

Zum Stoffwechsel von Aromaten, II *

Über die Muconsäurespaltung von einfachen *o*-Diphenolen

On the Metabolism of Aromatic Compounds, II *

The Muconic Acid Scission of Simple *o*-Diphenols

Günther Schulz und Erich Hecker

Institut für Biochemie des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg
und Max-Planck-Institut für Biochemie, München(Z. Naturforsch. **28 c**, 662–674 [1973] ; eingegangen am 5. Juni 1973)*o*-Diphenols, protocatechuic acid, pyrocatechols, muconic acids

The preparation of substituted *cis,cis*-muconic acids by oxidative ring scission of simple *o*-diphenols with peracetic acid is investigated.

Scission of pyrocatechol (1) to *cis,cis*-muconic acid (2) gives optimal yields, if acetic acid or ethyl acetate is used as solvent and if the solution is 15–20% with respect to sulfuric acid free peracetic acid comprising a one molar excess of oxidant.

Under similar conditions, 3-tosylamino-pyrocatechol yields with peracetic acid the hitherto unknown α -tosylamino-*cis,cis*-muconic acid (18). 18 may be converted to α -tosylamino-*trans,trans*-muconic acid (19) by means of iodine, UV light or heating.

From protocatechuic acid (4) under similar conditions not β -carboxy-*cis,cis*-muconic acid (5) is obtained, but rather β -carboxy-muconolactone (6b, γ -carboxymethyl- β -carboxy- Δ^{α} -butenolide). As yet, this lactone has been accessible only from an isomer of β -carboxy-*cis,cis*-muconic acid, the latter being obtainable by enzymatic scission of protocatechuic acid (4).

Steric effects are responsible for both, the formation of the free *cis,cis*-muconic acids 2 and 18 from pyrocatechol (1) and α -tosylamino-pyrocatechol, and the formation of the γ -lactone 6b instead of β -carboxy-*cis,cis*-muconic acid by scission of protocatechuic acid (4).

The time course of the reactions shows that — compared to pyrocatechol (1) — a 3-tosylamino-group enhances the peracetic acid scission, whereas a 4-carboxygroup as in 4 slows it down.

Einleitung

Mikroorganismen und Säugetiere verfügen über Enzymsysteme, mit deren Hilfe sie synthetische, aber auch natürlich vorkommende Aromaten metabolisieren können^{1,2}. Im Zusammenhang mit dem Problem des Umweltschutzes ist die detaillierte Kenntnis derartiger Stoffwechselprozesse besonders aktuell, da sie einerseits zu ungiftigen Abbau- und Ausscheidungsprodukten, andererseits aber auch zu akut toxischen oder carcinogenen Substanzen³ führen können. So spalten beispielsweise Oxygenasen, die in gewissen Bakterien und niederen Pilzen enthalten sind, aromatische Ringe zu Derivaten der Muconsäure, die durch intramolekulare Reaktion leicht Lactone bilden. Bezogen auf den Menschen kommen diese potentiell als Carcinogene⁴ exogenen (wie z. B. Patulin oder Aflatoxine) oder

endogenen Ursprungs (wie z. B. Secolactone von Steroiden) in Betracht.

Bei Versuchen mit aromatischen Kohlenwasserstoffen, Phenolen und Benzoesäure als Bodeninsektiziden wurde gefunden, daß Bodenbakterien, z. B. Coccaceae, Bacteriaceae, *Pseudomonas* u. a. diese Aromaten als einzige Kohlenstoffquelle benutzen können. In Kulturmedien von *Pseudomonas*-Arten, die Benzol als Kohlenstoffquelle verwerten, wurde Brenzcatechin (1) als Stoffwechselprodukt nachgewiesen; Phenol wurde dabei als Zwischenprodukt ausgeschlossen⁵. An zellfreien Extrakten aus *Pseudomonas fluorescens* wurde gezeigt, daß Brenzcatechin oxydativ zu *cis,cis*-Muconsäure (2) gespalten wird^{6,7}. Eine Oxygenase aus *Pseudomonas fluorescens* bzw. *Pseudomonas putida* ist in der Lage, Protocatechusäure (4) zu β -Carboxy-*cis,cis*-muconsäure (5) zu spalten^{8–10}. 5 bildet mit einem

* I. Mitt.: E. Hecker u. G. Nowoczek, Z. Naturforsch. **21 b**, 153 [1966].

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. E. Hecker, Deutsches Krebsforschungszentrum, Institut für Biochemie, D-6900 Heidelberg 1, Kirschnerstraße 6, Postfach 449.

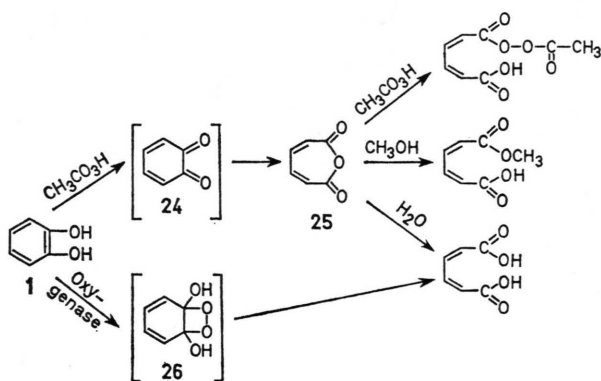
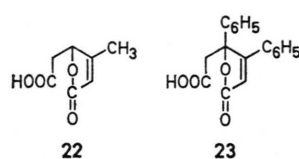
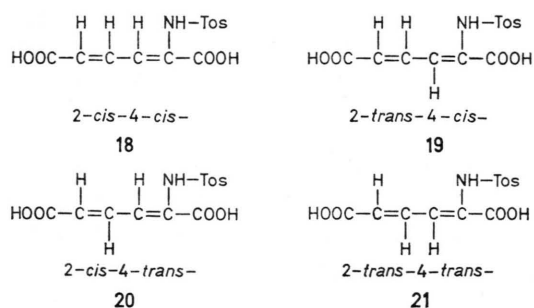
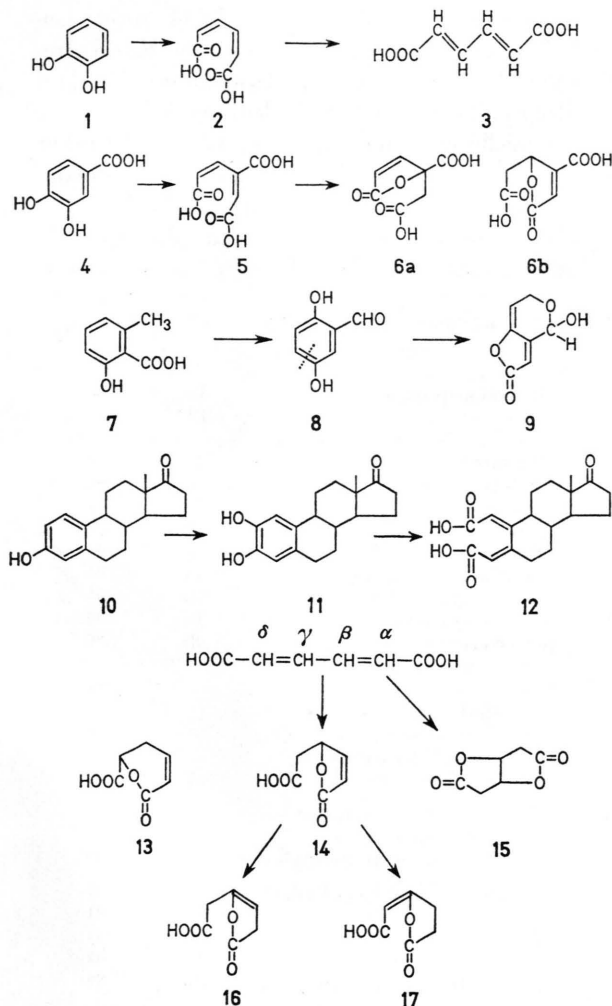


lactonisierenden Enzym aus *Pseudomonas putida* γ -Carboxymuconolacton (**6a**)¹⁰. Nach Adaption von *Neurospora crassa* an Protocatechusäure wurde aus zellfreien Extrakten des Schimmelpilzes das β -Carboxy-muconolacton (**6b**) isoliert¹¹. In prinzipiell ähnlicher Weise bilden auf Lebens- und Futtermitteln häufig vorkommende Pilze wie *Penicillium patulum* aus 6-Methyl-salicylsäure (**7**) über Gentisinaldehyd (**8**) das carcinogene Lacton Patulin (**9**). Für Steroide vom Typus des Progesterons¹² und des 3,4-Dihydroxy-9,10-seco-androsta-en-(4)-dions-(3,17)¹³ sind ebenfalls mikrobielle Ringspaltungen, teilweise unter Bildung von Lactonvorstufen¹² bekannt.

Auch bei Säugetieren kennt man Derivate der Muconsäure als Stoffwechselprodukte von Aromaten. Bereits Jaffe konnte durch Verfüttern von Benzol an

Hunde und Kaninchen aus deren Harn *trans,trans*-Muconsäure (**3**) isolieren¹⁴. In späteren Untersuchungen konnte *cis,cis*-Muconsäure (**2**) als Vorstufe der stabileren *trans,trans*-Form **3** wahrscheinlich gewacht werden^{15,16}. Die lange Zeit lediglich vermutete^{1,3,17} Bildung von Brenzcatechin (**1**) im Säugerorganismus ist inzwischen nachgewiesen¹ und kann als Vorstufe der Muconsäurespaltung angenommen werden. Auch das Auftreten des Brenzcatechinderivats 2-Hydroxyöstron (**11**) im Östrogenstoffwechsel (z.B. **10**) der Leber ist zweifelsfrei sichergestellt^{18,19}. Als weiterer Schritt des oxydativen Abbaus von **11** kommt die Ringspaltung zu einem *cis,cis*-Muconsäure-derivat (**12**) in Betracht²⁰.

Um die Bildung von Metaboliten vom Typ der Muconsäure aus radioaktiven Vorstufen nachweisen und sie auf carcinogene Wirkung prüfen zu kön-



nen, ist es erforderlich, sie auf chemischem Wege darzustellen. Im folgenden wird über Versuche zur Spaltung einfacher Brenzcatechine mit Peressigsäure zu Derivaten der *cis,cis*-Muconsäure berichtet.

Peressigsäurespaltung von Brenzcatechin

Das aromatische System des unsubstituierten Benzols ist gegen oxydative Angriffe recht stabil. Ringöffnungen mit chemischen Methoden konnten deshalb meist nur unter Zerstörung des Kohlenstoffgerüsts erreicht werden.

So liefert die Ozonspaltung von Benzol drei Mol Glyoxal²¹, ohne daß ungesättigte Zwischenstufen der Reaktion faßbar wären. Interessanter ist die Spaltung mit Chlorsäure²², die, ebenso wie die katalytische Oxydation mit Luftsauerstoff an Vanadiumoxyd²³, zu Maleinsäure führt. Spaltprodukte, bei denen alle sechs C-Atome des Benzols noch erhalten sind, konnten im Reagenzglasversuch nach der Einwirkung von Neutronen²⁴ und von Milas'-Reagenz (H₂O₂/OsO₄)²⁵ in geringer Menge nachgewiesen werden.

Einer definierten oxydativen Spaltung leichter zugänglich als Benzol sind Phenole und Phenoläther, Naphthalin und *o*-Chinone unter der Einwirkung organischer Persäuren (Tab. I).

Am besten untersucht ist die Oxydation von Phenol mit Peressigsäure zu *cis,cis*-Muconsäure^{26–28}. Phenol wird dabei zu Brenzcatechin (1) hydroxyliert und dieses zu *o*-Benzochinon dehydriert, das unter Ausbildung von zwei Carboxylgruppen zu *cis,cis*-Muconsäure (2) gespalten wird. Diesem Reaktionsablauf entsprechend, kann mit Brenzcatechinabkömmlingen als Ausgangsmaterial eine bessere Ausbeute an Muconsäurederivaten erwartet werden als von Phenolen (Tab. I). Wegen ihrer Instabilität kommen *o*-Chinone der Benzolreihe als Ausgangsmaterial für die Spaltung weniger in Betracht. — Zur Spaltung von Phenolen ist bisher nur Peressigsäure herangezogen worden (vgl. Tab. I), während Phenoläther und *o*-Chinone auch mit Perbenzoesäure und Perphthalsäure gespalten wurden. Perameisensäure ist zur Ringöffnung noch nicht verwendet worden und bei Ansätzen mit Peroxytrifluoressigsäure wurden die Spaltprodukte nicht isoliert^{30, 31}. Dem Lösungsmittel und der Konzentration der Persäure kommt für Ausbeute und Verlauf der Ringspaltung erhebliche Bedeutung zu.

Behandelte man Brenzcatechin (1) mit käuflicher 15-proz. Peressigsäure, so konnte *cis,cis*-Muconsäure (2) zunächst nur in Spuren gefunden werden. Wird die käufliche Peressigsäure durch Destillation von zugesetzter Schwefelsäure befreit, so ver-

Tab. I. Ringöffnungsreaktionen mit organischen Persäuren bei Phenolen, *o*-Diphenolen, Phenoläthern und *o*-Chinonen.

Persäure	eingesetzte Substanz	Lösungsmittel	Reaktionsprodukt	Ausbeute [%]	Lit.
Peressigsäure	Phenol	Eisessig	Muconsäure	35	26
	<i>p</i> -Kresol	Eisessig	β -Methylmuconsäure	6	29
	Brenzcatechin	Eisessig	Muconsäure	70	32
	Homobrenzcatechin	Eisessig	β -Methylmuconsäure	4	29
	<i>o</i> -Cumarsäure	Eisessig	Muconsäure	5	33
	Naphthalin	Eisessig	<i>o</i> -Carboxyzimtsäure	33	34
	β -Naphthol	Eisessig	<i>o</i> -Carboxyzimtsäure	70	35
	Nerolin	Eisessig	<i>o</i> -Carboxyzimtsäure	40	36
	Nerolin	Methanol	<i>o</i> -Carboxyzimtsäuremethylester	30	36
	<i>o</i> -Benzochinon	Eisessig	Muconsäure	—	37
	1-Methyl-phenanthren- <i>o</i> -chinon	Eisessig	3-Methyl-diphenyl-2,2'-dicarbonsäure	—	38
	1,2,5,6-Dibenz-3,4-anthrachinon	Eisessig/Tetrachloräthan	2-Phenyl-phenantron-3,2'-dicarbonsäure	67	39
Perbenzoesäure	Veratrol	Chloroform	Muconsäuredimethylester	1	40
	Nerolin	Benzol	<i>o</i> -Carboxyzimtsäure	2	36
			<i>o</i> -Carboxyzimtsäuremethylester	31	36
Perphthalsäure	β -Naphtochinon	Chloroform	<i>o</i> -Carboxyzimtsäureanhydrid	22	41
	Tetrabrom- <i>o</i> -chinon	Äther	Tribrom-muconolacton	31	41
	Tetrachlor- <i>o</i> -chinon	Äther	Tetrachlormuconsäure	30	42
			Trichlormuconolacton	42	42
	4-Methyl- <i>o</i> -chinon	Äther	β -Methylmuconsäureanhydrid	61	29

laufen die Spaltungsversuche an Brenzcatechin erwartungsgemäß: Nach Versetzen des Ansatzes mit der berechneten Menge Peressigsäure von 4 °C färbt sich die Reaktionslösung in wenigen Minuten intensiv dunkelrot. Die Rotfärbung des Ansatzes geht im Verlauf von einigen Tagen auf hellgelb zurück, während sich *cis,cis*-Muconsäure abscheidet.

Anisol und Guajakol reagieren mit 15-proz. Peressigsäure in methanolischer Lösung nicht zum *cis,cis*-Muconsäurehalbester wie in Analogie zur Oxydation von Nerolin in Methanol (Tab. I) zu erwarten war. Dagegen wird Guajakol in Essigester von 15-proz. Peressigsäure unter Bildung einer geringen Menge freier Muconsäure oxydiert. In Eisessig als Lösungsmittel konnten aus Anisol 1–2% und aus Guajakol bis zu 11% d. Th. an freier Muconsäure erhalten werden. Danach verläuft die Peressigsäurespaltung von Anisol und Guajakol am besten in Eisessig, allerdings zur freien *cis,cis*-Muconsäure und nicht zu deren Halbestern.

Der Einfluß von Menge und Konzentration der Peressigsäure sowie des Lösungsmittels auf die Spaltung von Brenzcatechin und Guajakol zu *cis,cis*-Muconsäure ist in Tab. II wiedergegeben. Brenz-

Tab. II. Die Ausbeute an *cis,cis*-Muconsäure (2) in Abhängigkeit von Konzentration und Menge der Peressigsäure im Ansatz. Alle Angaben in Prozent. Die Ausbeuten wurden durch Wägung des unmittelbar aus den Ansätzen kristallisierende 2 bestimmt.

Lösungsmittel	Konzentr. Peressigsäure	Molarer Überschuß	Ausb. v. Brenzcatech.	Ausb. v. Guajak.
Eisessig	10	100	49	6
		0	14	7
		10	26	8
	15	50	39	11
		100	49	9
Essigester	20	100	44	7
	15	50	50	2–3
		100	55	
		50	37	
	20	100	44	

catechin liefert gute Ausbeuten, wenn mit einer Konzentration von 10–20% Peressigsäure im Ansatz und mit einem doppelt molaren Überschuß gearbeitet wird. Mit 10-proz. Peressigsäure setzt die Reaktion beim Brenzcatechin langsamer ein, während bei mehr als 20% das Reaktionsprodukt peroxidhaltig wird.

Zur Unterdrückung des Peroxydgehaltes des Reaktionsproduktes und zur Steigerung der Aus-

beute an *cis,cis*-Muconsäure empfehlen Wacek und Fiedler³² einen Zusatz von Cobalt-III-acetat. Bei eigenen Versuchen erwies sich aber die Zugabe von Cobaltacetat als nicht vorteilhaft, da aus Brenzcatechin, Guajakol und Anisol nur sehr stark braungefärbte Reaktionsprodukte, aus Phenol eine ockerfarbene, in Wasser und organischen Lösungsmitteln fast unlösliche Substanz entstanden. Muconsäure konnte aus solchen Ansätzen in keinem Fall isoliert werden.

Einige physikalische Eigenschaften der dargestellten *cis,cis*-Muconsäure (2) im Vergleich zu den beiden anderen geometrisch isomeren Muconsäuren sind in Tab. III

Tab. III. Schmelzpunkte und UV-Absorption in Pufferlösung pH 7 für die drei geometrisch isomeren Muconsäuren (vgl. auch I. c.⁴³).

	Schmp. [°C]	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max}
<i>cis-cis</i> -Muconsäure (2)	187	257	17 300
<i>cis-trans</i> -Muconsäure	190–1	260	19 700
<i>trans-trans</i> -Muconsäure (3)	305	263	26 100

wiedergegeben. Die Fähigkeit der Isomeren zur Lactonbildung ist verschieden stark ausgebildet. So lactonisiert *trans,trans*-Muconsäure (3) auch unter recht drastischen Bedingungen nicht. Auch *cis,cis*-Muconsäure (2) ist bei Raumtemperatur und in festem Zustand stabil. Erst bei Eintragen von *cis,cis*- und auch von *cis,trans*-Muconsäure in starke Säuren oder bei deren trockenem Erhitzen bilden sich γ -Lactone²⁶. Bei dieser Lactonisierung wird in überwiegender Menge D,L- γ -Carboxymethyl- Δ^a -butenolid (14) erhalten, daneben auch wenig des Enollactons γ -Carboxymethylen-butenolid (17) und d saBis-lacton (15). Das Enollacton 16 oder δ -Lactone z. B. 13 wurden nicht gefunden. 16 entsteht aber auf enzymatischem Wege aus *cis,cis*-Muconsäure¹⁰ (vgl. unten).

Peressigsäurespaltung von 2-Acylamino-phenolen und -brenzcatechinen

Um den Einfluß eines elektronenliefernden Substituenten auf die Muconsäurespaltung kennenzulernen, wurde die Einwirkung von 15-proz. Peressigsäure in 100-proz. Überschuß auf 2-Acylamino-phenole bzw. -brenzcatechine untersucht.

Die Reaktion von 2-Acetamino-phenol mit Peressigsäure führte – ähnlich wie für *o*-Aminophenol

bekannt — zu *o*-Nitrophenol. Dagegen konnten aus Ansätzen von 2-Tosylamino-phenol geringe Mengen von *cis,cis*-Muconsäure erhalten werden. Danach setzt die Spaltung des 2-Tosylamino-phenols zwischen Tosylamino- und Hydroxylgruppe unter Eliminierung der ersteren ein. Auch Guajakol wurde bei ähnlichen Bedingungen unter Verlust der *o*-Methylgruppe zu *cis,cis*-Muconsäure gespalten (Tab. II). Ein weiterer Analogiefall ist die Spaltung von *o*-Cumar-säure³³, die nicht zu β -Muconylacrylsäure, sondern ebenfalls zur *cis,cis*-Muconsäure führt (Tab. I). Die Tatsache, daß auch C—C-Bindungen bei der Ringsprengung mit Persäuren gespalten werden, läßt vermuten, daß der Verlust von Substituenten im Zusammenhang mit dem Mechanismus der Reaktion steht (vgl. unten).

Versetzt man die Lösung von 3-Tosylaminobrenz-catechin in der berechneten Menge Eisessig bei 5–10 °C mit Peressigsäure, so färbt sich die Lösung sofort tiefrot. Sie erwärmt sich und muß zur Mäßigung der Reaktion gekühlt werden. Innerhalb von zwei Tagen hellt sich die Lösung auf, und das Reaktionsprodukt scheidet sich ab. Das gereinigte Produkt schmilzt bei 182 °C unter Zersetzung. Seine potentiometrische Titration in Äthanol ergibt die für eine Dicarbonsäure zu erwartende Titrationskurve und damit das Molekulargewicht. UV- und IR-Spektren des isolierten Produkts stehen mit der Konstitution der bisher unbekannten α -Tosylamino-muconsäuren (18–21) in Einklang.

Wie der Vergleich mit den UV-Spektren des Tosylanilids und des 3-Tosylamino-brenzcatechins (Abb. 1) zeigt, ist das kurzwellige Maximum im Spektrum des Reaktionsprodukts bei 226 nm dem Tosylaminorest zuzuschreiben. Das langwellige Maximum bei 305 nm ist, verglichen mit der *cis,cis*-Muconsäure (Abb. 1), um 45 nm nach Rot verscho-

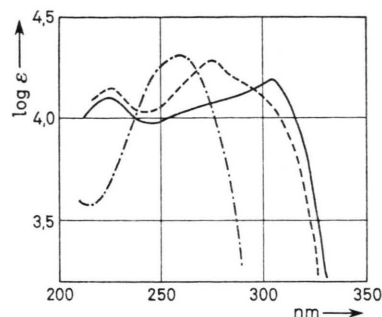


Abb. 1. UV-Spektren der α -Tosylamino-*cis,cis*-muconsäure (18, —), α -Tosylamino-*trans,trans*-muconsäure (21, - - -) und *cis,cis*-Muconsäure (2, - · - · -), in Pufferlösung pH 7.

ben, wahrscheinlich verursacht durch die Enamin-Gruppierung, die in Wechselwirkung mit den Doppelbindungen treten kann.

Im IR-Spektrum der α -Tosylamino-muconsäure (Abb. 2) liegt die N—H-Valenzschwingung bei $3,0 \mu$ und die α,β -ungesättigte Carboxylgruppe bei $5,89 \mu$. Die Valenzschwingung der konjugierten C=C-Doppelbindung tritt bei $6,20 \mu$ auf. Die intensiven Banden bei $8,70 \mu$ sind wahrscheinlich der symmetrischen SO_2 -Schwingung zuzuordnen.

Für die α -Tosylamino-muconsäure sind vier verschiedene geometrische Isomere möglich, nämlich je eine *cis,cis*- und eine *trans,trans*-Form sowie zwei *cis,trans*-Formen (vgl. Formelschema, 18–21).

Unter den *cis,cis*-Isomeren soll im folgenden die Verbindung verstanden werden, die durch Persäurespaltung aus 3-Tosylamino-brenzcatechin unter Erhalt der *cis,cis*-Konfiguration der Doppelbindungen entsteht. Es ist dadurch ausgezeichnet, daß alle H-Atome und die Tosylamino-Gruppe auf derselben Seite des Moleküls stehen (18). Von der so definierten α -Tosylamino-*cis,cis*-muconsäure werden die anderen Isomeren (19–21) sinngemäß abgeleitet.

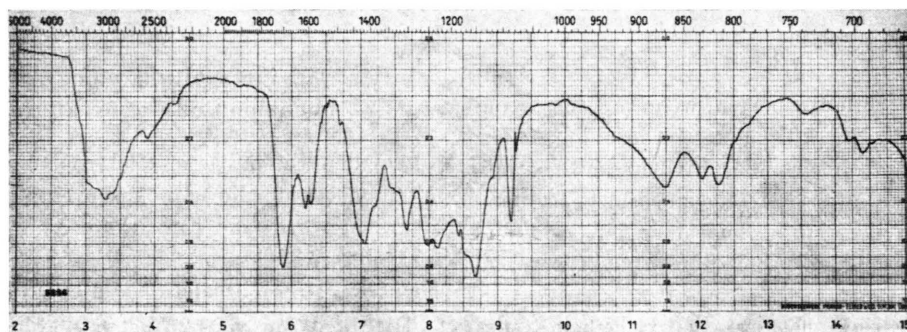


Abb. 2. IR-Spektrum der α -Tosylamino-*cis,cis*-muconsäure (18) (in Kaliumbromid.)

Aufschlüsse über die Stereochemie der dargestellten α -Tosylamino-muconsäure gibt zunächst das IR-Spektrum der Verbindung (Abb. 2). Das bekannte Spektrum der *trans,trans*-Muconsäure (3) zeigt bei $9,8\ \mu$ eine scharfe und zwischen $10,50\ \mu$ und $10,75\ \mu$ eine breite, aufgespaltene Bande, die der Deformationsschwingung der H-Atome an *trans*-Äthylenbindungen entspricht. Dagegen fehlen entsprechende Banden — wie zu erwarten^{26, 44, 45} — bei *cis,cis*-Muconsäure (Abb. 5), aber auch bei der isolierten Verbindung (Abb. 2). Diese Befunde sprechen für *cis*-Konfiguration an Δ^4 der α -Tosylamino-muconsäure.

Läßt man auf eine methanolische Lösung des isolierten Spaltprodukts UV-Licht in Gegenwart von einer Spur Jod einwirken (vgl. ^{33, 34}), dann erhält man eine Substanz mit dem Schmelzpunkt $214 - 216\ ^\circ\text{C}$, deren IR-Spektrum die für *trans*-Konfiguration charakteristischen Banden⁴⁶ bei $9,8\ \mu$ (schwach) und $10,05\ \mu$ (stark) aufweist (Abb. 3). Eine Verbindung mit identischem IR-Spektrum erhält man nach dem Erwärmen des Reaktionsproduktes in Nitromethan. Das UV-Spektrum dieser Verbindung (Abb. 1) unterscheidet sich aber von dem des Ausgangsmaterials durch eine Violettverschiebung des längerwelligen Maximums um $30\ \text{nm}$.

Für den Übergang von *cis,cis*- zu *trans,trans*-Dienen wird in der Literatur bei Carotinoiden und bei den geometrischen Isomeren der Muconsäure eine Rotverschiebung^{9, 47}, für andere Diene eine Violettverschiebung angegeben^{44, 45}.

Über die Konfiguration an Δ^2 kann aus den vorliegenden Daten keine sichere Aussage gemacht werden. Anhaltspunkte dafür ergeben sterische Betrachtungen an Kalottenmodellen.

Im Kalottenmodell von β -Methyl-*cis,cis*-muconsäure erkennt man, daß die ebene Anordnung so-

wohl in der *s-cis*- als auch in der *s-trans*-Form durch den β -Substituenten sterisch behindert ist. Entsprechend ist β -Methyl-muconsäure — selbst nach schonender Hydrolyse ihres Anhydrids — nur als β -Methyl-2-*cis*-4-*trans*-muconsäure faßbar²⁹. Aus Spaltungsansätzen von 4-Methyl-brenzcatechin mit Peressigsäure kann nur das sich aus β -Methyl-2-*cis*-4-*trans*-muconsäure bildende γ -Lacton (vgl. 22) gefaßt werden. Ähnliches gilt für β -Carboxy-*cis,cis*-muconsäure (vgl. unten). Im Gegensatz zu β -Methyl- und β -Carboxy-*cis,cis*-muconsäure kann sich die ebene Anordnung der Doppelbindungen bei *cis,cis*-Muconsäure und bei α -Tosylamino-*cis,cis*-muconsäure am Kalottenmodell unbehindert einstellen, wenn das Molekül in der *s-trans*-Form vorliegt. Damit wird nach dem oben über die Lactonisierungstendenz Gesagten verständlich, daß aus den Oxydationsansätzen in beiden Fällen freie Säuren und nicht Lactone erhalten werden.

Für den Fall des Brenzcatechins ist die *cis,cis*-Konfiguration der isolierten Muconsäure sichergestellt. Daher und wegen der sterischen Verhältnisse ist zu vermuten, daß die im 3-Tosylamino-brenzcatechin vorgebildete *cis*-Konfiguration nicht nur an Δ^4 , sondern auch an Δ^2 des Spaltproduktes erhalten geblieben ist. Es handelt sich daher sehr wahrscheinlich um die α -Tosylamino-*cis,cis*-muconsäure (18), die sich bei Belichtung in Gegenwart von Jod oder durch Erhitzen in Nitromethan in die stabilere α -Tosylamino-*trans,trans*-muconsäure (21) oder einer der beiden *cis,trans*-Isomeren 19 bzw. 20 umlagert.

Durch Erhitzen einer Lösung von 18 in Gegenwart von Wasser wird eine Substanz erhalten, die mit Hydroxylamin keine Lactonreaktion gibt. Da seine quantitative Trocknung unter Verlust von 1 Mol Wasser zu dem *trans,trans*-Isomeren führt,

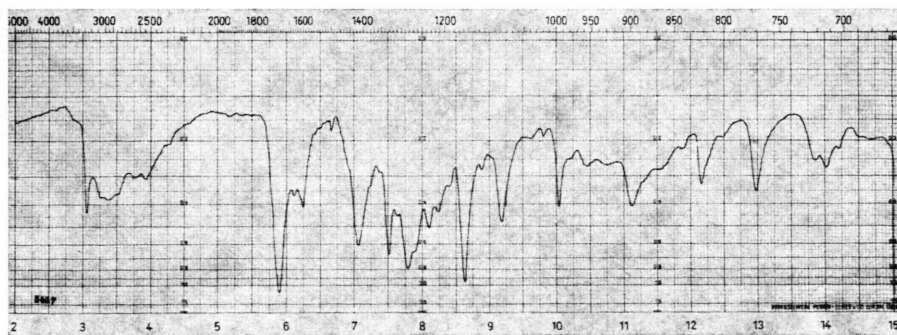


Abb. 3. IR-Spektrum der α -Tosylamino-*trans,trans*-muconsäure (21) (in Kaliumbromid).

das auch durch lichtkatalysierte Umlagerung erhalten wird, ist anzunehmen, daß es sich um ein Hydrat oder ein Hydratisierungsprodukt einer α -Tosyl-amino-muconsäure handelt.

Peressigsäurespaltung von Protocatechusäure

Protocatechusäure (4) reagiert mit Peressigsäure wesentlich langsamer als Brenzcatechin (1). Ansätze in Eisessig oder Essigester mit 15-proz. Peressigsäure im Überschuß färben sich auch bei Raumtemperatur nur gelb. Als Reaktionsprodukt läßt sich papierchromatographisch eine Säure nachweisen, die langsamer als Protocatechusäure wandert und mit Eisen-(III)-chlorid keine Farbreaktion gibt. Die präparative Trennung des Reaktionsprodukts von unveränderter Protocatechusäure gelingt durch Chromatographie auf einer Perlonsäule und liefert eine Verbindung, die bei 180–181 °C schmilzt. Die isolierte Verbindung gibt mit Hydroxylamin die für Lactone charakteristische Hydroxamsäure-reaktion mit Eisen-(III)-chlorid. Die rasche Titration mit Alkali gegen Phenolphthalein ergibt ein Äquivalentgewicht von 92,2 und die potentiometrische Titration weist auf das Vorhandensein von zwei freien Carboxylgruppen hin. Eine Lösung in Wasser entfärbt Kaliumpermanganat sofort. Danach muß ein Lacton der β -Carboxy-muconsäure vorliegen, wie auch die Analyse und die spektralen Daten ausweisen.

Die Substanz zeigt ein UV-Absorptionsmaximum bei 216 nm (Tab. IV). Im IR-Spektrum (Abb. 4) liegt eine breite Absorptionsbande zwischen 3 und 4 μ , die sich auf freie Carboxylgruppen zurückführen läßt. Der C=O-Schwingungsbereich enthält eine doppelgipfelige Bande: Der scharfe Gipfel bei 5,73 μ deutet auf das Vorliegen eines ungesättig-

Tab. IV. Physikalische Daten von Lactonen der β -Carboxy-muconsäure, die auf verschiedenen Wegen erhalten wurden, weitere Erläuterungen vgl. Text.

Darstellung	Schmp. [°C]	Lactone		
		$[\alpha]_D^{25}$ [°]	λ_{\max}^*	ϵ_{\max}^*
Protocatechu- säure mit Per- essigsäure	180–181	—	216	11 800
„inaktive“ β -Carb- oxymuconsäure	187–189	—	Endabsorption ^a	
in Ameisensäure	176–178	–2,5	215	10 700 ^b
β -Carboxy- muconsäure mit Enzym aus <i>Neurospora</i>	164–165	58	215	10 700 ¹¹

* In 0,1 M Phosphatpuffer pH 7. a, b Daten desselben Präparats in verschiedenen Laboratorien gemessen.

ten Lactons hin; der breitere Gipfel bei 5,80 μ entspricht der C=O-Valenzschwingung einer gesättigten Carboxylgruppe. Bei 6,10 μ liegt die Valenzschwingung einer konjugierten C=C-Doppelbindung.

Auf Grund der vorliegenden Daten und wegen der besonderen sterischen Verhältnisse (vgl. oben) kann angenommen werden, daß Protocatechusäure durch Peressigsäure zwar primär zu der bisher nur enzymatisch dargestellten β -Carboxy-*cis,cis*-muconsäure (5) gespalten wird, diese aber unter dem Einfluß des sauren Reaktionsmilieus direkt – oder nach *cis,trans*-Isomerisierung – lactonisiert. Mucon-, β -Methylmucon-²⁹ und β,γ -Diphenylmuconsäure⁴⁸ lactonisieren bei Säurekatalyse zu Δ^a -Butenoliden (vgl. 14, 22 und 23). Deshalb und wegen seiner Stabilität wird für das vorliegende Lacton die Struktur des D,L- γ -Carboxy-methyl- β -carboxy- Δ^a -butenolids (6b, β -Carboxy-muconolacton) angenommen.

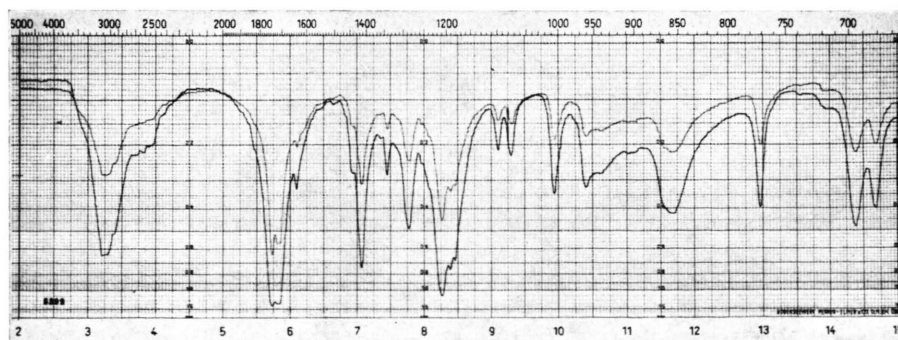


Abb. 4. IR-Spektrum des β -Carboxy-mucono-lactons (6b) (in Kaliumbromid).

Wie bereits einleitend erwähnt, haben Ornston und Stanier¹⁰ die aus enzymatischen Ansätzen faßbare β -Carboxy-*cis,cis*-muconsäure (5) durch Einwirkung eines lactonisierenden Enzyms aus *Pseudomonas putida* in das zu 6b isomere γ -Carboxymethyl- γ -carboxy- Δ^2 -butenolid¹⁰ (6a, γ -Carboxymuconolacton) überführt. 6a ist im Gegensatz zu 6b instabil: Es geht spontan oder enzymatisch katalysiert unter Verlust von CO₂ in β -Keto-adipinsäure-enol-lacton (16) über. 16 entsteht enzymatisch auch aus (+)-Mucono-lacton (vgl. 14 der enzymatischen Oxydation von Brenzcatechin¹⁰).

Durch Erhitzen einer durch lactonisierendes Enzym aus *Pseudomonas fluoreszens* nicht angreifbaren „inaktiven“ Form* von β -Carboxymuconsäure in Ameisensäure haben MacDonald *et al.*⁸ ein Lacton erhalten, das von Enzymen aus *Pseudomonas fluoreszens* nicht decarboxyliert wird. Es ist aufgrund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften mit dem hier dargestellten Lacton 6b identisch (Tab. IV), aber von 6a eindeutig verschieden¹⁰. Das von Tatum *et al.*¹¹ aus β -Carboxy-*cis,cis*-muconsäure mittels lactonisierendem Enzym aus *Neurospora crassa* erhaltene Lacton zeigt mit 6b praktisch identische UV- und IR-Daten, aber einen Schmelzpunkt von 164–165 °C (Tab. IV). Die Autoren deuten dies als Unterschied zwischen Racemat und optisch aktiver Form und weisen dem Lacton die Struktur eines der beiden enantiomeren Formen von 6b zu. Diese Interpretation wird gestützt durch den Befund, daß Rohextrakte aus *Neurospora crassa* sowohl das „biosynthetische Lacton“ vom Schmelzpunkt 164–165 °C, aber auch 50% des „synthetischen“ Lactons vom Schmelzpunkt 176–178 °C in β -Keto-adipinsäure überführen.

Zum Mechanismus der oxydativen Ringöffnung von o-Diphenolen

Die in den vorausgehenden Abschnitten beschriebenen experimentellen Befunde lassen sich weitgehend verstehen, wenn man eine Oxydation der o-Diphenole zu o-Chinonen (z. B. 24) mit anschließender Spaltung nach Art einer Baeyer-Villiger-Reaktion zu Säureanhydriden (z. B. 25) als Zwischenstufe zugrunde legt. Die Anhydride erwiesen sich in manchen Fällen als isolierbar, wenn man die

Reaktion in wasserfreiem Medium ausführt^{29, 41, 49}. Aus den Anhydriden entstehen durch Hydrolyse die Dicarbonsäuren, durch Alkoholyse die Halbestere der Dicarbonsäuren und durch Einwirkung überschüssiger Persäure Acylperoxyde³³.

Die Bildung des Muconsäure-dimethylesters aus Veratrol (Tab. I) und der Muconsäure aus o-Cumarsäure (Tab. I) fügen sich nicht ohne weiteres in diese Reaktionsfolge ein.

Unter den hier verwendeten Bedingungen war die Zwischenstufe des Säureanhydrids nicht zu fassen. Ihr Auftreten wird aber sehr wahrscheinlich gemacht durch die Isolierung eines Acylperoxydes bei Verwendung eines großen Persäureüberschusses.

Von besonderem Interesse sind die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der hier untersuchten o-Diphenole. Auf Zusatz von Peressigsäure setzt die Rotfärbung bei Brenzcatechin (1) innerhalb einiger Minuten ein, wobei eine schwach exotherme Wärmetönung auftritt. Beim 3-Tosylaminobrenzcatechin tritt die Rotfärbung schneller und unter erheblich stärkerer Erwärmung auf, während Protocatechusäure (4) ohne erkennbare Rotfärbung oder Wärmetönung sehr langsam reagiert. Erst nach 12 Wochen hat sie sich zu etwa 30% umgesetzt. Die Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit sind offenbar auf den Einfluß der Substituenten zurückzuführen: Die Elektronen abgebende Tosylaminogruppe in 3-Stellung übt eine beschleunigende, die Elektronen entziehende Carboxylgruppe in 4-Stellung dagegen eine verlangsamende Wirkung aus. Geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Ringspaltung ist vermutlich die Ringerweiterung zum Säureanhydrid.

Die enzymatische Spaltungsreaktion von Phenolen und o-Diphenolen verläuft über andere Zwischenprodukte als die chemische Spaltung mit Persäure oder H₂O₂⁵⁰, obwohl Ausgangs- und Endprodukte dieselben sind. Inkubiert man Brenzcatechin mit mikrobioeller Brenzcatechinoxidase in ¹⁸O₂-Atmosphäre, so findet man schweren Sauerstoff in beiden Carboxylgruppen der entstehenden *cis,cis*-Muconsäure. Läßt man die Reaktion in mit H₂¹⁸O angereichertem Medium ablaufen, so findet sich kein schwerer Sauerstoff in der isolierten *cis,cis*-Muconsäure⁵¹. Hydrolytische Prozesse – etwa eines Säureanhydrids – sind danach an der enzymatischen Spaltung von Brenzcatechin nicht beteiligt. Auch ist gezeigt worden, daß frisch bereitetes o-Benzo-chinon von Brenzcatechinoxidase nicht zu Muconsäure gespalten wird, sondern deren Einwir-

* Die gegenüber *Pseudomonas fluoreszens* „inaktive“ Form ist sehr wahrscheinlich ein geometrisches Isomeres der β -Carboxymuconsäure von unbestimmter Stereochemie^{8,10,11}, die „aktive“ Form ist β -Carboxy-*cis,cis*-muconsäure (5)^{8,10}.

kung auf Brenzcatechin hemmt⁵⁰. Ferner konnte eine Beteiligung von H_2O_2 bei der Reaktion von Brenzcatechin mit Brenzcatechinoxidase nicht nachgewiesen werden^{50, 51}.

Man nimmt als Zwischenstufe der enzymatischen Ringspaltung von Brenzcatechin durch Mikroorganismen die Addition von enzymatisch aktiviertem molekularem Sauerstoff unter Ausbildung eines zyklischen Peroxids (26) an. Dieses kann sich spontan oder unter dem Einfluß von Enzymen in *cis,cis*-Muconsäure umwandeln³.

Methoden und Substanzen

Mikroelementaranalysen sind teilweise von Dr. A. Schöller, Kronach/Ofr., teilweise von A. Bernhard, Mülheim/Ruhr, ausgeführt. IR-Spektren wurden mit dem selbstregistrierenden Perkin-Elmer-Spektrographen, Modell 21 (Steinsalzo-optik), die UV-Spektren mit Zeiss-Spektral-Photometer PMQ II aufgenommen. Sämtliche Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Papierchromatographie aufsteigend auf Schleicher und Schüll 2043 b. Lösungsmittel: Wasser (1), 95-proz. Äthanol (1), Butanol (4) Raumteile. Indikatoren: 1. UV-Licht (254/360 nm); 2. 0,05% Bromkresolpurpur (Umschlag pH 5,2–6,8) in 1/300 M Phosphatpuffer pH 7,2; 3. 3-proz. Eisen-(III)-chloridlösung.

R_F -Werte:

<i>cis,cis</i> -Muconsäure (2)	0,60
α -Tosylamino- <i>cis,cis</i> -muconsäure (18)	0,43
β -Carboxy-muconolacton (6b)	schwänzt
Brenzcatechin (1)	0,77
Guajakol	0,80
2-Tosylamino-phenol	0,83
3-Tosylamino-brenzcatechin	0,78
Protocatechusäure (4)	0,74

Alle Substanzen werden am empfindlichsten im durchfallenden UV-Licht nachgewiesen, das noch 1–2 μ g erkennen läßt. Mit Hilfe des Indikatorfarbstoffes können 5 μ g *cis,cis*-Muconsäure noch deutlich sichtbar gemacht werden. Dabei ist es zweckmäßig, den Streifen nicht zu besprühen, sondern in einer flachen Schale einseitig mit der Indikatorlösung zu benetzen und sogleich mit Fließpapier zu trocknen.

Perlonpulver zur Chromatographie wurde von Fa. Merck, Darmstadt, Brenzcatechin, Anisol, Guajakol, Protocatechusäure und 2-Acetamino-phenol im einschlägigen Handel bezogen.

Peressigsäure haben die Elektrochemischen Werke München in dankenswerter Weise zur Verfügung ge-

stellt. Nach Angaben des Herstellers enthält die verwendete Peressigsäure 40% Peressigsäure, 3% Wasserstoffsuperoxyd, 0,5% Schwefelsäure und 10% Wasser.

Zur Entfernung der Schwefelsäure wird die Peressigsäure in kleinen Anteilen im Vakuum in eine eisgekühlte Vorlage destilliert. Von 50 ml des technischen Produktes werden bei einer Wasserbadtemperatur von 24–26 °C und bei 12–15 Torr etwa 30 ml Destillat mit einem Gehalt von etwa 50% Peressigsäure und 0,4% Wasserstoffsuperoxyd gewonnen. Die destillierte Peressigsäure zeigt bei längerem Stehen in der Kälte nur geringen Verlust an aktivem Sauerstoff, nach 3 Wochen z. B. 5%,

Gehaltsbestimmungen werden in Anlehnung an eine Vorschrift des Werkes vorgenommen: 0,2 ml Peressigsäure wird mit etwa 10 ml 1 N Schwefelsäure verdünnt. Wasserstoffsuperoxyd wird nach Zugabe von etwas Mangansulfat mit N/10 Kaliumpermanganat titriert. Ein geringer Überschuß von Kaliumpermanganat induziert die Oxydation des Mangansulfates durch die Peressigsäure, so daß die farblose Lösung nach Verbrauch des H_2O_2 momentan tiefviolett wird. Nach Zugabe von Kaliumjodidlösung wird nun mit N/10 Natriumthiosulfat titriert. Die Titration muß rasch ausgeführt werden, da Peressigsäure in saurer wäßriger Lösung zu Essigsäure und Wasserstoffsuperoxyd hydrolysiert wird.

2-Tosylaminophenol. 11 g (0,1 Mol) *o*-Aminophenol werden mit 22,8 g (0,12 Mol) *p*-Toluolsulfochlorid in trockenem Zustand gut vermischt und danach 20 ml Pyridin zugegeben. Dabei erwärmt sich das Reaktionsgemisch, das noch 2 Stdn. auf dem Wasserbad warm gehalten wird. Die Lösung wird dann auf 400 g Eis gegossen, dem 10 ml konzentriertes HCl zugefügt sind. Das Reaktionsgemisch wird nach einigen Stunden fest. Durch mehrfaches Umkristallisieren aus Eisessig und danach aus Chloroform wird ein farbloses Produkt erhalten. Schmelzpunkt 141 °C, Ausbeute: 8,3 g (32% d. Th.).

$C_{13}H_{13}O_3NS$ (263,3)

Ber.: C 59,29 H 4,98 N 5,33 S 12,19,

Gef.: C 59,49 H 4,98 N 5,50 S 12,08.

3-Tosylamino-brenzcatechin. 3-Amino-brenzcatechin-hydrochlorid wird durch Hydrierung von 3-Nitro-brenzcatechin mit Pd/Tierkohle dargestellt. Da bei der Nitrierung von Brenzcatechin in Äther nach Weselsky und Benedikt⁵² die Ausbeuten an 3-Nitro-brenzcatechin schlecht sind, wird letzteres entsprechend den Erfahrungen von Klemenc⁵³ bei der Nitrierung von Vanillinsäure durch Nitrierung von Brenzcatechin-monoacetat dargestellt.

Brenzcatechin-monoacetat. 84 g technisches Brenzcatechin ($3/4$ Mol) werden in 170 ml trockenem

Pyridin gelöst und auf etwa 80 °C erhitzt. Unter mäßigem Rühren gibt man 78 g ($\frac{3}{4}$ Mol) Acetanhydrid zu und hält noch eine Stunde heiß. Nach Abdestillieren des Pyridins im Vakuum geht Brenzcatechin-monoacetat bei 130–132 °C/13 mm als fast farbloses Öl über, das nach einigen Tagen langsam erstarrt. Schmelzpunkt 56–57 °C, Ausbeute: 106 g (93% d. Th.).

3-Nitrobrenzcatechin. Zu einem Liter absolutem Äther, der auf –10 °C abgekühlt ist, läßt man ein Gemisch von 12 ml HNO₃ ($d = 1,52$) und 6 ml konzentrierter H₂SO₄ p.A. unter gutem Rühren zutropfen. Nach Beendigung fügt man die ätherische Lösung von 30 g Brenzcatechin-monoacetat langsam hinzu und läßt einen Tag bei Raumtemperatur stehen. Zur Entfernung der Säuren schüttelt man dreimal mit 100 ml Wasser aus, destilliert den Äther ab, gibt 5 ml 2 N H₂SO₄ hinzu und unterwirft den Rückstand der Wasserdampfdestillation. Das Destillat wird ausgeäthert und die gesammelten Ätherextrakte mit Petroläther (Siedepunkt 60–80 °C) mehrmals ausgekocht. Aus der dekantierten Petrolätherlösung kristallisiert 3-Nitro-brenzcatechin in hellgelben Nadeln aus, Schmelzpunkt 80 °C, Ausbeute: 8,8 g (29% d. Th. bezogen auf Brenzcatechin).

3-Aminobrenzcatechin-hydrochlorid. In einer Hydrierente von etwa 150 ml Fassungsvermögen werden 6,2 g 3-Nitrobrenzcatechin (0,02 Mol) in 80 ml reinem Eisessig gelöst und 1 g Palladium-Tierkohle hinzugefügt. Nach vier Stunden ist die errechnete Menge Wasserstoff aufgenommen. Der filtrierten Lösung werden 3 ml konzentrierte HCl zugesetzt und der Eisessig im Vakuum abdestilliert. Dabei färbt sich die Lösung schwach grünlich-braun. Aus der stark eingeeengten Eisessiglösung kristallisiert das 3-Aminobrenzcatechin-hydrochlorid in hellgrauen Blättchen aus, Ausbeute nahezu quantitativ.

3-Tosylamino-brenzcatechin. 1,62 g (10 mMol) 3-Aminobrenzcatechin-hydrochlorid und 2,75 g (15 mMol) *p*-Toluolsulfochlorid werden miteinander gut vermischt. Nach Zugabe von 4 ml trockenem Pyridin erwärmt sich das Gemisch stark. Es wird noch zwei Stunden auf dem Wasserbad erwärmt und dann auf 50 g Eis gegossen, dem zur Neutralisation des Pyridins 1,5 ml konzentrierter HCl zugesetzt waren. Beim Verreiben des sich abscheidenden Öls mit dem angesäuerten Eiswasser wird die Masse fest; man kristallisiert mehrmals aus Eisessig und aus Chloroform aus. Schmelzpunkt 170 °C, Ausbeute: 1,22 g (44% d. Th.).

C₁₃H₁₃O₄NS (279,3)

Ber.: C 55,91 H 4,70 N 5,02 S 11,49,

Gef.: C 55,93 H 5,01 N 4,72 S 11,19.

Oxydationen mit Peressigsäure. Je nachdem, ob die untersuchte Substanz eine oder zwei phenolische Hydroxylgruppen enthält, werden pro Mol Phenol entweder drei oder zwei Mol Peressigsäure verwendet. Die destillierte Peressigsäure sei z. B. 52,4-proz. Um sie auf 15% zu bringen, muß sie mit Eisessig auf das 3,5-fache Volumen verdünnt werden. Der Konzentrationsabnahme während der Reaktion ist durch einen Überschuß von 50% der stöchiometrischen Menge Rechnung zu tragen. Beispielsweise sind für 3 mMol eines Monophenols 13,5 mMol, entsprechend 1,96 ml 52,4-proz. Peressigsäure einzusetzen. Um 15-proz. Konzentration im Ansatz zu erreichen, ist mit 4,89 ml Eisessig zu verdünnen. Der zum Verdünnen verwendete Eisessig wurde über KMnO₄ gekocht und über eine Kolonne destilliert. Statt mit Eisessig wird bei manchen Versuchen mit derselben Menge gereinigtem Essigester oder Methanol verdünnt.

Die in Tab. II zusammengefaßten Versuchsansätze werden entsprechend den im folgenden beschriebenen Spaltungsreaktionen durchgeführt.

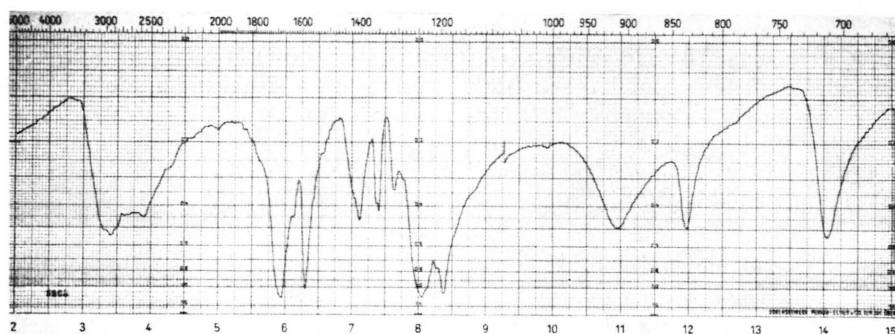
cis,cis-Muconsäure (2) aus Guajakol. 372 mg (3 mMol) Guajakol werden in einem kleinen Erlenmeyer-Kolben in 3,25 ml Eisessig gelöst, auf 0 °C gekühlt und 1,30 ml 52,4-proz. Peressigsäure hinzugefügt. Nach 12 Stdn. wird der Ansatz auf Raumtemperatur gebracht. Die Lösung färbt sich allmählich dunkelrot; und nach einigen Tagen beginnt die Muconsäure auszukristallisieren. Rohausbeute nach zehn Tagen: 53 mg = 0,37 mMol = 11% d. Th.

Mit KJ-Stärke läßt sich nachweisen, daß dem Rohprodukt das von Wacek und Fiedler³² beschriebene Peroxyd beigemischt ist. Durch Umkristallisieren aus Eisessig und danach aus Essigester wird reine 2 erhalten, Schmelzpunkt 187 °C.

C₆H₆O₄ (142,1) Ber.: C 50,71 H 4,26,
Gef.: C 50,52 H 4,45.

IR-Spektrum: Abb. 5, UV-Spektrum: Abb. 1, Tab. III.

Spaltungsversuch mit 2-Acetamino-phenol. 1,51 g (10 mMol) *o*-Acetamino-phenol wurden in 20 ml Eisessig gelöst und 12 ml 40,2-proz. Peressigsäure unter Kühlung hinzugegeben. Die Lösung blieb mehrere Stunden farblos, erst allmählich trat Gelb- und später Rotfärbung ein. Nach 3 Wochen wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, mit Petroläther das entstandene 2-Nitrophenol (65 mg, Schmelzpunkt 42–43 °C) abgetrennt und der Rückstand mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung digeriert. Der unlösliche Teil war 2-Acetamino-phenol (FeCl₃-Reaktion, Schmelzpunkt 198–202 °C). Der Ätherextrakt des schwach alkalischen Filtrats enthielt noch 2-Nitrophenol.

Abb. 5. IR-Spektrum der *cis,cis*-Muconsäure (**2**) (in Kaliumbromid).

cis,cis-Muconsäure (**2**) aus 2-Tosylamino-phenol. 5,25 g (20 mMol) 2-Tosylamino-phenol werden in 50 ml Eisessig gelöst und mit 25 ml 45-proz. Peressigsäure versetzt. Nach drei Tagen hat sich die Lösung dunkelrot gefärbt. Nach 14 Tagen wird stark eingeeengt und mit Chloroform versetzt. Aus der rothraunen Lösung scheiden sich im Kühlschrank nach einigen Tagen 70 ml gelbliche Kristalle ab, die durch Schmelzpunkt, Papierchromatogramm und IR-Spektrum als **2** identifiziert wurden.

α -Tosylamino-*cis,cis*-muconsäure (**18**) aus 3-Tosylamino-brenzcatechin. 1,4 g (5 mMol) 3-Tosylamino-brenzcatechin werden in 7,0 ml Eisessig in der Wärme gelöst, auf 5 °C abgekühlt und 3,5 ml 45-proz. Peressigsäure zugegeben. Die Lösung enthält dann 15-proz. Peressigsäure in 100-proz. Überschuß. Sie färbt sich sofort dunkelrot und erwärmt sich, so daß mit Eiswasser gekühlt werden muß. Nach 40 Stdn. wird der Ansatz auf Raumtemperatur gebracht; nach weiteren zwei Tagen beginnt das Reaktionsprodukt **18** auszukristallisieren. Rohausbeute nach 8 Tagen 215 mg (14% d. Th.).

In einem weiteren Ansatz werden 870 mg (3 mMol) 3-Tosylamino-brenzcatechin mit dem Gemisch von 1,9 ml 40,5-proz. Peressigsäure und 2,0 ml Eisessig ohne Kühlung übergossen und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der Ansatz enthält dann 20-proz. Peressigsäure in 66% Überschuß. Der Bodensatz löst sich innerhalb von 2 Tagen vollständig. Die Lösung ist in den ersten Tagen dunkelrot, nach 4 Tagen hellgelb gefärbt; nach 6 Tagen sind 232 mg **18** vom Schmelzpunkt 161–165 °C auskristallisiert, entsprechend etwa 20% d. Th.

Das Rohprodukt wird in möglichst wenig Aceton gelöst und das doppelte Volumen Nitromethan zugegeben. Beim langsamen Verdunsten des Lösungsmittels kristallisiert reines **18** aus, Schmelzpunkt 180–182 °C (Zersetzung). Nimmt man die bis zum Öl konzentrierte Mutterlauge des Ansatzes in Nitromethan auf, so kristallisiert nach einigen

Tagen noch etwas **18** aus.

$C_{11}H_{13}O_6NS$ (311,1)

Ber.: C 50,18 H 4,21 S 10,30,

Gef.: C 49,90 H 4,05 S 9,93.

IR-Spektrum: Abb. 2; UV-Spektrum: Abb. 1.

Werden 13,0 mg **18** in 96-proz. Äthanol mit N/20 NaOH ($f=1,074$) titriert, so erkennt man deutlich zwei Stufen, die durch einen Wendepunkt bei pH = 6,18 getrennt sind. Zur Neutralisation der ersten Stufen werden 0,75 ml N/20 NaOH benötigt entsprechend einem Molekulargewicht von 322. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit der Substanz ließ sich eine Äquivalentgewichts-Bestimmung in Wasser nicht durchführen.

Umlagerung von **18** zu α -Tosylamino-*trans,trans*-muconsäure (**21**). a. 10 mg **18** (Schmelzpunkt 18–182 °C) werden in 1 ml Methanol gelöst und bei Gegenwart einer Spur Jod 2 Stdn. mit UV-Licht von 254 nm bestrahlt. Die Lösung wird bei Zimmertemperatur eingedampft und der Trockenrückstand mit Aceton digeriert. Es werden 6 mg der in Aceton schwerlöslichen **18**, Schmelzpunkt 214–216 °C, isoliert und spektrophotometriert (Abbn. 1, 3). b. 20 mg *cis,cis*-Isomeres werden in 2 ml Aceton gelöst, 5 ml Nitromethan zugegeben und 5–6 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Es scheidet sich eine Substanz mit dem Schmelzpunkt 216–218 °C ab, die abfiltriert und ohne weitere Reinigung spektrophotometrisch gemessen wird (Abbn. 1, 3).

Hydrat von **18**. 12 mg **18** wurden in 1 ml Methanol gelöst, 2 ml Wasser zugegeben und 10 min gekocht. Beim Abkühlen schieden sich 8 mg einer Substanz mit dem Schmelzpunkt 242–244 °C in derben Kristallen aus.

Quantitative Trocknung der Substanz: Einwaage nach Trocknen bei Zimmertemperatur: 8,256 mg; nach Trocknen bei 100–110 °C (3 Stdn.): 7,780 mg; Differenz: 0,476 mg.

Für 1 Mol Wasser berechnete Gewichtsabnahme 0,452 mg. Der Rückstand der quantitativen Trock-

nung schmilzt bei 210–213 °C. Sein IR-Spektrum ist mit dem von **21** identisch (Abb. 3).

β-Carboxy-muconolacton (**6b**) aus Protocatechusäure (**4**). 780 mg (5 mMol) **4** werden in 6,48 ml Eisessig gelöst. Nach Abkühlen auf 5 °C werden 3,54 ml 43-proz. Peressigsäure zugegeben. Die Lösung enthält dann 15-proz. Peressigsäure in 100-proz. Überschuß. Der Ansatz wird nach 12 Std. auf Raumtemperatur gebracht und lichtgeschützt aufbewahrt. Nach 3 Monaten war das Lösungsmittel z. T. verdampft. Der Rückstand wurde auf Perlonpulver chromatographiert (vgl. dazu ⁵⁴): 25 g Perlonpulver feinst läßt man in Wasser 3 Std. quellen, schlämmt die Masse mit Wasser in eine Säule von 2 cm Durchmesser ein und drückt sie mit einem Stopfer auf 29–30 cm Säulenlänge zusammen. Ein Rundfilter dient zum Schutz gegen Aufwirbeln des Säulenkopfes. Die Tropfgeschwindigkeit beträgt etwa 1/2 ml/min. Die Säule wird zunächst mit 200 ml Wasser durchgespült. Der Rückstand des 5 mMol Ansatzes wird in 5 ml Aceton/Wasser 1 : 1 gelöst auf die Säule gegeben und anschließend mit 400 ml Wasser eluiert. Die ersten 50 ml Eluat enthalten noch keine Substanz. In den nächsten 350 ml ist **6b** enthalten. Nichtumgesetztes **4** wird danach mit 100 ml Wasser/Aceton eluiert. Die Hauptmenge **4** ist in den ersten 50 ml acetonhaltigen Eluates enthalten. Die Gesamtmenge wiedergewonnener **4** be-

trägt 230 mg. Am Kopf der Säule bleibt ein gelbes Produkt haften, das nur mit N/20 NaOH eluierbar ist und nicht weiter untersucht wurde. Ein zweiter Ansatz kann auf derselben Säule erfolgreich getrennt werden.

Nach Eindampfen des wäßrigen Eluats (400 ml) im Vakuum bei 40–45 °C bleiben farblose Kristalle zurück, 360 mg (38% d. Th.). Sie werden durch Umkristallisieren aus Essigester/Benzol oder aus Eisessig gereinigt, Schmelzpunkt 180–181 °C.

C₇H₆O₆ (186,13) Ber.: C 45,17 H 3,25,
Gef.: C 45,11 H 3,50.

IR-Spektrum: Abb. 4; UV-Spektrum: Tab. IV.

Titriert man 12,2 mg **6b** in etwa 5 ml 96-proz. Äthanol mit N/10 NaOH (*f* = 1,09) potentiometrisch, so läßt die Titrationskurve zwei Stufen erkennen, die durch einen Wendepunkt bei pH 6,00 getrennt sind. Aus dem Verbrauch von 0,60 ml N/10 NaOH bis zu diesem Wendepunkt ergibt sich das Molekulargewicht zu 186,5. Der zweite Teil der Kurve ist flacher und länger als der erste, weil Alkohol oberhalb pH 6 ebenfalls Lauge verbraucht. Bei Titration von 24,4 mg Lactonsäure in wäßriger Lösung gegen Phenolphthalein werden 2,65 ml N/10 NaCl (*f* = 1,00) entsprechend einem Äquivalentgewicht zu 92,2 verbraucht.

- ¹ T. D. Gibson, Science [Washington] **161**, 1093 [1968]; CRC Critical Reviews in Microbiology **1**, 199 [1971].
- ² F. Marks u. E. Hecker, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **349**, 523 [1968].
- ³ B. Witkop, Experimentia [Basel] **27**, 1121 [1972].
- ⁴ F. Dickens, Brit. med. Bull. **20**, 98 [1964].
- ⁵ E. K. Marr u. R. W. v. Stone, J. Bacteriol. **81**, 425 [1961].
- ⁶ O. Hayaishi u. K. Hashimoto, Med. J. Osaka Univ. **2**, 33 [1950].
- ⁷ O. Hayaishi, M. Katagiri u. S. Rothberg, J. biol. Chemistry **229**, 905 [1957].
- ⁸ L. L. Macdonald, R. Y. Stanier u. J. L. Ingraham, J. biol. Chemistry **210**, 809 [1954].
- ⁹ R. Y. Stanier u. J. L. Ingraham, J. biol. Chemistry **210**, 799 [1954].
- ¹⁰ L. N. Ornston u. R. Y. Stanier, J. biol. Chemistry **241**, 3776 [1966].
- ¹¹ S. R. Gross, R. D. Gafford u. E. L. Tatum, J. biol. Chemistry **219**, 781 [1956].
- ¹² K. Schubert, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **325**, 260 [1961].
- ¹³ D. T. Gibson, K. C. Wang, C. J. Sih u. H. Whitlock jr., J. biol. Chemistry **241**, 551 [1966].
- ¹⁴ M. Jaffe, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **62**, 58 [1909].
- ¹⁵ K. Bernhard u. E. Gressly, Helv. chim. Acta **24**, 83 [1941].
- ¹⁶ D. V. Parke u. R. T. Williams, Biochem. J. **54**, 231 [1953].
- ¹⁷ M. Nakajima, I. Tomida, A. Hashizume u. Sankichi Takei, Ber. dtsch. chem. Ges. **89**, 2224 [1956].
- ¹⁸ F. Marks u. E. Hecker, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **345**, 22 [1966].
- ¹⁹ J. Fishman, R. J. Cox u. T. F. Gallagher, Arch. Biochem. Biophysics **90**, 318 [1960].
- ²⁰ G. Walter u. E. Hecker, Z. Naturforsch. **28 c**, 675 [1973].
- ²¹ C. D. Harris u. V. Weiss, Ber. dtsch. chem. Ges. **37**, 3431 [1904].
- ²² L. Carius, Liebig's Ann. Chem. **155**, 217 [1870].
- ²³ C. Barrett, D.R.P. 365894; C. 1923, II, 405.
- ²⁴ G. Stein u. J. Weiss, J. chem. Soc. [London] **1949**, 3254.
- ²⁵ J. Cook u. R. Schoenthal, J. chem. Soc. [London] **1950**, 47.
- ²⁶ J. A. Elvidge, R. P. Linstead, B. A. Orkin, P. Sims, H. Baer u. D. B. Pattison, J. chem. Soc. [London] **1950**, 2228; J. A. Elvidge, R. P. Linstead, P. Sims u. B. A. Orkin, J. chem. Soc. [London] **1950**, 2235.
- ²⁷ J. Boeseken u. J. Engelberts, Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam, Proc. **34**, 1292 [1931].
- ²⁸ J. Boeseken u. C. L. M. Kerkhoven, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **51**, 964 [1932].
- ²⁹ J. A. Elvidge, R. P. Linstead u. P. Sims, J. chem. Soc. [London] **1951**, 3386, 3398.
- ³⁰ W. D. Emmons u. A. F. Ferris, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4623 [1953].
- ³¹ M. F. Hawthorne, Analytic. Chem. **28**, 540 [1956].
- ³² A. Wacek u. R. Fiedler, Mh. Chem. **80**, 170 [1949].
- ³³ C. Grundmann, Ber. dtsch. Chem. Ges. **69**, 1755 [1936].
- ³⁴ J. Boeseken u. C. F. Metz, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **54**, 345 [1935].
- ³⁵ G. A. Page u. D. S. Tarbell, Org. Syntheses Coll. Vol. **IV**, p. 136.
- ³⁶ H. Fernholz, Ber. dtsch. Chem. Ges. **84**, 110 [1951].
- ³⁷ J. Boeseken u. G. Sloof, Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam, Proc. **32**, 1043 [1929].
- ³⁸ C. J. Collins u. B. M. Benjamin, J. Amer. chem. Soc. **75**, 402 [1953].

- ³⁹ C. Heidelberger, P. M. Bhargava u. H. J. Hadler, J. Amer. chem. Soc. **77**, 2877 [1955].
- ⁴⁰ S. L. Friess, H. L. Soloway, B. K. Morse u. W. C. Ingersoll, J. Amer. chem. Soc. **74**, 1305 [1952].
- ⁴¹ P. Karrer u. L. Schneider, Helv. chim. Acta **30**, 859 [1947].
- ⁴² P. Karrer u. E. Testa, Helv. chim. Acta **32**, 1019 [1949].
- ⁴³ W. R. Siström u. R. V. Stanier, J. biol. Chemistry **210**, 821 [1954].
- ⁴⁴ A. Butenandt, E. Hecker u. H. G. Zachau, Ber. dtsch. Chem. Ges. **88**, 1155 [1955].
- ⁴⁵ L. Crombie, H. S. Harper u. R. J. D. Smith, J. chem. Soc. [London] **1957**, 2754.
- ⁴⁶ W. D. Celmer u. J. A. Solomons, J. Amer. chem. Soc. **75**, 1372 [1953].
- ⁴⁷ J. H. Pinckaro, B. Wille u. L. Zechmeister, J. Amer. chem. Soc. **70**, 1938 [1948].
- ⁴⁸ E. Beschke, G. Köhres u. L. Stoll, Liebig's Ann. Chem. **391**, 111 [1912].
- ⁴⁹ P. Karrer, R. Schwyzer u. A. Neuwirth, Helv. chim. Acta **31**, 1210 [1948].
- ⁵⁰ O. Hayaishi, A. A. Pachett u. B. Witkop, Liebig's Ann. Chem. **608**, 158 [1957].
- ⁵¹ O. Hayaishi, M. Katagiri u. S. Rothberg, J. biol. Chem. **229**, 905 [1957].
- ⁵² P. Weselsky u. B. Benedikt, Mh. Chem. **3**, 386 [1882].
- ⁵³ A. Klemenc, Mh. Chem. **35**, 94 [1914].
- ⁵⁴ W. Grassmann, H. Endres u. W. Pauckner, Ber. dtsch. Chem. Ges. **91**, 134 [1958].