

Reaktionen von naszierenden Chinonen mit β -Alaninmethylester in Essigsäure und in wäßriger Lösung

Reactions of Nascent Quinones with Methyl β -Alanate in Glacial Acetic Acid and in Aqueous Solution

Martin G. Peter

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

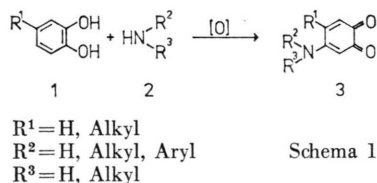
Z. Naturforsch. **33 c**, 912–918 (1978); eingegangen am 5. Juli, 1978

Nascent Quinones, Amine Addition

In order to generate a model for the reaction of proteins with nascent quinones, catechol and 4-methylcatechol were oxidized with silver-I-oxide in glacial acetic acid or with mushroom tyrosinase (EC 1.10.3.1) in phosphate buffer, respectively. The structures identified indicate that not only the amine reacts with the quinone by the well known addition-oxidation-mechanism, but also that solvent molecules may participate in product formation. The main product of the oxidation of catechol in glacial acid is N-(2-carbomethoxyethyl)-phenoxaz-2,3-dione.

Einleitung

Die Umsetzung von 1,2-Diphenolen (**1**) mit primären und sekundären Aminen (**2**) in Gegenwart eines Oxydationsmittels führt zu Chinonen vom Typ **3** (Schema 1) [1, 2]. Mit aliphatischen Aminen lassen sich gute Ausbeuten (>30%) nur in wasserfreiem Reaktionsmedium erzielen, während in Gegenwart von Wasser bisher nur Produkte aus der Umsetzung mit Anilin erhalten werden konnten [3].



Verschiedentlich wurde postuliert, daß die in Schema 1 dargestellte Reaktionsfolge auch in biologischen Systemen, in denen die Anwesenheit von Wasser nicht ausgeschlossen werden kann, mit aliphatischen Aminen abläuft, z.B. bei der Melaninbildung [4], der Biogenese von einigen Farbstoffen [5], der Braunfärbung von pflanzlichen Präparaten an der Luft [6] und bei der Sklerotisierung von Insektencuticula, wobei im letzteren Falle R¹ in **1** CH₂CH₂NHCOCH₃ ist [7]. Hierbei sollen die in Aminosäureresten von Proteinen enthaltenen

nucleophilen Gruppen (z.B. des Lysins oder auch des Cysteins) gemäß Schema 1 mit dem naszierenden *o*-Chinon unter Ausbildung kovalenter Bindungen reagieren. Eine Kondensation mit einer weiteren Aminogruppe führt dann unter Ausbildung Schiff'scher Basen zur Polymerisierung der Proteine. Diese Vorstellung leitet sich im wesentlichen aus der beobachteten Reaktionsweise von naszierenden Chinonen mit Aminen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln ab.

Zur Prüfung der Frage, ob die festgestellte Reaktivität naszierender *o*-Chinone gegenüber primären aliphatischen Aminen auch unter physiologischen Bedingungen zu beobachten ist, war es von Interesse, entsprechende Reaktionen vergleichend in wäßrigen und in nichtwäßrigen Lösungsmitteln durchzuführen und die Strukturen der entstandenen Produkte zu ermitteln. Als Aminkomponente wurde β -Alaninmethylester (Hydrochlorid) mit Brenzcatechin (**1**, R¹=H) und mit 4-Methylbrenzcatechin (**1**, R¹=CH₃) in Gegenwart von Oxydationsmittel einerseits in Essigsäure mit nachfolgender wäßriger Aufarbeitung, andererseits in Phosphatpuffer umgesetzt. Die Wahl von β -Alaninmethylester gründet sich auf die Anwesenheit einer freien Aminofunktion und einer Estergruppierung, womit die Analogie zu peptidgebundenem Lysin in einfachster Weise gegeben ist.

Ergebnisse und Diskussion

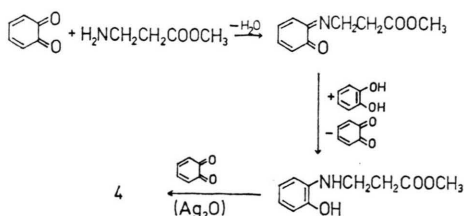
Generell entstehen sowohl bei der Oxydation mit Silber-I-oxid in Essigsäure als auch mit Tyrosinase (EC 1.10.3.1) stets mehrere Produkte. Die Struk-

Sonderdruckanforderungen an Dr. M. G. Peter, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, Gerhard-Domagk-Straße 1, D-5300 Bonn.

turaufklärung konzentrierte sich auf diejenigen Verbindungen, welche intensiv gefärbt waren und durch kombinierte Anwendung chromatographischer Methoden isoliert werden konnten. Die nicht optimierten Ausbeuten an spektroskopisch untersuchten Substanzen liegen größenordnungsmäßig zwischen 0,1 und 5%.

Oxydiert man Brenzcatechin mit Silber-I-oxid in Essigsäure in Gegenwart von β -Alaninmethylester (Hydrochlorid), so entsteht als Hauptprodukt in 2,6-prozentiger Ausbeute das N-(2-Carbomethoxyethyl)-phenoxaz-2.3-dion (**4**), dessen Struktur aus dem NMR-Spektrum abzuleiten ist. Vier aromatische Protonen erscheinen als schmales Multiplett bei $\delta = 7,36$ ppm, daneben sind die beiden Singulets der Protonen an C(1) und C(4) bei 6,31 und 6,02 ppm zu beobachten. Die übrigen Signale, ein A_2B_2 -Multiplett mit Zentren bei 4,42 und 2,91 ppm (Auflösung nach 1. Ordnung) und ein Singulett bei 3,74 ppm, werden der Carbomethoxyethylgruppe zugeordnet. Das zum Vergleich auf dem für die Herstellung N-alkylierter Phenoxazone üblichen Wege aus 2-Ethylaminophenol synthetisierte Phenoxaz-2.3-dion **5** [8] zeigt ein völlig analoges NMR-Spektrum. Im hochaufgelösten Massenspektrum von **4** beobachtet man einen $M^+ + 2$ Peak ($C_{16}H_{15}NO_5$) mit einer Intensität von 39% relativ zum Basispeak bei m/e 185 ($C_{11}H_7NO_2$), während das Molekülion bei m/e 299 ($C_{16}H_{13}NO_5$) mit einer relativen Intensität von 4% auftritt. Bei der Kondensation von **4** mit 1,2-Diaminobenzol in Essigsäure erhält man

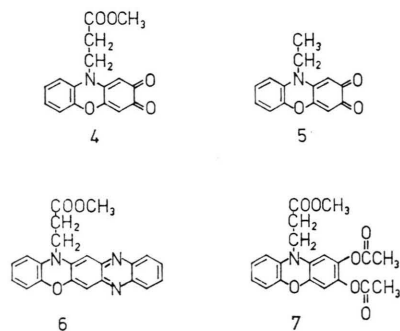
statt [1, 9], die allerdings nicht N-alkyliert sind. Ein synthetischer Zugang zu N-alkylierten Phenoxazonen aus naszierendem Chinon und primären Amin wurde bisher nicht beschrieben.



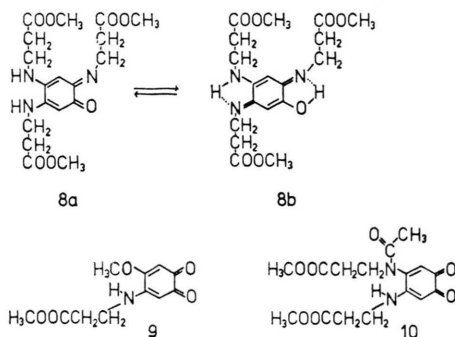
Schema 2

Als Nebenprodukte (Ausbeute: 0,1–0,25%) der Oxydation von Brenzcatechin mit Silberoxid in Essigsäure konnten die Verbindungen **8**, **9** und **10** identifiziert werden, wobei **8** und **9** als Gemisch vorliegen. Aus dem NMR-Spektrum folgt ein Molverhältnis von **8**:**9** = 15:85, wobei keine Entscheidung darüber getroffen werden kann, ob **8** in Form des Tautomeren **8a** oder **8b** vorliegt. Die stabilere Form dürfte jedoch **8b** darstellen. Die Anwesenheit von **8** zeigt sich im Massenspektrum durch das Auftreten des Molekülions bei m/e 395. Abspaltung der Carbomethoxyethylgruppe führt zu den Fragmentationen m/e 322 und 308. Das Molekülion von **9** ist bei m/e 239 zu beobachten. Verlust eines Methoxyradikals und von Kohlenmonoxid liefert m/e 208 sowie m/e 180 (100%), während die Ionen bei m/e 166 und 152 wiederum durch die Fragmentierung der Carbomethoxyethylgruppe entstehen. Die Herkunft der Methoxygruppe an C(4) von **9** ist noch unklar.

Die Struktur des Amid-Derivates **10** folgt sowohl aus dem Massenspektrum, das den Molekularionenpeak bei m/e 352 und ein durch Verlust von Keten entstandenes Fragment bei m/e 310 aufweist, als auch aus dem NMR-Spektrum, in dem das Singulett



das Phenazinderivat **6** und bei der reduktiven Acetylierung in Essigsäureanhydrid die Diacetylverbindung **7**. Die Bildung des Phenoxaz-2.3-dions **4** kann man sich gemäß Schema 2 durch eine Folge von Kondensationen und Redox-Prozessen vorstellen. Analoge Reaktionen finden bei der Biogenese von natürlich vorkommenden Phenoxazin-Derivaten



einer N-Acetylgruppe bei 1,96 ppm beobachtet wird. Für das Vorliegen eines Acetylderivates spricht auch die Stabilität der Verbindung **10** in gesättigter wäss. Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Erst nach einigen Tagen ist ein polareres Produkt neben dem Ausgangsmaterial nachzuweisen (DC-Evidenz). Mit 1.2-Diaminobenzol in Essigsäure beobachtet man rasches Verschwinden von **10** und die Bildung eines weniger polaren, bei 366 nm auf der DC-Platte gelborange fluoreszierenden Produktes, was für die *o*-Chinonstruktur von **10** spricht.

Wird Brenzcatechin mit Tyrosinase in Gegenwart von β -Alaninmethylester in Phosphatpuffer oxydiert, so lassen sich mittels DC zwei rot gefärbte Produkte neben dem Ausgangsmaterial nachweisen. Die weniger polare Komponente ist identisch mit **9**, wie aus dem NMR-Spektrum folgt. Im Massenspektrum dominiert hier die Abspaltung von Kohlenmonoxid zu m/e 211 (100%) aus dem Molekülion. Da bei der Aufarbeitung Methanol verwendet wurde, ist auch in diesem Falle noch unklar, ob die Methoxygruppe an C(4) aus dem Lösungsmittel stammt oder vom β -Alaninmethylester übertragen wird.

Die Oxydation von 4-Methylbrenzcatechin mit Silber-I-oxid liefert in Gegenwart von β -Alaninmethylester (Hydrochlorid) in Essigsäure in 4,4-prozentiger Ausbeute das kristallisierte Hauptprodukt **11**, während bei der Oxydation mit Tyrosinase in Phosphatpuffer in wesentlich schlechterer Ausbeute das von etwa 10% des Kondensationsproduktes **13** begleitete Konstitutionsisomere **12** entsteht. Dünnschicht-chromatographisch (CHCl_3 /Methanol) unterscheidet sich **11** von **12** durch die geringere Polarität. **11** und **12** zeigen ähnliche spektroskopische Eigenschaften: In den UV-Spektren liegen die Absorptionsmaxima von **11** bei 472 und 271 nm (Methanol), die von **12** bei 478 und 288 nm. Die Carbonylregion der IR-Spektren weist neben der typischen C=O Streckschwingung Banden in **11** bei 1672, 1642 und 1600 cm^{-1} , in **12** bei 1692,

1622 und 1565 cm^{-1} auf (vgl. [10]). Im Massenspektrum von **11** ist das Molekülion m/e 223 intensiver (59%) als der $M^+ + 2$ Peak (19%). Abspaltung der Carbomethoxyethylgruppe liefert die Fragmente m/e 164 (45%), 150 (95%) und 136 (16%). Das Massenspektrum von **12** weist den $M^+ + 2$ Peak bei m/e 225 mit höherer Intensität (45%) als den Molekularionenpeak (9%) auf. Hier führt die Abspaltung der Carbomethoxyethylgruppe aus dem $M^+ + 2$ Peak zu den Fragmenten m/e 152 (100%) und 138 (9%). Die hohe Intensität von m/e 164 im Spektrum von **11** ist ein Indiz für das Vorliegen der *p*-Chinonstruktur, die durch Abspaltung des Carboxymethylradikals das Ion **14** liefert. Vermutlich wird das *p*-Chinon durch Anlagerung von Essigsäure an das naszierende *o*-Chinon, anschließende Bildung der Schiff'schen Base und schließlich Hydrolyse des Vinylacetates bei der Aufarbeitung gebildet.

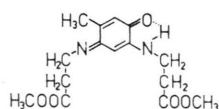
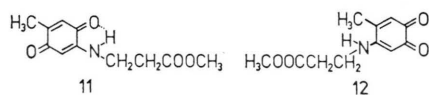


14

Die Anwesenheit von **13** zeigt sich im Massenspektrum von **12** durch den $M^+ + 2$ Peak bei m/e 310 ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$) sowie das Fragmentation m/e 237. Die NMR-Spektren von **11** und **12** sind bis auf die wenig intensiven Signale von **13** im Spektrum von **12** fast identisch. Die Mischung von **12** und **13** ließ sich weder mittels Dünnschicht-, noch Hochdruckflüssigkeitschromatographie und auch nicht an Sephadex LH-20 vollständig voneinander trennen. Möglicherweise liegen die beiden Verbindungen als Komplex vor, eine genauere Untersuchung steht noch aus.

Behandlung mit 1.2-Diaminobenzol in Essigsäure führt bei **11** zu keiner Umsetzung, während **12** rasch unter Bildung einer weniger polaren, bei 366 nm rotorange fluoreszierenden Substanz verschwindet.

Die Oxydation von 4-Methylbrenzcatechin in Gegenwart von β -Alaninmethylester mit Silber-I-oxid in Essigsäure führt bei nachfolgender wäßriger Aufarbeitung zu einem intensiv gelb gefärbten, fluoreszierenden Nebenprodukt, dessen Struktur gegenwärtig noch untersucht wird. Versuche, N-Acetyldopamin (**1**, $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3$) unter den hier beschriebenen Reaktionsbedingungen mit β -Alaninmethylester umzusetzen, führten bisher nicht zu eindeutigen charakterisierten Substanzen.



13

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Oxydation von 1.2-Diphenolen in Essigsäure in Gegenwart eines primären aliphatischen Amins und nachfolgender wäßriger Aufarbeitung zum Teil zu den erwarteten Additions-Oxydations-Verbindungen führt (Formeln **8** und **12**, vgl. [1, 2]). Daneben treten Produkte auf, die durch Anlagerung von Lösungsmittelmolekülen gebildet werden (Formeln **10** und **11**), oder die durch eine Folge von Redox-Prozessen und Kondensationen entstehen (Formel **4** und Schema 2). Auch in wäßriger Lösung entstehen als Hauptprodukte die Additions-Oxydations-Verbindungen, wobei die Ausbeuten geringer als bei den entsprechenden Reaktionen in Essigsäure sind. Weitere Untersuchungen sollen klären, ob diese Beobachtungen bei der Reaktion von Peptiden mit naszierenden *o*-Chinonen von Bedeutung sind.

Beschreibung der Versuche

Schmelzpunktbestimmungen mit einem Büchi SMP-20. — Abdampfoperationen am Rotationsverdampfer unter Wasserstrahlvakuum, Badtemperatur $30 \pm 5^\circ$. — *Chromatographie*: Offene Säulen (SC) mit Kieselgel (Macherey-Nagel, 0,1–0,065 mm) oder Sephadex LH-20 (Pharmacia). Dünnschichtchromatogramme (DC) an Kieselgel auf Aluminiumfolien (DC-60, Merck) präparative (PDC) an mit 0,1 cm Kieselgel PF₂₅₄ (Merck) beschichteten 20×20 cm Glasplatten; Laufmittel: DC-A: Chloroform mit Methanolzusatz nach Angabe, DC-B: Butanol/Essigsäure/Wasser = 40:12:30, DC-C: Benzol/Essigsäure/Wasser = 125:73:3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an Waters-Geräten: Pumpe Modell 6000 A, UV-Detektor Modell 440 bei 254 nm. Differentialrefraktometer Modell 600, Fertigsäulen ($0,4 \times 31$ cm) nach Angabe, Flußgeschwindigkeit: 1,5 ml/min; Angaben der Elutionsvolumina beziehen sich auf die Peakzentren. — *Spektroskopie*: Elektronenspektren: Beckman Modell 25; Lösungsmittel: Methanol. Angegeben sind die ϵ -Werte bei λ_{\max} ; sofern die Extinktionskoeffizienten nicht bestimmt wurden, sind die Verhältnisse der Absorptionsintensitäten als ϵ_{rel} angegeben. — IR: Pye Unicam SP 1100; Lösungsmittel: Chloroform. — $^1\text{H-NMR}$: Bruker WH-90 oder Varian T-60; chemische Verschiebungen (δ) relativ zu TMS als internem Standard = 0 ppm. — Massenspektren: AEI-MS 30 oder AEI-MS 9; hochaufgelöste (HR-MS): AEI-MS 50,

Direkteinlaß, 70 eV. Ionenquellentemperatur 180° oder 220°C . — *Reaktionsbedingungen*: Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Umsetzungen bei $22 \pm 3^\circ$ ausgeführt. Angaben der Ausbeuten beziehen sich auf eingesetztes 1.2-Diphenol. Brenzcatechin und 4-Methylbrenzcatechin wurden durch Sublimation im Kugelrohr bei 0,1 Torr gereinigt.

1. Oxydation von Brenzcatechin mit Silber-I-oxid

Man verrührte 13,13 g (56,7 mFG) Silber-I-oxid in 250 ml Essigsäure bis zum Auftreten eines weißen Niederschlages und versetzte mit 2,20 g (20 mmol) Brenzcatechin sowie 3,44 g (24,7 mmol) β -Alaninmethylester-Hydrochlorid. Nach 30 min gab man nochmals 3,47 g (15,0 mFG) Silber-I-oxid zu und rührte weitere 60 min. Danach wurde zentrifugiert, der Überstand eingengt und der Rückstand in 250 ml Wasser aufgenommen. Die nach viermaligem Extrahieren mit je 250 ml Dichloromethan anfallende wäßrige Phase enthielt geringe Mengen eines stark polaren (DC-B: $R_f \sim 0,1$) rotviolettten, nicht weiter untersuchten Produktes. SC des Eindampfrückstandes des Dichloromethanextraktes (1,23 g) an Kieselgel mit Dichloromethan/5% Methanol ergab Fraktion I (31 mg), II (485 mg) und III (241 mg). Aus Fraktion II ließen sich durch kombinierte Anwendung von PDC und HPLC die folgenden Produkte isolieren:

4, rot bis schwarz gefärbte Kristalle, Schmp. $156 - 158^\circ\text{C}$ (Acetonitril/Wasser), 77 mg (2,6%). DC-A (15%): $R_f \sim 0,9$; DC-A (2%): $R_f \sim 0,4$; DC-B: $R_f \sim 0,6$. HPLC ($\mu\text{-C}_{18}$ -Bondapak, 1 N Essigsäure/Methanol = 1:1): 40 ml; UV-Spektrum: 484 (br. S, $\epsilon = 5400$), 397 (8800), 341 (11800), 266 (S, 11300); IR: 1745, 1632, 1566, 1418 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CD_2Cl_2): 7,36 (schm. m, 4 H), 6,31 (s, 1 H), 6,02 (s, 1 H), 4,43 (t-artig, 2 H), 3,74 (s, 3 H), 2,91 (t-artig, 2 H), Entkopplungen: Einstrahlen bei 2,91 \rightarrow 4,43 (s), bei 4,43 \rightarrow 2,91 (s); HR-MS: $\text{M}^+ + 2\text{ m/e}$ 301,0948 (39%, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ 301,0968), 300 (11), M^+ 299,0803 (4, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ 299,0813), 271 (25), 242 (7), 229 (7), 228 (42), 215 (8), 214 (78), 213 (54), 212 (10), 186 (10), 185 (100, $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{NO}_2$), 170 (7), 115 (6), 97 (8), 91 (13), 87 (7), 85 (10), 83 (8), 81 (8), 77 (8), 73 (13), 71 (15), 69 (18), 65 (8), 59 (5), 58 (7), 57 (25), 56 (7), 55 (59), 51 (11), 50 (10), 45 (13), 43 (24).

8 und **9**, rotorange, liegen als Gemisch im Molverhältnis approx. 14:86 vor, zusammen 5,2 mg

(0,1%). DC-A (2%): $R_f \sim 0,3$, DC-B: $R_f \sim 0,8$. HPLC (μ -C₁₈-Bondapak, Wasser/15% Methanol): 62 ml. Bei der HPLC an μ -Porasil (Dichloromethan/5% Essigsäureethylester/0,3% 2-Propanol) eluiert eine rotorange gefärbte Komponente bei 15 ml, eine farblose bei 28,5 ml, die beim Tüpfeln auf Kieselgel sofort eine rote Farbe annimmt und einen mit der rotorange gefärbten Komponente identischen R_f -Wert zeigt. UV-Spektrum des Gemisches: 471, 399(S), 298($\epsilon_{\text{rel}} = 1:1,58:8,32$). IR: 3405, 1740, 1662, 1597 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): 6,23(br. s, 1 H), 5,78(s, 1 H), 5,44(s, 1 H), 5,33 und 5,31(zwei s, 0,32 H), 3,84(s, 3,16 H), 3,72(s, 4,58 H), 3,58(q-artig, 3,0 H), 2,64(t-artig, 2,95 H), Signallagen von **8**: 5,33, 5,31, 3,72, 3,58, 2,64 (Integralverhältnis: 1:1:9:6:6), Signallagen von **9** (vgl. Experiment 5): 5,78, 5,44, 3,84, 3,72, 3,58, 2,64 (Integralverhältnis: 1:1:3:3:2:2); MS: M^+ von **8** m/e 395 (1,2%), 364(3), 322(19), 308(14), $\text{M}^+ + 2$ von **9** 241(10), 240(12), M^+ von **9** 239,0794(49, ber. für C₁₁H₁₃NO₅ 239,0793) 226(2), 211(2), 208(11), 180(100, C₉H₁₀NO₂), 168(5), 166(44), 164(28), 152(16), 150(47), 138(18), 137(15), 136(20), 124(10), 122(13), 110(12), 109(18), 95(12), 94(15), 88(30), 69(38), 68(30), 59(32), 55(58), 53(18). **10**, rotviolett, 16,8 mg (0,24%). DC-A (2%): $R_f \sim 0,2$, DC-B: $R_f \sim 0,7$; HPLC (μ -C₁₈-Bondapak, 0,6 N Essigsäure/Methanol = 68:32): 15 ml; UV-Spektrum: 486($\epsilon = 2050$), 323(4370), 264(S); IR: 3410, 1738, 1665, 1599 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): 7,75(br. s, 1 H), 6,54(s, 1 H), 6,11(br. s, 1 H), 5,56(s, 1 H), 3,89 und 3,75(t, $J = 7$ Hz, und s, zus. 5 H), 3,64(s, 3 H), 3,49(q, $J = 7$ Hz, 2 H), 2,68(t, $J = 7$ Hz, 4 H), 1,96(s, 3 H); MS: $\text{M}^+ + 2$ m/e 354(9%), M^+ 352(24), 324(10), 312(13), 311(20), 310(100), 309(19), 279(20), 251(43), 237(60), 225(10), 191(18), 177(38), 163(40), 149(15), 87(22), 68(19), 59(28), 55(30), 43(50).

2. Umsetzung von **4** mit 1,2-Diaminobenzol

Man rührte 21 mg (0,07 mmol) des Phenoxaz-2,3-dions **4** und 100 mg (0,93 mmol) 1,2-Diaminobenzol in 10 ml Essigsäure, dampfte nach 1 h ein und chromatographierte den Rückstand zunächst an Kieselgel (SC, Dichloromethan/3% Methanol), dann mittels PDC (DC-A (4%)). Das orangefarbene Produkt **6** (15,4 mg, 59%) zeigte nach dem Um-

kristallisieren aus Aceton einen Schmp. 222 – 223 °C. UV-Spektrum: 479($\epsilon = 16800$), 311 (8300), 262(65000); IR: 1742, 1567, 1472 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CD_2Cl_2): 8,09 – 7,86(m, 2 H), 7,75 – 7,53(m, 2 H), 7,22(s, 1 H), 7,00 und 6,92 (s und schm. m, zusammen 5 H), 4,20(t-artig, 2 H), 3,76(s, 3 H), 2,85(t-artig, 2 H); HR-MS: $\text{M}^+ + 1$ m/e 372 (29%), M^+ 371,1285(100, ber. für C₂₂H₁₇N₃O₃ 371,1270), 298(91), 285(11), 284(41), 238(6), 237(6), 236(11), 131(7), 119 (19), 118(5), 91(6), 77(6), 57(9), 55(7), 43(8), 41(8).

3. Reduktive Acetylierung von **4**

Man erhitzte 35,4 mg (0,118 mmol) des Phenoxaz-2,3-dions **4** mit 50 mg Zinkstaub und 30 mg Natriumacetat in 2 ml Essigsäureanhydrid 5 min zum Sieden, pipettierte das Reaktionsgut auf 3 g Eis und extrahierte viermal mit Dichloromethan. PDC (DC-A (1%): $R_f \sim 0,2$) ergab 5,6 mg (12%) des Diacetyl-dihydroxyphenoxazins **7**, das bei der DC und beim Liegen an der Luft langsam eine rötliche Färbung annahm. HPLC (μ -Porasil, Dichloromethan/55% Petrolether 30 – 60/0,1% 2-Propanol): 20 ml. $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CD_2Cl_2): 7,02 – 6,44 (m, enthaltend s bei 6,50, 5 H), 6,34(s, 1 H), 3,82 (br. s, überlagert von scharfem s bei 3,69, 5 H), 2,64(t-artig, 2 H), 2,22 und 2,20(je ein s, 6 H); MS: $\text{M}^+ + 2$ m/e 387 (1%), 386(7), M^+ 385(29), 343(37), 302(20), 301(100), 300(15), 228(43), 215(14), 214(81), 71(27), 69(17), 59(5), 57 (50), 55(20), 43(31).

4. Synthese von N-Ethyl-phenoxaz-2,3-dion (**5**) [8]

Nach den Angaben der Literatur [8] bereitete man aus 2-Methoxyanilin und Bromethan zunächst das Hydrobromid des N-Ethyl-2-methoxyanilins, aus dem die Base mit Natronlauge freigesetzt wurde. Sdp. 118 – 119 °C/12 Torr. $^1\text{H-NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): 7,1 – 6,4(m, 4 H), 3,95 und 3,75 (br. s und s, 4 H), 3,10(q, $J = 7$ Hz, 2 H), 1,20(t, $J = 7$ Hz, 3 H). Die Abspaltung der Methoxygruppe erfolgte durch Eintropfen von 66 g (0,26 mol) Bortribromid in 50 ml Dichloromethan zu einer kräftig gerührten und auf –10 °C gekühlten Lösung von 20 g (0,13 mol) N-Ethyl-2-methoxyanilin in 200 ml Dichloromethan. Nach dem Stehenlassen über Nacht zersetzte man durch Zutropfen von 200 ml 10-prozentiger wäßriger Kaliumhy-

dioxid-Lösung und saugte den Niederschlag ab. Eine Probe zeigte nach Sublimation bei 230 °C/0,5 Torr folgendes $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, DMSO-d_6): 9,1 (br. s, 0,8 H), 6,77–6,23 (m, 4 H), 4,34 (br. s, 0,7 H), 3,03 (q, $J = 7$ Hz, 2 H), 1,17 (t, $J = 7$ Hz, 3 H). Zu dem restlichen, rohen N-Ethyl-2-aminophenol in 300 ml 10-prozentiger Schwefelsäure tropfte man während 4 h 100 ml einer Lösung von 10 g Kaliumdichromat in 10-prozentiger Schwefelsäure und extrahierte während dieser Zeit kontinuierlich mit Chloroform. Der Eindampfdruckstand des Extraktes wurde aus Chloroform umkristallisiert und ergab 1,23 g N-Ethyl-phenoxaz-2,3-dion (5) vom Schmp. 220 °C (Zers.) (Lit. 226 °C). DC-A (5%): $R_f \sim 0,3$, DC-B: $R_f \sim 0,55$. UV-Spektrum: 483 (S, $\epsilon = 5340$), 418 (6680), 266 (8240), 235 (13400); IR: 1630, 1557, 1416 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CD_2Cl_2): 7,31 (s, 4 H), 6,28 (s, 1 H), 6,01 (s, 1 H), 4,14 (q, $J = 7$ Hz, 2 H), 1,47 (t, $J = 7$ Hz, 3 H); MS: $\text{M}^+ + 2$ m/e 243 (14%), 242 (6), M^+ 241 (4), 214 (39), 213 (60), 211 (9), 185 (100), 157 (13), 156 (19), 128 (5), 77 (6), 50 (6).

$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (241,3)

Ber. C 69,70 H 4,60 N 5,81

Gef. C 69,66 H 4,57 N 5,68

5. Oxydation von Brenzcatechin mit Tyrosinase

Zu 110 mg (1 mmol) Brenzcatechin und 840 mg (6 mmol) β -Alaninmethylester-Hydrochlorid in 30 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,8 gab man 2,02 mg (1660 Einheiten [11]) Tyrosinase (Aldrich) in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8. DC-C zeigte die Bildung von zwei rot gefärbten Produkten, $R_f \sim 0,3$ und $\sim 0,7$, von denen das polarere im Verlaufe der Reaktion zunahm. Nach 70 min versetzte man mit 10 ml Methanol und 1 ml Essigsäure, dampfte ein und chromatographierte den Rückstand an $2,2 \times 115$ cm Sephadex LH-20 mit Wasser/Methanol/Essigsäure = 50:50:2,4. Man erhielt die Fraktionen I (354–416 ml, DC-B: $R_f \sim 0,3$, DC-C: $R_f \sim 0,15$), II (564–637 ml, DC-B: $R_f \sim 0,8$, DC-C: $R_f \sim 0,3$) und III (763–840 ml, DC-B: $R_f \sim 0,7$, DC-C: $R_f \sim 0,3$). Fraktion II (6,1 mg) lieferte bei der HPLC ($\mu\text{-C}_{18}$ -Bondapak, 0,3 N Essigsäure/Methanol = 67:33) 0,9 mg einer bei 33 ml eluierenden, rot gefärbten Substanz. UV-Spektrum: 467 ($\epsilon = 690$), 305 (5100), 286 (4700). IR: 3460, 1745, 1585 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$

(90 MHz, CDCl_3): 6,87 (br. s, 2 H), 5,74 (s, 1 H), 5,48 (s, 1 H), 3,90 (s, 3 H), 3,76 (s, 3 H), 3,55 (q-artig, 2 H), 2,69 (t, $J = 7$ Hz, 2 H); HR-MS: $\text{M}^+ + 2$ m/e 241,0945 (37%, ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ 241,0950), 240 (18), M^+ 239,0790 (65%, ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ 239,0793), 226 (14), 212 (19), 211 (100), $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4$, 208 (12), 180 (30), 168 (28), 166 (53), 164 (23), 152 (23), 138 (33), 137 (19), 136 (11), 125 (22), 124 (17), 122 (9), 110 (19), 109 (11), 106 (15), 95 (10), 94 (13), 69 (7), 68 (27), 59 (31), 55 (58), 53 (5).

6. Oxydation von 4-Methylbrenzcatechin mit Silber-I-oxid

Zu einer kräftig gerührten Lösung von 1,0 g (8,06 mmol) 4-Methylbrenzcatechin und 1,15 g (8,24 mmol) β -Alaninmethylester-Hydrochlorid in 200 ml Essigsäure gab man 9,5 g (41 mFG) Silber-I-oxid. Nach 3,3 h wurde zentrifugiert, der Überstand eingedampft und der Rückstand in 250 ml Wasser aufgenommen. Die nach Extraktion mit 4×250 ml Dichloromethan zurückbleibende wäßrige Phase enthielt eine nicht weiter untersuchte stark gelb fluoreszierende Substanz. Der Eindampfrückstand des Dichloromethanextraktes (1,39 g) enthielt eine rot gefärbte (DC-A (5%): $R_f \sim 0,8$) sowie eine gelbe, stark fluoreszierende (DC-A (5%): $R_f \sim 0,5$) Komponente. Chromatographie (SC) an Kieselgel (Dichloromethan/5% Methanol) lieferte Fraktion I (255 mg, rot gefärbt) und Fraktion II (167 mg, gelb gefärbt). Aus Fraktion I erhielt man durch PDC (DC-A (3%)) 79 mg (0,36 mmol, 4,4%) des 5-(2-Carboxymethylethylamino)-2-methyl-1,4-benzochinons (11), das nach dem Umkristallisieren aus Aceton/Hexan einen Schmp. 99–100 °C aufwies. UV-Spektrum: 472 ($\epsilon = 2730$), 271 (12130); IR: 3455, 1738, 1672, 1600 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): 6,47 (q, $J = 2,0$ Hz, 1 H), 5,87 (br. s, 1 H), 5,49 (s, 1 H), 3,72 (s, 3 H), 3,43 (q, $J = 7$ Hz, 2 H), 2,63 (t, $J = 7$ Hz, 2 H), 2,06 (d, $J = 2,0$ Hz, 3 H); MS: $\text{M}^+ + 2$ m/e 225 (19%), 224 (19), M^+ 223 (59), 164 (45), 150 (95), 136 (16), 135 (15), 122 (36), 121 (23), 87 (22), 77 (21), 68 (45), 55 (70), 53 (46), 44 (100), 43 (90), m^* : 120,61: 223 \rightarrow 164, 100,90: 223 \rightarrow 150, 99,21: 150 \rightarrow 122. $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (223,2)

Ber. C 59,19 H 5,87 N 6,28

Gef. C 59,09 H 5,75 N 5,90

7. Oxydation von 4-Methylbrenzcatechin mit Tyrosinase

Zu 2,0 g (16,13 mmol) 4-Methylbrenzcatechin und 2,5 g (17,92 mmol) β -Alaninmethylester-Hydrochlorid in 200 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,8 tropfte man unter Rühren während 2 h 18 mg (6900 Einheiten [11]) Tyrosinase in 50 ml 0,1 M Phosphat-Puffer pH 6,8. Die Lösung wurde weitere 7 h bei $33 \pm 3^\circ\text{C}$ gerührt und danach 18 h bei 22°C stehen gelassen. Nach Extraktion mit 4×200 ml Dichlormethan und Eindampfen des Extraktes erhielt man 1,44 g Rückstand, der gemäß DC-A (10%) zur Hauptmenge aus 4-Methylbrenzcatechin bestand. Nach wiederholter PDC (DC-A (10%)) erhielt man 7,0 mg eines rot gefärbten Produktes vom $R_f \sim 0,4$, das nach SC an 2×60 cm Sephadex LH-20 (Dichlormethan/Petrolether 60 – 90 = 7:3) 1,3 mg der Mischung von **12** und **13** ergab (Molverhältnis **12**:**13** approx. 9:1). UV-

Spektrum: 478 ($\epsilon = 2200$), 350(S, 2200), 288 (9700); IR: 3490, 1745, 1692, 1622, 1565 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): 6,27(m, bestehend aus br. s und d mit $J = 1,5$ Hz, 2,1 H), 5,50(s, 1,0 H), 5,29(s, $< 0,1$ H), 5,14(s, $< 0,1$ H), 3,77 – 3,37(m, bestehend aus 3,76 (s), ca. 3,75 (m) und 3,52(q-artig), zusammen 5,8 H), 2,70(t-artig, 2,6 H), 2,19(d, $J = 1,5$ Hz, 3,6 H); HR-MS: $\text{M}^+ + 2$ von **13** m/e 310, 1512 (1,4%, ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ 310,1529), 237(1), 226(5), $\text{M}^+ + 2$ von **12** 225,0998 (45, ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ 225,1001), M^+ von **12** 223,0842 (9, ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ 223,0845), 164(5), 153(8), 152(100, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_2$), 150(12), 138(9), 122(5), 85(7), 59(5), 55(69), 43(5), 42(5), m^* : 102,68: 225 \rightarrow 152.

Herrn Professor Dr. Steglich danke ich für wertvolle Diskussionen und Hinweise sowie für die Unterstützung dieser Arbeit.

- [1] H. W. Wanzlick, Angew. Chem. **74**, 313 (1964).
- [2] W. M. Horspool, Quart. Rev. **23**, 204 (1969).
- [3] R. H. Hackman u. A. R. Todd, Biochem. J. **55**, 631 (1953).
- [4] H. S. Mason u. E. W. Peterson, Biochim. Biophys. Acta **111**, 134 (1965).
- [5] H. Jackson u. L. P. Kendal, Biochem. J. **44**, 477 (1949).
- [6] R. Davies u. J. L. Frahn, J. Chem. Soc. Perkin I **1977**, 2295.
- [7] P. Karlson u. C. E. Sekeris, Nature **195**, 184 (1962).
- [8] M. Förster, J. Prakt. Chem. **21**, 341 (1880); E. Diepolder, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **31**, 496 (1898).
- [9] E. Haslam, The Shikimate Pathway, Halsted Press, S. 160 f. (John Wiley and Sons), New York u. Toronto 1974.
- [10] R. A. Heacock, Chem. Rev. **59**, 181 (1959).
- [11] L. A. Decker (Ed.), Worthington Enzyme Manual, S. 74, Freehold, New Jersey 1974.