

Abb. 7. Erhöhung der Extinktion von Delphinin in Acetatpuffer, pH = 4,7, (—) bei Zusatz von gereinigtem Äpfelpektin (----). 18 mg Delphininchlorid wurden in 6 ml 0,1-proz. methanolischer HCl und 2 ml dest. Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 0,2 M Acetatpuffer (pH = 4,7) auf 50 ml aufgefüllt und dann mit Pektin in Acetatpuffer (pH = 4,7) versetzt (40 mg auf 18 mg Delphinin). Vor der Messung wurden Vergleichslösung und Probe mit Pektinzusatz 1 Tag stehen gelassen und dann zentrifugiert.

ein. Über die Art der Bindung der Anhydrobase des Delphinins an das Pektin können vorderhand keine exakten Angaben gemacht werden. Es ist möglich, daß Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Cyanin bildet mit Pektinen keine blauvioletten, nicht dialysierbaren Komplexe. Auch das Aglykon Delphinidin zeigt bei Pektinzusatz weder eine Farbvertiefung noch die Bildung einer hochmolekularen, nicht dialysierbaren Verbindung.

Diese Ergebnisse können möglicherweise die Beobachtung von K. Hayashi et al. [28] erklären, die aus *Commelinia communis* eine blaue Verbindung isoliert haben,

[28] K. Hayashi, Y. Abe u. S. Mitsui, Proc. Japan Acad. 34, 373 (1958); 35, 169 (1959).

die auf 4 mol Delphinidin glucosid 1 g-Atom Magnesium enthält. Dem widerspricht, daß zwischen Delphinin oder Delphinidin, wie bei den Cyanidinderivaten, spektroskopisch und beim Versuch zur Isolierung keine Tendenz zur Komplexbildung mit Erdalkali-Ionen in wäßrigem Medium bei pH = 2 bis 9 nachweisbar ist [16, 18, 29]. Die Anlagerung von vier zweizähligen Anthocyanliganden würde für das Magnesium die Koordinationszahl 8 ergeben. Deshalb ist diese Theorie vom komplexchemischen Standpunkt nicht wahrscheinlich. Wenn nun aber beim Commelin, ähnlich wie beim Ritterspornfarbstoff, die blaue Farbe durch die Kombination eines Polysaccharides mit der Anhydrobase des Delphinidindiglykosids zustande käme und das Magnesium lediglich eine schwer abzutrennende Verunreinigung darstellen würde, wären die Widersprüche gelöst. Es ist somit wahrscheinlich, daß K. Hayashi et al. [28] erstmals einen Vertreter dieser höhermolekularen Farbstoffklasse in Händen hatten.

Die Bindung von Anthocyanen an Pektine dürfte auch bei der Färbung von Früchten eine Rolle spielen. So ist schon lange bekannt, daß man den Farbstoff der roten Weintraube durch Zusatz eines pektin-abbauenden Enzyms, z.B. Vinibon [30], besser in Lösung bringt und so einen Rotwein mit intensiverer Farbe erhält.

Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt. Außerdem standen Sachbeihilfen des Fonds der Chemischen Industrie zur Verfügung. Beiden Organisationen sei auch hier für die Förderung unserer Arbeiten herzlich gedankt.

Eingegangen am 31. Mai 1966 [A 532]

[29] E. Bayer, Chimia 16, 333 (1962).

[30] E. Vogt: Der Wein. 3. Auflage, Eugen Ulmer, Stuttgart 1955, S. 129.

Elektronenbrenzen, eine neue Methode zur Analyse kleinsten Mengen organischer Substanzen

VON PROF. DR. H. SCHILDKNECHT NACH ARBEITEN MIT DR. F. ENZMANN,
DIPL.-CHEM. K. GEßNER, DIPL.-CHEM. K. PENZIEN, DIPL.-CHEM. F. RÖMER UND DR. O. VOLKERT

ORGANISCH-CHEMISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT HEIDELBERG

Mit tritiiertem Wasser einer spezifischen Aktivität von 5 Ci/ml inkubierte organische Verbindungen werden spezifisch fragmentiert. Die β-strahlenden Fragmente lassen sich nach chromatographischer Trennung in geringsten Mengen nachweisen. Chemisch identifiziert, gestatten sie Rückschlüsse auf die fragmentierten Verbindungen, wie Versuche mit Aminosäuren, Estern, Lactonen, Säureamiden, Chinonen, Terpenen, Stickstoff-Schwefel-Heterocyclen und Naturstoffen gezeigt haben.

1. Einleitung

„Die Körper geschickt in ihre Bestandteile zu zerlegen, deren Eigenschaften zu entdecken und sie auf verschiedene Art zusammenzusetzen, ist der Gegenstand und Hauptzweck der ganzen Chemie“. Mit diesen Worten

hat Carl Wilhelm Scheele allen Tätigkeiten des Chemikers die Analyse vorangestellt.

Die älteste Art, organische Stoffe zu zerlegen, war, sie einfach zu erhitzen, d.h. zu brenzen. Inzwischen kennt man mehrere Arten der Energiezufuhr, die zur Spaltung chemischer Bindungen führen. So beobachteten wir, daß

β -Resorcylsäure nicht nur durch Brenzen bei 150 °C, sondern auch bei Zimmertemperatur in tritiertem Wasser decarboxyliert. Wir haben diesen Vorgang „Elektronenbrenzen“ genannt^[1] und wußten dabei noch nicht, daß neben der β -Strahlung oft auch das Wasser selbst oder seine Radiolyseprodukte wie hydratisierte Elektronen und OH-Radikale^[2] bei der Fragmentierung von Nutzen sein können. Es war uns aber sogleich bewußt, daß die unvermeidliche Tritium-Markierung den Nachweis der nur in Spuren vorliegenden Fragmente außerordentlich erleichtert und oft überhaupt erst möglich macht.

Auch Bernsteinsäure decarboxyliert beim Elektronenbrenzen unter Bildung tritium-markierter Propionsäure^[3]. Die Decarboxylierung von Mandelsäure ergab Benzaldehyd, da der sich zunächst bildende Benzylalkohol von den oxidierenden Bestandteilen des tritierten Wassers oxidiert wird. Die Bildung von n-Hexanal aus n-Hexanol und von Cyclohexanon aus Cyclohexanol in tritiertem Wasser bestätigte diese Annahme. Alle Carbonylverbindungen ließen sich als aktives 2,4-Dinitrophenylhydrazone fassen.

Bereits zu Beginn unserer Arbeiten konnten wir also sagen: *Elektronenbrenzen heißt, organische Moleküle reduzierend, oxidierend und markierend in kleinere, gut nachweisbare komplementäre Bruchstücke zerlegen.*

Zu klären war noch, ob sich Fragmentierungsregeln aufstellen lassen, um mit Hilfe der gefäßten Bruchstücke – etwa nach Art eines Zusammensetzungsspiels – einen Strukturvorschlag machen zu können. Zum Teil können wir das jetzt schon bejahen, wenn auch noch viele Untersuchungen nötig sein werden, das Elektronenbrenzen zu einer allgemein brauchbaren Methode der Strukturaufklärung organischer Verbindungen auszubauen.

2. Arbeitstechnik

Substanzproben von wenigen μg bis zu einigen mg werden in Gläschen von etwa 5 cm Länge und 3 mm Innendurchmesser zusammen mit 2,5 bis 50 mg tritiertem Wasser einer spezifischen Aktivität von 5 Ci/ml eingeschmolzen. Man beläßt die Lösung oder Suspension bei Raumtemperatur oder höherer Temperatur mehrere Tage bis einige Wochen, bis eine Verfärbung des Röhrcheninhaltes zu beobachten ist. Die Reaktionsprodukte werden chromatographisch aufgearbeitet.

Bei der Dünnenschichtchromatographie registriert man die Fraktionen mit Hilfe eines Dünnenschichtscanners und bei der Gaschromatographie mit einem Durchflußdetektor. So erhält man Aktivitätskurven, die einem Spektrum gleichen und deren Banden oft auch chemisch identifizierbaren Brenzprodukten zugeordnet werden können. Wir haben deswegen zu jeder Abbildung mit „Elektronenbrenzspektren“ ein Schema der dünnenschichtchromatographischen Verteilung der Fragmente beigelegt. Es läßt sich daraus entnehmen, welche Fragmente chemisch und welche nur auf Grund ihrer Radioaktivität oder auch ihrer Fluoreszenz nachgewiesen wurden. Die Identifizierung der tritierten Fragmente erfolgt außerdem immer durch vergleichende Dünnenschichtchromatographie auf

[1] H. Schildknecht, Kerntechnik 6, 249 (1964).

[2] Basic Mechanisms in the Radiation Chemistry of Aqueous Media, Radiat. Res. Suppl. 4, 1–217 (1964).

[3] H. Schildknecht u. O. Volkert, Z. analyt. Chem. 216, 97 (1966).

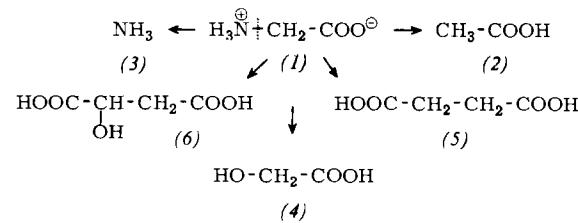
Kieselgel-G-Platten, wobei wir mindestens drei verschiedene Fließmittelsysteme verwenden. Dabei werden die aktiven Stellen von der Platte eluiert, erneut chromatographiert und meist auch das UV- bzw. IR-Absorptionsspektrum der eluierten Verbindung ermittelt.

Das Elektronenbrenzen mit Tritiumgas wird auf folgende Weise ausgeführt: Das Tritium wird zur Sicherheit an Uranpulver gebunden. Hierzu wird Uranhydrid bei 450 °C und 10⁻³ Torr in Wasserstoff und Uran gespalten. Das so vorbehandelte Uranpulver adsorbiert bei Raumtemperatur das Tritiumgas (3 Ci, 97,7 %), wobei sich Urantritid bildet, das bei 450 °C das Tritium wieder abgibt. Zur Bestrahlung pumpst man das Tritiumgas in ein Reaktionsgefäß (Volumen 5 ml), in dem sich die zu analysierende Substanz befindet. Die Substanz wird ständig mit einem glasüberzogenen Magnetdräht aufgewirbelt, um möglichst gleiche Bestrahlungsverhältnisse zu schaffen. Licht schirmten wir mit Stanniolpapier ab.

3. Elektronenbrenzen bekannter Verbindungen

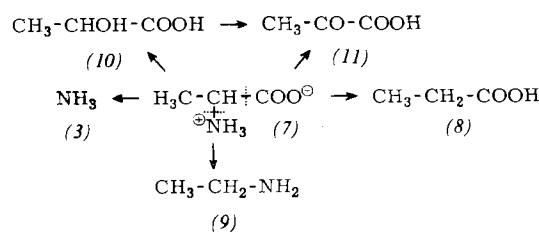
3.1. Elektronenbrenzen von Aminosäuren^[4]

Beim Elektronenbrenzen von Glycin (1) erhielten wir nur zwei Produkte, die ohne Folgereaktionen lediglich durch Spaltung von Bindungen entstanden waren. Auf dem Papier-Radiochromatogramm fanden wir das Ammoniumsalz der Essigsäure, die wir als Laufmittel mit verwendeten, und in einem anderen Chromatogramm Essigsäure (2). (Hier und in den folgenden Elektronenbrenz-Schemata sind die gespalteten Bindungen durch eine punktierte Linie markiert.) Nicht wiedergegeben



wurde, daß in allen Verbindungen der Wasserstoff zum Teil durch Tritium ersetzt ist. Diese Markierung erfolgt direkt durch Absättigung des Radikals $\bullet\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$ mit Tritiumatomen. Auch OH(OT)-Radikale können mit $\bullet\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$ reagieren, worauf die Bildung von Glykolsäure (4) und Äpfelsäure (6) hinweist. Im Einklang mit Literaturangaben^[5] über die Radiolyse organischer Verbindungen in Wasser mit γ -Strahlen läßt sich die Bildung der Bernsteinsäure (5) nur über intermediäre Radikalfragmente erklären.

Nach diesen Ergebnissen am Glycin waren wir nicht überrascht, bei der chromatographischen Analyse der



[4] K. Geßner, Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 1966.

[5] W. M. Garrison, Radiat. Res. Suppl. 4, 158 (1964).

Elektronenbrenz-Lösung von Alanin (7) Milchsäure (10) und Brenztraubensäure (11) zu finden. Nach Garrison^[5] spielen bei der radiolytischen Bildung von Brenztraubensäure (11) ebenfalls OH-Radikale eine Rolle. (11) kann aber auch direkt aus (10) gebildet werden. Wie aus dem Dünnschicht-Radiochromatogramm (Abb. 1) zu entnehmen ist, war neben (11) hauptsächlich Propionsäure (8) entstanden. Die damit zum Ausdruck kommende C–N-Spaltung wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß in gelösten Aminosäuren der Bindungsabstand zwischen dem protonierten N-Atom und dem C-Atom gegenüber dem Normalwert von 1,32 Å auf 1,50 Å vergrößert ist^[6]. Die C–N-Bindung ist im Zwitterion also geschwächt. Wenn kein Zwitterion vorliegt, wie in der Gasphase im Massenspektrometer, so tritt bevorzugt Spaltung der nächst schwächeren C=C=O-Bindung ein^[7]. In Lösung kann man aber auch untergeordnet eine Decarboxylierung beobachten, unter Bildung von Äthylamin (9).

Besonders ausgeprägt machte sich die Decarboxylierung beim Elektronenbrenzen von Asparaginsäure (12) be-

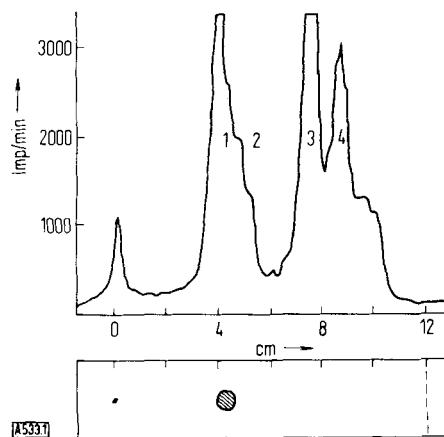


Abb. 1. Dünnschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 5 µg Alanin (7) (Laufmittel: Äthanol/NH₃/H₂O (80:4:16 v/v)). 1: Alanin (7); 2: Milchsäure (10); 3: Propionsäure (8) + Brenztraubensäure (11); 4: Alaninäthylester.

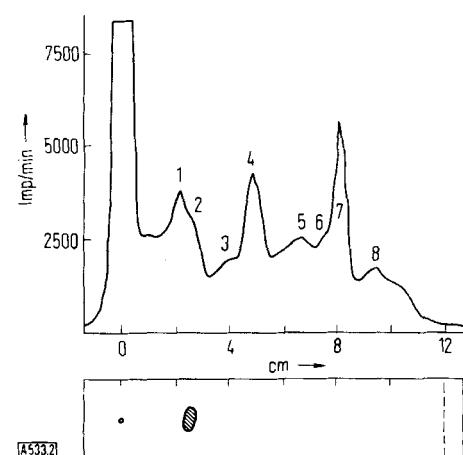


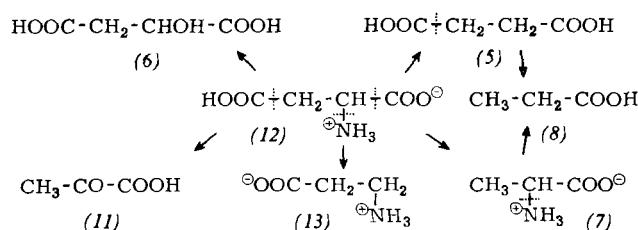
Abb. 2. Dünnschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 5 µg Asparaginsäure (12) (Laufmittel: Äthanol/NH₃ (7:3 v/v)). 1: Äpfelsäure (6); 2: Asparaginsäure (12); 3: Bernsteinsäure (5); 4: β-Aminopropionsäure (13); 5: Alanin (7); 6: Propionsäure (8); 7: Brenztraubensäure (11); 8: Asparaginsäureäthylester.

[6] R. B. Corey u. J. Donohue, J. Amer. chem. Soc. 72, 2899 (1950).

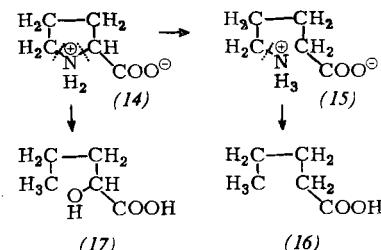
[7] G. Junk u. H. Svec, J. Amer. chem. Soc. 85, 839 (1963).

merkbar. Wie aus dem entsprechenden Dünnschicht-Radiochromatogramm (Abb. 2) hervorgeht, konnten Alanin (7), β-Aminopropionsäure (13) und Propionsäure (8) auch dann noch einwandfrei nachgewiesen werden, als wir (12) lediglich bei Raumtemperatur mit tritiertem Wasser stehenließen. Dieses Resultat unterstreicht in schöner Weise die spezifische Wirkung des tritierten Wassers.

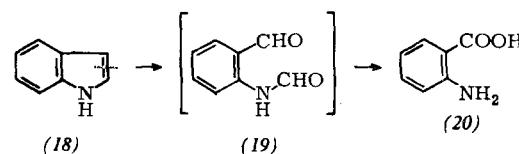
Daneben sind, wie im folgenden Elektronenbrenz-Schema aufgeführt, durch reduktive Desaminierung wieder Bernsteinsäure (5) und daraus Propionsäure (8) entstanden, oxidativ Äpfelsäure (6) und Brenztraubensäure (11); (8) kann sich auch aus (7) gebildet haben.



In besonders übersichtlicher Weise wurde beim Elektronenbrenzen von Prolin (14) der Ring geöffnet und (14) bis zur Valeriansäure (16) abgebaut. Nach Aktivitätsmessungen waren die Ausbeuten verglichen mit der Brenzreaktion beim Alanin (7) geringer. Wahrscheinlich kommt den Verbindungen mit 5-Ring – wie auch



bei der Massenspektroskopie bewiesen^[8] – größere Stabilität zu als den offenkettigen, oder es geht dem Kettenabbau eine Ringöffnung durch Hydrolyse voraus. So wird Tryptophan (21) schon allein durch Erwärmen mit Wasser etwas zu Indol (18) abgebaut. Auch beim Elektronenbrenzen von (21) bildet sich (18), das, selbst elektronengebunden, sehr wahrscheinlich über (19) die Anthranilsäure (20) gibt.



Diese Fragmentierung ist beim Elektronenbrenzen von Tryptophan (21) ganz nebенständlich, da nach dem Dünnschicht-Radiochromatogramm (Abb. 3) eine relativ große Zahl primärer Spaltprodukte entsteht.

Die Radiolyse von (21) mit Röntgenstrahlen^[9] liefert ebenfalls mehrere Spaltprodukte, die durch Decarboxy-

[8] K. Biemann: Mass Spectrometry, McGraw-Hill Book Comp., Inc., New York 1962, S. 260–296.

[9] G. Peter u. B. Rajewsky, Z. Naturforsch. 18b, 110 (1963).

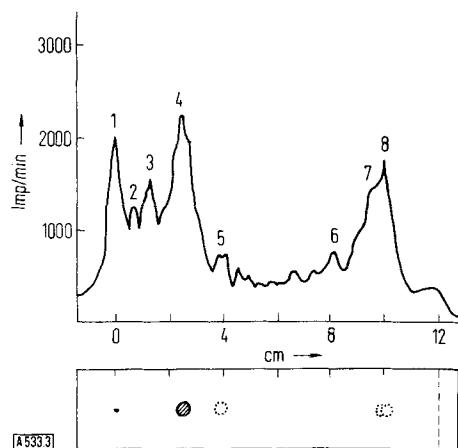
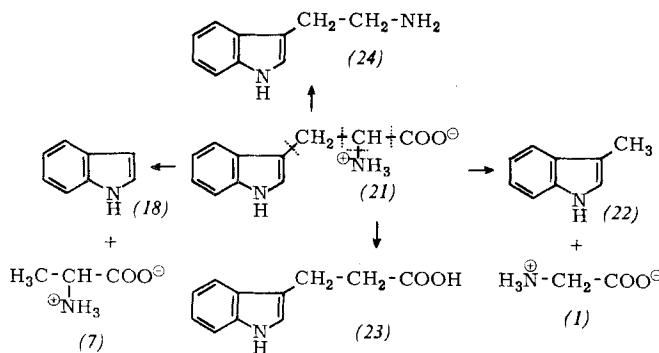


Abb. 3. Dünnenschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 10 µg Tryptophan (21). (Laufmittel: Butanol/NH₃ (7:3 v/v).) 1: Startpeak; 2: Glycin (1); 3: Alanin (7); 4: Tryptophan (21); 5: 3-Indolyl-β-propionsäure (23); 6: Tryptamin (24); 7: Indol (18); 8: Skatol (22).

lierung und Veränderung im Kohlenstoffgerüst entstanden sind. Eine Desaminierung wird nicht gefunden, auch nicht im Massenspektrometer^[8]; hier liegt die stärkste Bande bei m/e = 130, ein Hinweis darauf, daß die Fragmentierung bevorzugt beim Skatol (22) Halt macht. Das gleiche Ergebnis finden wir beim Elektronenbrenzen, wo neben der Bande für das Ausgangsmaterial (21) die größte Aktivität für die Skatol-Fraktion gefunden wurde. Das komplementäre Bruchstück, das Glycin (1), wurde auch gefunden. Aber nicht nur aus diesen Bruchstücken, sondern auch aus den Fragmenten (18) und (7) kann man auf das Ausgangsmaterial schließen.



Wie beim Tryptophan (21) erhielten wir beim Elektronenbrenzen des Wuchsstoffes 3-Indolyl-essigsäure neben Essigsäure Indol (18) und Skatol (22).

3.2. Elektronenbrenzen von Estern, Lactonen und Säureamiden^[10]

Als Hauptprodukt beim Elektronenbrenzen von Benzoësäurebenzylester entstand Benzoësäure, die wie der Ester stark markiert, auf der Dünnenschicht chemisch aber weder mit Bromkresolpurpur noch mit Bromphenolblau nachweisbar war. Daneben bildete sich p-Hydroxybenzoësäure, die natürlich dann ausblieb, als anstelle von tritiertem Wasser mit Tritiumgas elektro-nengebrannt wurde; dagegen entstand in beiden Fällen auch Benzaldehyd. Die hohen Radioaktivitäten der

Fragmente ermöglichen es, noch 0,1 µg Benzoësäurebenzylester durch sein Elektronenbrenzspektrum zu charakterisieren.

Bei der Formulierung der radiolytischen Reaktion kann man sich eine Spaltung der O-Benzylbindung vorstellen, entsprechend den Überlegungen von McLachlan^[11, 12] und den massenspektrometrischen Ergebnissen von Emery^[13]. Nicht erklärt wird dabei die hohe Aktivität der Benzoësäure. Diese könnte Folge einer Markierung im Phenylkern sein, die wiederum Hinweis auf ein mesomeriestabilisiertes Benzoylradikal sein könnte. Das Radikal gibt mit Wasserstoff Benzaldehyd, der zum Teil im sauerstoffhaltigen Tritiumgas zur Benzoësäure oxidiert wird.

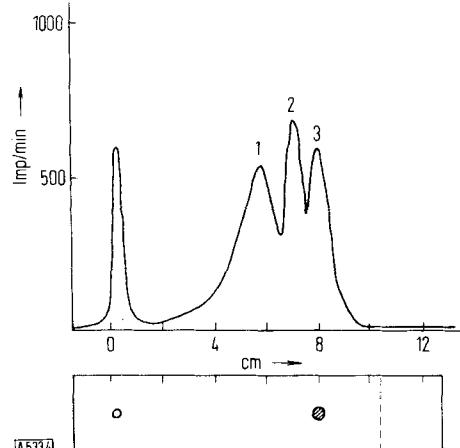


Abb. 4. Dünnenschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Produkte von 4 µg Benzoësäure-benzylester mit Tritiumgas. (Laufmittel: Benzol/Dioxan/Eisessig (90:25:4 v/v).) 1: Benzoësäure; 2: Benzaldehyd; 3: Benzoësäurebenzylester.

Aus Salicylsäure-phenylester entsteht beim Elektronenbrenzen in tritiertem Wasser oder Tritiumgas ebenfalls Salicylsäure; daneben wurde Phenol nachgewiesen. Offensichtlich wird dieses nicht durch Verseifung, son-

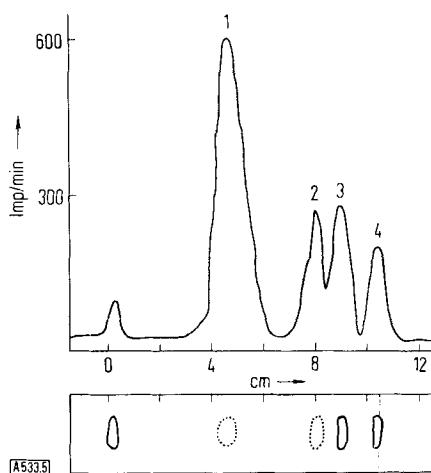


Abb. 5. Dünnenschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 5 µg Bernsteinsäure-dibenzylester in tritiertem Wasser unter UO₂-Zusatz (Laufmittel: Äthanol/ Ammoniak/Wasser (100:16:12 v/v)). 1: Bernsteinsäure; 2: Propionsäure; 3: Bernsteinsäure-dibenzylester; 4: Propionsäure-benzylester.

[10] H. Schildknecht u. F. Enzmann, Z. analyt. Chem., im Druck.

[11] A. M. McLachlan, J. Amer. chem. Soc. 82, 3309 (1960).

[12] A. M. McLachlan, J. org. Chemistry 29, 1598 (1964).

[13] E. M. Emery, Analytic. Chem. 32, 1495 (1960).

dern durch eine nucleophile Verdrängung am Carbonylkohlenstoff durch thermische Elektronen gebildet.

Beim Bernsteinsäure-dibenzylester hatten wir unter den beschriebenen Elektronenbrenzbedingungen zunächst keinen Erfolg. Erst bei Zugabe von Urandioxid-Pulver zum Reaktionsgemisch erhielten wir das Radiochromatogramm gemäß Abbildung 5. Danach wurde der Ester über die Bernsteinsäure bis zur Propionsäure bzw. deren Benzylester abgebaut. Aus dem Benzylrest entstand, als 2,4-Dinitrophenylhydrazone faßbar, wieder Benzaldehyd.

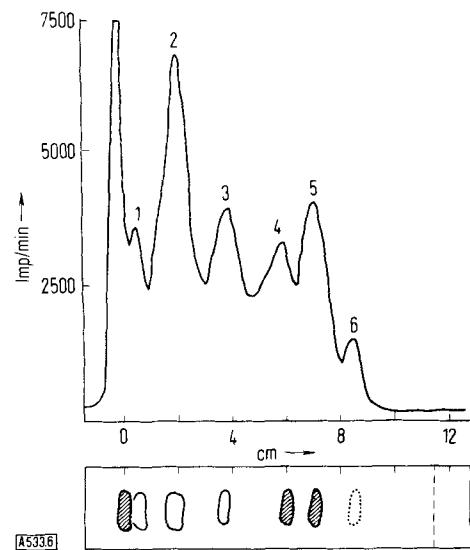
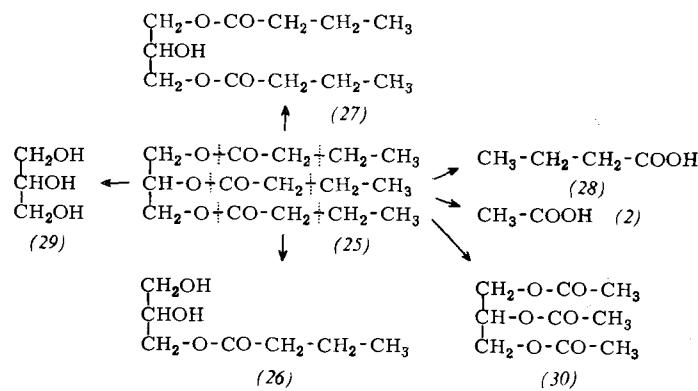


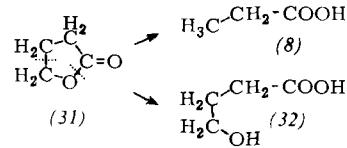
Abb. 6. Dünnschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 10 µg Tributyrin (25) (Laufmittel: Benzol/Dioxan (90:25 v/v)).

Wie vielfältig Tributyrin (25) durch tritiumes Wasser fragmentiert wird, zeigt Abbildung 6. Erstaunlich ist, daß zunächst der Buttersäurerest zum Essigsäurerest abgebaut wird, wie im folgenden Schema der Brenzreaktion veranschaulicht ist.



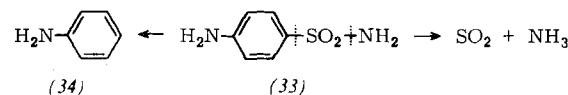
Obwohl wir chromatographisch nicht zwischen 1,3- und 1,2-Dibutyryl entscheiden konnten, dürfen wir doch auf Grund der Folgeprodukte annehmen, daß beim Elektronenbrenzen von (25) das 1,3-Dibutyryl (27) entsteht. In einem zweiten Chromatogramm ließ sich auch Glycerin (29) gut von den anderen Komponenten trennen. Es zeigt im Radiochromatogramm kaum ein Maximum, da es das labil gebundene Tritium beinahe vollständig beim Entwickeln des Chromatogramms austauscht. Glycerin kann jedoch mit $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ sichtbar gemacht werden.

γ -Butyrolacton (31) kann mit H_2O erst durch längeres Kochen und nur zum Teil zur Hydroxybuttersäure (32) verseift werden; mit tritiertem Wasser bildet sich diese



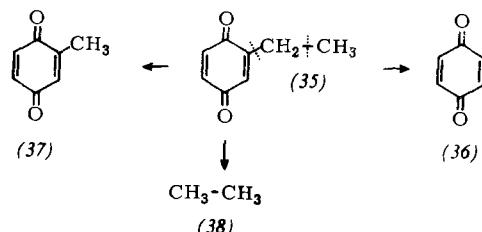
aber schon bei Raumtemperatur und mit besseren Ausbeuten. Neben (32) entsteht Propionsäure (8). Auch bei der Massenspektrometrie von (31) bildet sich ein C₃-Fragment, das als C₃H₄O[⊕]-Ion registriert wird [14].

Um eine Hydrolyse von vornherein auszuschließen, wurde Sulfanilamid (33) mit 3 Ci Tritiumgas zehn Tage lang inkubiert. Die Fragmentierung führte zu Anilin (34), Ammoniak und sehr wahrscheinlich Schwefel-dioxid.



3.3. Elektronenbrenzen von Chinonen^[15]

Das Verhalten der Chinone beim Elektronenbrennen interessierte uns, weil nicht selten die von uns untersuchten Abwehrstoffe von Arthropoden^[16] und auch von Pflanzen^[17] p-Benzochinone sind. Besonders wenn nur wenige µg einer solchen Verbindung für die Analyse verfügbar sind, kann bei alkylierten p-Benzochinonen die Art und Stellung der Seitenkette nur nach langem Mühen angegeben werden. Wir untersuchten deswegen zunächst das Elektronenbrenzverhalten derartiger Chinone. Schon beim ersten Beispiel, dem Äthyl-p-benzochinon (35), konnten wir beobachten, daß der Äthylrest stufenweise abgespalten wird; Benzo- und Toluchinon fanden wir dünnenschichtchromatographisch, das tritium-markierte Äthan mit dem Radiogaschromatographen.



Neben tritium-markierten Chinonen (35), (36) und (37) entstehen immer auch die markierten Hydrochinone. Das entspricht den Befunden von Vermeil^[18], wonach Hydrochinon aus p-Benzochinon bei der γ -Bestrahlung

[14] L. Friedman u. F. A. Long, J. Amer. chem. Soc. 75, 2832 (1953).

[15] F. Römer, Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 1966.

[16] H. Schildknecht, *Angew. Chem.* 75, 762 (1963); *Angew. Chem. internat. Edit.* 3, 73 (1964).

[17] Nachr. Chem. Techn. 12, 177 (1964).

[18] C. Vermeil, G. Roquer u. L. Salomon, J. Chim. physique 60, [5], 659 (1963).

in Wasser als ein Hauptprodukt entsteht. Die Bildung von Hydroxychinonen, die zu Huminsäuren weiterreagieren, kann dagegen vermieden werden, wenn man das tritierte Wasser mit Benzol, Toluol oder Äthanol als

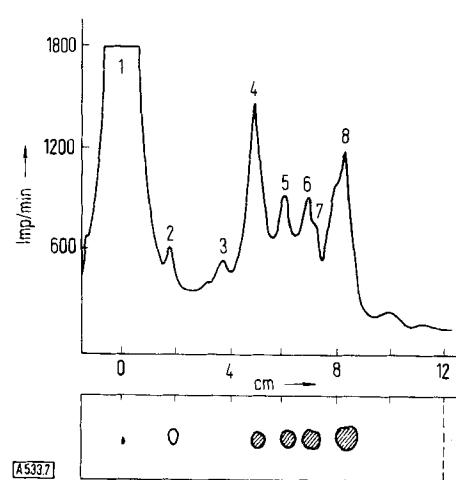
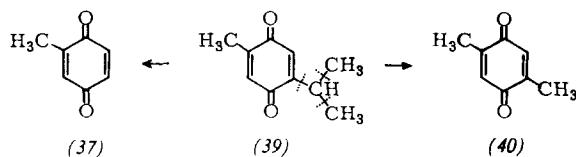


Abb. 7. Dünnschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 40 µg 2-Isopropyl-5-methyl-p-benzochinon (39) (Laufmittel: Petroläther (60–70 °C)/Eissigester (6:4 v/v)).

1: Huminsäuren; 2: Dithymochinon; 3: Toluhydrochinon; 4: 2,5-Dimethylhydrochinon; 5: Thymohydrochinon; 6: Toluchinon (37); 7: 2,5-Dimethyl-p-benzochinon (40); 8: Thymochinon (39).

Lösungsvermittler versetzt. Bei Zusatz eines organischen Lösungsmittels kann außerdem die Temperatur von 40 auf 80 °C erhöht werden, ohne daß beim Elektronenbrenzen polymere Produkte in größerer Menge entstehen.

Nach dem Elektronenbrenzen von n-Propyl-p-benzochinon fanden wir dünnenschichtchromatographisch neben den erwarteten Hydrochinonen Toluchinon (37). Benzochinon wurde nur als Hydrochinon nachgewiesen. Nach dem Elektronenbrenzen von Thymochinon (39) konnte nur die Hälfte der aktiven Brenzprodukte mit Sprühreagentien auf der Dünnschichtplatte sichtbar gemacht werden (Abb. 7). Durch das Toluchinon (37) und das 2,5-Dimethylchinon (40) sind Abspaltung bzw. Fragmentierung der Isopropylseitenkette nachgewiesen. Als Zwischenprodukt muß das 2-Äthyl-5-methyl-p-benzochinon entstanden sein, von dem aber – wie oben beschrieben – die Äthylgruppe weiter abgebaut wird. Die



Methylgruppe scheint dagegen stabiler zu sein, wie wir durch Elektronenbrenzen von Toluchinon (37) selbst zeigen konnten. Der Abbau findet also meist an der längeren und eventuell verzweigten Seitenkette statt. Selbst der Phenylrest wird – beim Elektronenbrenzen von Phenyl-p-benzochinon – glatt unter Bildung von Benzochinon abgespalten.

[19] H. Schildknecht u. K. H. Weis, Z. Naturforsch. 16b, 810 (1961).

Nun sind wir aber bei den Arthropoden-Abwehrstoffen auch den Methoxy-p-benzochinonen begegnet [19], die wir hinsichtlich ihres Elektronenbrenzverhaltens ebenfalls studiert haben. Dabei fanden wir, daß die Methoxygruppe leicht abgespalten wird. Dies ist von besonderer Bedeutung bei der Strukturaufklärung komplizierter Methoxychinone, die durch Elektronenbrenzen in einfachere und damit meist in bekannte alkylierte p-Benzochinone übergeführt werden können. Nicht nur das Methoxy-p-benzochinon (42), sondern auch das 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon (41) ergab mit Tritium markiertes Benzochinon (36), wieder neben den entsprechenden Hydrochinonen (vgl. Abb. 8).

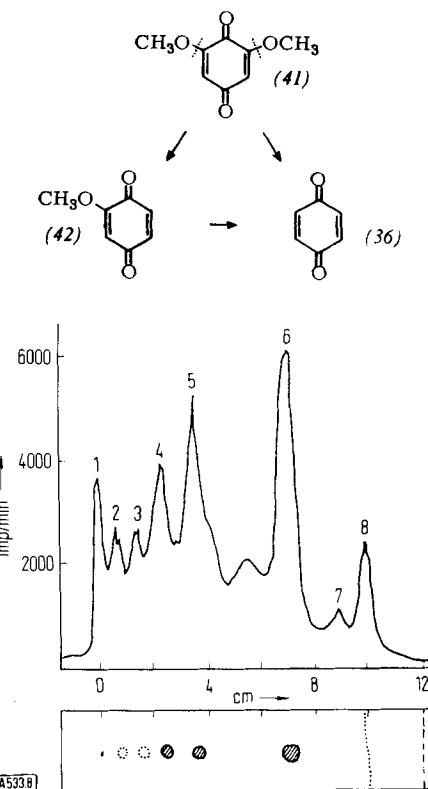
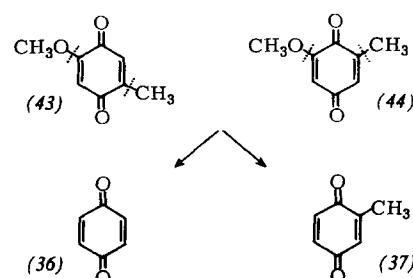


Abb. 8. Dünnschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 50 µg 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon (43) (Laufmittel: Chloroform/Petroläther (60–70 °C)/Äthanol (60:37:4 v/v)).

1: Polymere; 2: Hydrochinon; 3: Methoxyhydrochinon; 4: 2,6-Dimethoxyhydrochinon; 5: 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon (41); 6: Methoxy-p-benzochinon (42); 7: p-Benzochinon (36); 8: zweite Laufmittelfront.

Beim Elektronenbrenzen der Stellungsisomeren 2-Methoxy-5-methyl-p-benzochinon (43) und 2-Methoxy-6-methyl-p-benzochinon (44) wird neben Benzochinon nur das Toluchinon (37) gefunden. Die Methoxygruppe wird also leichter abgespalten als die Methylgruppe.



3.4. Elektronenbrenzen von Menthol und Thymol

Wir verwendeten zonengeschmolzenes Menthol (45). Die Startbande in Abbildung 9 röhrt her von adsorbiertem tritiertem Wasser und hydroxyliertem Menthol. Bande 2 wurde dem cis-3-Methylcyclohexanol (49) zugeordnet, das wir durch Reduktion von 3-Methylcyclohexanon mit LiAlH₄ hergestellt haben. Das trans-Isoomere (50) entstand ebenfalls beim Elektronenbrenzen, jedoch schwächer markiert. Bande 3 entspricht dem trans-2-cis-5-Dimethylcyclohexanol (51). Daß beim Elektronenbrenzen dieses Isomeres entsteht, ist im Einklang mit dem Befund von Hückel^[21], wonach (51) im

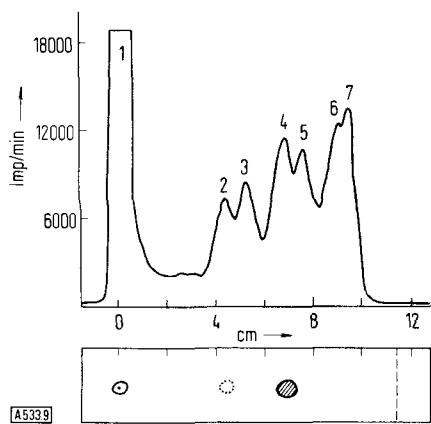
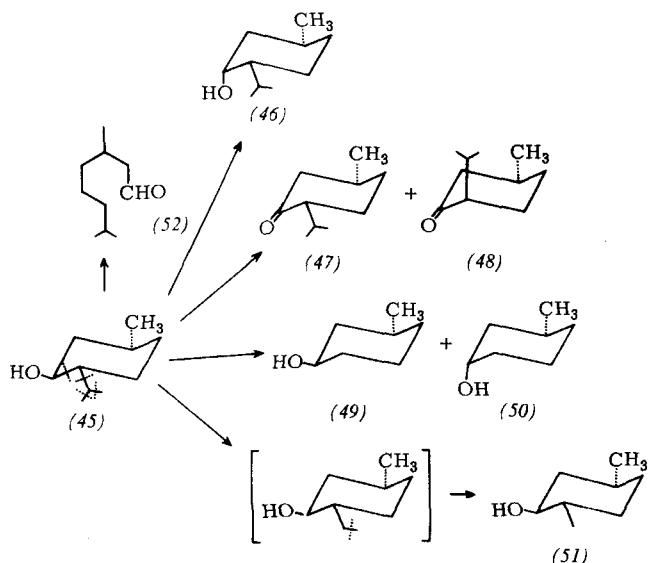


Abb. 9. Dünnschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 15 µg Menthol (45) (Laufmittel: Chloroform/Petroläther (60–70 °C)/Äthan (60:37:3 v/v)).

1: Hydroxyliertes Menthol; 2: cis-3-Methylcyclohexanol (49); 3: trans-2-cis-5-Dimethylcyclohexanol (51); 4: Menthol (45); 5: Neomenthol (46); 6: Menthon (47); 7: 7,3-Dimethyloctanal (52).

Gleichgewichtsgemisch mit seinen Isomeren am stärksten vertreten ist. Es entspricht in seiner Konfiguration dem Menthol. Wegen der gleichen R_f-Werte für Menthol und Isomenthol, Bande 4, sowie Neomenthol und Neoisomenthol, Bande 5, mußte auf eine Zuordnung

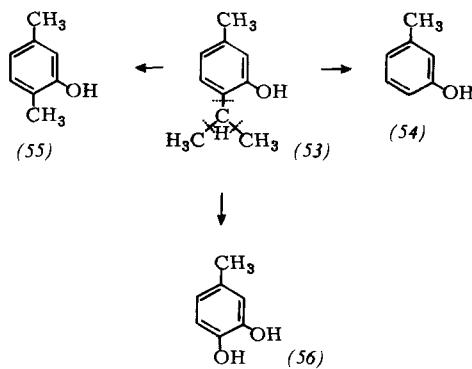


[20] H. Schildknecht u. K. Penzien, Z. analyt. Chem. 219, 102 (1966).

[21] W. Hückel, H. Feltkamp u. S. Geiger, Liebigs Ann. Chem. 637, 1 (1960).

dieser Banden zu einem bestimmten Isomeren verzichtet werden. Dafür konnten mit einem zweiten Chromatogramm (Laufmittel: Methylenchlorid) Isomenthon (48), Menthon (47) und 3,7-Dimethyloctanal (52) unter den Elektronenbrenzprodukten des Menthols gefunden werden.

Wie bei der Fragmentierung des Thymochinons (39) findet auch beim Menthol (45) eine Abspaltung der Isopropylgruppe statt. Sie dürfte deswegen bevorzugt sein, weil die Stabilisierungsenergie des vermutlich entstehenden Isopropylradikals groß ist. In dieselbe Richtung deutet der Befund, daß eine Abspaltung der ringständigen Methylgruppe des Menthols nicht beobachtet wurde. Merkwürdig bleibt, daß 2,5-Dimethylcyclohexanol (51) gefunden wird, aber kein 2-Äthyl-5-methylcyclohexanol, denn es ist unwahrscheinlich, daß die Spaltung zweier C–C-Bindungen synchron verläuft. So fand Hentz^[22] bei der ⁶⁰Co-γ-Radiolyse von Isopropylbenzol unter anderem Benzol, Äthylbenzol und Toluol. Das 3,7-Dimethyloctanal (52) aus Menthol in tritiertem Wasser dürfte entstehen, weil die Bindung zwischen dem C-Atom mit der Hydroxygruppe und dem isopropyl-substituierten C-Atom, verglichen mit den übrigen C–C-Bindungen des Ringes, am schwächsten ist. Die Dissoziationsenergie einer C–CO-Bindung ist kleiner als die einer C–C-Bindung. Was den dazugehörigen Mechanismus betrifft, so kann man in Ergänzung zum Elektronenbrenz-Schema die Alkyl-Abspaltung am besten durch den Angriff eines solvatisierten Elektrons erklären. Die dem Chemiker viel geläufigeren Oxidations-, Reduktions- und Ringspaltungsreaktionen aber können durch die übrigen Radiolyseprodukte des Wassers, besonders durch die OH-Radikale, eingeleitet worden sein.



In guter Übereinstimmung mit der Fragmentierung beim Menthol verlief das Elektronenbrenzen von Thymol (53). Von besonderem Interesse dürfte für den Naturstoffchemiker wieder die stufenweise und bevorzugte Abspaltung der Isopropylgruppe sein.

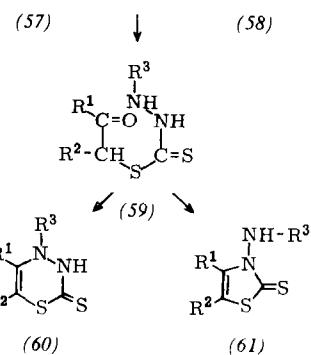
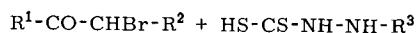
4. Strukturaufklärung von Thiazolen und Thiadiazinen durch Elektronenbrenzen^[23]

Die aus α-Halogenketonen (57) und N-substituierten Dithiocarbonsäurehydraziden (58) hergestellten Derivate (59) können zu einem 3,4-Dihydro-2*H*-1,3,4-thiadiazin-2-thion (60), aber auch zu einem 1,3-Thiazol-2-thion (61) den Ring schließen.

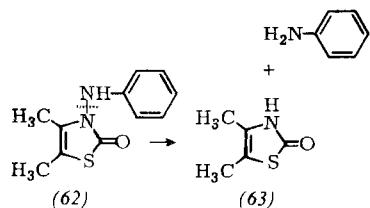
Für den Fall R³ = H kann der Fünfring in (61) leicht durch Desaminierung bewiesen werden, wenn nicht schon der Nachweis der Aminogruppe durch die Bil-

[22] R. R. Hentz, J. physic. Chem. 66, 1622 (1962).

[23] G. Ege, K. Geßner u. H. Schildknecht, unveröffentlicht.



dung einer Schiffsschen Base genügt. Dieser Beweis gelingt aber nicht mehr, wenn R^3 ein organischer Rest ist. Für $R^3 = \text{CO-C}_6\text{H}_5$ hat Sato^[24] einen 6-Ring formuliert, da solche Verbindungen alkalilöslich sind und diese Eigenschaft mit der Thiolbildung erklärt werden kann. Ege^[25] fand jedoch, daß die Alkalilöslichkeit kein Kriterium für die Sechsringstruktur ist. Weder chemisch noch spektroskopisch (NMR, UV, IR) gelang es, die Fünfringstruktur für das 3-Anilino 4,5-dimethyl-2*H*-1,3-thiazol-2-on (62) zu beweisen.



Beim Elektronenbrenzen von (62) sollte Anilin entstehen. In der Tat konnten auf dem Dünnschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 20 µg (62) die beiden komplementären Fragmente, Anilin und 4,5-Dimethyl-2*H*-1,3-thiazol-2-on (63), sowohl mit dem Dünnschichtscanner als auch chemisch nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10).

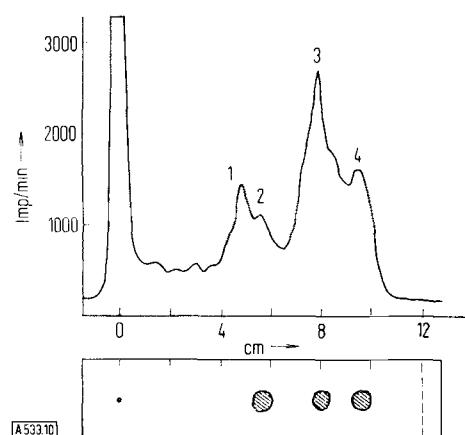
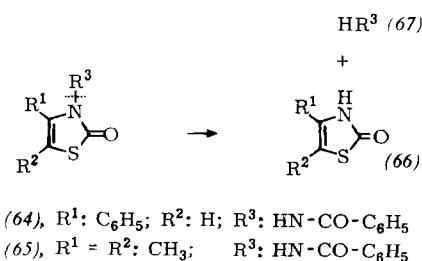


Abb. 10. Dünnschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 20 µg (62) (Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5 v/v)).
1: nicht aufgeklärt; 2: 4,5-Dimethyl-2*H*-1,3-thiazol-2-on (63); 3: Anilin; 4: 3-Anilino-4,5-dimethyl-2*H*-1,3-thiazol-2-on (62).

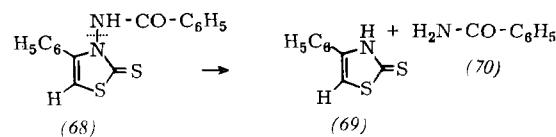
[24] T. Sato u. M. Ohta, J. pharmac. Soc. Japan (Yakugaku-zasshi) 75, 1535 (1955); Chem. Abstr. 50, 10727 (1956).

[25] G. Ege, unveröffentlicht.

Auch bei den Verbindungen (64) und (65) gab das Elektronenbrenzen erneut eine Bestätigung der von Ege bewiesenen Fünfringstruktur, da sich im Dünnschicht-Chromatogramm (66) und (67) nachweisen ließ. Ganz



entsprechend führte das Elektronenbrenzen von 3-Benzoylamido-4-phenyl-2*H*-1,3-thiazol-2-thion (68) mit Methanol als Lösungsmittel zu Benzamid (70) und 4-Phenyl-2*H*-1,3-thiazol-2-thion (69).



Beim Elektronenbrenzen von Thiazolen und Thiadiazinen überraschte immer wieder die für den Strukturbeweis schlüssige Fragmentierung. Schlüssig insofern, als die Thiadiazine nicht in die entsprechenden Fünfringverbindungen umgelagert, sondern zu noch unbekannten Fragmenten abgebaut werden. Sehr wahrscheinlich überlagern sich beim Elektronenbrenzen die hydrolytische Wirkung des Wassers und die spezifische Fragmentierungswirkung des hydratisierten Elektrons.

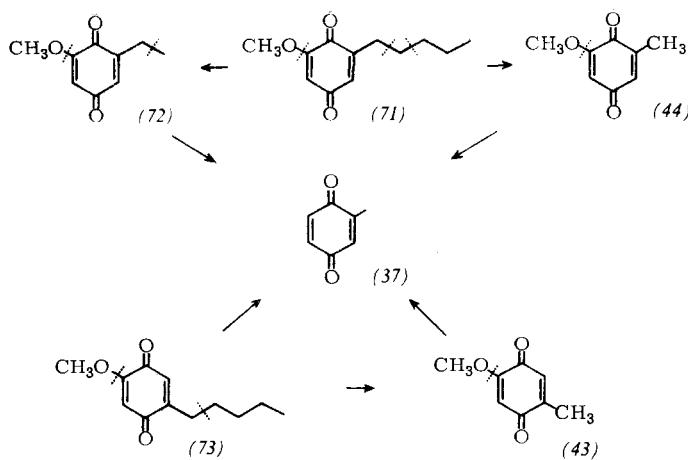
5. Strukturaufklärung von Naturstoffen durch Elektronenbrenzen

Die dargelegten Ergebnisse mit Modellsubstanzen ermutigten uns, das Elektronenbrenzen dort einzusetzen, wo es galt, Strukturvorstellungen für unbekannte Naturstoffe zu festigen.

So hatten wir z.B. durch eine umfassende spektroskopische Analyse erkannt, daß der Giftstoff der Primel, der von Karrer als Primin bezeichnet wurde, ein Methoxy-n-pentyl-p-benzochinon ist^[26]. Erst mit mehreren synthetisierten Chinonen als Vergleichssubstanzen konnte das Primin als 2-Methoxy-6-n-pentyl-p-benzochinon (71) charakterisiert werden^[27]. Später fanden wir, daß durch Elektronenbrenzen in einfacher Weise zwischen den beiden in Frage kommenden Isomeren unterschieden werden kann, indem die bekannten 2-Methoxy-5- und 2-Methoxy-6-methyl-p-benzochinone (43) und (44) als Fragmente resultierten. Das soll mit dem folgenden Brenzschema veranschaulicht werden:

[26] H. Schildknecht, I. Bayer u. H. Schmidt, Z. Naturforsch., im Druck.

[27] H. Schildknecht u. H. Schmidt, Z. Naturforsch., im Druck.



Im Einklang mit der Erfahrung beim Elektronenbrenzen anderer substituierter p-Benzochinone wird die Alkylseitenkette glücklicherweise nur soweit abgebaut, daß durch die verbleibende Methylgruppe und die noch vorhandene Methoxygruppe die Lage der Substituenten am Chinonkern des Primins festgelegt ist. Die Alkylgruppe aber ist durch den radiogaschromatographischen Nachweis von n-Butan unter den flüchtigen Komponenten genügend charakterisiert.

Eingangs war die Rede davon, daß man „spielend“ durch einfaches Zusammensetzen der gefäßten Elektronenbrenzfragmente zu einem Strukturvorschlag kommen kann. Vielleicht geht dieser Wunsch einmal in Erfüllung. Aber sicher ist, daß die Identifizierung der Bruchstücke des Arthropodenalkaloids Glomerin^[28] wesentlich mehr Zeit erforderte als die sinnvolle Kombination zum Strukturvorschlag^[29]. Glomerin, ein 1,2-Dimethylchinazol-4-on (74), war beim Elektronenbrenzen in Anthranilsäure (20), N-Methylantranilsäure (76), N-Methylantranilsäureamid (75) und Essigsäure zerfallen (vgl. Abb. 11).

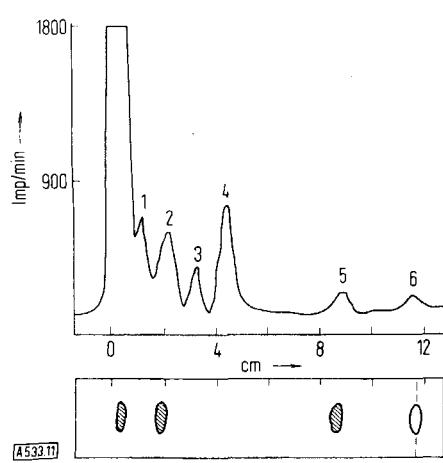


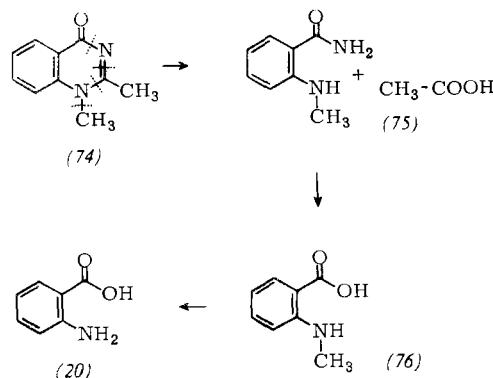
Abb. 11. Dünnschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von 5 µg Glomerin (74) (Laufmittel: Petroläther (60–70 °C)/Äther/Pyridin (1:1:1 v/v)).

1: nicht identifiziert; 2: Anthranilsäure (20); 3: nicht identifiziert; 4: Essigsäure (2); 5: N-Methylantranilsäureamid (75); 6: N-Methylanthranilsäure (76); Start, Glomerin (74).

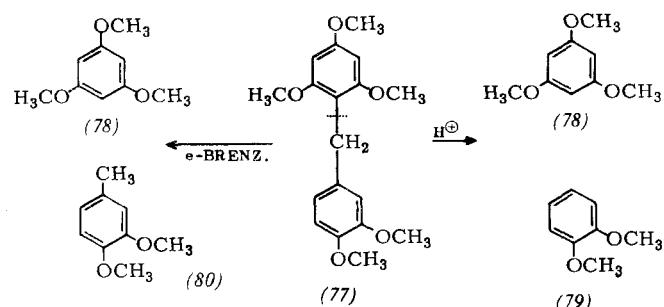
[28] H. Schildknecht, K. H. Weis, W. F. Wenneis u. U. Maschwitz, Z. Naturforsch. 21b, 121 (1966).

[29] H. Schildknecht u. W. F. Wenneis, Z. Naturforsch. 21b, 552 (1966).

Die Synthese des Glomerins war eigentlich eine Umkehr der Fragmentierung, indem man dabei, von der Anthranilsäure ausgehend, über (76) aus (75) mit Essigsäure (74) erhält. Sehr wahrscheinlich geht auch die Biosynthese im Glomeridenkörper von der Anthranilsäure aus.



Die zusammengesetzten Proanthocyanidine^[30] sind Kondensations- oder Dehydrierungsprodukte zweier Flavonoide, eines monomolekularen Proanthocyanidins und eines Catechins. Die beiden Molekühlhälfte können nun entweder über einen Äther-Sauerstoff, über eine C–C-Verknüpfung, oder auch ketalartig verbrückt sein. Zur Klärung der Struktur versuchten deswegen Weinges und Ebert^[31] an Modellsubstanzen, die den zusammengesetzten Proanthocyanidinen mit einer C–C-Verknüpfung entsprachen, auf chemischem Wege eine aufschlußgebende Spaltung zu erreichen. 2,4,6,3',4'-Pentamethoxydiphenylmethan (77) wurde jedoch säurekatalysiert in Phloroglucintrimethyläther (78) und Veratrol (79) gespalten, wobei die mittelständige Methylengruppe verlorenging. Es konnte also auf diese Weise die Substitutionsstelle im Veratrolrest nicht festgestellt werden. Im Dünnenschicht-Radiochromatogramm der Elektronenbrenz-Lösung von (77) ließ sich aber eine Fraktion einwandfrei dem Homoveratrol (80) zuordnen.



6. Ausblick

Bei allen chemischen Methoden zur Strukturaufklärung sollte bekannt sein, welche Bindungen des unbekannten Moleküls von dem Reagens angegriffen werden. Bei den Umsetzungen mit dem Reagens tritiertes Wasser sind es meist die energetisch schwächsten Bindungen, wobei C–N-, C–C-, C–O- und C–H-Bindungen oxidativ und reduktiv gespalten werden können. Hierbei ist es von großem Vorteil, daß Alkylseitenketten zum Teil

[30] K. Freudenberg u. K. Weinges, Tetrahedron Letters 1961, 267.

[31] W. Ebert, Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 1966.

partiell, aber auch als ganzes vom Grundkörper, z.B. einem Chinonkern, abgespalten werden, und man damit nicht nur auf die Art der Seitenkette, sondern zugleich auch auf die Substitutionsstelle schließen kann.

Die beobachtete Selektivität bei der Fragmentierung des Elektronenbrenzens ist überraschend, denn die bei einem β -Zerfall des Tritiums freiwerdende Energie liegt um den Faktor 10³ höher als die Dissoziationsenergien der oben erwähnten Bindungen. Man muß daraus den Schluß ziehen, daß die Wechselwirkung, die zur Fragmentierung führt, zwischen dem Molekül und einem Energieüberträger stattfindet, dessen Energie der Dissoziationsenergie ähnlich ist. Ob die Energieübertragung durch H-Atome oder OH-Radikale, durch Elektronen, Strahlung oder durch angeregte Wassermoleküle zustande kommt, ist auf obige Überlegung ohne Einfluß. Trotzdem wird man bestrebt sein, nach einer mechanistischen Interpretation des Elektronenbrenzens zu suchen, schon allein um Vorhersagen über den Verlauf der Fragmentierung machen zu können. Dazu sind die zunehmenden Kenntnisse über die Radiolyse organischer Verbindungen in wäßrigen Lösungen mit Röntgen- und γ -Strahlen von besonderem Wert.

Schon jetzt glauben wir annehmen zu können, daß den solvatisierten Elektronen eine besondere Bedeutung auch bei den von uns beobachteten Fragmentierungen kommt. Deswegen kann auch die Fragmentierung im Massenspektrometer manchmal zum Vergleich dienen. Während dabei jedoch von den komplementären Fragmenten immer nur die eine Hälfte registriert wird, kann man beim Elektronenbrenzen damit rechnen, daß beide Teile gefaßt werden. Außerdem werden beim Elektronenbrenzen nach der Fragmentierung die Bruchstücke durch Absättigung mit H(T)-Atomen oder OH(OT)-

Radikalen und durch Reaktion mit dem tritium-haltigen Wasser „eingefroren“, während die im Massenspektrometer gebildeten Primärradikale unter erneuter Fragmentierung sich intramolekular stabilisieren. Dies führt oft zu einem sehr bandenreichen Spektrum. Eindeutig aber kann man massenspektrometrisch zwischen isomeren Ionen nicht immer unterscheiden, wogegen nach dem Elektronenbrenzen die isomeren Fragmente, chromatographisch voneinander getrennt, als solche identifizierbar sind.

Für die Zukunft erhoffen wir uns von der Radiogaschromatographie, daß nicht nur alle Fragmente aufgrund höherer Empfindlichkeit der Strahlendetektoren nachweisbar werden, sondern auch daß sie oft allein durch ihre Retentionszeiten hinreichend charakterisiert sein werden. Die langen Inkubationszeiten von einigen Tagen bis Wochen werden dann nicht mehr erforderlich sein, wenn man anstelle tritierten Wassers von 5 Ci/ml spezifischer Aktivität solches von 25 Ci/ml verwendet. Dies erfordert eine besonders vorsichtige Arbeitsweise, die bei der Gaschromatographie eher als bei der Dünnenschichtchromatographie gewährleistet ist.

Die manchmal nicht ganz ungefährlichen Versuche und die zunächst unkonventionelle und für einen „Organiker“ etwas ungewohnte Arbeitsweise erforderten im besonderen Maße Fleiß und Idealismus meiner Doktoranden. Dafür möchte ich ihnen auch an dieser Stelle herzlich danken. Die Versuche wären nicht möglich gewesen ohne die dankenswerte Unterstützung des Ministeriums für wissenschaftliche Forschung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Fonds der Chemischen Industrie. Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. Hückel und den Dragoco-Werken danken wir für die Überlassung von Chemikalien.

Ein eingegangen am 14. Juni 1966 [A 533]

Eine neue Wirkstoffgruppe gegen Bilharziose

VON DR. P. SCHMIDT UND DR. M. WILHELM

WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNGSLABORATORIEN DER CIBA, BASEL (SCHWEIZ)

Zur Bekämpfung der Bilharziose eignen sich einige Verbindungen mit der 5-Nitro-2-thiazolyl-Gruppierung; besonders wirksam ist 1-(5-Nitro-2-thiazolyl)-2-imidazolidinon. Die Verbindungen werden von den Schistosomen, den Erregern der Krankheit, und ihren Eiern bevorzugt aufgenommen und bewirken das Absterben von Würmern und Eiern. — In diesem Aufsatz wird außerdem ein Überblick über ältere Versuche zur Bekämpfung dieser Tropenkrankheit gegeben.

1. Die Bilharziose (Schistosomiasis)

Die Bilharziose ist nach der Malaria die in subtropischen und tropischen Gebieten am weitesten verbreitete Erkrankung. Sie wird durch Blutwürmer aus der Gruppe der Trematoden hervorgerufen, nämlich durch Schistosomen, die in den Blutgefäßen des Menschen und einiger Säugetiere leben. Männchen und Weibchen sind eng umschlungen, wobei das kräftige Männchen mit seinen eingerollten Körperrändern das kleinere, faden-

förmige Weibchen umklammert und mit Hilfe seiner Saugnäpfe die Verankerung und die Fortbewegung des Pärchens im Gefäßlumen übernimmt (Abb. 1). Die Schistosomen ernähren sich vom Blut. Sie werden maximal 30 Jahre alt und 0,8 bis 1,2 cm lang.

Man kennt drei Hauptarten von Schistosomen, welche die Bilharziose des Menschen verursachen. Jede dieser Arten führt zu unterschiedlichen Krankheitsbildern:

Schistosoma haematobium, der Erreger der Urogenital-Bilharziose, befällt den Blasen- und Analbereich; er ruft Symptome hervor, die sich ausschließlich auf die Harnwege kon-