

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. H. EUGSTER & T. TAKEMOTO, *Helv.* 50, 126 (1967).  
 [2] G. F. R. MÜLLER, Beiträge zur Kenntnis der Inhaltsstoffe des Fliegenpilzes, Dissertation, Universität Zürich 1961.  
 [3] G. F. R. MÜLLER & C. H. EUGSTER, *Helv.* 48, 910 (1965).  
 [4] M.-L. L. SWENBERG, W. J. KELLEHER & A. E. SCHWARTING, *Science* 155, 1259 (1967).  
 [5] TH. WIELAND & W. SCHÖN, *Liebigs Ann. Chem.* 593, 157 (1955).  
 [6] E. BOURQUELOT & M. BRIDEL, *C. r. hebdomadaire Séances Acad. Sci.* 755, 437 (1912).  
 [7] J. L. BONNET, *Bull. Soc. Mycol. France* 75, 215 (1959); G. TALBOT & L. C. VINING, *Canad. J. Botany* 41, 639 (1963).  
 [8] F. REINDEL & W. HOPPE, *Chem. Ber.* 87, 1103 (1954).  
 [9] M. TOMITA & T. FUKAGAWA, *Z. physiol. Chem.* 178, 302 (1928).  
 [10] T. KANEKO & R. YOSHIDA, *Bull. chem. Soc. Japan* 35, 1153 (1962).  
 [11] E. BUSCHMANN, *Pharmaz. Post* 45, 453 (1911), *ref. Chem. Zbl.* 1912, II, 613.  
 [12] C. H. EUGSTER, *Helv.* 39, 1002 (1956).  
 [13] W. A. JACOBS & L. C. CRAIG, *J. biol. Chemistry* 113, 759 (1936).  
 [14] R. TSCHESCHE, H. JENSSSEN & P. N. RANGACHARI, *Chem. Ber.* 91, 1732 (1958).

## 81. Zur Kenntnis der VAN SLYKE-Reaktion des Muscimols und anderer 3-Hydroxyisoxazole

32. Mitteilung über Inhaltsstoffe von Fliegenpilzen<sup>1)</sup>

von M. Fräter-Schröder, R. Good<sup>2)</sup> und C. H. Eugster

Organisch-chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, 8001 Zürich

(20. II. 69)

*Zusammenfassung.* 3-Hydroxyisoxazole werden unter sehr milden Bedingungen zu instabilen N-Nitrosoverbindungen nitrosiert, welche in verdünnter Essigsäure rasch in N<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> zerfallen. Die Reaktion kann als Mikromethode zur Erkennung von 3-Hydroxyisoxazolen benutzt werden. Die Synthese mehrerer neuer 3-Hydroxyisoxazole wird angebehen.

Bei der chemischen Untersuchung der Fliegenpilz-Inhaltsstoffe *Muscimol* (I) und *Ibotensäure* (II) fielen die sehr hohen Werte auf, die bei der Bestimmung der primären Aminogruppen nach VAN SLYKE erhalten wurden<sup>3)</sup>, vgl. Tabelle.

Die nähere Untersuchung hat nun gezeigt, dass diese Erscheinung bei allen 3-Hydroxyisoxazolen anzutreffen ist, nicht aber bei den N-Acetylderivaten (2-Acetyl-3(2*H*)-isoxazolonen), z. B. VIII, den Isoxazolen, z. B. IX, den 5(4*H*)-Isoxazolen, z. B. IV, den 2(3*H*)-Oxazolonen, z. B. Muscazon (V), und den Oxazolidin-2-onen, z. B. *erythro*-Dihydromuscazon (VI).

Da es sich bei 3-Hydroxyisoxazolen um Iminolformen von Lactamen und zwar von cyclischen Hydroxamsäuren handelt, konnte vermutet werden, dass es sich bei dem zusätzlich entwickelten Gas um N<sub>2</sub>O handle<sup>4)</sup>. Von aliphatischen Hydroxamsäuren

<sup>1)</sup> 31. Mitteilung vorangehend.

<sup>2)</sup> Jetzige Adresse: J. R. GEIGY AG, Basel.

<sup>3)</sup> Ausgeführt von Herrn H. FROHOFER 1963 und 1965 nach der Methode von KAINZ [1].

<sup>4)</sup> Wir danken Herrn Prof. A. ESCHENMOSER, ETH Zürich, der in einer Diskussion erstmals auf diese Möglichkeit hingewiesen hatte.

ist bekannt [2], dass sie mit Nitrit und Säure unter energischen Bedingungen  $N_2O$  abspalten.

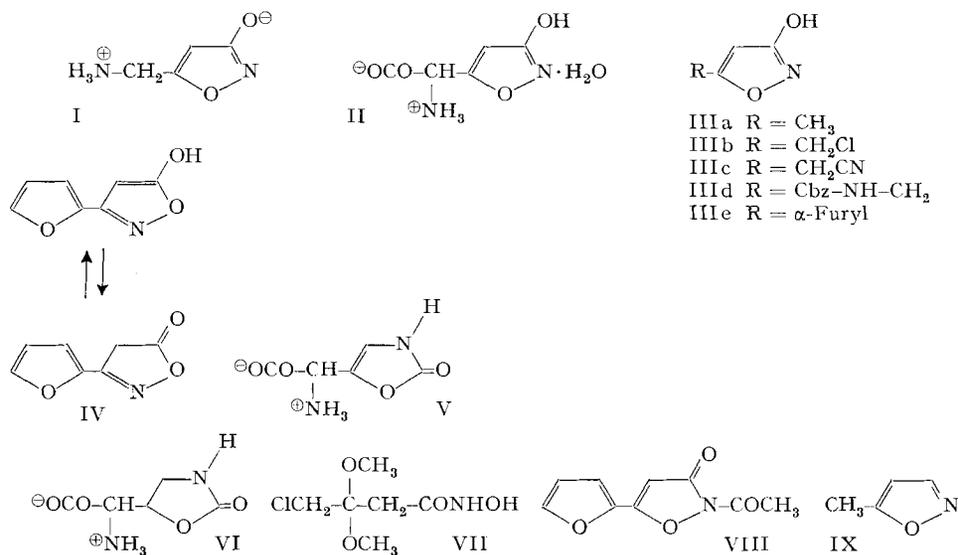
Die gas-chromatographische Analyse der gasförmigen Reaktionsprodukte hat diese Annahme bestätigt: alle 3-Hydroxyisoxazole entwickeln unter verhältnismässig milden Bedingungen  $N_2O$ , meist sogar mehr als ein Moläquivalent, und gleichzeitig  $CO_2$ .

Resultate der  $NH_2$ -Mikrobestimmung nach VAN SLYKE mit der Methode von KAINZ [1] für die Verbindungen I–IX

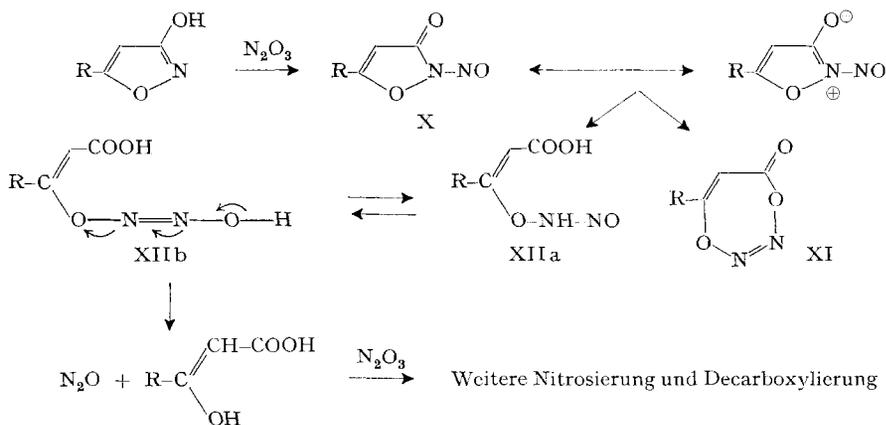
Verbindung (Mol.-Gew.)	% Stickstoff		$NH_2$ -Gruppen		Gef. Mol-äquivalente	
	ber.	gef.	ber.	gef.	$N_2O^a)$	$CO_2^a)$
$HONH_3^+Cl^-$ (69,50)	20,15	19,3	1,0	0,96	ca. 1	–
I (114,10)	24,55	24,3	1,0	1,98	>1	ca. 1
II (176,13)	15,91	15,7	1,0	1,97	>1	ca. 2
IIIa (99,09)	14,14	20–23	0	1,4–1,6	>1	ca. 1
IIIb (133,54)	10,49	21,7	0	2,07		
IIIc (124,10)	22,58	15,4	0	0,68		
IIId (248,23)	11,29	6,8	0	0,6		
IIIe (151,12)	9,27	15,0	0	1,6	>1	ca. 1
IV (151,12)	9,27	0	0	0		
V (158,11)	17,72	10,6	1,0	0,6		
VI (160,13)	17,50	9,6	1,0	0,55		
VII (197,63)	7,09				ca. 1	ca. 1
VIII (193,15)	7,25				nil	nil
IX (83,09)	16,86	0	0	0		

a) Resultate der gas-chromatographischen Untersuchung der gasförmigen Reaktionsprodukte:  $N_2$  wurde hier nicht bestimmt; die ursprünglich geplante quantitative Bestimmung konnte wegen zu grosser Schwankungen nicht erreicht werden.

## Formelschema



Vermutlich erfolgt N-Nitrosierung zu X<sup>5)</sup>. Dieses könnte sich nach Art anderer N-Nitrosolactame [3] zu einem cyclischen Diazoester (XI) isomerisieren, doch ist wegen des schwierig zu erreichenden cyclischen Übergangszustandes die Hydrolyse zu XIIa wahrscheinlicher. Letzteres stellt in der tautomeren Form XIIb ein Derivat der untersalpetrigen Säure dar. Es weist die notwendigen Voraussetzungen für den Zerfall in N<sub>2</sub>O und eine Ketosäure auf, welche für die Entstehung von CO<sub>2</sub> und weiteren Mengen von N<sub>2</sub>O verantwortlich zu machen ist.



Die Reaktion kann zur Erkennung von Mikromengen von 3-Hydroxyisoxazolen benutzt werden.

Die Synthesen der Verbindungen IIIb, c, d, e, IV, VII, VIII sind im exper. Teil) beschrieben. Sie erfolgten für die 3-Hydroxyisoxazole nach dem in [4] angegebenen Verfahren.

Die Arbeit musste aus äusseren Gründen abgebrochen werden.

Wir danken den Herren Prof. K. GROB und H. FROHOFER für zahlreiche Ratschläge beim Aufbau der Apparatur und bei der gas-chromatographischen Analyse, Herrn Prof. A. ESCHENMOSER, ETH Zürich, für Diskussionen, Herrn Dr. H. FRITZ, J. R. GEIGY AG, für Aufnahme und Diskussion von Spektren, und Herrn Prof. P. WASER für sein Interesse an dieser Arbeit. – Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS (Gesuch Nr. 4176) und der Firma J. R. GEIGY AG, Basel, danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil

**Apparatur.** Die Nitrosierung wurde mit  $10^{-2}$  mMol Substanz (meist 1–3 mg) bei Raumtemperatur während 30 Min. unter den von KAINZ [1] angegebenen Bedingungen in einer im wesentlichen nach seinen Angaben gebauten Apparatur durchgeführt. Trägergas war Helium. Die entstandenen Gase wurden in einem Gaseinlassventil durch Kühlen mit flüssiger Luft ausgefroren und anschliessend nach BENNETT [5] gas-chromatographisch getrennt und bestimmt. Gerät: CARLO ERBA Typ G.D., Kolonne 2,4 m Chromstahlrohr,  $\varnothing$  4 mm, Füllung Poropak Q 80–100 mesh, Temperatur 20–30°; Detektor Wärmeleitfähigkeitszelle bei 100°.

**Substanzen.** Nach Literaturangaben hergestellt wurden: I [6], II, V [7], IIIa [8], VI [9], IX [10].

Neu hergestellte Verbindungen:

a) 5-Chlormethyl-3-hydroxy-isoxazol (IIIb). Zu 10 g  $\gamma$ -Chloracessigester und 20 g Ortho-ameisensäure-methylester in 13 ml abs. Methanol wurden 2,7 ml mit Chlorwasserstoff bei 0° ge-

<sup>5)</sup> Es wurde nicht versucht, eine dieser N-Nitrosoverbindungen zu isolieren.

sättigtes abs. Methanol gegeben. Die Mischung wurde unter Feuchtigkeitsausschluss 4 Std. gekocht, dann auf Eis gegossen, sofort mit NaOH aq. auf pH 8 gestellt und mit Äther extrahiert. Nach üblicher Aufarbeitung wurde der *Ketalester* als dünnflüssiges Öl, Sdp. 101–103°/11 Torr, in 65% Ausbeute erhalten. FeCl<sub>3</sub>-Probe: negativ.

*Hydroxamsäure VII*: 35,9 g *Ketalester* liess man mit Hydroxylamin (aus 35 g Hydroxylaminhydrochlorid mit 42 g KOH in Methanol nach üblicher Vorschrift bereitete frische Lösung) unter N<sub>2</sub> während 96 Std. bei Raumtemperatur reagieren. Hernach dampfte man die Lösung im Vakuum ein, nahm das zurückbleibende gelbe Öl in der doppelten Menge Wasser auf und adsorbierte die Hydroxamsäure an Dowex 1 X 2 (50/100 mesh, OH<sup>⊖</sup>-Form, Säule 4,5 × 55 cm). Nach Auswaschen mit Wasser wurde sie mit 2 N Essigsäure eluiert. Die FeCl<sub>3</sub>-positiven Fraktionen gaben nach dem Eindampfen im Vakuum 30,0 g (90%) hellgelben kristallisierten Rückstand, Smp. 107–110°. Zur Analyse wurde aus Aceton umkristallisiert und bei 120°/0,0001 Torr sublimiert: Smp. 129–131°.

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>4</sub> (197,63) Ber. C 36,46 H 6,13 N 7,09% Gef. C 36,61 H 6,42 N 7,50%

*Cyclisation zum Hydroxyisoxazol III b* erfolgte durch Lösen von VII (5,0 g) in Eisessig (130 ml) und Sättigung mit Chlorwasserstoff bei 0°. Nach Stehen bei Raumtemp. (16 Std.) wurde die Lösung im Vakuum eingedampft, der Rückstand mehrmals mit Wasser versetzt und die Lösung erneut eingedampft. Das erhaltene gelbe, kristalline Produkt wurde durch Extraktion mit viel warmem Äther, Eindampfen der Lösung, Umkristallisation des Rückstandes (3,1 g, Smp. 90–95°) aus Tetrachlorkohlenstoff und vorsichtige Sublimation in kleinen Portionen im Hochvakuum in farblosen Nadeln erhalten, Smp. 97–101°. Das Reinprodukt ist stabil, Rohprodukte zersetzen sich unter Umständen ziemlich rasch. Starke Säure, pK<sub>MCS</sub><sup>\*</sup> = 7,40; ν<sub>max</sub> (Chlf.) 1629, 1522 cm<sup>-1</sup>. Umsatz mit wässrigem Ammoniak unter Druck gibt Muscimol (I) in nahezu quantitativer Ausbeute. λ<sub>max</sub><sup>CH<sub>2</sub>OH</sup> 210 nm, ε = 8840; + etwas Base: 213 nm, ε = 7680, Schulter ca. 245 nm, ε = 2260. – IR. (KBr): 3570–2600 cm<sup>-1</sup> (breite Banden), 1637 und 1527 (Isoxazolring); (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3509 (OH) usw. – NMR. (CDCl<sub>3</sub>): δ 5,50 (D, 2 H, J = 0,6 Hz, Methylen), 6,02 (T, 1 H, J = 0,6 Hz, Proton am Isoxazolring), 10,47 (1 H, S, OH).

C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>ClNO<sub>2</sub> Ber. C 35,97 H 3,02 Cl 26,55 N 10,49%  
(133,54) Gef. „ 36,09 „ 3,05 „ 25,97 „ 10,46%

Die tautomere Ketoform kann spektroskopisch nicht nachgewiesen werden.

b) *Nitril III c*. Eine Lösung von 2 g 5-Chlormethyl-3-hydroxy-isoxazol in 10 ml 50-proz. Äthanol wird mit einer Lösung von 2 g KCN in 10 ml 50-proz. Äthanol versetzt. Nach 24 Std. Stehen bei Raumtemp. säuert man das Gemisch mit 2 N Schwefelsäure an, dampft im Vakuum ein, zieht den Rückstand mit Äthanol aus, entfärbt den Extrakt mit Tierkohle und bringt das Nitril durch Einengen und Kühlung zur Kristallisation. Nach Umkristallisation aus Aceton-Äther-Petroläther und Sublimation bei 130–140°/0,01 Torr farblose Kristalle, Smp. 169–171°. IR: (KBr): 2257 cm<sup>-1</sup> (Nitril), 1639/1534 (Isoxazolring). – NMR. (Aceton-d<sub>6</sub>) δ 6,10 (T, 1 H am Isoxazolring), 4,14 (D, 2 H, Methylengruppe).

C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (124,10) Ber. C 48,39 H 3,25 N 22,58% Gef. C 48,74 H 3,38 N 22,31%

c) *N-Cbz-Muscimol (III d)*. 500 mg Muscimol, gelöst in 4 ml 2 N NaOH, wurden mit 0,80 ml Cbz-Cl versetzt und während einer Stunde kräftig geschüttelt. Anschliessend wurde mit 2 N HCl angesäuert, 30 Min. weitergerührt und hierauf der Kristallbrei abgenutscht. Nach Umkristallisation aus Chloroform 635 mg farblose Substanz, Smp. 144°, pK<sub>MCS</sub><sup>\*</sup> = 7,96; λ<sub>max</sub><sup>Alk.</sup> nm (ε): 204 (16300), Schulter 235 (1910), 256 (495), 262 (320), 267 (210); λ<sub>max</sub><sup>0,01 N NaOH</sup> 210 (12300), 235 (2880), 257 (495), 263 (320), 267 (210). – IR. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 3425 (NH), 1733 (Amidcarbonyl), 1631 (Isoxazolring), 1529 ev. 1511 cm<sup>-1</sup> (Amid II). – NMR. (CF<sub>3</sub>COOH) δ 4,51 (S, 2 H, CH<sub>2</sub>), 5,26 (S, 2 H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 6,15 (S, 1 H, Isoxazol-H), 5,5–7,2 (1 H, Amid-H), 7,36 (S, 5 H, Phenyl-H).

C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Ber. C 58,06 H 4,87 N 11,29 O 25,78%  
(243,23) Gef. „ 57,97 „ 4,97 „ 11,19 „ 25,86%

Die tautomere Ketoform konnte spektroskopisch nicht nachgewiesen werden.

d) *5-(α-Furyl)-3-hydroxy-isoxazol (III e)* wurde gleich wie III b hergestellt. Ansatz: 5,2 g α-Furylacetessigsäure-äthylester, 9,25 g Orthoameisensäure-methylester, 6 g abs. Methanol + 1,50 ml methanolische HCl; Ketalisierung durch 30 Min. Kochen unter Rückfluss. Ausbeute 86% (5,6 g)

farbloses *Ketal*, Sdp. 61–64°/0,0003 Torr. Reaktion mit  $\text{FeCl}_3$  negativ,  $n_D^{24} = 1,461$ ; IR. ( $\text{CHCl}_3$ ): 1730  $\text{cm}^{-1}$ .

$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_5$	Ber. C 57,88	H 7,07	$\text{OCH}_3$ 40,79% *)
(228,24)	Gef. „ 57,92	„ 6,97	„ 41,40%

\*) Auf Methoxyl umgerechneter Wert.

Aus 37,86 g *Ketal* wurden mit Hydroxylamin (aus 23 g Hydrochlorid) 21,6 g *Hydroxamsäure* erhalten (6,2 g *Ketal* wurden zurückgewonnen), die ohne weitere Reinigung in 40 ml abs. Methanol mit Chlorwasserstoff ringgeschlossen wurden. Ausbeute an *Isoxazolol IIIe* fast quantitativ. Farblose Nadeln nach Sublimation im Hochvakuum und Umkristallisation aus Aceton-Chloroform, Smp. 195–201°.

$\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3$ (151,12)	Ber. C 55,63	H 3,34	N 9,27%	Gef. C 55,77	H 3,50	N 9,37%
--	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

Elektrophile Substitution erfolgt in Stellung 4 am Isoxazolkern und nicht am Furanring!

$\lambda_{\text{max}}$  271,5 nm,  $\epsilon = 20450$  (Äthanol). IR. (KBr): 1661, 1576, 1530  $\text{cm}^{-1}$  und zahlreiche weitere, sehr scharfe und intensive Banden. – NMR. ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ): 6,31 (S, 1 H, Proton am Isoxazolring), 6,73 (2 D, 1 H,  $J_1 = 1,8$  Hz,  $J_2 = 3,5$  Hz,  $\beta'$ -Furanproton), 7,08 (2 D, 1 H,  $J_1 = 0,8$  Hz,  $J_2 = 3,5$  Hz,  $\beta$ -Furanproton), 7,92 (2 D, 1 H,  $J_1 = 1,8$  Hz,  $J_2 = 0,8$  Hz  $\alpha'$ -Furanproton), 10,47 (breites S, OH). – Die tautomere Ketoform konnte spektroskopisch nicht nachgewiesen werden.

c) *N*-Acetylverbindung VIII. 7 g IIIe gaben nach Erhitzen mit 60 ml Acetanhydrid + 5 ml Pyridin (2 Std., 100°) und Eindampfen das bräunliche Acetylierungsprodukt. Farblose Verbindung nach Sublimation (110–130°/0,00001 Torr) und Umkristallisation aus Aceton und Methanol, Smp. 142–149°. NMR. ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,58 (S, 3 H, N-Acetyl), 5,86 (S, Proton an Isoxazol), 6,56 (2 D,  $f = 1,5$  & 3,5 Hz,  $\beta'$ -Proton am Furan), 7,07 (D, breit,  $f = 3,5$  Hz,  $\beta$ -Proton am Furan), 7,68 (D, breit,  $f = 1,5$  Hz,  $\alpha'$ -Proton am Furan). UV.:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}}$  298,5 nm,  $\epsilon = 24800$ . IR. ( $\text{CHCl}_3$ ): 1727, 1658  $\text{cm}^{-1}$ .

$\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_4$ (193,15)	Ber. C 55,96	H 3,65	N 7,25%	Gef. C 56,23	H 3,45	N 7,39%
--	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

f) *Furylisoxazolol IV*. Hergestellt durch direkten Umsatz von  $\alpha$ -Furylacetessigester mit  $\text{NH}_2\text{OH}$  (80 Std. bei Raumtemperatur). Die Reaktionsprodukte wurden nach Eindampfen der Lösung im Vakuum in Wasser aufgenommen, mit Äther gewaschen und mit 2N Essigsäure angesäuert. Die ausgefallenen gelben Nadeln wurden abgenutscht, aus Äthanol umkristallisiert und bei 90°/0,00001 Torr sublimiert. Farblose Nadeln, Smp. 147–157° (Zers.). IR. (Chlf.): 1808  $\text{cm}^{-1}$ . Im NMR.-Spektrum ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ) liegen bei Raumtemperatur die Signale für ca. 58% Ketoform und 42% Enolform nebeneinander vor:  $\delta$  4,18 (S,  $-\text{CH}_2-$  der Ketoform), 5,85 (S, Vinylproton der Enolform), 6,70 (2 D, 1 H,  $\beta'$ -Furanproton beider Tautomerer), 7,20 (D,  $\beta$ -Furanproton der Enolform), 7,27 (D,  $\beta$ -Furanproton der Ketoform), 7,71 (D, 1 H,  $\alpha'$ -Furanproton beider Tautomerer). In  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  wandeln sich die beiden Tautomeren rascher ineinander um.

$\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3$	Ber. C 55,63	H 3,34	N 9,27%
(151,12)	Gef. „ 56,06; 55,67	„ 3,67; 3,75	„ 9,42; 9,19%

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. KAINZ, *Mikrochim. Acta* 4, 349 (1953).
- [2] A. T. AUSTIN, *J. chem. Soc.* 1950, 149.
- [3] R. HUISGEN & J. REINERTSHOFER, *Liebigs Ann. Chem.* 575, 174, 197 (1952).
- [4] A. R. GAGNEUX, F. HÄFLIGER, R. GOOD & C. H. EUGSTER, *Tetrahedron Letters* 1965, 2077.
- [5] D. BENNETT, *J. Chromatogr.* 26, 482 (1967).
- [6] G. F. R. MÜLLER & C. H. EUGSTER, *Helv.* 48, 910 (1965).
- [7] R. GOOD, G. F. R. MÜLLER & C. H. EUGSTER, *Helv.* 48, 927 (1965).
- [8] H. GÖTH, A. R. GAGNEUX, C. H. EUGSTER & H. SCHMID, *Helv.* 50, 137 (1967).
- [9] R. REINER & C. H. EUGSTER, *Helv.* 50, 128 (1967).
- [10] C. H. EUGSTER, L. LEICHTNER & E. JENNY, *Helv.* 46, 543 (1963).