

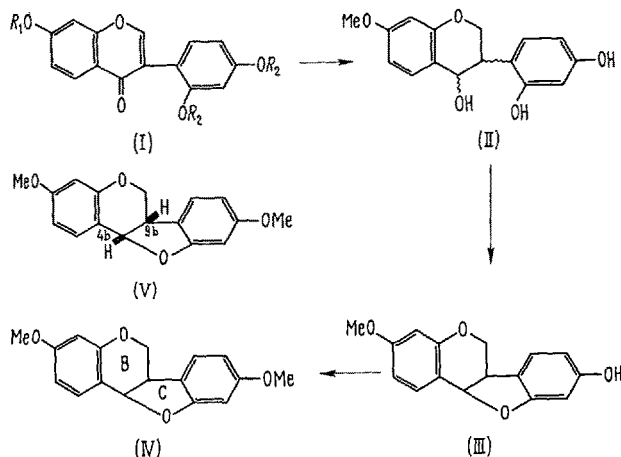
Zusammenfassung. Aus *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. var. *Buergeri* (Maxim.) C. K. Schneid wurde ausser dem bekannten Sophorol ein Phenol $C_{16}H_{12}O_5$ isoliert. Auf Grund spektroskopischer Untersuchungen und dem Vergleich mit einem synthetisch hergestellten Derivat (III; $R=CH_3$) wird dem Maackiain die Struktur (I; $R=H$) eines Chromanocumarans zugeschrieben.

Sauerstoff-Heteroringe¹. Die Konfiguration und Synthese des *d,l*-Homopterocarpins

Homopterocarpin, ein farbloser Inhaltsstoff des roten Sandelholzes sowie anderer Pterocarpus-Spezies², wurde bereits im Jahre 1874 von CAZENEUVE³ isoliert. Im Jahre 1940 ist die Struktur dieser Verbindung von ROBERTSON et al.⁴ sowie von SPÄTH und SCHLÄGER⁵ im Sinne der Formel IV aufgeklärt worden.

An dieser Stelle soll über den Konstitutionsbeweis dieses Naturstoffes durch die Synthese berichtet werden. Wir synthetisierten *d,l*-Homopterocarpin auf dem von uns früher⁶ mitgeteilten Wege.

Die Entalkylierung des 2',4',7-Trimethoxyisoflavons (I) $R_1 = R_2 = Me$ ^{4,5,7} mit Aluminiumchlorid in Benzol⁸ unter Rückfluss ergab das entsprechende Trihydroxyisoflavon (II) $R_1 = R_2 = H$ vom Smp. 272° (Zers.) (Acetyl-derivat Smp. 148–150°) in guter Ausbeute.



Bei der selektiven Methylierung des letzteren mit Methyljodid in Aceton in Gegenwart von Kaliumcarbonat bei Zimmertemperatur entstand 2',4'-Dihydroxy-7-methoxyisoflavon (I) $R_1 = CH_3$, $R_2 = H$ (Smp. 207–208°) in 73%iger Ausbeute.

Dieses partiell methylierte Isoflavon gab bei der Reduktion mit $NaBH_4$ ^{6,9} in Dioxan nur in schlechter Ausbeute das Stereoisomerengemisch der entsprechenden Isoflavan-4-ole II.

Das rohe Stereoisomerengemisch liess sich durch 1stündiges Kochen in Essigsäure leicht in ein Gemisch von tetracyclischer Verbindung III und entsprechendem Isoflav-3-en überführen. Letzteres konnten wir nur durch ein UV-Maximum bei 327 m μ charakterisieren. Die Verbindung III wurde ohne weitere Reinigung durch Methylierung mit Methyljodid in Aceton in *d,l*-Homopterocarpin (IV) übergeführt.

Das so erhaltene *d,l*-Homopterocarpin (IV) schmolz bei 123–125°, während das natürliche, optisch aktive Homopterocarpin den Schmelzpunkt 87°^{4,10} aufweist. Die synthetische Verbindung ergab jedoch völlig gleiche IR-

H. SUGINOME¹⁷

Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo (Japan), November 30, 1961.

¹⁷ Present address: University Chemical Laboratory, Cambridge (England).

(Chloroform) und UV-Spektren (λ_{max} 285 m μ , ϵ : 9250) wie der Naturstoff.

Modellbetrachtungen¹¹ zeigen, dass die *trans*-Verknüpfung der beiden Ringe B und C des Homopterocarpins (IV), im Gegensatz zur *cis*-Verknüpfung, zu einer spannungsreichen Struktur führt.

Der glatte Ringschluss der Substanz II mit Säure scheint *cis*-Verknüpfung wahrscheinlich zu machen. Im 56,4 Mhz NMR-Spektrum¹² von IV¹³ werden die Resonanzen des Protons an C_{4b} als Dublett mit Zentrum bei 99,3 C/S und die Methoxylgruppen bei 196,0 C/S bei höherer Feldstärke als das Signal des Chloroforms beobachtet. Am Modell des Homopterocarpins (IV) mit *cis*-verbundenen B-C-Ringen ergeben sich für die Winkel zwischen den durch die Atome $H-C_{4b}-C_{9b}$ und $C_{4b}-C_{9b}-H$ bestimmten Ebenen Werte von ungefähr 0–10°, die nach CONROY¹⁴ $J = 7,7-8$ C/S ergeben würden. Die Kuppelungskonstante des Protons an C_{4b} , $J = 5,9$, weist auf *cis*-Stellung¹⁵ der Ringe B-C des Homopterocarpins (IV) hin. Alle oben erwähnten Resultate lassen sich am besten durch die Formel V interpretieren.

¹ V. Mitteilung. IV. Mitteilung siehe H. SUGINOME, Exper. 18, 161 (1962).

² P. L. SAWHNEY und T. R. SESHADRI, J. sci. industr. Res. 13B, 5 (1954), und darin angeführte Literaturreferenzen. – F. E. KING, C. B. COTTERILL, D. H. GODSON, L. JURD und T. J. KING, J. chem. Soc. 1953, 3693. – A. AKISANYA, C. W. L. BEVAN und J. HIRST, J. chem. Soc. 1959, 2679.

³ P. CAZENEUVE, Ber. dtsh. chem. Ges. 7, 1798 (1874).

⁴ A. MCGOOKIN, A. ROBERTSON und W. B. WHALLEY, J. chem. Soc. 1940, 787.

⁵ E. SPÄTH und J. SCHLÄGER, Ber. dtsh. chem. Ges. 73, 1 (1940).

⁶ H. SUGINOME und T. IWADARE, Bull. chem. Soc. Japan 33, 567 (1960).

⁷ H. SUGINOME, J. org. Chem. 24, 1655 (1959).

⁸ W. B. WHALLEY, J. chem. Soc. 1953, 3366.

⁹ M. MIYANO und M. MATSUI, Chem. Ber. 91, 2044 (1958).

¹⁰ Literatur⁵ gibt als Schmelzpunkt 87–88° an.

¹¹ Es wurden Dreiding-Modelle verwendet.

¹² J. A. POPE, W. G. SCHNEIDER und H. J. BERNSTEIN, High-resolution Nuclear Magnetic Resonance (McGraw Hill, New York 1959). – J. D. ROBERTS, Nuclear Magnetic Resonance, Application to Organic Chemistry (McGraw Hill, New York 1959). – L. M. JACKMAN, Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry (Pergamon Press, London 1957). Die Spektren wurden mit einem Variant-Spektrometer in Chloroform als Lösungsmittel durchgeführt.

Den Herren Drs. I. YAMAGUCHI und N. HAYAKAWA, die diese Messungen im japanischen Atomenergie-Forschungsinstitut durchführten, sei an dieser Stelle bestens gedankt.

¹³ Wir möchten vorschlagen, das Chromanocumaransystem⁶, das heisst 4bH, 9bH, 10H-(1)-Benzopyrano-(4,3-b)-(1)-benzofuran, wie (A) zu nummerieren und Substanzen, welche dasselbe Skelett haben, als «Pterocarpiinoide» zu bezeichnen.

¹⁴ H. CONROY, Advances in Organic Chemistry (Interscience Publ., New York 1960), vol. 2, p. 310.

¹⁵ Aus den Rotationsdispersionskurven von Homopterocarpin, Pterocarpin⁴ und Maackiain¹ ergibt sich, dass diese Naturstoffe dieselbe Konfiguration haben. H. SUGINOME, unveröffentlichte Beobachtung.

Befriedigende analytische Resultate wurden für alle erwähnten synthetischen Verbindungen erhalten¹⁶.

¹⁶ Wir danken den Herren Professoren T. IRIE, T. MATSUMOTO und T. MASAMUNE an dieser Universität für ihre Ermütigung zur Durchführung dieser Arbeit.

Ebenso danken wir den Herren Drs. F. E. KING und J. W. W. MORGAN für die Überlassung des Homopterocarpins.

Ein Teil der Kosten für diese Untersuchungen wurde durch das Unterrichtsministerium für wissenschaftliche Forschung gedeckt. Für diese Beihilfe möchten wir an dieser Stelle ebenfalls unseren ergebensten Dank aussprechen.

¹⁷ Present address: University Chemical Laboratory, Cambridge (England).

Summary. The racemic form of homopterocarpin (V), a constituent of red sandal-wood, has been synthesized by a method which has previously been proposed by the authors. N.M.R. spectral studies in conjunction with the examination of models have enabled the assignment of the *cis* configuration (V) to homopterocarpin.

H. SUGINOME¹⁷ und T. IWADARE

Chemische Abteilung der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hokkaido, Sapporo (Japan), 30. November 1961.

Some Physicochemical Properties of Anticatalase

TRIA¹ reported that after injection of catalase to rabbits and consecutive test tube precipitation of the formed anticatalase from the rabbit serum by the antigen, the catalase could be denatured by a shift in pH, the denatured catalase could then be centrifuged off and the purified anticatalase would remain in the supernate. The following study was undertaken to gain more information about the chemical nature of this anticatalase.

A 0.4% lyophilized catalase (Worthington Biochemical Corp.) solution in physiological saline is administered to rabbits as follows: during the first week 0.5 ml each for four days, during the second 1.0 ml, the third 1.5 ml and the fourth 2.0 ml (also for four days). Injections after a three day interval are given subcutaneously, all others intravenously into the ear vein. 4–7 days after the last injection the rabbits are bled from the heart under nembutal anesthesia. 50 mg of crystalline catalase in suspension (Sigma Chemical Co.) are added to 100 ml of antiserum and the solution is allowed to stand at room temperature for 6–8 h. Next, it is kept for 4–7 days at approximately 3°C. The resulting precipitate is collected by centrifugation in the cold and stored while the supernate is treated again as described above by addition of catalase to a final concentration of 0.5 mg/ml etc. The combined precipitates are washed three times with equal volumes of cold physiological saline, suspended in 1.5 ml of distilled water (if 100 ml antiserum were used) and 1.5 ml 0.1N HCl is added. The suspension is allowed to stand 5 min in the cold. 0.5 ml of 0.1M phosphate buffer (pH 5.7) is added, followed by 1.5 ml of cold 0.1N NaOH. The precipitate formed is removed by centrifugation and the supernate containing the anticatalase is dialysed for 18 h against 0.1M phosphate buffer of pH 5.7. Yield: approximately 50 mg.

For the amino endgroup analysis the fluorodinitrobenzene method was used². 60 mg of DNP protein were hydrolysed in a sealed tube with 10 ml of 5.7N HCl at 110°C for 16 h. The hydrolysate was extracted with ether and passed through a silicic acid column. The fraction that eluted with the 17% butanol-chloroform mixture was chromatographed in toluene-chloroethanolpyridine-aqueous ammonia solvent followed by 1.5M phosphate buffer (pH 6.0) in the second dimension. Agar plate precipitin tests were performed according to the method of WILSON and PRINGLE³. In the experiments on amino acid composition 10 mg of the dried protein were hydrolysed with 2 ml 5.7N HCl for 22 h at 110°C. The resulting hydrolysate was evacuated to dryness *in vacuo* over NaOH pellets, dissolved in sodium citrate buffer pH 2.2 and analysed in

the Spinco Amino Acid Analyser⁴. Protein concentrations were determined spectrophotometrically after the $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (280 mμ, pH 5.7 0.1N phosphate buffer) was found to be 15.2 when spectral absorption and Kjeldahl nitrogen data were correlated and a nitrogen content of 16% was assumed. Sedimentation studies on the dialysed material were performed on a Spinco Model E ultracentrifuge at an average temperature of 25°C and a speed of 59780 rpm. Pictures were taken at 16 min intervals. For the molecular weight determinations the ultracentrifuge was run at 8225 rpm. The synthetic boundary cell was used for the approach to equilibrium experiment as well as the area measurement. Data for the meniscus only were utilized.

CHARLWOOD⁵ reported a S_{20w} value of 6.50 for rabbit γ-globulin (in phosphate buffer, r/2 0.2 pH 6.8). Concentration-dependence was small (not more than 3–4% for a change in protein concentration of 1% w/v). Our S_{20w} value of 6.93 for anticatalase is derived by correcting S for viscosity and density of the solvent and extrapolating to zero concentration. Using Archibald's procedure at 8210 rpm and assuming a partial specific volume of 0.735, CHARLWOOD obtained a molecular weight of 187600. Anticatalase exhibits a molecular weight of 177600. The Figure depicts ultracentrifuge sedimentation runs of catalase and anticatalase separately and combined. The shoulder indicating an impurity on the left of catalase peak becomes more apparent within the catalase-anticatalase reaction. Some catalase and some anticatalase have remained unreacted, probably because this anticatalase fraction lost activity during isolation. The question arises as to why the catalase-anticatalase peak appears so small although approximately 60% of the anticatalase material and 60% of the catalase has reacted. DEUTSCH and SEABRA⁶ reported that the solubility of the catalase-anticatalase complex is much lower than that for other antigen-antibody complexes and we observed a slight turbidity in our reaction mixture probably due to undissolved precipitin. In order to rule out the possibility that the 'unreacting anticatalase' might represent another type of antibody carried as an impurity in the isolation, an

¹ E. TRIA, J. biol. Chem. 129, 377 (1939).

² H. FRAENKEL-CONRAT, J. J. HARRIS, and A. LEVY, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analyses* (Intersciences Publishers, Inc., New York), vol. 2, p. 359.

³ M. W. WILSON and B. H. PRINGLE, J. Immunol. 73, 232 (1954).

⁴ S. MOORE, D. R. SPACKMAN, and W. H. STEIN, *Analyt. Chem.* 30, 1185 (1958).

⁵ P. A. CHARLWOOD, *Biochem. J.* 73, 126 (1959).

⁶ H. F. DEUTSCH and A. SEABRA, J. biol. Chem. 214, 455 (1955).