

194. Über die Biosynthese des Antibioticums Verrucarine E

Verrucarine und Roridine, 19. Mitteilung [1]

von P. Pfäffli und Ch. Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(21. VIII. 69)

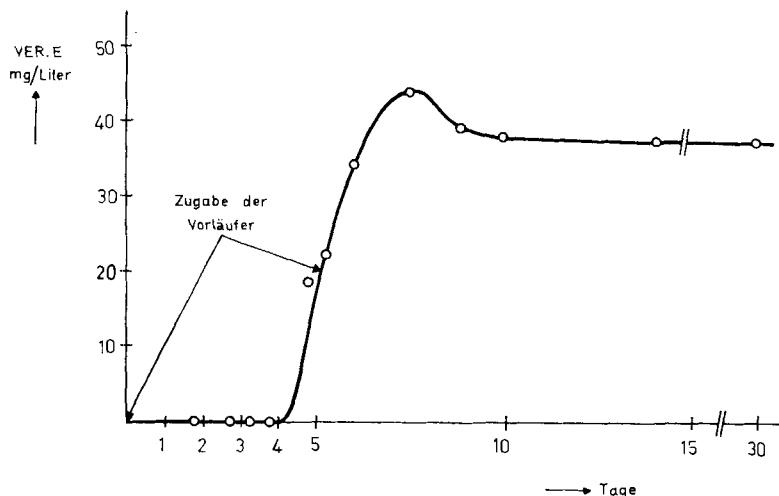
Summary. The incorporation of nine ^{14}C -labelled, assumed biosynthetic precursors of verrucarine E (**1**) formed by *Myrothecium verrucaria* have been measured. The antibiotic and 3-acetyl-4-methyl-pyrrole (**3**) derived from it were oxidized, and the radioactivity of four of the seven C-atoms determined. It has been found that the carbon skeleton of verrucarine E does not originate from proline, glutamic acid and its biogenic equivalents nor from 5-amino-levulinic acid, but is built up from four acetate units with loss of one carboxyl C-atom. These results are rationalized by proposing a biogenetic pathway for verrucarine E.

Verrucarine E, eines der cytostatisch wirksamen Stoffwechselprodukte von *Myrothecium verrucaria* [2], besitzt die Struktur des 3-Acetyl-4-hydroxymethyl-pyrrols (**1**) [1]. Diese ist, verglichen mit den anderen Vertretern des Antibiotica-Komplexes der Verrucarine und Roridine [3], erstaunlich einfach. Dennoch ist nicht von vornherein klar, welches ihre biogenetischen Vorläufer sind, d.h. Verrucarine E lässt sich nicht ohne weiteres einem der bekannten Biogenesetypen der natürlichen Pyrrol-Derivate zuordnen. Ausserdem ist die Zahl der pyrrolartigen Produkte des sekundären Intermediärstoffwechsels von Mikroorganismen relativ klein, so dass praktisch keine Vergleichsmöglichkeiten bestehen (vgl. [4] [5]). Im Falle des Prodigiosins stellten MARKS *et al.* [5] fest, dass Prolin, Glycin und Essigsäure die natürlichen Vorläufer sind. Bekannt ist auch, dass die 5-Aminolävulinsäure an der Biosynthese des Porphobilinogens, einem Baustein des Porphyrins, massgebend beteiligt ist [6]. Andererseits ist die Glutaminsäure verschiedentlich als biogenetischer Vorläufer von Sekundärmetaboliten, die sich von fünfgliedrigen N-haltigen Ringverbindungen, etwa von Pyrrolidin, ableiten, nachgewiesen worden.

Bei Verrucarine E wäre es nun denkbar, dass zuerst der Pyrrolring aufgebaut wird und die 3-Acetylgruppe sowie die 4-Hydroxymethylgruppe nachträglich, gleichzeitig oder schrittweise, in den aromatischen Kern eingeführt werden. Nach dieser Konzeption könnte die Acetylgruppe z.B. aus Essigsäure, die Hydroxymethylgruppe aus Serin oder aus der Methylgruppe des Methionins, die nachträglich oxydiert wird, oder aus dem C-Atom Nr. 2 von Glycin bzw. der Glykolsäure stammen. Nachdem in letzter Zeit auch die Mevalonsäure als essentieller Baustein von zahlreichen Indolalkaloiden erkannt worden war, musste auch ihr eventueller Einbau in Verrucarine E geprüft werden. Um alle diese Möglichkeiten abzuklären, verabreichten wir die folgenden neun ^{14}C -markierten Verbindungen an *Myrothecium verrucaria*: [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Na-Acetat, [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-Na-Acetat, [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-DL-Na-Mevalonat, [$3\text{-}^{14}\text{C}$]-L-Serin, [$\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{C}$]-L-Methionin, [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-Glycin, [$4\text{-}^{14}\text{C}$]-5-Amino-lävulinsäure, [$5\text{-}^{14}\text{C}$]-DL-Prolin und [$3,4\text{-}^{14}\text{C}$]-DL-Glutaminsäure. Sie wurden in Mengen von 0,25–2,5 mg und Radioaktivitäten von 0,1–0,5 mCi zu je 5 Liter Kulturlösung entweder zusammen mit der Sporensuspension oder nach 5-tägiger Inkubation jeweils bei 27° zugegeben.

Tabelle 1. *Einbauraten*¹⁾ der vermuteten biogenetischen Vorläufer in Verrucarín E bei Verabreichung am Anfang und nach 5 Tagen.

Vorläufer	Verabreichung am Anfang		Verabreichung nach 5 Tagen	
	abs. Einbau-rate in %	spez. mol. Einbau-rate in ‰	abs. Einbau-rate in %	spez. mol. Einbau-rate in ‰
[1- ¹⁴ C]-Na-Acetat	0,218	0,16	19,6	1,14
[2- ¹⁴ C]-Na-Acetat	0,147	0,168	30,3	2,05
[2- ¹⁴ C]-DL-Na-Mevalonat	0,038	0,0091	0,0042	0,0008
[3- ¹⁴ C]-L-Serin	0,23	0,033	1,46	0,433
[CH ₃ - ¹⁴ C]-L-Methionin	–	–	0,014	0,0003
[2- ¹⁴ C]-Glycin	–	–	0,516	0,024
[4- ¹⁴ C]-5-Amino-lävalinsäure	0,032	0,0007	0,023	0,0015
[5- ¹⁴ C]-DL-Prolin	0,023	0,0031	0,028	0,0069
[3,4- ¹⁴ C]-DL-Glutaminsäure	–	–	0,098	0,0094



Bildung von Verrucarín E im Kulturfiltrat.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, hoben sich die hohen spezifischen Einbauraten von Acetat, speziell bei Verabreichung nach 5 Tagen, deutlich gegen die um einen Faktor 10^{-2} bis 10^{-3} kleineren Einbauraten von Mevalonat, Methionin, 5-Aminolävalinsäure, Prolin und Glutaminsäure ab. Wie die späteren Resultate des Abbaus von Verrucarín E zeigen werden (vgl. Tab. 2), ist die dazwischenliegende Einbaurate von [3-¹⁴C]-Serin darauf zurückzuführen, dass diese Aminosäure als Acetatlieferant dient

¹⁾ Die Einbauraten sind wie folgt definiert:

Absolute Einbaurate in % = Radioaktivität des gesamten isolierten Verrucarins E in dpm $\times 100$ / Radioaktivität des eingesetzten Vorläufers in dpm.

Spezifische molare Einbaurate in ‰ = Radioaktivität des isolierten Verrucarins E in dpm pro mMol $\times 1000$ / Radioaktivität des eingesetzten Vorläufers in dpm pro mMol.

Tabelle 2. *Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmungen nach Abbau²⁾*.

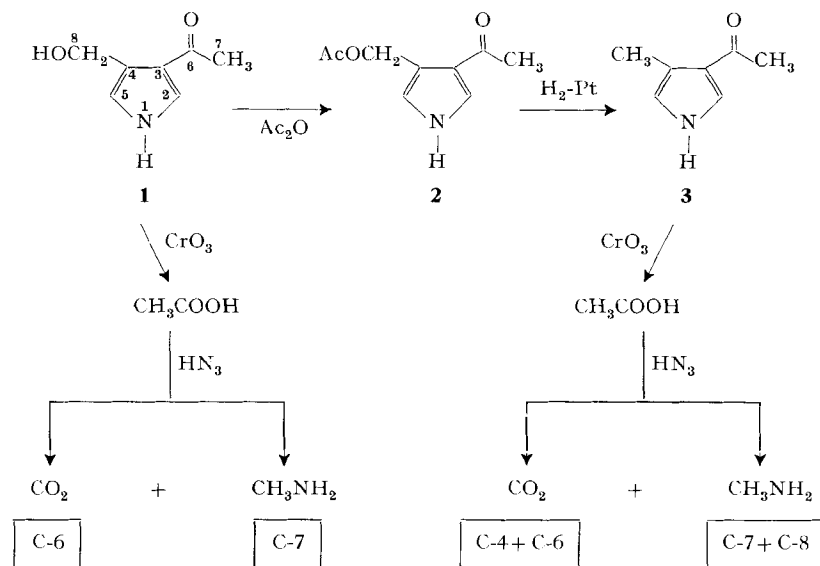
KUH-N-ROTH-Abbau von		Verabreichte Bausteine			
		[1- ¹⁴ C]-Na- Acetat	[2- ¹⁴ C]-Na- Acetat	[3- ¹⁴ C]-L- Serin	
Verrucarín E (1)	Methyl-	99,918	2,21	5,32	
	Summe	30,2	25,5	27,8	
	Carboxyl-	0,082	97,79	94,68	
3-Acetyl-methyl- pyrrol (3)	Methyl-	99,927	2,40	4,87	
	Summe	29,9	24,65	25,05	
	Carboxyl-	0,073	97,6	95,13	
Berechnet aus der Oxydation von 1 und 3	Methyl-	99,934	2,60	4,32	
	Summe	29,6	23,85	22,3	
	Carboxyl-	0,066	97,40	95,68	

(z. B. über die Zwischenstufen des Intermediärmetabolismus Hydroxypyruvat und 3-Phosphoglycerat), denn die Radioaktivitätsverteilung war gleich wie beim Einbau von [2-¹⁴C]-Acetat. Dass das Resultat von Glycin auf derselben Erscheinung beruht, ist naheliegend, doch wurde dieser Fall nicht näher untersucht. Aus den, verglichen mit Acetat, äusserst geringen Einbauraten von 5-Aminolävulinsäure, Prolin, Glutaminsäure, Methionin und Mevalonat, die offensichtlich im Grössenbereich einer allgemein erfolgten Verschleppung von Radioaktivität lagen, schlossen wir, dass diese Substanzen nicht als spezifische biogenetische Bausteine für Verrucarín E fungieren. Demgemäss verläuft die Bildung unseres Antibioticums weder über den Weg der üblichen Porphyrinsynthese noch über die Synthesewege der anfangs erwähnten, aus Prolin oder Glutaminsäure aufgebauten Metaboliten. Die deutlichen Unterschiede in den Einbauraten bei Verabreichung nach 0 und 5 Tagen werden verständlich durch den Verlauf der Bildungskurve von Verrucarín E, die dünnsschichtchromatographisch (Fehler ca. $\pm 5\%$) mit dem Kulturfiltrat bestimmt wurde (vgl. Fig.). Grossen Einfluss hatte der Zeitpunkt der Bausteinzugabe auch auf die «Verschmierung» der Radioaktivität im isolierten Verrucarín E. So wurde etwa bei der Verfütterung von [2-¹⁴C]-Na-Acetat am Anfang eine fast willkürliche Verteilung der Radioaktivität in der Acetyl-Gruppe von Verrucarín E gemessen, 55% in der Methylgruppe und 45% in der Carbonylgruppe, während bei der Verabreichung nach 5 Tagen die entschiedene Verteilung von 97,8% zu 2,2% erfolgt war. Das Hauptgewicht legten wir deshalb auf die Resultate der Bausteinzugabe nach 5 Tagen.

Zur Feststellung der Radioaktivitätsverteilung in Verrucarín E wurde das Antibioticum nach KUH-N-ROTH [7] mit CrO₃ in H₂SO₄ bei 100° oxydiert, wobei die resultierende Essigsäure die Werte für die Acetyl-Gruppe lieferte. Eine analoge Oxydation

²⁾ Die Resultate beziehen sich auf die Versuche, in denen die radioaktiven Bausteine nach 5 Tagen verabreicht wurden. Es sind die spezifischen molaren Radioaktivitäten angegeben, wobei die Zahlen für Methyl sich auf das gemessene BaCO₃ und für Carboxyl auf das gemessene Methylaminpikrat und die Summe sich auf Prozente der spezifischen molaren Radioaktivität von 3-Acetyl-4-methyl-pyrrol (3) beziehen. Der Bezug auf 3 statt 1 wurde gewählt, weil bei 3 infolge der längeren chemischen Behandlung als bei 1 die Wahrscheinlichkeit kleiner ist, dass darin verschleppte radioaktive Verunreinigungen aus dem Rohextrakt der Kulturbühe vorhanden sind und weil 3 allgemein stabiler ist als 1.

des aus Verrucarín E nach Acetylierung und nachfolgender Hydrogenolyse [1] [8] von **2** erhältlichen 3-Acetyl-4-methyl-pyrrols (**3**) ergab in der resultierenden Essigsäure das arithmetische Mittel der Aktivitäten in der Acetyl-Gruppe und des Bruchstücks C-4 + C-8 von Verrucarín E. Darauf, dass die Bedingung gleicher Ausbeute für die beiden Bruchstücke erfüllt war, wies der Befund hin, dass aus gleichen molaren Mengen von **1** bzw. **3** beim Derivat **3** mit einer Genauigkeit von $\pm 2\%$ die doppelte Menge Essigsäure entstand wie bei **1** und dass Essigsäure, gas-chromatographisch bestimmt, das einzige bei Raumtemperatur nicht gasförmige, aber wasserdampfflüchtige, saure Produkt der Oxydationen war.



Ac = $\text{CH}_3\text{CO}-$

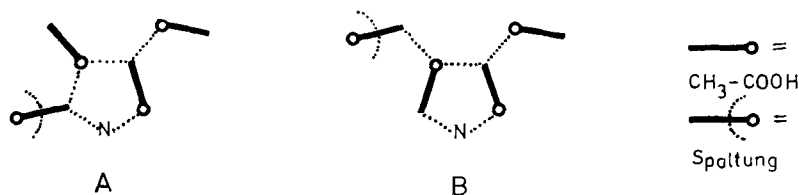
Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in der erhaltenen Essigsäure, die in Form des Ag-Salzes isoliert und umkristallisiert wurde, bauten wir das Ag-Acetat nach SCHMIDT ab, wobei das CO_2 als BaCO_3 und das CH_3NH_2 als Pikrat isoliert wurden.

Die unterschiedliche prozentuale Radioaktivität nach Inkorporation von $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -Na-Acetat und $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Na-Acetat lässt schliessen, dass für die Bildung von Verrucarín E wohl 4-Acetat-Einheiten benötigt werden, dass aber ein Carboxyl-C-Atom im Verlauf der Synthese wieder verloren geht. Ausgehend von $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Na-Acetat wurden denn auch sehr schön 4 radioaktiv markierte Zentren ins Antibiotikum eingebaut, d. h. die beim Abbau isolierten Essigsäurebruchstücke enthielten im Mittel $1/4,06$ Teile der ursprünglichen Aktivität von **3**. Beim Einbau von $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -Na-Acetat lag der Bruchteil näher bei einem Drittel, im Mittel bei $1/3,35$. Bei $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ -L-Serin betrug der Bruchteil wiederum ein Viertel, im Mittel $1/3,99$, was die Rolle des Serins als CH_2OH -Lieferanten auszuschliessen gestattet.

Unter folgender, naheliegender Annahme kann man sich den möglichen Aufbau von Verrucarín E wie folgt vorstellen: der sehr spezifische Aufbau aus 4 Acetat-Einheiten lässt die primäre Synthese von Polyketidkörpern [9] vermuten, jene Poly- β -

keton-Gebilde, die nach dem Prinzip durchgehender «Kopf-Schwanz»-Kondensation aktivierter Säuren konstruiert sind und verschiedentlich in Fällen von aus Acetat oder Propionat aufgebauten Molekeln entweder postuliert oder nachgewiesen worden sind.

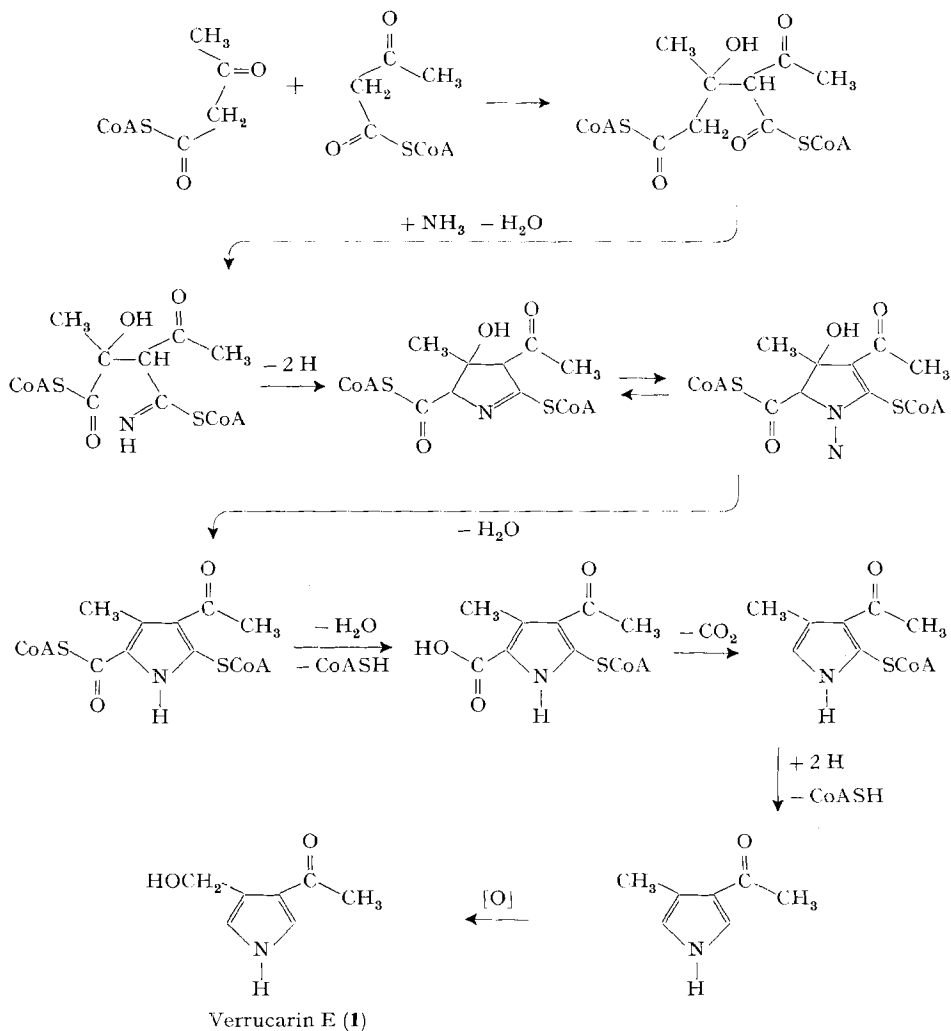
Bei Anwendung der erhaltenen Daten über den Einbau von Acetat in die C-Atome Nr. 4, 6, 7 und 8 von Verrucarín E findet man 6 Möglichkeiten für den Einbau einer dritten Essigsäure-Molekel, wenn gefordert wird, dass diese nur mit ihrem Methyl-C-Atom im Verrucarín-E-Gerüst verbleibt, nämlich an den Stellen a) C-2, b) C-3, c) C-7, d) C-8 (mit einem vollständig inkorporierten Acetat-Rest bei C-4 und C-3), e) C-8 (mit einem vollständig inkorporierten Acetat-Rest bei C-4 und C-5) und f) C-5. Durch die Forderung des Einbaus eines vierten Acetates als Einheit werden die Fälle a), b), c) und d) eliminiert. Bei Einbezug der vierten Acetat-Einheit, entweder mit dem Carbonyl-C-Atom bei C-2 oder C-3, liefern die beiden Spaltungsmodi e) und f) total vier Fälle von Aufbauprinzipien. Unter diesen widersprechen zwei Fälle dem Prinzip der «Kopf-Schwanz»-Kondensation, nämlich bei der Lage des vierten Carbonyl-C-Atoms auf C-3. Unter der oben erwähnten Annahme verbleiben also 2 Aufbauprinzipien, A und B, für das C-Gerüst von Verrucarín E aus 4 Essigsäuremolekeln unter Verlust eines Carboxyl-C-Atoms. Zwischen A und B könnte auch im Falle, dass alle 7 C-Atome des Antibioticums einzeln der Radioaktivitätsmessung zugänglich wären, nicht unterschieden werden.



Es ist denkbar, dass die in den skizzierten Schemata A und B benötigten 4 Acetat-Einheiten zunächst in je 2 aktivierte Acetylacetyl-Coenzym-A-Einheiten übergehen, die sich ihrerseits in einem nächsten Schritt vereinigen. Unter dem Gesichtspunkt der Kondensation mit einem N-Donor scheint die Variante A plausibler zu sein, da hier eine reaktivere α -Methylengruppe mit dem Stickstoff reagierte. Ausserdem würde im Fall, dass die geforderte Spaltung einer der ursprünglichen Essigsäure-Einheiten erst nach der Bildung des Pyrrolringes erfolgte, der Spaltungstyp A die Decarboxylierung einer Pyrrolcarbonsäure darstellen, die sicher leichter ablief, als die Decarboxylierung einer Pyrrolelessigsäure entspr. B. Die Herkunft des Stickstoffs ist unbekannt. Beim N-Donor könnte es sich etwa um Aminoaceton³⁾ oder eine äquivalente Verbindung handeln, die dann am ehesten der Acetylacetyl-Einheit entstammte, die das Carboxyl-C-Atom verliert. Die Kondensation mit einer Stickstoffquelle, die nur den Stickstoff lieferte, würde jedenfalls einen reduktiven und einen oxydativen Schritt umfassen. Schliesslich müsste noch die 8-Methylgruppe durch eine biologische Oxydation in die Hydroxymethylgruppe übergeführt werden.

³⁾ Wir danken Herrn Prof. A. H. JACKSON, Cardiff, Grossbritannien, für diesen Hinweis.

Das folgende, noch hypothetische, Reaktionsschema wäre im Einklang mit den experimentellen Ergebnissen und den obigen theoretischen Überlegungen, wobei NH_3 als einfachstes Beispiel einer N-Quelle benützt wird:



CoA = Coenzym A

Nach den bisherigen Ergebnissen ist Verrucarin E vom biogenetischen Standpunkt aus insofern bemerkenswert, als es wohl aus Essigsäure aufgebaut wird, aber nicht nach dem üblichen Schema der Polyketid-Synthese, da eine verzweigte Kette vorliegt.

Wir danken dem «SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG» (Projekt Nr.4450) und der SANDOZ AG, Basel, für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* -- Alle Smp. sind auf dem KOFER-Block bestimmt und korrigiert. Fehler ca. $\pm 2^\circ$. Substanzproben zur Radioaktivitätsmessung wurden 16 Std. bei $23^\circ/0,01$ Torr getrocknet. Die ^{14}C -Radioaktivitäten wurden nach Verbrennung der organischen Substanzen mit Sauerstoff und Absorption des entstandenen CO_2 in einem Methanol-Äthanolamin-Gemisch mit einem Flüssigkeits-Scintillationszähler nach der Methode KALBERER & RUTSCHMANN [10] gemessen⁴⁾. Bei den gezüchteten Kulturen von *Myrothecium verrucaria* handelt es sich um den Stamm S.833⁵⁾.

Für die Dünnschichtchromatographie nach der Methode STAHL diente Kieselgel G (E. MERCK AG, Darmstadt); Fließmittel: Dichlormethan mit 3 bis 10% Methanol. Sichtbarmachung der Pyrrolderivate auf den Chromatogrammen: UV.-Licht (254 nm) in Gegenwart von Zinksilicat, oder 15 Min. Belassen in Joddämpfen oder 24 Std. Belassen in feuchten HCl -Dämpfen.

2. *Kulturansatz von Myrothecium verrucaria Stamm S.833⁵⁾.* -- *Medium:* Eine Mischung von 20 g Malzextrakt (bezogen von der FERMENT AG, Basel), 4 g BACTO-Yeast-Extrakt und 20 g Fadenagar, mit entmineralisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, wurde zur Homogenisierung 30 Min. auf 100° erhitzt, heiss in die gewünschten Gefässe abgefüllt und darin 20 Min. bei 120° sterilisiert.

Stammkulturen: Schrägagarröhrchen mit *Myrothecium verrucaria* Stamm S.833 auf obigem Medium.

Vermehrungskulturen: 100-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 30 ml sterilem Medium wurden mit je 1 ml einer Sporensuspension beimpft, die wie folgt erhalten wurde: Die Sporen einer Schrägagarkultur wurden durch Schütteln in 8 ml 0,01-proz. steriler Na-Laurylsulfonat-Lösung aufgeschwemmt; die Suspension wurde mit 50 ml sterilem entmineralisiertem Wasser verdünnt. Die Inkubation erfolgte während 10 Tagen bei 27° .

Nährlösungskultur: Die Nährlösung bestand aus 275 g Glucose $\cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 g NH_4NO_3 , 25 g KH_2PO_4 , 12,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 150 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in entmineralisiertem Wasser gelöst, auf 5 l aufgefüllt, auf 50 500-ml-ERLENMEYER-Kolben verteilt und 20 Min. bei 120° sterilisiert. Jeder Kolben wurde mit 1 ml folgender Sporensuspension beimpft: Die Sporen einer Vermehrungskultur, die nicht länger als 4 Wochen bei 2° gelagert war, wurden durch Schütteln in 8 ml 0,01-proz. steriler Na-Laurylsulfonat-Lösung aufgeschwemmt und die Suspension mit 120 ml sterilem entmineralisiertem Wasser verdünnt.

Die Inkubation erfolgte während 8 Tagen bei 27° auf einer Schüttelmaschine, die pro Min. 140 Kreisbewegungen von 5 cm Durchmesser ausführte.

Die Bausteinzugabe geschah bei Verabreichung am Anfang dadurch, dass der radioaktive Baustein mit den übrigen Bestandteilen bei der Bereitung der Nährlösung gelöst wurde, oder bei Verabreichung nach 5 Tagen dadurch, dass eine Lösung des Vorläufers in 50 ml entmineralisiertem Wasser bei 23° durch ein Bakterienfilter steril-filtriert und in 1-ml-Portionen auf die 50 ERLENMEYER-Kolben verteilt wurde.

3. *Extraktion der Kulturbrühe.* Die gesamte Kulturbrühe von 5 l, die nach 8 Tagen des Pilzwachstums resultierte, wurde viermal mit je 5 l feuchtem Äthylacetat während 15 Min. ausgerührt, danach wurden die Äthylacetat-Phasen einzeln zuerst mit 1000 ml derselben 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung, dann einzeln zweimal mit je 1000 ml desselben Wassers gewaschen. Nach Filtrieren wurden die Äthylacetat-Lösungen im Vakuum in einem Umlaufverdampfer auf je ca. 250 ml eingengt, vereinigt, mit 1 g festem Na_2CO_3 versetzt, im Vakuum eingedampft und der Rückstand 15 Min. bei $60^\circ/11$ Torr getrocknet.

4. *Chromatographische Isolierung von Verrucaridin E (I).* Der mit Na_2CO_3 stabilisierte Extraktionsrückstand wurde in 30 ml Dichlormethan aufgenommen, die Lösung filtriert und auf 5 ml eingengt. Dieser Rohextrakt wurde an 30 g basischem Aluminiumoxid (M. WOELM, Eschwege/Deutschland) mit Dichlormethan (Fraktionen 1–5) und Dichlormethan mit 1% Methanol (Fraktionen 6–13), in 60-ml-Fraktionen aufgetrennt.

Die Fraktionen 1–6 enthielten kein Verrucaridin E. Die Fraktionen 7–10 lieferten 240 mg krist. Rohprodukt, das aus 12 ml Benzol von 70° umkristallisiert wurde. Nach zweistündigem Abkühlen

⁴⁾ Herr Dr. F. KALBERER, SANDOZ AG, Basel, hat auch die Messungen in verdankenswerter Weise ausgeführt.

⁵⁾ Wir danken der Firma SANDOZ AG, Basel, für die Überlassung dieses Stammes und der Vorschrift für die Kulturen.

der heissen Lösung, Animpfen bei 55° und Stehenlassen während 24 Std. bei 5° wurden ca. 150 mg relativ grosse Kristalle von reinem Verrucarín E (**1**) vom Smp. 89–92° erhalten.

5. *3-Acetyl-4-methyl-pyrrol (3) aus Verrucarín E (1)*. Eine Lösung von 20 mg **1** (0,144 mMol; MG = 139,16) in 1,0 ml Acetanhydrid wurde 8 Std. auf 65° erwärmt. Danach wurde das Acetanhydrid bei 65°/13 Torr abdestilliert. Der Rückstand wurde durch 24-stdg. Stehenlassen über NaOH vollständig vom Lösungsmittel befreit, in wenig Dichlormethan-Methanol-(95:5) gelöst, die Lösung durch 5 g Kieselgel filtriert und letzteres mit 40 ml des Lösungsmittels nachgewaschen. Nach dem Eindampfen und Trocknen resultierten 24 mg rohes O-Acetyl-Verrucarín E (**2**). Dieses wurde in 2,0 ml Methanol gelöst und mit 4,0 mg PtO₂-Katalysator 2 Std. bei 23°/Normaldruck vorhydriert. Nach der Zugabe von weiteren 6,0 mg PtO₂, aufgeschlämmt in 2,0 ml Methanol, wurde während weiteren 46 Std. hydriert (die Hydrierung kann nicht in einer Stufe vorgenommen werden). Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde im Vakuum ohne Erwärmung eingedampft und der Rückstand an 40 g Kieselgel mit Dichlormethan-Methanol-(99:1) (22 Fraktionen von je 20 ml) chromatographiert. Die aus den Fraktionen 14–16 erhaltenen Kristalle lieferten nach Sublimation bei 125°/11 Torr 12,6 mg (71,3% bezogen auf **1**) 3-Acetyl-4-methyl-pyrrol (**3**) vom Smp. 119°. Eine kristallin erstarrte Schmelze von **3** zeigt den Smp. 106° (unzersetzt). Umkristallisieren war aus 3,8 ml Benzol-Cyclohexan-(1:2) von 70° möglich.

6. *KUHN-ROTH-Oxydation von Verrucarín E (1) und von 3-Acetyl-4-methyl-pyrrol (3)*. 20 mg (0,144 mMol) **1** wurden mit 2,0 ml KUHN-ROTH-Oxydationslösung (100 g CrO₃ in 600 ml wässriger Lösung + 150 ml konz. H₂SO₄) in einem verschlossenen Rohr 3 Std. auf 100° erhitzt. Danach wurde die Lösung mit 5,0 ml 2N NaOH und 20 ml Wasser versetzt und (noch sauer) im Rotationsverdampfer bei 120 Torr destilliert. Die Destillation wurde noch viermal unter Nachgiessen von je 20 ml Wasser wiederholt. Das Destillat wurde mit 0,27 ml 2N NaOH auf pH 9 gebracht, auf wenige Tropfen eingengt, mit 0,25 ml 2N HNO₃ angesäuert und das Gefäss zur CO₂-Entfernung mit Stickstoff ausgeblasen. Mit 0,2N NaOH und 0,2N HNO₃ wurde dann die Lösung tropfenweise auf pH 6 eingestellt (oberes pH-Randgebiet der Pufferzone von Acetat-Puffer). Nach Zugabe von 0,20 ml 2N AgNO₃-Lösung fiel weisses Ag-Acetat aus, das beim Versetzen mit 5,0 ml Aceton noch stärker ausflockte. Die Flocken wurden abfiltriert, mit 5 ml Aceton-Wasser-(5:1) gewaschen, in total 10 ml Wasser bei 23° gelöst, die Lösung erneut filtriert, bei 40°/11 Torr eingedampft und das Ag-Acetat im Exsikkator über CaCl₂ getrocknet: 19,3 mg (81%) weisses krist. Ag-Acetat, das in 5 ml Wasser bei 23° gelöst wurde. Die durch Filtration geklärte Lösung wurde bei 11 Torr bis zum Ausfallen von Kristallen eingengt. Nach Versetzen mit 19 ml *t*-Butanol kristallisierte das Ag-Acetat bei 0° aus. Das Produkt ist licht- und wärmeempfindlich und sollte ohne unnötige Verzögerung weiter verwendet werden.

7. *SCHMIDT-Abbau von Ag-Acetat*. 20,4 mg (0,122 mMol) Ag-Acetat wurden in einer verschlossenen Spezialapparatur [1] bei 11 Torr zusammen mit 23,8 mg (0,366 mMol) NaN₃ (MG = 65,01) und 0,8 g Polyphosphorsäure-Wasser-(95:5) 1,5 Std. auf 85° erwärmt. Das entstandene CO₂ wurde während 1 Std. in 15 ml einer wässrigen Ba(OH)₂-Lösung absorbiert, die pro l 48 g Ba(OH)₂ und 18 g BaCl₂ enthielt. Das BaCO₃ wurde unter Stickstoff abzentrifugiert, dreimal mit Wasser-Methanol-(1:1) gewaschen und unter einer IR.-Lampe getrocknet. Ausbeute: 19,3 mg (80%) BaCO₃ (MG = 197,37).

Zur Gewinnung des Methylamins wurde der Rückstand der SCHMIDT-Reaktion mit 10 ml 15-proz. NaOH versetzt und bis zum Ausfallen von Salzen durch Destillation eingengt. In der Vorlage befand sich eine Lösung von 28,0 mg (0,122 mMol) Pikrinsäure in 4 ml Äthanol. Destillat und Vorlage wurden im Wasserstrahlvakuum eingedampft, bei 40° getrocknet, und der Rückstand zur Pikrinsäureentfernung dreimal mit je 2 ml siedendem und nachträglich abgekühltem Benzol gewaschen. Es resultierten 28,9 mg (91%) Methylaminpikrat (MG = 260,17) in goldgelben Kristallen vom Smp. 205–209° (langsame Zersetzung). Umkristallisieren aus 3,2 ml siedendem Äthylacetat und 6,4 ml siedendem Benzol ergab nach Abkühlen auf 0° nach 24 Std. 21,7 mg reines Pikrat vom Smp. 206–209°.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 18. Mitteilung: P. PFÄFFLI & CH. TAMM, *Helv.* 52, 1911 (1969).
- [2] E. HÄRRI, W. LÖFFLER, H. P. SIGG, H. STÄHELIN, CH. STOLL, CH. TAMM & D. WIESINGER, *Helv.* 45, 839 (1962).

- [3] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 157, 177 (1965); W. ZÜRCHER, J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 840 (1965); E. FETZ, B. BÖHNER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 1669 (1965); B. BÖHNER & CH. TAMM, *Helv.* **49**, 2527, 2547 (1966); R. ACHINI & CH. TAMM, *Helv.* **51**, 1712 (1968).
- [4] K. ARIMA, H. IMANAKA, M. KOSAKA, A. FUKUTA & G. TAMURA, *Agr. biol. Chemistry* **28**, 575 (1964); J. BIRCH, P. HODGE, R. W. RICHARDS, R. TAKEDA & T. R. WATSON, *J. chem. Soc.* **1964**, 2691.
- [5] G. S. MARKS & L. BOGORAD, *Proc. natl. Acad. Sci.* **46**, 25 (1960).
- [6] Vgl. P. KARLSON, «Biochemie», fünfte, neubearbeitete Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1966; HENRY R. MAHLER & EUGENE H. CORDES, «Biological Chemistry», Harper & Row, New York, Evanston & London, and John Weatherhill, Inc., Tokyo, 1968.
- [7] R. KUHN & F. L'ORSA, *Angew. Chem.* **44**, 847 (1931); R. KUHN & H. ROTH, *Ber. deutsch. Chem. Ges.* **66**, 1274 (1933); F. PREGL & H. ROTH, «Quantitative Mikroanalyse», 7. Aufl., Verlag Springer, Wien 1958.
- [8] E. FETZ & CH. TAMM, *Helv.* **49**, 349 (1966).
- [9] J. H. RICHARDS & J. B. HENDRICKSON, «The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins», Edit. W. A. Benjamin Inc., New York 1966; J. D. BU'LOCK, «The Biosynthesis of Natural Products», McGraw Hill, London, New York, Toronto, Sydney 1965.
- [10] F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, *Helv.* **44**, 1956 (1961).
- [11] J. J. BRITT, «Über die Biosynthese von Rosenolacton», Diss. ETH Zürich, Nr. 2948 (1959), S. 66.

195. Synthese von Benzazepinen und ihre Umlagerung in Chinoline und Pyrrolo[2,3-b]chinoline¹⁾

von A. Vogel, F. Troxler und A. Lindenmann

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien, SANDOZ AG, Basel

(26. VIII. 69)

Summary. BECKMANN or SCHMIDT rearrangement of ethyl *trans*-4-oxo-1-phenyl-2-tetralin-carboxylate (**2**) affords ethyl *trans*-2,3,4,5-tetrahydro-2-oxo-5-phenyl-1 *H*-benzo[b]azepine-4-carboxylate (**4**). Mild treatment of *trans*-2,3,4,5-tetrahydro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1 *H*-benzo[b]azepine-4-carboxylic acid (**7**) with thionyl chloride and pyridine in dimethylformamide and subsequent reaction with an amine yields the corresponding benzazepine-4-carboxamide. If heat is applied during the preparation of the acid chloride, rearrangement occurs yielding *cis* and *trans* derivatives of hydrocarbostyryl.

2,3,4,5-Tetrahydro-1,4-methano-1-methyl-5-phenyl-1 *H*-benzo[b]azepinium chloride (**25**) reacts with primary or secondary amines to *cis*-tetrahydroquinoline derivatives.

When heated above its melting point, *trans*-4,5-dihydro-2-methylamino-5-phenyl-3 *H*-benzo[b]azepine-4-carboxylic acid (**29**) rearranges with elimination of water to a mixture of *cis*- and *trans*-2,3,3a,4-tetrahydro-1-methyl-2-oxo-4-phenyl-1 *H*-pyrrolo[2,3-b]quinoline (**32** and **31**). The reduction of **31** was investigated.

The mechanisms of the rearrangements are discussed.

1. Synthese der Benzazepine. — *Trans*-1-Phenyl-4-tetralon-2-carbonsäure-äthylester (**2**) [1] [2] wurde in das Oxim **3** übergeführt und dieses nach BECKMANN mit Polyphosphorsäure in ein Benzazepinderivat umgelagert, das auch durch SCHMIDT-Reaktion von **2** mit Natriumazid und Polyphosphorsäure erhalten wurde. In analoger Weise liess sich auch die freie Tetraloncarbonsäure **1** [1] [2] umlagern.

¹⁾ Teilweise vorgetragen an der Winterversammlung der Schweiz. Chem. Gesellschaft vom 15. Februar 1969 in Neuenburg; Autoreferat: *Chimia* **23**, 184 (1969).