

Summary of statistical data

Concentration of phenobarbital (g/l)	Mean frequency without phenobarbital	Heart-beats/min with phenobarbital	Mean decrease (%)	Calculated decrease (%)	S.D. (%)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
2.9	494	282	42.9	43.2	3.4
2.9×10^{-1}	494	300	39.4	37.2	2.6
2.9×10^{-2}	504	348	30.8	31.3	2.5
2.9×10^{-3}	498	372	25.4	25.3	4.0
2.9×10^{-4}	510	414	19.0	19.3	2.6
0.0	510	426	17.1	—	3.3

In column (2) and (3) data are pooled from 8 animals, each measured 5 times during 10 sec, hence $n = 40$. Regression line (without zero concentration): % decrease = $40.4 + 5.97 \log \text{concentration}$. S.D. in the coefficient: 0.16. Multiple correlation coefficient: 0.94.

precise (S.D. $\pm 22\%$, $n = 4$ for 1 *D. pulex*) and as yet we have no experience with the electro-cardiogram method². 3. The actual experiment is quite simple, as is the electronic apparatus used (Figures 1 and 2). 4. By connecting the output of the amplifier to a recorder, one can obtain an 'optical cardiogram' (see inlay Figure 1b). 5. To draw a comparison between invertebrates and mammals concerning the physiological effects of phenobarbital is to invite more complex questions far beyond the scope of this study. However, proving that the heart frequency

of *Daphnia* is useful as a biological parameter in a test for phenobarbital suggests the possibility that *Daphnia* or other similarly 'simple organisms' would be useful in comparative biological studies of other drugs and hormones.

Zusammenfassung. Neue Methode zur exakten Bestimmung der Herzschlagfrequenz transparenter Wasserorganismen (*Daphnia pulex* 500/min) über einen Mikroprojektor bei Anwendung einer vom Licht abhängigen Resistenz (LDR).

TH. J. POSTMES, G. NACKEN and R. G. NELISSEN⁴

⁴ We should like to thank LLOYD C. EDMUNDS for critical reading and translation aid.

St. Annadal Hospital, Department of Medical Physics, Maastricht (The Netherlands), 4 October 1973.

Zur Synthese der *m*-Aminophenylboronsäure, Effektor in der Affinitätschromatografie von Nukleinsäuren

Affinitätschromatografische Trennverfahren haben in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Polynucleotide zunehmend an Bedeutung gewonnen. Hochspezifische Trennungen konnten unter anderem auf Basis der Wechselwirkungen zwischen komplementären Nucleobasen¹ sowie zwischen Oligo- und Polynucleotiden mit hydrophoben Substituenten und tritylierten oder benzylierten Cellulosen² erzielt werden. Um aus einem Gemisch von Mono- oder Oligonucleotiden solche mit terminaler *α*-s-Diolgruppe zu trennen, bedient man sich mit Vorteil ihrer Wechselwirkung mit Polymeren, die Boronatgruppen enthalten. Diese Art von Affinitätstrennung wurde zum Beispiel eingesetzt, um 3'-terminale Fragmente von Polyribonucleotiden zu analysieren³ oder um Desoxyoligonucleotide mit Ribo-Terminus aus einem Gemisch mit Desoxy-Oligomeren gleicher Kettenlänge abzusondern⁴. Die benötigten Säulenmaterialien wurden entweder durch Umsetzung hydrophiler Polymerer mit *m*-Succinylaminophenylboronsäure⁵ oder durch Copolymerisation von *m*-Methacryloylaminophenylboronsäure mit geeigneten Vernetzern⁶ gewonnen. In beiden Fällen dient *m*-Aminophenylboronsäure als Effektorgruppe. Für diese Schlüsselsubstanz haben wir einen einfachen Syntheseweg entwickelt, der von preisgünstigen Reagenzien ausgeht.

Ergebnisse. Der Weg, den wir zur Synthese von *m*-Aminophenylboronsäure beschritten haben, ist in Schema aufgezeichnet. Als Ausgangsmaterial diente *m*-Bromanilin (I), das zunächst am Stickstoffatom mit Trimethylsilylschutzgruppen versehen wurde⁷. Eine Grignard-Reaktion

¹ H. TUPPY und E. KÜCHLER, *Mh. Chem.* 95, 1961 (1964). – H. SCHOTT und G. GREBER, *Makromolek. Chem.* 149, 253 (1971). – C. ATELL und M. SMITH, *J. biol. Chem.* 246, 1944 (1971).

² P. J. CASHION, M. FRIDKIN, K. L. AGARWAL, E. JAY und H. G. KHORANA, *Biochemistry* 12, 1985 (1973). – J. J. MICHNIEWICZ, O. S. BHANOT, J. GOODCHILD, S. K. DHEER, R. A. WIGHTMAN und S. A. NARANG, *Biochim. biophys. Acta* 224, 626 (1970).

³ M. ROSENBERG, J. L. WIEBERS und P. T. GILHAM, *Biochemistry* 11, 3623 (1972).

⁴ H. SCHOTT, E. RUDLOFF, P. SCHMIDT, R. ROYCHOUDHURY und H. KÖSSEL, *Biochemistry* 12, 932 (1973). – T. F. MCCUTCHAN und P. T. GILHAM, *Biochemistry* 12, 4840 (1973). – H. SELIGER, G. AUMANN, V. GENRICH, M. PHILIPP und E. RÖSSNER, *Kurzmitteilungen, XXIV. Int. Kongress für Reine und Angew. Chemie, Hamburg (1973)*, p. 136.

⁵ H. L. WEITH, J. L. WIEBERS und P. T. GILHAM, *Biochemistry* 9, 4396 (1970).

⁶ H. SCHOTT, *Angew. Chem.* 84, 819 (1972); *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* 11, 824 (1972).

⁷ W. BROSER und W. HARRER, *Angew. Chem.* 77, 1139 (1965); *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* 4, 1081 (1965).

des Zwischenprodukts (II) mit Tri-*n*-butyl-borat⁸ führte dann zum Ersatz des Bromatoms durch eine Boronatgruppe. Die abschliessende Behandlung mit verdünnter Säure entfernte die Schutzgruppen und lieferte das gewünschte Produkt (III). *m*-Aminophenylboronsäure wurde direkt in reiner Form erhalten und war in der Dünnschichtchromatografie und in ihren spektroskopischen Eigenschaften identisch mit einem handelsüblichen Vergleichspräparat.

Die bisher allgemein angewandte Methode zur Darstellung von (III) geht von der Nitrierung und Reduktion von Phenylboronsäure aus^{8,9}. Unser Syntheseweg liefert ausbeutemässig ein vergleichbares Ergebnis, stellt jedoch insofern eine Vereinfachung dar, als die Trennung isomerer Nitrierungsprodukte und die katalytische Hydrierung vermieden werden. Er eignet sich somit besonders für Synthesen in grösserem Maßstab. Da angenommen werden kann, dass *o*- und *p*-Bromanilin sowie verwandte Verbindungen in ähnlicher Weise reagieren, dürfte ein allgemein anwendbarer Zugang zu Aminoarylboronsäuren vorliegen.

Material und Methode. Phenyllithium¹ und Tri-*n*-butylborat¹⁰ wurden nach Literaturvorschriften hergestellt. *m*-Bromanilin und Trimethylchlorsilan waren Produkte der Firma E. Merck, Darmstadt. *m*-Aminophenylboronsäurehemisulfat als Vergleichspräparat wurde von Aldrich erhalten. Alle Lösungsmittel waren destilliert und getrocknet. Die Reaktionsprodukte wurden durch IR- (Perkin Elmer Infracord), UV-Spektroskopie (Zeiss DMR 21 und PMQ 2) und Elementaranalyse¹¹ charakterisiert. Zur Chromatografie wurden Kieselgel-Dünnschichtfolien der Firma Schleicher-Schüll, Dassel, verwendet.

N, N-bis-(Trimethylsilyl)-3-bromanilin (II). Ein Dreihalskolben wurde mit Gaseinleitungsrohr, Tropftrichter und Rückflusskühler versehen. Der Kolben wurde mit einer Lösung von 157 g (1,86 Mol) Phenyllithium in 1500 ml Äther beschickt. 153 g (0,93 Mol) *m*-Bromanilin, gelöst in 200 ml Äther, wurden unter Rühren zutropft. Danach wurde noch 1 h weitergerührt. Während der gesamten Reaktionsdauer wurde ein schwacher Stickstoffstrom durch den Reaktionskolben geleitet. Zur Reaktionsmischung fügten wir dann nach und nach 109 g (128 ml = 1 Mol) Trimethylchlorsilan zu, wobei die Mischung bei gelindem Rückfluss gehalten wurde. Nach weiteren 2 h am Rückfluss wurde alles Lösungsmittel abdestilliert und durch 500 ml *n*-Heptan ersetzt. Die Suspension wurde erneut zum Rückfluss aufgeheizt, weitere 130 g (153 ml = 1,2 Mol) Trimethylchlorsilan zugesetzt und 15 h weitergekocht. Anschliessend wurden die Lithiumsalze unter Feuchtigkeitsausschluss abgesaugt, das Produkt vom Lösungsmittel befreit und zweimal im Hochvakuum fraktioniert (Sdp. 64–66°/0,2 mm, $n_D^{20} = 1,5393$).

Ausbeute: 150 g (60% d. Theor., bezogen auf *m*-Bromanilin). Analyse: C₁₂H₂₂BrNSi₂ (316,4); Ber.: Br 25,2% Gef.: Br 22,3%. IR: 3020 cm⁻¹ (Ar-H); 1600 cm⁻¹, 1480 cm⁻¹, 1460 cm⁻¹ (Phenyl-); 760 cm⁻¹ und Ar-H-Banden charakteristisch für *m*-Substitution bei 1740–1930 cm⁻¹.

Die Grignard-Verbindung von (II) wurde hergestellt, indem eine Lösung von 64 g (0,2 Mol) (II) in 250 ml Tetrahydrofuran zu einer Suspension von 5,4 g Magnesium in 20 ml Tetrahydrofuran zutropft wurde. Die Temperatur im Kolbeninnern wurde dabei auf 30–40° gehalten und ein schwacher Stickstoffstrom durchgeleitet. Der Ansatz wurde eine weitere Stunde lang bei 35° belassen, dann das Grignard-Reagens durch Glaswolle direkt zur Weiterverarbeitung in einen Tropftrichter filtriert.

Für die folgende Umsetzung benutzten wir eine Apparatur ähnlich der für die Synthese von (II) beschriebenen, wobei jedoch die Gaseinleitung durch KPG-Rührer und Thermometer ersetzt war. 46 g (0,2 Mol) frisch destilliertes *n*-Butyl-borat in 100 ml Äther wurden vorgelegt und der Kolbeninhalt auf –85° abgekühlt. Die Lösung des Grignard-Reagens von (II) wurde tropfenweise zugesetzt, wobei die Temperatur auf –85° bis –80° gehalten wurde. Nach Beendigung der Reaktion liessen wir den Ansatz über Nacht auf Raumtemperatur kommen. Die Trimethylsilylgruppen wurden durch Eingiessen in eine Mischung von 15 g konzentrierter Schwefelsäure und 15 g Eis hydrolysiert. Die Wasserphase (pH < 4!) wurde mit Äther ausgezogen, bis die Ätherwäsche farblos bleibt. Dann wurde langsam verd. wässrige Kalilauge in den Scheidetrichter hinzugefügt, bis alle Nebenprodukte in den Äther übergehen und *m*-Aminophenylboronsäure als einziges Produkt in der Wasserphase bleibt. Dieser Vorgang wurde durch Dünnschichtchromatografie verfolgt (Rf von (III) in Äthylacetat/Tetrahydrofuran 4/1 = 0,59).

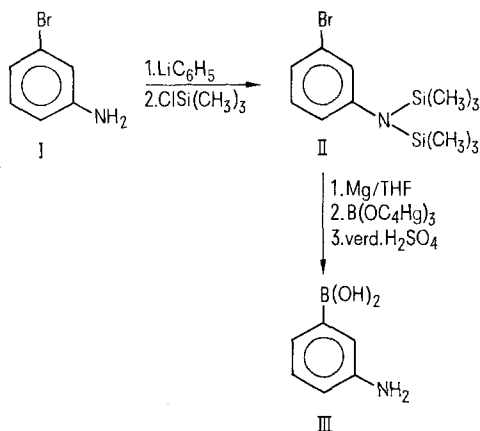
Die Ätherphase wurde nochmals mit Wasser rückextrahiert, und die vereinigte Wasserphase mit Kalilauge auf pH 7 eingestellt. Beim Einengen der Lösung fällt die *m*-Aminophenylboronsäure aus; sie wurde ins Hemisulfat überführt und durch Lyophilisieren aus Dioxan trocken als cremefarbenes Pulver erhalten.

Ausbeute: 21 g [45% d. Theor., bezogen auf (II)], Analyse: C₆H₁₀BNO₆S (235,04); Ber.: C 30,66%, H 4,29%, N 5,96%; Gef.: C 30,91%, H 5,15%, N 5,81%. IR: 3300 cm⁻¹ (B-OH¹²); 1620 cm⁻¹, 1680 cm⁻¹, 1500 cm⁻¹, 1450 cm⁻¹ (Phenyl-, -NH₂⁺); 1380 cm⁻¹ (B-O¹²); 760 cm⁻¹ (Ar-H, *m*-Substitution). UV: (in Methanol: $\lambda_{max} = 288$ und 237 nm, $\lambda_{min} = 274$ nm).

Summary. A new synthesis of *m*-aminobenzene boronic acid is described. The title compound is obtained by Grignard reaction of *N*-bromoaniline with tri-*n*-butyl borate.

H. SELIGER und V. GENRICH¹³

Institut für Makromolekulare Chemie der Universität
Freiburg, Stefan-Meier-Strasse 31, D-78 Freiburg
(BRD), 23. Juli 1974



⁸ F. R. BEAN und J. R. JOHNSON, J. Am. chem. Soc. 54, 4415 (1932).

⁹ W. SEAMAN und J. R. JOHNSON, J. Am. chem. Soc. 53, 711 (1931).

¹⁰ Organic Synthesis, (Ed. A. H. BLATT; J. Wiley & Sons, New York 1955, vol. 2, p. 517).

¹¹ Herrn O. WINDSCH danken wir für die Elementaranalyse.

¹² H. R. SNYDER, M. S. KONECKY, W. J. LENNARZ, J. Am. chem. Soc. 80, 3611 (1958).

¹³ Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe.