

des Tridekacarbonyl-tetraerrat-Anions gefällt werden; im Ammonosystem wird ausschließlich $[\text{Co}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]_2[\text{Fe}_4(\text{CO})_{13}]$ erhalten.

Zur *Analyse* wird nach dem Verflühen der Subst. mit $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$ aufgeschlossen; nach der Abtrennung des *Eisens* als *Hydroxyd* wird dasselbe mehrfach umgefällt. Das *Kobalt* wird nach dem Eindampfen der vereinigten Filtrate aus stark ammoniumchloridhaltiger ammoniakalischer Lösung unter Zusatz von Hydrazinsulfat *elektrolytisch* bestimmt.

| Vers. | Subst. Nr. | % Co | % Fe | Fe: 2 Co |
|---|------------|-------|-------|----------|
| 1 | (1) | 12.1 | 23.0 | 4.00 |
| 2 | (1 a) | 12.1 | 23.0 | 3.99 |
| 3 | (1 b) | 12.1 | 23.2 | 4.28*) |
| 4 | (1 c) | 12.2 | 23.1 | 3.98 |
| $[\text{Co}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]_2[\text{Fe}_4(\text{CO})_{13}]$ berechnet: | | 12.26 | 23.13 | 4.00 |
| <hr/> | | | | |
| 1 | (2) | 16.1 | 15.6 | 2.05 |
| 2 | (2 a) | 16.9 | 16.0 | 2.00 |
| 3 | (2 b) | 16.2 | 15.4 | 2.00 |
| $[\text{Co}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]_2[\text{Fe}_2(\text{CO})_8]$ berechnet: | | 16.30 | 15.48 | 2.00 |

*) enthält möglicherweise Hydrogensalz.

ADOLF BUTENANDT, GÜNTHER HALLMANN und RÜDIGER BECKMANN SYNTHESEN DES 3-HYDROXY-KYNURENINS

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, Tübingen (jetzt München)
(Eingegangen am 14. Februar 1957)

Herrn Professor B. Helferich zum 70. Geburtstag

Es werden zwei Wege zur synthetischen Darstellung des 3-Hydroxy-kynurenins beschrieben, die beide vom 2-Nitro-3-hydroxy-acetophenon ausgehen. Die als Intermediärprodukt des Tryptophanstoffwechsels bedeutsame Aminosäure ist nunmehr leichter als bisher zugänglich.

3-Hydroxy-kynurenin (VII) wurde 1949 erstmalig aus Calliphora-Frischpuppen isoliert¹⁾. Seitdem haben wir dieses wichtige Intermediärprodukt des Tryptophanstoffwechsels²⁾ laufend synthetisch dargestellt, sowohl für eigene Untersuchungen als auch für die anderer Laboratorien. Die von uns verwendeten Methoden wechselten^{1, 3)}; von ihrer ausführlichen Beschreibung haben wir bisher abgesehen, da sie in bezug auf Ausbeute und Reproduzierbarkeit noch nicht befriedigten. In der vorliegenden Mitteilung möchten wir nunmehr als Ergebnis mehrjähriger Erfahrungen diejenigen Wege

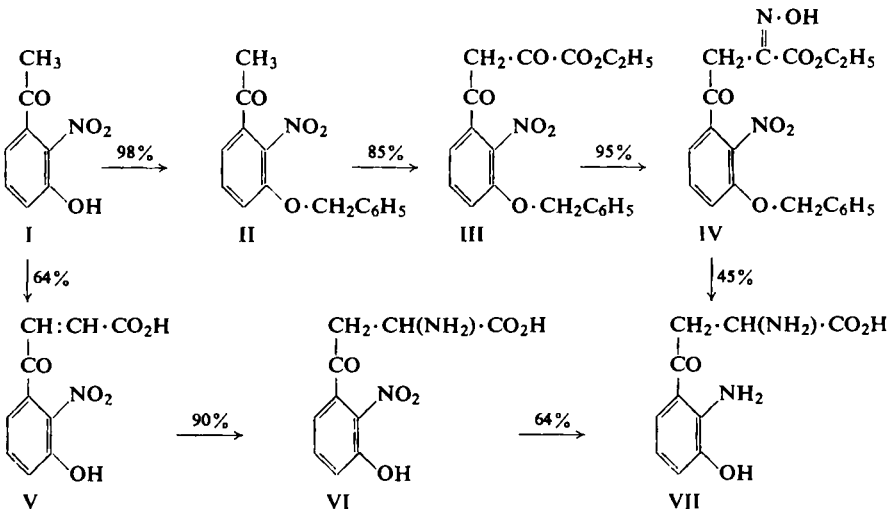
1) A. BUTENANDT, W. WEIDEL und H. SCHLOSSBERGER, Z. Naturforsch. **4b**, 242 [1949].

2) Zusammenfassung: A. BUTENANDT, Angew. Chem. **69**, 16 [1957].

3) A. BUTENANDT und G. HALLMANN, Z. Naturforsch. **5b**, 444 [1950].

beschreiben, die wir für die bestgeeigneten zur synthetischen Gewinnung des DL-3-Hydroxy-kynurens ansehen.

Die folgende Formelübersicht faßt die zu beschreibenden Umsetzungen zusammen:



Als geeignetes Ausgangsmaterial verwendet man 2-Nitro-3-hydroxy-acetophenon (I), das sich aus Acetophenon über dessen 3-Nitro-, 3-Amino- und 3-Hydroxy-Derivat leicht darstellen läßt. Die Nitrierung des 3-Hydroxy-acetophenons mit Kupfernitrat in Eisessig liefert neben der gewünschten 2-Nitro-Verbindung noch die bisher nicht beschriebenen 4-Nitro- bzw. 6-Nitro-3-hydroxy-acetophenone; arbeitet man mit Nitriersäure bei -20° , so entsteht ganz bevorzugt die 2-Nitro-Verbindung.

Wie früher bereits kurz mitgeteilt wurde³⁾, läßt sich im 2-Nitro-3-benzyloxy-acetophenon (II) die Acetylseitenkette durch Kondensation mit Oxalsäure-diäthylester um zwei C-Atome verlängern; der [2-Nitro-3-benzyloxy-benzoyl]-brenztraubensäure-äthylester (III) liefert leicht ein α -Oxim (IV), das katalytisch zu 3-Hydroxy-kynurenin (VII) hydriert werden kann.

Noch einfacher ist es, I direkt mit Glyoxylsäure zur [2-Nitro-3-hydroxy-benzoyl]-acrylsäure (V) zu kondensieren, die durch Addition von Ammoniak in fast quantitativ verlaufender Umsetzung in das schon bekannte^{1, 4)}, aber bisher nur schwer zugängliche [2-Nitro-3-hydroxy-benzoyl]-alanin (VI) überzuführen ist. Diese Aminosäure läßt sich katalytisch leicht zu 3-Hydroxy-kynurenin hydrieren.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

3-Nitro-acetophenon (in Anlehnung an B. B. CORSON und R. K. HAZEN⁵⁾): 225 g *Acetophenon* (1.87 Mol) werden unter guter Kühlung vorsichtig mit 600 ccm konz. Schwefelsäure vermischt. Zu dieser Lösung läßt man unter Kühlung mit Eis-Kochsalz und kräftigem Rühren innerhalb

4) M. KOTAKE, T. SAKAN und S. SENOH, J. Amer. chem. Soc. 73, 1832 [1951].

5) Org. Syntheses, Coll. Vol. II, 434 [1947].

von 1½ Stdn. eine Mischung von 170ccm konz. *Salpetersäure* und 272 ccm konz. Schwefelsäure zutropfen. Durch Zugabe von festem Kohlendioxyd wird die Temperatur auf -12 bis -15° gehalten. Gegen Ende der Nitrierung bildet sich ein dicker gelber Kristallbrei. Er wird in der Kälte in kleinen Anteilen unter kräftigem Rühren auf 2.5 kg Eis gegossen. Nach 1 Stde. wird das ausgefallene *3-Nitro-acetophenon* abgesaugt und mit viel Wasser neutral gewaschen. Schwach gelbe Nadeln vom Schmp. 80° (Ausb. 217 g, 70% d. Th.).

3-Amino-acetophenon: 150 g (0.91 Mol) in 500ccm Äthanol suspendiertes *3-Nitro-acetophenon* werden mit Raney-Nickel im Autoklaven bei 80° und 110–150 at Anfangsdruck hydriert und nach C. S. MARVEL und R. E. ALLEN⁶⁾ aufgearbeitet. Ausb. 96 g (78% d. Th.). Schmp. 93° .

*3-Hydroxy-acetophenon*⁷⁾: 48 g (0.35 Mol) *3-Amino-acetophenon* werden in einer Mischung von 100ccm Wasser und 35ccm konz. Schwefelsäure gelöst. Nach Zugabe von 160g Eis wird unter Eiskühlung und kräftigem Rühren mit einer Lösung von 24 g (0.35 Mol) Natriumnitrit in 30ccm Wasser diazotiert. Die *Diazoniumsalzlösung* läßt man innerhalb von 20 Min. in eine, mit 300ccm Toluol überschichtete, heiße Lösung von 65 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 450ccm 1 n H_2SO_4 eintropfen. Nach dem Abkühlen wird die wäbr. Phase abgetrennt und mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherauszug wird zusammen mit der Toluolphase mehrmals mit insgesamt 400–500ccm 1 n NaOH extrahiert, die vereinigten alkalischen Lösungen mit verd. Schwefelsäure angesäuert und erneut mit Äther ausgeschüttelt. Die äther. Lösung wird mit Wasser neutral gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird im Säbelkolben bei Ölpumpenvakuum destilliert. Man erhält 38 g (82% d. Th.) fast farbloses *3-Hydroxy-acetophenon* vom Schmp. 92° .

Nitrierung des *3-Hydroxy-acetophenons*

a) mit Kupfernitrat in Eisessig: 50 g (0.37 Mol) *3-Hydroxy-acetophenon* werden in einem Gemisch von 270ccm Eisessig und 30ccm Acetanhydrid gelöst. Unter schnellem Rühren fügt man innerhalb von 30 Min. in mehreren Anteilen insgesamt 100 g (0.413 Mol) fein gepulvertes $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ zu. Wenige Min. nach Zugabe eines geringen Nitratanteils beginnt die Reaktion unter Temperaturanstieg und Verfärbung der Lösung von Blau nach Tiefgrün. Während der Nitrierung muß die Temperatur zwischen $+12$ und $+15^{\circ}$ gehalten werden. Nach weiterer 1stdg. Reaktionsdauer unter gleichen Bedingungen wird unter Rühren in 700 g Eiswasser eingetragen, die hellgelben Kristalle werden nach mehrstündigem Stehenlassen bei 0° abgesaugt. Dann wird in 1.5l Benzol heiß gelöst und die Benzollösung auf 700ccm eingengt. Beim Erkalten scheidet sich zunächst das *6-Nitro-3-hydroxy-acetophenon* vom Schmp. 148 – 149° ab. Ausb. 13 g.

UV-Spektrum: λ_{max} (ϵ): 317 (9050) in Äthanol; 410 (18200) in *n*/10 NaOH

$\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_4\text{N}$ (181.1) Ber. C 53.04 H 3.90 N 7.56 Gef. C 52.93 H 4.01 N 7.45

Dampft man die Mutterlauge auf etwa 80ccm ein, so kristallisiert in fast farblosen Nadeln das *2-Nitro-3-hydroxy-acetophenon* (12 g = 18% d. Th.); es wird aus Benzol umgelöst: Schmp. 138° . Weitere Anteile fallen noch bei wiederholtem Einengen der Mutterlauge aus.

UV-Spektrum: λ_{max} (ϵ): 240 (5900) 312.5 (2985) in Äthanol

227.5 (19100) 420 (3460) in *n*/10 NaOH

$\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_4\text{N}$ (181.1) Ber. C 53.04 H 3.90 N 7.56 Gef. C 53.06 H 3.79 N 7.48

⁶⁾ J. Amer. chem. Soc. **68**, 1088 [1946].

⁷⁾ Die Ausarbeitung dieser Vorschrift verdanken wir Dr. I. CROMARTIE; vgl. R. H. F. MANSKE, Org. Syntheses, Coll. Vol. I, 404 [1948].

Die restliche Mutterlauge wird zur Trockne gebracht, der Rückstand mehrfach aus Benzol unter Zusatz von Petroläther umkristallisiert: 320 mg *4-Nitro-3-hydroxy-acetophenon* in grün-gelben Blättchen vom Schmp. 71.5—72.5°.

UV-Spektrum: λ_{\max} (ϵ): 271 (12700) 355 (5010) in Äthanol
240 (25700) 285 (12660) 440 (8200) in $n/10$ NaOH

$C_8H_7O_4N$ (181.1) Ber. C 53.04 H 3.90 N 7.56 Gef. C 53.24 H 4.07 N 7.91

b) mit *Nitriersäure*⁸⁾: 80 g fein gepulvertes *3-Hydroxy-acetophenon* werden portionsweise in 235 ccm konz. Schwefelsäure unter Eiskühlung gelöst. Zu dieser Lösung läßt man unter kräftigem Rühren innerhalb von 15 Min. eine Mischung aus 40 ccm konz. *Salpetersäure* und 32 ccm konz. Schwefelsäure zutropfen. Dabei wird die Temperatur durch Kühlen mit Eis-Kochsalz-Mischung und Zufügen von Trockeneis auf -20° gehalten. Gegen Ende der Reaktion entsteht ein zäher, orangefarbener Brei, der nach weiteren 10 Min. Rühren auf 1200 g Eis gegossen wird. Der ausgeflockte gelbe Niederschlag wird nach $\frac{1}{2}$ Stde. abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und aus etwa 100 ccm Äthanol umkristallisiert. Man erhält so das *2-Nitro-3-hydroxy-acetophenon (I)* vom Schmp. 131—132°; Ausb. 35—45% d.Th.

2-Nitro-3-benzyloxy-acetophenon (II): Eine Lösung von 15 g *I* in 100 ccm warmem absol. Alkohol wird mit 80 ccm einer äthanolischen Natriumäthylat-Lösung, die 3.8 g Natrium enthält, versetzt. Dabei fällt das dunkelrote Natriumsalz aus. Nach Zugabe von 21 g *Benzylchlorid* und einer Spatelspitze von fein gepulvertem Kaliumjodid wird 6 Stdn. unter Rühren gekocht. In der Kälte saugt man vom ausgefallenen Kochsalz ab und wäscht den Niederschlag mit Äthanol. Das Filtrat wird i. Vak. bis auf ein kleines Volumen eingengt, in Benzol aufgenommen und mit 2*n* NaOH ausgeschüttelt. Die mit Wasser neutral gewaschene Benzol-lösung behandelt man mit wenig Tierkohle und dampft sie bis auf ein kleines Volumen ein. Nach Zusatz von wenig Petroläther kristallisiert bei 0° das *2-Nitro-3-benzyloxy-acetophenon* aus. Durch Zugabe von Petroläther werden noch weitere Mengen des Benzyläthers erhalten. Schmp. 84° (aus Äther-Petroläther). Ausb. 18 g.

$C_{15}H_{13}O_4N$ (271.3) Ber. C 66.41 H 4.83 N 5.17 Gef. C 66.26 H 4.92 N 5.24

[*2-Nitro-3-benzyloxy-benzoyl*]-*brenztraubensäure-äthylester (III)*: In einem 250-ccm-Rundkolben werden unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 1.45 g Natrium in 50 ccm absol. Äthanol gelöst. Unter gutem Schwenken und Kühlen mit Eis-Kochsalz-Mischung gibt man in diese Lösung tropfenweise eine Suspension von 15 g fein gepulvertem *II* in 30 ccm *Oxalsäure-diäthylester*. Während der Zugabe erstarrt der Kolbeninhalt. Man läßt 24 Stdn. bei 0° stehen und arbeitet dann wie folgt auf: Unter Kühlung wird die Lösung mit eiskalter 2*n* H_2SO_4 angesäuert. Hierbei scheiden sich der überschüssige Oxalester und das Kondensationsprodukt als gelbes Öl ab. Man gibt unter Schütteln soviel Äther hinzu, bis sich der Oxalester gerade gelöst hat und das in Äther schwer lösliche Kondensationsprodukt flockig zurückbleibt; es wird abgesaugt und mit wenig Äther gewaschen: [*2-Nitro-3-benzyloxy-benzoyl*]-*brenztraubensäure-äthylester* kristallisiert aus Benzol in farblosen Nadeln vom Schmp. 138° . Ausb. 18 g (85% d.Th.).

$C_{19}H_{17}O_7N$ (371.3) Ber. C 61.45 H 4.62 N 3.77 Gef. C 61.56 H 4.80 N 3.75

[*2-Nitro-3-benzyloxy-benzoyl*]-*brenztraubensäure-äthylester- α -oxim (IV)*: 10 g *III* werden in 250 ccm Alkohol heiß gelöst und mit einer *Hydroxylaminacetat*-Lösung aus 4.2 g Hydroxylaminhydrochlorid in 40 ccm Alkohol tropfenweise versetzt. Die Lösung wird etwa 3 Stdn. bei Zimmertemperatur belassen und dann i. Vak. auf etwa 60 ccm eingengt. Dann wird unter gutem Schütteln tropfenweise mit Wasser versetzt und kräftig gerieben, bis Kristallisation

⁸⁾ Für die Ausarbeitung dieser Vorschrift haben wir Prof. Dr. T. B. Kim herzlich zu danken.

einsetzt. Man verdünnt langsam weiter mit Wasser, wobei man darauf achten muß, daß die zuerst gebildeten Kristalle nicht erneut in ein Öl übergehen. Der Oximester wird nach einigen Stdn. Stehenlassen bei 0° abgesaugt und aus Alkohol umkristallisiert: Farblose Nadeln vom Schmp. 139°. Ausb. 9.9 g (95% d.Th.).

$C_{19}H_{18}O_7N_2$ (386.3) Ber. C 59.30 H 4.70 N 7.20 Gef. C 59.62 H 4.71 N 7.11

*2-Nitro-3-hydroxy-benzoyl]-acrylsäure (V)*⁹⁾: Aus 180 g *Bariumglyoxalat* und einer Lösung von 41 ccm konz. Schwefelsäure in 110 ccm über Kupfersulfat destilliertem Eisessig wird unter Wasserkühlung und Feuchtigkeitsausschluß ein gleichmäßiger Brei hergestellt. Hierzu werden 12 g I und 30 ccm Acetanhydrid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 3 Tage auf 68–70° erhitzt. Das erkaltete Gemisch wird mit 200 ccm Wasser versetzt, vom Bariumsulfat abgesaugt und der Niederschlag mit 100 ccm Wasser ausgewaschen. Das gesamte braune Filtrat wird mit Chloroform mehrfach ausgeschüttelt. Die gelbe Chloroform-Lösung wird zweimal mit wenig Wasser gewaschen, i. Vak. bei 20° zur Trockne gebracht und der krist. Rückstand durch Aufbewahren über Kaliumhydroxyd i. Vak. von anhaftender Essigsäure befreit. Die *[2-Nitro-3-hydroxy-benzoyl]-acrylsäure* kann aus Wasser, Benzol oder Chloroform umkristallisiert werden. Ausb. 9.75 g (64% d.Th.); Schmp. 158°.

UV-Spektrum: λ_{\max} (ϵ): 218 (19150) 320 (2915) in Äthanol
232.5 (23400) 420 (4100) in *n*/10 NaOH

$C_{10}H_7O_6N$ (237.2) Ber. C 50.64 H 2.98 N 5.91 Gef. C 50.46 H 3.21 N 5.98

*2-Nitro-3-hydroxy-benzoyl]-alanin (VI)*⁴⁾: 710 mg (3 mMol) *V* werden mit 10 ccm 15-proz. wäbr. Ammoniak 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Durch Ansäuern mit verd. Salzsäure wird das *[2-Nitro-3-hydroxy-benzoyl]-alanin* ausgefällt und durch mehrmaliges Umfällen aus verd. wäbr. Ammoniak (1:10) gereinigt. Ausb. 731 mg (90% d.Th.). Zers.-P. 171–173°. Zur Analyse wird aus viel Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert.

$C_{10}H_{10}O_6N_2 \cdot 1H_2O$ (272.2) Ber. C 44.12 H 4.44 N 10.29 Gef. C 44.61 H 5.00 N 9.89

3-Hydroxy-kynurenin (VII): a) 2.9 g *IV* werden über Raney-Nickel (1.5 g) und Pd-Schwarz (0.2 g) in Äthanol bei 60° hydriert. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme wird unter Stickstoff eingedampft und das zurückbleibende gelbe Öl mit einer Lösung von 2.2 g $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ in 250 ccm Wasser versetzt. Nach Sättigung mit Stickstoff wird 2½ Stdn. geschüttelt und mit 2 *n* H_2SO_4 auf p_H 4 angesäuert. Nach Erwärmen auf 70° wird vom Bariumsulfat abgesaugt und mit wenig warmem Wasser gewaschen. Das Filtrat wird auf p_H 6 gebracht und i. Vak. unter Stickstoff eingeeengt. Bei 0° kristallisiert das *3-Hydroxy-kynurenin* in gelben Nadeln aus. Zers.-P. 238°, Ausb. 650–750 mg (40–45% d.Th.).

$C_{10}H_{12}O_4N_2$ (224.2) Ber. C 53.56 H 5.40 N 12.50 Gef. C 53.31 H 5.20 N 12.31

b) 218 mg (0.8 mMol) *VI* werden in 100 ccm Wasser suspendiert und mit Raney-Nickel bei 20° hydriert. Der Katalysator wird mit heißem Wasser gewaschen, die vereinigten Filtrate mit wenig verd. Salzsäure angesäuert und i. Vak. unter Kohlendioxyd zur Trockne gebracht. Das zurückbleibende, stark hygroskopische *3-Hydroxy-kynurenin-hydrochlorid* wird zur Entfernung des restlichen Lösungsmittels und der überschüss. Salzsäure 12 Stdn. im evakuierten Exsiccator über Ätzkali aufbewahrt. Bei der Neutralisation des in wenig Wasser gelösten Hydrochlorids mit verd. Ammoniak (1:10) kristallisiert die freie Aminosäure in gelben, feinen Nadeln aus. Sie wird aus wenig heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Ausb. 115 mg (64% d.Th.).

UV-Spektrum: λ_{\max} (ϵ): 235 (17200), 252.5 (6430), 377.5 (3954) in Äthanol
251 (14870), 290 (5700), 400 (2960) in *n*/10 NaOH
217.5 (11500), 320 (1402), 380 (1950) in *n*/10 HCl

⁹⁾ Für die Ausarbeitung dieser Vorschrift sind wir Dr. G. NEUBERT zu Dank verpflichtet.