

Reinigung der Kaninchenleber-Aldolase

Fraktionen	Gesamt- aktivität (BÜCHER- Einheiten)	Ausbeute	Spez. Aktivität E/mg							
			FDP			F-1-P				
Rohextrakt	138 000	(100%)	7							
Extrakt nach Erwärmen auf 47°	134 000	97%	10							
Rohkristallisate I bis III	64 000	46%	I	II	III	I	II	III		
Reinferment	31 500	23%	49	78	62	52	85	73		
			198*)			220**)				

*) Substratkonzentration $4 \cdot 10^{-4}$ M

***) Substratkonzentration $4 \cdot 10^{-3}$ M

auch von PEANASKY & LARDY beobachtet worden sind. Für das Fructosediphosphat ergibt sich eine MICHAELIS-Konstante von ca. $8 \cdot 10^{-6}$ Mol/l. (PEANASKY & LARDY fanden die Werte von $3,8 \cdot 10^{-3}$ oder $3,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, je nach der Berechnungsart.) Für F-1-P liegt der Wert zwischen den Grenzen 2 bis $8 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, je nach Berechnungsart. Wir werden auf die Kinetik und die physikalischen Eigenschaften des Ferments an anderer Stelle zurückkommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Darstellung kristallisierter Aldolase aus Kaninchenleber unter ausschliesslicher Verwendung von Aussalzen durch Ammoniumsulfat beschrieben.

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Zürich

201. Odeur et constitution XXI

Synthèses d'aldéhydes β -éthyléniques *cis*. II¹⁾

par M. Winter

(29 VI 63)

Les propriétés odorantes intéressantes de l'hexène-3-al *cis* nous ont amené à perfectionner sa synthèse et à entreprendre celle de quelques autres aldéhydes β -insaturés²⁾, et ceci suivant une variante nouvelle, représentée par le schéma, analogue dans son principe au procédé envisagé par DURAND *et al.*³⁾. L'intérêt d'une telle étude dépasse le cadre industriel, certains de ces aldéhydes pouvant fort bien exister à l'état naturel. C'est notamment le cas des nonène-3-al *cis* et nonadiène-3,6-al (tout *cis*) qui pourraient prendre naissance par autoxydation de glycérides riches en acides gras essentiels (acides linoléique, linoléique)⁴⁾.

¹⁾ Communication I sur les aldéhydes β -éthyléniques: Helv. 45, 2567 (1962).

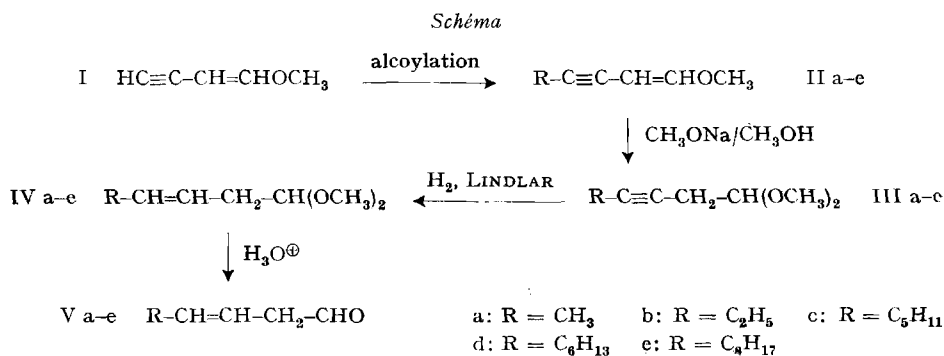
²⁾ Les procédés décrits ici font l'objet de demandes de brevets avec priorité du 2 mai 1962.

³⁾ R. R. DURAND, L. PIAUX & Melle S. TRAVERS, C. r. hebd. Acad. Sci. 256, 1554 (1963).

⁴⁾ J. J. BRODERICK, J. Amer. Perf. Arom. 72, (5) 49 (1958).

L'alcoylation du dérivé sodé du méthoxy-1-butène-1-yne-3 (I) au moyen d'esters sulfoniques⁵⁾ ou d'halogénures⁴⁾⁵⁾ a déjà été décrite. En alcoylant le dérivé magnésien de I par un ester sulfonique dans un mélange de tétrahydrofurane et de chlorure de méthylène⁶⁾ nous avons obtenu les ényne-éthers II sous forme de mélanges des stéréoisomères *cis* (~ 90%) et *trans*, qui reflètent l'hétérogénéité stérique du produit initial. Ici, la séparation des stéréoisomères est parfaitement inutile car les acétals acétyléniques III résultant de l'addition, en milieu alcalin, d'une molécule de méthanol sur la double liaison des composés II ne contiennent plus cette double liaison. Les alcoxy-1-butène-1-yne-3, dont la triple liaison est monosubstituée, subissent dans ces conditions une migration concomitante de la liaison acétylénique en position 2⁷⁾. Nous n'avons pas observé de phénomène analogue, ni la formation d'isomères alléniques, dans le cas de nos dérivés II à triple liaison disubstituée. L'addition du méthanol s'effectue déjà lentement à la température du méthanol bouillant en présence du méthylate de sodium. En autoclave à 110°, la réaction est terminée dans les 24 heures. Comme produit secondaire, il se forme un peu de triméthoxy-alcènes par addition de l'ion méthoxy sur la triple liaison. Les températures plus élevées (120 à 140°) favorisent la formation de ces produits secondaires qui, d'après le spectre RMN., seraient des mélanges de triméthoxy-1,1,3-(environ 70%) et triméthoxy-1,1,4-alcènes.

La semiréduction catalytique des acétals β -acétyléniques III fournit les acétals β -éthyléniques *cis* (IV) correspondants, contenant quelques centièmes de forme *trans*. L'hydrolyse acide ménagée de ces acétals permet d'isoler une fraction aldéhydique composée d'environ 90% d'aldéhyde β -éthylénique *cis* V à côté de quelques centièmes des isomères β -*trans*- et α -éthylénique. Nous n'avons pas réussi à éviter entièrement la formation de ce dernier isomère lors de l'hydrolyse des acétals. Néanmoins, l'isomérisation est beaucoup plus lente que l'hydrolyse des acétals, dans les conditions expérimentales employées. Les aldéhydes β -éthyléniques purs s'obtiennent par distillation fractionnée, l'isomère α -éthylénique bouillant à environ 20° plus haut. Leur pureté est démontrée par l'absence de toute absorption dans l'UV. dans la région de 220 $m\mu$. En solution hexanique, ils présentent une faible absorption entre 205–208 $m\mu$ ($E = 2000$ à 3750).



5) TH. HERBERTZ, Chem. Ber. 85, 475 (1952).

6) H. G. VIEHE & M. REINSTEIN, Chem. Ber. 95, 2557 (1962).

7) W. FRANCKE & K. H. SEEMANN, Chem. Zbl. 1954, 8444, DBP 871006.

Tableau 1. Méthoxy-1-alcène-1-yne-3 (II)

R	Eb. °C/Torr	n_D	d_4	Analyse
IIa	64-67/28	24°: 1,4888 ^a)	23°: 0,9055 ^a)	C ₆ H ₈ O Calc. C 74,97 H 8,39% Tr. C 74,80 H 8,65%
IIb	C ₂ H ₅ voir 1)			
IIc	96-98/10	20°: 1,4808 ^a)	22,5°: 0,8716 ^a)	C ₁₀ H ₁₆ O Calc. C 78,89 H 10,59% Tr. C 79,02 H 10,67%
IIId	65-68/0,01	20°: 1,4780 ^b)	20°: 0,8874 ^b)	C ₁₁ H ₁₈ O Calc. C 79,46 H 10,92% Tr. C 79,19 H 10,86%
IIe	113-115/0,1	20°: 1,4764 ^b)	20°: 0,8800 ^b)	C ₁₃ H ₂₀ O Calc. C 80,35 H 11,41% Tr. C 80,10 H 11,49%

IR.: bandes caractéristiques des isomères *cis* et *trans* analogues à II b⁸); dans II a absence de la bande à 1320 cm⁻¹.

a) isomère *cis*; b) mélange *cis-trans*

Tableau 2. Diméthoxy-1,1-alcyne-3 (III)

R	Eb. °C/Torr	n_D	d_4	Analyse
IIIa	53-55/14	20°: 1,4422	20°: 0,9322	C ₇ H ₁₂ O ₂ Calc. C 65,59 H 9,44% Tr. C 65,79 H 9,64%
IIIb	60-62/10	20°: 1,4392	20°: 0,9166	C ₈ H ₁₄ O ₂ Calc. C 67,57 H 9,93% Tr. C 67,37 H 9,83%
IIIc	96-97/10	—	—	C ₁₁ H ₂₀ O ₂ Calc. C 71,69 H 10,94% Tr. C 71,37 H 10,57%
IIId	69-72/0,001	20°: 1,4450	20°: 0,9050	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ Calc. C 72,68 H 11,18% Tr. C 72,65 H 11,23%
IIIe	83-85/0,002	20°: 1,4517	20°: 0,8898	C ₁₄ H ₂₆ O ₂ Calc. C 74,28 H 11,58% Tr. C 74,06 H 11,62%

IR.: bandes dans les régions suivantes (cm⁻¹): 2900 (s, CH); 2200 (w, C≡C); 1460, 1360 (m à s, CH); 1325 (m, CH₂C≡C, absent dans III a); 1230 (m); 1190 (s); 1120, 1065 (ss, -O-); 1010 (m); 970 (m à s); 918 (m); 826, 812 (m); 730-720 (m à w).

Tableau 3. Diméthoxy-1,1-alcène-3 cis (IV)

R	Eb. °C/Torr	n_D	d_4	Analyse
IVa	CH ₃ 55-57/30	20°: 1,4200	20°: 0,8826	C ₇ H ₁₄ O ₂
IVb	C ₂ H ₅ 43-45/12	23°: 1,4219	24°: 0,8706	C ₈ H ₁₆ O ₂
IVc	C ₃ H ₁₁ 86-87/10	22°: 1,4330	23°: 0,8662	C ₁₁ H ₂₀ O ₂
IVd	C ₄ H ₁₃ 108-110/14	20°: 1,4371	20°: 0,8584	C ₁₃ H ₂₄ O ₂
IVe	C ₆ H ₁₇ 62-63/0,001	20°: 1,4446	20°: 0,8728	C ₁₄ H ₂₆ O ₂

IR.: bandes dans les régions suivantes (cm⁻¹): 2900 (s, CH); 1660, 1620 (m à w, C=C); 1460, 1360 (m à s, CH; IVa bandes déplacées à 1443 et 1368); 1190 (s); 1125, 1065 (ss, -O-); 965 (m); 725 (m à s, C-C-cis; IVa: 707).

Tableau 4. Alcène-3-al-1 cis (V)

R	Eb. °C/Torr	n_D	d_4	Analyse
Va	CH ₃ 40-44/56	20°: 1,4247	20°: 0,8539	C ₉ H ₈ O
Vb	2,4-DNP: F. 113,5-114° C ₂ H ₅ 63-65/65	22°: 1,4296	21°: 0,8512	-
Vc	2,4-DNP: F. 99,5-101° ¹⁾ C ₅ H ₁₁ 74-76/12	23°: 1,4420	23°: 0,8521	C ₁₅ H ₂₀ O ₄ N ₄
Vd	2,4-DNP: F. 73-73,5° C ₆ H ₁₃ 89-90/10	20°: 1,4445	20°: 0,8401	C ₁₀ H ₁₈ O
Ve	2,4-DNP: F. 77,5-78° C ₈ H ₁₇ 53-55/0,001	20°: 1,4464	20°: 0,8452	C ₁₃ H ₂₀ O ₂
	2,4-DNP: F. 80-81°			

IR.: bandes dans les régions suivantes (cm⁻¹): 3550, 3460 (w); 3040 à 2840 plusieurs bandes et épaules (s, CH); 2720 (m, CHO); 1725 (s, C=O); 1650 (m à w, C=C); 1460, 1385 (m, CH; Va: 1440, 1388); 970 (variable, C=C trans, impurété); 725 (s, C=C cis; Va: 702)

UV.: (hexane) Va: λ_{max} 207, E = 2464; Vb: λ_{max} 206, E = 1958; Vd: λ_{max} 208, E = 2733; Ve: λ_{max} 205, E = 3750

Les spectres IR. des composés homologues II à IV montrent des vibrations caractéristiques très semblables (voir tableaux 1 à 4), à l'exception des composés IIa à Va. Ici, certaines bandes caractéristiques sont déplacées vers des fréquences plus basses, notamment la vibration C=C *cis*, qui se trouve à 707 et 703 cm^{-1} . La vibration C \equiv C des composés II et III (région 2200 cm^{-1}), est très faible partout. Une bande pointue à 1325 cm^{-1} , attribuable au méthylène en α de la triple liaison⁸⁾ ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$) se trouve être bien plus caractéristique pour ces composés. L'intensité de cette bande est plus forte dans les composés II-*trans* que II-*cis*. Les spectres IR. des β -hexénals *cis* et *trans* ont déjà été publiés antérieurement¹⁾.

Quelques propriétés physiques des aldéhydes, de leurs acétals et de leurs composés intermédiaires sont représentées dans les tableaux 1 à 4. Nous examinerons ultérieurement quelques propriétés chimiques des aldéhydes β -éthyléniques *cis*.

Tous ces aldéhydes β -éthyléniques *cis* se distinguent par leurs odeurs puissantes et agréables, dépourvues du caractère gras que possèdent généralement les aldéhydes α -éthyléniques. Les notes «vertes» des homologues inférieurs évoluent, chez les termes supérieurs, vers un caractère fruité et fleuri.

Remerciements: L'auteur exprime sa reconnaissance à la Direction de la maison FIRMENICH & CIE et à M. M. STOLL, Directeur Scientifique, de leur permission de publier ce travail. Il remercie M. B. WILLHALM de l'interprétation du spectre RMN., ainsi que les laboratoires auxiliaires, de l'exécution des mesures analytiques.

Partie expérimentale

Avec la collaboration technique de MM. J. SPÄTH et M. STUCKI

Les F. ne sont pas corrigés. Abréviations: 2,4-DNP = dinitro-2,4-phénylhydrazone; CGL = chromatographie gaz liquide; RMN. = résonance magnétique nucléaire. Intensités des bandes IR.: *ss* = très forte, *s* = forte, *m* = moyenne, *w* = faible.

1. *Alcoylation du méthoxybutényne. Méthode A, alcoylation du magnésien de I. - Exemple: méthoxy-1-dodécène-1-yne-3 (IIe)*. 24 g de Mg et 200 ml de tétrahydrofurane sont placés dans un ballon tricol équipé d'un bon agitateur, d'un thermomètre, d'une ampoule à décanter et d'un réfrigérant, et on maintient le tout sous une atmosphère d'azote. On introduit 110 g de bromure d'éthyle, dissous dans 400 ml de CH_2Cl_2 . Au magnésien formé, on ajoute goutte à goutte 90 g (1,1 mole) de I (fraîchement distillé, éb. 41-43°/50 Torr), dans 200 ml de CH_2Cl_2 . Il se forme par réaction exothermique, le magnésien de I qui reste entièrement en solution. On ajoute alors en 2½ h 572 g (2 moles) de *p*-toluènesulfonate d'octyle dans 400 ml de CH_2Cl_2 . La température du mélange devenu hétérogène est maintenue 6 h entre 40-45°. Puis on verse le tout dans CH_3COOH 10% aqueux, décante la phase aqueuse qu'on extrait encore une fois à l'éther, lave les phases organiques avec NaOH 10% et à l'eau, concentre et fractionne: fr. 1: éb. 35-36°/20 Torr, 21 g (= I non réagi); fr. 2: éb. 76-80°/0,1 Torr, 138,1 g (= bromure d'octyle⁹⁾); fr. 3: éb. 102-105°/0,1 Torr, 143 g; fr. 4: éb. 144-145°/0,001 Torr, 132 g (= *p*-toluène-sulfonate d'octyle non réagi). La fraction 3 est constituée par le mélange des isomères *cis* et *trans* de IIe (rendement 73%); analyses v. tableau 1.

Méthode B, alcoylation avec un halogénure dans l'ammoniaque liquide. - Exemple: méthoxy-1-décène-1-yne-3 (II d). Dans 2 l de NH_3 liquide (refroidi extérieurement à -40 à -50°), on introduit 70 g de sodium en présence de 0,9 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ¹⁰⁾. Puis, on ajoute en 20 min 246 g (3 moles) de I fraîchement distillé, et ensuite 520 g (3,15 moles) de bromure d'hexyle. Tout en agitant, on abandonne à la température du NH_3 liquide bouillant durant 20 h, puis on laisse évaporer la plus grande partie du NH_3 . On ajoute alors successivement 300 ml de méthanol, 1 l d'éther et 2 l d'eau, extrait la phase aqueuse encore une fois à l'éther et lave les phases éthérées. On sèche sur K_2CO_3

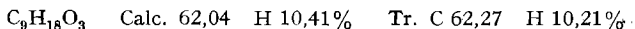
⁸⁾ M. WINTER, Helv. 46, 1754 (1963).

⁹⁾ A. C. COPE, J. Amer. chem. Soc. 56, 1578 (1934).

¹⁰⁾ T. H. VAUGHN, R. R. VOGT & J. A. NIEUWLAND, J. Amer. chem. Soc. 56, 2120 (1934).

anhydre, concentre et fractionne (sur peu de CaCO_3): fraction cœur, éb. 65–68°/0,01 Torr, 230 g (47%). Analyses: voir tableau 1.

2. *Addition du méthanol sur II. – Exemple: diméthoxy-1,1-hexyne-3 (IIIb)*. 210 g de méthoxy-1-hexène-1-yne-3 (IIb) dans 1 l de méthanol absolu sont chauffés à reflux en présence de 200 g de NaOCH_3 . Après 4 jours, 55% de IIb ont réagi, et après 12 jours, 95%. On dilue avec 2 volumes d'eau, extrait à l'éther, lave à l'eau, concentre et fractionne: fr. 1, éb. 50–57°/11 Torr, 28 g; fr. 2: éb. 58–61°/11 Torr, 196 g; fr. 3: éb. 60–100°/11 Torr, 4,5 g. La fraction 2 constitue IIIb (rendement 72%), voir tableau 2. La fraction 3 contient, suivant CGL, un mélange d'environ 50% de IIIb et 50% d'une substance s'éluant plus tard. On isole un échantillon par CGL préparative (colonne: Chromosorb W désactivé, chargé de 5% d'huile de silicone, $T_c = 150^\circ$, 50 ml He/min): $n_D^{20} = 1,4441$; $d_4^{20} = 0,9572$; p. mol. 174. Les spectres IR. (bandes $=\text{C}-\text{OCH}_3$ à 1208 cm^{-1} (s), $-\text{C}-\text{OCH}_3$ à 1117 et 1063 cm^{-1} (s), $\text{C}=\text{C-trans}$ à 968 cm^{-1} (s)) et MS. sont en accord avec la structure d'un triméthoxy-1,1,3(et 4)-hexène.



Dans l'autoclave, à une température de 110–115°, la réaction se termine dans les 24 h et donne un produit de composition semblable. A 130°, par contre, environ 30–40% de triméthoxyhexène sont formés.

3. *Réduction catalytique de III en IV. – Exemple: diméthoxy-1,1-cis-décène (IVd)*. 160 g de III d dans 800 ml d'hexane sont hydrogénés en présence de 15 g de catalyseur LINDLAR¹¹). En 6 h, un équivalent d'hydrogène est absorbé et la réduction s'arrête. Le traitement habituel fournit 150 g de IVd, éb. 108–110°/14 Torr (voir tableau 3).

4. *Préparation des aldéhydes IV. – Exemple: hexène-3-al cis (Vb)*. Dans un ballon tricol, maintenu sous une atmosphère d'azote, on mélange 9,8 g d'acétal IV b et 50 ml d'acétone contenant 2 g d'acide oxalique, et 25 mg d'hydroquinone. Entre 45–50°, on ajoute sous agitation énergique, peu à peu de l'eau à une vitesse telle que le mélange reste juste homogène. Après l'introduction de 220 ml d'eau (durée: 30 min), un léger trouble persiste. On refroidit, extrait trois fois à l'éther, lave au NaHCO_3 et à l'eau, concentre et distille. On recueille 6 g de distillat, éb. 46–48°/30 Torr, contenant suivant le CGL 95% d'hexène-3-al; rdt 85% de la théorie. La fraction de cœur (4,1 g, pureté 98%), selon les spectres UV. et IR., est identique au hexène-3-al cis préparé antérieurement par oxydation du *cis*-heptène-4-diol-1,2¹).

SUMMARY

The authors describe a new general synthesis of *cis*- β -ethylene aldehydes: the alkylation of 1-methoxy-1-buten-3-yne to 1-methoxy-1-alken-3-yne followed by addition of methanol produces 1,1-dimethoxy-3-alkynes. The catalytical reduction of these compounds to 1,1-dimethoxy-3-alkenes followed by mild acidic hydrolysis yields *cis*- β -ethylene aldehydes.

The following new aldehydes are described: *cis*- β -pentenal, *cis*- β -nonenal, *cis*- β -decenal and *cis*- β -dodecenal. All these aldehydes give off strong pleasant odours.

FIRMENICH & CIE, Laboratoires de Recherches, Genève

¹¹) H. LINDLAR, Helv. 35, 446 (1952).