

SUMMARY

1. A comparative study on catalase activity, as measured by FEINSTEIN's procedure, in presence of different substrates and at various temperatures has been made.

2. Catalase activity is reduced when H_2O_2 is replaced by perborate, urea- H_2O_2 or picolinic acid- H_2O_2 as a substrate. This is due to the inhibiting action of the peroxyde-carriers, which has been found smallest for borate.

3. The effect of temperature on catalase activity is small in presence of perborate ($Q_{10} = 1.07-1.12$), but can be affected by inhibitors in various ways, highest dependency resulting in presence of Na-Azide ($Q_{10} = 2.4$). Therefore, activity measurements in crude material at 37° and 0° are differently influenced by effectors present in the system.

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern
Anorganisch-chemische Anstalt der Universität Basel

17. Eine neue Spaltung von DL-Threonin in die optischen Antipoden von K. Vogler und P. Lanz

Herrn Prof. Dr. W. KUHN zum 60. Geburtstag gewidmet

(12. XII. 58)

Optisch aktives Threonin ist 1937 durch Arbeiten von WEST & CARTER¹⁾ synthetisch zugänglich geworden. Die Spaltung des Racemates in die Antipoden gelang damals durch fraktionierte Kristallisation der stereoisomeren Brucinsalze von N-Formyl-O-methyl-threonin.

Seither ist eine Reihe von Spaltungen des racemischen Threonins veröffentlicht worden. ZAMBITO, PERITZ & HOWE²⁾ machten beispielsweise Gebrauch von der Löslichkeitsdifferenz einer unstabilen Modifikation des Brucinsalzes von N-p-Nitrobenzoyl-D-threonin zum Brucinsalz von N-p-Nitrobenzoyl-L-threonin in Methanol. Nach BRENNER, RÜFENACHT & SAILER³⁾ scheint diese Spaltung «gelegentlich mit gewissen Schwierigkeiten verbunden zu sein». Es ist, wie wir fanden, in der Tat nicht leicht, dieses Verfahren mit guten Ausbeuten zu reproduzieren.

Eine andere verbesserte Methode³⁾ beruht auf der Trennung der diastereomeren Brucinsalze von N-Tosyl-threonin in Methanol. Die Nacharbeitung ergab, dass bei grossen Ansätzen mit dem Ausfallen des Doppelsalzes von N-Tosyl-DL-threonin, sog. partielles Racemat nach LADENBURG⁴⁾, gerechnet werden muss, wonach die Substanz erneut unter grösserer Vorsicht zu kristallisieren ist. Um einer Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak auszuweichen, werden die erhaltenen optisch aktiven N-Tosylthreonine im Bombenrohr mit konz. HCl entacyliert, was zur Herstellung grösserer Mengen nicht vorteilhaft ist. Die Totalausbeute an L- bzw. D-Threonin wird mit 44% bzw. 35% abgegeben.

¹⁾ H. D. WEST & H. E. CARTER, J. biol. Chemistry **119**, 109 (1937).

²⁾ A. J. ZAMBITO, W. L. PERITZ & E. E. HOWE, J. Amer. chem. Soc. **71**, 2541 (1949).

³⁾ M. BRENNER, K. RÜFENACHT & E. SAILER, Helv. **34**, 2102 (1951).

⁴⁾ A. LADENBURG, Ber. deutsch. chem. Ges. **27**, 75 (1894).

Das Verfahren von ELLIOTT⁵⁾ zur Überführung von DL-Threonin in L-Threonin über die Brucinsalze von *trans*-DL-2-Phenyl-5-methyl- Δ^2 -oxazolin-4-carbonsäure ist spezifisch auf die ELLIOTT'sche Threoninsynthese zugeschnitten und bietet beschränkte Möglichkeiten, wenn als Ausgangsmaterial, wie in unserem Fall, DL-Threonin selbst vorliegt. Schliesslich ist noch das Verfahren von AMIARD⁶⁾ zu erwähnen, das wir nicht nachgearbeitet haben. Diese originelle Methode beruht auf dem Mitreissen (entraînement) bei der raschen Kristallisation einer übersättigten Lösung von z. B. 129 g DL-Threonin und 5 g D-Threonin. Bei der Aufhebung der Übersättigung durch Animpfen erhält man 8,5 g D-Threonin, also mehr als zugesetzt wurde. Die nunmehr an L-Threonin angereicherte Mutterlauge, die auf richtige Konzentration gebracht und nach Vorschrift abgekühlt wird, liefert dann bei der 2. Kristallisation durch Mitreissen etwas mehr L-Threonin, als gegenüber dem Racemat berechnet ist. Und so geht das Spiel abwechslungsweise weiter, bis nach ca. 13 Kristallisationen ca. 46 g D-, ca. 39 g L- und ca. 42 g DL-Threonin vorliegen. Die Ausbeute an L-Form beträgt somit ca. 60%.

Im Laufe von Polypeptidsynthesen, in denen optisch aktives Threonin als Zwischenprodukt gebraucht wurde, sind wir auf ein Spaltungsverfahren gestossen, welches den in der Literatur beschriebenen, wie wir glauben, überlegen ist und mit welchem wir gute Erfahrungen gemacht haben. Unsere Methode beruht auf der sehr ausgeprägten Löslichkeitsdifferenz der diastereomeren Brucinsalze von L- bzw. D-Phtaloylthreonin in Methylcellosolve.

N-Phtaloyl-DL-threonin wird nach SHEEHAN, GOODMAN & HESS⁷⁾ durch Kochen von DL-Threonin mit Phtalsäureanhydrid in Dioxan bei 110° unter Rückfluss in einer Ausbeute von 85% erhalten. Das so hergestellte N-Phtaloyl-DL-threonin wird bei 80° zu einer Lösung von Brucin in Methylcellosolve gegeben und das schwerlösliche Brucinsalz von N-Phtaloyl-L-threonin durch Kristallisation beinahe quantitativ abgetrennt (99%). Das Brucinsalz von N-Phtaloyl-D-threonin bleibt vollständig gelöst und ist bis jetzt nicht kristallin erhalten worden.

Die Aufarbeitung der Salze zu L- bzw. D-Threonin geschieht mit Vorteil dadurch, dass man erstere in einem Gemisch von 2-n. Natronlauge und Chloroform durch kräftiges Rühren löst. Das Chloroform, welches die Brucinkomponente enthält, wird abgetrennt, die wässrige Phase mit konz. Salzsäure angesäuert, eingengt und mit konz. Salzsäure zur Entfernung des Phtaloylrestes unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen im Eisbad wird die ausgefallene Phtalsäure abgenutscht, das in der Mutterlauge verbleibende Threonin-hydrochlorid wie üblich mit Diäthylamin neutralisiert und aus Wasser/Alkohol umkristallisiert. Die Reinausbeute an L-Threonin bezogen auf das Brucinsalz beträgt 83%, an D-Threonin ca. 70%. Dies entspricht einer Totalausbeute an L-Threonin von 70%, bzw. an D-Threonin von 60%, berechnet auf das eingesetzte Racemat. Die Endprodukte sind papierchromatographisch rein.

Nach HANSEN & HILLHARDT⁸⁾ ist der N-Phtaloylrest sehr alkaliempfindlich und spaltet bereits bei pH 8 und 20–40° den Phtalimidring zum N-(o-Carboxybenzoyl)-threonin auf. Es ist uns bis jetzt nicht gelungen, diese optisch aktiven N-(o-Carboxy-

⁵⁾ D. F. ELLIOTT, J. chem. Soc. **1950**, 62.

⁶⁾ G. AMIARD, Bull. Soc. chim. France **1956**, 447; L. VELLUZ & G. AMIARD, *ibid.* **1953**, 903.

⁷⁾ J. C. SHEEHAN, M. GOODMAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1367 (1956).

⁸⁾ H. HANSEN & R. HILLHARDT, Z. physiol. Chem. **298**, 210 (1954).

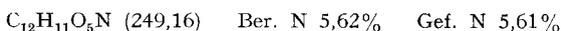
benzoyl)-threonine analysenrein zu fassen, wie sie offenbar nach der Alkaliextraktion der Brucinsalze in Lösung auftreten.

Unsere Spaltung gelingt auch, wenn nach Überlegungen von POPE & PEACHY⁹⁾ die halbe Menge Brucin eingesetzt wird. Die Ausbeute an dem schwerlöslichen Brucinsalz von N-Phtaloyl-L-threonin beträgt in diesem Falle 83%.

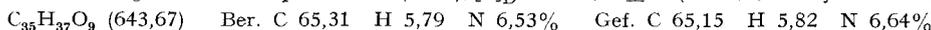
Die «optische» Reinigung des aus dem Mutterlaugensalz gewonnenen D-Threonins bildet keine Schwierigkeiten, da optisch aktives Threonin in Wasser schwerer löslich ist als das Racemat⁶⁾.

Experimenteller Teil¹⁰⁾

N-Phtaloyl-DL-threonin wurde im wesentlichen nach den Angaben von SHEEHAN, GOODMAN & HESS⁷⁾ synthetisiert. 100 g (0,84 Mol) fein pulverisiertes DL-Threonin (Biochemica ROCHE) und 150 g (1,01 Mol) Phtalsäureanhydrid in 450 ml Dioxan wurden 16 Std. unter Rühren und Rückfluss erhitzt und im Wasserstrahlvakuum bis zu einem zähflüssigen Sirup eingedampft. Dieser Sirup wurde in 650 ml Wasser aufgenommen und zur Kristallisation 2 Std. bei 0° belassen. Darauf wurde das ausgefallene N-Phtaloyl-DL-threonin abgesaugt, portionenweise mit total 400 ml Wasser gewaschen und im Wasserstrahlvakuum bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute: 178 g (85%), Smp. 119–121°. Zur Analyse wurde dreimal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert und 16 Std. bei 25° im Hochvakuum über Phosphorperoxyd getrocknet. Smp. 122–123°.



Spaltungsversuch mit der berechneten Menge Brucin. – *Brucinsalz von N-Phtaloyl-L-threonin.* 197 g (0,5 Mol) Brucin wurden in 250 ml Methylcellosolve bei einer Temperatur von 80° gelöst und unter mechanischem Rühren mit 124,5 g N-Phtaloyl-DL-threonin versetzt. Der sofort entstehende, gelb gefärbte Kristallbrei wurde zunächst noch 10 Min. bei 80° weitergerührt und dann 24 Std. bei 20° sich selbst überlassen¹¹⁾. Dann wurde das L-Salz abgesaugt, fünfmal mit je 80 ml Methanol gewaschen und bei 90° im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Ausbeute: 159 g (99%), Smp. 220–223° (Zers.), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37,3^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (c = 1,5; Methylcellosolve). Zur Analyse wurde zweimal aus Methylcellosolve umkristallisiert und 16 Std. bei 110° über Phosphorperoxyd im Hochvakuum getrocknet. Smp. 222–223° (Zers.), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37,5^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (c = 1,5; Methylcellosolve).



Brucinsalz von N-Phtaloyl-D-threonin. Die Methylcellosolve/Methanol-Mutterlauge, welche das leichtlösliche D-Salz enthält, wurde im Wasserstrahlvakuum eingedampft und bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die spröde, glasartige Substanz konnte bisher nicht kristallisiert werden. Ausbeute: 150 g (93%); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3,3^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (c = 1,5; Methylcellosolve).

Spaltungsversuch mit der halben Menge Brucin. 35,5 g (0,09 Mol) Brucin, 70 ml Methylcellosolve und 44,8 g (0,18 Mol) N-Phtaloyl-DL-threonin wurden wie oben beschrieben angesetzt und zum schwerlöslichen Brucinsalz von N-Phtaloyl-L-threonin aufgearbeitet. Ausbeute: 48,2 g (83%), Smp. 220–223° (Zers.), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37,2^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (c = 1,5; Methylcellosolve).

L-Threonin. 155 g (0,24 Mol) Brucinsalz von N-Phtaloyl-L-threonin wurden 30 Min. in einer Mischung von 362 ml 2-n. Natronlauge und 360 ml Chloroform kräftig gerührt. Hierbei löst sich das Brucinsalz vollständig auf und wird zerlegt. Die abgetrennte Phase wurde noch zweimal mit je 150 ml Chloroform ausgeschüttelt, während alle Chloroformphasen noch zweimal mit je 75 ml 0,5-n. Natronlauge nachgewaschen wurden. Die vereinigten und filtrierten wässrigen Lösungen wurden mit konz. Salzsäure auf ein pH von 3 gestellt, im Wasserstrahlvakuum auf $\frac{1}{3}$ des ursprünglichen Volumens eingedampft und nach Zusatz von 140 ml konz. Salzsäure $2\frac{1}{2}$ Std. unter

⁹⁾ W. J. POPE & ST. J. PEACHY, J. chem. Soc. **75**, 1066 (1899).

¹⁰⁾ Die angegebenen Smp. sind nicht korrigiert.

¹¹⁾ Es gelingt bei der angegebenen Konzentration kaum, alle Substanz in Lösung zu bringen, vielmehr fängt das schwerlösliche Salz an auszufallen, ehe alles N-Phtaloyl-DL-threonin in fester Form zugesetzt ist. Dank der grossen Löslichkeitsdifferenz der beiden Salze beeinträchtigt dies die Spaltung keineswegs, vorausgesetzt, dass der Kristallbrei nach Vorschrift 10 Min. bei 80° mit dem Rührer homogenisiert wird.

Rückfluss gekocht. Nun wurde im Eisbad abgekühlt, die ausgefallene Phtalsäure abgenutscht, zweimal mit je 40 ml Wasser nachgewaschen und das Filtrat unter Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 ml Wasser suspendiert, von nicht gelöstem Natriumchlorid und einer Spur Phtalsäure abgenutscht, mit etwas Wasser nachgewaschen und das Filtrat unter Wasserstrahlvakuum wieder zur Trockne eingedampft. Das gebildete *L*-Threonin-hydrochlorid wurde mit 200 ml Methanol herausgelöst, vom Natriumchlorid abgenutscht, mit Methanol nachgewaschen und die Lösung im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Der anfallende Rückstand wurde erneut in 200 ml Methanol aufgenommen, von einer Spur Natriumchlorid abfiltriert und das Filtrat mit Diäthylamin auf ein pH von 6 eingestellt. Nach 4 Std. wurde das ausgefallene *L*-Threonin abgenutscht, gründlich mit Methanol gewaschen und im Wasserstrahlvakuum bei 90° getrocknet. Ausbeute: 25,8 g (90%), $[\alpha]_D^{20} = -27,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; Wasser). Dieses Rohprodukt wurde in siedendem Wasser gelöst, filtriert, mit dem doppelten Volumen Alkohol versetzt, nach 2 Std. abgenutscht, mit Alkohol gewaschen und im Wasserstrahlvakuum bei 90° getrocknet. Ausbeute: 23,8 g (83%), $[\alpha]_D^{20} = -28,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; Wasser). In Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 verhält sich die Substanz nach 24 Std. Laufzeit (absteigend) papierchromatographisch einheitlich.

D-Threonin. 150 g (0,234 Mol) glasartiges Brucinsalz von *N*-Phtaloyl-*D*-threonin wurden mit 350 ml 2-n. Natronlauge und 350 ml Chloroform übergossen und 1 Std. kräftig gerührt. Die Substanz wird hierbei allmählich gelöst. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie beim *L*-Threonin. Das rohe *D*-Threonin wurde aus siedendem Wasser ohne Zusatz von Alkohol umkristallisiert. Ausbeute nach Aufarbeitung der Mutterlauge 20 g (70%), $[\alpha]_D^{20} = +27,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; Wasser). Über die papierchromatographische Reinheitsprüfung gilt das für *L*-Threonin Gesagte.

Die Mikroanalysen verdanken wir Herrn Dr. H. WALDMANN; die Papierchromatogramme wurden in zuvorkommender Weise von Herrn W. LERGIER ausgeführt.

SUMMARY

A new resolution of DL-threonine into the optical antipodes is effected by fractional crystallization of the stereoisomeric brucine salts of *L*- and *D*-*N*-phthaloyl-threonine in methyl-cellosolve. The two salts mentioned possess extraordinarily different degrees of solubility in methyl-cellosolve, and this allows the production of *D*- and *L*-threonine by simple operations in very high yield.

Chemische Forschungsabteilung der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. A.G., Basel

18. Hydroxy-morphinane

12. Mitteilung¹⁾

Die Konfiguration der Morphinane

von H. Corrodi, J. Hellerbach, A. Züst, E. Hardegger und O. Schnider

(13. XII. 58)

Nach Aufklärung der absoluten Konfiguration²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ der Alkaloide Morphin, Codein und Thebain erschien es reizvoll, auch den räumlichen Bau der synthetischen

¹⁾ 11. Mitteilung: A. GRÜSSNER, J. HELLERBACH & O. SCHNIDER, *Helv.* **40**, 1232 (1957).

²⁾ G. STORK, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 768 (1952); G. STORK in R. H. F. MANSKE & H. L. HOLMES, *The Alkaloids, Chemistry & Physiology*, Bd. 11, 171 ff. (Academic Press, New York 1952).

³⁾ J. KALVODA, P. BUCHSCHACHER & O. JEGER, *Helv.* **38**, 1847 (1955).

⁴⁾ M. MACKAY & D. CROWFOOT HODGKIN, *J. chem. Soc.* **1955**, 3252.

⁵⁾ H. CORRODI & E. HARDEGGER, *Helv.* **38**, 2038 (1955).