

schied entsprechend den Angaben von J. Gadamier das schwer lösliche Mercuroacetat aus. Nach 12-stdg. Stehenlassen wurde klar filtriert und mit NaCl-Lösung das quartäre Chlorid ausgefällt. Durch Lösen in heißem Wasser und Versetzen mit KJ wurde das Jodid erhalten, das im Vakuumröhrchen bei 224—225° unter Braunfärbung und Bläschenbildung schmolz.

Schon bei längerem Liegen der Base IV an der Luft tritt geringe Autoxydation unter allmählichem Gelbwerden auf.

6.7-Dimethoxy-1-[3.4.5-trimethoxy-benzyl]-isochinolin.

Zur Gewinnung dieser Base erhitzen wir 0.2005 g der Verbindung II mit 0.0987 g Pd-Mohr im Kugelföhrchen 45 Min. im Paraffinbad auf genau 200°. Die Lösung des Reaktionsproduktes in Äther wurde eingeeengt, worauf nach kurzer Zeit Krystallisation erfolgte. Schließlich wurde die Base über das Hydrochlorid gereinigt und nochmals aus Äther krystallisieren gelassen. Auf diese Weise wurden 0.1048 g 6.7-Dimethoxy-1-[3.4.5-trimethoxy-benzyl]-isochinolin erhalten. Schmp. 152.5—153.5°.

5.275 mg Sbst.: 13.135 mg CO₂, 3.000 mg H₂O.

C₂₁H₂₃O₅N. Ber. C 68.27, H 6.27. Gef. C 67.95, H 6.36.

Das Pikrat dieser Base krystallisierte aus Alkohol und schmolz bei 185—186°.

57. Richard Kuhn und Kurt Wallenfels: Dehydro-echinochrom.

[Aus d. Kaiser Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg. Institut für Biologie.]
(Eingegangen am 12. März 1942.)

Als Derivat des Naphthazarins, das einerseits zum 1.4.5.8-Tetraoxy-naphthalin hydriert, andererseits zum Naphthodichinon-(1.4.5.8) dehydriert werden kann, sollte auch das Echinochrom (I) befähigt sein, nicht nur 2 H-Atome aufzunehmen, sondern auch 2-H-Atome abzugeben. Im Hinblick auf die Möglichkeit der Beteiligung des Farbstoffs an Wasserstoffverschiebungen in den Eizellen von *Arbacia* ist bisher nur der Übergang in die farblose Dihydro-Stufe II erörtert worden, die als Heptaacetyl-Verbindung in krystallisierter Form erhalten werden konnte¹⁾. Den Übergang in ein Dichinon unter zellmöglichen Bedingungen mochte man für weniger wahrscheinlich halten, da das von K. Zahn²⁾ entdeckte Naphthodichinon-(1.4.5.8) nur durch ein so starkes Oxydationsmittel wie Bleitetraacetat erhältlich und in wäßr. Lösung unbeständig ist. Andere Dehydrierungsmittel, die man zur Überführung von Hydrochinonen in Chinone anzuwenden pflegt, versagen beim Naphthazarin.

Durch Einführung von Hydroxylgruppen wird jedoch das Redoxpotential der Naphthochinone, wie L. F. Fieser³⁾ und K. Wallenfels⁴⁾ fanden, zunehmend negativer. Das Leukoechinochrom mit 7 phenolischen

1) B. **72**, 1407 [1939].

2) K. Zahn u. P. Ochwat, A. **462**, 86 [1928].

3) Journ. Amer. chem. Soc. **50**, 439 [1928].

4) Unveröffentlicht.

OH-Gruppen übertrifft an Reduktionsvermögen alle Dihydro-Verbindungen der Naphthochinone mit geringerer Hydroxylzahl. Es war daher zu erwarten, daß auch das Potential für Echinochrom \rightleftharpoons Dehydro-echinochrom $- 2H$ sehr viel negativer liegen werde als für den Übergang von Naphthazarin in Naphthodichinon und in ein physiologisch interessantes Gebiet fallen werde.

Schüttelt man die rote Lösung von Echinochrom⁵⁾ in Äther mit Silberoxyd oder Bleidioxid, so geht die Farbe in helles Gelb über. Beim Einengen der Ätherlösung scheidet sich das gebildete Dehydro-echinochrom in gelben Blättchen ab. Es ist in Wasser, Alkohol und Äther sehr leicht, in Petroläther schwer löslich und besitzt die Zusammensetzung eines Monohydrats $C_{12}H_8O_7 + H_2O$, wenn es bei 35° über Phosphorpentoxid getrocknet wurde. Das Absorptions-Spektrum in Methanol (Abbild. 1) zeigt 2 Maxima, die bei 386 und 258 m μ liegen.

Die präparative Darstellung von Dehydro-echinochrom gelingt auch mit Unterchloriger Säure in wäßr. Lösung, wenn die für 1 Atom O berechnete Menge HOCl angewandt wird; ein Überschuß an Unterchloriger Säure zerstört den gebildeten Dehydro-Farbstoff. Mit Dichlorphenol-indophenol, dem Reagens auf Ascorbinsäure, läßt sich Echinochrom in wäßr. Lösung bei p_H 5—6 titrieren, doch werden, da es zur Einstellung eines Gleichgewichts kommt, etwa 110% d. Th. Indophenol benötigt, bis nahezu alles Echinochrom verschwunden ist. Chinon reagiert mit Echinochrom in trockenem Dioxan nicht, wohl aber auf Zusatz von Wasser. Auch diese Umsetzung bleibt, wenn man auf 1 Mol. Echinochrom 1 Mol. Chinon einwirken läßt, unvollständig und führt nur zu einem Gleichgewicht (Chinhydrinbildung). Noch unvollständiger verlief die Dehydrierung durch β -Naphthochinon in Dioxan-Wasser. Mit α -Naphthochinon trat überhaupt keine Umsetzung ein.

Diese Versuche gestatten die Lage des anscheinenden Redoxpotentials (ARP) zu schätzen. Viele Versuche, das Potential elektrometrisch zu messen, sei es durch oxydierende Titration von Echinochrom, sei es durch reduzierende Titration von Dehydro-echinochrom, sind bisher ergebnislos verlaufen. Von den geprüften freien Radikalen reagierte α -Trinitrophenyl- β - β -diphenylhydrazyl in Chloroform mit Echinochrom gar nicht; Porphyrexid und Porphyrindin, die in wäßr. Lösung angewandt wurden, sind zu energische Mittel, denen das gebildete Dehydro-echinochrom schon anheimfällt, während noch unverändertes Echinochrom vorhanden ist. Hervorzuheben ist die Beständigkeit des Echinochroms gegen verd. Wasserstoffperoxyd⁶⁾.

Das Dehydro-echinochrom setzt aus verd. Jodwasserstoffsäure kein Jod in Freiheit. Auch durch Ascorbinsäure, Cystein und SH-Glutathion kann es in schwach saurer Lösung nicht zu Echinochrom hydriert werden. Das einzige, uns bekannte Mittel, das in schwach saurer Lösung eine glatte Reduktion zu Echinochrom bewirkt, ist Schwefelwasserstoff. Diese Reaktion erfordert etwas Zeit. Sie gestattet einen empfindlichen Nachweis und die quantitative Bestimmung von Dehydro-echinochrom in Lösungen (Ausäthern und colorimetrische Bestimmung des Echinochroms). Das durch H₂S

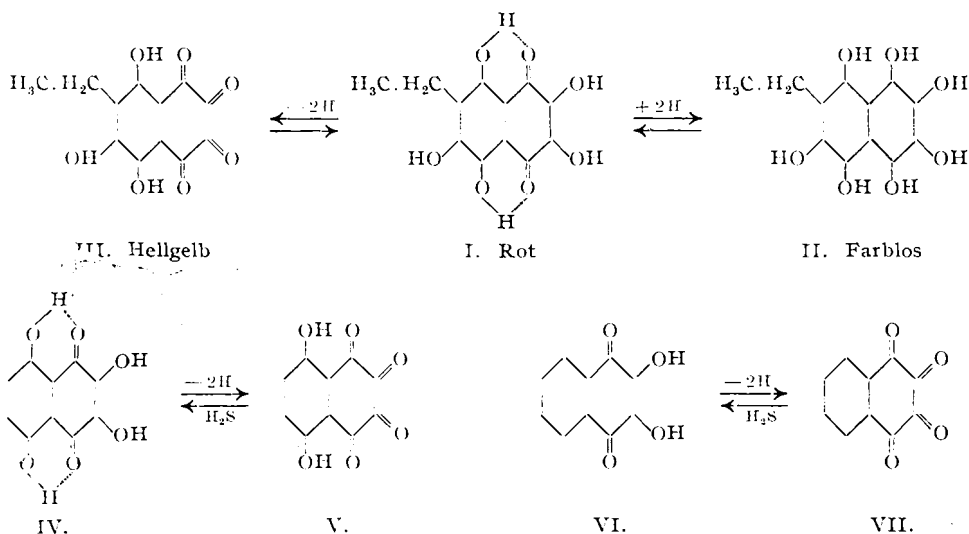
⁵⁾ Im folgenden ist unter Echinochrom stets Echinochrom A (Schmp. 220°) zu verstehen. Entsprechende Versuche mit Echinochrom B und C stehen noch aus.

⁶⁾ Die Reaktion mit Peroxydase und Hydroperoxyd beschreiben K. Wallenfels u. A. Gaulhe.

gebildete Echinochrom fällt bei genügender Konzentration unmittelbar kristallisiert aus. Es wurde durch Schmelzpunkt und Absorptionsbanden identifiziert. In schwach bicarbonathaltiger Lösung wird der hellgelbe Dehydro-Farbstoff durch verschiedene zelleigene Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure, Cystein und SH-Glutathion leicht zum roten Echinochrom hydriert. Bei Anwesenheit von Natriumbicarbonat kann man auch mit Hydrazobenzol und 1.4-Dioxy-naphthalin, nicht dagegen mit Hydrochinon oder Leukolactoflavin reduzieren; mit Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) tritt vorübergehend Rotfärbung (Echinochrom), dann Entfärbung (Bildung von Leuko-echinochrom) ein.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Natur im Farbstoff der Eier von *Arbacia* (I) durch die hohe Hydroxylierung des 2-Äthyl-naphthalins eine Verbindung hervorbringt, die sich in doppelter Weise an Reduktions-Oxydations-Vorgängen entsprechend den Formeln $\text{III} \rightleftharpoons \text{I} \rightleftharpoons \text{II}$ beteiligen kann. Sowohl die Hydrierung zur Leuko-Verbindung II als auch die Dehydrierung zum Dehydro-echinochrom (III) sind umkehrbar und spielen sich in Potentialgebieten ab, die denjenigen bekannter Dehydrase-Systeme entsprechen. Wir haben gefunden, daß gärende Hefe Dehydro-echinochrom zu Echinochrom reduziert. Ähnlich wie das kristallisierte Echinochrom verhält sich der in den Eizellen an hochmolekulare Träger gebundene Farbstoff. An violettroten Arbacia-Eiern, die allerdings schon längere Zeit unter konz. Ammonsulfatlösung aufbewahrt waren, konnte festgestellt werden, daß Chinon sehr starke Farbaufhellung nach Hellorange bewirkt. Beim anschließenden Einleiten von Schwefelwasserstoff kehrte die ursprüngliche dunkelrote Farbe zurück.

Das Absorptions-Spektrum, die Löslichkeitseigenschaften, die Bildung eines Mono- und eines Dihydrats sowie das Verhalten gegen Reduktionsmittel machen es wahrscheinlich, daß im Dehydro-echinochrom nicht ein substituiertes Naphthodichinon-(1.4.5.8), sondern ein Derivat des 1.2.3.4-Tetra-keto-tetrahydronaphthalins vorliegt.



Aus 2,3-Dioxy-naphthazarin (IV) erhielten wir mit Silberoxyd einen Dehydrokörper, der wie das Dehydro-echinochrom in hellgelben

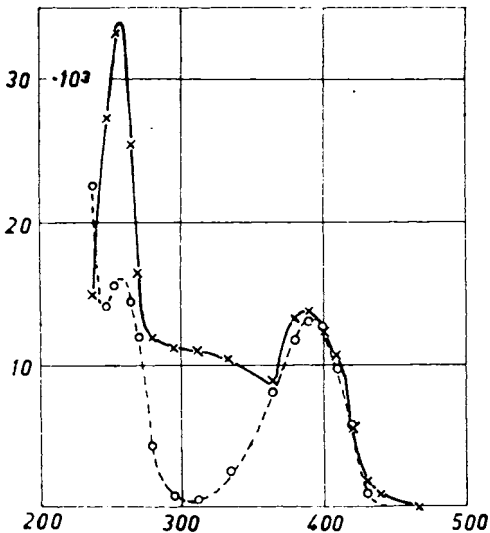


Abbildung 1. Absorptionsspektren in Methanol.

Abszissen: Wellenlängen in $m\mu$,

Ordinaten: $\alpha = \frac{2,30}{c \cdot d} \log \frac{J_0}{J}$ (c in Mol/l, d in cm).

—x—x— Dehydro-echinochrom-hydrat (III)
 ---o--- 5,8-Dioxy-1,2,3,4-tetraketo-tetrahydronaphthalin-hydrat (V)

Echinochroms und des 2,3-Dioxy-naphthazarins in sehr vielen Eigenschaften gleicht. Vom isomeren Naphthodichinon-(1.4.5.8) unterscheidet sich das 1.2.3.4-Tetraketo-tetrahydronaphthalin 1) durch seine sehr viel größere Löslichkeit in Wasser und in organischen Lösungsmitteln, 2) durch die Beständigkeit der wäßr. Lösung—Naphthodichinon und Methyl-naphthodichinon-(1.4.5.8) färben sich in Wasser rasch rot—, 3) durch den viel niedrigeren Zersetzungspunkt, 4) durch die Fähigkeit der Hydratbildung, 5) durch die Beständigkeit gegen Jodwasserstoffsäure. Durch H_2S wird VII entsprechend III und V zu Isonaphthazarin (VI) reduziert.

Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, daß die Dehydro-Verbindung des Echinochroms 5.6.8-Trioxo-7-äthyl-1.2.3.4-tetraketo-tetrahydronaphthalin (III) ist.

Blättchen kristallisiert und diesen auch im Absorptionsspektrum (Abbildung. 1), in der Fähigkeit zur Hydratbildung, im spezifischen Verhalten gegen H_2S (Reduktion zu 2,3-Dioxy-naphthazarin), in der Löslichkeit und in weiteren Eigenschaften durchaus gleicht. Man könnte diesen Dehydrokörper als 2,3-Dioxy-naphthodichinon-(1.4.5.8) formulieren. Wir halten es jedoch für wahrscheinlicher, daß das 5,8-Dioxy-1,2,3,4-tetraketo-tetrahydronaphthalin (V) vorliegt. Das zum Vergleich dargestellte 2-Methyl-naphthodichinon-(1.4.5.8) ist in seinem Absorptionsspektrum (Abbildung. 2) von den Dehydro-Verbindungen des 2,3-Dioxy-naphthazarins und des Echinochroms wesentlich verschieden.

Überdies hat sich gezeigt, daß das aus Isonaphthazarin (VI) erhältliche farblose 1.2.3.4-Tetraketo-tetrahydronaphthalin (VII), dessen Formulierung eindeutig ist, den Dehydrokörpern des

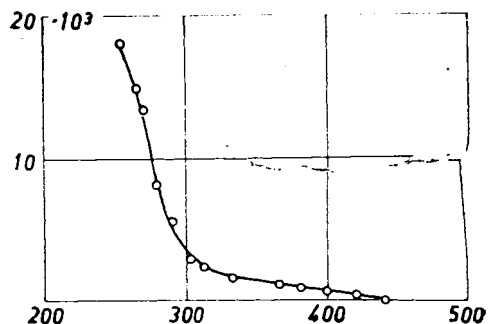
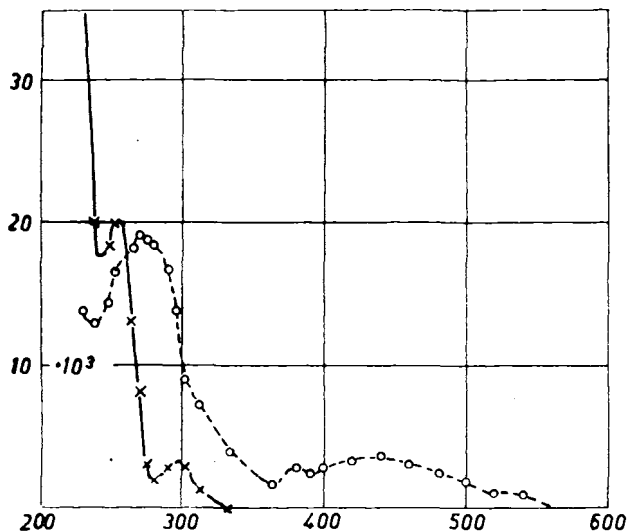


Abbildung 2. Absorptionsspektrum von 2-Methyl-naphthodichinon-(1.4.5.8) in Äthylalkohol.



Abbild. 3. Absorptionsspektren in Äthylalkohol.

-- x -- x -- 1.2.3.4-Tetraketo-tetrahydronaphthalin-hydrat (VII)

- - - o - - - Isonaphthazarin (VI)

Beschreibung der Versuche.**Dehydro-echinochrom (III).**

Dehydrierung mit Silberoxyd: 266 mg Echinochrom ($\frac{1}{1000}$ Mol) wurden in 200 ccm trockenem Äther gelöst und mit 300 mg Silberoxyd⁷⁾ 2 Stdn. geschüttelt, wobei die tiefrote Lösung hellgelb wurde. Nach dem Abzentrifugieren wurde im Vak. stark eingengt, worauf die Dehydro-Verbindung in gelben Blättchen (245 mg) ausfiel. Beim Erhitzen im offenen Röhrchen beginnt die Substanz bei etwa 70° zu sintern und schäumt unter Rotfärbung zwischen 90° und 100° auf.

Zur Analyse wurde über P_2O_5 bei 35° (0.5 mm) getrocknet.

3.975 mg Sbst.: 7.460 mg CO_2 , 1.255 mg H_2O .

$C_{12}H_8O_7 + H_2O$ (282.1). Ber. C 51.07, H 3.58. Gef. C 51.18, H 3.53.

Beim Liegen an der Luft wurde ein zweites Mol. H_2O aufgenommen.

3.165 mg Sbst.: 5.67 mg CO_2 , 1.255 mg H_2O .

$C_{12}H_8O_7 + 2H_2O$ (300.1). Ber. C 48.00, H 4.04. Gef. C 48.86, H 4.44.

Dehydrierung mit Unterchloriger Säure: 100 mg Echinochrom, in 550 ccm heißem Wasser gelöst, wurden bei 0–5° in langsamer Tropfenfolge mit 33 ccm einer wäßr. Lösung von Natriumhypochlorit versetzt, die mit verd. Salzsäure auf p_H 7 eingestellt war und die für 1 Atom O berechnete Menge an Unterchloriger Säure enthielt. Die rote Farbe und die Absorptionsbanden des Farbstoffs verschwanden. Zur Isolierung des Dehydro-echinochroms wurde im Vak. auf 200 ccm eingengt (Badtemp. nicht über 45°) und mit Äther im Apparat 10 Stdn. extrahiert. Die Ätherlösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet, auf 2 ccm eingengt und mit 25 ccm Petroläther (Sdp. bis 50°) versetzt. Ausb. 60–70 mg Hydrat.

⁷⁾ Dargestellt nach R. Willstätter u. A. Pfannenstiel, B. **37**, 4744 [1904].

Die wasserfreie Verbindung ließ sich durch längeres Trocknen bei 78° unter 0.01 mm (P_2O_5) erhalten. Sie nahm beim Liegen an der Luft in 2 Stdn. um 9.46%, in 16 Stdn. um 11.12% an Gewicht zu. Für das Dihydrat berechnet sich eine Gewichtszunahme von 12.00%. Im Schmelzpunktsröhrchen erhitzt, färbte sich das Dihydrat erst bei 130–140°, rot, um bei 160–165° unter Zersetzung zu schmelzen.

Phytochemische Hydrierung: Zu einem bei 30° gärenden Gemisch von 1 g Hefe, 200 mg Glucose und 100 mg *prim.* Kaliumphosphat in 1.5 ccm Wasser wurde die blaßgelbe Lösung von 20 mg Dehydro-echinochrom in 2 ccm Wasser gegeben. Nach $\frac{1}{2}$ Stde. hatten sich die Hefezellen lebhaft violettrot gefärbt, den reifen Eiern von *Arbacia* vergleichbar. Die in der Zentrifuge abgetrennte Lösung war hellgelb und enthielt noch viel unverändertes Dehydro-echinochrom (Reduktionsprobe mit H_2S). Die Hefe gab den roten Farbstoff nicht an Äther ab. Sie wurde mit flüssiger Luft gefroren, aufgetaut und mit Alkohol verrieben, der gleichfalls farblos blieb. Zugabe von verd. Salzsäure bewirkte Farbumschlag von Violettrot nach Hellrot. Hierauf erst ließ sich das gebildete Echinochrom in Äther treiben und durch seine Absorptionsbanden (530 und 500–490 m μ in Äther) identifizieren.

5.8-Dioxy-1.2.3.4-tetraketo-tetrahydronaphthalin (V).

20 mg 2.3-Dioxy-naphthazarin (IV)⁸) wurden in 50 ccm trockenem Äther gelöst und mit 150 mg Silberoxyd⁷) sowie 100 mg wasserfreiem Natriumsulfat 3 Stdn. geschüttelt. Die orangerote Farbe der Lösung ging dabei in ein helles Gelb mit stark blauer Fluorescenz über. Nach dem Abzentrifugieren wurde im Vak. vorsichtig zur Trockne verdampft, der Rückstand in 1 ccm trockenem Äther aufgenommen und mit 20 ccm Petroläther (Sdp. bis 50°) versetzt. Dabei fiel das Tetraketon in hellgelben Blättchen (18 mg) aus.

Zur Analyse wurde über P_2O_5 bei 35° (0.5 mm) getrocknet, wonach die Substanz annähernd 1 H_2O enthält.

2.830 mg Sbst.: 5.275 mg CO_2 , 0.925 mg H_2O .

$C_{10}H_4O_6 + H_2O$ (238). Ber. C 50.42, H 2.53. Gef. C 50.83, H 3.66.

Versuche, das Tetraketon umzukristallisieren, sind, wie auch beim Dehydro-echinochrom, erfolglos geblieben. Es kommt darauf an, die Darstellung so zu leiten, daß das Präparat direkt kristallisiert anfällt. Ähnliche Erfahrungen hat bereits R. Pummerer⁹) bei Dehydrierungsprodukten von Monophenolen gemacht.

Im offenen Röhrchen erhitzt, schmolz unser Präparat unter Rotfärbung und Gasentwicklung bei etwa 175°. Die Verbindung ist in Wasser, Alkohol und Äther leicht löslich. Beim Einleiten von H_2S in die blaßgelbe wässr. Lösung schied sich nach einiger Zeit 2.3-Dioxy-naphthazarin in roten Nadeln ab. Seine Absorptionsbanden (523, 509, 500–485 m μ in Äther) stimmten mit denen der Ausgangssubstanz überein.

⁸) Nach Ch. Kuroda u. H. Oshima, *Proceed. Imp. Acad.* [Tokyo] **16**, 214 [1940] aus 1.2.3.4-Tetramethoxy-benzol und Maleinsäureanhydrid erhältlich. Über eine vereinfachte Darstellung aus Naphthazarin werden K. Wallenfels u. A. Gauhe berichten. Der Schmp. liegt bei 220°.

⁹) R. Pummerer u. A. Rieche, *B.* **59**, 2161 [1926] u. a.

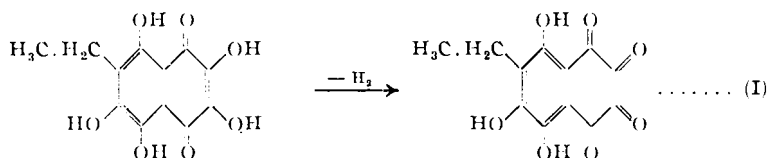
Vergleichs-Substanzen.

Das 1.2.3.4-Tetraketo-tetrahydronaphthalin wurde nach Th. Zincke und A. Ossenbeck¹⁰⁾ dargestellt und durch Krystallisation aus verd. Salpetersäure als Hydrat erhalten. Die Darstellung des 2-Methylnaphthodichinons-(1.4.5.8) werden K. Wallenfels und A. Gauhe beschreiben.

58. Kurt Wallenfels und Adeline Gauhe: Über die Dehydrierung von Echinochrom und anderen 2.3-Dioxy-naphthochinonen durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Biologie.]
(Eingegangen am 12. März 1942.)

Echinochrom, das tiefrot ist, läßt sich durch verschiedene Oxydationsmittel, z. B. Unterchlorige Säure oder Silberoxyd, glatt zu dem um zwei Wasserstoffatome ärmeren, gelben Dehydro-echinochrom dehydrieren. In derselben Weise wie Echinochrom verhalten sich 2.3-Dioxy-naphthazarin und 2.3-Dioxy-naphthochinon-(1.4) (Isonaphthazarin). Das Dehydrierungsprodukt ist nach R. Kuhn und K. Wallenfels¹⁾ ein Diorthochinon bzw. 1.2.3.4-Tetraketo-tetrahydronaphthalin. Schema I stellt die Reaktion für Echinochrom dar.



Wie wir gefunden haben, läßt sich diese Reaktion auch fermentativ durchführen. Verdünntes Wasserstoffperoxyd allein verändert eine wäßr. Lösung von Echinochrom nicht. Fügt man jedoch bei p_H 4—5 ein wenig Peroxydase-Lösung aus Meerrettich hinzu, so beobachtet man eine starke Aufhellung der Farbe, und bald ist die ursprünglich dunkelrote Lösung hellgelb geworden. Die für Echinochrom charakteristischen Absorptionsbanden sind vollständig verschwunden. Leitet man in die gelbe Lösung nun Schwefelwasserstoff, so verwandelt sich der gelbe Farbstoff wieder in den ursprünglichen roten zurück. Der zurückgebildete rote Farbstoff läßt sich mit Äther extrahieren. Die äther. Lösung zeigt am Löwe-Schumm-Spektroskop die Absorptionsbanden von Echinochrom (530 und 500—490 $m\mu$). Die colorimetrische Bestimmung des Echinochromgehalts ergibt, daß Dehydrierung und Hydrierung quantitativ verlaufen.

Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration.

Um die Geschwindigkeit der Dehydrierung bei verschiedenen p_H -Werten zu ermitteln, wurden in einer Cuvette 1 ccm einer 0.004-proz. Echinochrom-Lösung (Auflösen in wenig Alkohol, Verdünnen mit Wasser) mit 1 ccm

¹⁰⁾ A. 307, 1 [1899].

¹⁾ R. Kuhn u. K. Wallenfels, B. 75, 407 [1942].