

RÉSUMÉ

Les auteurs ont préparé les composés d'addition des chlorures de benzoyle, de mésoityle et d'acétyle avec TiCl_4 et étudié leurs spectres d'absorption infrarouge, qui prouvent des différences de structure entre ces corps. L'étude rétigraphique du chlorotitanate de mésoitylium a confirmé l'existence à l'état solide d'une espèce chimique définie.

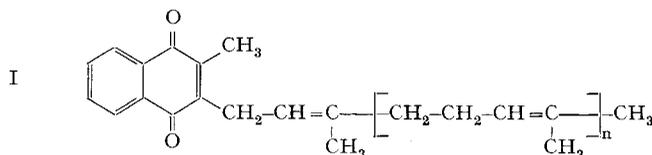
Laboratoire de chimie physique de l'Université de Genève

54. Die Struktur einer Vitamin-K₂-Verbindung aus Tuberkelbazillen und die Synthese höherer Isoprenologe der Vitamin-K₂-Reihe

von H. NOLL, R. RÜEGG, U. GLOOR, G. RYSER und O. ISLER

(7. XII. 59)

1949 isolierten SNOW *et al.*¹⁾ aus dem Unverseifbaren von Tuberkelbazillen ein öliges Chinon mit Vitamin-K-ähnlichem UV.-Absorptionsspektrum. Ferner zeigte SNOW²⁾ später, dass diese Verbindung eine ungesättigte Seitenkette in 3-Stellung des Naphtochinonringes besass und offenbar ein höheres Isoprenolog von DOISY's Vitamin K₂, Smp. 54°, aus faulemdem Fischmehl³⁾, darstellte. 1958 bestätigte NOLL⁴⁾ diese Vermutung, indem er die Verbindung in Form gelber Kristalle, Smp. 58–59°, rein darstellte und ihre K₂-Struktur durch IR.-spektroskopische Untersuchungen bewies. Etwa gleichzeitig gelang ISLER *et al.*⁵⁾ die Totalsynthese der Verbindungen der Vitamin-K₂-Reihe mit Seitenketten von 5–35 C-Atomen, sowie die Identifizierung



von DOISY's Verbindung (Smp. 54°) als Vitamin K₂₍₃₅₎ (I, n = 6) und eines niedrigen Isoprenologen aus den Mutterlaugen (Smp. 50°) als Vitamin K₂₍₃₀₎ (I, n = 5). Der direkte Vergleich der synthetischen Verbindungen der Vitamin-K₂-Reihe mit NOLL's

¹⁾ J. FRANCIS, J. MADINAVEITIA, H. M. MAC TURC & G. A. SNOW, *Nature* 163, 365 (1949).

²⁾ G. A. SNOW, Résumé des communications, 2e Congrès International de Biochimie, Paris, 95 (1952).

³⁾ R. W. MCKEE, S. B. BINKLEY, S. A. THAYER, D. W. MACCORQUODALE & E. A. DOISY, *J. biol. Chemistry* 131, 327 (1939).

⁴⁾ H. NOLL, *J. biol. Chemistry* 232, 919 (1958).

⁵⁾ O. ISLER, R. RÜEGG, L. H. CHOPARD-DIT-JEAN, A. WINTERSTEIN & O. WISS, *Helv.* 41, 786 (1958).

Kristallinat, Smp. 58–59°, bestätigte die früheren Befunde, dass es sich bei dem Produkt aus Tuberkelbazillen um eine Verbindung mit noch längerer Seitenkette handeln musste, nämlich um Vitamin $K_{2(45)}$ (I, $n = 8$) oder Vitamin $K_{2(50)}$ (I, $n = 9$).

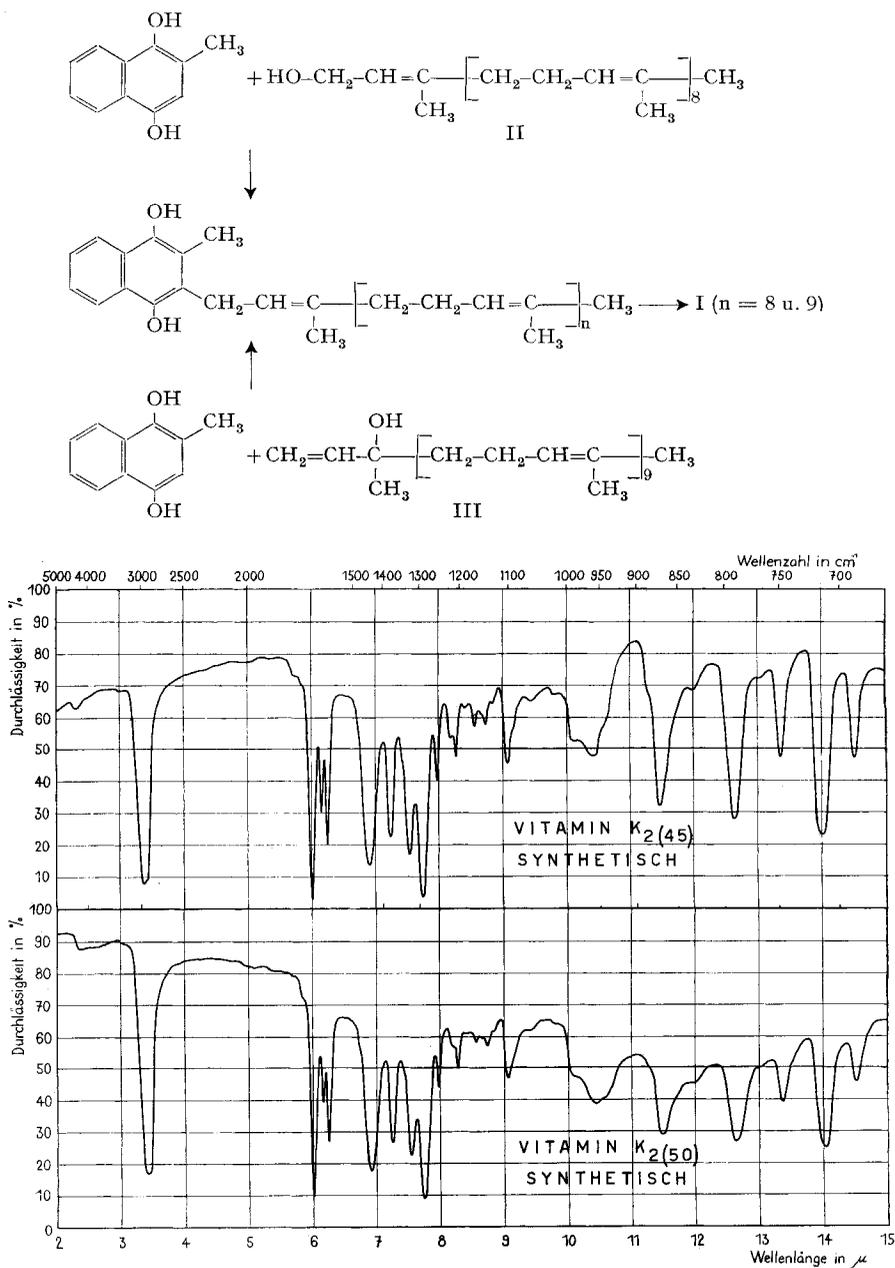


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektren von synthetischem Vitamin $K_{2(45)}$ und $K_{2(50)}$ krist.

Nachdem uns der C_{45} -Alkohol Solanesol II aus Tabak und die um einen Isoprenrest verlängerte Verbindung III mit 50 C-Atomen zur Verfügung standen⁶⁾, haben wir durch Kondensation dieser Alkohole mit 2-Methyl-1,4-naphthoquinon und Oxydation der Kondensationsprodukte mit Silberoxyd die Vitamine $K_{2(45)}$ (I, $n = 8$) und $K_{2(50)}$ (I, $n = 9$) hergestellt⁷⁾.

Papierchromatographischer Vergleich natürlicher und synthetischer Vitamin K_2 -Homologer

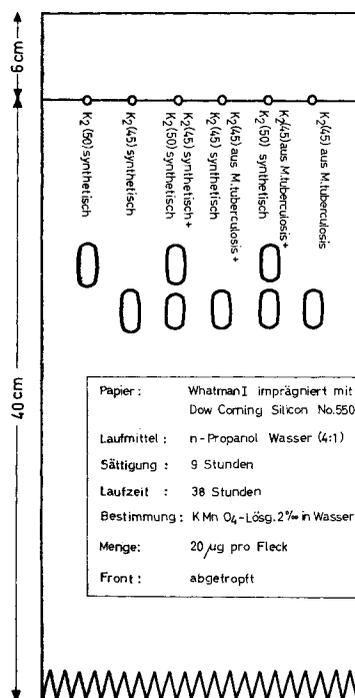


Fig. 2. Papierchromatogramm

Das Vitamin- K_2 -Präparat aus *M. tuberculosis*, Smp. 58–59°, erwies sich durch die Mischprobe und den Vergleich der IR.- und UV.-Absorptionsspektren, der Rf-Werte sowie der RÖNTGEN-Pulverdiagramme als identisch mit Vitamin $K_{2(45)}$ aus Solanesol (2-Methyl-3-solanesyl-1,4-naphthoquinon). Der Misch-Smp. mit Vitamin $K_{2(50)}$, Smp. 62°, dagegen war erniedrigt und der Vergleich der RÖNTGEN-Pulverdiagramme ergab deutliche Unterschiede.

⁶⁾ R. RÜEGG, U. GLOOR, R. N. GOEL, G. RYSER, O. WISS & O. ISLER, *Helv.* 42, 2616 (1959); M. KOFLER, A. LANGEMANN, R. RÜEGG, U. GLOOR, U. SCHWIETER, J. WÜRSCH, O. WISS & O. ISLER, *Helv.* 42, 2252 (1959).

⁷⁾ Inzwischen wurde die Synthese von Vitamin $K_{2(45)}$ aus Solanesol von C. H. SHUNK, R. E. ERICKSON, E. L. WONG & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 5000 (1959), kurz mitgeteilt.

BRODIE *et al.*⁸⁾ beschrieben unlängst in einer vorläufigen Mitteilung die Isolierung eines öligen, biologisch aktiven Naphtochinons aus *Mycobacterium phlei*. Nicht näher beschriebene IR.-Spektren liessen diese Autoren auf eine Vitamin-K₁-Struktur des *M.-phlei*-Chinons schliessen. Eine von Dr. BRODIE erhaltene Probe dieses Präparates zeigte jedoch ein für eine Verbindung der Vitamin-K₂-Reihe charakteristisches IR.-Spektrum⁹⁾ und verhielt sich ausserdem im papierchromatographischen Vergleich analog zu Vitamin K₂₍₄₅₎. Daraus folgt, dass die Verbindung aus

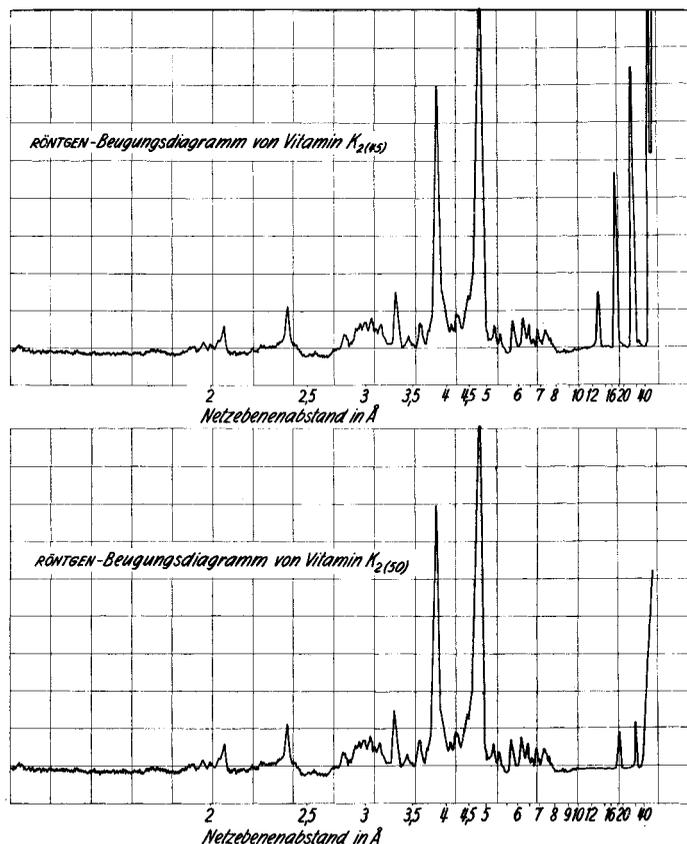


Fig. 3. RÖNTGEN-Pulverdiagramme von synthetischem Vitamin K₂₍₄₅₎ und K₂₍₅₀₎, aufgenommen mit einem Zählrohrgoniometer (PHILIPS, Typ PW 1050) und Cu K_α-Strahlung

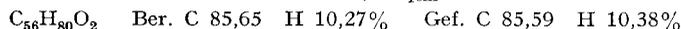
M. phlei nicht eine K₁-, sondern eine K₂-Struktur besitzt und mit dem Vitamin K₂₍₄₅₎ aus *M. tuberculosis* identisch sein dürfte.

Die Arbeiten in Pittsburgh (H. NOLL) wurden unterstützt durch Grant Nr. E-1500 von der Division of Research Grants of the National Institutes of Health und Senior Research Fellowship Nr. SF-274 vom US. Public Health Service.

⁸⁾ A. F. BRODIE, B. R. DAVIS & L. F. FIESER, J. Amer. chem. Soc. 80, 6454 (1958).

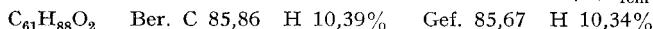
⁹⁾ Eingehende Studien mit synthetischen Homologen der Vitamine K₁ und K₂ haben gezeigt, dass sich die IR.-Spektren der beiden homologen Reihen qualitativ und quantitativ unterscheiden. H. NOLL wird darüber an anderer Stelle ausführlich berichten. Es sei hier nur erwähnt, dass beispielsweise die Spektren der K₂-Homologen bei 1100 und 840 cm⁻¹ je eine Bande aufweisen, die in den Spektren der K₁-Reihe fehlen.

Experimentelles¹⁰⁾. – *Vitamin K₂₍₄₅₎* (*I*, *n* = 8). Zu 7 g 2-Methylnaphtohydrochinon, 50 ml Dioxan, 0,5 g Zinkchlorid und 1 ml Bortrifluoridätherat werden unter Rühren bei 55–60° 7,5 g Solanesol in 30 ml Dioxan in 20 Min. getropft. Hierauf rührt man noch 1 Std. bei 55–60° weiter, giesst sodann auf Eiswasser und extrahiert mit Äther. Die Ätherlösung wird mit 5-proz. Natronlauge, die 1% Natriumdithionit enthält, und hierauf mit Wasser ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand in 200 ml Äther mit 10 g Silberoxyd 30 Min. geschüttelt. Man filtriert und dampft das Lösungsmittel ab. Der Rückstand wird in Petroläther (Siedebereich 60–90°) gelöst und über eine Säule aus 1 kg Aluminiumoxyd (Aktivität V) chromatographiert. Das Vitamin K₂₍₄₅₎ läuft mit Petroläther als gelbe Zone durch die Säule und wird getrennt aufgefangen. Nach Eindampfen erhält man ca. 3 g eines gelben Öles, das aus Methanol-Aceton kristallisiert wird, Smp. 53°. Aus den späteren Chromatogrammfraktionen können 4 g Solanesol zurückgewonnen werden. Um ganz reines Produkt zu erhalten, werden 200 mg Vitamin K₂₍₄₅₎ vom Smp. 53° in 3 ml Aceton gelöst, dann wird eine Spatelspitze Polyäthylpulver (Hostalen W) und anschliessend unter Rühren tropfenweise soviel Wasser zugegeben, dass das Aceton-Wassergemisch 80% Aceton und 20% Wasser enthält. Dieses Gemisch wird oben auf eine Säule aus 20 g Hostalen W aufgetragen und mit folgenden Lösungsmitteln entwickelt: 100 ml Aceton/Wasser 80:20; 100 ml Aceton/Wasser 85:15 und 400 ml Aceton/Wasser 90:10. Es werden Fraktionen à je 6 ml aufgefangen. Fraktionen 1–31 wurden nicht weiter untersucht. Fraktionen 32–45 enthielten wenig Kristalle von unscharfem Smp. Fraktionen 46–62 enthielten die Hauptmenge des Produktes (120 mg), das in gelben feinen Kristallen, Smp. 56–57°, ausfiel; UV.-Max. 248 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 246$).



Dihydro-di-O-acetyl-Derivat von I, *n* = 8: Farblose Kristalle aus Alkohol, Smp. 62–63°, unter vorherigem Sintern bei 44°, UV.-Max. 230 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 990$) [in Alkohol].

Vitamin K₂₍₅₀₎ (*I*, *n* = 9). Auf die gleiche Weise, wie beim Vitamin K₂₍₄₅₎ beschrieben, werden 7 g C₅₀-Carbinol III mit 7 g 2-Methyl-1,4-naphtohydrochinon, 0,5 g Zinkchlorid und 1 ml Bortrifluoridätherat in Dioxan bei 55–60° kondensiert und aufgearbeitet; Smp. 56°. Das erhaltene rohe Kristallisat wird, wie das K₂₍₄₅₎, an Hostalpulver chromatographiert, wobei man das reine Vitamin K₂₍₅₀₎ als gelbe Kristalle vom Smp. 62° erhält. UV.-Max. 248 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 224$).



Dihydro-di-O-acetyl-Derivat von I, *n* = 9: Farblose Kristalle aus Alkohol, Smp. 65° unter vorherigem Sintern bei 45°, UV.-Max. 230 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 897$) [in Alkohol].

Vitamin K₂₍₄₅₎ aus Mycobacterium tuberculosis. Kristallines Vitamin K₂₍₄₅₎ wurde aus zwei Stämmen von *M. tuberculosis* (BRÉVANNES, H₃₇Rv) isoliert. Züchtung der Kulturen und Isolierung erfolgten im wesentlichen wie früher beschrieben⁴⁾¹¹⁾. Die Oberflächenkulturen werden auf der Nutsche abgesaugt, mit destilliertem Wasser gewaschen und anschliessend durch mehrtägliches Suspendieren in Methanol-Äther (2:1) und anschliessend Aceton extrahiert. Die nachfolgend mit Chloroform extrahierten Lipide enthalten keine Vitamin-K₂-Verbindungen mehr.

Die Methanol-Äther- und Aceton-Extrakte werden nach Eindampfen im Vakuum in einer Wasser/Äther-Mischung aufgenommen. Anschliessend wird ein Teil der Phosphoglycolipide aus der getrockneten und konzentrierten Ätherphase mit 3–4 Teilen Aceton gefällt. Der klare gelbe Überstand wird zu einem Öl konzentriert, in Petroläther oder Isooctan gelöst und an SiO₂ oder Decalso chromatographiert. Die Vitamin-K₂-Verbindung wird gleich am Anfang mit dem gleichen Lösungsmittel als gelbes Band eluiert. Die IR.-spektroskopische Kontrolle der Eluate zeigte, dass diese Fraktionen noch mit beträchtlichen Mengen von Triglyceriden verunreinigt sind. Erneute Chromatographie liefert in ca. 30-proz. Ausbeute Fraktionen, die zu 70–90% angereichert sind. Wegen des unscharfen Trenneffektes mit den geprüften Adsorbentien sind zur weiteren Steigerung der Ausbeuten und des Reinheitsgrades mehrere Chromatographien not-

¹⁰⁾ Alle Smp. sind unkorrigiert. Die UV.-Absorptionsspektren wurden mit einem registrierenden BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK 1, aufgenommen; Lösungsmittel, wenn nichts anderes vermerkt, Petroläther (Siedebereich 80–105°); es wird in der Regel nur das Hauptmaximum angegeben. Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Zweistrahlspektrophotometer, Modell 21, aufgenommen.

¹¹⁾ H. NOLL & E. JACKIM, J. biol. Chemistry 232, 903 (1958).

wendig. Konzentrate, die über 70% Vitamin $K_{2(45)}$ enthalten, kristallisieren oft schon nach wenigen Std. Die weitere Reinigung erfolgt durch Umkristallisieren. Das Rohkristallinat wird in Isooctan gelöst und über Nacht bei -10° aufbewahrt. Dadurch werden weitere Verunreinigungen als farblos Niederschlag entfernt; die eingedampfte Lösung liefert aus Aceton-Methanol Kristalle, Smp. 54° , die durch Umkristallisieren aus Aceton schliesslich das reine Produkt, Smp. $58-59^\circ$, ergaben. Die Reinigung durch Umkristallisieren ist zeitraubend und verlustreich; aus dem Rohkristallinat wurden beispielsweise nur 10% an reinstem Produkt in einem Arbeitsgang erhalten. Papierchromatographische Kontrolle von Fraktionen verschiedenen Reinheitsgrades zeigte immer nur *eine* Vitamin $K_{2(45)}$ entsprechende Komponente, so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass die niederen Kristallisationsausbeuten auf die Anwesenheit eines Gemisches mehrerer isoprenologer Vitamin- K_2 -Verbindungen zurückzuführen sind (evtl. Stereoisomere?).

Trotz den Schwierigkeiten, reines Vitamin $K_{2(45)}$ in guten Ausbeuten zu isolieren, muss darauf hingewiesen werden, dass der Gehalt an Vitamin- K_2 -Verbindung von Tuberkelbazillen, die auf synthetischen Glycerin-Nährmedien gezüchtet wurden, beträchtlich ist; er beträgt nach spektroskopischen Messungen ca. 0,5% des Bakterientrockengewichtes.

Die Analysen wurden in der mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. A. DIRSCHERL) der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel, ausgeführt. Die IR.-Absorptionsspektren wurden in der physikalisch-chemischen Abteilung (Leitung Dr. M. KOFLER) von Dr. L. H. CHOPARD-DITJEAN und die RÖNTGEN-Pulverdiagramme von Dr. C. VON PLANTA aufgenommen.

SUMMARY

Vitamin $K_{2(x)}$ m. p. $58-59^\circ$, isolated by NOLL from *M. tuberculosis*, proved to be 2-methyl-3-solanesyl-1,4-naphthoquinone having a side-chain of 45 C-atoms. This vitamin $K_{2(45)}$ was synthesized from menadiol and solanesol. The next higher isoprenologue, vitamin $K_{2(50)}$ m. p. 62° , was obtained by lengthening solanesol by an isoprene unit followed by condensation with menadiol and oxidation.

University of Pittsburgh
Department of Microbiology, School of Medicine
Pittsburgh 13/Penns.

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