

2. Wir haben 430 g durch Züchtung in Glucose-haltiger Nährlösung gewonnenes Mycel erschöpfend extrahiert und etwa 20% Lipide erhalten, die 10% Phosphatide und 5,3% Unverseifbares enthielten.

3. Letzteres erwies sich grösstenteils als Ergosterin und war von Farbstoffen, wahrscheinlich α - und β -Carotin und Lycopin, begleitet.

4. Die gesättigten Fettsäuren bestanden in der Hauptsache aus Palmitinsäure, daneben wurden Stearinsäure, Behensäure, Tricosan-carbonsäure (Lignocerinsäure) und Pentacosan-carbonsäure (Cerotinsäure) gefunden.

5. Von den ungesättigten Säuren waren, ausser der hauptsächlich vertretenen Ölsäure, Linolsäure und in kleinen Mengen die γ -Linolensäure oder $\Delta^{6:7, 9:10, 12:13}$ -Octadecatriensäure vorhanden. Diese wurde bis anhin lediglich im Samenfett von *Oenothera biennis* nachgewiesen.

6. Wir haben erstmalig eine einfach ungesättigte Fettsäure mit 24 C-Atomen, der die Struktur einer $\Delta^{17:18}$ -Tricosen-carbonsäure zukommen dürfte, aufgefunden.

7. Ferner konnte die Gegenwart einer nicht aufgeklärten, einfach ungesättigten Fettsäure mit 26 C-Atomen (Pentacosen-carbonsäure) erwiesen werden.

Der „Astra“ Fett- und Ölwerke AG. in Steffisburg sind wir für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

136. Zur Kenntnis der p-Amino-salicylsäure und strukturähnlicher Verbindungen

von H. Erlenmeyer, B. Prijs, E. Sorkin und E. Suter.

(8. IV. 48.)

Von den tuberkulostatisch wirksamen Verbindungen, über die in den letzten Jahren in der Literatur berichtet wurde, besitzt die p-Amino-salicylsäure (2-Oxy-4-aminobenzoesäure) besonderes Interesse. J. Lehmann¹⁾ hat als erster in seiner bedeutsamen Untersuchung auf die biologischen Wirkungen dieser Verbindung aufmerksam gemacht. Aus seinen Ergebnissen lassen sich die folgenden, besonders auffälligen Eigenschaften der p-Amino-salicylsäure ableiten:

1. Hohe tuberkulostatische Wirkung in vitro.

2. Spezifität dieser Wirkung, indem andere Vertreter der säurefesten Bakterien nicht gehemmt werden.

¹⁾ J. Lehmann, Lancet **250**, 14, 15 (1946); Svenska Läkartidn. **43**, 2029 (1946).

3. Wirkung auf die durch abgetötete Tuberkelbazillen im Meer-schweinchen ausgelösten toxischen Erscheinungen.

4. Chemotherapeutische Wirkung in klinischen Versuchen.

Eine Reihe von weiteren Mitteilungen verschiedener Autoren¹⁾ haben chemische, bakteriologische und auch klinische Untersuchungen mit p-Amino-salicylsäure zum Gegenstand. Erwähnenswert ist insbesondere noch der Befund, dass die bakteriostatische Wirkung der p-Amino-salicylsäure durch p-Amino-benzoesäure je nach Konzentration der letzteren stark herabgesetzt wird²⁾.

Für die präparative Darstellung der p-Amino-salicylsäure werden hauptsächlich zwei Methoden angegeben: *W. Borsche*³⁾ gewinnt die entsprechende Nitrosalicylsäure aus 2,4-Dinitrophenylessigsäure über die 5-Nitro-benzisoxazol-2-carbonsäure, während *F. Ullmann* und *C. Wagner*⁴⁾ von o-Toluidin ausgehen und über 5 Stufen zur 4-Nitrosalicylsäure gelangen. Beide Verfahren müssen als umständliche Synthesen bezeichnet werden, wodurch, wie mehrere Autoren⁵⁾ bezeugen, die Gewinnung der Substanz in den erforderlichen Mengen bisher verhindert wurde. Neuerdings berichten *D. D. Martin*, *F. S. Spring*, *T. G. Dempsey*, *C. L. Goodacre* und *D. E. Seymour*⁶⁾ in einer kurzen Mitteilung über ein einfacheres Verfahren zur Darstellung der p-Aminosalicylsäure mit m-Aminophenol als Ausgangsmaterial. Die Autoren geben hierüber nur an: „We find that direct carboxylation of m-amino-phenol, using modified *Kolbe* conditions, gives p-amino-salicylic acid and not p-hydroxy-anthranilic acid.“

Wir werden durch diese Mitteilung veranlasst, eigene Untersuchungen, die wir in diesem Zusammenhang unternommen haben, und die uns in bezug auf die einfachere Darstellung der p-Amino-salicylsäure zum gleichen Ergebnis geführt haben, bekannt zu geben.

Im Laboratorium lässt sich nach unseren Versuchen die p-Amino-salicylsäure aus m-Aminophenol mit einer *Kolbe*'schen Synthese in einer Ausbeute von 80% der Theorie auf folgendem Weg gewinnen:

30 g m-Aminophenol wurden mit 150 g Kaliumhydrogencarbonat, 100 cm³ Wasser und 50 g festem CO₂ versetzt und in einem Autoklaven während 5–6 Stunden auf 85–90° geheizt, wobei der Druck auf 30 Atm. stieg. Nach dem Erkalten wurde von unverändertem m-Aminophenol (5 g) abfiltriert und die dunkle Lösung direkt unter Eiskühlung mit konzentrierter HCl gerade bis zur kongosauren Reaktion versetzt, wobei unter Aufhellung der Lösung die gewünschte p-Amino-salicylsäure ausfällt. Die Säure kann durch Lösen in Hydrogencarbonatlösung und Wiederausfällen mit HCl gereinigt werden. Smp. 149–151° unter CO₂-Abspaltung. Bei weiterer Zugabe von HCl erhält man noch eine grössere

¹⁾ *G. Valentin*, Svenska Läkartidn. **43**, 2047 (1946); *K. Alin*, *H. Difs*, Nordisk Medicine **1947**, 151; *G. P. Youmans*, Quart. Bull. North. Univ. Med. School Chicago **20**, 420 (1946); *G. P. Youmans*, *G. W. Raleigh*, *A. S. Youmans*, J. Bact. **54**, 409 (1947); *T. G. Dempsey*, *M. H. Logg*, Lancet **253**, 871 (1947); *J. A. Connor*, Lancet **254**, 191 (1948); *T. C. Whittet*, Lancet **254**, 268 (1948); *D. McAnally*, *D. E. Seymour*, Lancet **254**, 303 (1948).

²⁾ *G. P. Youmans*, *G. W. Raleigh*, *A. S. Youmans*, loc. cit.

³⁾ A. **390**, 1 (1912).

⁴⁾ A. **355**, 359 (1907), vgl. auch *H. Kondo*, *T. Nakajima*, *G. Murakawa*, J. pharmac. Soc. Japan **1922**, Nr. 483; C. **1922** III, 606; *P. Brenans*, *C. Prost*, C. r. **178**, 1010 (1924); C. **1924**, I, 2347.

⁵⁾ Vgl. Lancet **253**, 871 (1947): Owing to unavoidable manufacturing difficulties continuity of treatment in such dosage has not always been possible (80–140 g every week). — Lancet **254**, 191 (1948): The synthesis and isolation of the pure acid proved extremely difficult.

⁶⁾ Nature **161**, 435 (1948).

Menge der p-Amino-salicylsäure als Hydrochlorid vom Smp. 220—222°. Gesamtausbeute 80% der Theorie, berechnet auf umgesetztes m-Aminophenol.

Zur Identifizierung wurde die Säure durch Behandlung mit Benzoylchlorid in Pyridin in der Kälte in das Benzoylderivat übergeführt, dessen Schmelzpunkt bei 185—187° lag. Zum Vergleich wurde auf anderem Wege gewonnene p-Aminosalicylsäure ebenfalls in das Benzoyl-derivat übergeführt, welches sich auf Grund von Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt mit obigem Präparat als identisch erwies¹⁾.

Von biologischen Versuchen mit der p-Amino-salicylsäure seien hier nur in vitro-Versuche in Gegenwart von Serum, bzw. Tween 80 unter Angabe der noch eine totale Wachstumshemmung bewirkenden Konzentration (Grenzkonzentration) angeführt²⁾ (No. 1 der Tabelle).

Die Versuche zeigen, dass die tuberkulostatische Wirkung der p-Amino-salicylsäure in Gegenwart von Serum bzw. Tween 80 weitgehend erhalten bleibt³⁾. Im Gegensatz hierzu wird die tuberkulostatische Wirkung, die die p-Aminobenzoessäure in Konzentrationen von $4 \cdot 10^{-4}$ zeigt, durch Serum aufgehoben⁴⁾.

Weiterhin interessierte es uns zu erfahren, inwieweit die einzelnen für die p-Amino-salicylsäure charakteristischen Struktur-faktoren für eine solche Wirkung notwendig sind. Eine erste Reihe von vergleichenden Untersuchungen mit strukturähnlichen Verbindungen, die in diesem Zusammenhang unternommen wurden, sei im folgenden zusammengestellt.

Die Ergebnisse der biologischen Prüfung eines direkten Derivats der p-Amino-salicylsäure, des p-Amino-salicylsäure-nitrils, ist in der Tabelle unter 2 aufgeführt.

Unter Nr. 3—7 der Tabelle finden sich die Ergebnisse, die mit einer Reihe von isosteren Verbindungen ermittelt wurden.

Weiterhin war es von Interesse zu erfahren, ob eine Beeinflussung der COOH-Gruppe durch die o-ständige OH-Gruppe für die biologische Wirkung von Bedeutung ist.

Eine solche Störung könnte erstens durch sterische Hinderung der Mesomerie zwischen der COOH-Gruppe und der p-ständigen NH₂-Gruppe bewirkt werden, d. h. der o-ständige Substituent könnte durch seine Raumbeanspruchung verhindern, dass die COOH-Gruppe mit dem Benzolring und der NH₂-Gruppe eine ebene Grenzform (Ib) ausbildet⁵⁾.

¹⁾ Das DRP. 50835, Frdl. 2, 139, „Verfahren zur Darstellung der Carbonsäure des Meta-amidophenols und seiner Alkylderivate“, das keine Strukturangaben enthält und das im *Beilstein* 14, 592 fälschlicherweise unter der 2-Amino-4-oxy-benzoessäure eingeordnet ist, wurde von uns erst nachträglich aufgefunden.

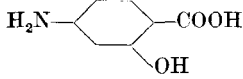
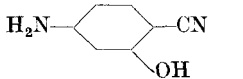
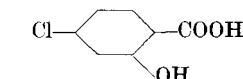
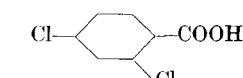

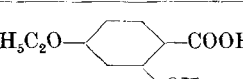

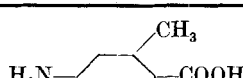

²⁾ Über die verschiedenen Nährlösungen siehe *R. J. Dubos, G. Middlebrook*, *Am. Rev. Tub.* **56**, 334 (1947).

³⁾ *H. Bloch, H. Erlenmeyer, E. Suter*, *Exp.* **3**, 199 (1947); s. auch *E. Suter, H. Erlenmeyer, E. Sorkin, H. Bloch*, *Z. Path. u. Bakt.* **11**, 193 (1948).

⁴⁾ Eigene unveröffentlichte Versuche.

⁵⁾ *R. G. Kadesch, S. W. Weller*, *Am. Soc.* **63**, 1310 (1941): The steric inhibition of resonance in aromatic carbonyl compounds.

Tabelle.

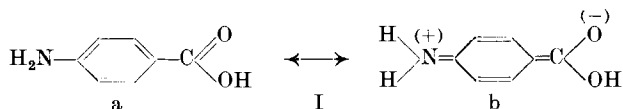
Lau- fende Nr.	Verbindung	Oberflächenkultur in <i>Lockemann</i> - Nährlösung		<i>Kirchner</i> - Nährlösung, 10% Serum enthaltend Grenzkonz. Mol/L	<i>Dubos</i> ²⁾ -Nähr- lösung 0,05% Tween 80 enthaltend Grenzkonz. Mol/L
		Mol/L	SZ ¹⁾		
1		$2,5 \cdot 10^{-6}$	80	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
2		$> 2 \cdot 10^{-4}$	< 1	$> 10^{-3}$	10^{-3}
3		$2 \cdot 10^{-4}$	1	$> 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$
4		$> 2 \cdot 10^{-4}$	< 1	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$
5		$> 2 \cdot 10^{-4}$	< 1	$> 10^{-3}$	10^{-3}
6		$> 2 \cdot 10^{-4}$	< 1	$> 10^{-3}$	10^{-3}
7		$> 10^{-3}$	< 1	$> 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$
8		$2 \cdot 10^{-4}$	1	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$ ⁴⁾
9		$> 2 \cdot 10^{-4}$	< 1	$> 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-4}$

¹⁾ SZ siehe *H. Bloch, H. Lehr, H. Erlenmeyer*, *Helv.* **28**, 1406 (1945).

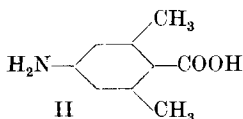
²⁾ Über die verschiedenen Nährlösungen, siehe *R. J. Dubos, G. Middlebrook*, *Am. Rev. Tub.* **56**, 334 (1947).

³⁾ Nr. 7 der Tabelle, vgl. *J. Lehmann*, *Lancet* **250**, 14, 15 (1946).

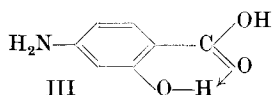
⁴⁾ Beurteilung des diffusen Wachstums schwierig, da die Substanz in diesen Konzentrationsbereichen ausfällt.



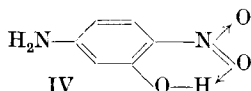
Ein Derivat der p-Amino-benzoesäure, in dem sehr wahrscheinlich eine derartige sterische Störung der Mesomerie zwischen der COOH- und der NH₂-Gruppe vorliegt und in dessen Struktur dementsprechend überwiegend eine H₂N— gegenüber einer H₂N⁽⁺⁾ = Grenzform angenommen werden muss, ist die 2,6-Dimethyl-4-amino-benzoesäure (II).



Zweitens ist aber eine entgegengesetzte Wirkung im Falle der p-Amino-salicylsäure gleichfalls zu diskutieren, indem die o-ständige OH-Gruppe mit der COOH-Gruppe durch eine H-Brücke einen stabilen Chelatring zu bilden vermag (III).



Eine Verbindung, in der in ähnlicher Weise diese Strukturmöglichkeit — Chelatbildung mit einem Substituent zweiter Ordnung — angenommen werden kann, ist 3-Amino-6-nitro-phenol (IV).



Die Ergebnisse der biologischen Prüfung der beiden erwähnten Verbindungen sind in der Tabelle unter 8 und 9 aufgeführt.

Wir möchten auch an dieser Stelle der CIBA Aktiengesellschaft für die Unterstützung unserer Untersuchungen verbindlichst danken. Herrn M. Aeberli und Herrn M. Erne danken wir für die Herstellung von Präparaten.

Zusammenfassung.

Es wird eine einfache Methode zur Darstellung der p-Amino-salicylsäure angegeben. Zur Prüfung der biologischen Strukturspezifität dieser Verbindung wird eine Reihe von strukturähnlichen Verbindungen hergestellt und auf ihre tuberkulostatische Wirksamkeit geprüft.

Universität Basel, Anstalt für anorganische Chemie und
Hygienisches Institut.