

78. Synthese des (*R*)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäure-lactons (Recifeolid)

von Hans Gerlach, Konrad Oertle und Adolf Thalmann

Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

(5. II. 76)

Synthesis of Recifeolide. – *Summary.* The synthesis of the mould metabolite recifeolide (VIII), a 12-membered ring lactone, is described. 1, 3-Butandiol was resolved with (–)-camphanic acid *via* the diastereomeric esters. The (*R*)-enantiomer was converted *via* (*R*)-1-iodo-3-butanol (II) into (*R*)-3-hydroxybutyl triphenyl phosphonium iodide (III). *Wittig* condensation of the phosphorane derived from III with methyl 8-oxo-octanoate (V) led to the methyl *trans*-11-hydroxy-8-dodecenoate (VI). The corresponding hydroxy acid VII was transformed into the *S*-(2-pyridyl) carbothioate which cyclizes under the influence of silver ion to the lactone VIII. With (–)-(*R*)-1, 3-butandiol (I) as starting material the naturally occurring (+)-(*R*)-recifeolide (VIII) is produced in 70% yield from VII.

In dieser Mitteilung soll die Synthese des Recifeolids (VIII), eines ungesättigten, optisch aktiven, 12gliedrigen Lactons, beschrieben werden. Recifeolid (VIII) wurde von *Vesonder et al.* [1]¹⁾ aus Kulturen des Pilzes *Cephalosporium recifei* isoliert. Dieselben Autoren haben auch die Struktur der Verbindung aufgeklärt. Über die biologische Rolle des Recifeolids ist nichts berichtet worden.

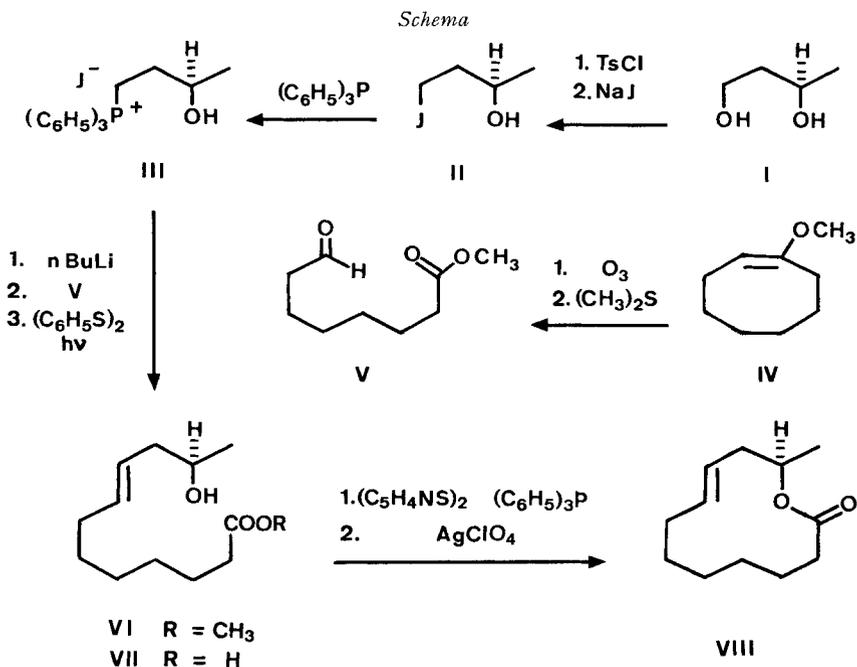
Die Synthese des Lactons VIII geht aus vom (–)-(*R*)-1, 3-Butan-diol(I)²⁾, das man aus dem rac. Diol durch Enantiomerentrennung mit (–)-Camphansäure über die diastereomeren Ester gewinnt. Aus einer gesättigten Lösung der Ester in Cyclohexan kristallisiert das Derivat des (–)-1, 3-Butandiols rascher aus und kann durch Umkristallisieren rein erhalten werden (vgl. exper. Teil). Durch Verseifen gewinnt man daraus das bis jetzt schwer zugängliche, linksdrehende Enantiomere. Die primäre Hydroxylgruppe des 1, 3-Butandiols wird beim Umsetzen mit einem Äquivalent *p*-Toluolsulfonylchlorid in Pyridin selektiv sulfonyliert und mit Natriumiodid in Aceton gegen Jod ausgetauscht. Das so hergestellte (–)-(*R*)-1-Jod-3-butanol (II) ergibt bei der Reaktion mit Triphenylphosphin das entsprechende Phosphoniumsalz III.

Spaltet man 1-Methoxycycloocten (IV) mit Ozon in Methanol und reduziert das Produkt mit Dimethylsulfid, so entsteht in guter Ausbeute³⁾ der 8-Oxo-octansäuremethylester (V). Dieser gibt bei der *Wittig*-Kondensation mit dem Phosphoran, hergestellt aus dem Phosphoniumsalz III und *n*-Butyllithium in Äther, den 11-Hydroxy-8-dodecensäuremethylester (VI): die beiden Isomeren mit *cis*- und *trans*-Anordnung der Substituenten an der Doppelbindung entstehen dabei im Mengen-

1) Die amerikanischen Autoren schlagen für das wohlriechende 12gliedrige Lacton VIII den Namen Recifeolid vor (Privatmitteilung Dr. F. H. Stodola).

2) (+)-(*S*)-1, 3-Butandiol wurde von *Levene et al.* [2] mit (+)-(*S*)-Milchsäure verknüpft.

3) 8, 8-Diäthoxy-octansäureäthylester wurde schon von *Schmidt & Grafen* [3], ohne Isolierung des Aldehyd-Zwischenproduktes, aus 1-Äthoxycycloocten durch Ozonisierung, Reduktion mit Wasserstoff/Palladium und Acetalisierung mit Triäthylorthoformiat hergestellt.



verhältnis 3:7. Belichtet man eine Lösung dieses Gemisches und 2 mol% Diphenyl-disulfid in Benzol mit einer Quecksilber-Hochdrucklampe⁴⁾, so erhält man nach 2 Std. ein Gemisch, das 83% des *trans*-Methylester neben 17% des *cis*-Isomeren enthält⁵⁾. Der (–)-(R)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäuremethylester (VI) lässt sich durch Chromatographieren an mit Silbernitrat beschichtetem Kieselgel vom *cis*-Isomeren abtrennen. Durch Verseifen erhält man daraus die (R)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäure (VII).

Die Cyclisierung der Hydroxysäure VII zum Recifeiolid (VIII) erfolgte durch die von uns entwickelte Methode [5] der Aktivierung von S-(2-Pyridyl)-thioestern mit Ag^+ -Ionen, die sich auch bei der Synthese [6] des Actin-Makrotetrolids Nonactin bewährt hat. Durch Reaktion von VII mit 2,2'-Dipyridyldisulfid und Triphenylphosphin in Benzol bildet sich der S-(2-Pyridyl)-thioester. Letzterer wird nicht isoliert, sondern durch Eintropfen in eine verdünnte Lösung von Silberperchlorat in Acetonitril direkt cyclisiert. Bei dieser Reaktionsfolge entsteht aus der Hydroxysäure VII, in 75% Ausbeute, das 12gliedrige Lacton VIII.

Das synthetische Recifeiolid (VIII) entspricht in allen seinen Eigenschaften (IR-, NMR- und Massenspektrum, optische Drehung) dem Naturprodukt⁶⁾ [1].

4) Diese durch photochemisch erzeugte Thiylradikale katalysierte *cis/trans*-Isomerisierung von Olefinen wurde schon von Schulte-Elte & Ohloff [4] bei der Herstellung von iso-Caryophyllen aus Caryophyllen angewandt.

5) Es wird angenommen, dass der bei der Isomerisierung im Überschuss entstehende 11-Hydroxy-8-dodecensäuremethylester *trans*-Anordnung der Substituenten an der Doppelbindung besitzt. Mit dieser Annahme verträglich ist auch die Bande bei 975 cm^{-1} im IR-Spektrum.

6) Wir danken Herrn Dr. F. H. Stodola, Northern Regional Research Laboratory Peoria, für eine Kopie des NMR.-Spektrums von natürlichem Recifeiolid.

Insbesondere besitzt es auch den gleichen positiven optischen Drehsinn. Damit ist gezeigt, dass die Molekeln des natürlichen Recifeiolid den (*R*)-Chiralitätssinn besitzen.

Die Synthese wurde zuerst mit dem leichter zugänglichen (+)-(*S*)-1,3-Butandiol als Ausgangsmaterial durchgeführt (vgl. exper. Teil). Dabei entsteht über den (+)-(*S*)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäuremethylester das unnatürliche (–)-(*S*)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäure-lacton.

In einem Modellversuch cyclisierten wir auch die (+)-(*R*)-Ricinelaidsäure [7], die aus natürlicher Ricinolsäure durch *cis/trans*-Isomerisierung leicht zugänglich ist. Unter optimalen Bedingungen (vgl. exper. Teil) lässt sich diese Hydroxysäure mittels der Silberionenaktivierungsmethode in 85% Ausbeute in das 13gliedrige (+)-(*R*)-*trans*-12-Hydroxy-9-octadecensäure-lacton überführen.

Die chiroptischen Eigenschaften des (+)-(*R*)-Recifeiolid (VIII) und des (+)-(*R*)-Ricinelaidsäurelactons sind erwähnenswert. Beide Lactone besitzen zwischen 365 und 589 nm einen positiven optischen Drehsinn, aber bei 225 nm einen negativen Circular dichroismus (vgl. exper. Teil).

Anmerkung bet der Druckfahnen-Korrektur (22. 3. 76): Inzwischen haben auch *Corey et al.* [12] auf einem andern Weg das (\pm)-Recifeiolid synthetisiert,

Diese Arbeit wurde vom *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* (Projekt 2.106.74) unterstützt.

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen. Die Smp. wurden in einer Glaskapillare im Ölbad bestimmt und sind nicht korrigiert. Die IR.-Spektren (Angaben in cm^{-1}) wurden auf einem *Perkin-Elmer-157 G*-Spektrometer und die NMR.-Spektren auf einem *Varian-HA-100*-Spektrometer aufgenommen. Die Lage der Signale ist in δ -Werten (ppm) bezogen auf internes Tetramethylsilan angegeben; *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quadruplett, *m* = Multiplett, *br.* = breite unaufgelöste Signale, *J* = Kopplungskonstanten in Hz. Die Massenspektren wurden mit einem *Hitachi-Perkin-Elmer-RMU-6 D*-Spektrometer aufgenommen. Die Spaltprodukte sind in Einheiten von *m/e* und die Intensität der Signale in Prozent (bezogen auf das intensivste Signal) in Klammern angegeben.

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel *Merck* der Korngrösse 0,06–0,2 mm verwendet. Gas-chromatographische Analysen (GC.) wurden mit dem *Carlo Erba-Fractovap Mod. G.1* (Flammenionisations-Detektor; 20 m Glaskapillare, beschichtet mit UCON HB; Helium als Trägergas) bei der angegebenen Temperatur durchgeführt.

Diastereomere Ester der (–)-Camphansäure mit (–)- und (+)-1,3-Butandiol. 7,92 g *rac*-1,3-Butandiol wurden mit 40 g (–)-Camphansäurechlorid in Pyridin verestert (vgl. [8]). Das Gemisch der diastereomeren Camphansäureester (40 g, Smp. 100–125°) wurde in 250 ml Methylenchlorid gelöst, mit 750 ml Cyclohexan versetzt und 400 ml des Lösungsmittels abdestilliert. In den ersten 12 Std. kristallisierte an der Glasoberfläche beim Abkühlen der eine Ester in kleinen Prismen, in den nächsten 24 Std. aus der abdekantierten Mutterlauge der andere Ester in Nadelbüscheln. Umkristallisieren der Prismen (19,2 g, Smp. 141–144°) aus dem oben angegebenen Lösungsmittelgemisch ergab 15,8 g Ester aus (–)-1,3-Butandiol und (–)-Camphansäure, Smp. 147–148°. – MS.: 450 (*M*⁺).

$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_8$ (450,5) Ber. C 63,98 H 7,61% Gef. C 64,03 H 7,61%

Umkristallisieren der Nadelbüschel aus dem oben angegebenen Lösungsmittelgemisch ergab den Ester aus (+)-1,3-Butandiol und (–)-Camphansäure, Smp. 105–106°. – MS.: 450 (*M*⁺).

$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_8$ (450,5) Ber. C 63,98 H 7,61% Gef. C 64,08 H 7,63%

(-)-(R)-1,3-Butandiol (I). Der Camphansäureester vom Smp. 147–148° wurde 18 Std. mit wässriger KOH-Lösung gekocht und das Gemisch anschliessend mit Äther kontinuierlich extrahiert: I vom Sdp. 100–102°/10 Torr, $[\alpha]_D = -29^\circ$ ($c = 1$, C₂H₅OH).

(+)-(S)-1,3-Butandiol. Acetessigsäureäthylester wurde nach Ridley [9] mit gärender Hefe zum (+)-(S)-3-Hydroxybuttersäureäthylester reduziert: $[\alpha]_D = +37^\circ$ ($c = 1$, CHCl₃). Reduktion mit LiAlH₄ in Äther ergab (+)-(S)-1,3-Butandiol: Sdp. 101–103°/10 Torr, $[\alpha]_D = +25^\circ$ ($c = 1$, C₂H₅OH) (Lit. [10]: $[\alpha]_D = +27^\circ$ ($c = 5$, C₂H₅OH)). Verseifen des Camphansäureesters vom Smp. 105–106° ergab (+)-(S)-1,3-Butandiol mit $[\alpha]_D = +29^\circ$ ($c = 1$, C₂H₅OH).

(±)-1-Jodbutan-3-ol. In eine auf –25° abgekühlte Lösung von 30 g (0,33 mol) 1,3-Butandiol in 75 ml Pyridin wurde innerhalb 30 Min. unter Rühren eine Lösung von 69 g (0,36 mol) *p*-Toluolsulfonylchlorid in 140 ml Pyridin getropft. Nach weiteren 30 Min. wurden 6 ml Wasser tropfenweise zugegeben und das Gemisch zwischen Benzol, 2N H₂SO₄ und 2N KOH verteilt. Der Eindampfrückstand der Benzolschichten (62 g) wurde zusammen mit 200 g NaJ in 2 l Aceton gelöst und die Lösung 1 Std. zum Sieden erhitzt. Nach Entfernen des Acetons i. V. wurde der Rückstand zwischen Benzol, Wasser und 2N KOH verteilt, die organische Phase eingedampft und der Rückstand i. HV. destilliert: 43 g, Sdp. 33–36°/0,01 Torr. Das Produkt enthält laut GC. (85°) 87% 1-Jodbutan-3-ol neben 5% 3-Jodbutan-1-ol und 8% 1,3-Dijodbutan, kann aber direkt zur Herstellung des Phosphoniumsalzes verwendet werden.

(+)-(S)-1-Jodbutan-3-ol. Hergestellt wie oben aus (+)-(S)-1,3-Butandiol von $[\alpha]_D = +25^\circ$ ($c = 1$, C₂H₅OH). Das Zwischenprodukt 1-(*p*-Toluolsulfonyloxy)-butan-3-ol wurde durch Chromatographie an Kieselgel (Hexan/Äthylacetat 3:2) gereinigt und mit NaI in Aceton umgesetzt. Das Produkt ist dann frei von 1,3-Dijodbutan und 3-Jodbutan-1-ol (vgl. oben): Sdp. 30–34°/0,01 Torr (Lit. [11] Sdp. 58–60°/0,5 Torr), $[\alpha]_D = +22^\circ$ ($c = 1,9$, C₆H₆). – NMR. (CCl₄): 1,25 (*d*, *J* = 6,3H), 1,75–2,15 (br., 2H), 3,25 (*t*, *J* = 6,2H), 3,80 (*m*, 1H).

(±)-(3-Hydroxybut-1-yl)-triphenyl-phosphoniumiodid. 5,84 g (22 mmol) Triphenylphosphin und 4,03 g (20 mmol) (±)-1-Jodbutan-3-ol in 20 ml Benzol wurden 20 Std. unter Rückfluss erhitzt, das ausgefallene Salz (7,6 g) abfiltriert und aus 55 ml Methanol/Äthylacetat 1:1 kristallisiert: 6,28 g (67%) grobe Prismen, Smp. 219–221° (Zers.).

C₂₂H₂₄OPJ (462,3) Ber. C 57,15 H 5,23 P 6,70% Gef. C 57,19 H 5,29 P 6,59%

(+)-(S)-(3-Hydroxybut-1-yl)-triphenyl-phosphoniumiodid. Hergestellt wie oben aus (+)-1-Jodbutan-3-ol von $[\alpha]_D = +22^\circ$ ($c = 1,9$, C₆H₆). Umkristallisiert aus Methanol/Äthylacetat 1:1: Prismen von Smp. 217–220°, $[\alpha]_D = +2^\circ$ ($c = 1$, CH₃OH).

1-Methoxy-cycloocten (IV). 30 g Cyclooctanon, 40 g Orthoameisensäure-trimethylester und 1 g *p*-Toluolsulfonsäurehydrat wurden während 14 Std. auf 120–145° erhitzt. Die leichtflüchtigen Produkte, Ameisensäuremethylester und Methanol, wurden dabei über eine kurze Kolonne abdestilliert. Der erkaltete Rückstand wurde mit Kaliumcarbonat-Lösung versetzt, abfiltriert und destilliert: 24 g (70%) IV, Sdp. 62–63°/10 Torr. – IR. (CCl₄): 1665. – NMR. (CCl₄): 1,4–1,8 (br., 8H), 1,9–2,5 (br., 4H), 3,42 (*s*, 3H), 4,40 (*t*, *J* = 8,1H).

8-Oxo-octansäuremethylester (V). In eine Lösung von 6 g 1-Methoxycycloocten in 70 ml Methanol wurde bei –78° bis zur Blaufärbung Ozon eingeleitet, dann 12 ml Dimethylsulfid zugegeben, 60 Min. bei RT. stehengelassen und das Lösungsmittel i. V. entfernt (der Rückstand kann direkt für die Wittig-Kondensation [vgl. unten] eingesetzt werden): 8 g V vom Sdp. 72–76°/0,01 Torr, einheitliche Substanz im Kapillar-GC. (135°). – IR. (CCl₄): u. a. 2710, 1740. – NMR. (CCl₄): 1,2–1,8 (br., 8H), 2,15–2,45 (br., 4H), 3,60 (*s*, 3H), 0,40 (*m*, 1H).

(+)-(S)-trans-11-Hydroxy-8-dodecensäuremethylester. Zu einer Suspension von 10,0 g (21,6 mmol) des (+)-(S)-(3-Hydroxybut-1-yl)-triphenyl-phosphoniumiodids in 150 ml Äther wurden bei 25° unter Rühren inert 3 Min. 10 ml 2,2M *n*-Butyllithium in Hexan und nach 7 Min. 2,8 g (16,3 mmol) 8-Oxo-octansäure-methylester zu der roten Suspension tropfenweise zugegeben. Nach 20 Min. Weiterrühren gab man zu der jetzt gelben Suspension 10 ml Wasser, dekantierte die Ätherschicht und extrahierte den weissen Niederschlag mit weitem 100 ml Äther. Die Ätherlösungen wurden eingedampft und der Rückstand an 300 g Kieselgel mit Cyclohexan/Äthylacetat 3:2 chromatographiert: 1,16 g (31%). Das Produkt enthält nach GC. (140°) 68% des *trans*- und

32% des *cis*-Isomeren. Belichtet⁷⁾ man das Produkt zusammen mit 50 mg Diphenyldisulfid, gelöst in 100 ml Pentan/Benzol 3:1, so erhält man nach 2 Std. ein Gemisch, das 84% des *trans*- und 17% des *cis*-Isomeren enthält. Durch Chromatographie an einer Kieselgel-Silbernitratssäule⁸⁾ mit Benzol/Äthylacetat 4:1 lässt sich der (+)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäure-methylester rein gewinnen: 0,80 g vom Sdp. 110°/0,01 Torr, $[\alpha]_D = +7,5^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3). – IR. (CCl_4): u. a. 3620, 1740, 970. – NMR. (CCl_4): 1,12 (*d*, $J = 6,3\text{H}$), 1,2–1,8 (br., 6H), 1,8–2,4 (br., 6H), 3,62 (*s*, 3H), 3,5–3,8 (*m*, 1H), 5,2–5,6 (br., 2H). – MS.: 210 ($M^+ - 18$), 184 ($M^+ - 44$), 74.

$\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_3$ (228,3) Ber. C 68,38 H 10,59% Gef. C 68,34 H 10,48%

(S)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäure. 1,01 g (+)-(S)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäuremethylester in 15 ml Methanol und 15 ml 2N KOH kochte man 30 Min., entfernte das Lösungsmittel zur Hälfte i. V. und extrahierte mit Chloroform. Dann wurde die KOH-Schicht mit H_2SO_4 angesäuert und mit Äthylacetat extrahiert. Der in Nadeln kristallisierende Rückstand der organischen Schicht, 974 mg, wurde direkt für die Cyclisierung (vgl. unten) verwendet.

(–)-(S)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäurelacton. Eine Lösung von 428 mg (2 mmol) (S)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäure, 535 mg (2,4 mmol) 2,2'-Dipyridyldisulfid und 656 mg (2,5 mmol) Triphenylphosphin in 1,5 ml Benzol wurde 30 Min. stehengelassen, dann mit 50 ml abs. Acetonitril verdünnt und innert 3 Std. unter Rühren zu einer 65° warmen Lösung von 6 mmol Silberperchlorat in 200 ml Acetonitril getropft. Nach weiteren 30 Min. wurde abgekühlt, das Lösungsmittel i. V. verdampft und der Rückstand zwischen 2mal 100 ml Benzol, 40 ml 1M Natriumcyanidlösung und 20 ml Wasser verteilt. Der Rückstand der organischen Schichten wurde an 100 g Kieselgel mit Benzol/Äthylacetat 99:1 chromatographiert: 270 mg (70%) vom Sdp. 60°/0,005 Torr, $[\alpha]_D = -59^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3). – MS.: 196 (M^+ , 38), 152 (25), 109 (27), 98 (100), 84 (27), 81 (33). – IR. (CCl_4): u. a. 1730, 970. – NMR. (CCl_4): 1,0–1,7 (br., 8H), 1,22 (*d*, $J = 6,3\text{H}$), 1,7–2,5 (br., 6H), 4,95–5,45 (br., 3H). $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$ (196,3) Ber. C 73,43 H 10,27% Gef. C 73,40 H 10,26%

(–)-(R)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäuremethylester (VI). Hergestellt aus (–)-(R)-1,3-Butandiol ($[\alpha]_D = -29^\circ$ ($c = 1$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)) wie oben: $[\alpha]_D = -9^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3). – MS., IR. und NMR. sind gleich wie beim enantiomeren Ester (vgl. oben).

(+)-(R)-*trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäurelacton: Recifeiolid (VIII). VIII wurde wie oben durch Verseifung des Methylesters VI und Cyclisierung der Hydroxysäure VII mittels der Silberionenaktivierungsmethode in 75% Ausbeute hergestellt: $[\alpha]_D = +70^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3). Das natürliche Recifeiolid besitzt ein $[\alpha]_D = +73^\circ$ ($c = 7,5$, CHCl_3 [1]). – CD. (Pentan): $\Delta\epsilon_{\text{max}} = -0,08$ (225 nm). – MS., IR. und NMR. sind gleich wie beim enantiomeren Lacton. Das NMR.-Spektrum des natürlichen Recifeiolid [1]⁶⁾ ist mit demjenigen der synthetisierten Verbindung völlig identisch.

(+)-(R)-Ricinelaidsäure. Technische Ricinolsäure (Fluka AG) wurde zusammen mit 2 mol% Diphenyldisulfid in Benzol gelöst, mit einer Quecksilberdampf Lampe⁷⁾ 3 Std. belichtet, das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand 2mal aus der 10fachen Menge Hexan umkristallisiert: feine Nadelchen vom Smp. 48–50°, Lit. [7] Smp. 51–52°.

(+)-(R)-*trans*-12-Hydroxy-9-octadecensäurelacton. Die Cyclisierung der (+)-(R)-Ricinelaidsäure erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie der Ringschluss zum *trans*-11-Hydroxy-8-dodecensäurelacton: Ausbeute 85%, Sdp. 110°/0,01 Torr, $[\alpha]_D = +46^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3), $[\alpha]_D = +42^\circ$ ($c = 1$, Pentan). – CD. (Pentan): $\Delta\epsilon_{\text{max}} = -0,22$ (225 nm). – UV. (Pentan): 225 nm (Schulter, $\epsilon = 50$). – IR. (CCl_4): u. a. 1730, 965. – MS.: 280 (M^+). – NMR. (CCl_4): 0,8–1,1 (br., 3H), 1,1–1,8 (br., 20H), 1,8–2,4 (br., 6H), 4,8–5,0 (*m*, 1H), 5,25–5,45 (br., 2H).

$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (280,4) Ber. C 77,09 H 11,50% Gef. C 77,03 H 11,58%

Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der ETH (Leitung W. Manser) ausgeführt. Die NMR.-Spektren wurden unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. F. M. Oth aufgenommen. Für die massenspektroskopischen Analysen danken wir Herrn Prof. Dr. J. Seibl.

7) Philips HP(L) Mitteldruckbrenner 125 W.

8) 200 g Kieselgel werden mit 0,2M Silbernitrat-Lösung bedeckt, auf einer Nutsche abgesaugt und 12 Std. bei 140° getrocknet.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *R. F. Vesonder, F. H. Stodola, L. J. Wickerham, J. J. Ellis & W. K. Rohwedder*, *Canad. J. Chemistry* **49**, 2029 (1971).
- [2] *P. A. Levene & H. L. Haller*, *J. biol. Chemistry* **65**, 49 (1925); *ibid.* **69**, 165 (1926); *P. A. Levene & A. Walti*, *ibid.* **68**, 415 (1926).
- [3] *U. Schmidt & P. Grafen*, *Liebigs Ann. Chem.* **656**, 97 (1962).
- [4] *K. H. Schulte-Elte & G. Ohloff*, *Helv.* **51**, 548 (1968).
- [5] *H. Gerlach & A. Thalmann*, *Helv.* **57**, 2661 (1974).
- [6] *H. Gerlach, K. Oerle, A. Thalmann & S. Servi*, *Helv.* **58**, 2036 (1975).
- [7] *J. P. Kass & S. B. Radlove*, *J. Amer. chem. Soc.* **64**, 2253 (1942).
- [8] *H. Gerlach*, *Helv.* **51**, 1587 (1968); *H. Gerlach & W. Müller*, *ibid.* **55**, 2277 (1972).
- [9] *D. Ridley & M. Stralow*, *J. chem. Soc. Chem. Commun.* **1975**, 400.
- [10] *K. Serch-Hanssen*, *Arkiv Kemi* **8**, 401 (1955).
- [11] *P. A. Levene, A. Walti & H. L. Haller*, *J. biol. Chemistry* **71**, 465 (1927).
- [12] *E. J. Corey, P. Ulrich & J. M. Fitzpatrick*, *J. Amer. chem. Soc.* **98**, 222 (1976).

79. One-Step Purification of Bovine Adrenal Glucose-6-phosphate Dehydrogenase by Affinity Chromatography

by **Ernst Bürgisser** and **Jean-Luc Fauchère**¹⁾²⁾

Institut für Molekularbiologie und Biophysik
Eidgenössische Technische Hochschule, CH-8049 Zürich

(5. II. 76)

Zusammenfassung. Das konventionelle Reinigungsverfahren von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH) (E.C. 1.1.1.49) aus Rinder-Nebennierenrinde wird durch eine einzige affinitätschromatographische Trennungsstufe ersetzt. Die Anwendung einer mit Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) substituierten Sepharose ergibt aus dem Rohextrakt eine Protein-Fraktion, aus welcher nach Einengen die G6PDH unmittelbar kristallisiert. Die Reinheit des Enzyms wird durch analytische Gel-Elektrophorese sowie durch Vergleich mit schon bestehenden Literaturdaten geprüft. Vier weitere NADP-abhängige Dehydrogenasen werden im Eluat identifiziert und partiell gereinigt.

1. Introduction. – Bovine adrenal glucose-6-phosphate dehydrogenase (D-glucose-6-phosphate: NADP oxidoreductase, E.C. 1.1.1.49) (G6PDH) has discriminatory properties towards adrenocorticotrophic hormone (ACTH) [1], making it a good model for detailed binding studies with ACTH. For this reason we have begun to isolate the enzyme in our laboratory. G6PDH has already been purified from other sources such as yeast [2] [3] or erythrocytes [4] by conventional techniques including in some cases affinity chromatography. Bovine adrenal G6PDH was first isolated and crystallized by *Criss & McKerns* [5]. *Squire & Sykes* [6] have reported on an improved procedure, which appears to be the best available at present. Their six-step fractionation method still remains very laborious. This is partly due to the presence in the

¹⁾ This work is a part of the doctoral thesis of *E. B.*

²⁾ Abbreviations: NADP (NADPH): oxidized (reduced) nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; SDS: sodium dodecylsulfate; Tris: tris-(hydroxymethyl)-aminomethane; EDTA: ethylene diamine tetraacetate; bicine: N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycine.