

THERMISCHE SPALTUNG UND MASSENSPEKTROMETRIE DER BENZODIAZEPINALKALOIDE (–)-CYCLOPENIN UND (–)-CYCLOPENOL

M. LUCKNER, K. WINTER und L. NOVER

Sektion Pharmazie der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg Halle (Saale),
Lehrstuhl für Pharmakognosie

und

Institut für Biochemie der Pflanzen der DAW zu Berlin, Halle (Saale)

und

J. REISCH

Institut für pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster

(Received in Germany 15 July 1968; Received in the UK for publication 22 July 1968)

Abstract—(–)-Cyclophenine (I) and (–)-cyclophenol (II) are benzodiazepine derivatives formed by *Penicillium viridicatum* Westling and *P. cyclopium* Westling. They are easily transformed to the quinoline alkaloids viridicatine (III) and viridicatol (IV) respectively by a general acid catalysis or an enzyme of *P. viridicatum* called cyclophenase.

Mass spectrometric investigations suggest that both benzodiazepine compounds may be converted to viridicatine and viridicatol by thermic degradation. In fact, by heating (–)-cyclophenine and (–)-cyclophenol in various solvents to 220–240°C they readily rearrange by loss of methyl isocyanate to viridicatine and viridicatol. Besides this major route of degradation there is a minor one giving rise to 3-methyl-3,4-dihydroquinazolone-(4), carbonmonoxide and benzaldehyde or *m*-hydroxybenzaldehyde. The pyrolysis presumably starts with the homolytic fission of the epoxide ring between the oxygen and either C-atom 10 or 3 and follows the route shown in Schemes 1 and 2.

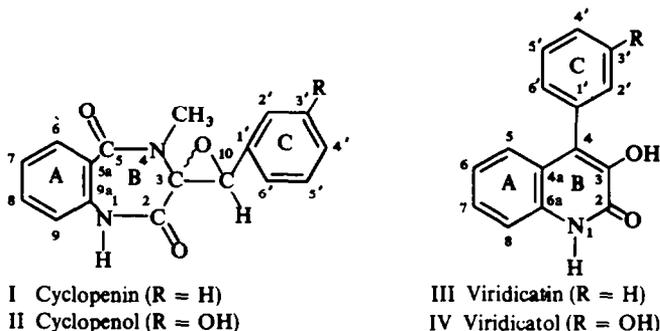
Degradation of biosynthetically labelled (–)-cyclophenol-2-¹⁴C, -3-¹⁴C and -5-¹⁴C supports the mechanisms proposed. It was possible to show that the carbonyl group of the methyl isocyanate derives from C (5) and the carbon monoxide from C (2) of the benzodiazepine ring. In the 3-methyl-3,4-dihydroquinazolone-(4) C-atoms 3 and 5, in the viridicatol C-atoms 2 and 3 of this ring remain (Table 1).

By mass spectrometric degradation of (–)-cyclophenine and (–)-cyclophenol a set of peaks is obtained which corresponds to the molecular ions of viridicatine or viridicatol and their fragmentation products (Figs. 1–4). In addition there seem to be other fragmentation routes probably connected in part with a hydrogen shift from the side chain to the benzodiazepine moiety (Schemes 3 and 4). In spite of this 3-methyl-3,4-dihydroquinazolone-(4) may be formed in small quantities. Conversion of cyclophenine and cyclophenol to 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinazolinone-(2,4) was not detectable.

EINLEITUNG

VON den Schimmelpilzen *Penicillium viridicatum* Westling und *P. cyclopium* Westling werden die biogenetisch nahe miteinander verwandten Alkaloide (–)-Cyclophenin (I) und (–)-Cyclophenol (II), Viridicatin (III) und Viridicatol (IV) gebildet.^{1–5} Für (–)-Cyclophenin und (–)-Cyclophenol wurde von uns auf Grund von Abbauversuchen und physikalischen Daten die in den Formeln I und II angegebene Struktur vorgeschlagen,⁶ die kürzlich von Rapoport *et al.*⁷ durch die Synthese des (±)-Cyclophenins bestätigt werden konnte. (–)-Cyclophenin und (–)-Cyclophenol entstehen *in vivo* aus Anthranilsäure und Phenylalanin^{6,8,9} und sind als Derivate

eines cyclischen Dipeptids dieser beiden Aminosäuren aufzufassen. Obwohl Viridicatin und Viridicatol die Struktur von Chinolinverbindungen besitzen,^{1, 2, 4} werden sie aus den gleichen Precursoren gebildet.^{5, 10} Wie kürzlich von uns nachgewiesen werden konnte, treten hierbei Cyclophenin und Cyclophenol als Intermediärprodukte auf.^{8, 11}



Die Umwandlung wird durch ein Ferment katalysiert, das von uns als Cyclophenase bezeichnet wurde.^{8, 11} Sie beginnt wahrscheinlich mit einer heterolytischen Öffnung des Epoxidringes zwischen dem Sauerstoff und C-Atom 10, wobei das Enzym als Elektronenacceptor wirksam ist. Der gleiche Primärschritt scheint auch die nichtenzymatischen Bildung von Viridicatin und Viridicatol bei Einwirkung von Hydronium-Ionen oder Lewissäuren einzuleiten.¹²

Massenspektrogramme der Benzodiazepinderivate liessen Peaks erkennen, die den Molekülonen und Fragmenten von Viridicatin und Viridicatol entsprachen. Da bei der Massenspektrometrie thermische Fragmentierungen häufig beobachtet worden sind, haben wir die Möglichkeit einer pyrolytischen Spaltung von Cyclophenin und Cyclophenol geprüft. Im folgenden soll über entsprechende Untersuchungen und über die bei der Massenspektrometrie erhaltenen Ergebnisse berichtet werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

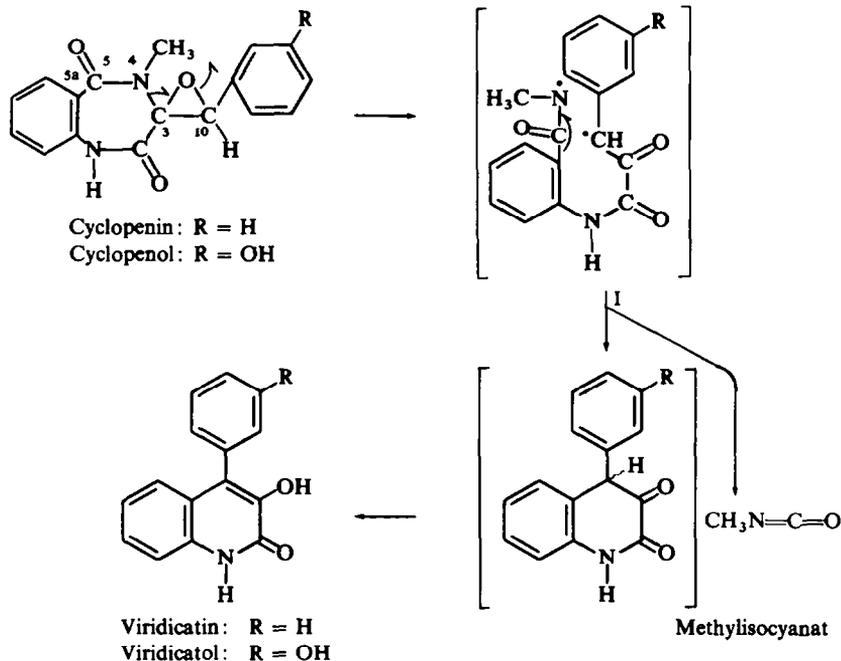
Beim Erhitzen von Cyclophenin und Cyclophenol auf höhere Temperaturen kommt es zu einem schnellen thermischen Zerfall beider Verbindungen. Werden Lösungen in Diphenyläther auf 220 bis 240° erwärmt, so sind die Alkaloide nach etwa 30 Minuten nicht mehr nachweisbar. Aus den Versuchsansätzen liessen sich dagegen die folgenden Spaltprodukte isolieren:

1. Viridicatin bzw. Viridicatol
2. Methylisocyanat, identifiziert durch Umsetzung zu *m*-Hydroxybenzyl-N,N'-dimethylharnstoff
3. Benzaldehyd bzw. *m*-Hydroxybenzaldehyd, identifiziert als Dinitrophenylhydrazon
4. 3-Methyl-3,4-dihydrochinazolon-(4)* und
5. Kohlenmonoxid, identifiziert nach Oxydation zu CO₂ als Bariumcarbonat.

Diese Verbindungen weisen auf zwei Spaltungsmechanismen bei der Pyrolyse der Benzodiazepinalkaloide hin. Beide sollten mit einer Homolyse des Epoxidringes beginnen.

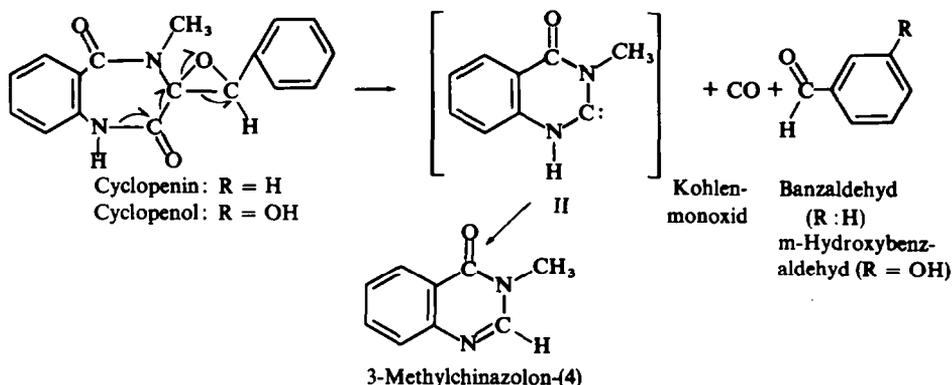
* Im folgenden werden der Kürze halber 3-Methyl-3,4-dihydrochinazolon-(4) als 3-Methylchinazolon-(4) und 3-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinazolon-(2,4) als 3-Methylchinazolon-(2,4) bezeichnet.

Die Bildung von Viridicatin bzw. Viridicatul und Methylisocyanat könnte dem in Schema 1 gezeigten Weg folgen. Die homolytische Öffnung des Epoxidrings zwischen dem Sauerstoff und C(10) führt hierbei zunächst zur Bildung eines Sauerstoff-Kohlenstoff-Diradikals, das sich durch Öffnung der Bindung zwischen C(3) und N(4) über das Stickstoff-Kohlenstoff-Diradikal I und weiter unter Ausstoss von Methylisocyanat in die stabilen Endprodukte Viridicatin bzw. Viridicatul umwandelt. Die treibende Kraft dieser Reaktion ist neben der successiven Stabilisierung des O-Radikals durch Übergang in ein N-Radikal die Bildung der durch Mesomerie energetisch begünstigten Chinolinverbindungen und des Methylisocyanats.



SCHEMA 1 Möglicher Mechanismus für die thermische Spaltung von Cyclophenin und Cyclophenol unter Bildung von Viridicatin bzw. Viridicatul und Methylisocyanat.

Die Bildung der anderen Spaltprodukte sollte durch die homolytische Spaltung des Epoxidrings zwischen C(3) und dem Sauerstoff eingeleitet werden. Das entstehende Sauerstoff-Kohlenstoff-Diradikal könnte in einem konzertierten Mechanismus unter Spaltung der Bindungen C(10) — C(3), C(3) — C(2) und C(2) — N(1) in Benzaldehyd bzw. in *m*-Hydroxybenzaldehyd, Kohlenmonoxid und über das Zwischenprodukt II in Methylchinazol(4) übergehen (Schema 2). Aber nur unter bestimmten Versuchsbedingungen (z.B. Einhaltung eines bestimmten Temperaturbereichs) kann dieser Weg überhaupt nachgewiesen werden. Auch unter optimalen Bedingungen wurde stets eine starke Bildung von Viridicatin und Viridicatul beobachtet, während die des Chinazolons etwa zehnmal geringer war. Der zur Bildung von Viridicatin bzw. Viridicatul führende Spaltungs- und Umlagerungsmechanismus nach Schema 1 ist gegenüber dem zur Bildung des Chinazolons führenden offenbar bevorzugt, was wahrscheinlich auf die dort mögliche, Stabilisierung des primär entstehenden ungepaarten Elektrons an C(10) durch den aromatischen Ring C bedingt wird.



SCHEMA 2 Möglicher Mechanismus für die thermische Spaltung von Cyclophenin und Cyclophenol unter Bildung von Kohlenmonoxid, Benzaldehyd bzw. m-Hydroxybenzaldehyd und 3-Methylchinazolon-(4).

Eine besondere katalytische Wirkung des bei den Versuchen als Lösungsmittel benutzten Diphenyläthers liegt nicht vor. Auch bei Verwendung von Naphthalin und Chinolin wurden die beschriebenen Spaltprodukte in vergleichbaren Mengen erhalten. Dagegen konnte bei Benutzung von Phenol die Bildung von 3-Methylchinazolon-(4) nicht nachgewiesen werden.

Der bei der Bildung von Viridicatin bzw. Viridicatol nach Schema 1 geforderte Verlust von C (5) des Benzodiazepinrings und der bei der Bildung von 3-Methylchinazolon-(4) nach Schema 2 postulierte Ausstoss der Carbonylgruppe in Position 2 als CO konnte durch Pyrolyse radioaktiv markierter Cyclophenolpräparate bewiesen werden (Tabelle 1).

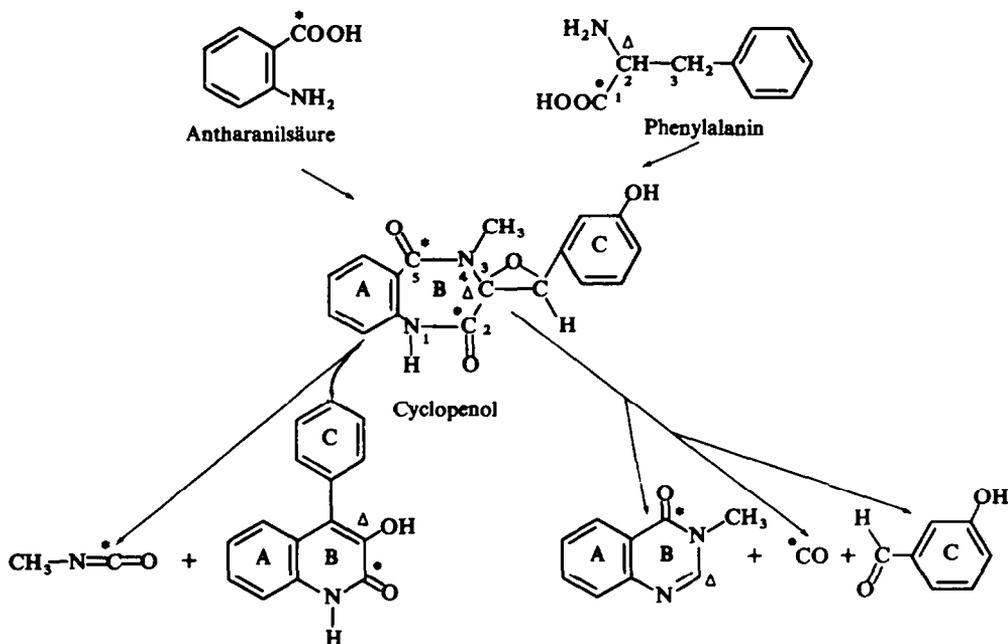
Der Abbau von (–)-Cyclophenol-5-¹⁴C ergab radioaktives 3-Methylchinazolon-(4) und radioaktives Methylisocyanat, während die anderen Spaltprodukte praktisch inaktiv waren. Die im Verhältnis zum eingesetzten Cyclophenolpräparat verhältnismässig geringe spezifische Aktivität des Methylisocyanat—CO₂ ist wahrscheinlich durch Verunreinigung mit inaktivem CO₂ bedingt, das durch Pyrolyse aus dem Diphenyläther* oder aus anderen, nicht näher bekannten Abbauwegen des Cyclophenols stammt.

Die Pyrolyse von (–)-Cyclophenol-2-¹⁴C führte zu radioaktivem Viridicatol und zuradioaktivem Kohlenmonoxid. Aus dem oben genannten Grund* war in diesem Versuch auch beim CO die spezifische Radioaktivität im Verhältnis zur spezifischen Aktivität des Cyclophenols zu klein. Während das Methylisocyanat, wie zu erwarten, praktisch keine Radioaktivität enthielt, war das 3-Methylchinazolon-(4) schwach radioaktiv. Dieser Befund ist wahrscheinlich auf die ungenügende Reinigung des vermessenen Präparates zurückzuführen.

Nach Abbau von (–)-Cyclophenol-3-¹⁴C fand sich Radioaktivität praktisch nur im Viridicatol und im 3-Methylchinazolon-(4). Die Untersuchungen haben damit gleichfalls zu einem neuen, für den Nachweis der Isotopenverteilung in markierten Präparaten geeigneten Abbauweg für Cyclophenin und Cyclophenol geführt, der gegenüber den früher beschriebenen^{5,6} übersichtlicher und einfacher durchzuführen ist und mit besseren Ausbeuten verläuft.

* Bei Blindversuchen ohne Zusatz von Cyclophenol waren stets sowohl kleinere Mengen von CO₂ als auch von CO nachweisbar.

TABELLE 1. THERMISCHE SPALTUNG RADIOAKTIV MARKIERTER CYCLOPENOLDERIVATE



		Methyliso- cyanat (CO_2)	Viridicatol	CO (CO_2)	3-Methyl- chinazolone-4 (Pikrat)	m-Hydroxy- benzaldehyd (2,4-Dinitro- phenylhydra- zon)
Cyclophenol-5- ^{14}C	2.55 · 10 ³ (100)	1.14 · 10 ² (45)	2 · 10 ² (8)	2.4 · 10 (1)	2.8 · 10 ³ (110)	1.1 · 10 ² (4)
Cyclophenol-2- ^{14}C	2.17 · 10 ⁴ (100)	4.4 · 10 ² (2)	1.7 · 10 ⁴ (79)	4.8 · 10 ³ (22)	1.9 · 10 ³ (9)	—*
Cyclophenol-3- ^{14}C	1.15 · 10 ⁴ (100)	2.4 · 10 (0.2)	8.5 · 10 ³ (74)	2.4 · 10 (0.2)	8.0 · 10 ³ (70)	9.1 · 10 (0.7)

Angabe der Radioaktivität in $\text{Imp. min}^{-1} \cdot \mu\text{Mol}$; in Klammern: spezifische Radioaktivität in % der spezifischen Radioaktivität des zum Abbau verwendeten Cyclophenolpräparates.

* Das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des m-Hydroxybenzaldehyds wurde in diesem Versuch nicht isoliert.

Die Massenspektren von Cyclophenin und Cyclophenol (Abb. 1 und 2) lassen, wie bereits in der Einleitung angedeutet wurde, ausser dem Molekularpeak und einem Fragment mit m/e 57, das wahrscheinlich dem Ion des Methylisocyanats entspricht, eine Reihe von Massenspitzen erkennen (z.B. m/e 237, 236, 208, 190, 180, 165, 152 und 77 bzw. 253, 252, 236, 224, 206, 196, 180, 167, 152, 139, 115, 89 und 76), die auch in den Spektren von Viridicatin und Viridicatol (Abb. 3 und 4) vorhanden sind.†

† Über die massenspektrometrische Untersuchung von Viridicatin und ähnlich gebauten Verbindungen soll in einer späteren Mitteilung berichtet werden.

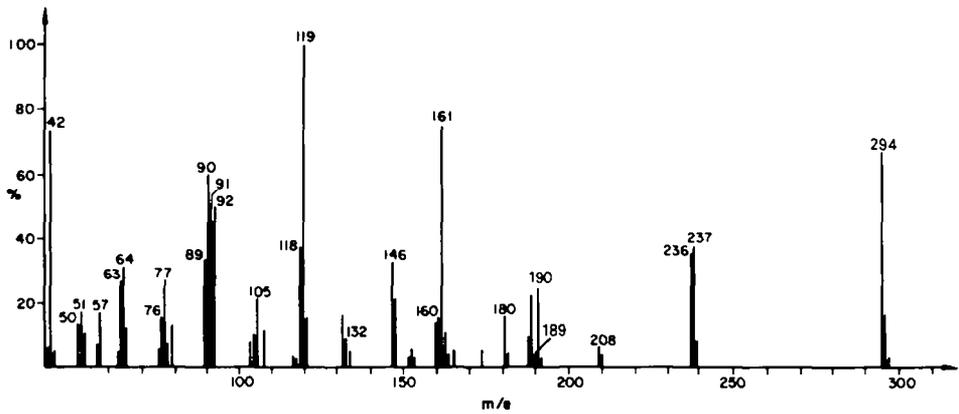


ABB. 1 Massenspektrum von Cyclopenin.

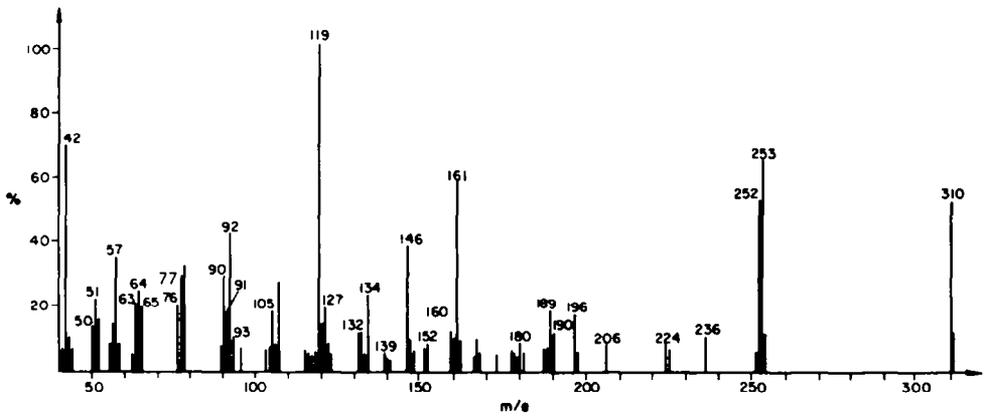


ABB. 2 Massenspektrum von Cyclopenol.

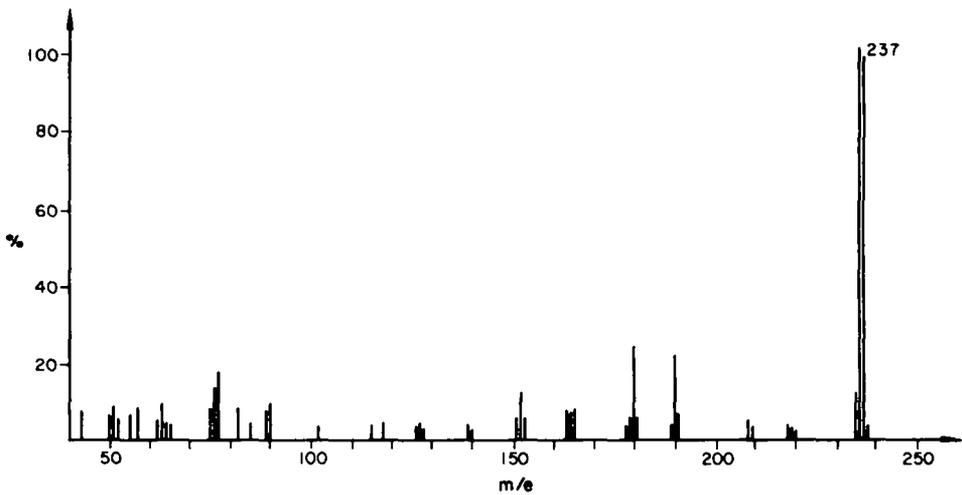


ABB. 3 Massenspektrum von Viridicatin.

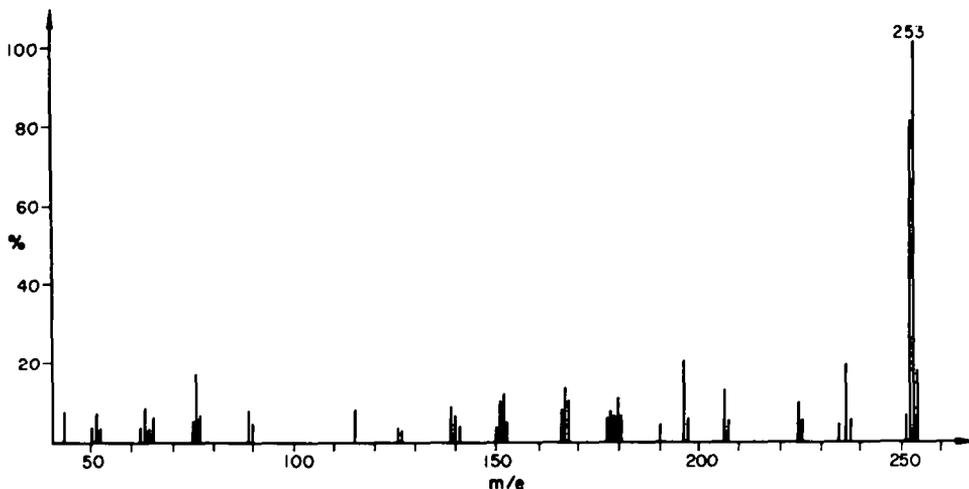
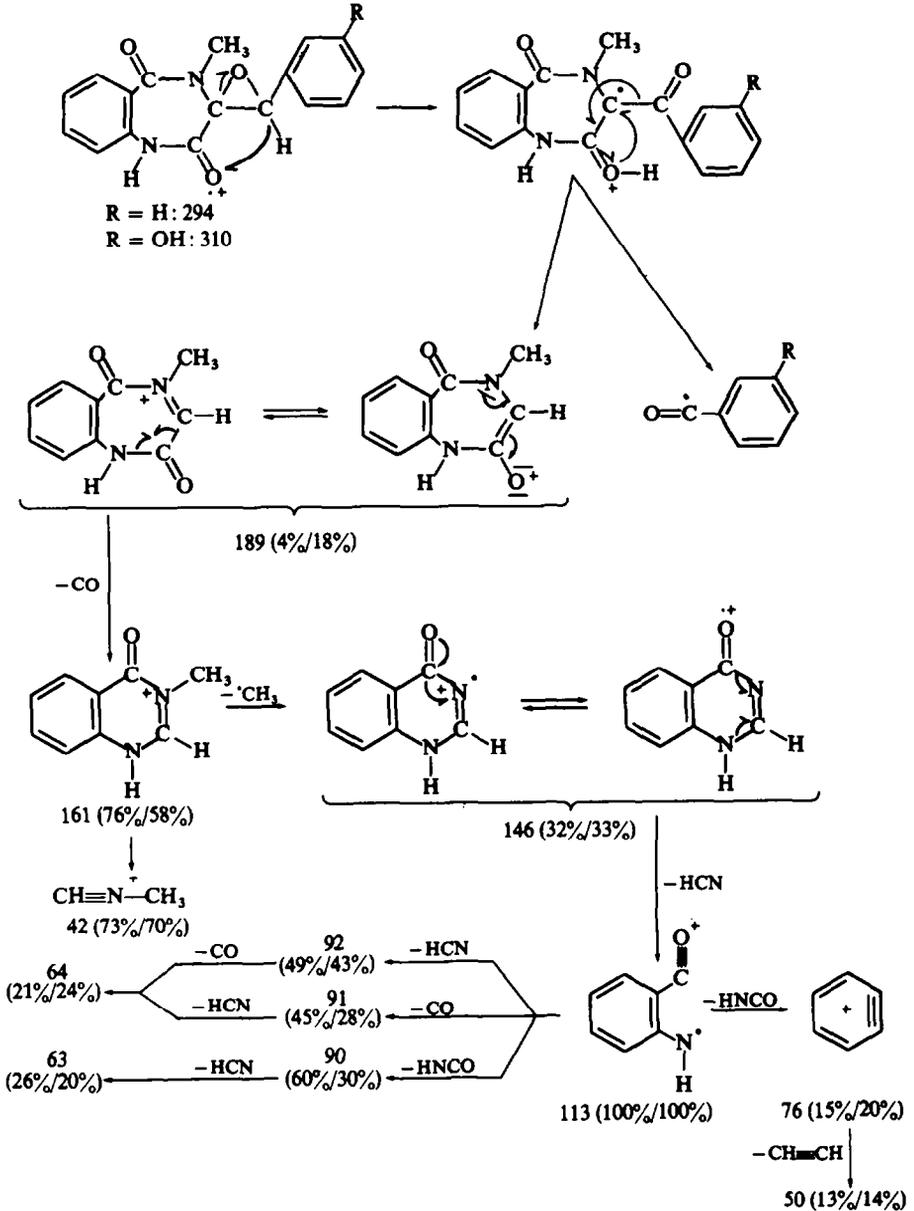


ABB. 4 Massenspektrum von Viridicatol.

Wahrscheinlich verläuft die Spaltung und Umlagerung der Benzodiazepinderivate zu Viridicatin und Viridicatol bei der Massenspektrometrie auf dem gleichen Weg wie bei der Pyrolyse in Lösung (Schema 1). Es kann jedoch nicht entschieden werden, ob die Öffnung des Epoxidrings mit der die Umwandlung eingeleitet wird, auch hier durch thermische Spaltung erfolgt (Die Temperatur der Ionenquelle lag bei Cyclophenin zwischen 170 und 190°, bei Cyclophenol zwischen 290 und 310°) und die dabei gebildeten Bruchstücke Viridicatin bzw. Viridicatol und Methylisocyanat erst nachträglich ionisiert werden oder ob durch Aufspaltung des Benzodiazepin-Moleküls direkt die geladenen Fragmente entstehen. Ist letzteres der Fall, so sollten das Viridicatin- bzw. Viridicatol-Ion aus einem Cyclophenin- bzw. Cyclophenol-Ion mit positiver Ladung am Epoxidsauerstoff bzw. am Sauerstoff der Carbonylgruppe an C(2) und das Methylisocyanat-Ion aus dem Molekül-Ion, das eine positive Ladung am Sauerstoffatom der Carbonylgruppe in Position 5 besitzt, gebildet werden.

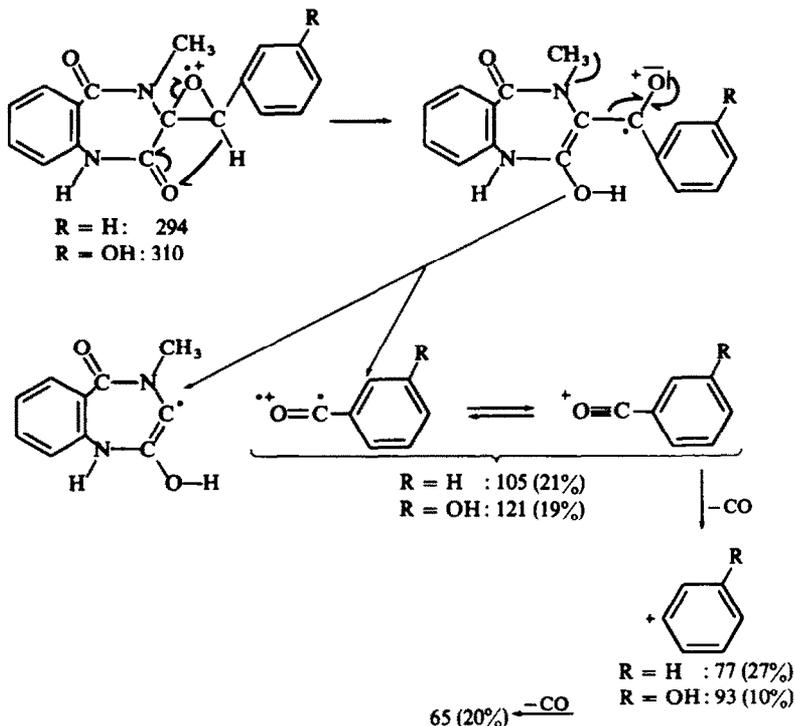
Die neben den für die Chinolinderivate charakteristischen Peaks in den Spektren von Cyclophenin und Cyclophenol auftretenden Massespitzen (z.B. m/e 189, 161, 146, 119, 105, 92, 91, 90, 89, 77, 64 und 63 bzw. 189, 161, 146, 121, 119, 105, 93, 92, 91, 90, 77, 65, 64 und 63) weisen auf weitere Fragmentierungsmechanismen hin, deren möglicher Verlauf in den Schemata 3–5 wiedergegeben ist. Ausgangspunkt dieser Fragmentierungen sollten gleichfalls Molekülionen mit der Elektronenlücke am Epoxid- bzw. am Carbonylsauerstoff in Position 2 sein. Wie bei der thermischen Spaltung (vgl. Schemata 1 und 2) könnte bei ihnen der Epoxidring zwischen dem Sauerstoff und C(3) bzw. C(10) geöffnet werden.

Die Bildung des Fragments mit der Masse 189 und der aus ihm durch weitere Fragmentierung folgenden (vgl. Schema 3), ist notwendigerweise mit der Wanderung eines Wasserstoffatoms von der Benzylseitenkette zum Benzodiazepinring verbunden. Nur hierdurch ist die beobachtete Massespitze bei 161 m/e zu erklären, die um eine Masseinheit höher ist als zu erwarten gewesen wäre, wenn das Molekül auf dem in Schema 2 angegebenen Wege zu 3-Methylchinazolon-(4) aufgespalten wird. Auch tritt im Spektrum von 3-Methylchinazolon-(4) (Abb. 5) das Bruchstück mit 146 m/e (vgl. die Spektren von Cyclophenin und Cyclophenol) nicht auf.



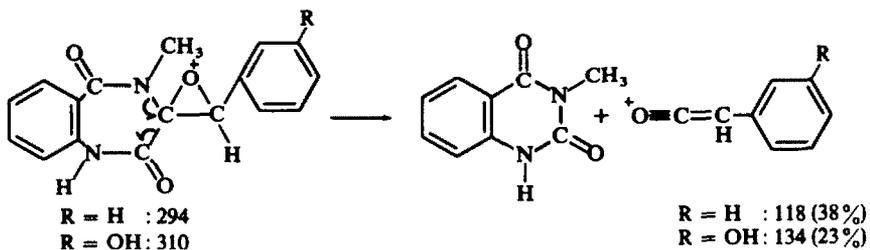
SCHEMA 3 Möglicher Mechanismus der Fragmentierung des Cyclopenin-bzw. Cyclopenol-Moleküls mit positiver Ladung am Sauerstoff der Carbonylgruppe in Position 2.

An der Wasserstoffwanderung, die auch bei der Bildung der Fragmente *m/e* 105 bzw. 121 (vgl. Schema 4) eintreten müsste, sollte das tertiäre H-Atom an C(10) ebenfalls



SCHEMA 4 Möglicher Mechanismus der Fragmentierung des Cyclophenin- bzw. Cyclophenol-Moleküliions mit positiver Ladung am Epoxidsauerstoff unter Öffnung der Bindung zwischen diesem Sauerstoff und C-Atom 3.

beteiligt sein. Die Richtigkeit dieser Hypothese soll durch spätere Untersuchungen bewiesen werden. In den Schemata 3 und 4 ist die Verschiebung so formuliert, dass der Wasserstoff zunächst auf die Carbonylgruppe in Stellung 2 übertragen wird. Eine direkte 1,2-Verschiebung von C(10) nach C(3) kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.



SCHEMA 5 Möglicher Mechanismus der Fragmentierung des Cyclophenin- bzw. Cyclophenol-Moleküliions mit positiver Ladung am Epoxidsauerstoff unter Öffnung der Bindung zwischen diesem Sauerstoff und C-Atom 10.

Trotz dieser Verschiebung wird wahrscheinlich jedoch eine kleine Menge von 3-Methylchinazoln-(4) bei der Massenspektrometrie von Cyclopenin und Cyclophenol (durch thermische Spaltung?) gebildet. Auf den Spektren ist sowohl ein Ion mit der Masse 160 m/e (15%/10%) als auch z.B. das daraus entstehende Bruchstück mit der Masse 132 m/e (9%/11%) zu erkennen, die für diese Substanz typisch sind (Abb. 5, Schema 6).

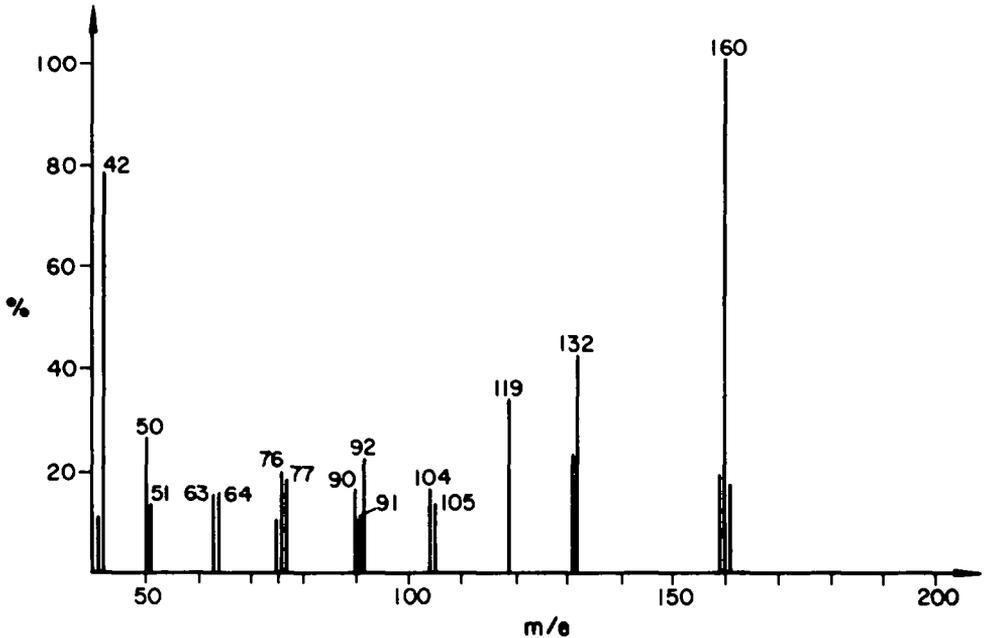


Abb. 5 Massenspektrum von 3-Methylchinazoln-(4).

Auch tritt das für das 3-Methylchinazoln-(4) charakteristische Bruchstück mit der Masse 42 m/e in den Spektren von Cyclopenin und Cyclophenol auf. Es entsteht bei der Massenspektrometrie dieser Verbindungen jedoch in so grosser Menge, dass es ausser aus 3-Methylchinazoln-(4) noch aus einer anderen Verbindung entstanden sein muss. Es ist deshalb anzunehmen, dass auch das in Schema 3 aufgeführte Fragment mit 161 m/e , das dem 3-Methylchinazoln-(4) strukturell ähnlich ist, unter Bildung eines Ions mit 42 m/e zerfallen kann.

Ein stabiles Ion mit 42 m/e tritt z.B. bei der Massenspektrometrie der Tropanalkaloide auf. Ihm wird die Struktur $\text{CH}\equiv\text{N}^+ - \text{CH}_3$ zugeschrieben.¹³ Es ist anzunehmen, dass das beim Zerfall von 3-Methylchinazoln-(4) und Cyclophenin bzw. Cyclophenol gebildete Fragment dieselbe Struktur hat.

Das nach Schema 5 gleichfalls zu erwartende Ion des 3-Methylchinazolindion-(2,4) (m/e 176, vgl. Abb. 6) entsteht bei der Massenspektrometrie von Cyclophenin und Cyclophenol nicht. 3-Methylchinazolindion-(2,4) selbst fragmentiert unter Bildung eines Ions mit 119 m/e , das wahrscheinlich die gleiche Struktur wie das in Schema 3 angegebene Ion der gleichen Mass hat. Die für dieses Fragment gefundenen Zerfallsprodukte sind auch auf den Spektren des 3-Methylchinazolindions-(2,4) zu erkennen (Abb. 6).

EXPERIMENTELLES

1. *Verwendete Chemikalien*

(a) (–)-Cyclopenin und (–)-Cyclophenol. Zur Gewinnung der beiden Alkaloide wurde *Penicillium cyclospium* Stamm SM 72, wie unter¹¹ angegeben, kultiviert, aus dem Kulturfiltrat das Gemisch der Alkaloide an Kohle absorbiert und von dieser mit Methanol eluiert.

Das Methanoleluat wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 10% iger wässriger Ammoniaklösung aufgenommen und die Lösung mehrmals mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Auszüge wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Das sich beim langsamen Eindunsten abscheidende, kristalline Gemisch von Cyclophenin und Cyclophenol wurde mit wenig Äthylacetat gewaschen und getrocknet.

Zur Trennung von Cyclophenol und Cyclophenin wurden 1 g Gemisch in möglichst wenig Aceton-Äthylacetat (1:3) gelöst und an einer Al₂O₃-Säule (Al₂O₃ neutral, Aktivität I (nach Brockmann), Länge der Säule 200 mm, Durchmesser 25 mm) chromatographiert. Als Elutionsmittel dienten je 100 ml der Mischungen Aceton/Äthylacetat, 1:3, 1:1 und 3:1. Anschliessend wurde mit 100 ml reinem Aceton und je 100 ml Aceton-Methanol 1:1 sowie 100 ml Methanol eluiert. Das Ergebnis wurde dünn-schichtchromatographisch (Laufmittel I) kontrolliert.

Cyclophenin erscheint in den ersten Fraktionen, Cyclophenol wird mit Aceton bzw. der Aceton-Methanol-Mischung aus der Säule ausgewaschen. Beide Verbindungen kristallisieren beim Eindunsten der Fraktionen. Sie wurden aus Methanol-Wasser und Aceton-Benzol-Heptan umkristallisiert. Cyclophenin: Fp. korr. 183–184°, Cyclophenol: Fp. korr. 215° (Zers.).

(b) (–)-Cyclophenol-2-¹⁴C, (–)-Cyclophenol-3-¹⁴C und (–)-Cyclophenol-5-¹⁴C wurden nach Verfütterung von DL-Phenylalanin-1-¹⁴C, D,L-Phenylalanin-2-¹⁴C bzw. Anthranilsäure-¹⁴COOH aus dem Kulturfiltrat von *Penicillium cyclospium* (Stamm SM 72) isoliert.⁹

(c) Viridicatin¹⁴ und Viridicatol⁴ wurden synthetisiert. 3-Methylchinazolon-(4) wurde aus Isatosäureanhydrid und Methylamin gewonnen.¹⁵ Die Zwischenprodukte der Umsetzung wurden hierbei nicht isoliert. Fp. des 3-Methylchinazolon-(4) 105° (vgl.¹⁶). Methylisocyanat wurde durch thermische Spaltung von N-Diphenyl-N'-methylharnstoff,¹⁷ dargestellt aus Diphenylcarbaminsäurechlorid und Methylamin^{18, 19} erhalten.

(d) *m*-Hydroxybenzylmethylamin wurde durch Hydrierung von *m*-Hydroxybenzalmethylimin in Anlehnung an die Vorschrift von Chromwell *et al.*^{20, 21} hergestellt.

2.44 g (0.02 Mol) *m*-Hydroxybenzaldehyd wurden in 50 ml Äthanol (95%) in der Wärme gelöst, die Lösung wurde mit 1.60 ml 40% iger wässriger Methylaminlösung (0.02 Mol) versetzt. Beim Abkühlen kristallisierte das gebildete *m*-Hydroxybenzalmethylimin in feinen Nadeln aus. Die Kristalle wurden mit wenig 50% igem Äthanol und mit Wasser gewaschen (Ausbeute 1.9 g (70.5% d.Th.) Fp. korr. 149 bis 151°).

Das Methylimin wurde in 100 ml Äthanol (95 V%) gelöst und in Gegenwart von frisch bereitetem alkalischen Raney-Nickel (hergestellt aus 5.0 g Legierung) bei Raumtemperatur und Normaldruck hydriert (Dauer 30 min). Danach wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingeengt und das zurückbleibende *m*-Hydroxybenzylmethylamin aus Essigester umkristallisiert (Ausbeute: 1.6 g (85% d.Th.), Fp. korr. 141–142°).

(e) N-*m*-Hydroxybenzyl-N,N'-dimethylharnstoff wurde durch Umsetzung äquimolarer Mengen von *m*-Hydroxybenzylmethylamin mit Methylisocyanat in Methanol gewonnen und aus Chloroform/Cyclohexan umkristallisiert (Ausbeute 95%, Fp. korr. 100–101°).

2. *Thermische Spaltung von (–)-Cyclophenin bzw. (–)-Cyclophenol*

Das Alkaloid (30–50 mg) wurde in einem Zweihalskolben mit 1.0 ml Diphenyläther versetzt. Der Kolben wurde unter Durchleiten von kohlendioxidfreiem und sauerstofffreiem, trockenem Stickstoff in einem Metallbad auf 220–240° 30 min erhitzt. Zur Absorption begideter Spaltprodukte wurde der Gasstrom zunächst durch 10 ml einer Lösung von 3.0 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 100 ml 20% iger Schwefelsäure, dann durch zwei Waschflaschen mit je 50 ml gesättigter Bariumhydroxidlösung, durch eine bei –70° gehaltene Kühlfalle, ein auf 450–650 erhitztes, mit Glaswolle und Kupferoxid gefülltes Glasrohr²² und wiederum durch eine Waschflasche mit 50 ml Bariumhydroxidlösung geleitet.

Bei der Spaltung von Cyclophenin wird der gebildete Benzaldehyd in der ersten Vorlage als 2,4-Dinitrophenylhydrazon abgeschieden. Der Niederschlag wurde nach Versuchsende abgesaugt, zunächst mit verdünnter Schwefelsäure und danach mit Wasser gewaschen und getrocknet (Ausbeute 10% d.Th.).

m-Hydroxybenzaldehyd, der bei der thermischer Spaltung von Cyclophenol entsteht, ist zu wenig

flüchtig, um mit dem Gasstrom aus dem Reaktionsgefäß entfernt zu werden. Er wurde bei der Aufarbeitung des Inhalts des Zweihalskolbens als 2,4-Dinitrophenylhydrazon abgeschieden (s.u.).

In der schwefelsauren Dinitrophenylhydrazinlösung wird das gebildete Methylisocyanat hydrolytisch in Methylamin und CO_2 zerlegt. Das gebildete Kohlendioxid wird in der nächsten Falle als Bariumcarbonat aufgefangen.

Das bei der thermischen Spaltung entstandene Kohlenmonoxid wird durch das erhitzte Kupferoxid zu CO_2 oxydiert. Das gebildete CO_2 wird in der letzten Falle als Bariumcarbonat zurückgehalten.

Die Fällungen von Bariumcarbonat in der zweiten und in der letzten Vorlage wurden scharf abzentrifugiert, dreimal mit je 25 ml Wasser gewaschen und getrocknet.

Der Inhalt des Zweihalskolbens wurde mit wenig Äther in ein Erlenmeyerkölbchen übergeführt und der Äther durch Erhitzen entfernt. Nach Zusatz von 10 ml Heptan wurde die Mischung zum Sieden erhitzt. Nach Stehen über Nacht wurde das abgeschiedene Viridicatin bzw. Viridicatol bei 0° abgesaugt (Ausbeute 60% d.Th.) und aus Methanol-Wasser umkristallisiert (Viridicatin: Fp. korr. $269-270^\circ$; Viridicatol: Fp. korr. 276°).

Das Filtrat wurde dreimal mit 10 ml Wasser extrahiert. Aus der wässrigen Lösung wurden nach Ansäuern mit 0.5 ml konzentrierter Salzsäure mit zweimal 10 ml Äther geringe, in der Lösung verbliebene Mengen von Viridicatin bzw. Viridicatol und nach der Spaltung von Cyclophenol der gebildete *m*-Hydroxybenzaldehyd ausgeschüttelt. Der Äther wurde in letzterem Falle mit 5 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagensetzt und auf dem Wasserbad entfernt. Das abgeschiedene 2,4-Dinitrophenylhydrazon wurde mit verdünnter Schwefelsäure und Wasser gewaschen und getrocknet.

Das *m*-Hydroxybenzaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon wurde durch präparative Schichtchromatographie (vgl. Abschnitt 3) von im Niederschlag enthaltenen, weniger polaren Dinitrophenylhydrazonen abgetrennt, mit Äthylacetat vom Schichtmaterial eluiert und aus Dioxan-Wasser umkristallisiert (Fp. korr. $258-260^\circ$; Fp. korr. von authentischem Material $260-262^\circ$; Mischschmelzpunkt beider Präparate $260-262^\circ$).

Die nach Ausschütteln mit Äther verbliebene wässrige Phase wurde mit Na_2CO_3 neutralisiert und dreimal mit 15 ml Chloroform extrahiert. Nach Trocknen der Auszüge wurde das Chloroform abdestilliert. Das zurückbleibende 3-Methylchinazol-(4) mehrerer Ansätze wurde gesammelt und aus Heptan umkristallisiert. Fp. korr. 105° ; Mischschmelzpunkt mit authentischem Material ohne Depression.

Zur Reinigung kleiner Mengen 3-Methylchinazol-(4) wurde der Rückstand in wenigen Tropfen Wasser gelöst und mit 0.3 ml gesättigter, wässriger Pikrinsäure-Lösung versetzt. Das sich in kleinen gelben Nadeln abscheidende Pikrat des 3-Methylchinazol-(4) wurde aus Aceton-Wasser umkristallisiert. Fp. korr. $200-204^\circ$ (Zers.) Mischschmelzpunkt mit authentischem Material ohne Depression (Ausbeute 5-10% d.Th.).

Zum direkten Nachweis des bei der thermischen Spaltung entstehenden Methylisocyanats wurde mit einem Überschuss von Cyclophenin bzw. Cyclophenol gearbeitet und der aus dem Reaktionsgefäß austretende Gasstrom direkt durch eine Lösung von *m*-Hydroxybenzylmethylamin in Methanol geleitet, bis die Substanz sich vollständig zu *m*-Hydroxybenzyl-N,N'-dimethylharnstoff umgesetzt hatte (Prüfung dünnschichtchromatographisch, vgl. Abschnitt³). Fp. korr. nach Umkristallisation aus Chloroform Cyclohexan, $100-101^\circ$, Mischschmelzpunkt mit authentischem Material ohne Depression.

3. Chromatographie

Die Chromatographie erfolgte an Kieselgel G (Merck).

Cyclophenin, Cyclophenol, Viridicatin, Viridicatol, 3-Methylchinazol-(4) und 3-Methylchinazolindion-(2,4):

Laufmittel: Benzol-Äthylacetat-Methanol (7:3:0.5). Die Mischung wurde bis zur Hälfte der Sättigungskonzentration mit Wasser versetzt.

Detektionsmittel: 1 ml 10%ige Eisenchloridlösung, 50 ml Methanol, 50 ml Wasser und 20 ml konzentrierte Salzsäure werden gemischt. Viridicatin und Viridicatol reagieren sofort unter Grünfärbung, Cyclophenin und Cyclophenol erst nach Erhitzen auf 100° . Der Fleck von 3-Methylchinazol-(4) wird durch Dragendorffs-Reagens orange-braun gefärbt. 3-Methylchinazolindion-(2,4) zeigt eine blaue Fluoreszenz.

Benzaldehyd- und *m*-Hydroxybenzaldehyddinitrophenylhydrazon:

Laufmittel: Heptan-Toluol-Äthylacetat (1:1:0.3).

Die Verbindungen sind als gelbe Flecke im Tageslicht direkt sichtbar.

m-Hydroxybenzylmethylamin und N-*m*-Hydroxybenzyl-N,N'-dimethylharnstoff:

Laufmittel: Benzol-Methanol-Ammoniaklösung (25%) (20:10:1). Detektion: diazotierte Sulfanilsäure.

4. Bestimmung der Radioaktivität

Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit dem Tricarb-Flüssigszintillations-Zähler. Bariumcarbonat wurde vor der Messung mit Citronensäure zersetzt und das entstehende CO₂ in einer methanolischen Lösung von Äthanolamin aufgefangen.

5. Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden in einem Hitachi-Perkin-Elmer-RMU-6D Massenspektrometer bei 70 eV aufgenommen. Temperatur: bei Viridicatin und Cyclopenin 170–190°, bei Viridicatol und Cyclo-penol 290–310°, bei 3-Methylchinazolol-(4) 20°, bei 3-Methylchinazololion-(2,4) 120°.

Bei der Formulierung der Fragmentierungsreaktionen wurden gewisse Vereinfachungen vorgenommen. Die Pfeile in den Schemata bedeuten deshalb nicht in jedem Fall einen ursächlichen Zusammenhang zwischen den einzelnen Ionen.

In den Schemata geben die Zahlen in Klammern die Intensität des Peaks bezogen auf den Basepeak an. In Schema 3 bezieht sich die erste Zahl auf das Spektrum des Cyclo-penins, die zweite auf das des Cyclo-penols.

LITERATUR

- ¹ K. G. Cunningham und G. G. Freeman, *Biochem. J.* **53**, 328 (1953).
- ² A. Bracken, A. Pocker und H. Raistrick, *Ibid.* **57**, 587 (1954).
- ³ J. H. Birkinshaw, M. Luckner, Y. S. Mohammed, K. Mothes und C. E. Stickings, *Ibid.* **89**, 196 (1963).
- ⁴ M. Luckner und Y. S. Mohammed, *Tetrahedron Letters* 1987 (1964).
- ⁵ M. Luckner und K. Mothes, *Arch. Pharmaz.* **296**, 18 (1963).
- ⁶ Y. S. Mohammed und M. Luckner, *Tetrahedron Letters* 1953 (1963).
- ⁷ H. Smith, P. Wegfahrt und H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1668 (1968).
- ⁸ M. Luckner, *Abh. dtsh. Akad. Wiss. Berlin. Kl. Chem., Geol. Biol.* Nr. 3, S. 445 (1966).
- ⁹ L. Nover und M. Luckner, *European J. Biochem.* im Druck.
- ¹⁰ M. Luckner und K. Mothes, *Tetrahedron Letters* 1035 (1962).
- ¹¹ M. Luckner, *European J. Biochem.* **2**, 74 (1967).
- ¹² M. Luckner, K. Winter und J. Reisch, *Ibid.* **7**, 380 (1969).
- ¹³ E. C. Blossy, H. Budzikiewicz, M. Ohashi, G. Fodor und C. Djerassi, *Tetrahedron* **20**, 585 (1964).
- ¹⁴ B. Eistert und H. Selzer: *Z. Naturforsch.* **17b**, 202 (1962).
- ¹⁵ E. Knappe: *J. pract. Chem.* II **43**, 209 (1891).
- ¹⁶ M. T. Bogert und G. A. Geiger: *J. Am. Chem. Soc.* **34**, 524 (1912).
- ¹⁷ Weygand-Hilgetag, *Organisch-chemische Experimentierkunst* p. 542, hrsg. von G. Hilgetag und A. Martini, Johannes Ambrosius Barth Verlag, Leipzig (1964).
- ¹⁸ BASF, D.R.P. 285 134.
- ¹⁹ J. R. Robinson und W. H. Brown: *Canad. J. Chem.* **29**, 1063 (1951).
- ²⁰ N. H. Cromwell, R. D. Babson und C. E. Harris: *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 313 (1943).
- ²¹ N. H. Cromwell und H. Hoeksema, *Ibid.* **67**, 1658 (1945).
- ²² H. Simon und H. G. Floss: *Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen.* Springer Verlag, Berlin (1967).