloressigsäure versetzt und nach 15 Minuten zentrifugiert. Nach Abstumpfen auf p<sub>H</sub> 3,5 wird aus der klaren Lösung durch Zugabe von 5 ccm 20-proc. Hg-acetat-lösung (in 2-proc. Essigsäure) je 100 ccm Lösung ein Quecksilbersalz gefällt. Die bei der Zerlegung des abzentrifugierten Niederschlags mittels H<sub>2</sub>S (Eiskühlung!) erhaltene Lösung nach der Vorschrift von S. E. Kerr<sup>73</sup> auf Ba<sub>2</sub>-ATP verarbeitet. Ausbeute: 25–30%, bezogen auf Adenosin.

### CoA-Gehalt von frischer und verarmter Hefe

Für die Versuche wurde handelsübliche Bäckerhefe der Hefefabrik Oberkotzau benutzt. 1 Teil Hefe wurde in 1 Teil siedenden Wassers eingetragen, einmal kurz aufgekocht, sofort in Eisbad abgekühlt und dann die Zelltrümmer abzentrifugiert. In einem aliquoten Teil der überstehenden Lösung wird CoA quantitativ bestimmt.

Zum Zwecke der Verarmung wurde eine Suspension in Leitungswasser, die pro ccm 20 mg Hefe enthält, in einer Flasche unter O<sub>2</sub> mechanisch geschüttelt (Brutraum!). Für die CoA-Bestimmung einen Teil der Suspension zentrifugiert, die sedimentierten Hefezellen mit siedendem Wasser übergossen und wie oben auf Kochsaft verarbeitet. Tab. 1, S. 4 gibt das Ergebnis mehrerer Bestimmungen an frischer und verarmter Hefe wieder.

### CoA-Gehalt der Hefe während der Oxydation von Essigsäure

Zwei 2-proc. Hefesuspensionen, die eine frisch bereitet, die andere nach vorhergehender Verarmung, von denen ein Teil zur CoA-Bestimmung abgezweigt worden war, wurden mit festem KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf die Konzentration m/30 gebracht.

Zur Atmungs-messung je 2 ccm dieser Suspension in kegelförmige Warburg-Gefäße mit NaOH im Einsatz, deren Birne 1 ccm m/20-Na-acetat enthielt. 10 Minuten nach Einbringen in den Thermostaten (T = 30°) Manometerhähne geschlossen und 15 Minuten später den Inhalt der Birne zugekippt. O<sub>2</sub>-Verbrauch gemessen.

Zum gleichen Zeitpunkt dem Rest der phosphathaltigen Hefesuspensionen, die in passenden Erlenmeyerkolben unter den gleichen Bedingungen geschüttelt wurden, auf je 10 ccm 5 ccm m/20-Na-acetat zugefügt. Um den CoA-Gehalt zu bestimmen, werden von Zeit zu Zeit Proben von je 10 ccm entnommen, die Hefe an der Zentrifuge abgeschleudert, zur Entfernung von Phosphat einmal mit

<sup>72</sup>) Wir danken der Löwenbrauerei München, insbesondere Herrn Dr. Fries, für die Überlassung der Hefe.

<sup>73</sup>) JI. Biol. Chem. **139**, 121 (1941).



Wasser gewaschen, sofort mit 1,33 ccm siedenden Wassers versetzt, einmal kurz aufgekocht, usw. Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist in Fig. 1, S. 5 wiedergegeben.

Es sei bemerkt, daß die auf diese Weise gewonnenen CoA-Werte nicht genau dem Zeitpunkt der Entnahme entsprechen. Zweifellos atmet die Hefe nach der Entnahme bis zur Bereitung des Kochsaftes weiter, so daß der CoA-Gehalt einer 15 Minuten nach der Zugabe von Acetat entnommenen Probe in Wirklichkeit der Hefesuspension etwa 25 Minuten nach diesem Zeitpunkt entspricht. Ein Fehler, der sich vor allem im Ansatz mit frischer Hefe, wo die Atmung sehr schnell zunimmt, bemerkbar macht. Aus diesem Grund kamen die betreffenden Punkte in Fig. 2 (S. 7) zu weit nach links zu liegen. Der CoA-Gehalt wird dort mit einer zu kleinen Atmungsgröße in Beziehung gebracht.

Als Maß für die „Induktionszeit“ wurde willkürlich die Zeitdifferenz gewählt, um welche die Atmung der verarmten Hefe hinter jener der frischen Hefe bei 400 cmm O<sub>2</sub> nachhinkt. Sie beträgt in Fig. 1 bei der verarmten Hefe z.B. 108 Minuten. Wurde jedoch die verarmte Hefe vor der Atmungsmessung abzentrifugiert, die überstehende Lösung durch die gleiche Menge frischen Leitungswassers ersetzt und erst jetzt KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> zugesetzt, dann stieg die „Induktionszeit“ auf 166 Minuten an (vgl. Fig. 1).

Um die Resynthese von CoA während der Acetatverbrennung zu belegen, seien in Tab. 3 noch einige Versuchsergebnisse aufgeführt.

Tab. 3

Versuch	CoA-Einh./g Hefe (zu Versuchsbeginn)	Verarmungszeit	Induktionszeit	Min. nach Zugabe von Acetat	CoA-Einh./g Hefe
4 a	128	—	—	25	300
b	104	24 Std.	40 Min.	70	296
5 a	192	—	—	35	516 (?)
b	144	24 Std.	150 Min.	180	300

a = frische, b = verarmte Hefe

## II. Isolierung von Acetyl-CoA aus Hefe

### a) Enzymatischer Test auf Acetyl-CoA

Unserer quantitativen Bestimmungsmethode liegt die Transacetylierung von Acetyl-CoA auf Sulfanilamid zugrunde, wobei eine dem Acetyl-CoA entsprechende Menge Sulfanilamid acetyliert wird. Bestimmt man daher das freie Sulfanilamid vor und nach Inkubation mit Sulfanilamid-Transacetylase, dann entspricht die gefundene Differenz dem in den Versuch eingebrachten Acetyl-CoA. Nach der Gleichung:



entsprechen 172 γ Sulfanilamid 43 γ aktivem CH<sub>3</sub>CO oder — bei Zugrundelegung eines Mol.-Gew. von 800 für Acetyl-CoA — 800 γ Acetyl-CoA.

### Anreicherung der Sulfanilamid-Transacetylase

Ein Ausgangsmaterial zur Darstellung des Ferments ist Acetonpulver aus Taubenleber, bei dessen Bereitung wir uns an die Vorschrift von Kaplan und Lipmann<sup>21)</sup> hielten.



200 mg Acetonpulver werden mit 2 ccm 0,02m-NaHCO<sub>3</sub> gründlich verrieben, hoctourig (15000 Umdr./Min., Winkelzentrifuge von Runne, Heidelberg-Rohrbach) zentrifugiert und der dabei erhaltene dunkelrote, klare Extrakt unter Eiskühlung je ccm mit 0,7 ccm Aceton versetzt. Nach Abtrennung der unwirksamen Fällung in der Zentrifuge wird aus der überstehenden, hellroten Lösung das wirksame Protein durch Zugabe des halben Volumens Aceton (Endkonzentration 60%) unter Rühren gefällt und hoctourig abzentrifugiert. Die Fällung wird in 0,6 ccm doppeldest. Wassers aufgenommen, wobei sie vollständig in Lösung geht. In gefrorenem Zustand bei -20° (Kühltruhe) aufbewahrt, kann diese, eine aktive Sulfanilamid-Transacetylase enthaltende Lösung, einige Tage ohne merklichen Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Die Fraktionierung mit Aceton ist nicht zu umgehen. Verwendet man nämlich im Test an Stelle des angereicherten Ferments rohen Leberextrakt, dann reagiert nur ein Teil des eingesetzten Acetyl-CoA mit Sulfanilamid, während der Rest in Nebenreaktionen verbraucht wird. Wir sind damit beschäftigt, die Natur dieser Nebenreaktionen aufzuklären.

Die Genauigkeit der Bestimmung und der Meßbereich werden erhöht, wenn man die Reinigung der Sulfanilamid-Transacetylase noch weiterführt. Nach Versuchen von M. Bühler<sup>65</sup>) kann das wie folgt geschehen:

20 g frische Taubenleber werden unter Eiskühlung mit 40 ccm m/50-Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-Lösung homogenisiert, das Homogenat 5 Minuten lang unter ständigem Rühren in einem auf 49° erhitzten Wasserbad gehalten, dann im Eisbad abgekühlt und zentrifugiert. Der dabei erhaltene Bodensatz wird an der Zentrifuge zuerst mit 20 ccm und dann noch mit 7 ccm der Pyrophosphat-lösg. gründlich gewaschen. Bei Zugabe des gleichen Volumens Aceton zu den vereinigten Extrakten, was langsam und unter ständigem Rühren bei 0° geschehen muß, fällt eine Fraktion aus, die nach 5 Minuten langem Stehen bei -10° im Kälteraum abzentrifugiert wird. Die überstehende Lösung enthält die Hauptmenge des Ferments. Um die Ausbeute zu erhöhen, extrahieren wir den Bodensatz nacheinander mit 60 ccm und 30 ccm 50-proc. Aceton und vereinigen die dabei erhaltenen Lösungen mit der Mutterlauge der Fällung. Nach Abkühlen auf -10° bis -12° wird das 1½-fache Vol. Aceton zugesetzt (Endkonzentration 80%) und nach 10 Minuten langem Stehen bei der tiefen Temperatur die das gesuchte Ferment enthaltende Fällung im Kälteraum abzentrifugiert. Sofort in wenig Wasser aufnehmen und im Vakuum-Exsikkator über KOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aus dem gefrorenen Zustand zur Trockne bringen. Ausbeute 300 mg.

Da dieses Trockenpräparat wenig haltbar ist, wird es sofort weiter verarbeitet. 400 mg Trockenpulver werden mit 5 ccm Wasser verrieben und ergeben nach dem Zentrifugieren 5,2 ccm Lösung I. Beim Einrühren von 0,88 g festem Ammonsulfat (0,2-gesättigt) fällt Eiweiß aus, das nach einstündigem Stehen bei 0° abzentrifugiert und verworfen wird. Aus den dabei erhaltenen 5,0 ccm Lösung II fällen 1,06 g Ammonsulfat (0,5-gesättigt) das wirksame Protein, das nach einstündigem Stehen bei 0° in der hoctourigen Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt und in 2,3 ccm doppel dest. Wasser aufgenommen wird. Man erhält, eventuell nach Zentrifugieren, 3,65 ccm einer klaren, gelbgefärbten Lösung, die ohne weiteres zur Acetyl-CoA-Bestimmung verwendet werden kann und, im gefrorenen Zustand bei -20° aufbewahrt, einige Wochen haltbar ist.

Ausführung der Bestimmung. Der Ansatz, bestehend aus:

- 0,01—0,125 ccm der auf Acetyl-CoA zu testenden Lösung,
- 0,05 ccm m/5-Pyrophosphat-Puffer (8,92 g Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O, mit 8,0 ccm n-HCl und Wasser auf 100 ccm),
- 0,01 ccm 0,4m-Cystein · HCl,
- 0,025 ccm m/250-Sulfanilamid-Lösg.,
- 0,01—0,04 ccm Enzymlösg. (je nach Reinheitsgrad),



und soviel Wasser, um das Volumen auf 0,25 ccm zu bringen, wird in kleinen, mit Gummistopfen verschlossenen Zentrifugengläsern im Wasserbad 1 Stunde lang inkubiert.  $T = 35^\circ$ . Nach Zugabe von 1 ccm 5-proc. Trichloressigsäure wird das denaturierte Eiweiß abzentrifugiert und in der überstehenden Lösung freies Sulfanilamid nach Bratton und Marshall<sup>31)</sup> bestimmt. Zu diesem Zweck wird 1 ccm der Lösung zu 9 ccm Wasser gegeben, die sich in einem mit Gummistopfen verschlossenen Reagensglas befinden. Durch 5–10 Minuten langes Einstellen in ein Eisbad abkühlen, dann herausnehmen, mit 1 ccm 0,1-proc. Na-nitrit-lösg., genau 3 Minuten später mit 1 ccm 0,5-proc. Ammonium-sulfaminat-lösg. und nach 2 Minuten mit 1 ccm 0,1-proc. N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin · 2 HCl-lösg. vermischen. 10–30 Minuten nach Zusatz des Diamins die Intensität der Rotfärbung im Pulfrich-Photometer (Filter S 53) oder im lichtelektrischen Photometer „Eppendorf“ (Hg-Linie 546 m $\mu$ ) messen. Schichtdicke: 2 cm. In Tab. 4 ist das Protokoll einer Bestimmung wiedergegeben, in Fig. 3 das Ergebnis graphisch dargestellt.

Tab. 4

Als Enzym diente 0,01 ccm der über die Ammonsulfat-Fraktionierung gereinigten Transacetylase

Acetyl-CoA-Präparat	—	100 $\gamma$	200 $\gamma$	400 $\gamma$	600 $\gamma$
Extinktion	0,403	0,354	0,310	0,238	0,195
$\gamma$ Sulfanilamid noch vorhanden	17,3	15,2	13,3	10,2	8,4
$\gamma$ Sulfanilamid acetyliert	—	2,1	4,0	7,1	8,9

Ergebnis: 100  $\gamma$  des Präparates acetylieren 2,1  $\gamma$  Sulfanilamid. Das Präparat enthält demnach:  $\frac{1000 \cdot 2,1 \cdot 43}{100 \cdot 172} = 5,2 \gamma \text{ CH}_3\text{CO/mg.}$

## b) Vorbehandlung der Hefe und Bereitung des Kochsafts

Je nachdem ob Alkohol oder Zucker als Substrat während der Vorbehandlung der Hefe dient, muß man die Inkubation in geschlossenen Flaschen oder in offenen Filtrierstutzen vornehmen. Da wir hinsichtlich der mit beiden Substraten erzielten Ausbeuten an Acetyl-CoA keine wesentlichen Unterschiede fanden, lassen wir heute im allgemeinen die Hefe zur Anreicherung an CoA und dessen Beladung mit der Acetylgruppe in zuckerhaltiger Lösung atmen. Da wir aber zu Beginn unserer Untersuchung in der Hauptsache mit Alkohol arbeiteten, sei zunächst die dabei eingehaltene Methodik kurz angegeben.

300 g frische Bäckerhefe der Firma in Oberkotzau werden mit Wasser auf ein Vol. von 450 ccm verdünnt und nach Zugabe von 30 ccm 96-proc. Äthylalkohols in einer verschlossenen 3-l-Rollflasche unter reinem  $O_2$  bei  $30^\circ$  maschinell geschüttelt. Wegen der starken Atmung der Hefe muß etwa alle 15 Minuten die in der Flasche befindliche Atmosphäre durch frischen Sauerstoff ersetzt werden. Dauer der Inkubation 45 Minuten.

Bei der Vorbehandlung der Hefe in zuckerhaltiger Lösung erwies es sich für eine gute Ausbeute als wesentlich, daß bei schwach alkalischer Reaktion gearbeitet wurde. Zu diesem Zweck geben wir dem in einem 10-l-Filtrierstutzen befindlichen Ansatz, bestehend aus 750 g frischer Bäckerhefe — mit Wasser auf 2,1 l verdünnt — und 225 g Trauben- oder Rohrzucker, der im Brutraum bei  $30^\circ$  unter kräftigem, mechanischem Rühren mit reinem  $O_2$  aus der Bombe durchströmt wird, von Anfang an 4 g festes  $\text{NaHCO}_3$  zu. Um ein während des Atmungsprozesses wahrnehmbares Absinken der Reaktion nach der saueren Seite zu kompensieren, werden nach 15 Minuten abermals



6 g und 10 Minuten später noch einmal 3 g  $\text{NaHCO}_3$  zugefügt. Dauer der Inkubation 45 Minuten.

Nach unseren Erfahrungen verdienen bei der Bereitung des Kochsafts zwei Punkte besondere Beachtung. Erstens muß man dafür sorgen, daß die Hefe bis zuletzt  $\text{O}_2$  hat, und zweitens dafür, daß wegen der Gefahr einer hydrolytischen Spaltung von Acetyl-CoA das Erhitzen der Hefesuspension nicht zu lange ausgedehnt wird. Der schwankende Acetyl-CoA-Gehalt unserer Präparate ist zweifellos darauf zurückzuführen, daß die Überwindung dieser beiden Klippen nicht immer in der gleichen Weise gelingt, so daß die bei dieser Methode wohl unvermeidbaren Verluste einmal größer und einmal kleiner sind.

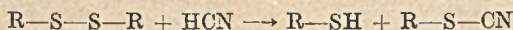
Praktisch gehen wir so vor, daß wir zum Zwecke des Abkochens die Hefesuspension — eventuell in Portionen — zunächst in eine größere Rollflasche überführen und dann unter ständigem Schütteln in 6–8 Portionen in 200 ccm kräftig siedenden Wassers eintragen, im Falle der Vorbehandlung mit Zucker wegen des Bicarbonats unter gleichzeitigem Zusatz von 20 ccm Eisessig. Reaktion darf nicht alkalisch werden! Durch kräftige Heizung wird dafür gesorgt, daß die Temperatur im Kochtopf nicht unter  $70\text{--}80^\circ$  fällt und der Inhalt nach Zugabe der letzten Portion der Hefesuspension innerhalb kürzester Zeit zum Kochen kommt. Einmal kurz aufkochen lassen und dann sofort durch Einstellen in ein Eisbad unter ständigem Rühren auf  $10^\circ$  abkühlen. Sofort anschließend werden die Zelltrümmer in der Zentrifuge abgetrennt, wobei man aus 750 g Hefe etwa 1690 ccm eines klaren, gelbfärbten Kochsafts erhält.

### c) Anreicherung von Acetyl-CoA aus Hefekochsaft

Die Anreicherung von Acetyl-CoA läßt sich mittels der Nitroprussid-Reaktion auf einfache Weise kontrollieren. Wir führen die Reaktion in folgender Weise aus:

0,05 ccm der zu prüfenden Lösung wird in einem kleinen Reagensglas ( $\varnothing 0,9$  cm) mit 0,01 ccm einer frisch bereiteten 2-proc. Nitroprussid-natrium-lösg. und 0,025 ccm konz. Ammoniak versetzt. Bei Anwesenheit von Acetyl-CoA färbt sich die Mischung im Verlauf einer Minute rot. Um die Reaktion empfindlicher zu gestalten, kann man der Probe vor Zugabe des Ammoniaks noch festes Ammonsulfat zufügen. Unter diesen Bedingungen tritt sichtbare Rötung auf, wenn die zu prüfende Lösung mehr als  $2 \gamma$ , „aktives“  $\text{CH}_3\text{CO}$ /ccm enthält, im Test also mehr als  $0,1 \gamma \text{CH}_3\text{CO}$  anwesend sind.

Um auf Disulfide zu prüfen, setzen wir nach dem Ammoniak noch 0,025 ccm einer 2 m-KCN-Lösg. zu. Eine dann auftretende Rotfärbung zeigt die Gegenwart eines Disulfids an, weil solche bekanntlich unter der Wirkung der Blausäure freie Mercaptane liefern:



Da bei der Prüfung auf Acetyl-CoA mittels der Nitroprussid-Reaktion freie Mercaptane stören, müssen letztere vor Beginn der Isolierung zu den entsprechenden Disulfiden oxydiert werden. Zu diesem Zweck versetzen wir den frischen Hefekochsaft mit soviel 2,5-proc. alkoholischer Jodlösung, bis eine Probe mit Nitroprussid keine Färbung mehr gibt<sup>37)</sup> (ohne Zusatz von Ammonsulfat geprüft!). Für 1690 ccm Kochsaft, entsprechend 750 g Hefe, werden dazu etwa 24,5 ccm der Jodlösung benötigt.



## 1. Phenolextraktion

In 1690 ccm des oxydierten Kochsafts werden 845 g festes Ammonsulfat gelöst und Acetyl-CoA zusammen mit anderen Nucleotiden durch dreimalige Extraktion mit je 212 ccm verflüssigten Phenols (=  $\frac{1}{8}$  des Kochsaft-Vol.) im Scheidetrichter ausgezogen. Um dabei Phenol zu sparen, wird der dritte, nur noch wenig Substanz enthaltende Phenolextrakt gleich zur ersten Extraktion des Kochsafts der nächsten Hefeaufarbeitung verwendet.

Die Phenolextrakte von vier Aufarbeitungen (entsprechend 3 kg Hefe) werden vereinigt, mit dem gleichen Vol. Äther versetzt und die Mischung, die ein Vol. von 3,6 l besitzt, im Scheidetrichter zehnmal hintereinander mit je 40 ccm Wasser ausgezogen, bis keine gelbe Farbe mehr in die wäßrige Phase übergeht. Die gesammelten, das gesuchte Nucleotid enthaltenden Extrakte werden mit frischem Äther von gelöstem Phenol befreit und i. V. bei tiefer Temperatur auf 35 ccm eingedampft.

## 2. Fällung als Bariumsulfat

Die eingedampfte Lösung wird nach Abkühlen im Eisbad vorsichtig mit verd. Ammoniak auf pH 7—7,5 gebracht, wozu etwa 3,0 ccm nötig sind, mit 60 ccm m-Bariumacetat versetzt und 300 ccm (3 Vol.) 96-proc. Alkohol zugegeben. Die viel Bariumsulfat enthaltende Fällung wird abzentrifugiert. Sie kann ohne Wirksamkeitsverlust in der Kühltruhe bei  $-20^{\circ}$  aufbewahrt werden.

Es ist zu bemerken, daß die Hauptmenge des Acetyl-CoA bereits ohne Alkohol-Zusatz fällt. Im Interesse einer höheren Ausbeute ist es aber ratsam, Alkohol zuzugeben.

## 3. Adsorption an Aktivkohle, Elution und Acetonfällung

Zur Zerlegung wird das Bariumsulfat 5- bis 6-mal mit je 10 ccm  $2n\text{-H}_2\text{SO}_4$  unter Eiskühlung verrieben und zentrifugiert, bis beim letztenmal kaum noch Farbe in Lösung geht. Aus den vereinigten, intensiv gelbbraun gefärbten Auszügen, die wegen des großen Schwefelsäureüberschusses stark kongosaure Reaktion zeigen, wird die wirksame Substanz an Kohle adsorbiert. Zu diesem Zweck der im Eisbad gekühlten Lösung 2 g Carboraffin C 1,0 (Laboratorium für Adsorptionstechnik, Bad Homburg) zusetzen, 10 Minuten lang mechanisch rühren und dann die Kohle abzentrifugieren. Nachdem man sich davon überzeugt hat, daß in der farblosen überstehenden Lösung weder Acyl-S noch Disulfide geblieben sind, wird die Kohle an der Zentrifuge sulfatfrei gewaschen, wozu etwa 400 ccm Wasser nötig sind, und anschließend das Acetyl-CoA wieder eluiert. Dazu wird die gewaschene Kohle in 10 ccm 10-proc. Pyridin-Wasser aufgeschlämmt, 5 Minuten lang mechanisch gerührt (Eisbad!) und dann zentrifugiert. Die Behandlung mit wäßrigem Pyridin ist etwa viermal zu wiederholen, bis in einer Probe des Eluats die Farb-reaktion sowohl auf Acyl-S wie auch auf Disulfide negativ ausfällt. Die vereinigten Eluate werden im Scheidetrichter von der Hauptmenge des Pyridins durch zweimalige Extraktion mit je  $\frac{1}{5}$  Vol. Chloroform befreit, dann bei tiefer Temperatur i. V. auf 8 ccm eingedampft, eventuell mitgeschleppte Aktivkohle hochtourig abzentrifugiert und mit 40 ccm Aceton versetzt. Nach längerem Aufbewahren — über Nacht — in der Kühltruhe bei  $-20^{\circ}$  wird die jetzt nicht mehr schmierige Fällung abzentrifugiert, zweimal mit frischem Aceton verrieben und dann im Vak.-Exs. über  $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KOH}$  oder Silicagel getrocknet. Bei  $0^{\circ}$  über Silicagel kann das Trockenpulver ohne Wirksamkeitsverlust aufbewahrt werden. Ausbeute 180—250 mg Substanz (aus 3 kg Hefe), deren Acetylgehalt zwischen 1—5,5  $\gamma$   $\text{CH}_3\text{CO}$ /mg schwankte.



Über die in den einzelnen Stufen einer solchen Aufarbeitung von 2,25 kg Hefe eingetretenen, leider nicht unbeträchtlichen Verluste an Acetyl-CoA, gibt Tab. 2, S. 10 Auskunft.

### III. Die chemische Natur von Acetyl-CoA

#### Vergleich „acetylierende Komponente“ – Acyl-mercaptan

Der Gehalt einer Lösung an „acetylierender Komponente“ wurde durch den Verbrauch von Sulfanilamid im enzymatischen Test, der Gehalt an Acyl-S durch Vergleich der von dieser Lösung mit Nitroprussid-natrium unter Standard-Bedingungen gegebenen Färbung mit jener einer 0,224-proc. wäßrigen Lösung von S-Acetyl- $\beta$ -mercapto-propionsäure-äthylester bestimmt<sup>38</sup>).

Für den Vergleich wurden Lösungen des zerlegten Bariumsalzes (Vol. 95 ccm) und des Kohle-Extrats, nach Abtrennung von Pyridin und Eindampfen (Vol. 35 ccm), die beide im Verlauf einer Aufarbeitung von 2,25 kg Hefe (vgl. Tab. 2, S. 10) anfielen, herangezogen. Außerdem noch zwei Trockenpräparate (Acetonfällungen) aus anderen Aufarbeitungen. Ergebnis des Vergleichs vgl. Fig. 4, S. 12. Die in der Fig. aufgeführten Zahlenwerte beziehen sich bei o und + jeweils auf 0,1 ccm Lösung, bei  $\Delta$  und  $\square$  dagegen auf 1 mg Trockensubstanz.

#### Inaktivierung von Acetyl-CoA durch Alkali

10 mg Acetyl-CoA (2,7  $\gamma$   $\text{CH}_3\text{CO}/\text{mg}$ ) wurden in 0,5 ccm Wasser gelöst und unter Eiskühlung mit 0,075 ccm n-KOH auf  $\text{pH}$  8—9 gebracht (Phenolphthalein rosa!). Nach Verdünnung mit Wasser auf 0,75 ccm wurden 0,125 ccm entnommen und zu 0,005 ccm 2n-HCl + 0,0375 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  gegeben. Dem Rest der Lösung (= 0,625 ccm), die sich weiterhin im Eisbad befand, 0,125 ccm n-KOH zugefügt (Endkonzentration =  $n/6\text{-KOH}^{74}$ ). Daraus von Zeit zu Zeit Proben zu je 0,15 ccm entnommen und, um die Wirkung des Alkalis abzustoppen, zu 0,0175 ccm 2n-HCl gegeben. Das in den einzelnen Proben noch vorhandene aktive Acetyl enzymatisch bestimmt. Das Ergebnis ist in Fig. 5, S. 12 wiedergegeben, wobei auf der Ordinate der Logarithmus des in den einzelnen Proben vorhandenen aktiven Acetyls aufgetragen wurde. Man erhält eine Gerade, wie es für eine Reaktion 1. Ordnung typisch ist. Aus ihrer Neigung von 0,43/5 Min. folgt für die Reaktionskonstante

$$k = \frac{0,43}{5 \cdot \log e} = 0,198 \text{ [1/Minuten]},$$

und daraus für die Halbwertszeit:  $t = 210$  [Sekunden].

#### Inaktivierung von Acetyl-CoA durch $\text{Hg}^{++}$

2 mg Acetyl-CoA, insgesamt 11,2  $\gamma$  aktives  $\text{CH}_3\text{CO}$  enthaltend, wurden in 0,4 ccm Wasser gelöst und mit 0,03 ccm 10-proc. Hg-acetat-lösg. versetzt, wobei ein Niederschlag ausfiel. Nach  $3/4$ -stünd. Stehen bei Zimmertemperatur wurde alles Quecksilber durch Einleiten von  $\text{H}_2\text{S}$  als Sulfid ausgefällt, das  $\text{HgS}$  abzentrifugiert und an der Zentrifuge zweimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate und Waschwasser wurden gefrier-getrocknet, der Rückstand in 0,1 ccm Wasser aufgenommen und durch Zugabe von festem  $\text{NaHCO}_3$  neu-

<sup>74</sup>) Unter der Annahme, daß das verwendete Acetyl-CoA-Präparat keine erst im alkalischen Gebiet dissoziierenden Gruppen enthält.



tralisiert. Wie die Prüfung im enzymatischen Test ergab, war kein aktives Acetyl mehr vorhanden.

Wir haben die Spaltung durch Quecksilber dazu benützt, um CoA frei von Acetyl-Verbindung darzustellen. 40 mg Acetyl-CoA ( $2,5 \gamma \text{CH}_3\text{CO}/\text{mg}$ ) wurden in 1 ccm Wasser gelöst, durch Zugabe von 0,5 ccm 10-proc. Hg-acetat-lösg. ein Quecksilbersalz gefällt und dieses an der Zentrifuge einmal mit 0,5-proc. Hg-acetat-lösg. gewaschen. Der Niederschlag wurde in 2 ccm Wasser verteilt, mittels  $\text{H}_2\text{S}$  zerlegt, das ausgeschiedene HgS abzentrifugiert und zweimal mit je 1 ccm Wasser gewaschen. Filtrat und Waschwasser, aus dem gefrorenen Zustand eingedampft, lieferten 26 mg Substanz mit 100 CoA-Einheiten/mg. Es diente uns für den folgenden Inaktivierungsversuch.

### Inaktivierung von CoA durch Jodacetat

26 mg des vorstehend beschriebenen CoA-Präparates wurden in 2 ccm Wasser gelöst und unter mechanischem Rühren (Eisbad) mittels 2-proc. Na-amalgam in die SH-Form übergeführt.  $\text{N}_2$ -Atmosphäre! Durch gelegentliche Zugabe von Eisessig wurde dafür gesorgt, daß die Reaktion nicht alkalisch wurde. 0,2 ccm der reduzierten Lösg. zu 0,006 ccm m-K-jodacetat gegeben, mit etwas festem  $\text{NaHCO}_3$  auf  $\text{pH} = 7,0$  gebracht und 2 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Parallel dazu eine Probe der reduzierten Lösg. ebenfalls mit Nabcarbonat neutralisiert und bei Zimmertemperatur aufbewahrt, diesmal aber ohne Jodacetat. Mit Nitroprussid geprüft, gab dann die Probe ohne Jodacetat eine kräftige, momentan auftretende Rotfärbung (freies SH), jene mit Jodacetat aber blieb farblos. Wie die anschließende Bestimmung im Kaplan-Lipmann-Test ergab, enthielt die mit Jodacetat behandelte Probe weniger als 5% der CoA-Aktivität der Kontrollprobe ohne Jodacetat.

Derselbe Versuch wurde anschließend mit 100 mg eines Acetyl-CoA-Präparates wiederholt, das  $1,0 \gamma \text{CH}_3\text{CO}/\text{mg}$  enthält. Es wurde nach Lösung in 4 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  der Reduktion mit Na-amalgam unterworfen. Je 0,2 ccm der reduzierten Lösung mit 0,006 ccm m-K-jodacetat (I), bzw. 0,006 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  (II) in Gegenwart von  $\text{NaHCO}_3$  inkubiert. I zeigte danach noch deutlich die verzögerte Nitroprussid-Reaktion auf S-Acyl, während bei II diese Reaktion durch freie SH-Gruppen verdeckt war.

Die mit beiden Lösungen im verkleinerten Kaplan-Lipmann-Test (vgl. S. 24) gefundene Acetylierung von Sulfanilamid ist in Tab. 5 wiedergegeben.

Tab. 5

ccm Lösung I bzw. II, 1:20 verdünnt, zugegeben	$\gamma$ Sulfanilamid acetyliert	
	Lösg. II (ohne Jodacetat)	Lösg. I (mit Jodacetat)
0,01	5,9	3,4
0,02	9,5	7,4
0,04	11,0	9,75
0,08	12,75	12,0



# Quantitative Bestimmung von Acyl-mercaptanen mittels der Nitroprussid-Reaktion

Von Feodor Lynen

Mit 2 Figuren im Text

(Eingelaufen am 26. Juli 1951)

Die Identifizierung der „aktivierten Essigsäure“ mit dem der Klasse der Acyl-mercaptane angehörenden Acetyl-CoA<sup>1)</sup> hat dem Interesse an dieser Körperklasse neuen Auftrieb verliehen und den Wunsch nach einer empfindlichen Bestimmungsmethode wachgerufen. Wie wir im Zusammenhang mit unserer Untersuchung über Acetyl-CoA fanden, läßt sich die für Acyl-mercaptane charakteristische „verzögerte“ Nitroprussid-Reaktion in dieser Weise verwenden.

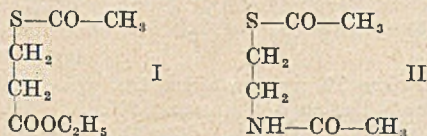
Versetzt man eine Mischung aus Acyl-mercaptan und Nitroprussidnatrium mit Alkali, so tritt zunächst Hydrolyse der Thioester-Bindung unter Freisetzung einer SH-Gruppe ein, welche sich dann mit dem Komplexsalz unter Bildung einer intensiven, allerdings nicht beständigen Rotviolett-Färbung weiter umsetzt.

Für quantitative Messungen wird diese Reaktion aber erst brauchbar, wenn man durch Zugabe von Ammonsulfat die Beständigkeit der Färbung und damit die Empfindlichkeit der Methode steigert.

An Reagentien werden benötigt:

1. 2-proc. wäßrige Lösung von kristallisiertem Nitroprussid-natrium ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ), die frisch bereitet und im Eisbad aufbewahrt wird
2. bei Zimmertemperatur gesättigte Lösung von Ammonsulfat in Wasser
3. konz. Ammoniak ( $D = 0,91$ ).

Als Modellsubstanzen kamen S-Acetyl- $\beta$ -mercapto-propionsäure-äthylester (I)<sup>2)</sup> und Diacetyl-thio-äthanolamin (II)<sup>3)</sup> in Anwendung, und zwar in 0,2- bzw. 1-proc. wäßriger Lösung. Da sie neutral reagieren, können diese Lösungen einige Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden, ohne dabei merkliche Hydrolyse zu erfahren.



<sup>1)</sup> F. Lynen, E. Reichert und L. Rueff, A. 574, 1 (1951).

<sup>2)</sup> Ich danke Herrn Privatdozent Dr. H. Behringer für die Überlassung größerer Mengen dieser Substanz.

<sup>3)</sup> Ich danke Herrn Prof. Th. Wieland, Universität Mainz, und Fräulein G. Vogelmann für Überlassung von kristallisierten Präparaten (Schmp. 23°) dieser Verbindung.



## Versuchsausführung

In rechteckige, mit Deckglas verschlossene Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke werden

- 0,01—0,1 ccm der wäßrigen Acyl-mercaptanlsg.,
- 0,9—0,99 ccm Wasser, um das Volumen auf 1 ccm zu bringen,
- 2 ccm Ammonsulfatlösung und
- 0,3 ccm Nitroprussid-natrium

gegeben und durchgemischt. Setzt man jetzt dieser Mischung, nachdem ihre Extinktion im Vergleich zu reinem Wasser gemessen wurde 0,3 ccm Ammoniak zu und beobachtet dann die Lichtabsorption bei der Hg-Linie 546 m $\mu$ , z. B. in

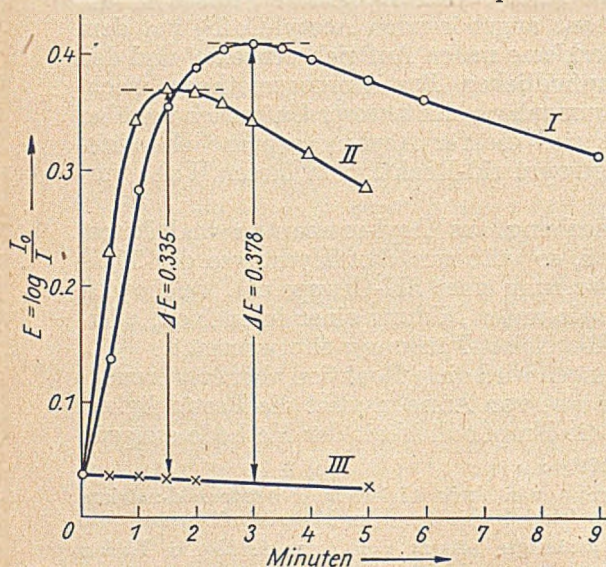


Fig. 1. Kinetik der Farbstoffbildung in Abhängigkeit von der Temperatur

I, II: 50,5  $\gamma$  Diacetyl-thio-äthanolamin, entsprechend 10  $\gamma$  Acyl-S bzw. 13,5  $\gamma$  CH<sub>3</sub>CO in 1 ccm H<sub>2</sub>O; III: 1 ccm H<sub>2</sub>O. Übrige Zusätze vgl. Text. Der Reaktionsansatz wurde vor Zugabe des NH<sub>3</sub> bei I auf 10°, bei II auf 35° gebracht, während III bei Raumtemperatur (24°) blieb.

dem für diesen Zweck vorzüglich geeigneten, direkt anzeigenden lichtelektrischen Photometer „Eppendorf“<sup>4)</sup>, dann nimmt man, wie in Fig. 1 zu sehen ist, in den ersten Minuten einen raschen Anstieg der Extinktion bis zu einem Maximum wahr, dem sich dann ein langsamer Abfall anschließt. Der ansteigende Ast der Kurve ist auf die die farbgebende SH-Gruppe liefernde Hydrolyse der Acyl-S-Bindung zurückzuführen, der Abfall auf die Unbeständigkeit der Nitroprussid-Färbung, auch in Gegenwart von Ammonsulfat. Wegen der Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Temperatur ist es nicht weiter verwunderlich, daß der Anstieg der Extinktionskurve ein steilerer ist und das Maximum früher erreicht wird, wenn die Reaktionsmischung bei Zugabe des Ammoniaks eine Temperatur von 35° hatte (Kurve II), als wenn der Ausgangspunkt bei nur 10° lag (Kurve I).

Da die Messungen ohne Thermostat ausgeführt wurden, betrug der Temperaturunterschied nur zu Beginn der Messung 15°. Er gleich sich während der Beobachtungszeit im Photometer durch Wärmeaustausch mit der Umgebung aus und war am Ende der Messung auf 6° zurückgegangen (29° bzw. 23°).

Ein Parallelansatz ohne Acyl-mercaptan (Kurve III) ließ nur einen langsamen, kaum nennenswerten Extinktionsabfall erkennen. Die uns interessierende, charakteristische Größe ist die Differenz

<sup>4)</sup> Elektromedizinische Werkstätten G. m. b. H., Hamburg.



$\Delta E$  zwischen dem Extinktions-Maximum  $E_{\text{Max}}$  und der Ausgangs-Extinktion  $E_0$ . Sie ist zwar, wie Fig. 1 erkennen läßt, in gewissem Umfang temperaturabhängig — bei tiefer Temperatur nimmt sie einen größeren Wert an als bei hoher — aber für den besonderen Fall, daß die Temperaturbedingungen innerhalb einer Versuchsreihe konstant gehalten werden, nur abhängig von dem vorhandenen Acyl-mercaptan und über einen weiten Bereich seiner Menge direkt proportional (Fig. 2).

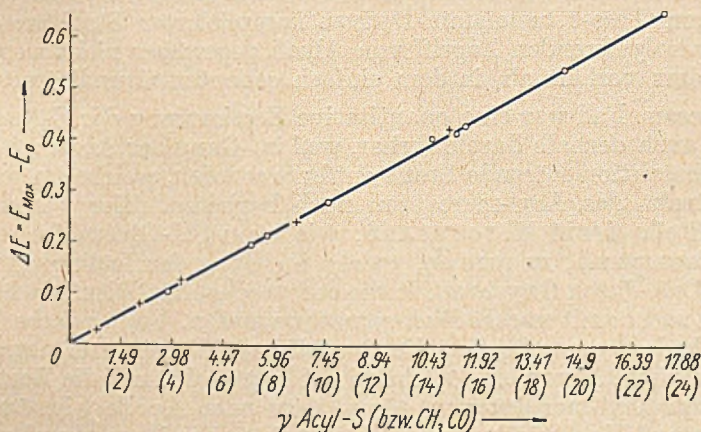


Fig. 2. Proportionalität zwischen Farbe und Acyl-mercaptan-Gehalt  
 + S-Acetyl- $\beta$ -mercapto-propionsäure-äthylester (I),  
 ○ Diacetyl-thio-äthanolamin (II)

Um auf einfache Weise die für quantitative Messungen erforderliche Temperaturkonstanz innerhalb einer Versuchsreihe zu erzielen, werden die Ansätze aus Lösungen zusammengestellt, welche bereits Raumtemperatur angenommen haben.

Wie Fig. 2 weiterhin erkennen läßt, besteht kein Unterschied, ob die Versuche mit Lösungen von S-Acetyl- $\beta$ -mercapto-propionsäure-äthylester (+) oder mit Diacetyl-thio-äthanolamin (○) ausgeführt wurden. Somit bietet sich die Möglichkeit, ganz allgemein den Gehalt einer Lösung an Acyl-S durch Vergleich des von ihr bei der Umsetzung mit Nitroprussid-natrium unter bestimmten Bedingungen gegebenen Färbung mit jener einer Standard-Lösung, deren Gehalt an I oder II festgelegt ist, zu ermitteln. Wie man aus der Figur ersehen kann, lassen sich auf diese Weise noch 0,75  $\gamma$  Acyl-S recht genau bestimmen, was 1  $\gamma$  an S gebundenem Acetyl (CH<sub>3</sub>CO) entspricht. Eine Empfindlichkeit übrigens, die sich durch Verwendung besonderer Küvetten ohne Schwierigkeiten noch weiter treiben ließe.



Es ist allerdings zu erwähnen, daß die alkalische Hydrolyse von I und II mit größenordnungsmäßig gleicher Geschwindigkeit erfolgt<sup>5)</sup>, so daß schon aus diesem Grunde gleichartiges Verhalten bei der Farbreaktion zu erwarten war. Wie sich in dieser Hinsicht ein wesentlicher Unterschied in der Spaltungsgeschwindigkeit — bedingt durch veränderte Mercaptan- bzw. Acylkomponente — auswirkt, muß noch geprüft werden.

Wir haben diese Methode des Vergleichs bisher dazu benützt, um in unseren aus Hefe isolierten Präparaten von Acetyl-CoA den Gehalt an Acyl-S zu ermitteln<sup>1)</sup>. Dies war ohne weiteres möglich, weil nach unseren Versuchen der an Schwefel gebundene Acetylrest in diesem Thio-äthanolamin-Derivat komplizierter Struktur sich dem hydrolysierenden Zugriff von Alkali gegenüber nicht wesentlich anders verhält als in dem einfach gebauten Grundkörper II.

In diesem Fall war eine quantitative Bestimmung der S-Acetylgruppe auch deshalb durchführbar, weil im Gang der Aufarbeitung die Farbreaktion störende Stoffe entfernt wurden, welche im rohen Hefeextrakt das Acyl-mercaptan noch begleiten. Hier wären an erster Stelle freie Mercaptane, wie etwa SH-Glutathion oder freies Coenzym A, zu nennen, welche im Gang der Isolierung von Acetyl-CoA durch Oxydation in die entsprechenden Disulfide übergeführt und damit unschädlich gemacht wurden. Von anderen biologisch bedeutsamen Stoffen, die ebenfalls mit Nitroprussid-natrium in alkalischer Lösung eine Färbung geben und deshalb die Bestimmung von Acyl-mercaptanen stören, seien noch Acetessigsäure, Aceton und Kreatinin erwähnt<sup>6)</sup>. Da sie sich in ihren chemischen Eigenschaften von Acetyl-CoA wesentlich unterscheiden, dürfte auch für den Fall ihres Vorhandenseins im rohen Hefeextrakt ihre Anwesenheit in unseren über mehrere Stufen gereinigten Präparaten ausgeschlossen sein. Im übrigen erfolgt die Bildung des Farbstoffs bei diesen Stoffen mit anderer Kinetik — bei Acetessigsäure z. B., die von uns eingehender studiert wurde, entwickelt sich die Färbung wesentlich langsamer als bei Acyl-mercaptanen —, so daß sich die Gegenwart solcher Verbindungen im Test sofort zu erkennen gäbe.

Zuletzt sei noch darauf hingewiesen, daß die Farbreaktion selbst verständlich auch von Stoffen gestört wird, die, wie elementares Jod, Jodacetat,  $As_2O_3$  usw., mit freien SH-Gruppen reagieren. In ihrer Gegenwart liegt das bei der Bestimmung erreichte Maximum der Absorption niedriger und erfolgt auch der nach Überschreiten des Maximums eintretende Extinktionsabfall mit größerer Geschwindigkeit, wie man es erwarten muß, wenn die durch das Alkali freigesetzte, farbgebende SH-Gruppe durch eine chemische Reaktion festgelegt wird.

<sup>5)</sup> G. Vogelmann, Diplomarbeit, München 1951.

<sup>6)</sup> Vgl. Beilstein, Hdb. org. Chemie.



Diese Empfindlichkeit der Methode gegenüber Störungen durch Begleitstoffe ist der Grund, warum es mir bisher noch nicht gelang, das Verfahren direkt auf rohen Hefekochsaft und auf Extrakte tierischer Gewebe anzuwenden. Die Bemühungen, dieser Schwierigkeiten Herr zu werden und ein allgemein anwendbares Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Acyl-mercaptanen zu entwickeln, werden jedoch fortgesetzt.

[Für die Gewährung einer Sachbeihilfe danke ich der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft bestens.

## Synthese der 3- und der 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose

Von *Karl Freudenberg* und *Klaus v. Oertzen*

(Aus dem Chemischen Institut der Universität und dem Forschungsinstitut für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide, Heidelberg)

(Eingegangen am 11. Juli 1951)

Glucose vermag 5 Disaccharide der  $\beta$ -Reihe mit aldehydischer Gruppe zu bilden. Von diesen wurde die Sophorose oder 2-( $\beta$ -Glucosido)-glucose von K. Freudenberg und K. Soff<sup>1)</sup> sowie A. M. Gachokidse<sup>2)</sup> synthetisch gewonnen und von J. Rabaté als Bestandteil eines Glucosides der *Sophora japonica* aufgefunden<sup>3)</sup>. Laminari-biose oder 3-( $\beta$ -Glucosido)-glucose haben L. Zechmeister und G. Tóth als Osazon aus Hefeglucan<sup>4)</sup> und V. C. Barry<sup>5)</sup> sowie J. J. Connell, E. L. Hirst und E. G. V. Percival<sup>6)</sup> aus Laminarin, einem Polysaccharid aus Algen, in freiem Zustand isoliert. Die Synthese fehlte bisher. Cellobiose oder 4-( $\beta$ -Glucosido)-glucose wurde von A. P. N. Franchimont aus Cellulose gewonnen<sup>7)</sup> und von K. Freudenberg und W. Nagai<sup>8)</sup> sowie W. T. Haskins, R. M. Hann und C. S. Hudson<sup>9)</sup> synthetisch bereitet. 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose war bisher unbekannt. Gentiobiose oder 6-( $\beta$ -Glucosido)-glucose wurde von E. Bourquelot und

<sup>1)</sup> Ber. **69**, 1245 (1936).

<sup>2)</sup> Journ. Obschtsch. Chim. **11**, 117 (1941); C. **1942**, I, 1502.

<sup>3)</sup> Bull. [5] **7**, 565 (1940); K. Freudenberg, H. Knauber und F. Cramer, Ber. **84**, 144 (1951).

<sup>4)</sup> Biochem. Z. **270**, 309 (1934).

<sup>5)</sup> Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. **22**, 423 (1941).

<sup>6)</sup> Chem. Soc. **1950**, 3494.

<sup>7)</sup> Ber. **12**, 1938 (1879); vgl. K. Freudenberg, Ber. **54**, 767 (1921).

<sup>8)</sup> Ber. **66**, 27 (1933).

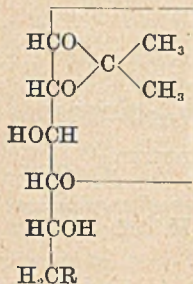
<sup>9)</sup> Am. Soc. **64**, 1289 (1942).



H. Hérissé<sup>10)</sup> aus Gentianose und von K. Freudenberg, C. C. Andersen, Y. Go, K. Friedrich und N. K. Richtmyer<sup>11)</sup> aus Amygdalin gewonnen. Die Synthese haben B. Helferich und W. Klein<sup>12)</sup> ausgeführt und D. D. Reynolds und W. L. Evans<sup>13)</sup> variiert.

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese der Laminari-biose mitgeteilt sowie die Reihe dieser Biosen durch die Synthese der 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose abgeschlossen.

Ältere Versuche haben ergeben, daß Monacetonglucose-6-bromhydrin (I) mit Acetobromglucose am Hydroxyl 5 umgesetzt werden kann<sup>14)</sup>. Versuche, das Brom unmittelbar oder auf Umwegen gegen Hydroxyl auszutauschen, haben jedoch zu Derivaten des 5-Glucosido-3,6-glucoseanhydrids geführt<sup>15,16)</sup>.



I R = Br

II R = OCOCH<sub>3</sub>

III R = OSO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>7</sub> (Tosyl)

IV R = OSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (Mesyl)

Aus diesem Grunde wurden Versuche mit den entsprechenden Acyl-Verbindungen II–IV angestellt. Bei der Umsetzung mit Acetobromglucose und Silberoxyd wurde Jod<sup>17)</sup> und entwässerter Gips<sup>13)</sup> zugesetzt. Die Rohprodukte wurden acetyliert. Die Ausbeute an 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucosederivat V, VI, VII erreichte bei Verwendung von Monaceton-6-mesyl-glucose (IV) durchschnittlich 40% der zu erwartenden Menge, bei II und III nur etwa halb soviel.

Daneben entsteht aus der Acetylverbindung II in verschwindender Menge, aus den beiden Sulfonsäureestern III und IV mit greifbarer Ausbeute (6%) das entsprechende Derivat VIII, IX, X der 3-( $\beta$ -Glucosido)-glucose.

Die Sulfonsäureester VI, VII, IX und X werden mit Natriumacetat in Eisessig-Acetanhydrid<sup>18)</sup> in die Acetate V bzw. VIII umgewandelt.

Besonderer Prüfung bedurfte die Frage, ob, wie oben vorausgesetzt, das Hauptprodukt das 5- und das Nebenprodukt das 3-Disaccharid ist.

<sup>10)</sup> Compt. rend. hebdom. 132, 575 (1901).

<sup>11)</sup> Ber. 63, 1961 (1930).

<sup>12)</sup> A. 450, 219 (1926).

<sup>13)</sup> Am. Soc. 60, 2559 (1938).

<sup>14)</sup> K. Freudenberg, H. Toepffer und C. C. Andersen, Ber. 61, 1750 (1928).

<sup>15)</sup> K. Freudenberg, H. Toepffer und S. H. Zaheer, Ber. 63, 1966 (1930).

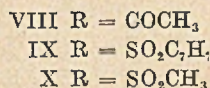
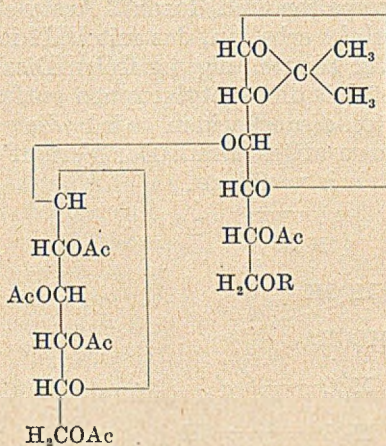
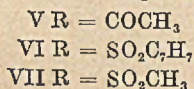
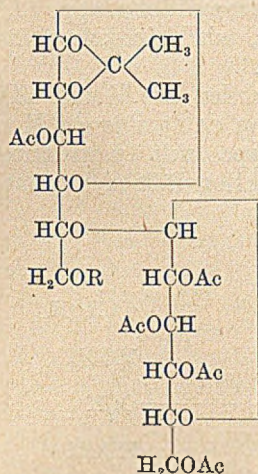
<sup>16)</sup> K. Freudenberg und C. Knoevenagel, Ber. 73, 441 (1940).

<sup>17)</sup> B. Helferich, E. Bohn u. S. Winkler, Ber. 63, 989 (1930).

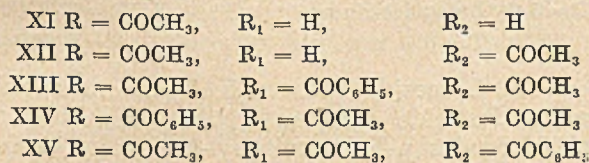
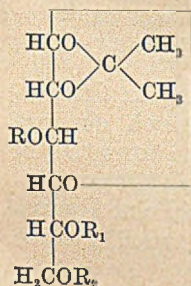
<sup>18)</sup> Vgl. B. Helferich und A. Gnüchtel, Ber. 71, 712 (1938).



Die bekannte Monaceton-3-acetyl-glucose (XI) nimmt mit 1 Mol Acetylchlorid (nicht mit Acetanhydrid) ein Acetyl an der gewünschten Stelle (6) auf. Das entstandene Diacetat muß die Kon-



stitution der Monaceton-3,6-diacetyl-glucose (XII) haben. Dafür spricht seine Entstehung sowie die Feststellung, daß es ein Benzoat (XIII) bildet, das von den beiden bekanntesten Isomeren XIV<sup>19)</sup> und XV<sup>20)</sup> verschieden ist. Das Diacetat XII liefert mit Acetobrom-



glucose das Monaceton-hexa-acetyl-disaccharid V, dessen Konstitution damit bewiesen ist.

Um die Konstitution des zweiten Disaccharid-Derivates (VIII) zu bestimmen, wurde die Diaceton-glucose herangezogen, die einzig

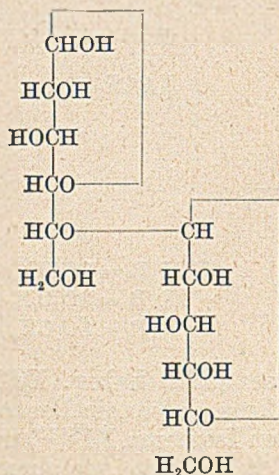
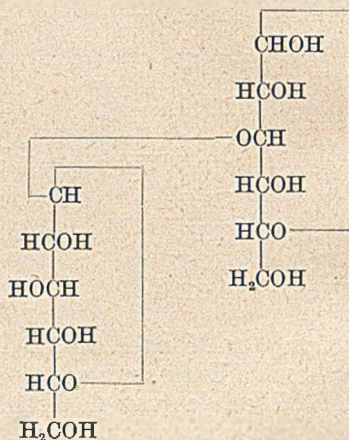
<sup>19)</sup> P. Brigl und H. Grüner, Ber. 66, 1977 (1933).

<sup>20)</sup> H. Ohle, E. Euler und R. Lichtenstein, Ber. 62, 2885 (1929).



in 3-Stellung ein freies Hydroxyl besitzt<sup>21</sup>). Auch mit den heutigen Hilfsmitteln gelingt ihre Umsetzung nur mit einer Ausbeute von 4%, und es war nicht möglich, das erwartete Diaceton-tetra-acetyl-disaccharid zu fassen. Erst wenn die labilere Isopropylidengruppe (5,6) abgespalten und durch 2 Acetyle ersetzt ist, wird ein kristallines Produkt erhalten, das mit VIII identisch ist.

Zur Herstellung der freien Disaccharide werden aus V und VIII zunächst die Acetylgruppen entfernt. Aus den entstandenen Monaceton-disacchariden wird die Acetongruppe mit verdünnten Säuren abgespalten. Der Verlauf dieser Reaktion läßt sich polarimetrisch verfolgen.

XVI = 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucoseXVII = 3-( $\beta$ -Glucosido)-glucose  
= Laminari-biose

Die 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose (XVI) ist noch nicht in kristallisiertem Zustande erhalten worden. Sie liefert jedoch ein gut kristallisierendes p-Toluolsulfonyl-hydrizon. Osazone konnten in reinem Zustande nicht erhalten werden. Während die anderen Bioside Pyranosido-pyranosen sind, ist das 5-Disaccharid eine Pyranosido-furanose. Diese Sonderstellung scheint sich auch in der Drehung auszudrücken.

Biose	2	3	4	5	6
$[\alpha]_D^{20}$ in Wasser (Gleichgewicht)	+18°	+20,8	+35,2	-23,8	+9,6

Der Zucker reduziert Fehlingsche Lösung; sein Geschmack ist bitter-süß.

<sup>21</sup>) K. Freudenberg und A. Doser, Ber. 56, 1243 (1923).

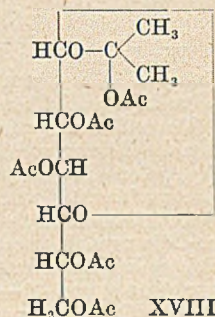


Die 3-( $\beta$ -Glucosido)-glucose kristallisiert leicht. Die Enddrehung des Zuckers und die Drehung des Osazons stimmt mit den Angaben von Connell, Hirst und Percival sowie Zechmeister und Tóth genügend überein; die Zersetzungspunkte liegen um 20–30° höher. Auch dieses Disaccharid bildet mit Toluolsulfonsäurehydrazid, das sich schon früher gut bewährt hat<sup>22</sup>), ein schönes Hydrazon. Das Disaccharid reduziert Fehlingsche Lösung und schmeckt süß.

In diesem Zusammenhang wurde die von H. H. Schlubach, W. Rauchenberger und A. Schultze<sup>23</sup>) sowie von P. Brigl und W. Zerrweck<sup>24</sup>) entdeckte sogenannte Pentacetyl-monaceton-glucose (XVIII) aus Monaceton-triacetyl-glucose nach neuem Verfahren hergestellt. In der Monaceton-glucose und ihrem Triacetat sind zwei 5-Ringe miteinander verknüpft, was bei cyclischen Acetalen nach bisherigen Erfahrungen nur in *cis*-Stellung möglich ist. Beim Übergang zu XVIII wird der Ring am Sauerstoff 2 geöffnet<sup>23</sup>).

Damit ist die Konfiguration am C-Atom 1 in XVIII bestimmt. XVIII ist ein acetyliertes  $\alpha$ -Glucofuranosid. Die molekulare Drehung beträgt +270°. Die zugehörige  $\beta$ -Verbindung dreht +13,5°.

Das aus dem höherdrehenden 2,3-Diacetyl-äthyl-furanosid-5,6-carbonat<sup>25</sup>) gewonnene rechtsdrehende Äthyl-glucofuranosid ist daher im Einklang mit der bisherigen Auffassung gleichfalls ein  $\alpha$ -Furanosid, weil die Glucosidgruppe auf derselben Seite liegt wie der Sauerstoff an der für die *d*- und *l*-Zuteilung maßgebenden Gruppe 5. Somit bietet die Verbindung XVIII einen Beitrag zu der noch immer nicht ganz befriedigenden Konfigurationsbestimmung der Glucoside.



### Beschreibung der Versuche

Diacetonglucose<sup>26</sup>), Monoacetonglucose<sup>27</sup>), Monoaceton-6-acetylglucose<sup>28</sup>) und Acetobromglucose<sup>29</sup>) wurden nach bekannten Vorschriften hergestellt.

<sup>22</sup>) K. Freudenberg und F. Blümmel, A. 440, 45 (1924).

<sup>23</sup>) Ber. 66, 1248 (1933).

<sup>24</sup>) Ber. 66, 936 (1933).

<sup>25</sup>) W. N. Haworth und C. R. Porter, Chem. Soc. 1929, 7296; W. N. Haworth, C. R. Porter und A. C. Waine, ebenda 1932, 2254.

<sup>26</sup>) O. Th. Schmidt und A. Simon, Journ. prakt. Chem. 152, 190 (1939).

<sup>27</sup>) K. Freudenberg und H. v. Hochstetter, Ber. 61, 1741 (1928).

<sup>28</sup>) E. Fischer und H. Noth, Ber. 51, 321, 336 (1918).

<sup>29</sup>) M. Barczai-Martos und F. Korösy, Nature 165, 369 (1950). Das Rohprodukt wird aus Äther oder einfacher aus Methanol-Wasser (K. Freudenberg, A. Noë und E. Knopf, Ber. 60, 241 (1927)) umkristallisiert.



## 1,2-Aceton-6-tosylglucose (III)

Zu dem Verfahren von H. Ohle und E. Dickhäuser<sup>30)</sup> ist zu bemerken, daß die Lösung des Tosylchlorids in Chloroform zweckmäßig unter Eiskühlung zutropft wird, so daß die Temperatur nicht wesentlich über 0° steigt. Die zunächst orange gefärbte Lösung entfärbt sich beim Stehen bei Zimmertemperatur allmählich; dann ist die Reaktion beendet. Die weitere Aufarbeitung geschieht wie vorgeschrieben. Die Ätherlösung wird aber nur bis auf 30 ccm eingedampft und das Produkt unmittelbar durch Zugabe von Petroläther zur Kristallisation gebracht. So läßt sich die Rohausbeute auf 80% d. Th. steigern. Zur Reinigung wird in der dreifachen Menge Methanol gelöst und sehr langsam mit Wasser ausgefällt. Ausbeute an reinem Produkt 65—70% d. Th.

## 1,2-Aceton-6-mesylglucose (IV)

Die Lösung von 25 g Monoacetonglucose in 200 ccm trockenem Pyridin befindet sich in einem mit Rührer, Tropftrichter und Calciumchlorid-Rohr versehenen Rundkolben, der von einer gut wirkenden Eis-Kochsalz-Mischung umgeben ist. Man tropft nun unter kräftigem Rühren innerhalb von etwa 1½ Stunden die Lösung von 13,0 g Mesylchlorid (1 Mol) in 75 ccm reinem Chloroform zu; die Außentemperatur soll dabei — 15° nicht überschreiten. Nach Beendigung des Eintropfens läßt man — unter ständigem Rühren — die Kältemischung allmählich auftauen; nach einigen Stunden hat sie Zimmertemperatur angenommen und die zunächst orange gefärbte Lösung ist hell geworden. Sie wird über Nacht selbst überlassen und entfärbt sich dabei vollends. Bei einer Wasserbadtemperatur von 40—45° vordampft man i. V. das Chloroform und den größten Teil des Pyridins, versetzt den Rückstand unter Kühlung bis zur schwach sauren Reaktion mit verd. Schwefelsäure und schüttelt ihn zehnmal mit je 100 ccm Essigester aus. Die vereinigten Extrakte werden schnell mit 50 ccm Eiswasser gewaschen und mit möglichst wenig gesättigter kalter KHCO<sub>3</sub>-Lösung entsäuert.

Die mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknete Lösung hinterläßt beim Eindampfen i. V. einen Sirup. Eine Probe, in sehr wenig Aceton gelöst, liefert auf Zugabe von etwa 10 Vol. Benzol beim Anreiben Impfkristalle, mit deren Hilfe die Hauptmenge kristallisiert. Rohausbeute etwa 30 g = 89% d. Th.

Zur Reinigung wird in 60 ccm warmem Essigester gelöst und nach Erkalten bis zur beginnenden Trübung mit Petroläther versetzt. Nach Animpfen erhält man einen festen Kristallbrei. Das abgesaugte Produkt wird nochmals in der gleichen Weise umkristallisiert und ist dann rein. Ausbeute 20 g = 60% d. Th. Feine farblose Nadeln, Schmp. 99°.

Das Produkt ist leicht löslich in Wasser (etwa 35%), Aceton, Alkohol und Essigester; wenig löslich in Äther, Chloroform, Benzol und Tetrachlorkohlenstoff; unlöslich in Petroläther.

C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> S (298,28)	Ber. C 40,27	H 6,07	S 10,75
	Gef. » 40,52	» 6,19	» 10,68

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0,784 \cdot 5}{0,3922 \cdot 1} = -10,0^\circ \text{ (Methanol)}$$

## 1,2-Aceton-3,5-diacetyl-6-mesylglucose

1 g der vorstehenden Mesylverbindung wird in 3 ccm Pyridin mit 2 ccm Acetanhydrid bei Zimmertemperatur acetyliert. Nach 24 Stunden kristallisiert

<sup>30)</sup> Ber. 58, 2593, 2602 (1925).



auf Wasserzusatz das Diacetat aus. Umkristallisation aus Methanol ergibt 1,2 g = 95% d. Th. Derbe, farblose Nadeln, Schmp. 143°.

$C_{14}H_{22}O_{10}S$ (382,36)	Ber. C 43,97	H 5,80	S 8,38
	» » 44,13	» 5,82	» 8,22

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+0,162 \cdot 5}{0,2263 \cdot 1} = +3,6^\circ \text{ (Chloroform)}$$

### 1,2-Aceton-3,6-diacetylglucose (XII)

Zu der auf mindestens  $-15^\circ$  gekühlten Lösung von 38 g 1,2-Aceton-3-acetylglucose<sup>31)</sup> in 120 ccm trockenem Pyridin werden 11,4 g (1 Mol) Acetylchlorid, mit 90 ccm reinem Chloroform verdünnt, unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß innerhalb 90 Minuten zugetropft. Nachdem das Gemisch unter weiterem Rühren langsam Raumtemperatur angenommen hat, überläßt man es bis zum anderen Morgen sich selbst, engt es dann bei einer Badtemperatur bis zu  $45^\circ$  i. V. ein und nimmt den dünnen Sirup in 200 ccm Essigester auf. Dieser Lösung entzieht man das Pyridin mit verd. Schwefelsäure, schüttelt die wäßrige Schicht noch zweimal mit je 50 ccm Essigester aus, wäscht die vereinigten Extrakte mit Wasser und  $KHCO_3$ -Lösung und trocknet sie mit  $Na_2SO_4$ . Nach Verdampfen des Lösungsmittels an der Wasserstrahlpumpe bleibt ein gelber Sirup zurück, der beim Anreiben bald durchkristallisiert. Rohausbeute 40 g = 90% d. Th. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus 20 ccm Isobutanol: 25,5 g = 62%. Die Mutterlauge ergibt mit 90 ccm Petroläther eine zweite Fraktion; aus Isobutanol umkristallisiert: 3,5 g. Die Gesamtausbeute an reinem Produkt beträgt 29 g = 66% d. Th. Durchsichtige farblose Polyeder, Schmp. 96°. Leicht löslich in Methanol, Essigester, Aceton, Chloroform; mäßig in Wasser; schwerlöslich in Tetrachlorkohlenstoff; unlöslich in Petroläther.

$C_{13}H_{20}O_8$ (304,29)	Ber. C 51,31	H 6,63	Acetyl 28,39
	Gef. » 51,15	» 6,64	» 29,00

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+0,207 \cdot 5}{0,0963 \cdot 1} = +10,7^\circ \text{ (Chloroform)}$$

### 1,2-Aceton-3,6-diacetyl-5-benzoylglucose (XIII)

2 g der vorstehenden Diacetylverbindung werden in 4 ccm Pyridin gelöst und unter Kühlung mit 0,9 g (1 Mol; keinen Überschuß verwenden) Benzoylchlorid versetzt. Nach 20-stündigem Stehen bei  $37^\circ$  wird das farblose Gemisch mit Eis zersetzt und das sich abscheidende Öl in Essigester aufgenommen. Nach der üblichen Aufarbeitung hinterbleibt ein Sirup, der in 2 ccm warmem Isobutanol gelöst und nach dem Erkalten allmählich mit 25 ccm Petroläther versetzt wird. Beim Anreiben scheidet sich das Benzoat aus; später werden weitere 5 ccm Petroläther zugegeben, nach einigen Stunden saugt man ab. 1,8 g = 67%, Schmp. 91–94°. Nach Umkristallisation aus Methanol: 1,1 g = 41% d. Th. Durchsichtige farblose Polyeder ähnlich XII, Schmp. 94°, Mischschmp. mit XII etwa  $72^\circ$ .

$C_{20}H_{24}O_9$ (408,39)	Ber. C 58,82	H 5,92
	Gef. » 58,94	» 5,83

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+0,898 \cdot 5}{0,3066 \cdot 1} = +14,6^\circ \text{ (Chloroform)}$$

<sup>31)</sup> K. Josephson, A. 472, 217 (1929).



Zum Vergleich werden die Daten für die isomeren Verbindungen angeführt:

XIV Schmp. 78°,  $[\alpha]_D^{20} = -26,7^\circ$

XV » 108°, » = + 7,1°

### 1,2-Aceton-3-acetyl-5,6-dimesylglucose

Die Lösung von 1 g Monoaceton-3-acetylglucose<sup>31)</sup> in 5 cem Pyridin wird mit 1,5 cem Mesitylchlorid versetzt. Die kräftige Wärmetönung wird durch Wasserkühlung abgefangen und die Mischung bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Am nächsten Morgen ist sie dunkelbraun und erstarrt. Sie wird mit Wasser zersetzt, die Kristallmasse zerdrückt, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Man löst sie in Aceton, filtriert von dunklen Flocken ab und entfärbt das dunkelgelbe Filtrat mit Kohle. Mit Wasser fallen Nadeln aus: 1,2g = 75% d. Th. Nach Umkristallisation aus 40 cem Methanol ist die Substanz rein. Farblose Nadeln, Schmp. 171°, bei 178° Zers. Löslich in Aceton und Essigester, mäßig löslich in Chloroform, wenig in Äther.

$C_{13}H_{22}O_{11}S_2$  (418,43) Ber. C 37,31 H 5,30 S 15,32  
Gef. » 37,25 » 5,23 » 15,24

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0,508 \cdot 2}{0,0462 \cdot 1} = -22,0^\circ \text{ (Aceton)}$$

### Die Umsetzung mit Acetobromglucose (vgl. 1<sup>3)</sup>)

Das Reaktionsgefäß ist ein Rundkolben, der Rührer, Tropftrichter und  $CaCl_2$ -Rohr trägt und mit schwarzem Papier umwickelt ist. In ihm werden Reaktionskomponente, Silberoxyd und Gips in Chloroform gelöst bzw. aufgeschlämmt und zur Trocknung eine Stunde gerührt. Dann wird Jod zugefügt und die in Chloroform gelöste Acetobromglucose in  $1\frac{1}{2}$  bis 2 Stunden zugetropfelt. Die Menge der Acetobromglucose ist der Reaktionskomponente äquivalent. Man rührt weiter, bis die Reaktion beendet ist, saugt von Gips und Silberverbindungen ab und wäscht mit Chloroform nach.

Ist noch gelöstes Jod vorhanden, so entfernt man es durch Ausschütteln mit verd. Thioisulfatlösung. Andernfalls schüttelt man nur mit Wasser.

Die getrocknete Lösung wird i. V. zum Sirup eingedampft, dessen Weiterverarbeitung bei den einzelnen Versuchen beschrieben ist.

Das Ende der Reaktion erkennt man daran, daß keine Acetobromglucose mehr vorhanden ist: Eine filtrierte Probe von etwa 1 cem wird falls nötig durch Schütteln mit Quecksilber von Jod befreit und vorsichtig zum Sirup eingedampft. Diesen kocht man eine Minute mit 1—2 cem Wasser, um glucosidisches Brom abzuhydrolysieren. Klare Auflösung tritt dabei nur dann ein, wenn die Kupplungskomponente wasserlöslich und erst wenig Disaccharidderivat gebildet ist. Nach Abkühlen und Filtrieren versetzt man mit einem Tropfen konz.  $HNO_3$  und  $AgNO_3$ -Lösung. War noch Acetobromglucose zugegen, so fällt  $AgBr$  aus; sonst ist die Reaktion beendet.

Für ihre Dauer läßt sich keine genaue Angabe machen, sie schwankt zwischen einer und zwanzig Stunden, vom Ende des Eintropfens an gerechnet; auch noch längere Dauer wurde beobachtet.

Das käufliche Chloroform wird gereinigt durch Schütteln mit konz.  $H_2SO_4$ , bis diese farblos bleibt, Waschen mit Wasser, verd. Sodalösung und nochmals mit Wasser. Dann wird es einige Stunden mit  $CaCl_2$  geschüttelt, 24 Stunden über



frisch geglühter Pottasche stengelassen und in einer braunen Flasche über dem gleichen Trockenmittel aufbewahrt.

Das Silberoxyd wurde nach B. Helferich und W. Klein<sup>12)</sup> hergestellt.  
Gips: Gefällter, trockener Gips wird 2 Stunden auf 240° erhitzt.

5-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-3,6-diacetylglucose (V)  
aus 1,2-Aceton-3,6-diacetylglucose (XII)

Eingesetzt werden:

16 g XII in 50 ccm Chloroform,  
50 g Gips, 13 g Ag<sub>2</sub>O, 2,7 g Jod.  
21,6 g Acetobromglucose in 90 ccm Chloroform.

Weiterverarbeitung des Sirups: Er wird in 50 ccm Methanol gelöst und allmählich mit Wasser versetzt, wobei man jeweils nur eine leichte Trübung hervorrufft und wartet, bis die Lösung über den abgeschiedenen Kristallen wieder klar ist. Bleibt die Trübung stundenlang bestehen, so saugt man ab und wäscht mit wenig Methanol nach.

Das Rohprodukt (Nadeln) wird aus 35 ccm Methanol umkristallisiert: 3,5 g = 10,5% d. Th.

Feine Nadeln oder dicke, mehrseitige, bisweilen rechteckige Prismen, Schmp. 173°. Die beiden Kristallformen lassen sich ineinander überführen: Beim schnellen Abkühlen und Anreiben entstehen Nadeln, bei langsamer Kristallisation Prismen. Je reiner das Produkt ist, desto größer ist seine Neigung, die Prismen auszubilden. Der Schmp. beider Formen ist der gleiche.

Leicht löslich in Chloroform, Essigester, Aceton; löslich in heißem Methanol und heißem Tetrachlorkohlenstoff; unlöslich in Wasser und Petroläther.

C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>17</sub> (634,57)	Ber. C 51,10	H 6,03	Acetyl 40,70
	Gef. » 50,97	» 6,15	» 40,48

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{-1,008 \cdot 5}{0,1752 \cdot 1} = -28,8^{\circ}(\text{Chloroform})$$

3-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-5,6-diacetylglucose (VIII)  
aus Diaceton-glucose

Eingesetzt werden:

13,4 g Diacetonglucose in 50 ccm Chloroform,  
50 g Gips, 12,5 g Ag<sub>2</sub>O, 2,5 g Jod.  
21,2 g Acetobromglucose in 80 ccm Chloroform.

Das Reaktionsgemisch wird hier nicht mit Wasser ausgeschüttelt, etwa noch gelöstes Jod wird mit Quecksilber entfernt. Weiterverarbeitung des Sirups: Er wird in 45 ccm Eisessig auf der Schüttelmaschine gelöst, mit 11 ccm Wasser versetzt und 2–3 Tage bei Raumtemperatur stengelassen, um dann i. V. möglichst weitgehend eingengt zu werden. Der dicke Kristallbrei besteht im wesentlichen aus Monoacetonglucose. Zur Vervollständigung ihrer Abscheidung fügt man 150 ccm Essigester zu und bewahrt über Nacht im Eisschrank auf. Nach Absaugen und Waschen mit Essigester bleiben 4,8 g Monoacetonglucose zurück; das entspricht 5,7 g oder 42% nicht umgesetzter Diaceton-glucose.

Die Essigester-Lösung wird an der Pumpe zum Sirup eingedampft und dieser mit 20 ccm Pyridin und 20 ccm Acetanhydrid acetyliert. Nach Aufarbeitung mit Chloroform als Lösungsmittel erhält man einen braunen Sirup und aus diesem durch Anreiben mit 30 ccm Methanol und spätere vorsichtige Wasserzugabe 1,3 g = 4% d. Th. des Disaccharidderivates, das mit Methanol gewaschen wird.

Es wird durch Lösen in 6 ccm siedendem Chloroform und Versetzen mit 20 ccm siedendem Methanol gereinigt. Beim langsamen Abkühlen kristallisieren stark lichtbrechende, farblose, quadratische Täfelchen, Schmp. 201°. Leicht



löslich in Chloroform, mäßig in Essigester, wenig in heißem Methanol, unlöslich in kaltem Methanol, Wasser und Petroläther.

$C_{27}H_{38}O_{17}$ (634,57)	Ber. C 51,10	H 6,03	Acetyl 40,70
	Gef. » 51,19	» 6,11	» 40,79

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-2,094 \cdot 5}{0,3337 \cdot 1} = -31,4^\circ \text{ (Chloroform)}$$

3-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-5,6-diacetylglucose (VIII)  
und  
5-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-3,6-diacetylglucose (V)  
aus 1,2-Aceton-6-acetylglucose (II)

Eingesetzt werden:

10 g II in 125 cem Chloroform (nur teilweise Lösung),  
50 g Gips, 9 g  $Ag_2O$ , 2 g Jod.  
15,7 g Acetobromglucose in 125 cem Chloroform.

Weiterverarbeitung des Sirups: Er wird mit 20 cem Pyridin und 15 cem Acetanhydrid acetyliert. Am nächsten Tag wird die hellbraune Lösung bei  $45^\circ$  i. V. eingengt und unter Eiskühlung mit verd. Schwefelsäure bis zur eben sauren Reaktion versetzt; dabei scheiden sich Kristalle ab. Das Ganze wird gründlich mit 300 cem Chloroform durchgeschüttelt, bis die Kristalle verschwunden sind, die Chloroformschicht mit Wasser und Bicarbonat gewaschen und mit Natriumsulfat unter Zusatz von Kohle getrocknet.

Beim Eindampfen i. V. bleibt eine gelbe Kristallmasse zurück. Sie wird in wenig warmem Eisessig gelöst. Nach dem Erkalten gibt man reichlich Wasser zu: Jetzt ist das Produkt farblos. Man kristallisiert es aus 100 cem Methanol um: dabei kommen nur die quadratischen Plättchen des 3-( $\beta$ -Glucosido-)glucose-Derivates heraus. Ausbeute 0,4 g = 1,6 % d. Th. Schmp.  $201^\circ$ . Der Mischschmp. mit dem vorstehenden Präparat zeigt keine Depression.

Die Mutterlauge wird i. V. bis auf 30—40 cem eingedampft und ergibt so 3,6 g = 15% d. Th. an noch nicht reinem Isomeren; es schmilzt nach mehrfacher Umkristallisation aus Methanol bei  $171^\circ$ . Der Mischschmp. mit dem aus XII gewonnenen Disaccharidderivat ist ebenfalls  $171^\circ$ .

3-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-5-acetyl-6-tosylglucose (IX)  
und  
5-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-3-acetyl-6-tosylglucose (VI)  
aus 1,2-Aceton-6-tosylglucose (III)

Eingesetzt werden:

23,5 g III in 200 cem Chloroform (zunächst bildet sich eine Lösung, nach wenigen Minuten ein Kristallbrei von III mit Kristallchloroform), 60 g Gips, 15,6 g  $Ag_2O$ , 3,1 g Jod. 25,8 g Acetobromglucose in 100 cem Chloroform.

Weiterverarbeitung des Sirups: Er wird mit 35 cem Pyridin und 30 cem Acetanhydrid acetyliert. Am nächsten Tag engt man die braune Lösung bei  $45^\circ$  i. V. ein und versetzt unter Eiskühlung bis zur eben sauren Reaktion mit verd.  $H_2SO_4$ ; dabei scheidet sich meist nur ein Öl ab. Es wird in 170 cem Essigester aufgenommen, wie üblich gewaschen und unter Zusatz von Kohle getrocknet. Man fügt dann im Laufe einiger Stunden 90—100 cem Petroläther zu und saugt 12 Stunden später ab: 12,6 g = 27% d. Th. an manchmal noch schwach gefärbtem Rohprodukt, Umkristallisation aus 40 cem Methanol liefert zwei Fraktionen:

1. Fraktion: 9,8 g = 21%, farblose, feine Nadeln, Schmp. nach kurzem Sintern  $147^\circ$ , bei  $155^\circ$  Zers. Diese Fraktion ist ebenso wie das Rohprodukt ein Gemisch der beiden Isomeren IX und VI, wie die Umesterung ergibt (s. u.).



2. Fraktion: 1,7 g = 3,5% d. Th., gleichfalls farblose, feine Nadeln, Schmp. nach nochmaliger Umkristallisation scharf 155°, Zers. bei 205°. Diese Fraktion ist die reine Verbindung VI.

Leicht löslich in Chloroform und Essigester, wenig in Äther und Tetrachlorkohlenstoff; unlöslich in Wasser und Petroläther.

$C_{32}H_{42}O_{18}S$ (746,72)	Ber. C 51,47	H 5,67	S 4,29
	Gef. » 51,62	» 5,72	» 3,94

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-1,045 \cdot 5}{0,4045 \cdot 1} = -12,9^\circ \text{ (Chloroform)}$$

Das Gemisch (VI und IX) hat dieselbe Zusammensetzung und dreht in Chloroform — 16,3°.

3-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-5-acetyl-6-mesylglucose (X)  
und

5-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-3-acetyl-6-mesylglucose (VII)  
aus 1,2-Aceton-6-mesylglucose (IV)

Eingesetzt werden:

22,0 g IV in 220 ccm Chloroform, in dem sich die Substanz nur teilweise löst, 72 g Gips, 18,4 g  $Ag_2O$ , 3,6 g Jod. 30,3 g Acetobromglucose in 110 ccm Chloroform.

Der Sirup wird mit 35 ccm Pyridin und 30 ccm Acetanhydrid acetyliert. Dabei färbt sich die Lösung gelbbraun, und es scheidet sich eine dicke Kruste gelber grober Kristalle ab. Am nächsten Tag wird, wie beim vorigen Präparat beschrieben, aufgearbeitet: Auf Zusatz der Säure schreitet die Kristallisation fort; als Lösungsmittel wird Chloroform verwendet. Nach dessen Verdampfen bleibt eine gelbliche Kristallmasse zurück, die auf dem Wasserbad in 160 ccm Aceton gelöst wird. Zusatz von 400 ccm Methanol bewirkt die Abscheidung des Reaktionsproduktes, die schließlich im Eisschrank vervollständigt wird. Rohausbeute 19,8 g = 40% d. Th. Zur Reinigung wird in 100 ccm warmem Eisessig gelöst und mit 400 ccm Wasser wieder ausgefällt. Schließlich wird abgesaugt und ohne Trocknung aus 1350 ccm Methanol umkristallisiert. Sehr langsames Abkühlen begünstigt die Entstehung gut ausgebildeter Kristalle. Ausbeute 18,8 g = 38% d. Th. Mehrere cm-lange, schmale, farblose Prismen, Schmp. 207° unter späterer Zers. Die Umesterung zeigt, daß VII vorliegt.

Leicht löslich in Chloroform, mäßig löslich in Essigester und heißem Methanol, schwer löslich in Äther, Tetrachlorkohlenstoff und kaltem Methanol, unlöslich in Wasser und Petroläther.

$C_{28}H_{38}O_{18}S$ (670,60)	Ber. C 46,56	H 5,71	S 4,78
	Gef. » 46,66	» 5,87	» 4,60

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0,932 \cdot 10}{0,3413 \cdot 1} = -27,3^\circ \text{ (Chloroform)}$$

Aus der Mutterlange des Rohproduktes erhält man das Isomere X: Man dampft sie i. V. zunächst auf die Hälfte ein und filtriert von wenig nachgefallenem VII ab. Das Filtrat engt man weiter, bis auf etwa 40 ccm, ein und saugt nach einigen Stunden ab: 3,2 g = 6,5% gelber feiner Nadeln. Die Entfärbung geschieht wieder durch Lösen in wenig warmem Eisessig und Ausfällen mit Wasser; dann wird aus 30 ccm Methanol umkristallisiert: 2,0 g = 4% d. Th.

$C_{28}H_{38}O_{18}S$ (670,60)	Ber. C 46,56	H 5,71	S 4,78
	Gef. » 46,54	» 5,75	» 4,60

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-2,328 \cdot 5}{0,3314 \cdot 1} = -35,1^\circ \text{ (Chloroform)}$$



3-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-5,6-diacetylglucose (VIII)  
 und  
 5-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-3,6-diacetylglucose (V)  
 aus IX und VI

14 g des umkristallisierten Isomeregemisches IX und VI worden in 34 ccm Eisessig + 170 ccm Acetanhydrid gelöst und mit 12,6 g entwässertem Natriumacetat versetzt. Beim Erhitzen löst sich auch dieses. Nach 5-stündigem Kochen am Rückfluß unter Feuchtigkeitsausschluß wird bei 80—90 mm Hg (Bad etwa 90°; so läßt sich vorzeitige Kristallisation verhindern) bis fast zur Trockne eingedampft. Auf Zusatz von 350 ccm Wasser gehen die Salze in Lösung und es scheidet sich ein Öl ab, das bald erstarrt. Die Masse wird mit Wasser gewaschen und in 200 ccm Chloroform aufgenommen. Bicarbonatlösung entzieht die letzte Säure; dann trocknet und entfärbt man durch Schütteln mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Kohle. Der beim Einengen i. V. zurückbleibende Sirup wird in 350 ccm heißem Methanol gelöst; dann läßt man 12 Stunden stehen, saugt ab, wäscht mit Methanol und erhält so 2,8 g = 23,5% VIII. Reinigung durch Lösen in 6 ccm heißem Chloroform und Versetzen mit 40 ccm heißem Methanol: 2,0 g, Schmp. 201°. Das Produkt ist identisch mit dem aus Diacetylglucose und Aceto-bromglucose gewonnenen.

Die Mutterlauge des Rohproduktes wird eingedampft und die Kristallmasse mit 100 ccm Methanol bis zur Lösung aufgeköcht. Im Eisschrank kristallisieren 7,4 g = 62% V aus. Erst nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol ist das Produkt rein (Schmp. 171°).

1 g reines VI (Schmp. 155°) ergibt 720 mg = 85% V. Schmp. 172°.

3-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-5,6-diacetylglucose (VIII)  
 aus

3-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-5-acetyl-6-mesylglucose (X)

1 g X wird im Gemisch von 3 ccm Eisessig und 14 ccm Acetanhydrid gelöst (das Isomere VII löst sich darin nicht, s. u.), 1 g entwässertes Natriumacetat zugegeben und das Ganze 5 Stunden unter Feuchtigkeitsausschluß am Rückflußkühler gekocht. Nach 1/2 Stunde scheidet sich Natriummessylat ab. Nach Eindampfen bei 80 mm wird der Rückstand mit 50 ccm Wasser versetzt; die Salze gehen in Lösung und das zunächst abgeschiedene Öl verwandelt sich in eine bröckelige grauweiße Masse, die zerkleinert, nach einiger Zeit abgesaugt, mit Wasser gewaschen und in 15 ccm Chloroform aufgenommen wird. Dieser Lösung entzieht man die letzte Säure mit Bicarbonat. Nach Trocknen und Eindampfen i. V. bleibt ein kristallisiertes Produkt zurück, das in 6 ccm Chloroform heiß gelöst wird. Nach Zugabe von 30 ccm siedendem Methanol läßt man langsam abkühlen und erhält 0,9 g = 85% d. Th. VIII vom Schmp. 201°.

5-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-3,6-diacetylglucose (V)  
 aus

5-( $\beta$ -Tetraacetylglucosido)-1,2-aceton-3-acetyl-6-mesylglucose (VII)

4,5 g VII, die gleiche Menge entwässertes Natriumacetat, 12 ccm Eisessig und 60 ccm Acetanhydrid werden am Rückflußkühler unter Feuchtigkeitsausschluß zum Sieden erhitzt. Bald tritt Lösung ein, und nach 2—3 Stunden scheidet sich Natriummessylat aus. Man kocht insgesamt 6 Stunden, dampft ein, versetzt mit Wasser und saugt ab, wie bei den Tosyl-Verbindungen beschrieben. Fällt das Rohprodukt nur sehr wenig gefärbt an, so kann man es unmittelbar umkristallisieren; die Ausbeute kann dabei bis auf 4,0 g = 95% d. Th. steigen. Sonst



nimmt man in Essigester (50 ccm) auf, wäscht mit Bicarbonat und kristallisiert die durch Ei dämpfen i. V. gewonnene Substanz aus 35 ccm Methanol um. 3,6 g = 85% d. Th., Schmp. 172°.

### 3-( $\beta$ -Glucosido)-1,2-acetonglucose aus ihrem Hexaacetat VIII

7 g VIII werden in 28 ccm abs. Methanol aufgeschlämmt und mit 6 ccm  $n_{10}$ -abs.-methanolischer  $\text{NaOCH}_3$ -Lösung unter Feuchtigkeitsausschluß zum Sieden erhitzt. Es tritt rasch Lösung ein. Nach 15 Min. muß die Flüssigkeit noch alkalisch sein, eine Probe darf mit Wasser keine Ausfällung mehr geben. Mit einem Tropfen Eisessig wird neutralisiert und i. V. zu einer amorphen, glasigen Masse eingedampft, die nicht zur Kristallisation zu bringen ist.

Zur Bestimmung der Drehung kann man in Wasser lösen, die Lösung über Säulen mit Amberlite IRA 400 und IR 120 laufen lassen und die so salzfrei gemachte Flüssigkeit i. V. zuletzt über  $\text{P}_2\text{O}_5$  eindampfen.

Das glasige, harte Produkt zeigt

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{-1,370 \cdot 5}{0,284 \cdot 1} = -24,2^\circ \text{ (Wasser)}$$

Soll die Entacetonierung folgen, so entsalzt man nur, wenn diese Reaktion polarimetrisch verfolgt werden soll, andernfalls stört die geringe Menge Natriumacetat nicht.

5-( $\beta$ -Glucosido)-1,2-acetonglucose aus ihrem Hexaacetat V wird genau so hergestellt. Auch für die Entsalzung gilt das gleiche.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{-0,428 \cdot 20}{1,3011 \cdot 1} = -6,6^\circ \text{ (Wasser)}$$

### 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose (XVI) aus ihrer Monoacetonverbindung

a) mit 0,5n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 20°

1,390 g des entsalzten Glases werden bei 20° mit 0,5n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  zu 20 ccm gelöst. Die Drehung wird im 2-dm-Rohr verfolgt. Die Anfangsdrehung (extrapoliert) beträgt  $\alpha = -1,02^\circ$ , nach etwa 4 Tagen ist  $\alpha$  bei  $-2,98^\circ$  konstant. Das ergibt für die spez. Drehung von XVI unter Berücksichtigung der Molekulargewichte einen vorläufigen Wert von

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{-2,98 \cdot 20 \cdot 382,4}{1,390 \cdot 2 \cdot 342,3} = -23,9^\circ \text{ (0,5n-}\text{H}_2\text{SO}_4\text{)}$$

Die mittlere Geschwindigkeitskonstante der Reaktion =  $\bar{k} = 7,3 \cdot 10^{-4}$  ( $\text{min}^{-1}$ ).

b) mit 0,1n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 68°.

Das Drehrohr besitzt einen Mantel, der von Wasser konstanter Temperatur durchströmt wird. Ist das Rohr damit vorgeheizt, wird durch seinen Mittelstutzen die wie vorstehend bereitete saure Lösung eingefüllt und der Stutzen mit einem in die Flüssigkeit eintauchenden Thermometer verschlossen, so daß man die Temperatur genau ablesen kann. Festlegung des Reaktionsbeginns: Die nur kurzdauernde Säureeinwirkung bei Zimmertemperatur bis zum Einfüllen in das heiße Rohr kann vernachlässigt werden, da während dieser Zeit die Reaktionsgeschwindigkeit um zwei Größenordnungen geringer ist als später in der Hitze, wie sich aus den Konstanten ergibt (s. unten). Im Rohr selbst kann die Acetonabspaltung und damit die Drehungsänderung nicht überall gleichzeitig einsetzen, da es eine gewisse Zeit dauert, bis der gesamte Inhalt gleichmäßig die Heizwassertemperatur angenommen hat. Die während dessen entstehenden Schlieren erschweren auch zunächst die Ablesung. — Immerhin scheint es ungünstig, den durchschnittlichen Reaktionsbeginn ( $t = 0$ ) eine Minute nach



Einfüllung anzusetzen; die zugehörige Anfangsdrehung ergibt sich dann durch Extrapolation.

1,3011 g des entsalzten Glases werden mit Wasser zu 10 ccm gelöst und davon 2,5 ccm mit 0,2n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 5 ccm gebracht. Im geheizten 1-dm-Rohr wird die Drehung verfolgt. Nach einer Stunde ist sie konstant und beträgt  $-1,06^\circ$ . Das ergibt

$$[\alpha]_D^{68} = \frac{-1,06 \cdot 20 \cdot 382,4}{1,3011 \cdot 1 \cdot 342,3} = -18,2^\circ (0,1n\text{-H}_2\text{SO}_4)$$

Nach Abkühlen wird das Rohr mehrere Stunden bei  $20^\circ$  belassen und dann die Drehung erneut gemessen:  $\alpha_D$  ist jetzt auf  $-1,38^\circ$  gesunken, d. h.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-1,38 \cdot 20 \cdot 382,4}{1,3011 \cdot 1 \cdot 342,3} = -23,7^\circ (0,1n\text{-H}_2\text{SO}_4)$$

Beim Wiedererwärmen auf  $68^\circ$  stellt sich wieder  $\alpha_D = -1,06^\circ$  ein. Die extrapolierte Anfangsdrehung ist  $\alpha = -0,19^\circ$ . Die mittlere Konstante  $\bar{k}$  beträgt  $5,8 \cdot 10^{-2} (\text{min}^{-1})$ .

Zur präparativen Darstellung des freien Zuckers dampft man den aus 5 g V erhaltenen Acetonzucker nur zum Sirup ein, der noch Natriumacetat enthalten kann und nicht trocken zu sein braucht. Seine Lösung in 30 ccm 0,1n-Salz- oder Schwefelsäure erhitzt man 2 Stunden auf  $70^\circ$ . Zur Neutralisation und Entsalzung läßt man die abgekühlte Lösung über Amberlite IRA 400 und dann über IR 120 laufen, behandelt in der gleichen Weise nochmals mit den beiden Ionenaustauschern und dampft i. V. zum Glas ein. Dieses ist nach Trocknen über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> zunächst pulverisierbar, zerläuft aber an der Luft bald. Bisher gelang es nicht, daraus den kristallisierten Zucker zu gewinnen.

Vor dem Eindampfen wird die Drehung der Lösung bestimmt und ein angemessenes Volumen in ein tariertes Platinschiffchen gebracht, darin eingedunstet und schließlich bei  $80^\circ$  bis zur Gewichtskonstanz über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. So erhält man die Einwaage; es errechnet sich als endgültige spez. Drehung

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-1,249 \cdot 3}{0,1572 \cdot 1} = -23,8^\circ (\text{Wasser})$$

Die gleiche spez. Drehung resultiert bei dem aus dem Tosylhydrizon (s. unten) freigelegten Zucker.

### 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose-tosylhydrizon

1,2 g glasige 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose werden in 2,5 ccm Wasser gelöst, 7,5 ccm Alkohol und dann 0,65 g (1 Mol) Tosylhydrizin zugefügt. Auf dem Wasserbad löst sich dieses schnell auf, und nach  $\frac{3}{4}$ -stündigem Erhitzen stellt man das Gemisch in den Eisschrank. Nach 1—2 Tagen, schneller beim Animpfen, beginnt die Abscheidung einer weißen Substanz. Nach weiteren 2 Tagen wird abgesaugt, zur Entfernung etwa nicht umgesetzten Tosylhydrizins mit Methanol verrieben, wieder abgesaugt und mit Methanol gewaschen. Rohausbeute 0,9 g = 50% d. Th. Umkristallisation aus 6 ccm Wasser: 0,6 g = 33%. Jetzt ist das Hydrizon rein.

Büschel feiner, farbloser Nadeln, Schmp.  $193\text{--}194^\circ$  unter Zersetzung. Kalt löslich in Pyridin-Wasser-Gemisch, heiß in Pyridin (aus dem die Verbindung dann nicht mehr herauskommt) und in Wasser. Unlöslich in kaltem und heißem Methanol, Äthanol, Dioxan, Tetrahydrofuran, Essigester, Äther, Chloroform.

C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>12</sub>N<sub>2</sub>S (510,51) Ber. C 44,70 H 5,92 N 5,49  
Gef. » 44,44 » 6,18 » 5,56

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-1,032 \cdot 5}{0,2394 \cdot 1} = -21,6^\circ (\text{Pyridin-Wasser } 4:1)$$



## Zerlegung mit Benzaldehyd

0,5 g Tosylhydrizon werden auf dem Wasserbad in 8 ccm Wasser gelöst und mit 0,1 g (1 Mol) Benzaldehyd versetzt. Sofort scheidet sich das Benzaldehyd-tosylhydrizon ölig ab, um im Laufe des viertelstündigen Erhitzens zu kristallisieren. Man läßt dann einige Zeit bei Raumtemperatur stehen, saugt ab und wäscht mit Wasser nach. Die Ausbeute an Hydrizon ist die theoretisch zu erwartende.

Die wäßrige Lösung wird zweimal ausgeäthert, nach Entfernung des gelösten Äthers ihre Drehung bestimmt und i. V. zum Glas gedampft, das ebensowenig kristallisieren will wie die aus der Acetonverbindung unmittelbar gewonnene 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{-1,010 \cdot 3}{0,1266 \cdot 1} = -23,9^{\circ} \text{ (Wasser)}$$

3-( $\beta$ -Glucosido)-glucose (Laminari-biose) (XVII)  
aus ihrer Monoacetonverbindung

1. Zur polarimetrischen Verfolgung der Reaktion mit 0,2n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 70°.

0,3991 g des salzfreien Glases werden mit 0,2n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu 5 ccm gelöst und die Drehung im geheizten 1-dm-Rohr verfolgt. Die extrapolierte Anfangsdrehung ist  $\alpha = -2,00^{\circ}$ . Nach 5 Stunden ist die Drehung konstant und beträgt  $+1,62^{\circ}$ .

$$\bar{k} = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ (min}^{-1}\text{)}.$$

Nach Abkühlen auf 18° mißt man  $\alpha_{\text{D}} = +1,50^{\circ}$ , d. h. die spez. Drehung des freien Zuckers ist

$$[\alpha]_{\text{D}}^{18} = \frac{+1,50 \cdot 5 \cdot 382,4}{0,3991 \cdot 1 \cdot 342,3} = +21,0^{\circ} \text{ (0,2n-H}_2\text{SO}_4\text{)}$$

2. Zur präparativen Darstellung verfährt man genau wie es bei der 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose beschrieben ist. Es wird aber nicht über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet, sondern eine Probe des noch zähen Sirups mit etwas Alkohol angerieben und stehen gelassen. Dabei kristallisiert sie in 1—2 Tagen weitgehend strahlenförmig durch. Die Hauptmenge wird in möglichst wenig Wasser gelöst, dann das zehnfache Volumen Eisessig zugesetzt und angeimpft. Im Eisschrank kommt der Zucker bald in schönen Nadeln heraus. Aus 2 g des Monoaceton-hexaacetates (VIII) erhält man 670 mg = 64% d. Th. an Rohprodukt, Schmp. 182—189°. Nach einer weiteren Umkristallisation ist die Laminari-biose rein, 510 mg = 48%. Farblose Nadeln, Schmp. 188—192° unter Gelbfärbung. Connell, Hirst und Percival geben für die aus Alkohol kristallisierende, abwärts rotierende Laminari-biose 160—163° an.

Kristallwasser scheint nicht vorhanden zu sein; beim Trocknen über NaOH im Hochvakuum wird aber ein wenig Wasser festgehalten (1,55% = 0,256 Mol), das erst bei mehrstündigem Trocknen bei 100° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> im Hochvakuum abgegeben wird.

$$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \text{ (342,30)} \quad \text{Ber. C 42,10 H 6,48}$$

$$\text{Gef. } \gg 42,26 \gg 6,40$$

Mutarotation. 0,0977 g des 1,55% Wasser enthaltenden Zuckers werden zu 2 ccm wäßriger Lösung gelöst; 1-dm-Rohr.

In der letzten Spalte der Tabelle sind die Werte für  $[\alpha]$  angegeben, wie sie sich nach  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{\alpha_{\text{D}} \cdot 2 \cdot 100}{0,0977 \cdot 98,45}$  für den wasserfreien Zucker errechnen.



t (min)	$\alpha_D^{20}$	$[\alpha]_D^{20}$	$[\alpha]_D^{20}$ <sub>wfr</sub>
0	+0,36	+ 7,4	+ 7,5 (extr.)
10	+0,46	+ 9,4	+ 9,6
20	+0,56	+11,5	+11,7
35	+0,64	+13,1	+13,3
45	+0,71	+14,5	+14,8
55	+0,76	+15,5	+15,8
70	+0,80	+16,4	+16,7
100	+0,87	+17,8	+18,1
150	+0,95	+19,5	+19,8
180	+0,98	+20,1	+20,4
240	+0,99	+20,3	+20,6
300	+1,00	+20,5	+20,8 konstant

Die aus Wasser/Eisessig kristallisierte 3-( $\beta$ -Glucosido)-glucose hat also, auf wasserfreies Kohlenhydrat umgerechnet, als

Anfangsdrehung  $[\alpha]_D^{20} = +7,5^\circ$  (Wasser)

Gleichgewichtsdrehung nach Beendigung der Mutarrotation

$$[\alpha]_D^{20} = +20,8^\circ \text{ (Wasser).}$$

Dunstet man die wässrige Lösung des Zuckers in einem Schälchen über  $P_2O_5$ , i. V. ein und reibt den sehr zähen Sirup dann auf dem Wasserbad mit siedendem Alkohol an, so erhält man augenblicklich eine pulverige Substanz, die nach mehrstündigem Stehen in der Kälte abgesaugt wird.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+0,848 \cdot 2}{0,0872 \cdot 1} = +19,4^\circ \text{ (Wasser)}$$

Eine Mutarrotation ist nicht festzustellen. Die britischen Autoren haben an Laminari-biose, die aus Alkohol kristallisiert war, Abwärtsrotation gefunden ( $+26^\circ \rightarrow +21,0^\circ$ , auf wasserfreie Substanz bezogen).

### 3-( $\beta$ -Glucosido)-glucosazon

wurde in Anlehnung an die allgemeine Methode von D. D. Garard und H. C. Sherman<sup>22)</sup> bereitet. Dabei kommen nach dem Abkühlen oft große mehrseitige farblose Tafeln von Acetylphenylhydrazin heraus, von denen abfiltriert wird. Das Filtrat liefert dann auf Zusatz des gleichen Volumens Wasser das Osazon, das in Büscheln feiner gelber Nadeln kristallisiert. Nach Absaugen wird gründlich mit Wasser gewaschen: Schmp. 195—198°. Man löst in wenig warmem Methanol, fügt die 5—10-fache Menge Essigester hinzu, versetzt dann langsam bis zur Trübung mit Petroläther und läßt über Nacht stehen. Das abgeschiedene Osazon wird noch einmal in der gleichen Weise umkristallisiert. Rosetten feiner Nadeln, Schmp. 229°. (Vgl. auch die Ausführungen über die 3-( $\beta$ -Glucosido)-glucose und ihr Osazon auf S. 41.)

$C_{24}H_{32}O_8N_4$  (520,53) Ber. C 55,38 H 6,20 N 10,76  
Gef. » 55,23 » 6,34 » 10,75

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0,394 \cdot 2}{0,0111 \cdot 1} = -71,0^\circ \text{ (Äthanol)}$$

<sup>22)</sup> Am. Soc. 40, 955 (1918).



Die britischen Autoren finden für ihr aus Wasser kristallisiertes Osazon den Schmp. 202° und die Drehung  $-76,5^\circ$  (auf wasserfreie Substanz berechnet). L. Zechmeister und G. Thôt<sup>1)</sup> geben Schmp. 198° und  $[\alpha]_D^{20} = -75,3^\circ$  (in Alkohol) an.

### 3-( $\beta$ -Glucosido)-glucose-tosylhydrizon

0,42 g XVII werden in 0,6 cem Wasser gelöst und mit 2 cem Alkohol und 0,23 g (1 Mol) Tosylhydrazin 45 Minuten auf dem Wasserbad erhitzt. Nach 5 Tagen hat weder bei 0° noch bei Raumtemperatur die Kristallisation eingesetzt, beginnt dann aber sehr bald nach Zusatz von soviel Äther, wie ohne Trübung aufgenommen wird. 24 Stunden später wird abgesaugt, mit wenig Methanol verrieben, wieder abgesaugt und mit Methanol gewaschen. Rohausbeute 0,30 g = 48% d. Th. Verfärbung bei 175°, Schmp. unter Zersetzung 182°. Nach Lösen in warmem Methanol und Ausfällung mit Äther zeigt das Hydrizon den gleichen Schmp. Farblose Nadeln, leicht löslich in Wasser und warmem Methanol im Gegensatz zum 5-( $\beta$ -Glucosido)-glucose-tosylhydrizon.

$C_{19}H_{30}O_{12}N_2S$  (510,51) Ber. C 44,70 H 5,92 N 5,49  
Gef. » 44,54 » 6,07 » 5,59

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0,735 \cdot 2}{0,0608 \cdot 1} = -24,2^\circ \text{ (Wasser)}$$

### Monoaceton-pentaacetylglucose (XVIII)

2 g Monoaceton-triacetylglucose<sup>23)</sup> werden in 4 cem Acetanhydrid gelöst, in Eis gekühlt und mit der ebenfalls gekühlten Mischung von 1,2 cem 60-proc. Überchlorsäure, 6 cem Acetanhydrid und 2 cem Eisessig versetzt. Man läßt 5 Min. bei Zimmertemperatur stehen, verdünnt die rote Lösung mit 20 cem Chloroform und schüttelt mit 20 cem Eiswasser durch. Dabei setzt man so viel Bicarbonat-Lösung zu, daß die wäßrige Schicht Kongo-Papier nicht mehr bläut. Sie wird noch einmal mit Chloroform ausgezogen. Die vereinigten hellgelben Chloroform-Extrakte werden nach der Trocknung i. V. eingedampft. Den Sirup verdünnt man mit 5 cem Methanol und fügt unter Anreiben allmählich etwa 80 cem Wasser zu. Die so erhaltenen Kristalle werden nach einigem Stehen abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Rohausbeute 1,5 g = 58% d. Th. Reinigung durch mehrfache Umkristallisation aus Methanol. Schmp. 140°; Mischschmp. mit dem Produkt nach H. H. Schlubach<sup>23)</sup> ergibt keine Depression.

### Glucose aus XVIII

0,75 g Monoaceton-pentaacetylglucose werden in 4,5 cem abs. Methanol suspendiert und mit 0,75 cem 0,1n-abs.-methanolischer  $NaOCH_3$ -Lösung versetzt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 10 Min. ist die klare Lösung eingetreten. Man läßt noch 50 Min. stehen, neutralisiert dann mit einem Tropfen Eisessig und dampft i. V. ein. Der Sirup wird mit 0,15 cem Wasser verdünnt und mit 0,6 cem Eisessig versetzt. Bei 0° beginnt bald die Kristallisation, die nach 3 Tagen beendet ist. Das Produkt wird abgesaugt und mit Eisessig gewaschen. Rohausbeute 0,2 g = etwa 70% d. Th. Reinigung durch Lösen in wenig Wasser und Zusatz von Eisessig wie vorstehend. Das Produkt ist reine Glucose.

Herrn Dr. A. Götz danken wir für die Ausführung der Mikroanalysen.

<sup>23)</sup> H. Ohle und K. Spencker, B. 59, 1836, 1845 (1926).



## Über bi- und polycyclische Azulene

## IX. Mitteil. \*):

## Versuche zur Darstellung bi- und tricyclischer Azaazulene

Von Wilhelm Treibs, Hans-Martin Barchet,  
Günther Bach und Werner Kirchhof

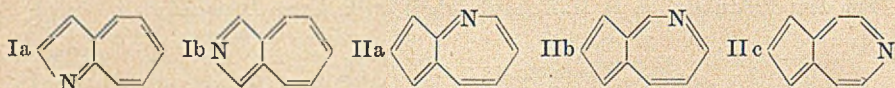
(Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Leipzig)

(Mit 3 Figuren im Text)

(Eingelaufen am 14. Juli 1951)

Azaazulene, also bi- und polycyclische Azulensysteme, bei denen eine oder mehrere Methingruppen durch Stickstoffatome ersetzt sind, wurden bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Falls sich die für aromatische Systeme, bei Substitution einer Methingruppe durch ein Stickstoffatom, abgeleiteten Regeln auch auf die Azulene übertragen lassen, müßte ein solcher Ersatz zwar größere Intensität der Absorptionsbanden im Gefolge haben, ohne jedoch deren Lage stärker zu beeinflussen. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, daß die Azulene im Vergleich mit aromatischen Kohlenwasserstoffen polare, oder zumindest leicht polarisierbare Systeme sind, wie ihre bereitwillige Kupplung mit einfachen Diazoniumsalzen<sup>1)</sup> beweist. Azaazulene könnten auch aus pharmakologischen Gründen interessante Verbindungen sein.

Für das Zustandekommen bicyclischer Azaazulene bestehen grundsätzlich 5 verschiedene Möglichkeiten: 1. Ersatz einer Methingruppe des 5-Rings durch den Azastickstoff (Ia und Ib) und 2. Ersatz einer Methingruppe des 7-Rings durch Azastickstoff (IIa, IIb und IIc):



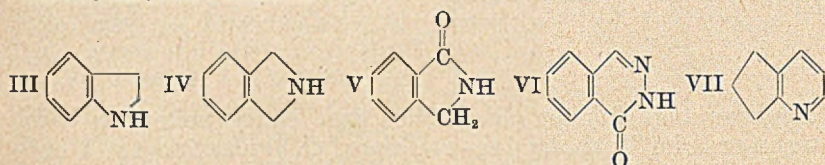
Wir versuchten zunächst bicyclische Azaazulene des ersten Typs aus entsprechenden, leicht zugänglichen Heterocyclen durch Buchner-Synthese darzustellen. Bei der Umsetzung von Diazoessigester mit Indolin (III), bzw. seinem N-Methyl- und Acetyl-derivat, mit nachfolgender thermischer Behandlung und Dehydrierung wurde kein 1-Azaazulen-carbonsäureester, wohl aber Indolin-essigsäureester erhalten. Als Ausgangsprodukt für das 2-Azaazulen-System (Ib) kam das Iso-indolin (IV) in Frage. Wir

\*) VIII. Mitteil.: W. Treibs, B. Ulrici und A. Stein, A. 573, 93 (1951).

<sup>1)</sup> Pl. A. Plattner, Ang. Chem. 62, 513 (1950); W. Treibs und W. Ziegenbein, A. 572, 165 (1951).



stellten aus Phthalimid durch Reduktion nach Adkins Phthalimidin (V) her. Die Umsetzung dieser Verbindung mit Grignard-Reagens gelang nicht. Bei ihrer Reduktion nach Wolff-Kishner entstand statt des erwarteten Iso-indolins (IV) Phthalazon (VI), das sich nach der Abwandlung von S. Gabriel und A. Neumann<sup>2)</sup> in das Iso-indolin (IV) überführen ließ. Dessen N-Acetylderivat wurde bei 140° mit Diazoessigester umgesetzt und auf 200° erhitzt, doch war bisher weder direkt noch nach Dehydrierung 2-Azaazulencarbonsäureester faßbar.



Wir versuchten hierauf, zu Azaazulenen des chemischen Baues IIa, IIb, oder IIc zu gelangen, indem wir nach der Vorschrift von V. Prelog und S. Szpilfogel<sup>3)</sup> ausgehend vom Cyclopentanon- $\alpha$ -carbonsäureäthylester das Cyclopenteno-2,3-pyridin (Pyridan) (VII) gewannen. Bei dessen Reaktion mit Diazoessigester wurde zwar ein grüner Farbstoff erhalten, dessen Farbe aber mit Säure nach Grünblau umschlug, so daß nach den weiter unten beschriebenen Erfahrungen am Azulen-ester aus 4-Azafluoren kein Azulen-ester vorliegen dürfte. Die chemische Natur des farbigen Reaktionsproduktes konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden.

Nachdem demnach die Synthesen bicyclischer Azaazulene aus bisher unbekanntem Ursachen zu keinen befriedigenden Ergebnissen geführt hatten, versuchten wir tricyclische Azaazulene darzustellen. Wir gingen dabei von der Voraussetzung aus, daß das analog gebaute, von uns zuerst beschriebene 1,2-Benzazulen<sup>4)</sup>, bei dem ein kondensierter Benzolring in das Azulen-System einbezogen ist, sowie seine Derivate<sup>5)</sup> sich als außerordentlich beständige, überraschend leicht entstehende und gut kristallisierende Verbindungen erwiesen hatten. Diese Überlegung wurde durch unsere Versuche zur Synthese tricyclischer Azaazulene nur mit Einschränkung bestätigt.

Für die direkte Synthese eines solchen Systems ohne Ring-erweiterung stand uns das Heptindol (VIII)<sup>6)</sup> zur Verfügung, das sich leicht aus Suberon und Phenylhydrazin in beliebiger Menge

<sup>2)</sup> B. 26, 521 (1893).

<sup>3)</sup> Helv. 28, 1684 (1945).

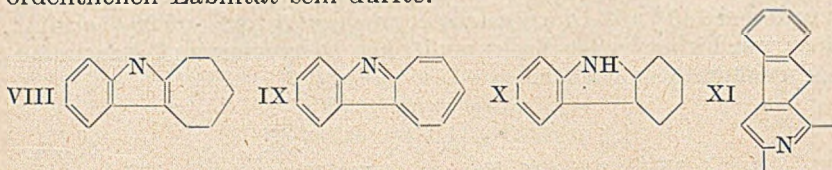
<sup>4)</sup> B. 81, 38 (1948); A. 564, 43 (1949).

<sup>5)</sup> A. 572, 165 (1951).

<sup>6)</sup> Chem. Soc. 1928, II, 2583.



gewinnen läßt. Als wir dies „Hexahydro-azaazulen“ mit Palladium-Tierkohle oder Selen dehydrierten, zeigte sich zwar im Chromatogramm ein unbeständiger, schwacher blauer Ring, jedoch konnte das 3-Aza-1,2-benzazulen (IX) bisher nicht in nennenswerter Menge herausgearbeitet werden, was wohl eine Folge seiner außerordentlichen Labilität sein dürfte.



Ebensowenig führten Versuche der Ringerweiterung nach Buchner beim Tetrahydro-carbazol (X) und seinem n-Acetyl-derivat, sowie beim 1,3-Dimethyl-2-azafluoren<sup>7)</sup> (XI), zum Ziel.

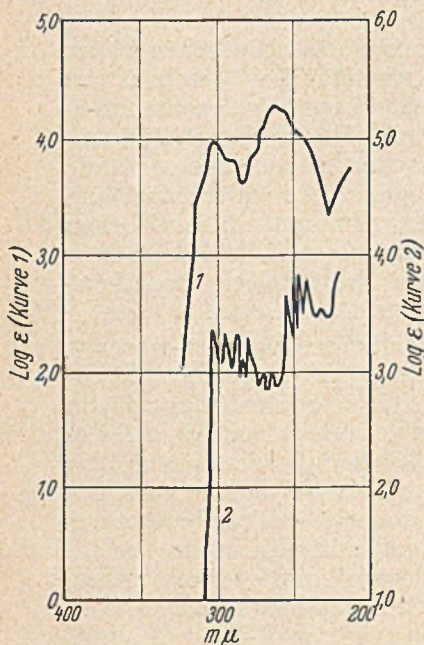


Fig. 1. 1 Fluoren 2 Azafluoren

Die Synthese des ersten tricyclischen Azaazulens gelang durch Ringerweiterung des 4-Azafluorens (XII), das O. Kruber und L. Rappen<sup>8)</sup> aus Steinkohlenteer isoliert hatten. Die Absorptionskurve letzteren interessanten Heterocyclus im UV-Gebiet (Fig. 1, Kurve 2) zeigt erwartungsgemäß einen ähnlichen Verlauf wie die des analog gebauten carbocyclischen Fluorens<sup>9)</sup> (Fig. 1, Kurve 1), nur scheint die Feinstruktur (Schwingungsstruktur) noch ausgeprägter zu sein. Auch ist das Hauptmaximum etwas nach kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Bei der Umsetzung des 4-Azafluorens mit Diazoessigester und folgender thermischer Behandlung entstand, wie bereits wiederholt bei der Synthese tricyclischer Azulene festgestellt, spontan, ohne zusätzliche Dehydrierungsmittel ein Aza-

benzazulen-carbonsäureester (XIV), der sich in Äther erst nach Zusatz einer geringen Alkoholmenge mit tiefvioletter

<sup>7)</sup> B. 16, 1607 (1883); 17, 1612 (1884); 25, 2786 (1892); Chem. Soc. 1924, 2365.

<sup>8)</sup> B. 81, 483 (1948).

<sup>9)</sup> J. D'Ans und E. Lax, Taschenbuch für Chemiker und Physiker, S. 1716 (Berlin, Springer-Verlag 1943).



Farbe löste. Bei der Chromatographie über Aluminiumoxyd wanderte er äußerst langsam als stahlblauer Ring und ließ sich leicht von den schwächer adsorbierten Beimischungen trennen. Leider machte sich bei der öfter wiederholten Reinigung bereits die außerordentliche Empfindlichkeit des Azaazulens gegen Licht und Luft bemerkbar. Die Lösungen mußten im Dunkeln bei niedriger Temperatur abgedunstet werden. Peroxydhaltiger Äther bewirkte schnelle Zerstörung. Da der Ester trotz wiederholten Chromatographierens nicht kristallisierte, schüttelten wir ihn aus ätherischer Lösung mit 0,01-proc. Salzsäure aus, wobei er als Salz mit brauner Farbe in Lösung ging und bei Sodazusatz in schwarzen Flocken ausfiel, die aber trotz richtiger Verbrennungswerte nicht kristallisiert erhalten werden konnten. Die violettblaue alkoholische Lösung ist etwas beständiger, verfärbt sich aber nach einigen Stunden am hellen Tageslicht und nach einigen Tagen im Dunkeln. Bei Versuchen zur Darstellung von Addukten mit Trinitrobenzol, Pikrin- oder Styphninsäure fand Zerstörung statt. Die Absorptionsspektren mußten sehr schnell aufgenommen werden, da bereits längere Bestrahlung der Belichtungslampen Verfärbung verursachte.

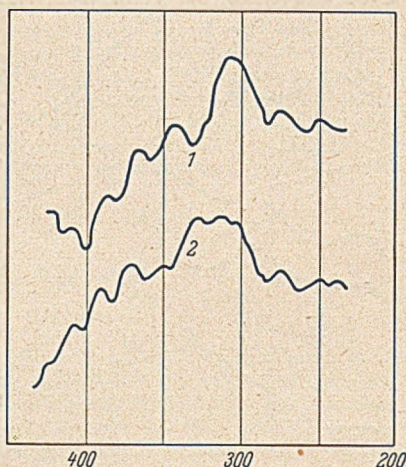


Fig. 2

- 1 Aza-benzazulen-carbonsäure-  
äthylester  
2 1,2-Benzazulen-6-carbonsäure-  
äthylester

Bei der Verseifung des auf 200° erhitzten Reaktionsproduktes von 4-Azafluoren mit Diazoessigester durch alkoholische Lauge bei Zimmertemperatur trat gleichzeitig Decarboxylierung ein. Das Aza-benzazulen war in Äther nur wenig mit violetter Farbe löslich und wanderte in der Aluminiumoxyd-Säule sehr langsam als intensiv blauer Ring. Aus ätherischer Lösung wurde es durch Petroläther gefällt. Durch Einwirkung von Licht und Luft wird es noch schneller zersetzt als der Ester. Ob das Azaazulen in seinem chemischen Bau dem Ester XIV entspricht, oder ob es aus einem anderen Ester der Buchner-Synthese entstanden ist, steht noch nicht fest.

Durch eine Umsetzung des Esters XIV mit Methyl-magnesiumjodid konnte ein violettes Methoxyäthylol-aza-benzazulen gewonnen werden, das sich aber so schnell zersetzte, daß seine optische Untersuchung bisher noch nicht möglich war. Dasselbe war bei einem Isopropyl-aza-benzazulen der Fall, das durch Behandlung des Produktes der Buchner-Synthese des Azafluorens mit Methyl-magnesiumjodid ohne vorherige thermische Behandlung und folgende Dehy-



drierung erhalten wurde, trotzdem alle Operationen bei gedämpftem Tageslicht unter Stickstoff ausgeführt wurden. Das Isopropyl-azabenzazulen wanderte im Chromatogramm als violetter Ring, das Eluat war blau.

Das Absorptionsspektrum des Azaazulen-esters XIV (Fig. 2, Kurve 1) im UV-Gebiet entspricht völlig dem des analog gebauten carbocyclischen 1,2-Benzazulen-6-carbonsäure-äthylesters (Fig., 2, Kurve 2) und zeigt den charakteristischen Kurvenverlauf der Azulene. Jedoch sind die wichtigsten Banden etwas nach kürzeren Längen verlagert.

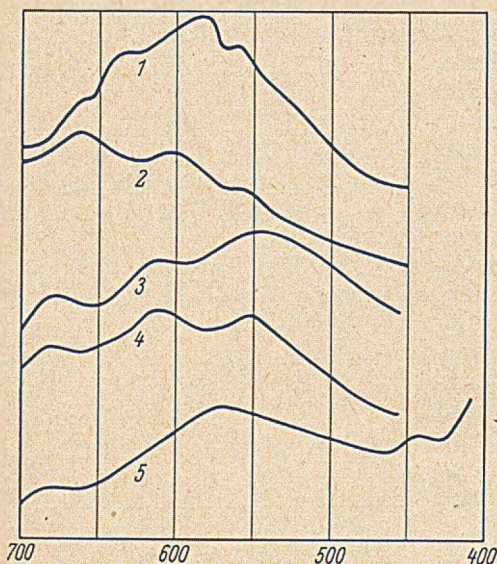
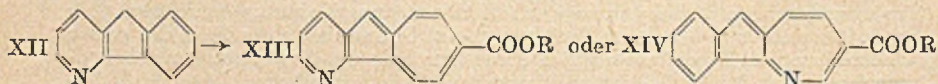


Fig. 3

- 1 Grundazulen
- 2 1,2-Benzazulen-6-carbonsäure-äthylester
- 3 Aza-benzazulen-carbonsäure-äthylester
- 4 1,2-Benzazulen
- 5 Aza-benzazulen

Zwar liegen die 3 wichtigsten Banden etwa an den gleichen Stellen wie beim 1,2-Benzazulen-6-carbonsäure-ester (Fig. 3, Kurve 2), doch sind die Intensitäten ganz verschieden. Das Absorptionsmaximum ist um 120 mμ nach kürzeren Wellen verschoben. Der Azastickstoff übt also einen stark hypsochromen Einfluß aus. Auch der Vergleich der beiden Kurven des Azabenzazulens (Fig. 3, Kurve 5) und des 1,2-Benzazulens (Fig. 3, Kurve 4) zeigt diesen aufhellenden Einfluß des Azastickstoffs.

Für die Ringerweiterung des 4-Azafluorens nach Buchner bestehen grundsätzlich 2 Möglichkeiten, wobei die genaue Anlagerungsstelle, also die Lage der Estergruppe unbestimmt ist: 1. Erweiterung des carbocyclischen Ringes zu XIII, 2. Erweiterung des heterocyclischen Ringes zu einem Azabenzazulen-carbonsäure-ester (XIV).





Alle Versuchsergebnisse deuten darauf hin, daß die Ringerweiterung am Heteroring erfolgte. Für einen Azulen-ester, bei dem der Hetero-Sechsering dem Azulen-System ankondensiert ist, ist die große Unbeständigkeit und die starke Verlagerung der maximalen Lichtabsorption im sichtbaren Gebiet unverständlich. Vielmehr wären dann die gleiche Beständigkeit und eine ähnliche Lage der maximalen Absorptionsbande wie beim 1,2-Benzazulen-ester zu erwarten.

Die Versuche über die Synthese von Azaazulenen werden fortgesetzt. Wir sprechen Herrn Dr. Kruber und der Gesellschaft für Teerverwertung in Duisburg-Meiderich für die Überlassung des 4-Azafluorens unseren besonderen Dank aus. Ferner danken wir der Agfa-Filmfabrik in Wolfen für die Anfertigung der Absorptionskurven im sichtbaren Gebiet mittels des Spektraldensographen von Zeiss-Ikon und dem Leuna-Werk für die Aufnahmen der Absorptionsspektren im UV-Gebiet. Die Mikroanalysen wurden von R. Martin in der mikrochemischen Abteilung des Instituts für organische Chemie der Universität Leipzig ausgeführt.

## Beschreibung der Versuche

### *Isoindolin (IV)*

a) Phthalimidin. 50 g Phthalimid wurden mit 15 g Kupferchromit-Katalysator nach H. Adkins in 50 ccm Dioxan bei 230° und 160 Atü 6 Stunden lang hydriert. Die Lösung des Reaktionsproduktes in heißem Wasser, wobei unumgesetztes Phthalimid ungelöst blieb, wurde mit Tierkohle entfärbt und i. V. eingengt, wobei Phthalimidin vom Schmp. 146° auskristallisierte, das ohne Reinigung weiter verarbeitet wurde.

b) Phthalazon. 6 g Phthalimidin wurden mit 5 g Hydrazinhydrat im Bombenrohr 24 Stunden auf 180—220° erhitzt. Nach Ablassen des gebildeten Ammoniaks wurde nochmals 24 Stunden lang auf die gleiche Temperatur erhitzt. Das vereinigte Reaktionsprodukt von 3 Versuchen wurde nach Abdestillieren des Wassers und Hydrazins i. V. destilliert. Das erstarrte Destillat kristallisierte aus Alkohol in farblosen Nadeln vom Schmp. 182°.

$C_8H_6ON_2$  (146,1) Ber. C 65,74 H 4,14 N 19,17  
Gef. » 65,48 » 4,02 » 19,27

c) Das nach S. Gabriel<sup>2)</sup> aus Phthalazon dargestellte Isoindolin wurde durch 1-stündiges Erhitzen mit der doppelten Menge Essigsäureanhydrid in das N-Acetyl-isoindolin übergeführt, das nach 2-maligem Umkristallisieren aus Petroläther bei 76,5° schmolz.

### *Azaazulencarbonsäure-äthylester (XIV)*

Zu 5 g 4-Azafluoren wurden bei 130° innerhalb 3 Stunden 3 g Diazoessigester getropft. Das Reaktionsprodukt wurde eine Stunde auf 200° erhitzt. Insgesamt wurden 1200 ccm Stickstoffentwickelt. Aus dem zähfesten, dunkelgrünen Gemisch wurde unverändertes 4-Azafluoren durch Digerieren mit Äther entfernt. Der ungelöste Rückstand löste sich erst dann in Äther, nachdem dieser mit einigen Tropfen Alkohol versetzt worden war. Die Lösung wurde 3-mal über Aluminiumoxyd chromatographiert, wobei der Azulen-ester äußerst langsam als blauer Ring wanderte und mit Äther, dem eine etwas größere Menge Alkohol zugesetzt war, eluiert wurde. Beim Ausschütteln der violetten Lösung mit Wasser schied sich



der Azulen-ester nach Entfernen des Alkohols aus dem Äther fest ab. Aus der alkoholhaltigen Ätherlösung ging er augenblicklich mit bräunlicher Farbe in sehr verd. Salzsäure und konnte aus dieser Lösung mittels Sodalösung als dunkelblaue feste Masse wieder ausgeschieden werden, die keinen definierten Schmp. zeigte und sich bei höherer Temperatur schnell zersetzte. In Alkohol und Aceton löste sich der Azulen-ester leicht mit violetter Farbe. Die Lösungen sind in der Durchsicht im Lampenlicht rot, im Tageslicht blau.

$C_{16}H_{13}O_2N$ (251,3)	Ber. C 76,5	H 5,2	N 5,6
	Gef. » 76,96	» 4,92	» 6,03

#### *Aza-benzazulen*

Das thermisch behandelte Reaktionsprodukt aus 5 g Azafluoren und 3 g Diazoessigester wurde im Dunkeln 3 Tage lang mit der Lösung von 1,25 g KOH in 100 ccm Methanol stehengelassen, in 300 ccm Wasser gegossen und 10-mal ausgeäthert. Das Azaazulen wurde 3-mal in Ätherlösung, in dem es etwas löslich ist, über Aluminiumoxyd chromatographiert, durch alkoholhaltigen Äther eluiert und durch Petrolätherzusatz zur Ätherlösung ausgefällt.

$C_{13}H_9N$ (179,2)	Ber. C 87,1	H 5,0	N 7,8
	Gef. » 86,59	» 5,38	» 7,36

## Über bi- und polycyclische Azulene

### X. Mitteil.\*):

#### Über ein tetracyclisches Azulen aus Tetrahydro-fluoranthen

Von *Wilhelm Treibs*

(Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Leipzig)

(Mit 2 Figuren im Text)

(Eingelaufen am 14. Juli 1951)

In Mitteilung I und II<sup>1)</sup> beschrieben wir die erstmalige Synthese eines tricyclischen Azulens, des 1,2-Benzazulens (I), aus Fluoren, in Mitteilung VII<sup>2)</sup> die Darstellung einiger Derivate dieses interessanten Azulens und in Mitteilung II<sup>1)</sup> die Gewinnung des tricyclischen 1,8-Trimethylen-azulens (II) aus Tetrahydroacenaphthen. In Fortführung dieser Untersuchungen sahen wir uns 1947 nach Möglichkeiten um, noch stärker kondensierte Azulen-Systeme darzustellen, die, außer auf Grund ihrer optischen, möglicherweise auch durch besondere physiologische — z. B. carcinogene — Eigenschaften interessant sein könnten. Als bequemes Ausgangsmaterial für tetracyclische Azulene kam zunächst das Fluoranthen (III) in Frage, das als Überlagerung des Fluoren- und des Acenaphthen-Systems angesehen werden kann, und in dem zwei Möglichkeiten

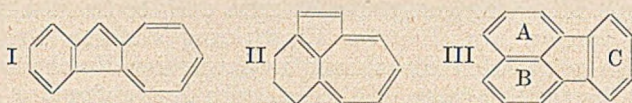
\*) IX. Mitteil.: W. Treibs, H. M. Barchet, G. Bach und W. Kirchhof, A. 574, 54 (1951).

<sup>1)</sup> B. 81, 38 (1948); A. 564, 43 (1949).

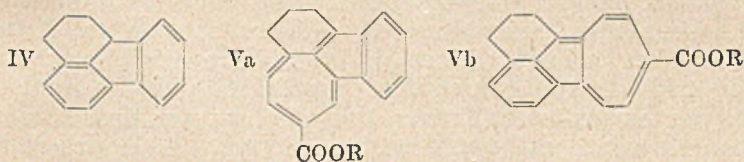
<sup>2)</sup> A. 572, 165 (1951).



der Ringerweiterungen mittels Diazoessigesters an den Ringen A und B oder an dem Ring C bestehen:



Ebensowenig wie beim Acenaphthen ist beim Fluoranthen selbst theoretisch die Möglichkeit einer Azulenbildung durch Ringerweiterung nach Buchner gegeben, was durch den Versuch bestätigt wurde. Genau so wie dort, kann auch hier diese Schwierigkeit durch Aufhydrieren eines aromatischen Ringes des tetracyclischen Systems behoben werden. Wir setzten das kristallisierte Tetrahydro-fluoranthen (IV) bei  $145^{\circ}$  mit Diazoessigestern um und erhitzten auf  $200^{\circ}$ , wobei genau so wie früher bei der gleichen Behandlung des Fluorens, seiner Derivate, des Azafluorens und des Tetrahydro-acenaphthens spontane Dehydrierung zum Azulen-ester, ohne Zusatz besonderer Dehydrierungsmittel erfolgte. Da der Azulen-ester kein Trinitrobenzolat bildete und nur äußerst langsam durch Phosphorsäure ausgezogen wurde, reicherten wir ihn zunächst durch viermaliges Chromatographieren in Cyclohexanlösung über Aluminiumoxyd an, wobei er viel langsamer als grüner Ring wanderte als die Verunreinigungen. Doch bildete das Eluat immer noch eine grüne Lösung. Erst nachdem wir ihn nunmehr zweimal über das äußerst langsam entstehende Phosphorsäureaddukt gereinigt hatten, zeigte seine Lösung reinblaue Farbe. Trotz richtiger Analysenzahlen konnte er bisher nicht kristallisiert erhalten werden, sondern stellte eine zähfeste grüne Masse dar, die viel unbeständiger gegen Licht und Wärme war als der 1,2-Benzazulen-6-carbonsäureester. Seine Lösung verfärbte sich langsam im Dunkeln, schneller im Lichte. Versuche, durch Erhitzen der freien Säure zum tetracyclischen Azulen selbst zu gelangen, führten trotz vieler Abwandlungen der Bedingungen stets unter völliger Zersetzung zu einer festen blasigen Masse. Für die Ringerweiterung des Tetrahydro-fluoranthens zum Azulen-ester (V) bestehen die zwei Möglichkeiten Va und Vb ohne Berücksichtigung der Lage der Estergruppe.



Da uns also bisher die Decarboxylierung des tetracyclischen Azulenesters bzw. Estergemisches zum entsprechenden Azulen



nicht gelang, setzten wir entsprechend unseren früheren Erfahrungen am Grundazulen-ester und am 1,2-Benzazulen-ester den Azulen-ester V mit Methylmagnesiumjodid zum entsprechenden Methoäthylol-azulen um. Bei der Einwirkung anderer Grignard-Reagenzien zeigte sich die gleiche merkwürdige Erscheinung wie beim 1,2-Benzazulen-ester. Während beim Zutropfen des Methylmagnesiumjodids die blaue Azulenfarbe bestehen blieb, verschwand sie sofort bei der Umsetzung mit Äthyl- und mit Phenyl-magnesiumhaloid. Das Methoäthylol-azulen

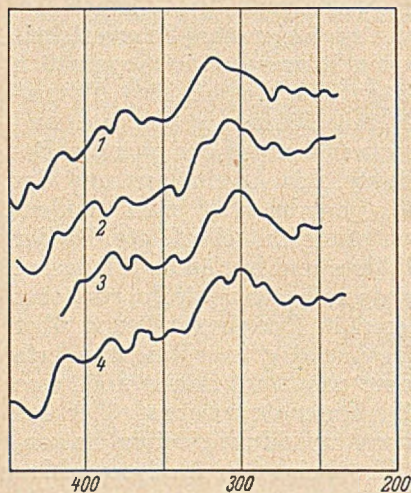


Fig. 1

- 1 Carbäthoxy-azulen aus Fluoren
- 2 Carbäthoxy-azulen aus Tetrahydrofluoranthen
- 3 Methoäthylol-azulen aus Fluoren
- 4 Methoäthylol-azulen aus Tetrahydrofluoranthen

wurde durch Chromatographieren über Aluminiumoxyd nochmals gereinigt, wobei es so langsam als hellblauer Ring wanderte, daß es völlig von geringen Anteilen schneller wandernder Verunreinigungen befreit werden konnte. Ebensovienig wie der Ester konnte es kristallisiert erhalten, oder in ein Trinitrobenzolat übergeführt werden. Bei Einwirkung wasserabspaltender Reagenzien blieb es entweder unverändert, oder es trat Verschwinden der Azulenfarbe ein. Die Lösung des Azulens, für das der genaue Ort der Methoäthylolgruppe noch nicht festgelegt ist, ist rotstichiger als die des Esters Va oder Vb.

Von besonderem Interesse ist ein Vergleich der Spektren der beiden beschriebenen Azulenderivate aus Tetrahydrofluoranthen mit den Abkömmlingen des 1,2-Benzazulens und des 1,8-Trimethylenazulens. Im UV-Spektrum (Fig. 1) zeigen beide Derivate des Fluoranthenazulens (Kurven 2 und 4) das charakteristische Bandenspektrum der Azulene und große Ähnlichkeit mit den UV-Spektren des 1,2-Benzazulen-carbonsäureesters (Kurve 1) bzw. des Methoäthylol-1,2-benzazulens (Kurve 3). Im sichtbaren Spektrum (Fig. 2) tritt die außerordentliche Ähnlichkeit der Absorptionskurven der Azulen-ester (Kurven 1 und 2) bzw. der Methoäthylolazulene (Kurven 3 und 4) überzeugend hervor. Die Hauptbanden beider Azulene aus Tetrahydrofluoranthen (Kurven 2 und 4) sind gegenüber den Azulenen aus Fluoren (Kurven 1 und 3) nach längeren Wellen verschoben. Wir geben zusätzlich noch das Spek-



trum des 1,8-Trimethylen-azulens (Kurve 6), dessen Anfertigung mit dem Spektral-Densographen früher noch nicht möglich war, und das charakteristisch von den Absorptionsspektren der übrigen Azulene abweicht.

In Tab. 1 sind die wichtigsten Banden der beschriebenen Azulene nochmals vergleichsweise zusammengestellt, wobei die Hauptmaxima der Absorption jeweils fett gedruckt sind:

Tab. 1

Grundazulene	665	632	<b>581</b>	560
1,2-Benzazulene-ester	<b>663</b>	608	558	
Azulene-ester aus Tetrahydro-fluoranthen (V)	<b>676</b>	<b>628</b>	540	
Methoäthylol-benzazulene	661	<b>598</b>	550	
Methoäthylol-azulene aus V	672	<b>611</b>	570	492
1,2-Benzazulene	682	<b>613</b>	556	
1,8-Trimethylen-azulene	652	622	<b>587</b>	

Der angegliederte Trimethylenring der beiden Azulene-Derivate aus Tetrahydro-fluoranthen, der in beiden möglichen Arten der Ringerweiterung (Va und Vb) einem Substituenten an der Besetzungsstelle 3, also an einer ungeraden Substitutionsstelle entspricht, müßte einen bathochromen Einfluß ausüben, falls die optischen Verschiebungsregeln am Grundazulene auch für das Benzazulene-System Geltung besitzen, was mit den Versuchsergebnissen übereinstimmt.

Aus den Absorptionsspektren im sichtbaren Gebiet und im UV-Gebiet gewinnt man den Eindruck, daß die Buchner-Synthese am Tetrahydro-fluoranthen ebenso wie am Fluoren und Tetrahydro-acenaphthen nur, oder weit überwiegend in einer Richtung verläuft.

Für die Aufnahme der Absorptionsspektren sind wir der Agfa-Filmfabrik, insbesondere Herrn Dr. E. Rolle und dem Chemiewerk Leuna, insbesondere Herrn Dr. Bemann, zu Dank verpflichtet. Die Mikroanalysen wurden von Herrn R. Martin in der mikroanalytischen Abteilung des Instituts für organische Chemie der Universität Leipzig ausgeführt.

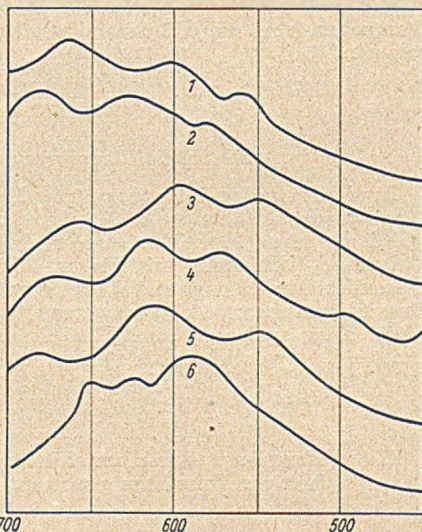


Fig 2

- 1 Carbäthoxy-azulene aus Fluorene
- 2 Carbäthoxy-azulene aus Tetrahydrofluoranthen (V)
- 3 Methoäthylol-azulene aus Fluorene
- 4 Methoäthylol-azulene aus Tetrahydrofluoranthen
- 5 1,2-Benzazulene
- 6 1,8-Trimethylen-azulene



## Beschreibung der Versuche

*Tetrahydro-fluoranthen (IV)*

100 g Fluoranthen (Teorverwertung-Duisburg-Meiderich) wurden unter Zusatz von 50 ccm Methanol bei 120° und 150 Atü mit 20 g Raney-Nickel 3 Stunden hydriert und nach Abdampfen des Lösungsmittels bei 8 mm fraktioniert, wobei die Fraktion vom Sdp. 183—190° kristallisierte und nach dem Umkristallisieren aus Methanol bei 74—75° schmolz.

$C_{16}H_{14}$ (206)	Ber. C 93,2	H 6,8
	Gef. » 92,93	» 6,78

*Azulenester aus Tetrahydro-fluoranthen (V)*

In 20 g auf 140° erhitztes Tetrahydro-fluoranthen wurden innerhalb 5 Stunden 8 g Diazo-ossigester eingetrofft. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Stunden auf 200° erhitzt. Seine grüne Lösung in Cyclohexan wurde über 200 g Aluminiumoxyd (Brockmann) gegeben, wobei das Azulen äußerst langsam als grüne Zone wanderte und mit einem Cyclohexan-Äthergemisch eluiert wurde. Nach 4-maligem Wiederholen dieser Operation wurde der Azulen-ester durch je 2-stündiges Schütteln mit 90-proc. Phosphorsäure und Regenerieren durch Zersetzung des Adduktes mit Eis 2-mal gereinigt und nochmals in Pentanlösung über  $Al_2O_3$  chromatographiert. Er wanderte als grüne Zone, das Eluat war violettstichig blau, der zähe Rückstand grün. Der Ester verhielt sich optisch genau so wie der Benzazulen-ester. Der Rückstand wurde 2 Tage im Dunkeln im guten Vakuum belassen.

$C_{20}H_{18}O_2$ (290)	Ber. C 82,2	H 6,2
	Gef. » 82,63	» 6,58

*Methoäthylol-azulen aus Tetrahydro-fluoranthen*

In die Grignard-Lösung aus 0,5 g Magnesium und 3 g Jodmethyl in 20 ccm Äther wurde die Lösung von 0,5 g Azulenester (V) in 20 ccm Äther eingetrofft, wobei die blaue Farbe bestehen blieb. Nach 5-stündigem Stehen wurde die Grignard-Verbindung mit Eis und Chlorammoniumlösung zersetzt und mit Thiosulfatlösung, Lauge und Wasser gewaschen. Der blaue Ätherrückstand wurde über Aluminiumoxyd chromatographiert, wobei das Azulen sehr langsam als blauer Ring wanderte. Nach Eluieren mit Äther-Petroläthergemisch und Abdunsten i. V. verblieb es als zähfeste blaue Masse.

$C_{20}H_{20}O$ (276)	Ber. C 96,9	H 7,2
	Gef. » 96,43	» 6,82

Alle Absorptionsspektren im sichtbaren Gebiet wurden mit dem Spektraldensographen von Zeiss-Ikon gemessen.



(Mitteilungen aus dem Chemischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim)

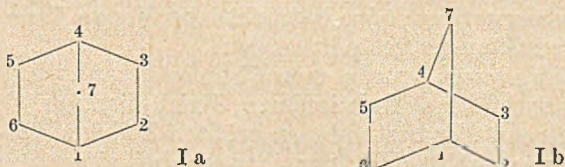
## Über innermolekulare Umlagerungen in der Bicyclo-[1,2,2]-heptan-Reihe I

Die Einwirkung von salpetriger Säure auf Camphenylamin

Von Siegfried Beckmann und Roland Bamberger

(Eingelaufen am 3. August 1951)

Die Retropinakolin-Umlagerungen des Borneols bzw. Isoborneols zu Camphen und umgekehrt verlaufen, wie H. Meerwein<sup>1)</sup> gezeigt hat, über die Kationen der als Zwischenprodukte auftretenden Ester; die Annahme einer tricyclischen Zwischenstufe konnte in diesem Fall mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Auch die Umlagerungen verschiedener anderer Terpenalkohole lassen sich auf ähnliche, über Esterkationen verlaufende Retropinakolin-Umlagerungen zurückführen. Diesen Ester-Umlagerungen nahe verwandt sind die Umlagerungen, die beim Behandeln primärer Amine mit salpetriger Säure eintreten, wobei sich vorübergehend Diazoniumsalze bilden dürften, bei deren Zerfall Ionen als Zwischenprodukte auftreten können. Aber schon Meerwein<sup>2)</sup> hat bei den Bicyclo-[1,2,2]-heptan-abkömmlingen einen weiteren Umlagerungstypus angenommen, eine 2,6-Verschiebung, die ebenfalls als Umlagerung von Radikationen aufgefaßt wurde. Dieser Umlagerungstypus unterscheidet sich von den Retropinakolin-Umlagerungen (Wagnersche und Nametkinsche Umlagerung) insofern, als bei letzteren die Loslösung bzw. Wiederverknüpfung von Bindungen ausschließlich an zwei benachbarten C-Atomen vor sich geht, bei Camphanabkömmlingen, z. B. an den C-Atomen 1 und 2 oder 2 und 3, während bei der 2,6-Verschiebung zwei durch ein drittes getrennte C-Atome in Mitleidenschaft gezogen sind. Die C-Atome 2 und 6 sind im Bicyclo-[1,2,2]-heptan-Ringsystem allerdings, was aus der Darstellung Ib etwas besser sichtbar wird, räumlich viel stärker genähert, als etwa aus der ebenen Formulierung Ia hervorgeht.

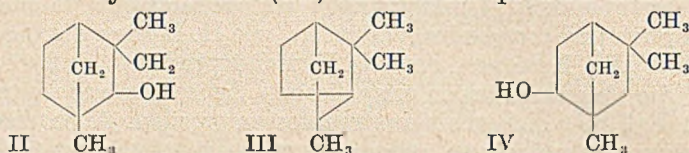


<sup>1)</sup> H. Meerwein und K. van Emster, B. 53, 1815 (1920); B. 55, 2500 (1922); H. Meerwein und Mitarbeiter, A. 453, 16 (1927).

<sup>2)</sup> H. Meerwein und R. Wortmann, A. 435, 190 (1924); H. Meerwein und F. Montfort, A. 435, 207 (1924).



Die zwei Beispiele von Meerwein für die 2,6-Verschiebung, der Übergang des  $\alpha$ -Campherdichlorids in  $\beta$ -Campherdichlorid und die Racemisierung des Isoborneols, erwiesen sich allerdings als nicht zutreffend und ließen sich später auf gewöhnliche Retropinakolin-Umlagerungen zurückführen<sup>3)</sup>. Einen dritten Fall dieser Art, den Übergang von Fenchol (II) in Isofenchol (IV) bzw. in die nur aus letzterem abzuleitenden Kohlenwasserstoffe, haben G. Komppa und G. Nym an<sup>4)</sup> untersucht und den Reaktionsverlauf weitgehend aufklären können; es ist hier mit sehr großer Wahrscheinlichkeit das tricyclische Cyclofenchol (III) als Zwischenprodukt anzunehmen.



Ein tricyclisches Zwischenprodukt, das Apocyclen (VI), wird von Komppa und Nym an<sup>5)</sup> auch bei der Umlagerung des Camphenylchlorids (Va) in Isoapoborneol ( $\alpha$ -Isofenchocamphorol) (VII) und ein konfigurativ nicht bestimmtes  $\beta$ -Fenchocamphorol (VIII) angenommen. Einen ähnlichen Reaktionsverlauf scheint auch die Umsetzung des Camphenylamins (V) mit salpetriger Säure zu nehmen. G. und O. Komppa<sup>6)</sup> erhielten hierbei ein gleichartig zusammengesetztes Alkoholgemisch; auf dessen Zusammensetzung nur indirekt aus seinen oxydativen Abbauprodukten geschlossen wurde, ohne vorausgehende Isolierung der einzelnen Reaktionsprodukte. Auch hier wird ein Reaktionsablauf über das tricyclische Apocyclen als Zwischenstufe angenommen, das jedoch unter den Reaktionsprodukten nicht festgestellt wurde.

Zur näheren Untersuchung dieser Umlagerungsreaktion sind wir von einem weitgehend racemisierten Camphenylamin (V) ausgegangen, das durch Reduktion von Camphenilonoxim mit Natrium und Alkohol gewonnen war und ein Gemisch der *endo*- und *exo*-Form darstellt, dessen Trennung wegen der damit verbundenen Verluste unterblieb. Bei der Umsetzung von dessen Hydrochlorid mit salpetriger Säure und Eisessig konnte außer einem Alkoholgemisch noch ein Kohlenwasserstoff und eine beträchtliche Menge Ester unter den Reaktionsprodukten festgestellt werden.

Das Alkoholgemisch wurde mit Phthalsäureanhydrid verestert und durch sorgfältige fraktionierte Kristallisation der sauren Phthalate getrennt. Es bestand zum größten Teil aus *Apo-isoborneol* ( $\alpha$ -Isofenchocamphorol) (VII), das ja auch bei einer Wagnerschen

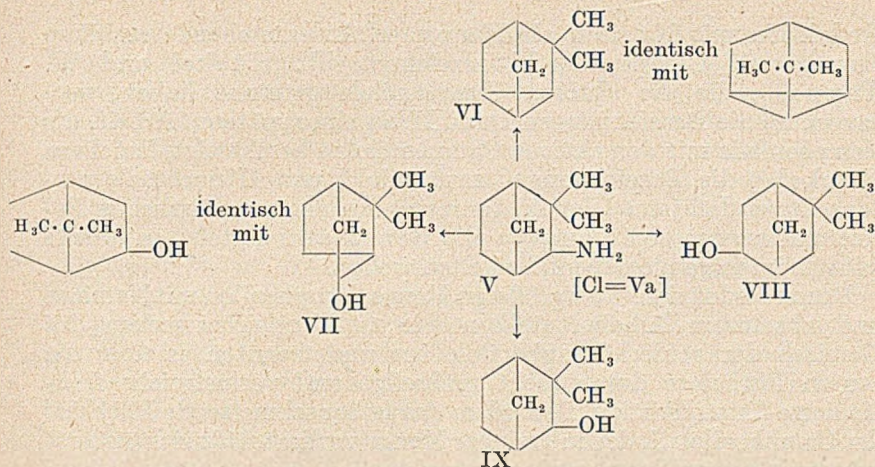
<sup>3)</sup> J. Houben und E. Pfannkuch, A. 489, 193 (1931).

<sup>4)</sup> A. 535, 252 (1938).

<sup>5)</sup> B. 69, 1813 (1936).

<sup>6)</sup> B. 69, 2606 (1936).





Umlagerung des Camphenylamins als Reaktionsprodukt zu erwarten wäre. Daneben wurden aus dem Gemisch die beiden diastereomeren Camphenilole (IX) isoliert, sowie schließlich als mengenmäßig geringster Bestandteil das  $\beta$ -Isosofenchocamphorol (VIII), dessen Bildung aus dem Camphenylamin durch normale Retro-pinakolin-Umlagerungen nicht möglich ist. Die so erhaltenen Alkohole waren optisch inaktiv. Sie konnten alle in reinem Zustande gewonnen und durch Derivate und Abbauprodukte eindeutig charakterisiert werden.

Das dl-Iso-apóborneol (dl- $\alpha$ -Iso-fenchocamphorol) ist von G. Komppa und T. Hasselström<sup>7)</sup> aus Apocyclen durch Anlagerung von Chlorwasserstoff und anschließende Verseifung, sowie von G. Komppa und G. Nyman<sup>8)</sup> durch Verseifung des „Camphenylchlorids“ gewonnen worden. Bei der Nachprüfung dieser Angaben fanden wir, daß das Iso-apoborneol bislang noch nicht in reiner Form vorgelegen hat. Bei sorgfältiger Reinigung über das saure Phthalat erhöhte sich sein Schmp. auf 141,5—142,5<sup>0</sup> (Komppa und Nyman 132—133<sup>0</sup>), der des sauren Phthalats auf 174—175<sup>0</sup> (Komppa und Nyman 168—169<sup>0</sup>).

Das in der älteren Literatur erwähnte Camphenilol ist stets ein Gemisch der beiden Diastereomeren gewesen. G. Komppa und S. Beckmann<sup>9)</sup> haben erstmalig die beiden dl-Camphenilole als Individuen beschrieben, wenn auch nicht ganz frei vom jeweiligen anderen Isomeren. Dabei wurde das höherschmelzende, bei der Reduktion des Ketons mit Natrium in geringerer Menge entstehende Diastereomere als Camphenilol I, das niedriger schmelzende, bei der

<sup>7)</sup> A. 497, 116 (1932).

<sup>8)</sup> B. 69, 1814 (1936).

<sup>9)</sup> A. 522, 149 (1936).



Reduktion mit Natrium als Hauptprodukt entstehende stabilere Isomere als Camphenilol II bezeichnet. W. Hückel und W. Tappe<sup>10)</sup>, die die aktiven Camphenilole getrennt haben, vertauschten die Bezeichnungen I und II. In einer späteren Arbeit, die sich ebenfalls mit den aktiven Camphenilolen beschäftigt, hat dann Hückel<sup>11)</sup> die Bezeichnung Camphenilol I und II nochmals vertauscht, so daß jetzt Übereinstimmung mit der ursprünglichen Bezeichnungsweise von Komppa und Beckmann besteht, an welche wir uns im folgenden ebenfalls halten wollen.

Durch Reduktion einer größeren Menge Camphenilon mit Natrium und absolutem Alkohol stellten wir zu Vergleichszwecken das Gemisch der beiden Camphenilole her und trennten es über die sauren Phthalate durch recht mühselige und verlustreiche fraktionierte Kristallisation. Besonders das höher schmelzende Phthalat des Camphenilols I, das in geringer Menge vorliegt, läßt sich äußerst schwer in reiner Form gewinnen.

Die beiden reinen Diastereomeren und deren Derivate haben folgende Schmelzpunkte:

	Alkohol	saures Phthalat	Phonylurethan
dl-Camphenilol I	103—104°	178—179°	110—111°
dl-Camphenilol II	75—76°	154—155°	105,5—106,5°

Die bei der Behandlung des Camphenilylamin-hydrochlorids mit salpetriger Säure erhaltene *Esterfraktion* besteht hauptsächlich aus Chlorid, das bei der Verseifung im wesentlichen Apo-isoborneol (VII) und weniger Camphenilol I (IX) liefert.

Die *Kohlenwasserstoff-Fraktion* wurde mit alkalischer Permanganatlösung behandelt, wobei der allergrößte Teil des Kohlenwasserstoffs unangegriffen blieb und nach der Aufarbeitung in einheitlichem kristallisierten Zustande erhalten wurde. Er erwies sich als identisch mit dem von Komppa als hypothetisches Zwischenprodukt angenommenen *Apocyclen* (VI), das ursprünglich wohl durch etwas Alkohol verunreinigt und daher flüssig war. Anhaltspunkte für das Vorliegen eines zweiten Kohlenwasserstoffes wurden nicht gefunden.

Damit war eine Voraussetzung für die Hypothese eines tricyclischen Zwischenproduktes bei der Umlagerung des Camphenilylamins erfüllt. Es mußte nun noch bewiesen werden, daß das Apocyclen tatsächlich unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zu Iso-apoborneol und  $\beta$ -Iso-fenchocamphorol hydratisiert werden kann. Statt des Camphenilylamin-hydrochlorids haben wir daher das Acetat in essigsaurer Lösung mit salpetriger Säure umgesetzt,

<sup>10)</sup> B. 69, 2769 (1936).

<sup>11)</sup> W. Hückel, W. Doll, S. Eskola und H. Weidner, A. 549, 186 (1941).



in der Erwartung, daß in der schwachen wäßrigen essigsäuren Lösung eine Hydratisierung kaum eintreten und somit der Reaktionsverlauf ein anderer sein könnte. Es zeigte sich aber, daß auch bei Abwesenheit von Mineralsäure die Reaktion keineswegs anders verlief. Die Esterfraktion bestand nun aus Acetat statt aus Chlorid, im übrigen war — soweit eine Beurteilung möglich — auch quantitativ dasselbe Alkoholgemisch neben Apocyclen entstanden. Ferner wurde die Umsetzung des Camphenilylamin-acetats mit salpetriger Säure unter besonders milden Bedingungen — unter Kühlung bei 0° und anschließendem Stehenlassen bei Zimmertemperatur — vorgenommen, so daß ein Teil des Amins unangegriffen blieb. Falls man das Apocyclen als Zwischenprodukt annehmen will, müßte unter solchen Bedingungen, unter denen eine Hydratisierung praktisch ausgeschlossen ist, das Apocyclen als primäres Reaktionsprodukt weitgehend angereichert sein. Das Gegenteil war aber der Fall: es wurde kaum Apocyclen und nur sehr wenig  $\beta$ -Iso-fenchocamphorol gefunden, dafür etwas mehr Iso-apoborneol und Camphenilole.

Bei der Anlagerung von Chlorwasserstoff an Apocyclen entsteht nach G. Komppa und G. Nyman<sup>12)</sup> nach anschließender Verseifung als Hauptprodukt Iso-apoborneol (etwa 80%), neben einer geringeren Menge konfigurativ nicht bestimmten  $\beta$ -Fenchocamphorols. Dagegen fanden G. Komppa und R. H. Roschier<sup>13)</sup>, sowie S. Nametkin und Z. Alexandroff<sup>14)</sup>, daß bei der Hydratisierung des Apocyclens mit Essigsäure-Schwefelsäure als Hauptprodukt ein  $\beta$ -Fenchocamphorol neben geringeren Mengen Camphenilols und Apoborneols entstehen. Die Struktur der Alkohole war nur durch oxydativen Abbau ermittelt, eine Isolierung und konfigurative Zuordnung war nicht vorgenommen worden. Wir können diese Befunde bestätigen und ergänzen. Bei der Behandlung von Apocyclen mit Essigsäure in Gegenwart katalytischer Mengen Schwefelsäure und anschließender Verseifung erhielten wir 65–70%  $\beta$ -Isofenchocamphorol, 20–25% Iso-apoborneol und 10–15% konfigurativ nicht bestimmten Camphenilols. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei der Hydratisierung des Apocyclens mit Ameisensäure erhalten. Wir haben ferner eine Anzahl Versuche ausgeführt, um festzustellen, ob das Apocyclen unter den Bedingungen, die bei der Umsetzung des Camphenilylamins mit salpetriger Säure herrschen, überhaupt hydratisiert wird. Dabei wurde in essigsaurer Lösung verschiedener Konzentration sowie mit Zusätzen von Natriumnitrit, Salzsäure und — wegen der geringen Löslichkeit des Apocyclens in Essigsäure — mit Dioxan als Lösungsmittel gearbeitet.

<sup>12)</sup> B. 69, 1814, 1818 (1936).

<sup>13)</sup> A. 429, 175 (1922).

<sup>14)</sup> A. 467, 191 (1928).



Bei allen diesen Versuchen wurde aber das Apocyclen, mindestens zum allergrößten Teil, unverändert zurückgewonnen, während sich ein Acetat nur in so geringen Mengen gebildet hatte, daß es bestenfalls im Destillationsrückstand durch den Geruch gerade noch festzustellen war. Es hatten sich unter günstigsten Bedingungen höchstens einige Proz. Apocyclen umgesetzt.

Zusammenfassend wäre also festzustellen, daß das Apocyclen mit wasserhaltiger Essigsäure mit irgendwie nennenswerter Geschwindigkeit nicht reagiert. Mit Essigsäure-Schwefelsäure oder Ameisensäure verläuft die Reaktion rasch, als Hauptprodukt tritt dann aber nicht Iso-apoborneol, sondern  $\beta$ -Iso-fenchocamphorol auf. Daher kann die Umlagerungsreaktion des Camphenilylamins zum Iso-apoborneol auch nicht über das Apocyclen als Zwischenprodukt verlaufen. Vielmehr liegt es näher, hier eine normale kryptoionisch verlaufende Wagnersche Umlagerung anzunehmen. Dagegen ist es nicht völlig ausgeschlossen, daß die Bildung sehr kleiner Mengen  $\beta$ -Iso-fenchocamphorols auf die Hydratisierung des Apocyclens zurückgeführt werden könnte. Eine andere Möglichkeit für die Bildung des  $\beta$ -Iso-fenchocamphorols wäre durch eine 2,6-Verschiebung im Sinne Meerweins gegeben. In diesem Falle wäre allerdings mit der Wanderung eines Wasserstoffatoms zu rechnen, das, um das Sextett des vom Anion verlassenen Kohlenstoffs zu ergänzen, ein Elektronenpaar mitbringen, d. h. als Anion wandern müßte.

Betrachtet man die konfigurativen Verhältnisse der aus dem Camphenilylamin erhaltenen Alkohole, dann ergeben sich recht bemerkenswerte Zusammenhänge. Das Ausgangsmaterial war ein Gemisch von *exo*- und *endo*-Camphenilylamin. Ohne Umlagerung sind daraus die beiden Camphenilole entstanden. Dagegen scheint die Umlagerung sterisch selektiv zu verlaufen: es wurde nur das Apo-isoborneol gefunden und keinerlei Anhaltspunkte für das diastereomere Apoborneol, desgleichen nur  $\beta$ -Iso-fenchocamphorol und keinerlei  $\beta$ -Fenchocamphorol. Die gleiche sterische Selektivität ist auch in einigen anderen Fällen beobachtet worden, z. B. bei der Umsetzung der beiden diastereomeren Norbornylamine mit salpetriger Säure: es entsteht aus beiden Aminen dasselbe Norborneol, und zwar die *exo*-Form<sup>15)</sup>. Auch dem Apo-isoborneol und dem  $\beta$ -Iso-fenchocamphorol muß man aber mit großer Wahrscheinlichkeit aus Gründen analoger Bildungsweise wie beim *exo*-Borneol (Isoborneol) die *exo*-Konfiguration zusprechen. Allen genannten Alkoholen ist nämlich gemeinsam, daß sie bei der alkalischen Reduktion der Ketone nicht oder nur in untergeordneter Menge entstehen. Dagegen scheint die *exo*-Form, außer bei der Umsetzung der Amine mit salpetriger Säure, auch bei der Hydratisierung der

<sup>15)</sup> K. Alder und G. Stein, A. 514, 211 (1934); 525, 183 (1936).



Kohlenwasserstoffe in Gegenwart starker Säuren bevorzugt zu entstehen.

Es ist beabsichtigt, die hier angedeuteten Gesetzmäßigkeiten an weiteren Beispielen nachzuprüfen.

Der „Lech-Chemie“, Gersthofen, sind wir für die Überlassung von Ausgangsmaterial zu großem Dank verpflichtet.

## Beschreibung der Versuche

### Camphenilylamin-hydrochlorid

Zur Gewinnung des Camphenilylamins gingen wir von einem schwach rechtsdrehenden Camphen aus;  $[\alpha]_D^{25} = +17,8^\circ$  in Alkohol. | W. Hückel<sup>16)</sup> gibt für d-Camphen in Alkohol  $[\alpha]_D^{20} = +99,6^\circ$  an.

Aus dem Camphen wurde im wesentlichen nach der Vorschrift von P. May<sup>17)</sup> über das  $\omega$ -Nitrocamphen das Camphenilon dargestellt. Schmp. 39—40°.  $[\alpha]_D^{25} = +8,4^\circ$  in Benzol. Nach Hückel<sup>16)</sup> ist  $[\alpha]_D^{20} = +64,3^\circ$ .

Das Camphenilon wurde in das Oxim (Schmp. 108—109°) übergeführt, dieses mit Natrium und Alkohol zum Camphenilylamin reduziert<sup>18)</sup>, und letzteres als Hydrochlorid isoliert. Dieses war ganz schwach rechtsdrehend:  $[\alpha]_D^{25} = +2,0^\circ$  in Wasser. Es ist ein Gemisch des *exo*- und *endo*-Isomeren.

### Umsetzung von Camphenilylamin-hydrochlorid mit salpetriger Säure<sup>19)</sup>

Zu 45 g Camphenilylamin-hydrochlorid in 120 ccm Wasser werden 24 g Natriumnitrit in 30 ccm Wasser und 24 ccm Eisessig zugegeben und sofort Wasserdampf durchgeleitet. Das übergehende, grünlich gefärbte Öl wird vom Wasser abgetrennt und unter Zusatz von etwas Natronlauge nochmals mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat wird in Äther aufgenommen, getrocknet und fraktioniert. Man erhält so 32 g eines von Kristallen durchsetzten Öles, das größtenteils bei 90—110°/30 mm siedet.

Um aus dem Reaktionsgemisch die Alkohole abzutrennen, wird es mit 36 g Phthalsäure-anhydrid und 16 g Pyridin auf dem Wasserbade erwärmt. Das Reaktionsgemisch wird in Äther gelöst, mit verd. Salzsäure und Wasser gewaschen und mit 2n-Sodalösung ausgeschüttelt. Die Sodalösung A enthält die sauren Phthalate der Alkohole, die Ätherlösung B Kohlenwasserstoff und Ester.

Die Sodalösung A wird angesäuert und die ölig ausfallenden Phthalate werden mit Äther ausgeschüttelt. Die getrocknete Ätherlösung wird zum Lösungsmittel befreit, der Rückstand in Benzol aufgenommen und die Benzollösung von etwas ausgeschiedener Phthalsäure filtriert. Durch Zusatz von niedrigsiedendem Ligroin wird die Kristallisation eingeleitet. Zuerst wird mehrfach aus Benzol-Ligroin, dann aus wasserhaltigem Methanol umkristallisiert. Man erhält so Kristallfraktionen, deren Schmelzpunkt bei 174—175° konstant bleibt und die, mit dem

<sup>16)</sup> A. 549, 191 (1941).

<sup>17)</sup> Dissertation, T. H. Aachen 1910.

<sup>18)</sup> G. Komppa A. 366, 71 (1909)

<sup>19)</sup> Vgl. auch G. und O. Komppa, B. 69, 2806 (1936).



sauren Phthalat des Iso-apoborneols gemischt, keine Depression geben. Die Verseifung des Phthalats liefert das bei 141,5—142,5° schmelzende dl-Iso-apoborneol ( $\alpha$ -Iso-fenchocamphorol).

Die Oxydation des Iso-apoborneols mit Kaliumpermanganat gibt Apocampfersäure, Schmp. und Mischschmp. 203—204°. Daraus das Anhydrid, Schmp. und Mischschmp. 175—176°.

Aus den Mutterlaugen des Iso-apoborneol-phthalats erhält man ein zweites, in rechteckigen Täfelchen kristallisierendes Phthalat, das nach wiederholtem Umkristallisieren aus wasserhaltigem Methanol bei 178—179° schmilzt. Es konnte durch Mischschmp. mit dem sauren Phthalat des dl-Camphenilols I (vgl. weiter unten) identifiziert werden.

Die vereinigten Mutterlaugen werden eingengt. Durch fraktionierte Kristallisation aus wasserhaltigem Methanol wird ein drittes Phthalat isoliert, das bei 154° schmilzt und, mit dem sauren Phthalat des dl-Camphenilols II (Schmp. 154—155°) gemischt, keine Depression gibt.

Die beiden letztgenannten Phthalate wurden zu den entsprechenden Alkoholen verseift und diese mit Dichromat-Schwefelsäure zu dl-Camphenilon oxydiert. Das Keton wurde durch das Semicarbazon identifiziert. Schmp. und Mischschmp. 222—223°.

Nach wiederholter Abtrennung der höher schmelzenden Phthalate konnte aus den Endmutterlaugen durch Kristallisation aus Essigester-Petroläther und Benzol-Petroläther ein in feinen Nadelchen kristallisierendes viertes Phthalat abgetrennt werden, das bei 130—131° schmolz und durch Mischschmp. mit dem sauren Phthalat des dl-Iso- $\beta$ -fenchocamphorols<sup>20)</sup> identifiziert wurde. Durch Verseifung des Phthalats und Oxydation des erhaltenen Alkohols mit Kaliumpermanganat entstand die cis-Apofenchocampfersäure. Schmp. und Mischschmp. 144,5—145°.

$C_9H_{14}O_4$  (186,2) Ber. Äquiv. Gew. 93,1 Gef. 93,0.

Die nach Ausschütteln der sauren Phthalate mit Sodalösung hinterbliebene Ätherlösung B wurde getrocknet, der Äther an einer kleinen Kolonne abdestilliert und der Rückstand fraktioniert.

Fraktion I: 130—145°/730 mm 1,5 g Apocyclen,

» II: 185—200°/730 mm 7 g Ester (Chlorid).

Fraktion I wurde 15 Stunden mit alkalischer Permanganatlösung geschüttelt. Es wurde nur sehr wenig Permanganat verbraucht. Der mit etwas Braunstein durchsetzte feste Kohlenwasserstoff wurde abgesaugt, in Äther aufgenommen, und durch Waschen mit Natriumbisulfatlösung vom Braunstein befreit. Sdp. 134,5—136°/720 mm, Schmp. 40,5—41,5°.

Das Verhalten des Kohlenwasserstoffs gegen Permanganat, seine Eigenschaften und seine Konstanten deuten auf Apocyclen hin. Der Mischschmp. mit einem aus Camphenilon-Hydrason dargestellten Apocyclen ergab keine Depression.

Die Esterfraktion II wurde mit alkoholischer Kalilauge verseift. Der entstandene Alkohol wurde durch Wasserdampfdestillation und Destillation i. V. gereinigt. Er erstarrte in der Vorlage und schmolz roh bei 95—97°. Der Alkohol wurde mit Phthalsäure-anhydrid und Pyridin verestert. Durch fraktionierte Kristallisation wurden die sauren Phthalate des Iso-apoborneols (Schmp. 174 bis 175°) und des Camphenilols I (Schmp. 178—179°) abgetrennt und durch Mischschmp. identifiziert. Die Mutterlaugen wurden nicht näher untersucht.

In dem mit Salpetersäure angesäuerten wäßrigen Verseifungsrückstand ließ sich mit Silbernitrat reichlich Cl nachweisen. Die Esterfraktion bestand demnach im wesentlichen aus den Chloriden des Iso-apoborneols und Camphenilols I.

<sup>20)</sup> G. Komppa und S. Beckmann, A. 537, 140 (1939).



## Umsetzung des Camphenilylamin-acetats mit salpetriger Säure

a) Bei Wasserbadtemperatur. Eine Lösung von 24 g Camphenilylamin in 50 ccm Wasser und 26 g Eisessig wurden mit 15 g Natriumnitrit in 30 ccm Wasser langsam versetzt. Die Reaktion setzte sofort unter Wärmeerzeugung ein und wurde durch zweistündiges Erwärmen auf dem Wasserbade zu Ende geführt. Das Reaktionsprodukt wurde ausgeäthert und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Es wurden erhalten:

2 g Apocyclen, Schmp. 41,5—42,5°,  
6 g Ester (Acetat),  
7,5 g Alkohole.

Die Esterfraktion bestand im wesentlichen aus Iso-apobornylacetat. Bei der Verseifung lieferte sie ein Iso-apoborneol, das roh bei 112—114° schmolz, demnach nur wenig von den anderen, niedriger schmelzenden Alkoholen enthalten konnte.

Aus der Alkoholfraktion wurden 4 g Iso-apoborneol über das saure Phthalat abgetrennt. Der Rest der Alkohole wurde mit Kaliumpermanganat oxydiert. Dabei wurden erhalten: 1,2 g Camphenilon, 1,2 g Apocampfersäureanhydrid und 0,6 g Apofenchocampfersäure. Demnach sind insgesamt folgende Mengen an den einzelnen Alkoholen, einschließlich der als Ester vorliegenden, ermittelt worden: 8,5 g Iso-apoborneol, 1,2 g Camphenilole und 0,5 g Iso- $\beta$ -fenchocamphorol.

b) Umsetzung bei 0°. Eine Lösung von 20 g Camphenilylamin in 75 ccm 50-proc. Essigsäure wurde auf 0° abgekühlt und im Verlauf von zwei Stunden unter Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 20 g Natriumnitrit in 40 ccm Wasser versetzt. Nach 12-stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde das abgeschiedene Öl ausgeäthert, die ätherische Lösung mit Sodälösung gewaschen und getrocknet. Das Reaktionsprodukt, 13,8 g, wurde in obenbeschriebener Weise aufgearbeitet. Fast ein Drittel des Camphenilylamins war nicht umgesetzt worden. Das Reaktionsprodukt bestand aus 0,6 g Kohlenwasserstoff, 4,3 g Acetat und 6,2 g Alkoholen.

Aus der Kohlenwasserstoff-Fraktion, die offenbar noch durch Alkohol verunreinigt war, konnte wegen der geringen Menge das Apocyclen nicht rein erhalten werden.

Die Esterfraktion bestand zum allergrößten Teil aus Iso-apobornylacetat. Bei deren Verseifung wurde ein Iso-apoborneol erhalten, das roh bei 115—116° schmolz.

Aus der Alkoholfraktion wurden über die sauren Phthalate 2,5 g Apo-isoborneol abgetrennt. Der Rest der Alkohole wurde mit Kaliumpermanganat oxydiert. Dabei wurden erhalten: 1,1 g Camphenilon, 1,4 g Apocampfersäureanhydrid und 0,1 g *cis*-Apofenchocampfersäure. Unter Berücksichtigung der Oxydationsergebnisse waren im Reaktionsprodukt folgende Mengen der einzelnen Alkohole festgestellt worden, einschließlich der als Ester vorliegenden: 6,4 g Iso-apoborneol, 1,1 g Camphenilole, 0,1 g eines  $\beta$ -Fenchocamphorols.

### *dl*-Iso-apoborneol (*dl*- $\alpha$ -Iso-fenchocamphorol)

Das Iso-apoborneol wurde durch Verseifung eines aus 29 g Camphenilol nach G. Komppa und G. Nyman<sup>21)</sup> dargestellten „Camphenilylchlorids“ mit Kalkmilch gewonnen. Der rohe Alkohol wurde in das saure Phthalat übergeführt und dieses aus wasserhaltigem Methanol bis zum konstanten Schmp. umkristallisiert. Es wurden so 12,5 g an reiner Iso-apoborneol-phthalestersäure erhalten. Kleine, farblose Prismen, Schmp. 174—175°.

$C_{17}H_{20}O_4$  (288,3) Ber. Äquiv.Gew. 288,3 Gef. Äquiv.Gew. 288,0

<sup>21)</sup> B. 69, 1813 (1936).



Durch Verseifung des Phthalats wurde das dl-Iso-apoborneol erhalten. Aus Petroläther kleine farblose Nadeln. Schmp. 141,5—142,5°.

$C_9H_{16}O$  (140,2) Ber. C 77,2 H 11,5  
Gef. » 77,0 » 11,6

Das Phenylurethan des Iso-apoborneols hat den Schmp. 113—114°.

### Die diastereomeren dl-Camphenilole

75 g Camphenilon wurden nach G. Komppa<sup>22)</sup> mit Natrium und Alkohol reduziert. Das rohe Camphenilol schmolz bei 82—84°. Es wurde mit Phthalsäureanhydrid und Pyridin verestert und die erhaltenen sauren Phthalate (127 g) aus wasserhaltigem Methanol umkristallisiert.

Zuerst wurde das saure Phthalat des Camphenilols II abgeschieden, das in kleinen harten Prismen kristallisiert und rein bei 154—155° schmilzt. Ausbeute an reinem Phthalat 87 g.

$C_{17}H_{26}O_4$  (288,3) Ber. Äquiv.Gew. 288,3 Gef. Äquiv.Gew. 287,6

Daraus durch Verseifung mit wäßriger Natronlauge und anschließende Wasserdampfdestillation das Camphenilol II. Umkristallisiert aus Petroläther, Schmp. 75—76°.

Das Phenylurethan des Camphenilols II kristallisiert aus Petroläther in feinen Nadelchen. Schmp. 105,5—106,5°.

$C_{18}H_{21}O_2N$  (259,3) Ber. N 5,41 Gef. N 5,40, 5,43

Aus den eingeeengten Mutterlaugen des Camphenilols II kristallisiert das saure Phthalat des Camphenilols I, das nach vielfach wiederholtem Umkristallisieren in rechteckigen Tafeln vom Schmp. 178—179° erhalten wird. Ausbeute an reinem Phthalat 3 g.

$C_{17}H_{20}O_4$  (288,3) Ber. Äquiv.Gew. 288,3 Gef. Äquiv.Gew. 287,9

Daraus durch Verseifung das Camphenilol I. Feine Nadeln aus Petroläther, Schmp. 103—104°. Mit dem Camphenilol II gemischt tritt eine Schmelzpunktniedrigung ein.

Das Phenylurethan von Camphenilol I bildet, aus Petroläther umkristallisiert, kurze Nadeln vom Schmp. 110—111°.

$C_{18}H_{21}O_2N$  (259,3) Ber. N 5,41 Gef. N 5,37, 5,36

### Hydratisierung des Apocyclens nach Bertram-Walbaum

10 g Apocyclen (Schmp. 42—42,5°) wurden mit 25 g Eisessig und 6 Tropfen 50-proc. Schwefelsäure 4 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Das Acetat wurde mit Wasser ausgefällt, ausgeäthert, mit Sodalösung und Wasser gewaschen und destilliert. Sdp. 100—104°/17.

Das Acetat wurde mit 2n-alkoholischer Kalilauge verseift. Das entstandene Alkoholgemisch wurde mit Wasserdampf übergetrieben, ausgeäthert und destilliert. Sdp. 96—100°/18, Schmp. 46—48°.

Das Alkoholgemisch wurde mit Phthalsäureanhydrid und Pyridin verestert. Durch fraktionierte Kristallisation der sauren Phthalate aus Benzol-Petroläther wurde ein in feinen Nadeln kristallisierendes Phthalat abgetrennt, das rein bei 130—131° schmolz und nach Kristallform und Schmp. mit dem von G. Komppa und S. Beckmann<sup>23)</sup> beschriebenen sauren Phthalat des Iso-β-fenchocamphorols übereinstimmte.

$C_{17}H_{20}O_4$  (288,3) Ber. Äquiv.Gew. 288,3 Gef. Äquiv.Gew. 288,5

<sup>22)</sup> A. 366, 71 (1909).

<sup>23)</sup> A. 537, 140 (1939).



Durch Verseifung des Phthalats mit Natronlauge wurde das *dl*-Iso- $\beta$ -fenchocamphorol erhalten. Sdp. 95—96°/15, Schmp. 61,5—62°. Durch Umkristallisieren aus Petroläther wurde der Schmp. nicht erhöht. Komppa und Beckmann (a. a. O.) geben ihn für das *dl*-Iso- $\beta$ -fenchocamphorol zu 60—61° an.

Das bisher nicht beschriebene *Phenylurethan des Iso- $\beta$ -fenchocamphorols* kristallisiert aus niedrigsiedendem Ligroin in feinen Nadeln, die bei 93—93,5° schmelzen.

$C_{16}H_{21}O_2N$  (259,3) Ber. N 5,41 Gef. N 5,48, 5,46

Bei der Oxydation des Iso- $\beta$ -fenchocamphorols mit alkalischer Permanganatlösung wurde *cis*-Apofenchocampfersäure erhalten. Schmp. und Misch-Schmp. 144—145°.

$C_9H_{14}O_4$  (186,2) Ber. Äquiv. Gew. 93,1 Gef. Äquiv. Gew. 93,3

Aus den Mutterlaugen des Iso- $\beta$ -fenchocamphorol-phthalats wurden durch fraktionierte Kristallisation aus Benzol-Petroläther und wasserhaltigem Methanol 0,3 g des sauren Phthalats des *Iso-apoborneols* vom Schmp. 174—175° isoliert und durch Mischschmp. identifiziert.

Die angefallenen vereinigten Mutterlaugen wurden eingedampft, der Rückstand verseift und das so erhaltene Alkoholgemisch mit alkalischer Permanganatlösung oxydiert. Als Oxydationsprodukte wurden isoliert: 0,9 g Camphenilon, 1,3 g *cis*-Apofenchocampfersäure und 1,9 g Apocampfersäure-anhydrid.

Aus der fraktionierten Kristallisation der Phthalate und dem oxydativen Abbau der Mutterlaugen-Alkohole ergibt sich folgende Zusammensetzung für das bei der Einwirkung von Eisessig-Schwefelsäure auf Apocyclen erhaltene Alkoholgemisch:

5,0 g Iso- $\beta$ -fenchocamphorol = 66%,  
 1,7 g Iso-apoborneol ( $\alpha$ -Isofenchocamphorol) = 22%,  
 0,9 g Camphenilole = 12%.

Die Hydratisierung des Apocyclens wurde in ganz analoger Weise auch mit Ameisensäure ohne Zusatz von Schwefelsäure durchgeführt und dabei ein ganz ähnliches Ergebnis erhalten, und zwar: 65% Iso- $\beta$ -fenchocamphorol, 26,5% Iso-apoborneol und 8,5% Camphenilole.

#### Versuche zur Hydratisierung des Apocyclens mit Essigsäure

Es wurden verschiedene Versuche ausgeführt, um festzustellen, wie weit das Apocyclen unter den Bedingungen, die bei der Umsetzung des Camphenilylamins mit salpêtriger Säure herrschen, hydratisiert wird. Es seien hier nur einige als Beispiele angeführt.

A. 4,8 g Apocyclen wurden mit 20 cem 50-proc. Essigsäure und 1,2 g Natriumnitrit auf dem Wasserbade unter häufigem Umschütteln 6 Stunden erwärmt. — Zurückgewonnen 4,4 g Apocyclen. Der Destillationsrückstand hatte schwachen Acetatgeruch.

B. 4,6 g Apocyclen wurden mit 20 cem Eisessig und einer Lösung von 2 g Natriumnitrit und 2 g Natriumacetat in 10 cem Wasser, sowie 10 Tropfen 2n-HCl 12 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. — Zurückgewonnen 4,0 g Apocyclen. Der Rückstand roch schwach nach Ester.

C. 1,2 g Apocyclen wurden in 6 cem Dioxan gelöst und mit 3,0 g Eisessig auf dem Wasserbade erwärmt. Je 1 cem der Lösung wurden titriert.

Verbrauch an  $n/2$ -NaOH: bei Beginn des Versuches 10,20 cem,  
 nach 8 Stunden 10,15 cem.

In keinem Fall konnte eine nennenswerte Umsetzung beobachtet werden.



# Über innermolekulare Umlagerungen in der Bicyclo-[1, 2, 2]-heptan-Reihe II

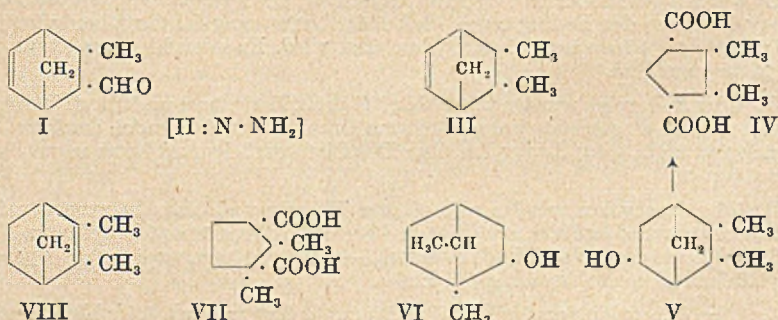
## Das *trans*-2,3-Dimethyl-bicyclo-[1,2,2]-hepten-(5) und dessen Hydratisierung

Von Siegfried Beckmann und Roland Bamberger

(Eingelaufen am 3. August 1951)

Bei der Bertram-Walbaumschen Reaktion, der Anlagerung von Essigsäure an bicyclische Terpene in Gegenwart katalytischer Mengen Schwefelsäure, gehen in der Regel Umstellungen des Kohlenstoffgerüsts vor sich, die den Retropinakolin-Umlagerungen bei der Wasserabspaltung aus den Terpenalkoholen bzw. der Säureabspaltung aus deren Estern entsprechen. Wie in der vorangehenden Mitteilung gezeigt worden ist, muß man bei den Bicyclo-[1,2,2]-heptan-Abkömmlingen aber noch mit anderen Umlagerungen rechnen, die sich nicht auf das Schema der Retropinakolin-Umlagerungen zurückführen lassen. Zum Studium dieser Umlagerungsreaktionen sind verschiedene Verbindungen besonders geeignet, die durch die Dien-Synthese zugänglich geworden sind.

Aus Cyclopentadien und Crotonaldehyd haben O. Diels und K. Alder<sup>1)</sup> den 6-Methyl-endomethylen-tetrahydrobenzaldehyd (I) gewonnen. Durch dessen Reduktion über das Hydrazon (II) erhält man ein neues Apoterpen, das 2,3-Dimethyl-bicyclo[1,2,2]-hepten-(5) (III), das sich vom Santen (VIII) nur durch die Lage der Doppelbindung unterscheidet und daher kurz *Para-santen* genannt werden soll. Der so erhaltene Kohlenwasserstoff stellt die *trans*-Form dar<sup>2)</sup>. Er bildet ein farbloses Nitrosochlorid und ein Dihydro-



<sup>1)</sup> A. 470, 67, 92 (1929).

<sup>2)</sup> Über unsere Befunde bezüglich der konfigurativen Verhältnisse der diastereomeren 6-Methyl-endomethylen-tetrahydrobenzaldehyde und des Parasantens soll demnächst an anderer Stelle berichtet werden.



triazol, letzteres im Einklang mit den Beobachtungen von K. Alder und G. Stein<sup>3)</sup> über die erhöhte Additionsbereitschaft von Bicyclo-[1,2,2]-hepten-ring-Systemen gegenüber Phenylazid.

Das *trans*-Para-santen (III) addiert glatt Essigsäure in Gegenwart von etwas Schwefelsäure unter Bildung eines nicht einheitlichen Acetats, das bei der Verseifung ein halbfestes Alkoholgemisch liefert. Das Gemisch läßt sich durch Überführung in die sauren Phthalsäureester und deren fraktionierte Kristallisation in zwei Individuen zerlegen. Der in größerer Menge (65–70%) entstandene feste Alkohol erwies sich als identisch mit dem  $\alpha$ -Santenol (VI), das bekanntlich auch bei der Hydratisierung des Santens (VIII) unter Wagnerscher Umlagerung entsteht<sup>4)</sup>, und das durch oxydativen Abbau zur *cis*-Santensäure (VII) einwandfrei identifiziert werden konnte. Der zweite Alkohol war flüssig und gab bei der Oxydation mit alkalischer Permanganatlösung dieselbe 2,3-Dimethyl-cyclopentan-1,4-dicarbonensäure (IV), wie das *trans*-Para-santen. In ihm ist demnach das Kohlenstoffgerüst des *trans*-Para-santens erhalten geblieben. Er ist daher als *trans*-2,3-Dimethyl-bicyclo-[1,2,2]-heptanol-(5) (V) zu formulieren. Seine konfigurative Zuordnung (OH *endo* oder *exo*) bleibt allerdings offen. Da die beiden Methylgruppen im Alkohol, ebenso wie im Para-santen, zueinander *trans*-Stellung einnehmen, bleibt es ferner noch offen, ob die Hydroxylgruppe der *endo*- oder der *exo*-Methylgruppe gegenübersteht.

Nimmt man die Hydratisierung des Para-santens statt mit Eisessig-Schwefelsäure mit 99-proc. Ameisensäure vor, dann erhält man als Reaktionsprodukt fast ausschließlich  $\alpha$ -Santenol. Es tritt also mit Ameisensäure fast vollständige Umlagerung ein. Wenn man dagegen an Para-santen in abs. Ätherlösung trockenen Chlorwasserstoff anlagert und das dabei entstehende Chlorid mit Kalkmilch verseift, erhält man fast nur 2,3-Dimethyl-bicyclo-[1,2,2]-heptanol, d. h. hierbei tritt eine Umstellung des Kohlenstoffgerüsts praktisch nicht ein. Man hat es also in der Hand, aus dem Para-santen entweder den einen oder den anderen Alkohol zu gewinnen, je nachdem ob man mit Ameisensäure oder mit Chlorwasserstoff hydratisiert.

Die Hydratisierung des Para-santens ist insofern von Interesse, weil hier, sowohl bei einer normal als auch bei einer nach dem Schema der Wagnerschen Umlagerung verlaufenden Reaktion, ein strukturell gleiches Reaktionsprodukt zu erwarten ist, nämlich ein 2,3-Dimethyl-bicyclo-[1,2,2]-heptanol-(5) (V). Die Bildung des  $\alpha$ -Santenols beweist, daß hier eine Umlagerungsreaktion abläuft, die nicht auf das Schema einer Retropinakolin-Umlagerung zurückgeführt werden kann. Man könnte sich denken, daß unter der Wirkung saurer Agenzien beim Para-santen eine Verschiebung der

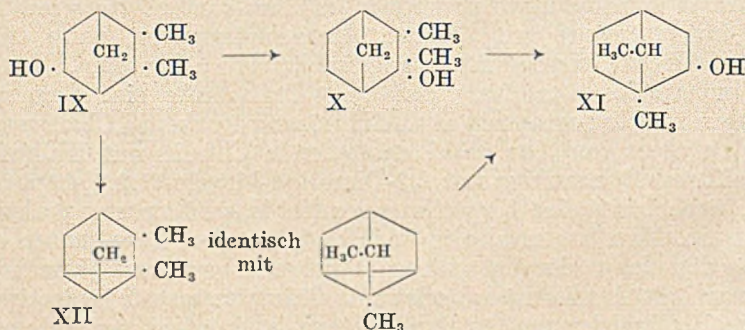
<sup>3)</sup> A. 485, 211 (1931); 501, 1 (1933).

<sup>4)</sup> F. W. Semmler und K. Bartelt, B. 41, 128 (1908).



Doppelbindung aus der 5,6- in die 2,3-Stellung stattfindet unter Entstehung von Santen, das dann in bekannter Weise unter Wagnerscher Umlagerung zu  $\alpha$ -Santenol hydratisiert wird. Wir haben daher das Para-santen in Gegenwart von Kalium-hydrogensulfat zum Sieden erhitzt und anschließend den abdestillierten Kohlenwasserstoff oxydiert. Als Oxydationsprodukt wurde aber nur die 2,3-Dimethyl-cyclopentan-1,4-dicarbonsäure festgestellt, das normale Abbauprodukt des Para-santens; daneben wurde eine sehr geringe Menge unangegriffenen Kohlenwasserstoffs gefunden, vermutlich Cyclosanten. Für eine Isomerisierung des Para-santens durch Kalium-hydrogensulfat zu Santen ergaben sich keinerlei Anhaltspunkte.

Für die Bildung des  $\alpha$ -Santenols (XI) aus dem Para-santen wären formal zwei Wege denkbar. Erstens eine über die Esterkationen verlaufende 2,6-Verschiebung beim primär gebildeten 2,3-Dimethyl-bicycloheptanol-(5) (IX) unter Entstehung des Santen-hydrates (X), das bekanntlich unter den gegebenen Reaktionsbedingungen rasch zu  $\alpha$ -Santenol (XI) isomerisiert wird. Als zweite Möglichkeit wäre eine Abspaltungs- und Wiederanlagerungs-Reaktion denkbar, die über ein tricyclisches Zwischenprodukt, das bisher unbekanntes Cyclo-santen (XII), führen würde, wobei bei der Öffnung des Dreiringes eine andere Bindung angegriffen werden müßte, als die beim Ringschluß entstandene.



Um festzustellen, ob das Cyclo-santen bei der Hydratisierung  $\alpha$ -Santenol gibt und daher überhaupt als Zwischenprodukt in Frage kommt, haben wir durch Behandlung von Santenon-hydraton mit Quecksilberoxyd das Cyclo-santen hergestellt und mit Eisessig-Schwefelsäure hydratisiert. Als Hauptreaktionsprodukt bildet sich in der Tat ein Santenol, das durch oxydativen Abbau zu *cis*-Santen-säure identifiziert wurde. Eine nähere Untersuchung des Cyclo-santens selbst, sowie des primären Reaktionsprodukts mußte unterbleiben, da die uns zur Verfügung stehende Menge zu gering war.



Die Hydratisierung des Cyclo-santens zu Santenol ist allerdings keineswegs ausreichend, um eine Annahme des Cyclo-santens als Zwischenstufe bei der Hydratisierung des Para-santens zu begründen. Vielmehr deutet der Befund, daß bei der Behandlung des Para-santens mit Chlorwasserstoff in Äther, d. h. unter Bedingungen, die für eine Ionisierung ungünstig sind, auch keine Isomerisierung erfolgt, eher auf eine Umlagerung von Radikal-ionen hin.

### Beschreibung der Versuche

#### *trans*-2,3-Dimethyl-bicyclo-[1,2,2]-hepten-(5) (= *trans*-Para-santen) (III)

Den als Ausgangsprodukt benötigten 2,5-Endomethylen-6-methyl-tetrahydrobenzaldehyd erhält man durch Diensynthese von Crotonaldehyd und Cyclopentadien<sup>4</sup>). Man kann das Gemisch der beiden stereoisomeren Formen des Aldehyds verwenden, da beide bei der Reduktion denselben sterisch einheitlichen Kohlenwasserstoff geben.

30 g des Aldehyds werden in 40 cem Alkohol gelöst und mit 18 g 95-proc. Hydrazinhydrat 3 Stunden auf dem Wasserbade unter Rückfluß gekocht. Dann werden 35 cem Alkohol abdestilliert, das Hydrazon mit Wasser ausgefällt und ausgeäthert. Die getrocknete Ätherlösung wird, zuletzt i. V., vom Äther befreit. Ausbeute an Hydrazon 33 g. Von einer Vakuumdestillation wurde Abstand genommen, weil dabei Zersetzung eintrat.

Die Zerlegung des Hydrazons<sup>5</sup>) wird in einem kleinen Claisenkolben vorgenommen, der mit 7 g feingepulvertem Ätzkali und 0,1 g 10-proc. platinierter Kohle beschickt ist und sich in einem Ölbad von 180—190° befindet. Das Hydrazon wird unter Durchleiten eines schwachen Stickstoffstromes zugetropft; der entstehende Kohlenwasserstoff destilliert kontinuierlich über und wird in einer gut gekühlten Vorlage aufgefangen. Er wird mit kalter verd. Schwefelsäure und mit Wasser gewaschen, über Chlorcalcium getrocknet und über Natrium destilliert. Sdp. 130—131°/730. Ausbeute 14 g.

Das Para-santen ist eine wasserklare Flüssigkeit von dumpfem Geruch. Es entfärbt kalte, soda-alkalische Permanganatlösung sofort, desgleichen Brom in Chloroformlösung.

$d_4^{20}$  0,8538;  $n_D^{20}$  1,4538;  $MR_D$  für  $C_9H_{14}$  Ber. 38,89; Gef. 38,75

$C_9H_{14}$ (122,2)	Ber. C 88,45	H 11,55
	Gef. » 88,38	» 11,74

*Nitroschlorid.* Zu 1,3 g Para-santen, 4 cem Eisessig und 2,5 cem Isoamylnitrit werden unter Kühlung mit Kältemischung 1,5 cem konz. Salzsäure zugetropft. Aus Chloroform-Alkohol farblose Kristalle. Schmp. 165—166°.

$C_9H_{11}ONCl$ (187,6)	Ber. N 7,46	Cl 18,90
	Gef. » 7,31	» 19,03

*Dihydrotriazol-Verbindung.* 0,2 g Para-santen werden mit 0,25 g Phenylazid in einem verschlossenen Gefäß bei Zimmertemperatur 12 Stunden stehengelassen. Die entstandene harte Kristallmasse wird aus Methanol umkristallisiert. Das Dihydrotriazol bildet farblose, schräge Prismen vom Schmp. 142,5—143,5°.

$C_{15}H_{19}N_3$ (241,3)	Ber. N 17,41	Gef. N 17,35
---------------------------	--------------	--------------

<sup>5</sup>) Vgl. N. D. Zelinsky, B. A. Kazansky und A. F. Plate, B. 66, 1417 (1933).



## 2,3-Dimethyl-(cis,trans)-cyclopentan-1,3-dicarbonsäure-(cis,cis) (VII)

1 g *trans*-Para-santen wird mit einer Lösung von 4 g Kaliumpermanganat und 1 g Natriumcarbonat in 100 ccm Wasser 8 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Die vom Braunstein filtrierte Lösung wird unter Einleiten von Kohlendioxyd auf dem Wasserbade eingengt, mit verd. Schwefelsäure angesäuert und 10-mal mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wird getrocknet, der Äther abdestilliert. Der ölige Rückstand erstarrt im Vakuumexsiccator und wird aus Essigester-Petroläther umkristallisiert. Die Dicarbonsäure bildet kleine Prismen, leicht löslich in Alkohol und Essigester, schwer löslich in kaltem Wasser und Petroläther. Schmp. 147—148°.

$C_9H_{14}O_4$ (186,2)	Ber. C 58,08	H 7,58	Äquiv. Gew. 93,1
	Gef. » 57,81	» 7,51	» 93,1

Die Säure bildet weder mit Essigsäureanhydrid noch mit Acetylchlorid ein Anhydrid.

Hydratisierung des *trans*-Para-santens

12 g Para-santen werden mit 30 g Eisessig und 5 Tropfen 50-proc. Schwefelsäure 3 Stunden auf dem Wasserbade am Steigrohr erwärmt. Das erkaltete Reaktionsprodukt wird in Äther gelöst, mit Sodalösung und Wasser gewaschen, über Chlorcalcium getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Äthers hinterbleiben 16 g eines farblosen Öles, das nach Bornylacetat riecht und bei 103—105°/20 mm siedet.

Das Acetat wird mit alkoholischer Kalilauge auf dem Wasserbade verseift, der Äthylalkohol abdestilliert und der Rückstand mit Wasserdampf destilliert. Das wäßrige Destillat wird ausgearbeitet und ausgeäthert, die Ätherlösung über Natriumsulfat getrocknet, der Äther abdestilliert. Der Rückstand siedet bei 97—99°/20 mm. Ausbeute 11 g an halbfestem Alkoholgemisch.

Zwecks Überführung in die sauren Phthalate wird das Alkoholgemisch mit 12,5 g Phthalsäureanhydrid und 7 g Pyridin 8 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Das Reaktionsprodukt wird in Äther aufgenommen, mit verd. Salzsäure gewaschen, mit Sodalösung ausgeschüttelt. Durch Ansäuern mit verd. Schwefelsäure werden die sauren Phthalate ausgefällt.

Durch mehrfache fraktionierte Kristallisation aus Benzol-Petroläther und aus wäßrigem Methanol können 4,1 g eines einheitlichen sauren *Phthalats A* vom Schmp. 174—175° abgetrennt werden.

Aus den eingengten Mutterlaugen scheidet sich nach mehrtägigem Stehen ein zweites *Phthalat B* ab, das nach wiederholtem Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther bei 114—115° schmilzt. Ausbeute 3,0 g.

Die danach hinterbleibenden Mutterlaugen werden vereinigt, vom Lösungsmittel befreit und verseift. Das so erhaltene Alkoholgemisch wird mit alkalischer Permanganatlösung oxydiert. Das Oxydationsprodukt wird durch mehrtägiges Stehenlassen mit Acetylchlorid und Ausschütteln des Reaktionsproduktes mit Natriumhydrogencarbonat-lösung in ein Anhydrid und eine nicht anhydrid-bildende Säure zerlegt.

Das Anhydrid (4,6 g) schmilzt nach dem Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther bei 116—117° und wurde durch Mischschmp. mit *cis*-Santensäureanhydrid (Schmp. 116—117°) identifiziert.

Die nicht anhydridbildende Säure (0,8 g) schmilzt nach dem Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther bei 147—148° und gibt mit der *trans*-2,3-Dimethylcyclopentan-1,4-dicarbonsäure gemischt, keine Depression des Schmelzpunktes.



*trans*-2,3-Dimethyl-bicyclo-[1,2,2]-heptanol-(5) (V)

Das durch fraktionierte Kristallisation abgetrennte saure Phthalat A (Schmp. 174—175°) wird mit 20-proc. Natronlauge auf dem Wasserbade verseift. Der entstandene Alkohol wird mit Wasserdampf übergetrieben und ausgeäthert. Sdp. 97—98°/17.

Der neue Alkohol bildet eine farblose ölige Flüssigkeit von angenehmem Geruch, die bei —15° noch nicht kristallisiert.

$C_9H_{16}O$ (140,2)	Ber. C 77,08	H 11,50
	Gef. » 76,98	» 11,75

Das saure Phthalat kristallisiert aus Benzol-Ligroin oder Methanol in kleinen schrägen Prismen. Schmp. 174—175°.

$C_{17}H_{20}O_4$ (288,3)	Äquiv.Gew. Ber. 288,3	Gef. 289,1
---------------------------	-----------------------	------------

*trans*-2,3-Dimethyl-bicyclo-[1,2,2]-heptanon-(5)

Zur Darstellung des Ketons wird 1 g des Alkohols mit einer Lösung von 1 g Kaliumdichromat und 1,2 g Schwefelsäure in 6 ccm Wasser 10 Stunden geschüttelt, das flüssige Keton mit Wasserdampf übergetrieben, ausgeäthert und destilliert. Sdp. 85—86°/20.

Das Semicarbazon wird aus wasserhaltigem Methanol umkristallisiert und bildet dünne durchsichtige Blättchen vom Schmp. 177—178°.

$C_{10}H_{17}ON_3$ (195,3)	Ber. N 21,52	Gef. N 21,17
----------------------------	--------------	--------------

Das Keton wird durch Schütteln mit alkalischer Kaliumpermanganatlösung bei 50—60° zu einer Dicarbonsäure oxydiert, die nach dem Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther bei 147—148° schmilzt. Mit der aus *trans*-Para-santen erhaltenen 2,3-Dimethyl-cyclopentan-1,4-dicarbonsäure IV) (Schmp. 147—148°) gemischt, gibt sie keine Depression des Schmelzpunktes.

$\alpha$ -Santenol (VI)

Das saure Phthalat B (Schmp. 114—115°) aus dem bei der Hydratisierung des Para-santens erhaltenen Alkoholgemisch wird mit 20-proc. Natronlauge 30 Min. unter Rückfluß gekocht. Das  $\alpha$ -Santenol wird mit Wasserdampf übergetrieben, wobei es im Kühler auskristallisiert. Nach Umkristallisieren aus wenig Petroläther bildet es feine weiße Nadeln vom Schmp. 85—86°. G. Komppa<sup>6)</sup> gibt für reinstes  $\alpha$ -Santenol den Schmp. 86° an.

Durch Schütteln mit alkalischer Permanganatlösung bei 50—60° wird das  $\alpha$ -Santenol zu *cis*-Santensäure (VII) oxydiert. Schmp. und Mischschmp. 171°.

$C_{10}H_{14}O_4$ (186,2)	Äquiv.Gew. Ber. 93,1	Gef. 93,0
---------------------------	----------------------	-----------

Aus der Säure erhält man durch Behandeln mit Acetylchlorid das *Santensäure-anhydrid*. Schmp. und Mischschmp. 116—117°.

Einwirkung von Ameisensäure auf *trans*-Para-santen

9,2 g Para-santen werden mit 21 g 99-proc. Ameisensäure 1½ Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Der Ameisensäure-ester wird mit Wasser ausgefällt, in Äther aufgenommen, mit Sodälösung und Wasser gewaschen und über Chlorcalcium getrocknet. Sdp. 86—88°/13. Ausbeute 11,4 g.

Der Ester wird mit alkoholischer Kalilauge verseift. Der entstandene Alkohol wird mit Wasserdampf übergetrieben und ausgeäthert. Sdp. 90—92°/16. Der Alkohol erstarrt zu farblosen Kristallen, die roh bei 62—65° schmelzen. Ausbeute 8,5 g.

<sup>6)</sup> B. 62, 1751 (1929).



Der rohe Alkohol wurde mit Phthalsäureanhydrid und Pyridin in den sauren Phthalsäureester übergeführt. Durch Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther wurden 5,2 g  $\alpha$ -Santenol-phthalsäureester erhalten. Schmp. und Mischschmp. 114—115°.

Die Phthalat-Mutterlaugen wurden eingedampft und verseift. Der erhaltene Alkohol (Schmp. 57—60°) wurde mit alkalischer Permanganatlösung bei 60—70° oxydiert. Das saure Oxydationsprodukt wurde mit Acetylchlorid behandelt, das Acetylchlorid verdampft und der Rückstand in einem Gemisch von Essigester und Äther gelöst. Zur Entfernung nicht-anhydridbildender Säure wurde die Lösung mehrfach mit Natrium-hydrogencarbonat-lösung ausgeschüttelt.

Nach dem Abdestillieren des Essigesters und Äthers hinterblieben 3,2 g Santensäure-anhydrid, die aus Essigester-Petroläther umkristallisiert wurden. Schmp. und Mischschmp. 116—117°.

Aus der Bicarbonatlösung wurden nur 0,1 g einer nicht-anhydridbildenden Säure erhalten, die nicht näher untersucht wurde.

### 5-Chlor-2,3-dimethyl-(trans)-bicyclo-[1,2,2]-heptan

In 10 g *trans*-Para-santen, gelöst in 10 ccm absol. Äther, wird unter Feuchtigkeitsausschluß und Kühlung mit Kältemischung trockener Chlorwasserstoff eingeleitet. Die Lösung wird 12 Stunden stehengelassen, dann mit kalter Bicarbonatlösung und Eiswasser gewaschen und über Chlorcalcium getrocknet. Bei der anschließenden Vacuumdestillation wird die Vorlage mit Eis-Kochsalzmischung gekühlt.

Vorlauf	Sdp. 35—75°/20 nicht umgesetztes Para-santen
Hauptfraktion	» 80—84°/20 Chlorid

Ist der Vorlauf beträchtlich, dann wird die Behandlung mit Chlorwasserstoff in der angegebenen Weise wiederholt.

Die Hauptfraktion wird nochmals destilliert. Das Chlorid bildet eine wasserklare ölige Flüssigkeit. Sdp. 80—81°/18.

$C_9H_{15}Cl$ (158,6)	Ber. Cl 22,34	Gef. Cl 22,15, 22,10
-----------------------	---------------	----------------------

Um festzustellen, ob das Chlorid durch Umlagerung entstandenes tertiäres Chlorid enthält, wurde die HCl-Abspaltungsgeschwindigkeit bei 18° gemessen. 0,936 g Chlorid wurden in 20 ccm *n*/2-alkoholischer KOH gelöst und davon je 1 ccm mit *n*/10-HCl titriert. Der Verbrauch an *n*/10-HCl war während 24 Stunden konstant. Das Chlorid ist demnach vollständig sekundär.

Zur Verseifung wird das Chlorid mit Kalkmilch 40 Stunden bei Wasserbadtemperatur geschüttelt. Der entstandene ölige Alkohol ist fast reines 2,3-Dimethyl-bicyclo-[1,2,2]-heptanol-(5).

Die Identifizierung des Alkohols erfolgt über das saure Phthalat. Schmp. und Mischschmp. 170—171°.

### Cyclo-santen

5,5 g  $\alpha$ -Santenon-hydrason<sup>7)</sup> (Sdp. 113—115°/18) werden in 35 ccm 96-proc. Äthanol gelöst und unter Eiskühlung portionsweise mit 10 g frisch dargestelltem gelbem Quecksilberoxyd versetzt. Nach Beendigung der Stickstoffentwicklung wird 5 Stunden auf dem Wasserbade unter Rückfluß gekocht und anschließend 25 ccm Äthanol abdestilliert. Nach Zugabe von weiteren 30 ccm Alkohol werden nochmals 25 ccm abdestilliert. Durch Zugabe von 120 ccm gesättigter Kochsalzlösung zu den vereinten Alkoholdestillaten wird das Cyclo-santen ausgefällt. Es wird abgetrennt, mit Chlorcalcium getrocknet und über Natrium destilliert. Sdp. 129—130°/730. Ausbeute 1,1 g.

$d_4^{24,5}$ 0,8693;	$n_D^{24,5}$ 1,4535;	$MR_D$ für $C_9H_{14}$ Ber. 37,16	Gef. 38,06
----------------------	----------------------	-----------------------------------	------------

7) G. Komppa und T. Hasselström, A. 496, 169 (1932).



Das Inkrement für den Dreiring beträgt hier 0,90. Für tricyclische Verbindungen mit dem gleichen Ringsystem sind folgende Inkremente gefunden worden: Tricyclen 0,95<sup>8)</sup>, 0,80<sup>9)</sup>; Cyclo-fenchen 0,93<sup>9)</sup>, 0,95<sup>10)</sup>, 0,87<sup>11)</sup>; Apocyclen 0,64<sup>12)</sup>.

Das Cyclo-santen bildet eine wasserklare Flüssigkeit von dumpfem Geruch. Es ist beständig gegen soda-alkalische Permanganatlösung.

$C_9H_{14}$ (122,2)	Ber. C 88,45	H 11,55
	Gef. » 88,31	» 11,41

### Hydratation des Cyclo-santens nach Bertram-Walbaum

0,9 g Cyclo-santen wurden mit 3,5 g Eisessig und 1 Tropfen 50-proc. Schwefelsäure 2 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Das gebildete Acetat wurde in bekannter Weise aufgearbeitet und mit alkoholischer Kalilauge verseift. Der halb feste Alkohol wurde mit alkalischer Permanganatlösung oxydiert. Die bei der Oxydation entstandene Säure (0,6 g) schmolz nach dem Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther bei 170,5—171°. Sie wurde durch Mischschmp. mit der *cis*-Santensäure identifiziert.

Bei der Hydratation des Cyclo-santens war demnach im wesentlichen Santenol entstanden.

### Isomerisierungsversuch mit *trans*-Para-santen

4,5 g Para-santen wurden mit 1,5 g Kaliumhydrogensulfat 2 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Der abdestillierte Kohlenwasserstoff ging vollständig bei 129,5—130°/730 über. Er wurde 36 Stunden mit soda-alkalischer Permanganatlösung geschüttelt. Die alkalische Lösung wurde ausgeäthert. Der nach dem Abdestillieren des Äthers hinterbleibende sehr geringfügige Rückstand roch nach Kohlenwasserstoff. Er wurde mit Semicarbazid-acetatlösung versetzt. Nach mehrtägigem Stehen war keine Semicarbazonbildung eingetreten. Im Oxydationsprodukt war demnach kein Santendiketon vorhanden.

Die vom Braunstein filtrierte alkalische Lösung wurde eingeeengt, angesäuert und erschöpfend ausgeäthert. Nach dem Vertreiben des Äthers hinterblieben 2,4 g einer kristallisierenden Säure, die nach dem Umkristallisieren aus Wasser bei 146,5—147° schmolz und durch Mischschmp. mit der 2,3-Dimethyl-cyclopentan-1,4-dicarbon säure, dem normalen Oxydationsprodukt des Para-santens, identifiziert wurde.

<sup>8)</sup> H. Meerwein und K. van Emster, B. 53, 1816 (1920).

<sup>9)</sup> G. J. Östling, Soc. 1912, 457.

<sup>10)</sup> G. Komppa und H. Roschier, A. 470, 154 (1929).

<sup>11)</sup> S. Nametkin und L. Brüssoff, A 459, 166 (1927)

<sup>12)</sup> G. Komppa und H. Roschier, A. 429, 183 (1922).

(Abgeschlossen am 24. September 1951)







# CHEMISCHE BERICHTE

(früher: Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft)

Herausgegeben von Clemens Schöpf, Darmstadt

84. Jahrgang. 1951. Erscheint in 10 Heften. Bezugspreis DM 75.—  
(einschl. Jahresregister), Einzelheft DM 8.—. Gegr. 1868

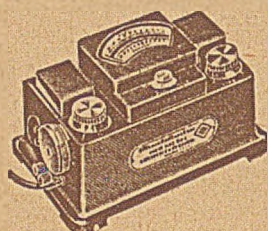
## Inhaltsangabe zu Heft Nr. 5-6 · 84. Jahrgang 1951

- A. Koflor, Zur Kenntnis der Hexachlor-cyclohexane, II. Mitteil.: Zweistoffsysteme
- W. Treibs u. H. Röhnert, Über die Phenylhydrazin-*p*-sulfonsäure und ihre analytische Verwendung zur Herausarbeitung von Ketonen
- W. Treibs, Zur Autoxydation sauerstoffaktiver Säuren, XV. Mitteil.: Über die Grignard-Reaktion und die Zerewitinoff-Bestimmung bei peroxydischen Verbindungen
- K. Freudenberg u. G. Gehrke, *p*-Cumaralkohol und sein Dehydrierungspolymerisat
- W. Mathes, W. Sauermilch u. Th. Klein, Die Oxydation von Pyridin homologen in der Gasphase
- Br. Böttcher u. Fr. Bauer, Über Trithione, V. Mitteil.
- H. Beyer u. W. Lässig, Über Thiazole, VI. Mitteil.: Das Verhalten des Chloracetyl-cyanessigsäure-äthylesters bei der Hantzschschen Thiazolsynthese
- B. Helferich u. H. Schirp, Eine neue Methode zur Darstellung der Pentaacetyl-*al-d*-galaktose
- K. Freudenberg, R. Kraft und W. Heimberger, Über den Sinapinalkohol, den Coniferylalkohol und ihre Dehydrierungspolymerisate
- M. Seyhan, Notiz über die Oxydation von 2,3-Dimethyl-chinoxalin mit Selendioxyd
- H. Beyer u. Elf. Kreutzberger-Reese, Über Thiazole, VII. Mitteil.: Die Überführung der *S*-Methyl- $\beta$ -[thiazolyl-(2)]-isothiosemicarbazide in 1-[Thiazolyl-(2)]-1,2,4-triazole
- H. Beyer u. A. Kreutzberger, Über Thiazole, VIII. Mitteil.: Synthesen esterartiger Abkömmlinge der Hydrazo- und Azothiazole-(2,2')
- R. Tschesche, K. H. Köhncke u. Fr. Korte, Über Pteridine, II. Mitteil.: Die Synthese der 9-Oxy-pteroyl-glutaminsäure
- F. Bohlmann, Konstitution und Lichtabsorption, I. Mitteil.: Carbonyl-Derivate
- H. Dannenberg u. H. Brachert, Synthese des 1-Methylpyrens u. des 1,2-Dimethyl-pyrens
- H. Beyer u. A. Kreutzberger, Über Thiazole, IX. Mitteil.: Die benzidinartige Umlagerung der Hydrazothiazole-(2,2') zu 2,2'-Diamino-dithiazolylen-(5,5')
- W. Langenbeck u. G. Zimmermann, Racematspaltung des *d, l*-Leucins über seine Ester
- W. Langenbeck u. H. Boser, Notiz über Pyrrolon ( $\gamma$ -Aminocrotonsäure-lactam)
- R. Grewe, H. Pohlmann und M. Schnoor, Ein neuer Weg zum Morphinan
- W. Langenbeck u. H. J. Haase, Die Parahämatine von Naphthylimidazolen
- H. Brockmann u. R. Randebrock, Synthese und Absorptionsspektren einiger *meso*-Naphthodianthron-Derivate
- F. Bohlmann, Konstitution und Lichtabsorption, II. Mitteil.: Diacetylen-Verbindungen
- R. Kuhn u. H. R. Hensel, 4,4'-Dichlor-salicil
- R. Kuhn u. K. Dury, Alkalischer Abbau von Aureomyein und Terramycin
- R. Kuhn u. H. Zahn, Über Kumulene IV, Oktaheptaene

VERLAG CHEMIE · GMBH · WEINHEIM/BERGSTRASSE



## Neues, verbessertes Universal-Kolorimeter, Modell IV



Erhöhte Empfindlichkeit · Doppelskala für Extinktion und Absorption · Eingebauter Stabilisator  
Umschaltbar für Zeiger-Instrument und Multiflex-Galvanometer · Neue Interferenzfilter

Günstiger Preis: 500 DM

Verlangen, Sie unsere neue Kolorimeter-Broschüre

**DR. B. LANGE**



BERLIN - ZEHLENDORF, Hermannstraße 14-18 · Telefon 848122

Soeben erschien

Vol. 5

W. THEILHEIMER

## SYNTHETIC METHODS

of Organic Chemistry

Synthetische Methoden  
der Organischen Chemie

Mit Titeln u. Generalregister  
der Bände 1—5. Mit deut-  
schem Register. — XII und  
612 Seiten. 1951. DM 64.50

Zu beziehen durch:

VERLAG CHEMIE G.M.B.H.,  
Weinheim / Bergstraße  
Abt. Sortiment und Antiquariat

## Katalog Nr. 5 Chemie

Bücher u. Zeitschriften  
aus dem Gebiete der  
Angewandten Chemie  
ca. 1100 Nrn.

ist erschienen

\*

Kostenlose Zusendung  
auf Verlangen

\*

VERLAG CHEMIE GMBH.  
Weinheim/Bergstr.

Abteilung Sortiment u. Antiquariat

PAUL WALDEN

## Drei Jahrtausende Chemie

Mit 24 Porträts. Berlin 1944. Ohlwd. DM 8.—

Inhaltsübersicht: Aus den Anfängen der chemischen Technik und Alchemie. — Chemisch-technische Kenntnisse des Abendlandes vom 1. bis zum 16. Jahrh. — Paracelsus. — Deutsche Chemiker und Denker legen im 17. Jahrh. neue Fundamente zu einer wissenschaftlichen Chemie. — Anfänge der analytischen und organischen Chemie. — Alchemie vom 16. bis zum 18. Jahrh. — Die Grundlegung der messenden wissenschaftlichen Chemie um die Wende des 18. Jahrh. — Das 19. und 20. Jahrh. — Die chemische Forscherschule Liebig's.

VERLAG CHEMIE · GMBH · WEINHEIM / BERGSTR.  
ABT. SORTIMENT UND ANTIQUARIAT

Alle den Anzeigentell betreffenden Anfragen und Zuschriften sind ausschließlich zu richten an:  
Verlag Chemie, GmbH., Anzeigenverwaltung, Weinheim/Bergstr.