

REDOX-CHARAKTERISTIK VON 3,5-DI-TERT-BUTYL-4-HYDROXIBENZYLIDENMALONITRIL

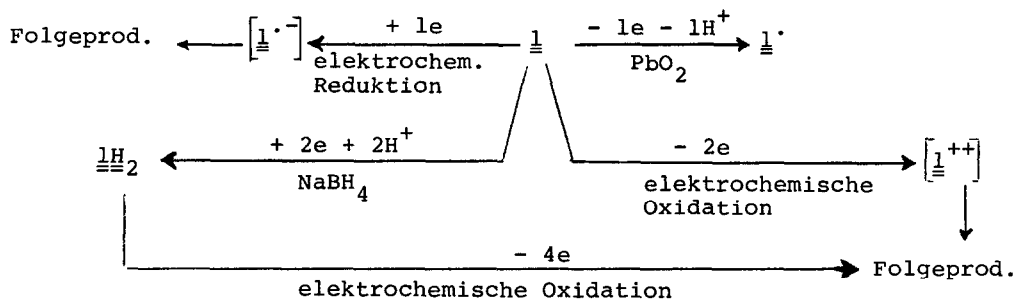
J. Rieser<sup>\*\*</sup>, G. Abou-Elenien, K. Wallenfels<sup>\*</sup>

Chemisches Laboratorium der Universität, Albertstr. 21, D-78 Freiburg (Germany)

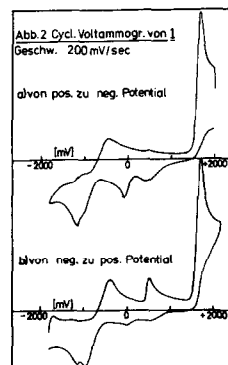
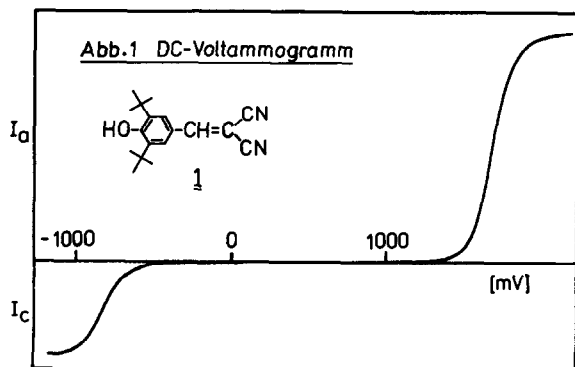
<sup>\*\*</sup>Jetzige Adresse: F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., CH-4002 Basel (Switzerland)

(Received in Germany 26 July 1977; received in UK for publication 5 August 1977)

Benzylidenmalonitril und seine Derivate sind Verbindungen vielfältiger biologischer Aktivität. Die Stammverbindung selbst und insbesondere ihre Halogenderivate sind Reizstoffe der Schleimhäute von Mund, Nase und Augen. Chemisch sind sie dadurch charakterisiert, dass sie in nichtenzymatischer Reaktion durch hydridliefernde Verbindungen, d.h. komplexe Hydride oder Dihydropyridine geeigneten Potentials zu den lachrymatorisch unwirksamen Benzylmalonitrilen reduziert werden <sup>1)</sup>. In Erythrozyten wurde ein Enzym gefunden, das diese Reduktionen durch NAD(P)H katalysiert <sup>1)</sup>. Die 4-Hydroxiderivate erwiesen sich als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien und der cyclischen Phosphorylierung in Chloroplasten <sup>2,3)</sup>. Die bislang wirksamste Verbindung ist das 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxibenzylidenmalonitril (1) <sup>3)</sup>. Es ist wie das 2,4-Dinitrophenol ein Phenol hoher Acidität. Wie die Elektronenspektren zeigen, reicht schon die Basizität von Methanol oder Äthanol aus, um 1 teilweise zum intensiv gelb gefärbten, mesomeriestabilisierten Anion zu deprotonieren <sup>4,5)</sup>. Möglicherweise hängt mit dieser Acidität die biologische Wirkung als Entkoppler zusammen, wenn in der lipophilen Phase der Mitochondrienmembran in Zusammenhang mit dem Elektronentransport Protonen translociert werden <sup>6)</sup>. 1 ist aber auch ein bemerkenswertes Redoxsystem. Es liegt nahe zu vermuten, dass Verbindungen, welche die Elektronenübertragung von der ATPase-abhängigen Phosphorylierung abzutrennen vermögen, mit diesem Redoxsystem interferieren. Daher war es interessant, 1 in seinem Redoxverhalten zu charakterisieren. Im folgenden Schema sind die bisher durchgeführten Reaktionen zusammengefasst.

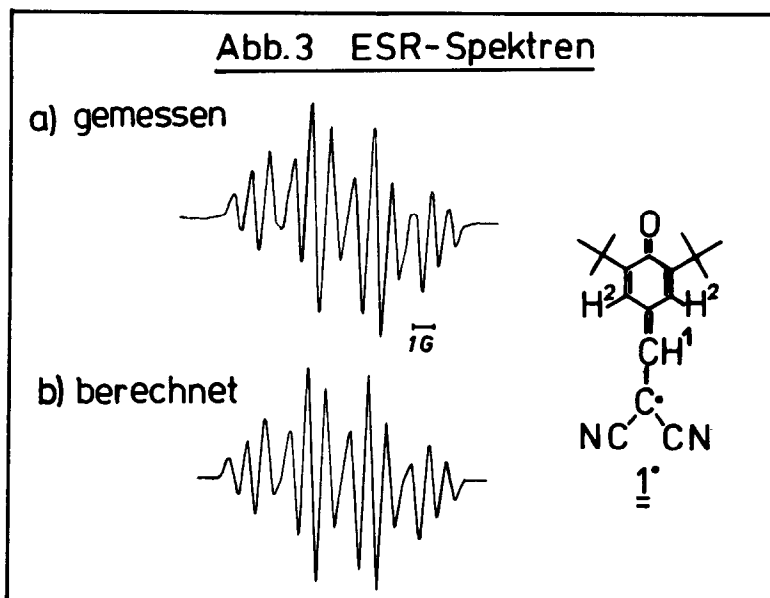


Die elektrochemischen Messungen wurden in trockenem Benzonnitril (BN) oder Acetonitril (AN) mit tetra-Butylammoniumperchlorat als Leitsalz durchgeführt. Die Arbeitselektrode war eine rotierende (DC-Voltammetrie) bzw. stationäre (Cycl. Voltammetrie) Pt-Scheibenelektrode von 1.3 mm Durchmesser, bei der Coulometrie ein Pt-Blech von 5 cm<sup>2</sup> Oberfläche. Als Gegenelektrode diente ein Pt-Draht im jeweiligen Lösungsmittel und als Referenzelektrode Ag/AgCl (in BN bzw. AN, N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl ges.) mit einem Potential gegen Kobaltocinium/Kobaltocen von -743 mV<sup>7)</sup>. Die Pt-Scheibenelektrode belegt sich sehr schnell, sie wurde vor jeder Messung sorgfältig geschliffen und poliert. Die Depolarisatorkonzentration war 10<sup>-2</sup>-10<sup>-3</sup> mol/l. Abb. 1 zeigt die Strom-Spannungskurve der voltammetrischen Oxidation und Reduktion von 1 in AN. Man erhält jeweils nur eine Welle, wobei die Oxidationsstufe doppelte Höhe zeigt. Die Halbstufenpotentiale liegen bei E<sub>1/2</sub><sup>Red</sup> = -1090 mV (BN: -1140 mV) und E<sub>1/2</sub><sup>Ox</sup> = 1847 mV (BN: 1777 mV). Oxidation und Reduktion sind irreversibel, die logarithmische Analyse nach Tomeš<sup>8)</sup> ergibt Geraden mit S-Werten von 112 mV (Red) und 137 mV (Ox). Die cycl. Voltammogramme zeigen bei hohen Geschwindigkeiten (Abb. 2 in AN) elektrochemisch aktive Folgeprodukte (AC-Mechanismus). Die Peaks verschwinden nach wenigen Cyclen.



Die Coulometrische Analyse zeigte, dass die Reduktionsstufe einem Einelektronen-, die Oxidationsstufe einem Zweielektronenübergang zuzuordnen ist. Im Verlauf der Coulometrie treten charakteristische Farbänderungen auf. Die zunächst schwach gelbe Ausgangslösung wird bei der Reduktion gelbbraun, bei der Oxidation zunächst blaugrün, dann gelbgrün und schliesslich intensiv gelb. Das entstehende Reduktionsprodukt wird in einer Stufe mit dem Halbstufenpotential von 660 mV (BN) wieder oxidiert, das Oxidationsprodukt ebenfalls in nur einer Welle mit  $E_{1/2} = -317$  mV (BN) wieder reduziert.

Bei Zugabe von aktivem Bleidioxid zu 1 in Dichlormethan färbt sich die Lösung zunächst blau, dann grün und schliesslich gelb, ein einheitliches Oxidationsprodukt konnten wir bislang nicht isolieren (DC-Chromatogramm 4 - 8 Spots). Wird 1 in Toluol unter  $N_2$  bei Raumtemperatur nur kurzzeitig (2-5 min) mit  $PbO_2$  behandelt, so lässt sich in der Lösung eine paramagnetische Substanz nachweisen. Man erhält bei Raumtemperatur ein ESR-Spektrum mit Hyperfeinstruktur (Abb. 3a)), nach welchem dem Monoradikal <sup>9)</sup> die Struktur 1<sup>\*</sup>, mit der grössten Elektronendichte am Dicyanmethylenkohlenstoff, zugeordnet werden kann. In Abb. 3b) ist das simulierte Spektrum dargestellt, berechnet mit den Kopplungskonstanten  $a_N = 0.85G$ ,  $a_{H^1} = 2.80G$ ,  $a_{H^2} = 2.13G$  und der Halbwertsbreite 0.45G. Als Verbreiterungsfunktionen wurden Gausskurven verwendet.



Das Radikal ist in Lösung recht stabil, nach 4 h Stehen bei Raumtemperatur erhält man ein ESR-Spektrum gleicher Intensität. Wird dagegen die Lösung wieder mit  $\text{PbO}_2$  in Kontakt gebracht, so tritt weitere Oxidation zu diamagnetischer Substanz ein. Nach ca. 60 min Schütteln ist weder bei Raumtemperatur noch bei  $-180^\circ\text{C}$  ein ESR-Signal festzustellen.

Bei der Reduktion von  $\underline{\underline{1}}$  mit  $\text{NaBH}_4$  in 2-Propanol/ $\text{H}_2\text{O}$  werden im Gegensatz zur elektrochemischen Reduktion zwei Elektronen und zwei Protonen unter Bildung von 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzylmalonitril ( $\underline{\underline{1H}_2}$ ) übertragen. Nach Extraktion mit Äther, Kristallisation aus Heptan und Trocknung ( $60^\circ\text{C}/\text{HV}/10\text{h}$ ) ist die Substanz analysenrein (F:  $139-140^\circ\text{C}$ ;  $R_f$  in Benzol/n-Heptan/Acetonitril (3:2:1): 0.39 und in Benzol/Methanol (9:1): 0.25; Elektronenspektrum (Doppelbande):  $\lambda = 278.5$  und  $272.5$  nm in Äthanol und  $\lambda = 277$  und  $270.5$  nm in Dichlormethan).  $\underline{\underline{1H}_2}$  wird elektrochemisch in einer einzigen Vierelektronenstufe ( $\text{BN}:E_{1/2} = 1777$  mV) zum gleichen Produkt wie  $\underline{\underline{1}}$  oxidiert. Die farblose Lösung wird zunächst schwach gelb und durchläuft dann die gleichen Farbstufen wie  $\underline{\underline{1}}$  (Reduktion des Oxidationsproduktes wie bei  $\underline{\underline{1}}$  mit  $E_{1/2} = -317$  mV).

Wir danken dem Bundesministerium des Innern für die finanzielle Unterstützung. Weiterhin gilt unser Dank Herrn Doz. Dr.Bäuerlein, Heidelberg, für die Überlassung einer Probe von 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidenmalonitril und Herrn Dr.Kothe, Freiburg, für die Aufnahme und Diskussion der ESR-Spektren.

#### Literatur

- 1) K.Wallenfels, W.Ertel, A.Höckendorf, J.Rieser und K.H.Ueberschär, Naturw. 62, 459 (1975)
- 2) C.R.Bovell, L.Packer und G.R.Schonbaum, Arch.Biochem.Biophys. 104, 458 (1964)
- 3) S.Muraoka und H.Terada, Biochim.Biophys.Acta 275, 271 (1972)
- 4) D.Lauerer, M.Coenen, M.Pestemer und G.Scheibe, Z.Phys.Chem. (NF) 10, 236 (1957)
- 5) H.Terada, Biochim.Biophys.Acta 387, 519 (1975)
- 6) P.Mitchell, FEBS Lett. 78, 1 (1977)
- 7) W.Sümmermann, Dissertation, Freiburg 1969
- 8) J.Tomeš, Coll.Czech.Chem.Comm. 9, 12 (1937)
- 9) Zur Radikalbildung vergl. E.Müller, R.Mayer, H.D.Spanagel und K.Scheffler, Liebigs Ann.Chem. 645, 53 (1961) und W.Espersen und R.W.Kreilick, J.Phys.Chem. 73, 3370 (1969)