

Über die Wirkungen von Aldehyden auf gesunde und maligne Zellen, 2. Mitt.:

Synthese von homologen 4-Hydroxy-2-alkenalen, I.

Von

H. Esterbauer und W. Weger

Aus der Lehrkanzel für Biochemie der Universität Graz, Österreich

(Eingegangen am 5. Mai 1967)

4-Hydroxy-2-alkenale verschiedener Kettenlänge (C_5-C_{10}) werden in einer mehrstufigen Synthese hergestellt: Alkanal $\rightarrow$ $\rightarrow$ 2-Bromalkanaldimethylacetal $\rightarrow$ 2-Alkenaldimethylacetal $\rightarrow$ $\rightarrow$ 4-Brom-2-alkenaldimethylacetal $\rightarrow$ 4-Hydroxy-2-alkenaldimethylacetal $\rightarrow$ 4-Hydroxy-2-alkenal.

In der ersten Mitteilung dieser Reihe¹ berichteten wir über die wichtigsten biologischen, insbesondere carcinostatischen Eigenschaften von 4-Hydroxyoctenal, einer Substanz, die sich bei der Autoxydation ungesättigter Fette in Gegenwart von Wasser bildet². Da Octanal, Octenal und Hydroxyoctenal-dimethylacetal sowohl bei in vitro- als auch bei in vivo-Versuchen keine oder nur geringe (Octenal) Hemmaktivität gegen Tumorzellen zeigen³, muß als wirksames Prinzip des Hydroxyoctenals die Gruppierung $-CHOH-CH=CH-CHO$ angesehen werden. Die Doppelbindung muß sich in *trans*-Stellung befinden, da bei *cis*-ständiger Doppelbindung eine innere Acetalisierung unter Ausbildung des furanoiden Rings eintritt.

Die Isolierung der Substanz in reiner Form aus dem Autoxydationsgemisch ist äußerst umständlich und langwierig, zumal die Ausbeuten sehr bescheiden sind: Aus 100 g Linolsäuremethylester erhält man maximal 0,5 g Hydroxyoctenal. Für einen eingehenden biologischen Test der Substanzen mußten jedoch zumindest Gramm-Mengen zur Verfügung

¹ E. Schauenstein, H. Esterbauer, G. Jaag und M. Taufer, Mh. Chem. **95**, 180 (1964).

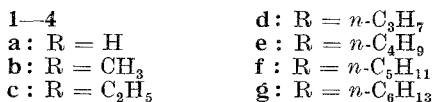
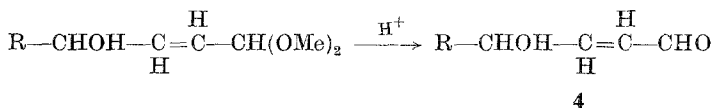
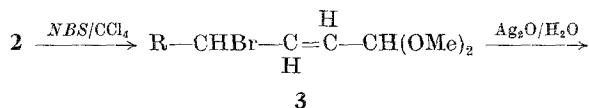
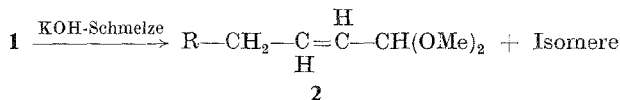
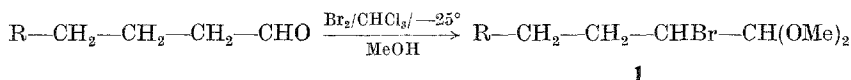
² E. Schauenstein und H. Esterbauer, Fette, Seifen, Anstrichmittel, im Druck (1967). E. Schauenstein, J. Lip. Res., im Druck (1967).

³ D. Conrath, Dissertation, Univ. Graz 1965.

stehen. Ferner war auch die Frage interessant, inwieweit sich verschiedene 4-Hydroxy-alkenale in ihrer Wirkung auf maligne und gesunde Zellen unterscheiden. Wir versuchten daher, diese in der Literatur bisher nicht beschriebenen 4-Hydroxyalkenale synthetisch herzustellen.

Die Suche nach geeigneten Synthesewegen für 4-Hydroxyoctenal bzw. dessen Homologe wurde insoweit erleichtert, als die Eigenschaften des Hydroxyoctenals durch die erwähnten Untersuchungen bereits bekannt waren. Insbesondere war es wertvoll zu wissen, daß sich Hydroxyoctenal in alkalischem Medium ($\text{pH} \geq 12$) innerhalb von Sekunden, im sauren Medium ($\text{pH} \leq 1$) und bei Temperaturen über 80° innerhalb von Stunden zersetzt.

Als gangbarer Weg erwies sich die Umsetzung von 2-Alkenalacetalen (2) mit N-Bromsuccinimid (NBS) zu den 4-Bromalkenaldimethylacetalen (3). Mit feuchtem Silberoxid kann die Bromgruppe gegen Hydroxyl ausgetauscht werden. Das 4-Hydroxyalkenalacetal läßt sich mit verdünnter Citronensäure glatt zum 4-Hydroxy-alkenal (4) hydrolysieren.



Todd und Teich⁴ beschreiben die Bromierung von Crotonaldehyddiäthylacetal mit NBS und erhalten in 19% Ausbeute 4-Bromcrotonaldehyddiäthylacetal. Andere Enalacetale wurden unseres Wissens nicht in Allylstellung bromiert. Wir setzten homologe Alkenaldimethylacetale (2 a—g) mit NBS zu Bromalkenaldimethylacetalen (3 a—g) um. Die Ausbeute lag in allen Fällen unter 20%. Das bei der Reaktion entstehende Hauptprodukt wurde nicht untersucht.

⁴ D. Todd und S. Teich, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 1895 (1953).

Die Verbindungen **3** lassen sich auch durch Umsetzen der entsprechenden 1-Methoxy-1,3-alkadiene mit *NBS* in Methanol darstellen⁵. Über die Ergebnisse dieser Versuche soll später berichtet werden.

Da die Allylbromierung nur mit geringer Ausbeute verläuft, konnte die eben beschriebene Synthese der Verbindungen **4** nur dann erfolgreich sein, wenn **2** nach einem einfachen Verfahren mit guter Ausbeute herstellbar waren. *Bedukian*⁶ berichtet über ein allgemein anwendbares Verfahren zur Herstellung von α,β -ungesättigten Aldehyden, bzw. deren Acetalen. Nach dieser Vorschrift werden gesättigte Aldehyde über die Stufe der Enolacetate in **1** übergeführt. Aus **1** erhält man durch Abspaltung von Brom in Methanol/Butanol **2**. Wir stellten nach dieser Methode die Verbindungen **2 b–f** dar. In keinem Fall gelang es, reine 2-Alkenaldimethylacetale zu synthetisieren, vielmehr erhielten wir stets ein Gemisch von 2-Alkenaldimethylacetal (ca. 50%) und Alkenaldimethylacetal mit Doppelbindung in anderer Lage.

Einfacher läßt sich **2** in Abwandlung des Verfahrens von *Bedukian* auf folgende Weise herstellen: Der gesättigte aliphatische Aldehyd wird mit Brom bei tiefer Temperatur in α -Stellung bromiert^{7, 8}, der Bromaldehyd wird — ohne vorherige Isolierung — mit Methanol acetalisiert. Das Bromalkanaldimethylacetal **1** behandelt man bei Temperaturen über 150° mit geschmolzenem KOH und erhält in guter Ausbeute 2-Alkenaldimethylacetal (**2**). Dieses Verfahren hat gegenüber dem erstgenannten einige Vorteile: Die Darstellung der Enolacetate entfällt, die Ausbeuten sind in allen Fällen besser, das bei der Kalischmelze gebildete Isomerengemisch enthält einen höheren Prozentsatz an 2-Alkenalen, die besonders bei Substanzen **2 a–c** schwierige vollkommene Abtrennung des Butanols entfällt.

Experimenteller Teil

I. Darstellung der 2-Bromalkanaldimethylacetale (**1 a–g**)

Zu einer Lösung von 2 Molen Alkanal in 150 ml CHCl_3 tropft man unter Rühren 2 Mole Brom, gelöst in 100 ml CHCl_3 . Die Temp. soll dabei — 30° nicht übersteigen. Nach beendeter Zugabe rührt man solange bei — 30° weiter, bis die ursprünglich rot gefärbte Lösung gelb geworden ist. Zu dieser Lösung werden unter Rühren bei — 10° 500 ml Methanol zugetropft. Man läßt ca. 24 Stdn. bei Zimmertemp. stehen und gießt dann das Reaktionsgemisch

⁵ W. Flaig, Ann. Chem. **568**, 24 (1950); S. M. Makin und B. K. Kruptsov, Chem. Abstr. **55**, 27 030 (1961).

⁶ P. Z. Bedukian, J. Amer. Chem. Soc. **79**, 889 (1957).

⁷ F. G. Fischer, L. Ertel und K. Löwenberg, Ber. dt. Chem. Ges. **64**, 32 (1931); H. Erlenmeyer und J. P. Jung, Helv. Chim. Acta **32**, 37 (1949); S. M. McElvain und L. R. Morris, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 2657 (1952).

⁸ R. Kuhn und C. Grundmann, Ber. dt. chem. Ges. **70**, 1898 (1937).

unter Rühren zu einer Lösung von 2 Molen Na-Acetat in 1,5 l Wasser. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Na_2CO_3 -Lösung neutralisiert und mit wasserfr. Na_2CO_3 getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert, der Rückstand im Wasserstrahlvak. fraktioniert (vgl. Tab. 1).

II. Darstellung der Alkenaldimethylacetale (2 a—g)

In einen 1 l-Dreihalskolben mit Rührer, Rückflußkühler und Destillationsaufsatz gibt man 1 Mol Bromalkanaldimethylacetal und 400 g KOH. Die Mischung wird am Ölbad unter Rühren auf 155° (Badtemp.) erwärmt. Der Großteil des KOH wird vom Bromprodukt bei dieser Temp. gelöst (ein Teil wird wahrscheinlich infolge Schmelzpunktserniedrigung bereits bei 150° schmelzen), so daß man eine nahezu homogene Mischung erhält. Sobald der Großteil des KOH gelöst ist, setzt die HBr-Abspaltung ein. Die Reaktion verläuft stark exotherm und kann unter Umständen so heftig werden, daß der Destillationsaufsatz das gebildete Alkenaldimethylacetal nicht bewältigen kann. Aus diesem Grund ist ein zusätzlicher Rückflußkühler zur Sicherheit unbedingt empfehlenswert.

Bei Einsatz von 1 a—d destillieren die gebildeten Verbindungen 2 a—d innerhalb von 30 Min. zum Großteil ab. Der Rest wird bei 200—100 mm Hg abgesaugt, gleichzeitig wird die Badtemp. auf 200° gesteigert. Bei Einsatz der Verbindungen 1 e—g rührt man 1 Stde. bei 160° und destilliert anschließend die gebildeten Verbindungen 2 e—g bei 200—100 mm Hg; gegen Ende steigert man die Badtemp. auf 200° . Im Rückstand bleibt ein festes dunkelbraunes Gemisch aus KOH und KBr, das nur wenig 1 bzw. 2 enthält. Das Destillat wird mit Na_2CO_3 getrocknet und mit einer gut wirksamen Kolonne fraktioniert (vgl. Tab. 1 u. Tab. 4).

Bestimmung des Gehaltes an 2-Alkenaldimethylacetal:

10–3 Mole Alkenaldimethylacetal (Isomerengemisch) werden in einem Schliffkölbchen eingewogen und mit 10 ml 10proz. wäßr. Citronensäure versetzt. Bei Verbindung 2 a—c läßt man 30 Min. bei Zimmertemp. stehen, bei Verbindung 2 d—g schüttelt man 30 Min. Nach entsprechender Verdünnung (1 ml Probe, 99 ml destill. Wasser, $d = 0,1$ cm), bestimmt man UV-spektroskopisch die Konzentration an Alkenal. Das UV-Absorptionsmaximum α,β -ungesättigter Aldehyde in Wasser liegt bei $44700\text{--}44900\text{ cm}^{-1}$. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt im Mittel ca. 15500.

III. Darstellung der 4-Bromalkanaldimethylacetale 3 a—g

Eine Mischung von 0,25 Molen Alkenaldimethylacetal, 44 g Bromsuccinimid (0,25 Mol), 0,2 g Azoisobutyronitril, 300 ml CCl_4 wird 30 Min. unter Rückfluß gerührt. Der Ansatz verfärbt sich schwach rotbraun. Man kühlt auf -10° ab und filtriert das ausgefallene Succinimid ab. Das Filtrat wird 2mal mit NaHCO_3 -Lösung gewaschen und anschließend mit Na_2CO_3 getrocknet. Man destilliert das Lösungsmittel am Rotavapor ab. Der Rückstand wird im Vak. destilliert. Die bei der Destillation anfallenden 4-Bromalkanaldimethylacetale waren in keinem Fall rein und konnten wegen ihrer Zersetzlichkeit (HBr-Abspaltung) auch durch wiederholtes Destillieren nicht gereinigt werden. Die Ausbeute bzw. Reinheit der Verbindungen 3 wurde durch adsorptive Säulenchromatographie bestimmt (Tab. 2).

Tabelle 1. 2-Bromalkanaldimethylacetale und Alkanaldimethylacetale

Nr.	Formel †	Sdp., °C./Torr	n_D^{20}	d_4^{20}	MR, ber.	MR, gef.	Ausb., % d.Th.	Reinheit *	Schmp. des DNPH **	Ausbeute an DNPH, % d.Th.
1 a	C ₆ H ₁₃ BrO ₂	66/10	1,291	1,309	40,90	40,80	80	—	—	—
1 b	C ₇ H ₁₅ BrO ₂	81/10	1,449	1,256	45,58	45,60	70	—	—	—
1 c	C ₈ H ₁₇ BrO ₂	94—95/10	1,450	1,197	50,20	50,50	68	—	—	—
1 d	C ₉ H ₁₉ BrO ₂	108—110/10	1,451	1,182	54,83	54,70	54	—	—	—
1 e	C ₁₀ H ₂₁ BrO ₂	122—123/10	1,452	1,149	59,43	59,31	81	—	—	—
1 f	C ₁₁ H ₂₃ BrO ₂	135—136/10	1,453	1,131	64,20	64,30	57	—	—	—
1 g	C ₁₂ H ₂₅ BrO ₂	150—152/10	1,488	1,141	68,77	68,44	51	—	—	—
2 a	C ₆ H ₁₂ O ₂	120/760	1,413	0,883	32,73	32,76	50	43	190	40
2 b	C ₇ H ₁₄ O ₂	138—140/760	1,416	0,875	37,34	37,06	75	68	160	75
2 c	C ₈ H ₁₆ O ₂	164/760	1,418	0,873	41,96	41,67	77	68	149	70
2 d	C ₉ H ₁₈ O ₂	73/10	1,422	0,864	46,58	46,57	80	70	131,5	65
2 e	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	88—90/10	1,426	0,864	51,18	50,96	75	65	127	55
2 f	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	100—103/10	1,431	0,864	55,81	55,71	50	53	124	50
2 g	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	115/10	1,436	0,863	62,42	60,64	50	52	129,5	50

* 2,3-Alkanaldimethylacetalgehalt bestimmt nach der Verseifung des Acetals im UV (vgl. exper. Teil).

** DNPH = 2,4-Dinitrophenylhydrazon.

† Die Analyse (CH) ergab Werte, welche mit den für die angegebene Formel ber. innerhalb enger Fehlergrenzen übereinstimmen.

Tabelle 2. 4-Brom-2-alkenaldimethylacetale

Nr.	Formel	Sdp., °C/Torr	Destillat- menge in g*	Reinheit %	n_D^{20}	d_4^{20}
3 a	$C_6H_{11}BrO_2$	40—47/1	13,5	60—70	1,459	1,390
3 b	$C_7H_{13}BrO_2$	55—62/1	20	55—60	1,468	1,342
3 c	$C_8H_{15}BrO_2$	98—103/10	14	60—70	1,471	1,300
3 d	$C_9H_{17}BrO_2$	85—95/1	18	50	1,478	1,309
3 e	$C_{10}H_{19}BrO_2$	95—107/1	20	45	1,448	1,219
3 f	$C_{11}H_{21}BrO_2$	107—120/1	22	40	—	—
3 g	$C_{12}H_{23}BrO_2$	125—135/1	25	35	—	—

* Bei Einsatz von 0,25 Molen **2**.

IV. Darstellung der 4-Hydroxyalkenaldimethylacetale und 4-Hydroxyalkenale (**4**)

a) Zu einer Suspension von Silberoxid (8,5 g $AgNO_3$ in 50 ml Wasser, gefällt mit 2,5 g KOH in 50 ml Wasser, abgenutscht und mit 500 ml Wasser gewaschen) in 50 ml Wasser und 50 ml Aceton gibt man ca. 10 g rohes 4-Bromalkenylldimethylacetal (die bei der Destillation anfallenden Rohprodukte). Die Suspension wird 2 Stdn. bei Zimmertemp. geschüttelt. Silberoxid und AgBr werden abgenutscht, man wäscht mit Aceton den Niederschlag gründlich aus. Das Filtrat versetzt man mit 200 ml Wasser und extrahiert 3mal mit 50 ml $CHCl_3$. Das Lösungsmittelgemisch wird am Rotavapor abdestilliert. **3 a** konnte mit Silberoxid bei Zimmertemp. nicht in die entsprechende Hydroxyverbindung übergeführt werden, bei erhöhter Temp. entstanden andere Produkte. Zur Bestimmung der Ausb. (80—90%) und für die IR-Spektren wurden die Hydroxyalkenylldimethylacetale (200 mg des Rohproduktes) säulenchromatographisch gereinigt. Die wichtigsten IR-Absorptionsbanden der Hydroxyalkenaldimethylacetale gehen aus Tab. 4, Sp. 2, hervor.

b) Das bei a) anfallende Rohprodukt wird mit dem 3fachen Volumen 1proz. wäfr. Citronensäure versetzt und 1 Stde. bei Zimmertemp. geschüttelt. Man extrahiert **4** erschöpfend mit $CHCl_3$. Nach Abdunsten des $CHCl_3$ im Vak. wird der Rückstand in 100 ml Petroläther (*PÄ*) aufgenommen. Die Verbindungen **4** werden mit Wasser erschöpfend extrahiert. Bei **4 b** genügt 3maliges Extrahieren mit je 100 ml H_2O , bei **4 f** muß mindestens 10mal mit je 100 ml H_2O extrahiert werden. Der extrahierte *PÄ* enthält den Hauptteil der Verunreinigungen und wird verworfen. Die Wasserphase enthält **4** mit etwa 70% Reinheit. Der Großteil des Wassers wird im Vak. abdestilliert und **4** erneut mit $CHCl_3$ extrahiert. Der nach Abdestillieren des $CHCl_3$ im Vak. verbleibende Rückstand wird durch multiplikative Verteilung im System $CHCl_3/H_2O$ (für Substanzen **4 b**, **4 c**, **4 d**) bzw. Petroläther/Wasser (für Substanzen **4 e—g**) weiter gereinigt. Als Reinheitskriterium diente die Konstanz des spezif. dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ' bei 45250 cm^{-1} (Alkohol). Die Verbindungen **4** sind farblose, geruchlose Flüssigkeiten. Sie zeigen im UV das für α,β -ungesättigte Aldehyde charakteristische Absorptionsspektrum mit dem Hauptmaximum bei 45250 cm^{-1} und mit einem Vormaximum bei 32000 cm^{-1} (vgl. Tab. 3, oben). Die polarographische Reduktionsstufe $E_{1/2}$ der Verbindungen **4** liegt bei $-1,55\text{ V}$ (Lösungsmittel: Benzol/Methanol 1:1, 0,3*m*-LiCl). Die wichtigsten IR-Absorptionsbanden der Verbindungen **4** sind in Tab. 4, Sp. 3, zusammengefaßt. Zur weiteren Charakterisierung wurden **4 b—g** in die 2,4-Dinitrophenylhydrazone bzw. Semicarbazone übergeführt.

Tabelle 3. 4-Hydroxy-2-alkenale und deren 2,4-Dinitrophenylhydrazone und Semicarbazone

Substanz Nr.		4b	4c	4d	4e	4f	4g
2,4-Dinitro- phenylhydrazon	Formel*	$C_5H_8O_2$	$C_6H_{10}O_2$	$C_7H_{12}O_2$	$C_8H_{14}O_2$	$C_9H_{16}O_2$	$C_{10}H_{18}O_2$
	Ausb., % d. Th. **	9,3	7,1	5,5	7,3	3,1	2,7
	$\epsilon'_{43250}/EtOH$	130	115	102	92,5	84	77
	$\epsilon'_{32000}/EtOH$	0,34	0,31	0,28	0,27	0,24	0,19
	Formel*	$C_{11}H_{12}N_4O_5$	$C_{12}H_{14}N_4O_5$	$C_{13}H_{16}N_4O_5$	$C_{14}H_{18}N_4O_5$	$C_{15}H_{20}N_4O_5$	$C_{16}H_{22}N_4O_5$
Semicarbazon	Schmp., ° C	173	199	179—181	146—147	154—155	141
	$\epsilon_{27000}/CHCl_3$	27 860	28 000	28 500	28 300	28 200	29 300
	$\epsilon_{21900}/alk. KOH$	31 960	32 200	32 500	30 100	30 800	31 900
	Ausb., % d. Th.	85	90	90	90	85	80
Semicarbazon	Formel*	$C_6H_{11}N_3O_2$	$C_7H_{13}N_3O_2$	$C_8H_{15}N_3O_2$	$C_9H_{17}N_3O_2$	$C_{10}H_{19}N_3O_2$	$C_{11}H_{21}N_3O_2$
	Schmp., ° C	170	—	140	139—141	131—134	123—124
	$\epsilon_{38000}/EtOH$	28 500	—	28 000	28 050	28 000	28 300
	Ausb., % d. Th.	75	—	70	75	85	90

* Die Analyse (CH, bei den Derivaten auch N) ergab Werte, welche mit den für die angegebene Formel ber. innerhalb enger Fehlergrenzen übereinstimmen.

** Bezogen auf eingesetztes Alkanal (1).

c) 0,001 Mol Hydroxyalkenaldimethylacetal oder Hydroxyalkenal (**4b—g**) werden im äquimol. Verhältnis mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinreagens (0,1 g 2,4-DNPH, 0,75 ml konz. H_2SO_4 , 7,5 ml Äthanol, 17 ml Wasser) versetzt und einige Min. kräftig geschüttelt. Der Niederschlag wird abgenutscht, mit Wasser säurefrei gewaschen und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (Säule 2 cm $\times$ 50 cm, 20 g Kieselgel, CHCl_3 als Elutionsmittel). Nach der Säulentrennung wird 2mal umkristallisiert (Alkohol/Wasser) (vgl. Tab. 3, Mitte).

Tabelle 4. IR-Absorptionsbanden von Octenaldimethylacetal (**a**), 4-Hydroxy-octenaldimethylacetal (**b**) und 4-Hydroxyoctenal (**c**)*. Lösungsmittel CHCl_3 , $c = 7,5 \cdot 10^{-2}$ m/l

a	b	c	Zuordnung
—	2,82	2,73	OH-Valenz, nicht assoz.
—	2,88	2,85	OH-Valenz, assoz.
3,38	3,44	3,44	CH-Valenz
3,50	3,55	3,50	
—	—	3,65	CH-Valenz der CHO
—	—	5,90	C=O-Valenz der $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$
6,00	6,27	6,07	C=C-Valenz
6,83	6,88	6,85	CH Deform.
7,25	7,26	7,25	
7,36	7,42	—	C—O-Valenz
8,40	8,75	—	
8,85	8,90	8,93	C—O—C-Valenz der Acetalgruppe
9,30	9,35	—	
9,50	9,55	—	
10,33	10,30	10,23	CH wagging $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{C}=\text{C}- \\ \\ \text{H} \end{array}$
10,50	10,50	—	

* Homologe Verbindungen unterscheiden sich nur in den durch den Paraffinrest bewirkten Banden.

d) Zu einer gesätt. wäßr. Lösung von Hydroxyalkenal (**4b—g**) gibt man festes Semicarbazidhydrochlorid (1,5fache Menge) und überläßt die Lösung 24 Stdn. bei Zimmertemp. sich selbst. Der Niederschlag wird abgesaugt und 2mal aus Wasser umkristallisiert (vgl. Tab. 3, unten).

Die Arbeit wurde unterstützt durch eine Subvention des Österreichischen Forschungsrates, Wien.