

Über Reinigung und Chemie der Penicilline

VON DER

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH

ZUR ERLANGUNG

DER WÜRDE EINES DOKTORS DER
NATURWISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE

PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON

Charles R. Cramer

dipl. sc. nat.

von Zürich

Referent: Herr Prof. Dr. Pl. A. Plattner

Korreferent: Herr Prof. Dr. L. Ruzicka



ZÜRICH 1949

Dissertationsdruckerei Leemann AG.

Leer - Vide - Empty

**MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET**

Leer - Vide - Empty

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. L. RUZICKA,

danke ich herzlich für das meiner Arbeit stets bewiesene Wohlwollen und rege Interesse.

Ebenfalls danke ich

Herrn Prof. Dr. Pl. A. PLATTNER,

unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, für die wertvollen Ratschläge, mit denen er mich stets unterstützte.

Leer - Vide - Empty

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung und Literaturübersicht	9
I. Teil: Die Reinigung von Penicillin-Rohprodukten	12
A. Chromatographische Methoden	13
1. Die „saure“ Chromatographie	14
2. Die Verteilungschromatographie	25
3. Versuche, Säuren in organischen Medien zu chromatographieren	26
B. Reinigung durch Reduktion und Oxydation	31
1. Die Reduktion mit Aluminiumamalgam	31
2. Die Oxydation mit Kaliumpermanganat	31
C. Die Salze der Penicilline	33
D. Die Ester der Penicilline	36
II. Teil: Arbeiten zur Konstitutionsaufklärung	38
E. Orientierende Analysen	39
F. Desaktivierung und Abbau	41
1. Desaktivierung durch Bakterien, prim. Alkohole und Amine (inkl. NH_3)	42
2. Abbau durch heisse Hydrolyse	42
a) Die CO_2 -Abspaltung	42
b) Der Aminostickstoff nach Van Slyke	44
c) Der destillierbare Stickstoff	45
3. Abbau durch kalte, saure Hydrolyse	47
4. Abbau durch kaltes Alkali und nachfolgende Oxydation	48
a) Die alkalische, kalte Verseifung	48
b) Oxydation mit Jod	50
c) Vorschrift zur Ausführung der Aktivitätstitration mit Jod	53
5. Die Oxydation	53
6. Schlußfolgerungen	54
G. Die Untersuchung der Schwefelbindung (Penicillamin)	54
H. Die Penilloaldehyde	58
J. Die Veröffentlichung der anglo-amerikanischen Resultate (Chemie der Penicilline)	61

	Seite
III. Teil: Andere Pilzstoffwechselprodukte (Verunreinigungen des Penicillins)	
K. Brenzschleimsäure	66
L. Fumarsäure	66
M. Succinyl-1,Leucin	67
N. Bernsteinsäure	68
O. Glutarsäure	69
P. 1,Methylbernsteinsäure	69
	Versuche No. Seite
Experimentelle Belege	70
A. Chromatographische Methoden	1—10 70
B. Reinigung durch Reduktion und Oxydation	11—14 77
C. Die Salze der Penicilline	15—16 79
D. Die Ester der Penicilline	17—19 80
F. Desaktivierung und Abbau	20—29 83
G. Die Untersuchung der S-Bindung	29—38 86
Oxydation mit $KMnO_4$ nach <i>Kögl</i>	29 86
Thiazolidin-carbonsäuren	30—31 87
Saure Hydrolyse eines Methylesters und Aufarbeitung (Amine, Hydrazone, Phenacetursäure, Phenylelessigsäure)	32—37 89
Penicillamin	38 95
H. Penilloaldehyde	39—43 95
Isolierung	39 95
Abbau	40 96
Phenacetamid, Phenacetyl-glycin	41—42 97
Synthese des Penilloaldehyds G	43 98
K. Brenzschleimsäure	44 99
L. Fumarsäure	45 100
M. Succinyl-1,Leucin	46—47 100
Isolierung	46 100
Hydrolytische Spaltung	47 101
N. Bernsteinsäure	48 102
O. Glutarsäure	49 102
P. 1,Methylbernsteinsäure	50 103
Literaturverzeichnis	105

Einleitung und Literaturübersicht

Seit dem Sommer 1942 beschäftigt sich an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich eine Arbeitsgruppe mit Stoffwechselprodukten niederer Pilze; die Untersuchungen über Penicillin nahmen dabei eine Vorrangstellung ein. Der biologische Teil wurde im Institut für spezielle Botanik (Leitung Prof. Dr. E. Gäumann) von Dr. L. Ettlinger ausgeführt, dem zeitweise Frau Henzi, Frl. Y. Morf und Frl. N. Hediger beistanden. Die Bearbeitung im organisch-chemischen Institut (Leitung Prof. Dr. L. Ruzicka) unterstand Prof. Dr. Pl. A. Plattner. Diese Gruppe umfaßte die Chemiker Dr. L. H. Werner, W. Schlegel und C. R. Cramer.

Ich danke den Leitern der beiden Arbeitsgruppen und meinen Kollegen herzlich für die vielseitige Anregung und Mithilfe und nicht zuletzt für die aktive Zusammenarbeit, die bei der Bearbeitung eines biologisch und chemisch so eng verbundenen Gebietes die wesentliche Voraussetzung bildet.

Die vorliegende Arbeit schliesst sich eng an an diejenige meines Kollegen W. Schlegel, „Untersuchungen über die Gewinnung von Penicillin aus den Kulturen von *Penicillium notatum*“ (Dissertation E. T. H. 1947), wo die allgemeine Literatur über Penicillin eingehend besprochen wird. Im folgenden seien deshalb nur die speziell hier interessierenden Publikationen referiert.

Unsere Arbeit war gekennzeichnet durch die vollständige kriegsbedingte Abgeschlossenheit von der Umwelt. Die Zeitschriften fehlten ganz oder trafen nur einzeln, mit grosser Verspätung ein. Zudem verhängten die U. S. A., Canada und Grossbritannien zu Beginn des Jahres 1943 eine Publikationssperre über alle Arbeiten, die sich mit der Produktion, Reinigung und Chemie des Penicillins befassten. Bis zum Eintreffen der ersten amerikanischen Ampulle (November 1944) hatten wir nicht einmal Vergleichsmöglichkeiten oder konkrete Anhaltspunkte dafür, ob unser

Antibiotikum wirklich identisch mit dem anglo-amerikanischen Penicillin war.

Veröffentlichungen über die biologischen Arbeiten waren schon bei Beginn der Arbeit in unserer Karthothek recht gut vertreten und stellten ihr weiteres Erscheinen während der Kriegsjahre nie ganz ein. Die klinisch-therapeutischen Publikationen erreichten uns in einem rasch anwachsenden, beinahe unübersehbaren Strom.

Ganz im Gegensatz dazu existierten nur sehr wenige Publikationen über Reinigung und Chemie des Penicillins, und sie waren zudem grösstenteils in Form vorläufiger Mitteilungen gehalten [12, 1, 2, 3, 11, 4, 15]*). Wertvoll waren vor allem die Arbeiten der Oxforder Gruppe (*Abraham, Baker, Chain, Florey, Holiday, Robinson* et al.), die über den damaligen Stand (Frühjahr 1942) der chemischen und physikalischen Untersuchung berichteten [6], den Stickstoffgehalt erkannten [5] und das Abbauprodukt Penicillamin isolierten [7]. *Duffin* und *Smith* [16] gaben die Isolierung der Penillsäure, eines anderen Abbauprodukts von Penicillin, bekannt. Amerikanische Forscher (*Chaffee, Hobby, Meyer* et al.) beschrieben die Herstellung von Ammoniumsalzen, acetylierten Produkten und Estern [19, 24, 25], und etwas später erreichte uns noch die Mitteilung der Londoner Gruppe (*Catch, Cook, Heilbron*) über die chromatographische Reinigung von Penicillin an Silicagel [10].

Sehr zuverlässig oder endgültig waren aber auch diese Arbeiten nicht. So wurde beispielsweise die Anwesenheit von Schwefel sowohl im Penicillin wie auch im Penicillamin und der Penillsäure entweder nicht erkannt oder sogar in Abrede gestellt [6, 7]. Auch wurde von „kristallinen“ Ammoniumsalzen mit nur 240—250 OxU/mg gesprochen [19]. Heute wissen wir, dass es sich dabei um das Kristallinat einer Verunreinigung, wahrscheinlich Brenzschleimsäure, gehandelt haben muss.

Im übrigen waren wir im wesentlichen auf Zeitungsmeldungen und einige zusammenfassende Referate angewiesen, von denen ich

*) Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis.

diejenigen von *Coghill* [13] und von *Van Winkle* und *Herwick* [37] erwähnen möchte. Kurz vor Abschluss der vorliegenden Arbeit (Januar 1946) wurde das militärische Geheimnis, das die Chemie des Penicillins umgab, gelüftet. In einer kurzen, summarischen Zusammenfassung wurden die hauptsächlichsten Resultate gleichzeitig in verschiedenen Zeitschriften veröffentlicht, von denen uns diejenige in der *Nature* [29] zugänglich war. Die eingehende Würdigung und der Vergleich mit unseren Resultaten findet sich im Abschnitt J.

Die vorliegende Arbeit setzt sich ihrer Darstellung nach aus drei Teilen zusammen. Der erste beschäftigt sich mit der Reinigung und der Natur des Penicillins, während im zweiten Teil die hauptsächlichsten Untersuchungen und Resultate, die zur Konstitutionsermittlung beitragen, zusammengestellt sind. Im letzten Teil wird über einige Pilzstoffwechselprodukte berichtet, die während den Arbeiten mit Penicillin als mitlaufende Verunreinigungen aufgefunden worden sind.

I. Teil: Die Reinigung von Penicillin-Rohprodukten

Für die nachfolgenden Untersuchungen gelangten vorge-reinigte Penicillin-Konzentrate zur Verwendung, deren Herstellung *W. Schlegel* (Über die Gewinnung von Penicillin aus den Kulturen von *Penicillium notatum*, Diss. E. T. H. 1947) beschreibt. Zur Orientierung seien die standardisierten Aufarbeitungsmethoden hier nochmals skizziert.

1. Aufarbeitung aus wässrigem Kulturmedium (surface culture, deep culture)

Das klare Kulturfiltrat mit 40–160 Pa/ccm¹) (1–4 OxU/ccm) wird mit 10-proz. Schwefelsäure auf pH 2,6 angesäuert und mit Äthylacetat extrahiert. Es folgt eine erste Adsorption an Aluminiumoxyd, wobei die meisten Neutralstoffe und schwachen Säuren entfernt werden. Das mit Phosphatpuffer, pH 6,8 aus der Säule eluierte Penicillin ist gegenüber dem Kulturfiltrat zwei- bis fünfmal reiner, und zugleich wird eine rund hundertfache Konzentration erreicht (4000–20000 Pa/ccm).

Durch erneute Extraktion mit Essigester und nachfolgendem zweitem Chromatogramm an Aluminiumoxyd, wobei die Säule nach dem Entwickeln geschnitten wird, gelingt eine nochmalige zweifache Reinigung und Konzentration.

Die besten Fraktionen werden angesäuert, mit Äther ausgeschüttelt und durch sorgfältige Extraktion mit Baryt-lauge in die Bariumsalzlösungen übergeführt, wobei oft eine zusätzliche Reinigung beobachtet werden kann. Die eingefrorenen, neutralen Lösungen werden lyophil getrocknet.

¹) Über die Definition unserer P-Einheiten siehe *L. Ettlinger* [17] und *W. Schlegel* (Diss. E. T. H. 1947); vgl. auch Abschnitt C: „Salze der Penicilline“.

Das auf diese Weise erhaltene Produkt mit ca. 900—5000 Pa/mg (20—110 OxU/mg) wird im folgenden als Standard I Präparat bezeichnet.

Eine spätere Variante der Aufarbeitung bestand darin, nach dem zweiten, geschnittenen Chromatogramm eine Extraktion mit Methylenchlorid einzuschieben.

2. Aufarbeitung von Kleiekulturen

Die krümelig-feuchte Kleie (5000—20000 Pe/g trockene Kleie) wird mit Essigester unter Zusatz von fein pulverisiertem Kaliumbisulfat gerührt. Nach der Filtration wird der Essigesterextrakt gut getrocknet und wie oben an Aluminiumoxyd adsorbiert. Da diese Produkte bedeutend reiner sind als jene aus wässrigen Kulturen, erübrigt sich ein geschnittenes Chromatogramm.

Es war jedoch bald offensichtlich, dass unsere Penicillin-Bariums Salze in Form des Standard I Präparates bei weitem noch nicht einheitliche Stoffe sein konnten.

Eine erste Aufgabe bestand also darin, neue Methoden und Wege ausfindig zu machen, die eine weitere effektive Reinigung ermöglichten. Die grosse Empfindlichkeit des Penicillins gegenüber Oxydation, Wärme, pH-Änderungen, primären Alkoholen, verschiedenen Kationen und Enzymen (siehe Abschnitt F), schliesst eine Reinigung nach normalen chemischen Methoden zum vorneherein aus; als Reinigungsmethode kommt vor allem die Chromatographie in Frage.

A. Chromatographische Methoden

Das Prinzip der von *Abraham* und *Chain* [2, 6] in Anwendung auf das Penicillin beschriebenen Chromatographie beruht auf der Adsorption von konzentrierten Extrakten in organischen Lösungsmitteln (Äther, Amylacetat) an Aluminiumoxyd, nachfolgendem Schneiden der Säule und Elution mit Pufferlösungen. Anwendungen dieser Art sind von uns ausgiebig benützt worden (*W. Schlegel*, Diss. E. T. H. 1947) und eine weitere, nennenswerte Reinigung

der Bariumsalze, Standard I, auf dieser Basis ist nicht mehr zu erreichen.

Catch, Cook und Heilbron [10] berichten über eine neuartige Anwendung der Verteilungschromatographie (Partition Chromatography) nach *Gordon, Martin und Synge* [18], auf die später noch eingegangen werden soll.

Eine von diesen grundsätzlich verschiedene Methode der Chromatographie führte dann nach intensiver Bearbeitung zum Erfolg; nämlich das sogenannte „saure“ Chromatogramm.

1. Die „saure“ Chromatographie

Es handelt sich dabei im Prinzip um ein Anionenverdrängungschromatogramm aus wässrig-gepuffertes Lösung an mit Säure vorbehandeltem Aluminiumoxyd.

Die Anregung zu Untersuchungen dieser Art lieferten die Publikationen von *Schwab* und Mitarbeitern [32, 33]. Sie konnten Kationen anorganischer Salzgemische an unbehandeltem Aluminiumoxyd adsorbieren und mit verschiedenen Anionen selektiv eluieren. Noch interessanter ist ihr Anionenchromatogramm. Durch die Behandlung mit Säure wird die Adsorptionsfähigkeit des Aluminiumoxyds für Anionen stark gesteigert. Es können nun Anionen auf der Basis gegenseitiger Verdrängung chromatographiert werden. Die Autoren geben auch eine Verdrängungsreihe an.



Bei der Übertragung dieser Methode auf Säuregemische organischer Natur, wie sie in den Penicillinkonzentraten vorliegen, mussten folgende Umstände berücksichtigt werden:

1. Der Übergang von einem starken Elektrolyten zu einer organischen Säure.
2. Die pH-Empfindlichkeit des Penicillins.

Spekulationen führen hier nicht zum Ziel; das Problem wurde in über hundert Chromatogrammen experimentell untersucht und gelöst.

Es zeigte sich bald, dass das sogenannte Penicillin, im Reinheitsgrad des Standard-I-Präparates ein vielfältiges Säuregemisch von Pilzstoffwechselprodukten, in seiner Stellung in der Schwab-schen Verdrängungsreihe zwischen dem Phosphat-Ion und dem Chlor-Ion steht. Das Aluminiumoxyd wurde also mit Salzsäure vorbehandelt, das in Phosphatpuffer gelöste Penicillin an der Säule aufgezogen und mit weiterem Phosphatpuffer pH ca. 7 eluiert. Während des Durchlaufs kann eine Auftrennung der Initialzone beobachtet werden, indem die dunklen Schichten zurückbleiben und hellere Produkte schnell nach unten wandern. Verfolgt man den pH-Verlauf am Austritt, so zeigt sich, dass das ursprünglich niedere pH von 3,5 bis 4,5 beim Beginn des Auslaufs der biologischen Aktivität sprunghaft auf 5,8 bis 6,0 ansteigt. Darauf wandert das pH, solange noch organisches Material in der Säule ist, langsam bis 7,5 weiter und bleibt dann nach einem zweiten, weniger ausgeprägten Sprung bei pH 8,2 bis 8,6 stehen (vgl. Versuche 3 und 4)²⁾.

Wechselnd grosse Aktivitätsverluste, verschieden gute Auftrennung des Gemisches, sowie andere Schwierigkeiten in der Reproduktion der Chromatogramme erforderten die Auffindung, Untersuchung und genaue Festlegung der dabei ausschlaggebenden Faktoren.

Grossen Einfluss hatte vor allem die Vorbehandlung des Aluminiumoxyds mit Säure; dies setzte seinerseits eine genaue Kenntnis der Qualität des Adsorbens' voraus. Weiter musste das optimale Verhältnis der drei besonders empfindlichen Komponenten: Menge Salzsäure, bzw. Aluminiumoxyd zu Menge Initialphosphatpuffer zu Menge des darin gelösten Penicillins gefunden werden. Auch für die Konzentration des zum Eluieren benötigten Phosphatpuffers wurde der günstigste Wert ermittelt. Von mehr untergeordneter Bedeutung zeigten sich die Faktoren: Verhältnis der Aktivität zu Menge Aluminiumoxyd, benötigte Zeit, bzw. Durchlaufgeschwindigkeit, bedingt durch das Verhältnis von Höhe zu Durchmesser der Säule, und schliesslich die Temperatur.

²⁾ (Versuch ...): weist auf den entsprechenden Versuch in den „Experimentellen Belegen“ hin.

a) *Aluminiumoxyd*

Es zeigte sich, dass zur Definition des Aluminiumoxyds die gewöhnliche Aktivitätsbestimmung nach *Brockmann* und *Schodder* [9] nicht genügte.

Zwei weitere Eigenschaften des Adsorbens' und die genaue Kenntnis ihrer Werte waren wichtig:

1. Die Alkalinität: Aluminiumoxyd wird in Wasser aufgeschlämmt und mit 1n Salzsäure so lange titriert, bis die Aufschlammung noch nach 10 Minuten Kongopapier stark violett färbt. Der gemessene Wert wird als Sättigungswert des Aluminiumoxyds bezeichnet und soll ungefähr 1 ccm 1n HCl/1g Al_2O_3 betragen.

2. Die Reaktionsgeschwindigkeit: Aluminiumoxyd wird in wässriger Aufschlammung 90 Sekunden lang durchgeschüttelt und dann schnell mit einem Drittel des Sättigungswertes an Salzsäure versetzt. Die Reaktion der Aufschlammung wird alle 30 Sekunden mit Kongopapier geprüft, bis ein konstanter Farbton bestehen bleibt. Dies soll nach spätestens 90 Sekunden der Fall sein.

Aluminiumoxyd, das diesen Erfordernissen nicht entspricht, ist ungeeignet.

b) *Vorbehandlung des Aluminiumoxyds mit Salzsäure*

Bei der Anwendung von zu wenig Säure wird der normalerweise alkalische Charakter des Aluminiumoxyds zu wenig geändert, so dass die Adsorptionsfähigkeit zu klein ist. Das Penicillin läuft sofort durch, ohne sich aufzutrennen und wird zudem durch das mehr oder weniger hohe pH alkali-inaktiviert. Umgekehrt wird bei der Verwendung von zu viel Salzsäure das Adsorbens zu anionotrop. Das Roh-Penicillin wird stark zurückgehalten und gut aufgetrennt. Durch das niedere pH und die verlängerte Elutionszeit treten wieder Aktivitätsverluste ein.

Da die Daten des titrierten Aluminiumoxyds bekannt sind, kann man die zur Vorbehandlung benötigte Menge Salzsäure genau definieren. Als Optimum wurde 55 % des Sättigungswertes ermittelt, was offenbar der grössten Pufferwirkung entspricht.

Das Aluminiumoxyd wird also vor dem Gebrauch mit der berechneten Menge Salzsäure aufgeschlämmt. Nachdem die Säure adsorbiert ist, d. h. Kongopapier nicht mehr oder nur sehr schwach gebläut wird, wäscht man mit Wasser so lange aus, bis nur mehr Spuren Chlorid in der Waschflüssigkeit nachgewiesen werden können.

c) Phosphatpuffer

Der Puffer, eine Mischung von I und II Natriumphosphat mit dem pH 6,6, hat die Aufgabe, einerseits das Antibiotikum vor extremen pH-Werten zu schützen und andererseits das organische Säuregemisch selektiv aus der Säule zu eluieren. Aus diesen zwei Funktionen ergibt sich ein Optimum für die benötigte Puffermenge, d. h. sie muss in einem bestimmten Verhältnis zur Menge Penicillingemisch und zur Menge Aluminiumoxyd stehen. Die Konzentration der im Rohpenicillin enthaltenen Aktivität spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle und kann in weiten Grenzen schwanken.

Bei der Reinigung von Salzen aus Flachschiebkulturen, die gegenüber pH-Änderungen besonders empfindlich waren, verwendete man am besten auf 10 g Bariumsalz mit 800 bis 2500 Pa/mg 200 ccm 5% Phosphatpuffer und 350 g Aluminiumoxyd.

Bei den reineren und relativ beständigeren Konzentraten aus Kleiekulturen wird direkt die bei 0°C gesättigte filtrierte Pufferlösung (ca. 3proz.), die durchschnittlich $3 - 6 \cdot 10^5$ Pe/ccm enthält, auf die Säule gegeben; die Menge Adsorbens beträgt dabei, je nach der Menge der Verunreinigungen, 100—150 g Aluminiumoxyd pro 100 ccm Konzentrat.

Die günstigste Konzentration des als Elutionsmittel benötigten Phosphatpuffers pH 6,8 beträgt 2,5%.

d) Zeit und Temperatur

Ein Chromatogramm soll nicht mehr als drei Stunden beanspruchen, und die Temperatur soll nicht über 15°C betragen, weil sonst wegen der Wärmeempfindlichkeit des Penicillins Ver-

luste eintreten. Ist die Durchlaufgeschwindigkeit infolge tiefer Temperatur zu klein, so muss sie unbedingt durch Ansetzen eines entsprechenden Drucks gesteigert werden.

Die vorliegende Art, allgemein, organische Säuren aus wässrigem Medium zu chromatographieren, ist bisher noch nicht bekannt geworden. Die wenigen Arbeiten auf diesem Gebiet beschränken sich auf die Aminosäuren und stammen einerseits von *Wieland* und Mitarbeitern [35, 36] und *Schramm* und *Primosigh* [31], andererseits von *Gordon*, *Martin*, *Synge* et al. [14, 18] („Partition Chromatography“).

Es war deshalb von allgemeinem Interesse, etwas mehr über den Mechanismus dieser Art von Chromatographie zu erfahren. Einige wenige Untersuchungen möchte ich erwähnen, die durchgeführt wurden, soweit die intensive Bearbeitung des Penicillins dies gestattete. Die Resultate lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Die Adsorptionsfähigkeit für Säuren steigt bis zum Sättigungswert mit der Menge Salzsäure an, die zur Vorbehandlung des Aluminiumoxyds verwendet wurde. Dies ging klar hervor aus den vielen Versuchen, die zur Ermittlung des günstigsten Salzsäureprozentsatzes führten.

2. Sobald organische Säuren auf die Säule gegeben werden, treten im Eluat Chlor-Ionen auf (Versuch 3). Ebenso wird Schwefelwasserstoff von Penicillin aus der Säule verdrängt, wie ein Chromatogramm eines Penicillin-Reaktivierungsversuches mit H_2S zeigte.

3. Werden die organischen Säuren ihrerseits mit Phosphatpuffer ausgewaschen, so können Phosphat-Ionen erst von pH 8 an, d. h. wenn das organische Material eluiert ist, nachgewiesen werden (Versuch 3).

4. Eine Adsorptionssäule, die mit Phosphat gesättigt ist, adsorbiert keine organischen Säuren mehr. Auch ein Ausglühen zwecks Reaktivierung ist fast wirkungslos.

5. Die Wanderung der Säuren in der Säule erfolgt in Form ihrer Salze. Dieses kann sehr schön durch Chromatographie eines Indikators gezeigt werden; der Hauptteil der wandernden Indikatorzone besitzt die Farbe des Salzes (Versuch 1).

6. Natürlich kann auch das Kation einen gewissen Einfluss haben. Aus leicht ersichtlichen Gründen eluiert z. B. das Natrium-Ion stärker als das Ammonium-Ion.

7. Die Säuren werden nach ihrem pK aufgetrennt und treten in der Reihenfolge steigender pK-Werte aus der Säule aus (Versuch 2).

8. Punkt 7 gilt nur mit einer Einschränkung. Neben dem pK spielen noch andere Faktoren eine gewisse, allerdings untergeordnete Rolle. Grosse und wenig hydrophile Moleküle werden stärker zurückgehalten als kleine, leicht wasserlösliche, wie sich aus einer Reihe von zufälligen Beobachtungen entnehmen liess.

Die angeführten Punkte lassen sich mit allem Vorbehalt folgendermassen erklären:

Durch die Behandlung mit Säure wird der Charakter des Aluminiumoxyds grundlegend verändert. Natriumchlorid erscheint in der Waschflüssigkeit und Chlorionen bleiben im Adsorbens hängen (Punkt 2). Die Adsorptionsfähigkeit für Anionen ist stark gestiegen (Punkt 1); *Wieland* [35] spricht von anionotropem Aluminiumoxyd. Die Chromatographie beruht nun auf gegenseitiger Anionenverdrängung, wobei die meisten organischen Säuren in der Verdrängungsreihe von *Schwab* [32, 33] zwischen dem Chlor-Ion und dem Phosphat-Ion stehen (Punkte 2 und 3). Man kann jedoch auf Grund verschiedener Versuche der Ansicht sein, dass die Stellung eines Kations oder Anions in der Verdrängungsreihe von *Schwab* nicht unbedingt als feststehend betrachtet werden darf, sondern dass vielmehr dem Verhältnis der Konzentrationen, in welchem die Komponenten zueinander stehen, ebenfalls entscheidende Bedeutung zukommt.

Im Verlauf des Chromatogramms treten die organischen Säuren an die Stellen der Chlor-Ionen und werden ihrerseits von den Phosphat-Ionen verdrängt. Das Weiterwandern von einer Phosphatverdrängungsstelle bis zum nächsten günstigen Adsorptionsort, wo ein Chlor-Ion sitzt, geschieht in Form des Salzes (Punkt 5). Das verdrängte Chlor-Ion wandert zusammen mit dem Kation, das an den Austauschvorgängen nicht teilnimmt, aus der Säule (Punkte 2 und 6). Dabei ist es offensichtlich, dass die Säuren, die schon bei niederem pH Salze bilden, schneller weiter-

befördert werden als jene, die höhere pK-Werte besitzen (Punkt 7). Kompliziert wird dieser Vorgang nur noch durch das Auftreten zusätzlicher (nicht-ionogener) Adsorptionen, die von den übrigen Eigenschaften des organischen Moleküls (Grösse, Löslichkeit, Polarität) abhängen (Punkt 8).

Die Reinigung des Penicillins, die man durch „saure“ Chromatographie erreichen kann, hängt stark von der Zusammensetzung des Rohproduktes ab. Auch hier konnte man, wie schön früher (siehe W. Schlegel, Diss. E. T. H. 1947) beobachten, dass Material mit viel desaktiviertem Penicillin sehr schlecht gereinigt werden kann. Allgemein gilt, dass die Resultate umso günstiger ausfallen, je höher die Konzentrationen sind, mit denen gearbeitet wird; die Grösse des Ansatzes ist also ebenfalls bestimmend. Der Verlauf des Chromatogramms wird stets durch das pH kontrolliert und auf Grund des pH's in Fraktionen getrennt (Versuche 3 und 4). Bei der Verarbeitung von Produkten für therapeutische Zwecke in semiindustriellem Masstab genügt eine Auftrennung in zwei bis drei Fraktionen (hell, dunkel). Die ersten hellen Fraktionen enthalten durchschnittlich 50—90 % der total eingesetzten Aktivität bei Verwendung von Flachschichtprodukten, Standard I, und 70—80 % bei Verarbeitung von Material aus Kleiekulturen.

Der Reinigungskoeffizient beträgt, nach der Überführung in das Bariumsalz (siehe W. Schlegel, Diss. E. T. H. 1947) 10 bis 20 bei Standard-I-Präparaten und 2 bis 4 bei Kleiesalzen. Der Rest der eingesetzten Aktivität ist in den dunklen Fraktionen enthalten. Daraus hergestellte Bariumsalze sind oft hygroskopisch und nach der lyophilen Trocknung in Wasser schlecht löslich. Die totalen Aktivitätsverluste während des Chromatogramms überschreiten selten 10 %.

Später war uns dann auch die Möglichkeit gegeben, therapeutisches Penicillin amerikanischen Ursprungs (Merck, Heyden, Commercial Solvents Corporation) „sauer“ zu chromatographieren. Diese Produkte verhielten sich unserem Kleiematerial sehr ähnlich und liessen sich ausgezeichnet weiter reinigen (bis zu Salzen von 60 000 Pe/mg bzw. 1500 OxU/mg).

Auf Seite 21 findet sich eine Zusammenstellung der hauptsächlichsten Resultate.

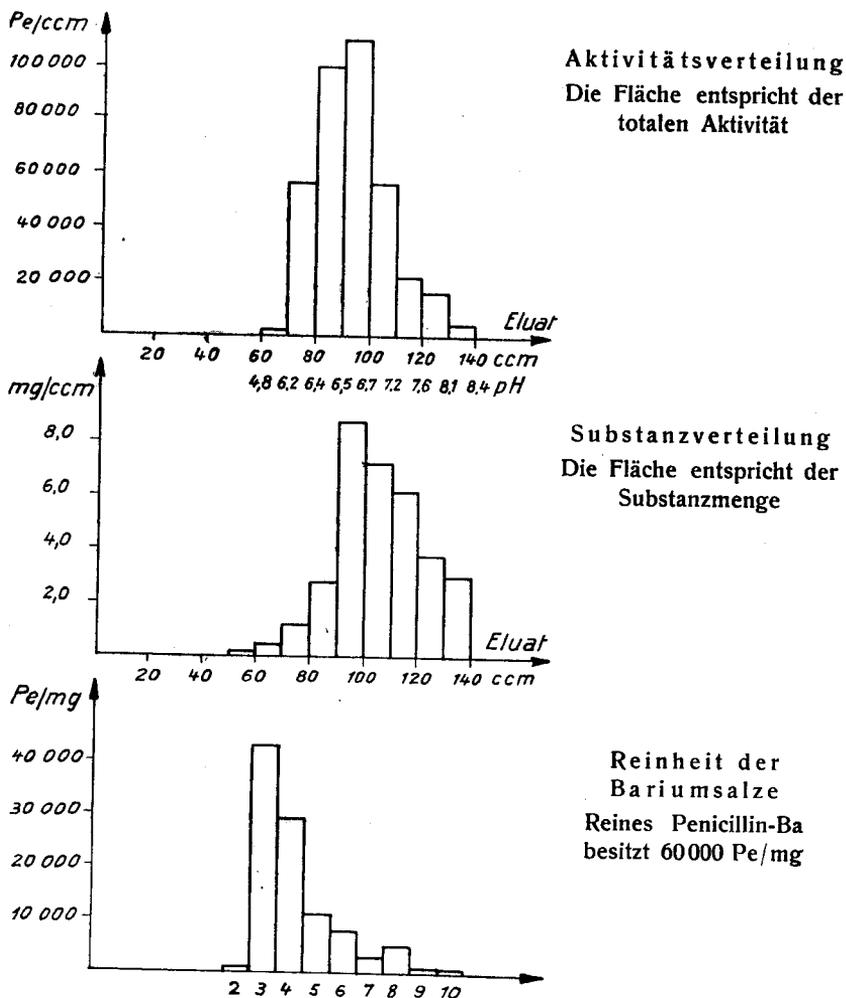


Fig. 1. Ausfraktionierung eines „sauren“ Chromatogramms (vgl. Versuch 4, experimentelle Belege).

Substanz: Ein Pufferkonzentrat aus Kleiekulturen, das standardisiert aufgearbeitet und über Methylenechlorid gereinigt worden war. $3,6 \cdot 10^6$ Pc.
Säule: Aluminiumoxyd, mit 57% HCl vorbehandelt.
Aktivitätsausbeute: 100%.

Ausfraktionierung und Wiederholung „saurer“ Chromatogramme

Um über die Verhältnisse zwischen aktiven Substanzen und Ballaststoffen und um über die Natur dieser Verunreinigungen Auskunft zu erhalten, wurden verschiedentlich einzelne Chromatogramme in sehr viele Fraktionen zerlegt. Dabei wurde jede Fraktion einzeln in das Bariumsalz übergeführt, gewogen und getestet.

Auf Seite 22 sind anhand eines Beispielen die Resultate in Diagrammen aufgezeichnet, die besser als Zahlen die Verhältnisse wiedergeben (Fig. 1).

Die entsprechenden Zahlen finden sich im Versuch 4 (experimentelle Belege).

Man sieht deutlich, dass der grösste Teil der Aktivität zwischen pH 6,2 und 7,2 eluiert wird, wobei die reinste Fraktion um pH 6,2—6,4 erscheint. Die Hauptmenge der Substanz ist gegen die alkalische Seite verschoben, d. h. die Verunreinigungen sind hauptsächlich schwächere Säuren als Penicillin.

Material aus Flachschiehtkulturen verhält sich etwas verschieden. Neben den Verunreinigungen schwachsauren Charakters sind auch stärkere Säuren als Penicillin vorhanden. Die Elution der Hauptaktivität ist im Vergleich mit Kleiematerial um 0,2—0,4 pH-Stufen nach der auren Seite hin verlegt.

Es stellte sich natürlich die Frage, ob durch wiederholte Chromatographie an einem bereits auf diese Weise gereinigten Material eine weitere Aktivitätssteigerung zu erreichen wäre, besonders im Hinblick auf die oft ansehnlichen Aktivitätsmengen, die in den dunklen Endfraktionen enthalten sind.

Eine Versuchsreihe, die mit Salzen verschiedenster Herkunft durchgeführt wurde, zeitigte das Resultat, dass eine weitere Reinigung nur durch noch schärfere Ausfraktionierung zu erreichen ist. Ausserdem ist der Erfolg stark von der Wahl des Ausgangsmaterials abhängig. So gelang es, von einem bereits „sauer“ chromatographierten Bariumsalz mit 7500 Pc/mg zu einem solchen von 47 000 Pc/mg (1000 OxU/mg) zu gelangen, während im allgemeinen nur eine 1½—2-fache Reinigung erzielt werden konnte.

Eine weitere Auftrennung der dunklen Fraktionen ergab, wie aus den angeführten Diagrammen (Fig. 2) hervorgeht, dass die Aktivität von den Begleitstoffen nicht mehr getrennt werden kann.

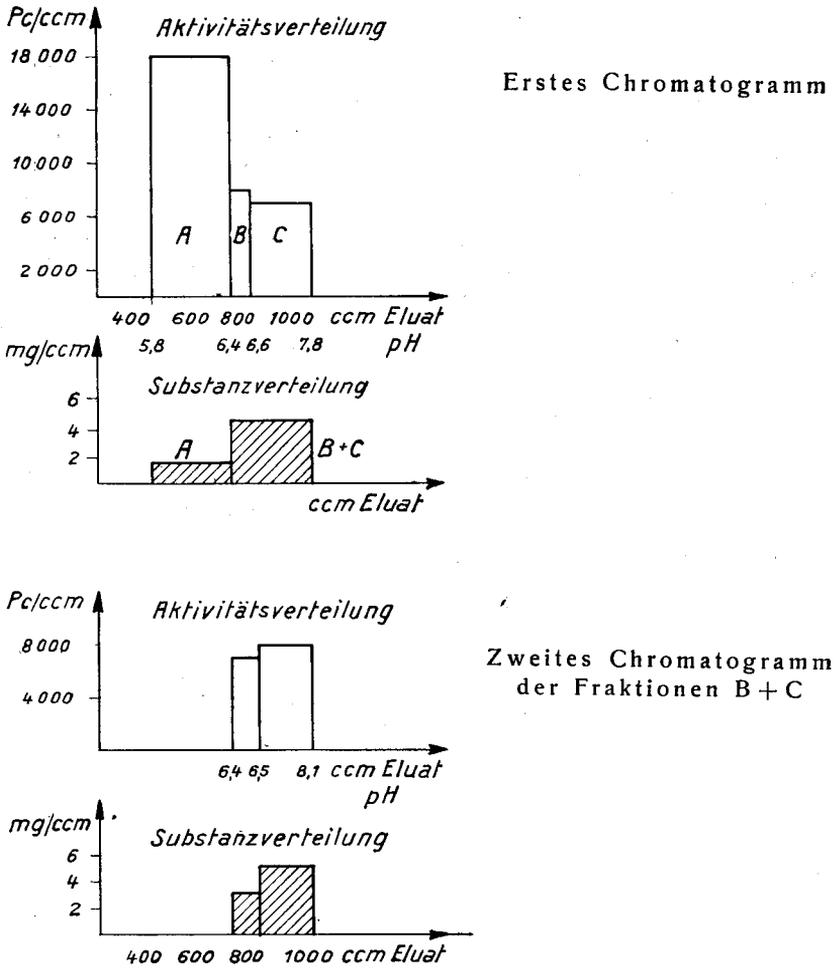


Fig. 2. Chromatogramm eines Bariums Salzes aus Flachsichtzuchtung und Re-Chromatographie der Dunkelfractionen (B + C).

Man beachte das pH, bei welchem die Fraktionen erscheinen!

Aus einer Fülle derartiger Ergebnisse wurde schon früh der Schluss gezogen, dass im Rohpenicillin verschiedene penicillinaktive Komponenten vorhanden sind. Diese Penicilline verhalten

sich biologisch fast gleich und müssen auch in ihrem Aufbau eng verwandt miteinander sein.

Auf diese Weise verhalf das „saure“ Chromatogramm zu einer Art Analyse, die eine einfach auszuführende Untersuchung irgend eines Materials erlaubte und mit welcher Veränderungen durch chemische Eingriffe wie Reduktion oder Oxydation (siehe Abschnitt B) festgestellt werden konnten.

2. Die Verteilungschromatographie (Partition Chromatography)

Parallel zur Ausarbeitung des „sauen“ Chromatogramms wurden auch Untersuchungen über die Anwendung der Verteilungschromatographie [14, 18] zur Reinigung von Penicillin angestellt, so wie sie *Catch, Cook* und *Heilbron* [10, 15] angedeutet haben. Die Verfasser chromatographieren Penicillin aus Äther oder Amylacetat an Silicagel oder „Hyflo-Supercel“ als wasserhaltigem Träger. Dem Silicagel wird das Hydroxyd eines Alkali- oder Erdalkali-Metalls beigemischt, oder 2,5 % eines Erdalkal karbonats wird vor dem Gebrauch auf den Träger niedergeschlagen. Durch häufiges Überführen von der wässrigen Phase in die organische und zurück werden die Säuren nach ihrer Stärke in Zonen getrennt, indem die schwächeren in der Säule nach unten wandern und die stärkeren in den oberen Teilen zurückgehalten werden. Die Autoren erreichen damit, ohne Aktivitätsverlust, eine vielfache Konzentration und Reinigung, die zu Strontiumsalzen von 500 bis 750 OxU/mg (22 500—34 000 Pe/mg) führt.

Für unsere Versuche verwendeten wir Silicagel, das nach der Vorschrift von *Gordon, Martin* und *Synge* [18] hergestellt wurde. Aus der wässrigen Aufschlammung, die die berechnete Menge Bariumhydroxyd enthielt, wurde durch Einleiten von Kohlendioxyd 2,5 % Karbonat an den Träger niedergeschlagen, kurz mit kohlenensäurehaltigem Wasser gewaschen und bei 100° C getrocknet. Eine wässrige Aufschlammung dieses Produktes besitzt das pH 6,6.

Verschiedene technische Schwierigkeiten bereitete die Dosierung des Wassergehaltes im Silicagel, sowie das Einfüllen der Säule. Das Silicagel-Bariumcarbonat wurde mit 15 oder 20 Ge-

wichtsprozenten Wasser angefeuchtet und leicht zerkrümelt, so dass ein scheinbar trockenes Pulver entstand. Dieses wurde dann mit dem organischen Lösungsmittel (Chloroform, Äther, Äthylacetat) überschichtet, gut gerührt und nach 15 Minuten in die Säule eingefüllt (Versuch 5). Das mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahierte Penicillin (aus flacher Schicht) liess man nun in die Säule einlaufen und wusch mit weiteren Mengen Solventien, am besten Äthylacetat, nach.

Anfangs erschienen wechselnde Mengen eines hellgelben inaktiven Pigmentstoffes im Eluat, worauf sich in der Säule langsam, von oben nach unten drei scharf getrennte Zonen mit den Farben dunkelrotbraun (1 cm), hellocker (4 cm) und hellgrüngelb (4 cm) ausbildeten. Nach dem Zerschneiden der Säule wurden die drei Fraktionen mit Puffer eluiert und in die Bariumsalze übergeführt. Die dunkle Fraktion enthielt dabei fast die vollständige biologische Aktivität und war etwa dreimal reiner als das Ausgangsprodukt (Versuch 6).

Offenbar war unser damaliges Material aus flacher Schicht für diese Art der chromatographischen Reinigung nicht besonders gut geeignet. Unterdessen hatte sich auch das „saure“ Chromatogramm bereits so weit entwickelt, dass die Resultate jene der Verteilungschromatographie übertrafen. Um der „sauen“ Chromatographie ebenbürtig zu sein, müsste zudem das Chromatogramm von *Catch, Cook* und *Heilbron* [10, 15] nach der Durchlaufmethode ausgeführt werden können, da das Ausstossen und Zerschneiden der Säule stets heikel und zeitraubend ist. Durch richtige Dosierung von Adsorbens und Adsorbat und durch Anwendung geeigneter Lösungsmittel suchten wir diese Forderung zu erfüllen; die damals stets wechselnde Beschaffenheit unseres Ausgangsmaterials verunmöglichte jedoch bald die weiteren Untersuchungen.

3. Versuche, Säuren in organischen Medien zu chromatographieren

Trotz der bisher angewandten, verschiedenen Reinigungsmethoden zeigte es sich immer mehr (siehe Abschnitt E), dass auch unsere „sauer“ chromatographierten Bariumsalze mit 10 000 bis

20 000 Pe/mg noch weit davon entfernt waren, einigermaßen einheitliche Stoffe darzustellen. Eine kurze Rekapitulation zeigt folgendes Bild:

Das erste und zweite Chromatogramm an Aluminiumoxyd (siehe auch standardisierte Aufarbeitung I, *W. Schlegel*, Diss. E. T. H. 1947) besteht in einem Aufziehen und Entwickeln des Säuregemisches aus organischem Lösungsmittel und Elution mit wässrigem Puffer. Diese Reinigungsmöglichkeit ist praktisch erschöpft oder lässt sich nur wenig, dafür aber mit grossem Aktivitätsverlust verbessern. (Vgl. auch *Abraham* und *Chain* [6].) Genau das Gleiche gilt für das in rein wässrigem Medium arbeitende „saure“ Chromatogramm. Die Verteilungschromatographie (Verteilung in organischer und wässriger Phase) führt nicht weiter, da sich ihr Reinigungseffekt grösstenteils mit demjenigen des „sauen“ Chromatogramms deckt. Eine prinzipiell andere Möglichkeit ist es, organische Säuren in nur organischem Medium zu chromatographieren.

Die übliche Methode an Aluminiumoxyd vom Typus Brockmann versagt bekanntlich, weil die Säuren und viele Phenole so stark adsorbiert werden, dass sie mit keinem organischen Lösungsmittel mehr eluiert werden können; schuld daran ist sicher die Carboxyl- bzw. Enol-Gruppe. In der Praxis wird denn auch dieses Hindernis so umgangen, dass die Säuren in Form ihrer Derivate chromatographisch bearbeitet werden. (Siehe Abschnitt D.) Eine solche Umgehung war aber im Hinblick auf das Ziel, hochaktive Salze des Penicillins zu erhalten, unerwünscht, da die Verseifung der Penicillinester unter Erhaltung der Aktivität praktisch unmöglich erscheint³⁾. oder nur in Spezialfällen (Hydrilester [24]) ausgeführt werden kann.

Eingangs möchte ich darauf hinweisen, dass die im Folgenden angeführten Versuche lediglich orientierenden Charakter haben und nicht über Vorversuche hinaus gediehen sind.

Der Gedanke lag nahe, als Adsorbens ganz schwach aktives (im Sinne von *Brockmann*), sogenanntes „totgebranntes“ Aluminiumoxyd, also technische Tonerde, zu verwenden. Die ersten Ver-

³⁾ Nach Angaben von Dr. *E. Chain* (Vortrag E. T. H. Febr. 1946) gelingt die Verseifung bei -70°C in Pyridin.

suche, die direkt mit Penicillin durchgeführt wurden, waren erfolgversprechend. Bei vorsichtiger Behandlung (Temperatur unter 0° C; wasserfreie Lösungsmittel) zeigte das Penicillin überraschende Beständigkeit. Das in Chloroform oder Benzol-Äther auf die Säule gegebene Säuregemisch wurde unter Verwendung der üblichen Lösungsmittelreihe im Durchlauf chromatographiert. Es konnte deutlich die Abtrennung einer ersten Verunreinigung festgestellt werden, die grösstenteils aus Brenzschleimsäure (vgl. Abschnitt K) bestand. Die anschliessenden Fraktionen enthielten eine weitere, stickstoffhaltige Verunreinigung (Succinylleucin); dann erschienen die besten aktiven Fraktionen, die gegenüber dem Ausgangsprodukt vier bis fünfmal reiner (36 000—45 000 Pc/mg), aber mengenmässig sehr gering (10 %) waren. Die letzten, stark gelben Fraktionen umfassten die Hauptmenge der Aktivität, zusammen mit dem Rest der Verunreinigungen.

Die Schwierigkeit lag also immer noch bei der zu starken Adsorption, die sich hauptsächlich in der folgenden Erscheinung äusserte: Beim Aufziehen des Penicillins aus Chloroform oder Benzol-Äther wurde das gesamte Säuregemisch vom Adsorbens in einer kleinen, scharf abgegrenzten Zone zurückgehalten. Beim weiteren Entwickeln des Chromatogramms wanderte ein Teil derselben normal weiter und trennte sich auf; ein wechselnd grosser Anteil der Säuren blieb jedoch in der Initialzone hängen und konnte dann weder mit Methanol noch Wasser, sondern erst mit Puffer eluiert werden (salzartige Bindung). Die Untersuchung dieses Puffereluates zeigte, dass darin alle ursprünglich eingesetzten Säuren vorhanden waren, so dass angenommen werden musste, dass diese irreversible Adsorption nur durch das Adsorbens verursacht wurde.

Folgende Überlegungen bestimmten die weiteren Untersuchungen: Die Erfahrung zeigt, dass man verschiedene Arten der Adsorption unterscheiden muss. Eine erste, starke wird durch die Fähigkeit der Carboxylgruppe, Salze zu bilden, verursacht; eine zweite, schwächere beruht auf der Adsorptionsfähigkeit der übrigen funktionellen Gruppen des Moleküls. Man trachtete also danach, die Wirkung der Carboxylgruppe durch Ausschaltung der Ionisationsmöglichkeit zu verringern (absolute Lösungsmittel).

Durch Elimination des kationotropen Charakters der Tonerde (Reinigung und Vorbehandlung mit Säure) sollte die oben erwähnte irreversible Adsorption verringert werden können. Die Empfindlichkeit des Penicillins, vor allem der freien Säure gegenüber primären Alkoholen machte es zudem notwendig, die Aktivität mit einem lipophilen Lösungsmittel (Äther, Äthylacetat) zu eluieren, was durch ein sehr schwach aktives Adsorbens ermöglicht werden sollte.

Zehn verschiedene Tonerdesorten wurden nach folgenden Gesichtspunkten untersucht und behandelt (Versuch 7):

- a) **Korngrösse:** Diese muss einem Durchlaufchromatogramm angepasst sein. Durch Seihen, Aufschlännen in Wasser und Dekantieren wurde das zu feinkörnige Material abgetrennt.
- b) **Reinigung:** Durch Auskochen mit der 10-fachen Menge Wasser wurden die löslichen Verunreinigungen entfernt (Natrium- und Calcium-Sulfat, Sulfide). Tonerde, deren Aufschlammung ein pH über 7,0 zeigte, erwies sich als unbrauchbar.
- c) **Vorbehandlung:** Die Tonerde wurde durch Kochen mit einem Säureüberschuss vorbehandelt. Zur Verwendung gelangten: Salzsäure, Phosphorsäure, Citronensäure und Oxalsäure.
- d) **Trocknung:** Das Material wurde je nach der zur Vorbehandlung benützten Säure entweder vor dem Gebläse ausgeglüht oder bei 130° im Vakuum getrocknet.
- e) **Prüfung (Versuch 8):** Mit kleinen Proben wurden vergleichende Chromatogramme mit Picrinsäure ausgeführt, deren Verlauf erlaubte, die Brauchbarkeit der Tonerden zu beurteilen, wobei vor allem die Grösse der irreversiblen Adsorption (Ausbildung der Initialzone) Beachtung fand. Dabei erwies sich Material, das mit Citronensäure und Oxalsäure vorbehandelt worden war, ungeeignet; Salzsäure schien etwas günstiger als Phosphorsäure zu sein.

Mit dem besten Tonerdepräparat, das mit Salzsäure vorbehandelt worden war, fast keine irreversible Adsorption zeigte und aus dem Picrinsäure schon mit wenig Äthylacetat vollständig

eluiert werden konnte, wurden einige Trennungsversuche einfacher Säuregemische unternommen. Aus einem Gemisch gleicher Teile konnten ungefähr 20 % der eingesetzten Brenzschleimsäure und 70 % der Pikrinsäure in reinem Zustand abgetrennt werden. Salicylsäure und Anthranilsäure, sowie Picrinsäure und Anthranilsäure liessen sich fast quantitativ trennen.

Die Chromatographie von Penicillin an diesem ausgewählten Präparat zeitigte ebenfalls ein günstiges Resultat. Über 50 % der Aktivität wurde, teilweise mit fünffacher Reinigung, schon mit Essigester eluiert (Versuch 9). Da jedoch die irreversible Adsorption bei Verwendung von Tonerden nie vollständig unterdrückt werden konnte, suchten wir nach einem anderen Adsorbens.

Silicagel nach *Gordon, Martin* und *Synge* [18] schien die Forderungen zu erfüllen, wenn es zuerst gut mit Wasser und Alkohol ausgewaschen, mit wenig Salzsäure vorbehandelt und über Phosphorpentoxyd aufbewahrt worden war. Seine Adsorptionsfähigkeit ist, verglichen mit Tonerde, gering, und das Verhältnis von Adsorbens zu Substanzmenge muss in der Grössenordnung von 200 bis 500 : 1 gewählt werden.

Nach einigen gelungenen Vorversuchen mit einfachen Säuren wurde auch Penicillin mit Erfolg an Silicagel chromatographiert (Versuch 10). Irgend eine Salzbildung (irreversible Adsorption) konnte nicht festgestellt werden, und obgleich die Zonen nicht scharf abgezeichnet erschienen, war das Resultat gut. Fast die gesamte Aktivität erschien, zwei- bis vierfach gereinigt, mit Äthylacetat, während ansehnliche Mengen inaktiver, farbiger Substanzen nachher in den Methanolfractionen eluiert wurden.

Aus verschiedenen technischen Gründen wurden die Versuche in diesem Stadium der Untersuchung eingestellt. Der weitere Ausbau dieser Methode liegt offensichtlich in der Richtung einer verbesserten Vorbehandlung des Silicagels.

Zum Schlusse möchte ich noch auf die frappante Ähnlichkeit im Verlauf der Chromatogramme von freier Penicillinsäure und von Penicillinester (siehe Abschnitt D) aufmerksam machen, die als Hinweis dafür aufgefasst werden kann, dass die Möglichkeit tatsächlich besteht, Säuren unter Ausschaltung der Wirkung der ionisierten Carboxylgruppe wie Ester zu chromatographieren.

B. Reinigung durch Reduktion und Oxydation

1. Reduktion

Abraham und *Chain* [6] schalten in ihren Reinigungsprozess eine Reduktion mit Aluminiumamalgam ein. Die wässrige Bariumsalzlösung wird mit frisch zubereitetem Aluminiumamalgam versetzt und das pH fortwährend durch Zugabe von Salzsäure auf pH 7,0 gehalten. Ein gelbes Pigment fällt dabei aus, und die Suspension nimmt allmählich eine grünliche Farbe an. Nach der Überführung über Amylacetat in das Bariumsalz erscheint dieses gegenüber dem Ausgangsprodukt zwei- bis dreimal gereinigt (300 OxU/mg). Die totalen Aktivitätsverluste während der Reaktion betragen nur 10–25 %.

Reduktionen, die ganz analog mit Bariumsalzen aus eigener Züchtung, in flacher Schicht, durchgeführt wurden, bestätigten die Beobachtungen von *Abraham* und *Chain*. Bei Verwendung eines Ausgangssalzes von 800 Pa/mg (18 OxU/mg) betrug die Reinigung etwa das Vierfache. Dunkle Farbstoffe wurden während der Reduktion ausgefällt, und die saure chromatographische Analyse des grünlich aufgehellten Produktes zeigte im Vergleich mit der unbehandelten Substanz, dass vor allem die Ballaststoffe der dunklen Fraktionen entfernt worden waren (Versuche 11 und 12). Seite 32 zeigt die Bilder in Diagrammen, vor und nach der Behandlung mit Aluminiumamalgam.

2. Oxydation

Nach *Abraham* und *Chain* [6] wird Penicillin unter Aktivitätsverlust von Wasserstoffsperoxyd und Kaliumpermanganat leicht oxydiert.

Wir fanden, dass der Reinheitsgrad der Produkte dabei eine ausschlaggebende Rolle spielt. Gibt man zu einer Penicillinlösung steigende Mengen Kaliumpermanganat, so werden zuerst nur die farbigen Ballastfarbstoffe oxydiert, während das aktive Prinzip noch erhalten bleibt. Wasserstoffsperoxyd wirkt, etwas schwächer, im gleichen Sinne. (Über Jodoxydationen siehe Abschnitt F 4, b und c, F 5).

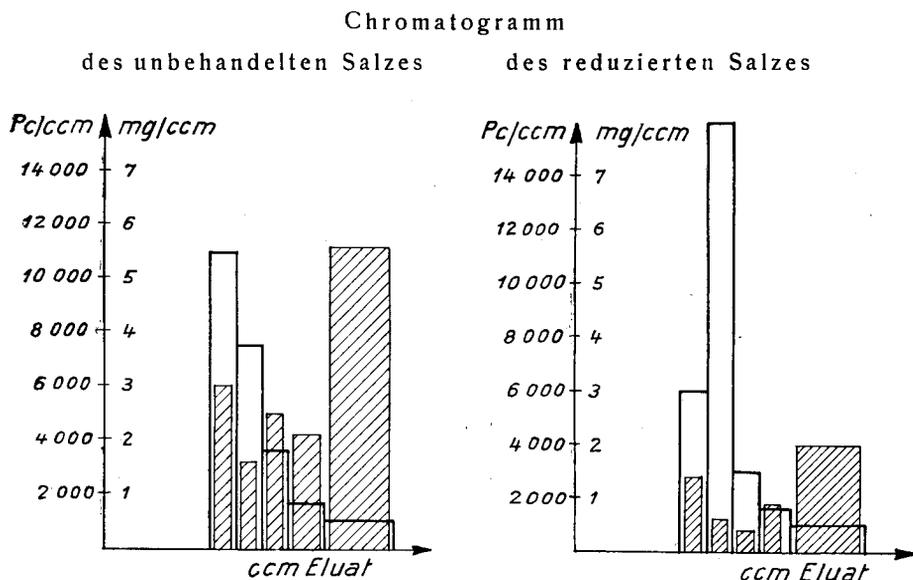


Fig. 3. Chromatographische Analyse vor und nach der Behandlung mit Aluminiumamalgam.

Nichtschraffierte Fläche = Aktivitätsmenge. Schraffierte Fläche = Substanzmenge. Die Reinheit kann aus dem Verhältnis von Aktivitätsmenge zu Substanzmenge abgelesen werden.

Auf dieser Beobachtung baute sich eine Reinigungsmethode auf, die vor allem für die in den dunklen Fraktionen des „sauren“ Chromatogramms anfallende Aktivität Verwendung fand. In einer kleinen Versuchsreihe wurde in jedem Fall zuerst die für die Aktivität maximal erträgliche Permanganatmenge bestimmt (Versuch 13). Im Hauptansatz wurde dann das Oxydationsmittel unter Rühren und bei 0°C zugetropft. Nach dem Abzentrifugieren des ausgeschiedenen Braunsteins wurde die angesäuerte Lösung mindestens viermal mit Äther gut ausgeschüttelt, wobei fast alle Farbstoffe im Wasser zurückblieben. Der Reinigungskoeffizient variierte je nach dem Ausgangsmaterial von 2 bis 16. Das Bild des sauren Chromatogramms bewies, dass Verunreinigungen der Nachfraktionen eliminiert worden waren (Versuch 14).

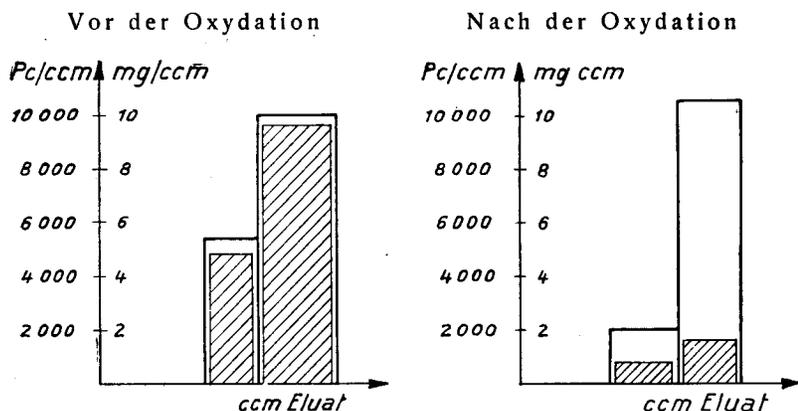


Fig. 4. Chromatographische Analyse der „Dunkelfractionen“ vor und nach der Oxydation mit Kaliumpermanganat.

Schraffierte Fläche = Substanzmenge

Es ist bemerkenswert, dass Material, das auf diese Weise behandelt worden ist, eine ganz ausserordentliche Empfindlichkeit gegenüber den verschiedensten Einflüssen zeigt und dass es nie gelang, Bariumsalze mit mehr als 5000—7000 Pc/mg zu erhalten. Auch das übrige Verhalten weist darauf hin, dass solches Material dem üblichen Penicillin nicht mehr gleichgesetzt werden darf. (Siehe auch Abschnitt F 5, F 6.)

C. Die Salze der Penicilline

In der Literatur [3, 6, 19, 24, 10, 25] werden fast alle Alkali- und Erdalkalisalze [6, 10] sowie Ammoniumsalze [25] der noch rohen Produkte besprochen und viele amorphe Schwermetall- und Alkaloidsalze [6] erwähnt. Der geringen Toxizität wegen findet neben dem Calciumsalz vor allem das Natriumsalz klinische Verwendung. Für Laboratoriumszwecke wird das leicht herstellbare und nicht hygroskopische Bariumsalz bevorzugt. Die Herstellung solcher Salze beschreibt W. Schlegel (Diss. E. T. H. 1947). Das in einem organischen Lösungsmittel gelöste, freie Penicillin (über

die Löslichkeit der freien Säure siehe *W. Schlegel*) wird meist mit einer wässrigen Lösung des betreffenden Hydroxyds ausgeschüttelt. Durch fraktionierte Extraktion mit Bariumhydroxyd kann mit noch nicht sauer chromatographiertem Material Standard I eine zwei- bis dreifache Reinigung erzielt werden, doch steht der Reinigungseffekt in keinem Verhältnis zum Arbeitsaufwand.

Wie *R. Coghill* [13] berichtet, gelang es erstmals *O. Wintersteiner* und *H. B. Mac Phillamy* am Squibb Institute for Medical Research kristallisiertes Penicillin in Form des Natriumsalzes zu erhalten. Ein Milligramm dieses kristallisierten Penicillin-Natriums G oder II besitzt nach Definition [34] 1666 internationale Penicillin-Einheiten oder 1650 Oxford-Einheiten. Da wir lange Zeit keine Möglichkeit hatten, unsere P-Einheit mit der Oxforder-Einheit zu vergleichen, waren wir über die Stärke unserer Präparate im unklaren. Der von uns aus verschiedenen Gründen anfänglich angenommene Umrechnungsfaktor: 1 OxU = 20 PE musste verschiedentlich abgeändert werden, bis er durch Vergleich mit dem Internationalen Arbeitsstandard definitiv festgelegt werden konnte. Es gilt:

$$1 \text{ Oxford-Unit} = 45 \text{ P-Einheiten}^4)$$

Reines Penicillin G oder II würde demnach rund 75 000 Pe/mg in Form des Natriumsalzes oder 66 000 Pe/mg als Bariumsalz besitzen.

Unsere besten Bariumsalze aus hiesigen Kulturen mit 34 000--47 000 Pe/mg (750--1050 OxU/mg), die wie die amerikanischen Produkte Penicillin G enthalten, sind also nur zu ca. 50--70% rein.

Versuche, unsere Produkte in Form der Natriumsalze, die meist durch Umsetzung der Bariumsalzlösungen mit Natriumsulfat hergestellt wurden, zu kristallisieren, sind bis jetzt gescheitert, oder die wenigen Kristalle konnten nicht isoliert werden.

Eine Zeitlang schenken wir dem Ammoniumsalz besondere Beachtung (Versuch 15); es schien Ansätze zur Kristallisation zu

⁴⁾ Über die Testmethodik, die Definition der P-Einheit und die Bedeutung ihrer Indices (Pa, Pb, Pc etc.) informiert *L. Ettlinger*, Ber. Schweiz. bot. Ges. 56 (1946).

zeigen, und seine Herstellung war oft mit einer vielfachen Reinigung verbunden. Aus der vollständig trockenen Äther- oder Chloroform-Lösung wurde das Penicillin durch Zugabe von trockenem ammoniakalischem Äther bzw. Chloroform fraktioniert ausgefällt. Die Fällung erfolgte bald trocken, kristallin-flockig und mit fast 100-proz. Aktivitätsausbeute, bald klebrig-ölig unter starker Desaktivierung.

Von rohen Bariumsalzen mit nur 2000 Pa/mg konnte man im Falle einer Ausflockung in trockener Form zu fast weissen, anscheinend kristallinen Ammoniumsalzen von bis zu 38 000 Pa/mg (850 OxU/mg) gelangen, die sogar aus Äthanol umgefällt werden konnten. Genauere Untersuchung zeigte dann, dass solche Salze beträchtliche Mengen Brenzschleimsäure (vgl. Abschnitt K) enthielten, die bei der Ausfällung kristallisierte und dem Penicillin als Träger diente; nach Zusatz von Brenzschleimsäure zu Material, das sich sonst ölig ausschied, fiel das Präzipitat in trockener Form aus. Da die angelsächsischen Forscher aus ihrem Material ebenfalls Brenzschleimsäure isolierten⁵⁾, darf man wohl annehmen, dass die Mitteilung von *Hobby, Meyer und Chaffee* [19], wonach sie mittels einer gleichartigen Ausfällung kristallisierte Ammoniumsalze von 240 OxU/mg erhalten hätten, auf derselben Erscheinung beruhte.

Mit folgenden Basen versuchten wir vergeblich kristallisierte Salze unserer Produkte zu erhalten: Trimethylamin, Triäthylamin, Anilin, Benzidin, Brucin, Strychnin, Cinchonidin.

Es soll nicht sehr schwierig sein, aus amerikanischen Produkten kristallisiertes Triäthylaminsalz zu erhalten, während aus Gemischen verschiedener Penicilline (wie es bei uns der Fall ist), meistens keine Kristalle isoliert werden können⁶⁾.

Nach der Veröffentlichung der anglo-amerikanischen Resultate [29] gelang es, aus unseren Produkten ein kristallisiertes Benzylamid-benzylaminsalz einer Penicilloinsäure zu isolieren, das den Schmelzpunkt F_p 122—124⁰ zeigte; es lieferte jedoch keine guten Analysenwerte (Versuch 16).

⁵⁾ Private Mitteilung von Herrn Dr. *E. Chain*, Oxford.

⁶⁾ Vortrag von Dr. *E. Chain* (E. T. H. 4. Februar 1946).

D. Die Ester der Penicilline

Wegen der Unmöglichkeit, die Penicilline als freie Säuren in trockener Form, z. B. als Pulver oder Öl aktiv zu erhalten, fanden schon früh die Ester besondere Beachtung.

Nachdem *Abraham* und *Chain* [6] erfolglos versucht hatten, Silbersalze mit verschiedenen Alkyljodiden umzusetzen, gelang es *Meyer, Hobby* und *Chaffee* [25] leicht, die Säuren mit Diazo-Körpern zu verestern. Die aliphatischen Penicillinester zeigen in vitro nur 0,3—1,2% der Aktivität der freien Säure, während sie in vivo durch die Esterase verseift werden und mit der vollen Aktivität wirken.

Die grossen Schwierigkeiten, die die weitere Reinigung unserer Salze bereitete, und die vergeblichen Kristallisationsversuche veranlassten uns, mit Estern, hauptsächlich den Methyl-estern, zu arbeiten.

Zur Veresterung wurde die Bariumsalzlösung mit Phosphorsäure oder Schwefelsäure angesäuert (pH 2,6) und mit Äther extrahiert; die trockene ätherische Lösung wurde sodann mit einem Überschuss Diazomethan versetzt. Verunreinigungen, welche dabei nicht verestert wurden, entfernte man durch Ausschütteln der Esterlösung mit Phosphatpuffer.

Aus einem Gramm Bariumsalz erhielt man je nach Ausgangsprodukt 350 bis 700 mg eines mehr oder weniger gelbbraunen Öls, das ungefähr 10% Methoxyl und 2—7% Schwefel enthielt, und bald rechts, bald links drehte ($[\alpha]_D = +56^{\circ}$; $-5,7^{\circ}$). Die in vitro-Aktivität betrug durchschnittlich 1—2% des eingesetzten Bariumsalzes.

Bei der chromatographischen Auftrennung der Rohester wurde ein deutlicher Unterschied in der Zusammensetzung und im Verhalten zwischen Material aus Flachs- und Kleiekultur offenbar. Beide Produkte konnten jedoch in zwei Substanzgruppen, eine schwefelfreie, inaktive und eine schwefelhaltige, aktive, aufgetrennt werden.

Bei der Chromatographie von Estern aus Flachs- und Kleiekultur (Versuch 17) wurde mit Benzol 30—40% der eingesetzten Substanz in Form farbloser bis hellgelber, meist dünnflüssiger Öle

eluiert, die oft mit Kristallen durchsetzt waren. Die ersten Fraktionen waren stickstofffrei, optisch inaktiv und enthielten hauptsächlich Brenzschleimsäureester, während die späteren in zunehmendem Masse stickstoffhaltig waren, stark links drehten ($[\alpha]_D = -22^\circ$) und nach saurer Hydrolyse eine positive Ninhydrinfärbung gaben (siehe Abschnitt M, Succinyl-1-Leucin). Eine weitere stickstoffhaltige, jedoch schwefelfreie, gewichtsmässig kleine Verunreinigung erschien mit Äther. Der reinste (7,3 % S), aktivste (1000 Pc/mg) Penicillinester wurde im ersten Essigestereluat als viskoses, hellrotes Öl gefunden (Gewicht 5—15 %). Die folgenden Äthylacetatfraktionen waren schwächer aktiv, hochviskos, dunkelrot und enthielten bedeutend weniger Schwefel. Produkte mit viel desaktiviertem Material gaben mengenmässig grosse Nachfraktionen (bis 60 %).

Die Ester aus Bariumsalzen, die aus Kleiekulturen (Versuch 18) gewonnen worden waren, zeigten ein einheitlicheres Bild. An inaktiven Vorfraktionen, die hauptsächlich ein Gemisch einfacher Dicarbonsäureester darstellten (siehe Abschnitt N bis P), konnten nur 5—10 % abgetrennt werden. Die aktiven Substanzen erschienen, mit einem ersten Reinheitsmaximum, als dünnflüssige hellgelbe Öle (800 Pc/mg; 6,5 % S, Gewicht 11 %) schon in den Benzolfraktionen, und mit einer zweiten Aktivitätssteigerung in der ersten Essigesterfraktion (Gewicht 11 %). Aussehen (viscos), Farbe (rot), Aktivität (1200 Pc/mg), Schwefelgehalt (7,3 %) und weiteres dieses zweiten aktiven Penicillinesters stimmten mit demjenigen aus flacher Schicht überein.

Weitere chromatographische Auftrennung der reinsten Ester zeigte, dass eine nochmalige Anreicherung möglich war. Durch Destillation im Hochvakuum konnte ohne Aktivitätsverlust eine zusätzliche Reinigung erzielt werden (Versuch 19). Das beste Präparat aus Flachschiebkultur, das die untenstehenden Daten aufwies, zeigte Ansätze zur Kristallisation; infolge Materialmangel konnte die Untersuchung jedoch nicht weitergeführt werden.

Wie man sieht, entsprechen die Analysenwerte dieser Methyl-ester einer ungefähren Bruttoformel:

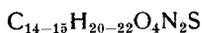


Tabelle 2. Analysendaten eines Methylesters

	gefundene Werte	berechnete Werte	
		C ₁₄ H ₂₀ O ₄ N ₂ S	C ₁₅ H ₂₂ O ₄ N ₂ S
C	57,37 %	53,83 %	58,26 %
H	6,79 %	6,45 %	6,79 %
N	7,11 %	8,97 %	8,59 %
S	10,99 %	10,26 %	9,82 %
OCH ₃	11,78 %	9,94 %	9,51 %
Van Slyke NNH ₂	4,33 %	4,48 %	4,29 %
Doppelbindungszahl	0	—	—
Aequivalentgewicht (nach alkal. Vers.)	146	156,19	163,20
Molekulargewicht	292	312,38	326,40
Siedepunkt Kp _{0,01}	ca. 180°	—	—
Spez. Drehung [α] _D ²⁴	+ 207°	—	—
C = 1,80 % in CHCl ₃		—	—
UV.-Spektrum Max. Å	2800	—	—
E $\frac{1}{1}$ % 1 cm	7,2	—	—

II. Teil: Arbeiten zur Konstitutionsaufklärung

Es stellt sich ganz allgemein die Frage, ob es einen Sinn hat, mit Arbeiten zur Konstitutionsaufklärung zu beginnen, wenn das zu untersuchende Material nur zu 10—15 % rein ist und der biologisch wirksame Anteil zudem aus verschiedenen, allerdings ähnlichen Stoffen besteht. Zieht man jedoch die besonderen Umstände in Betracht, wie sie bei den Penicillinen vorliegen, so ist es einleuchtend, dass wir schon früh versuchten, Näheres über die Zusammensetzung des wirksamen Prinzips zu erfahren.

Solche Arbeiten sind ihrer Natur gemäss äusserst langwierig, da wegen den vielen Verunreinigungen (welche eigentlich die Hauptmenge ausmachen) das Resultat eines einzigen Versuches an und für sich nichts aussagt. Die Eigenschaften des aktiven Prinzips können nur durch Reiheversuche mit Präparaten verschiedener Reinheitsgrade erkannt und die Ergebnisse durch Extrapolation

tion errechnet werden. In seinem Vortrag über die Chemie der Penicilline (E. T. H. 4. Februar 1946) hat Dr. *E. Chain* mitgeteilt, dass auch in Oxford die Konstitutionsaufklärung grösstenteils mit unreinem Material durchgeführt worden ist.

Wir besaßen keine kristallisierten Produkte; Bariumsalze von 6000—10000 Pe/mg (ca. 10—15-proz.) waren relativ reichlich vorhanden, doch enthielten sie soviel desaktiviertes Material, dass sie sich als Salz nicht mehr weiter reinigen liessen. Sie wurden deshalb grösstenteils in Form der Ester, deren Reinigung teilweise möglich war, zu weiteren Untersuchungen verwendet.

Für die nachstehend beschriebenen Untersuchungen standen uns im wesentlichen 5 g Bariumsalz aus Kleiekulturen mit etwa 20000—34000 Pe/mg (30—50-proz.) zur Verfügung, die für direkte Abbauversuche genügend rein schienen.

Im Oktober 1945 erhielten wir dann noch eine grössere Menge amerikanischen, therapeutischen Materials, das sich leicht bis zu Bariumsalzen von 50000—60000 Pe/mg (75—90-proz.) reinigen liess und vor allem zur Isolierung von Penicillamin und Penilloaldehyden Verwendung fand.

E. Orientierende Analysen (Zusammenfassung)

Vergleichende Elementaranalysen von Salzen, die schon in einem frühen Stadium der Reinigung durchgeführt wurden, zeigten, dass das Antibioticum neben Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff auch Stickstoff enthalten musste, da der Stickstoffgehalt mit der Aktivität anstieg (vgl. auch [2, 6]).

Ba-Salz, St. I, Rohprodukt	800 Pe/mgN	1,89 %
Ba-Salz, St. II, 1 × sauer chromatogr.	7 200 Pe/mgN	2,27 %
Ba-Salz, St. III, 2 × sauer chromatogr.	36 000 Pe/mgN	3,09 %

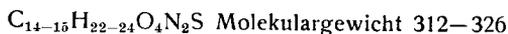
Der N-Gehalt konnte aber bei der Reinigung auch vorerst fallen, da Salze aus flacher Schicht meist stickstoffreiche Nebenprodukte aufwiesen (siehe Abschnitt M) wie z. B. ein Bariumsalz mit nur 900 Pe/mg und N 10,48%.

Die Methoxywerte waren entweder Null oder verschwindend klein.

Die Analyse von gereinigten Estern bewies im weiteren die Anwesenheit von Schwefel (*Plattner* [27]), was wir kurz darauf beim Eintreffen der Publikationen von *van Winkle* und *Herwick* [37] bestätigt fanden. Da die Anwesenheit von Barium die analytischen Kohlenstoff- und Schwefel-Werte unsicher machte, konnten nur die Analysen von Estern erfolgreiche Verwertung finden. Aus den vielen Daten, wie sie z. B. im Abschnitt D (Seite 38) dargestellt worden sind, konnte Folgendes gesichert werden:

Das Penicillin (bzw. die Penicilline) besitzt bei einem Molekulargewicht von ungefähr 300 (freie Säure) eine Carboxylgruppe, die bei der Einwirkung von Diazomethan verestert wird; im weiteren sind keine Methoxylgruppen vorhanden; auch eine leicht hydrierbare Doppelbindung liegt in unserem Falle nicht vor. Es enthält pro Carboxylgruppe ein Schwefelatom und zwei Stickstoffatome.

Der N-Gehalt war bei unseren Produkten stets etwas zu niedrig (oder der S-Gehalt zu hoch), so dass pro Schwefelatom nur 1,5—1,9 N-Atome vorhanden waren. (Vergleiche auch die zu niederen N-Werte in den Bruttoformeln von *Abraham* und *Chain* [6], sowie von *Catch*, *Cook* und *Heilbron* [10]. Die Bruttoformel für den Methylester aus Flachschiebkultur ist als wahrscheinlich:



d. h. freie Säure:



Aus den U.V.-Absorptionsspektren ⁷⁾ liessen sich keine weiteren Schlüsse ziehen, und sie trugen hauptsächlich dazu bei, Nebenprodukte zu identifizieren (siehe Abschnitte K und L). Extinktionsmaxima bei Rohprodukten verschwanden bei zunehmender Reinheit und liessen neue Maxima auftauchen, die aber ebenfalls Verunreinigungen zuzuschreiben waren. Die reinsten Methylester zeigten noch ein wenig ausgeprägtes Maximum bei 280 $m\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 7,2$) (vgl. [10, 24]). Auch vergleichende Spektren bei verschiedenartiger Desaktivierung (Hitze, Säure, Alkali, Peroxyd, U.V.-Bestrahlung) ergaben nur undeutliche Resultate (vgl. auch [6]).

⁷⁾ Herrn E. Heilbronner, der die Absorptionsspektren aufnahm, möchte ich für seine Arbeit herzlich danken.

Hingegen zeigte die Bestimmung der spezifischen Drehung, dass bei steigender biologischer Aktivität die Rechtsdrehung zunahm (vgl. [10, 24]). Salze aus Kleiekulturen waren allgemein optisch stärker aktiv als solche aus Flachschiehtkulturen, da die letzteren viel mehr linksdrehende Nebenprodukte mit sich führten.

Tabelle 3. Spezifische Drehung

Ba-Salz (Kleie)	10 000 Pc/mg $[\alpha]_D^{13} + 96^{\circ}$ (c = 1,23 % in H ₂ O)
Ba-Salz (Kleie)	23 800 Pc/mg $[\alpha]_D^{13} + 142^{\circ}$ (c = 1,42 % in H ₂ O)
Ba-Salz (Flache S.)	47 000 Pa/mg $[\alpha]_D^{17} + 106^{\circ}$ (c = 0,644 % in H ₂ O)
Ba-Salz gereinigt aus Commercial Solvents Corp. Prod.	58 000 Pe/mg $[\alpha]_D^{13} + 189^{\circ}$ (c = 0,933 % in H ₂ O)
Methylester (Flache S.)	1 400 Pc/mg $[\alpha]_D^{24} + 207^{\circ}$ (c = 1,80 % in CHCl ₃)

F. Desaktivierung und Abbau

Die ungewöhnliche Instabilität des biologisch aktiven Penicillins ist so charakteristisch, dass es in der diesbezüglichen Literatur wohl kaum eine Publikation gibt, die diese Eigenschaft nicht erwähnt.

Rein empirisch findet man, dass das Antibiotikum mehr oder weniger rasch durch folgende Agenzien zerstört wird: Enzyme wie Penicillinase [3] und Clarase [21] (siehe auch W. Schlegel, Diss. E. T. H. 1947), primäre Alkohole [6], Überschuss von organischen Basen oder Ammoniak in trockenen organischen Lösungsmitteln [6, 24], viele Schwermetallionen wie Cu, Pb und Zn [6], Oxydationsmittel wie Permanganat, Peroxyd, Chloramin T, alkalisches Ferricyanid und Ketonreagenzien [6, 24, 7, eigene Versuche], Säure, d. h. pH unter 6, Alkali, d. h. pH über 7 und ganz allgemein erhöhte Temperatur.

Abraham und Chain [6] haben erstmals die verschiedenen Inaktivierungsmechanismen untersucht. Sie finden durch elektrometrische Titration, dass die Säureinaktivierung mit der Alkaliinaktivierung bei Zimmertemperatur nicht identisch ist. Die Titrationskurve ist nur in einem kleinen pH-Bereich um den Neutralpunkt reversibel. Wird dieser überschritten, so erscheint nach der

Inaktivierung sowohl auf der sauren wie auch auf der alkalischen Seite je eine neue ionisierende Gruppe mit dem pK 7,6 bzw. 5,0. Ist eine dieser Gruppen einmal gebildet (z. B. durch Titration auf der alkalischen Seite, pK 5,0), so ist sie stabil, und die andere Gruppe (in diesem Falle pK 7,6) wird durch nachfolgende Titration auf der anderen pH -Seite (i. F. sauer) nicht mehr gebildet.

Die Inaktivierung durch Wärme erfolgt sowohl in alkalischem wie neutralem und saurem Milieu unter Verlust von Kohlendioxyd (5,6).

Im folgenden seien, kurz zusammengefasst, unsere hauptsächlichsten Untersuchungen und Resultate wiedergegeben.

1. Desaktivierung durch Bakterien, Alkohole und Amine (inkl. NH_3)

Über die Inaktivierung von Kulturfiltraten und Konzentraten durch Bakterien berichtet *W. Schlegel* (Diss. E. T. H. 1947).

In Methanol neutral gelöstes Bariumsalz wird in der Kälte kaum, dagegen beim Erwärmen auf $37^{\circ}C$ sofort desaktiviert; bei freier Penicillinsäure (pH ca. 2,6) tritt die Desaktivierung dagegen schnell schon bei $0^{\circ}C$ ein (*W. Schlegel*).

Wenn man bei der Herstellung von Penicillin-Ammonium- oder -Benzidin-Salzen (siehe Abschnitt C) mit einem Überschuss auch von trockener Base arbeitet, wird das Präzipitat ebenfalls desaktiviert.

2. Abbau durch heisse Hydrolyse

Erhitzt man eine neutrale, alkalische oder saure, wässrige Penicillinlösung, so wird Kohlendioxyd abgespalten.

a) Die CO_2 -Abspaltung

(Vgl. dazu Versuche 20 und 21)

In langen Reiheversuchen wurden Bariumsalze und Methyl-ester verschiedener Herkunft und Aktivität auf ihre Kohlendioxyd-
abspaltung hin untersucht. Die Reaktion wurde in Quarzgefässen

sowohl mit Schwefelsäure als auch mit Barytlauge bei 95—100° C ausgeführt. Die Werte der sauren und der alkalischen Abspaltung stimmen um so mehr miteinander überein, je reiner das betreffende Material ist. Es zeigt sich, dass die CO₂-Werte vor allem bei der alkalischen Abspaltung weniger mit der Aktivität pro mg als vielmehr mit dem Stickstoffgehalt direkt parallel gehen. Extrapoliert man die Resultate auf reines Penicillin, bzw. auf den vermuteten Stickstoffgehalt von rund 7%, so sieht man, dass fast alle Äquivalentgewichte in der Gegend von 170—200 liegen. Die nachstehende Tabelle enthält einige Beispiele.

Tabelle 4. CO₂-Abspaltung

(Werte in Äquivalentgewichten: mg Substanz/N-Atom bzw. $\frac{1}{2}$ CO₂)

Material	Pe/mg	N-Gehalt		CO ₂ in Äq. gew.		Extrapol. Wert auf 7% N ber.
		%	Äq.	sauer	alkal.	
<i>Ba-Salze</i>						
I aus Kleie	8 600	1,37	1022	720	621	122
II „ „	14 000	1,97	711	648	700	197
III „ „	14 400	1,45	966	1100	955	198
IV „ „	24 000	2,76	507	491	450	178
V flache Sch.	14 000	2,51	558	600	552	198
VI Heyden, U.S.	35 000	4,05	345	330	300	174
<i>Methylester:</i>						
VII aus Kleie	1 200	6,08	230	—	234	178 (8% N) ber.

Schlussfolgerungen: Da auf zwei Atome Stickstoff ein Molekül CO₂ abgespalten wird und das Kohlendioxyd sicher einen Bestandteil des Antibiotikums darstellt (steigende CO₂-Werte bei steigender Aktivität) kann obiges als Beweis dafür aufgefasst werden, dass im Penicillin 2 N-Atome vorhanden sind. Die Unparallelität zwischen CO₂-Wert und Aktivität/mg kann damit erklärt werden, dass desaktiviertes Penicillin ebenfalls noch Kohlendioxyd abspaltet. Tatsächlich müssen z. B. die Präparate I, II und V desaktiviertes Material enthalten, da, wie aus den

betreffenden Aufarbeitungsprotokollen hervorgeht, bei der lyophilen Trocknung infolge eines technischen Defektes grössere Aktivitätsverluste eingetreten waren. Aus dem nicht desaktivierten und gut ausgetesteten Präparat III mit 14400 Pe/mg und der Beziehung, dass reines Penicillin-Barium ca. 66000 Pe/mg enthält, lässt sich rechnerisch ein Molekulargewicht von rund 440 finden, d. h. ca. 312 für die freie Säure (vgl. Seite 40).

Eine Abspaltung von Kohlenmonoxyd, auch in Spuren, konnte nie beobachtet werden.

*b) Der Aminostickstoff nach van Slyke*⁸⁾

(Vgl. dazu Versuch 22)

Während Aminostickstoff-Bestimmungen an aktiven, frischen Bariumsalzen und Estern wenig von Null verschiedene Werte gaben, veranlasste uns das Auftreten einer positiven Ninhydrinfärbung nach der heissen Behandlung mit Säure eine diesbezügliche Untersuchung aufzunehmen.

In ihrer Mitteilung über Penicillamin schreiben schon *Abraham, Chain, Baker* und *Robinson* [7], dass nach der einstündigen Hydrolyse von Bariumsalzen mit 0,1 n Schwefelsäure bei 100° C 59% des Gesamtstickstoffes als Aminostickstoff nach *Van Slyke* bestimmbar sei.

Interessanterweise gelang es bei unserem Material nur in seltenen Ausnahmefällen, unter obigen Bedingungen so hohe Aminostickstoffwerte zu erhalten. Erst nach alkalischer Verseifung mit 0,1 n Barytlauge und nachfolgender Oxydation mit Jodlösung in schwach saurem Medium stieg der *Van Slyke*-Wert auf ungefähr die Hälfte des totalen Stickstoffgehaltes, ein bemerkenswertes Verhalten, auf das ich später nochmals zurückkommen werde.

Aus den Versuchsreihen, von denen hier einige Beispiele zusammengestellt sind, ging jedoch klar hervor, dass der Aminostickstoff sicher durch Hydrolyse des Antibiotikums entsteht und dass höchstens 1 Stickstoffatom des Penicillins daran beteiligt ist.

⁸⁾ Die Bestimmungen des Amino- und Ammoniak-Stickstoffes wurden teilweise von W. Ingold ausgeführt, dem ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Tabelle 5. Aminostickstoff nach *Van Slyke* (N_{NH_2})

Material	Total-N %	Hydrolysebedingungen	N_{NH_2} %	Anteil von total-N %
Ba-Salz (Kleie) 8000 Pc/mg	1,75 K	1 ^h 0,1 n HCL	100 ^o	0,32 18
		6 ^h 0,1 n HCL	100 ^o	0,59 34
		1 ^h 1 n HCL	100 ^o	0,89 50
Ba-Salz (Kleie) 23800 Pc/mg	2,76 D	ohne Hydrolyse, direkt		0,15 5,5
		1 ^h 0,1 n H ₂ SO ₄	100 ^o	0,38 14
		2 ^{1/2} ^h 0,1 n H ₂ SO ₄	100 ^o	0,33 12
		1/2 ^h 0,2 n Ba(OH) ₂	20 ^o	0,34 12
		J ₂ ; + 0,1 n HCL	1 ^h 100 ^o	0,72 26
Methylester (flache Sch.)	7,67 K	1 ^h 0,2 n Ba(OH) ₂ ; + J ₂	20 ^o	1,24 45=90% von 1 N
		4 ^h HCL 1 : 1	120 ^o	3,65 48=96% von 1 N

K = Kjeldahl-Bestimmung, D = Dumas-Bestimmung

Qualitative Orientierung über die Hydrolysate auf der Tüpfelplatte ergab, dass der Schwefel oft mit Nitroprussid-Natrium in soda-alkalischem Medium direkt nachgewiesen werden konnte. Da wir jedoch nach der sauren Hydrolyse nie Schwefelwasserstoff abfangen konnten, liess dies auf eine Sulfhydrylgruppierung schliessen, was auch dadurch wahrscheinlich gemacht wurde, dass mit Quecksilberchlorid eine weisse Fällung eintrat. Oft konnte aber der Schwefel in den Hydrolysaten weder direkt mit Nitroprussidnatrium noch auf Zusatz von Kaliumcyanid, sondern erst durch normalen Kaliumaufschluss (*Lassaigne*) gezeigt werden. Auch mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin erfolgte hin und wieder eine undeutliche Fällung.

c) Der destillierbare Stickstoff

(Vgl. dazu Versuch 23)

Weitere Untersuchungen zeigten, dass nach energischer saurer Hydrolyse Stickstoff derart vorlag, dass er mit Alkali, zum Teil als Ammoniak, abdestilliert werden konnte. Auffällig war, dass sein

Prozentsatz meistens mit demjenigen der *Van Slyke*-Analysen grössenordnungsmässig übereinstimmte.

Tabelle 6. Destillierbarer Stickstoff

Material	NNH ₂ %	Hydrolysebedingung	NNH ₈ %
Ba-Salz (Kleie) 8 600 Pe/mg	0,32	1 ^h 2n H ₂ SO ₄ 100 ^o	0,32
Ba-Salz (Kleie) 17 000 Pe/mg	0,23	1 ^h 2n H ₂ SO ₄ 100 ^o	0,23
Ba-Salz (Kleie) 23 800 Pe/mg	0,74	1 ^h 2n H ₂ SO ₄ 100 ^o	0,74

Um zu zeigen, dass der bei der Hydrolyse neben Aminostickstoff entstandene „Ammoniakstickstoff“ die *Van Slyke*-Resultate nicht verfälschte, wurde ein solches „Stickstoffdestillat“ unter *Van Slyke*-Bedingungen auf Stickstoffentwicklung geprüft; die Werte lagen innerhalb des Nullwertes.

Dass die beiden verschiedenen Stickstoffarten nach der Hydrolyse tatsächlich vorliegen, konnte sehr schön durch den folgenden quantitativen Versuch gezeigt werden (Versuch 32):

Ein Methylester, der 6,19 % Totalstickstoff (*Dumas*) enthielt, wurde energisch hydrolysiert. Nach dem Abfiltrieren der dabei entstandenen Huminstoffe, die nur 0,2 % N (*Kjeldahl*) enthielten, zeigte eine *Kjeldahl*-bestimmung 7,67 % (= 100) Totalstickstoff an. Nach der Destillation mit Kalkmilch bei 30—35^o C wurden 3,28 % des Stickstoffs (= 43 % des Totalwertes) im Destillat nachgewiesen. Die zurückbleibende Lösung enthielt nach *Kjeldahl* noch 3,99 % Total N (= 52 %) und nach *Van Slyke* 4,18 % Amino-N (= 55 %).

Die analytische Untersuchung des destillierten Stickstoffs zeigte, dass er zum grossen Teil in Form von Ammoniak vorhanden war, daneben wurden aber auch Spuren niederer Amine⁹⁾ (z. B. Isobutylamin) und Produkte, die sich wie *Schiff*'sche Basen verhielten, aufgefunden. Die letzteren gaben nach saurer Spaltung

⁹⁾ Die Londoner Forschungsgruppe spricht ebenfalls von einer Substanz, die als schwerlösliches Picronolat, Flavianat und Aurichlorid isoliert werden konnte [10].

positive Aldehydreaktionen, was auf ein gleichzeitiges Überdestillieren des schon in der ursprünglichen Hydrolysenlösung vermuteten Aldehyds schliessen liess (vgl 10). Einstweilen konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob diese Aldehyde dem Penicillin zugeschrieben werden durften.

3. Abbau durch kalte, saure Hydrolyse

Lässt man eine Penicillinlösung in verdünnter Säure bei Zimmertemperatur stehen, so kann man wohl eine rasche Desaktivierung, jedoch keine CO₂-Abspaltung feststellen. Unter solchen Bedingungen erhielten *Duffin* und *Smith* [16] die Penillsäure. Sie schreiben, dass dabei die spezifische Rechtsdrehung bis zu einem konstanten Endpunkt zunimmt, und dass nach Entfernung der mit Äther extrahierbaren Verunreinigungen aus der im U.V.-Licht fluoreszierenden wässrigen Lösung die Penillsäure mit n-Butanol extrahiert werden kann.

Diesbezügliche Versuche führten bei uns zu keinem Erfolg. Wir konnten im Gegenteil bei der Desaktivierung ein Sinken der Rechtsdrehung feststellen.

Tabelle 7. Hydrolyse mit 0,01 n HCl und spezifische Drehung Ba-Salz mit 58 000 Pe/mg in 0,01 n HCl bei 30—35 ° C

Nach 0 Std.	$[\alpha]_D^{13} = +189^{\circ}$	(c = 0,933 % in H ₂ O)
Nach 1/2 Std.	$[\alpha]_D^{14} = +175^{\circ}$	(c = 1,05 % in 0,01 n HCl)
Nach 17 Std.	$[\alpha]_D^{16} = +148,5^{\circ}$	(c = 1,05 % in 0,01 n HCl)
Nach 70 Std.	$[\alpha]_D^{17} = +128,5^{\circ}$	(c = 1,05 % in 0,01 n HCl)
Nach 120 Std.	$[\alpha]_D^{18} = +119^{\circ}$	(c = 1,05 % in 0,01 n HCl)

Auch Fluoreszenz bei U.V.-Bestrahlung trat nicht auf. Aus dem Ätherextrakt wurden Spuren Penilloaldehyde (siehe Abschnitt H) isoliert, und der n-Butanol-Extrakt enthielt penicillamin-ähnliche Produkte.

Tatsache ist lediglich, dass die Inaktivierung in saurem Medium in der Kälte verschieden ist von derjenigen in der Wärme und sich ebenfalls unterscheidet von der Desaktivierung in kaltem Alkali.

4. Abbau durch kaltes Alkali und nachfolgende Oxydation

a) Die alkalische Verseifung (Vgl. dazu Versuche 24, 25, 26)

Verseifungen mit 0,2n Barytlaug in Quarzgefässen wurden in grosser Zahl sowohl kalt durch halbstündiges Stehenlassen bei Zimmertemperatur, als auch heiss durch einstündiges Eintauchen ins kochende Wasserbad, vorgenommen.

Obwohl die Genauigkeit der Bestimmung nichts zu wünschen übrig liess und die Einzelwerte gut reproduziert werden konnten, so bereitet die Auswertung der Zahlenreihen doch einige Schwierigkeiten, da ein Vergleich mit anderen Analysendaten nicht sehr gleichmässig ausfällt. Es ist jedoch offensichtlich, dass bei den Salzen die Werte sowohl der kalten wie der heissen Verseifung ungefähr parallel mit der Aktivität pro mg verlaufen; das bedeutet also, dass die Verseifungszahlen dem Penicillin und nicht seinen Verunreinigungen zugeschrieben werden müssen.

Da bei der heissen alkalischen Behandlung 1 Mol CO₂ abgespalten wird, welches 2 Äquivalente Alkali beansprucht, so ist es vorteilhaft, das Äquivalent der heissen Verseifung in ein Verhältnis zu demjenigen der kalten Verseifung, z. B. in der Form 2 : x, zu bringen.

Tabelle 8. Alkalische Verseifung
(Werte in Äquivalentgewichten)

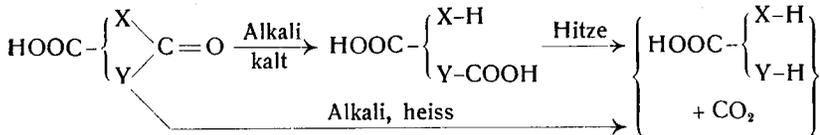
Bariumsalze	CO ₂ -Abspaltung	Verseifung		Verhältnis der verseifb. Gruppen (heiss : kalt)
		heiss	kalt	
8 600 Pe/mg	621	582	1030	2 : 1,13
14 000 Pe/mg	700	655	1440	2 : 0,89
16 700 Pe/mg	391	423	795	2 : 1,06
17 000 Pe/mg	512	492	1035	2 : 0,95
23 000 Pe/mg	—	700	1430	2 : 0,98
24 000 Pe/mg	694	596	1235	2 : 0,98
35 000 Pe/mg	300	340	610	2 : 1,11
Mittelwert				2 : 1,01

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, beträgt das Verhältnis der Äquivalentgewichte ziemlich genau 1:2, d. h. das Verhältnis der verseifbaren Gruppen ist reziprok 2:1.

Da andererseits die Werte der heissen alkalischen Verseifung grössenordnungsmässig mit den CO₂-Abspaltungswerten übereinstimmen und diese letzteren bedeuten, dass aus Penicillin 1 Mol CO₂ (= 2 Äquivalente) abspalten wird, so folgt daraus, dass das Äquivalent der kalten alkalischen Verseifung nur 1 sein kann.

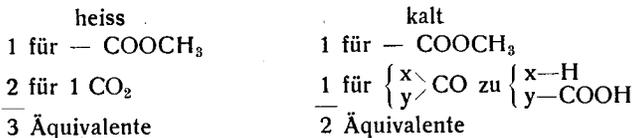
Das Resultat lautet also: Penicillin-Barium verbraucht bei der kalten alkalischen Verseifung, wobei sich kein CO₂ abspaltet, 1 Äquivalent Alkali, bei der heissen Verseifung, wobei 1 Mol CO₂ frei wird, 2 Äquivalente Alkali.

Dies führt zu der eindeutigen Schlussfolgerung, dass Penicillin während der kalten Verseifung eine neue, zweite Carboxylgruppe bildet und dass diese gleiche Carboxylgruppe beim Erhitzen in Form von CO₂ abgespalten wird.



Zieht man dabei noch die ausserordentlich leichte Bildung dieser neuen Säuregruppe in Betracht (in 0,1 n Lauge bei 20° C innert 5 Minuten, vergleiche auch Versuch 26), so darf man wohl eine Struktur ähnlich einer Lacton-Konfiguration vermuten.

Bei der Verseifung der Ester wäre nun zu erwarten, dass bei der heissen Verseifung drei und bei der kalten zwei Äquivalente Alkali verbraucht würden.



Die Verseifungszahlen der Ester lagen aber interessanterweise ohne Rücksicht auf den Reinheitsgrad stets nahe bei 145—150. Dies erklärt sich daraus, dass die Verunreinigungen meist niedere

Dicarbonsäureester sind (z. B. Glutarsäure $\text{OCH}_3 = 20,66\%$, Äq.-Gew. 150,17, vgl. dritter Teil). Damit werden auch die hohen Methoxylwerte verständlich, die wir bei den Estern feststellen konnten (vgl. Abschn. D und E).

b) Oxydation mit Jod

Oxydationsversuche mit Jodlösung führten zu der interessanten Feststellung, dass Penicillin vor allem nach alkalischer Verseifung grosse Mengen Jod verbraucht. Während die Jodmengen, welche die Bariumsalze direkt in neutraler Lösung aufnehmen, in weiten Grenzen schwanken, zeigt sich nach der kalten alkalischen Verseifung eine auffällige Parallelität zwischen der ursprünglichen Aktivität pro mg und dem Jodverbrauch.

Die Aufnahme während der Titration erfolgt dabei in zwei deutlich verschiedenen Geschwindigkeitsstufen. Während der ersten wird das Jod momentan verbraucht; in der zweiten tritt die Entfärbung bei 15°C sehr langsam ein, bei 40°C jedoch ebenfalls relativ schnell. Das Verhältnis des Schnellwertes zum Totalwert konnte nicht eindeutig bestimmt werden, betrug jedoch meistens 2 : 3. Über weitere Verhältniszahlen nach verschiedener Vorbehandlung orientiert Versuch 28.

Extrapoliert man die Endwerte (schnell + langsam) auf reines Penicillin-Barium mit 66000 Pe/mg (vgl. Abschnitt C), so findet man ein annähernd konstantes Äquivalentgewicht von 68,3. Bei Annahme, dass das Bariumsalz ein Molekulargewicht von rund 410 besitzt (vgl. Abschnitte D, E und F 2a), bedeutet dies, dass Penicillin unter diesen Bedingungen ziemlich genau 6 Äquivalente Jod verbraucht, ein Resultat, das wir bis jetzt nicht erklären konnten (Tabelle 9).

Nach der heissen alkalischen Verseifung und CO_2 -Abspaltung war die totale Jodaufnahme gegenüber der kalten um etwa $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ geringer, erfolgte aber immer noch in zwei Geschwindigkeitsstufen, von denen die erste in ihrer Grösse nicht verändert zu sein schien; hingegen war besonders nach heisser, saurer Hydrolyse nur noch eine Geschwindigkeit der Jodaufnahme zu beobachten.

Tabelle 9. Titration mit Jod

Bariumsalze Pe/mg biolog. gef.	Äquivalent- gewicht J ₂ gef.	Extrapoliert auf reines Pen-Ba ber.	Aktivität/mg aus J ₂ -Titra- tion ber.
8 900	420	56,5	10 600
14 000	370	78,5	12 000
16 700	265	68,0	16 800
17 000	267	68,8	16 700
23 000	200	69,7	22 200
23 800	200	70,8	22 200
35 000	131	69,4	34 000
44 000	107	71,4	41 500
58 000	81	71,3	55 000
	Mittelwert	68,3	

Die Werte schwanken jedoch je nach Bariumsalz so stark, dass keine definitiven Aussagen darüber gemacht werden können (Versuch 28).

Die gute Übereinstimmung der Jodtitrationswerte nach der kalten Verseifung mit der durch biologische Testierung gefundenen Aktivität veranlasste uns, diese Methode zur Aktivitätsbestimmung auszubauen.

Parallelbestimmung von Jodtitration und biologischem Test über mehrere Monate zeigte günstige Resultate.

Sind einmal die Verhältnisse zwischen Test und Titration bekannt, so liegt die Fehlergrenze der titrierten Aktivitätswerte, besonders bei Reihenversuchen, innerhalb der biologischen. Es können sowohl Barium- und Natriumsalzlösungen wie Phosphatpufferextrakte gleichermassen titriert werden. Die Bestimmung des Endpunktes ist nach einiger Übung nicht schwierig, und die Fehler, die auftreten, wenn die Titration von verschiedenen Personen ausgeführt wird, bewegen sich innerhalb 5%. Der Vorteil dieser Testmethode wird noch dadurch vergrößert, dass die Aktivität eines Salzes oder einer Lösung schon nach einer halben Stunde festgestellt werden kann.

Gegen eine solche Aktivitätsbestimmung ist natürlich einzuwenden, dass die Titration gar nicht mehr mit aktivem Material

erfolgt und deshalb mit alkali-inaktivierten Produkten zu vollständig falschen Werten führen muss. Wir haben jedoch die Erfahrung gemacht, dass bei unserem Aufarbeitungs- und Reinigungs-Verfahren die alkalische Desaktivierung nicht oder ausserordentlich selten vorkommt, und dass die meisten Aktivitätsverluste durch Säure oder sonstige hydrolytische Vorgänge hervorgerufen werden.

Die folgende graphische Darstellung gibt ein Bild über die Streuung der Resultate der Jodtitration und der biologischen Testierung.

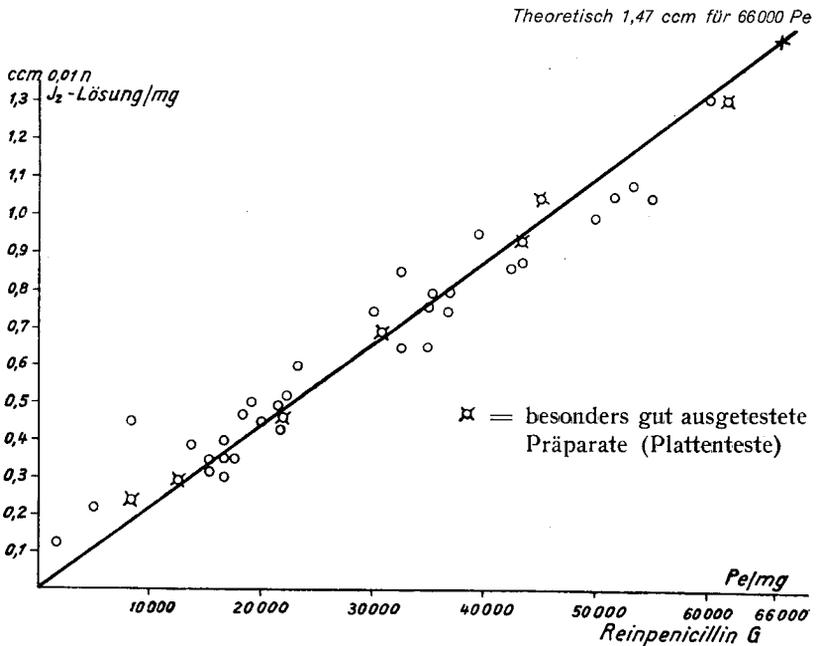


Fig. 5. Biologische Aktivität und Titrationsaktivität.

Abszisse: Durch biologische Testierung gefundene Aktivität pro mg (jedes angeführte Salz wurde mindestens dreimal ausgetestet und die Werte gemittelt).

Ordinate: Durch Jodtitration gefundene Aufnahme bzw. Aktivität (ausgedrückt in ccm 0,01 n J₂ pro mg Salz).

Die gezogene Linie entspricht der Theorie. Die Abweichungen davon sind die Summen der biologischen und der titrierten Fehler.

c) Vorschrift zur Ausführung der Aktivitätstiteration mit Jod

Proben von Penicillinsalzen oder Lösungen, enthaltend ungefähr 100 000 Pe (2000 OxU) total, werden entweder eingewogen oder auspipettiert, mit etwas Wasser verdünnt und nach Zugabe von 2 ccm 0,1 n Kalilauge $\frac{1}{2}$ Stunde stehen gelassen. Danach wird mit 0,1n Salzsäure auf mindestens pH 5 angesäuert (ca. 2,5 ccm), etwas Stärkelösung zugesetzt und mit 0,02 n Jodlösung bei 40° C so lange titriert, bis die Blaufärbung wenigstens 3 Minuten bestehen bleibt. Zieht man nicht vor, das Resultat auf einer graphischen Tabelle, wie oben, direkt abzulesen, so berechnet sich die Aktivität zu:

$$x \text{ ccm} \cdot \frac{1}{6} \cdot \text{Normalität (J}_2) \cdot \text{MG (Penicillin)} \cdot \text{Aktiv./mg (Reinpenicillin)}$$

$$(0,02) \qquad (408) \qquad (66\,000 \text{ Pe, bzw. } 1650 \text{ OxU})$$

oder

$$\text{Pe total} = x \text{ ccm (0,02 n J}_2) \cdot 22\,500$$

$$\text{OxU total} = x \text{ ccm (0,02 n J}_2) \cdot 500$$

5. Die Oxydation

(siehe auch Abschnitte B und G)

Vergleichende Versuchsreihen über den Einfluss verschiedener Oxydationsmittel auf die Desaktivierung führten zu dem überraschenden Resultat, dass die Aktivität von Penicillin durch Jod im Gegensatz zu Kaliumpermanganat oder Wasserstoffsperoxyd nicht beträchtlich herabgesetzt wird.

Jod		Kaliumpermanganat ¹⁰⁾	
Kontrolle	18 500 Pe	Kontrolle	18 500 Pe
$\frac{1}{4}$ der schnellen Aufn.	17 000 Pe	$\frac{1}{4}$ d. Endwertes in Soda	15 700 Pe
$\frac{1}{2}$ der Totalaufnahme	16 000 Pe	$\frac{1}{2}$ d. Endwertes in Soda	12 400 Pe
$\frac{1}{1}$ der Totalaufnahme	11 500 Pe	$\frac{1}{1}$ d. Endwertes in Soda	0 Pe

Es scheint also, dass auch bestimmten Oxydationsstufen des Penicillins noch biologische Aktivität zukommt. (Vgl. auch Abschnitte B. Oxydation.)

¹⁰⁾ Über die Bestimmung des Endwertes von KMnO_4 siehe Abschn. G.

6. Schlussfolgerungen

Die Resultate, die sich bis zum vorliegenden Stadium der Arbeit ergaben, seien kurz rekapituliert.

Es gibt verschiedene, in ihrem Aufbau jedoch sehr ähnliche Penicilline mit der ungefähren Bruttoformel $C_{13-15}H_{18-22}O_4N_2S$ (freie Säure). Das Molekulargewicht des Bariumsalzes beträgt rund 410, dasjenige des Methylesters 340. Penicillin ist eine starke einbasische Säure (pK zwischen 2,6 und 3). Bei der alkalischen Verseifung erscheint eine zweite Carboxylgruppe, die in der Hitze abgespalten wird. Durch das Erscheinen dieser Carboxylgruppe und nachfolgender Jodoxydation wird der weitere Abbau des Moleküls bedeutend erleichtert. Nach der Säurehydrolyse liegt ein Stickstoffatom als Aminostickstoff und das andere in der Form von Ammoniak, Aminen oder N-haltigen Aldehyden vor. Gute Werte werden jedoch erst nach alkalischer Verseifung und nachfolgender Oxydation mit Jod erhalten.

Das Spaltstück mit dem Aminostickstoff umfasst wahrscheinlich auch das Schwefelatom und reagiert wie eine Aminosäure. Das Molekül nimmt eine unerklärlich grosse Menge Jod auf, die offensichtlich mit dem Schwefel in Zusammenhang gebracht werden muss. Es drängt sich daher eine Untersuchung der Verhältnisse beim Schwefelatom auf.

G. Die Untersuchung der Schwefelbildung

Die wechselnd grosse Jodaufnahme (0—2 Mol) und das gelegentliche Auftreten einer schwach positiven Nitroprussidnatriumfärbung bei unbehandelten Bariumsalzen liessen eine Sulphydril-Disulfid-Gruppierung vermuten. Es wurden deshalb Reduktionsversuche, zum Beispiel mit Aluminiumamalgam oder Schwefelwasserstoff unternommen, die zeigen sollten, ob dadurch die Jodtitrationswerte oder andere Analysendaten beeinflusst werden könnten. Nach anfänglich undeutlichen Resultaten musste das Vorliegen einer —SH- oder —S—S-Gruppe in Abrede gestellt werden.

Ebenso führten Oxydationsversuche mit sodaalkalischem Kaliumpermanganat, wie sie von *Kögl* [20] bei der Untersuchung von Biotin angewandt worden waren, nicht zum Erfolg. Während Modellsubstanzen, wie Cystein, Cystin und Methionin, die richtigen Werte lieferten (6, 10 und 4 Oxydationsäquivalente), führten die Penicillin-Bariumsalze zu einem Verbrauch von mindestens 15—20 Oxydationsäquivalenten pro Mol Penicillin (auf 2 N oder 1 S berechnet) (Versuch 29).

Auch die Aufnahme von 6 Mol Jod in zwei Geschwindigkeitsstufen nach kalter Verseifung liess sich nicht erklären. Modellversuche, die mit Alkoholen, Aldehyden, Enolen, En-Aminen, Ascorbinsäure, Disulfiden, Cystein, Methionin und anderen Substanzen durchgeführt wurden, ergaben ganz andere Verhältnisse, als sie beim Penicillin vorlagen.

Während Farbreaktionen mit Naphtochinonsulfat auf Cystein nach *Lugg* [23] undeutliche Resultate zeitigten, gab Penicillin-Barium mit Phosphorwolframsäure und Bisulfit nach *Lugg* [22] eine blaugrüne Färbung, welche nach Zugabe von Quecksilberchlorid nach grün überging. (*Ratner* und *Clarke* [28] erhielten mit Thiazolidin-4-carbonsäure eine Blaufärbung).

Das Bild nach der sauren Hydrolyse war ebenfalls nicht sehr erfolgversprechend. Untersuchungen der Hydrolysate (wie beispielsweise Versuche 32 und 34) ergaben, dass der Schwefel stets dort zu finden war, wo auch die Ninhydrinreaktion positiv ausfiel. Verschiedene Eigenschaften stimmten mit den von *Abraham*, *Chain*, *Baker* und *Robinson* [7] für Penicillamin angegebenen überein, obgleich diese Autoren, trotz der Fällung mit Quecksilberchlorid, keinen Schwefel beobachtet hatten. So gab unser Produkt ebenfalls eine blaue Reaktion mit Ferrichlorid, konnte mit Quecksilberchlorid ausgefällt und mit Schwefelwasserstoff wieder in Freiheit gesetzt werden und gab eine rein blaue Ninhydrinreaktion; wir konnten jedoch nur in Einzelfällen Spuren von Kristallen feststellen (Versuch 38). Es lag also wahrscheinlich eine schwefelhaltige Aminosäure vor. Diese Annahme wurde auch dadurch gestützt, dass die Ausbeute an Quecksilberfällung bei nicht zu energischer Hydrolyse ungefähr parallel mit dem Gehalt an Aminostickstoff (*Van Slyke*) verlief.

Der Schwefel liess sich hin und wieder mit Nitroprussid-Natrium direkt nachweisen, was auf eine freie Sulfhydrylgruppe schliessen liess. Die SH-Gruppe wurde im Vergleich zu Cystein ausserordentlich leicht oxydiert und konnte nachher mit Nitroprussid-Natrium und Kaliumcyanid im Gegensatz zu Cystin und anderen Disulfiden nicht mehr nachgewiesen werden¹¹⁾. Auch die Reduktion sowohl mit Schwefelwasserstoff bei pH 12, die bei Cystin spielend verläuft, als auch mit Zinn oder Zink und Säure, und mit Aluminiumamalgam in Wasser, misslang.

Nach allen Versuchen schien es am wahrscheinlichsten, dass im Penicillin der Schwefel als Thioäther vorlag, und zwar in einer Konfiguration, die sich leicht spalten lassen musste.

Wir stellten daraufhin Thiazolidin-4-carbonsäure [28], ihr N-Acetyl-Derivat, sowie p-Tolylthiazolidin-4-carbonsäure durch Kondensation von Cystein mit Formaldehyd bzw. p-Tolyl-Aldehyd her. Die Substanzen titrierten als einbasische Säuren. Thiazolidin-4-carbonsäure nahm in zwei Geschwindigkeitsstufen, rasch 2, langsam nochmals 2, total 4 Äquivalente Jod auf. Bei Zugabe von Kaliumjodid ging die Jodaufnahme wie bei Penicillin sehr langsam und nur in der Wärme vorstatten.

Überraschende Ähnlichkeit zeigte sich im weiteren bei der Bestimmung des Aminostickstoffs nach milder alkalischer Verseifung und Oxydation mit Jod. Nach der Verseifung liessen sich 20,6 % des totalen Stickstoffs der Thiazolidin-4-carbonsäure als Aminostickstoff bestimmen, im Penicillin 12 % bzw. 24 % des einen Stickstoffatoms (vgl. Abschnitt F, *Van Slyke*); nach der darauffolgenden Oxydation waren 90,5 % des Totalstickstoffs der Thiazolidincarbonensäure und 90 % des einen Penicillinstickstoffs nach *Van Slyke* bestimmbar.

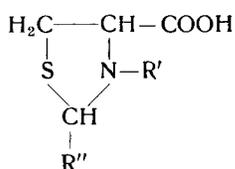
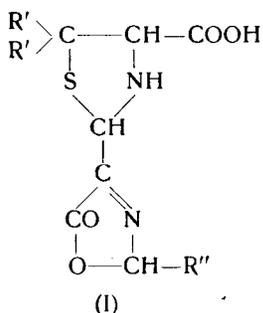
Eine schon früher gemachte Beobachtung, dass Penicillin nach trockener Zinkstaubdestillation sowohl auf dem Fichtenspan wie mit Ehrlich-Reagens positiv reagierte, klärte sich ebenfalls auf, indem Thiazolidinderivate gleiche Färbungen geben.

¹¹⁾ Diese etwas verwirrende Tatsache wurde auch von Dr. *E. Chain* (Vortrag 4. 2. 46, E. T. H.) vermerkt; das Disulfid von Penicillamin lässt sich mit Kaliumcyanid nicht spalten.

Im November 1945 fanden wir im „Daily Express“ eine Notiz mit einer angeblichen Penicillinformel (I), die eine Thiazolidin-konfiguration enthielt.

Das Vorliegen eines Thiazolidinringes im Penicillin schien sich also zu bestätigen (Versuche 30 und 31).

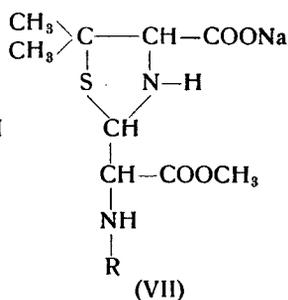
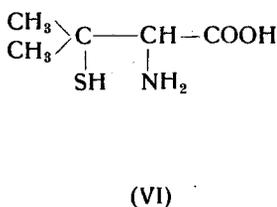
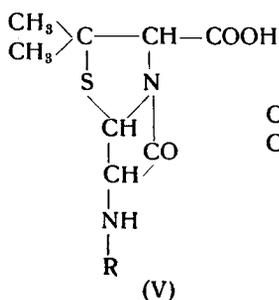
Trotzdem konnten wir jedoch mit der Formulierung, wie sie im „Daily Express“ dargestellt war (I), aus folgenden Gründen nicht einig gehen.



- (II) R' = H R'' = H
 (III) R = H R'' = -C₆H₄CH₃
 (IV) R' = -COCH₃ R'' = H

Thiazolidin-4-carbonsäure (II) und ihr p-Tolyl-Derivat (III) verbrauchen direkt 4 Äquivalente Jod. N-acetylierte Thiazolidin-carbonsäure (IV) nimmt jedoch überhaupt keines auf; die Jod-oxydation und Ringaufspaltung erfolgt nur bei freier =NH-Gruppe (Versuch 31). Die oben formulierte Verbindung müsste also direkt mit mindestens 4 Äquivalenten Jod titrierbar sein. Dies steht im Widerspruch zu Penicillin, das erst nach milder Verseifung, während welcher eine neue Carboxylgruppe entsteht (siehe Abschnitt F 4), grosse Mengen Jod aufnimmt. Im aktiven Penicillin muss also das Stickstoffatom des Thiazolidinringes tertiär gebunden sein. Die Verseifung verläuft jedoch unter solch milden Umständen, dass es sich dabei zum Beispiel unmöglich um ein N-Acetyl-Derivat handeln kann; N-Acetylthiazolidin-4-carbonsäure setzt denn auch der heissen, energischen Verseifung grossen Widerstand entgegen (Versuch 31).

Es scheint also vor allem die Annahme gegeben, dass im Penicillin der Thiazolidinstickstoff mit der zweiten Carboxylgruppe in einer Lactamverbindung steht (V).



Diese Annahme war, wie sich später bei der Veröffentlichung der englisch-amerikanischen Resultate (Abschnitt J) zeigte, berechtigt.

Unsere Arbeiten nach dieser Veröffentlichung konzentrierten sich hauptsächlich auf die Isolierung von Penicillamin (d-β-β'-dimethyl-cystein) (VI) (Versuch 38). Durch Versetzen des kalt verseiften Penicillins mit konzentrierter Quecksilberchloridlösung (Versuch 37) erhielten wir unter CO₂-Entwicklung in guter Ausbeute das Quecksilberpräzipitat des Penicillamins. Durch nachfolgende Ausfällung des Quecksilbers mit Schwefelwasserstoff konnte die Aminosäure als hellgelbes Öl gefunden werden; Kristallisationsversuche scheiterten. Die einzigen Kristalle, die starke SH-Reaktion zeigten, erhielten wir durch Abbau von methanolinaktiviertem Penicillin (VII) (Methylhalbester-Natriumsalz der Penicilloinsäuren) mit Quecksilberchlorid.

Es scheint, dass die Oxydation zum Disulfid ausserordentlich leicht vor sich geht. Oxydierte Produkte liessen sich, nach Veresterung und Acetylierung, destillieren, ergaben jedoch schlechte Analysenwerte (Versuch 38).

H. Die Penilloaldehyde

Im Anschluss an die Beobachtung des Vorhandenseins von Aldehyden¹²⁾ in unseren Hydrolysaten (siehe Abschnitt F) (Versuch 34) wurde im Dezember 1945 in grösseren Ansätzen (450 mg Bariumsalz) deren Isolierung versucht.

¹²⁾ Schon *Catch, Cook* und *Heilbron* bemerkten in ihren Hydrolysaten Acetaldehyd und einen α,β-ungesättigten Aldehyd C₇H₁₂O.

Die von Penicillamin und Quecksilberchlorid befreite Lösung zeigte mit fuchsinschwefliger Säure starke Rotfärbung und ergab auf Zusatz von salzsaurem 2,4-Dinitrophenylhydrazin sofort eine Fällung von rotgelbem Hydrazon. Die Ausbeute betrug vorerst nur ungefähr 5% (auf das eingesetzte Gewicht des Bariumsalzes berechnet) und liess deshalb keinen Schluss zu, ob der Aldehyd dem Penicillin oder seinen Verunreinigungen zuzuschreiben sei. Erst Hydrolysen mit Bariumsalzen verschiedener Reinheit, Vergleiche von amerikanischem Penicillin mit unseren Produkten, und die grosse Ausbeutesteigerung beim Abbau mit Quecksilberchlorid nach milder alkalischer Verseifung liessen keine Zweifel mehr darüber, dass die Aldehyde tatsächlich ein Abbauprodukt des Penicillins darstellten. Aus den nach der Ausfällung der Aldehydhydrazone verbleibenden Hydrolyselösungen wurden in der analytischen Aufarbeitung noch einige kristallisierte Produkte, meist Säuren, erhalten, die zum Teil mit früher isolierten übereinstimmten und von denen noch kurz Brenzschleimsäure identifiziert wurde (siehe Abschnitt K). Die Identifizierung der anderen wurde auf einen späteren Zeitpunkt verschoben.

Während die Hydrazone aus den gereinigten amerikanischen Produkten einigermaßen einheitlich zu sein schienen und schon nach wenigen Umkristallisationen aus Methanol in langen haarfeinen Kristallnadeln vom Schmelzpunkt 185—186°C vorlagen, waren die Derivate unserer eigenen Produkte (aus Kleiekulturen) Gemische, die sich durch Kristallisation nicht trennen liessen. Das beste 2,4-Dinitrophenylhydrazon aus einem gut chromatographierten U.S.A.-Heyden-Bariumsalz mit rund 50000 Pe/mg ergab Analysenwerte, die nicht richtig gedeutet werden konnten.

2,4-Dinitrophenylhydrazon von:

Penilloaldehyd F	Ber. C 50,14	H 5,11	N 20,89	%
Penilloaldehyd G	Ber. C 53,78	H 4,23	N 19,55	%
Penilloaldehyd X	Ber. C 51,47	H 4,05	N 18,76	%
Eigenes Produkt	Gef. C 53,10	H 4,76	N 19,45	%

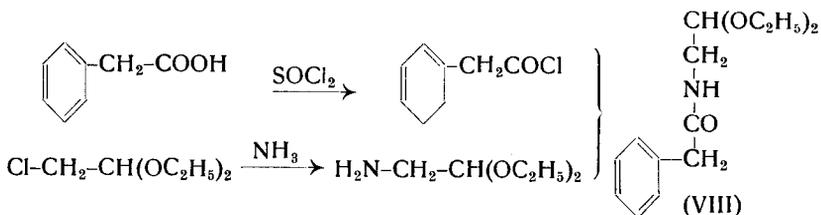
Es war deshalb nötig, den Aldehyd in Form eines günstigeren Derivates zu fassen. Versuche, das Oxim, Semicarbazon oder Dimedonderivat zu erhalten, scheiterten; einzig Phenylhydrazin und

p-Nitrophenylhydrazin lieferten schmutzig aussehende Kristallisate.

Wir hatten eben die Entdeckung gemacht, dass der Aldehyd Stickstoff enthält, als die englisch-amerikanische Publikation eintraf und die Verhältnisse aufklärte (siehe Abschnitt J).

Schon früher isolierte Produkte, die wir nach unseren Erfahrungen mit Brenzschleimsäure, Fumarsäure etc. als Verunreinigungen ansahen und deshalb nicht weiter untersucht hatten, wurden nun in kurzer Folge als Phenylelessigsäure (Versuch 35), Phenacetursäure (Versuch 42) und Phenacetamid (Versuch 41) identifiziert.

Ausgehend von Monochloracetal und Glycin wurde Penilloaldehyd-G-acetal (VIII) synthetisiert. Schmelzpunkt Fp 36—37°.



Sein 2,4-Dinitrophenylhydrazon zeigte nach viermaligem Umkristallisieren den Schmelzpunkt Fp 186,2—186,5° und die gleichen, schönen Kristalle wie das aus amerikanischem Penicillin isolierte Hydrazon. Der Mischschmelzpunkt gab keine Depression, die Analysendaten waren wieder schlecht (Versuch 43).

Säurehydrolytische Spaltung lieferte in guter Ausbeute Phenylelessigsäure.

Des weiteren wurde versucht, das Gemisch der 2,4-Dinitrophenylhydrazone aus unseren Kleiesalzen durch Chromatographie an schwach aktivem Aluminiumoxyd zu trennen und durch anschliessendes Umkristallisieren zu reinigen. Wir konnten dabei ein rotes und drei gelbe Produkte isolieren, die sämtlich verschiedene Schmelzpunkte und verschiedene Analysendaten besaßen (Versuch 39).

Das gelbe Hydrazon des ersten Chloroformeluates, das mengenmässig stark überwog, wurde hydrolytisch gespalten und gab Phenylelessigsäure. Das Hydrazon des Essigestereluates

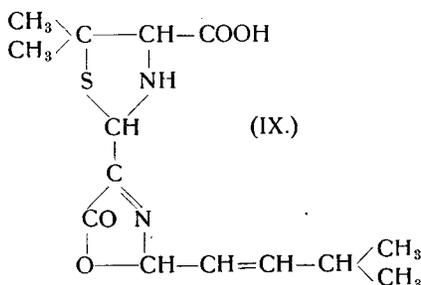
lieferte eine Säure vom Typus der niederen Fettsäuren; sie konnte jedoch infolge Materialmangel nicht mehr identifiziert werden (Versuch 40).

Das Penicillin aus den hiesigen Kleiekulturen besteht also hauptsächlich aus Penicillin G oder II; daneben scheint aber noch mindestens ein anderes Penicillin vom Typus F (I) oder K vorzuliegen (vgl. Abschnitt J).

J. Die Veröffentlichung der anglo-amerikanischen Resultate

(Chemie der Penicilline)

Im November 1945 erreichte uns hauptsächlich durch eine Notiz im „Daily Express“ folgende angebliche Penicillinformel:

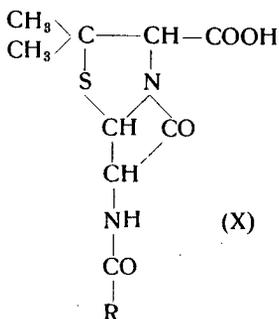


Wie man leicht sehen kann, setzt sich diese Formulierung im wesentlichen aus 3 bis 4 Teilstücken (ein Dimethylcystein, 1—2 Aldehyde und CO₂) zusammen, welche, wenn wir der Formel Glauben schenken wollten, aus Penicillin isoliert worden waren. Das Positivum einer solchen Formulierung liegt sicher in der Annahme eines Thiazolidinringes, der, wie aus unseren Untersuchungen (Abschnitte F, G und H) hervorgeht, viele Eigenschaften des Penicillins erklären kann. Unsere Einwände gegen die obige Formel sind im Abschnitt G bereits dargelegt worden.

Kurz nach Neujahr 1946 erhielten wir dann die vorläufige zusammenfassende Veröffentlichung der Resultate [29] über die Konstitutionsaufklärung und Chemie der Penicilline, die von 38 Universitätsinstituten, Firmen der chemischen Industrie und staat-

lichen Institutionen Grossbritanniens, Canadas und der U. S. A. unterzeichnet ist, und deren Inhalt ich kurz referieren möchte. Einige ergänzende Angaben sind dem Vortrag von Dr. *E. Chain* (E. T. H. 4. 2. 46) entnommen. Aus dem Folgenden mag man entnehmen, wie einzigartig und kompliziert die Struktur und die Reaktionsmöglichkeiten dieser Verbindungen sind.

Bis heute sind vier Penicilline bekannt geworden, die sämtliche in ihrem Hauptaufbaugerüst miteinander übereinstimmen (X).



Bruttoformel $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}-\text{R}$
pK 2,8

(X)

Wie man sieht, findet also unsere Vermutung einer Lactambindung am Thiazolidinring eine schöne Bestätigung.

Die Penicilline unterscheiden sich lediglich im Aufbau der Seitenkette R:

Penicillin I ¹³⁾	oder F:	R = - <i>A</i> ² -pentenyl	-C ₅ H ₉
Penicillin II	oder G:	R = -benzyl	-C ₇ H ₇
Penicillin III	oder X:	R = -p-oxy-benzyl	-C ₇ H ₇ O
Penicillin	K:	R = -n-heptyl	-C ₇ H ₁₅
Dihydropenicillin I:		R = -n-amyl	-C ₅ H ₁₁

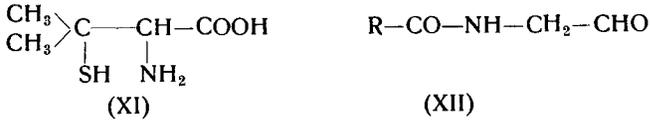
(Pen. F hydriert)

Die Trennung der Penicilline kann durch Chromatographie der hochgereinigten Gemische an Silicagel erreicht werden.

Die Spaltstücke bei heisser Hydrolyse mit verdünnten Mineralsäuren sind, wie man aus (X) leicht ersehen kann: Penicillamin (d,β,β'-dimethylcystein (XI), Kohlendioxyd und Penilloaldehyde (XII), die in Form der 2,4-Dinitrophenylhydrazone oder Dimedon-

¹³⁾ In England sind die Bezeichnungen I, II, III, in den U. S. A. die Bezeichnungen F, G, X und K gebräuchlich.

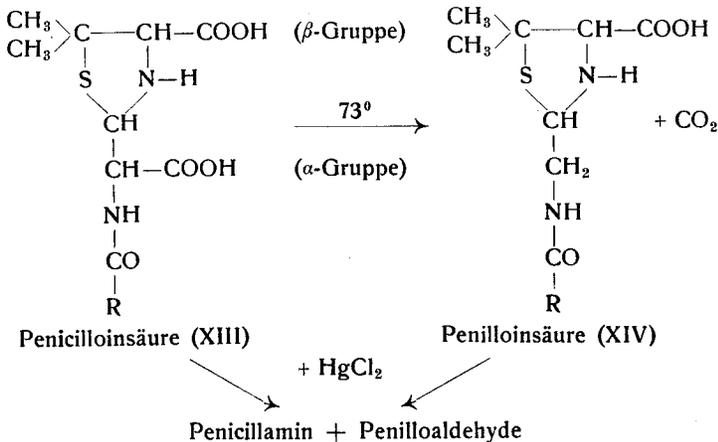
derivate isoliert wurden. Daneben findet man auch Teilstücke der Penilloaldehyde, wie Phenyllessigsäure, Phenylacetylglycin und Phenacetamid im Falle von Penicillin G.



Durch Oxydation mit Brom geht Penicillamin leicht in die Penicillaminsäure über, die ein gut kristallisiertes Kupfersalz liefert.

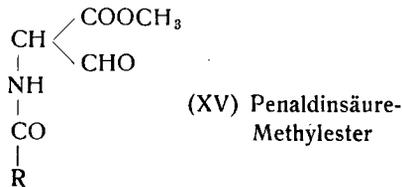
Beweisend für die Konstitution der Penilloaldehyde ist die hydrolytische Spaltung nach der Oxydation mit Silbéroxyd, wobei Glycin und eine entsprechende Säure gebildet wird.

Bei der Einwirkung von kaltem Alkali auf Penicillin entstehen unter Spaltung der Lactambindung und Bildung einer neuen Carboxylgruppe (!) (mit α bezeichnet) die Penicilloinsäuren (XIII). Durch kurzes Erhitzen auf 73°C im Vakuum werden sie unter CO_2 -Abspaltung in die Penilloinsäuren (XIV) übergeführt. Beide Produkte liefern beim Abbau mit Quecksilberchlorid Penicillamin und in guter Ausbeute die Penilloaldehyde.



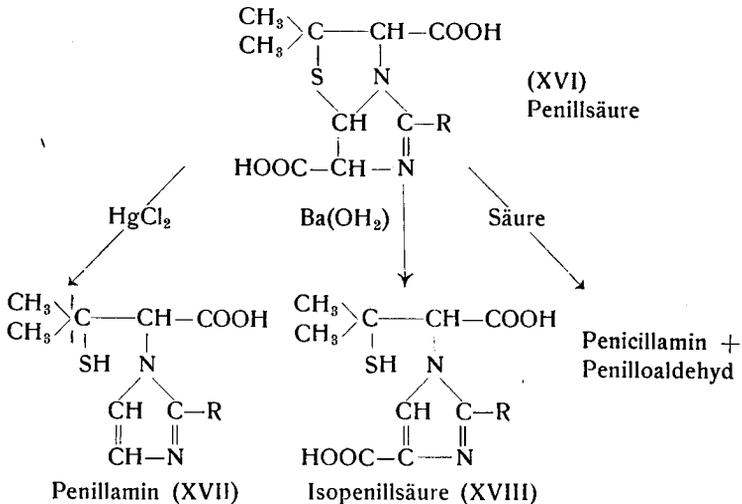
Prinzipiell gleich verläuft die Inaktivierung mit primären Alkoholen und Aminen, indem die Aufspaltung der Lactambindung unter Bildung der Halbestere bzw. Halbamide der Penicilloinsäure

erfolgt. Beim Abbau des α -Methylpenicilloates mit Quecksilberchlorid kann das Zwischenprodukt, der Methylester der Penaldinsäure (XV) gefasst werden. Durch Hydrierung mit Adams Platinoxid erhält man Hexahydrophenylacetylalanin (im Falle von Penicillin G).

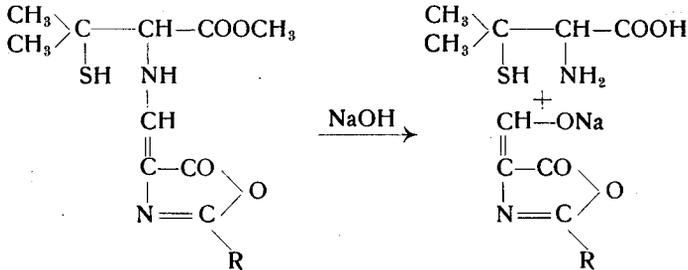


Der β -Methylester des aktiven Penicillins entsteht bei der Einwirkung von Diazomethan.

Unter dem Einfluss von sehr verdünnter kalter Säure ($1/100$ n), d. h. wenn eine Penicillinlösung eines Bariumsalzes mit der auf den Bariumgehalt berechneten Menge Schwefelsäure versetzt und am Vakuum eingedampft wird, entsteht in bis 80proz. Ausbeute die stark rechts drehende Penillsäure (XVI). Durch Quecksilberchlorid wird sie zu den hydrolysebeständigen Penillaminen (XVII) abgebaut, mit Barytlauge entsteht die isomere Isopenillsäure (XVIII) und in saurer Lösung zerfällt sie rasch in Penicillamin und Penilloaldehyd (vgl. Abschnitt F, c, 3).



Aus Methylpenicillin G entsteht durch Einwirkung von Quecksilberchlorid der Methylester der isomeren Penicillensäure (XIX), der durch wässrige Natronlauge in Penicillamin und 4-Oxymethylen-2-benzyl-oxazolone (XX) verseift wird (Merck).

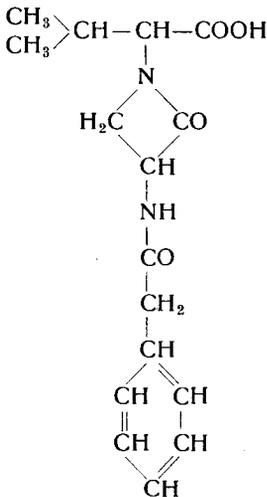


Penicillensäuremethylester (XIX)

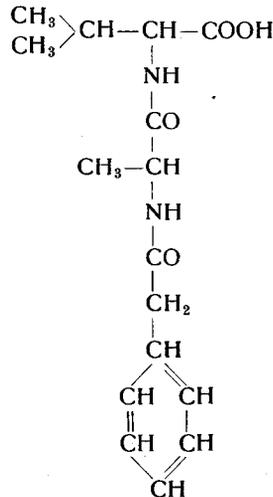
4-Oxymethylen-2-benzyl-oxazolone (XX)

Die lange andauernde Diskussion, ob dem Penicillin eine Thiazolidin-Oxazolone-Struktur (vgl. IX) oder eine β -Lactam-Struktur zuzuschreiben sei, wurde durch die Resultate der Hydrierungsversuche (Desthionierung) mit Raney-Nickel zugunsten des β -Lactams entschieden (R. Mazingo, Merck).

Neben Desthiopenicillin (XXI) entstand auch Phenacetyl-l,alanin-d, valin (XXII).



Desthiopenicillin (XXI)



Phenacetyl-l,alanin-d, valin (XXII)

III. Teil: Andere Pilzstoffwechselprodukte

Sowohl bei der Reinigung wie auch beim hydrolytischen Abbau von Penicillin sind eine Reihe von Begleitstoffen isoliert worden. Einige davon haben wir identifiziert, und diese sollen im folgenden kurz besprochen werden.

K. Brenzschleimsäure

Bei der Verbrennungsanalyse eines sogenannten „kristallinen“ Penicillinammoniumsalzes (Abschnitt C) bemerkten wir erstmals, dass eine Substanz in weissen Plättchen sublimierte (Versuch 44). Sie zeigte einen Zersetzungsintervall von 158—175° als Ammoniumsalz, den Schmelzpunkt F_p 131° als freie Säure und war identisch mit synthetischer Brenzschleimsäure (Furan- α -carbonsäure). Das hauptsächlich bei Penicillinsalzen aus unserer Flachschtzucht auftretende U.V.-Absorptionsmaximum bei 2480 Å; $\log \epsilon = 4$, konnte auf diese Säure zurückgeführt werden. Es war sogar möglich, aus den Spektren der Penicillinbariumsalze direkt den Gehalt an Brenzschleimsäure zu berechnen. Salze aus Flachschtzucht (ca. 14 000 Pe/mg) enthielten bis 30% Brenzschleimsäure, in den amerikanischen Produkten (640 OxU/mg), besonders Commercial Solvents Corporation, war sie reichlich vertreten und auch in den Hydrolysaten von Salzen aus Kleiekulturen (25 000 Pe/mg) wurde sie in Spuren nachgewiesen (Versuch 45). Bei der Chromatographie der freien Penicillinsäuren (Abschnitt A, 3) und der Methylester (Abschnitt D), kann sie von Penicillin vollständig getrennt werden.

Brenzschleimsäure scheint also ein allgemein verbreitetes Stoffwechselprodukt der Penicillien zu sein.

L. Fumarsäure

Die analoge Rolle, die Brenzschleimsäure bei Produkten aus Zucht in flacher oder tiefer Schicht spielt, kommt bei Kleiekulturenmaterial der Fumarsäure zu. Die U.V.-Absorptionskurve

solcher Produkte weist einen charakteristischen Knick bei 2600 Å; $\log \epsilon = 3,25$ auf, der vom Bariumsalz der Fumarsäure herrührt.

Wir erhielten erstmals Fumarsäure durch Sublimation eines Ätherextraktes nach saurer Hydrolyse eines Bariumsalzes (Versuch 45). Im Esterchromatogramm erscheint der Dimethylester der Fumarsäure in den ersten inaktiven Vorfraktionen. Der gewichtsmässige Anteil in Kleiesalzen beträgt 5—10% bei Aktivitäten von rund 25000 Pe/mg. Auch bei Kristallisationsversuchen mit Penicillinammoniumsalzen aus Flachschtzüchtung wurde ihr Diammoniumsalz in geringer Menge aus der n-Butanol-Fraktion isoliert.

M. Succinyl-l,Leucin

Eine Untersuchung der bei der Chromatographie von Penicillin-Methylester aus Flachschtzüchtung in den Benzolfractionen anfallenden, inaktiven Produkte, die gewichtsmässig bis 30% betragen konnten, führte zur Isolierung von Succinyl-l,Leucinmethylester (vgl. Abschnitt D und Versuche 17 und 46).

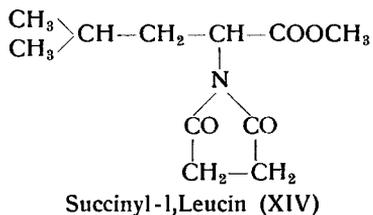
Die mit Petroläther extrahierten Benzolfractionen des Penicillinesterchromatogramms (Versuch 17) waren stickstoffhaltig, besaßen eine deutliche spezifische Linksdrehung ($[\alpha]_D$ bis -32^0) und zeigten nach saurer Hydrolyse eine blaue Ninhydrinfärbung. Das Estergemisch wurde nochmals chromatographiert; dabei konnte in den Petrolätherfraktionen eine weitere Menge Brenzschleimsäureester und mit Essigester noch etwas rechtsdrehendes Material abgetrennt werden. Die Benzolfractionen bestanden aus einem farblosen bis hellgelben Öl, das sich im Hochvakuum destillieren liess, wobei die Hauptmenge bei $110-120^0$ (0,01 mm Hg) übergang (Versuch 46). Das Produkt gab Analysenwerte, die der Formel $C_{11}H_{17}O_4N$ (wovon 1 $-OCH_3$) entsprachen; eine leicht hydrierbare Doppelbindung lag nicht vor. Die spezifische Drehung betrug: $[\alpha]_D = -39,4^0$ ($c = 1,845\%$ in Chloroform). Später konnte die Substanz auch in kristallisierter Form gefasst werden: Schmelzpunkt $Fp = 63^0$ (*K. Berse*).

Vorversuche durch Abbau mit Jodwasserstoffsäure lieferten Bernsteinsäure und eine neutrale Aminosäure. Nach

Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure im Bombenrohr bei 110—120° konnten in fast theoretischer Ausbeute Bernsteinsäure und l,Leucin (als 3,5-Dinitrobenzoat) vom Schmelzpunkt Fp 185—186° gewonnen werden, so dass feststand, dass die Substanz einzig aus diesen beiden Spaltstücken zusammengesetzt sein musste (Versuch 47).

Bei der alkalischen Behandlung wurden zwei Gruppen leicht und eine dritte sehr schwer verseift. Der Endpunkt der Titration nach Verseifung der ersten zwei Gruppen war scharf (noch keine freie Aminosäure); es bestand also zwischen Leucin und Bernsteinsäure immer noch eine Peptid-Bindung.

Wir nahmen deshalb folgende Formulierung an:



Succinyl-l,Leucin-Methylester wurde später von einem unserer Mitarbeiter, *K. Berse*, synthetisch hergestellt und erwies sich in jeder Beziehung identisch mit dem natürlichen Produkt.

Eine ähnliche Substanz, Fumaryl-d,l,Alanin, ist schon von *Birkinshaw, Raistrick* und *Smith* [8] aus dem Kulturfiltrat von *Penicillium reticulosum* isoliert worden.

Aus den mengenmäßig geringen Vorfraktionen bei der Chromatographie von Penicillinmethylester aus Kleiekulturen wurden die folgenden Produkte isoliert:

N. Bernsteinsäure

Die Penicillinmethylester-Vorfraktionen wurden nochmals chromatographiert. Durch Verseifung eines stickstoffarmen Benzoleuates erhielt man ein Säuregemisch, das neben viel Fumarsäure unter anderem auch Bernsteinsäure enthielt. Durch

wiederholte fraktionierte Sublimation wurde sie gereinigt und nach Aussehen, Schmelzpunkt Fp 176—180° und Mischschmelzpunkt Fp 177—180° mit synthetischer Bernsteinsäure identifiziert (Versuch 48).

O. Glutarsäure

Eine andere destillierte Benzolfraction lieferte nach der Verseifung hauptsächlich eine Säure vom Schmelzpunkt Fp 96—97°, die nach Analyse und Mischschmelzpunkt mit Glutarsäure übereinstimmte (Versuch 49).

P. l,Methylbernsteinsäure

Eine weitere Säure, die aus einer Petrolätherfraction gewonnen wurde, ergab Analysenwerte, die ebenfalls auf $C_5H_8O_4$ stimmten, zeigte jedoch den Schmelzpunkt Fp 109,5—110° und gab im Mischschmelzpunkt mit Glutarsäure eine starke Depression (60°). Ein Mischschmelzpunkt mit racemischer Brenzweinsäure ergab keine Depression, Fp 109,5—110,5°.

Die Substanz drehte jedoch schwach links $[\alpha]_D^{14} = -7\frac{1}{2}^\circ$ ($c = 0,052\%$ in Wasser), so dass es sich um das optisch aktive l-Isomere handeln musste (Versuch 50).

Experimentelle Belege ¹⁾

A. Chromatographische Methoden

1. Die „saure“ Chromatographie

Versuch 1: Chromatogramm eines Indikators (Reaktionsmechanismus)

10 g Aluminiumoxyd wurden mit 55 % HCl nach Vorschrift (Seite 16) behandelt und in eine Säule gefüllt. 2 ccm Bromthymolblaulösung (0,05 %), Umschlag pH 6,0—7,6, wurden auf die Säule gegeben und mit 2,5 % Phosphatpuffer eluiert. Die nach unten sich verbreiternde Zone war hauptsächlich blau gefärbt, begann bei pH 6,0 auszutreten und war bei pH 8,0 vollständig eluiert.

Versuch 2: Chromatogramm gemischter Indikatoren (Reaktionsmechanismus)

2 ccm eines Gemisches von:

Methylorange	pH-Umschlag	3,1— 4,4
Methylrot	pH-Umschlag	4,2— 6,3
Bromthymolblau	pH-Umschlag	6,0— 7,6
Phenolphthalein	pH-Umschlag	8,3—10

wurden wie in Versuch 1 an 10 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Die farbigen Zonen wanderten dicht gedrängt ohne scharfe Trennung, jedoch in der richtigen Reihenfolge. Im Eluat erschien zuerst Methylorange (gelborange) bei pH 3,8, dann Methylrot (rot) bei pH 5,4, das bald mit Bromthymolblau (blau) überdeckt war; zuletzt wurde noch etwas rotes Penolphthalein eluiert.

¹⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

Versuch 3: Beispiel eines sauren Chromatogramms mit einem Bariumsalz, Standard I, aus Flachschtzuchtung

Substanz: 10,0 g Ba-Salz mit 1300 Pc/mg wurden in 200 ccm 5% Phosphatpuffer pH 6,8 gelöst und das ausgefällte Ba-Phosphat abfiltriert. Lösung: 255 ccm mit $8,6 \cdot 10^6$ Pc.

Säule: 350 g Aluminiumoxyd wurden mit 175 ccm 1 n HCl (50% der Sättigung) behandelt (Seite 16) und ins Rohr gebracht. Höhe 17,5 cm, Durchmesser 4,8 cm, Boden 3 cm Sand.

Durch Schnelltest²⁾ der Fraktionen II bis IV wurde der Auslaufbeginn der Aktivität festgestellt: Fraktion II = 0; III = 0; IV = Stufe 8. Die austretenden Fraktionen wurden in je 20 ccm vorgelegtem, gekühltem 5% Phosphatpuffer pH 7,0 aufgefangen.

Zeit	pH	Cl'	PO ₄	Frkt.	ccm	Pc.10 ⁶	Bemerkungen
0	4,2	+		I	425	0	Eluat farblos
15	5,6	+					
25	5,8			II	195	0	Eluat gelblich
35	5,8	+	—				
44	5,4			III	56	0	Eluat gelblich
50	5,4	+					
56	5,8						
1.15	6,0	(+)		IV	520	6,5	Eluat hellgelb
50	6,0						
52	6,4	—					
2.13	6,6						
27	6,8	—	(—)	V	480	2,0	Beginn d. dunklen Zone
3.05	7,5		—				
25	8,1		+				Eluat dunkelrotbraun
Total: $8,5 \cdot 10^6$ Pc							
Eingesetzt: $8,6 \cdot 10^6$ Pc							Ausbeute: 99 %

Die Testresultate waren an diesem Tage (22. 11. 44) 40% unter dem Normalwert. Die Hauptfraktion (IV) wurde ins Bariumsalz übergeführt:

²⁾ Der Schnelltest ist ein gewöhnlicher Verdünnungsreihentest, der jedoch schon nach dreistündiger Inkubationszeit abgelesen wird und dessen Werte qualitativen Charakters sind.

Neutestierung von Fraktion IV (23. 11. 44) 540 ccm mit $13,8 \cdot 10^6$ Pc
 Bariumsalzlösung 215 ccm mit $16,0 \cdot 10^6$ Pc
 Bariumsalz: 915 mg mit 16500 Pc/mg (Mittel aus 4 Testen) $15,2 \cdot 10^6$ Pc
 Reinigungskoeffizient: 12,7

Versuch 4: Fraktioniertes Chromatogramm eines Konzentrates aus Kleiekultur (vgl. Diagramm Seite 22)

Substanz: 44 ccm eines über Methylenchlorid gereinigten Produktes in bei 0° C gesättigtem Phosphatpuffer, pH 7,0.

Säule: 40 g Aluminiumoxyd, das mit 24 ccm 1,03 n HCl vorbehandelt worden war (57% der Sättigung). Höhe: 14 cm, Durchmesser: 1,9 cm.

Elution: Mit 2,5% Phosphatpuffer, pH 6,8.

Die Fraktionen wurden in der Grösse von je 10 ccm in je 5 ccm vorgelegtem kaltem Puffer abgefangen.

pH	Frkt.	Pc/ccm	Aktivitäts-Anteil in %	mg ³⁾	Pc/mg ⁴⁾	Bemerkungen
von 4,2 bis 4,8	I	0	0	—	—	farblos
„ 4,8	II	0	0	—	—	
„ 4,8	III	165	0	2,3	600	
„ 6,2	IV	1 200	0,3	3,7	2 700	hellgelb
„ 6,4	V	57 200	15,6	11,0	43 300	
„ 6,5	VI	99 000	27,1	28,6	28 900	gelb
„ 6,7	VII	110 000	30,1	89,6	10 300	
„ 7,2	VIII	56 500	15,5	72,3	6 500	stark gelb
„ 7,6	IX	21 600	5,8	62,2	2 900	dunkel
„ 8,1	X	17 100	4,7	38,2	3 700	
„ 8,4	XI	3 190	0,9	28,2	920	
Total:		3 657 000 Pc	100 %	316,1 mg		

³⁾ Die Fraktionen wurden mit je 2,5 ccm 10% H₃PO₄ angesäuert und mit 10 ccm Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit 10 ccm Wasser gewaschen und am Vakuum eingedampft.

⁴⁾ Die Werte sind auf Ba-Salz berechnet. Die Relation (in einem Blindversuch bestimmt) ist im vorliegenden Falle:

Gewicht des Ätherrückstandes mal 1,2 = Gewicht des Ba-Salzes.

2. Die Verteilungschromatographie

Versuch 5: Herstellung von Silicagel mit 2,5% Bariumkarbonat

Das Silicagel wurde nach der Vorschrift von *Gordon, Martin* und *Synge* [18] hergestellt. In Wasser zeigte es ein pH 4,9. Titration mit 0,1 n NaOH ergab einen HCl-Gehalt von 0,75%. 20 g Gel wurden darauf in einer Lösung von 1,44 g Bariumhydroxyd · 8 aq. (ber. 0,80 g + Säurekorrektur: 0,64 g) in 100 ccm Wasser aufgerührt. Während 10 Minuten leitete man einen CO₂-Strom ein, filtrierte und wusch mit insgesamt 100 ccm kohlendioxidhaltigem Wasser nach. Das Präparat wurde am Vakuum bei 100⁰ C zwei Stunden lang getrocknet. Die wässrige Aufschlämmung des weissen Pulvers zeigte pH 6,6.

Versuch 6: Beispiel eines Verteilungschromatogramms

Substanz: 100 mg Bariumsalz, Standard I, mit 650 Pa/mg, total 65 000 Pa wurden mit verdünnter Phosphorsäure bis pH 2,6 angesäuert und mit Äthylacetat ausgeschüttelt.

Säule: 5 g Silicagel mit 2,5% Bariumkarbonat wurden mit 1 ccm Wasser (20 Gew.-%) benetzt und in einem Becherglas gut vermischt, bis ein scheinbar trockenes Pulver entstand. Nun übergoss man das Adsorbens mit Äthylacetat und rührte so lange um (mindestens 15 Minuten), bis keine Luftblasen mehr aus dem Gel emporstiegen; darauf wurde das Rohr gefüllt. Höhe 10 cm, Durchmesser 0,8 cm.

Fraktion Farbe	Zone cm	Eluat Pa	Bariumsalz			Ausbeute
			mg	Pa/mg	Pa total	
I dunkelrot	1	64 500	36	1 870	68 500	105 %
II hellocker	4	4 200	19	162	3 100	74 %
III hellgelb	4	0	11,5	0	0	—
Total:					71 600	110 %
Reinigungskoeffizient:						2,9

Nun gab man die Lösung von Penicillin in Äthylacetat auf die Säule und entwickelte das Chromatogramm durch weiteres Waschen mit total 100 ccm Essigester.

Das Eluat war zuerst stark gelb gefärbt, nachher wieder farblos. Der durchgelaufene Pigmentstoff erwies sich als inaktiv. In der Säule hatten sich von oben nach unten drei scharf abgegrenzte Zonen entwickelt. Sie wurden nach dem Ausstossen der Säule mechanisch getrennt, erschöpfend mit 5% Phosphatpuffer pH 7,2 eluiert, geprüft und einzeln in die Bariumsalze übergeführt.

3. Chromatographie der freien Säuren in organischen Medien

Versuch 7: Beispiele aus der Untersuchung von Tonerden

a) Korngrösse: 100 g einer Tonerdeprobe (Material F III) wurden in 1 l Wasser aufgeschlämmt. Nach 2 Minuten Stehen entfernte man das nicht abgesetzte Material durch Dekantieren. Nach zweimaliger Wiederholung blieben noch 50 g Tonerde zurück.

b) Reinigung: 10 g Tonerde (F III) wurden in 100 ccm Wasser 30 Minuten lang gekocht (pH 6,6) und filtriert. Nach dem Eindampfen des Filtrates blieb 0,8 g = 8% Rückstand, der Na^+ , Ca^{++} , Fe^{+++} , CO_3^{--} , SO_4^{--} , Sⁿ und Oxalat enthielt.

c) 100 g der nach a) und b) gereinigten Tonerde (F III) wurden mit 1 l 0,5 n HCl eine Stunde lang gekocht und auf der Nutsche mit insgesamt 5 l destilliertem Wasser ausgewaschen. Das letzte Filtrat gab keine Trübung mit Silbernitrat mehr.

d) Das Material wurde im Porzellantiegel 5 Stunden vor dem Gebläse (ca. 700°C) gegläht und im Exsiccator über P_2O_5 aufbewahrt.

Versuch 8: Vergleichende Chromatogramme mit Picrinsäure

In zwei kleine Chromatographierohre wurden je 4 g zweier Tonerden verschiedener Provenienz (M 1000 · HCl und F III · HCl) eingefüllt; die Materialien waren beide genau nach obigem Schema

gereinigt und mit Salzsäure vorbehandelt worden. An jeder Säule wurden je 20 mg Picrinsäure, gelöst in 5 ccm absolutem Äther, aufgezogen. Säulen: Höhe 5 cm, Durchmesser 0,5 cm.

Lösungsmittel nach ccm	Material M 1000.HCl			Material F III.HCl		
	Breite d. Zone cm	Eluat	Initial- zone	Breite d. Zone cm	Eluat	Initial- zone
15 Äther	0,9	farblos	0,9 cm	1,8	farblos	1,8 cm
5 Äthylacetat	1,3	farblos	sichtbar	4,1	gelb	schwach
10 Äthylacetat	1,5	farblos	stark	0,4	hellgelb	} ganz schwach
15 Äthylacetat	1,6	farblos	stark	0	farblos	
5 Äthylacetat- MeOH 1:1	5,0	gelb	stark	—	—	sofort leer
10 „	3	heller	stark	—	—	—
5 Methanol	2,5	heller mittel	—	—	—	—
5 Wasser	—	unverändert	—	—	—	—
5 5% Puffer	—	farblos	keine	—	—	—

Resultat: FIII·HCl ist bedeutend inaktiver als M1000·HCl und zeigt zudem eine sehr schwache Salzbildung.

Versuch 9: Chromatogramm von freier Penicillinsäure an Tonerde

Substanz: 100 mg Bariumsalz mit 14 700 Pc/mg (17 800 Pc/mg freie Säure⁵⁾), das aus Flachschiechtzuchtung stammte und bereits sauer chromatographiert worden war, wurde mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde mit Natriumsulfat vgetrocknet und die restlichen Spuren Wasser mit Trockeneis ausgefroren.

Säule: 5 g Tonerde (FIII·HCl) (siehe Versuche 7 und 8) in absolutem Chloroform. Höhe 10 cm, Durchmesser 0,6 cm.

Fraktion I enthält Brenzschleimsäure. Fraktionen II und III waren teilweise kristallisiert, N-haltig und gaben eine positive Ninhydrinreaktion.

Lösungsmittel	Frkt.	ccm	Pc.10 ³	mg ⁶⁾	Pc/mg ⁵⁾	Eluat
Chloroform	I	60	0	10,0	0	farblos
Äther	II	22	0	5,7	0	farblos
Äther	III	25	2	2,9	700	farblos
Äthylacetat	IV	21,5	602	11,0	55 000	gelb
Äthylacetat	V	10	480	8,0	60 000	hellgelb
Äthylacetat-MeOH 5%	VI	21,5	105	5,0	21 000	stark gelb
Äthylacetat-MeOH 5%	VII	9	45	3,1	14 500	hellgelb
Äthylacetat-MeOH 1:1	VIII	43	82	9,6	8 500	stark ocker
Methanol	IX	9	74	10,0	7 400	stark gelb
5 % Puffer	X	8,5	107	14 ⁷⁾	7 200	dunkel-rotgelb
Total:			1 397	77,3		
Eingesetzt:			1 450	80,0	17 800	
Ausbeute:			96,5%	97,9%		

Versuch 10: Chromatogramm von freier Penicillinsäure an Silicagel

Lösungsmittel	Frkt.	ccm	Pc.10 ³	mg ⁸⁾	Pc/mg	Eluat
Chloroform	I	110	0	1,4	0	farblos
Äther	II	120	0	5,5	0	hellgelb
Äthylacetat	III	110	360	11,0	34 000	noch heller
Äthylacetat-MeOH 5%	IV	110	165	12 ⁹⁾	13 800	stark gelb
Äthylacetat-MeOH 1:1	V	100	40	4 ⁹⁾	5 800	hell
Methanol	VI	95	0	2 ⁹⁾	0	farblos
Total:			565 000 Pc	35,9 mg		
Eingesetzt:			510 000 Pc	38,0 mg	12 100 Pc/mg	
Ausbeute:			111 %	95 %		

⁵⁾ Die Aktivität von reiner Penicillinsäure berechnet sich zu ca. 80 000 Pc/mg.

⁶⁾ Die Gewichtrelation von Ba-Salz zu Säure (in einem Blindversuch bestimmt) beträgt hier: 1 : 0,8; ber. 1 : 0,825.

⁷⁾ Das Gewicht der Pufferfraktion wurde als Gewicht des eingedampften Ätherextraktes bestimmt.

⁸⁾ Relation von Bariumsulfat zu freier Säure im vorliegenden Fall: gef. 1 : 0,76, ber. 1 : 0,825.

⁹⁾ Die richtigen Gewichte mussten durch Extrahieren der eingedampften Rückstände mit Äther bestimmt werden, da Methanol zusätzliche Verunreinigungen aus dem Gel herauslöst.

Substanz: 50 mg Bariumsalz, Standard I + sauer chromatographiert mit 10 000 Pc/mg bzw. 12100 Pc/mg als freie Säure wurden mit Chloroform extrahiert und sorgfältig getrocknet.

Säule: 25 g trockenes Silicagel wurde mit Chloroform übergossen, 15 Minuten lang umgerührt und in die Röhre eingefüllt.

B. Reinigung durch Reduktion und Oxydation

Versuch 11: Herstellung des Aluminiumamalgams

5 g Aluminiumspäne werden in konzentrierter Sodalösung etwas erwärmt, bis eine starke Wasserstoffentwicklung einsetzt. Nachdem man mit Brunnenwasser gut ausgewaschen hat, behandelt man zwei bis drei Minuten lang mit einer 5proz. HgCl_2 -Lösung bei 30°C . Nach gründlichem Auswaschen mit Wasser ist das Amalgam zur Verwendung bereit.

Versuch 12: Ausführung der Reduktion

Es erwies sich als vorteilhaft, nur frisch zubereitetes Aluminiumamalgam zu verwenden. 200 mg Bariumsalz, Standard I, mit 800 Pa/mg, total also 160 000 Pa, wurden in 30 ccm Wasser gelöst und mit 0,5 g Aluminiumamalgam während $2\frac{1}{2}$ Stunden behandelt. Zusatz von wenig Methylenchlorid verhinderte das Schäumen. Das pH wurde durch Zugabe von 0,1 n HCl konstant auf pH 6,6 gehalten, wozu total 4,2 ccm Säure nötig waren. Nach dem Zentrifugieren und Auswaschen des Rückstandes erhielt man 35 ccm einer hellgelben bis grünlichen Lösung mit total 120 000 Pa. Aktivitätsverlust 14 %.

Die Überführung in das Bariumsalz ergab 45,5 mg eines fast weissen Pulvers mit 3000 Pa/mg. Ausbeute: 113 %. Reinigungskoeffizient: 3,8.

Beispiel einer Oxydation von dunklen Fraktionen

Versuch 13: Bestimmung der Menge Kaliumpermanganat, mit der die Lösung ohne Verminderung der Aktivität oxydiert werden kann

Von einer Phosphatpuffer-Penicillin-Lösung gesammelter dunkler Fraktionen aus neun sauren Chromatogrammen wurde je

1 ccm in der Verdünnung 1:10 mit steigenden Mengen Kaliumpermanganat (0,1 n) versetzt und geprüft. Das zugegebene Permanganat wurde augenblicklich verbraucht.

ccm 0,1 n KMnO_4	Pc total
Kontrolle	4 800
0,1	4 800
0,2	4 800
0,4	5 600
0,6	4 800
0,8	4 350
1,0	5 300
1,2	5 400
1,4	2 920
1,6	2 980
1,8	2 600
2,0	2 800
3,0	1 200

1,2 bis 1,4 ccm 0,1 n KMnO_4 pro ccm Penicillinlösung wurden also ohne Verminderung der Aktivität vertragen.

(Die obige Testreihe kann als Schulbeispiel angesehen werden für eine sehr gute, gelungene Austestierung in Verdünnungsreihen. Das Resultat ist eindeutig.)

Versuch 14: Ausführung der Oxydation im Hauptansatz

Zu 2,4 l Dunkelfractionen mit total $11,5 \cdot 10^6$ Pc wurden unter Eiskühlung und starkem Rühren (Methylenchlorid als Antischaummittel) 240 ccm 1 n KMnO_4 -Lösung (vgl. Versuch 13) innert einer Stunde zugegeben. Die Temperatur überstieg dabei nie $+3,0^\circ\text{C}$ (Min. $+0,2^\circ\text{C}$). Durch Zentrifugieren wurde der ausgeschiedene Braunstein abgetrennt und zweimal mit etwas Wasser ausgewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden mit 10proz. Phosphorsäure auf pH 2,6 angesäuert und viermal gründlich mit Äther ausgeschüttelt. (Wir machten die Beobachtung, dass das Antibiotikum nach der Oxydation bedeutend schwieriger zu extrahieren war.) Die ätherische Lösung wurde nun normal mit Barytlaug

ausgezogen; die Bariumsalzlösung enthielt nach Test $14,7 \cdot 10^6$ Pc (kein Verlust).

Durch eine technische Störung der Trocknungsapparatur trat dann Aktivitätsverlust ein. Es resultierten 6,0 g eines hellgelben Pulvers mit 1360 bis 1430 Pc/mg, total 8,2 bis $8,6 \cdot 10^6$ Pc, was einer Ausbeute von ca. 80 % entspricht.

Zur Bestimmung des Reinigungskoeffizienten wurden 25 ccm der ursprünglichen Dunkelfractionen in das Bariumsalz übergeführt. Der Vergleich der Salze zeigt:

Unbehandelt	ber. 120 Pc/mg	gef. 100— 135 Pc/mg
Oxydiert	ber. 1920 Pc/mg	gef. 1360—1430 Pc/mg
Reinigung	ber. 16-fach	gef. 12-fach

C. Die Salze der Penicilline

Versuch 15: Darstellung eines Ammoniumsalzes

Die ersten drei aktiven Fractionen eines sauren Chromatogramms, durchgeführt mit einem Bariumsalz von 1700 Pa/mg wurden vereinigt, geprüft und gekühlt. Totalaktivität: 315 ccm mit $3,8 \cdot 10^6$ Pa. Nach Zusatz von 32 ccm eiskalter 10proz. H_3PO_4 extrahierte man mit dreimal 50 ccm Äther. Die ätherische Lösung wurde mit zweimal 10 ccm Eiswasser gewaschen, mit Natriumsulfat vorgetrocknet und am Vakuum auf ca. 30 ccm eingengt. Durch Ausfrieren in Trockeneis-Kältemischung entfernte man die letzten Spuren Wasser und filtrierte vom gebildeten Eis ab. Nun setzte man tropfenweise absoluten mit Ammoniak gesättigten Äther (0,01 n) zu. Es entstand zuerst eine Trübung, dann fielen helle Flocken aus. Es wurden zwei Fractionen abzentrifugiert und schnell am Hochvakuum getrocknet.

Frkt.	Aussehen	mg	Pa/mg	Pa total
I	trockenes gelbes Pulver	150	16 000	$1,40 \cdot 10^6$
II	kristallines weißes Pulver	30	38 000	$1,14 \cdot 10^6$
III	nicht gefälltes dunkles Öl (ranziger Geruch)	219	700	$0,15 \cdot 10^6$

Umfällung aus Alkohol, Sublimationsprobe und Analyse von Fraktion I führten zur Auffindung von Brenzschleimsäure (siehe Abschnitt K).

Versuch 16: Darstellung eines Benzylaminsalzes
(Benzylamid-Benzylaminsalz einer Penicilloinsäure)

100 mg Bariumsalz mit 58 000 Pe/mg wurden wie üblich mit Äther extrahiert. Die eingeeengte und gut getrocknete ätherische Lösung wurde mit 50 mg Benzylamin, gelöst in wenig Äther, versetzt. Es fiel sogleich ein Öl, das nach einigen Stunden bei 0° C zu einer mit Kristallen durchsetzten Schmiere erstarrte. Das ausgefällte Material wurde in benzylaminhaltigem Alkohol gelöst, filtriert und langsam eingedampft. Die Substanz fiel in hellen Flocken aus, die durch Filtration von der Mutterlauge getrennt werden konnten. Nach nochmaligem Lösen in wenig Wasser, das eine Spur Benzylamin enthielt, kristallisierte das Salz beim Erkalten in feinen Plättchen (21,5 mg). Schmelzpunkt Fp 122—124°. Die Substanz gab beim Versetzen mit Quecksilberchloridlösung einen weissen Niederschlag.

3,696 mg Substanz gaben 8,437 mg CO₂ und 2,293 mg H₂O
2,439 mg Substanz gaben 0,219 ccm N₂ bei 20°/728 mm
3,770 mg Substanz verbrauchten 0,557 ccm 0,02n KJO₃

C ₃₀ H ₃₆ O ₄ N ₄ S · H ₂ O	Ber. C 63,58	H 6,76	N 9,88	S 5,66 %
(Penicillin G)	Gef. C 62,30	H 6,94	N 10,02	S 4,74 %

D. Die Ester der Penicilline

Versuch 17: Chromatogramm eines Esters aus Flachsichtsalzen, Standard I

Ein Gemisch von 16,88 g Bariumsalzen mit durchschnittlich 7000 Pc/mg (155 OxU/mg), total 118 Mill. Pc wurde in 150 ccm Wasser gelöst, mit 75 ccm 10proz. H₃PO₄ bei 0° C angesäuert und mit 2 × 200 ccm tiefgekühltem Äther extrahiert; die trockene ätherische Lösung wurde mit 250 ccm 1,3proz. Diazomethan in Äther versetzt. Nach 10 Minuten wurde durch dreimaliges Ausschütteln

mit je 50 ccm 5% Phosphatpuffer ein Pigment phenolischen Charakters entfernt und die trockene Esterlösung bei niedriger Temperatur eingedampft. Es resultierten 6,78 g Ester mit 295 Pc/mg¹⁰⁾, total 2 Mill. Pc, entsprechend 1,7% der eingesetzten Aktivität.

$$[\alpha]_D^{20} = -5,7^\circ \quad (c = 1,920 \text{ in } \text{CHCl}_3)$$

Solvent	Frkt.	mg	Pc/mg	N ¹¹⁾	Keto ₁₂₎	$[\alpha]_D^{16 \ 13)}$	Bemerkungen
Benzol	1	20		-	-	$\pm 0^\circ$	farblos
	2	580		(+)	-		farblos
	3	170		+	-		hellgelb
	4	135		++		- 9,57°	gelb mit Krist.
	5	200	0	+++	(+)		gelb mit Krist.
	6	150		+++			gelb mit Krist.
	7	120		+++		- 11,58°	gelb mit Krist.
	8	115		+++	(+)	- 13,44°	gelb mit Krist.
	9	110		+++			stark gelbes Öl
	10	60		++		- 32,04°	stark gelbes Öl
	11	55		++	(+)		stark gelbes Öl
Äther	12	120	0	++		- 21,92°	hellgelb
	13	220		++	-	- 9,40°	klebrig
	14	55		++	-		fast farblos
	15	45	0	+	-	- 6,51°	farblos
	16	40	0	+	-		hellgelb
Äthylacetat	17	40	18	++	-	- 0,88°	hellgelb
	18	1225	980	++++	-	+ 41,65°	rot, viskos
	19	915	38	++++	+		dunkelrot
	20	430	25	+++	++	+ 7,38°	schmutzigrot
	21	265	20	++	+++		braunrot
Methanol	22	550	0	+	+++		braunrot
	23	905		++	+		dunkelbraun

¹⁰⁾ Test der Ester: Eingewogene Menge (ca. 3 mg) in 1 ccm Aceton gelöst und mit 9 ccm Wasser verdünnt, in Verdünnungsreihen geprüft. Fehler: + 100%, - 50%.

¹¹⁾ N-Gehalt: Ca. 0,2 mg Substanz wurden im Glühröhrchen mit halogenfreiem Kalk verbrannt und die Menge des gebildeten NH₃ auf feuchtem Lackmuspapier abgeschätzt.

¹²⁾ Ketonprüfung: Eine Substanzprobe in Dioxan wurde in eine konz.-wässrige Lösung von Hydroxylamin·HCl + Bromphenolblau getüpfelt und der Farbumschlag beobachtet.

¹³⁾ Drehungen: Sie wurden in Chloroform ausgeführt (c = 1–2%).

Das Produkt wurde an 280 g Aluminiumoxyd, das mit Äthylacetat neutralisiert worden war (Aktivitätsklasse I bis II), chromatographiert.

Versuch 18: Chromatogramm eines Esters aus Kleiekultur

1 g Bariumsalz mit 16 500 Pc/mg wurden wie in Versuch 17 verestert. Das resultierende hellgelbe Produkt: 650 mg mit 250 Pc/mg, entsprechend ca. 1 % der eingesetzten Aktivität: wurde an 20 g neutralisiertem Aluminiumoxyd chromatographiert.

Lösungsmittel	Frkt.	mg	Pc/mg	% S ¹⁴⁾	Bemerkungen
Benzol	1	25,5	—	—	farblos
	2	39,4	100	1,0	hellgelb, dünnfl.
	3	18,0	590	3,9	hellgelb, dünnfl.
	4	7,8	770	4,2	hellgelb, dünnfl.
	5	16,1	585	6,0	hellgelb, dünnfl.
Äther	6	18,9	980	7,0	hellgelb, dünnfl.
	7	13,2	620	6,5	hellgelb, dünnfl.
Äthylacetat	8	73,1	1200	7,3	hellrot, viskos
	9	75,3	150	1,7	dunkelrot
Methanol	10	90,1	34	0,95	braun
	11	133,3	—	0,44	gelbbraun
Total:		510,7	1,55 · 10 ⁵ Pc		
Ausbeute:		78,5 %	96 %		

Versuch 19: Destillation einer aktiven Esterfraktion

Es wurde in einem Kugelrohr im Sublimationsblock bei 0,01 mm Hg destilliert.

Ausgangsprodukt	96,8 mg	850 Pc/mg	$[\alpha]_D^{19} = + 98^\circ$
Frkt. I 120—145—160° (11 Min.)	16,6 mg	0 Pc/mg	
Frkt. II 160—180—200° (14 Min.)	60,0 mg	1380 Pc/mg	$[\alpha]_D^{24} = + 207^\circ$
Rückstand (S-haltig)	19,4 mg	—	
Total	96,0 mg		
Ausbeute	99 %	101 %	

¹⁴⁾ S-Bestimmung: Eine eingewogene Menge Ester wurde in der üblichen Weise mit K aufgeschlossen. Sofort nach dem Ansäuern der Lösung wurde der freie H₂S mit Jodlösung titriert. Genauigkeit: ca. ± 5 %.

F. Desaktivierung und Abbau

Zu 2a

Versuch 20: Ausführung der CO_2 -Abspaltung

Zur Kohlendioxydbestimmung wurde das mit Lauge oder Säure versetzte Penicillin (Bariumsalz oder Methylester) in einem Quarzglas von ungefähr 10 ccm Inhalt auf $90\text{--}100^\circ$ erhitzt. Das abgespaltene CO_2 wurde dabei mittels eines durch das Reaktionsgefäß perlenden Stickstoffstromes weggeführt und in einer Vorlage mit Barytlauge aufgefangen. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Barytlauge mit Hilfe einer horizontalen Eintauchpipette auf Bromthymolblau oder Phenolphthalein titriert. Blindprüfungen der Apparatur mit einem Soda-Urtiter ergaben eine Bestimmungsgenauigkeit von $\pm 1,5\%$.

Beispiel einer sauren CO_2 -Abspaltung

8,00 mg Bariumsalz wurden mit 2 ccm 0,1 n Schwefelsäure versetzt und das entstehende CO_2 wurde während zwei Stunden mit Stickstoff (2—3 Blasen/sec an einer Kapillare) in die Vorlage übergetrieben. Die Vorlage enthielt 1 ccm Barytlauge mit dem

Titer:	1,0614 ccm 0,100 n
nach der Reaktion	<u>0,8574 ccm 0,100 n</u>
Kohlendioxyd	0,2040 ccm 0,100 n
Äquivalentgewicht	392

Zu 2a

Versuch 21: Beispiel einer alkalischen CO_2 -Abspaltung

6,30 mg eines Methylesters wurden mit 1 ccm 0,1 n Barytlauge in Stickstoffatmosphäre zwei Stunden lang auf 100° erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 30° wurde, ohne das geschlossene System zu öffnen, durch eine Kapillare 1 ccm 10proz. H_3PO_4 zugegeben und das in Freiheit gesetzte CO_2 mit Stickstoff während einer Stunde übergetrieben.

Vorgelegt 1 ccm $\text{Ba}(\text{OH})_2$	1,0614 ccm 0,1000 n
Nach der Reaktion	0,7274 ccm 0,1000 n
CO_2	0,2340 ccm 0,1000 n
Äquivalentgewicht	269

Zu 2b

Versuch 22: Aminostickstoff-Bestimmung nach saurer Hydrolyse

24,9 mg Bariumsalz wurden in 2 ccm 0,1 n HCl 1 Stunde lang auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Das abgekühlte Hydrolysenprodukt wurde auf 2,500 ccm verdünnt. Aminostickstoffbestimmung:

2,000 ccm Lösung gaben in 5 Min	0,293 ccm N ₂
Der Nullwert betrug	0,011 ccm N ₂
Entwickelter Stickstoff	0,282 ccm (18 ⁰ /725 mm)
Gef.	0,78 % NNH ₂

Zu 2c

Versuch 23: Bestimmung des destillierbaren Stickstoffs nach saurer Hydrolyse

Das Bariumsalz wurde während einer Stunde mit 2n Schwefelsäure bei 100⁰ hydrolysiert, wobei sich die Substanz meist stark dunkel färbte. Die Destillation erfolgte gleich wie bei der Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl*. Das Destillat wurde mit Barytlauge auf Methyrot titriert.

25,0 mg Substanz verbrauchten	0,565 ccm 0,02 nHCl
entsprechend	0,16 mg N ₂
Gef.	0,63 % NNH ₂

Zu 4a

Versuch 24: Heisse alkalische Verseifung

15,43 mg Bariumsalz wurden im Quarzglas unter Stickstoff mit 1 ccm Barytlauge eine Stunde lang auf 96⁰ erhitzt. Die Titration mit 0,1000 n HCl wurde mit einer horizontalen Eintauchpipette ausgeführt.

Titer der Barytlauge	1,0845 ccm 0,1000 n
Nach der Verseifung	0,8495 ccm 0,1000 n
Verbrauch	0,2350 ccm 0,1000 n
Äquivalentgewicht	655

Versuch 25: Kalte alkalische Verseifung

17,85 mg Bariumsalz wurden im Quarz mit 1 ccm Barytlauge bei 20⁰ eine halbe Stunde lang unter N₂ stehen gelassen.

Die Substanz verbrauchte 0,1700 ccm 0,1000 n Ba(OH)₂
 Äquivalentgewicht 1050

Zu 4a

Versuch 26: Kalte Verseifungsgeschwindigkeit

Drei Proben des Bariums Salzes (Versuch 25) wurden wie oben
 verseift. Die Rücktitration erfolgte nach 3, 5 und 15 Minuten.

Nach 3 Minuten	Äquivalentgewicht 1135
„ .5 „	„ 1070
„ 15 „	„ 1065
„ 30 „ (Vers. 25)	„ 1050

Der Endwert ist also praktisch schon nach 5 Minuten erreicht.

Zu 4b

Versuch 27: Jodtitration

4,48 mg Bariums Salz mit 15 000 Pc/mg (biologischer Test)
 wurden mit 2 ccm 0,1 n NaOH 1 Stunde lang bei 20° verseift.
 Nach Zugabe von 2,2 ccm 0,1 n HCl (pH 4,6) und etwas
 Stärkelösung wurde mit 0,0163 n J₂-Lösung titriert. Es wurden
 aufgenommen:

Schnell Blaufärbung 5 sec	0,60 ccm	Äquivalentgewicht 459
Total (40°) Blaufärbung 5 min	0,90 ccm	Äquivalentgewicht 306
Verhältnis : schnell : total = 2 : 3		
Titrationssaktivität	Gef. 14 700 Pc/mg	
Biologische Aktivität	Gef. 15 000 Pc/mg	

Die biologische Aktivität wurde aus dem Mittel aus sechs
 Testen berechnet.

Zu 4b

Versuch 28: Jodaufnahme nach verschiedener Behandlung

Obiges Bariums Salz mit 15 000 Pc/mg wurde nach verschiedener
 Vorbehandlung auf seine Jodaufnahme geprüft. Die Werte sind in
 Äquivalenten Jod pro Mol Penicillin-Barium ausgedrückt. (Bezugs-
 wert: kalte alkalische Verseifung = 6 Äquivalente Jod.)

Bedingungen	genaue Werte		runde Werte	
	schnell	total	schnell	total
In H ₂ O pH 6,6—6,8 sofort	0,21	1,88	0	2
In 0,2 n Ba(OH) ₂ 30' 20°	3,92	6,00	4	6
In 0,2 n Ba(OH) ₂ 2 Std. 100°	3,77	5,00	4	5
In 0,02 n H ₂ SO ₄ 1 Std. 20°	0,92	2,95	1	3
In 4 n H ₂ SO ₄ 1 Std. 100°	2,95	3,70	3	4
In 4 n H ₂ SO ₄ 6.Std. 100°	2,22	2,29	2	2

Die Normalität der Jodlösung wurde sowohl durch Titration von Thiosulfat als auch von Cystein-Hydrochlorid (Hoffmann-La Roche) geprüft.

Die Zahlen erheben keinen Anspruch auf unbedingte Gültigkeit, da, wie schon auf Seite 51 bemerkt, bei anderen Bariumsalzen teilweise verschiedene Verhältnisse aufgefunden wurden. Es geht lediglich die Tatsache hervor, dass Penicillin unter den obigen Bedingungen je verschieden ab- oder umgebaut wird. Nur die beiden letzten Hydrolysen erfolgen wahrscheinlich über denselben Reaktionsmechanismus.

Bemerkenswert ist noch, dass bei Gegenwart von Kaliumjodid fast kein Jod aufgenommen wird.

G. Die Untersuchung der Schwefelbindung

Versuch 29: Oxydation mit Kaliumpermanganat in sodaalkalischem Medium (Kögl [20])

Die eingewogene Substanz (ca. 10 mg) wurde in wenigen Kubikzentimetern Wasser gelöst (Cystin aufgeschlämmt), mit 2 Tropfen 2n Sodalösung versetzt und rasch mit 0,110n KMnO₄ titriert, bis die Entfärbung nicht mehr momentan eintrat. Dann wurde nach Zugabe von je 0,1 ccm KMnO₄-Lösung die Zeit bis zur Entfärbung gemessen. Der Endpunkt war erreicht, wenn die Entfärbungszeit ca. 2 Min. beanspruchte. Die Bestimmungen wurden dreifach ausgeführt und ihre Werte gemittelt.

Material	0,1 n KMnO ₄ /mg Substanz	Oxydations-	
		äq./Mol.	Ber.
Cystein-Hydrochlorid	0,660	6,2	6
Cystin	0,743	10,7	10
Methionin	0,477	3,9	4
Penicillin-Barium:			
Flache Schicht 14 000 Pe/mg	0,281	ca. 19 auf 2 N ber.	
Flache Schicht 12 000 Pe/mg	0,261	ca. 17 auf 2 N ber.	
Kleiekulturen 24 000 Pe/mg	0,334	ca. 20 auf 2 N ber.	
Kleiekulturen 22 000 Pe/mg	0,337	ca. 21 auf 2 N ber.	

Versuch 30: Thiazolidin-4-carbonsäuren
(Ratner, Clarke [28])

Thiazolidin-4-carbonsäure: 1,1 g Cystein-Hydrochlorid wurde in 3 cm Wasser gelöst und mit 0,6 ccm 38proz. Formalinlösung während 8 Stunden stehen gelassen und dann mit 1 ccm Pyridin versetzt. Nach 20 Stunden wurden die abgeschiedenen Kristalle isoliert und zweimal aus Wasser und etwas Pyridin umkristallisiert.

Schmelzpunkt Fp 196—197⁰, Ausbeute: 0,65 g oder 76%.

Bei der Herstellung der p-Tolylthiazolidin-4-carbonsäure, die nach viermaliger Kristallisation aus Methanol den Schmelzpunkt Fp 156⁰ besass, erzielte man eine Ausbeute von 71%.

Reaktionen (beide Thiazolidine):

Ninhydrin: blauviolette Färbung
 Nitroprussid-Na + KCN: sehr schwach rosa
 Fichtenspan: stark rot
 Quecksilberchlorid: weißes Präzipitat

Titration (Thiazolidin-4-carbonsäure):

8,4 mg Substanz verbrauchten 0,627 ccm 0,1 n Ba(OH)₂

Äquivalentgewicht: Ber. 133
 Gef. 133,5

Jodaufnahme (Thiazolidin-4-carbonsäure):

10,2 mg Substanz wurden in 10 ccm Wasser gelöst, mit 2 ccm 0,1 n HCl versetzt und mit 0,0184 n Jodlösung titriert.

Verbrauch:	schnell	15,3 ccm	0,01 n J ₂
	total	32,1 ccm	0,01 n J ₂

Äquivalente J₂ pro Mol:

	schnell	Ber. 2	Gef. 2,01
	total	Ber. 4	Gef. 4,17

Aminostickstoff (*Van Slyke*) (Thiazolidin-4-carbonsäure):

<i>Vor</i> Jodoxydation	Gef. 2,17 % NNH ₂	d. h. 23,9 % v. Total N
<i>Nach</i> Jodoxydation	Gef. 9,55 % NNH ₂	d. h. 90,5 % v. Total N
	Ber. 10,51 % NHN ₂	d. h. 100 % v. Total N

Nach Zugabe von 2 Äquivalenten Jod gab die Substanz mit Nitroprussidnatrium und Kaliumcyanid starke Rotfärbung; nach Zugabe von weiteren 2 Äquivalenten (total 4) Jod konnte Formaldehyd abdestilliert werden (mit Chromotropsäure nachgewiesen). Der Thiazolidinring wird also durch die Jodoxydation aufgespalten.

Versuch 31: N-Acetylthiazolidin-4-carbonsäure

Darstellung:

200 mg Thiazolidin-4-carbonsäure wurde mit 0,2 ccm Wasser und 0,25 ccm Acetanhydrid auf dem Wasserbad erwärmt. Nach 30 Minuten dampfte man im Vakuum zur Trockene. Das Acetyl-derivat kristallisierte leicht aus Wasser und besass den Schmelzpunkt Fp 140—141°.

Titration:

13,7 mg Substanz wurden mit 2 ccm 0,1 n Barytlauge 1 Stunde lang bei 20° stehen gelassen. Das Produkt verbrauchte 0,787 ccm 0,1 n Ba(OH)₂.

Äquivalentgewicht:	Ber. 175
„ „	Gef. 174

Die Acetylgruppe wird also in der Kälte nicht verseift.

Heisse Verseifung:

5,9 mg Substanz wurden mit 1 ccm 0,1 n Barytlaug 1 Stunde lang auf 100° erhitzt.

Verbrauch an Ba(OH)₂: Ber. 0,337 ccm 0,1 n

Gef. 0,403 ccm 0,1 n

Verseifter Anteil: ca. 20 %

Die verseifte Lösung nahm nach dem Ansäuern 0,735 ccm 0,01 n J₂ auf, entsprechend 1,4 Äquivalenten Jod pro Mol N-Acetyl-derivat.

Säurehydrolytische Spaltung:

Man erhitzte 10,4 mg Substanz mit 2 ccm 1 n Schwefelsäure 1 Stunde lang bei 100°. Die Jodaufnahme betrug:

16,95 ccm 0,01 n J₂ entsprechend 2,85 Äquivalenten J₂/Mol. Acetyl-derivat
oder 2,16 Äquivalenten J₂/Mol. Carbonsäure.

Das N-Acetyl-derivat wird also unter diesen energischen Bedingungen nur zu 50—60 % verseift.

Versuch 32: Saure Hydrolyse eines Methyl-esters

350 mg eines chromatographierten Penicillinmethyl-esters (zweite Essigesterfraktion) mit 435 Pc/mg und 6,19 % Stickstoff (*Dumas*) wurden mit 5 ccm HCl 1:1 im Bombenrohr während 6 Stunden bei 120° hydrolysiert. Beim Öffnen des Rohres entwich Kohlendioxyd, jedoch keine Spur von Schwefelwasserstoff. Die Hydrolysenlösung war dunkel gefärbt.

Sie wurde filtriert:

(1) schwarzer Rückstand 140 mg = 40 %
(alkohollöslich)

Das saure Filtrat wurde dreimal mit Äther extrahiert:

(2) hellgelber Säureextrakt 80 mg = 23 %

Die wässrige Lösung wurde am Vakuum eingedampft:

(3) gelbbrauner Rückstand 140 mg = 40 %

Die Voruntersuchung ergab	(1)	(2)	(3)
Ninhydrinprobe	—	—	++
Nitroprussid-Na	—	—	(+)
Nitroprussid-Na + KCN	—	—	(+)
S (Aufschluß mit K)	+	(+)	+++
S (semiquantitativ)	1 ‰		7,1 ‰
N (qualitativ)	+	++	+++
N (Kjeldahl)	0,2 ‰		7,67 ‰
NH ₄ (Mikrobestimmung)			3,28 ‰

Die wässrige Lösung (3), die viel braune Huminsubstanzen enthielt, wurde zur Entfernung des Ammoniaks und der Amine über Kalkmilch destilliert (*Winterstein* [38]).

Destillation über Kalkmilch

110 mg der Substanz (3) = 23 ccm wurden in einem 300-ccm-Claissenkolben mit 20 ccm Äthanol und 5 ccm einer 10proz. Calciumhydroxyd-Suspension versetzt und während 30 Minuten destilliert. Die zwei Vorlagen enthielten im gesamten 15,00 ccm 0,1 n HCl. Die Destillationstemperatur betrug 30–35° bei 25–30 mm Hg.

Das Destillat (3,1) wurde auf 50 ccm aufgefüllt. Zwei Titrationen äquivalenter Teile bestätigten den Wert Mikro-Ammoniak-Bestimmung (3,28 ‰) und ergaben 2,9 und 3,1 ‰ „Ammoniakstickstoff“.

Aus der zurückgebliebenen Kalkmilch-Aufschlammung wurde das Calcium durch Einleiten von Kohlendioxyd ausgefällt und der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat (3,2) war bedeutend aufgehellt; die Bestimmung des Stickstoffs nach *Kjeldahl* zeigte 3,99 ‰ Total-N und diejenige nach *Van Slyke* 4,18 ‰ Amino-N.

Der Filtrerrückstand (3,3) (Calciumcarbonat und Huminsubstanzen) enthielt nur Spuren Stickstoff (*Kjeldahl*).

Versuch 33: Untersuchung des Destillates aus der Kalkmilchdestillation (3,1) Ammoniak, Amine

Das Destillat wurde am Vakuum eingedampft (20,2 mg Hydrochloride, berechneter N-Gehalt ca. 16 ‰). Eine Probe wurde mit starker Natronlauge versetzt; neben Ammoniak war typischer

Amingeruch feststellbar. Zur Auftrennung wurden 19,4 mg der Chlorhydrate dreimal mit je 1 ccm Chloroform extrahiert:

CHCl ₃ -unlöslich:	(3,1,1)	9,1 mg	47 %
CHCl ₃ -löslich	(3,1,2)	9,8 mg	51 %

Die chloroform-unlösliche Substanz (3,1,1) war Ammonchlorid, das schon früher bei ähnlichen Hydrolysen gefunden worden war.

Der chloroform-lösliche Anteil (3,1,2) zeigte einerseits typische Reaktionen für primäre Amine (Senföprobe, Farbreaktion mit Nitroprussid-Na + Spur Brenztraubensäure + Eisessig = hellblau), andererseits Aldehydreaktionen (fuchsin-schweflige Säure, 2,4-Dinitrophenylhydrazin). Es konnten zwei verschiedene 2,4-Dinitrophenylhydrazone isoliert werden:

2,4-Dinitrophenylhydrazone

- I rot Fp 150—155°
- II gelb Fp 177—180°

Das letztere konnte später als dasjenige des Penilloaldehyds G erkannt werden.

1 mg Substanz mit 3 Tropfen alkoholisch gesättigter Picrolonsäurelösung versetzt, ergab Trübung und Kristallisation zweier untereinander und von Picrolonsäure verschiedener Substanzen. Durch Umkristallisieren auf dem Objektträger konnte die eine etwas gereinigt werden und zeigte den Schmelzpunkt Fp 195—215°. Das Chloroplatinat der gleichen Substanz besass den Schmelzpunkt Fp 225—235° und war nach Mischschmelzpunkt und Kristallform identisch mit dem Chloroplatinat des Isobutylamins (Fp 225—230°).

Versuch 34: Untersuchung des Filtrats (3,2), neutrale Aminosäure, Phenacetyl-glycin

Die vom Calciumkarbonat gut abfiltrierte Lösung, enthaltend 115 mg Substanz, gab blauviolette Ninhydrinfärbung und war schwefelhaltig, doch liess sich der Schwefel nicht direkt mit Nitro-

prussid-Na und Kaliumcyanid nachweisen. Die Aminosäuren wurden nach der Methode von *Schramm* und *Primosigh* [31] an Silicagel und saurem Aluminiumoxyd (*Wieland* [35]) chromatographisch aufgetrennt.

85 mg des orangegelben Substanzgemisches wurden in Wasser auf eine Säule von 8,5 g Silicagel (*Gordon, Martin, Synge* [18]) (d. h. Verhältnis Substanz zu Adsorbens 1:100) gegeben. 80,6 mg Aminosäuregemisch, welches tief blauviolette Ninhydrinreaktion gab, lief sofort durch; das Eluat enthielt auch noch Ca^{++} . Beim Eluieren mit 0,1 n Salzsäure erschienen nur noch 0,2 mg, die eine schwache Ninhydrinfärbung gaben (Ammoniak); alle anderen Fraktionen enthielten anorganisches Material.

Die obigen Aminosäuren (80,0 mg) wurden nun an 8 g Aluminiumoxyd (mit Salzsäure gesättigt) chromatographiert. Mit Wasser konnten total 34,7 mg farbloser neutraler Aminosäuren (3,2,1) eluiert werden, während eine gelbbraune Zone (3,2,2) langsam mit 0,1 n Natronlauge ausgewaschen wurde (ca. 30 mg).

Diese zweite Substanz (3,2,2) gab eine blaue Ninhydrinfärbung, war stark schwefelhaltig, zeigte eine blaue Ferrichloridreaktion, nahm Jod auf, konnte jedoch weder direkt noch als Esterchlorhydrat, als 3,5-Dinitrobenzoat oder als Kupfersalz kristallisiert werden. Es handelte sich hier wahrscheinlich um das Disulfid von Penicillamin.

Das Wassereluat (3,2,1) gab eine violette Ninhydrinreaktion, enthielt keinen Schwefel und war ein Gemisch einer neutralen Aminosäure (3,2,1,1) und eines Calciumsalzes einer ebenfalls stickstoffhaltigen Säure (3,2,1,2). Bei trockener Destillation des Gemisches über Kalk wurde starker Amingeruch (wie Isobutylamin) festgestellt. 12,0 mg des Substanzgemisches wurden mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (*Saunders* [30]) umgesetzt, wobei man 6,2 mg eines Dinitrobenzoates erhielt, das nach mehrmaligem Umkristallisieren, aber immer noch unrein, den Schmelzpunkt F_p 171—178° besass. Eine genaue Identifizierung war nicht mehr möglich, doch schien eine Aminosäure vom Typus Valin oder Leucin vorzuliegen.

Die Säure (3,2,1,2) konnte nach dem Eindampfen der salzsäuren Lösung sublimiert werden, besass den Schmelzpunkt F_p

141—143⁰ und war Phenacetyl glycin (siehe Versuch 41), das wahrscheinlich während der Kalkmilchdestillation aus dem entsprechenden Aldehyd (Penilloaldehyd G) entstanden war.

Versuch 35: Untersuchung des Säureextraktes (2)
Phenyllessigsäure, N-haltige Säuren

Das hellgelbe, stark riechende, stickstoffhaltige Säuregemisch wurde in ätherischer Lösung mit Diazomethan verestert (65,2 mg Ester) und an 2 g Aluminiumoxyd (mit Äthylacetat neutralisiert, Aktivitätsklasse I—II) chromatographiert. Der Verlauf des Chromatogramms zeigte deutlich, dass hauptsächlich zwei Substanzgruppen vorlagen. Mit Petroläther und Benzol erschienen total 31,2 mg eines farblosen Öls (2,1), das keinen Stickstoff enthielt. Nach der alkalischen Verseifung mit 1 n KOH bei 100⁰, 1 Stunde, wurden im Ätherextrakt 27,2 mg Säure gefunden, die grösstenteils kristallisierte. Durch fraktionierte Sublimation erreichte man eine nochmalige Auftrennung in zwei Substanzen. Die erste, die schon bei 30—40⁰ (0,01 mm Hg) sublimierte, war Brenzschleimsäure, Fp 130⁰ (17,4 mg). Die zweite sublimierte langsamer bei der gleichen Temperatur, zeigte den Schmelzpunkt Fp 75,5⁰ und erwies sich nach Mischschmelzpunkt und Analyse als Phenyllessigsäure.

3,710 mg Substanz gaben 9,560 mg CO₂ und 1,976 mg H₂O

C₈H₈O₂ Ber. C 70,57 H 6,92 %
Gef. C 70,32 H 6,96 %

Der mit Äthylacetat eluierte Säureester (2,2) (23,7 mg) besass einen starken angenehmen Geruch, war stickstoffhaltig und gab nach alkalischer Verseifung unter teilweiser Verharzung eine leichtflüchtige (ca. 2 mg) und eine destillierbare, stickstoffhaltige Säure (4,6 mg). Als drittes gab die wässrige Verseifungslösung eine purpurne Ninhydrinreaktion. Dieses eigenartige Resultat konnte nur dadurch erklärt werden, dass eine N-acetylierte Aminosäure bei der alkalischen Verseifung teilweise in die Aminosäure und Acylsäure zerlegt worden war. Die ätherlösliche Säure war jedoch so leichtflüchtig, dass sie am Vakuum zum grössten Teil verloren ging, sie war jedenfalls nicht identisch mit Phenyllessigsäure.

Nach unserem heutigen Wissen hat es sich bei dieser Substanz wahrscheinlich um eine einem Penilloaldehyd (aber nicht Penilloaldehyd G) entsprechende Säure gehandelt, die bei der energischen Verseifung teilweise in Glycin (purpurfarbige Ninhydrinprobe!) und eine Säure gespalten worden war.



Versuch 36: Saurer Abbau der Penicillinbariumsalze

450 mg Bariumsalz mit 24 000 Pe/mg wurde mit 17 ccm 0,2 n Schwefelsäure 1½ Stunden lang in einer evakuierten Ampulle erhitzt. Die bräunliche Hydrolysenlösung wurde vom ausgeschiedenen Harz und Ba-Sulfat abfiltriert. Aus dem Filtrerrückstand konnte mit Alkohol 106 mg braunschwarzes Harz ausgewaschen werden; es enthielt Stickstoff und Schwefel. Das klare Filtrat wurde mit konz. Sublimatlösung versetzt, wobei das Hg-Salz des Penicillamins ausfiel und abzentrifugiert werden konnte (sehr wenig, vgl. Versuch 38).

Das im Zentrifugat noch enthaltene HgCl_2 wurde mit Schwefelwasserstoff ausgefällt und das klare Filtrat tropfenweise mit einer Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 n HCl bis zur Beendigung der Ausfällung versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert (23 mg). (Aufarbeitung des Hydrazons siehe Versuch 41.)

Nachdem durch Zufügen einiger Tropfen Aceton überschüssiges 2,4-Dinitrophenylhydrazin entfernt worden war, wurde die Lösung normal analytisch verarbeitet, wobei ansehnliche Mengen Phenacetursäure und Phenacetamid und geringe Mengen Phenyllessigsäure isoliert wurden (siehe Versuch 41).

Versuch 37: Alkalischer Abbau der Penicillinbariumsalze

In bedeutend besserer Ausbeute wurden Penicillamin und Penilloaldehyde durch folgenden Abbau gewonnen:

450 mg Bariumsalz mit 22 000 Pe/mg wurden mit 10 ccm 0,5 n Natronlauge 30 Minuten lang bei 20° verseift. Bei Zugabe von kalt konzentrierter HgCl_2 -Lösung fiel unter CO_2 -Entwicklung das

Penicillamin in reichlicher Menge (ca. 300 mg Hg-Salz). Die restliche Hydrolysenlösung wurde von Quecksilberchlorid befreit, worauf man die Penilloaldehyde durch Versetzen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, gelöst in salzsaurem Methanol, fällte (ca. 50 mg Hydrazone). Die verbleibende Lösung enthielt nur Spuren Phenylacetyl-glycin und keine Phenylelessigsäure.

Versuch 38: Penicillamin

Das abzentrifugierte Penicillamin-Quecksilber-Salz (1,2 g aus 1,5 g gereinigtem U. S.-Bariumsalz mit 48 000 Pe/mg) wurde in 8 ccm Wasser aufgeschlämmt, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt und am Vakuum eingedampft. Es resultierte 570 mg braungelbes Öl, das mit Nitroprussidnatrium starke Rotfärbung und mit Ferrichlorid Blaufärbung zeigte.

Nach vielen misslungenen Kristallisationsversuchen, zum Beispiel aus n-Butanol-Äther oder Butanol-Chloroform wurde der Rest (270 mg) in absolutem Methanol durch Einleiten von Chlorwasserstoff bei 60—80° während 2 Stunden zweimal verestert. Das Esterchlorhydrat zeigte immer noch SH-Reaktion, liess sich jedoch nicht kristallisieren. 150 mg Ester·HCl wurden darauf durch zweistündiges Erhitzen mit 4 ccm Acetanhydrid und 3 g Natriumacetat (siehe *Plattner* [26]) acetyliert. Das Acetylderivat, das keine SH-Reaktion mehr gab, liess sich im Hochvakuum destillieren, wobei bei 150°/0,005 mm Hg ein gelbes Öl überging. Die Analysendaten waren jedoch schlecht, da bei der Destillation Schwefel abgespalten wurde.

H. Die Penilloaldehyde

Versuch 39: Isolierung der Penilloaldehyde

85 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazone (aus 490 mg Bariumsalz, Kleiekultur hergestellt, vgl. Versuch 37) wurden viermal aus Methanol umkristallisiert; die hellgelben haarähnlichen Kristalle zeigten den Schmelzpunkt F_p 184—185°. Eine Analyse ergab folgendes Bild:

3,622 mg Substanz gaben 9,443 mg CO₂ und 2,182 mg H₂O
 2,453 mg Substanz gaben 0,229 ccm N₂ bei 17°/715 mm Hg

Pen. F = C₁₄H₁₇O₅N₅ Ber. C 50,14 H 5,11 N 20,89 %

Pen. G = C₁₆H₁₅O₅N₅ Ber. C 53,78 H 4,23 N 19,60 %

Pen. X = C₁₆H₁₅O₆N₅ Ber. C 51,47 H 4,05 N 18,76 %

Gef. C 52,53 H 3,83 N 19,48 %

30 mg dieses Hydrazongemisches wurden an 3 g Aluminiumoxyd (mit Äthylacetat neutralisiert, Aktivitätsklasse III—IV) chromatographiert.

Subst.	Eluat	mg	Farbe	Fp °C	C %	H %
I	Benzol	2	schmutzig rot	150—160	—	—
II	Äther	0,5	hellgelb	ca. 185	—	—
III	CHCl ₃	15	hellgelb	185,2—185,5	52,51	4,13
IV	CHCl ₃	5	hellgelb	184,8—185,2	60,07	6,33
V	Ätylac.	4	dunkelgelb	175 —176	52,77	5,21
Vergl.	Penilloaldehyd-G-Hydrazon			185,5—186,5	53,78	4,23

Versuch 40: Abbau der Penilloaldehyd-Hydrazone durch saure Hydrolyse

7,4 mg des mit Chloroform eluierten Hydrazons III wurden mit 1 ccm Salzsäure 1:1 im Bombenrohr bei 120° während 10 Stunden hydrolysiert. Aus dem Ätherextrakt der sauren Hydrolysenlösung erhielt man durch Sublimation 2,4 mg Phenyl-essigsäure vom Schmelzpunkt Fp 74,5—75°. Ausbeute 85%.

0,95 mg Hydrazon V, das durch viermaliges Umkristallisieren aus Alkohol-Wasser vorgereinigt worden war, wurde mit 0,3 ccm Salzsäure auf die obige Weise hydrolysiert. Im Säureextrakt fand sich eine leichtflüchtige Säure mit ranzigem Geruch (ähnlich Valeriansäure), die sich jedoch schon bei Zimmertemperatur im Hochvakuum verflüchtigte. (Vgl. auch Versuch 35.)

Versuch 41: Die Aufarbeitung der restlichen Hydrolysenlösung. Phenacetamid

Die von Penicillamin und Penilloaldehyden befreite Hydrolysenlösung (ausgehend von 450 mg Bariumsalz, vgl. Versuche

35 und 36) wurde sukzessive mit Äther und Essigester, und alkalisch mit n-Butanol, extrahiert. Der am Vakuum zur Trockene gedampfte Rückstand der Hydrolysenlösung wurde noch mit Äthanol ausgezogen.

Der Ätherextrakt wurde in neutrale (6 mg) und saure (66 mg) Anteile zerlegt. Durch Sublimation der meist kristallisierten Säuren konnte neben viel Brenzschleimsäure (ca. 30 mg) und wenig Fumarsäure (8,5 mg), Phenyllessigsäure, Fp 74—75° gewonnen werden (ca. 10 mg).

Der Essigesterextrakt (12 mg) lieferte neben Fumarsäure nur Spuren Phenyllessigsäure.

Die n-Butanolfractionen (22 mg) gaben bei der Sublimation fast reines Phenacetamid (14 mg) vom Schmelzpunkt Fp 141—143°.

3,762 mg Substanz gaben 7,241 mg CO₂ und 1,289 mg H₂O

2,172 mg Substanz gaben 0,375 ccm N₂ bei 17°/728 mm Hg

C₈H₉ON Ber. C 71,09 H 6,67 N 10,38 %
Gef. C 71,15 H 6,74 N 10,33 %

Versuch 42: Isolierung von Phenacetursäure

Die restliche Hydrolysenlösung (nach der Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln, vgl. Versuch 41) wurde langsam zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand, der hauptsächlich aus NaCl bestand, wurde 20 Stunden lang bei 120° im Hochvakuum (0,005 mm) der Sublimation unterworfen. Es bildeten sich zwei staubige Ringe, die durch eine zweite Sublimation gut in Ammonchlorid und Phenacetursäure vom Schmelzpunkt Fp 142—143° getrennt werden konnten. Ausbeute 6,7 mg.

3,726 mg Substanz

0,030 mg Rückstand

3,696 mg Substanz gaben 8,365 mg CO₂ und 1,956 mg H₂O

3,857 mg Substanz gaben 0,244 cm N₂ bei 15°/710 mm Hg

C₁₀H₁₁O₃N Ber. C 62,16 H 5,74 N 7,25 %
Gef. C 61,76 H 5,92 N 7,00 %

Versuch 43: *Synthese des Penilloaldehyds G*
(Phenylacetylaminoacetaldehyd)

a) Phenylelessigsäurechlorid: 5 g Phenylelessigsäure, Fp 76°, wurden mit 10 g Thionylchlorid 1 Stunde lang zum Sieden erhitzt. Die nachfolgende Destillation bei 98° (15 mm Hg) ergab 5,00 g Säurechlorid. Ausbeute 91 %.

b) Phenacetursäure: Zu 800 mg Glycin in 10 ccm Wasser wurde 800 mg NaOH gegeben, auf -20° gekühlt und mit 1,55 g Phenylelessigsäurechlorid versetzt; es wurde 30 Minuten stark geschüttelt. Beim Ansäuern der Lösung fiel Phenylacetyl-glycin, das nach dreimaliger Kristallisation aus Wasser den Schmelzpunkt Fp 143—144° besass. Ausbeute: 1,8 g entsprechend 93,5 %.

3,796 mg Substanz gaben 8,646 mg CO₂ und 1,976 mg H₂O
2,659 mg Substanz gaben 0,170 ccm N₂ bei 19°/728 mm Hg

C₁₀H₁₁O₃N Ber. C 62,16 H 5,74 N 7,25 %
Gef. C 62,15 H 5,82 N 7,16 %

c) Monoaminoacetal: 4 g Chloracetal (frisch destil- liert) wurden mit 60 ccm Äthanol, das mit trockenem Ammoniak gesättigt war, im Bombenrohr bei 110—125° während 15 Stunden erhitzt. Die vom Ammonchlorid abfiltrierte braune Lösung wurde am Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 10 ccm Wasser gelöst und das Di- und Tri-Acetalamin durch Ausschütteln mit Äther entfernt. Das zurückbleibende Monoacetalamin konnte, nach Sättigung der Lösung mit Pottasche, mit Äther extrahiert werden. Das Produkt destillierte konstant bei 68—70°/14 mm Hg. Ausbeute: 500 mg entsprechend 15 %.

3,725 mg Substanz gaben 7,395 mg CO₂ und 3,759 mg H₂O

C₆H₁₅O₂N Ber. C 54,10 H 11,35 %
Gef. C 54,18 H 11,29 %

d) Penilloaldehyd-G-Acetal: 450 mg Monoamino- acetal wurden in 5 ccm Äther gelöst und mit 150 mg NaOH, gelöst in 1,5 ccm Wasser, unterschichtet. Unter starker Kühlung gab man langsam 525 mg Phenylelessigsäurechlorid, gelöst in 2 ccm Äther,

zu und schüttelte während einer halben Stunde gut durch. Die Lösung wurde mit Pottasche gesättigt und mit Äther extrahiert. Es resultierten 820 mg Penilloaldehyd-G-Acetal (Phenylacetyl-aminoacetal), das nach kurzem Stehen kristallisierte und nach zweimaliger Umkristallisation aus Äther-Petroläther den Schmelzpunkt Fp 36—37° besass. Ausbeute: 96%.

3,737 mg Substanz gaben 9,159 mg CO₂ und 2,775 mg H₂O
3,389 mg Substanz gaben 0,169 ccm N₂ bei 18°/727 mm Hg

C₁₄H₂₁O₃N Ber. C 66,90 H 8,42 N 5,57 %
Gef. C 66,88 H 8,31 N 5,60 %

e) Penilloaldehyd-G-2,4-dinitrophenylhydrazon: 15 mg Acetal wurden aus salzsaurer alkoholischer Lösung mit 22 mg reinem 2,4-Dinitrophenylhydrazin·HCl gefällt und viermal aus Methanol umkristallisiert. Die prächtigen Kristalle besaßen den scharfen Schmelzpunkt Fp 186,2—186,4°, analysierten jedoch schlecht.

3,610 mg Substanz gaben 7,146 mg CO₂ und 1,410 mg H₂O
1,761 mg Substanz gaben 0,317 ccm N₂ bei 14°/714 mm Hg

C₁₆H₁₅O₅N₅ Ber. C 53,78 H 4,23 N 19,60 %
Gef. C 54,02 H 4,37 N 20,11 %

K. Brenzschleimsäure

Versuch 44: Isolierung

Beim Umfällen von 23 mg Penicillinammoniumsalz mit 32 000 Pa/mg aus Alkohol mit Äther entstanden 14 mg eines „Kristallisates“, das im Hochvakuum sublimiert werden konnte. Sublimat: 10 mg. Zersetzungsintervall 175—185° (Ammoniumsalz).

3,840 mg Substanz gaben 6,546 mg CO₂ und 1,791 mg H₂O
4,45 mg Substanz verbrauchten 3,335 ccm 0,01 n HCl (Kjeldahl)

C₅H₇O₃N Ber. C 46,51 H 5,46 N 10,85 %
Gef. C 46,52 H 5,22 N 10,28 %

11 mg Ammoniumsalz wurden mit 17 mg fein pulverisiertem Natriumbisulfat bei etwa 200⁰ kurz gesintert. Die anschliessende Sublimation im Hochvakuum lieferte 6 mg Brenzschleimsäure vom Schmelzpunkt Fp 129,5—130,5⁰.

2,914 mg Substanz gaben 5,737 mg CO₂ und 0,962 mg H₂O

C ₅ H ₄ O ₃	Ber. C 53,58	H 3,60 %
	Gef. C 53,73	H 3,69 %

L. Fumarsäure

Versuch 45: Isolierung

Das saure Hydrolysat eines Bariumsalzes (Kleie) mit 20 000 Pe/mg wurde mit Essigester extrahiert und der Extraktionsrückstand (58,8 mg) im Hochvakuum der Sublimation unterworfen. Neben einem Öl und Brenzschleimsäure sublimierte langsam Fumarsäure vom Schmelzpunkt Fp 287—191⁰. Ausbeute: 5 mg.

1,302 mg Substanz gaben 1,966 mg CO₂ und 0,401 mg H₂O

C ₄ H ₄ O ₄	Ber. C 41,38	H 3,47 %
	Gef. C 41,20	H 3,45 %

M. Succinyl-l-Leucin

Versuch 46: Isolierung

630 mg in Petroläther lösliche inaktive Vorfraktionen aus Penicillin-Methylester (Flachsichtkulturen) wurden nochmals an 30 g neutralisiertem Aluminiumoxyd (Aktivitätsklasse I—II) chromatographiert. Die Benzol-Eluate enthielten total 360 mg hellgelbes Öl, das im Vakuum bei 0,1 mm Hg grösstenteils zwischen 110—120⁰ destillierte. Das beste Präparat zeigte folgende Analysendaten:

3,730 mg Substanz gaben 7,881 mg CO₂ und 2,465 mg H₂O
3,097 mg Substanz gaben 0,174 ccm N₂ bei 24°/727 mm Hg
4,088 mg Substanz verbrauchten 5,362 ccm 0,02 n Na₂S₂O₃

C₁₁H₁₇O₄N Ber. C 58,13 H 7,49 N 6,16 OCH₃ 13,65 %
Gef. C 57,66 H 7,40 N 6,17 OCH₃ 13,56 %

Verseifung, milde: 7,501 mg Substanz wurden mit 1 ccm 0,1 n Barytlauge 1 Stunde auf 100° erhitzt und verbrauchten nachher 0,672 ccm 0,100 n Ba(OH)₂.

Äquivalentgewicht: Ber. 113,5
Gef. 111,8
entsprechend 1,97 Äquivalente/Mol.

Verseifung, energisch: 12,422 mg Substanz wurden mit 3 ccm 0,1 n Barytlauge 8 Stunden gekocht und verbrauchten 1,574 ccm 0,100 n Ba(OH)₂.

Äquivalentgewicht: Ber. 75,66
Gef. 79
entsprechend 2,87 Äquivalente/Mol.

Versuch 47: Hydrolytische Spaltung von Succinyl-1-leucin

30,5 mg Substanz wurden im Bombenrohr mit 1 ccm konz. HCl während 10 Stunden auf 110—120° erhitzt; die Hydrolysenlösung wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 1 ccm Wasser gelöst und dreimal mit Äther extrahiert. Durch Sublimation bei 130—140° (0,1 mm Hg) des Ätherrückstandes wurden total 13,9 mg Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 176—178° isoliert. Ausbeute: 88,5 %.

2,964 mg Substanz gaben 4,440 mg CO₂ und 1,429 mg H₂O

C₄H₆O₄ Ber. C 40,68 H 5,12 %
Gef. C 40,88 H 5,39 %

Zur wässrigen Lösung wurden 0,36 ccm 1 n NaOH und 20 mg fein zerriebenes 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in kleinen Portionen und unter heftigem Schütteln zugegeben (Saunders [30]). Beim Versetzen der tiefroten Lösung mit 50proz. Essigsäure fielen zuerst ölige Klümpchen und nachher Kristalle aus, total 28 mg.

Ausbeute 66 %. Nach mehrmaliger Umkristallisation aus Wasser-Äthanol zeigte das Produkt den Schmelzpunkt Fp 184,5—185,5⁰ und stimmte mit einem synthetischen 1,Leucin-3,5-dinitrobenzoat Fp 184,5—185,5⁰ vollständig überein.

2,270 mg Substanz gaben 4,003 mg CO₂ und 0,958 mg H₂O

C₁₃H₁₅O₇N₃ Ber. C 48,00 H 4,65 %
Gef. C 48,13 H 4,72 %

Später konnte das Succinyl-l-leucin durch langsame Destillation im Hochvakuum kristallisiert erhalten werden, Fp 63⁰ (*K. Berse*).

Die spezifische Drehung des reinen Produkts wurde zu $[\alpha]_D^{20} = -39,2^0$ ($c = 1,820\%$ in CHCl₃) bestimmt.

N. Bernsteinsäure

Versuch 48: Isolierung

158 mg inaktive Penicillin-Methylester-Vorfraktionen aus einem Chromatogramm mit Penicillinester aus Kleiekulturen wurden nochmals an 3,5 g neutralisiertem Aluminiumoxyd aufgetrennt. Zwei Benzolfractionen (8,8 mg), die kristallisierten Fumarsäuredimethylester enthielten (nach Sublimation Fp 101,5⁰) wurden verseift und sublimiert. Die Substanz wurde durch die Sublimation in zwei Fraktionen aufgetrennt, von denen die erste, leicht sublimierbare (1 mg) Bernsteinsäure Fp 176—180⁰ und die zweite Fumarsäure Fp 290—293⁰ war (6,1 mg). (Analysen: siehe Versuche 45 und 47.)

O. Glutarsäure

Versuch 49: Isolierung

Die erste Benzolfraction des oben erwähnten Chromatogramms (Versuch 48) mit Kleiematerial, total 17,2 mg, wurde mit 0,2 n Barytlauge verseift.

Äquivalentgewicht: Ber. 66
Gef. 76

Im Ätherrückstand befanden sich 12,7 mg (78%) Kristalle, die, aus Äther-Petroläther umkristallisiert, den Schmelzpunkt Fp 96—97° besaßen und mit Glutarsäure keine Schmelzpunktsdepression zeigten.

3,708 mg Substanz gaben 6,176 mg CO₂ und 2,039 mg H₂O

C₅H₈O₄ Ber. C 45,45 H 6,10 %
Gef. C 45,45 H 6,16 %

P. l-Methylbernsteinsäure

Versuch 50: Isolierung

Die Verseifung einer Petrolätherfraktion (34,8 mg), die aus dem gleichen zweiten Chromatogramm von Vorfraktionen aus Penicillinmethylester-Kleiematerial stammte (vgl. Versuche 48 und 49), lieferte bei der Verseifung 22 mg Säuregemisch.

Äquivalentgewicht (aus alkalischer Verseifung des Esters):

C₅H₈O₄ Ber. 66
Gef. 70

Bei der Sublimation konnte leicht Brenzschleimsäure abgetrennt werden (12 mg); der Rest des Sublimates (8 mg) war in allen Lösungsmitteln ausser Petroläther leicht löslich und konnte nicht umkristallisiert werden. Nach einer erneuten Sublimation besaß die Säure den Schmelzpunkt Fp 109,5—110° und gab mit Glutarsäure eine starke (60°) Schmelzpunktsdepression, obgleich die Analysendaten auf eine gleiche Bruttoformel stimmten.

3,690 mg Substanz gaben 6,065 mg CO₂ und 2,005 mg H₂O

C₅H₈O₄ Ber. C 45,45 H 6,10 %
Gef. C 45,85 H 6,08 %

Mit racemischer Brenzweinsäure zeigte die Substanz keine merkliche Depression:

Substanz	Fp 109,5—110°
Brenzweinsäure	Fp 109,0—110°
Mischschmelzpunkt	109,0—109,5°

Optische Drehung:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{14} = -7\frac{1}{2}^{\circ} \text{ (c = 0,052\% in H}_2\text{O)}$$

Die Analysen wurden in der mikroanalytischen Abteilung des organisch-chemischen Laboratoriums an der E. T. H. von Herrn *W. Manser* ausgeführt.

Literaturverzeichnis

1. *Abraham E. P., Chain E.*, Nature **146**, 837 (1940).
2. *Abraham E. P., Chain E., Fletcher C. M., Gardner A. D., Heatley N. G., Jennings M. A., Florey H. W.*, Lancet **241**, 177 (1941).
3. *Abraham E. P.*, Nature **148**, 758 (1941); Lancet **241**, 761 (1941).
4. *Abraham E. P., Chain E.*, Nature **149**, 328 (1942).
5. *Abraham E. P., Baker W., Florey H. W., Holiday E. R., Robinson R.*, Nature **149**, 356 (1942).
6. *Abraham E. P., Chain E., Holiday E. R.*, Brit. J. Exptl. Path. **23**, 103 (1942).
7. *Abraham E. P., Chain E., Baker W., Robinson R.*, Nature **151**, 107 (1943).
8. *Birkinshaw J. H., Raistrick H., Smith G.*, Biochem. J. (Cambridge) **36**, 829 (1942).
9. *Brockmann H., Schodder H.*, B. **74**, 73 (1941).
10. *Catch, J. R., Cook A. H., Heilbron I. M.*, Nature **150**, 633 (1942).
11. *Chain E.*, Nature **148**, 758 (1941).
12. *Clutterbuck P. W., Lovell R., Raistrick H.*, Biochem. J. (Cambridge) **26**, 1907 (1932).
13. *Coghill R.*, Chem. a. Engin. News (A. C. S.) **22**, 588 (1944).
14. *Consdon R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Rosenheim O.*, Biochem. J. (Cambridge) **38**, 244 (1944); Biochem. J. (Cambridge) **39**, 251 (1945).
15. *Cook A. H.*, Biochem. J. (Cambridge) XXIII Dec. (1942).
16. *Duffin W. M., Smith S.*, Nature **151**, 251 (1943).
17. *Ettlinger, L.*, Ber. d. Schweiz. bot. Ges. **56**, 681 (1946).
18. *Gordon A. H., Martin A. J. P., Synge R. L. M.*, Biochem. J. (Cambridge) **35**, 1358 (1941); Biochem. J. (Cambridge) **36**, 79, 313 (1943).
19. *Hobby G. L., Meyer K., Chaffee E.*, Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med. **50**, 277 (1942).
20. *Kögl F.*, Zts. f. physiol. Ch. (*Hoppe-Seyler*) **269**, 81 (1941).
21. *Lawrence C. A.*, Science **99**, 15 (1944).
22. *Lugg J. W. H.*, Biochem. J. (Cambridge) **26**, 2144 (1932).
23. *Lugg J. W. H.*, Biochem. J. (Cambridge) **27**, 688 (1933).
24. *Meyer K., Chaffee E., Hobby G. L., Dawson M. H., Schwenk E., Fleischer G.*, Science **96**, 21 (1942).
25. *Meyer K., Hobby G. L., Chaffee E.*, Science **97**, 205 (1943).

26. *Plattner Pl. A.*, Inauguraldissertation, Universität Bern, 1929.
27. *Plattner Pl. A.*, *Experientia* **1**, 176 (1945).
28. *Ratner S.*, *Clarke H. T.*, *Am. Soc.* **59**, 200 (1937).
29. Redaktionell, *Nature* **156**, 766 (1945).
30. *Saunders B. C.*, *Biochem. J. (Cambridge)* **28**, 580 (1944).
31. *Schramm G.*, *Primosigh J.*, *B.* **76**, 373 (1943); *B.* **77**, 417 (1944).
32. *Schwab G. M.*, *Jockers K.*, *Zts. f. angew. Chemie* **50**, 546 (1937).
33. *Schwab G. M.*, *Dattler G.*, *Zts. f. angew. Chemie* **50**, 691 (1937); *Zts. f. angew. Chemie* **51**, 709 (1938).
34. *Veldee M. V.*, *Herwick R. P.*, *Coghill R.*, *Science* **101**, 42 (1945).
35. *Wieland Th.*, *B.* **75**, 1001 (1942); *Zts. f. angew. Chemie* **56**, 213 (1943); *Zts. f. physiol. Chemie (Hoppe-Seyler)* **273**, 24 (1945).
36. *Wieland Th.*, *Fremery H.*, *B.* **77**, 234 (1944).
37. *Winkle, van, W.*, *Herwick R. P.*, *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific Ed.)* **34**, 97 (1945).
38. *Winterstein A.*, *Handbuch der Pflanzenanalyse*, III. Teil, Abschnitt **35**, S. 90.

Lebenslauf

Am 3. April 1920 wurde ich in Zurzach (Aargau) geboren. Ich besuchte die Gemeindeschule und die Bezirksschule in Zurzach sowie die Schulen am Landerziehungsheim Kefikon (Thurgau) und am Institut Briner in Flims (Graubünden). Es folgte die Ausbildung an der Kantonsschule Aarau, die ich im Herbst 1939 mit der Eidgenössischen Maturität, Typus C, abschloss. Anschliessend immatrikulierte ich mich an der Abteilung für Naturwissenschaften an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Im Herbst 1943 schloss ich das Studium mit dem Diplom als Naturwissenschaftler ab. Von November 1943 bis April 1946 beschäftigte ich mich mit der vorliegenden Promotionsarbeit am Organisch-chemischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich.