

WILHELM SANDERMANN und HANS STOCKMANN

Untersuchungen über die Biogenese von Terpenen und Terpenoiden
mit markierten Verbindungen, I

Darstellung der radioaktiven Ausgangssubstanzen β,β -Dimethyl-acrylsäure, Geraniumsäure, Farnesyssäure und ω -Geranyl-geraniumsäure*)

Aus der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft,
Institut für Holzchemie und chemische Technologie des Holzes, Reinbek, Bez. Hamburg
(Eingegangen am 6. Februar 1957)

Als möglicherweise bei der Biogenese von Terpenen und Terpenoiden als Zwischenprodukte in Betracht kommende Verbindungen werden β,β -Dimethyl-acrylsäure, Geraniumsäure, Farnesyssäure und ω -Geranyl-geraniumsäure, in der Carboxylgruppe radioaktiv markiert, dargestellt. Die für Herstellung im Makroverfahren bekannten Methoden werden für die Isotopentechnik modifiziert.

Die von O. WALLACH¹⁾ formulierte Hypothese der biologischen Bildung von Terpenen aus Isopren wurde in den folgenden Jahrzehnten hinsichtlich des Grundbausteins und des Geltungsbereiches erweitert; so wurden Verbindungen in den Kreis der Betrachtungen einbezogen, die, wie die Sterine, sich nur z. T. in Isoprenbausteine aufgliedern lassen. Außer dem Isopren und den mit ihm in engem konstitutionellem Zusammenhang stehenden Alkoholen beanspruchte besonders der β -Methyl-crotonaldehyd^{2,3)} Interesse als möglicher spezifischer Grundbaustein der genannten Verbindungsklasse, da sowohl seine Bildung⁴⁾ als auch Weiterreaktion zu kondensierten Produkten⁵⁾ wie Dehydrocitrinal und Farnesinal unter zellmöglichen Bedingungen stattfand.

In neuerer Zeit wurde für die Funktion des Zwischenproduktes die β,β -Dimethyl-acrylsäure (I) bei der Kautschuksynthese vermutet⁶⁾ und bei der Biosynthese des Cholesterins bzw. Squalens⁷⁻¹⁰⁾, des Pulegons¹¹⁾ sowie der Carotinoide¹²⁾ nachgewiesen.

*) Auszug aus der Dissertat. H. STOCKMANN, Univ. Hamburg 1957.

1) Liebigs Ann. Chem. **239**, 1 [1887].

2) H. v. EULER, Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie **3**, 219 [1908].

3) H. v. EULER und E. KLUSSMANN, Svensk kem. Tidskr. **44**, 198 [1932].

4) A. KUSIN und N. NEWRAJEW, C. **1942** II, 41; Biochimia (russ.) **6**, 261 [1941].

5) F. G. FISCHER und A. MARSCHALL, Ber. dtsch. chem. Ges. **64**, 2825 [1931].

6) J. BONNER und B. ARREGUIN, Arch. Biochemistry **21**, 109 [1949].

7) K. BLOCH, L. C. CLARK und I. HARARY, J. biol. Chemistry **211**, 687 [1954].

8) H. RUDNEY, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2595 [1954]; **77**, 1698 [1955].

9) J. L. RABINOWITZ, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3037 [1954].

10) W. SANDERMANN und H. STOCKMANN, IV. Mitteil., im Druck.

11) W. SANDERMANN und H. STOCKMANN, II. Mitteil., Chem. Ber. **91**, 930 [1958], nachstehend.

12) T. W. GOODWIN und V. V. MODI, Congr. intern. biochim. Résumés communs., 3e Congr., Bruxelles 1955, S. 87.

An größeren Zwischengliedern ist bisher lediglich bei der Cholesterin-Biosynthese zwischen der β,β -Dimethyl-acrylsäure und Squalen nur die natürliche Farnesyssäure¹³⁾ bekannt.

Für die Darstellung der in der Carboxylgruppe markierten β,β -Dimethyl-acrylsäure (I) empfahl sich die Synthese aus $C_4 + C_1$, letzteres zweckmäßig in Form von Kohlendioxyd. Aus der Literatur waren folgende Verfahren bekannt, wobei die Carboxylierungsreaktion jeweils nicht angegeben ist:

1. Isobutylhalogenid + Mg \rightarrow Isovaleriansäure \rightarrow α -Brom-isovalerylbromid \rightarrow α -Brom-isovaleriansäureester \rightarrow I und anschließende Verseifung¹⁴⁾

2. Isobutylen + Na¹⁵⁾

3. Isobutenylbromid + Li¹⁶⁾

4. β -Methyl-allylchlorid + Mg¹⁷⁾.

Aus Vorversuchen ergab sich, daß die Methoden 2 und 3 infolge von Nebenreaktionen zur reichlichen Bildung von Neutralprodukten führten.

Das Verfahren 1 ergab in den ersten drei Stufen Ausbeuten um 90 %. Die Dehydrohalogenierung konnte aber nur mit maximal 55-proz. Ausbeute durchgeführt werden, wodurch die Gesamtausbeute 40 % d. Th. nicht überschritt.

Die gleiche Ausbeute wurde zunächst auch beim Verfahren 4 erhalten, wenn nach den in der Isotopentechnik üblichen Methoden¹⁸⁾ (5–6facher Überschuß des Grignard-Reagenzes gegenüber Kohlendioxyd) gearbeitet wurde.

Nachteilig bei Verfahren 4 waren stark wechselnde Ausbeuten an Grignard-Verbindung und reichliche Bildung von sauerstoffhaltigen Neutralprodukten. Beides läßt sich auf die hohe Reaktionsfreudigkeit des Allylhalogenids und seiner Grignard-Verbindung zurückführen. Außerdem hatte sich gezeigt, daß auch bei einem Überschuß von Kohlendioxyd gegenüber der Grignard-Verbindung und unter wechselnden Versuchsbedingungen letztere nicht vollständig umgesetzt wurde.

Zur Klärung dieses Widerspruchs können Gedankengänge von J. MEISENHEIMER¹⁹⁾ herangezogen werden, der annimmt, daß die Lösung von Allylmagnesiumhalogeniden „normale“ Komplexe der Grignard-Verbindung mit Äther als Liganden und „anomale“ mit Allylhalogenid in der äußeren Koordinationssphäre enthält. Macht man nun die Annahme, daß bei der acidimetrischen Gehaltsbestimmung, die bei Zimmertemperatur durchgeführt wird, beide Komplexe in Reaktion treten und bei der tiefen Temperatur der Carboxylierung nur noch das Ätherat reagiert, so erscheint der aufgezeigte Widerspruch einer Klärung näher.

Für die Darstellung der aktiven β,β -Dimethyl-acrylsäure (I) wurde Verfahren 4 schließlich so modifiziert, daß auf 1 Mol. der durch Titration festgestellten Grignard-Verbindung 1 Mol. Kohlendioxyd angewandt wurde. Die Verwertung des letzteren erfolgte dann nur zu 40–45 %, jedoch betrug die Ausbeute an I 72–74 %, bez. auf den Umsatz des Kohlendioxyds. Das nicht umgesetzte Kohlendioxyd wurde

13) F. DITURI, F. A. COBEY, J. V. B. WARMS und S. GURIN, J. biol. Chemistry **221**, 181 [1956].

14) W. B. LESLIE, Atomic Energy Commission MDDC 674.

15) A. MORTON und M. BROWN, J. Amer. chem. Soc. **67**, 2224 [1945].

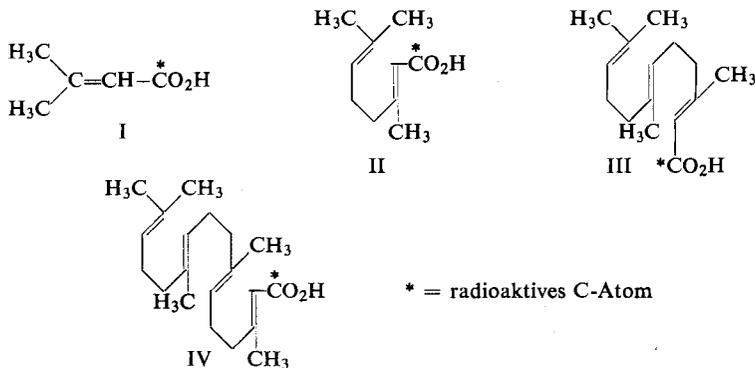
16) E. A. BRAUDE und C. J. TIMMONS, J. chem. Soc. [London] **1950**, 2000.

17) R. B. WAGNER, J. Amer. chem. Soc. **71**, 3214 [1949].

18) M. CALVIN, CH. HEIDELBERGER, J. C. REID, B. N. TOLBERT und P. F. YANKWICH, Isotopic Carbon, S. X, Verlag John Wiley & Sons, Inc., New York 1949.

19) J. MEISENHEIMER und J. CASPER, Ber. dtsch. chem. Ges. **54**, 1655 [1921].

quantitativ wiedergewonnen. Die gewünschte Wiedergewinnung des radioaktiven Materials aus den sauerstoffhaltigen Neutralprodukten in möglichst hoher spezifischer Aktivität wurde dadurch erreicht, daß die gebildete Grignard-Verbindung laufend der Reaktionsmischung entzogen wurde (vgl. Versuchsbeschreibung), womit die Bildung nichtaktiver Neutralprodukte hintangehalten wurde.



Die Darstellung der *Geraniumsäure* (II) erfolgte aus Methylheptenon und Bromessigester nach CH. A. VODOZ und H. SCHINZ²⁰⁾. Der benötigte Bromessigester wurde aus Kohlendioxyd nach G. A. ROPP²¹⁾ gewonnen. Zwecks Vermeidung von Nebenreaktionen wurde auf äußerste Reinheit des Methylheptenons Wert gelegt. Es wurde im Anschluß an die üblichen Reinigungsmethoden über das Semicarbazon und dessen Spaltung mit verd. Schwefelsäure in der Kälte rein gewonnen. Nur dieses Verfahren ergab ein Semicarbazon mit gleichem Schmelzpunkt wie vor der Spaltung. Die Ausbeute an II im mMol-Maßstab betrug 40–45 % d. Th., bez. auf Bariumcarbonat.

Die Darstellung der *Farnesylsäure* (III) erfolgte ebenfalls nach Angaben der Literatur²²⁾ aus Geranylaceton und Bromessigester. Das käufliche Keton wurde, wie beim Methylheptenon angegeben, gereinigt. Gesamtausbeute an III 40 % d. Th. Das für die Darstellung von ω -*Geranyl-geraniumsäure* (IV)²³⁾ benötigte Farnesylaceton wurde in Abänderung des „klassischen“ Verfahrens²⁴⁾ (Nerolidol \rightarrow Farnesylbromid \rightarrow Farnesyl-acetessigester und anschließende Ketonspaltung) direkt aus Nerolidol und Diketen gewonnen, indem der zunächst entstandene Acetessigsäure-nerolidylester pyrolysiert wurde, wobei sich unter Decarboxylierung und Inversion des Allylrestes Farnesylaceton bildete. Bei der Herstellung des Hexahydrofarnesylacetons war diese Methode bereits in der Literatur beschrieben worden^{25,26)}. Gesamtausbeute an IV 43 % d. Th.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

20) Helv. chim. Acta **33**, 3313 [1950]. 21) J. Amer. chem. Soc. **72**, 4459 [1950].

22) A. CALIEZI und H. SCHINZ, Helv. chim. Acta **35**, 1637 [1952].

23) A. CALIEZI und H. SCHINZ, Helv. chim. Acta **35**, 1649 [1952].

24) L. RUZICKA und G. FIRMENICH, Helv. chim. Acta **22**, 392 [1939].

25) Amer. Pat. 2660608; C. A. **48**, 13714 c [1954].

26) Das Keton wurde, da kein kristallines Semicarbazon erhalten werden konnte, mittels Girards Reagenz T gereinigt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

β,β -Dimethyl-acrylsäure (I): Auf einen Zweihalskolben wurde ein Liebig-Kühler gesetzt, dessen Innenrohr locker mit Magnesiumspänen gefüllt wurde. Er trug an seinem oberen Ende einen Anschütz-Aufsatz, dessen einer Schenkel mit einem Tropftrichter versehen war und auf dessen anderem sich ein gegen Feuchtigkeit gesicherter Rückflußkühler befand, der mit normalem Leitungswasser gespeist wurde, während durch den Liebig-Kühler Wasser von etwa 20° gepumpt wurde. Durch den zweiten Tubus des Zweihalskolbens wurde langsam trockener kohlendioxidfreier Stickstoff geleitet. Die oberste Schicht der Mg-Späne wurde mit β -Methyl-allylchlorid angeätzt und mit Äther befeuchtet. Die Lösung von 2 g β -Methyl-allyl-chlorid in 15 ccm Äther ließ man so zutropfen, daß die oberste Mg-Schicht ständig frei von Flüssigkeit war. Die acidimetrische Gehaltsbestimmung der Reaktionsmischung ergab etwas wechselnde Ausbeuten zwischen 70 und 80 %. Von der ätherischen Lösung wurden 3 mMol entnommen, in einen 250-ccm-Zweihalsrundkolben übergeführt und mit trockenem Äther auf etwa 80 ccm verdünnt.

Der eine Tubus des Zweihalskolbens trug einen Dreiwegehahn, der andere ein unten erweitertes Gaseinleitungsrohr mit Hahn, das unter den Flüssigkeitsspiegel tauchte. Letzteres war durch einen Polyisobutylen-schlauch mit dem Kohlendioxid-Entwicklungsgefäß verbunden, das sowohl das Zutropfen von Flüssigkeit wie auch wechselweise das Durchspülen mit Gasen ermöglichte.

Der Zweihalskolben und das CO₂-Entwicklungsgefäß wurden an der Wasserstrahlpumpe über den Dreiwegehahn evakuiert, nach Aufsieden des Äthers die Verbindung zur Wasserstrahlpumpe getrennt und die Grignard-Lösung in Aceton/Trockeneis auf -60° gekühlt. Im Kohlendioxid-Entwicklungsgefäß befanden sich 592.8 mg Bariumcarbonat mit einer Aktivität von 6.0 mC. Zur Freisetzung des Kohlendioxids ließ man 8*n* Überchlorsäure zutropfen und spülte nach beendeter Gasentwicklung mit etwa 10 ccm kohlendioxid- und wasserfreiem Stickstoff. Die Grignard-Lösung wurde während dieser Zeit im Kältebad belassen und von Zeit zu Zeit umgeschwenkt. Im Laufe von 10 Min. wurde sie auf -25° gebracht und bei dieser Temperatur noch 15 Min. aufbewahrt. Anschließend wurde der Grignard-Ansatz aus dem Kühlbad entfernt, nach Erreichen einer Temperatur von etwa 0° mit Stickstoff das nichtumgesetzte Kohlendioxid in 50 ccm 0.5*n* carbonatfreier Natronlauge absorbiert, mit Bariumchloridlösung gefällt und unter Ausschluß von Kohlendioxid abgesaugt. Wiedergewonnen wurden 315.4 mg, es waren also 277.4 mg Bariumcarbonat umgesetzt worden.

Danach wurde das Reaktionsgemisch mit eiskalter Ammoniumsulfatlösung zersetzt, anschließend 15 ccm 2*n* H₂SO₄ zugegeben, nach Überführung in einen Scheidetrichter die Schichten getrennt, die wäbr. Phase 2mal mit je 20 ccm Äther ausgezogen und die äther. Lösungen vereinigt. Diese wurden 2mal mit je 5 ccm Wasser gewaschen, das Waschwasser mit der schwefelsauren Lösung vereinigt und mit Wasserdampf destilliert. Nachdem 1 l Destillat übergegangen war, wurden in den Destillierkolben 20 mg der auf gleichem Wege bereiteten inaktiven, reinen β -Methyl-vinyllessigsäure (das β,γ -ungesättigte Isomere von I) zugegeben, abermals 1 l abdestilliert, nochmals 20 mg der genannten Säure zugefügt und 1¹/₂ l Flüssigkeit erneut abdestilliert. Danach wurde eine Probe von 1 ccm des nun übergehenden Destillats auf Radioaktivität geprüft. Pro ccm wurden 860 Zerfälle gemessen, die weniger als dem 10⁵. Teil der umgesetzten Aktivität entsprechen, und die Destillation abgebrochen.

Die ätherische Lösung war inzwischen mit 3 mal je 10 ccm 2*n* KOH ausgeschüttelt worden und wurde mit dem eben gewonnenen Destillat vereinigt. Der *p*_H-Wert der wäßrigen Lösung betrug über 9, deshalb wurde ohne weitere Alkalizugabe das Wasser i. Vak. abgedampft und

der Rückstand mit so viel Kaliumhydroxyd versetzt, daß er in Bezug auf dieses 25-proz. war, sein Volumen betrug ungefähr 15 ccm. Die Umlagerung der β -Methyl-vinyllessigsäure in I wurde in Abänderung des WAGNERSchen Verfahrens nach MORTON¹⁵⁾ durchgeführt und entsprechend die alkalische Lösung 25 Min. gekocht. Nach Abkühlen wurde vorsichtig unter weiterer Kühlung verd. Schwefelsäure (1:3) im Überschuß zugegeben, zur Bindung noch vorhandener Chlorwasserstoffsäure (aus dem β -Methyl-allylchlorid) 2 g Silbersulfat zugefügt und wiederum mit Wasserdampf destilliert*).

Nachdem 2 l Destillat übergegangen waren, wurden in den Destillationskolben 20 mg reinste inaktive I gegeben und nach Übergang eines weiteren Liters abermals 20 mg zugefügt, nach Abdestillieren von weiteren 1 $\frac{1}{2}$ l wurde die Operation unterbrochen und das Destillat mit 0.1 n carbonatfreier Kalilauge gegen Phenolphthalein titriert. Verbrauch 18.3 ccm, Ausb. 73 % d. Th., bezogen auf ungesetztes Bariumcarbonat. Zur titrierten Lösung wurden weitere 20 ccm 0.1 n KOH gegeben, i. Vak. auf 1 l eingeengt, davon 1 ccm abgenommen und tropfenweise in ein V2A-Schälchen gegeben, dessen Rand mit Siliconöl eingerieben war. Der Durchmesser des nach Verdunstung zurückbleibenden Fleckes betrug 16 mm und gab bei der Prüfung auf Radioaktivität im Durchschnitt 112900 Zerfälle/Min. Die Zählausbeute der benutzten Meßanordnung betrug 2.70 %.

Für das Flächengewicht von 0.15 mg/cm² beträgt der Korrekturfaktor für die Selbstabsorption 0.974²⁷⁾. Zahl der Zerfälle (korr.) 115900/Min., Ausbeute an Radioaktivität 69 %.

*Reinheitsprüfung der β,β -Dimethyl-acrylsäure**):* Eine Probe des neutralisierten zweiten Wasserdampfdestillats wurde mit 100 mg des Kaliumsalzes einer aus Mesityloxyd hergestellten inaktiven β,β -Dimethyl-acrylsäure versetzt und solange eine 10-proz. alkoholische Lösung von *p*-Chlorbenzyl-isothioharnstoff-hydrochlorid zugegeben, bis kein Niederschlag mehr entstand. Das abgesaugte Salz wurde wechselweise aus Methanol/Wasser und Dioxan/Wasser umkristallisiert; Schmp. 146–147°; spezif. Aktivität 644 Zerfälle/Min. und mg, die sich auch nach zweimal wiederholter Umkristallisation nicht änderte. Die Mutterlauge der Fällung wurde portionsweise mit je 50 mg reinem inaktivem *p*-Chlorbenzyl-isothiuroniumsalz der β,β -Dimethyl-acrylsäure versetzt, nach jeweiliger Zugabe bis zur Lösung erhitzt, nach Erkalten filtriert und das Filtrat erneut mit festem Thiuroniumsalz versetzt.

Ursprüngliche Mutterlauge:	320 Zerf./Min. und 0.03 ccm
nach 1. Zugabe von Thiuroniumsalz:	230 Zerf./Min. und 0.03 ccm
nach 2. Zugabe von Thiuroniumsalz:	190 Zerf./Min. und 0.03 ccm
nach 3. Zugabe von Thiuroniumsalz:	115 Zerf./Min. und 0.03 ccm
nach 4. Zugabe von Thiuroniumsalz:	86 Zerf./Min. und 0.03 ccm

Geraniumsäure (II): II wurde nach VODOZ und SCHINZ²⁰⁾ aus *Methylheptenon* und *Bromessigsäure-methylester* hergestellt. Das angewandte, käufliche Methylheptenon mußte allerdings aufs sorgfältigste gereinigt werden. Zu dem Zweck wurde es 12 Stdn. unter Rühren mit 10-proz. Kaliumcarbonatlösung gekocht, nach Aufarbeitung in das Semicarbazon übergeführt und dieses bis zur Schmelzpunktskonstanz (Schmp. 136°) umkristallisiert. Zur Spaltung wurden 1 Mol. Semicarbazon, 1.5 Moll. 5 n H₂SO₄ und 150 ccm Petroläther bis zur Auflösung der festen Bestandteile geschüttelt und aufgearbeitet. Das Keton, dessen Semicarbazon scharf bei 136° schmolz, wurde nach dem Schmelzpunkt mit Bromessigester umgesetzt.

*¹⁾ Die entsäuerte Ätherschicht enthielt noch starke Aktivität und wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels auf Bariumcarbonat verarbeitet.

**²⁾ Reinheitsprüfung und physiologische Versuche wurden an getrennt hergestellten Präparaten vorgenommen.

²⁷⁾ l. c. 18), S. 317.

Der benötigte Bromessigester wurde nach ROPP²¹⁾ durch Umsetzung von Bromessigsäure mit Diazomethan gewonnen. Insgesamt wurden aus 6.5 mC Bariumcarbonat mit einer spezif. Aktivität von 2 mC/mMol 5.2 mC Bromessigester in einer Menge von 5.2 mMol erhalten, der durch isotopische Verdünnung eine spezif. Aktivität von 1 mC/mMol aufwies. Die *Geraniumsäure* wurde in 40–45-proz. Gesamtausbeute, bez. auf Bariumcarbonat, gewonnen. Gesamtmenge 1.9 mMol, spezif. Aktivität 0.4 mC/mMol.

Farnesyssäure (III): Die Darstellung erfolgte nach CALIEZI und SCHINZ²²⁾ aus *Geranylaceton* und *Bromessigsäure-äthylester*. Ersteres war käuflich und wurde über das Semicarbazon gereinigt. Die Spaltung des reinen Semicarbazons (Schmp. 95–96°) erfolgte in gleicher Weise, wie beim Methylheptenon angegeben. Die Gesamtausbeute an *III*, bez. auf eingesetztes Bariumcarbonat, betrug 40%. Ausb. an Radioaktivität 38%. Insgesamt wurden 2.0 mMol mit einer spezif. Aktivität von 0.4 mC/mMol gewonnen.

ω-Geranyl-geraniumsäure (IV): Diese Säure läßt sich nach dem Schrifttum²³⁾ aus *Farnesylaceton* und *Bromessigsäure-äthylester* darstellen. Das Farnesylaceton wurde in Analogie zu einem Verfahren zur Herstellung von Hexahydrofarnesylaceton²⁵⁾ hergestellt. Dazu wurde wie folgt verfahren: 22.2 g käufliches Nerolidol wurden mit 3 Tropfen Pyridin versetzt, dazu ließ man nach Erwärmen auf 40–45° 9 g frisch i. Vak. destilliertes Diketen so zutropfen, daß die Temperatur nach Entfernung der Heizquelle auf der angegebenen Höhe blieb. Nach beendeter Zugabe wurde noch 10 Min. auf 55° erwärmt, nach Abkühlen mit dem doppelten Volumen Äther versetzt, nacheinander mit verd. Schwefelsäure, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und der Äther abdestilliert. Der Rückstand wurde mit 0.1 g *p*-Toluolsulfonsäure erwärmt. Bei 150–160° setzte Kohlendioxydentwicklung ein. Im kohlendioxydfreien Stickstoffstrom wurde die Kohlensäure in 200 ccm carbonatfreie 1 *n* NaOH übergetrieben und titriert. Gef.: 73 mMol Kohlendioxyd. Der Rückstand wurde wie üblich aufgearbeitet. Sdp_{0.03} 107–108°, Ausb. 17.2 g (66% d. Th.). Das Keton wurde mit Girards Reagenz T gereinigt und auf *IV* verarbeitet²²⁾. Die Ausbeute an markierter *IV* betrug 43%, die an Radioaktivität 41%. Insgesamt wurden 2.0 mMol mit einer spezif. Aktivität von 0.4 mC/mMol gewonnen.