

Im Stoff von Smp. 96—97° dürfte die β -Triacetyl-D-digitalose (IX) und im Stoff vom Smp. 115—117° die α -Triacetyl-D-digitalose (X) vorliegen.

Fraktionen 17—23 lieferten 60 mg gelben Sirup, aus dem keine Krystalle zu erhalten waren.

In weiteren Ansätzen liess sich die β -Triacetyl-D-digitalose (IX), die den Hauptteil des Acetatgemisches ausmacht, durch Impfen des in Äther-Petroläther gelösten Rohsirups direkt krystallisiert erhalten. Eine Probe von synthetischer D-Digitalose (XI) wurde wie oben beschrieben acetyliert und gab nach Impfen mit kryst. IX Krystalle, die bei 96—97° schmolzen; ebenso schmolz die Mischprobe.

Die Mikroanalysen wurden teils im Laboratorium von *F. Weiser*, Basel (*F. W.*), teils im mikroanalytischen Laboratorium der Organ.-chem. Anstalt der Universität Basel (*O. A. B.*) ausgeführt.

Zusammenfassung.

1. D-Digitalose wurde ausgehend vom 4,6-Benzal- α -methyl-D-galaktosid-(1,5)-3-methyläther synthetisiert.

2. Die Bereitung von krystallisierter β -Triacetyl-D-digitalose und krystallisierter α -Triacetyl-D-digitalose wird beschrieben.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

25. Versuche zur Herstellung künstlicher Komplexantigene der Steroidreihe.

1. Mitteilung.

Diazotierbare Ester des Δ^5 -Androsten-3 β , 17 β -diols

von *C. A. Grob* und *M. W. Goldberg*¹⁾.

(18. XII. 48.)

Im Zusammenhang mit Versuchen zur Feststellung der potentiellen Antigenität von Steroiden²⁾ haben wir uns vor einigen Jahren mit dem Problem der Herstellung künstlicher Komplexantigene dieser Verbindungsklasse befasst. Vom chemischen Standpunkt aus kommt es darauf an, Methoden anzuwenden, welche es gestatten, Steroidmolekel in Proteine einzubauen, ohne dass Abbau oder Denaturierung der letzteren eintritt. Zu den wichtigsten dieser Verfahren gehört die von *Landsteiner*³⁾ eingeführte Diazoniummethode, bei welcher die einzuführende Molekel als Diazoniumsalz mit dem Protein gekuppelt wird. So ist es in letzter Zeit *Hooker* und *Boyd*⁴⁾

¹⁾ Jetzige Adressen: *C.A.G.*, Chemische Anstalt der Universität Basel; *M.W.G.*, Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, New Jersey, USA.

²⁾ Diese Arbeit wurde von Prof. *H. Mooser*, Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Zürich, der die biologischen Versuche durchgeführt hat, angeregt.

³⁾ *Landsteiner*, The Specificity of Serological Reactions, S. 101, Springfield 1936.

⁴⁾ *Hooker* und *Boyd*, *J. Immunol.* **38**, 479 (1940).

gelingen, mittels dieser Methode Strychnin und Eiweiss zu einem Antigen zu verbinden. Ferner gelang es *King* und *Franks*¹⁾ diazotierten Oestron-p-aminophenyläther an Casein zu kuppeln. Ebenfalls grosse Bedeutung zur Herstellung markierter Antigene besitzt die Azidmethode. Diese beruht darauf, dass sich Säureazide mit freien Aminogruppen von Proteinen umsetzen. Ein Beispiel dieser Art beschreiben *Butler* und Mitarbeiter²⁾. Diese Autoren stellten ein Antigen her, indem sie Acetyl-salicylsäure über das Säurechlorid in ein Azid überführten und letzteres mit Serumglobulin kuppelten. Als weitere, ebenfalls schonende Methoden zur Einführung von Substituenten in Proteinmolekeln seien die Oxazonmethode³⁾ und die Isocyanatmethode⁴⁾, welche in letzter Zeit häufig verwendet wurde, erwähnt. Wir berichten im folgenden über die Herstellung von Androstendiolestern der 4-Amino-2-sulfo-benzoessäure und deren Kupplung mit verschiedenen Proteinen nach der Diazoniummethode⁵⁾.

Da das Δ^5 -Androsten-3 β -17 β -diol⁶⁾ keine funktionelle Gruppe besitzt, mit der eine direkte Umsetzung mit Proteinen möglich wäre, ist es notwendig, zuerst ein Derivat herzustellen, welches direkt oder nach entsprechender Umwandlung diazotiert und mit Eiweiss gekuppelt werden kann. Als diazotierbare Komponente schien uns ein Säurechlorid oder Anhydrid, welches eine diazotierbare Aminogruppe, resp. eine reduzierbare Nitrogruppe, enthält, geeignet. Wir verwendeten zunächst die p-Aminobenzoessäure und setzten diese mit Androstendiol-3-monoacetat (I) um. Infolge der äusserst geringen Löslichkeit der Salze dieses Aminoesters II war es nicht möglich, die Verbindung zu diazotieren, so dass nach löslicheren Derivaten der p-Aminobenzoessäure gesucht wurde. Wir entschlossen uns daher zur Verwendung der 4-Amino-2-sulfo-benzoessäure (III). Zur Herstellung von Halbestern dieser Säure kommen die Chloride und Anhydride IV bis VII in Betracht, wobei sich später allerdings nur das Anhydrid der 4-Nitro-2-sulfo-benzoessäure (VII) als brauchbar erwies.

Die 4-Amino (resp. 4-Nitro)-2-sulfo-benzoessäure, welche zur Herstellung der Verbindungen IV bis VII in Frage kommt, ist in der Literatur beschrieben⁷⁾. Von den 4 Verbindungen IV bis VII war nur das Dichlorid der 4-Nitro-2-sulfo-benzoessäure (V) bekannt.

1) *King* und *Franks*, Am. Soc. **63**, 2042 (1941).

2) *Butler*, *Harington* und *Yuill*, Biochem. J. **34**, 831 (1940).

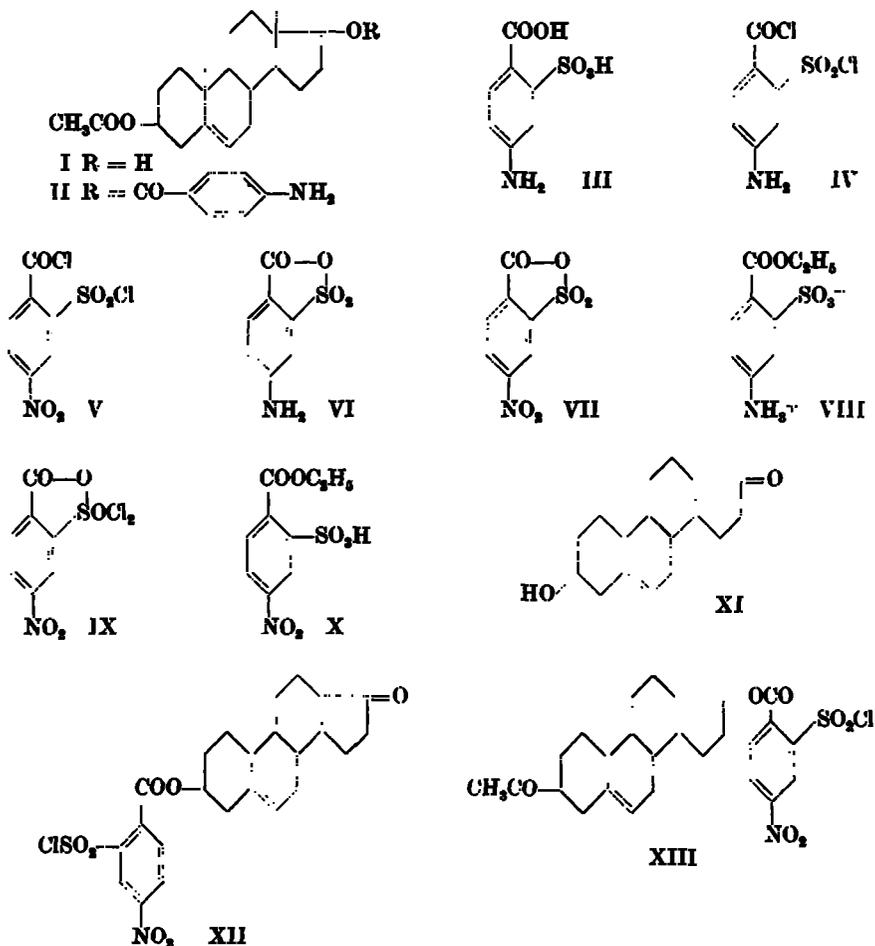
3) *Lettré* und *Fernholz*, Z. physiol. Ch. **266**, 31, 37 (1940); *Lettré*, *Buchholz* und *Fernholz*, ibid. **267**, 108 (1941).

4) *Hopkins* und *Wormall*, Biochem. J. **33**, 908 (1939); *Fieser* und *Creech*, Am. Soc. **61**, 3502 (1939); *Creech* und *Jones*, Am. Soc. **63**, 1661 (1941); *Green* und *Creech*, Am. Soc. **68**, 2401 (1946).

5) Keiner der dargestellten Ester besass antigene Eigenschaften; s. *Mooser* und *Grilichess*, Schw. Z. Path. Bakt. **4**, 375 (1941).

6) Im folgenden Androstendiol genannt.

7) *Hedrick*, Am. **9**, 411 (1887); *Kastle*, Am. **11**, 179 (1889); *Taverne*, R. **25**, 63 (1906).



Dieses wurde von *Kastle*¹⁾ durch Erhitzen der freien Säure oder des sauren Natriumsalzes mit Phosphorpentachlorid erhalten. Wir versuchten, diese Reaktion auf die 4-Amino-2-sulfo-benzoesäure zu übertragen und erhielten das Säuredichlorid IV als unreines Öl, welches sich weder krystallisieren noch destillieren liess. Durch Behandlung mit Alkohol gewannen wir daraus in nur schlechter Ausbeute den Monoäthylester VIII, welcher ein inneres Salz bildet. Das Säuredichlorid IV wies überdies derart unerfreuliche Eigenschaften auf, dass auf seine weitere Verwendung verzichtet wurde.

Bei der erwähnten Herstellung des Dichlorids der 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure nach *Kastle* entsteht kein einheitliches Produkt, sondern ein Gemisch von zwei Isomeren. *Remsen* und *Gray*²⁾ schreiben

¹⁾ *Kastle*, Am. 11, 179 (1889).

²⁾ *Remsen* und *Gray*, Am. 19, 496 (1897).

den beiden Formen in Analogie zu den zwei isomeren Phtalylechloriden die Formeln V und IX zu, nämlich die symmetrische Form V dem bei 98° schmelzenden Produkt und die unsymmetrische Form IX dem Körper vom Smp. 57°. Da aber nach *Henderson*¹⁾ beide Isomeren mit Alkohol denselben bei 65° schmelzenden Halbester X liefern, kann auf die Isolierung der einzelnen Isomeren verzichtet werden. Wir haben diese Angaben bestätigen können und den Halbester X mit Wasserstoff in Gegenwart von *Raney-Nickel* zum früher erhaltenen Äthylester der 4-Amino-2-sulfo-benzoesäure (VIII) reduziert. Weniger gut verlief die Reduktion mit Ammonsulfid.

Um Erfahrungen für die Veresterung mit Steroiden zu sammeln, haben wir das Dichlorid V auch mit der berechneten Menge absoluten Äthylalkohols in Gegenwart von Pyridin verestert und ebenfalls den Monoäthylester X erhalten. Bei dieser Operation wird also die Sulfochlorid-gruppe in die freie Sulfosäure-gruppe verwandelt. Bei der Veresterung des Dichlorides V mit β -Dehydroandrosteron (XI) in analoger Weise wurde ein krystallines, chlorhaltiges Produkt erhalten, welches auf Grund der Analyse das Sulfochlorid des Nitrosulfobenzoesäure-esters des β -Dehydroandrosterons (XII) sein dürfte. Es war also in diesem Fall die Sulfochloridgruppe nicht verseift worden. Bei Versuchen dies nachträglich zu tun, wurden nur uneinheitliche Produkte erhalten, aus denen sich keine krystallinen Verbindungen isolieren liessen.

Das Dichlorid V wurde in gleicher Weise mit Androstendiol-3-monoacetat (I) umgesetzt. Auch hier wurde eine chlorhaltige, krystalline Verbindung isoliert, welche auf die Formel eines Sulfochlorid-esters XIII stimmende Analysenwerte gab. Die Verbindung liess sich durch wässriges Dioxan in Gegenwart von Natriumacetat nicht verseifen. Auch gelang es nicht, mit Wasserstoff in Gegenwart von Platin durch Reduktion der Nitrogruppe unter reduktiver Eliminierung des Chlors zu einheitlichen Verbindungen zu gelangen. Wir gaben deshalb die Versuche mit dem Dichlorid der 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure (V) auf und untersuchten die Endoanhydride der 4-Amino- (resp. 4-Nitro-)2-sulfo-benzoesäure (VI) resp. (VII).

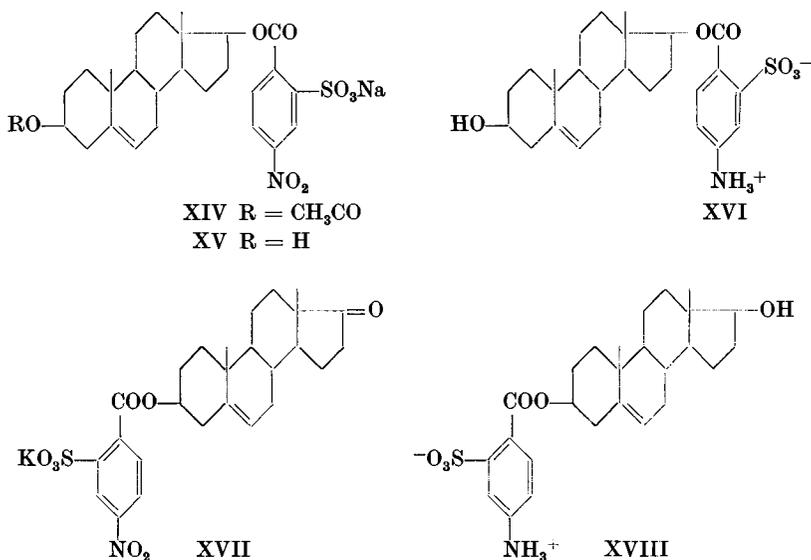
Das Endoanhydrid der unsubstituierten o-Sulfo-benzoesäure entsteht leicht aus der freien Säure durch Erhitzen mit oder ohne Phosphorpentoxyd, sowie durch Behandlung mit Acetylchlorid. Aus dem neutralen Kaliumsalz wird es durch Erwärmen mit Phosphor-pentachlorid erhalten und aus dem sauren Kaliumsalz mit Phosphor-pentachlorid, Thionylchlorid oder Phosphorpentoxyd²⁾. Auf die 4-Amino-2-sulfo-benzoesäure übertragen, führte keine dieser Methoden zum Ziel. Die 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure ging jedoch nach

¹⁾ *Henderson*, Am. **25**, 1 (1901).

²⁾ Vgl. die Literaturübersicht in: *Organ. Syntheses*, Coll. Vol. **1**, 495 (1946).

diesen Verfahren in durchwegs guten Ausbeuten in das 4-Nitro-2-sulfo-benzoessäure-endoanhydrid (VII) über, wie im experimentellen Teil näher beschrieben wird. Mit Alkohol geht dieses Anhydrid glatt in den früher erwähnten Monoäthylester X über.

Wir führten zunächst die Synthese des Androstendiol-17-(4'-amino-2'-sulfosäure)-benzoats (XVI) durch. Das Nitro-sulfobenzoesäure-anhydrid (VII) liess sich in benzolischer Lösung glatt mit Androstendiol-3-monoacetat (I)¹⁾ umsetzen. Der erhaltene Ester (XIV, H statt Na) konnte jedoch nicht mit freier Sulfogruppe isoliert werden, da sich die Verbindung in dieser Form nach längerem Stehen in Lösung oder nach dem Abdampfen des Lösungsmittels rasch verfärbt. Durch Zusatz von Natriumcarbonat oder Pyridin erhält man aber beständige Salze (XIV), welche mit Natriumcarbonatlösung direkt in 3-Stellung partiell verseift werden können. Interessanterweise ist das so erhältliche Salz XV benzollöslich und kann dadurch bequem von den begleitenden Salzen rein abgetrennt werden.



Die Hydrierung des Natriumsalzes XV über *Raney*-Nickel führte zum Natriumsalz des Amins XVI, und zwar unter Bedingungen, bei denen eine Absättigung der 5,6-ständigen Doppelbindung im Steroidgerüst ausgeschlossen ist. Aus dem Natriumsalz kann der freie Aminosulfobenzoäureester XVI, welcher sicherlich als inneres Salz vorliegt, nach Ansäuern mit Mineralsäuren krystallin erhalten werden. Die Bereitung der freien Sulfosäuren auf diese Weise gelingt nur bei den Aminosulfosäuren, wie III und VIII.

¹⁾ *Ruzicka und Wettstein, Helv. 18, 1273 (1935).*

Neben der Verbindung XVI interessierten wir uns für den analogen Ester mit einer freien Hydroxylgruppe an C-17, nämlich das 4⁵-Androsten-3,17-diol-3-(4'-amino-2'-sulfosäure)-benzoat (XVIII). Zu seiner Darstellung wurde β -Dehydroandrosteron (XI) mit Nitrosulfobenzoesäure-anhydrid (VII) zum kristallinen Ester XVII (H statt K) umgesetzt, der aber wiederum erst nach Überführung in ein Salz der Sulfosäure beständig war. Mit Wasserstoff über Raney-Nickel wurde gleichzeitig die Nitrogruppe und die 17-ständige Keto-Gruppe des Kaliumsalzes dieses Esters XVII reduziert. Die Hydrierung gelang auch mit dem Pyridinsalz des Esters XVII (Pyridiniumion statt K). Durch Ansäuern mit Salzsäure liess sich die freie Aminosulfosäure XVIII bereiten, welche nur mit grosser Mühe zur Krystallisation zu bringen war.

Die beiden so hergestellten Aminosulfobenzoesäure-ester XVI und XVIII wurden nach der Diazoniummethode an verschiedene Eiweissarten, nämlich Hühnereiweiss, Rinderalbumin, Casein und Pferdeserum gekuppelt. Allgemein wurden die wasserlöslichen Natriumsalze der Ester mit der berechneten Menge Nitrit diazotiert. Da in salzsaurer Lösung die freien Aminosäuren aus den Natriumsalzen gefällt werden, wurden die Lösungen der Natrium-ester-salze in die vorgelegte, berechnete Menge Nitrit in verdünnter Salzsäure einlaufen gelassen. Die so erhältlichen, gelben Diazoniumsalze dürfen nicht längere Zeit, auch nicht bei 0°, aufbewahrt werden, weil einerseits die Lösungen gallertig und opaleszierend werden und andererseits die Gefahr der Selbstkupplung der Diazoniumsalze besteht.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass unter den eingehaltenen Bedingungen, also einerseits in kalter, verdünnter Salzsäure und andererseits in kalter, soda-alkalischer Lösung keine Verseifung der Aminobenzoesäure-ester stattfindet. Es wurde auch festgestellt, dass beim Erwärmen von Androsten-diol-17-(4'-amino-2'-sulfosäure)-benzoat (XVI) mit 0,5-n. alkoholisch-wässriger Kalilauge während zwei Stunden keine nennswerte Verseifung stattfindet.

Ein Diazoniumsalz wurde in soda-alkalischer Lösung gekuppelt, indem es bei 0° der alkalischen Eiweisslösung zugegeben wurde. Der Endpunkt der Reaktion wurde jeweils durch Tüpfeln mit R-Salzlösung festgestellt. Die verschiedenen Eiweissarten wurden mit wechselnden Mengen des Steroidesters aufgeladen. Je nach der Menge waren die Azoproteine in neutraler Lösung gelb bis braun, in alkalischer Lösung mehr oder weniger rötlich gefärbt. Die Azoproteine hatten zudem die Tendenz, besonders wenn stark aufgeladen, schon in neutraler Lösung auszufallen. Durch Zutropfen von wenig Soda-lösung konnten sie jeweils wieder gelöst werden. Die beste Löslichkeit wiesen die Kupplungsprodukte mit Casein auf, welche auch bei sehr starker Aufladung nie ausflockten.

Dass jeweils eine Kupplung auch tatsächlich stattfand, ist durch die Verwandlung der verwendeten, fast farblosen Seren oder Eiweisslösungen in die typisch braunen Azoproteine wahrscheinlich gemacht. Auch die Verschiebung des isoelektrischen Punktes der Proteine gegen höhere p_H -Werte liess auf eine Veränderung der Proteinmolekel schliessen. Es schien aber trotzdem ratsam, wenigstens in einem Falle die Anwesenheit des Androstendiol-Restes in einem Azoprotein nachzuweisen. Zu diesem Zwecke wurde das durch Umfällen gereinigte Protein (Δ^5 -Androstendiol-17-(4'-amino-2'-sulfo)-benzoat an Casein gekuppelt) im Soxhlet-Apparat durch erschöpfende Extraktion mit Alkohol und Äther weiter gereinigt. Dann wurde das Eiweiss mit Natronlauge hydrolysiert, wobei natürlich alles an Amino-sulfo-benzoesäure gebundene Androstendiol verseift und damit von den Aminosäuren des Caseins abgelöst wurde. Dieses Androstendiol müsste sich durch Extraktion des Hydrolysats mit Äther isolieren lassen. Tatsächlich gelang es, eine kleine Menge Substanz zu isolieren, welche sich mittels p-Nitrobenzoylchlorid in ein krystallisiertes Derivat überführen liess. Letzteres war mit auf normalem Wege hergestelltem Δ^5 -Androstendiol-3,17-bis-p-nitrobenzoat nach Schmelzpunkt und Mischprobe identisch.

Experimenteller Teil¹⁾.

Dichlorid der 4-Amino-2-sulfo-benzoesäure (IV).

10 g getrocknete Aminosulfo-benzoesäure wurden mit 19 g Phosphorpentachlorid im Mörser innig verrieben und in einem Rundkolben mit Rückflusskühler unter Feuchtigkeitsabschluss im Ölbad langsam auf 140° erhitzt, wobei das Gemenge unter Salzsäureentwicklung schmolz und zu kochen anfang. Die Masse wurde weitere 10 Minuten bei dieser Temperatur belassen. Nach dem Erkalten wurde der gelbe Brei im Scheidetrichter mit Eis versetzt, durch Zugabe von eiskalter Sodalösung eben lakmussauer gestellt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Dabei traten regelmässig lästige Emulsionen auf, die nur nach längerem Stehen bei tiefer Temperatur vergingen. Die Chloroformlösung wurde achtmal mit je 50 cm^3 Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Es hinterblieben $7,2\text{ g}$ eines stark schäumenden, dickflüssigen Öls, welches jedoch nicht krystallisierte.

Monoäthylester VIII. Das rohe Säurechlorid wurde gleich mit 50 cm^3 absolutem Äthanol während 8 Stunden gekocht, wobei zuerst alles in Lösung ging und dann allmählich Abscheidung eines weissen Niederschlags von Monoäthylester erfolgte. Dieser wurde nach dem Erkalten abgenutscht und wog nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator $2,0\text{ g}$. Das Filtrat wurde im Vakuum zur Trockne verdampft, wobei $6,7\text{ g}$ eines roten Öls zurückblieben. Dieses wurde mit 200 cm^3 absolutem Äthanol weitere 6 Stunden gekocht. Es konnten jedoch nur noch $0,5\text{ g}$ Äthylester gewonnen werden. Durch mehrmaliges Umkrystallisieren aus Wasser-Alkohol wies der Ester einen Zersetzungspunkt von 260 bis 270° auf.

$4,225\text{ mg}$ Subst. gaben $6,840\text{ mg CO}_2$ und $1,750\text{ mg H}_2\text{O}$

$4,152\text{ mg}$ Subst. gaben $0,215\text{ cm}^3\text{ N}_2$ (21° , 723 mm)

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_5\text{NS}$	Ber. C	44,07	H	4,52	N	5,71%
	Gef. „	44,18	„	4,64	„	5,72%

¹⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

Monoäthylester der 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure (X).

2 g Nitro-sulfo-benzoesäure-dichlorid¹⁾, 0,35 cm³ absolutes Äthanol und 0,3 cm³ absolutes Pyridin wurden in 10 cm³ absolutem Benzol gelöst und drei Stunden unter Rückfluss gekocht. Dann wurde vom ausgeschiedenen Pyridin-hydrochlorid abfiltriert und die Benzollösung eingedampft. Die zurückbleibende, ölige Masse krystallisierte beim Stehen. Aus Benzol umgelöst, schmolz die Substanz bei 65°, was mit den Angaben von *Henderson*²⁾ übereinstimmt.

Umsatz von Nitro-sulfo-benzoesäure-dichlorid mit β -Dehydroandrosteron zu XII³⁾.

1 g β -Dehydroandrosteron, in 5 cm³ absolutem Benzol und 6 cm³ absolutem Pyridin gelöst, wurden mit einer Lösung von 1g Dichlorid in 10 cm³ absolutem Benzol versetzt und zwei Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten wurde vom Bodensatz abfiltriert und das Filtrat zur Trockne verdampft, wobei 2,18 g eines zähen Öles hinterblieben. Nach dem Umlösen aus Chloroform-Essigester wurden 850 mg eines krystallinen, chlorhaltigen Produktes erhalten, das bei 182–84° unter Zersetzung schmolz. Nach weiterem, zweimaligem Umlösen aus Aceton-Wasser schmolz die Substanz konstant bei 185° unter Zersetzung. Sie wurde 14 Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

4,510 mg Subst. gaben 9,65 mg CO₂ und 2,32 mg H₂O
 C₂₆H₃₀O₇NCIS Ber. C 58,25 H 5,64% Gef. C 58,39 H 5,76%

Umsatz von Nitro-sulfo-benzoesäure-dichlorid mit Δ^5 -Androsten-3 β ,17 β -diol-3-monoacetat zu XIII³⁾.

450 mg Androstendiol-3-monoacetat, 0,9 g Nitrosulfobenzoesäure-dichlorid und 0,2 cm³ absolutes Pyridin wurden in 10 cm³ absolutem Benzol gelöst und drei Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde vom Bodensatz abfiltriert und die Benzollösung im Vakuum abgedampft, wobei ein chlorhaltiges, gelbliches Pulver zurückblieb. Dieses krystallisierte aus Aceton-Wasser in schönen Nadeln und schmolz nach viermaligem Umlösen aus Aceton-Wasser bei 205–208° unter Zersetzung. Das Präparat wurde 14 Stunden im Hochvakuum bei 115° getrocknet.

3,728 mg Subst. gaben 7,909 mg CO₂ und 1,948 mg H₂O
 C₂₈H₃₄O₈NCIS Ber. C 57,90 H 5,85% Gef. C 57,97 H 5,91%

4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure-endoanhydrid (VII).

a) Aus dem Dikaliumsalz mit Phosphorpentachlorid. 8 g im Vakuum bei 100° getrocknetes Dikaliumsalz der Nitro-sulfo-benzoesäure wurden im Mörser innig mit 2,3 g Phosphorpentachlorid verrieben und im Bombenrohr vier Stunden auf 180° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Reaktionsprodukt zweimal mit je 100 cm³ absolutem Benzol ausgekocht und vom Rückstand abfiltriert. Aus dem eingeeengten Filtrat krystallisierten 4,7 g Anhydrid vom Smp. 108–110° in Form harter, rechteckiger Prismen. Nach weiterem, zweimaligem Umkrystallisieren aus Benzol-Hexan stieg der Schmelzpunkt auf 112°.

3,767 mg Subst. gaben 5,04 mg CO₂ und 0,5 mg H₂O
 C₇H₄O₆NS Ber. C 36,69 H 1,32% Gef. C 36,51 H 1,49%

Das Anhydrid war sehr hygroskopisch und wandelte sich an der Luft in kurzer Zeit in die bei 71° schmelzende 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure um. Beim Erhitzen mit Anilin in benzolischer Lösung bildete es ein charakteristisches Anilinsalz des Anilids, Smp. 263°. In Benzol war das Anhydrid ziemlich löslich, in Petroläther und Hexan schwerlöslich.

¹⁾ *Kastle*, loc. cit.

²⁾ *Henderson*, loc. cit.

³⁾ Vorarbeiten ausgeführt von *A. Marxer*.

b) Aus dem Mono-kaliumsalz mit Thionylchlorid. 10 g im Vakuum bei 100° getrocknetes Monokaliumsalz wurden mit 20 g Thionylchlorid während 18 Stunden unter Rückfluss und Feuchtigkeitsausschluss auf dem Wasserbad gekocht. Nach dem Erkalten wurde das überschüssige Thionylchlorid abdestilliert, das Reaktionsgemisch mehrere Male mit absolutem Benzol ausgekocht und vom Rückstand abfiltriert. Die eingengte Benzollösung schied nach kurzem Stehen 5.8 g krystallisiertes Anhydrid vom Smp. 112° aus (Ausbeute 72%).

c) Aus der freien Säure mit Acetylchlorid. 2 g wasserfreie Nitrosulfo-benzoesäure wurden mit 10 g Acetylchlorid versetzt und unter Rückfluss und Feuchtigkeitsausschluss 4 Stunden bei einer Ölbadtemperatur von 115° erhitzt. Dann wurde durch Erwärmen im Vakuum stark eingengt und die ausfallenden Krystalle abgenutscht. Ausbeute 1,2 g Anhydrid vom Smp. 112°.

d) Aus der freien Säure durch Destillation. 2 g Nitro-sulfo-benzoesäure wurden in einem Säbelkolben bei 12 mm destilliert. Bei 184° ging das Anhydrid über das sofort krystallin erstarrte. Ausbeute 1,4 g vom Smp. 112°.

e) Wasserabspaltung mit Phosphorpentoxyd. 3 g der freien Säure wurden mit der eineinhalbfachen Menge Phosphorpentoxyd bis zur Verflüssigung erhitzt und dann weitere 10 Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Nach dem Abkühlen der Masse wurden 25 cm³ absolutes Benzol zugefügt und während einer Stunde unter Rückfluss gekocht. Dann wurde vom Rückstand abfiltriert und die Benzollösung bis zur beginnenden Trübung eingengt, wobei das Anhydrid in Form kleiner Prismen auskrystallisierte. Es wurden 2,3 g Anhydrid vom Smp. 112° erhalten.

Anilinsalz des 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure-anilids. 1 g Nitro-sulfo-benzoesäure-anhydrid wurden in 15 cm³ absolutem Benzol gelöst und mit 5 cm³ dreimal destilliertem Anilin versetzt. Das Anilinsalz fiel in flockiger Form aus und wurde abgenutscht. Es wurde je einmal aus Wasser und Alkohol und wieder zweimal aus Wasser umkrystallisiert und schmolz dann bei 236° unter Zersetzung. Zur Analyse wurde das Salz über Nacht im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

4,029 mg Subst. gaben 8,14 mg CO₂ und 1,52 mg H₂O
 C₁₉H₁₇O₆N₃S Ber. C 54,93 H 4,13% Gef. C 55,14 H 4,22%

Reduktion des 4-Nitro-2-sulfosäure-äthylbenzoats zu VIII.

Der durch Kochen von Nitro-sulfo-benzoesäure-anhydrid mit absolutem Äthanol erhaltene Monoäthylester der Nitro-sulfo-benzoesäure wurde mit *Raney*-Nickel und Wasserstoff in Feinsprit hydriert. Nach Aufnahme der theoretischen Menge von 3 Mol Wasserstoff kam die Hydrierung praktisch zum Stillstand. Nach dem Abfiltrieren des Nickels wurde die Lösung eingedampft und der Ester aus wässrigem Alkohol umkrystallisiert. Smp. 270° unter Zersetzung.

3,682 mg Subst. gaben 5,950 mg CO₂ und 1,508 mg H₂O
 C₉H₁₁O₅NS Ber. C 44,07 H 4,52% Gef. C 44,10 H 4,58%

Die Reduktion wurde auch mit Schwefelwasserstoff in ammoniakalischer Lösung durchgeführt. 10 g Nitro-ester wurden in 50 cm³ verdünntem Ammoniak gelöst und unter Einleiten von Schwefelwasserstoff während 2½ Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Nach den ersten 30 bzw. 60 Minuten wurden je 10 cm³ konz. Ammoniaklösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft, in 300 cm³ warmem Wasser aufgenommen, filtriert und angesäuert. Es bildete sich ein feiner, weisser Niederschlag, der jedoch nur aus Schwefel bestand. Nach weiterem Einengen fiel ein weisses Pulver aus, das gut in Wasser und Lauge löslich war. Durch Umkrystallisieren aus wässrigem Alkohol wurde der bei 270° unter Zersetzung schmelzende Ester erhalten, der sich identisch mit obigem, durch Reduktion mit Nickel und Wasserstoff hergestellten Aminoester erwies.

Δ^5 -Androsten-3 β , 17 β -diol-17-(4'-amino-2'-sulfosäure)-benzoat (XVI).

1,5 g Androstendiol-3-monoacetat und 1 g Nitro-sulfo-benzoessäure-anhydrid wurden in 50 cm³ absolutem Benzol gelöst und eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Zur erkalteten Benzollösung wurde eine Lösung von 0,7 g Soda (kalz.) in möglichst wenig Wasser gegeben, wobei sich beim Umschütteln das Natriumsalz des Reaktionsproduktes amorph ausschied. Das Benzol wurde im Vakuum abgedampft und der Rückstand unter Erwärmen mit wässrigem 50-proz. Äthanol versetzt, bis eine klare Lösung vorlag. Diese wurde eine Viertelstunde unter Rückfluss gekocht und der Sodaüberschuss mit Eisessig neutralisiert. Die Lösung wurde dann zur Trockne verdampft und der Rückstand zweimal mit Benzol, in dem das Estersalz kolloidal löslich ist, aufgeköcht und abgenutscht. Nach dem Verdampfen des Benzols blieb das Natriumsalz in pulveriger Form zurück. Dieses wurde dreimal mit je 50 cm³ Äther digeriert, um eventuell nicht ungesetztes Androstendiol zu entfernen. Nach dem Trocknen hinterblieben 2,1 g Natriumsalz. Ein Teil der sehr hygroskopischen Substanz wurde bei 100° im Hochvakuum getrocknet, zur Analyse im Schweinchen eingewogen und mit Bichromat verbrannt.

4,380 mg Subst. gaben 9,268 mg CO₂ und 2,360 mg H₂O

C₂₆H₃₂O₆NSNa Ber. C 57,66 H 5,96% Gef. C 57,75 H 6,03%

Reduktion: 2,1 g Nitroester-salz wurden in 100 cm³ Feinsprit gelöst und mit Raney-Nickel (aus 2 g Raney-Legierung) hydriert. Nach Aufnahme von 3 Mol Wasserstoff blieb die Hydrierung stehen. Die Lösung wurde filtriert und eingeeengt. Diese wurde tropfenweise mit 2-n. Salzsäure versetzt, wobei die freie Aminosulfosäure in filtrierbarer Form ausfiel. Der Niederschlag wurde abgenutscht und mehrere Male mit Methanol zur Entfernung von nicht reduzierter Nitroverbindung (die noch als Natriumsalz vorliegen müsste) gewaschen. Zur weiteren Reinigung wurde die Substanz aus Pyridin-Äthanol umkrystallisiert. Zu diesem Zwecke wurde die Substanz in sehr wenig Pyridin gelöst und in der Wärme Äthanol zugesetzt. Nach dreimaligem Umkrystallisieren schmolz die Substanz bei 228° unter Zersetzung. Sie wurde 14 Stunden im Hochvakuum bei 120° getrocknet.

3,938 mg Subst. gaben 9,196 mg CO₂ und 2,557 mg H₂O

C₂₆H₃₅O₆NS Ber. C 63,78 H 7,21% Gef. C 63,73 H 7,27%

Die Substanz ist schwer wasser-, alkohol- und methanollöslich. Eine Probe mit Salzsäure und Nitrit, dann mit alkalischer R-Salzlösung versetzt, ergab einen roten Farbstoff.

 β -Dehydroandrosteron-(4'-nitro-2'-sulfosäure)-benzoat (XVII).

Eine Lösung von 1,55 g β -Dehydroandrosteron und 1,25 g Nitrosulfobenzoessäure-anhydrid in 40 cm³ absolutem Benzol wurde eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Die Lösung färbte sich rötlich, und an den Wänden setzten sich dunkelrote Krystalle fest. Ein Teil der Benzollösung wurde abgedampft, wobei eine rote Schmiere zurückblieb. Versuche, diese aus Aceton-Benzol umzulösen, führten zu sehr wenig Krystallen, die bei 158–160° unter Zersetzung schmolzen. Diese wurden bei Zimmertemperatur im Hochvakuum über Nacht getrocknet.

3,763 mg Subst. gaben 8,32 mg CO₂ und 2,06 mg H₂O

C₂₆H₃₁O₆NS Ber. C 60,33 H 6,04% Gef. C 60,34 H 6,13%

Kaliumsalz: Es wurde wie oben verestert und die Benzollösung mit etwas mehr als der berechneten Menge Pottasche in Wasser geschüttelt, wobei das Kaliumsalz ausfiel. (Dieses Salz ist nicht benzollöslich.) Es wurde mit Alkohol, dann mit Wasser gewaschen. Das Salz ist unlöslich in Wasser und Alkohol, gut löslich dagegen in Pyridin und heissem 50-proz. Alkohol.

Pyridinsalz: Die Benzollösung der freien Sulfosäure wurde mit einem Überschuss an Pyridin versetzt und die Lösung zur Trockne verdampft. Nach fünfmaligem Umkrystallisieren aus Pyridin-Petroläther schmolz die Substanz bei 221–223°. Zur Analyse wurde die Substanz 14 Stunden bei 90° im Hochvakuum getrocknet.

3,868 mg Subst. gaben 8,81 mg CO₂ und 2,14 mg H₂O

C₃₁H₃₆O₈N₂S Ber. C 62,40 H 6,08% Gef. C 62,16 H 6,19%

Δ^5 -Androsten-3 β , 17 β -diol-3-(4'-amino-2'-sulfosäure)-benzoat (XVIII).

Die katalytische Hydrierung der Nitrogruppe und der Ketogruppe in Stellung 17 wurde sowohl mit dem Pyridinsalz wie auch mit dem Kaliumsalz durchgeführt. Im ersten Falle wurden 7 Mole Wasserstoff aufgenommen, da der Pyridinkern mit Nickel mitreduziert wird. Vorteilhafter ist die Hydrierung des Kaliumsalzes in 50-proz. Feinsprit, wobei 4 Mol Wasserstoff aufgenommen werden, nämlich 3 Mol durch die Nitrogruppe und 1 Mol durch die Ketogruppe. Nach beendigter Hydrierung wurde die Lösung auf die Hälfte eingengt und daraus durch Zutropfen von konz. Salzsäure die freie Sulfosäure gefällt. Diese wurde abgenutscht und auf der Nutsche mit Alkohol gewaschen. Zum Umkrystallisieren eignet sich am besten Wasser-Pyridin. Die Substanz wird warm in Wasser suspendiert und tropfenweise so viel Pyridin zugesetzt, dass vollständige Lösung eintritt. Nach viermaligem Umkrystallisieren schmolz die Substanz unter Zersetzung bei 263—64°, wenn die Probe bei 258° in den Schmelzpunktsblock eingeführt wurde.

4,336 mg Subst. gaben 10,07 mg CO₂ und 2,76 mg H₂O

Rückstand 0,096 mg

C₂₆H₃₅O₆NS Ber. C 63,78 H 7,21% Gef. C 64,12 H 7,21%

Der freie Aminosulfosäure-ester ist wasser- und alkoholunlöslich, jedoch mischbar mit Pyridin.

Kupplung der Amino-sulfo-benzoesäureester an Proteine.**A. Δ^5 -Androsten-3 β , 17 β -diol-17-(4'-amino-2'-sulfosäure)-benzoat mit**

a) Hühnereiweiss. 200 mg Natriumestersalz wurden in 200 cm³ Wasser gelöst und von dieser Lösung unter Rühren so viel in ein auf 0° gekühltes Gemisch von 20 cm³ 0,1-n. Salzsäure und 20 cm³ 0,01-n. Natriumnitritlösung zugepft, bis Jodkalium-Stärke-Papier kein freies Nitrit mehr anzeigte. Dann wurden nacheinander noch je 10, 5, 1 und 1 cm³ der 0,01-n. Natriumnitritlösung vorgelegt und immer wieder durch Zusatz der Estersalzlösung verbraucht. Insgesamt wurden also 37 cm³ 0,01-n. Natriumnitritlösung (theoretischer Verbrauch 39,2 cm³) verbraucht, bis eine bleibende Nitritreaktion entstand. Der geringe Nitritüberschuss wurde durch Zusatz von 20 mg Natriumestersalz in wenig Wasser zerstört. Das Diazoniumsalz wurde sodann unter Rühren in eine eisgekühlte, soda-alkalische Lösung von 0,4 g krystallisiertem Hühnereiweiss (74% -ig) in 100 cm³ Wasser zulaufen gelassen. Die ursprünglich gelbe Lösung nahm eine tief-orange Färbung an. Nachdem weitere 30 Minuten gerührt wurde, gab ein Tropfen der Lösung mit alkalischer R-Salzlösung auf einem Filterpapier keinen roten Farbfleck mehr. Die Lösung wurde dann mit verdünnter Essigsäure auf p_H 7 gebracht, wobei sich eine geringe Menge braun-gefärbtes Azoprotein ausschied.

In einem zweiten Versuch wurde 1 Mol Hühnereiweiss (Molekulargewicht zu 30000 angenommen) mit 6 Mol (Molekulargewicht 511) Estersalz aufgeladen. 200 mg Estersalz wurden wie oben angegeben diazotiert, wobei von Anfang an 37 cm³ 0,01-n. Nitritlösung vorgelegt wurden. Das Diazoniumsalz wurde zu der soda-alkalischen Lösung (p_H 8—9) von 2,7 g krystallisiertem Hühnereiweiss (entsprechen 2 g getrocknetem Eiweiss) in 200 cm³ Wasser zugegeben. Nach einer halben Stunde war die Kupplung beendet. Beim Ansäuern schied sich schon bei p_H 8 ziemlich viel Azoprotein aus.

b) Rinderalbumin. Der Gehalt der verwendeten Rinderalbuminlösung wurde durch Bestimmung des Trockenrückstandes nach Eindunsten der Lösung über Phosphor-pentoxyd im Vakuumexsikkator festgestellt. Der erhaltene Wert von 1,85% Eiweiss stimmte mit dem aus der Ermittlung des Stickstoffgehaltes errechneten überein. Der durch Analyse bestimmte, prozentuale Stickstoffgehalt mit dem Faktor 6,4 multipliziert gibt ziemlich genau den Eiweissgehalt eines Serums an.

22,983 mg Rinderalbumin gaben 0,059 cm³ N₂ (18°, 724 mm)

Gef. N 0,29%

Eiweissgehalt = 0,29 × 6,4 = 1,85%

1. Es wurde Natriumestersalz diazotiert und mit Rinderalbumin im Molverhältnis 6:1 gekuppelt (Mol.-Gew. von Rinderalbumin zu 70000 angenommen). Das Azoprotein schied sich bei p_H 6,5–7 in geringer Menge aus.

2. Es wurde im Verhältnis von 12 Mol Estersalz zu 1 Mol Rinderalbumin aufgeladen. Bei p_H 7 schied sich beträchtlich mehr des braun gefärbten Azoproteins aus.

c) Casein. 110 mg Estersalz wurden diazotiert und bei p_H 8–9 an 650 mg Casein in 100 cm³ Wasser, welches mit einigen Tropfen verdünnter Sodalösung versetzt worden war, gekuppelt. Die alkalische Lösung des Kupplungsproduktes war orange-rot und ging beim Ansäuern in Gelb über. Bei p_H 4 war noch alles klar gelöst. Es wurde auch die doppelte Menge Estersalz an 650 mg Casein gekuppelt. In diesem Falle war die Färbung intensiver. Bei p_H 6,8 war die Lösung opaleszierend; es erfolgte aber kein Niederschlag.

d) Pferdeserum. 3,25 g Estersalz wurden mit einer vorgelegten Mischung von 6 cm³ 1-n. Natriumnitritlösung und 200 cm³ 0,1-n. Salzsäure diazotiert und in soda-alkalischer Lösung mit 130 cm³ Pferdeserum (enthaltend 7 g Eiweiss pro 100 cm³) gekuppelt. Die braunrote Lösung war stark trüb; es bildete sich jedoch kein nennenswerter Niederschlag.

B. Δ^5 -Androsten-3 β , 17 β -diol-3-(4'-amino-2'-sulfosäure)-benzoat mit

a) Pferdeserum. 2 g des Estersalzes wurden wie üblich diazotiert und an 80 cm³ Pferdeserum (enthaltend 7 g Eiweiss pro 100 cm³ Serum) gekuppelt. Die alkalische Lösung war weinrot und ging bei p_H 7 in Gelb-Orange über. Sie war stark opaleszierend, ohne jedoch einen nennenswerten Niederschlag abzuscheiden.

Weitere Kupplungen wurden analog den obigen Beispielen ausgeführt.

Analyse des Azoproteins aus Δ^5 -Androsten-3, 17-diol-17-(4'-amino-2'-sulfosäure)-benzoat und Casein.

150 g der Injektionslösung wurden mit Eisessig angesäuert und die gelbe Fällung des Azoproteins abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mehrere Male durch Digerieren mit Wasser und Abzentrifugieren gewaschen und nach dem Trocknen im Vakuum-exsikkator im Soxhlet-Apparat während 8 Stunden mit Alkohol extrahiert. Die ersten Überläufe waren gelb gefärbt. Nach dem Abdampfen des Alkohols verblieben 0,75 g eines gelb gefärbten Rückstandes, der nicht weiter untersucht wurde.

Im gleichen Apparat wurde das Azoeiweiss während 3 Stunden mit Äther extrahiert, der von Anfang an farblos übergang und nach dem Abdampfen keinen Rückstand hinterliess. Der im Becher des Soxhlet-Apparates verbliebene Rückstand wurde 2 Stunden bei 100° im Vakuum getrocknet und wog 2,6 g. Dieser Rückstand wurde mit 30 cm³ 1-n. NaOH während 3 Stunden unter Rückfluss gekocht, wobei er bis auf wenige Flocken unter intensiver Rotfärbung in Lösung ging. Nach dem Abkühlen wurde mit ca. 150 cm³ Wasser verdünnt und einen Tag lang mit Äther im Apparat nach *Kutscher-Stuedel* extrahiert. Nach dem Trocknen und Verdampfen des Äthers blieb ein weisser Rückstand von 50 mg. Dieser wurde mit 100 mg p-Nitrobenzoylchlorid in 7 cm³ Pyridin während 2 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Der grösste Teil des Pyridins wurde dann im Vakuum abgedampft, der Rückstand in viel Chloroform aufgenommen, zweimal mit Sodalösung, einmal mit verdünnter Salzsäure und dann mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde eingedampft und der Rückstand von 65 mg aus Chloroform-Ligroin umkrystallisiert. Es wurden Krystalle vom Smp. 245° (unkorr.) erhalten, die mit Androstendiol-bis-p-nitrobenzoat (Smp. 248° uncorr.) keine Depression gaben.

Δ^5 -Androsten-3 β , 17 β -diol-bis-p-nitrobenzoat.

Diese Verbindung wurde wie üblich aus Androstendiol und p-Nitrobenzoylchlorid in Pyridin hergestellt. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Chloroform-Ligroin schmolz sie bei 256° (korr.).

4,188 mg Subst. gaben 10,365 mg CO₂ und 2,254 mg H₂O
C₃₃H₃₆O₈N₂ Ber. C 67,33 H 6,16% Gef. C 67,54 H 6,02%

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Herrn *W. Manser* ausgeführt.

Zusammenfassung.

Es wird die Herstellung von Δ^5 -Androsten-3 β , 17 β -diol-3- und 17-monoestern der 4-Amino-2-sulfo-benzoesäure beschrieben. Zur Synthese dieser Ester eignet sich das 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure-endoanhydrid, welches nach verschiedenen Verfahren hergestellt wurde, am besten.

Die Alkalisalze dieser Ester sind wasserlöslich und lassen sich diazotieren. Die diazotierten Verbindungen wurden mit verschiedenen Proteinen zu Androstendiol-azoproteinen gekuppelt. In einem Falle wurde ein solches Azoprotein verseift, wobei Androstendiol zurückgewonnen werden konnte.

Organisch-Chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

26. Versuche zur Herstellung künstlicher Komplexantigene der Steroidreihe.

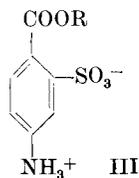
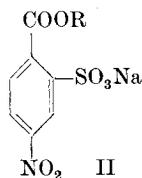
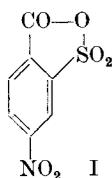
2. Mitteilung.

Weitere Steroidester der 4-Amino-2-sulfo-benzoesäure

von C. A. Grob und W. A. Goldberg.

(18. XII. 48.)

In der ersten Mitteilung¹⁾ haben wir über eine Methode zur Herstellung wasserlöslicher, diazotierbarer Steroidderivate berichtet. Diese beruht auf der leichten Veresterbarkeit der 3- resp. 17-ständigen Hydroxylgruppe des Δ^5 -Androsten-3 β , 17 β -diols mit 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure-endoanhydrid (I). Die so erhaltenen Ester konnten in Form ihrer Salze (II, R = Steroidrest) isoliert und durch Reduktion in 4-Amino-2-sulfo-benzoesäureester (III), welche als Alkalisalze wasserlöslich sind, übergeführt werden. Diese Ester liessen sich diazotieren und mit Proteinen kuppeln.



Es war zu erwarten, dass sich diese Methode auch auf andere Steroide übertragen liesse, und so haben wir in der Folge versucht,

¹⁾ Grob und Goldberg, Helv. **32**, 172 (1949).