

Radiation Chemistry of DNA Model Compounds. Part II *
Alkyl Phosphate Cleavage of Aliphatic Phosphates induced by Hydrated Electrons and by OH Radicals

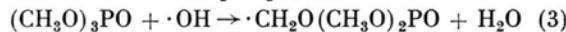
C. v. SONNTAG, G. ANSORGE, A. SUGIMORI, T. OMORI,
 G. KOLTZENBURG u. D. SCHULTE-FROHLINDE
 Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Abt. Strahlenchemie
 (Z. Naturforsch. 27 b, 471–472 [1972]; received January 31, 1972)

Our studies of the radiation chemistry of aqueous solutions of aliphatic phosphates have revealed details which might shed some light on the chemical mechanisms of radiation induced strand breaks in DNA and related compounds.

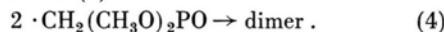
SCHOLES and WEISS have shown that during γ -radiolysis of aqueous solutions of nucleic acids¹ and of dihydrogen ethyl phosphate² in the presence of oxygen, labile phosphates are formed which readily hydrolyse. WILKINSON and WILLIAMS³ found inorganic phosphate after γ -radiolysis of disodium alkyl phosphates also in the absence of oxygen. They³ proposed the reaction sequence (1) and (2), leading to labile phosphates.



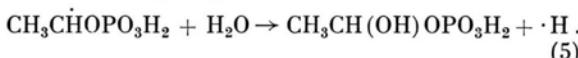
Our results show that this mechanism can be disregarded for kinetic reasons. Using pulse radiolysis techniques we measured the rate constant of OH attack on trimethyl phosphate (I), cf. reaction (3), and on sodium dimethyl phosphate (II) in N_2O -saturated solutions in competition with OH attack on CNS^- ($k = 7.5 \times 10^9 \text{ l mole}^{-1} \text{ s}^{-1}$, cf. ref.⁴) and found $k = 8 \times 10^7 \text{ l mole}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for both phosphates.



These data reveal stationary concentrations of OH radicals at dose rate levels attainable with ${}^{60}\text{Co}$ γ -radiation which are much too low to render reaction (2) competitive with reaction (1). The radical $\cdot\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_3\text{O})_2\text{PO}$ shows u.v. end absorption with $\epsilon = 480 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at $= 220 \text{ nm}$, and decays with a second order rate constant of $k = 2 \times 10^9 \text{ l mole}^{-1} \text{ s}^{-1}$, attributable to reaction (4).



An alternative mechanism for the formation of labile phosphate (reaction (5)), proposed as a step in the photolysis of dihydrogen ethyl phosphate⁵, must be rejected on energetic grounds.



A possibility, however, is the elimination of an alkyl group by dissociative electron capture, e.g. reaction (6).



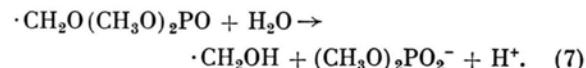
Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. D. SCHULTE-FROHLINDE, MPI für Kohlenforschung, Abt. Strahlenchemie, D-4330 Mülheim (Ruhr), Stiftstr. 34–36.

We determined the rate constant for reaction (6) by pulse radiolysis to be $2 \times 10^5 \text{ l mole}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Reaction (6) has been confirmed for neat I and for its aqueous solutions by product analysis and scavenger experiments^{6, 7}, and in part by e.s.r. measurements⁸. The reaction of $\cdot\text{e}^-$ with II is slower by at least three orders of magnitude, as we have shown by product analysis following ${}^{60}\text{Co}$ γ -irradiation⁹.

Starting material	Product (acid)	G (acid)	pH ^a	dose rate [eV/gh]
I $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{PO}$	$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{PO}_2^-$ ^b	0.8 ₀	11	40×10^{18}
		0.9 ₀	11	7×10^{18}
		1.5 ₀	11	1.2×10^{18}
		0.4 ₁	10	7×10^{18}
		0.1	7	7×10^{18}
II $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{PO}_2^-$	$\text{CH}_3\text{OPO}_3^{--b}$	0.9 ₀	11	7×10^{18}
		1.5 ₃	4	7×10^{18}
III $\text{CH}_3\text{OPO}_3^{--}$	PO_4^{---c}	0.7	8	20×10^{18}

Table 1. Initial G-values * of acid formation in the ${}^{60}\text{Co}$ - γ -radiolysis of aqueous N_2O saturated ($2.2 \times 10^{-2} \text{ M}$) solutions ($10^{-2}–5 \times 10^{-2} \text{ M}$) of trimethyl phosphate, sodium dimethyl phosphate, and disodium methyl phosphate at room temperature. * G-values (molecules produced per 100 eV energy absorbed) increased with increasing dose. Initial G-values are those extrapolated to zero dose. Total doses applied ranged from 3×10^{17} to $1.7 \times 10^{19} \text{ eV/g}$. a pH of the unirradiated solutions, b determined by titration with aqueous NaOH, c determined according to Woods and MELLON¹².

In aqueous solutions the solvated electron alone cannot be responsible for the scission of the alkyl phosphate linkage, as indicated by acid formation (acid as defined in table 1). In the absence of oxygen, and in the presence of N_2O which scavenges all electrons, a substantial amount of acid is formed during γ -radiolysis of aqueous solutions of I, II, and disodium methyl phosphate (III), cf. table 1. In the case of I neither N_2O nor the small amounts of H_2O_2 which are formed during the radiolysis are responsible for the formation of the acid⁷. Therefore, it is the attack of the OH radical on the substrate which must finally lead to the scission of the alkyl phosphate linkage. The primary step is the hydrogen abstraction e.g. reaction (3), a reaction which has been confirmed by e.s.r. measurements^{8, 10}. We suggest that reaction (3) is followed by a hydrolytic step (reaction (7) in the case of I), generating a hydroxymethyl radical and the corresponding acid.



* Part I: V. HARTMANN, C. v. SONNTAG u. D. SCHULTE-FROHLINDE, Z. Naturforsch. 25 b, 1394 [1970].

The rate of reaction (7) should depend on the pH of the solution according to the general acid base catalysis concept of ester hydrolysis. The increase found in G(acid) with increasing pH (cf. Table 1) is in agreement with this expectation. The occurrence of reaction (7) is further confirmed by the fact that with decreasing dose rate acid formation increases, (cf. Table 1), as would be expected from the competition of reaction (7) with reaction (4).

Recently BOPP and HAGEN¹¹ have shown that strand breaks in DNA in aqueous oxygen free solutions occur predominantly by deoxyribose phosphate cleavage at carbon 3 of the sugar moiety. The chemical mechanism of this strand break is an open question. Ap-

plying our scheme to their findings one should expect a preferred radical attack at carbon 3 followed by a hydrolytic bond cleavage analogous to reaction (7). A preferred attack at carbon 3 is quite likely because the hydrogen atom in this position is tertiary compared to the secondary ones in position 5. The effect found by BOPP and HAGEN¹¹ is, however, much more specific than we would expect on the basis of this difference. Different rates of the hydrolytic steps, steric factors, or other not yet elucidated mechanisms should contribute to the specificity of the effect observed.

A. SUGIMORI thanks the Alexander-von-Humboldt-Stiftung for a stipend.

- ¹ G. SCHOLES and J. WEISS, *Nature [London]* **171**, 920 [1953].
- ² G. SCHOLES and J. WEISS, *Nature [London]* **173**, 267 [1954].
- ³ R. W. WILKINSON and T. F. WILLIAMS, *J. Chim. Phys.* **52**, 603 [1955].
- ⁴ C. L. GREENSTOCK, J. W. HUNT, and M. NG, *Trans. Faraday Soc.* **65**, 3279 [1969].
- ⁵ M. HALMAN and I. PLATZNER, *J. chem. Soc. [London]* **1965**, 5380.
- ⁶ K.-D. HAASE, (to be published).
- ⁷ A. SUGIMORI, G. KOLTZENBURG, and D. SCHULTE-FROHLINDE, (to be published).

- ⁸ A. BEGUM, S. SUBRAMANIAN, and M. C. R. SYMONS, *J. chem. Soc. [London], Ser. A* **1970**, 1334.
- ⁹ T. OMORI, G. KOLTZENBURG, and D. SCHULTE-FROHLINDE, (to be published).
- ¹⁰ E. A. C. LUCKEN, *J. chem. Soc. [London], Ser. A*, **1966**, 1354; A. R. METCALFE and W. A. WATERS, *J. chem. Soc. [London], Ser. A*, **1967**, 340.
- ¹¹ A. BOPP and U. HAGEN, *Biochem. biophysica Acta [Amsterdam]* **209**, 320 [1970].
- ¹² J. T. WOODS and M. G. MELLON, *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)* **13**, 762 [1941].

Dicholesterinester von Dicarbonsäuren

Dicholestenylesters of Dicarboxylic Acids

DIETER GROSS

Bundesanstalt für Materialprüfung/Berlin

(Z. Naturforsch. **27 b**, 472—473 [1972]; eingegangen am 25. November 1971, revidiert am 29. Dezember 1971)

Substanzen mit cholesterinischer Phase haben in den letzten Jahren größeres Interesse, vor allem als Temperaturindikatoren, gefunden^{1, 2}. Bekannt waren vor allem Verbindungen mit einem Existenzbereich der anisotropen Phase zwischen 40° und 150 °C. Durch Einführung von Ätherfunktionen in den Säurerest von Cholesterinestern ist es möglich gewesen, die Umwandlungstemperaturen gegenüber den entsprechenden Fett-säureestern zu erniedrigen³. Die Veresterung von Cholesterin mit Polyalkoxysäuren führt zu kristallinen Flüssigkeiten im Gebiet tiefer Temperaturen. Beispielsweise tritt die anisotrope Phase des β -[(2"-butoxy)-2'-äthoxy]-äthoxypropionsäurecholesterinesters bei 0 °C auf. Die vorliegende Arbeit beschreibt Versuche zur Darstellung von Verbindungen mit hohen Umwandlungstemperaturen.

Durch Veresterung von Dicarbonsäuren in Dioxan oder Chlorbenzol mit Cholesterin sind bis auf den Oxal-ester⁴ bisher nicht bekannte Dicholesterinester darge-

Sonderdruckanforderungen an Dipl.-Chem. D. GROSS, Bundesanstalt für Materialprüfung (BAM), D-1000 Berlin 45, Unter den Eichen 87.

stellt worden, die eine cholesterinische Phase oberhalb 150 °C besitzen. Die Reaktionen sind mit mäßiger Ausbeute verlaufen, jedoch konnten keine Halbester mit flüssig-kristallinem Schmelzbereich isoliert werden. Innerhalb der Reihe der geradzahligen homologen Verbindungen sinken die Temperaturen der Schmelz- und Klärpunkte mit steigendem Molekulargewicht. Die höchsten Werte werden beim Dicholesterinoxalsäure-ester gefunden. Bei höheren Homologen wird die Temperaturdifferenz zwischen dem Klärpunkt der cholesterinischen Phase und dem Schmelzpunkt mit steigendem Mol.-Gew. zunehmend größer, so daß monotope Phasen mit vergrößertem Existenzbereich resultieren. Bei schnellem Abkühlen auf Zimmertemperatur erstarren die isotropen Schmelzen, vor allem die der höher molekularen Verbindungen, zu trüben Gläsern, in denen die flüssig-kristalline Phase fest vorliegt und sich durch ihre Farbigkeit zu erkennen gibt. Ein nachträgliches Kristallieren wurde nicht beobachtet, so daß interessante Möglichkeiten für anwendungstechnische Untersuchungen eröffnet werden.

Die Temperaturabhängigkeit der Klär- und Schmelzpunkte innerhalb der homologen Reihe lässt darauf schließen, daß die Verringerung der Kettenlänge der Dicarbonsäuren ein kooperatives Verhalten beider Cholesterinteile des Moleküls bewirkt. Im Fall des Phthalsäureesters erzwingt die ebene Form des Säurerestes eine weitgehend koplanare Lage der Molekülteile, so daß die intermolekularen Wechselwirkungs-kräfte steigen und die Ausbildung einer flüssig-kristallinen Phase unterbleibt.

Experimentelles

Zur Darstellung der Dicoholesterinester der Dicarbon-säuren wurden 0,02 Mol Cholesterin, 0,011 Mol Dicar-bonsäure und 0,5 g *p*-Toluolsulfinsäure mit 100 ml Dioxan 16 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde die Lösung abgekühlt, in 500 ml Wasser einge-gossen, wobei die Diester neben Cholesterin und Nebenprodukten anfielen. Das Gemisch wurde abgesaugt, mehrfach mit Wasser gewaschen und getrocknet. Durch Kochen mit Äthanol wurden die als Verunreinigungen vorliegenden Feststoffe in Lösung gebracht, während die Diester ungelöst zurückblieben. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Diester in Methylchlorid gelöst und mit der 5-fachen Menge an Äthanol versetzt. Beim Verkochen des Methylen-chlorids fielen die Diester allmählich aus. Durch mehr-faches Umkristallisieren in Dichlormethan/Äthanol oder in *n*-Propanol wurden die reinen Endprodukte erhalten, die infrarotspektrometrisch auf die Abwesenheit von Hydroxylbanden und durch Elementaranalysen geprüft wurden.

Ausbeute: 15 bis 20% der Theorie.

- ¹ S. P. BROWN, Materials Evaluation **26**, 163 [1968].
- ² B. BÖTTCHER, D. GROSS u. E. MUNDY, Z. Materialprüfung **11**, 156 [1969].
- ³ D. GROSS u. B. BÖTTCHER, Z. Naturforsch. **25 b**, 1099 [1970].

Die Bestimmung der Schmelz- und Klärpunkte er-folgte mit einem handelsüblichen Gerät zur Schmelz-punktbestimmung (Fa. Mettler, Modell FP 2), be-stehend aus einem digital anzeigen Temperatur-steuergerät, einem mit Polarisationsfiltern ausgerüste-nen Mikroheiztisch und einem Stereomikroskop. Die lineare Aufheizrate betrug 2 °C/min. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der nachstehenden Tab. 1 zusammen-gefaßt.

Dicoholesterinester der	Schmelzpunkt in °C	Klärpunkt in °C
Oxalsäure	184 ^b ,	227 ^c
Bernsteinsäure	217	208
Adipinsäure	199	185
Korksäure	183	164
Sebazinsäure	176	151
Phthalsäure	179	—

Tab. 1. Schmelz- und Klärpunkte von Dicoholesterinestern ^a.
^a aus CH₂Cl₂/C₂H₅OH, ^b Erweichungspunkt, ^c l. c. ⁴ 227 °C.

- ⁴ F. RADT (Hrsg.), Elsevier's Encyclopaedia of organic Chemistry, Series III, Vol. 14, Suppl., p. 16215, Amsterdam 1954.

Zur Gewinnung von Porphobilinogen aus δ-Aminolävulinsäure mittels *P. shermanii*: Bemerkenswerter Effekt einer Hitzebehandlung der Zellen

Preparation of Porphobilinogen from δ-aminolevulinic Acid by Means of *P. shermanii*: Remarkable Effect by Heat Treatment

GERHARD MÜLLER

Isotopenlaboratorium des Fachbereichs Chemie
der Universität Stuttgart

(Z. Naturforsch. **27 b**, 473—474 [1972]; eingegangen am 19. Januar 1972)

Unser Versuche zur Darstellung von Porphobilino-gen aus δ-Aminolävulinsäure mittels Zellsuspensionen von *P. shermanii* hatten gezeigt, daß Inkubationen bei relativ hoher Temperatur (70 °C) zu den besten Aus-beuten führen¹. Diese ungewöhnlichen Bedingungen veranlaßten uns, hierzu weitere Untersuchungen durch-zuführen. Sie ergaben bisher, daß Zellen von *P. shermanii*, die in wäßrigem Medium einer Hitzebehand-lung unterworfen worden waren, zur Umwandlung von δ-Aminolävulinsäure in Porphobilinogen wesentlich ge-eigneter sind als unbehandelte Zellen. Bei 30 °C ist

Sonderdruckanforderungen an Dr. GERHARD MÜLLER,
D-700 Stuttgart, Azenbergstraße 14—16.

mit hitzebehandelten Zellen eine ca. sechsfach höhere Porphobilinogen-Bildung zu verzeichnen. Unter diesen Bedingungen wird die Bildung von Kondensationspro-dukten des Porphobilinogen weitgehend vermieden. Gegenüber dem früheren Verfahren ergibt sich hieraus eine erhebliche Vereinfachung der Reinigungsoperatio-nen und eine Ausbeutesteigerung von 21 auf 54 Pro-zent.

Die bisherigen Untersuchungen zur Aufklärung der Ursachen dieses Effektes haben ergeben, daß die Stei-gerung der Ausbeute an Porphobilinogen nicht nur mit einer teilweisen Inaktivierung der Porphyrin-Bildung erklärt werden kann. Weitere Versuche sollen zeigen, ob δ-Aminolävulinsäure-Aufnahme bzw. Porphobilino-gen-Abgabe durch Veränderungen der Zellmembran bzw. der Transportmechanismen begünstigt werden. Ferner werden wir untersuchen, ob in *P. shermanii* der Succinat-Glycin-Zyklus verwirklicht ist (s. dazu l. c.²). Weitere Versuche sollen auch darüber Aufschluß geben, ob die Hitzebehandlung eine Aktivierung sowie einen konservierenden und stabilisierenden Einfluß auf die δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase ausübt. Es zeigte sich nämlich, daß mit den vorbehandelten Zellen minde-stens 20 Inkubationen mit unveränderter Porphobili-nogen-Ausbeute durchgeführt werden können. Zur Dar-stellung von Porphobilinogen eignen sich neben frisch isolierten sowohl gefriergetrocknete als auch tiefgefro-rene Zellen. In gefrorenem bzw. lyophilisiertem Zu-stand behalten sie ihre Aktivität über einige Jahre.

Beschreibung der Versuche

δ -Aminolävulinsäure wird nach NEUBERGER und SCOTT³ dargestellt. Die Fermentationen werden, wie bereits früher beschrieben^{1, 4}, unter Verwendung von Cornsteep oder eines synthetischen Nährmediums durchgeführt.

Gewinnung von Porphobilinogen. 80 g gefriergetrocknete Zellen (entsprechend 270 g Bakterienfeuchtmasse) werden in 21 Tris/HCl-Puffer (pH 8,2, 0,05 M an Tris) suspendiert und während 30 Min. bei 70 °C unter Röhren vorinkubiert. Anschließend wird abzentrifugiert und die Zellmasse erneut in der gleichen Menge Tris/HCl-Puffer gleicher Zusammensetzung suspendiert. Diese Suspension wird mit einer Lösung von 1,6 g δ -Aminolävulinsäure-hydrochlorid in 100 ml H₂O, deren pH mit Tris-Lösung auf 8,2 eingestellt wurde, versetzt und in einem 4-l-Rundkolben, der mit einem Wattestopfen verschlossen wird, unter Röhren (Magnetruhrer) 20 Stunden bei 30 °C inkubiert. Dann wird von der Zellmasse abzentrifugiert und der pH der Lösung mit verdünnter HCl auf 7,2 eingestellt. Anschließend wird die Lösung auf eine kurze Säule (5 cm Länge, 4,5 cm Durchmesser) aus DEAE-Cellulose (Fa. Merck, Darmstadt) gegeben, deren Chlorid-Form mit Tris-HCl-Puffer (pH 7,2, 0,05 M an Tris) so lange gewaschen worden war, bis der Durchlauf ein pH von 7,2 hatte. Es wird so lange mit diesem Puffer eluiert, bis kein Porphobilinogen mehr von der Säule kommt. Der pH

des Eluats wird mit verdünnter HCl auf 4 eingestellt und das Porphobilinogen mit 20-proz. Quecksilber(II)-acetat-Lösung gefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, mit H₂S zersetzt und vom HgS abzentrifugiert⁵. Dieses wird mehrere Male mit wenig Wasser extrahiert. Danach wird der pH der Lösung mit konz. Ammoniak auf 4 gestellt, wobei sich das Porphobilinogen abscheidet. Nach mehreren Std. im Kühlschrank werden die Kristalle abgesaugt, mit eiskalter verdünnter Essigsäure (pH 4) und anschließend mit wenig kaltem Aceton gewaschen. Das so gewonnene Produkt ist in den meisten Fällen genügend rein.

Falls eine Umkristallisation notwendig ist, wird das Rohprodukt in möglichst wenig 0,5 N Ammoniak gelöst, eventuell filtriert, und bis zur Aufhellung etwas DEAE-Cellulose (OH[⊖]-Form) eingerührt. Nachdem vom Austauscher abfiltriert worden war, stellt man zur Fällung des Porphobilinogen den pH mit Eisessig vorsichtig auf 4 ein, lässt mehrere Std. im Kühlschrank stehen, saugt ab und trocknet im Exsiccator über KOH. Ausbeute: 635 mg (54% der Theorie).

Das Verfahren konnte ohne Schwierigkeiten auch mit größeren Mengen, z. B. in 8-l-Ansätzen, durchgeführt werden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie bin ich für Personal- und Sachbeihilfen dank verpflichtet.

¹ G. MÜLLER u. G. BEZOLD, Z. Naturforsch. **24b**, 47 [1969].

² Literaturzusammenstellung: G. S. MARKS: Heme and Chlorophyll, S. 129–130, Van Norstrand Company Ltd., London 1969.

³ A. NEUBERGER and J. J. SCOTT, J. chem. Soc. [London] **1954**, 1820.

⁴ G. MÜLLER, W. DIETERLE u. G. SIEBKE, Z. Naturforsch. **25b**, 307 [1970].

⁵ G. H. COOKSON and C. RIMINGTON, Biochem. J. **57**, 476 [1954].

A New Synthesis of Furo(2,3-b)quinoline

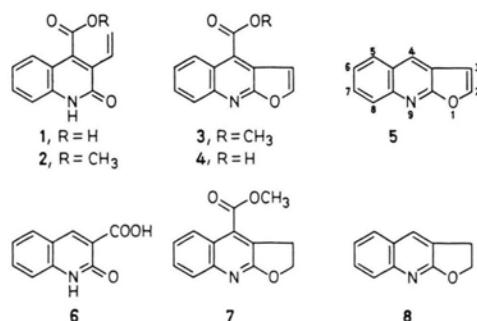
P. SHANMUGAM and P. LAKSHMINARAYANA

Department of Organic Chemistry, University of Madras,
Madras 25, India

(Z. Naturforsch. **27 b**, 474–476 [1972]; received November 16, 1971,
revised December 24, 1971)

Furo(2,3-b)-quinoline (**5**) is the parent compound of many alkaloids¹ of the Rutaceae. Of the two methods^{2, 3} known for its synthesis, the one due to KING et al., involved in the final step, the catalytic dehydrogenation of the dihydrobase **8** with Pd/c. The base **8** is now obtainable^{4–6}, through a shorter reaction sequence than the one employed by them². But the dehydrogenation of **8** to **5** could not be effected inspite of repeated trials using varying strengths of the catalyst. The only published synthesis of **5** is that

of GRUNDON and MCCORKINDALE who obtained it from a synthetic precursor to dictamnine. Apart from a number of steps involved, the yield at most of the stages leading to the precursor as well as its conversion to **5** is not appreciable. Hence a need to accomplish a neat and convenient synthesis of the title compound was felt by us and this communication deals with such an objective realised through the use of 4-carboxy-3-vinyl-2-quinoline (**1**)⁷.



Requests for reprints should be sent to Dr. P. SHANMUGAM, Reader in Organic Chemistry University of Madras, A. C. College Campus, Madras 25 (India).

Addition of bromine to its methyl ester **2** in chloroform and heating the resulting solution with triethylamine under reflux furnished the 4-carbomethoxy-furoquinoline (**3**). Similar conversion of a vinyl-quinolone to the corresponding furo(2,3-b)quinoline has been reported⁸. The acid **4** derived from **3** by hydrolysis readily underwent decarboxylation with copper-bronze in boiling diphenyl ether to give the desired furoquinoline **5** in 65% yield.

3 and **5** underwent hydrogenation with Pd/c and H₂ to give **7**² and **8**⁵ respectively. Permanganate oxidation³ of **5** gave 2-quinolone-3-carboxylic acid, identical with the authentic sample⁹.

The N.M.R. spectra of the bases **3**, **5**, **7** and **8** are in accord with the structures assigned. The furan protons of **3** and **5** form an AB quartet (*J* = 2.5 cps) as expected¹⁰. The C₅ proton in **3** as well as in **7** appears at a lower field than the other aromatic protons, presumably due to deshielding by the carbomethoxy group.

Experimental

4-Carbomethoxy-3-vinyl-2-quinolone (2)

3.3 g **1** was refluxed with 8 ml purified thionyl-chloride on a steam bath till it became homogeneous. After stripping off the excess reagent, the residue was taken in anhydrous chloroform and added to ice cold methanol (20 ml). Refluxed for an hour, cooled and repeatedly washed with water and finally with sodium bicarbonate solution. After drying over anhydrous MgSO₄, the solvent was removed and the residue weighing 3 g was straight-away used for the next reaction.

Analytically pure sample was however obtained by chromatography over alumina in benzene and elution with benzene-chloroform (9 : 1) evaporation and crystallisation from benzene gave rectangular plates. m.p. no sharp melting and it seems to undergo a thermal change above 150 °C. (The ester with m.p. 149–150 °C, erroneously indicated as **2** in a previous paper⁷ is the ester of the reduced acid, viz., 4-carboxy-3-ethyl-2-quinolone).

I.R.(KBr): 3436 cm⁻¹ (–NH–); 1733 cm⁻¹ (COOCH₃); 1647 cm⁻¹ (–NHCO–).

C₁₃H₁₁NO₃ (229.2)
Calc. C 68.11 H 4.84 N 6.11,
Found C 67.92 H 4.65 N 6.0.

4-Carbomethoxy furo(2,3-b)quinoline (3)

The crude ester (3 g) was dissolved in anhydrous chloroform and 2.5 g bromine (in 10 ml chloroform) was added in drops at room temperature. After the addition it was mixed with triethylamine (8 ml) and heated under reflux for 90 minutes. The residue that left behind after removal of the solvent and the unused amine, was chromatographed over alumina in benzene. Yield: 1.8 g. Crystallised from benzene-petrol m.p. 150–150 °C.

I.R.(KBr): 1717 cm⁻¹ (no band at the amide-carbonyl-region).

NMR(CDCl₃): δ 4.1 (s, 3H, –COOCH₃) ; δ 7.15 (d, 1H, H₃) ; δ 7.88 (d, 1H, H₂) ; δ 8.83 (q, 1H, H₅) ; δ 7.5–8.3 (m, 3H, H₆, H₇, H₈).

UV EtOH: 245; 339 (log ε 4.5195; 4.1218) λ_{max}(mμ).

C₁₃H₉NO₃ (227.2)

Calc. C 68.72 H 3.99 N 6.16,
Found C 68.74 H 4.01 N 6.2.

(b) Hydrogenation of **3** in ethanol using Pd/c (2%) and H₂ (30 lb) gave **7**, m.p. 109–110 °C in 70% yield identical with authentic sample⁷ in all respects (m.p. mixed m.p. I.R., U.V. and N.M.R.).

NMR(CDCl₃): δ 3.45 (t, 2H, H₃) J = 8 cps; δ 4.6 (t, 2H, H₂) J = 8 cps; δ 3.92 (s, 3H, COOCH₃) ; 7.1–7.85 (m, 3H, H₆, H₇, H₈) ; δ 8.28 (q, 1H, H₅).

C₁₃H₁₁NO₃ (229.2)

Calc. C 68.11 H 4.84 N 6.11,
Found C 68.01 H 4.69 N 6.30.

4-Carboxy furo(2,3-b)quinoline (4)

1.5 g **3** was refluxed with 6 N HCl (25 ml) for two hours, filtered hot and the filtrate cooled and diluted with water. The white precipitate that separated was collected and crystallised from aq. ethanol. Yield 1.4 g (95%). m.p. 276–277 °C.

I.R.(KBr): 1709 cm⁻¹; 1607 cm⁻¹; 1527 cm⁻¹.

C₁₂H₇NO₃ (213.2)

Calc. C 67.61 H 3.31 N 6.57,
Found C 67.58 H 3.47 N 6.9.

Furo(2,3-b)quinoline (5)

200 mg **4** was heated with copper bronze (fine powder) in 15 ml diphenyl ether under reflux for 3 hours. Cooled and 20 ml ether added and extracted with 4 N HCl (10 ml). The acid extract was basified, extracted with ether and dried over anhydrous K₂CO₃. Removal of the solvent and crystallisation of the residue from *n*-hexane gave **5** in fine colourless needles (120 mg) m.p. 78.2–79.2 °C (lit.³ m.p. 76–77 °C).

I.R.(KBr): 1620 cm⁻¹; 1575 cm⁻¹.

N.M.R.(CDCl₃): δ 6.85 (d, 1H, H₃) ; δ 7.8 (d, 1H, H₂) ; δ 8.33 (s, 1H, H₄) ; δ 7–8 (m, 4H, Ar).

U.V. EtOH: 235; 308 (log ε 4.6222; 4.0729) λ_{max}(mμ).

C₁₁H₇NO (169.2)

Calc. C 78.09 H 4.17 N 8.28,
Found C 77.92 H 3.98 N 8.10.

(b) Hydrogenation of **5** in ethanol using Pd/c (10%) and H₂ (20 lbs) gave **8** in 60% yield m.p. 121–122 °C (petrol) identical with authentic sample⁵ (m.p. mixe m.p. superimposable I.R.). The N.M.R. spectrum agrees with the published data¹¹.

C₁₁H₉NO (171.2)

Calc. C 77.17 H 5.30 N 8.18,
Found C 76.9 H 5.10 N 8.02.

We thank Dr. K. NAGARAJAN, CIBA Research Centre for NMR spectra, Mr. R. BALASUBRAMANIAN for the analysis and Professor S. SWAMINATHAN for his encouragement. One of us (P. L. N.) wishes to thank the U. G. C. for a Fellowship.

- ¹ H. T. OPENSHAW, Alkaloids **9**, 226 [1967].
² Unpublished work by KING, LATHAM, and PATRIDGE mentioned by PRICE, Fortschor, Chem. Org. Naturstoffe **13**, 320 [1956].
³ M. F. GRUNDON and N. J. MCCORKINDALE, J. chem. Soc. [London] **1957**, 2177.
⁴ G. KOBAYASHI and Y. KUWAYAMA, J. pharmac. Soc. Japan **79**, 125 [1959].
⁵ J. P. JOHN and P. SHANMUGAM, Proc. Indian Acad. Sci. **51**, 161 [1961].
⁶ H. ZIMMER, F. HAUPTER, J. ROTHE, W. E. J. SCHROF, and R. WALTER, Z. Naturforsch. **18b**, 165 [1963].
⁷ P. LAKSHMINARAYANA, P. SHANMUGAM, and K. K. BALASUBRAMANYAN, Tetrahedron Letters [London] **57**, 4947 [1970].
⁸ P. SHANMUGAM and P. LAKSHMINARAYANA, Tetrahedron Letters [London] **25**, 2323 [1971].
⁹ P. FREILANDER and C. F. GOERING, Chem. Ber. **17**, 459 [1884].
¹⁰ A. V. ROBERTSON, Aust. J. Chem. **16**, 451 [1963].
¹¹ N. S. NARASIMHAN, M. V. PARADKAR, and R. H. ARULKAR, Tetrahedron [London] **27**, 1354 [1971].

Zur Kondensation von 3-Acy1-4-hydroxy-cumarinen mit o-Aminophenylglyoxal-dimethylacetal

The Condensation of 3-Acy1-4-hydroxy-cumarins with o-Aminophenylglyoxal-dimethylacetal

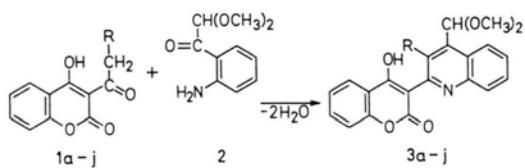
MLADEF TRKOVNIK und BLANKA BOBAREVIĆ
 Laboratorium für Organische Chemie des Chemischen Instituts der Universität Sarajewo, Jugoslawien
 und
 THOMAS KAPPE
 Institut für Organische Chemie der Universität Graz
 (Z. Naturforsch. **27 b**, 476—477 [1972]; eingegangen am 21. Januar 1972)

Herrn Professor Dr. ERICH ZIEGLER zum 60. Geburtstag gewidmet

o-Aminophenylglyoxal-dimethylacetal (**2**), welches in einfacher Weise aus 4-Hydroxy-carbostyrol zugänglich ist¹, ist eine wertvolle Ausgangsverbindung für die Synthese des Indigos¹ sowie von Carbostyrol- und Chi-

nolin-4-aldehyden². Die letztgenannte Verbindungs-klasse (als Dimethylacetale geschützt) entsteht durch Kondensation von **2** mit Carbonylverbindungen, die in α -Stellung eine Methyl- oder Methylengruppe besitzen, im Sinne einer FRIEDLÄNDER-³ bzw. PFITZINGER-Chinolinsynthese⁴.

Überträgt man dieses Verfahren auf die Kondensation von **2** mit 3-Acy1-4-hydroxy-cumarinen (**1a—j**), so erhält man in 3-Stellung mit dem 2-Chinolyl-4-aldehydrest substituierte 4-Hydroxy-cumarine **3a—j**⁵. Die Ketone **1a—j** können durch KLOSA-ZIEGLER-Acylierung^{6—8} aus 4-Hydroxy-cumarin und den entsprechenden Carbonsäuren in Gegenwart von POCl_3 gewonnen werden.



R	Ausb. % d. Th.	Schmp. [°C]	Summenformel	Analyse C	H	N
a H	85	248—250	C ₂₁ H ₁₇ NO ₅	Ber. 69,40 Gef. 69,21	4,73 4,65	3,86 3,98
b CH ₃	82	101—103	C ₂₂ H ₁₉ NO ₅	Ber. 70,00 Gef. 70,24	5,09 5,36	3,71 3,62
c C ₂ H ₅	79	93—95	C ₂₃ H ₂₁ NO ₅	Ber. 70,55 Gef. 70,68	5,43 5,24	3,58 3,79
d n-C ₃ H ₇	75	88—90	C ₂₄ H ₂₃ NO ₅	Ber. 71,07 Gef. 70,96	5,73 5,64	3,46 3,56
e i-C ₃ H ₇	76	91—93	C ₂₄ H ₂₃ NO ₅	Ber. 71,07 Gef. 71,32	5,73 5,88	3,46 3,67
f n-C ₄ H ₉	78	87—88	C ₂₅ H ₂₅ NO ₅	Ber. 71,59 Gef. 71,84	6,02 6,31	3,34 3,32
g n-C ₅ H ₁₁	74	83—85	C ₂₆ H ₂₇ NO ₅	Ber. 72,04 Gef. 72,26	6,28 6,34	3,23 3,24
h n-C ₆ H ₁₃	75	77—79	C ₂₇ H ₂₉ NO ₅	Ber. 72,48 Gef. 72,59	6,54 6,34	3,13 3,29
i n-C ₇ H ₁₅	77	72—74	C ₂₈ H ₃₁ NO ₅	Ber. 72,86 Gef. 72,62	6,78 6,97	3,03 2,89
j n-C ₈ H ₁₇	72	81—83	C ₂₉ H ₃₃ NO ₅	Ber. 73,22 Gef. 73,50	7,01 6,87	2,95 3,16

Tab. 1. 2-(4-Hydroxy-cumarinyl-3)-4-dimethoxymethyl-chinoline (3a—j).

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der 2-(4-Hydroxycumarinyl-3)-4-dimethoxymethyl-chinoline (3 a–j)

Zur Lösung von 0,35 g (15 mMol) Natrium in 24 ml abs. Äthanol fügt man 1,17 g (6 mMol) *o*-Aminophenylglyoxal-dimethylacetal (**2**) und 6 mMol des 3-Acyl-4-hydroxy-cumarins^{6–8} (**1 a–j**) und erhitzt 30 Min.

- ¹ E. ZIEGLER u. TH. KAPPE, Angew. Chem. **76**, 921 [1964]; Mh. Chem. **96**, 889 [1965]; Schwz. Pat. 447 434 (vom 6. 8. 1963, ausg. 29. 3. 1968), Chem. Zbl. **1969/35**, 1768.
- ² E. ZIEGLER, TH. KAPPE u. H. G. FORAITA, Mh. Chem. **97**, 409 [1966].
- ³ P. FRIEDLÄNDER, Ber. dtsch. chem. Ges. **15**, 2572 [1882]; W. PFITZINGER, J. pr. Chem. 2 **33**, 100 [1886]; **38**, 582 [1888].
- ⁴ R. C. ELDERFIELD, Heterocyclic Compounds, Vol. **4**, 45 ff. [1952].

unter Rückfluß. Der Alkohol wird im Vakuum entfernt und das zurückbleibende Na-Salz von **3** in 100 ml Wasser aufgenommen. Aus dieser Lösung werden **3 a–j** durch Einleiten von CO₂ oder durch vorsichtiges Ansäuern mit verd. Essigsäure ausgefällt. Alle Verbindungen sind gelb und aus 1-Butanol kristallisierbar.

- ⁵ Eine große Anzahl von in 3-Stellung substit. 4-Hydroxycumarinen finden als orale Antikoagulatien oder Rodenticide Verwendung: L. REPPEL, Pharmazie **18**, 381 [1963]; E. RENK u. W. G. STOLL, Progr. Drug. Res. **1968** (11), 226.
- ⁶ J. KLOSA, Arch. Pharmaz. **288**, 356 [1955]; **289**, 104 [1956].
- ⁷ E. ZIEGLER, G. WILDGRUBE u. H. JUNEK, Mh. Chem. **87**, 439 [1956].
- ⁸ M. TRKOVNIK, B. BOBAREVVIĆ u. V. JOVANOVIĆ, Croat. Chem. Acta **40**, 91 [1968].

Lithium Slows Down the *Kalanchoe* Clock

WOLFGANG ENGELMANN

Institut für Biologie, D-7400 Tübingen (Germany),
Auf der Morgenstelle
(Z. Naturforsch. **27 b**, 477 [1972]; received February 7, 1972)

Flowers of *Kalanchoe blossfeldiana* isolated from the plants continue to exhibit a circadian rhythm of petal movement after having been transferred from a light-dark cycle of 12:12 hours into conditions of constant temperature and darkness¹. Details of the photoelectric recording will be described elsewhere.

Times at which flowers are open are shown in the table, a). The period length is 22.4 hours. If the medium (0.2 mole saccharose in water²) contains 1 mM lithium chloride, the period length increases to 24.3 hours (table, b).

Preliminary experiments show that lithium sulfate has the same lengthening effect, but not sodium chloride. In 0.5 mM lithium chloride the period length is increased to the same amount, but 0.1 mM has no effect. 5 mM lithium chloride is lethal to the flowers if given continuously.

Lithium ions are known to influence developmental processes in protozoa³, animals^{4, 5}, and plants⁶. They are assumed to affect membrane permeability⁷ and nucleic acid synthesis⁸. I am not aware of any report of its action on circadian rhythmicity.

Requests for reprints should be sent to Dr. W. ENGELMANN, Institut für Biologie, D-7400 Tübingen, Auf der Morgenstelle 1.

- ¹ W. ENGELMANN and H.-W. HONEGGER, Z. Naturforsch. **22 b**, 200 [1967].
- ² W. ENGELMANN and V. VIELHABEN, Z. Pflanzenphysiol. **55**, 54 [1965].
- ³ V. SCHWARTZ, Roux Arch. Entw. mech. **158**, 89 [1967].
- ⁴ C. HERBST, Z. wiss. Zool. **55**, 446 [1892].
- ⁵ J. RUNNSTRÖM, Act. Zool. **9**, 365 [1928].
- ⁶ R. KANDELER, Planta **90**, 203 [1970].
- ⁷ B. ROSE and W. R. LOWENSTEIN, J. membr. Biol. **5**, 20 [1971].
- ⁸ M. VOLM, V. SCHWARTZ, and K. WAYSS, Naturwissenschaften **57**, 250 [1970].
- ⁹ J. T. ENRIGHT, Z. vergl. Physiol. **72**, 1 [1971].
- ¹⁰ J. T. ENRIGHT, Z. vergl. Physiol. **75**, 332 [1971].
- ¹¹ J. F. FELDMANN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **57**, 1080 [1967].

	max	1st	2nd	3rd	4th	5th
a)	control	20.0	42.5	65.6	87.8	110.2
	sd	1.1	1.1	1.0	2.5	2.3
	n	9	9	9	7	5
		22.5	23.1	22.2	21.8	
b)	1 mM LiCl	19.0	42.1	68.4	92.7	116.1
	sd	0.9	0.9	1.2	1.1	1.8
	n	8	9	9	9	8
		23.1	26.3	24.3	23.4	

Table 1. Effect of lithium on the period length of the petal movement of *Kalanchoe* flowers. a) Times of maximum flower opening ("max") after transfer from a 12:12 light-dark cycle into continuous green safelight at time 0, in hours. 2nd line: standard deviation sd, 3rd line: number of recordings per maximum, 4th line: period length. b) Same for flowers kept in a 1 mM LiCl solution.

Circadian rhythms are slowed down by heavy water (e. g.⁹), ethyl alcohol¹⁰, and cycloheximide¹¹. It is unknown whether lithium acts on the basic oscillator underlying the overt rhythm (petal movement in the case reported here) or merely influences the coupling between both. These possibilities are currently being tested.

This work has been supported by grant En 42/13 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft.