

Die Synthese der 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure-(3-¹⁴C)

Von

G. Billek und E. F. Herrmann

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 19. Dezember 1958)

Es wird eine neue Synthese der 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure beschrieben. 4-Hydroxybenzaldehyd wird mit Hydantoin zum 4-Acetoxybenzaldehyd kondensiert, welches mit wäßr. Alkali quantitativ zur 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure gespalten werden kann. Die Verwendung von carbonylmarkiertem 4-Hydroxybenzaldehyd, dessen Synthese verbessert wurde, liefert die 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure-(3-¹⁴C) auch in Millimoldimensionen in hoher Ausbeute. Die vordem bekannten Synthesen der 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure sind für eine Markierung mit Radiokohlenstoff wenig geeignet.

Die 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure steht im Zusammenhang mit dem Tyrosinstoffwechsel und wird für einen Leberfunktionstest herangezogen („Testacid“, Chemiewerk Homburg). In jüngster Zeit fanden substituierte Phenylbrenztraubensäuren Beachtung, als B. D. Davis¹ bei der Biogenese der Aromaten in niederen Organismen nachweisen konnte, daß Phenylbrenztraubensäure als erste aromatische Verbindung dieser Reaktionsfolge gebildet und anschließend hydroxyliert und aminiert wird. Ein ähnlicher Weg wird auch für die Biogenese des aromatischen Grundkörpers des Lignins angenommen, wobei markierte Shikimisäure^{2, 3} und Phenylbrenztraubensäure⁴ bereits erfolgreich als Lignin-Vorstufen dienen konnten. Die 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure wurde ferner von G. Eberhardt und F. F. Nord⁵ aus dem Kulturmedium des holzzer-

¹ U. Weiss, B. D. Davis und E. S. Mingioli, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 5572 (1953).

² S. A. Brown und A. C. Neish, Nature **175**, 688 (1955).

³ G. Eberhardt und W. J. Schubert, J. Amer. Chem. Soc. **78**, 2835 (1956).

⁴ S. A. Brown und A. C. Neish, Canad. J. Biochem. Physiol. **33**, 948 (1955).

⁵ G. Eberhardt und F. F. Nord, Arch. Biochem. Biophys. **55**, 578 (1955).

störenden Pilzes *Lentinus lepideus* isoliert. Auf Grund ihrer strukturellen Verwandtschaft mit den Ligninbausteinen erhebt sich die Frage, ob diese Säure im Verlauf der Biogenese des Lignins eine Rolle spielt und welche. Zu diesem Zweck wurde von F. F. Nord⁶ eine carboxyl-markierte 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure-(1-¹⁴C) hergestellt. Diese Verbindung wurde mit hoher Einbaurate vom Lignin des Zuckerrohres aufgenommen. Weitere Aussagen waren jedoch infolge der ungünstigen Markierung der eingesetzten Säure nicht möglich.

Die in vorliegender Arbeit hergestellte kernnah markierte 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure-(3-¹⁴C) wurde von uns bei Versuchen mit der Fichte eingesetzt, wobei eine geringere Einbaurate als bei Zuckerrohr gefunden wurde. Die Markierung am kernnahen C-Atom der Seitenkette ermöglichte es, nach einem oxydativen Abbau des Lignins ein aktives Vanillin zu isolieren, welches eine im Vergleich zum Lignin nur geringe Aktivität besaß. Von der eingesetzten 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure ist demnach nur ein Bruchteil in die typischen Guajacylpropaneinheiten des Fichtenlignins umgewandelt worden⁷. Über diese Arbeiten wird demnächst berichtet werden⁸.

Diese Diskrepanz gegenüber den Befunden von F. F. Nord wurde von A. C. Neish⁹ geklärt. Demnach sollen sich *Gramineae* (z. B. Zuckerrohr) in bezug auf die Verwertung von 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure anders verhalten als die Fichte.

Die Synthese der 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure

Trotz der vielfältigen Bedeutung der 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure verlaufen die bis zu Beginn dieser Arbeit bekannten Synthesen unbefriedigend und sind für eine Markierung mit Radiokohlenstoff wenig geeignet.

Nach O. Neubauer und K. Fromherz¹⁰ wird 4-Hydroxybenzaldehyd mit Hippursäure kondensiert, das Azlacton gespalten, die Benzoessäure abgetrennt und die 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure als Natriumbisulfitverbindung isoliert. Die angegebenen Ausbeuten von 34% konnten nur bei großen Ansätzen erreicht werden.

Nach J. A. Saul und V. M. Trikojus¹¹ wird ein Azlacton aus 4-Hydroxy-

⁶ S. N. Acerbo, W. J. Schubert und F. F. Nord, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 1990 (1958).

⁷ G. Billek, IV. Internat. Congr. Biochem., Vienna 1958, Symposium II, (in press) London: Pergamon Press. 1959.

⁸ K. Kratzl und G. Billek, unveröffentlicht.

⁹ A. C. Neish, IV. Internat. Congr. Biochem., Vienna 1958, Symposium II (in press). London: Pergamon Press. 1959; S. A. Brown, D. Wright und A. C. Neish, Canad. J. Biochem. Physiol. **37**, 25 (1959).

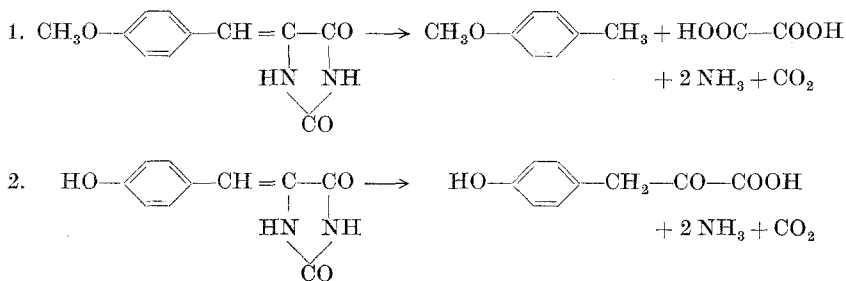
¹⁰ O. Neubauer und K. Fromherz, Z. physiol. Chem. **70**, 326 (1911).

¹¹ J. A. Saul und V. M. Trikojus, Biochem. J. **42**, 80 (1948).

benzaldehyd und Acetursäure hergestellt und in zwei Stufen gespalten. Die von den Autoren angegebene Gesamtausbeute von 23% wurde nie erreicht. *F. F. Nord*⁶ hat nach dieser Synthese erstmals eine 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure-(carboxyl-¹⁴C) hergestellt, jedoch nur eine Gesamtausbeute von 9%, bezogen auf die eingesetzte Aktivität, erhalten.

M. Bergmann und *D. Delis*¹² kondensieren 4-Hydroxybenzaldehyd mit 3-Phenylhydantoin zum 5-(4'-Hydroxybenzal)-3-phenylhydantoin und spalten mit 4 n Natronlauge zur 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure. Der bei der Spaltung entstehende Phenylharnstoff muß vor der Isolierung der 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure abgetrennt werden. Die Gesamtausbeute beträgt etwa 40%.

Die Nachteile dieser Verfahren beruhen auf der Schwierigkeit des Abtrennens der Nebenprodukte von der unbeständigen und vor allem in unreinem Zustand zersetzlichen 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure. Deshalb haben wir das Kondensationsprodukt von 4-Hydroxybenzaldehyd und Hydantoin herangezogen, das bei der Spaltung neben der Ketosäure lediglich NH_3 und CO_2 liefert. Hierfür mußten hochkonzentrierte Alkalien verwendet werden, um eine vollständige Spaltung zu erzielen. Dies steht im Gegensatz zu der Feststellung von *H. R. Henze*, *W. B. Whitney* und *M. A. Eppright*¹³, wonach aus derartig substituierten Hydantoinen durch Einwirkung konzentrierter Alkalien vorwiegend der Kohlenwasserstoff und Oxalsäure (Weg 1) gebildet werden; z. B. im Fall des Anisal-hydantoin. Diese Feststellung konnte bei Verbindungen ohne phenolische Hydroxylgruppe bestätigt werden. Bei Anwesenheit von freien oder alkalilabil substituierten Phenolgruppen hingegen verläuft die Spaltung ausschließlich nach Weg 2.



Diese Spaltung des aus carbonylmarkiertem 4-Hydroxybenzaldehyd hergestellten Hydantoin stellt einen einfachen Weg zur Synthese der 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure-(3-¹⁴C) dar. Diese Methode¹⁴ ist

¹² *M. Bergmann* und *D. Delis*, Ann. Chem. **458**, 76 (1927).

¹³ H. R. Henze, W. B. Whitney und M. A. Eppright, J. Amer. Chem. Soc. **62**, 565 (1940).

¹⁴ Österr. Patentanmeldung vom 30. 5. 1958, Z. 5 A 3824/58—1, Klasse 12 e₂.

auf breiterem Gebiet anwendbar, da man auch andere phenolische Arylbrenztraubensäuren nach dem gleichen Verfahren herstellen kann¹⁵.

Eigenschaften

Die 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure ist in alkalischer Lösung außerordentlich oxydabel; sie zersetzt sich beim Stehen an der Luft in 2 n Natronlauge binnen weniger Stunden. Als Spaltstücke wurden vor allem 4-Hydroxybenzaldehyd neben 4-Hydroxybenzoesäure und Oxalsäure nachgewiesen.

In festem Zustand liegt die Säure in der Enolform vor. Beim Lösen in Wasser stellt sich langsam das Gleichgewicht mit der Ketoform ein. In alkalischem Bereich erfolgt rasche Umlagerung in die Ketoform, die sich nach Ansäuern erst allmählich wieder in die Enolform umlagert. Diese Erscheinungen konnten durch die verzögerte bzw. rasche Bildung eines 2,4-Dinitro-phenylhydrazons sowie durch Messung der Absorption im UV bewiesen werden. Dies bestätigt die Befunde von *W. E. Knox* und *B. M. Pitt*¹⁶. Dementsprechend werden zur Reinigung und Aufbewahrung von Lösungen sowie bei der Chromatographie der 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure stets verdünnte Säuren herangezogen¹⁷.

Zur Synthese des 4-Hydroxybenzaldehyds-(carbonyl-¹⁴C)

Die Synthese des 4-Hydroxybenzaldehyds-(carbonyl-¹⁴C) wurde bereits von *K. Kratzl* und *G. Billek*¹⁸ beschrieben. Mittlerweile konnte die Synthese der als Vorstufe dienenden 4-Benzoyloxy-benzoesäure-(carboxyl-¹⁴C) weitgehend verbessert werden, so daß Ausbeuten bis zu 80% erzielbar sind. Das 4-Benzoyloxy-benzoylchlorid-(carbonyl-¹⁴C) wurde wie üblich durch Umsetzung mit Thionylchlorid erhalten. Die Reduktion zum 4-Benzoyloxy-benzaldehyd-(carbonyl-¹⁴C) war bisher nach *Rosenmund* durchgeführt worden. Nach *H. C. Brown* und *R. F. McFarlin*¹⁹ können Aldehyde aus den entsprechenden Säurechloriden einfacher mittels Lithium-tri-(tert.-butoxy)-aluminiumhydrid hergestellt werden. Dieses Verfahren ließ sich auch für die Synthese des 4-Hydroxybenzaldehyds erfolgreich anwenden. Die Ausbeute an eingesetzter Aktivität ist weitaus größer als bei der *Rosenmund*-Reduktion, da die nicht umgesetzte Säure zurückgewonnen werden kann.

Abschließend wird die vollständige Synthese der 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure-(3-¹⁴C) formelmäßig wiedergegeben:

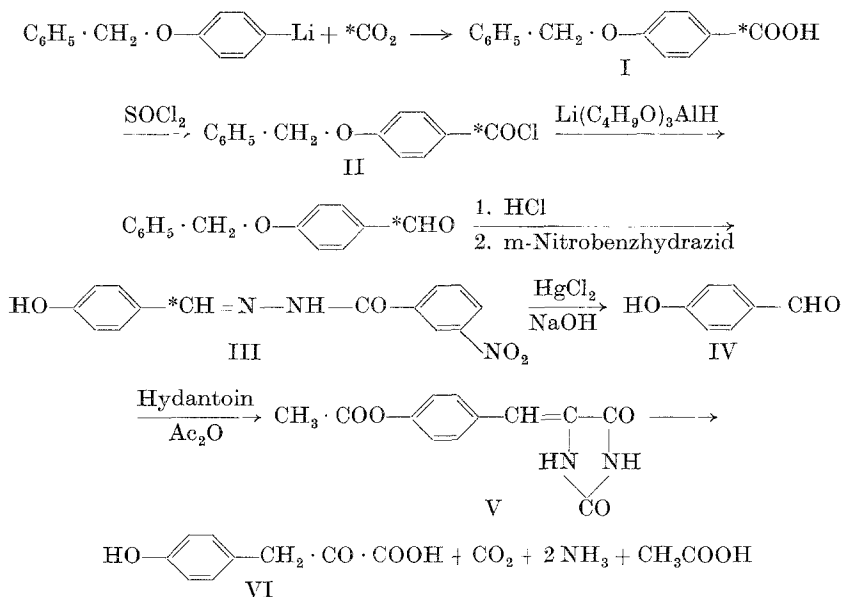
¹⁵ *G. Billek*, unveröffentlicht.

¹⁶ *W. E. Knox* und *B. M. Pitt*, *J. biol. Chem.* **225**, 675 (1957).

¹⁷ Nähere Angaben siehe *E. F. Herrmann*, Dissertation Univ. Wien, 1958.

¹⁸ *K. Kratzl* und *G. Billek*, *Mh. Chem.* **85**, 845 (1954).

¹⁹ *H. C. Brown* und *R. F. McFarlin*, *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 252 (1956).



Experimenteller Teil

4-Benzyl-oxy-benzoesäure-(carboxyl-¹⁴C) (I): Die Umsetzung von 4-Jodphenyl-benzyläther mit n-Butyllithium zum 4-Lithium-phenyl-benzyläther sowie die anschließende Carboxylierung wird in einer Universalapparatur für Synthesen mit ¹⁴CO₂ durchgeführt²⁰.

Das Reaktionsgefäß wird mit 1,55 g (= 5 mMole) 4-Jodphenylbenzyläther²¹ in 20 ml absol. Äther, der Kolben des Gasentwicklers mit 492 mg BaCO₃ (= 2,5 mMole) einer Aktivität von 1 mC und der Tropftrichter mit 10 ml konz. H₂SO₄ beschickt. Nun wird die Apparatur mit trockenem Stickstoff gespült, die magnetische Rührung eingeschaltet und die Lösung von 4-Jodphenyl-benzyläther mittels Trockeneis-Aceton gekühlt, wobei der 4-Jodphenyl-benzyläther auskristallisiert. Durch den Tropftrichter läßt man eine Lösung von 320 mg (= 5 mMole) Butyllithium²² in Äther rasch zufließen. Die hellviolette Lösung wird ohne Entfernen des Kältebades 10 Min. gerührt und daraufhin sofort mit flüssiger Luft ausgefroren. Die gesamte Apparatur wird auf 0,001 Torr evakuiert, von der Pumpe abgeschaltet und die flüssige Luft durch ein Aceton-Trockeneis-Bad ersetzt.

Sobald sich das Gemisch hinreichend verflüssigt und die Rührung in Gang kommt, wird in der abgeschlossenen Apparatur das Kohlendioxyd binnen 5 Min. entwickelt. Um die letzten Reste Kohlendioxyd im Reaktionsgefäß

²⁰ K. Kratzl und G. Billek, *Holzforschung* **7**, 66 (1953); M. Calvin, *Isotopic Carbon*, S. 179 ff. New York: J. Wiley and Sons Inc. 1949; G. Billek, *Atompraxis* **4**, 270, 371 (1958).

²¹ D. Matheson und H. McCombie, *J. Chem. Soc. [London]* **1931**, 1103.

²² *Organic Reactions*, Bd. VI, S. 352.

zu kondensieren, wird dieses neuerlich mit flüssiger Luft gekühlt und das Zeretzungsgefäß mit siedendem Wasser erhitzt. Unter ständigem Rühren läßt man auf etwa 0° erwärmen.

Die Apparatur wird mit Stickstoff bis zu Normaldruck gefüllt, die hellviolette trübe Lösung mit 40 ml Äther verdünnt und mit 20 ml verd. HCl (1:1) versetzt. Die wäßr. Phase wird mit insgesamt 120 ml Äther ausgeschüttelt, die äther. Lösung mit 150 ml n KOH in mehreren Anteilen ausgezogen. Die Lösung des Kaliumsalzes wird filtriert, durch Erwärmen vom gelösten Äther befreit und mit HCl angesäuert. Ausb.: 428,5 mg (= 76%) vom Schmp.: 186—193°.

4-Benzoyloxy-benzoylchlorid-(carbonyl-¹⁴C) (II): 428,5 mg 4-Benzoyloxy-benzoesäure-(carboxyl-¹⁴C) werden mit 3 ml frisch destilliertem Thionylchlorid in einem 50 ml-Rundkolben 1½ Stdn. auf 65° erwärmt. Man entfernt überschüssiges Thionylchlorid durch Überleiten eines Stickstoffstromes und trocknet über Natriumhydroxyd. Die Ausbeute ist praktisch quantitativ; eine Reinigung ist zur weiteren Verarbeitung nicht nötig.

m-Nitrobenzhydrazon des 4-Hydroxy-benzaldehyds-(carbonyl-¹⁴C) (III): 468 mg (= 1,9 mMole) 4-Benzoyloxy-benzoylchlorid-(carbonyl-¹⁴C) werden in 25 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst, mit flüssiger Luft eingefroren und rasch mit 966 mg (= 3,8 mMole) Lithium-tri-(tert.-butoxy)-aluminiumhydrid¹⁹ überschichtet. Die flüssige Luft wird durch ein Trockeneis-Aceton-Kühlbad ersetzt und die magnetische Rührung eingeschaltet, wobei alsbald Verflüssigung des Kolbeninhaltes eintritt. Man läßt das Kühlbad innerhalb von 2 Stdn. auf ungefähr —10° erwärmen. Die nun klare Lösung wird mit 3 ml konz. HCl in 30 ml Wasser versetzt und mit insgesamt 75 ml Äther ausgeschüttelt. Die äther. Lösung wird mit 75 ml n KOH in mehreren Anteilen ausgeschüttelt. Durch Ansäuern dieser Lösung können ungefähr 50—55% reiner 4-Benzoyloxy-benzoesäure-(carboxyl-¹⁴C) zurückgewonnen werden. Die äther. Lösung des 4-Benzoyloxy-benzaldehyds-(carbonyl-¹⁴C) wird ohne Trocknen in einem hinreichend großen Rundkolben zur Trockne gedampft. Die anfallende halbfüssige Kristallmasse wird mit 75 ml Wasser und 75 ml konz. HCl versetzt, der Kolben mit einem absteigenden Kühler versehen und im Stickstoffstrom 1½ Stdn. zum Sieden erhitzt. Die filtrierte Lösung wird mit 40-proz. NaOH neutralisiert, mit einigen Tropfen Essigsäure angesäuert und noch heiß mit 500 mg m-Nitrobenzhydrazid in heißem Wasser gefällt. Nach guter Kühlung saugt man ab und erhält so 211 mg (= 39% d. Th.) vom Schmp. 282—284° (III).

4-Hydroxy-benzaldehyd-(carbonyl-¹⁴C)²³ (IV): 211 mg (= 0,74 mMole) m-Nitrobenzhydrazon werden in 20 ml 2 n NaOH gelöst, zum Sieden erhitzt und tropfenweise mit 2,96 ml (= 1,48 mMole) m/2 Quecksilber(II)-chlorid-Lösung (unter Zusatz von NaCl Bildung des leichter löslichen Na₂[HgCl₄]) versetzt. Hierbei wird unter Stickstoffentwicklung das Hydrazon rasch gespalten. Die erhaltene Lösung wird vom Quecksilber filtriert, auf pH = 7 gebracht und mit Äther erschöpfend extrahiert. Es werden so 90 mg (= 99% d. Th.) kristalliner 4-Hydroxy-benzaldehyd-(carbonyl-¹⁴C) vom Schmp. 115—116° erhalten.

4-Acetoxybenzal-¹⁴C-hydantoin (V): In einem kleinen Rundkolben werden 90 mg (= 0,737 mMole) 4-Hydroxybenzaldehyd-(carbonyl-¹⁴C), 81 mg

²³ H. Silbernagel, Mh. Chem. 86, 256 (1955).

(= 0,81 mMole) Hydantoin und 110 mg wasserfreies Natriumacetat mit 0,5 ml Essigsäureanhydrid 3 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt. Danach wird das Reaktionsprodukt mit 2 ml Wasser übergossen und nach Zerkleinern des Kristallklumpens mehrere Stdn. bei Zimmertemperatur belassen. Die Ausbeute beträgt 180 mg (= 99% d. Th.) eines für die Weiterverarbeitung genügend reinen Produktes vom Schmp. 200—230°.

Eine inaktive Probe dieser Verbindung wurde aus Eisessig mit einem Schmp. von 236° erhalten.

$C_{12}H_{10}N_2O_4$. Ber. C 58,53, H 4,09.
Gef. C 58,88, 58,77, H 4,27, 4,23.

4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure-(3-¹⁴C) (VI): 180 mg 4-Acetoxy-benzal-¹⁴C-hydantoin werden in einen dreifach tubulierten, mit Tropftrichter, Rückflußkühler und Gaseinleitungsrohr versehenen Rundkolben eingetragen. Unter Einleiten eines sauerstofffreien Stickstoffstromes läßt man 15 ml einer 40-proz. NaOH einfließen. Der Kolbeninhalt wird magnetisch gerührt und in einem Bad von 150—160° 3 Stdn. zum Sieden erhitzt. Unter ständigem Rühren und guter Kühlung werden 13 ml konz. HCl langsam zugesetzt; die Lösung wird mittels Natriumbicarbonat auf ein pH von etwa 7 gebracht. Eine mehrstündige Extraktion mit peroxydfreiem Äther entfernt Spuren phenolischer Verunreinigungen. Danach säuert man mit konz. HCl stark an und extrahiert neuerlich erschöpfend mit Äther. Die äther. Lösung wird ohne vorheriges Trocknen bei möglichst tiefer Temperatur abgedampft und der Rückstand im Exsikkator getrocknet. Der hellgelbe kristalline Rückstand wird in 10 Teilen Wasser gelöst (sehr langsame Lösung) und mit 1 Teil konz. HCl versetzt. Nach längerer Kühlung (mindestens 12 Stdn.) werden 79 mg (= 60% d. Th.) 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure-(3-¹⁴C) vom Schmp. 210—215° erhalten. Durch Kühlen der Mutterlauge wird eine zweite Fraktion gewonnen.

Für eine weitere Reinigung ist Lösen in 10 Teilen Eisessig und Versetzen mit 10 Teilen konz. HCl empfehlenswert; das Absaugen soll nach etwa 1stdg. Kühlen erfolgen.

Papierchromatographie: Für die Reinheitsprüfung bewährte sich die aufsteigende Papierchromatographie unter Verwendung von n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1 als Steigflüssigkeit. Sprühreagens: diazotiertes p-Nitroanilin²⁴ bzw. 2,4-Dinitrophenylhydrazin (0,2% in 2 n HCl). Bei Verwendung von S & S 2043 b fanden wir folgende R_f -Werte: 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure 0,72, 4-Hydroxybenzaldehyd 0,87, 4-Hydroxybenzoesäure 0,86, 4-Hydroxy-phenyllessigsäure 0,82. Unbekannte Zersetzungsprodukte der 4-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure besaßen die R_f -Werte 0,0, 0,22 und 0,32.

Herrn Prof. Dr. K. Kratzl danken wir für sein stetes Interesse und wertvolle Diskussion. Der Österreichischen Gesellschaft für Holzforschung gilt unser Dank für die Unterstützung dieser Arbeit.

²⁴ H. G. Bray, W. V. Thorpe und K. White, Biochem. J. **46**, 271 (1950).