

## KURZE MITTEILUNGEN

*Bis am 20. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht  
Es werden auch Manuskripte aus dem Ausland angenommen*

### Contribution to the study of the linkage between the peptide and sugar moieties in cow's $\kappa$ -casein\*

Whole cow's  $\kappa$ -casein is constituted by two genetic variants<sup>1,2</sup> each of which can be separated by chromatography on DEAE-cellulose or by electrophoresis in seven different

fractions<sup>3</sup>. The observed heterogeneity of whole cow's  $\kappa$ -casein is mainly due to variations in the quantitative sugar composition of the fractions: the peptide skeleton seems homogeneous with the exception of a few changes attributable to the genetic variants. The present investi-

\* 18th Communication on caseins, received by the editor January 29, 1968. 17th Communication, see C. ALAIS, N. KIGER and P. JOLLÈS, *J. Dairy Sci.* 50 (1967) 1738.

<sup>1</sup> D.G. SCHMIDT, *Biochim. Biophys. Acta* 90 (1964) 411.

<sup>2</sup> J.H. WOYCHIK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16 (1964) 267.

<sup>3</sup> J. PUJOLLE, B. RIBADEAU-DUMAS, J. GARNIER and R. PION, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25 (1966) 285.

gations were made with whole  $\kappa$ -casein. Its sugar moiety is constituted by galactosamine ( $\text{GalNH}_2$ ), galactose (Gal) and N-acetylneuraminic acid (NANA). Digestion experiments with neuraminidase (EC 3.2.1.18) have shown that NANA is in a terminal position<sup>4,5</sup>. Treatment of whole  $\kappa$ -casein with the enzyme rennin (EC 3.4.4.3) gives rise to the formation of an insoluble para- $\kappa$ -casein part, almost free of sugars, and of a  $\kappa$ -caseinoglycopeptide-part ( $\kappa$ -CGP). This latter contains a fraction with a molecular weight of about 7,000–8,000, which does not dialyze, remains soluble in 12% trichloroacetic acid and contains almost all the sugars of whole  $\kappa$ -casein; NANA is here again liberated by neuraminidase<sup>4,5</sup>. In a previous paper, JOLLÈS *et al.*<sup>6</sup> indicated that if NANA is situated in a terminal position, Gal ( $\text{NH}_2$ ) occupies an internal one and seems to be linked to the peptide moiety. This note will give some new details on the nature of the peptide  $\rightarrow$  sugar linkage in cow's  $\kappa$ -CGP.

Whole cow's  $\kappa$ -CGP was obtained according to the method of ALAIS and JOLLÈS<sup>5</sup>: it contained 3.3% Gal ( $\text{NH}_2$ ), 4.3% Gal and 8.0% NANA, determined respectively according to the procedures of SCHULTZE *et al.*<sup>7</sup>, RONDLE and MORGAN<sup>8</sup> and WARREN<sup>9</sup>.

It is well known that O-glycosidic linkages to serine and threonine are alkali-sensitive<sup>10</sup>. Treatment with mild alkali causes cleavage of the glycosidic bond(s) by  $\beta$ -elimination which results in the formation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\alpha$ -amino acid residues (absorbancy increase at 241  $m\mu$ ). Serine and/or threonine residues involved are degraded at the same rate as sugars are liberated<sup>11</sup>.

On treatment of  $\kappa$ -CGP with 0.5 N NaOH at 20° an increase of the absorbancy at 241  $m\mu$  in function of time was observed (Fig. 1). No increase occurred in water.

The alkali-sensitive glycosidic linkages in certain glycoproteins differ widely in their degree of alkali lability. GOTTSCHALK<sup>12</sup> suggested recently a treatment at higher temperatures. The increase of the absorbancy at 241  $m\mu$  was determined again in modified conditions (0.1 N NaOH; 100°; very short times): it was faster and more important (Fig. 1).

Simultaneously it was possible to follow the appearance with time of phosphorous (Fig. 1) determined according to the method of FISKE and SUBARROW<sup>13</sup>. Around one residue per mole of  $\kappa$ -CGP was liberated at 20° and at 100°.

<sup>4</sup> P. JOLLÈS, C. ALAIS and J. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta* 51 (1961) 309.

<sup>5</sup> C. ALAIS and P. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta* 51 (1961) 315.

<sup>6</sup> P. JOLLÈS, C. ALAIS, A. ADAM, A. DELFOUR and J. JOLLÈS, *Chimia* 18 (1964) 357.

<sup>7</sup> H. E. SCHULTZE, R. SCHMIDTBERGER and H. HAUPT, *Biochem. Z.* 329 (1958) 490.

<sup>8</sup> C. J. RONDLE and W. T. J. MORGAN, *Biochem. J.* 61 (1955) 586.

<sup>9</sup> L. WARREN, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1971.

<sup>10</sup> C. E. BALLOU, *Advances Carbohydr. Chem.* 9 (1954) 59.

<sup>11</sup> A. NEUBERGER, A. GOTTSCHALK and R. D. MARSHALL, in *Glycoproteins* (Elsevier Publ. Co., Ed. A. GOTTSCHALK) 5 (1966) 282.

<sup>12</sup> A. S. BHARGAVA and A. GOTTSCHALK, *Biochim. Biophys. Acta* 148 (1967) 132.

<sup>13</sup> C. H. FISKE and Y. SUBARROW, *J. Biol. Chem.* 66 (1925) 375.

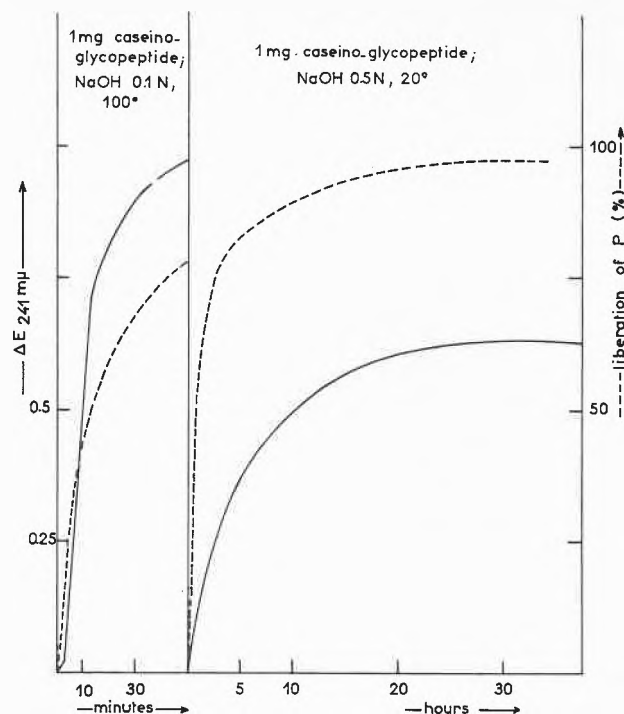


Figure 1. Change in absorbancy at 241  $m\mu$  with time when  $\kappa$ -CGP (1 mg) was treated with 0.5 N NaOH (3 ml) at 20° or with 0.1 N NaOH (3 ml) at 100°, and appearance of P

On treatment of  $\kappa$ -CGP with 0.5 N NaOH at 20° as well as with 0.1 N NaOH at 100° we observed a partial destruction of the threonine. A slight decrease of serine was observed only when  $\kappa$ -CGP was treated at 100°.

We tried to obtain a short glycopeptide from whole  $\kappa$ -casein or  $\kappa$ -CGP in view to study more easily the linkage(s) between the peptide and sugar moieties.  $\kappa$ -CGP was digested with neuraminidase, chymotrypsin (EC 3.4.4.5) and pronase-P (*Streptomyces griseus* protease); the enzymic digest was successively filtrated on Sephadex G-25 and Biogel P6 columns and finally chromatographed on Dowex 50  $\times$  2. We obtained a short glycopeptide with the following composition (molar ratios): Thr (2), P-Ser (1), Glu (1), Pro (1), Gly (0.5), Gal (1),  $\text{GalNH}_2$  (1), traces of Val and Ala. The molecular weight (M. W.) of the glycopeptide was however not determined up to now and it is possible that the real M. W. corresponds to twice the minimal M. W. The same glycopeptide was obtained from whole  $\kappa$ -casein. In a recent paper, BAKER and HWANG<sup>14</sup> described also the purification of a glycopeptide from  $\kappa$ -casein: it is however quite different from ours and has a M. W. of 11,000.

With our glycopeptide we observed in 0.5 N NaOH (20°; 48 hours) and in the presence of 0.3 N lithium borohydride<sup>15</sup> a partial destruction (around 50%) of threonine and nearly a total destruction of galactosamine (Table 1).

<sup>14</sup> B. E. BAKER and P. C. HWANG, *J. Dairy Sci.* 50 (1967) 1206.

<sup>15</sup> J. MONTREUIL, M. MONSIGNY and M. T. BUCHET, *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 264 (1967) 2068.

Table 1. Amino acid composition (molar ratios after total hydrolysis) of a glycopeptide from  $\kappa$ -casein and  $\kappa$ -CCP obtained after 3 enzymic digestions and 3 chromatographies (see text), before and after alkali treatment

Amino Acid	Glycopeptide	Glycopeptide after alkali treatment and reduction
Thr	2.23	1.29
Ser	1.00	1.00
Glu	0.80	0.81
Pro	0.99	0.85
Gly	0.47	0.46
Ala	0.33	0.32
Val	0.26	0.18
Gal(NH <sub>2</sub> )	1.30	0.21

The appearance of sugars characterized by paper chromatography and according to SCHULTZE *et al.*<sup>7</sup> was also followed with time when  $\kappa$ -CCP was treated with 0.5 N HCl at 100°. Free Gal appeared already at the beginning of the treatment: however free Gal (NH<sub>2</sub>) could only be characterized after one hour. These experiments indicate that Gal(NH<sub>2</sub>) occupies an internal position.

Our results which will be published in detail elsewhere suggest the presence of an O-glycosidic linkage between threonine and galactosamine in  $\kappa$ -CCP as well as in whole  $\kappa$ -casein. They are in accordance with observations of MALPRESS who too demonstrated the presence of O-glycosidic linkages in human and cow caseinoglycomacropeptides<sup>16</sup>.

Our chemical structure studies have already shown that the sugar moiety is not linked to the N-terminal octadecapeptide<sup>17</sup> nor to the described C-terminal sequence of  $\kappa$ -CCP<sup>18</sup>.

This communication constitutes a part of a thesis which will be submitted by one of the authors (A.-M. F.) in partial fulfillment of the requirements for the degree of «Doctorat ès Sciences» of the University of Paris.

A.-M. FIAT,\* C. ALAIS\*\* and P. JOLLÈS\*

Laboratory of Biochemistry, Faculty of Sciences,  
96, boulevard Raspail, Paris\*,  
and Dairy Department, Faculty of Sciences, Nancy (France)\*\*

<sup>16</sup> F. H. MALPRESS and M. SEID-AKHAVAN, *Biochem. J.* 101 (1966) 764.

<sup>17</sup> A. DELFOUR, C. ALAIS and P. JOLLÈS, *Chimia* 20 (1966) 148.

<sup>18</sup> P. JOLLÈS, *Angew. Chem. Intern. Ed.* 5 (1966) 558.

## Zwei neue Ringsysteme der Pyridinophanreihe\*

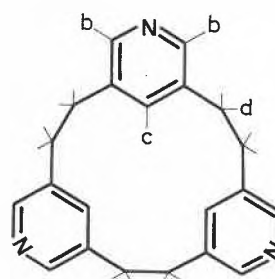
### Summary

The chromatographic separation of the product resulting from the reaction of sodium and tetraphenylethylene on 3,5-di-chloromethyl-pyridine led to the isolation of [2.2.2] (3,5) pyridinophane (yield 4,2%) and [2.2.2.2] (3,5) pyridinophane (yield 1,5%). The structure of the new ring systems was confirmed by NMR and mass spectra analyses.

Wir haben kürzlich über die Synthese von [2.2] (3,5)-Pyridinophan berichtet<sup>1</sup>. Die weitere chromatographische Auftrennung des bei der Einwirkung von Natrium auf 3,5-Di-chlormethyl-pyridin<sup>2</sup> (–75°, Tetrahydrofuran, Tetraphenyläthylen als Katalysator)<sup>3</sup> erhaltenen rohen Reaktionsproduktes führte nun zur Abtrennung der zwei größeren Ringsysteme, [2.2.2] (3,5) Pyridinophan und [2.2.2.2] (3,5) Pyridinophan in reiner Form.

Bei der chromatographischen Abtrennung der zwei neuen Verbindungen an einer Aloxsäule (Akt. II) werden vorerst Tetraphenyläthylen und Tetraphenyläthan durch Eluieren mit Benzol entfernt. Nachfolgendes Eluieren mit reinem Methylenchlorid ergibt praktisch reines

[2.2] (3,5) Pyridinophan. Durch Zusatz von 1% Methanol zum Eluiermittel können dann [2.2.2] (3,5) Pyridinophan (Ausbeute 4,2%, Smp. 259–260°) und [2.2.2.2] (3,5) Pyridinophan (Ausbeute 1,5%, Smp. 277–278°) isoliert werden. Beide Verbindungen kristallisieren aus Hexan/Methylenchlorid in schwach gelben Nadelchen, können aber durch Sublimation im Hochvakuum in farbloser Form erhalten werden.



[2.2.2] (3,5) Pyridinophan

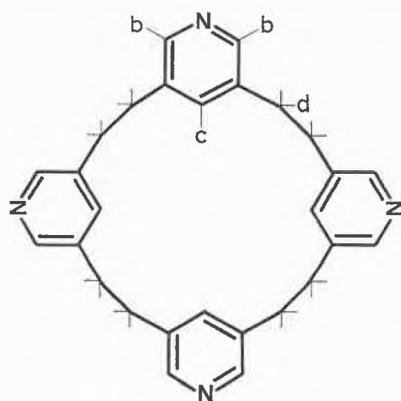
Die angenommenen Strukturen werden durch Elementaranalyse (ber. für C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub> C 79,96 H 6,71 N 13,32%; gef. C 79,98 H 6,79 N 13,29% und für C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub> ber. C 79,96 H 6,71 N 13,32%; gef. C 79,95 H 6,89 N 13,30%), NMR-Spektrum und massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung (Molekül-Ionen bei m/e 315 und 420) bestätigt.

\* Eingegangen am 31. Januar 1968.

<sup>1</sup> W. JENNY und H. HOLZRICHTER, *Chimia* 21 (1967) 509. Die Ausbeute an [2.2] (3,5) Pyridinophan konnte inzwischen durch Variation der Versuchsbedingungen auf 5% gesteigert werden. Die Verbindung schmilzt im zugeschmolzenen Röhrchen bei 263–265° (Kofler-Block).

<sup>2</sup> KYOSUKE TSUDA *et al.*, *Pharm. Bull. (Japan)* 1 (1953) 144.

<sup>3</sup> Vgl. dazu auch E. MÜLLER und G. RÜSCHEISEN, *Chem. Ber.* 90 (1957) 543.



[2.2.2.2] (3,5)Pyridinophan

In der [2.2. ...]Metacyclophanreihe bildeten gewisse physikalische Eigenschaften, wie die Schmelzpunkte, die Kernresonanz- und die Massenspektren einen wesentlichen Beitrag zur Sicherung der Struktur dieser Ringsysteme<sup>4</sup>. Bei den [2.2. ...] (3,5)Pyridinophanen zeigen sich nun bei Vergrößerung des zyklischen Systems ähnliche Gesetzmäßigkeiten wie in der Metacyclophanreihe. Trotzdem erst ein Glied mit ungerader Zahl Lutidineinheiten bekannt ist, darf vermutet werden, daß auch in dieser Reihe die Schmelzpunkte der ungeradzahlig Glieder ganz allgemein tiefer liegen als diejenigen der unmittelbar benachbarten geradzahlig. Entgegen der in der Metacyclophanreihe geltenden Regel scheinen aber die Schmelzpunkte der geradzahlig Pyridinophane mit fortschreitender Ringgröße anzusteigen<sup>5</sup>. Eine Bestätigung dieser Gesetzmäßigkeiten und die Begründung ihrer Ursachen wird erst aufgrund des in Aussicht stehenden, erweiterten experimentellen Tatsachenmaterials möglich sein.

Die NMR-Spektren (vgl. Tabelle 1) der zwei neuen Ringsysteme sind denjenigen der entsprechenden Metacyclophane sehr ähnlich. Die aliphatisch gebundenen *d*-Protonen, welche im [2.2] (3,5)Pyridinophan als AA'BB'-Spektrum erscheinen, geben im [2.2.2]- und [2.2.2.2] (3,5)Pyridinophan Anlaß zur Ausbildung eines Singletts (nicht fixierte, drehbare C—C-Bindung). Der sehr ausgeprägte Abschirmungseffekt auf die *c*-Protonen in [2.2] (3,5)Pyridinophan nimmt mit zunehmender Ringgröße ab. Die Verschiebung der *H<sub>c</sub>*-Signale nach höherem Feld ist bei den zwei neuen Ringsystemen aber noch deutlich nachweisbar.

In den Massenspektren der Pyridinophane beobachten wir neben dem intensiven Molekül-Ionen-Peak (*M*<sup>+</sup>) auch die Massen der doppelt positiv geladenen Ionen (*M*<sup>++</sup>). Die relative Intensität der *M*<sup>++</sup>-Ionen-Peaks nimmt aber mit zunehmender Ringgröße sehr stark ab.

Tabelle 1. Protonenresonanzsignale von [2.2. ...] (3,5)Pyridinophanen; Spektren aufgenommen in Deuteriochloroform bei 100 MHz mit TMS als interne Referenzsubstanz ( $\delta$  in p.p.m.)

	<i>H<sub>b</sub></i>	<i>H<sub>c</sub></i>	<i>H<sub>d</sub></i>
[2.2]-	8,38	4,51	3,22/2,18*
[2.2.2]-	8,24	6,39	2,83**
[2.2.2.2]-	8,04	6,69	2,77**

\* AA'BB'-Spektrum.

\*\* Singlett.

*H<sub>b</sub>* und *H<sub>c</sub>* bilden bei allen drei Ringsystemen ein *A<sub>2</sub>X*-Spektrum.

Durch Abspaltung von Äthylen entsteht aus [2.2] (3,5)-Pyridinophan ein Fragment-Ion (*M*-28 [*C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>*]) mit überraschend großer Intensität. Diese Fragmentierung kann, allerdings in wesentlich geringerem Maße, auch bei den höheren Pyridinophanen beobachtet werden (vgl. Tabelle 2). Der früher vorgeschlagene Fragmentierungsme-

Tabelle 2. Relative Intensitäten (bezogen auf *M*<sup>+</sup>) charakteristischer Fragment-Ionen der [2.2. ...] (3,5)Pyridinophane

Fragment-Ion	[2.2]-	[2.2.2]-	[2.2.2.2]-
<i>M</i> -28 ( <i>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></i> )	182 (105%)	287 (3,3%)	392 (0,5%)
<i>n</i>			
<i>M</i> -(92 + <i>n</i> . 105)	0	118 (2,9%)	223 (5,6%)
1		118 (18%)	223 (?%)
2			118 (2,3%)
<i>M</i> -(106 + <i>n</i> . 105)	0	104 (33%)	209 (37%)
1		104 (28%)	209 (2,1%)
2			104 (3,7%)
<i>M</i> -(120 + <i>n</i> . 105)	0	90 (2,9%)	195 (6,5%)
1		90 (3,3%)	195 (0,6%)
2			90 (1%)

chanismus<sup>4</sup> scheint auch in der [2.2. ...] (3,5)Pyridinophanreihe Gültigkeit zu haben. Charakteristische Fragment-Ionen treten in Dreiergruppen bei den Massenzahlen *M*-(92 + *n*. 105), *M*-(106 + *n*. 105) und *M*-(120 + *n*. 105) auf. Der mittlere Peak der Dreiergruppe mit der Masse *M*-(106 + *n*. 105) ist stets am intensivsten. Einem solchen Zerfall sollte eine intramolekulare H-Umlagerung vorausgehen. Besonders die in den Spektren aller drei Pyridinophane nachweisbaren Fragment-Ionen der Masse *M*-15 (*CH<sub>3</sub>*) deuten tatsächlich in dieser Richtung.

Eine ausführliche Publikation dieser Arbeit wird in den *Helv. Chim. Acta* erscheinen.

W. JENNY und H. HOLZRICHTER

Forschungslaboratorien der  
CIBA Aktiengesellschaft, Basel, Farbstoffabteilung  
Institut für organische Chemie der Universität Bern

<sup>4</sup> K. BURRI und W. JENNY, *Helv. Chim. Acta* 50 (1967) 1978.

<sup>5</sup> Vgl. dazu Zit.<sup>4</sup>, S. 1981-2.

## Selektive Ring-Verknüpfung in kondensierten Polyazaheterozyklen mittels Azidoazomethin-Tetrazol-Tautomerie Synthesen einiger neuer Azasteroide\*

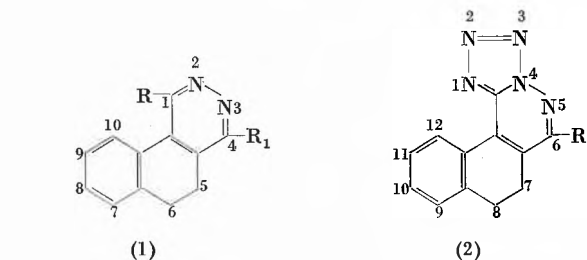
### Summary

Selective orientation of some fused rings by means of azidoazomethine-tetrazole equilibrium has been used for the preparation of some steroid-like polyazaheterocycles.

Von Azasteroiden, die einen Pyridazin-Ring enthalten, wurden erst neulich einige Verbindungen beschrieben<sup>1-5</sup>. In dieser Mitteilung berichten wir über einige bisher noch unbekannt Azasteroide mit Pyridazin als Ring C des Steroidskelettes.

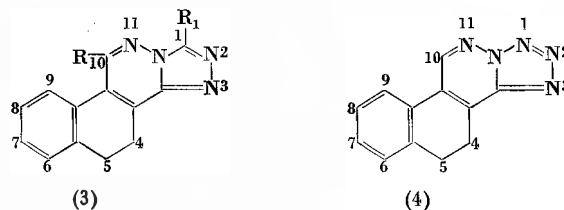
Als Ausgangsstoff diente 1,4-Dichlor-5,6-dihydrobenzo[f]phthalazin (1a)<sup>6</sup>, das mit nukleophilen Reagenzien zuerst selektiv das 1-Chloratom austauscht. Unter verschiedenen Verbindungen wurde so auch die entsprechende Hydrazino-Verbindung (1b) zugänglich, und diese, in üblicher Weise nitrosiert, ergab 6-Chlor-7,8-dihydrobenzo[h]tetrazolo[5,1a]phthalazin (2a). Nach Austausch des restlichen Chloratoms gegen die Hydrazino-Gruppe zu (2b) und nachfolgender Nitrosierung wurde jedoch nicht die erwartete bis-Tetrazolo-Verbindung erhalten, sondern die entsprechende 6-Azido-Verbindung (2c) (im IR-Spektrum [Nujol] eine starke Absorption bei 2128 cm<sup>-1</sup>, charakteristisch für die Azid-Gruppe<sup>7,8</sup>). Dieselbe Verbindung wurde auch entweder aus (1a) oder aus (2a) nach der Behandlung mit NaN<sub>3</sub> erhalten. Die Entscheidung über die Stellung der Azid-Gruppe bzw. über die Angliederung des Tetrazolringes wie für Verbindungen des Typs (4) oder wie vorgeschlagen für (2), wurde auf Grund der NMR-Spektren und einiger weiterer Umwandlungen getroffen.

Eine Destabilisierung des ankondensierten Tetrazolringes ist bei Azaheterozyklen in manchen Fällen bekannt, und die resultierende Azidoazomethin-Tetrazol-Tautomerie wurde bei einigen einfacheren Systemen eingehend untersucht<sup>9-11</sup>. Unsere Versuche zeigen, daß auch



- (1)  
 a) R = R<sub>1</sub> = Cl; Fp. 124–126°  
 b) R = NHNH<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> = Cl;  
 = Fp. 175–178°  
 c) R = H, R<sub>1</sub> = Cl;  
 Fp. 118–119°  
 d) R = H, R<sub>1</sub> = NHNH<sub>2</sub>;  
 Fp. 253–254° (Dihydrochlorid)

- (2)  
 a) R = Cl; Fp. 162–165°  
 b) R = NHNH<sub>2</sub>; Fp. 265–268°  
 c) R = N<sub>3</sub>; Fp. 192–195°



- (3)  
 a) R = N<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = NH<sub>2</sub>;  
 Fp. 255–256° (Zers.)  
 b) R = N<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = H;  
 Fp. 220–222° (Zers.)  
 c) R = R<sub>1</sub> = NH<sub>2</sub>;  
 Fp. über 325°  
 d) R = NH<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> = H;  
 Fp. über 320°  
 e) R = R<sub>1</sub> = H; Fp. 220–222°

(4)  
 Fp. 236–238°

ein ankondensierter Triazolring denselben Effekt ausüben kann wie ein ankondensierter Tetrazolring, wobei die Umwandlung eines zweiten ankondensierten Tetrazolringes in die Azidgruppe auftritt. So wurden aus (2b) mit Bromcyan oder Diäthoxyessigsäuremethylester-Verbindungen (3a) und (3b) erhalten. In den IR-Spektren kann man das Vorliegen der Azidgruppe gut erkennen.

Durch Behandlung mit H<sub>2</sub>S konnte die endgültige Elimination des Fünfringes durch Überführung in die Aminogruppe erreicht werden. So wurden die Verbindungen des Azasteroid-Typus, 4,5-Dihydrobenzo[f]-s-triazolo[3,4-a]phthalazin, (3c) und (3d), erhalten.

Zur Darstellung des Tetrazolo-Analogen (4) (4,5-Dihydrobenzo[f]tetrazolo[5,1-a]phthalazin) aus (1b) erwiesen sich folgende Reaktionswege als gangbar. Elimination der Hydrazino-Gruppe mittels Kupfersulfat und Behandlung des entstandenen (1c) mit NaN<sub>3</sub> ergab (4), das andererseits auch aus (1d) durch Nitrosierung erhalten wurde.

Die Konstitution obiger Verbindungen konnte vor allem mit Hilfe der NMR-Spektren sichergestellt werden.

\* Eingegangen am 3. Februar 1968.

- <sup>1</sup> M. TOMOEDA, R. KIKUCHI und M. URATA, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 13 (1965) 517.
- <sup>2</sup> M. TOMOEDA und J. YOSHIKAWA, *Tetrahedron Letters* 1967, 975.
- <sup>3</sup> K. SCHUBERT und K. H. BÖHME, *Chem. Ber.* 93 (1960) 1884.
- <sup>4</sup> A. VAN DER GEN, W. A. ZUNNEBELD, U. K. PANDIT und H. O. HUISMAN, *Tetrahedron* 21 (1965) 3651.
- <sup>5</sup> F. L. WEISENBORN, D. C. REMY und T. L. JACOBS, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 552.
- <sup>6</sup> J. DREISEITEL und A. KOCWA, *Dissertationes Pharm.* 11 (1959) 157; *Chem. Abstr.* 54 (1960) 4593.
- <sup>7</sup> L. J. BELLAMY, *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*, Methuen, London 1960, S. 273.
- <sup>8</sup> K. NAKANISHI, *Infrared Absorption Spectroscopy*, Holden-Day, San Francisco 1964.
- <sup>9</sup> C. TEMPLE, C. L. KUSSNER und J. A. MONTGOMERY, *J. Org. Chem.* 31 (1966) 2210. Enthält weitere Referenzen.
- <sup>10</sup> G. A. REYNOLDS, J. A. VAN ALLAN und J. F. TINKER, *J. Org. Chem.* 24 (1959) 1205.
- <sup>11</sup> B. STANOVNIK und M. TIŠLER, *Tetrahedron* 23 (1967) 387.

Beträchtliche Abschirmungseffekte bei sterisch behinderten Protonen in polykondensierten Aza- oder Thia-Heteroaromaten mit angularer Anordnung sind bekannt<sup>12-14</sup>. Ähnliche Beobachtungen (ohne Berücksichtigung von Ringstrom- und Anisotropieeffekten) machten wir bei Verbindungen vom Typ (1). Hier wurden chemische Verschiebungen für Protonen H<sub>10</sub> (1a: Multipl.  $\tau = 1,70$ ; 1b: Multipl.  $\tau = 1,53$ ) bei niedrigerer Feldstärke als für H<sub>10</sub> in der sterisch nicht behinderten Verbindung (1c) (Multipl.  $\tau = 2,25$ ) beobachtet. Denselben Effekt kann man beim Imidazo-Analogen vom Typ (2)<sup>15</sup>, wo H<sub>12</sub> des 6-Chlor-7,8-dihydrobenz[h]imi-

dazo [2,1-a]-phthalazins bei  $\tau = 0,72$  (Multipl.) erscheint, beobachten. Bei der Azido-Tetrazol-Verbindung (2c) war eine solche Unterscheidung nicht möglich, da die Protonen H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub> und H<sub>12</sub> ein nicht aufgelöstes Multipl. ergeben. Bei dem Azasteroid (3e) ist eine Abschirmung für H<sub>9</sub> (Multipl.  $\tau = 2,22$ ) kaum bemerkbar, und die Protonen der -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Gruppe ergeben ein Multipl. beim  $\tau = 6,73$ , das typisch ist für ein AA'BB'-System.

Elementaranalysen liegen für sämtliche neuen Verbindungen vor. Die NMR-Spektren wurden mit gesättigten Lösungen in CDCl<sub>3</sub> oder CF<sub>3</sub>COOH aufgenommen (innerer Standard: TMS).

B. STANOVNIK und M. TRŠLER

Institut für organische Chemie der Universität  
Ljubljana (Jugoslawien)

<sup>12</sup> R. H. MARTIN, N. DEFAY, F. GEERTS-EVRARD und D. BOGAERT-VERHOOGEN, *Tetrahedron Suppl.* 8 (1966) 1. Teil, S. 181.

<sup>13</sup> W. W. PAUDLER und T. J. KRESS, *J. Org. Chem.* 32 (1967) 2616.

<sup>14</sup> T. E. YOUNG und C. J. OHNMACHT, *J. Org. Chem.* 32 (1967) 1558.

<sup>15</sup> Dargestellt aus (1, R = NH<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> = Cl) und Bromacetaldehyd nach dem schon früher veröffentlichten Verfahren<sup>11</sup>.

## Ein carbozyklisches System mit 50 Ringgliedern\* [2.2.2.2.2.2.2.2.2.2] Metacyclophan

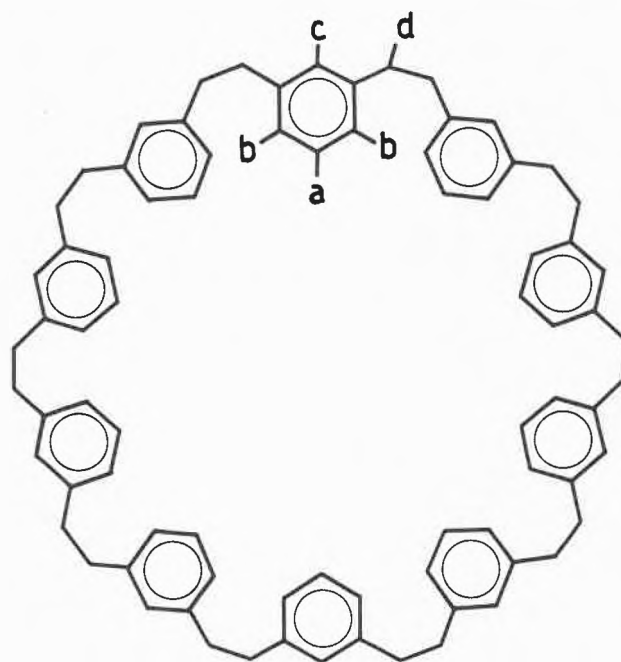
### Summary

A further ring system, [2.2.2.2.2.2.2.2.2.2] metacyclophane was isolated in pure state by chromatographic separation from the crude reaction product of a Wurtz reaction with  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*m*-xylene. The structure of the new system was confirmed by NMR and mass spectra.

Es wurde in früheren Arbeiten<sup>1</sup> gezeigt, daß die Wurtz-Reaktion mit  $\alpha,\alpha'$ -Dibrom-*m*-xylol nach der Variante von MUELLER und ROESCHEISEN<sup>2</sup> nahezu 90% ringförmige Verbindungen liefert. Der Gehalt des Rohproduktes an [2.2. ...] Metacyclophanen nimmt mit zunehmender Ringgröße stark ab. Beim 40-gliedrigen Octameren<sup>3</sup> konnten nur noch 0,5% der reinen Verbindung isoliert werden. Es war also zu erwarten, daß die Gewinnung noch größerer Ringe wegen den sich zusehends verkleinernden Ausbeuten mit Schwierigkeiten verbunden sein würde. Die Kenntnis dieser großen Ringe erschien uns aber sehr wertvoll, vor allem zur Bestätigung und Festigung der in der [2.2. ...] Metacyclophanreihe aufgefundenen Gesetzmäßigkeiten<sup>4</sup>.

Wir haben nun gefunden, daß bei einer Verfeinerung des chromatographischen Verfahrens auch größere Ringsysteme mit Molekulargewichten über 1000 in reiner Form isolierbar sind. Hier soll über die Gewinnung von Deca-*m*-xylylen ([2.2.2.2.2.2.2.2.2.2] Metacyclophan) und seine Eigenschaften berichtet werden.

Nach der früher beschriebenen Isolierung des Octameren<sup>3,4</sup> wird durch Eluieren mit *n*-Hexan/Äthylacetat (100:1) das Decamer in Form eines weißen Pulvers mit 0,3% Ausbeute erhalten. Die neue Verbindung kristallisiert aus *n*-Hexan in kleinen Drusen, welche aus feinen Prismen bestehen und bei 98–100°C schmelzen. Nach dreimaliger Kristallisation aus *n*-Hexan enthalten die



[2.2.2.2.2.2.2.2.2.2] Metacyclophan

\* Eingegangen am 20. Februar 1968.

<sup>1</sup> K. BURRI und W. JENNY, *Helv. Chim. Acta* 50 (1967) 1980.

<sup>2</sup> E. MUELLER und G. ROESCHEISEN, *Chem. Ber.* 90 (1957) 543.

<sup>3</sup> W. JENNY und K. BURRI, *Chimia* 21 (1967) 472.

<sup>4</sup> Vgl. Zit.<sup>1</sup>, S. 1978–93.

Präparate immer noch geringe Mengen des linearen Octameren, welches dünn-schichtchromatographisch und massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte. Die endgültige Reinigung gelang durch präparative Dünnschichtchromatographie, wobei mit Benzol/Hexan (1:2) eluiert wurde.

Das Decamere schmilzt fast bei der gleichen Temperatur wie das Octamere. Es ist wahrscheinlich, daß auch dem  $C_{50}$ -Ring – besonders im Kristallgitter – eine mehr raumerfüllende, gestreckte Konformation zukommt<sup>5</sup>.

Einen wichtigen Beitrag zur Strukturaufklärung mußte die massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung liefern. Diese Analyse sollte vor allem eine eindeutige Antwort auf die Frage geben, ob es sich bei dem vorliegenden Produkt um das Ringsystem  $C_{80}H_{80}$  ( $M = 1040$ ) oder die offenkettige lineare Verbindung  $C_{80}H_{82}$  ( $M = 1042$ ) handelt. Das Spektrum wurde auf einem doppelfokussierenden Massenspektrographen CEC 21/110 B aufgenommen und lieferte einen intensiven Molekel-Ionenpeak ( $M^+$ ) mit der Masse 1040. Diese Spitze konnte durch Vergleich mit Perfluoralkan sicher identifiziert werden. Das isotope Ion ( $^{13}C$ ) erreicht bei diesem Kohlenwasserstoff nahezu 90% von  $M^+$ . Die kürzlich ausführlich beschriebene, gesetzmäßige Fragmentierung der [2.2. ...] Metacyclophane<sup>4</sup> kommt im Massenspektrum des Decameren besonders auffallend zum Ausdruck. Im Massenbereich unterhalb dem Molekel-Ion treten Fragment-Ionen in deutlichen Dreiergruppen bei den Massenzahlen  $M - (91 + n \cdot 104)$ ,  $M - (105 + n \cdot 104)$  und  $M - (119 + n \cdot 104)$  auf, wobei das mittlere Ion der Dreiergruppe mit der Masse  $M - (105 + n \cdot 104)$  stets am intensivsten ist (vgl. Tabelle 1).

Das NMR-Spektrum des neuen Ringsystems zeigt für die chemischen Verschiebungen (in  $CDCl_3$ ) die erwarteten Werte. Es ähnelt sehr stark demjenigen des Octameren (vgl. Tabelle 2). Die Signale der aromatisch ge-

bundenen Protonen ( $H_a$ ,  $H_b$ ,  $H_c$ ) können als  $AB_2C$ -Spektrum analysiert werden, wobei zu beachten ist, daß sich die  $H_b$ - und  $H_c$ -Signale teilweise überschneiden. Die aliphatisch gebundenen  $H_d$ -Protonen erscheinen erwartungsgemäß als Singlett. Die Integrationen stehen in vollem Einklang mit der vorgeschlagenen Zuordnung.

Tabelle 1. Berechnete und beobachtete Massenzahlen der Fragment-Ionen im Massenspektrum von [2.2.2.2.2.2.2.2.2] Metacyclophan

$M - (m + n \cdot 104)$ , $m = 91, 105$ und $119$			
$n$	$m = 91$	$m = 105$	$m = 119$
0	949	935	921
1	845	831	817
2	741	727	713
3	637	623	609
4	533	519	505
5	429	415	401
6	325	311	297
7	221	207	193
8	117	103	89

Tabelle 2. Chemische Verschiebungen der Protonen in Octa- und Deca-*m*-xylylen; Spektren, aufgenommen in Deuteriochloroform bei 100 MHz mit TMS als interne Referenzsubstanz ( $\delta$  in p. p. m.).

	$H_a$	$H_b$	$H_c$	$H_d$
Octa-	7,14	6,94	6,83	2,78
Deca-	7,10	6,90	6,82	2,78

Eine ausführliche Publikation dieser Arbeit wird in den *Helv. Chim. Acta* erscheinen.

W. JENNY und R. PAIONI

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft,  
Basel, Farbstoffabteilung, und  
Institut für organische Chemie der Universität Bern

<sup>5</sup> Vgl. dazu unsere Ausführungen über die Schmelztemperaturen der [2.2. ...] Metacyclophane in *Helv. Chim. Acta* 50 (1967) 1981–3.