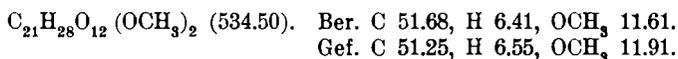


Leicht löslich in Aceton, Chloroform, Benzol, Methanol, etwas schwerer in Äthanol. In Äther und Wasser nur sehr wenig löslich. Fehlingsche Lösung wird nicht reduziert.

[4 - Oxy-3.α-dimethoxy-propio-phenon] - [β-cellobiosid]-  
(4): Das acetylierte Cellobiosid wird mit 3 Tln. kristallisiertem Baryhydrat wie oben verseift und aufgearbeitet. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus 95-proz. Alkohol 2.3 g aus 5 g Acetat (71% d. Theorie). Schmp. 197—201°.



$[\alpha]_D^{20}$ : — 64.41° (Methanol,  $c = 0.437$ ), — 68.98° (Wasser,  $c = 0.616$ ).

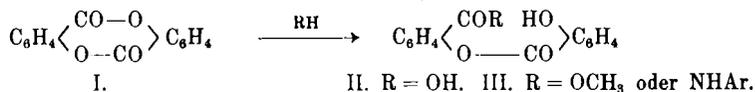
Leicht löslich in Wasser, ziemlich leicht in Methanol, schwerer in Äthanol, schwer in Aceton, Chloroform, Äther, Benzol. Fehlingsche Lösung wird nicht reduziert.

### 116. Ludwig Anschütz und Robert Neher: Zum Isomerieproblem der Disalicylide, III. Mittel.: Genetische Verknüpfung von β-Disalicylid und Diposal unter gemäßigten Versuchsbedingungen\*).

[Aus d. Organ.-chem. Institut der Deutschen Techn. Hochschule Brünn.]

(Eingegangen am 30. März 1944.)

Die in unseren ersten beiden Mitteilungen<sup>1)</sup> veröffentlichten Versuchsergebnisse hatten für das β-Disalicylid die gleiche lactidartige Struktur wahrscheinlich gemacht, die für das α-Disalicylid schon seit langem bewiesen ist. Gegen die Strukturidentität der beiden Disalicylide spricht aber u. a. die Tatsache, daß es bisher nie gelungen ist, das β-Disalicylid mit *O*-Salicyl-salicylsäure (Diposal) unter gemäßigten Versuchsbedingungen genetisch zu verknüpfen, während dies beim α-Disalicylid ohne weiteres möglich ist und den besten Beweis für die Konstitution dieser Verbindung abgibt. α-Disalicylid (I) läßt sich nämlich glatt durch Hydrolyse, Alkoholyse oder Aminolyse zu Diposal (II) oder dessen Derivaten (III) halbseitig aufspalten<sup>2)</sup>:



Auch gelingt es, Diposalchlorid durch Abspaltung von HCl mit Hilfe von Diäthylanilin in α-Disalicylid überzuführen<sup>3)</sup>. Ganz anders liegen die Verhältnisse beim β-Disalicylid: Aufspaltende Mittel, gegen die es sehr widerstandsfähig ist, verwandeln es in Salicylsäure oder deren Derivate.

\*) Hrn. Prof. Dr. Hans Meerwein, Marburg/Lahn, zum 65. Geburtstag zugeeignet.

<sup>1)</sup> Journ. prakt. Chem. [2] 159, 264, 343 [1941].

<sup>2)</sup> R. Anschütz, B. 52, 1878 [1919]; G. Schroeter, B. 52, 2228 [1919]. In letzterer Arbeit wird das α-Disalicylid als Salosalicylid bezeichnet.

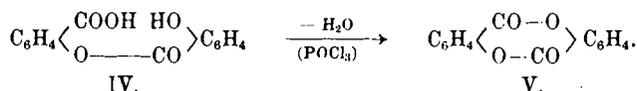
<sup>3)</sup> G. Schroeter, B. 52, 2227 [1919].

Immerhin ist aber das  $\beta$ -Disalicylid mit dem Diplosal dadurch genetisch verknüpft, daß es aus ihm bei der zersetzenden Destillation im Vak. hervorgeht<sup>4)</sup>, jedoch bei Temperaturen (240—300°), bei denen Umlagerungen durchaus möglich sind, wie man schon daraus ersieht, daß auch das Disalicylsäureanhydrid bei der Destillation im Vak.  $\beta$ -Disalicylid liefert<sup>5)</sup>.

Wir setzten es uns zum Ziel<sup>6)</sup>,  $\beta$ -Disalicylid und Diplosal unter gemäßigten Versuchsbedingungen genetisch miteinander zu verknüpfen. In der Tat ist es uns schließlich gelungen, das  $\beta$ -Disalicylid aus Diplosal bei einer Temperatur zu synthetisieren, die 150° nicht übersteigt. Hiernach konnte an der lactidartigen Struktur des  $\beta$ -Disalicylids kaum mehr gezweifelt werden. Immerhin schien es erwünscht, das Ergebnis der Synthese des  $\beta$ -Disalicylids durch dessen hydrolytische Rückverwandlung in das Diplosal zu bestätigen. Diesem Vorhaben stellte sich die Schwierigkeit in den Weg, daß Aufspaltungsversuche am  $\beta$ -Disalicylid, wie erwähnt, stets zu Salicylsäure oder deren Derivaten geführt hatten. Bei einer Untersuchung dieser Verhältnisse stellten wir fest, daß  $\beta$ -Disalicylid von aufspaltenden Mitteln erst unter Versuchsbedingungen angegriffen wird, denen Diplosal nicht standzuhalten vermag. Für die Umwandlung von  $\beta$ -Disalicylid in Diplosal schien uns hiernach nur noch der enzymatische Weg in Frage zu kommen, der uns wirklich zum Erfolg geführt hat; allerdings verläuft der Vorgang aus noch zu erörternden Gründen wenig glatt und ist nicht sicher reproduzierbar.

### 1) Synthese von $\beta$ -Disalicylid aus Diplosal.

Unsere ursprüngliche Annahme, daß sich bei der erwähnten Synthese von  $\alpha$ -Disalicylid aus Diplosalchlorid und Diäthylanilin das  $\beta$ -Disalicylid als Nebenprodukt bilde, hat sich als irrig erwiesen, obschon wir die HCl-Abspaltung aus Diplosalchlorid unter den verschiedensten Bedingungen vornahmen. Schließlich führte uns das Verfahren von R. Spallino und G. Provenzal<sup>7)</sup> zur Darstellung der Dithymotide aus Thymotinsäure mit Hilfe von Phosphorylchlorid in siedendem Xylol zum Ziel. Unter diesen Bedingungen erhält man aus Diplosal (IV) neben Tetrasalicylid und Polysalicylid das  $\beta$ -Disalicylid (V) in 17-proz. Ausbeute:



### 2) Chemische Spaltung des $\beta$ -Disalicylids.

Aus der lactidartigen Formulierung des  $\beta$ -Disalicylids ließ sich folgern, daß diese Verbindung *quantitativ* in Salicylsäure (mit Diplosal als Zwischenprodukt) überführbar sein müsse. In der Tat haben wir aus  $\beta$ -Disalicylid durch alkalische Verseifung bei genügend energischen Versuchsbedingungen die berechnete Menge Salicylsäure erhalten. Im übrigen stellten wir fest, daß  $\beta$ -Disalicylid in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur auch von anderen aufspaltenden Mitteln nur schwierig an-

4) R. Anschütz, B. 52, 1881 [1919].

5) L. Anschütz u. R. Neher, Journ. prakt. Chem. [2] 159, 267 [1941].

6) Vergl. Dissertat. R. Neher, Brünn 1943.

7) Gazz. chim. Ital. 39 II, 330 [1909] (C. 1910 I, 273).

gegriffen wird, wobei sich Salicylsäure oder deren Derivate bilden. Diplosal oder dessen Abkömmlinge wurden niemals gefaßt, was vermuten ließ, diese als Zwischenprodukte angenommenen Verbindungen könnten möglicherweise gleich nach ihrer Entstehung von den angewandten Reagenzien weiter gespalten werden. Eine vergleichende Hydrolyse von  $\beta$ -Disalicylid und Diplosal mit 13-proz. methanolisch-wäßriger Salzsäure hat diese Annahme vollkommen bestätigt.  $\beta$ -Disalicylid lieferte hierbei erst nach 40 Tagen, dagegen Diplosal schon nach 6 Tagen durch Ferrichlorid nachweisbare Mengen von Salicylsäure. Aus diesen Befunden geht hervor, warum  $\beta$ -Disalicylid bei früheren Spaltungsversuchen niemals Diplosal oder dessen Derivate geliefert hat.

### 3) Enzymatische Hydrolyse der Disalicylide.

(Bearbeitet von R. Neher

unter Leitung von Prof. A. Schöffner<sup>8)</sup>, Brünn.)

Nach E. Bamann, E. Schweizer und M. Schmeller<sup>9)</sup> wirkt Leberesterase auf Glykolid mäßig, auf Lactid gut, auf Diplosal dagegen überhaupt nicht ein. Hiernach war zu hoffen, die lactidartig gebauten Disalicylide durch Leberesterase zu Diplosal ohne weitere enzymatische Hydrolyse zu Salicylsäure spalten zu können. Diese Annahme hat sich zwar als grundsätzlich richtig erwiesen, doch war es bei den für die Versuche notwendigen Bedingungen und der von ihnen beanspruchten Zeitdauer unvermeidlich, daß durch Wirkung der Esterase entstandenes Diplosal auf nichtenzymatischem Wege hydrolytisch zu Salicylsäure gespalten wurde. Dieser Umstand hat das Gelingen der enzymatischen Versuche ernstlich in Frage gestellt.

Zur enzymatischen Hydrolyse verwendeten wir Esterase aus Schweineleber, die dieser in Form eines ammoniakalischen Extrakts entzogen und sodann gereinigt und konzentriert worden war. Zur Feststellung des Spaltungsverlaufs diente das Verfahren von E. Knaffl-Lenz<sup>10)</sup>, bei dem die Verseifung eines Esters durch die verbrauchte Laugenmenge gemessen wird, die zur Aufrechterhaltung eines bestimmten, durch einen Indicator gekennzeichneten  $p_H$  notwendig ist. Die Schwerlöslichkeit der Substrate zwang zum Arbeiten in Suspension. Weitere methodische Einzelheiten im Versuchsteil.

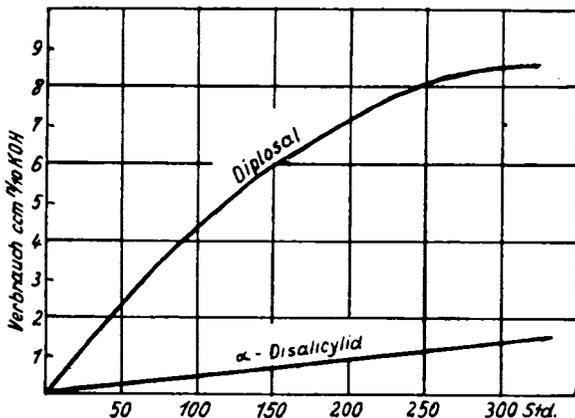
Zunächst führten wir eine vergleichende Hydrolyse der beiden Disalicylide und des Diplosals bei Abwesenheit von Esterase, aber unter sonst gleichen Bedingungen wie bei den enzymatischen Versuchen durch. Dabei ergab sich die Beständigkeit des  $\beta$ -Disalicylids, während  $\alpha$ -Disalicylid beträchtlich und Diplosal stark hydrolysiert wurde. Anschließend vorgenommene enzymatische Spaltungsversuche zeigten, daß beide Disalicylide auf Leberesterase ansprechen. Da bei diesen Versuchen stets Bodenkörper zugegen war, also mit unbekanntem Konzentrationen gearbeitet wurde, können sie nicht zu einer genauen Bestimmung der Hydrolysen-

<sup>8)</sup> Hrn. Prof. Schöffner sei auch an dieser Stelle für seine Hilfsbereitschaft herzlich gedankt.

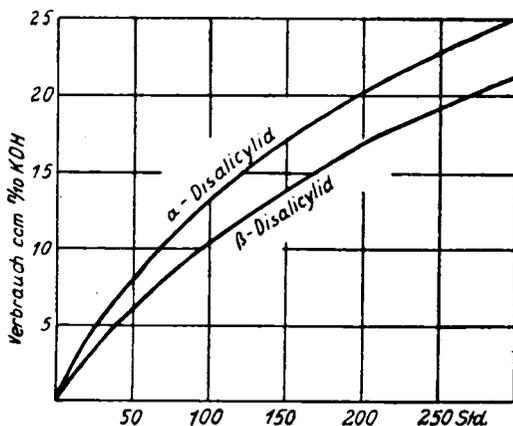
<sup>9)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 222, 121 [1933].

<sup>10)</sup> Medd. Kgl. Vetenskapsakad. Nobelinst. 6, Nr. 2, 1 [1922] (C. 1923 III, 261); Arch. exper. Pathol. Pharmakol. 97, 242 (C. 1923 III, 399).

geschwindigkeiten dienen. Immerhin bieten sie wohl einen brauchbaren Anhalt für die Beurteilung der vorliegenden Verhältnisse. Wir lassen daher die Ergebnisse zweier Hydrolysenversuche in graphischer Darstellung folgen. Abbild. 1 zeigt den Laugenverbrauch bei der hydrolytischen Spaltung von  $\alpha$ -Disalicylid und von Diplosal bei Abwesenheit von Esterase, Abbild. 2 das Ergebnis der enzymatischen Hydrolyse der beiden Disalicylide. Die Kurven der beiden Disalicylide bei der enzymatisch bewirkten Spaltung unterscheiden sich nicht so sehr voneinander, wie man hätte erwarten können. Wichtiger als dieser aus dem angegebenen Grunde nicht weiter auszuwertende quantitative Befund ist die qualitative Feststellung der Umwandlung von  $\beta$ -Disalicylid über das (in einigen Fällen isolierte) Diplosal in Salicylsäure durch Leberesterase unter Versuchsbedingungen, die bei Abwesenheit des Enzyms keinerlei Veränderung hervorzurufen vermögen. Denn hieraus ergibt sich mit zwingender Notwendigkeit der Schluß, daß die aromatischen Kerne des  $\beta$ -Disalicylids durch zwei Carbonsäureester-Bindungen miteinander verknüpft sein müssen, da die Annahme der Öffnung anderer Bindungen durch eine Esterase allen bisherigen Erfahrungen über die Spezifität von Enzymen widersprechen würde.



Abbild. 1. Hydrolyse von  $\alpha$ -Disalicylid und Diplosal.



Abbild. 2. Enzymat. Hydrolyse der Disalicylide.

#### 4) Versuche zur Ermittlung der Konfiguration der Disalicylide.

Legt man der Disalicylid-Isomerie die stereochemische Deutung zugrunde, dann bleibt noch die Entscheidung zu treffen, welches der beiden Disalicylide die *cis*-Form und welches die *trans*-Form darstellt. Diese

Frage hat bereits die Beilstein-Redaktion<sup>11)</sup> gestreift, und zwar mit dem Hinweis, daß die *cis*-Form — im Gegensatz zur *trans*-Form — nicht mit ihrem Spiegelbilde deckbar ist und mithin in zwei optisch aktiven Modifikationen gewinnbar sein sollte, vorausgesetzt, daß diese nicht spontan oder doch sehr leicht ineinander übergehen, was auf Grund einer Modellbetrachtung nicht ausgeschlossen erscheint. Im Hinblick auf diese Erwägungen haben wir mit der Möglichkeit gerechnet, bei der enzymatischen Hydrolyse eines der beiden Disalicylide zu einer optischen Aktivierung des behandelten Materials zu gelangen dank Bevorzugung einer der beiden spiegelbildlichen *cis*-Modifikationen vor der anderen seitens der Leberesterase. Eine solche Aktivierung ist jedoch nicht eingetreten. Wir haben sodann versucht, substituierte Disalicylide mit reaktiven Gruppen zu gewinnen, um an diesen Spaltversuche durch Bildung diastereomerer Verbindungen anstellen zu können. Diesem Vorhaben stand vor allem die für Substitutionsreaktionen zu große Empfindlichkeit der Disalicylide entgegen. Auch die hierauf versuchte Umwandlung geeigneter substituiertes Salicylsäuren in die zugehörigen Disalicylide oder von Disalicyliden mit nichtreaktiven Gruppen in solche mit reaktiven Gruppen hat uns wegen der damit verbundenen Versuchs-Schwierigkeiten nicht zu einer für unsere Zwecke geeigneten Verbindung geführt. Als ungangbar erwiesen hat sich schließlich auch der neuerdings gelegentlich mit Erfolg eingeschlagene Weg der Spaltung von Racematen durch chromatographische Adsorption an optisch aktivem Material<sup>12)</sup>; zum wenigsten zeigte Lactose, die für diesen Zweck besonders geeignet ist, kein Adsorptionsvermögen gegenüber den Disalicyliden. Einzelheiten über die vorstehend beschriebenen Versuche sind der Dissertation<sup>6)</sup> des einen von uns zu entnehmen.

Für die Zuordnung der *cis*- und *trans*-Form zu den beiden Disalicyliden fehlt also einstweilen eine sichere Grundlage. Wir halten es für wahrscheinlich, daß dem reaktionsfähigen  $\alpha$ -Isomeren die durch große Beweglichkeit ausgezeichnete<sup>13)</sup> *cis*-Form und dem reaktionsträgen  $\beta$ -Isomeren die völlig starre *trans*-Form zukommt.

#### Zusammenfassung.

Auf Grund der von uns erreichten genetischen Verknüpfung des  $\beta$ -Disalicylids mit dem Diplosal durch Synthese bei gemäßigten Versuchsbedingungen und durch enzymatischen Abbau sehen wir keine andere Erklärungsmöglichkeit mehr für die Disalicylid-Isomerie als die Annahme, daß hier eine neuartige Stereoisomerie vorliegt.

#### Beschreibung der Versuche.

1) Synthese von  $\beta$ -Disalicylid aus Diplosal und Phosphoroxychlorid in siedendem Xylol.

10 g Diplosal wurden in der Wärme in 100 ccm trockenem Xylol gelöst und mit 6 g frisch dest. Phosphoroxychlorid unter Rückfluß und

<sup>11)</sup> Beilsteins Handb. d. organ. Chemie, 4. Aufl., Bd. 19, S. 171/72, 500 [1934].

<sup>12)</sup> G. Karagunis u. G. Coumoulos, Praktika Akad. Athenon 13, 414 [1938] (C. 1939 I, 4740); G. M. Henderson u. H. G. Rule, Nature [London] 147, 917 [1938] (C. 1939 I, 4911); Journ. chem. Soc. London 1939, 1568 (C. 1940 I, 846).

<sup>13)</sup> Das Modell läßt sich spannungsfrei in sehr verschiedene Lagen bringen.

Feuchtigkeitsausschluß so lange zum Sieden erhitzt, bis sich kein HCl mehr entwickelte (etwa 5 Stdn.). Während des Erhitzens schied sich aus der anfangs klaren Lösung allmählich Polysalicylid als weiße Krystallmasse ab. Nach dem Erkalten wurde vom Krystallbrei abgesaugt und die Xylol-Lösung so lange mit anteilweise zugesetzten Mengen von Natronlauge durchgeschüttelt, bis sich ein kleiner unverbrauchter Rest hiervon durch schwach alkal. Reaktion nachweisen ließ, worauf mehrmals mit Wasser gewaschen wurde. Bei diesen Operationen fiel aus der Xylol-Lösung Polysalicylid aus, welches die Trennung von der wäbr. Flüssigkeit erschwerte. Um etwa mitgerissenes  $\beta$ -Disalicylid nicht zu verlieren, gab man etwas Chloroform hinzu, worauf vom Polysalicylid abfiltriert wurde. Anschließend engte man die Xylol-Chloroform-Lösung stark ein, was zur Abscheidung von Tetrasalicylid-Chloroform<sup>14)</sup>,  $C_{28}H_{16}O_8$ ,  $2 CHCl_3$ , führte, das abfiltriert wurde. Aus der Mutterlauge entfernte man das restliche Xylol möglichst vollständig durch Vak.-Destillation. Die hierbei erhaltene Krystallmasse nahm man in Chloroform auf, kochte unter Zusatz von Aktivkohle und krystallisierte nach dem Verjagen der Hauptmenge des Chloroforms fraktioniert, wobei sich zuerst  $\beta$ -Disalicylid und dann der Rest von Tetrasalicylid als Molekülverbindung mit Chloroform abschied. Bei dem Versuch wurden erhalten:

1.6 g $\beta$ -Disalicylid, entspr. . . . . .	17.2% d. Theorie
2.1 g Tetrasalicylid-Chloroform, entspr. . . . .	15.1% „ „
5.0 g Polysalicylid, entspr. . . . . .	53.8% „ „
Gesamt-Ausb.: . . . . .	86.1% „ „

$\alpha$ -Disalicylid konnte unter den Reaktionsprodukten nicht nachgewiesen werden.

Um die Ausbeute an  $\beta$ -Disalicylid zu verbessern, wurde die Reaktion unter mehrfacher Abänderung der Versuchsbedingungen wiederholt, jedoch ohne den gewünschten Erfolg. Ein Ersatz des Xylols durch Chloroform führte bei sonst gleicher Arbeitsweise zu einem Ausbleiben der  $\beta$ -Disalicylid-Bildung.  $\alpha$ -Disalicylid entstand in keinem Fall.

## 2) Chemische Spaltung der Disalicylide und des Diplosals.

a) Quantitative Umwandlung von  $\beta$ -Disalicylid in Salicylsäure durch energische Einwirkung starker Natronlauge: 1 g  $\beta$ -Disalicylid wurde in der Hitze bis zur vollkommenen Lösung mit 50 ccm 45-proz. Natronlauge behandelt. Sodann füllte man auf 200 ccm auf und untersuchte aliquote Anteile dieser Lösung qualitativ und quantitativ, indem man zunächst mit Salzsäure schwach ansäuerte und sodann ausätherte. Der Äther-Rückstand zeigte alle Eigenschaften der Salicylsäure; nur waren ihm kleine Mengen Natriumchlorid beigemischt (die von dem im Äther gelösten Wasser aufgenommen waren). Zur quantitativen Bestimmung der entstandenen Salicylsäure wurde vom Gesamtgewicht eines Verdampfungsrückstandes die durch Ausfällung mit Silbernitrat ermittelte Menge Natriumchlorid abgezogen.

<sup>14)</sup> Vergl. R. Anschütz, B. 25, 3507 [1892].

20, 100 ccm Lösung (entspr. 0.1000, 0.5000 g  $\beta$ -Disalicylid) hinterließen 0.1193, 0.5682 g Rückstand, der 0.0260, 0.0324 g AgCl lieferte (entspr. 0.0106, 0.0132 g NaCl).

Ber. Salicylsäure 0.1150, 0.5750 g.

Gef. Salicylsäure 0.1087, 0.5550 g, 94.5, 96.5% d. Theorie.

b) Weitere Aufspaltungsversuche an  $\beta$ -Disalicylid: Zu den nachstehend verzeichneten Versuchen wurden etwa je 0.5 g  $\beta$ -Disalicylid verwendet, die mit einem großen Überschuß der aufspaltenden Mittel (10—100 ccm) behandelt wurden. Nähere Angaben in der Dissertation des einen von uns<sup>6)</sup>. Ergebnisse:

$\beta$ -Disalicylid	$\xrightarrow{\text{CH}_3 \cdot \text{CO}_2\text{H}, 2 \text{ Stdn. kochen}}$	$\left\{ \begin{array}{l} \beta\text{-Disalicylid} \\ \beta\text{-Disalicylid} \end{array} \right.$
$\beta$ -Disalicylid	$\xrightarrow{\text{CH}_3 \cdot \text{CO}_2\text{H}, 80 \text{ Stdn. kochen}}$	$\left\{ \begin{array}{l} \beta\text{-Disalicylid} \\ \text{Salicylsäure} \end{array} \right.$
$\beta$ -Disalicylid	$\xrightarrow{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ (konz.)}, \text{ lösen}}$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Salicylsäure} \\ 5\text{-Sulfosalicylsäure} \end{array} \right.$
$\beta$ -Disalicylid	$\xrightarrow[\text{15 Min. kochen}]{\text{CH}_3 \cdot \text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{HCl (4\%)}}$	$\left\{ \begin{array}{l} \beta\text{-Disalicylid} \\ \text{Methylsalicylat (wenig)} \end{array} \right.$
$\beta$ -Disalicylid	$\xrightarrow[\text{50 Stdn. kochen}]{\text{CH}_3 \cdot \text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{HCl (15\%)}}$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Salicylsäure} \\ \text{Methylsalicylat} \end{array} \right.$
$\beta$ -Disalicylid	$\xrightarrow[\text{15 Min. kochen}]{\text{CH}_3 \cdot \text{OH} + \text{CH}_3 \cdot \text{ONa (0.3\%)}}$	$\left\{ \begin{array}{l} \beta\text{-Disalicylid (wenig)} \\ \text{Salicylsäure} \\ \text{Methylsalicylat} \end{array} \right.$

c) Vergleichende Hydrolyse von  $\beta$ -Disalicylid und Diplosal mit 13-proz. methanol.-wäßr. Salzsäure: 2 g  $\beta$ -Disalicylid wurden in 290 ccm methanol.-wäßr. Salzsäure (13% HCl) suspendiert und bei Zimmertemp. unter wiederholtem Umschütteln stehen gelassen. Von Zeit zu Zeit wurde mittels Ferrichlorids auf Salicylsäure geprüft, die erst in 40 Tagen in Spuren nachweisbar war. Aufarbeitung des Ansatzes nach 48 Tagen: Zunächst wurde von unverändertem  $\beta$ -Disalicylid abfiltriert. Das Filtrat versetzte man mit Wasser, ätherte aus und trocknete den Auszug. Der geringfügige Äther-Rückstand enthielt Tröpfchen von Salicylsäuremethylester (Geruch) und eine krystallisierte Substanz, die man mit verd. Soda-Lösung aufnahm. Nach dem Filtrieren und Ansäuern entstand eine sehr geringe weiße Fällung. In Wasser aufgenommen, zeigte sie keine Reaktion mit Ferrichlorid. Da die Substanz bei 146° schmolz, dürfte es sich um Diplosal gehandelt haben, das bei 148° schmilzt und mit Ferrichlorid keine Färbung gibt. Eine genaue Identifizierung war aus Materialmangel nicht möglich.

2 g Diplosal wurden in gleicher Weise behandelt, wie vorstehend für  $\beta$ -Disalicylid angegeben. Bereits nach 6 Tagen zeigte sich eine schwache Reaktion mit Ferrichlorid, die nach 48 Tagen sehr deutlich wurde. Von einer Aufarbeitung wurde abgesehen.

d) Vergleichende Hydrolyse der Disalicylide und des Diplosals bei Abwesenheit von Enzym<sup>15)</sup>: 0.1 g  $\beta$ -Disalicylid

<sup>15)</sup> Für die Ausführung der Versuche mit  $\alpha$ -Disalicylid und Diplosal sind wir Frau Dr. I. Lichtblau zu Dank verpflichtet.

wurde in 85 ccm Wasser suspendiert. Nach Indicatorzusatz (Bromkresolpurpur) wurde auf dessen Umschlagspunkt durch Zusatz von 0.1-n. KOH eingestellt, worauf der Ansatz im Thermostaten bei 37° gehalten wurde. Das  $\beta$ -Disalicylid erwies sich unter diesen Bedingungen mehrere Wochen hindurch als vollkommen beständig.

0.1 g  $\alpha$ -Disalicylid wurde in 85 ccm Wasser in gleicher Weise behandelt. Es erfuhr eine beträchtliche Hydrolyse, wie aus dem Laugenverbrauch hervorgeht, der in Abbild. 1 wiedergegeben ist. Eine Wiederholung des Versuchs mit 0.5 g  $\alpha$ -Disalicylid in 55 ccm Wasser (zwecks Angleichung der Verhältnisse an die bei Gegenwart von Enzym ausgeführten Versuche) zeitigte etwa dieselben Ergebnisse.

0.2 g Diposal wurden in 85 ccm Wasser aufgeschwemmt, wobei sich ein großer Teil löste; hierauf wurde unter den oben angegebenen Bedingungen bei 37° gehalten und die bald einsetzende starke Hydrolyse am Laugenverbrauch beobachtet, der in Abbild. 1 wiedergegeben ist.

Bei Beurteilung dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß Diposal in Wasser wesentlich leichter löslich ist als die beiden Disalicylide.

### 3) Enzymatische Hydrolyse der Disalicylide.

a) Darstellung und Reinigung der Leberesterase-Lösungen: Fein zerkleinerte Schweineleber wurde durch Extraktion mit Aceton und Äther entfettet und getrocknet. 5 g des angefallenen Leberpulvers behandelte man bei Zimmertemp. 3 Stdn. mit der 40-fachen Menge 0.025-n.  $\text{NH}_3$ , worauf durch Abzentrifugieren die Enzym-Lösung gewonnen wurde. Zu deren Reinigung nach Z. Baker und C. G. King<sup>16)</sup> säuerte man zunächst vorsichtig (um nicht zuviel Eiweiß und damit Enzym auszufällen) mit 0.1-n. Essigsäure gegen Methylrot schwach an. Von dem abgeschiedenen Eiweiß wurde abzentrifugiert, mit Ammoniak unter Verwendung von Universal-Indicatorpapier (Merck) auf  $\text{pH}$  6.8 abgestumpft und durch 17-stdg. Dialyse gegen Glycerin (87-proz.) gereinigt und auf das 2- bis 3-fache des Ausgangsvol. konzentriert. Von der Brauchbarkeit der erhaltenen Enzym-Auszüge überzeugte man sich durch Testspaltungen an Methylbutyrat<sup>17)</sup> und Milchsäurelactid<sup>18)</sup>.

b) Enzymatische Spaltungen der Disalicylide: Zunächst wurde eine Spaltung der Disalicylide ohne Zusatz eines Desinfektionsmittels durchgeführt, wobei sich zeigte, daß beide Verbindungen auf Leberesterase ansprechen, und zwar das  $\alpha$ -Disalicylid besser als das  $\beta$ -Isomere. Bei der Suche nach einem geeigneten Desinfektionsmittel haf sich das Natriumsalz der Äthylquecksilber-thiosalicylsäure (Merthiolat)<sup>19)</sup>

<sup>16)</sup> Journ. Amer. chem. Soc. 57, 358 [1935] (C. 1935 II, 539). Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die Vorschrift der amerikanischen Autoren in der oben wiedergegebenen Weise abzuändern, um nicht Enzym-Lösungen von allzu geringer Wirksamkeit zu erhalten.

<sup>17)</sup> Dargestellt nach Dtsch. Reichs-Pat. 232818 (C. 1911 I, 1090); vergl. Frdl., Fortschr. Teerfarb.-Fabrikat. 10, 72 [1910/12].

<sup>18)</sup> Dargestellt nach R. Dietzel u. R. Krug, B. 58, 1313 [1925].

<sup>19)</sup>  $\text{NaO}_2\text{C}(1)\text{C}_6\text{H}_4(2)\text{S.Hg.C}_2\text{H}_5$ ; vergl. J. H. Waldo, Journ. Amer. chem. Soc. 53, 992 [1931] (C. 1931 I, 2744); J. H. Waldo, H. A. Shonle u. H. M. Powell, Journ. Bacteriol. 21, 323 [1931] (C. 1932 I, 3077); H. M. Powell u. W. A. Jamieson, Amer. Journ. Hyg. 13, 296 [1931] (C. 1932 I, 3085); W. A. Jamieson u. H. M. Powell, Amer. Journ. Hyg. 14, 218 [1931] (C. 1932 I, 3085).

weitaus am besten bewährt. Als Indicator bei dem von uns angewandten Verfahren von Knaffl-Lenz<sup>10)</sup> diene uns anfangs Bromkresolpurpur. Später verwendeten wir wegen der dunklen Farbe der Enzym-Lösungen Universal-Indicatorpapier (Merck). Die enzymatischen Spaltungen erfolgten in Suspension bei 37°<sup>20)</sup>.

Beispiel für eine Spaltung (vergl. Abbild. 2): 0.5 g  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Disalicylid + 55 ccm gereinigte und konz. Enzym-Lösung + 3 mg Merthiolat + 13 Tropfen Indicator-Lösung<sup>21)</sup>. Der Verlauf der Hydrolyse ist in Tafel 1 wiedergegeben.

Tafel 1. Vergleichende enzymatische Spaltung der Disalicylide.

Versuchs- zeit in Stunden	Verbr. ccm 0.1-n. KOH beim		% Spaltung zu Salicylsäure <sup>22)</sup> beim	
	$\alpha$ -Disalicylid	$\beta$ -Disalicylid	$\alpha$ -Disalicylid	$\beta$ -Disalicylid
17	3.61	2.15	8.7	5.2
42	6.65	5.10	16.0	12.3
66	9.81	7.75	23.6	18.6
90	12.45	9.40	29.9	22.6
138	16.77	13.25	40.3	31.8
186	19.83	15.80	47.6	38.0
242	22.55	18.91	54.2	45.4
307	25.59	21.75	61.5	52.2

Aufarbeitung: Den Ansatz machte man mit konz. Soda-Lösung schwach alkalisch und schüttelte mit Chloroform unverändertes Disalicylid aus. Hierauf wurde die alkal. Lösung von abgediehltem Eiweiß (durch Abzentrifugieren) und von der Chloroform-Schicht getrennt, sofort mit konz. Salzsäure angesäuert und 3-mal ausgeäthert. Der äther. Auszug wurde durch Abzentrifugieren von neuerdings gallertartig abgediehltem Eiweiß und der wäbr. Lösung abgetrennt. Die äther. Lösung ließ man mit Calciumchlorid und Aktivkohle 24 Stdn. stehen, filtrierte sodann und verdampfte den Äther. Der Rückstand enthielt die entstandenen Hydrolysenprodukte, Salicylsäure und Diplosal. Unter dem Koflerschen Heizmikroskop konnte das Vorhandensein beider Säuren an ihrem gut zu beobachtenden Eutektikum (118°) mit Sicherheit erkannt werden, und zwar sowohl bei dem mit  $\alpha$ -Disalicylid wie bei dem mit  $\beta$ -Disalicylid angesetzten Versuch.

<sup>20)</sup> Ausführung des Versuchs im gewöhnlichen Thermostaten; die Verwendung eines Schüttel-Thermostaten empfiehlt sich nicht, da sie eine vorzeitige Ausflockung von Eiweiß begünstigt.

<sup>21)</sup> Verwendet wurde eine 0.5-proz. alkohol. Lösung von Bromkresolpurpur (Dibrom-*o*-kresol-sulfophthalein).

<sup>22)</sup> Die Spaltungsprodukte der Disalicylide stellen ein Gemisch von Diplosal und Salicylsäure dar, in dem letztere stark überwiegt. Die Zusammensetzung dieses Gemisches läßt sich im Gang der Untersuchung nicht feststellen. Die angegebenen Prozentzahlen sind also Mindestwerte, die je nach den vorhandenen (nicht erheblichen) Mengen an Diplosal zu erhöhen wären.

Isolierung von Diplosal: Trotzdem der Nachweis von Diplosal unter den Produkten der enzymatischen Spaltung der beiden Disalicylide durch Feststellung des Eutektikums mit Salicylsäure als genügend sicher anzusehen ist, haben wir uns bemüht, das aus  $\beta$ -Disalicylid durch enzymatische Hydrolyse gebildete Diplosal in Substanz zu fassen, da die genetische Verknüpfung dieser beiden Verbindungen bei 37° von großer Bedeutung für die von uns bearbeitete Frage ist. Die beabsichtigte Isolierung des Diplosals ist bei einigen Ansätzen gelungen, bei anderen blieb uns der Erfolg versagt. Schuld hieran dürfte neben der Hydrolysenempfindlichkeit des Diplosals dessen Einschließung durch die in ihrem Ausmaß nicht genau reproduzierbaren Eiweißfällungen sein, die nachweislich auch einen großen Teil der gebildeten Salicylsäure zurückhalten. Die Versuche wurden in der vorstehend beschriebenen Weise bei pH 6.8 unter Anwendung von Universal-Indikatorpapier (Merck) ausgeführt. Die nach dem Verdampfen des Äthers erhaltenen Hydrolysenprodukte erhitzte man im Vak.-Trockenschrank 1 Stde. bei 15 mm auf 100°, wobei die Salicylsäure quantitativ wegsublimierte, während etwa vorhandenes Diplosal rein zurückblieb (Schmp. 148°). Tafel 2 gibt eine Übersicht über die von uns ausgeführten Versuche, die teils gruppenweise aufgearbeitet wurden.

Tafel 2. Enzymatische Umwandlung von  $\beta$ -Disalicylid in Diplosal.

Versuch Nr.	$\beta$ -Disalicylid in g:	Enzym-Lösung in ccm:	Versuchszeit in Stunden:	Erhaltenes Diplosal in mg:
1	0.8	20	24	6
2	0.8	40	24	
3	0.8	53	164	0
4	0.8	53	164	
5	0.6	60	121	0
6	0.5	60	234	0
7	0.5	40	24	2.5
8	0.5	40	24	
9	0.5	40	24	
10	0.5	40	263	4

4) Verhalten der Disalicylide unter dem Koflerschen Mikroschmelzpunktsapparat nach Beobachtungen von M. Baumeister und M. Brandstätter<sup>23)</sup>.

Die hochliegenden Schmelzpunkte der Disalicylide lassen sich nicht leicht genau festlegen; insbesondere wird der Schmelzpunkt des  $\alpha$ -Disalicylids sehr verschieden gefunden, wobei die Wahl des zum Umkrystalli-

<sup>23)</sup> Für die Durchführung dieser Untersuchungen zu einer Zeit, in der uns noch die apparativen Mittel dazu fehlten, im Institut von Hrn. Prof. Kofler, Innsbruck, durch Frl. Dr. Baumeister und Frl. Dr. Brandstätter möchten wir auch hier unseren Dank zum Ausdruck bringen.

sieren verwendeten Lösungsmittels eine beträchtliche Rolle spielt<sup>24</sup>). Es schien daher erwünscht, zur besseren Kennzeichnung dieser Verbindungen ihr Verhalten beim Schmelzvorgang nach dem schönen Verfahren von L. Kofler genau zu verfolgen. Bei dieser Untersuchung lieferten die aus Chloroform umkrystallisierten Disalicylide folgende Werte:

$\alpha$ -Disalicylid (Makro-Schmp. 213°): Beim Erhitzen ab etwa 140° starke Sublimation in Form von Blättchen, Körnern und Prismen. Die Verbindung schmilzt zwischen 213° und 218°; ihre Schmelze erstarrt glasig. Ein Gleichgewicht zwischen Krystallen und Schmelze läßt sich nicht einstellen. Brechungsindices bei verschiedenen Temperaturen, bestimmt nach der Koflerschen Glaspulvermethode:  $n_D^{245}$  1.5700,  $n_D^{209}$  1.5794.

$\beta$ -Disalicylid (Makro-Schmp. 199—200°): Beginnt ab 130° in Nadeln und Blättchen zu sublimieren. Die Verbindung schmilzt zwischen 197° und 203°; ihre Schmelze erstarrt beim Erkalten krystallinisch. Bei 203° läßt sich ein Gleichgewicht zwischen Krystallen und Schmelze einstellen. Brechungsindices bei verschiedenen Temperaturen, bestimmt nach der Koflerschen Glaspulvermethode:  $n_D^{217}$  1.5609,  $n_D^{188}$  1.5700<sup>25</sup>).

Eutektikum von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Disalicylid:  $175 \pm 1^\circ$ .

### 117. Ludwig Anschütz und Gerhard Groß: Zum Isomerieproblem der Disalicylide, IV. Mitteil.: Beiträge zur Kenntnis der Dikresotide\*).

[Aus d. Organ.-chem. Institut d. Deutschen Techn. Hochschule Brünn.]

(Eingegangen am 30. März 1944.)

Die in der Literatur enthaltenen Angaben über Dikresotide schienen insofern einer Nachprüfung bedürftig, als aus ihnen geschlossen werden kann, daß es nicht gelungen, ja vielleicht nicht einmal möglich ist, die sechs theoretisch vor auszusehenden bimolekularen Anhydride der drei Kresotinsäuren darzustellen. Auf Grund der in unserer III. Mitteilung<sup>1)</sup> auf chemischem und biochemischem Wege bestens gestützten stereochemischen Deutung der Disalicylid-Isomerie ist aber nicht einzusehen, warum sich nicht von der *o*-, *m*- und *p*-Kresotinsäure je ein  $\alpha$ - und ein  $\beta$ -Dikresotid ableiten sollte wie von der Salicylsäure das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -Disalicylid. Wir haben uns daher um die Klarstellung dieser Verhältnisse bemüht.

Zuerst hat M. Schöpff<sup>2)</sup> ein bei 224—225° schmelzendes Dikresotid als Nebenprodukt bei der Darstellung von 4,5-Dimethyl-xanthon durch Destillation von *o*-Kresotinsäure mit Essigsäureanhydrid erhalten. Zehn Jahre später haben A. Einhorn und C. Mettler<sup>3)</sup> durch Einleiten von Phosgen in die Pyridin-Lösung der drei Kresotinsäuren drei Dikresotide dargestellt: *o*-Dikresotid, Schmp. 231—231.5°; *m*-Dikresotid, Schmp. 207° bis 207.5°; *p*-Dikresotid, Schmp. 243°. In neuerer Zeit hat R. Anschütz<sup>4)</sup> mitgeteilt, daß sich die zur Disalicylid-Bildung mit Erfolg angewandte

<sup>24)</sup> Vergl. G. Schroeter, B. 52, 2234 [1919].

<sup>25)</sup> Bestimmung an der unterkühlten Schmelze.

\*) Vergl. G. Groß, Dissertat. Brünn 1943.

<sup>1)</sup> Vergl. die vorangehende Abhandlung.

<sup>2)</sup> B. 25, 3645 [1892].

<sup>3)</sup> B. 35, 3644 [1902].

<sup>4)</sup> A. 439, 8 [1924].