

276. Heinrich Hellmann und Wolf-Dieter Vigelius: Synthese von Phosphorsäureestern der 3-Oxy-anthranilsäure

[Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen]

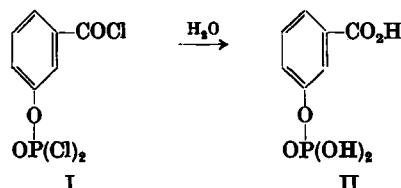
(Eingegangen am 20. September 1955)

*Herrn Professor Dr. Dr. h. c., Dr. h. c. Walter Schoeller
zum 75. Geburtstag gewidmet*

Zum Zwecke der Konstitutionsermittlung eines von H. Hellmann und O. Wiss aufgefundenen Metaboliten des Tryptophans wurden Phosphorsäureester der 3-Oxy-anthranilsäure durch Umsetzung von 2-Nitro-3-oxy-benzoësäure mit Phosphorpentachlorid, Hydrolyse des Produktes und Reduktion des Hydrolysates ohne Isolierung von Zwischenprodukten dargestellt.

Durch papierchromatographische Analyse fanden H. Hellmann und O. Wiss¹⁾ nach Einwirkung von Rattenleberhomogenat auf Tryptophan, Kynurein oder Anthranilsäure einen Stoff, welcher auf Grund seiner Farbreaktionen auf dem Papier vor und nach Hydrolyse sowie der Deutung seiner UV- und IR-Spektren mit Vorbehalt als Phosphorsäureester der 3-Oxy-anthranilsäure (VI) angesprochen wurde. Da aus den fermentativen Ansätzen nur Bruchteile eines Milligramms von dem neuen Metaboliten erhalten wurden, welche sich nicht zur Kristallisation bringen ließen, wurde die Synthese von Vergleichspräparaten angestrebt. In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese des primären und sekundären Phosphorsäureesters der 3-Oxy-anthranilsäure beschrieben.

Die Bemühungen, den primären Phosphorsäureester der Oxyanthranilsäure durch Umsetzung von Monochlorphosphorsäure-dibenzylester mit dem Natriumsalz der 2-Nitro-3-oxy-benzoësäure und Hydrierung des Reaktionsproduktes darzustellen, waren vergeblich. Sämtliche Ansätze führten zu explosionsartiger Zersetzung unter Bildung von Ekzeme erzeugenden Produkten. Dagegen gelang die Synthese nach einem Verfahren von R. Anschütz und G. D. Moore²⁾, die bei Einwirkung von Phosphorpentachlorid auf *m*-Oxybenzoësäure das Trichlorid I erhielten, welches aus dem Reaktionsgemisch herausdestilliert und durch Eintragen in Wasser zum gut kristallisierenden Phosphorsäureester der *m*-Oxybenzoësäure (II) hydrolysiert werden konnte.



¹⁾ a) H. Hellmann u. O. Wiss, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **10**, 216 [1952];
b) O. Wiss u. H. Hellmann, *Z. Naturforsch.* **8b**, 70 [1953].

²⁾ Liebigs Ann. Chem. **289**, 336 [1887].

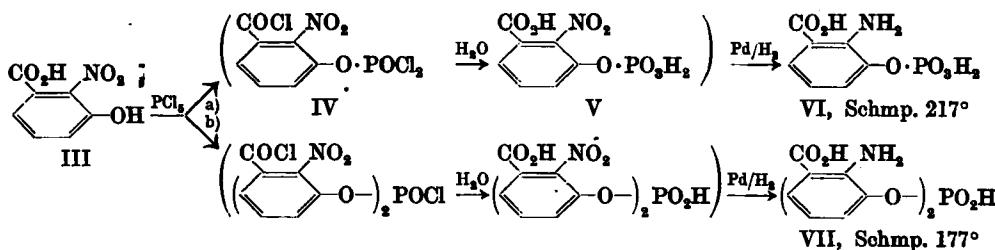
Die Übertragung der Methode auf die 2-Nitro-3-oxy-benzoësäure (III) bringt beträchtliche Schwierigkeiten mit sich. Das entsprechende nitrierte Trichlorid (IV) kann nicht unzersetzt destilliert werden. Bei jedem Destillationsversuch erfolgte Explosion. Aus diesem Grunde wurde auf seine Isolierung verzichtet und das nach Absublimieren des überschüssigen Phosphor-pentachlorids erhaltene klare braune Öl mit wenig Wasser hydrolysiert. Bei Einengen des Hydrolysats fiel ein glasiger brauner Rückstand an, aus welchem der Phosphorsäureester der 2-Nitro-3-oxy-benzoësäure (V) trotz aller Reinigungsmaßnahmen nicht in kristallisierter Form isoliert werden konnte. Schließlich wurden auch in dieser Synthesestufe die Versuche zur Isolierung eines definierten Produktes aufgegeben. Das Hydrolysat gelangte unmittelbar zur Reduktion. Behandlung mit Zink und Salzsäure sowie mit Raney-Nickel und Wasserstoff führte zu nichttrennbaren Gemischen. Dagegen schieden sich nach der katalytischen Hydrierung mit Palladiummohr beim Einengen der wäßrigen Lösung, welches zur Schonung der Substanz bei Zimmertemperatur vorgenommen wurde, Kristalle ab. Mehrmaliges Umkristallisieren aus Alkohol führte zu farblosen Nadeln, welche sich bei 161° braun färben und sich bei 177° unter Gasentwicklung zersetzen.

Die Substanz erwies sich in der papierchromatographischen Analyse als einheitlich; sie ist durch ihre intensive blaue Fluoreszenz im gefilterten UV-Licht leicht zu erkennen. Bei Hydrolyse mit 2n HCl geht sie in 3-Oxy-anthraniolsäure und Phosphorsäure über, wie sich papierchromatographisch leicht nachweisen läßt¹⁾. Beim Diazotieren und Kuppeln mit Äthyl- α -naphthylamin auf dem Papier liefert sie einen leuchtend roten Farbstoff, wodurch das Vorhandensein einer freien aromatischen Aminogruppe nachgewiesen ist. Die freie Aminogruppe läßt sich auch in den UV-Absorptionsspektren (Abbild. 2), welche von sauren, neutralen und alkalischen Lösungen von Anthranilsäure, *m*-Oxybenzoësäure und 3-Oxy-anthraniolsäure gemessen wurden²⁾, einwandfrei erkennen. Die Spektren geben ferner Aufschluß darüber, daß die Carboxygruppe frei und die phenolische Oxygruppe verestert vorliegt. Sämtliche hier genannten Eigenschaften, aus denen man schließen darf, daß die synthetisierte Substanz einen Phosphorsäureester der Oxyanthranilsäure darstellt, kommen auch dem auf enzymatischem Wege erhaltenen Produkt zu, so daß sehr enge Beziehungen zwischen beiden bestehen müssen, zumal die UV-Absorptionsspektren beider Stoffe (Abbild. 2 und 3) die gleichen charakteristischen Veränderungen bei Variation der Wasserstoffionen-Konzentration der Lösungen zeigen. Eine starke Diskrepanz tritt jedoch in dem mit Partridge-Gemisch⁴⁾ entwickelten Papierchromatogramm auf, in welchem die synthetische Substanz einen R_F -Wert von 0.55 und die fermentativ gewonnene einen solchen von 0.8 besitzt. Die Diskrepanz schien ihre Erklärung durch die Elementaranalyse des synthetischen Produktes, deren Werte für den sekundären Phosphorsäureester der Oxyanthranilsäure (VII) zutreffen, gefunden zu haben, denn alle oben genannten Eigenschaften sind

³⁾ Bezuglich der ausführlichen Interpretation der Spektren sei auf die frühere Veröffentlichung^{1b)} hingewiesen. ⁴⁾ S. M. Partridge, Biochem. J. 42, 238 [1948].

mit dem sekundären Ester ebenso gut vereinbar wie mit dem primären (VI), für welchen das fermentative Produkt nach wie vor gehalten wurde.

Die nächste Aufgabe bestand darin, den primären Phosphorsäureester der Oxyanthranilsäure (VI) darzustellen. Die partielle Hydrolyse des sekundären Esters (VII) zum primären (VI) gelang nicht. Entweder trat vollständige Hydrolyse ein, oder der sekundäre Ester blieb unversehrt. Die Hydrolyse wurde jeweils papierchromatographisch verfolgt, was leicht zu bewerkstelligen war, da sowohl die Oxyanthranilsäure selbst als auch ihre Phosphorsäureester im gefilterten UV-Licht stark fluorescieren.



Der primäre Ester (VI) konnte schließlich nach demselben Verfahren, welches zur Darstellung des sekundären (VII) gedient hatte, unter Anwendung eines Verdünnungsprinzips erhalten werden. Das Prinzip ließ sich nach zahlreichen vergeblichen Versuchen in der Form verwirklichen, daß eine ätherische Lösung von 2-Nitro-3-oxy-benzoësäure langsam auf eine mit Phosphorpentachlorid gefüllte Glasfritte bei geringem Unterdruck getropft wurde. Hierdurch kam die Nitro-oxybenzoësäure nur kurze Zeit mit einem großen Überschuß von Phosphorpentachlorid in Berührung, so daß keine Gefahr der Bildung von sekundärem Ester (Weg b) bestand. Die Anordnung bot ferner den Vorteil, daß das Produkt sofort nach seiner Bildung durch die Fritte gesaugt wurde, und daß aus dem Filtrat kein lästiges überschüssiges Phosphorpentachlorid entfernt zu werden brauchte. Die weitere Verarbeitung des Reaktionsproduktes, welche in gleicher Weise wie beim sekundären Ester erfolgte, führte zu farblosen Kristallen mit einem Zersp. von 217°. Die kristallisierte Substanz zeigt alle Farbreaktionen und spektralen Charakteristika (Abbild. 1), die oben für den sekundären Ester angegeben wurden, so daß auch diese Verbindung einen Phosphorsäureester der Oxyanthranilsäure darstellen muß. In dem mit Partridge-Gemisch entwickelten Papierchromatogramm zeigte sie überraschenderweise einen R_F -Wert von 0.3. Da der sekundäre Ester im gleichen Chromatogramm einen R_F -Wert von 0.55 besitzt, und die enzymatisch gewonnene Substanz, welche – wie erwähnt – für den primären Ester gehalten wurde, einen solchen von 0.8 aufweist, vermuteten wir zunächst, daß die beschriebene apparative Anordnung das Verdünnungsprinzip doch nicht im gewünschten Sinne hatte wirksam werden lassen, und daß wider Erwarten der tertiäre Ester entstanden war. Die Elementaranalyse des synthetischen Stoffes vom Zersp. 217° ergab jedoch, daß in der Tat der primäre Ester der Oxyanthranilsäure (VI) gebildet wurde. Ein Vergleich der

UV-Absorptionsspektren vom primären und sekundären Ester bestätigt dies; die Bandenmaxima des sekundären Esters (Abbild. 2) sind etwa doppelt so hoch wie diejenigen des primären Esters (Abbild. 1). Diese Erscheinung ist der Ausdruck für den doppelten Gehalt des sekundären Esters an chromophoren Systemen (2 Oxyanthranilsäure-Reste) gegenüber dem primären Ester.

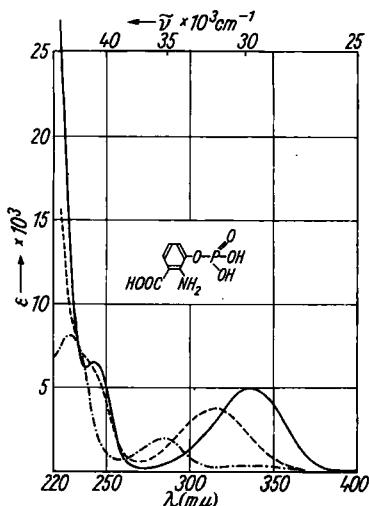


Abbildung 1. UV-Absorptionsspektren des primären Phosphorsäureesters der 3-Oxy-antrhanilsäure (VI), Schmp. 217°;
 — in Alkohol, - - - in *n* NaOH,
 - - - in *n* HCl gemessen

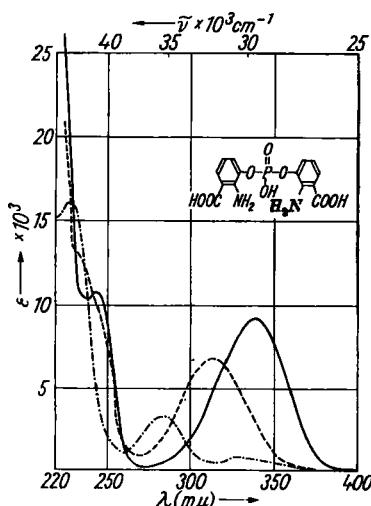


Abbildung 2. UV-Absorptionsspektren des sekundären Phosphorsäureesters der 3-Oxy-antrhanilsäure (VII), Schmp. 177°;
 — in Alkohol, - - - in *n* NaOH,
 - - - in *n* HCl gemessen

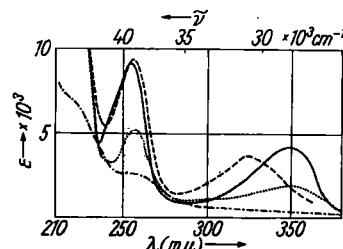


Abbildung 3. UV-Absorptionsspektren des fermentativ gewonnenen Produkts^{1);}
 — in Alkohol, - - - in *n* NaOH, - - - in *n* HCl, - · - · - in stark verd.
 Salzsäure gemessen

Durch diese Synthese ist der Beweis erbracht, daß der von H. Hellmann und O. Wiss¹⁾ auf fermentativem Wege gefundene Tryptophan-Metabolit nicht mit dem primären Phosphorsäureester der 3-Oxy-antrhanilsäure (VI) identisch ist. Es kann jedoch kein Zweifel darüber bestehen, daß das enzymatische Produkt in sehr naher Verwandtschaft zu dem genannten Ester steht. Über die wahre Natur des fermentati-

ven Produktes liegen noch keine näheren Anhaltspunkte vor. Die nachstehend wiedergegebenen IR-Spektren der beiden synthetisierten Phosphorsäureester zeigen zwar hinsichtlich der beschriebenen funktionellen Gruppen

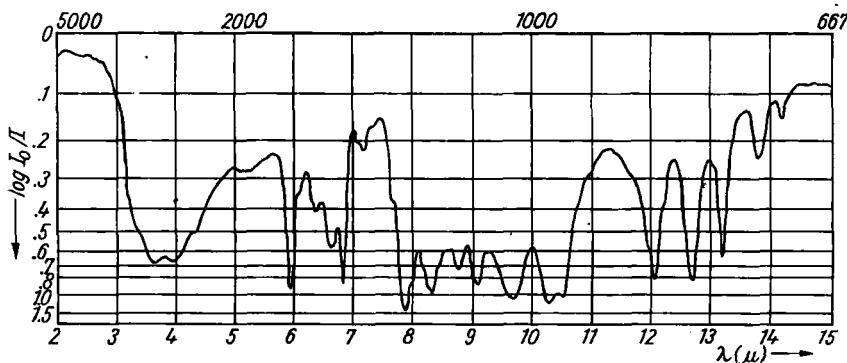


Abbildung 4. IR-Spektrum des primären Phosphorsäureesters der 3-Oxy-anthrancinsäure (VI)

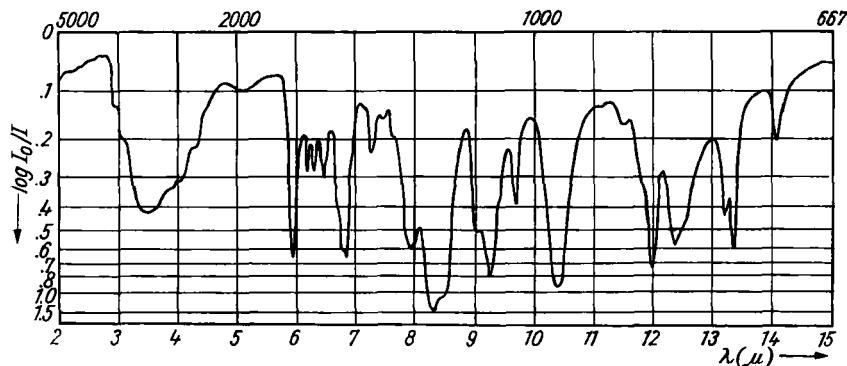


Abbildung 5. IR-Spektrum des sekundären Phosphorsäureesters der 3-Oxy-anthrancinsäure (VII)

Die IR-Spektren wurden mit dem selbstregistrierenden IR-Spektrophotometer Perkin-Elmer, Modell 21, aufgenommen. Die Substanzen lagen in fester Form, eingepreßt in KBr, vor. Die Spektren beider Substanzen zeigen eine intensive komplexe Bande bei $3-4.2 \mu$, unter denen sich OH- und NH-Valenzschwingungen freier und assoziierter Gruppierungen verbergen. Beide Spektren zeigen eine Bande bei 5.95μ , welche der C=O-Valenzschwingung einer Carboxygruppe zuzuordnen ist. Zwischen der komplexen Bande und der C=O-Schwingung liegt eine niedrige Bande, die von einer NH₃⁺-Gruppierung herrührt. In beiden Spektren treten bei 8.3μ ausgeprägte Banden auf, die von dem System P—O—C (aromatisch) herrühren dürften. Diese Bande ist beim sekundären Ester, in welchem zwei derartige Gruppierungen vorliegen, bedeutend höher als beim primären Ester⁵⁾.

mit dem IR-Spektrum der enzymatisch erhaltenen Substanz gewisse Übereinstimmungen^{1b)}, doch kommen die nahen verwandtschaftlichen Beziehungen der drei Stoffe hier nicht so deutlich zum Ausdruck wie in den UV-Absorp-

⁵⁾ Hrn. Dr. U. Schiedt und Hrn. R. Beckmann, Max-Planck-Institut für Biochemie, Tübingen, danken wir für die Aufnahme und Interpretation der UV- und IR-Spektren.

tionsspektren. Dies darf nicht wundernehmen, da die dem fermentativen Produkt anhaftenden Verunreinigungen im IR-Spektrum stärker hervortreten und dadurch das Spektrum weniger differenziert erscheinen lassen.

Abschließend sei erwähnt, daß die Papierchromatogramme der synthetischen Produkte häufig auch eine nicht isolierte, in gefiltertem UV-Licht blau fluoreszierende Substanz vom R_F -Wert 0.8 aufwiesen, welche möglicherweise mit dem enzymatischen Produkt identisch ist. Auch nach Kochen des primären Esters (VI) in Wasser zeigt das Papierchromatogramm zuweilen einen solchen Fleck, wodurch die Vermutung nahegelegt wird, daß beim enzymatischen Prozeß tatsächlich der primäre Ester entsteht, welcher dann aber im Zuge der Aufbereitung in die noch unbekannte Substanz vom R_F -Wert 0.8 umgewandelt wird.

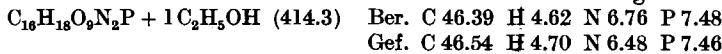
Hrn. Prof. A. Butenandt danken wir herzlich für die Unterstützung unserer Arbeiten.

Beschreibung der Versuche

2-Nitro-3-methoxy-benzoësäure: 3-Methoxy-benzoësäure wurde nach J. F. Nyc und H. K. Mitchell⁶⁾ nitriert und 2-Nitro-3-methoxy-benzoësäure durch fraktionierte Kristallisation abgetrennt. Schmp. 251° (12% d.Th.).

2-Nitro-3-oxy-benzoësäure: 2-Nitro-3-methoxy-benzoësäure wurde mit Pyridin-hydrochlorid nach V. Prey⁷⁾ und H. Schlossberger⁸⁾ umgesetzt. Schmp. 177.5° (80% d.Th.). (1 Mol. Kristallwasser.) Die Substanz wurde durch 10stdg. Trocknen bei 110° vom Kristallwasser befreit. Schmp. 179.5–180.5°.

Sekundärer Phosphorsäureester der 3-Oxy-antrhanilsäure: In Anlehnung an Anschütz und Moore²⁾ wurden 3.7 g 2-Nitro-3-oxy-benzoësäure (kristallwasserfrei) mit 8.3 g Phosphorpentachlorid trocken vermischt. Nach kurzer Zeit trat Reaktion unter starker Chlorwasserstoff-Entwicklung ein. Das Umsetzungsprodukt wurde im mit Kapillarrohr verschlossenen Gefäß über Nacht stehengelassen und überschüss. Phosphorpentachlorid auf dem Wasserbad i. Vak. absublimiert. Das zurückbleibende braune Öl wurde mit 2 ccm Wasser versetzt. Wieder erfolgte Reaktion unter starker Chlorwasserstoff-Entwicklung. Nach 1 Stde. wurde das braune breiige Produkt 3 Stdn. lang bei 30° i. Vak. vom Chlorwasserstoff befreit, in 100 ccm Wasser gelöst und mit Wasserstoff unter Katalyse von 0.5 g Palladiummohr hydriert. Bei 735 Torr Außendruck und 20° wurden 450 ccm Wasserstoff aufgenommen. Die vom Katalysator abfiltrierte gelbe Lösung wurde bei 30° i. Vak. eingeeengt, bis hellbraune Kristalle ausfielen. Nach Filtration und viermaligem Umkristallisieren aus Alkohol wurden rein weiße Nadeln erhalten, die sich bei 161° braun färben und sich bei 177° unter Gasentwicklung zersetzen.



R_F -Wert 0.55 (in Partridge-Gemisch, Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5).

Primärer Phosphorsäureester der 3-Oxy-antrhanilsäure: 0.5 g 2-Nitro-3-oxy-benzoësäure (kristallwasserfrei) wurden in 50 ccm absol. Äther gelöst und auf einen mit 10 g Phosphorpentachlorid gefüllten Glasfiltertiegel G3, der auf einem Kolben mit Vakuumvorstoß saß, tropfen gelassen, wobei der Kolben unter leichten Unterdruck gesetzt wurde. Nach Verjagen des Äthers i. Vak. wurde das im Kolben zurückbleibende hellgelbe Öl mit 0.5 ccm Wasser hydrolysiert und Chlorwasserstoff durch Erwärmen auf 30° i. Vak. vertrieben. Der hellbraune feste Rückstand wurde in 50 ccm

⁶⁾ J. Amer. chem. Soc. 70, 1847 [1953].

⁷⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 1219 [1941].

⁸⁾ Dissertation., Tübingen 1950.

Wasser gelöst und an 0.5 g Palladiummohr mit Wasserstoff katalytisch hydriert. Nach Einengen der vom Katalysator abfiltrierten Lösung bei 30° i. Vak. hinterließ ein brauner glasiger Rückstand, aus dem sich beim Behandeln mit 3 ccm Alkohol feine Kristalle abschieden. Diese wurden nach Abfiltrieren in 50 ccm Alkohol in der Wärme gelöst, die Lösung wurde mit 30 ccm Eisessig versetzt und der Alkohol bei Zimmertemperatur i. Vak. vertrieben. Aus dem Eisessig schieden sich nach dreimaliger Wiederholung der Operation weiße feine Kristalle aus, die sich bei 217° unter Gasentwicklung zersetzen.

$C_7H_8O_6NP$ (233.1) Ber. C 36.06 H 3.46 N 6.01 P 13.29
Gef. C 36.26 H 3.46 N 5.81 P 13.04

R_F -Wert 0.3 (in Partridge-Gemisch, Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5).

277. Heinrich Hellmann und Edith Folz: Über den Mechanismus der Reaktionen von quartären Ammoniumsalzen mit Alkalicyanid¹⁾

[Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen]
(Eingegangen am 20. September 1955)

Bei der Synthese von Asparaginsäure nach R. O. Atkinson entsteht als Produkt der Umsetzung des Jodmethylates von Dimethylaminomethyl-acetamino-malonester nicht Cyanmethyl-acetamino-malonester sondern β -Cyan- α -acetamino-propionsäureester. Die Bildung des β -Cyan- α -acetamino-propionsäureesters ist durch die Michael-Addition des Cyanids an Acetamino-acrylester, welcher aus dem quartären Salz durch Decarbäthoxylierung und Abspaltung von Trimethylamin intermediär hervorgeht, zwanglos zu erklären. Die Bedeutung dieses Befundes für die Interpretation der Mechanismen von Alkylierungen mit quartären Ammoniumsalzen wird erläutert.

Zahlreiche tertiäre Amine, die durch Mannich-Kondensation von nucleophilen Substanzen mit Formaldehyd und sekundären Aminen leicht zugänglich sind, können als freie tertiäre Basen oder als quartäre Ammoniumsalze auf H-acide Verbindungen alkylierend wirken. Die Mechanismen dieser Alkylierungsreaktionen sind in neuerer Zeit weitgehend aufgeklärt worden²⁾, so daß man heute in der Lage ist, mit großer Sicherheit voraussagen zu können, ob eine Mannich-Base oder ihr quartäres Salz prinzipiell zur Alkylierung fähig ist oder nicht. Die wesentlichen Erkenntnisse über den Verlauf der genannten Reaktionen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Tertiäre Mannich-Basen können nur dann direkt alkylierend wirken, wenn sie am C-Atom in β -Stellung zum Amin-Stickstoff noch mindestens ein reaktionsfähiges H-Atom tragen. Sie spalten sekundäres Amin ab unter Ausbildung eines ungesättigten Systems, welches dann die zu alkylierende Substanz nach Art einer Michael-Addition addiert. Tertiäre Basen, denen dieser Eliminierungs-Additions-Mechanismus versperrt ist, weil sie keine additionsfähige Doppelbindung ausbilden können, besitzen keine alkylierende Fähigkeit. Von dieser Regel scheint es eine ganze Reihe von Ausnahmen zu geben. Hierbei handelt es sich jedoch tatsächlich um scheinbare Ausnahmen, deren Mechanismen einwandfrei aufgeklärt werden konnten: So können tertiäre Mannich-

¹⁾ X. Mitteil. der Reihe: Synthesen mit tertiären Mannich-Basen; vergl. IX. Mitteil.: H. Hellmann u. F. Lingens, Chem. Ber. 87, 940 [1954].

²⁾ Zusammenfassende Darstellungen: H. Hellmann, Angew. Chem. 65, 473 [1953]; J. H. Brewster u. E. L. Eliel, Org. Reactions 7, 99 [1953].