

CHEMISCHE BERICHTE

Fortsetzung der
BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN
GESELLSCHAFT

94. Jahrg. Nr. 8

S. 1931—2360

ADOLF BUTENANDT, DANKWART STAMM und ERICH HECKER

Mikromethode zur Konstitutionsermittlung ungesättigter Alkohole und Säuren

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Eingegangen am 6. Dezember 1960)

Ulrich Haberland zum 60. Geburtstag

4-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester ungesättigter Alkohole lassen sich mit Kaliumpermanganat in Aceton in Mengen bis zu 1 mg derart spalten, daß nur Doppelbindungen des Alkoholrestes angegriffen werden. Die Spaltprodukte können getrennt und durch Papierchromatographie identifiziert werden. In vielen Fällen ergibt sich daraus die vollständige Konstitution des Alkoholrestes. Es werden 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester ungesättigter Alkohole sowie von ω -Hydroxysäure-methylestern und ω -Hydroxyketonen beschrieben und Systeme zur papierchromatographischen Trennung von 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-estern angegeben.

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid¹⁾ hat sich als Reagenz zur Charakterisierung und Äquivalentgewichtsbestimmung von Alkoholen vielfach bewährt²⁻⁵⁾, und vor kurzem gelang die Reindarstellung des ersten Sexuallockstoffes aus dem Insektenreich — des konjugiert ungesättigten Hexadecadienols Bombykol des Seidenspinners^{6,7)} — als 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester. Da sich von Wirkstoffen dieses Typus häufig nur sehr geringe Mengen isolieren lassen, ist ein Verfahren wünschenswert, das

¹⁾ E. HECKER, Chem. Ber. **88**, 1666 [1955]; E. S. AMIN und E. HECKER, Chem. Ber. **89**, 695 [1956].

²⁾ A. BUTENANDT und NGUYEN-DANG TAM, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **308**, 277 [1957].

³⁾ A. BUTENANDT und H. REMBOLD, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **308**, 284 [1957].

⁴⁾ F. LYNEN und Mitarbb., Angew. Chem. **71**, 657 [1959].

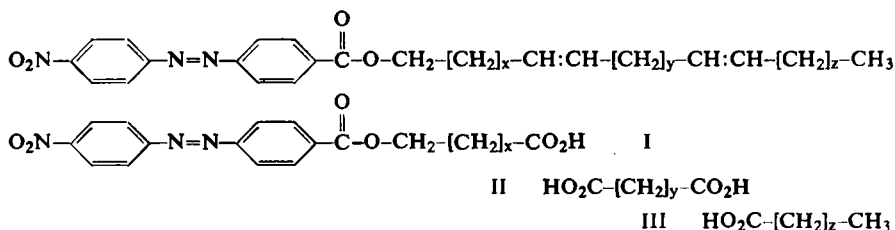
⁵⁾ L. A. WITTING und J. W. PORTER, Biochem. Biophys. Res. Comm. **1**, 341 [1959].

⁶⁾ A. BUTENANDT, Naturwiss. Rdsch. **8**, 457 [1955]; Nova Acta Leopoldina, N. F. **17**, 445 [1955]; E. HECKER, Proc. X. Internat. Congr. Entomology **2**, 293 [1956/58]; Angew. Chem. **68**, 683 [1956].

⁷⁾ A. BUTENANDT, R. BECKMANN, D. STAMM und E. HECKER, Z. Naturforsch. **14b**, 283 [1959]; A. BUTENANDT, R. BECKMANN, D. STAMM und E. HECKER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **324**, 71, 84 [1961].

die Konstitution der intensiv farbigen und gut kristallisierenden NABS-Ester^{*)} ungesättigter Alkohole mit möglichst geringen Substanzmengen zu ermitteln gestattet. Das für die Konstitutionsermittlung des Bombykols entwickelte⁸⁾ und mit Erfolg verwendete⁷⁾ Verfahren scheint uns von allgemeiner Anwendbarkeit und wird daher im folgenden ausführlich beschrieben.

Bei unseren Versuchen kam uns die Stabilität des NABS-Restes gegen Oxydationsmittel¹⁾ zustatten, und es ließ sich zeigen, daß NABS-Ester ungesättigter Alkohole mit Permanganat in trockenem Aceton oxydiert werden können, ohne daß der NABS-Rest oder die NABS-Ester-Bindung angegriffen werden. Der Abbau verläuft nach folgendem Schema:



Aus den Ansätzen läßt sich in jedem Falle ein durch den roten NABS-Rest markierter Ester (I) einer Hydroxysäure isolieren. Im Falle von isoprenoiden Alkoholen mit geeigneter Lage der Doppelbindung wären entsprechend NABS-Ester von Hydroxyketonen zu erwarten. Darüber hinaus können auch die restlichen, bei der oxydativen Spaltung von NABS-Estern ungesättigter Alkohole erhaltenen Bruchstücke (II und III) im Rahmen eines Trennungsganges erfaßt und papierchromatographisch identifiziert werden.

Um den Substanzbedarf bei der Spaltung und dem anschließenden Trennungsgang auf weniger als 2 mg NABS-Ester reduzieren zu können, muß in einem geschlossenen System gearbeitet werden, damit man Substanzverluste durch Verdampfung und Benetzung vermeidet. Es werden daher alle Arbeitsgänge in einer *Hochvakuumapparatur* ausgeführt, wie sie ähnlich bei Synthesen radioaktiver Verbindungen üblich sind. Eine entsprechende Apparatur wurde in Anlehnung an die Angaben von M. CALVIN⁹⁾ aufgebaut und für die besonderen Aufgaben abgeändert und ergänzt. Alle verdampfenden Substanzen können in kurzer Zeit im kältesten Gefäß gesammelt werden. Im übrigen sind die für den Umgang mit Mikromengen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten¹⁰⁾.

OXYDATIVE SPALTUNG UND TRENUNGSGANG

Die oxydative Spaltung wird mit insgesamt der 100fachen Menge Kaliumpermanganat in trockenem Aceton unter vollkommenem Wasserausschluß durchgeführt, um eine Spaltung der Esterbindung sicher zu verhindern. Man arbeitet in einem

^{*)} Die 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4) wird im folgenden mit NABS abgekürzt.

⁸⁾ Dr. med. D. STAMM, Dissertat., Univ. München 1961.

⁹⁾ M. CALVIN, C. HEIDELBERGER, J. C. REID, B. M. TOLBERT und P. E. YANKWICH, *Isotopic Carbon*, J. Wiley and Sons, Inc., New York 1949, S. 130 ff.

¹⁰⁾ N. D. CHERONIS, *Micro and Semimicro Methods*, in A. WEISSBERGER, *Technique of Organic Chemistry*, Vol. VI, Interscience Publishers, Inc., New York 1954.

Zentrifugenglas mit Schliff, das mit einem Kühlfinger als Rückflußkühler versehen ist und dessen Öffnung man mit einem Calciumchloridrohr verschließt. Ein gleichmäßiges Sieden des Reaktionsgemisches läßt sich trotz des abgeschiedenen Mangandioxydhydrats erzielen, wenn man die Apparatur im Glycerinbad auf 65° erwärmt und ein Siedestäbchen zugibt. Nach beendeter Reaktion liegt ein Gemisch der Spaltprodukte mit viel Mangandioxyd und Permanganat vor. Das Zentrifugenglas wird an die Hochvakuumapparatur angeschlossen und das Lösungsmittel bei 2×10^{-1} Torr und bei Raumtemperatur in eine Spiralfalle mit Außenkühlung destilliert. Bei Verzweigungen des Alkoholrestes zu erwartende Ketone treibt man anschließend bei 3×10^{-3} Torr in eine zweite Kühlfalle über. Der Rückstand im Zentrifugenglas ist danach völlig trocken.

Mit der Zugabe von Wasser müssen die dabei entstehenden Hydroxylionen neutralisiert und möglichst gleichzeitig muß überschüssiges Kaliumpermanganat zerstört werden. Dabei darf das Milieu jedoch nicht mineralsauer werden, weil dann möglicherweise vorhandene Oxalsäure durch Kaliumpermanganat zerstört würde. Das Verfahren der Wahl ist die Zugabe einer wäßrigen Lösung von Ameisensäure. Überschüssige Ameisensäure und vorhandene Spaltsäuren werden anschließend mit Kaliumcarbonat neutralisiert. Sämtliche Spaltsäuren (gegebenenfalls Monocarbon-, Dicarbon- und Ketosäuren) mit Ausnahme der NABS-Ester-Säure liegen dann als Anionen gelöst vor. Man zentrifugiert das Gemisch aus Mangandioxyd und dem unlöslichen Salz der NABS-Ester-Säure ab, extrahiert das anfallende Sediment noch zweimal mit Kaliumhydrogencarbonatlösung, suspendiert es in 0.2 *n* H₂SO₄ und leitet zur Auflösung des Mangandioxyds Schwefeldioxyd ein. Danach liegt die freie NABS-Ester-Säure als feinflockiger, roter Niederschlag vor, den man abzentrifugiert und zur Trockne lyophilisiert, in Methylenchlorid aufschwemmt und mit Diazomethan verestert, da sich die freien Säuren als recht instabil erwiesen haben. Man chromatographiert den erhaltenen NABS-Ester eines Hydroxysäure-methylesters auf Aluminiumoxyd und identifiziert ihn durch Papierchromatographie im System Decan (3)/Pyridin (2).

Eine Probe des Zentrifugations-Überstandes aus dem Oxydationsansatz wird lyophilisiert und durch Zugabe von 2.4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz auf Anwesenheit von *Ketosäuren* geprüft. Fällt die Probe positiv aus, so wird der gesamte Ansatz durch dieselbe Behandlung von *Ketosäuren* befreit. Falls keine *Ketosäuren* entstanden sind, säuert man mit 1 *n* H₂SO₄ an und treibt die *Monocarbonsäuren* mit Wasserdampf über.

Da Fettsäuren mit mehr als 8 C-Atomen sich an kühleren Stellen üblicher Destillationsapparaturen kondensieren und somit nicht quantitativ im Destillat erscheinen, wurde die Apparatur von R. MARKHAM¹¹⁾ zur quantitativen Mikrodestillation von NH₃ zweckmäßig modifiziert, so daß alle Teile zwischen Destillierkolben und Kondensationsstelle von einem Dampfmantel umgeben sind; die mit einem Glasstopfen verschlossene Öffnung gestattet das Herausspülen von Kondensaten aus dem Kühler. Mit dem Gerät lassen sich alle Monocarbonsäuren bis einschließlich Palmitinsäure quantitativ im Destillat auffangen.

Dicarbonsäuren verbleiben im Rückstand der Wasserdampfdestillation, der mit 1 *n* Na₂CO₃ neutralisiert und anschließend lyophilisiert wird. Die Abtrennung der Dicarbonsäuren von den großen Mengen anorganischer Salze, die die anschließende

¹¹⁾ Biochem. J. 36, 790 [1942].

Papierchromatographie stören würden, gelingt nach Aufnahme des Trockenrückstandes in 5 *n* H₂SO₄ durch Ausschütteln mit Äther. Der Trockenrückstand der Ätherextrakte wird in die Ammoniumsalze übergeführt. Zur Trennung und Identifizierung von Oxal- und Malonsäure wird das System Propanol-(1) (60)/konz. Ammoniak (40)^{12a)}, für Bernstein- bis Sebacinsäure das System Äthanol (80)/16-proz. wäbr. Äthylamin (20)^{12b)} verwendet.

Das die Monocarbonsäuren enthaltende Wasserdampfdestillat wird zur Zerstörung von Ameisensäure mit *n*/₁₀ KMnO₄ in natriumcarbonatalkalischer Lösung titriert, vom Mangandioxyd abzentrifugiert und lyophilisiert. Durch eine erneute Wasserdampfdestillation befreit man von anorganischen Salzen, bestimmt den Gehalt des Destillats durch Titration mit *n*/₁₀ NaOH und lyophilisiert zur Trockne. Die Salze der Säuren werden unter Kühlung in wenig 1 *n* H₂SO₄ aufgenommen, mit Dioxan versetzt und der Lösung das Wasser mit Natriumsulfat entzogen. Man verestert die in Dioxan gelösten Säuren mit Diazomethan und überführt die Methylester in die Hydroxamsäuren¹³⁾. Hydroxamsäuren unverzweigter Monocarbonsäuren werden im System Amylalkohol (40)/Eisessig (10)/Wasser (40)¹⁴⁾, Hydroxamsäuren unverzweigter höherer Monocarbonsäuren im System Essigester (12)/Tetrahydrofuran (70)/Wasser (94)/Eisessig (9) und Hydroxamsäuren methylverzweigter Monocarbonsäuren im System *n*-Octanol (75)/Wasser (75)/Ameisensäure (25)/*n*-Heptan (5) getrennt und identifiziert.

ÜBERPRÜFUNG DES VERFAHRENS AN MODELLSUBSTANZEN

Oxydation und Trennungsgang wurden durch Abbau einiger bekannter Modellsubstanzen überprüft. Man ging dazu aus von je 1–2 mg der Ester und erhielt die in Tab. 1 zusammengestellten Produkte.

Tab. 1. Übersicht über die bei der Oxydation einiger Modell-NABS-Ester erhaltenen Spaltprodukte

Ausgangsmaterial		Spaltprodukte			
NABS-Ester von	eingesetzt mg	NABS-Ester des Methylesters von	Dicarbon-säure	Monocarbon-säure	Keton
Crotonalkohol	2	Glykolsäure	—	Essigsäure	—
Hexen-(3)-ol-(1)	2	β-Hydroxy-propionsäure	—	Propionsäure	—
Petrosilinalkohol	2	ω-Hydroxy-capronsäure	—	Laurinsäure	—
Sorbinol	1	Glykolsäure	Oxalsäure	Essigsäure	—
Linolalkohol	2	ω-Hydroxy-nonansäure	Malonsäure	Capronsäure	—
	1	ω-Hydroxy-nonansäure	—	Capronsäure	—
Linolenalkohol	1	ω-Hydroxy-nonansäure	Malonsäure	Propionsäure	—
Farnesol	1	Glykolsäure	—	—	Aceton

¹²⁾ a) F. A. ISHERWOOD und C. S. HANES, *Biochem. J.* **55**, 824 [1953]; b) A. G. LONG, J. R. QUALE und R. J. STEDMAN, *J. chem. Soc. [London]* **1951**, 2197.

¹³⁾ F. MICHEEL und H. SCHWEPPE, *Angew. Chem.* **66**, 136 [1954].

¹⁴⁾ A. R. THOMPSON, *Austral. J. sci. Res., Ser. B* **4**, 180, 285 [1951].

Bei der Oxydation der NABS-Ester der geprüften Alkohole sind die erwarteten NABS-Ester der ω -Hydroxysäure-methylester und die Monocarbonsäuren auch bei Anwendung von nur 1–2 mg eindeutig nachweisbar. Da Essigsäure durch Oxydation des Acetons fast immer in kleinen Mengen entsteht, kommt deren Nachweis bei der Spaltung der Ester des Crotonalkohols und des Sorbinols keine Signifikanz zu. Die beim Sorbinolester zu erwartende Oxalsäure läßt sich unter den Bedingungen des Abbaus einwandfrei nachweisen.

Der Nachweis der beim Vorliegen von Divinylmethangruppierungen erwarteten Malonsäure, z. B. im NABS-Ester des Linolalkohols, gelingt nicht, wenn nur 1 mg des Esters eingesetzt wird, sie läßt sich aber bei Oxydation von 2 mg des Esters unter sonst gleichen Bedingungen einwandfrei erfassen. Dementsprechend findet man Malonsäure bereits bei Oxydation von 1 mg NABS-Ester des Linolenalkohols, aus dem die doppelt molare Menge Malonsäure zu erwarten ist.

Die Schwierigkeiten des Nachweises von Malonsäure bei der Oxydation von Divinylmethangruppierungen mit Kaliumpermanganat in Aceton sind bekannt. In Fällen, in denen nach Angaben der Literatur^{15,16} keine Malonsäure gefunden wurde, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob sorgfältig auf Wasserausschluß, d. h. neutrales Milieu, geachtet wurde. Auch erscheint zweifelhaft, ob die Empfindlichkeit der Nachweismethoden den von uns verwendeten vergleichbar war. Bei Oxydation mit Kaliumpermanganat in Eisessig ist Malonsäure nachgewiesen worden¹⁷. Anstelle zu erwartender Malonsäure wurde auch Oxalsäure gefunden^{15,16}, ein Befund, den wir in anderem Zusammenhang bestätigen konnten¹⁸). Da sich das Vorliegen konjugierter Doppelbindungen bereits vor der Spaltung auf UV-spektrophotometrischem Wege sicher ausschließen läßt, kann in solchen Fällen das Auftreten von Oxalsäure bei der Spaltung selbst als Hinweis auf ein Divinylmethansystem gewertet werden.

Im Falle des NABS-Esters von Farnesol wird lediglich der NABS-Ester des Glykol-säure-methylesters isoliert, da sich die zu erwartende Lävulinsäure unter den Bedingungen der Reaktion nicht fassen läßt¹⁹). Das zu erwartende Aceton ist nicht nachweisbar, da es in großem Überschuß als Lösungsmittel dient.

Diese Modellversuche und ihre Anwendung zur Konstitutionsermittlung des Bombykols^{7,8}) zeigen, daß das Verfahren durch Abbau von NABS-Estern ungesättigter Alkohole weitgehende Einblicke in die Konstitution des Alkoholrestes ermöglicht. Die dazu erforderlichen Substanzmengen sind kleiner als die für eine übliche CH-Mikroanalyse benötigten, die gewonnenen Informationen sind aber in günstigen Fällen umfassender. So ist eine Elementaranalyse nicht unbedingt erforderlich, wenn sich alle zu erwartenden Spaltprodukte nachweisen lassen. Ihre Vollzähligkeit läßt sich durch das vor der Spaltung der NABS-Ester auf spektrophotometrischem Wege verlustlos zu ermittelnde Molekulargewicht¹) leicht kontrollieren. Selbst wenn als einziges Spaltprodukt nur der NABS-Ester eines Hydroxysäure-methylesters oder der NABS-Ester eines Hydroxyketons erhalten wird, kann bereits die Identifizierung dieses Bruchstücks in Kombination mit dem spektrophotometrisch bestimmten Molekulargewicht des Ausgangsmaterials wertvolle Hinweise auf dessen Konstitution geben.

¹⁵) K. S. MARKLEY, *Fatty Acids*, Interscience Publishers, Inc., New York 1947, S. 406–410.

¹⁶) D. T. MOWRY, W. R. BRODE und J. B. BROWN, *J. biol. Chemistry* **142**, 679 [1942].

¹⁷) A. T. JAMES und J. WEBB, *Biochem. J.* **66**, 515 [1957].

¹⁸) A. BUTENANDT und Mitarbb., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, im Druck.

¹⁹) M. KERSCHBAUM, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **46**, 1732 [1913].

Da sich ungesättigte Fettsäuren mit Lithiumaluminiumhydrid quantitativ in die entsprechenden primären Alkohole überführen lassen, ist das beschriebene Verfahren auch zur Konstitutionsermittlung ungesättigter Carbonsäuren geeignet¹⁸⁾.

Für wertvolle technische Assistenz haben wir Frau U. WOLF und Herrn M. MÜLLER herzlich zu danken. Die DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, die SCHERING AG, Berlin, die FARBENFABRIKEN BAYER, Leverkusen, und die DEUTSCHE HOFFMANN-LA ROCHE AG, Grenzach, haben diese Arbeit in dankenswerter Weise unterstützt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte werden, wenn nicht besonders vermerkt, auf der Heizbank nach KOFLER bestimmt. Mikroanalysen sind von Dr. A. SCHOELLER, Kronach (Ofr.), und von A. BERNHARDT, Mülheim (Ruhr), ausgeführt. Es wird stets Aluminiumoxyd der Firma WOELM, Eschwege, verwendet.

Modellsubstanzen

Ungesättigte Alkohole: Crotonalkohol wird durch Reduktion von reinem Crotonaldehyd mit Lithiumalanat gewonnen. Hexen-(3)-ol-(1) verdanken wir der Firma POLAK & SCHWARZ, GmbH., Emmerich (Rhein), Petrosilinalkohol wird durch Reduktion von Petrosilinsäure (Δ^6 -Octadecan-carbonsäure-(1), Schmp. 31°) mit Lithiumalanat dargestellt. Der Alkohol destilliert bei 65°/0.8 Torr als klare farblose Flüssigkeit. Die Ausgangssäure wird aus Petrosilensamen nach S. H. BERTRAM²⁰⁾ isoliert und gereinigt. Linol- und Linolenalkohol werden aus den entsprechenden reinen Säuren (Fluka) durch Reduktion mit Lithiumalanat gewonnen. Farnesol wurde von der Firma Fluka bezogen.

ω -Hydroxycarbonsäure-methylester: Die Methylester werden aus den entsprechenden Säuren auf übliche Weise dargestellt und durch Destillation gereinigt. Glykolsäure wird als Handelspräparat verwendet. β -Hydroxy-propionsäure wird durch Verseifung von Äthylencyanhydrin²¹⁾ dargestellt, ω -Hydroxy-capronsäure wird in Analogie zur Darstellung von ω -Hydroxy-caprylsäure aus Sebacinsäure gewonnen²²⁾. Zur Darstellung von α -Methyl- β -hydroxy-propionsäure-methylester geht man aus vom Diäthylester der Methylmalonsäure²³⁾, den man in Analogie zur Vorschrift von F. MARGUERY²⁴⁾ in das Mononatriumsalz überführt. Dieses wird in Diäthylenglykol-dimethyläther (Diglyme) suspendiert und die Estergruppe mit Natriumborhydrid und Aluminiumchlorid selektiv reduziert²⁵⁾.

ω -Hydroxyketone: Hydroxyaceton wird nach Org. Syntheses²⁶⁾, Butanol-(1)-on-(3) durch Reduktion von Acetessigester-äthylenketal²⁷⁾ mit Lithiumalanat²⁸⁾ dargestellt. Das Ketal wird durch Destillation gereinigt (Sdp.₉ 82–85°), mit HCl gespalten und das Hydroxyketon erneut destilliert (Sdp.₁ 60–62.5°). Pentanol-(1)-on-(4) bereitet man nach N. D. ZELINSKY und E. F. DENGIN²⁹⁾.

NABS-Ester: Die Ester (Tab. 2) sind im allgemeinen, wie bereits beschrieben¹⁾, dargestellt worden. Bei Estern ungesättigter Alkohole erwies sich Filtration über anionotropes Aluminiumoxyd Akt.-St. IV als besonders schonend. Man kann solche Ester auf sehr milde Weise

²⁰⁾ Thesis Univ. Delft 1928, S. 139.

²¹⁾ Org. Syntheses, 2. Edit., Vol. I, S. 321, Wiley Sons, Inc., New York 1948.

²²⁾ A. GRÜN und Th. WIRTH, Ber. dtsh. chem. Ges. **55**, 2206 [1922], dort S. 2215.

²³⁾ I. c. ²¹⁾, Vol. 2, S. 279 [1947].

²⁴⁾ Bull. Soc. chim. France (3) **33**, 542 [1905].

²⁵⁾ H. C. BROWN und B. C. SUBBA RAO, J. Amer. chem. Soc. **78**, 2582 [1956].

²⁶⁾ I. c. ²¹⁾, Vol. II, S. 5 [1947].

²⁷⁾ E. J. SALMI, Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 1803 [1938].

²⁸⁾ R. F. NYSTROM und W. G. BROWN, J. Amer. chem. Soc. **69**, 2548 [1947].

²⁹⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. **55**, 3355 [1922].

Tab. 2. 4-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester einiger ungesättigter Alkohole, ω -Hydroxysäure-methylester und ω -Hydroxyketone

4-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester von	Schmp. °C	umkristallisiert aus	Bruttoformel	Mol.-Gew.	Analyse		
					C	H	N
<i>ungesätt. Alkoholen</i>							
Crotonalkohol	136	Bzl.-Cyclohex. Aceton	$C_{17}H_{15}N_3O_4$	325.3	Ber. 62.74 Gef. 62.85	4.65 4.69	12.92 13.01
Hexen-(3)-ol-(1)	129—130	Bzl.-Cyclohex. Aceton	$C_{19}H_{19}N_3O_4$	353.4	Ber. 64.57 Gef. 64.53	5.42 5.46	11.89 12.13
Petrosilinalkohol	88—89	Hexan, Aceton	$C_{31}H_{43}N_3O_4$	521.7	Ber. 71.36 Gef. 71.51	8.32 8.37	8.06 8.20
Linolalkohol	79—80	Aceton-Wasser, Aceton, Aceton-Nitromethan	$C_{31}H_{41}N_3O_4$	519.7	Ber. 71.64 Gef. 71.62	7.95 7.86	8.09 8.10
Linolenalkohol	74—75	Aceton-Wasser, Aceton, Aceton-Nitromethan	$C_{31}H_{39}N_3O_4$	517.7	Ber. 71.87 Gef. 71.40	7.60 7.70	8.12 8.03
Farnesol	85—86	Nitromethan, Athanol	$C_{28}H_{33}N_3O_4$	475.6	Ber. 70.71 Gef. 71.61	6.99 6.81	8.84 9.37
<i>ω-Hydroxysäure-methylestern</i>							
Glykolsäure-methylester	148	Bzl.-Cyclohex.	$C_{16}H_{13}N_3O_6$	343.3	Ber. 55.98 Gef. 56.17	3.82 3.88	12.24 12.49
β -Hydroxy-propionsäure-methylester	147—148	Bzl., Cyclohex.	$C_{17}H_{15}N_3O_6$	357.3	Ber. — Gef. —	— —	11.76 11.73
α -Methyl- β -hydroxy-propionsäure-methylester	146	Bzl., Cyclohex.	$C_{18}H_{18}N_3O_6$	372.4	Ber. 58.06 Gef. 58.44	4.87 4.70	11.29 11.31
ω -Hydroxy-capronsäure-methylester	123—124	Bzl.-Cyclohex., Aceton	$C_{20}H_{21}N_3O_6$	399.4	Ber. 60.14 Gef. 60.27	5.30 5.20	10.52 10.61
<i>ω-Hydroxyketonen</i>							
Hydroxyaceton	166	Bzl., Aceton	$C_{16}H_{13}N_3O_5$	327.3	Ber. 58.71 Gef. 58.91	4.01 4.10	12.84 12.47
Butanol-(1)-on-(3)	145	Bzl., Aceton	$C_{17}H_{15}N_3O_5$	341.3	Ber. 59.82 Gef. 59.70	4.43 4.56	12.31 12.48
Pentanol-(1)-on-(4)	121	Bzl.-Cyclohex. Aceton-Wasser	$C_{18}H_{17}N_3O_5$	355.4	Ber. 60.83 Gef. 60.91	4.82 4.76	11.82 11.84

erhalten, wenn man analog der im folgenden für Farnesol gegebenen Vorschrift verfährt (bearbeitet von R. BECKMANN): 173 mg (0.6 mMol) NABS-Chlorid werden in 20 ccm trockenem Benzol gelöst und nach Abkühlen auf 4° mit 112 mg Farnesol (0.5 mMol) in wenig Benzol sowie 0.57 μ l (0.7 mMol) trockenem Pyridin versetzt. Nach 48stdg. Aufbewahren im Kühlschrank wird vom abgeschiedenen Niederschlag abfiltriert, dieser mit Benzol gewaschen und die vereinigten Filtrate über Natriumsulfat getrocknet. Man dampft die Lösung am Rotationsverdampfer ohne äußere Erwärmung vollständig zur Trockne und erwärmt den Rückstand mit 3 ccm feuchtem Nitromethan oder Aceton, um überschüss. Säurechlorid zu zerstören. Es wird vom Ungelösten abfiltriert und das Filtrat 12 Stdn. im Kühlschrank aufbewahrt. Die abgeschiedenen Kristalle werden mit eiskaltem Lösungsmittel gewaschen. Man erhält 156 mg (66% d. Th.) NABS-Ester des Farnesols, Schmp. 78--80°; der Schmp. erhöht sich durch Umkristallisieren auf 85--86°.

ω -Hydroxy-nonansäure-methylester wird durch oxydative Spaltung der NABS-Ester von Linol- und Linolenalkohol dargestellt, die NABS-Ester von ω -Hydroxy-decansäure-methylester³⁾ sowie von Sorbinol¹⁾ sind bereits bekannt.

Die in Tab. 2 zusammengefaßten Ester sind stabile Verbindungen, die sich bei Raumtemperatur beliebig lange unzerstört halten. Eine Ausnahme stellen die Ester des Linol- und Linolenalkohols dar, die in rohem Zustand einen intensiven Leinölgeruch aufweisen. Dieser verschwindet erst nach häufigem Umkristallisieren; die analysenreinen Präparate sind geruchsfrei. Nach 2-wöchigem Aufbewahren der Ester bei Raumtemperatur beginnen die Kristalle zu verkleben und der Leinölgeruch stellt sich, vermutlich durch Autoxydation, wieder ein.

Papierchromatographie

NABS-Ester von Alkoholen bis C₈, von ω -Hydroxysäure-methylestern und von ω -Hydroxyketonen: Unmittelbar vor der Ausführung der Trennung werden Streifen von SS 2043 b (acetyliert, 20--25% Acetyl) 30 Min. bei 100° getrocknet und nach Abkühlen auf Raumtemperatur zur Chromatographie verwendet. Man trägt am Start Mengen von 5--20 μ g pro Ester, gelöst in Chloroform/Methanol (1:1), in möglichst kleinen Flecken auf. Dann wird etwa 12 Stdn. mit dem System Decan (3)/wasserfreies Pyridin (2) aufsteigend entwickelt. Nach dem Trocknen des Chromatogramms werden die Flecken auf Grund ihrer Eigenfarbe oder durch ihre starke UV-Absorption im durchfallenden UV-Licht (vorzugsweise 254 μ) erkannt. Da sich die Lösungsmittelfront nicht immer mit ausreichender Genauigkeit ermitteln läßt, werden die Laufstrecken der NABS-Ester auf die des NABS-Esters des Methanols bezogen und mit R_M bezeichnet (Tab. 3).

Tab. 3. Beispiele für R_M-Werte einiger NABS-Ester im System Decan (3)/Pyridin (2). Der NABS-Ester des Methanols hat einen R_F-Wert (bezogen auf die Lösungsmittelfront) von etwa 0.5

NABS-Ester von	R _M -Wert	NABS-Ester von	R _M -Wert
<i>Alkoholen</i>			
Methanol	1	β -Hydroxy-propionsäure	0.74
Äthanol	1.21	β -Hydroxy- α -methylpropionsäure	0.81
Hexanol	1.48	ω -Hydroxy-capronsäure	0.97
Octanol	1.58	ω -Hydroxy-nonansäure	1.14
Crotonalkohol	1.25	ω -Hydroxy-decansäure	1.28
Hexen-(3)-ol-(1)	1.44	<i>ω-Hydroxyketonen</i>	
<i>ω-Hydroxysäure-methylester von</i>		Hydroxyaceton	0.52
Glykolsäure	0.65	Butanol-(1)-on-(3)	0.57
		Pentanol-(1)-on-(4)	0.62

NABS-Ester höherer Alkohole ab C₈ (teilweise bearbeitet von R. BECKMANN): Man hydrophobiert Streifen von SS 2045 b durch Eintauchen in eine 2-proz. Lösung von Quilon*) in Propanol-(2) und trocknet sie bei 100° im Trockenschrank. Auf unten ausgezackte Streifen solchen „Quilon-Papiers“ werden je 5–20 µg pro Ester in Flecken von 1–1.5 cm Durchmesser aufgetragen. Der Streifen wird dann in nitromethangesättigtes Nonan soweit eingetaucht, daß die Flecken am Start gerade noch nicht mit dem Lösungsmittel in Berührung kommen. Überschüssiges Nonan wird schnell zwischen Filtrierpapier abgepreßt und die so mit stationärer Phase beladenen Streifen 8–10 Stdn. absteigend mit nonangesättigtem Nitromethan entwickelt. Nach dem Trocknen erkennt man die Flecken wie oben angegeben. Ihre Laufstrecke hängt von der Menge der stationären Phase auf dem Papier und der Entwicklungsdauer ab. Da es sich außerdem um ein Durchlaufchromatogramm handelt, bezieht man die Laufstrecke der Ester auf die Laufstrecke des NABS-Esters des Cholesterins¹⁾ (R_C -Werte; Tab. 4) und wählt die Entwicklungszeit so, daß dieser Ester etwa 1–3 cm wandert. Nonan kann auch durch Decan ersetzt werden, die Neigung der Ester zur Schwanzbildung ist dann etwas größer, so daß kleinere Mengen aufzutragen sind.

Tab. 4. Beispiele für R_C -Werte einiger NABS-Ester höherer Alkohole im System Nonan/Nitromethan

NABS-Ester von	R_C -Wert	NABS-Ester von	R_C -Wert
Octanol	8.10	Cholesterin	1.00
Decanol	6.35	Petrosilinalkohol	2.60
Dodecanol	4.60	$\Delta^{10,12}$ -Hexadecadienol-(1) (Bombykol)	5.10
Tetradecanol	3.20	Farnesol	7.50
Hexadecanol	2.05	Geraniol	9.30

In beiden hier zur Chromatographie von NABS-Estern von Alkoholen beschriebenen Systemen gilt für deren *Wanderungsgeschwindigkeit eine Regel*, die wir auch bei säulenchromatographischen Trennungen gefunden haben¹⁾ und die sich mehrfach als sehr nützlich erwies^{7,18)}. Bei Anwesenheit von Doppelbindungen in einem NABS-Ester ist dessen Laufstrecke, verglichen mit der des NABS-Esters des entsprechenden gesättigten Alkohols, verkürzt, und zwar derart, daß der Ester eines ungesättigten Alkohols mit Y C-Atomen und X Doppelbindungen etwa ebenso schnell läuft wie der Ester eines gesättigten Alkohols mit $Y-2X-1$ C-Atomen, gleichgültig, ob die Doppelbindungen konjugiert sind oder nicht. Ester verzweigter Alkohole wie Geraniol und Farnesol, laufen etwa wie der NABS-Ester eines gesättigten unverzweigten Alkohols mit $Y-2X$ C-Atomen. Diese Faustregel spiegelt sich in den R_C -Werten von Tab. 4 wider.

Monocarbonsäure-hydroxamate: Die im Trennungsgang anfallenden freien Säuren werden mit Diazomethan verestert und mit Hydroxylaminreagenz auch in Mikromengen in guter Ausbeute in die Hydroxamsäuren übergeführt. Das Reagenz wird aus folgenden Lösungen erhalten: A) 1 n Hydroxylamin-hydrochlorid in Methanol, B) 1 n KOH in Methanol, C) Tetrahydrofuran/Eisessig (4:1); man mischt 1 Vol. A und 2 Vol. B und saugt das entstehende KCl ab. Diese Reagenz-Lösung (D) hält sich nur wenige Stunden.

Man gibt zu einem mMol Ester 3 ccm der Hydroxylaminreagenz-Lösung D und hält 30 Min. bei 25°, dann neutralisiert man mit C, wobei pro 3 ccm D 0.3 ccm C verbraucht werden. Die neutralisierte Lösung wird auf das Papier aufgetragen. Fleckennachweis: Nach Trocknen des Papiers bei 90° (5 Min.) mit 2-proz. Lösung von FeCl₃ in Äthanol/Butanol (4:1).

*) Stearinsäure-Chromchlorid-Komplex der Dupont de Nemours, Wilmington, Delaware, USA.

Hydroxamate der unverzweigten Monocarbonsäuren bis C₈ werden auf SS 2043 b mit der Oberphase des Systems Amylalkohol (40)/Eisessig (10)/Wasser (50) auf bekannte Weise¹⁴⁾ getrennt.

Hydroxamate der unverzweigten Monocarbonsäuren von C₉ bis C₂₂ werden auf SS 2043 b (acetyliert, 20–25 % Acetyl) in einem System chromatographiert, das mehr Eisessig als das in der Literatur angegebene System³⁰⁾ enthält: Essigsäureäthylester (12)/Tetrahydrofuran (70)/Wasser (94)/Eisessig (9) (Tab. 5, System A).

Hydroxamate methylverzweigter Monocarbonsäuren bis C₆ lassen sich auf SS 2043 b trennen, wenn man in der Horizontalkammer nach R. STROBEL³¹⁾ mit der wasserarmen Phase des Systems n-Octanol (75)/Wasser (75)/Ameisensäure (25)/Heptan (5) entwickelt. Der in die Kammer eingespannte Streifen wird zunächst 8 Stdn. mit Wasserdampf gesättigt, dann das Laufmittel (Tab. 5, System B) in den dazu vorbereiteten Trog gegeben, Laufzeit 30–40 Stdn. Während des Entwickelns ist Temperaturkonstanz zu wahren und die Kammer auch vor geringer Zugluft durch geeignete Isolierung zu schützen.

Tab. 5. *R_F*-Werte einiger Hydroxamate in den Systemen A und B. Erläuterungen im Text

Hydroxamsäure der	<i>R_F</i> -Wert	Hydroxamsäure der	<i>R_F</i> -Wert
<i>System A</i>			
Caprinsäure	0.77	Buttersäure	0.48
Laurinsäure	0.69	α-Methyl-buttersäure	0.68
Myristinsäure	0.60	β-Methyl-buttersäure	0.71
<i>System B</i>			
Essigsäure	0.09	Valeriansäure	0.75
Propionsäure	0.22	γ-Methyl-valeriansäure	0.88
Isobuttersäure	0.43	β-Methyl-valeriansäure	0.92
		Capronsäure	0.94

Dicarbonensäuren: Oxalsäure und Malonsäure werden nach ISHERWOOD^{12a)} auf Whatman Nr. 1 im System Propanol (60)/konz. Ammoniak (40) durch absteigendes Entwickeln getrennt. Bernsteinsäure bis Sebacinsäure trennt man auf demselben Papier durch absteigendes Entwickeln im System Äthanol (80)/16-proz. wäbr. Äthylamin (20)^{12b)}.

Oxydative Spaltung

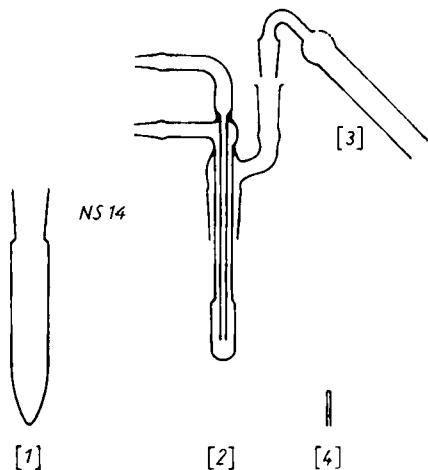
In ein Zentrifugenglas mit Schliff (Abbild. 1) wird 1 mg des NABS-Esters eingewogen und 0.3 ccm getrocknetes Aceton p. a. sowie ein Siedestäbchen hinzugegeben. In das Glas wird ein als Rückflußkühler wirkender Kühlfinger eingesetzt, dessen äußere Öffnung durch ein CaCl₂-Rohr verschlossen ist. Das Derivat löst sich beim Erwärmen. Dann wird die Apparatur in einer Trockeneis/Aceton-Kältemischung gekühlt, und durch einen Trichter wird ein Sechstel von 100 mg fein gepulvertem KMnO₄ p. a. eingetragen. Die Apparatur wird wieder mit dem Kühlfinger verschlossen und in ein Glycerinbad von 65° auf einer automatisch regulierten Heizplatte 2 cm tief eingetaucht. Nach 15 Min. trägt man nach Kühlung wie oben in Kältemischung ein weiteres Sechstel des KMnO₄ ein und erhitzt anschließend wieder im Glycerinbad. Dies wird noch 4 mal wiederholt. Nach 75 Min. gibt man mit dem letzten KMnO₄ noch 0.1 ccm Aceton hinzu und erhitzt weitere 5 Stdn. am Rückflußkühler.

Abdestillieren des Lösungsmittels und der Ketone. Zerstörung des überschüssigen Permanganats: Nach Abkühlen in der Kältemischung wird die Apparatur geöffnet und das Zentrifugenglas mit der oben beschriebenen Hochvakuumanlage verbunden. Bei 2×10^{-1} Torr wird das Aceton in eine Kühlschlange abdestilliert und bei 3×10^{-3} Torr die möglicherweise entstandenen Ketone. Nach beendeter Destillation wird auf das Zentrifugenglas mit dem trockenen Rück-

³⁰⁾ F. MICHEL und H. SCHWEPPE, Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta 1954, 53.

³¹⁾ R. STROBEL, Dissertat. Univ. München 1958.

stand der Kühlfinger aufgesetzt. Durch einen dünnen Polyäthylenschlauch spritzt man zur Zerstörung des nicht verbrauchten KMnO_4 0.2 ccm verd. Ameisensäure (1.2 mMol/ccm) und durchrührt durch Einblasen von Luft. Man wiederholt dies mit 0.2 ccm und 0.1 ccm verdünnter Ameisensäure, so daß insgesamt 0.6 mMol zugegeben werden. Nach beendeter Zugabe ist der Inhalt des Zentrifugenglases sauer.



Abbild. 1

Zentrifugenglas [1] mit Kühlfinger [2], CaCl_2 -Rohr [3] und Siedestäbchen [4] zur oxydativen Spaltung von Mikromengen der NABS-Ester ungesättigter Alkohole

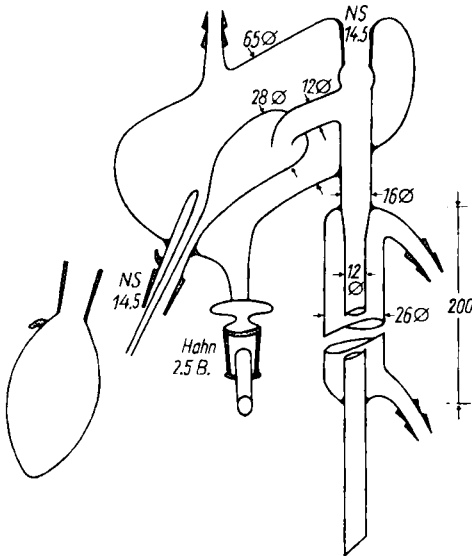
Extraktion der Monocarbonsäuren, Dicarbonsäuren und Ketosäuren: Zur Extraktion der bei der Spaltung entstandenen Monocarbonsäuren, Dicarbonsäuren und Ketosäuren werden langsam 0.2 ccm 3.6 n KHCO_3 eingespritzt, zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, der Rückstand zur weiteren Extraktion zweimal mit 0.5 ccm 1 n KHCO_3 gewaschen, zentrifugiert und abpipettiert. Die Überstände werden im Kolben der Wasserdampfdestillationsapparatur (Abbild. 2) vereinigt. Zum Nachweis von Ketosäuren entnimmt man gegebenenfalls $\frac{1}{5}$ des Inhalts und lyophilisiert.

Isolierung des NABS-Derivatbruchstückes: Das Zentrifugenglas mit dem Rückstand der KHCO_3 -Extraktion wird mit einem Kühlfinger verschlossen, durch dessen Öffnung ein Polyäthylenschlauch auf den Grund des Glases geführt wird. Man spritzt wie oben langsam viermal 0.2 ccm 1 n H_2SO_4 ein und durchmischt zwischendurch mit Luft. Zur Zerstörung des Mangandioxyds wird SO_2 eingeleitet. Das NABS-Derivatbruchstück fällt als roter Niederschlag aus, der nach dem Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes mehrfach mit Wasser gewaschen und durch Lyophilisieren getrocknet wird.

Veresterung des NABS-Derivatbruchstückes: Der trockene Niederschlag des NABS-Esters wird in 0.2 ccm Methylenchlorid aufgelöst und mit Diazomethan in Methylenchlorid (0.7 mMol Diazomethan pro 1 ccm) verestert; dabei geht der Niederschlag in Lösung. Man läßt 2 Std. stehen und dampft das Methylenchlorid bei vermindertem Druck ab. Der Rückstand wird in möglichst wenig Benzol aufgenommen und auf eine Säule von 8 mm Durchmesser, in die 10 g saures Al_2O_3 der Aktivität III mit wasserfreiem Benzol eingeschlämmt wurde, aufgebracht und mit Benzol eluiert. Dabei werden das nicht umgesetzte Diazomethan zerstört und alle bei der Veresterung entstandenen Verunreinigungen abgetrennt. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wird der Rückstand wieder in 0.2 ccm Benzol aufgenommen und zur papierchromatographischen Identifizierung verwandt.

Abtrennung der Monocarbonsäuren von den Dicarbonsäuren: Die vereinigten Überstände der KHCO_3 -Extraktion werden mit 2 ccm 1 n H_2SO_4 angesäuert und in die Apparatur zur Wasserdampfdestillation gegeben. Man bläst so lange Dampf ein, bis 100 ccm Destillat über-

gegangen sind. Dann läßt man die Apparatur erkalten und spült von dem Verschuß aus die möglicherweise noch im Anfangsteil des Kühlers haftenden höheren Fettsäuren mittels Äthers herunter. Das Destillat wird dann mit $n/10$ NaOH gegen Phenolphthalein titriert.



Abbild. 2
Apparatur zur Wasserdampfdestillation
der Monocarbonsäuren bis Palmitinsäure.
Zahlenangaben in mm

Isolierung der Dicarbonsäuren: Der Rückstand der Wasserdampfdestillation wird mit 2 ccm $1 n$ K_2CO_3 neutralisiert und lyophilisiert. Der reichlich anorganische Salze enthaltende Trockenrückstand wird in ein Zentrifugenglas übergeführt, unter Eiskühlung in 2 ccm Wasser gelöst, mit 0.5 ccm konz. Schwefelsäure p. a. versetzt und 6mal mit 5 ccm Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte werden mit weiteren 20 ccm Äther verdünnt und mehrmals mit wenig Wasser kongoneutral gewaschen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand über Nacht i. Vak. über KOH getrocknet. Der Rückstand wird in 20 μ l verd. Ammoniak aufgenommen. Von dieser Lösung werden etwa 15 μ l zur Papierchromatographie aufgetragen.

Herstellung der Monocarbonsäure-methylester: Das die Monocarbonsäuren enthaltende Wasserdampfdestillat wird mit 2 g festem Na_2CO_3 p. a. alkalisiert, auf dem Wasserbad erhitzt und zur Zerstörung der überschüssigen Ameisensäure mit $n/10$ $KMnO_4$ titriert; vom abgeschiedenen Mangandioxyd wird abfiltriert. Das Gemisch aus K_2CO_3 und den Kaliumsalzen der Monocarbonsäuren wird in den Kolben der Wasserdampfdestillations-Apparatur übergeführt, mit 3 ccm $1 n$ H_2SO_4 versetzt und die Wasserdampfdestillation wiederholt. Die 100 ccm Wasserdampfdestillat werden mit $n/10$ NaOH titriert und über Nacht lyophilisiert. Der Salzurückstand wird in ein Zentrifugenglas übergeführt und mit 0.4 ccm $1 n$ H_2SO_4 versetzt. Man rührt längere Zeit um, zentrifugiert und pipettiert den Überstand ab. Das Sediment wird noch 2 mal mit 0.6 ccm wasserfreiem Dioxan in derselben Weise nachgewaschen. Die vereinigten Dioxanlösungen werden mit Diazomethan in Dioxan verestert.

Überführung in die Monocarbonsäure-hydroxamate: Zu der Lösung der Monocarbonsäuremethylester in Dioxan werden 0.6 ccm Hydroxylaminreagenz (Lösung D) gegeben; die Mischung wird 30 Min. bei 25° gehalten. Danach wird mit 0.06 ccm Eisessig in Tetrahydrofuran (Lösung C) neutralisiert. Das Dioxan wird i. Vak. abgedampft und der Rückstand in absol. Methanol aufgenommen.