

Von Zuckern abgeleitete freie Radikale*

(6. Mitt. über Verdazyle)

Von

R. Kuhn und **Gertrude Fischer-Schwarz**

Aus dem Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Institut für Chemie,
Heidelberg

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 5. Februar 1966)

Ausgehend von Zuckerformazanen wurden wasserlösliche grüne Verdazyle dargestellt. Diese freien Radikale hemmen die Wasserstoffperoxidzerersetzung durch Katalase und durch Platinmohr.

Formazanes of aldoses have been used to prepare water soluble green verdazyles. These free radicals inhibit the decomposition of hydrogen peroxide by means of catalase and platinum black.

Von *Kuhn* und *Trischmann*^{1,2} wurden freie stabile Radikale der Formel **1** (Verdazyle) durch Ringschluß aus Formazanen dargestellt. In saurer Lösung disproportionieren die grünen Radikale zu den Leukoverbindungen **2** und den violetten Kationen **3**. (Siehe Formel S. 518).

Zur Prüfung auf etwaige biologische Wirksamkeit waren wasserlösliche Verdazyle erwünscht. Als Ausgangsprodukt hierzu boten sich die Zuckerformazane³ an.

Darstellung

Ringschlußversuche mit Pentose- und Hexoseformazanen unter Verwendung von Methyljodid ergaben uneinheitliche grüne Reaktions-

* Vorgetragen am Institut für die Chemie der organischen Naturstoffe der Sowjetischen Akademie der Wissenschaften in Moskau am 21. November 1963.

¹ *R. Kuhn* und *H. Trischmann*, *Angew. Chem.* **75**, 294 (1963).

² *R. Kuhn* und *H. Trischmann*, *Mh. Chem.* **95**, 457 (1964).

³ *L. Mester*, *Adv. Carbohydr. Chem.* **13**, 105 (1958).

produkte, da auch die OH-Gruppen teilweise methyliert wurden. Mit Formaldehyd erhielten wir sowohl im sauren als auch im alkalischen Medium Gemische verschieden stark mit Formaldehyd in den Zucker-

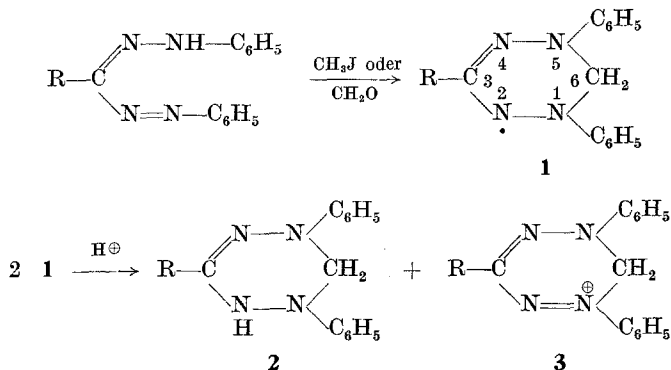


Tabelle 1. Aus Zuckerformazanen dargestellte Verdazyle der Formel 1

Acetylverbindungen		Schmp., °C
1 a	R = D-galacto-Pentaacetoxy-pentyl	85—86
1 b	R = D-manno-Pentaacetoxy-pentyl	70—71
1 c	R = D-gluco-Tetraacetoxy-hydroxy-pentyl	90—92 *
1 d	R = L-rhamno-Triacetoxy-hydroxy-pentyl	70—72 *
1 e	R = D-arabo-Triacetoxy-hydroxy-butyl	56—58 *
1 f	R = D-xylo-Triacetoxy-hydroxy-butyl	66—67 *

Verdazyle mit freien OH-Gruppen		Schmp. (Zers.) °C
1 g	R = D-galacto-Pentahydroxy-pentyl	79—80
1 h	R = D-manno-Pentahydroxy-pentyl	99—100
1 i	R = D-gluco-Pentahydroxy-pentyl	79—81
1 j	R = L-rhamno-Tetrahydroxy-pentyl	79—80
1 k	R = D-arabo-Tetrahydroxy-butyl	81—82
1 l	R = D-xylo-Tetrahydroxy-butyl	60—62

* Stellung der Acetoxygruppen unbekannt.

ketten kondensierter Verdazyle. Hingegen setzten sich acetylierte Zuckerformazanen^{4,5} im schwach sauren Medium mit Formaldehyd zu den acetylierten Kationen (3) um, die mit Ammoniak die freien Radikale (1; R = Tetrahydroxybutyl, Pentahydroxy-pentyl) ergaben. Im Alkali-

⁴ G. Zemplén, L. Mester, A. Messmer und E. Eckhardt, Acta chim. Acad. Sci. Hung. **2**, 25 (1952).

⁵ L. Mester und A. Major, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4297 (1955).

schen gelang der Ringschluß mit den acetylierten Formazanen nicht, da teilweise Acetylgruppen abgespalten wurden und uneinheitliche Produkte entstanden.

Die ausgehend von Galaktose, Mannose, Glucose, L-Rhamnose, D-Arabinose und D-Xylose dargestellten acetylierten Zuckerverdazyle **1a**—**1f** wurden kristallin erhalten. Sie ergaben bei der Entacetylierung sowohl mit ammoniakal. Methanol als auch nach *Zemplén* die gewünschten Verdazyle **1g**—**1i**, die aber im Gegensatz zu den Acetylderivaten amorph blieben. Eine Übersicht über die dargestellten Zuckerverdazyle vermittelt Tab. 1.

Mit Acetanhydrid in Pyridin ließ sich das freie Radikal **1g** in die Acetylverbindung **1a** zurückverwandeln (Mischprobe, IR-Spektrum).

Eigenschaften

Die Löslichkeit der Radikale **1g** bis **1i** in Wasser ist gering (ca. 1 mMol pro Liter). Natriumdithionit, Zinkstaub + Eisessig, Ascorbinsäure, Schwefelwasserstoff oder katalytische Hydrierung mit Palladium bringen sowohl die grüne Farbe der Radikale als auch die violette Farbe der Kationen zum Verschwinden. Die farblosen Lösungen werden durch Luftsauerstoff rasch wieder zu den grünen bzw. violetten Verbindungen autoxydiert. Die Kationen **3** bilden sich aus den Verdazylen **1** entweder mit Halogen (Brom, Jod) oder mit Säuren. Die prozentuale Zusammensetzung (Kation/Radikal) als Funktion des pH ließ sich spektrophotometrisch bestimmen. Aus Abb. 1 ist ersichtlich, daß im pH-Bereich von 4 bis 7 alle 3 Oxydationsstufen **1**, **2** und **3** nebeneinander vorliegen. Der pH-Wert, bei dem 50% des eingesetzten Radikals in der grünen Form vorliegen, beträgt ca. 6,2. Dieser pK-Wert drückt die geringe Basizität (Protonenaffinität) des Radikals zahlenmäßig aus.

Die *ESR*-Spektren der Verdazyle **1a** bis **1i** zeigen das charakteristische 9-Linienspektrum des Triphenylverdazyls mit demselben *Garß*-Abstand.

Die UV-Maxima der Verdazyle **1a** bis **1i** liegen alle an derselben Stelle wie diejenigen von 1,5-Diphenylverdazyl ($\lambda_{\max} = 670, 342, 312 \text{ m}\mu$). Entsprechendes trifft für die Kationen **3a** bis **3i** zu ($\lambda_{\max} = 510 \text{ m}\mu$).

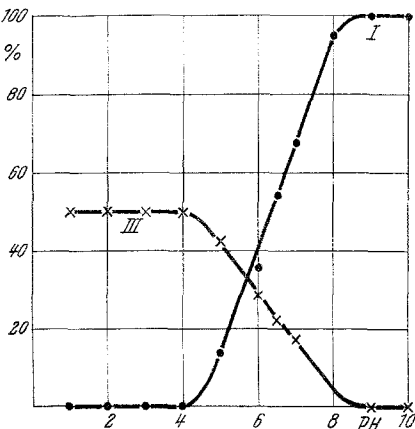


Abb. 1. Prozentgehalt an **1** (Radikal) und **3** (Kation) in wäßrigen Lösungen von D-galaktopentahydroxypentyl-1,5-diphenylverdazyl (**1g**) bei verschiedenen pH-Werten. Die auf $t = 0$ Min. extrapolierten Extinktionen betragen, wenn nur Kation oder nur Radikal vorlag, für das Kation $E_{510} = 0,88$ (100%) und $E_{670} = 0,06$ (0%); für das Radikal $E_{510} = 0,08$ (0%) und $E_{670} = 0,28$ (100%)

Obwohl die nicht kristallisierten, freien Zuckerverdazyle bei der Elementaranalyse stimmende Werte lieferten, betrug die molare Extinktion der Lösungen nur ca. 50% (maximal 73%) derjenigen, die auf Grund der ϵ -Werte des kristallisierten 1,5-Diphenylverdazyls zu erwarten war.

Auch bei der katalytischen Hydrierung wurden nur ca. 50% (maximal 68%) der erwarteten H_2 -Menge aufgenommen. Die Präparate verhielten sich wie Gemische der Radikale und ihrer Leukoverbindungen. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung wurde gefunden, daß eine grüne wäßrige

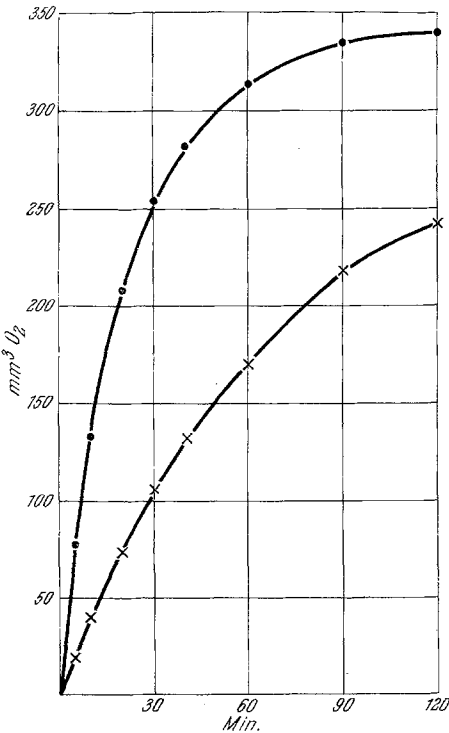


Abb. 2

Abb. 2. H_2O_2 -Zersetzung durch Katalase mit (×) und ohne (·) Radikal 1 g bei pH 7,6 bei 4° C. Versuchsbedingungen wie Abb. 3. An Stelle der Platinmohr-Suspension 0,20 ml Katalase-Lösung (1:40 000)

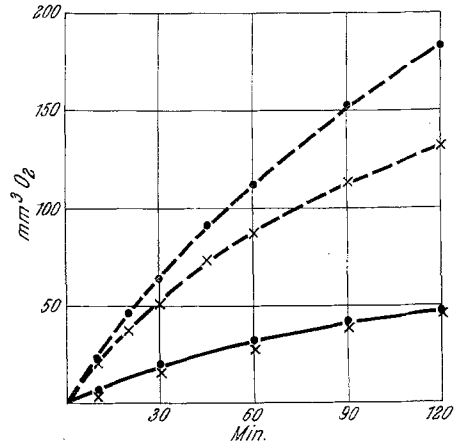


Abb. 3

Abb. 3. H_2O_2 -Zersetzung durch Platinmohr mit (×) und ohne (·) Radikal (1 g) bei pH 4 (—) und bei pH 7,6 (---). Die bei pH 4 vorliegenden Kationen hemmen nicht. Temp.: 4° C. Ordinaten: $mm^3 O_2$. Je 6,30 ml 0,30proz. H_2O_2 + 2,50 ml $m/50$ Acetat- (pH 4) bzw. $m/50$ Phosphatpuffer (pH 7,6) + 0,20 ml Platinmohr-Suspension + 0,20 ml Wasser bzw. wäßrige Lösung von 25 γ Radikal 1 g

Lösung von D-galacto-Verdazyl nach dem Ansäuern mit verd. Mineralsäure und Stehen an der Luft eine um 30—40% stärkere Violettfärbung gibt als sie in Parallelversuchen mit einer „gleich grünen“ Lösung von 1,5-Diphenylverdazyl erhalten wurde. (Unter diesen Bedingungen würde nicht nur die durch Disproportionierung des galacto-Verdazyls entstandene, sondern auch die im Präparat bereits enthaltene Leukoverbindung in das Kation übergehen.) Schüttelte man die saure violette Lösung mit Silberpulver (Riedel de Haën), so waren wiederum nur ca. 70%

der erwarteten Grünfärbung spektralphotometrisch feststellbar. Dieselben Resultate wurden erhalten, wenn das Verdazyl **1g** nicht mit verd. Mineralsäure, sondern mit Jod in das Kation verwandelt wurde, und wieder Molekularsilber zur Rückverwandlung in das Radikal verwendet wurde. 1,3,5-Triphenyl-verdazyliumjodid (und -bromid) lassen sich, wie wir fanden, in Methanol mit Molekularsilber zu 100% in das Radikal zurückverwandeln.

Die Verdazyle **1a** bis **1g** drehen die Ebene des polarisierten Lichtes nicht meßbar. Während Galaktose-phenylhydrazon und -diphenylformazan bei 500 und 600 m μ reproduzierbare Drehwerte lieferten, die bei Versetzen mit Boraxlösung auf das 10-fache anstiegen, zeigt das Verdazyl **1g** auch nach Zusatz von Borax keine optische Aktivität. Ebenso verhält sich das Kation **3g**. Gemessen wurde mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 mit einem Zeiß-Doppelmonochromator MM 12 und einer Xenon-Hochdrucklampe jeweils im Minimum der Absorptionskurve (500 m μ für das Radikal bzw. 600 m μ für das Kation); α war kleiner als $\pm 0,006^\circ$ ($c = 0,05$, $d = 1$, Methanol). Flavine, in denen ebenfalls Polyhydroxyalkylketten der Zuckerreihe mit einem Chromophor verbunden sind, zeigen meist hohe optische Aktivität. Vielleicht hängt das unmeßbar geringe Drehungsvermögen der Zuckerverdazyle damit zusammen, daß das radikalische Zentrum intramolekular freie CHOH-Gruppen dehydriert (reversibel), was zu sterisch uneinheitlichen (nicht kristallisierenden), nur wenig drehenden und Leukoverbindungen enthaltenden Produkten führen könnte.

Die Wasserstoffperoxid-Zersetzung durch Katalase wird von 3-D-galacto-Pentahydroxypentyl-1,5-diphenyl-verdazyl (**1g**) gehemmt. Bei 4° und 25° fanden wir eine Hemmung um etwa 40% (Abb. 2). Um etwa den gleichen Prozentsatz wird die H₂O₂-Zersetzung durch Platinmohr von **1g** gehemmt (Abb. 3). Das Kation **3g** hingegen hemmt nicht.

Herrn W. Schulz sind wir für zahlreiche manometrische Messungen der H₂O₂-Zersetzung sehr zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil

3-[D-galacto-Pentaacetoxy-pentyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1a**)

1. 500 mg C-[D-galacto-Pentaacetoxy-pentyl]-N,N'-diphenylformazan (Pentaacetyl-galaktoseformazan)⁴ werden in 40 ml Methanol gelöst und mit 2 g KHSO₄ und 8 ml 30proz. Formaldehyd versetzt. Man erhitzt 10 Min. zum Sieden, wobei sich die dunkelrote Lösung tiefviolett färbt. Nach Abfiltrieren des ungelösten KHSO₄ versetzt man mit 25 ml 2 n-NH₃ und gießt in 1 ml Wasser. Man läßt 24 Stdn. stehen, wobei 270 mg **1a** (51%) vom Schmp. 85—86° kristallin ausfallen; λ_{\max} (log ϵ) = 670 m μ (3,60).

C₂₉H₃₃N₄O₁₀ (597,8). Ber. C 58,25, H 5,52, N 9,36, OAc 36.

Gef. C 58,23, H 5,61, N 9,31, OAc 36,17.

Molgew. (Mechrolab, in Methanol) 605.

2. 3 g C-[D-*galakto*-Pentahydroxypentyl]-N,N'-diphenyl-formazan (Galaktoseformazan) wurden nach *Zemplén*⁴ peracetyliert. Das rohe Pentaacetylformazan (wiederholt mit Wasser gewaschenes Öl, das zuletzt erstarrt) wurde in 200 ml Methanol gelöst und mit 15 g KHSO₄ und 50 ml 30proz. Formaldehyd versetzt. Die Umsetzung analog 1) lieferte 1,8 g **1 a** (38%, bez. auf Formazan). Ausb. bei Reinisolierung des Pentaacetylformazans 37,5% (1. Stufe 75%, 2. Stufe 50%).

3. 600 mg **1 g** wurden in 10 ml Pyridin gelöst und mit 6,6 ml Ac₂O 48 Stdn. stehen gelassen. Die Lösung wurde mit 50 ml 2 n-NH₃ versetzt und in 400 ml Wasser gegossen. Nach 12 Stdn. wurden 520 mg **1 a** (58%) abgesaugt; identisch mit nach 1. oder 2. dargestelltem **1 a** (Mischprobe, IR-Spektrum).

3-[D-*manno*-Pentaacetoxy-pentyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 b**)

3 g C-[D-*manno*-Pentahydroxypentyl]-N,N'-diphenyl-formazan (Mannoseformazan) wurden nach *Mester*⁵ acetyliert. Das ölige Rohprodukt wurde in 80 ml Methanol gelöst und mit 12 g KHSO₄ und 50 ml 30proz. Formaldehyd [analog **1 a**, 2.] umgesetzt. Ausb. 1,3 g (28%) **1 b**, Schmp. 70—71°. λ_{max} (log ε) = 670 mμ (3,53).

C₂₉H₃₃N₄O₁₀ (597,8). Ber. C 58,25, H 5,52, N 9,36, OAc 36.
Gef. C 58,38, H 5,26, N 9,58, OAc 36,4.
Molgew. 638 (Mechrolab, in Methanol).

3-[D-*gluco*-Tetraacetoxy-hydroxy-pentyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 c**)

3 g C-[D-*gluco*-Pentahydroxypentyl]-N,N'-diphenyl-formazan (Glucoseformazan) wurden in 18 ml Pyridin gelöst und mit 12 ml Ac₂O 48 Stdn. bei Zimmertemp. stehen gelassen. Die Lösung wurde in 1 l Wasser gegossen, wobei das acetylierte Formazan ölig erstarrte. Es wurde wiederholt mit Wasser gewaschen, dann in 200 ml Methanol gelöst und mit 15 g KHSO₄ und 50 ml 30proz. Formaldehyd [wie **1 a**, s. 1.] umgesetzt. Ausb. 1,35 g (30%) **1 c**, Schmp. 90—92° [λ_{max} (log ε) = 670 mμ (3,56)]. Der Acetylbestimmung nach enthielt das Radikal nicht 5 sondern nur ca. 4 Acetylgruppen.

C₂₇H₃₁N₄O₉ (555,5). Ber. C 58,5, H 5,6, N 10,05, OAc 31,0.
Gef. C 58,7, H 5,5, N 9,87, OAc 27,9.
Molgew. (Mechrolab, in Methanol) 540.

Die Darstellung der acetylierten Verdazyle **1 d**, **e**, **f**, erfolgte analog **1 c**, ausgehend von je 3 g Zuckerformazan.

3-[L-*manno*-Triacetoxy-hydroxy-pentyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 d**). Ausb. 2,1 g (52%), Schmp. 70—72°.

C₂₅H₂₉N₄O₇. Ber. C 60,03, H 5,63, N 11,2, OAc 26,0.
Gef. C 60,93, H 5,95, N 11,63, OAc 26,98.

3-[D-*arabo*-Triacetoxy-hydroxy-butyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 e**): Ausb. 1,35 g, Schmp. 56—58°.

C₂₄H₂₄N₄O₆. Ber. C 60,8, H 5,60, N 11,6, OAc 26,8.
Gef. C 61,0, H 5,8, N 11,59, OAc 26,4.

3-[D-xylo-Triacetoxy-hydroxy-butyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 f**): Ausb. 1,4 g, Schmp. 66—67°.

$C_{24}H_{24}N_4O_6$. Ber. C 60,8, H 5,60, N 11,6, OAc 26,8.
Gef. C 60,89, H 5,76, N 11,69, OAc 26,64.

Abspaltung der Acetylgruppen

3-[D-galacto-Pentahydroxypentyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 g**)

1. 500 mg **1 a** wurden in 100 ml ammoniakal. Methanol* gelöst und 24 Stdn. bei Zimmertemp. stehen gelassen. Dann wurde i. Vak. abdestilliert, das Verdazyl aus dem Rückstand mit Essigester herausgelöst und mit Benzin (60—70°) gefällt. Nach 12 Stdn. wurden 260 mg **1 g** (80%), Zersp. 79—80°, abgesaugt; λ_{\max} (log ϵ) = 670 m μ (3,32).

$C_{19}H_{23}N_4O_5$ (387,5). Ber. C 58,98, H 5,96, N 14,5.
Gef. C 58,5, H 5,84, N 14,7.
Molgew. (Mechrolab, in Methanol) 402.

2. 500 mg **1 a** wurden in 30 ml absol. Äthanol gelöst. Zur erkalteten Lösung wurden 5 ml Natriummethylatlösung (aus 0,05 g Na) unter Rühren zugegeben. Nach 5 Stdn. wurde auf 5 ml eingeeengt und über ca. 25 cm³ Austausch IR 120 (H⁺) geschickt. Dann ließ man die schmutzgrüne Lösung über alkalischen Austauscher MIH laufen. Die nun tiefgrüne Lösung wurde i. Vak. verdampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit Benzin 210 mg (65%) **1 g** gefällt. Identisch mit nach 1. dargestelltem **1 g** (Mischprobe, IR-Spektrum).

Die Darstellung der Zuckerverdazyle **1 h**, **i**, **j**, **k**, **l** erfolgte analog **1 g** [1.], ausgehend von je 1 g acetyliertem Verdazyl (**1 b** bis **f**).

3-[D-manno-Pentahydroxypentyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 h**): Ausb. 360 mg (56%), Zersp. 99—100°; λ_{\max} (log ϵ) = 670 m μ (3,39).

$C_{19}H_{23}N_4O_5$ (387,5). Ber. C 58,98, H 5,96, N 14,5.
Gef. C 58,57, H 6,06, N 14,62.
Molgew. (Mechrolab, in Methanol) 367.

3-[D-gluco-Pentahydroxypentyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 i**): Ausb. 400 mg (57%), Zersp. 79—81°; λ_{\max} (log ϵ) = 670 m μ (3,305).

$C_{19}H_{23}N_4O_5$. Ber. C 58,98, H 5,96, N 14,5.
Gef. C 58,81, H 6,03, N 14,33.

3-[L-rhamno-Tetrahydroxypentyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 j**): Ausb. 410 mg (49%), Zersp. 79—80°.

$C_{19}H_{23}N_4O_4$. Ber. C 61,2, H 6,19, N 15,01.
Gef. C 61,09, H 6,23, N 15,63.

* Methanol bei 0° mit NH₃-Gas gesättigt, dann mit dem gleichen Volumen Methanol verdünnt.

⁶ G. Zemplén und A. Kunz, Ber. dtsh. chem. Ges. **56**, 1705 (1923).

⁷ H. U. Bergmeyer, Biochem. Z. **327**, 255 (1955).

3-[D-*arabo*-Tetrahydroxybutyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 k**): Ausb. 500 mg (89%), Zersp. 81—82°.

$C_{18}H_{21}N_4O_4$. Ber. C 60,05, H 5,88, N 15,7.
Gef. C 59,69, H 5,84, N 15,72.

3-[D-*xylo*-Tetrahydroxybutyl]-1,5-diphenyl-verdazyl (**1 l**): Ausb. 460 mg (82%), Zersp. 60—62°.

$C_{18}H_{21}N_4O_4$. Ber. C 60,05, H 5,88, N 15,7.
Gef. C 60,22, H 5,96, N 15,4.

Die UV-Spektren wurden in Wasser am Spektrophotometer Cary, Modell 14, bei Konzentrationen von 10^{-4} Mol/l und einer Schichtdicke von 1 cm bei 27° gemessen.