

## Darstellung von Coniferyl- und Sinapinalkohol, markiert in den Methoxygruppen durch $^{14}\text{C}$

K. HAIDER und S. LIM

Institut für Biochemie des Bodens der Forschungsanstalt für Landwirtschaft  
Braunschweig-Völkenrode, Deutschland (Direktor : Prof. Dr. W. Flaig)

(Empfangen am 22 Oktober 1965)

### SUMMARY

*For experiments about the microbial cleavage of phenolic methyl-ethers and lignin like polymerides, phenolic compounds which arise during microbial lignin decomposition and also lignin alcohols such as coniferyl- and sinapylalcohol were labelled in the methoxyl-groups by  $^{14}\text{C}$ . For this reason suitable preliminary compounds were reacted with  $^{14}\text{CH}_3\text{I}$  and vanillic acid and syringic acid were prepared and reduced to vanillin and syringaaldehyde. By reacting these aldehydes with malonic acid, ferulic acid and sinapic acid were obtained and reduced to coniferyl- and sinapylalcohol. The yield was around 15 or respectively 10 % related to the used amount of methyl iodide; the specific activity of the coniferylalcohol was around 0,2 mC/mmole and 0,1 mC/mmole for the sinapylalcohol and for the other compounds, 0,5 mC/mmole.*

### ZUSAMMENFASSUNG

*Für Untersuchungen über die mikrobielle Abspaltung von Methylgruppen aus phenolischen Methyläthern und aus ligninähnlichen Polymerisaten wurden verschiedene Phenole, die als Spaltprodukte während dem mikrobiellen Abbau von Lignin auftreten, sowie die Ligninalkohole Coniferyl- und Sinapinalkohol, in den Methylgruppen durch  $^{14}\text{C}$  markiert. Dabei wurde durch eine Umsetzung von geeigneten Vorstufen mit  $^{14}\text{CH}_3\text{I}$  Vanillinsäure und Syringasäure synthetisiert und zu Vanillin und Syringaaldehyd reduziert. Durch Umsetzung der Aldehyde mit Malonsäure wurde Ferulasäure und Sinapinsäure dargestellt und zu Coniferyl- und Sinapinalkohol reduziert. Die Ausbeuten des Verfahrens lagen bei 15 bzw. 10 %, bezogen auf das eingesetzte Methyljodid; die spezifische Aktivität des Coniferylalkohols betrug etwa 0,2 mC pro mMol, die des Sinapinalkohols 0,1 mC/mMol und die der übrigen Verbindungen etwa 0,5 mC pro mMol.*

## EINLEITUNG.

HENDERSON <sup>(1)</sup> findet bei einer Einwirkung von Bodenmikroorganismen auf verschiedene Phenolmethyläther eine Abspaltung der Methylgruppen und das intermediäre Auftreten der freien phenolischen Verbindungen. Wir <sup>(2, 3, 4)</sup> interessieren uns im Rahmen der Untersuchungen über die Bildung der organischen Bodensubstanz aus Lignin für die Abspaltung der Methylgruppen aus dem Lignin und phenolischen Spaltstücken des Lignins. Hierfür erwies es sich als zweckmäßig, verschiedene Phenolmethyläther und Ligninalkohole in den Methylgruppen durch  $^{14}\text{C}$  zu markieren, um die Abspaltungsrate und die weiteren Umsetzungen der Methylgruppen nach der Abspaltung besser verfolgen zu können <sup>(2, 3, 4)</sup>.

Bei allen radiochemischen Synthesen besteht der Wunsch, die teure markierte Ausgangsverbindung möglichst quantitativ in Reaktion zu bringen. Daher schied eine Methylierung der freien Phenole durch markiertes Diazomethan oder Dimethylsulfat aus. In einer Arbeit von MURRAY <sup>(5)</sup> wird zur Darstellung des Östron- $^{14}\text{C}$ -methyläthers Östron mit  $^{14}\text{CH}_3\text{Br}$  in Aceton unter Zusatz von Kaliumcarbonat in guter Ausbeute methyliert. Wir versuchten Methyljodid an Protocatechusäure-methylester-4-benzyläther in Methyläthylketon unter Anwesenheit von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anzulagern. Bei inaktiven Vorversuchen erwiesen sich Methyljodid und Methylbromid als gleichwertig, daher wurde das erstere wegen seines höheren Siedepunktes vorgezogen. Es war zweckmäßig, das Methyljodid nicht in der stöchiometrischen Menge zu verwenden, sondern im Unterschuss und nach Ablauf der Reaktion mit Dimethylsulfat nachzumethylieren. Besonders bei der Darstellung der Trimethoxybenzoesäure durch Anlagerung von Methyljodid an Gallussäuremethylester ließ sich dadurch ein besserer Umsatz des Methyljodids erzielen.

Im einzelnen verlief die Synthese über folgende Stufen: Protocatechusäuremethylester-4-benzyläther wurde mit  $^{14}\text{CH}_3\text{J}$  in Methyläthylketon unter Zusatz von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  umgesetzt und nach Ablauf der Reaktion mit Dimethylsulfat nachmethyliert. Der Vanillinsäuremethylester-4-benzyläther wurde verseift und ein Teil der Benzylvanillinsäure durch Kochen mit äthanolischer Salzsäure gespalten und daraus Vanillinsäure gewonnen. Ein anderer Teil der Benzylvanillinsäure wurde mit  $\text{Pd}/\text{H}_2$  reduziert und in Vanillin überführt. Durch Umsetzung des Vanillins mit Malonsäure erfolgte die Herstellung von Ferulasäure, die in Acetylferulasäure und in Acetylferulasäurechlorid überführt wurde. Diese wurde mit  $\text{LiAlH}_4$  zum Coniferylalkohol reduziert.

Gallussäuremethylester wurde mit  $^{14}\text{CH}_3\text{J}$  wie oben beschrieben umgesetzt und wiederum mit Dimethylsulfat nachmethyliert. Durch Verseifen des Esters wurde Trimethoxybenzoesäure erhalten, die partiell zur Syringasäure demethyliert wurde. Nach Acetylierung erfolgte mit  $\text{Pd}/\text{H}_2$  eine Reduktion zum Acetylsyringaldehyd, dieser wurde mit Malonsäure zu Acetylsinapinsäure umgesetzt. Durch Thionylchlorid wurde die Acetylsinapinsäure in das Säurechlorid überführt und mit Äthanol zu dem Acetylsinapinsäure-äthylester umgesetzt. Die Reduktion dieser Verbindung mit  $\text{LiAlH}_4$  ergab Sinapinalkohol.

Bei den inaktiven Vorversuchen zur Durchführung der Synthese ergab sich eine gute Übereinstimmung der Schmelzpunkte aller Substanzen mit den in der Literatur angegebenen Schmelzpunkten. Die markierten Substanzen wurden chromatographisch auf ihre Reinheit untersucht.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

##### *Protocatechusäure-methylester-4-benzyläther.*

10 g Protocatechusäuremethylester (Schmp. 142° C) werden in 45 ml Methyläthylketon gelöst und mit 12,5 g trockenem Kaliumcarbonat versetzt und nach Zusatz von 8,3 g Benzylchlorid 6 Stunden gekocht. Danach wird abgesaugt und der Rückstand gut mit Methyläthylketon ausgewaschen. Das Methyläthylketon wird sorgfältig abdestilliert und der Rückstand aus 60 %igem wässrigen Methanol umkristallisiert. Es empfiehlt sich, mehrmals aus 60 %igem Methanol umzukristallisieren, da die Ausbeute bei der weiteren Umsetzung vom Reinheitsgrad des Präparates abhängig ist. Schmp. 128°C, Ausbeute 35 %.

##### *Vanillinsäuremethylester-4-benzyläther und Vanillinsäure-4-benzyläther ( $O^{14}CH_3$ ).*

516 mg (2 mMol) Protocatechusäure-methylester-4-benzyläther werden in 5 ml Methyläthylketon in einem Kölbchen mit 14,5 mm Schliff gelöst und mit 333 mg Kaliumcarbonat versetzt, sowie mit 220 mg Methyljodid (1,55 mMol). Dann wird das Kölbchen an eine Vakuumlinie angeschlossen und mit Aceton-Trockeneis gekühlt und evakuiert. Die Ampulle mit dem aktiven Methyljodid (1 mC in 4,8 mg, bezogen vom Radiochemical Center, Amersham, Great Britain) wird ebenfalls an die Vakuumapparatur angeschlossen und das Methyljodid freigesetzt und in das Kölbchen überkondensiert. Dann wird Stickstoff in die Vakuumapparatur eingelassen und das Kölbchen abgenommen und verschlossen. Es wird unter Kühlung etwa 2 Stunden stehen gelassen, dann noch 2 Stunden bei Zimmertemperatur. Anschließend wird unter Rückfluß etwa 4 Stunden auf 60° C, dann 16 Stunden auf 85° C erhitzt, schließlich abfiltriert und der Rückstand gut mit Methyläthylketon nachgewaschen. Die klare, etwas bräunlich gefärbte Lösung wird mit einem Überschuß an Dimethylsulfat versetzt und nochmals 3 Stunden erhitzt. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand mit 10 ml äthanolischer Natronlauge (30 ml H<sub>2</sub>O + 3 g NaOH + 70 ml Äthanol) 1 Stunde unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wird nochmals mit etwas Wasser versetzt und dann mit verd. HCl angesäuert und ausgeäthert. Die Benzylvanillinsäure wird aus der ätherischen Lösung mit 1 %iger Natronlauge mehrmals ausgeschüttelt und nach Vertreiben des Äthers durch Ansäuern gefällt. Der Niederschlag wird nach längerem Stehen abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert. Es ergaben sich 400 mg Benzylvanillinsäure. Ausbeute 79%, bezogen auf Protocatechusäure-methylester-4-benzyläther; die radiometrische

Ausbeute, bezogen auf das eingesetzte Methyljodid lag bei etwa 85 %. Die spezifische Aktivität der Benzylvanillinsäure betrug 0,5 mC/mMol.

*Vanillinsäure ( $O^{14}\text{CH}_3$ ).*

Die Spaltung des Benzyläthers erfolgt durch äthanolische Salzsäure<sup>1</sup>. Hierbei werden 100 mg der Benzylvanillinsäure mit 1 ml Äthanol und 2 ml konz. HCl bei 120°C 1,5 Stunden gekocht und dann der Alkohol durch Aufblasen von Stickstoff entfernt und die Vanillinsäure in der Kälte auskristallisieren gelassen, schließlich aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute 80 %, spezifische Aktivität 0,5 mC/mMol.

*Vanillin ( $O^{14}\text{CH}_3$ ).*

Die Reduktion der Benzylvanillinsäure zum Vanillin erfolgt nach den Angaben von KRATZL und BILLEK<sup>(6)</sup>. Zur Spaltung des Benzyläthers des Vanillins wurden etwa 300 mg mit 50 ml H<sub>2</sub>O und 50 ml konz. HCl versetzt und bei 120°C im N<sub>2</sub>-Strom solange Lösungsmittel abdestilliert, bis kein Benzylchlorid mehr übergeht. Das Vanillin wird nach<sup>(6)</sup> als m-Nitrobenzhydrazon ausgefällt und zum Vanillin aufgearbeitet. Ausbeute 63 %, bezogen auf die eingesetzte Benzylvanillinsäure. ZENK<sup>(7)</sup> findet, daß auch eine direkte Methylierung von Protocatechualdehyd-4-benzyläther mit Methyljodid nach anschließender Abspaltung der Benzylgruppe in guter Ausbeute zum Vanillin führt.

*Ferulasäure und Coniferylalkohol ( $O^{14}\text{CH}_3$ ).*

Die Darstellung dieser Verbindungen erfolgt nach den Angaben von KRATZL und BILLEK<sup>(8)</sup>. Dabei wurde die Ferulasäure ( $O^{14}\text{CH}_3$ ) vor der weiteren Umsetzung mit inaktiver Ferulasäure auf das doppelte verschnitten, dann acetyliert und mit Thionylchlorid in das Säurechlorid überführt. Das Acetylferulasäurechlorid wird bei 10<sup>-3</sup> Torr in einem 3-Kugelrohr zur Reinigung destilliert und mit LiAlH<sub>4</sub> zum Coniferylalkohol reduziert. Die Ausbeute des gesamten Verfahrens zur Darstellung des methylmarkierten Coniferylalkohols betrug etwa 15 %, bezogen auf das eingesetzte Methyljodid. Die spezifische Aktivität lag bei 0,2 mC/mMol.

*Trimethoxybenzoesäure ( $O^{14}\text{CH}_3$ ).*

370 mg (2 mMol) Gallussäuremethylester (Schmp. 200°C) werden in 10 ml Methyläthylketon gelöst und mit 900 mg trockenem Kaliumcarbonat versetzt. Danach werden 450 mg Methyljodid zugegeben, dies entspricht etwas mehr als der halben stöchiometrischen Menge. Die Zugabe des aktiven Methyljodids (1 mC) erfolgt in der gleichen Weise, wie es bei der Darstellung

<sup>1</sup> Persönliche Mitteilung von Dr. G. BILLEK.

der Benzylvanillinsäure beschrieben wurde. Nach zweistündigem Stehen in der Kälte und weiteren 2 Stunden bei Zimmertemperatur wird die Mischung erst 4 Stunden auf 60°, dann 20 Stunden auf 85°C erhitzt. Nach Abfiltrieren des Kaliumcarbonats wird ein Überschuß von Dimethylsulfat zugesetzt und nochmals 3 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die weitere Aufarbeitung und die Verseifung des Esters erfolgt, wie bei der Darstellung von Benzylvanillinsäure beschrieben wurde. Die so erhaltene Trimethoxybenzoesäure läßt sich aus Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle umkristallisieren. Die Ausbeute war 310 mg (73 %). Die radiometrische Ausbeute lag bei etwa 80 %. Die spezifische Aktivität betrug 0,5 mC/mMol.

#### *Syringasäure (O<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>).*

Die partielle Demethylierung der Trimethoxybenzoesäure zur Syringasäure erfolgte nach BOGERT und COYNE <sup>(9)</sup>. Das Verfahren verlief mit einer Ausbeute von etwa 80 % durch Erwärmen von Trimethoxybenzoesäure in konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 40°C unter gelegentlichem Rühren. Die radiometrische Ausbeute vermindert sich durch den Verlust einer Methylgruppe auf 56 %, spezifische Aktivität 0,35 mC/mMol.

#### *Syringaldehyd, Sinapinsäure und Sinapinalkohol (O<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>).*

Durch Acetylieren von Syringasäure ließ sich nach FREUDENBERG und HÜBNER <sup>(10)</sup> die Acetylsyringasäure darstellen und diese wird mit Wasserstoff in Anwesenheit eines Palladium Katalysators zum Acetylsyringaldehyd reduziert (Ausbeute 79 %). Durch Umsetzung des Aldehyds mit Malonsäure wird Acetylsinapinsäure erhalten. Bei dieser Umsetzung wird analog einer Methode zur Darstellung von Sinapinsäure nach KRATZL und BUCHELA <sup>(11)</sup> verfahren (Ausbeute 80 %). Die Acetylsinapinsäure wurde nach FREUDENBERG und DILLENBURG <sup>(12)</sup> mit Thionylchlorid in das Säurechlorid überführt und mit Äthanol zum Acetylsinapinsäure-äthylester umgesetzt. Vor dem Umkristallisieren aus Äthanol wird das Rohprodukt mit nichtmarkiertem Acetylsinapinsäure-äthylester im Verhältnis 1 : 2 verschnitten (Ausbeute 82 %). Durch Reduktion des Esters mit LiAlH<sub>4</sub> nach <sup>(12)</sup> wird Sinapinalkohol erhalten (Ausbeute 50 %). Diese Methode ergab ein reineres Produkt als es bei dem von <sup>(10)</sup> vorgeschlagenen Verfahren erhalten wurde, bei dem der Acetylsyringaldehyd mit Malonsäuremonoäthylester umgesetzt wird. Die Ausbeute des gesamten Verfahrens zur Darstellung des methylmarkierten Sinapinalkohols betrug etwa 10 %, bezogen auf das eingesetzte <sup>14</sup>CH<sub>3</sub>J, die spezifische Aktivität lag bei etwa 0,1 mC/mMol.

Dem Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung sei an dieser Stelle für die Überlassung von Personal- und Sachmitteln gedankt.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. HENDERSON, M. E. K. — *J. Gen. Microbiol.*, **16** : 686 (1957).
2. HAIDER, K., LIM, S. U. und FLAIG, W. — *Landwirtsch. Forschung*, **15** : 196 (1962).
3. HAIDER, K., LIM, S. U. und FLAIG, W. — *Holzforschung*, **18** : 81 (1964).
4. HAIDER, K. und LIM, S. U. — In Vorbereitung.
5. MURRAY, A. — In A. MURRAY and D. L. WILLIAMS : *Organic Synthesis with Isotopes*, Interscience Publishers, Inc., New York (1958), I : 1094.
6. KRATZL, K. und BILLEK, G. — *Holzforschung*, **7** : 66 (1953).
7. ZENK, M. H. — *Z. Pflanzenphysiol.* (Im Druck).
8. KRATZL, K. und BILLEK, G. — *Mh. Chem.*, **84** : 406 (1953).
9. BOGERT, M. J. and COYNE, B. B. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **51** : 569 (1929).
10. FREUDENBERG, K. und HÜBNER, H. H. — *Chem. Ber.*, **85** : 1181 (1952).
11. KRATZL, K. und BUCHTELA, K. — *Mh. Chem.*, **90** : 1 (1959).
12. FREUDENBERG, K. und DILLENBURG, R. — *Chem. Ber.*, **84** : 67 (1951).