

Synthese von Pulvinsäure-[^{14}C], 4-Hydroxy-pulvinsäure-[^{14}C] und
4'-Hydroxy-pulvinsäure-[^{14}C]

Hans Ehrenfried Noppel*, Karl-Heinz Schweer* und Friedrich von Massow**

*Institut für Radiochemie der Gesellschaft für Kernforschung mbH.

D-7500 Karlsruhe, BRD

**Botanisches Institut, Lehrstuhl 1, Universität (TH) Karlsruhe

D-7500 Karlsruhe, BRD

Received on July 31, 1975

SUMMARY

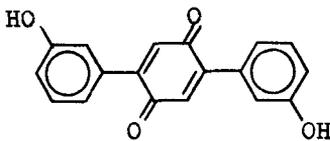
The syntheses of Pulvinic acid-[^{14}C], 4- and 4'-Hydroxy-pulvinic acid-[^{14}C], starting with phenylacetonitrile-[2- ^{14}C], are described. The identity of each of the labelled compounds is established by thin layer chromatographic comparison with the unlabelled one, synthesized by the same method. The latter were identified with the aid of elementary analysis, mass-, ^1H -n.m.r.- and infrared spectroscopy.

ZUSAMMENFASSUNG

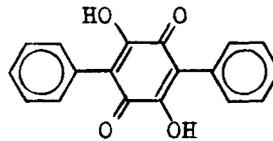
Es wird die Synthese von Pulvinsäure-[^{14}C], 4- und 4'-Hydroxy-pulvinsäure-[^{14}C], ausgehend von Phenylacetonitril-[2- ^{14}C], beschrieben. Die Identität der markierten Verbindungen wurde durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit den auf gleichem Wege synthetisierten inaktiven Substanzen sichergestellt, deren Struktur durch Elementaranalyse, Massen-, ^1H -NMR- und IR-Spektren festgelegt worden war.

1. EINLEITUNG

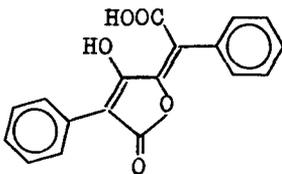
Zur Klärung der Biosynthese von Farbstoffen der Terphenylchinon-Gruppe, z.B. Volucrisporin⁽¹⁾ und Polyporsäure⁽²⁾, sowie der Terphenylchinon-Folgeprodukte, den Pulvinsäure-Derivaten⁽²⁾, wurden schon eingehende Untersuchungen angestellt. Dabei wurden auch radioaktiv markierte Verbindungen eingesetzt^(1,2). Für die komplizierter gebauten Farbstoffe vom Xylerythrin-Typ⁽³⁻⁶⁾, die von dem holzerstörenden Pilz *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. auf befallenen Holz gebildet werden, liegen bisher nur erste Hinweise zur Biosynthese vor⁽⁷⁾. Weil Xylerythrin sowohl das Terphenylchinon-Gerüst als auch die Pulvinsäure-Struktur enthält, ist die Bildungsweise dieser Farbstoffe nicht von vornherein klar voraussagbar.



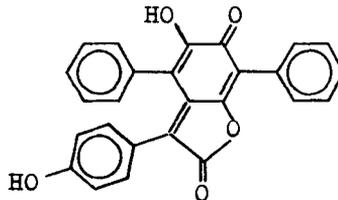
Volucrisporin



Polyporsäure



Pulvinsäure



Xylerythrin

Bisher wurden für die Biosynthese derartiger Pigmente zwei Möglichkeiten diskutiert: Gripenberg und Martikkala⁽⁵⁾ vermuten eine Kondensation von Polyporsäure mit einem p-hydroxy-substituierten Aromaten, während v. Massow und Nimz⁽⁷⁾ annehmen, daß an eine Pulvinsäure-Zwischenstufe eine weitere Phenylpropaneinheit ankondensiert. Noch konnte keine Entscheidung getroffen werden, welche der beiden Hypothesen den Gegebenheiten des Pilzes entspricht.

In enger Zusammenarbeit mit dem Botanischen Institut der Universität (TH) Karlsruhe synthetisierten wir deshalb im Institut für Radiochemie des Kernforschungszentrums Karlsruhe Pulvinsäure sowie die beiden möglichen, in den Phenylringen mono-substituierten p-Hydroxy-Derivate. Die Präparate wurden dabei an genau definierten, zwischen den beiden Phenylringen liegenden C-Atomen ^{14}C -markiert.

2. SYNTHESWEGE

In Anlehnung an die Arbeiten von Adams und Calvery⁽⁸⁾, Asano und Kameda⁽⁹⁾ sowie Frank, Clark und Coker⁽¹⁰⁾ wurde der im nachstehenden Formelschema aufgezeichnete Syntheseweg beschriftet:

Ausgehend von Phenylacetonitril-[$2\text{-}^{14}\text{C}$] (I) (=Benzylcyanid-[$7\text{-}^{14}\text{C}$]; Lieferant: Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/M.) erhielten wir mit Oxalsäurediäthylester durch Esterkondensation den 3-Phenyl-3-cyanobrenztraubensäureäthylester-[$3\text{-}^{14}\text{C}$] (II), der als Ausgangssubstanz für die unsubstituierte und substituierte Pulvinsäure diente.

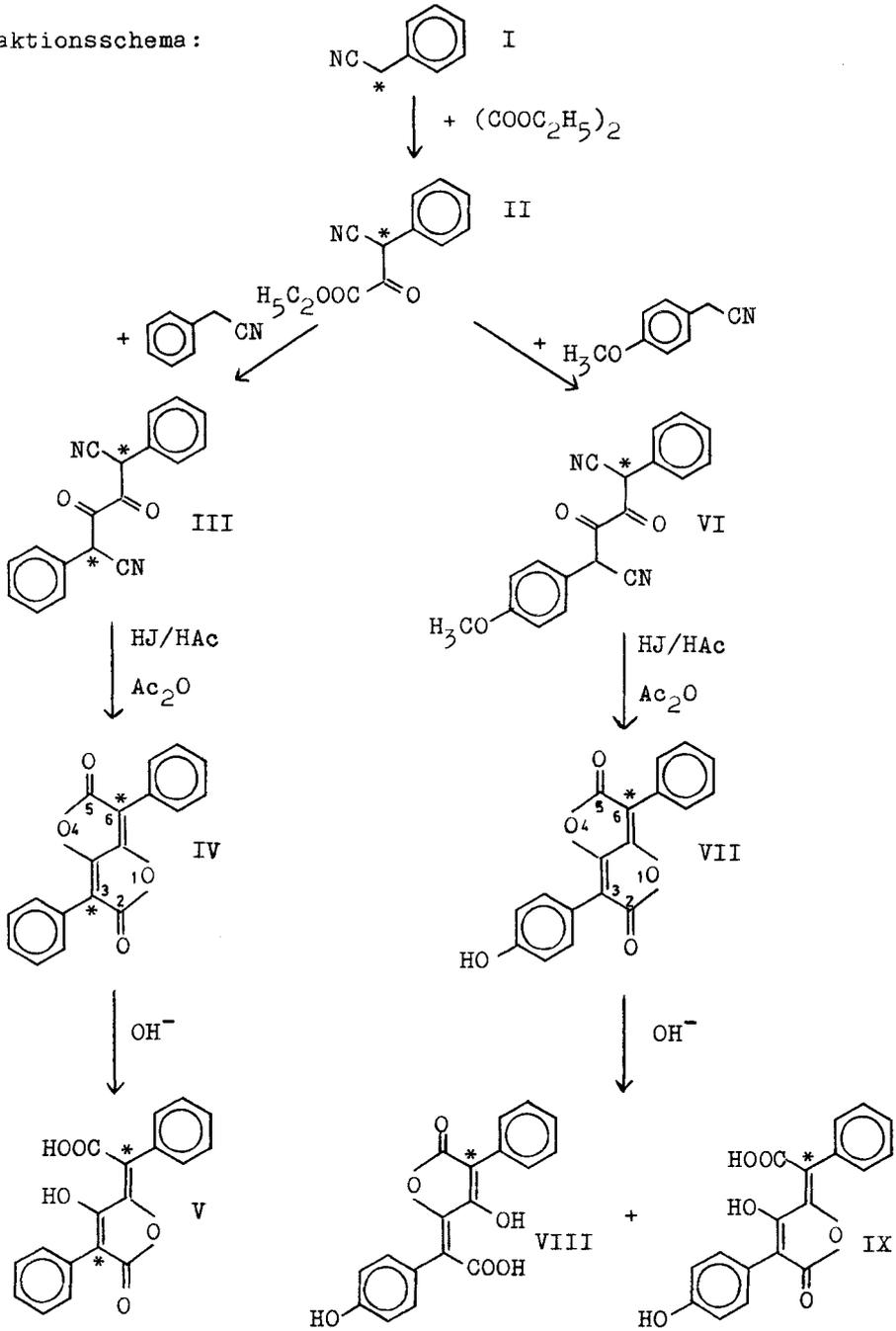
2.1 Synthese der Pulvinsäure-[^{14}C]

Durch nochmalige Esterkondensation des 3-Phenyl-3-cyanobrenztraubensäureäthylesters-[$3\text{-}^{14}\text{C}$] (II) mit inaktivem Benzylcyanid wurde das 2,5-Diphenyl-ketipinsäure-dinitril-[$2,5\text{-}^{14}\text{C}_{1/2}$] (III) erhalten.

Durch Verseifung mittels farbloser, konstant siedender Jodwasserstoffsäure⁽¹¹⁾ (D. 1,7)* in Eisessig und Komplettierung des Ring-

*Es muß eindringlich davor gewarnt werden, die Destillation der Jodwasserstoffsäure nach Entfärben mit Unterphosphoriger Säure ohne weitere Sicherheitsmaßnahmen durchzuführen. In einem Fall ereignete sich nach beendeter Destillation eine sehr heftige Explosion, vermutlich infolge Bildung selbstentzündlicher Phosphine. Die Destillation ist gefahrlos durchzuführen, wenn Stickstoff als Trägergas benutzt wird. Das Inertgas muß bis zum Erkalten des Destillationskolbens die Apparatur durchspülen.

Reaktionsschema:



schlusses durch kurzzeitiges Erhitzen in Acetanhydrid, konnte das 3,6-Diphenyl-furo[3,2-b]furandion-(2,5)-[3,6- $^{14}\text{C}_{1/2}$] (IV) (= Pulvinsäurelacton-[^{14}C]) erhalten werden. Beim Behandeln mit 2 %iger Natronlauge entstand daraus das gelbe 3-Phenyl-4-hydroxy-5-(7-carboxy-benzal-[7- $^{14}\text{C}_{1/2}$])-furanon-(2)-[3- $^{14}\text{C}_{1/2}$] (V) (= Pulvinsäure-[^{14}C]).

Sowohl chemische als auch radiochemische Ausbeute über alles betragen 14,3 %. Die Ausbeuten lagen bei dieser und den folgenden Synthesen deutlich unter denen der inaktiven Vorversuche.

Im Falle des völlig symmetrisch gebauten 2,5-Diphenyl-ketipinsäuredinitrils (III) und des Pulvinsäurelactons (IV) kann nicht mehr unterschieden werden, welches der beiden in Frage kommenden C-Atome in der Brücke zwischen den beiden Phenylringen markiert ist. Folglich ist auch bei der Pulvinsäure (V), obwohl sie infolge der einfachen Lactonringöffnung bei der Verseifung nicht mehr symmetrisch ist, nur ein markiertes Produkt zu erwarten.

2.2 Synthese der 4- und 4'-Hydroxy-pulvinsäure-[^{14}C]

Der zweite, analoge Weg führte durch Umsetzung des 3-Phenyl-3-cyano-brenztraubensäureäthylesters-[3- ^{14}C] (II) mit inaktivem 4-Methoxy-benzylcyanid zum 2-Phenyl-5-(4-methoxy-phenyl)-ketipinsäure-dinitril-[2- ^{14}C] (VI) und über das 3-Phenyl-6-(4-hydroxy-phenyl)-furo[3,2-b]furandion-(2,5)-[3- ^{14}C] (VII) (= 4-Hydroxy-pulvinsäurelacton-[^{14}C]) zu den beiden p-hydroxy-substituierten Pulvinsäuren:

3-Phenyl-4-hydroxy-5-(7-carboxy-4-hydroxy-benzal)-furanon-(2)-[3- ^{14}C] (VIII) (= 4'-Hydroxy-pulvinsäure-[^{14}C]) und
3-(4-Hydroxy-phenyl)-4-hydroxy-5-(7-carboxy-benzal-[7- ^{14}C])-furanon-(2) (IX) (= 4-Hydroxy-pulvinsäure-[^{14}C]).

Die beiden substituierten Pulvinsäuren (VIII) und (IX) sind bezüglich des markierten C-Atoms aufgrund des Syntheseweges nur an demjenigen C-Atom markiert, das dem nichtsubstituierten Phenylrest benachbart ist. Das 2-Phenyl-5-(4-methoxy-phenyl)-ketipinsäure-dinitril (VI) und das 3-Phenyl-6-(4-hydroxy-phenyl)-furo[3,2-b]-furandion-(2,5) (VII) sind nicht mehr symmetrisch gebaut. Bei der Aufspaltung eines Lactonringes müssen somit 2 chemisch unterschiedliche Hydroxy-pulvinsäuren entstehen, je nachdem, welcher der beiden Lactonringe sich öffnet. Unsere Synthese bestätigte dies. Infolge des Einflusses der Hydroxyl-Gruppe bilden sich auch nicht gleiche Mengen der beiden substituierten Pulvinsäuren (VIII) und (IX). In sämtlichen inaktiven und aktiven Versuchen war das Mengenverhältnis (VIII) : (IX) etwa 1 : 2. Ein erster Versuch, die Säure (IX) in die vor allem gewünschte Säure (VIII) zu überführen, war ohne Erfolg.

Im Rohprodukt wurden dünnschichtchromatographisch neben den erwarteten Säuren (VIII) und (IX) noch 3 weitere Substanzflecken entdeckt. Das Rohprodukt wurde daraufhin säulenchromatographisch in die einzelnen Fraktionen aufgetrennt. Die in den Fraktionen 1-4 vorliegenden Substanzen wurden durch Massen- und teilweise auch durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie identifiziert. Substanz 1 war inaktiv. Substanz 5 konnte nur im Falle der radioaktiven Synthese unter dem Dünnschicht-Scanner als sehr schwacher Peak gefunden werden. Da er weder gefärbt noch unter der UV-Lampe zu sehen war, scheidet für ihn eine pulvinsäureähnliche Struktur aus; diese 5. Fraktion wurde deshalb weder isoliert noch näher untersucht.

Berücksichtigt man nur die beiden Säuren (VIII) und (IX), so ergab sich bei unserer radioaktiven Synthese über sämtliche Stufen eine chemische Ausbeute von 10,9 % und eine radiochemische Ausbeute von 9,4 %. Die Differenz erklärt sich durch das Vorliegen von aktiven und inaktiven Nebenprodukten.

3. STRUKTURAUFKLÄRUNG

Bei der Strukturermittlung der Substanzen 1-4 kamen uns die Arbeiten von Steglich und Mitarbeitern⁽¹²⁻¹⁴⁾ zugute, in denen ausführlich die Massen- und ^1H -NMR-Spektren der Pulvinsäure und mehrerer substituierter Pulvinsäuren diskutiert und deren Struktur bewiesen worden sind. Diese Untersuchungen wurden an den aus Vorversuchen gewonnenen inaktiven Substanzen durchgeführt.

Sämtliche Substanzen zeigen die für Pulvinsäuren typischen Zerfallsreihen in den Massenspektren^(12,14).

3.1 Substanz 1:

Massen: 323^+ ($\text{M}^+ + 1$; 10%), 322^+ (M^+ ; 40%), 296^+ (8%), 294^+ (7%), 266^+ (23%), 264^+ (10%), 210^+ (21%), 161^+ (19%), 149^+ (23%), 139^+ (23%), 133^+ (37%), 125^+ (42%), 111^+ (65%), 105^+ (100%).

Durch metastabile Peaks sind folgende Zerfälle belegt:

322^+ nach 294^+ (-CO), 294^+ nach 266^+ (-CO), 322^+ nach 266^+ (-CO₂), 161^+ nach 133^+ (-CO), 133^+ nach 105^+ (-CO).

Das Molekülion 322^+ entspricht einem dihydroxy-substituierten Derivat des Pulvinsäure-lactons $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{O}_6$. Durch die symmetrische Spaltung des Kohlenstoffgerüsts entsteht daraus nur ein Bruchstück (161^+), sodaß die beiden sich aus der Molekül-Bruttoformel ableitenden phenolischen Hydroxyle gleichmäßig auf die beiden Ringe verteilen. Das Fehlen einer ^{14}C -Markierung dieses Produktes stimmt mit den Gegebenheiten überein. Es handelt sich bei Produkt 1 um das 4,4'-Dihydroxy-pulvinsäurelacton. Eine Erklärung für dessen Entstehung kann nicht gegeben werden.

3.2 Substanzen 2 und 3:

Beide Produkte weisen, abgesehen von den Intensitäten der Bruchstücke, praktisch keinen Unterschied auf.

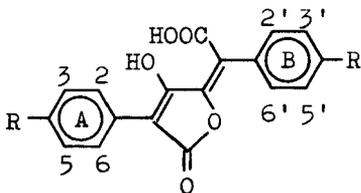
Massen (die erste Intensität entspricht Substanz 2, die zweite Sub-

stanz 3): 325^+ ($M^+ + 1$; 13%/10%), 324^+ (M^+ ; 56%/39%), 306^+ (92%/100%),
 305^+ (21%/23%), 281^+ (23%/ -); 280^+ (100%/20%), 250^+ (41%/45%),
 207^+ (12%/ -), 194^+ (39%/47%), 161^+ (49%/55%), 145^+ (74%/91%),
 139^+ (16%/25%), 134^+ (65%/29%), 133^+ (58%/84%), 121^+ (21%/ -),
 118^+ (23%/15%), 117^+ (33%/45%), 107^+ (18%/ -), 106^+ (21%/20%),
 105^+ (47%/46%), 91^+ (17%/ -), 90^+ (22%/ -), 89^+ (65%/67%).

Durch metastabile Peaks sind in beiden Fällen folgende Zerfälle belegt: 324^+ nach 306^+ ($-H_2O$), 306^+ nach 250^+ ($-C_2O_2$), 250^+ nach 194^+ ($-C_2O_2$), 161^+ nach 133^+ ($-CO$), 133^+ nach 105^+ ($-CO$), 145^+ nach 117^+ ($-CO$), 117^+ nach 89^+ ($-CO$).

Bei den Substanzen 2 und 3 sollte es sich um die 4'-Hydroxy-pulvinsäure und deren Isomere, die 4-Hydroxy-pulvinsäure handeln; beide mit der Bruttoformel $C_{18}H_{12}O_6$. Es finden sich bei beiden Substanzen die Fragmente, die durch Wasserabspaltung (306^+ /Bildung eines Fragmentes mit Pulvinsäure-lacton-Struktur), durch CO_2 -Verlust (280^+ /Beweis für das Vorliegen einer Pulvinsäure) und durch symmetrische Spaltung des Kohlenstoffgerüsts entstehen (aus dieser Spaltung rühren die Fragmente 161^+ und 145^+ her, die sich nur durch eine phenolische Hydroxylgruppe unterscheiden und somit zwei unterschiedlich substituierte Ringe nachweisen).

Die Unterscheidung ist durch das 1H -NMR-Spektrum möglich, da die Ringprotonen durch das benachbarte Lacton (bei Ring A) bzw. die benachbarte Carboxylgruppe (bei Ring B) unterschiedlich beeinflusst werden.



R = H = Pulvinsäure

R = OH = Atromentinsäure

Die Spektren für beide Substanzen lassen sich aus den Spektren der Pulvinsäure und der Atromentinsäure (= 4,4'-Dihydroxy-pulvinsäure) zusammensetzen⁽¹³⁾. Die 4'-Hydroxy-pulvinsäure setzt sich aus Ring A der Pulvinsäure und Ring B der Atromentinsäure zusammen (nach⁽¹³⁾): Ring A = H-2,6: d 8,02 / H-3,5: d 6,87; Ring B = H-2',6': "s" 7,44), das Spektrum der 4-Hydroxy-pulvinsäure entsprechend aus Ring B der Pulvinsäure und Ring A der Atromentinsäure (nach⁽¹³⁾): Ring A = H-2,6: m 8,11 / H-3,4,5: m 7,25 - 7,52; Ring B = H-2',6': d 7,22 / H-3',5': d 6,85). Die ¹H-NMR-Spektren der Substanzen 2 und 3 (aufgenommen in Deutero-Aceton; 90 MHz; Trimethylsilan als interner Standard) wiesen das Produkt 2 als 4'-Hydroxy-pulvinsäure (VIII) aus (Ring A = H-2,6: m 8,11 / H-3,4,5: m 7,26 - 7,45; Ring B = H-2',6': d 7,29 / H-3',5': d 6,88) und das Produkt 3 als 4-Hydroxy-pulvinsäure (IX) (Ring A = H-2,6: d 8,02 / H-3,5: d 6,92; Ring B = H-2'bis 6': "s" 7,41).

3.3 Substanz 4:

Massen: 338⁺(M⁺;3%), 320⁺(6%), 309⁺(7%), 308⁺(29%), 294⁺(6%), 292⁺(3%), 291⁺(12%), 290⁺(50%), 264⁺(16%), 262⁺(5%), 261⁺(4%), 235⁺(3%), 234⁺(13%), 208⁺(4%), 179⁺(3%), 178⁺(10%), 163⁺(6%), 148⁺(4%), 147⁺(6%), 146⁺(12%), 145⁺(100%), 135⁺(4%), 134⁺(3%), 131⁺(7%), 121⁺(5%), 119⁺(9%), 118⁺(51%), 117⁺(28%), 108⁺(8%), 107⁺(52%), 91⁺(21%), 90⁺(21%), 89⁺(46%).

Durch metastabile Peaks belegt sind die Zerfälle:

338⁺ nach 320⁺ (-H₂O), 320⁺ nach 290⁺ (-CH₂O), 294⁺ nach 264⁺ (-CH₂O), 290⁺ nach 234⁺ (-C₂O₂), 262⁺ nach 234⁺ (-CO), 234⁺ nach 178⁺ (-C₂O₂), 145⁺ nach 117⁺ (-CO), 117⁺ nach 89⁺ (-CO).

Die Abspaltungen von H₂O (320⁺) oder CO₂ (294⁺) aus dem Molekülion 338⁺ zeigen, daß es sich um ein Pulvinsäure-Derivat handeln

muß. Dies besitzt die Bruttoformel $C_{19}H_{14}O_6$ und sollte demnach eine Methoxylgruppe tragen. Diese wird bewiesen durch die anfängliche Abspaltung von CH_2O aus dem Molekülion wie auch aus den Fragmenten 320^+ bzw. 294^+ . Da diese Abspaltung bevorzugt abläuft, findet sich aus der symmetrischen Spaltung des Kohlenstoffgerüsts nur das Bruchstück 145^+ , was für unsubstituierte Ringe charakteristisch ist (mit Folgezerfällen); allerdings zeigt das intensive Ion 107^+ einen Aromaten an, der einen sauerstoffhaltigen Substituenten trägt, jedoch kein freies Hydroxyl (in jenem Falle müßte wie bei den Produkten 2 und 3 die Zerfallsreihe $161^+ / 133^+ / 105^+$ auftreten). Das Vorliegen des Methylesters einer Pulvinsäure kann ausgeschlossen werden, weil dann CH_3OH statt H_2O aus dem Molekülion abgespalten werden müßte und die Eliminierung von CO_2 nicht stattfinden dürfte. Es sollte sich also um das Methoxy-Derivat der Substanz 2 oder 3 handeln (oder um ein Gemisch der beiden entsprechenden Isomeren).

Die Entscheidung konnte auch hier durch das 1H -NMR-Spektrum getroffen werden. Es weist durch die Lage der Protonen die Substanz 4 als 4-Methoxy-pulvinsäure aus (Ring A = H-2,6: d 8,09 / H-3,5: d 6,98; Ring B = H-2'bis 6': "s" 7,37; Methoxyl-Protonen: 3,81). Die gleiche Lage der Ringprotonen finden Steglich et al.⁽¹³⁾ bei dem 4-Hydroxy-pulvinsäuremethylester (Ring A = H-2,6: d 8,09 / H-3,5: d 7,0; Ring B = H-2'bis 6': "s" 7,41).

Die Massenspektren wurden mit einem VARIAN MAT CH - 5 - Gerät, die 1H -NMR-Spektren mit einem BRUKER WH-90-Gerät aufgenommen.

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1. Reinheitsprüfungen:

Sämtliche radioaktiven Zwischen- und Endprodukte wurden mittels dünnschichtchromatographischer Verfahren auf ihre Reinheit unter-

sucht und ihre Identität mit den inaktiven Referenzsubstanzen festgestellt:

4.1.1. Stationäre Phase: DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄
Mobile Phase: Toluol/Ameisensäuremethylester/Ameisensäure
= 11/8/1 (v/v).

4.1.2. Stationäre Phase: DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄
Mobile Phase: Chloroform/Methanol = 9/1 (v/v).

4.2. Reinigungsoperationen:

Das rohe Endprodukt bei der Pulvinsäuresynthese wurde durch Säulenchromatographie gereinigt. Auf gleiche Weise wurde die rohe Hydroxy-Pulvinsäure in die einzelnen Reinsubstanzen aufgetrennt, wobei im Falle der radioaktiven Synthese lediglich die Produkte 2 und 3, also die 4'- und die 4-Hydroxy-pulvinsäure (VIII) und (IX) isoliert wurden:

Es kam eine Glassäule mit den Abmessungen 1400 x 22 mm mit Teflonhahn zum Einsatz.

Stationäre Phase: Kieselgel 60, Korngröße 0,063 - 0,2 mm.

Mobile Phase: Toluol/Ameisensäuremethylester/Ameisensäure
= 60/39/1 (v/v).

Die Laufgeschwindigkeit betrug 1 Tropfen/Sekunde.

Die Auftrennung erfolgte mit oa. 15 ml Lösung/Glas.

4.3. Synthesen:

Die Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem PACKARD TRI-CARB 2420 Liquid Scintillation Spectrometer ausgeführt. Die Angaben der gemessenen Aktivitäten erfolgen mit einer Signifikanz von $\pm 5\%$; auf Einzelangaben der möglichen Abweichungen wurde verzichtet.

4.3.1. 3-Phenyl-3-cyano-brenztraubensäureäthylester-[3-¹⁴C] (II)

Zu der noch heißen Lösung von 415 mg (18,0 mM) Natrium in 5,8 ml

abs. Äthanol wurden rasch unter Rühren 2,74 g (18,75 mM; 2,54 ml) Oxalsäurediäthylester und 685 mg (5,85 mM; 10,2 mCi) Phenylacetonitril-[2-¹⁴C] (I) (= Benzylcyanid-[7-¹⁴C]), das mit 1,37 g (11,70 mM; 1,35 ml) inaktivem Benzylcyanid verdünnt worden war, hinzugefügt. Anschließend wurde die orangebraune Lösung 10 Min. bei 80°C, dann 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Stehen über Nacht wurde mit 3 ml Wasser versetzt, auf 35°C erwärmt und tropfenweise mit 2 ml konz. Salzsäure angesäuert. Dabei fiel ein orangegelber Niederschlag aus, der noch 1 Stunde gerührt, dann über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, abgesaugt und mit gekühltem, 20 %igem Äthanol nachgewaschen wurde.

Die Ausbeute betrug 3,33 g (15,3 mM) 3-Phenyl-3-cyano-brenztraubensäureäthylester-[3-¹⁴C] (II) (Fp. 128,3°C) entspr. 87,2 % (bez. auf Benzylcyanid).

Aktivität: Spez.Akt. 571 μ Ci/mM; 2,63 μ Ci/mg; Ges.-Akt. 8,76 mCi entspr. 85,9 % (bez. auf Benzylcyanid-[7-¹⁴C]).

Reinheitsprüfung: DC, System 4.1.1.: Rf = 0,37.

3-Phenyl-3-cyano-brenztraubensäureäthylester-[3-¹⁴C] (II) ist die Ausgangssubstanz für die beiden nachfolgend beschriebenen Synthesen.

4.3.2. Synthese der Pulvinsäure-[¹⁴C]

4.3.2.1. 2,5-Diphenyl-ketipinsäure-[2,5-¹⁴C]_{1/2}]-dinitril (III)

Unter magnetischem Rühren wurden zu der Lösung von 207 mg (9,0 mM) Natrium in 3,5 ml abs. Äthanol 550 mg (4,7 mM; 0,55 ml) Benzylcyanid und 975 mg (4,5 mM; 2,56 mCi) 3-Phenyl-3-cyano-brenztraubensäureäthylester-[3-¹⁴C] (II) möglichst rasch hinzugefügt. Beim nachfolgenden 1,5-stdg. Erhitzen auf 100-110°C trübte sich die Lösung rasch, schäumte auf, und es fiel ein orangegelber Niederschlag aus. Nach dem Erkalten wurde mit 2 ml Eisessig versetzt, kräftig durchgerührt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Suspension wurde dann mit 5 ml gekühltem, 40 %igem Äthanol versetzt und abgesaugt.

Die Ausbeute betrug 863,5 mg (2,99 mM) 2,5-Diphenyl-ketipinsäure-[2,5-¹⁴C_{1/2}]-dinitril (III) entspr. 66,5 % (bez. auf 3-Phenyl-3-cyano-brenztraubensäureäthylester-[3-¹⁴C] (II)).

Aktivität: Spez.Akt.: 574 μ Ci/mM; 1,99 μ Ci/mg; Ges.-Akt. 1,72 mCi entspr. 67,1 % (bez. auf 3-Phenyl-3-cyano-brenztraubensäureäthylester-[3-¹⁴C] (II)).

Reinheitsprüfung: DC, System 4.1.2.: Rf = 0,47.

4.3.2.2. 3,6-Diphenyl-furo[3,2-b]furandion-(2,5)-[3,6-¹⁴C_{1/2}] (IV)

= Pulvinsäurelacton-[¹⁴C]

860 mg (2,98 mM; 1,71 mCi) 2,5-Diphenyl-ketipinsäure-[2,5-¹⁴C_{1/2}]-dinitril (III) wurden mit 18 ml Eisessig und 4 ml Jodwasserstoffsäure (s.Anm. unter 2.1) (D. 1,7) 2 Stunden unter Rühren und Rückfluß (Badtemp. ca. 140°C) erhitzt. Dabei bildete sich eine tief dunkelrote Lösung. Nach dem Erkalten wurde mit ca. 7 ml gesättigter wässriger Natriumsulfitlösung versetzt, bis sich die Farbe nach gelb aufgehellt hatte. Unter Zusatz von Wasser wurde dreimal ausgeäthert und die vereinigten Ätherextrakte am Rotationsverdampfer im Wasserstrahlvakuum (ca. 15 Torr) eingedampft. Der Rückstand, ein braungelbes Öl, wurde mit Chloroform versetzt und so lange nachdestilliert, bis er sich in einen Schaum verwandelt hatte. Dieser Schaum wurde in 15 ml Acetanhydrid gelöst, 1 Min. lang auf 140 bis 150°C (Badtemp.) erhitzt, rasch in Eiswasser abgeschreckt, der dabei entstandene Niederschlag abgesaugt und mit Essigsäure und Wasser nachgewaschen.

Die Ausbeute betrug 303 mg (1,04 mM) leuchtend gelbes Pulvinsäurelacton-[¹⁴C] (IV) entspr. 34,9 % (bez. auf 2,5-Diphenyl-ketipinsäure-[2,5-¹⁴C_{1/2}]-dinitril (III)).

Reinheitsprüfung: DC, System 4.1.1.: $R_f = 0,73$. Im Dünnschichtchromatogramm ist auch bereits schwach der Fleck der Pulvinsäure- $[^{14}\text{C}]$ (V) zu erkennen.

4.3.2.3. 3-Phenyl-4-hydroxy-5-(7-carboxy-benzal- $[7-^{14}\text{C}_{1/2}]$)-furanon-(2)- $[3-^{14}\text{C}_{1/2}]$ (V) = Pulvinsäure- $[^{14}\text{C}]$

300 mg (1,03 mM) 3,6-Diphenyl-furo[3,2-b]furandion-(2,5)- $[3,6-^{14}\text{C}_{1/2}]$ (IV) wurden in 25 ml 2 %iger Natronlauge 15 Min. lang unter Rückfluß erhitzt. Dabei bildete sich eine fast klare Lösung, die heiß abgesaugt wurde. Das Filtrat wurde im Eisbad gekühlt und dann 2 ml konz. Salzsäure zugetropft, wobei die Pulvinsäure- $[^{14}\text{C}]$ (V) als leuchtend gelber Niederschlag ausfiel. Sie wurde abgesaugt und mit wenig Eiswasser nachgewaschen. Diese rohe Pulvinsäure- $[^{14}\text{C}]$ enthielt noch eine Verunreinigung. Sie wurde deshalb nach 4.2. durch Säulenchromatographie gereinigt. Das so erhaltene Produkt wurde aus Benzol umkristallisiert.

Die Ausbeute betrug 225,5 mg (0,73 mM) 3-Phenyl-4-hydroxy-5-(7-carboxy-benzal- $[7-^{14}\text{C}_{1/2}]$)-furanon-(2)- $[3-^{14}\text{C}_{1/2}]$ (V) = Pulvinsäure- $[^{14}\text{C}]$ entspr. 70,9 % (bez. auf Pulvinsäurelacton- $[^{14}\text{C}]$ (IV)) und 14,3 % (bez. auf Benzylcyanid- $[7-^{14}\text{C}]$ (I)).

Aktivität: Spez.Akt.: 580 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$; 1,88 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$; Ges.-Akt. 424 μCi entspr. 24,7 % (bez. auf 2,5-Diphenyl-ketipinsäure- $[2,5-^{14}\text{C}_{1/2}]$ -dinitril (III)) und 14,3 % (bez. auf Benzylcyanid- $[7-^{14}\text{C}]$ (I)).

Reinheitsprüfung: DC, System 4.1.1.: $R_f = 0,47$.

4.3.3. Synthese der 4'- und 4-Hydroxy-pulvinsäure- $[^{14}\text{C}]$

4.3.3.1. 2-Phenyl-5-(4-methoxy-phenyl)-ketipinsäure- $[2-^{14}\text{C}]$ -dinitril (VI)

Das 2-Phenyl-5-(4-methoxy-phenyl)-ketipinsäure- $[2-^{14}\text{C}]$ -dinitril (VI) wurde nach 4.3.2.1. in analoger Weise wie das 2,5-Diphenyl-

ketipinsäure-[2,5-¹⁴C_{1/2}]-dinitril (III) aus 497 mg (21,5 mM) Natrium, 8,2 ml abs. Äthanol, 1,657 g (11,5 mM; 1,54 ml) 4-Methoxybenzylcyanid und 2,34 g (10,78 mM; 6,15 mCi) 3-Phenyl-3-cyanobrenztraubensäureäthylester-[3-¹⁴C] (II) hergestellt. Nach dem Erkalten der Reaktionsmischung wurde mit 5 ml Eisessig angesäuert, nach Stehen im Kühlschrank mit 11,5 ml gekühltem, 40 %igem Athanol versetzt und abgesaugt.

Die Ausbeute betrug 1,628 g (5,11 mM) 2-Phenyl-5-(4-methoxy-phenyl)-ketipinsäure-[2-¹⁴C]-dinitril (VI) entspr. 47,4 % (bez. auf 3-Phenyl-3-cyano-brenztraubensäureäthylester-[3-¹⁴C] (II)).

Aktivität: Spez.Akt.: 531 µCi/mM; 1,67 µCi/mg; Ges.-Akt. 2,72 mCi entspr. 44,2 % (bez. auf 3-Phenyl-3-cyano-brenztraubensäureäthylester-[3-¹⁴C] (II)).

Reinheitsprüfung: DC, System 4.1.2.: Rf = 0,50 - 0,52. Minimale Aktivität bei Rf = 0,44 und 0,80.

4.3.3.2. 3-Phenyl-6-(4-hydroxy-phenyl)-furo[3,2-b]furandion-(2,5)-[3-¹⁴C] (VII) = 4-Hydroxy-pulvinsäurelacton-[¹⁴C]

Das 4-Hydroxy-pulvinsäurelacton-[¹⁴C] wurde nach 4.3.2.2. analog dem Pulvinsäurelacton-[¹⁴C] (IV) aus 1,6 g (5,02 mM; 2,67 mCi) 2-Phenyl-5-(4-methoxy-phenyl)-ketipinsäure-[2-¹⁴C]-dinitril (VI), 30 ml Eisessig und 8 ml Jodwasserstoffsäure (s.Anm. unter 2.1) (D. 1,7) hergestellt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionsmischung mit ca. 13 ml gesättigter, wässriger Natriumsulfitlösung versetzt. Der als Rückstand verbliebene Schaum wurde in 25 ml Acetanhydrid gelöst, unter Rühren 1 Min. lang auf 140 - 150°C (Badtemp.) erhitzt, im Eisbad abgeschreckt und der dabei entstandene leuchtend rote Niederschlag abgesaugt.

Die Ausbeute betrug 516 mg (1,68 mM) 4-Hydroxy-pulvinsäurelacton-[¹⁴C] (VII) entspr. 33,5 % (bez. auf 2-Phenyl-5-(4-methoxy-phenyl)-

ketipinsäure-[2-¹⁴C]-dinitril (VI)).

Reinheitsprüfung: DC, System 4.1.1.: Das Dünnschichtchromatogramm zeigte 7 Substanzflecken, da mehrere Produkte entstehen konnten und auch bereits die entsprechenden Säuren in kleinen Anteilen im Reaktionsgemisch enthalten waren.

4.3.3.3. 3-Phenyl-4-hydroxy-5-(7-carboxy-4-hydroxy-benzal)-

furanon-(2)-[3-¹⁴C] (VIII) = 4'-Hydroxy-pulvinsäure-[¹⁴C]

und

3-(4-Hydroxy-phenyl)-4-hydroxy-5-(7-carboxy-benzal-

[7-¹⁴C])-furanon-(2) (IX) = 4-Hydroxy-pulvinsäure-[¹⁴C]

510 mg (1,66 mM) des sehr hydrophoben 4-Hydroxy-pulvinsäurelactons-[¹⁴C] (VII) wurden in 20 ml 2 %iger Natronlauge suspendiert und unter Rühren 15 Min. unter Rückfluß erhitzt. Die noch heiße Lösung wurde abgesaugt, das Filtrat im Eisbad gekühlt und mit 2 ml konz. Salzsäure angesäuert. Dabei fielen die rohen Hydroxy-pulvinsäuren teils fest, teils als dunkelrotes Öl aus. Sie wurden mit Diäthyläther extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer wieder abgezogen, wobei ein orangeroter Schaum zurückblieb.

Reinheitsprüfung: DC, System 4.1.1.: Visuell und im UV sind 4 Peaks erkennbar. Unter dem Dünnschicht-Scanner erscheint noch ein fünfter, schwach aktiver Peak:

Peak 1: R_f = 0,33 inaktiv

Peak 2: R_f = 0,43 Hauptpeak (VIII)

Peak 3: R_f = 0,49 (IX)

Peak 4: R_f = 0,54

Peak 5: R_f = 0,62 schwach aktiv.

Das Rohprodukt wurde gemäß 4.2. an einer Kieselgelsäule chromatographisch getrennt, um die einzelnen Reifractionen zu erhalten.

Im Falle der radioaktiven Synthese wurden nur die interessierenden

Fractionen 2 und 3 isoliert. Neben den Reinfractionen erhaltene Übergangsfractionen wurden nochmals auf der Säule getrennt.

Die Ausbeuten betragen:

Fraktion 2 = 4'-Hydroxy-pulvinsäure-[¹⁴C] (VIII): 122 mg (0,38 mM),
Fraktion 3 = 4-Hydroxy-pulvinsäure-[¹⁴C] (IX): 303 mg (0,93 mM),
entspr. einer gemeinsamen Ausbeute von 78,9 % (bez. auf 4-Hydroxy-pulvinsäurelacton-[¹⁴C] (VII)).

Aktivitäten: Spez. Akt. (VIII) und (IX): 518 μ Ci/mM; 1,60 μ Ci/mg;
Ges.-Akt. 659,0 μ Ci entspr. 24,7 % (bez. auf 2-Phenyl-5-(4-methoxyphenyl)-ketipinsäure-[2-¹⁴C]-dinitril (VI)) oder 9,4 % (bez. auf Benzylcyanid-[7-¹⁴C] (I)).

Wir danken Herrn P. Schuster, Gesellschaft für Kernforschung mbH., Institut für Radiochemie, für die Durchführung der Aktivitätsmessungen, den Herren Dr. Zahorsky und Tanger, Universität (TH) Karlsruhe, Institut für Organische Chemie, für die Aufnahme der Massenspektren und Herrn Dr.M.A.R. Smith, Firma Bruker-Physik AG., Rheinstetten/Fo., für die Aufnahme der ¹H-NMR-Spektren.

Die Arbeiten über die Farbstoff-Biosynthese bei *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

5. LITERATUR

- (1) Read G., Vining L.C. und Haskins R.H. - Can. J. Chem. 40 : 2357 (1962)
- (2) Maass W.S.G. und Neish A.C. - Can. J. Botan. 45 : 59 (1967)
- (3) Gripenberg J. - Acta Chem. Scand. 19 : 2242 (1965)
- (4) Wanzlick H.-W. und Jahnke U. - Chem. Ber. 101 : 3753 (1968)

- (5) Gripenberg J. und Martikkala J. - Acta Chem. Scand. 23 :
2583 (1969)
- (6) Gripenberg J. und Martikkala J. - Acta Chem. Scand. 24 :
3444 (1970)
- (7) v. Massow F. und Nimz H. - Arch. Mikrobiol. 88 : 147 (1973)
- (8) Adams R. und Calvery H.O. in "Organic Syntheses", Coll. Vol.
II, Interscience Publishers, New York 1943, S. 287
- (9) Asano M. und Kameda J. - Ber. dt. chem. Ges. 68 : 1568 (1935)
- (10) Frank R.L., Clark G.R. und Coker J.N. - J. Amer. chem. Soc.
72 : 1824 (1950)
- (11) "Organicum" VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
1968, 8. Aufl., S. 625
- (12) Steglich W., Furtner W. und Prox A. - Z. Naturforsch. 23b :
1044 (1968)
- (13) Steglich W., Besl H. und Zipfel K. - Z. Naturforsch. 29b :
96 (1974)
- (14) Zipfel K. - Dissertation D 83, Berlin 1974