

Theodor Wieland und Heinrich Aquila<sup>1)</sup>

Modellversuche zur oxydativen Phosphorylierung, XII<sup>2)</sup>

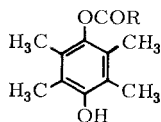
## Die Bildung von Adenosintriphosphat aus Adenosindiphosphat und Phosphat bei der Oxydation von Monoacylderivaten des Durohydrochinons, des 2.3-Dimethoxy-5.6-dimethyl-benzo- und des 2.3-Dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinons

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

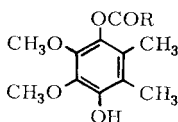
(Eingegangen am 23. Dezember 1968)

Bei der Oxydation (mit Brom in Pyridin) der Monoacetyl- und Acetylglycylderivate **1a**, **2a**, **3a** bzw. **1b**, **2b**, **3b** der im Titel genannten Hydrochinone und des *N*-Phthaloyl- $\alpha$ -tert.-butylester- $\gamma$ -glutamylesters **3c** entstand in Gegenwart der Tetrabutylammoniumsalze von Phosphat und Adenosindiphosphat ATP in Ausbeuten von 5–20%.

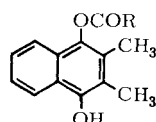
In der VIII. Mitteil. dieser Reihe<sup>3)</sup> haben wir berichtet, daß bei der Oxydation von Monoacetyl-durohydrochinon (**1a**) in Pyridin in Gegenwart der Tetrabutylammoniumsalze (TBA-Salze) von Adenosin-5'-diphosphorsäure (ADP) und Orthophosphorsäure (P) fast 10% Adenosintriphosphat (ATP) entstehen. Diese Versuche wurden fortgesetzt, wobei sowohl die Natur des Acylrests als auch die des Hydrochinons variiert wurde. Außer dem Acetylrest interessierte, als Modell für die Carboxylgruppenbeteiligung makromolekularer Zellsubstanzen, der Rest des *N*-Acetyl-glycins (**1b**, **2b** und **3b**) und der des *N*-Phthaloyl-glutaminsäure- $\alpha$ -tert.-butylesters (**3c**). Die Hydrochinone wurden vom 2.3.5.6-Tetramethyl-hydrochinon (Vitamin E-Typ, **1a** und **1b**) über das Ubichinon-ähnliche 2.3-Dimethoxy-5.6-dimethyl-hydrochinon (Dihydroaurantiogliocladin, **2a** und **b**) zum 2.3-Dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon (Vitamin K-Typ, **3a**, **b** und **c**) abgewandelt.



**1a, b**



**2a, b**



**3a, b, c**

a: R = CH<sub>3</sub>    b: R = CH<sub>2</sub>-NHCOCH<sub>3</sub>    c: R = [CH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-CH(NPh<sub>t</sub>)-CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

<sup>1)</sup> Aus der Dissertat. *H. Aquila*, Univ. Frankfurt a. M., 1968, D 30.

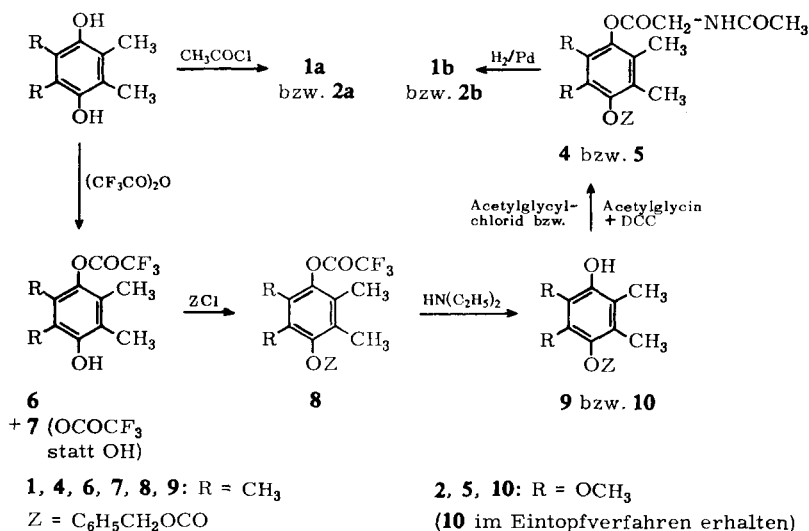
<sup>2)</sup> XI. Mitteil.: *E. Bäuerlein* und *Th. Wieland*, Chem. Ber. **102**, 1299 (1969).

<sup>3)</sup> *Th. Wieland* und *H. Aquila*, Angew. Chem. **80**, 190 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. **7**, 213 (1968).

## Synthesen der Mediatorverbindungen

Monoacetyl-durohydrochinon (**1a**) wurde neben der Diacetylverbindung durch Acetylieren des Durohydrochinons mit Acetylchlorid in Pyridin gewonnen und chromatographisch isoliert<sup>3)</sup>. Dieses einfache Verfahren war für die Einführung des *N*-Acetyl-glycyl-Rests nicht geeignet, weshalb bei der Darstellung von **1b** der in Schema I wiedergegebene Weg eingeschlagen wurde. Die einseitige Umsetzung des Hydrochinons mit Chlorameisensäure-benzylester gelang nicht. Zur Herstellung des Monobenzoyloxycarbonyl-durohydrochinons (**9**) wurde eine Hydroxylgruppe vorübergehend durch den Trifluoracetylrest geschützt. Die Trifluoracetylverbindung **6**, die außer dem Bis-trifluoracetyl-Derivat **7** entsteht, wurde mit Chlorameisensäurebenzylester zum Diester **8** acyliert, aus dem der Trifluoracetylrest leicht mit Diäthylamin zu **9** abgespalten werden konnte. In einfacher Weise ließ sich **9** aus dem Hydrochinon ohne Isolierung der Zwischenstufen **6** und **8** gewinnen („Eintopfverfahren“). Zur *N*-Acetyl-glycyl-Verbindung **1b** kamen wir durch Umsetzung von **9** mit *N*-Acetyl-glycylchlorid zu **4** und anschließende hydrogenolytische Abspaltung der Schutzgruppe.

Schema I



Die Derivate **2a** und **b** des 2.3-Dimethoxy-5.6-dimethyl-hydrochinons, das *Aquila* auf einem ergebnisreicheren Weg als in der Literatur beschrieben<sup>4,5)</sup> synthetisierte<sup>6)</sup>, wurden ebenfalls nach Formelschema I erhalten. Acetylierung mit Acetylchlorid in Pyridin lieferte (außer der Diacetylverbindung) den Monoester **2a**, während für **2b** der schon beim Durohydrochinon-Derivat **1b** geschilderte Umweg, bis Verbindung **10**

4) T. R. Seshadri und G. B. Venkatasubramanian, J. chem. Soc. [London] **1959**, 1660.

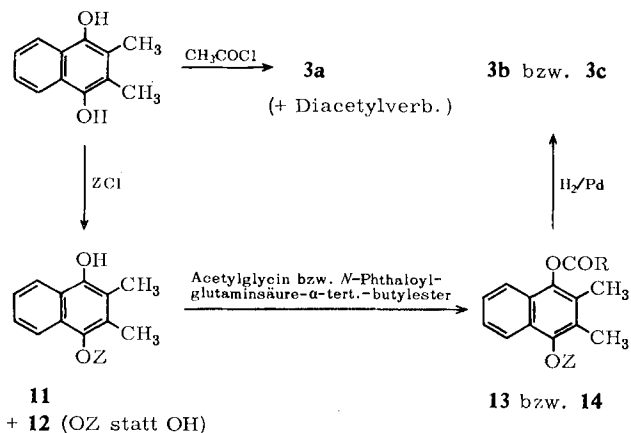
5) W. Baker, J. F. W. McOmie und D. Miles, J. chem. Soc. [London] **1953**, 820.

6) H. Aquila, Liebigs Ann. Chem. **721**, 220 (1969).

im Eintopfverfahren, über die Trifluoracetylverbindung, deren Z-Verbindung und Reaktion des vom Trifluoracetylrest befreiten Z-Hydrochinons **10** mit Acetylglycin und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) über Verbindung **5** eingeschlagen werden mußte.

Die Derivate **3a**, **b** und **c** des 2,3-Dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinons erhielten wir auf den in Schema II angegebenen Wegen.

Schema II



2,3-Dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon gab mit Acetylchlorid in Pyridin neben der Diacetylverbindung das Monoacetylderivat **3a**. Zur Einführung der Aminosäurereste wurde das Hydrochinon zuerst mit Chlorameisensäure-benzylester umgesetzt, wobei außer der Bis-benzyloxycarbonyl-Verbindung **12** das gewünschte Monoderivat **11** entstand. Seine Veresterung mit *N*-Acetyl-glycin entweder mit Dicyclohexylcarbodiimid oder über das gemischte Anhydrid mit Kohlensäure-äthylester gab den Diester **13**, aus dem der Benzyloxycarbonylrest mit Wasserstoff katalytisch zu **3b** abgespalten wurde. In gleicher Weise entstand **3c** aus dem Umsetzungsprodukt **14** von Verbindung **11** mit *N*-Phthaloyl-glutaminsäure- $\alpha$ -tert.-butylester<sup>7)</sup>.

### Oxydative Phosphorylierungen

Die neuen Monoacylhydrochinone **1a**, **b**, **2a**, **b** und **3a**, **b**, **c** gaben bei der Oxydation in Pyridin mit Brom aus ADP und P deutliche, enzymatisch nachgewiesene<sup>8)</sup> Mengen von ATP. Die Ausbeuten sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Man sieht, daß alle Verbindungen die oxydative ATP-Bildung vermitteln. Als Mechanismus für diese Reaktion haben wir<sup>3)</sup> vorgeschlagen, daß durch den (oxydativen) Elektronentzug an der *p*-ständigen Hydroxygruppe der Acylrest aktiviert wird und mit dem Orthophosphat zu Acetylphosphat, einem phosphorylierenden Agens reagiert. Acetylphosphat konnten wir jetzt als erstes Oxydationsprodukt von **1a** mit Brom in Gegenwart von Orthophosphat (in Abwesenheit von ADP) im Elektropherogramm nach Verwendung von <sup>32</sup>P direkt nachweisen. Der *N*-Acetyl-glycin-

<sup>7)</sup> H. Aquila und Th. Wieland, Liebigs Ann. Chem. **721**, 223 (1969).

<sup>8)</sup> S. in H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 539, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962.

Tab. 1. ATP-Ausbeuten (%), ber. auf Mediator), die bei der Oxydation der verschiedenen Mediatoren (0.1 mMol) in 5 ccm Pyridin aus 0.1 mMolen der TBA-Salze von ADP und P entstehen

Oxydationsmittel	1a	1b	2a	2b	3a	3b	3c	ohne
Brom (0.1–0.15 mMol)	0.9							
Brom (0.25 mMol)	6.0	10.4	8.1		9.1	13.7		0.6
	6.6	8.1			9.0			
	5.9				12.6 <sup>a)</sup>			
Brom in Pyridin (0.25 mMol) <sup>a)</sup>	12.4	14.4	12.7	14.2	14.2	16.7	12.3	0.7
	11.2	12.1	11.6	12.1	16.2	19.1	12.6	0.8
				11.9	12.8	15.5		0.8
Jod (0.11 mMol)	0.7		0.7		0.8			0.7
Fe[(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-</sup> b) (0.5 mMol)						0.2		0.2

<sup>a)</sup> Von l. c.<sup>3)</sup> etwas abweichende Versuchsbedingung (s. Versuchsteil S. 2293).

<sup>b)</sup> Als Tetrabutylammonium(TBA)-Salz, aus TBA-Perchlorat und K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> in Methanol/Wasser, Verdampfen des Filtrats bis zur Wasserfreiheit.

Rest (**b**) brachte, wie die Tabelle zeigt, durchwegs etwas höhere ATP-Ausbeuten als der Acetylrest (**a**). Dies ist mit der größeren Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffs bei **b** infolge des induktiven Effekts der Acetylaminogruppe vereinbar; *N*-Acetylglycylphosphat sollte ein besseres Phosphorylierungsmittel als Acetylphosphat sein. Der  $\gamma$ -Glutamylester (**3c**) erwies sich als etwa den Acetylestern gleich. -- Von der Struktur der Hydrochinone von **1**–**3** ist kein deutlicher Einfluß auf die ATP-Ausbeute zu sehen, höchstens eine kleine Überlegenheit des Naphthohydrochinons (**3**). Die Konzentration des Broms spielt hingegen eine große Rolle, wie die Unterschiede zwischen den ATP-Ausbeuten bei Verwendung von 1.5fachen und 2.5fachen Brommengen zeigen. Jod wird nur äußerst langsam verbraucht ohne ATP zu liefern, mit (TBA)<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, das ebenfalls langsam unter Entstehen einer dunkelbraunen Farbe verbraucht wird, kam die ATP-Menge auch nicht über den Blindwert hinaus. Die ohne Mediator gebildeten ATP-Mengen dürften auf Dismutation des ADP<sup>9)</sup> zurückzuführen sein.

Wir nehmen an, daß die Bildung der in l. c.<sup>3)</sup> vorgeschlagenen, oxydativ erzeugten energiereichen *O*-Acyl-Verbindungen eine hohe Aktivierungsenergie verlangt und langsam verläuft. Vom schwachen Oxydationsmittel Jod werden nicht genügend viele Acyldonatoren erzeugt, um trotz Nebenreaktionen Phosphat in energiereiche Bindung abzugeben, vom Hexacyanoferrat(III) wird vermutlich nur ein Elektron übertragen und das Radikal reagiert in anderer Weise<sup>10)</sup>. Mit dem starken Oxydationsmittel Brom bildet sich das reaktive Acylium-Ion, die Hauptmenge des Broms reagiert aber mit dem Adenin der Adenosinphosphate<sup>11)</sup> oder mit den gebildeten Chinonen.

<sup>9)</sup> D. L. M. Verheyden, W. E. Wehrli und J. G. Moffat, J. Amer. chem. Soc. **87**, 2257 (1965).

<sup>10)</sup> Vgl. H. Musso, Angew. Chem. **75**, 965 (1963).

<sup>11)</sup> Wang-J Liu und Te-Pao Wang, Sheng Wu Hua Hsueh Yu Cheng Wu Li Hsueh Pao **5** (1), 109–15 (1965) (Ch); C. A. **63**, 3212 h (1965).

## Beschreibung der Versuche

*O*-Acetyl-tetramethylhydrochinon (**1a**): 4.2 g *Durohydrochinon* vom Schmp. 222–228°, analog l. c.<sup>12)</sup> aus *Durochinon* mit Zinn(II)-chlorid in Eisessig erhalten, wurden in 35 ccm Pyridin unter N<sub>2</sub> bei 0° unter Rühren in 1 Stde. tropfenweise mit der Lösung von 1.91 g *Acetylchlorid* in 5 ccm Chloroform versetzt. Nach 1 Stde. bei Raumtemperatur wurde abdestilliert, mit 3 mal 50 ccm Chloroform extrahiert und der Extrakt eingedampft. Chromatographie an Kieselgel (0.05–0.20 mm, Merck, Darmstadt), zuerst mit Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform (1:1), dann mit Chloroform entfernte die rascher wandernde Diacetylverbindung von **1a**, das aus der heißen Lösung in 10 ccm Benzol bei Zugabe von 20 ccm Cyclohexan in farblosen Blättchen (1.8 g, 34%) vom Schmp. 144° ausfiel. Nach 3 maligem Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser, dann aus Benzol Schmp. 146.5–147.5°.

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub> (208.3) Ber. C 69.21 H 7.74 Gef. C 69.77 H 7.89

*O*-Trifluoracetyl-tetramethylhydrochinon (**6**): Zu 8.3 g *Durohydrochinon* in 70 ccm Pyridin wurde unter N<sub>2</sub> und Rühren bei Raumtemperatur innerhalb von 30 Min. die Lösung von 10.5 g *Trifluoressigsäureanhydrid* in 10 ccm Chloroform getropft. Nach weiteren 2 Stdn. wurde i. Vak. verdampft und der Rückstand unter Eiskühlung mit 50 ccm Chloroform, 5 ccm 2*n* HCl und 20 g Eis gut durchgearbeitet. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser, wenig Äthanol und 30 ccm Chloroform gewaschen. Die Chloroformlösungen wurden gemeinsam abgedampft und nach dem Aufnehmen in wenig Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform (1:1) an einer Kieselgelsäule (2 × 30 cm) im selben Gemisch, später mit Chloroform chromatographiert. Zuerst erschien *O*.*O'*-Bis-trifluoracetyl-tetramethylhydrochinon (**7**), das aus Petroläther (30–50°) in langen Nadeln vom Schmp. 150–150.5° anfiel (3.0 g). Aus den folgenden Fraktionen der Chromatographie, die z. T. durch *Durochinon* gelb waren, erhielt man nach Abdampfen und Umkristallisieren aus Petroläther (30–50°) 3.2 g (24%) farblose Nadeln der *Monoacetylverbindung* **6** vom Schmp. 96°, die durch Überführung in **8** identifiziert wurde.

*O*-Trifluoracetyl-*O'*-benzyloxycarbonyl-tetramethylhydrochinon (**8**): Zu einer Lösung von 2.62 g der *Trifluoracetylverbindung* **6** und 1.9 g 95proz. *Chlorameisensäure-benzylester* in 5 ccm Dioxan wurde unter Luftausschluß und Eiskühlung die Lösung von 1.2 g Triäthylamin in 1 ccm Dioxan in 15 Min. eingetropft. Nach weiteren 15 Min. wurde i. Vak. verdampft, in Chloroform aufgenommen, mit wenig 2*n* HCl unter Eiszugabe ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen und die Chloroformphase nach Trocknen mit MgSO<sub>4</sub> und Einengen an Kieselgel im selben Lösungsmittel chromatographiert. Die zuerst auslaufende Fraktion (2.2 g) wurde aus Petroläther (30–50°) umkristallisiert und ergab dabei 1.85 g (47%) farblosen *Diester* **8** vom Schmp. 101–102°.

C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (396.3) Ber. C 60.7 H 4.85 Gef. C 60.96 H 5.13

*O*-Benzyloxycarbonyl-tetramethylhydrochinon (**9**)

A. Aus der *Diacetylverbindung* **8**: 0.4 g **8** wurden unter N<sub>2</sub> in 5 ccm Äthanol mit 85 mg *Diäthylamin* 7 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Man erhielt nach Abdampfen und Umkristallisieren aus wenig Methanol, dann aus CCl<sub>4</sub> 270 mg (90%) farblose, körnige Kristalle vom Schmp. 114.5–115.5°.

C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub> (300.3) Ber. C 71.88 H 6.71 Gef. C 71.69 H 6.95

B. Aus *Durohydrochinon* im „Eintopfverfahren“: Zur Lösung von 33.2 g *Durohydrochinon* in 200 ccm Pyridin wurden unter N<sub>2</sub> und Rühren bei 20–30° in 30 Min. 42.0 g *Trifluoressigsäureanhydrid* in 30 ccm Chloroform getropft. Nach 1 Stde. gab man zum eisgekühlten

<sup>12)</sup> K. Fries und W. Lohmann, Ber. dtsch. chem. Ges. **54**, 2919 (1921).

Ansatz 37.4 g 95proz. *Chlorameisensäure-benzylester* tropfenweise zu. Am nächsten Tag wurde unter Eiskühlung die Lösung von 16.2 g *Diäthylamin* in 50 ccm Äthanol zugegeben, nach 1 Stde. i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit 2*n* HCl angesäuert und mit im ganzen 200 ccm Chloroform durchgearbeitet. Das Nichtgelöste wurde abgesaugt, mit Wasser, wenig Äthanol und 3 mal mit 25 ccm heißem Chloroform gewaschen. Die vereinigten Chloroformphasen wurden mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. zur Trockne verdampft. Aus dem Rückstand entfernte man Durochinon durch Extraktion mit 50 ccm Chloroform und Abfiltrieren. Nach Einengen wurde die Chloroformlösung an einer 3.5 × 40 cm-Säule von Kieselgel mit demselben Laufmittel chromatographiert. Zuerst kam *O,O'*-*Bis-benzyloxy-carbonyl-durohydrochinon* (20 g), das nach Umkristallisieren aus CCl<sub>4</sub> Schmp. 138–140° hatte, dann beim Eluieren der Säule mit 2proz. Äthanol-haltigem Chloroform **9**. Das braungelbe Pulver gab nach Umkristallisieren aus CCl<sub>4</sub>, dann aus Methanol farbloses **9** (6.6 g = 11%, ber. auf Durohydrochinon) vom Schmp. 111–113°.

*O-Benzyl-oxy-carbonyl-O'-(N-Acetyl-glycyl)-tetramethylhydrochinon (4)*: Zur Eis/Kochsalzgekühlten Lösung von 0.6 g der *Benzyloxy-carbonylverbindung 9* in 5 ccm Pyridin wurden unter gutem Rühren 0.54 g feinstgepulvertes *N-Acetyl-glycylchlorid*<sup>13)</sup> zugefügt. Nach 6 stdt. Rühren bei 0° und 10 Stdn. bei 20° wurde i. Vak. verdampft, der Rückstand in Chloroform gelöst, die Lösung mit 2*n* HCl, Wasser, NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Abdampfen chromatographierte man in Methanol/Chloroform (1:1 Vol.) an einer Säule (3.5 × 200 cm) von Sephadex LH-20, wonach die Hauptfraktion aus Methanol umkristallisiert 0.4 g (50%) farblose Nadeln vom Schmp. 175–176° ergab.

C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub> (399.4) Ber. C 66.15 H 6.31 N 3.51 Gef. C 65.45 H 6.05 N 3.57

*O-(N-Acetyl-glycyl)-tetramethylhydrochinon (1b)*: 0.4 g **4** wurden unter N<sub>2</sub> in 150 ccm reinstem Methanol nach Zugabe von ca. 0.5 ccm einer dicken Aufschlammung von Pd-Mohr in Methanol unter Vibrieren und Durchleiten von *Wasserstoff* hydrogeniert, wobei die Barytprobe des Abgases nach 1 Stde. das Ende der Reaktion anzeigte. Nach Filtrieren und Einengen wurde in Methanol/Chloroform (1:1 Vol.) an Sephadex LH-20 chromatographiert. Die im Uvicord registrierte Eluatfraktion wurde i. Vak. eingedampft, aus ihr gewann man durch Umkristallisieren aus Methanol ca. 0.25 g (90%) farblose Kristalle vom Schmp. 205–205.5°.

C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub> (265.3) Ber. C 63.38 H 7.22 N 5.28 Gef. C 63.34 H 7.21 N 5.22

*O-Acetyl-2.3-dimethoxy-5.6-dimethyl-hydrochinon (2a)*: Zu 1.98 g *2.3-Dimethoxy-5.6-dimethyl-hydrochinon*<sup>6)</sup> in 10 ccm Pyridin wurden unter N<sub>2</sub> und Rühren 0.79 g *Acetylchlorid* in 5 ccm Chloroform innerhalb von 30 Min. zugetropft. Nach 1 Stde. wurde i. Vak. eingedampft, in Chloroform aufgenommen, 2 mal mit 2*n* HCl, 2 mal mit Wasser gewaschen, getrocknet und an Kieselgel in Chloroform mit steigendem Zusatz von Äther, später von Dioxan chromatographiert. Die im Uvicord registrierten, etwa gleich großen (200 ccm) Fraktionen I–V enthielten folgende Komponenten: I: braunrote Kristalle des 2.3-Dimethoxy-5.6-dimethylchinhydrons vom Schmp. 60°; II–V: Gemische aus Chinon, Mono- und Diacetylverbindung, die nicht kristallisiert werden konnten. IV gab bei Chromatographie an Sephadex LH-20 in Methanol/Chloroform (1:1) eine rascher wandernde Substanz (0.14 g) vom Schmp. 90°, die Diacetylverbindung. Die später erscheinende Uvicord-registrierte Substanz (im ganzen 1.04 g; 45%) kristallisierte aus Cyclohexan/Petroläther in farblosen Blättchen vom Schmp. 82°. Sie erwies sich im NMR-Spektrum und durch Analyse als **2a**.

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub> (240.3) Ber. C 59.99 H 6.71 Gef. C 60.15 H 6.67

<sup>13)</sup> J. Max, Liebigs Ann. Chem. **369**, 286 (1909).

*O*-Benzyloxycarbonyl-2,3-dimethoxy-5,6-dimethyl-hydrochinon (**10**) (Eintopfverfahren): Zu 3.96 g 2,3-Dimethoxy-5,6-dimethyl-hydrochinon in 20 ccm Pyridin wurde unter N<sub>2</sub>, Eiskühlung und Rühren in 30 Min. die Lösung von 4.2 g Trifluoressigsäureanhydrid in 5 ccm Dioxan getropft. Nach 2 Stdn. bei Raumtemperatur wurde, wieder unter Eiskühlung, in 45 Min. die Lösung von 3.75 g 95proz. Chlorameisensäure-benzylester in 5 ccm Dioxan zuge tropft. Nach 10stdg. Aufbewahren bei Raumtemperatur wurden bei 0° 1.7 g Diäthylamin in 5 ccm Äthanol zuge tropft, dann ließ man 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehen, verdampfte i. Vak. und nahm den Rückstand in 20 ccm Chloroform auf. Nach Waschen der Lösung mit 1 n HCl, dann 2mal mit Wasser wurde in Chloroform (1:1) als Lösungsmittel an Sephadex LH-20 chromatographiert und nach dem Uvicorddiagramm in die Fraktionen A, B und C aufgeteilt. Fraktion A gab nach dem Abdampfen und Behandeln mit Methanol 0.2 g Kristalle vom Schmp. 112° (laut NMR-Spektrum die Bis-benzyloxycarbonyl-Verbindung), aus Fraktion C konnten durch Kristallisation aus Petroläther (30—80°) 1.7 g Prismen vom Schmp. 78—82° (Ausgangshydrochinon, Schmp. 84°) erhalten werden. Fraktion B wurde nach Abdampfen in Chloroform an Kieselgel chromatographiert, wobei sich **10** in der dritten Fraktion anreichte. Diese wurde in Methanol an Sephadex LH-20 nochmals chromatographiert, wobei 2.0 g eines einheitlichen Öls isoliert werden konnten, dessen NMR-Spektrum die erwarteten Protonensignale aufwies.

*O*-Benzyloxycarbonyl-*O'*-[*N*-Acetyl-glycyl]-2,3-dimethoxy-5,6-dimethyl-hydrochinon (**5**): 1.0 g **10** wurde zusammen mit 0.7 g *N*-Acetyl-glycin und 1.3 g Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ccm Pyridin eine Woche bei 4° aufbewahrt. Nach Filtrieren wurde i. Vak. verdampft, der Rückstand in 20 ccm Chloroform gelöst und die Lösung mit 5 ccm Eisessig versetzt. Nach 30 Min. wurde vom neuerlich ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit 1 n HCl und Wasser ausgeschüttelt und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Bei der Chromatographie an Kieselgel in Chloroform unter steigendem Zusatz von Äther, dann Dioxan erschien bei ca. 3% Äther unverändertes **10** und bei ca. 10% Dioxan das gewünschte Produkt **5**. Ausb. 0.84 g (65%) vom Schmp. 124—126° (aus CCl<sub>4</sub>).

C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>8</sub> (431.4) Ber. C 61.24 H 5.84 N 3.25 Gef. C 61.11 H 5.60 N 3.34

*O*-[*N*-Acetyl-glycyl]-2,3-dimethoxy-5,6-dimethyl-hydrochinon (**2b**): 0.38 g **5** wurden in 40 ccm Methanol über Pd-Mohr wie üblich hydriert. Aus Methanol kristallisierten 0.16 g feine Nadeln vom Schmp. 179.5—180.5°. Der Eindampfrückstand der Mutterlauge (0.08 g) war ebenfalls kristallin und hatte einen Schmp. von 177—179°. Gesamtausb. 92%. Analyse der ersten Kristalle:

C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub> (297.3) Ber. C 56.56 H 6.44 N 4.71 Gef. C 56.64 H 6.26 N 4.89

*O*-Acetyl-2,3-dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon (**3a**): In die mit Eis gekühlte Lösung von 4.0 g 2,3-Dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon in 20 ccm Pyridin wurden 1.6 g Acetylchlorid in 5 ccm Chloroform in 20 Min. getropft. Nach 1 Stde. bei Raumtemperatur wurde abgedampft, in Chloroform aufgenommen, 2mal mit 2 n HCl, dann 2mal mit Wasser gewaschen und nach Eindampfen in Methanol/Chloroform (1:1) an Sephadex LH-20 chromatographiert. Zuerst kam die *O*,*O'*-Diacetyl-Verbindung, aus CCl<sub>4</sub> 0.77 g vom Schmp. 192—193°. Die Monoacetylverbindung **3a** aus dem späteren Eluat wurde ebenfalls aus CCl<sub>4</sub> umkristallisiert und wog 1.33 g mit Schmp. 150—152°. Durch 2maliges Umkristallisieren aus CCl<sub>4</sub> stieg der Schmp. auf 153—154°.

C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> (230.3) Ber. C 73.02 H 6.13 Gef. C 73.11 H 6.25

*O*-Benzyloxycarbonyl-2,3-dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon (**11**): Zur Lösung von 18.8 g 2,3-Dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon und 14 ccm Triäthylamin in 55 ccm Dioxan wurden unter

N<sub>2</sub> und Rühren 17.6 g 95proz. *Chlorameisensäure-benzylester* im Verlauf von 1 Stde. bei 0° zugetropft. Nach 1½ Stdn. bei Raumtemperatur wurde in 10 ccm 6*n* HCl + 10 g Eis eingerührt und mit Wasser auf 500 ccm verdünnt. Man schüttelte 1 mal mit 100 ccm und 2 mal mit 50 ccm Chloroform aus, wobei sich etwas Ausgangs-Hydrochinon abschied, das durch Zugabe von 50 ccm Essigester in Lösung gebracht wurde. Die Lösung wurde 2 mal mit 100 ccm Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, auf 20 ccm eingengt und mit 100 ccm Chloroform zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen saugte man vom ungelösten, nicht umgesetzten Naphthohydrochinon ab und chromatographierte das Filtrat an Kieselgel mit Chloroform als Laufmittel. Dabei wanderte *O,O'*-*Bis-benzyloxycarbonyl-2,3-dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon* (**12**) am schnellsten durch die Säule. Man konnte davon 9.5 g vom Schmp. 144–145° durch Kristallisation aus Methanol isolieren. Nach Zusatz von 2% Äthanol zum Eluens erschien das gewünschte Produkt **11**, das nach Abdampfen aus CCl<sub>4</sub>, wenig Methanol und wieder CCl<sub>4</sub> umkristallisiert 1.2 g (3.7%) farblose Kristalle vom Schmp. 131.5 bis 132.5° gab.

C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> (322.3) Ber. C 74.52 H 5.63 Gef. C 74.36 H 5.71

*O-Benzyloxycarbonyl-O'-[N-acetyl-glycyl]-2,3-dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon* (**13**): Eine Lösung von 0.65 g der *Benzyloxycarbonylverbindung* **11**, 0.24 g *N-Acetyl-glycin* und 0.8 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 5 ccm Pyridin blieb unter N<sub>2</sub> 60 Stdn. bei 4° stehen. Dann wurde vom Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, eingengt, in 10 ccm Chloroform mit ca. 2 ccm Eisessig versetzt und nach 30 Min. erneut filtriert. Die Chloroformlösung wurde 2 mal mit Wasser gewaschen und ihr Abdampfrückstand an Sephadex LH-20 in Methanol/Chloroform (4:1) chromatographiert. Die Hauptfraktion gab beim Umkristallisieren aus Methanol nach Aufarbeitung der Mutterlauge 0.55 g (65%) *Diester* **13** vom Schmp. 176.5–177.5°.

*O-[N-Acetyl-glycyl]-2,3-dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon* (**3b**): 0.55 g der *Benzyloxycarbonylverbindung* **13** wurden in 30 ccm Methanol über ca. 0.1 g Pd-Mohr bis zum Ende der CO<sub>2</sub>-Entwicklung im Durchstrom hydriert (Barytprobe). Nach Filtrieren und Abdampfen wurde in Methanol/Chloroform (4:1) an Sephadex LH-20 chromatographiert. Man isolierte aus der Hauptfraktion (Uvicord) 0.35 g (93%), die aus Essigester in feinen farblosen Nadelchen vom Schmp. 188–189° kristallisierten.

C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> (287.3) Ber. C 66.88 H 5.96 N 4.88 Gef. C 66.84 H 5.97 N 4.84

*O-Benzyloxycarbonyl-O'-[N-phthaloyl- $\gamma$ -L-glutamyl( $\alpha$ -tert.-butylester)]-2,3-dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon* (**14**): Die Lösung von 1.05 g *N-Phthaloyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ -tert.-butylester*<sup>7)</sup> und 0.97 g *Benzyloxycarbonyl-dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon* **11** in 15 ccm Pyridin wurde nach Zugabe von 1.3 g *Dicyclohexylcarbodiimid* unter N<sub>2</sub> 1 Woche bei 4° aufbewahrt. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffs wurde abgedampft, in Chloroform gelöst und mit 10proz. Citronensäure, Wasser, NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen und eingengt. Durch Chromatographie an Sephadex LH-20 in Methanol/Chloroform (4:1) erhielt man in der zweiten Hauptfraktion die gewünschte Verbindung (1.5 g). Sie wurde noch in Chloroform an Kieselgel chromatographiert und 2 mal aus Methanol umkristallisiert. Ausb. 0.8 g (52%) farblose Kristalle vom Schmp. 121.5–122°.

C<sub>37</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>9</sub> (637.7) Ber. C 69.69 H 5.53 N 2.20 Gef. C 69.59 H 5.52 N 2.21

*O-[N-Phthaloyl- $\gamma$ -L-glutamyl( $\alpha$ -tert.-butylester)]-2,3-dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon* (**3c**): 0.5 g der *Benzyloxycarbonylverbindung* **14** wurden in 5 ccm Chloroform + 50 ccm Methanol über Pd-Mohr in üblicher Weise hydriert. Aus Benzol/Petroläther (30–50°) erhielt man 0.3 g (78%) vom Schmp. 138–138.5°.

C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>7</sub> (503.5) Ber. C 69.17 H 5.81 N 2.78 Gef. C 68.93 H 5.81 N 2.71



### Oxydative Phosphorylierungen

Die Oxydationsansätze wurden prinzipiell in derselben Weise vorgenommen, wie in den früheren Abhandlungen (s. z. B. I. c.<sup>3)</sup>) beschrieben ist. In Abweichung davon wurden bessere ATP-Ausbeuten erhalten, wenn man zur Herstellung der TBA-Salze in wäßr. Lösung arbeitet und das Brom nicht, wie in I. c.<sup>3)</sup> unverdünnt, sondern in Pyridin (0.014 ccm in 1 ccm) zutropft und nach erfolgter Oxydation den Abdampfrückstand mit 0.5 ccm Methanol, danach mit 0.3 ccm Wasser aus dem Reaktionsgefäß herauslöst und mit Methanol auf 2 ccm auffüllt.

*Oxydative Bildung von [<sup>32</sup>P]Acetylphosphat:* 0.2 ccm einer salzsauren [<sup>32</sup>P]Orthophosphorsäure-Lösung (1.2 µC) wurden in einem 50-ccm-Rundkolben i. Vak. eingedampft, dann wurden 0.87 ccm einer 0.115 *m* Phosphorsäure-Lösung in Dioxan und 2.0 ccm 0.1 *m* Tetra-butylammoniumhydroxid in Isopropylalkohol zupipettiert und i. Vak. eingedampft. Nach Trocknen über Nacht im Ölpumpenvakuum über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> wurde die Lösung des Rückstandes in 4.0 ccm Acetonitril mit 20.8 mg *O*-Acetyl-tetramethylhydrochinon (**1a**) versetzt, und nach Auflösen unter Rühren und Eiskühlung 1.0 ccm einer 0.25 *m* Brom-Lösung in Acetonitril zutropft. Nach 30 Min. trug man 0.01 ccm davon mit der Kapillarpipette als 3 cm langen Startstrich auf eine 20 × 20 cm-Cellulosedünnschichtplatte auf. Diese war 0.5 mm dick mit feuchtem Cellulosepulver (MN 300, Macherey & Nagel) beschichtet, getrocknet und dann mit einer Puffermischung vom pH 1.9 (Ameisensäure/Essigsäure/Wasser 50 : 150 : 880 Vol.) besprüht worden. Dann wurde mit Platinbandelektroden auf gut gekühlter Unterlage des Elektrophoreseapparates (Pherograph, Frankfurt, Fa. Hormuth Inh. Vetter, Wiesloch) eine Spannung von 1000 V angelegt. Nach 45 Min. waren bei 40 mA Orthophosphat 4 cm und Acetylphosphat 7.0 cm zur Anode gewandert. Die Streifen konnten mit dem Molybdatreagens<sup>14)</sup>, der des Acetylphosphats auch mit Hydroxylamin, dann Eisen(III)-chlorid-Lösung sichtbar gemacht werden. Die Auszählung mit dem Dünnschicht-Scanner (Dr. Bertold) ergab für das Acetylphosphat 6% der gesamtregistrierten Radioaktivität.

In Tab. 2 sind die *R<sub>F</sub>*-Werte der beschriebenen Verbindungen zusammengestellt.

Tab. 2. *R<sub>F</sub>*-Werte der beschriebenen Verbindungen auf Kieselgel. SiF-Fertigplatten (Riedel-de Haën) in Chloroform (A) und Benzol/Dioxan/Eisessig (90 : 25 : 4 Vol.) (B)

Verbindung	A	B	Verbindung	A	B
Durochinon	0.35		4		0.24
Durohydrochinon		0.58	5		0.37
1a	0.10	0.57	6	0.27	
1b		0.15	7	0.61	
Aurantiogliocladin	0.18	0.61	8	0.32	
2a	0.11	0.57	9	0.16	0.64
2b		0.17	10	0.19	0.64
2.3-Dimethyl- $\alpha$ -naphthochinon	0.36	0.71	11	0.14	0.60
3a	0.08	0.57	12	0.43	0.72
<i>O,O'</i> -Diacetyl-2.3-dimethyl- $\alpha$ -naphthohydrochinon	0.18	0.62	13		0.23
3b		0.14	14	0.08	0.68
3c	0.01	0.55			

Die Substanzflecken wurden mit tert.-Butylhypochlorit, dann Tolidin nach *R. H. Mazur* u. a., *J. biol. Chemistry* **237**, 1619 (1962), mit blauer bis brauner Farbe sichtbar gemacht.

<sup>14)</sup> *C. S. Hanes* und *F. A. Isherwood*, *Nature* [London] **104**, 1107 (1949).