

L-Desoxy-chloromycetin*.

(L-3-p-Nitrophenyl-2-dichloroacetamido-propanol-1, II. Mitt.¹)

Von

K. Eiter und K. Letnansky.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 20. April 1954.)

Aldolkondensationen von p-Nitrobenzaldehyd und acylierten Aminoacetaldehyden nach Angabe von *S. Tatsuoka* und Mitarbeitern² konnten nicht reproduziert werden.

Das Thiosemicarbazon des bereits beschriebenen α -Dichloroacetamido-p-nitrozimtaldehyds IV zeigt bei In-vitro-Versuchen eine gute tuberkulostatische Wirkung.

Die in der I. Mitteilung geäußerte Annahme, daß bei der Reduktion von II mit gärender Hefe eine Umlagerung unter Bildung der Verbindung X vom Schmp. 185° eingetreten ist, wurde überprüft. Es stellte sich heraus, daß der genannte Stoff das O,N-Diacetat der L-Verbindung von V ist, welche zufälligerweise in Methanol und Pyridin keine meßbare optische Aktivität erkennen ließ. Die phytochemische Reduktion von substituierten Zimtaldehyden der Formel II und III führt je nach Verwendung bestimmter Hefestämme entweder zu optisch inaktiven oder aktiven Verbindungen der Formeln VI bzw. VIII.

Der eine von uns (*K. E.*) hat vor längerer Zeit über die Synthese des D,L-Desoxy-chloromycetins VIII berichtet. Damals wurde von Versuchen ausgegangen, welche sich die Synthese des Antibiotikums Chloromycetin (Chloramphenicol) selbst zum Ziele setzten; es wurde versucht, Benzaldehyd bzw. p-Nitro-benzaldehyd mit N-acylierten Aminoacetaldehyden unter mannigfacher Variation der Versuchsbedingungen einer Aldolkondensation zum entsprechenden 3-Phenyl-

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *L. Ebert* in Verehrung zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ Mh. Chem. **83**, 123 (1952).

bzw. 3-p-Nitrophenyl-2-acylaminoopropanol-3-al-1 I zu unterwerfen. Es gelang uns nicht, diese Verbindung zu isolieren.

Zu unserer Überraschung erhielten wir Kenntnis von einer Arbeit von *S. Tatsuoka, A. Morimoto, A. Miyake, M. Miyamoto, J. Ueyanagi, T. Shimada* und *H. Miyazaki*², die die Kondensation von p-Nitrobenzaldehyd mit N-Benzoylaminoacetaldehyd in Gegenwart von Triäthylamin durchführten und angeblich zum erythro-Racemat des oben angeführten Acylaminooxyaldehyds I gelangten. Angesichts unserer seinerzeitigen vergeblichen Bemühungen um die Herstellung dieser Verbindung haben wir die Angaben der japanischen Autoren wiederholt nachgearbeitet, wobei es uns nicht gelang, die gewünschte Substanz zu isolieren.

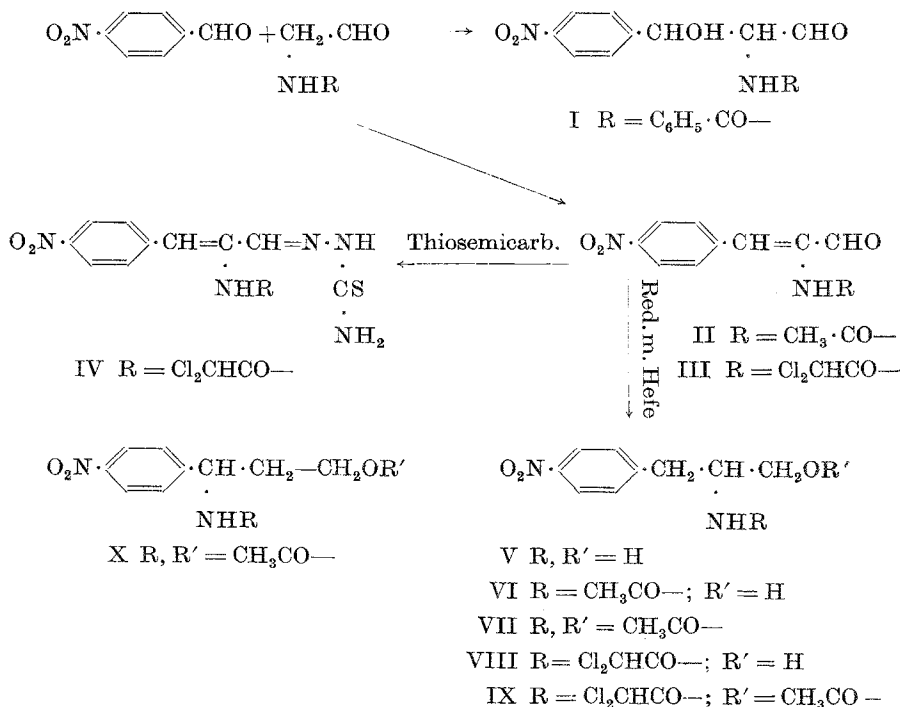
Der für die Aldolkondensation benötigte freie Hippuraldehyd, welcher bereits früher von *E. Fischer*³ beschrieben worden war, wurde von uns aus dem Hippuraldehyddiäthylacetal vom Schmp. 38° durch Hydrolyse mit 10%iger Schwefelsäure gewonnen, wobei wir in Versuchsreihen die Verseifungstemperaturen und -zeiten zur Gewinnung optimaler Aldehydmengen ermittelt haben. Die Ausbeuten an p-Nitrophenylhydrazon des gebildeten Hippuraldehyds ließen erkennen, daß eine annähernd quantitative Verseifung des Acetals in 10%iger Schwefelsäure beim Erhitzen auf 50° durch 1½ Std. erfolgt war. Die Angaben der japanischen Autoren bezüglich der Verseifung des auch von uns bereits beschriebenen Dichloracetamino-acetaldehyd-diäthylacetals vom Schmp. 56° zum freien Aldehyd durch dreistündiges Stehenlassen des Acetals mit 10%iger Schwefelsäure bei Zimmertemperatur sind nach unseren Beobachtungen nicht ganz zutreffend; nach dieser Zeit konnten wir unverändertes Acetal zurückgewinnen, die Ausbeuten an Aldehyd, wieder bestimmt als p-Nitrophenylhydrazon, betrugen 55%. Die japanischen Autoren geben an, daß ihnen eine Aldolkondensation von p-Nitrobenzaldehyd und Dichloracetaminoacetaldehyd nicht gelungen ist.

Obwohl wir also alle Versuchsbedingungen zum Gelingen der von den zitierten Autoren beschriebenen Aldolkondensation geschaffen hatten, ergab die Aufarbeitung der Ansätze, die zur Erfassung etwaiger geringster Mengen gebildeten Oxy-acylaminoaldehyds öfters auch unter Heranziehung der Molekulardestillation vorgenommen wurde, keine Verbindung der beschriebenen Art. Wir können damit nur frühere Literaturangaben bestätigen, welche bei solchen Kondensationen nur teerige Produkte isolieren konnten.

Wie bereits von uns beschrieben, ließ sich das Phenylpropan-skelett aus z. B. p-Nitrobenzaldehyd und Acylamino-acetaldehyd-diäthylacetalen

² J. Pharm. Soc. Japan **71**, 776 (1950).

³ Ber. dtsch. chem. Ges. **26**, 464 (1893).



sehr wohl aufbauen, wenn die *Knövenagelsche* Kondensation beider Komponenten durch kurzes Kochen in Eisessig bei Gegenwart von z. B. wenig Piperidin vorgenommen wurde. Auf diese Weise gelang bei Verwendung von N-Acetyl-amino-acetaldehyd-diäthylacetal die Darstellung von p-Nitro- α -acetamido-zimtaldehyd II, beim Einsatz von Dichlor-acetyl-aminoacetal die Synthese von p-Nitro- α -dichloracetamido-zimtaldehyd III. Diese Substanz zeigte bei der seinerzeitigen biologischen Testung gegen *Shigella sonnei* bereits eine Hemmwirkung, so daß wir es für aussichtsreich hielten, von diesem Aldehyd das Thiosemikarbazon IV herzustellen, um es auf seine tuberkulostatische Wirkung prüfen zu lassen. Die Annahme einer tuberkulostatischen Wirkung war durch das Vorhandensein von drei konstitutiven Merkmalen des Moleküls zu erwarten: 1. Die Thiosemikarbazon-Gruppierung, 2. die Cinnamyl-Struktur, welche ja schon lange als tuberkulostatisch wirksam bekannt ist, und 3. der dem Antibiotikum Chloromycetin analoge Bau.

Das Thiosemikarbazon des Aldehyds III ist ein gelber, kristallisierter Körper, von dem sich in Wasser bei Zimmertemperatur nur knapp 3 γ /ml lösen; während die Löslichkeit in Alkohol mäßig ist, löst sich die Verbindung in Pyridin, Dimethylformamid und Urethan gut. Zur biologischen Testung kam die Substanz in einem Urethan-Wasser-Gemisch

gelöst zur Anwendung. Die von Herrn Dozent Dr. *Zischka* am Pathologischen Institut der Universität Wien in freundlicher Weise vorgenommenen Hemmversuche an *M. tuberculosis*, Typ. humanis, für die wir an dieser Stelle bestens danken, ergaben eine absolute Hemmung der Bakterien in sämtlichen mit dem Thiosemikarbazon versetzten Nährböden bis zur stärksten durchgeführten Verdünnung von 10 γ .

Aus Gründen, die wir bereits¹ dargelegt haben, wurde der p-Nitro- α -acetamido-zimtaldehyd als auch die entsprechende Dichloracetylverbindung phytochemisch mit gärender Hefe reduziert. Wir hatten damals am Beginn unserer Untersuchungen zur besseren Abtrennung des durch Reduktion erhaltenen Alkohols VI diesen acetyliert und so ein N,O-Diacetat des D,L-3-p-Nitrophenyl-2-aminopropanol-1 V vom Schmp. 161° erhalten, welches mit einem auf anderem Wege⁴ hergestellten D,L-3-p-Nitrophenyl-2-acetamido-1-acetoxy-propan identisch war. Aus unerklärlichen Gründen, die uns auch veranlaßten, eine neuerliche Untersuchung vorzunehmen, ergaben dieselben Reduktionsversuche in der Folge immer ein Diacetat vom Schmp. 185°, welches in Methanol und Pyridin keine meßbare optische Aktivität zeigte, so daß wir bei gleicher Bruttozusammensetzung und gestützt durch die Aussagen des Spektroskopikers, der das UR-Spektrum der Diacetate vom Schmp. 161° und 185° nicht Verbindungen vom Verhältnis Racemat-aktive Komponente zuordnete, zur Annahme gelangten, daß das Diacetat vom Schmp. 185° eine ortsisomere Verbindung, und zwar das D,L-3-p-Nitrophenyl-3-acetamido-1-acetoxypropan X sei. Die nunmehr durchgeführten neuen Untersuchungen brachten eine völlige Aufklärung der tatsächlichen Konstitution des Diacetats vom Schmp. 185°. Wird dieses N,O-Diacetat mit 5%iger Salzsäure verseift, so entsteht das Hydrochlorid eines Aminoalkohols V mit dem Schmp. 195°, welches in 0,5 n HCl eine ausgeprägte optische Aktivität, und zwar $[\alpha]_D^{20} = -19 \pm 2^\circ$ zeigte; wir hatten es seinerzeit leider unterlassen, auch dieses Hydrochlorid auf seine optische Aktivität zu prüfen. Das analoge Hydrochlorid des D,L-p-Nitrophenyl-alaninols schmilzt bei 180°⁵.

Aus der wäßrigen Lösung des L-3-p-Nitrophenyl-2-aminopropanol-1-hydrochlorids kann durch Versetzen mit verdünntem Ammoniak der freie Aminoalkohol mit dem unscharfen Schmp. 120 bis 123° gefällt

⁴ A. Dornow, Ber. dtsh. chem. Ges. 84, 307 (1951).

⁵ In unserer I. Mitteilung wurde im experimentellen Teile anlässlich der Beschreibung der Verseifung von D,L-N,O-Diacetyl-p-nitrophenyl-alaninol mit Salzsäure das Hydrochlorid vom Schmp. 179 bis 180° mit einem von Dornow zur Verfügung gestellten Hydrochlorid des D,L-p-Nitrophenyl-alaninols verglichen. An dieser Stelle ist die verschentliche Bezeichnung „D,L-O,N-Diacetyl-p-nitrophenyl-alaninol von Dornow“ durch die richtige Bezeichnung „D,L-p-Nitrophenyl-alaninol-hydrochlorid von Dornow“ zu ersetzen.

werden, der durch Hochvakuumdestillation bis auf 145° erhöht werden konnte. Ein so gereinigtes Präparat zeigt in Methanol eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{22} = -26 \pm 2^{\circ}$. Es ist bemerkenswert, daß zum Unterschied davon das racemische 3-p-Nitrophenyl-2-aminopropanol-1 vom Schmp. 120° praktisch nicht im Hochvakuum ohne weitgehende Zersetzung destilliert werden kann.

Ob die geringen Bandendifferenzen im UR-Spektrum, welche zwischen racemischem und „optisch aktivem“ Diacetat festgestellt wurden, vielleicht vom kristallisierten Zustand der Substanzen herrühren, sollen Aufnahmen, die in Kürze in Lösung gemacht werden, beweisen.

Nun zur Erklärung unserer Befunde: wir hatten bei unseren ersten Gärversuchen eine Hefe verwendet, welche den p-Nitro- α -acetamidozimtaldehyd II zum racemischen 3-p-Nitrophenyl-2-acetamido-propanol-1 reduzierte, dessen O-Acetat VII den Schmp. 161° besitzt; bei den darauffolgenden phytochemischen Reduktionen erhielten wir aus dem Aldehyd einen gesättigten Alkohol, dessen O-Acetat bei 185° schmolz und welches, wie unsere neuen Versuche zeigten, nach der Verseifung einen Aminoalkohol ergab, der optisch aktiv war. Bei diesen Versuchen hatte also die angewandte Hefe asymmetrisch reduziert, wobei zufälligerweise das aus Gründen der leichteren Abtrennbarkeit hergestellte N,O-Diacetat vom Schmp. 185° keine meßbare optische Aktivität zeigte. Nach einer persönlichen Rückfrage stehen diese Befunde auch in Übereinstimmung mit den Angaben der Fa. Mautner-Markhof, die uns jeweils in dankenswerter Weise die frischen Hefen für unsere Versuche zur Verfügung stellte; danach wurde zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen die ursprünglich verwendete Hefe, welche also keine asymmetrische Reduktion bewirkte und die Laborbezeichnung *saccharomyces cerevisiae* RSTC/Z besaß, ohne daß wir davon Kenntnis gehabt hätten, gegen eine Hefe mit der Bezeichnung *sacch. cerev. DÄN. MN.* ausgetauscht, welche in der Folge immer nur die optisch aktiven Verbindungen bei der Reduktion lieferte. Soweit in der Übergangszeit ein Gemisch der Bäckereihefen vom Stamm RSTC/Z und DÄN. MN. zur Reduktion verwendet wurden, entstanden natürlich Gemische des Racemats und der optisch aktiven Verbindung.

Die von uns bereits beschriebenen Verbindungen, die also der optisch aktiven Reihe angehören, wollen wir nun mit ihren richtigen Bezeichnungen und Schmelzpunkten nochmals kurz anführen.

L-3-p-Nitrophenyl-2-aminopropanol-1 V vom Schmp. 145° gibt mit Dichloressigsäuremethylester das L-3-p-Nitrophenyl-2-dichloracetamido-propanol-1 (L-Desoxy-chloromycetin) VIII vom Schmp. 148° und $[\alpha]_D^{19} = -10 \pm 2^{\circ}$. Die biologische Testung an *Shigella sonnei*, welche Herr Dr. Eibel am Serotherapeutischen Institut in Wien durchführte, ergab eine Hemmwirkung gegen diese Mikroben, und zwar eine 50%ige

Hemmung des Wachstums bei 40 μ /ml. Es ist dies im Vergleich zu manchen anderen Abwandlungsprodukten der Chloromycetinmolekel eine verhältnismäßig große Aktivität.

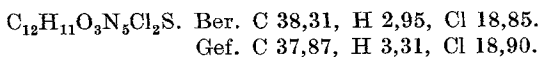
Die Acetylierung von L-Desoxy-chloromycetin mit Essigsäureanhydrid ergab L-3-p-Nitrophenyl-2-dichloracetamido-1-acetoxy-propan IX vom Schmp. 147°. Dieses Derivat eignet sich gut zur Charakterisierung der L-Verbindung des Desoxy-chloromycetins, da das D,L-3-p-Nitrophenyl-2-dichloracetamido-1-acetoxy-propan den Schmp. 135° besitzt. Unser Schmelzpunkt liegt wesentlich höher als der für diese Verbindung in der Literatur⁶ angegebene von 110°.

Die Reduktion von α -Dichloracetamido-p-nitrozimaldehyd III vom Schmp. 175° mit der Hefe RSTC/Z ergab D,L-Desoxy-chloromycetin VIII vom Schmp. 156° (O-Acetat IX Schmp. 135°). Wird die Reduktion mit dem Hefestamm DÄN. MN. vorgenommen, so erhält man L-Desoxy-chloromycetin VIII vom Schmp. 148° (O-Acetat Schmp. 147°).

Biologisch komplexe Systeme, wie sie in Form gärender Hefe zu unseren Reduktionsversuchen verwendet wurden, können zuweilen bei Einhaltung anscheinend völlig gleicher äußerer Bedingungen ein verschiedenes Reaktionsverhalten zeigen. Bei der sehr großen Anzahl durchgeführter phytochemischer Reduktionen konnte durch Verwendung der angeführten Hefestämme das Racemat bzw. die optisch aktive Verbindung isoliert werden; bei einem Versuch jedoch, bei welchem α -Acetamido-p-nitrozimaldehyd mit der Hefe DÄN. MN. reduziert wurde, konnte nach der Acetylierung des aus der Gärlösung erhaltenen Extrakts neben L-3-p-Nitrophenyl-2-acetamido-1-acetoxy-propan vom Schmp. 185° eine Verbindung vom Schmp. 107 bis 109° abgetrennt werden, welche auf Grund der Elementaranalyse und der Synthese das O-Acetat des p-Nitrophenylacetols ist. Bei einem anderen Versuch, bei welchem L-Dichloracetamido-p-nitrozimaldehyd mit der Hefe DÄN. MN. vergoren wurde, erhielten wir statt des erwarteten L-Desoxy-chloromycetins die optisch inaktive Verbindung.

Experimenteller Teil.

Thiosemicarbazon des α -Dichloracetamido-p-nitro-zimaldehyds (IV): 0,101 g α -Dichloracetamido-p-nitro-zimaldehyd vom Schmp. 175° wurden in Äthanol gelöst und mit einer äthanol. Lösung von 0,032 g Thiosemicarbazid versetzt. Nach dem Einengen fällt das Thiosemicarbazon in kleinen gelben Nadeln, die sich ab 220° verfärben, wobei bis 350° kein eigentliches Schmelzen beobachtet werden kann.



Reduktion von α -Acetamido-p-nitrozimaldehyd (II) mit der Hefe DÄN.

⁶ J. Amer. Chem. Soc. **73**, 3670 (1951).

MN.: Bei einem Reduktionsansatz des Aldehyds II, dessen experimentelle Einzelheiten in der I. Mitt. beschrieben sind, wurde einmal bei der Aufarbeitung des Extraktionsgutes nach seiner Acetylierung mit Acetanhydrid neben L-p-Nitrophenyl-alaninoldiacetat (VII) vom Schmp. 185° aus methanol. Lösung eine in farblosen Schuppen kristallisierende Verbindung vom Schmp. 107° abgetrennt. Die Elementaranalyse ergab Werte, welche in guter Übereinstimmung mit dem Diacetat des p-Nitrozimtaldehyds waren. Diese Verbindung scheint unseres Wissens in der Literatur nicht auf, so daß wir sie aus p-Nitrobenzaldehyd und Acetanhydrid in Gegenwart geringer Mengen konz. Schwefelsäure herstellten. Die Substanz kristallisiert aus Methanol in farblosen Tafeln vom Schmp. 114 bis 115°. Sie ergab im Gemisch mit der Verbindung vom Schmp. 107° eine deutliche Schmp.-Depression.

$C_{13}H_{13}O_6N$. Ber. C 55,91, H 4,69, N 5,02.

Gef. C 56,12, H 4,79.

O-Acetat des p-Nitrophenyl-acetols: Das nach Angaben von *M. Darmon*⁷ hergestellte Phenylacetol wurde in der üblichen Weise mit Acetanhydrid acetyliert und das entstandene Phenylacetol-O-acetat aus Methanol umgelöst; Hochvakuumdestillation ergibt eine Substanz vom Schmp. 62—63°.

$C_{11}H_{12}O_3$. Ber. C 68,73, H 6,29.

Gef. C 68,58, H 6,16.

60 mg des Phenylacetol-O-acetats wurden unter Kühlung mit festem Kohlensäure-Alkohol portionenweise in 0,5 ml rauchender HNO_3 ($d=1,52$) eingetragen. Die Substanz löste sich sofort auf, worauf der Kolbeninhalt 15 Min. bei Zimmertemp. belassen wurde. Man zersetzte hierauf unter abermaliger äußerer Kühlung mit CO_2 -Alkohol durch Eintragen von Eisstücken in das Nitriergemisch. Nach kurzer Zeit schieden sich Kristalle ab, welche abgesaugt wurden. Die Mutterlauge wurde mit $NaHCO_3$ neutralisiert, mit Essigester ausgeschüttelt, getrocknet, abgedampft und der Rückstand im Ölvak. destilliert. Das bei 110° Luftbadtemp. übergehende O-Acetat des p-Nitrophenylacetols wurde mit den zuerst abgesaugten Kristallen vereint und mehrmals aus Methanol umgelöst. Schmp. 107—109°. Im Gemisch mit der bei der Hefehydrierung der Substanz II anfallenden Verbindung vom Schmp. 107° trat keine Schmelzpunktsdepression auf.

$C_{11}H_{14}O_5N$. Ber. C 55,69, H 4,67, N 5,91.

Gef. C 56,02, H 5,06, N 6,10.

Verbindung Schmp. 107° aus Hefehydrierung: Gef. C 56,15, H 4,86, N 6,2.

D-Tartrat des L-p-Nitrophenyl-alaninols: L-3-p-Nitrophenyl-2-aminopropanol-1 (V) gibt mit D-Weinsäure ein ausgezeichnet kristallisierendes neutrales Salz, welches in Äthanol schwer löslich und zur Charakterisierung als auch zur Reinigung des Aminoalkohols V hervorragend geeignet ist. 0,1 g Aminoalkohol V wurden in 30 ml Äthanol gelöst und mit 0,071 g D-Weinsäure in 35 ml Äthanol versetzt. Umlösen des Tartrats aus Äthanol ergibt weiße prächtige Nadeln vom Schmp. 192 bis 193° (u. Zers.).

$C_{22}H_{30}O_{12}N_4$. Ber. C 48,70, H 5,57. Gef. C 48,57, H 5,63.

D,L-3-p-Nitrophenyl - 2 - dichloracetamido - 1 - acetoxy - propan IX: 0,037 g D,L-Desoxy-chloromycetin vom Schmp. 156° wurden in 1 ml Acetanhydrid gelöst, 15 Min. am siedenden Wasserbad erwärmt und über Nacht stehen

⁷ C. r. acad. sci., Paris 197, 1328 (1933).

gelassen. Nach dem Eindampfen im Vak. und Umlösen aus Methanol zeigte die Verbindung den Schmp. 133 bis 134°. Ausbeute quantitativ.

$C_{13}H_{14}O_5N_2Cl_2$. Ber. C 44,72, H 4,04, N 8,02.

Gef. C 44,70, H 4,06, N 8,15.

L-3-p-Nitrophenyl-2-dichloracetamido-1-acetoxy-propan IX: Wird L-Desoxy-chloromycetin vom Schmp. 148°, $[\alpha]_D^{19} = -10 \pm 2^\circ$, in gleicher Weise wie bei der D,L-Verbindung beschrieben acetyliert, so erhält man das O-Acetat vom Schmp. 147°. Die Acetylierungen dürfen nicht in Gegenwart von Pyridin durchgeführt werden.

$C_{18}H_{14}O_5N_2Cl_2$. Ber. C 44,72, H 4,04. Gef. C 45,09, H 4,36.

Biologische Testung des Thiosemicarbazons des α -Dichloracetamido-p-nitrozimtaldehyds IV: Die Urethan-Wasser-Lösung des Thiosemicarbazons wurde in den Konzentrationen 10, 100, 250 und 1000 γ einem Löwenstein-Eiernährboden zugesetzt. Dabei kam es bei den Konzentrationen 1000 und 500 γ zu einer Ausfällung der gelösten Substanz, während bei den niedrigeren Konzentrationen dies nicht der Fall war. Die Nährböden wurden mit dem Tuberkelbakterienstamm 167 beimpft. Die Ablesungen nach Bebrütung erfolgten am 16., 26., 33. und 45. Tag. Auch bei der letzten Ablesung wurde in sämtlichen mit dem Thiosemicarbazon versetzten Nährböden bis zur stärksten durchgeführten Verdünnung von 10 γ kein Wachstum von Tuberkelbazillen festgestellt, während bei den angelegten Kontrollen bei der Ablesung am 16. Tag bereits deutliches Wachstum von Tuberkelbazillen zu sehen war.

Die Mikroanalysen wurden von Herrn Dr. G. Kainz im Mikroanalytischen Laboratorium des II. Chemischen Institutes ausgeführt.