durch Hinzufügen von Glaswatte verhindert. Die Ausbeute an Bistrifluoracetyl-TDR betrug 700 mg = 78 Prozent. Das Produkt sintert bei 50°.

Analyse: $C_{14}H_{12}F_6N_2O_7$ (Mol.-Gew.: 434,3).
Ber. C 38,7 H 2,8 N 6,4 F 26,3,
Gef. C 39,3 H 3,0 N 6,8 F 25,4.

IR-Spektrum: $\nu(C=O)$ der CF_3COO -Gruppen 1800 cm^{-1} , $\nu(C=O)$ der $NHCONH$ - und $NHCO$ -Gruppen 1700 cm^{-1} (breit).

3',5'-Bis-O-trifluoracetyl-5-bromuracildesoxyribosid

Auf gleiche Weise wurden 200 mg 5-Bromuracildesoxyribosid in 6,5 ml Pyridin mit 650 mg TFEP trifluor-

acetyliert. Die Ausbeute an leicht gelblichem Produkt betrug 230 mg = 71 Prozent. Es sintert ebenfalls bei 50°.

Analyse: $C_{13}H_9BrF_6N_2O_7$ (Mol.-Gew.: 499,1).
Ber. C 31,3 H 1,8 Br 16,0 F 22,8,
Gef. C 31,8 H 2,2 Br 15,1 F 20,5.

Trifluoracetylierung von Uracil-, 5-Joduracil- und Adenindesoxyribosid

Nach dem beschriebenen Verfahren konnte von keinem der drei Ausgangsprodukte ein Bistrifluoracetyl-Derivat isoliert werden, da jeweils zwischen 90 und 110° Zersetzung eintrat.

Über Pflanzenabwehrstoffe V *

Synthesen und Eigenschaften des Primins und seiner Isomeren

H. SCHILDKNECHT und HANS SCHMIDT **

Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg und Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg

(Z. Naturforschg. 22 b, 287—294 [1967]; eingegangen am 12. Oktober 1966)

Es wird die Synthese des Primins, ausgehend vom *o*-Vanillin, beschrieben. In der gleichen Weise konnten durch Variation der Reaktionskomponenten in der Synthesefolge zwei Isomere des Primins mit verzweigten Alkylseitenketten dargestellt werden. Bei der übersichtlichen Synthese der stellungsisomeren 2-Methoxy-5-alkyl-*p*-benzochinone diente als Ausgangsmaterial Resorcin, das mit Carbonsäuren umgesetzt die 2,4-Dioxyvalerophenone gibt. Nach der Reduktion zu den 2,4-Dioxyalkylbenzolen erhält man durch Oxydation mit Kaliumnitrosodisulfonat und Methylierung mit Diazomethan die entsprechenden alkylierten Methoxychinone.

Durch eine umfangreiche spektroskopische Analyse ist es uns gelungen den hautreizenden Giftstoff von *Primula obconica*, der von BLOCH und KARRER ¹ als Primin bezeichnet wurde, als das 2-Methoxy-6-n-pentyl-*p*-benzochinon (I) zu charakterisieren ².

Dieses einfache Methoxychinon ist bisher lediglich durch Oxydation von Olivetoldimethyläther, dem 3,5-Dimethoxy-1-n-pentylbenzol, im Laboratorium dargestellt worden ³. Eine übersichtliche Synthese des Primins aber sollte nicht nur den gemachten Strukturvorschlag bestätigen, sondern darüber-

hinaus genügend reines Material für physiologische Versuche liefern. Wir zielten auf eine möglichst variierbare Synthese ab, da wir uns von Testversuchen mit Primin-Isomeren und -Homologen Aufschluß über Zusammenhänge von Wirkung und Struktur hautreizender Chinone erhofften. Zugleich war ein breiter spektroskopischer Vergleich der unbekannten Chinone erwünscht.

1. Synthese des Primins

Bei der Synthese des Primins gingen wir vom *o*-Vanillin aus, das wir mit Dimethylsulfat, zum 2,3-Dimethoxybenzaldehyd (II) methylierten ⁴. Die weitere Umsetzung mit der Grignard-Verbindung ⁵ des *n*-Butylbromids führte zum 2,3-Dimethoxy-

* IV. Mitteilung über Pflanzenabwehrstoffe, s. vorhergehende Veröffentlichung.

** Aus der Dissertation von HANS SCHMIDT, Heidelberg 1965.

¹ B. BLOCH u. P. KARRER, naturf. Ges. Zürich 72, 1, Beibl. [1927].

² H. SCHILDKNECHT, I. BAYER u. H. SCHMIDT, Z. Naturforschg. 22 b, 36 [1967].

³ F. FUZIKAWA, Ber. dtsch. chem. Ges. 68, 72 [1935].

⁴ J. S. BUCK, Organ. Syntheses, Coll. Voll. II, S. 619.

⁵ W. A. AWAD, M. F. AL-NEWAIHY u. S. F. SELIM, J. org. Chemistry 23, 1783 [1958].

I. Frauenklinik und Hebammenschule
H. Schenck, H. Schenck, H. Schenck
H. Schenck, H. Schenck, H. Schenck

oxyphenylbutyl-carbinol (III; Tab. 1) das wir mit Dichromat/Schwefelsäure^{5,6} zum 2.3-Dimethoxy-valerophenon (IV; Tab. 2) oxydierten. Die partielle Entmethylierung⁷ mit Aluminiumchlorid in Toluol ergab das 2-Oxy-3-methoxy-valerophenon (V; Tab. 3), das nach CLEMMENSEN zum 1-n-Pentyl-guajakol (VI; Tab. 4) reduziert wurde. Im letzten Schritt der Synthese wurde mit Kaliumnitrosodisulfonat zum 2-Methoxy-6n-pentyl-p-benzochinon oxydiert (I; Tab. 5).

Die Reinigung des Endproduktes durch Chromatographie, Umkristallisieren und Sublimieren lieferte goldgelbe Kristalle vom Schmp. 62–63°. Sie ließen sich wie der Naturstoff mit sehr gutem Ergebnis zonenschmelzen und zeigten dann den gleichen Schmelzpunkt von 66,7–66,8° wie das zonengereinigte Primin; der Mischschmelzpunkt ergab keine Depressionen.

1.1. Synthese von 2-Methoxy-6-alkyl-p-benzo- chinonen

Die Pentylseitenkette des Priminmoleküls variierten wir, indem wir in der zweiten Synthesestufe der oben aufgezeigten Synthesefolge die Butyl-Grignard-Komponente veränderten. Wir synthetisierten die 2.3-Dimethoxycarbinole VII und VIII (Tab. 1) durch Umsetzung der Grignard-Verbindung von *i*-Butylbromid bzw. sek. Butylbromid mit 2.3-Dimethoxybenzaldehyd. Über die entsprechenden 2.3-Dimethoxyphenone IX und X (Tab. 2)

R in Verbindung	Nr.	Ausbeute in % d. Th	Eigen- schaften	Sdp. in °C/mm
$\text{CH}_2-\text{CH} \begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$	VII	70–75	farbloses, zähflüssi- ges Öl	111–114 /0,2
$\text{CH} \begin{smallmatrix} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$	VIII	75–85	„	103–108 /0,2
$(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$	III	85–90	„	99–102/ 0,08–0,1

Tab. 1. 2.3-Dimethoxyphenyl-carbinole.

gelangten wir durch partielle Entmethylierung der 2-Methoxy-Gruppe zu den 2-Oxy-3-methoxy-phenonen XI und XII (Tab. 3). Die hohe Selektivität dieser Reaktion spricht dafür, daß auch hier, wie im

R in Verbindung	Nr.	Ausbeute in % d. Th.	Eigen- schaften	Sdp. in °C/mm
$\text{CH}_2-\text{CH} \begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$	IX	75–80	schwach gelbes, vis- koses Öl	103–105 /0,2
$\text{CH} \begin{smallmatrix} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$	X	75–80	„	90–92 /0,2
$(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$	IV	73–83	„	90,5– 93,5/0,08 –0,1

Tab. 2. 2.3-Dimethoxyphenone.

Falle der partiellen Entmethylierung von Naphthochinon-Derivaten mit peri-ständiger Methoxygruppe⁸, unter großem Energieverlust vom Stoffsystem betrachtet, Aluminiumkomplexe der 2-Oxy-3-methoxyphenone entstehen (XIII). Tatsächlich kann man auch in Toluol unlösliche, tiefgefärbte Niederschläge beobachten, die sich auf Zusatz von Wasser stürmisch zersetzen.

⁶ H. v. KRANNICHFELDT, Ber. dtsh. chem. Ges. **46**, 4016 [1913].

⁷ T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta **10**, 392 [1927].

⁸ E. HARDEGGER, E. WIDMER, K. STEINER u. A. PFIFFNER, Helv. chim. Acta **47**, 2031 [1964].

R in Verbindung 	Nr.	Ausbeute in % der Theorie	Eigen- schaften	Siedepunkt in °C/mm	FeCl ₃ -Reaktion in verd. alkohol. Lösung
$\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3$ CH_3	XI	50—60	tiefgelbes, leicht- bewegliches Öl	97—101/0,2	intensiv violettblau
$\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ CH_3	XII	50—70	tiefgelbes, leicht- bewegliches Öl	89—94/0,2	intensiv violettblau
$(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$	V	60—90	tiefgelbes, leicht- bewegliches Öl	87—89,5/0,08 —0,1	intensiv violettblau

Tab. 3. 2-Hydroxy-3-methoxy-phenone.

R in Verbindung 	Nr.	Ausbeute in in % der Theorie	Eigen- schaften	Siedepunkt in °C/mm	FeCl ₃ -Reaktion in verd. alkohol. Lösung
$(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	XIV	58—65	farblose, leicht bewegliche Flüssigkeit	87—90/0,2	blaugrün
$\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ CH_3	XV	70—78	farblose, leicht bewegliche Flüssigkeit	76—77/0,2	blaugrün
$(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	VI	70—89	farblose, leicht bewegliche Flüssigkeit	83/01	blaugrün

Tab. 4. 2-Oxy-3-methoxy-alkylbenzole (1).

R in Verbindung 	Nr.	Ausbeute in % der Theorie	Eigen- schaften	Schmelz- punkt	Analyse			
					Ber. Gef.	C	H	O
$(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	I	20—40	goldgelbe Nadeln	62—63		69,21	7,74	23,05
						69,50	7,75	22,81
$(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{CH}_3$ CH_3	XVI	10—20	goldgelbe Blättchen	51,5—52		69,21	7,74	23,05
						69,62	7,82	23,24
$\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ CH_3	XVII	10—15	goldgelbe Blättchen	102—106		69,21	7,74	23,05
						69,53	7,72	23,25

Tab. 5. 2-Methoxy-6-alkyl-p-benzochinon (1.4).

Durch Reduktion der 2-Oxy-3-methoxy-phenone erhielten wir die 2-Oxy-3-methoxy-iso-pentyl-benzole XIV und XV (Tab. 4), die wir mit Kaliumnitrosodisulfonat zu den entsprechenden Priminisomeren XVI und XVII (Tab. 5) oxydierten.

2. Synthese von 2-Methoxy-5-alkyl-p-benzochinonen

Als erstes Chinon dieser Reihe synthetisierten wir das 2-Methoxy-5-n-pentyl-p-benzochinon XVIII.

Durch Kondensation von Resorcin mit *n*-Valeriansäure in Gegenwart von wasserfreiem Zinkchlorid erhielten wir das 2,4-Dioxy-*n*-valerophenon (XIX, Tab. 6), das nach Clemmensen zum 2,4-Dioxy-*n*-pentyl-(1)-benzol (XX, Tab. 7) reduziert wurde.⁹ XX haben wir mit Kaliumnitrosodisulfonat^{10–15} bei $p_H=8$ im Phosphatpuffer zu 2-Hydroxy-5-*n*-pentyl-*p*-benzochinon (XXI) oxydiert, das wir jedoch nicht isolierten, sondern in ätherischer Lösung sogleich mit Diazomethan in das entsprechende Methoxychinon XVIII überführten (Tab. 8).

Die Maxima im UV-Spektrum des synthetischen Chinons bei 267 und 365 $m\mu$, die charakteristischen Banden und Bandenlagen im IR-Spektrum, das Massenspektrum sowie das NMR-Spektrum waren sehr ähnlich mit denen des Primins.

Abb. 1. IR-Spektrum des 2-Methoxy-5-*n*-pentyl-*p*-benzochinons in KBr (XVIII).

R in Verbindung 	Nr.	Ausbeute in % der Theorie	Eigen- schaften	Siedepunkt in °C/mm	FeCl ₃ -Reaktion in verd. alkohol. Lösung
$-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$	XIX	82	gelbes, viskoses Öl	111–114/0,2	rot
$-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_3$	XXVI	70–78	gelbes, viskoses Öl	145–152/1	rot
$-\text{C}(=\text{O})-\underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	XXVII	55–75	gelbes, viskoses Öl	143–148/1	rot

Tab. 6. 4-Acyl-Resorcine.

R in Verbindung 	Nr.	Ausbeute in % der Theorie	Eigen- schaften	Schmelzpunkt in °C	FeCl ₃ -Reaktion in verd. alkohol. Lösung
$(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	XX	85–91	farblose Nadeln	71–72	gelbgrün
$(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_3$	XXIX	75–82	farblose Blättchen	63	gelbgrün
$\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ $(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$	XXX	85–91	farblose Nadeln	53,5	gelbgrün

Tab. 7. 4-Alkyl-Resorcine.

⁹ A. R. L. DOHME, E. H. COX u. E. MILLER, J. Amer. chem. Soc. **48**, 1688 [1926].

¹⁰ H. J. TEUBER u. G. JELLINEK, Chem. Ber. **85**, 95 [1952].

¹¹ H. J. TEUBER u. W. RAU, Chem. Ber. **86**, 1036 [1953].

¹² H. J. TEUBER u. N. GÖTZ, Chem. Ber. **87**, 1236 [1954].

¹³ H. J. TEUBER u. G. JELLINEK, Chem. Ber. **87**, 1841 [1954].

¹⁴ H. J. TEUBER u. G. STAIGER, Chem. Ber. **88**, 802 [1955].

¹⁵ F. RASCHIG, Ber. dtsch. chem. Ges. **40**, 4581 [1907].

R in Verbindung 	Nr.	Ausbeute in % der Theorie	Eigen- schaften	Schmelz- punkt in °C	Analyse			
					Ber. Gef.	C	H	O
$(CH_2)_4-CH_3$	XVIII	35—40	tiefgelbe Schuppen	114—115		69,21	7,74	23,05
						69,01	7,51	
$(CH_2)_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_3$	XXII	19—25	tiefgelbe Blättchen oder Nadeln	107—108		69,21	7,74	23,05
						69,23	7,56	22,69
$\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	XXIII	17—23	gelbe Nadeln oder Blättchen	73—74		69,21	7,74	23,05
						69,42	7,85	23,24

Tab. 8. 2-Methoxy-5-alkyl-p-benzochinone (1.4).

Durch Verwendung von *i*-Valeriansäure und Methyläthyllessigsäure an Stelle von *n*-Valeriansäure, konnten wir in der beschriebenen Weise die Chinone XXII und XXIII synthetisieren.

3. Experimentelle Einzelheiten

3.1. Synthese der 2-Methoxy-6-alkyl-p-benzochinone (1.4)

3.1.1. 2,3-Dimethoxybenzaldehyd

182 g (1,2 Mole) *o*-Vanillin und 450 ml kochendes Wasser werden in einem Dreihalskolben, der mit Rührer, Rückflußkühler und Tropftrichter versehen ist, auf dem siedenden Wasserbad unter kräftiges Turbinieren erhitzt. Nun gibt man 300 ml einer Lösung von 150 g Natriumhydroxyd in 750 ml Wasser in einem Schuß zu.

Unter fortwährendem Erhitzen tropft man 189 g (142 ml) Dimethylsulfat so ein, daß das Reaktionsgemisch in schwaches Sieden gerät (1 Sde.). Dann erhitzt man noch 45 Min. und läßt, wie vorher beschrieben, weitere 39 g (30 ml) Dimethylsulfat zufließen. Das Ende der Reaktion zeigt sich durch saures Verhalten gegenüber Lackmus an; danach erhitzt man noch 10 Min., macht durch Zugabe von 60 ml Natriumhydroxyd-Lösung schwach alkalisch und tropft weitere 39 g Dimethylsulfat zu. Man wartet wiederum saure Reaktion des Gemisches ab, erhitzt kurz und wiederholt noch je zweimal die zuletzt genannten Prozeduren mit 39 g Dimethylsulfat und 60 ml Lauge, so daß die gesamte Menge an verwendetem Methylierungsmittel 345 g (2,7 Mole) beträgt. Nach der letzten Zugabe erhitzt man noch 20 Min. und macht dann mit 150 ml Lauge stark alkalisch.

Kühlt man das Reaktionsgemisch schnell auf ca. 25° ab, so scheidet sich der 2,3-Dimethoxybenzaldehyd ölig ab und man extrahiert dreimal mit je 300 ml Äther. Nach Abziehen des Äthers erfolgt die weitere Reinigung durch Destillation im Hochvakuum oder Umkristallisation aus Methanol. Man erhält farblose Kristalle vom Schmp. 50—51° (Sdp. 80°/0,2 mm). Ausbeute 179—189 Gramm.

3.1.2. Umsetzung des 2,3-Dimethoxybenzaldehyds mit Grignard-Verbindungen zu Carbinolen

In einem Dreihalskolben, der mit Rührer, Tropftrichter und Rückflußkühler versehen ist, bereitet man wie üblich aus 300 mMol Alkylhalogenid (z. B. 41,1 g Butylbromid) und 7,2 g Magnesiumspänen eine Grignard-Lösung, zu der man unter Eiskühlung eine ätherische Lösung von 21 g (ca. 125 mMol) 2,3-Dimethoxybenzaldehyd langsam zutropft.

Gegen Ende der Reaktion fällt ein grauer, pulveriger bis schmieriger Niederschlag aus, den man über Nacht stehen läßt und am folgenden Tage mit Eis und verdünnter Essigsäure zersetzt. Die ätherische Phase wird dreimal mit Wasser, dann einmal mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung und wiederum mit Wasser gewaschen und schließlich über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Danach wird abfiltriert, der Äther i. Vak. abgezogen und der ölige Rückstand im Hochvakuum fraktioniert destilliert, wobei die Carbinole nach zwei bis drei Tropfen farblosen Vorlaufes als geruchlose, farblose, viskose Öle übergehen (s. Tab. 1).

Ausbeuten: 19,6—21,0 g VII,
21,0—23,8 g VIII,
22,6—23,8 g III.

3.1.3. Oxydation der Carbinole zu Phenonen

85 mMol Carbinol (19 g III, oder VII, oder VIII) werden in einem Rundkolben mit einer Oxydationslösung aus 190 ml Wasser, 38 g Natriumdichromat und 17 g konz. Schwefelsäure übergossen. Das Gemisch

färbt sich braun und ein aromatischer Geruch tritt auf. Für die Ausbeuten an Phenon ist es sehr wichtig, daß dann sofort mit Wasserdampf destilliert wird. Die aufgefundenen 3,5–4 l Destillat werden mit Äther ausgeschüttelt und die ätherische Lösung über Nacht mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Am folgenden Tage wird abfiltriert und der Äther i. Vak. abgezogen. Die anschließende Fraktionierung im Hochvakuum lieferte die Phenone als schwachgelbe, ölige Flüssigkeiten von aromatischem Geruch (s. Tab. 2).

Die 2,4-Dinitrophenylhydrazone (2,4-DNPH) der Phenone (Tab. 9) werden aus alkoholischer Lösung mit schwefelsaurer 2,4-DNP-Lösung gefällt und aus absol. Äthanol, Äthanol-Benzol-Gemischen oder aus Essigester-Äthanol-Gemischen umkristallisiert.

2,4-DNPH des Ketons Nr.	Eigenschaften	Schmp. in °C	N	
			Ber.	Gef.
IX	rotorange gefärbte Nadeln aus absol. Äthanol	225–226	13,93	13,96
X	rote Nadeln aus absol. Äthanol	224,5–225,5	13,93	13,97
IV	orange gefärbte Nadeln aus absol. Äthanol	138–139	13,93	13,95

Tab. 9. 2,4-DNPH der 2,3-Dimethoxy-phenone.

Die Methoxylbestimmung der Phenone zeigt, daß sie zwei Methoxylgruppen pro Molekül enthalten.

Ausbeuten: 13,8–14,8 g IX,
14,2–15,3 g X,
14,1–15,0 g IV.

3.1.4. Partielle Entmethylierung der 2,3-Dimethoxy-phenone

Ca. 45 mMol (10 g IV, oder IX, oder X) Dimethoxy-phenon werden in 20–40 ml absol. Toluol gelöst und unter kräftigem Rühren mit einem Magnetrührer mit kleinen Anteilen von insgesamt 10 g wasserfreien Aluminiumchlorids versetzt. Unter beträchtlicher Erwärmung entsteht ein zähflüssiges, rotbraunes Gemisch, das man noch 5 Min. auf dem Ölbad zum Sieden erhitzt. Anschließend wird eine Wasserdampfdestillation vorgenommen, wobei die Farbe des Reaktionsgemisches augenblicklich von Rotbraun nach Tiefgrün umschlägt und das gebildete 2-Hydroxy-3-methoxy-phenon in tiefgelben, öligen Tropfen mit Wasserdampf übergetrieben wird. Die Destillation dauert 8–10 Stdn. und ergibt 3,5–4 l Destillat.

Nach dem Ausäthern wird die ätherische Lösung mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, der Äther abgezogen und der ölige Rückstand im Hochvakuum fraktioniert.

Bei dieser Reaktion sei besonders darauf hingewiesen, daß sich die relativen Ausbeuten erheblich senken,

wenn man pro Ansatz größere Mengen als die oben aufgeführten verwendet. In Extremfällen isoliert man dann nämlich nur einige Tropfen des monoentmethylierten Produktes, und das Hauptreaktionsprodukt ist eine farblose, feste, diäthoxymethylierte Substanz. Ganz allgemein empfiehlt es sich, bei allen Stufen der pro Ansatz aufgeführten Mengen nicht zu überschreiten, um die von uns gefundenen Ausbeuten zu erzielen.

Die 2-Oxy-3-methoxy-phenone gehen praktisch ohne Vorlauf als tiefgelbe, ölige Flüssigkeiten über (Daten s. Tab. 3).

Ausbeuten: 4,5–5,6 g XI,
4,7–6,3 g XII,
6,0–7,0 g V.

Die Methoxylbestimmung der 2-Oxy-3-methoxy-phenone ergibt, daß sie jeweils pro Molekül eine Methoxygruppe enthalten.

3.1.5. Clemmensen-Reduktion der 2-Oxy-3-methoxy-phenone

In einem Dreihalskolben werden unter kräftigem Rühren rund 32 mMol Phenon mit 75 ml Salzsäure (1:1) und 35 g Zinkamalga 7–8 Stdn. reduziert, wobei zur Lösungsvermittlung 20–30 ml Äthanol zugesetzt werden können. Die Außentemperatur wird mit Hilfe eines Kontaktthermometers auf 120–125° gehalten. Am Ende der Reaktion filtriert man in der Kälte vom Zink ab, schüttelt mit Äther aus. Der Rückstand der mit Wasser gewaschenen und auf wasserfreiem Natriumsulfat getrockneten Ätherlösung, wird im Hochvakuum destilliert. Nach 2–3 Tropfen farblosen Vorlaufes gehen die 1-Alkyl-2-oxy-3-methoxybenzole (= 1-Alkyl-guajakole) als farblose, leicht bewegliche Flüssigkeiten über. Sie sind frei von Carbonylverbindungen, was man mit einer 2,4-DNP-Lösung nachweisen kann (Daten s. Tab. 4).

Ausbeuten: 3,6–4,0 g XIV,
4,3–4,8 g XV,
4,7–5,4 g VI.

3.1.6. Oxydation der 2-Oxy-3-methoxy-1-alkylbenzole

Sie wird genau so vorgenommen wie unter 1.3 beschrieben. Unter den dort geschilderten Bedingungen werden 5 mMol des Alkylguajakols oxydiert.

Die besten Ausbeuten werden erzielt, wenn man im gepufferten Medium bei $p_H=9$ arbeitet. Dazu emulgiert man rund 5 mMol des Alkylguajakols in einer Mischung, die aus 20–30 ml Wasser, 10 ml Boratpuffer ($p_H=9$) und 7 ml Äthanol besteht. Zu dieser Emulsion tropft man dann zügig die Oxydationslösung aus 15 mMol Kaliumnitrosodisulfonat in 200 ml Wasser und 50 ml Boratpuffer ($p_H=9$) zu.

Während der Oxydation wird, wie auch vorher bei der Emulgierung, mit Hilfe eines Magnetrührers stark gerührt; nach der vollständigen Zugabe des Oxydationsmittels wird noch 2–4 Stdn. weitergerührt. Auf diese Weise können bei den Chinonen mit Äthyl-, Pro-

pyl- und Butyl-Seitenkette bereits an dieser Stelle durch Ausrühren die kristallinen(!), nur wenig verunreinigten Substanzen isoliert werden.

3.1.7. Reinigung der Chinone

Die Rückstände der Oxydation werden in Chloroform p. a. aufgenommen und an einer Kieselgelsäule (Kieselgel zur Chromatographie 0,05–0,2 mm; Merck) mit Chloroform p. a. als Elutionsmittel chromatographiert. Die gelbe Zone rührt vom Chinon her und wird nach dem Eluieren noch einige Male an der Säule gereinigt. Der Verdunstungsrückstand des gelben Eluates ist tiefgelb und kristallin und stellt das gewünschte Chinon dar.

Erhält man einen schmierigen Rückstand, so kann dieser durch Anreiben mit Äther, Petroläther oder Aceton zur Kristallisation gebracht werden. Zur weiteren Reinigung werden die Chinone im Hochvakuum bei 40–45° sublimiert und ergeben goldgelbe Nadeln (Daten, s. Tab. 5).

Ausbeuten: 210–420 mg I,
100–210 mg XVI,
100–160 mg XVII.

3.2. Synthese der 2-Methoxy-5-alkyl-p-benzochinone-1.4

3.2.1. Darstellung der Acylresorcine

1 Mol Carbonsäure (102 g Valeriansäure) und 45 g wasserfreies Zinkchlorid werden in einem Dreihalskolben, der mit Rührer und Rückflußkühler versehen ist, unter kräftigem Rühren solange auf 130–140° Außentemperatur erhitzt, bis eine klare Lösung entstanden ist. Man hält die Temperatur konstant (Kontaktthermometer) und versetzt mit 38 g (ca. $\frac{1}{3}$ Mol) reinem, sublimierten Resorcin, das man in kleinen Portionen im Verlauf von 30–40 Min. zugibt. Unter weiterem kräftigem Rühren erhitzt man noch 2 Stdn. auf 130–140° Außentemperatur. In der Kälte gibt man zum Reaktionsgemisch Wasser, rührt einige Min. durch und trennt in einem Scheidetrichter das rote bis rotbraune, ölige Produkt von der schwach gelb gefärbten wäßrigen Schicht ab. Man wäscht das Reaktionsprodukt noch zwei- bis dreimal mit Wasser und kann anschließend im Hochvakuum fraktionieren.

Die Acylresorcine sind zähe, gelbe Öle, die bald beim Destillieren im verwendeten Säbelkolben zu farblosen Kristallen erstarren. Aus Gemischen von Benzol/Ligroin oder Petroläther/Ligroin erhält man farblose Nadeln (Daten s. Tab. 6).

3.2.2. Darstellung der Alkylresorcine (Clemmensen-Reduktion)

Aus 100 g feinen Zinkblechstreifen und einer 5-proz. Sublimatlösung stellt man wie üblich Zinkamalgam her. In einem Dreihalskolben mit Rührer und Rückflußkühler gibt man etwa $\frac{1}{6}$ Mol des entsprechenden Ketons, 300 ml Salzsäure (1:1) und das hergestellte

Zinkamalgam. Ein Kontaktthermometer sorgt dafür, daß die Temperatur während der 6–8 Stdn. dauernden Reduktion konstant auf 110–115° gehalten wird; dabei rührt man so kräftig wie möglich. Ist die Reaktion beendet, was man leicht an der gelbgrünen Eisenchloridreaktion in verdünnt alkoholischer Lösung beobachten kann, läßt man abkühlen, filtriert vom Zink ab und äthert aus. Die ätherische Phase wird einige Male mit Wasser gewaschen, der Äther abgezogen und der braune, ölige Rückstand im Hochvakuum destilliert. Die Alkylresorcine gehen als farblose, zähe Öle über, die bald zu einer farblosen, kristallinen Masse erstarren. Durch Umkristallisieren aus Petroläther erhält man farblose Nadeln bzw. Blättchen (Daten, s. Tab. 7).

Ausbeuten: 25,5–27,3 g XX,
22,5–24,6 g XXIX,
25,5–27,3 g XXX.

3.2.3. Oxydation der Alkylresorcine und Methylierung der Oxydationsprodukte

In einem Schütteltrichter von 1 l Fassungsvermögen werden ca. 5 mMol des entsprechenden Alkylresorcins und 50 ml Phosphatpuffer ($p_H=8$) solange geschüttelt, bis eine feine Emulsion entstanden ist. Nun versetzt man mit dem ersten Drittel der tiefviolettten Oxydationslösung aus 4–5 g (ca. 15–20 mMol) Kaliumnitroso-disulfonat und 350–400 ml Phosphatpuffer ($p_H=8$). Bereits nach einigen Sek. färbt sich der Inhalt des Schüttelrichters rot und wird nach wenigen Min. intensiven Schüttelns blutrot.

Die tiefe Färbung entsteht infolge Chinhydronbildung aus Hydroxychinon und unverbrauchtem Alkylresorcin und durch Bildung anderer Nebenprodukte. Die blutrote Farbe des Reaktionsgemisches vertieft sich, wenn man das zweite und das letzte Drittel des Oxydationsmittels zugegeben und nach jeder Zugabe einige Min. kräftig geschüttelt hat. Macht man die Mischung nun mit verdünnter Schwefelsäure deutlich sauer (gegen Universal-Indikator), so schlägt die blutrote Farbe augenblicklich nach Schmutziggelb um. Beim Ausäthern erhält man eine tiefgelbe bis orangegelbe Ätherlösung, während die wäßrige Phase durch das Oxydationsmittel violett gefärbt erscheint. Wenn man drei- bis viermal mit jeweils ca. 150 ml Äther ausgeschüttelt hat, ist die wäßrige Phase fast farblos geworden, bedingt durch die rasche Zersetzung des Kaliumnitroso-disulfonats im sauren Medium.

Die vereinigten Ätherextrakte werden über Nacht mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Am folgenden Tage wird abfiltriert und der Äther schonend bei einer Badtemperatur von 35–45° i. Vak. und unter Stickstoff bis auf ca. 70–100 ml abgezogen. Zieht man den Äther bis zur Trockene ab, so bleibt eine braune, faserig-kristalline, bisweilen auch schmierige Masse zurück, die das unreine Hydrochinon darstellt. Die ätherische Lösung des Hydroxychinons wird anschließend unter Eiskühlung und Schütteln mit einer Lösung von 0,8–1,2 g (20–30 mMol) Diazomethan in Äther methyliert, die man in kleinen Anteilen zugibt. Das Reaktionsgemisch läßt man nun 12–15 Stdn. stehen.

Zu beachten ist, daß man den Überschuß an Diazomethan nicht größer wählt als angegeben, da sonst die dunkelbraunen, öligen Additionsprodukte von Diazomethan an Chinone, die stets auftreten, zum Hauptumsetzungsprodukt werden. Wichtig ist außerdem, daß man eine durch Destillation hergestellte Diazomethanlösung verwendet, da die übliche, durch Dekantieren des Äthers von der alkalischen Entwicklungslösung dargestellte Lösung stets noch so viel Alkali enthält, daß vorhandenes Chinon zersetzt wird.

Nach 12–15 Std. zieht man den Äther von der nun Methoxychinon enthaltenden Lösung ab; es verbleibt ein dunkelbrauner, fester, manchmal auch schmieriger Rückstand, das noch stark verunreinigte Methoxychinon.

3.2.4. Reinigung der Chinone

Der obige Rückstand wird in Chloroform p. a. aufgenommen und an einer Kieselgelsäule (Kieselgel zur Chromatographie 0,05–0,24mm; Merck) mit Chloro-

form p. a. als Elutionsmittel gereinigt. Mit dem Eluat der gelben Zone, das das gesuchte Chinon darstellt, wird die chromatographische Reinigung einige Male wiederholt, dann läßt man das Chloroform über Nacht abdunsten und erhält das Methoxychinon als gelbe, amorphe Masse; aus Petroläther umkristallisiert, im Hochvakuum bei 40° sublimiert und erneut aus Petroläther umkristallisiert, liefert sie zartgelbe Nadeln.

Die Eluate der übrigen Zone geben nach dem Verdunsten des Chlorforms schmierige, braune Rückstände, die auf die Farbtaste für Chinone negativ reagieren (Chinhydrone; Additionsprodukte von Diazomethan an Oxichinone) s. Tab. 8).

Ausbeuten: 260–420 mg XVIII,
200–260 mg XXII,
180–240 mg XXXIII.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie sind wir für die gewährten finanziellen Unterstützungen dieser Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Effects of Substrate on Heat Inactivation of Taka-amylase A

GIITI TOMITA and SAM SOON KIM

Institute of Biophysics, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka (Japan)

(Z. Naturforschg. 22 b, 294–300 [1967]; eingegangen am 4. Juli 1966)

Taka-amylase A is highly protected from heat inactivation and denaturation by the presence of its substrate, starch. The effect of pH on the protective action was studied to find the relation between the protective action and the state of ionization of taka-amylase A. The separation of protective effect of substrate from that of hydrolysis products was made by digesting starch with taka-amylase A before incubation to find the difference of protective abilities of substrate and hydrolysis products. The stabilization of the higher order structure of enzyme protein, depending on the state of ionization of enzyme protein, brought about by the formation of enzyme-substrate and -product complexes seems to be responsible for the appearance of the protective effect observed.

Some enzymes, for example, D-amino-acid oxidase¹, glutamic dehydrogenase², alcoholic dehydrogenase³, lactic dehydrogenase³, bacterial α -amylase⁴ and taka-amylase A^{5–7}, are considerably protected from the inactivation and denaturation by the presence of coenzymes or substrates or related compounds.

Such a phenomenon is of interest not only from the standpoint of the mechanism of inactivation or denaturation, but also from that of the enzymatic reaction mechanism, since a structural change of

enzyme protein induced by the presence of coenzymes or substrates or related compounds is thought to be closely related to the appearance of enzymatic activity.

The protective effect of starch on the inactivation and denaturation of taka- and bacterial α -amylase by heat, acid and urea has been studied by OKUNUKI and others^{4, 5}.

They concluded that the protective effect must be derived from the hydrolysis products of starch, for the reason that starch was completely hydrolysed

¹ K. BURTON, Biochem. J. 48, 458 [1951].

² H. KUBO, Sympos. Enzyme Chemistry (in Japanese) 5, 1 [1950].

³ K. OKUNUKI, B. HAGIHARA, I. SEKUZU, M. NOZAKI, J. YAMASHITA, and T. YONETANI, Sympos. Enzyme Chemistry (in Japanese) 11, 99 [1956].

⁴ B. HAGIHARA, T. NAKAYAMA, H. MATSUBARA, and T. OKUNUKI, J. Biochemistry [Tokyo] 43, 483 [1956].

⁵ B. HAGIHARA, T. NAKAYAMA, H. MATSUBARA, and K. OKUNUKI, Biochemistry [Tokyo] 43, 483 [1956].

⁶ G. TOMITA and S. S. KIM, Nature [London] 205, 46 [1965].

⁷ G. TOMITA and S. S. KIM, Experientia [Basel] 22, 366 [1966].