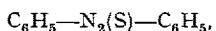


On the Sulphur Analogue of Azoxy-Benzene: Azo-Thio-Benzene

In continuation of previous work on organic sulphur compounds¹, we treated thionyl-aniline, C_6H_5NSO , first prepared by MICHAELIS and HERZ² from thionyl-chloride and aniline, with sodium in boiling toluene and obtained a reddish oil which can be purified by careful distillation *in vacuo*. Elementar analysis and molecular weight determination (cryoscopy in benzene) gave results in accordance with the formula $C_{12}H_{10}N_2S$ (calculated: C 67.29%; H 4.67%; N 13.09%; S 14.96%; found: C 67.14%; H 4.75%; N 13.14%; S 15.04%; molecular weight, calculated: 214.27; found: 202.64). By heating with powdered zinc the substance is desulphurated to azo-benzene. These facts together with deep colour of the product, are in favour of a structure corresponding to azo-thio-benzene



the sulphur analogue of azoxy-benzene.

From *p*-chloro- and *p*-bromo-aniline, following the same procedure, dichloro- and dibromo-azo-thio-benzene have been obtained.

The UV-absorption spectra, in *n*-hexane solution (concentration 10^{-2} g/l) of azo-thio-benzene and of its bromo-derivative shows a maximum at 410 resp. 425 m μ ($lg \epsilon$ 3.99 resp. 4.18).

Details of preparation and experiments in progress will be published elsewhere.

G. LEANDRI and P. REBORA

Institute of Industrial Chemistry, University of Bologna (Italy), September 24th, 1956.

Riassunto

Trattando la tionalanilina con sodio, in toluolo bollente, si ottiene l'azo-thio-benzolo, l'analogo solforato dell'azossi-benzolo.

Con lo stesso procedimento, dalla *p*-bromo- e dalla *p*-clorotionalanilina, è stato preparato il *p*-*p*'-dibromoed il *p*-*p*'-dicloro-azo-thio-benzolo.

Sono stati registrati gli spettri UV dell'azo-thio-benzolo e del *p*-*p*'-dibromo-derivato.

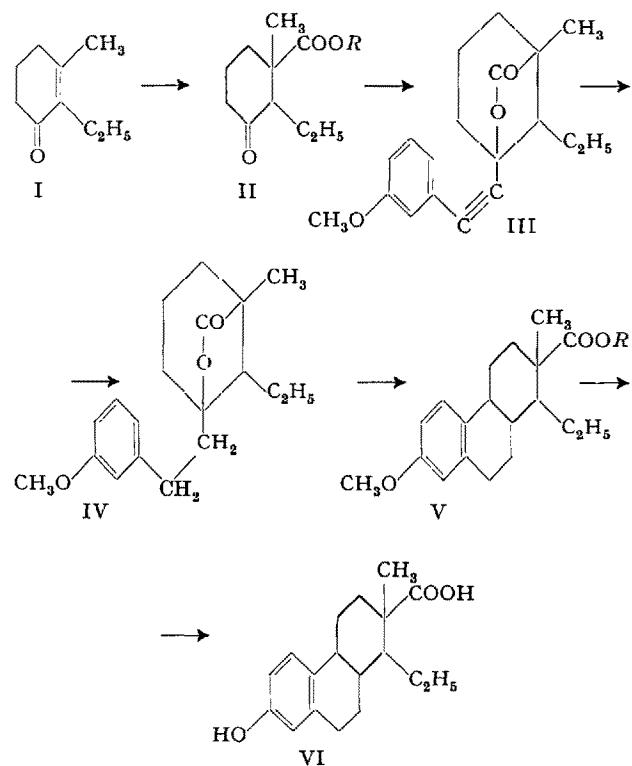
¹ G. LEANDRI *et al.*, see e.g. notes I–XVI, Ann. Chim. 44 (1954) and 45 (1955).

² A. MICHAELIS and R. HERZ, Ber. dtsch. chem. Ges. 23, 3480 (1890).

Neue Totalsynthese einer razemischen Doisynolsäure¹

Durch die hervorragenden Arbeiten von MIESCHER *et al.*² wurde die Doisynolsäure, die erstmals von DOISY *et al.*³ aus Östron dargestellt worden war, als 1-Äthyl-2-methyl-7-hydroxy-1,2,3,4,9,10,11,12-octahydrophenanthren-2-carbonsäure (VI) identifiziert. Von den acht möglichen Stereoisomeren Razematen stellten ANNER und MIESCHER⁴ auf totalsynthetischem Wege deren fünf in Form der Methyläther dar, indem sie als Ausgangsstoffe die drei kristallisierten Ketoester verwendeten, die aus dem Bachmannschen öligen Ketoester⁵ erhalten werden konnten; zwei dieser Razemate erhielten sie auch durch Reduktion des α -Monodehydro-doisynolsäuremethylesters mittels Natrium und Ammoniak und nachfolgende Verseifung. HUNTER und HOGG⁶ reduzierten die synthetische Monodehydro-doisynolsäure mit katalytisch angeregtem Wasserstoff und gewannen hierbei ebenfalls zwei razemische 7-Methyldoisynolsäuren (V, $R = H$), deren eine mit keinem der fünf Razemate von ANNER und MIESCHER⁴ identisch zu sein scheint.

und MIESCHER⁴ auf totalsynthetischem Wege deren fünf in Form der Methyläther dar, indem sie als Ausgangsstoffe die drei kristallisierten Ketoester verwendeten, die aus dem Bachmannschen öligen Ketoester⁵ erhalten werden konnten; zwei dieser Razemate erhielten sie auch durch Reduktion des α -Monodehydro-doisynolsäuremethylesters mittels Natrium und Ammoniak und nachfolgende Verseifung. HUNTER und HOGG⁶ reduzierten die synthetische Monodehydro-doisynolsäure mit katalytisch angeregtem Wasserstoff und gewannen hierbei ebenfalls zwei razemische 7-Methyldoisynolsäuren (V, $R = H$), deren eine mit keinem der fünf Razemate von ANNER und MIESCHER⁴ identisch zu sein scheint.



Im Hinblick auf die hohe östrogene Wirksamkeit einiger Stereoisomeren der 7-Methyldoisynolsäure waren wir bemüht, eine geeignete Synthese dieser Verbindungen zu finden, die die Darstellung einer zur eingehenderen pharmakologischen, eventuell auch klinischen Prüfung nötigen Substanzmenge gestatten würde. Wir gelangten hierbei durch ein neues, im Schema angedeutetes Verfahren zu einem kristallinen Razemat der erwähnten Säure (V, $R = H$) und von diesem zu einer neuen Doisynolsäure (VI).

Ausgehend von 2-Äthyl-3-methyl-2-cyclohexen-1-on (I), das durch Äthylierung und Hydrolyse von Hagemanns Ester zugänglich ist⁷, erhielten wir durch Anlagerung von Cyanwasserstoff und nachfolgende Hydrolyse die kristalline 2-Äthyl-3-methylcyclohexanon-3-carbonsäure (II, $R = H$) vom Schmelzpunkt 137–138°. Der durch Umsetzung mit Diazomethan oder mit

⁴ G. ANNER und K. MIESCHER, Helv. chim. Acta 30, 1422 (1947).

⁵ W. E. BACHMANN, S. KUSHNER und A. C. STEVENSON, J. Amer. chem. Soc. 64, 974 (1942).

⁶ J. H. HUNTER und J. A. HOGG, J. Amer. chem. Soc. 68, 1676 (1946); 71, 1922 (1949).

⁷ L. I. SMITH und G. F. ROUAULT, J. Amer. chem. Soc. 65, 631 (1943).

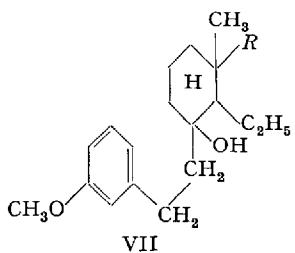
¹ XIII. Mitteilung *Synthetische Versuche in der Gruppe der östrogenen Hormone*; XII. Mitteilung siehe Chem. listy 50, 2004 (1956).

² K. MIESCHER, Helv. chim. Acta 27, 1727 (1944); Chem. Rev. 43, 367 (1948).

³ D. W. MAC CORQUODALE, S. A. THAYER und E. A. DOISY, J. biol. Chem. 99, 327 (1933); 101, 753 (1933); U.S. Patent 2,069,096 (1933).

methylalkoholischer Chlorwasserstofflösung erhaltene Methylester (II, $R = \text{CH}_3$; Siedepunkt, 92–93°; Semicarbazon, Schmelzpunkt 210–212°; 2,4-Dinitrophenylhydrazone, Smp. 138°) wurde mit Kalium-*m*-methoxyphenylazetylid⁸ in tertiärem Butylalkohol umgesetzt. Hierbei entstand in guter Ausbeute das Azetylenderivat vom Sdp._{0,2} 195–200°, der Bruttoformel $C_{19}H_{22}O_3$ (offensichtlich III), das bei der Hydrierung an Palladium quantitativ 2 Mol Wasserstoff aufnahm und in eine Verbindung der Bruttoformel $C_{19}H_{26}O_3$ überging; beim Kristallisieren aus Petroläther wurden 40% eines kristallinen Anteiles vom Schmelzpunkt 70° gewonnen. Die Verbindung entspricht auf Grund ihrer Summenformel, des Ergebnisses der Methoxylbestimmung, der Laktontitration und schliesslich auch ihres infraroten Spektrums⁹ dem Lakton der 1-(2-*m*-Methoxyphenyl-äthyl)-2-äthyl-3-methylcyclohexanol-3-carbonsäure (IV).

Zur weiteren Charakterisierung dieser Verbindung zogen wir die alkalische Hydrolyse heran, bei der wir eine kristalline Hydroxysäure (VII, $R = \text{COOH}$) vom Schmelzpunkt 106° erhielten, die sehr unbeständig war und beim Erwärmen leicht in das Ausgangslacton überging. Zum gleichen Zweck diente auch die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid, wobei ein um 4 Wasserstoffatome reicherer kristalliner Stoff vom Schmelzpunkt 87° entstand, offenbar das Diol VII ($R = \text{CH}_2\text{OH}$).



Das Lakton IV wurde mittels Chlorwasserstoff und Aluminiumchlorid in siedendem Benzol zyklisiert. Als Reaktionsprodukt isolierten wir in guter Ausbeute eine amorphe, teilweise demethylierte Carbonsäure. Sie wurde deshalb mit Dimethylsulfat in alkalischer Lösung methyliert und hierauf mit Diazomethan esterifiziert. Der entstandene Methylester wurde chromatographisch gereinigt und destilliert (Sdp._{0,08} 190°); seine Bruttoformel war $C_{20}H_{28}O_3$ und entsprach dem erwarteten 7-Methyl-doisynolsäure-methylester (V, $R = \text{CH}_3$). Die durch alkalische Verseifung erhaltene amorphe Säure (Smp. 50–60°) wies im Test nach BÜLBRING und BURN an infantilen kastrierten Rattenweibchen eine dem Östradiolbenzoat ungefähr gleiche östrogene Wirksamkeit auf¹⁰.

Diese amorphe Säure ist in warmer Natriumcarbonatlösung löslich und scheidet sich beim Abkühlen der Lösung zum Teil in Form eines kristallinen Natriumsalzes aus. Beim Ansäuren der Lösung dieses Salzes erhielten wir die kristalline Monocarbonsäure $C_{19}H_{26}O_3$ (V, $R = \text{H}$), die sich aus Methanol kristallisiert lässt und bei 189–191° schmilzt. Dieser Schmelzpunkt stimmt

⁸ W. S. JOHNSON, D. K. BANNERJEE, W. P. SCHNEIDER, C. D. GUTSCHE, W. E. SHELBERG und L. J. CHINN, J. Amer. chem. Soc. 74, 2832 (1952). – O. EXNER, V. ŠIMÁK, J. O. JÍLEK und M. PROTIVA, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 19, 330 (1954).

⁹ Das Spektrum wurde von Herrn Dr. E. KNOBLOCH in der physikalisch-chemischen Abteilung unseres Institutes aufgenommen.

¹⁰ Die östrogene Wirksamkeit wurde von Herrn Dr. V. JELÍNEK in der physiologischen Abteilung unseres Institutes bestimmt.

mit den Angaben von ANNER und MIESCHER⁴ für die hochwirksamen Stereoisomeren der 7-Methyl-doisynolsäure $A\alpha$ (Smp. 187–188°) und $C\beta$ (Smp. 189–191°) überein und nähert sich ihrer Angabe für das Stereoisomere $C\alpha$ (Smp. 179–181°). Ein direkter Vergleich unserer Substanz mit den erwähnten Stereoisomeren $A\alpha$, $C\alpha$ und $C\beta$, der durch die außerordentliche Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. G. ANNER in den Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft in Basel erfolgte, deutet darauf hin, dass unser Produkt höchstwahrscheinlich mit dem Stereoisomeren $C\alpha$ der Konfiguration *cis-anti-cis* identisch ist. Die infraroten Spektren beider Substanzen sind identisch und der Mischschmelzpunkt beider Proben, deren Schmelzpunkte etwas unterschiedlich sind, zeigte nur eine ganz geringe Depression. Hingegen weisen die Mischschmelzpunkte mit den Stereoisomeren $A\alpha$ und $C\beta$ beträchtliche Depressionen auf, und auch in den infraroten Spektren sind sichtliche Unterschiede. Die wiederum mittels des gleichen Testes¹⁰ bestimmte östrogene Wirksamkeit unserer kristallinen Säure ist dieselbe wie die der amorphen Probe, das heisst, sie kommt der Wirksamkeit des Östradiolbenzoats gleich.

Durch Demethylierung unserer Substanz mit Pyridinhydrochlorid erhielten wir eine neue Doisynolsäure (VI) vom Schmelzpunkt 113–117° (Methanol), deren Analyse der Zusammensetzung $C_{18}H_{24}O_3 \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$ entspricht.

M. PROTIVA, J. O. JÍLEK,
E. ADLEROVÁ und L. NOVÁK

Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie in Prag, den 1. Oktober 1956.

Summary

A new synthesis is described of a crystalline 7-methyl-doisynolic acid showing a strong estrogenic activity. This acid is probably identical with the stereoisomer $C\alpha$ of ANNER and MIESCHER. Demethylation of this methoxy-acid yields a new doisynolic acid of mp. 113–117° (hemihydrate).

Die Wasserbestimmung in Zellmaterial von *Saccharomyces cerevisiae* nach KARL FISCHER

Im Verlaufe unserer Versuche mit Kulturweinhefen suchten wir nach Bestimmungsmethoden für Nass- und Trockengewicht, welche auch beim Vorliegen von kleinen Mengen Zellmaterial hinreichend genaue Resultate ergeben. Die Reproduzierbarkeit des Wassergehaltes von «Nasshefe» durch standardisierte Zentrifugation ist bei Hefemengen unter 1 g besonders gering¹, und die Genauigkeit der üblichen Trockensubstanzbestimmung lässt rasch nach, wenn die dabei verwendeten Glasfiltertiegel mehrmals im Gebrauch waren (vgl. auch WHITE¹, S. 138). Da für unsere Zwecke die Wasserbestimmung nach KARL FISCHER mehrere Vorteile aufweist (kleinere Probemengen, rasche Ermittlung der Resultate, Eignung für Routineanalysen), haben wir versucht, dieses Verfahren auch an feuchtem Zellmaterial von Kulturhefen durchzuführen.

Die Ermittlung des «Nassgewichtes»

Die Hefezellen wurden durch ein Bakterienfilter Co 5 (Membranfilter, Göttingen) aus der Nährlösung abfiltriert und mit 2 × 20 ml Wasser auf dem gleichen Filter

¹ J. WHITE, Yeast Technology (London 1954), S. 143.