

1. Die Isolierung von (-)- β -Methoxy-adipinsäure aus den Oxydationsprodukten von Calciferol-methyläther

von Sune Bergström.

(28. X. 48.)

Der sterische Bau des Kohlenstoffgerüsts der Sterinmolekel ist jetzt in grossen Zügen bekannt, und in vielen Fällen ist auch die Lage verschiedener Substituenten relativ zur Molekelebene („ α “ oder „ β “) festgelegt. In keinem Fall scheint aber eine chemische Verknüpfung von diesem α, β -System mit dem DL-System, das vom Glycerinaldehyd ausgeht, stattgefunden zu haben.

Als erster Schritt zur Verknüpfung von dem C_3 -Asymmetriezentrum der Sterine mit dem konventionellen DL-System wird hier der oxydative Abbau von Calciferol-methyläther (III) beschrieben.

Bei der Oxydation von Calciferoläther wäre als Spaltstück von Ring A eine optisch aktive β -Methoxy-adipinsäure (IV) zu erwarten. Die Zugehörigkeit dieser Säure zur D- oder L-Serie könnte dann z. B. durch Abbau zu oder Aufbau von D- oder L-Äpfelsäure-methyläther festgestellt werden.

Im Calciferol kann die Hydroxylgruppe in β -Stellung angenommen werden, da es keine Anhaltspunkte dafür gibt, dass bei der Umwandlung von Ergosterin (I) zum Calciferol (II) unter dem Einfluss von ultraviolettem Licht eine Epimerisierung an diesem Asymmetriezentrum stattgefunden hat. Die soeben erschienene Arbeit von *Crawfoot* und *Dunitz*¹⁾ über die Röntgen-Analyse des 4-Jod-5-Nitrobenzoesäureesters des Calciferols bestätigt diese Annahme. Ergosterin hat die Hydroxylgruppe in der gleichen räumlichen Lage wie Cholesterin²⁾, bei dem kürzlich direkte chemische Beweise für die β -Stellung von *Kendall* und Mitarbeitern³⁾ sowie von *Shoppee*⁴⁾ erbracht worden sind. Aller Erfahrung nach wird die Konfiguration auch durch die Ätherbildung nicht geändert.

Eine optisch aktive β -Oxy- oder β -Methoxy-adipinsäure scheint bisher nicht hergestellt worden zu sein. *Farmer*⁵⁾ hat racemischen β -Methoxy-adipinsäure-dimethylester aus Dihydromuconsäure-ester

¹⁾ *D. Crawfoot* und *J. D. Dunitz*, *Nature* **162**, 608 (1948).

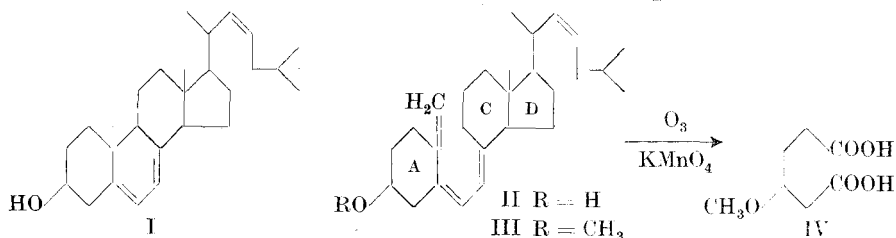
²⁾ *E. Fernholz* und *P. N. Chakravorty*, *B.* **67**, 2021 (1934).

³⁾ *V. R. Mattox*, *R. B. Turner*, *L. L. Engel*, *B. F. McKenzie*, *W. F. McGuckin* und *E. C. Kendall*, *J. Biol. Chem.* **164**, 569 (1946); *V. R. Mattox*, *R. B. Turner*, *B. F. McKenzie*, *L. L. Engel* und *E. C. Kendall*, *J. Biol. Chem.* **173**, 283 (1948).

⁴⁾ *C. W. Shoppee*, *Soc.* **1948**, 1032.

⁵⁾ *E. H. Farmer*, *Soc.* **123**, 3324 (1923).

durch Behandeln mit Natriummethylat in methylalkoholischer Lösung erhalten und daraus die freie Säure vom Smp. 88–89° bereitet.



Wir haben Hydrochinon-monomethyläther mit *Raney*-Nickel hydriert und das entstandene 4-Methoxy-cyclohexanol direkt mit Kaliumpermanganat oxydiert. Die so gewonnene DL- β -Methoxy-adipinsäure schmolz bei 85–87°.

Krystallisiertes Calciferol (I) wurde mit Methyljodid und Silberoxyd methyliert. Der ölige Methyläther III wurde dann ozonisiert und das Ozonid sofort mit Kaliumpermanganat in Aceton oxydiert. Die Oxydationsprodukte wurden mit Äther fraktioniert extrahiert. Es wurde festgestellt, dass die synthetische β -Methoxy-adipinsäure sich beim Schütteln mit 3 Volumen Äther und 1 Volumen Phosphorsäure-Glycin-Puffer vom p_H 0,7 zu etwa gleichen Teilen zwischen die beiden Phasen verteilt. Dann wurden die sauren Oxydationsprodukte in einem solchen System nach dem Gegenstrom-extraktionsverfahren von *Craig*¹⁾ weitergereinigt. Aliquote Teile der Ätherschichten wurden

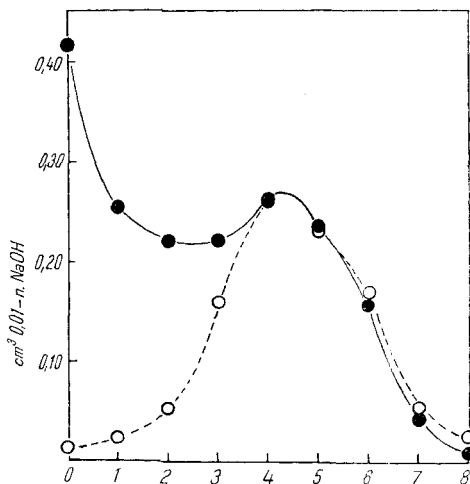


Fig. 1.

● Oxydationsprodukt. ○ DL- β -Methoxy-adipinsäure.

¹⁾ L. C. Craig, J. Biol. Chem. **155**, 519 (1944); L. C. Craig, C. Golumbic, H. Mighton und E. Titus, J. Biol. Chem. **161**, 321 (1945); B. Williamson und L. C. Craig, J. Biol. Chem. **168**, 687 (1947).

dann eingedampft, der Rückstand in Äthanol gelöst und mit 0,01-n. NaOH titriert. Die Werte, sowohl für die synthetische β -Methoxy-adipinsäure als auch für eine Fraktion der Oxydationsprodukte, sind in Fig. 1 aufgetragen. Daraus ist ersichtlich, dass sich etwa die Hälfte der Säureäquivalente dieser Fraktion wie die synthetische β -Methoxy-adipinsäure verhält, während die übrigen Produkte alle stärker ätherlöslich sind. Die Fraktionen 4–8 wurden daher vereinigt und die daraus regenerierte Säure über das Bariumsalz in das Benzylthiuroniumsalz übergeführt, das gut krystallisierte¹⁾, bei 132,5–134° schmolz und die spez. Drehung $[\alpha]_D^{20} = -1,2^0 \pm 0,4^0$ zeigte.

Synthetische DL- β -Methoxy-adipinsäure gab ein Benzylthiuroniumsalz, das bei 139–140° schmolz.

Aus dem Benzylthiuroniumsalz wurde die freie β -Methoxy-adipinsäure isoliert, die bei 74–75° schmolz und $[\alpha]_D^{20} = -2,9^0 \pm 1,2^0$ zeigte.

Da nur kleine Mengen zur Verfügung standen, sind die Drehungswerte nicht sehr genau. Es bleibt noch zu beweisen, ob die gefundenen (–)-Methoxy-adipinsäure der D- oder der L-Reihe angehört.

Herrn Professor T. Reichstein danke ich bestens für den Arbeitsplatz in seinem Institut sowie für seine wertvollen Ratschläge und für sein dauerndes Interesse an dieser Arbeit.

Experimenteller Teil.

4-Methoxy-cyclohexanol.

15 g Hydrochinon-monomethyläther wurden in 50 cm³ Methanol gelöst und mit etwa 3 g Raney-Nickel W 2²⁾ im Drehaufkloß bei 150° und 125 Atm. hydriert. Als die Reaktion nach 3 Stunden beendet war, wurde der Katalysator abfiltriert und das Methanol durch eine kurze Kolonne im Vakuum abgedampft. Der zurückbleibende Sirup (16 g) wurde direkt zur folgenden Oxydation verwendet.

β -Methoxy-adipinsäure.

10 g rohes 4-Methoxy-cyclohexanol wurden in der Lösung von 20 g Natriumcarbonat-dekahydrat in 100 cm³ Wasser suspendiert und unter Turbinieren während 2 Stunden mit 35 g pulverisiertem Kaliumpermanganat in kleinen Portionen versetzt. Die Temperatur wurde durch äussere Kühlung bei 15–20° gehalten. Als das Permanganat nach einigen Stunden verbraucht war, wurde vom Bräunstein abfiltriert und gut ausgewaschen; dann wurden die Filtrate im Vakuum auf etwa 60 cm³ eingedunstet und mit konz. Salzsäure auf pH 3 gebracht. Die saure Lösung wurde nun zehnmal mit je 120 cm³ Äther ausgeschüttelt, die Ätherlösung kurz über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft.

Der Rückstand (10 g) krystallisierte langsam. Er wurde mit einigen cm³ Äther angerührt und über Nacht bei +4° stehen gelassen. Filtrieren und Waschen mit kaltem Äther hinterliess 3,4 g rohe β -Methoxy-adipinsäure, die bei 83–86° schmolz. Eine Trübung blieb aber bis etwa 110°.

Zur Reinigung wurde die Säure in Methanol gelöst und mit methanolischer Bariumhydroxyldlösung neutralisiert. Die dicke Fällung wurde abfiltriert und in etwa 25 cm³ Wasser gelöst. Die trübe Lösung wurde mit 20 cm³ Methanol versetzt und ein geringer klebriger Niederschlag abzentrifugiert. Die klare Lösung wurde darauf mit 3 Volumen

¹⁾ C. W. Shoppee und T. Reichstein, Helv. **25**, 1611 (1942).

²⁾ R. Mozingo, Org. Synth. **21**, 15 (1941); H. Adkins und A. A. Pavlic, Am. Soc. **69**, 3039 (1947).

Methanol gefällt. Die farblose Fällung wurde abzentrifugiert, in Wasser gelöst, in der Hitze mit verdünnter H_2SO_4 möglichst genau von Bariumionen befreit und im Vakuum zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde aus Äther-Petroläther krystallisiert. Ausbeute 2 g kleine, dicke Prismen, die bei $85-87^\circ$ klar schmolzen.

Eine kleine Probe wurde bei 0,02 mm und 200° sublimiert und nochmals aus Äther-Petroläther umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt blieb unverändert.

3,970 mg Subst. gaben 6,94 mg CO_2 und 2,42 mg H_2O (F. W.)

4,799 mg Subst. gaben 6,336 mg AgJ (Zeisel) (F. W.)

$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_5$ Ber. C 47,72 H 6,87 OCH_3 17,62%
(176,17) Gef. „ 47,70 „ 6,82 „ 17,45%

Calciferol-methyläther.

3,25 g krystallisiertes Calciferol¹⁾ (Smp. $101-113^\circ$) wurden zweimal mit 20 cm³ trockenem Benzol im Vakuum eingedampft und dann mit 15 cm³ Methyljodid und 12 g über Phosphorpentoxyd getrocknetem Silberoxyd in 40 cm³ trockenem Äther bei Feuchtigkeitsausschluss unter Rückfluss gekocht. Nach 12 Stunden wurde filtriert, mit Äther nachgewaschen, das Filtrat im Vakuum eingedampft und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet. Das Reaktionsprodukt war eine schwach gelbe, zähe Flüssigkeit (3,3 g), die sofort weiterverarbeitet wurde.

4,842 mg Subst. gaben 2,809 mg AgJ (Zeisel) (F. W.)

$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ (410,66) Ber. $-\text{OCH}_3$ 7,56% Gef. $-\text{OCH}_3$ 7,67%

Oxydative Spaltung des Calciferol-methyläthers.

Der oben erwähnte Methyläther wurde in Äthylacetat bei -10° ozonisiert. Die Lösung wurde dann rasch im Vakuum bei 25° zur Trockne verdampft und in 100 cm³ Aceton gelöst. Sie wurde dann unter Eiskühlung allmählich mit 10 g Kaliumpermanganat versetzt. Der Braunstein wurde abfiltriert und mit Aceton und heissem Wasser ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum auf etwa 150 cm³ konzentriert. Die Lösung wurde mit Schwefelsäure auf pH 3 gebracht und dann zweimal mit je 50 cm³ Äther extrahiert.

Die klare wässrige Lösung wurde weiter im Vakuum auf etwa 50 cm³ konzentriert und dann mehrmals mit 50 cm³ Äther extrahiert. Die ätherischen Extrakte wurden kurz über Natriumsulfat getrocknet, zur Trockne eingedampft und gewogen.

Extrakt Nr.: 1—2 3—5 6—8 9—11 12—14

Gewicht: 2,160 g 0,644 g 0,169 g 0,087 g 0,062 g

Für die weitere Fraktionierung wurde das „Gegenstrom-Extraktions“-Verfahren, wie es kürzlich von Craig (l. c.) entwickelt worden ist, angewandt. Es wurde gefunden, dass sich synthetische DL- β -Methoxy-adipinsäure in einem System von 3 Volumen Äther und 1 Volumen von einem Puffer, der durch Mischung von 10 Teilen 2-m. Phosphorsäure und 1 Teil 20-proz. Glycinlösung hergestellt worden war, etwa hälftig zwischen den beiden Phasen verteilte. Die beiden Phasen waren zuerst miteinander gesättigt worden. Die wässrige Phase hatte ein pH von 0,7 (Glaselektrode). Wenn die wässrige Phase mit Natriumsulfat gesättigt wurde, wurde mehr als 95% der organischen Säure im Äther gefunden.

In Fig. 1 ist das Resultat einer Verteilung mit acht Überführungen (9 Scheidetrichter) eingezeichnet.

600 mg der vereinigten Ätherextrakte 3—5 wurden in einem Scheidetrichter (Nr. 0) zwischen 300 cm³ Äther und 100 cm³ Phosphorsäure-Glycin-Puffer durch kräftiges Schütteln während 1 Minute verteilt. Die wässrige Phase passierte dann acht Scheidetrichter, numeriert von 1—8, die alle 300 cm³ Äther enthielten. Diese wässrige Phase blieb dann in Trichter 8. Im ersten Scheidetrichter wurde immer eine frische Wasser-

¹⁾ Der Firma *Ed. Geistlich Söhne AG.*, Wollhusen, sei auch an dieser Stelle für die geschenkwaise Überlassung des Calciferols bestens gedankt.

phase zugesetzt, die der ersten nachfolgte, so dass, als die Verteilung beendet war, alle neun Scheidetrichter (0—8) zwei Phasen enthielten. Die unteren Phasen wurden dann mit Natriumsulfat gesättigt; 2 cm³ von jeder Ätherphase wurden entnommen, mit Stickstoff zur Trockne geblasen, in 2 cm³ Äthanol gelöst und nach Zusatz von Phenolphthalein mit 0,01-n. NaOH titriert. Nach Abzug des Leerwertes von 2 cm³ Äther, der mit Phosphorsäure geschüttelt worden war, wurde die Kurve in Fig. 1 erhalten. Mehr als die Hälfte der Säureäquivalente des Präparates zeigt also ein Verteilungsverhalten, das mit demjenigen der synthetischen DL- β -Methoxy-adipinsäure übereinstimmt. Die übrigen sauren Bestandteile sind stärker ätherlöslich und sind in den früheren Fraktionen angereichert. Die Fraktionen 4—8 wurden vereinigt und die wässrige Phase mehrmals mit Äther extrahiert. Der Äther wurde über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingedampft; der Rückstand wurde in einigen cm³ Wasser gelöst und dann mit 0,25-n. Bariumhydroxyd neutralisiert. Nach Abfiltrieren von einer Spur Bariumphosphat wurde die Lösung in gefrorenem Zustand im Vakuum über P₂O₅ getrocknet (Rückstand 260 mg).

Das Bariumsalz wurde in Wasser gelöst und die Bariumionen bis auf eine Spur mit H₂SO₄ gefällt. Das gebildete Bariumsulfat wurde abzentrifugiert und die Lösung zur Trockne eingedampft (138 mg).

Benzylthiuroniumsalz.

Die Säure wurde in einigen cm³ Wasser gelöst und mit Bariumhydroxyd (5,3 cm³ 0,25-n.) genau neutralisiert. Zu dieser Lösung wurden 284 mg Benzylthiuroniumsulfat in methanolischer Lösung zugesetzt. Das ausgefallene Bariumsulfat wurde abzentrifugiert und die Fällung mit Methanol mehrmals gewaschen. Die vereinigten methanolischen Lösungen hinterliessen nach Eindampfen im Vakuum einen Sirup, der langsam krystallisierte. Das Produkt wurde in einigen Tropfen heissem Methanol gelöst und dann vorsichtig mit Aceton versetzt. Es krystallisierten 196 mg farblose Nadelchen. Smp. 132,5—134°. Weitere Umkrystallisationen änderten den Schmelzpunkt nicht. $[\alpha]_D^{20} = -1,1^0 \pm 0,45^0$ ($c = 8,970$ in Methanol), bzw. $= -1,2^0$ ($c = 5,933$ in Methanol)¹⁾.

89,70 mg Subst. zu 1 cm³; $l = 0,5$ dm; $\alpha_D^{20} = -0,05^0 \pm 0,02^0$

89,0 mg Subst. zu 1,5 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{20} = -0,07$

Zur Analyse wurde 15 Stunden im Hochvakuum über P₂O₅ getrocknet.

9,10 mg Subst. gaben 0,865 cm³ N₂ (23,5°, 771 mm) (W. K.)

C₂₃H₃₂O₅N₄S₂ (510,26) Ber. N 10,98% Gef. N 11,10%

In derselben Weise wurde aus synthetischer DL-Methoxyadipinsäure ein Benzylthiuroniumsalz hergestellt, das aber einen Schmelzpunkt von 139—140° hatte. Die Mischprobe von optisch aktivem und racemischem Thiuroniumsalz schmolz bei 135—136°.

12,33 mg Subst. gaben 1,183 cm³ N₂ (24,3°, 771 mm) (W. K.)

C₂₃H₃₂O₅N₄S₂ (510,26) Ber. N 10,98% Gef. N 11,16%

Das Thiuroniumsalz von den Drehungsbestimmungen (79 mg) wurde in 5 cm³ n. Schwefelsäure gelöst und die Lösung zehnmal mit 15 cm³ Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden mit 5 cm³ 0,4-n. Bariumhydroxyd und zweimal mit je 5 cm³ Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Auszüge wurden mit Kohlendioxyd neutralisiert und nach Filtrieren im Vakuum zur Trockne gebracht (41 mg).

Das Barium-Salz wurde in 3 cm³ Wasser gelöst und mit 0,24 cm³ 1,0-n. Schwefelsäure versetzt, wonach noch ein kleiner Überschuss von Bariumionen vorlag. Nach dem Zentrifugieren wurde die Lösung im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand löste sich grösstenteils leicht in Aceton; einige unlösliche Flocken wurden abfiltriert. Der Trockenrückstand von Acetonlösung (21 mg) wurde dann in einem kleinen Rohr im Vakuum bei 150° und 0,2 mm rasch destilliert. Das farblose Destillat krystallisierte bald in langen Nadeln und zeigte $[\alpha]_D^{21} = -2,9^0 \pm 1,2^0$ ($c = 3,40$ in Methanol).

17,00 mg Subst. zu 0,5 cm³; $l = 0,5$ dm; $\alpha_D^{21} = -0,05^0 \pm 0,02^0$

¹⁾ Freundlicherweise von Dr. S. Stållberg-Stenhagen, Upsala, ausgeführt.

Die von der Drehungsbestimmung regenerierte Säure wurde nochmals im Vakuum sublimiert und aus Äther-Petroläther umkrystallisiert. Smp. 74—75°.

Zur Analyse wurde 15 Stunden in Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet.

Die Mischprobe mit DL- β -Methoxy-adipinsäure schmolz unscharf bei 74—85.

3,112 mg Subst. gaben 5,461 mg CO_2 und 1,952 mg H_2O (W. K.)

2,318 mg Subst. verbrauchten 6,540 cm³ 0,0118-n. $Na_2S_2O_3$ (Zeisel-Vieböck) (W. K.)

$C_7H_{12}O_5$	Ber. C 47,72	H 6,87	$-OCH_3$ 17,62%
(176,17)	Gef. „ 47,89	„ 7,01	„ 17,22%

Die Mikroanalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium von Herrn F. Weiser, Basel (F. W.), und im Mikroanalytischen Laboratorium (Leitung W. Kirsten) des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Upsala, Schweden, (W. K.), ausgeführt.

Zusammenfassung.

Bei der Ozonisation von Calciferol-methyläther wurde als Spaltstück aus Ring A (—)- β -Methoxy-adipinsäure isoliert.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel
und Physiologisch-Chemische Abteilung der
Universität Lund, Schweden.

2. Über die Affinität wasserlöslicher Substanzen zu Wolle und ihre antibakterielle Aktivität

von Roland Fischer, S. Seidenberg und U. P. Weis.

(2. XI. 48.)

Als im Jahre 1911 zum erstenmal Azofarbstoffe für Wolle mit Sulfonamid- und substituierten Sulfonamidgruppen dargestellt wurden¹⁾, konnte man innerhalb dieser Farbstoffgruppe eine bessere Wasch- und Walkechtheit der sulfonamidhaltigen gegenüber den sulfonamidfreien Farbstoffen feststellen; die ersteren gingen eben eine innigere Verbindung mit der Eiweisszelle der Wolle ein. Domagk's Beobachtung über die Streptokokkenwirkung eines solchen sulfonamidhaltigen Farbstoffs wurde dann für die weiteren Arbeiten richtunggebend und führte zur Entdeckung des Prontosils.

Wenn wir uns jetzt auf die Suche nach Ähnlichkeiten zwischen Wolle einerseits und Bakterien andererseits begeben, so liefert bereits eine nicht-systematische Durchsicht der Literatur interessante Zusammenhänge. Es fällt zunächst auf, daß die Ähnlichkeit „Wolle-

¹⁾ H. Hörlein, Medizin und Chemie 3, 19 (1936) Bayer.