

FRIEDHELM KORTE UND HANS BARKEMEYER

Heterocyclen im Stoffwechsel, IV¹⁾DIE SYNTHESE
RINGMARKIERTER 4-AMINO-BENZOESÄURE-[2.6-¹⁴C]

Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn

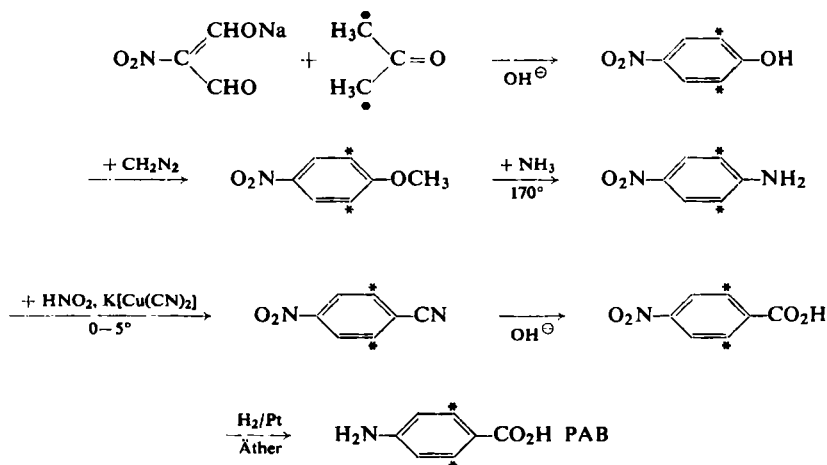
(Eingegangen am 1. August 1957)

Es wird ein Verfahren beschrieben, das, von markiertem Aceton ausgehend, die Darstellung ringmarkierter Aromaten gestattet. — Die Synthese ringmarkierter 4-Amino-benzoesäure auf diesem Wege gelingt in 6 Stufen, die Gesamtausbeute beträgt rund 35 % d. Th.

Im Rahmen unserer Arbeiten über den Stoffwechsel von Mikroorganismen benötigten wir ¹⁴C-markierte 4-Amino-benzoesäure (PAB). Um die Gefahr eines Verlustes an ¹⁴C durch Decarboxylierung während des Stoffwechselgeschehens auszuschalten, verwendeten wir ringmarkierte PAB und nicht die von anderen Autoren auf verschiedenen Wegen dargestellte carboxylmarkierte Substanz^{2, 3)}.

Das Verfahren basiert auf der Beobachtung von H. B. HILL und J. TORREY⁴⁾, daß Nitromalondialdehyd mit Aceton im alkalischen Milieu zu 4-Nitro-phenol kondensiert. Die Reaktion diente den genannten Autoren als Beweis für die Konstitution des von ihnen erstmalig dargestellten Nitromalondialdehyds und verlief in über-

Reaktionsschema:



1) III. Mitteil.: F. KORTE, H. WEITKAMP und H. G. SCHICKE, Chem. Ber. 90, 1100 [1957].

2) JU. W. MARKOWA, L. N. SENKOWA und M. N. SCHTSCHUKINA, C. 1956, 4106.

3) A. WACKER, H. GRISEBACH, A. TREBST und F. WEYGAND, Angew. Chem. 66, 326 [1954].

4) J. Amer. chem. Soc. 22, 89 [1899].

schüssigem Aceton mit einer Ausbeute von 25 %. Wesentlich bessere Ausbeuten konnten bei der Kondensation mit 1.3-disubstituiertem Aceton, z. B. Acetondicarbonsäure, erzielt werden⁵⁻⁷⁾.

Durch systematische Änderung der Reaktionsbedingungen bei der Umsetzung mit Aceton gelang eine Steigerung der Ausbeute auf 65 % d. Th. (bezogen auf Aceton). Die Einführung der Carboxylgruppe an Stelle des phenolischen Hydroxyls gelingt über die Substitution von $-OH$ gegen $-NH_2$, Diazotierung und Sandmeyer-Reaktion mit Cyanid und Verseifung des 4-Nitro-benzonitrils zur Carbonsäure. Die Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe wird durch Hydrierung in Äther mit Platin (auf Kohle) erreicht.

In der zweiten Stufe ist eine Methylierung mit Diazomethan erforderlich, weil die Spaltung der Phenoläther mit NH_3 in besserer Ausbeute erfolgt als der Austausch der phenolischen Hydroxylgruppe gegen die Aminogruppe mittels NH_3 ⁸⁾.

Die Sandmeyer-Reaktion gelingt in einer Ausbeute von 95 %, wenn man die Diazoniumsalz-Lösung unmittelbar vor der Umsetzung mit dem Cu^I -Komplex durch Zusatz von $KHCO_3$ auf pH 6 abpuffert und auf 0–5° abkühlt.

Zur Vermeidung von Ausbeuteverlusten wird auf eine Reindarstellung der Zwischenprodukte weitgehend verzichtet, jedoch ist eine Reinigung der 4-Nitro-benzoesäure durch Sublimation vor der katalytischen Hydrierung der Nitrogruppe erforderlich. In gleicher Weise wird PAB gereinigt.

Die Gesamtausbeute beträgt, bezogen auf Aceton-[1.3- ^{14}C], rund 35 % d. Th.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir auch an dieser Stelle für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die einzelnen Reaktionsschritte wurden unter Verwendung inaktiven Materials ausgeführt. Die angegebenen Schmelzpunkte wurden ebenfalls an inaktiver Substanz bestimmt. Die in Klammern stehenden Ausbeuteangaben beziehen sich auf in Vorversuchen eingesetzte Reinchemikalien.

4-Nitro-phenol-[2.6- ^{14}C]: In die Lösung von 38.7 mg *Aceton-[1.3- ^{14}C]* (spezif. Aktivität 1.5 mC/mMol) in 5 ccm Wasser werden 490 mg *Natrium-nitromalondialdehyd-monohydrat*⁹⁾ eingetragen. Wenn das Salz gelöst ist, wird mit 0.125 ccm NaOH (25 Gew. %) versetzt und das Reaktionsgemisch 3 Tage bei +5° und 5 Tage bei +20° stehengelassen. Die Lösung nimmt im Laufe dieser Zeit eine blutrote Färbung an.

Zur Aufarbeitung überführt man in einen 50-ccm-Erlenmeyer-Kolben und sättigt mit festem CO_2 . Das entstandene 4-Nitro-phenol wird durch Ausschütteln mit Äther (4mal je 10 ccm) quantitativ extrahiert. Nach Abdestillieren des Äthers erhält man als Rückstand 68 mg fast farbloses *4-Nitro-phenol-[2.6- ^{14}C]* vom Schmp. 109–110°. Ausb. 65 % d. Th. (bez. auf Aceton).

5) H. B. HILL und J. TORREY, J. Amer. chem. Soc. **24**, 1 [1900].

6) V. PRELOG und K. WIESNER, Helv. chim. Acta **30**, 1465 [1947].

7) E. C. S. JONES und J. KENNER, J. chem. Soc. [London] **1931**, 1850.

8) H. SALKOWSKI, Liebigs Ann. Chem. **174**, 282 [1874].

9) P. E. FANTA, Org. Syntheses **32**, 95 [1952].

4-Nitro-anisol-[2.6-¹⁴C]

Herstellung der Diazomethan-Lösung: In einem 50-ccm-Erlenmeyer-Kolben werden 6 ccm 50-gewichtsproz. Kalilauge mit 20 ccm Äther überschichtet. Unter Eiskühlung werden 2.06 g Nitrosomethylharnstoff eingetragen und nach beendeter Reaktion die wäßrige Phase abgetrennt.

68 mg *4-Nitro-phenol-[2.6-¹⁴C]* werden in 1 ccm Äther gelöst und mit 6 ccm der äther. Diazomethan-Lösung versetzt. Man läßt leicht verschlossen 24 Stdn. bei 20° stehen. Nach Abdestillieren des Äthers bleibt ein Rückstand von 77 mg, Schmp. 46–50°, Ausb. quantitativ (bez. auf Nitro-phenol). Das Reaktionsprodukt ist mit geringen Mengen Polymerisat aus dem Diazomethan verunreinigt. Die folgenden Umsetzungen werden dadurch nicht gestört.

4-Nitro-anilin-[2.6-¹⁴C]: Die Reaktion wird im Bombenrohr (20 cm Länge, Innendurchm. 1 cm, Wandstärke 2 mm) durchgeführt. Um eine quantitative Überführung des Anisols zu ermöglichen, ist das Bombenrohr mit einem Schliff (NS 14.5) versehen. Das im Reaktionskolben befindliche *4-Nitro-anisol-[2.6-¹⁴C]* wird in wenig Äther gelöst und in das Bombenrohr einpipettiert. Man spült mit Äther nach, schließt das Rohr an eine Vakuum-Destillationsapparatur an und vertreibt das Lösungsmittel bei geringem Unterdruck. Zur Beschleunigung des Vorganges führt man eine nicht zu enge Kapillare bis kurz über die Oberfläche der Lösung und erwärmt im Wasserbad auf 40–45°. Um Siedeverzüge zu vermeiden, soll die Oberfläche der Badflüssigkeit höher als die des Äthers stehen. Wegen der Leichtflüchtigkeit des *4-Nitro-anisols* muß ein scharfes Absaugen der letzten Ätherreste unterbleiben.

Nach Überführung des *4-Nitro-anisols* gibt man in das Bombenrohr 5 ccm konz. NH_3 und schmilzt vor dem Gebläse ab. Das Rohr wird, mit Asbestschnur umwickelt, im Bombenofen über 20 Stdn. auf 170° erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird geöffnet (kein Überdruck im Rohr), das auskristallisierte *4-Nitro-anilin* in Äther gelöst und die goldgelbe Reaktionslösung nach Verdünnen mit 5 ccm Wasser 4 mal mit je 10 ccm Äther ausgeschüttelt. Aus den vereinigten Ätherlösungen erhält man nach Abdestillieren des Lösungsmittels 51–55 mg *4-Nitro-anilin-[2.6-¹⁴C]*, Schmp. 138–145°; Ausb. 75–81 % d. Th. (bez. auf *4-Nitro-anisol*).

4-Nitro-benzonitril-[2.6-¹⁴C]: Zur Überführung in das Hydrochlorid werden 55 mg *4-Nitro-anilin-[2.6-¹⁴C]* in Äther gelöst und quantitativ in ein 10-ccm-Zentrifugenglas übergeführt. Man engt die Lösung auf 2 ccm ein und versetzt mit dem gleichen Volumen äther. Salzsäure (absol. Äther bei 0° mit Chlorwasserstoff gesättigt). Das ausgefallene Hydrochlorid wird abzentrifugiert und 2 mal mit Äther gewaschen.

Die Diazotierung erfolgt im Zentrifugenglas. Das Hydrochlorid wird in 2 ccm 5*n* HCl gelöst und bei 0–5° langsam mit der Lösung von 40 mg $NaNO_2$ in 2 ccm Wasser versetzt. Nach frühestens 10 Min., unmittelbar vor Durchführung der Sandmeyer-Reaktion, wird die Lösung durch Zusatz von $KHCO_3$ (ca. 1.35 g) auf pH 6 gebracht, außerdem gibt man einige ccm Eiswasser zu.

Herstellung der $K[Cu(CN)_2]$ -Lösung: Zu der Lösung von 50 Tln. $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ in 200 Tln. Wasser gibt man unter ständigem Erhitzen auf dem Wasserbad die Lösung von 55 Tln. KCN in 100 Tln. Wasser und filtriert nach dem Abkühlen.

Die Sandmeyer-Reaktion wird im 100-ccm-Spitzkolben mit seitlichem Ansatz und mechanischer Rührvorrichtung durchgeführt. Die neutralisierte Diazoniumsalz-Lösung befindet sich in einem mit Eiswasser gekühlten Tropftrichter. Der zu einer Kapillare ausgezogene Auslauf des Tropftrichters mündet unter der Oberfläche der vorgelegten $K[Cu(CN)_2]$ -Lösung.

Der mit Eiswasser gekühlte Reaktionskolben wird mit 3 ccm $K[Cu(CN)_2]$ -Lösung und 20 ccm Äther beschickt. Unter kräftigem Turbinieren läßt man innerhalb von 5 Min. die

Diazonium-Verbindung eintropfen, rührt 1 Stde. nach und läßt einige Stunden bei Raumtemperatur stehen; dann wird die Ätherphase abgetrennt und die wäßrige Phase dreimal mit je 10 ccm Äther nachextrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bleiben als Rückstand 47 mg 4-Nitro-benzonitril-[2.6- ^{14}C], Schmp. 138–145°, Ausb. 80 % d. Th. (bez. auf 4-Nitro-anilin) (95 % d. Th.).

4-Nitro-benzoesäure-[2.6- ^{14}C]: 47 mg 4-Nitro-benzonitril-[2.6- ^{14}C] werden im 100-ccm-Rundkolben mit 2 ccm 2*n* NaOH 75 Min. im siedenden Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Nach Verdünnen mit 2 ccm Wasser wird zweimal mit je 10 ccm Äther gewaschen und die wäßrige Phase mit 3 ccm 2*n* HCl angesäuert. Die ausgefallene Säure wird durch Ausschütteln mit Äther in Lösung gebracht und die wäßrige Phase noch dreimal mit etwas Äther nachextrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bleiben als Rückstand 50 mg 4-Nitro-benzoesäure-[2.6- ^{14}C], Schmp. 230–235°, Ausb. 94 % d. Th. (bez. auf 4-Nitro-benzonitril) (96–98 % d. Th.).

4-Amino-benzoesäure-[2.6- ^{14}C]: Die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhaltene 4-Nitro-benzoesäure wird zur Reinigung i. Hochvak. sublimiert.

48 mg sublimierter 4-Nitro-benzoesäure-[2.6- ^{14}C] werden in 30 ccm Äther in Gegenwart von ca. 50 mg Platinkohle (Aktivkohle mit 5 % Pt) bei Raumtemperatur mit Wasserstoff reduziert. Die Reduktion ist nach etwa 30 Min. beendet (3 Moll. H_2).

Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wird der Rückstand zweimal bei Wasserstrahlvakuum im Molekularkolben sublimiert. Nach Ablösen des Sublimates vom Kühlfinger und Abdestillieren des Lösungsmittels (Äther) bleiben 37 mg 4-Amino-benzoesäure-[2.6- ^{14}C] als Rückstand, Schmp. 185–185.5°, Ausb. 90 % d. Th. (bez. auf 4-Nitro-benzoesäure) (98 % d. Th.).

Die radioaktive Substanz wurde papierchromatographisch auf radiochemische Einheitlichkeit geprüft. Radioaktive Verunreinigungen konnten nicht festgestellt werden. An Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043a ergaben sich folgende R_F -Werte (absteigend):

0.68 (gesätt. wäßr. Lösg. von Na_2HPO_4)

0.77 (3 % NH_4Cl in Wasser)

0.69 (Äthanol/*n*-Butanol/2*n* $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ = 50:15:10:25)

Die spezif. Aktivität wurde zu 1.5 mC/mMol durch Vergleich mit authent. Material (Harnstoff- ^{14}C) bestimmt. Im Verlauf der Synthese ist daher kein Verlust an spezif. Aktivität eingetreten.

Der Misch-Schmp. von nach dem oben beschriebenen Verfahren synthetisierter inaktiver Substanz mit reiner 4-Amino-benzoesäure war ohne Depression.