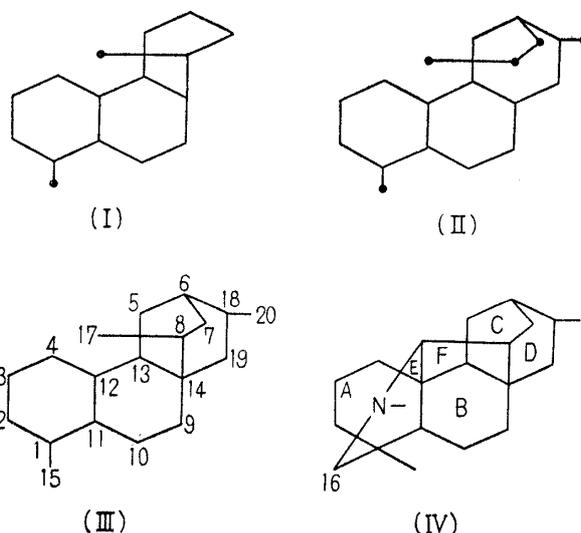


12. **Shin-ichiro Sakai**: Akonitum-Alkaloide. XXI.<sup>1)</sup> Über Hypognavin. (5)<sup>1, 2)</sup>

(Pharmazeutisches Fakultät, Universität Tokyo\*)

Durch Selen-Dehydrierung des Hypognavinols habe ich drei Alkylphenanthrene, zwei kristallinische vom Schmp. 187~191° und 89~90.5°, und ein flüssiges mit dem Trinitrobenzolat vom Schmp. 173~175°, in kleiner Menge rein isoliert, von denen dasjenige vom Schmp. 187~191° als 1,8-Dimethylphenanthren (I) festgestellt wurde.<sup>2)</sup> Kürzlich wurde die Konstitution des Alkylphenanthrens vom Schmp. 89~90.5°, welches gleichzeitig auch ein Dehydrierungsprodukt des Anhydroignavinols bildet,<sup>3)</sup> als 1,7-Dimethyl-6-propylphenanthren (II) festgestellt.<sup>4)</sup> Bindet man (I) und (II), so bekommt man ein Skelett (III), aus welchem in Erwägung der Konstitution der anderen Diterpenoid-Alkaloide wie Garrya-Alkaloide oder Atisin die Formel (IV) als das wahrscheinlichste Grundskelett des Hypognavinols aufgebaut wurde.



Über die Konstitution des stickstoffhaltigen Ringes ist noch fast nichts zu sagen, weil man bei der Selen-Dehydrierung des Hypognavinols kein aromatisches N-haltiges Produkt isolieren konnte, wie 1-Methyl-7-äthyl-3-azaphenanthren beim Veatchin oder Garryin der Fall ist.<sup>5)</sup> Die Schwierigkeit dieser Aromatisierung des stickstoffhaltigen Ringes ist jedoch an Hand der Formel (IV) verständlich. Der 5-gliedrige F-Ring in ihr, welcher durch Bindung von C-8 und C-17 gebildet wurde, sowie der Brücken-Stickstoff, der sich auf drei Ringe erstreckt, sollte gegen die Aromatisierung des Stickstoffringes E einen grossen Widerstand ausüben. Es wurde nun also aufs neue die Selen-Dehydrierung des Des-N-methylhypognavinols geplant, bei welchem der Stickstoff nur zu einem Ring gehört. Hierbei konnte man eine schwach basische Fraktion isolieren, die obwohl sie sich wegen der kleinen Menge schwer reinigen liess, eine mit dem 3-Azaphenanthren (durch Dehydrierung von Pyridin-tetrahydro-3-azaphenanthren<sup>6)</sup> neu hergestellt) ähnliche UV-Absorptionskurve zeigt (Fig. 1). Ferner konnte man den 6-gliedrigen E-Ring durch oxydativen Versuch von acylierten Des-N-basen bestätigen.

1) XX. Mitt. S. Sakai: Dieses Bulletin, **7**, 50(1959).

2) S. Sakai: Yakugaku Zasshi, **76**, 1054(1956).

3) E. Ochiai, T. Okamoto, T. Sugawara, S. Sakai: Dieses Bulletin, **2**, 388(1954).

4) E. Ochiai, T. Okamoto, S. Hara, S. Sakai, M. Natsume: Dieses Bulletin, **6**, 327(1958).

5) M. F. Bartlett, K. Wiesner: Chem. & Ind. (London), **1954**, 542.

6) F. Mayer, O. Schneekl: Ber., **56**, 1408(1923).

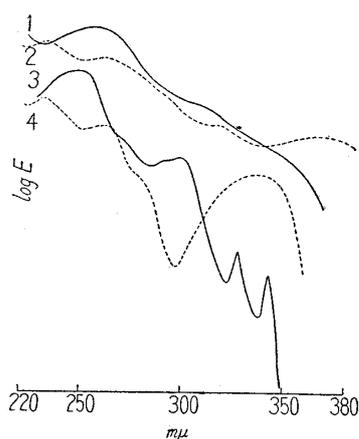
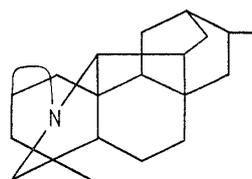


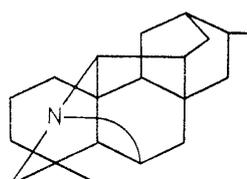
Fig. 1.  
Die Fraktion aus  
1,2) Des-N-methylhypognavinol  
3,4) 3-Azaphenanthren  
— EtOH-Lösung  
..... N HCl-Lösung

Durch Benzoylieren des Des-N-methylhypognavinols konnte man nur das Dibenzoat (Prismen, Schmp. 234°) kristallinisch erhalten, während das Tribenzoat amorph blieb. Das letztere ergab bei der Oxydation mit Chromtrioxyd in Pyridin-Lösung bei Zimmertemperatur Prismen vom Schmp. 244~245°, deren Analysenzahlen mit der Formel  $C_{21}H_{24}O_5N(COC_6H_5)_3$  übereinstimmten. In ihrem IR-Spektrum (Nujol) ist eine Bande bei  $1656\text{ cm}^{-1}$  vorhanden, welche einem Laktam-Carbonyl zuzuschreiben ist, sodass sie als ein Laktam des Tribenzoyl-des-N-methylhypognavinols festgestellt wurde. Ganz analog konnte man durch Oxydation des amorphen Tri-*p*-nitrobenzoyl-des-N-methylhypognavinols das entsprechende Laktam vom Schmp. 241~242° erhalten, dessen Konstitution auch aus der Bande seines IR-Spektrums (Nujol) bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  gesichert wurde. Beide Laktame ergaben beim Verseifen kein kristallinisches Produkt. Andererseits konnte man aus Triacetyl-des-N-äthylhypognavinol (Nadeln, Schmp. 165~170°) durch analoge Oxydation mit Chromtrioxyd in Pyridin-Lösung ein kristallinisches Produkt vom Schmp. 260~261° und von der Zusammensetzung  $C_{22}H_{26}O_5N(COCH_3)_3$  erhalten, dessen Konstitution aus den Banden seines IR-Spektrums (Nujol) bei  $1727\text{ (CH}_3\text{COOR)}$  und  $1635\text{ (N-CO) cm}^{-1}$  als ein dem Triacetat entsprechendes Laktam versichert wurde. Die letztere ergab beim Verseifen mit methanolischer Kali-Lösung prismatisches Kristalle vom Schmp. 257~259°. Das letztere besitzt eine Zusammensetzung von  $C_{22}H_{29}O_5N$  und in seinem IR-Spektrum (KBr) ist eine Laktam-Bande bei  $1614\text{ cm}^{-1}$  vorhanden. Bei 2 std. Erhitzen des letzteren mit 50-proz. Schwefelsäure auf 135° konnte man keine Entstehung von AcOH nachweisen. Die Laktam-Bande bei  $1614\text{ cm}^{-1}$  stammt also nicht aus einer N-Acetylgruppe sondern aus einem 6-gliedrigen Ring-Laktam, welches durch Oxydation der C-16 Methylengruppe im E-Ring entstanden ist.

Der Model-Versuch zeigt, dass für die dritte Bindungsstelle des Stickstoffes C-3 und C-10 (V und VI) möglich sind. Wegen des 5-gliedrigen F-Ringes sind die beiden übrigen Valenzrichtungen des C-17 so fixiert, dass die dritte Valenz des Stickstoffs beim sesselförmigen E-Ring nur mit C-3 und beim wannenförmigen E-Ring mit C-10 fast spannungsfrei binden kann.



(V)



(VI)

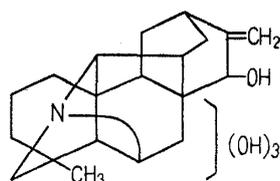
Mit diesen Formeln ist der Widerstand des Des-N-methylhypognavinols gegen den zweiten Hofmann'schen Abbau auch verständlich, weil unter den  $\beta$ -Stellungen zum Stickstoff C-1 und C-12 keinen Wasserstoff tragen und die Neubildung einer Doppelbindung zwischen C-17

und C-8 der Bredt'schen Regel widersprechenden würde. Die Formel (V) ist auch aus der Betrachtung der oxydativen Versuche des Dihydrohypognavinons sowie des Des-N-methylhypognavinols (vgl. unten) weniger wahrscheinlich, sodass die Formel (VI) als das wahrscheinlichste Grundskelett des Hypognavinols betrachtet wurde.

In der vorigen Mitteilung<sup>7)</sup> wurde festgestellt, dass Hypognavin bzw. Hypognavinol eine Vinylgruppe enthält, die mit einer sekundären Hydroxylgruppe einen Allylalkohol bildet. Aus der Betrachtung des Grundskelettes der anderen Diterpenoid-Alkaloide geht klar hervor, dass C-20 zu dieser Vinylgruppe gehört und dementsprechend eine Hydroxylgruppe auf C-19 sitzt.

Hypognavinol ergab bei der C-Methyl-Pestimmung nach Kuhn-Roth<sup>8)</sup> nur 0.1 Mol CH<sub>3</sub>. Des-N-methylhypognavinol ergab jedoch den Wert von 0.35 Mol CH<sub>3</sub> und überdies konnte man dabei nach Karrer, *et al.*<sup>9)</sup> die wirkliche Entstehung der Essigsäure papierchromatographisch nachweisen.<sup>10)</sup> Ferner konnte man bei Anwendung eines Platin-Plättchens als der Oxydationskatalysator beim Hypognavinol 0.46~0.64 Mol CH<sub>3</sub> bestimmen. Hypognavinol enthält also sicher eine C-Methylgruppe, die unter Berücksichtigung des Diterpenoid-Skelettes dem C-16 zugeteilt wurde.

Die Konstitution des Hypognavinols kann man sich also mit der Formel (VII) wie folgt vorstellen.



(VII)

Über die übrigen Hydroxylgruppen des Hypognavinols wurde in der vorigen Mitteilung<sup>2)</sup> gezeigt, dass zwei davon acylbar sind, von denen eine im Hypognavin benzoiliert vorhanden ist und zwar liegt diese mit der anderen sekundären Hydroxylgruppe benachbart. Die dritte gehinderte Hydroxylgruppe wurde dabei als tertiär vermutet. Über die Stellungen dieser drei Hydroxylgruppen, die noch nicht sicher bekannt sind, konnte man aus einem oxydativen Versuch des Des-N-methylhypognavinols einen Anhaltspunkt erhalten. Bei der Oxydation des letzteren mit Silberoxyd in Äthanol-Lösung oder mit Kaliumferricyanid in alkalischer Lösung wurde ein kristallinisches Produkt (Prismen vom Zers. Pkt. 234~235°) von der Zusammensetzung C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>N erhalten. Es besitzt einen pKa'-Wert von 5.33 (in 50% Methylcellosolve-Wasser). Es bildete ein prismatisches Perchlorat vom Zers. Pkt. 266° mit einem pKa'-Wert 5.23 (in 50% Methylcellosolve-Wasser). Mit Jodmethyl verband sich in der Kälte nicht und bildete beim Erhitzen im Wasserbad statt des Jodmethylates ein prismatisches Jodhydrat vom Zers. Pkt. 252°. Im IR-Spektrum (Nujol) des Perchlorates bzw. Jodhydrates ist ausser einer Bande bei 1660 bzw. 1656 cm<sup>-1</sup> (schwach) (C=C) noch eine C=N<sup>+</sup> Bande bei 1686 bzw. 1679 cm<sup>-1</sup> (mittelstark) vorhanden, während in demjenigen der freien Base nur eine Bande bei 1658 cm<sup>-1</sup> (C=C) bemerkbar ist. Es wurde dabei gesichert, dass man durch Zersetzen des Perchlorates die ursprüngliche Base regenerieren kann. Ferner wurde gezeigt, dass die Base bei der Reduktion mit Natriumborhydrid das originelle Des-N-methylhypognavinol regeneriert. Es wurde noch bemerkt, dass das Perchlorat beim Acetylieren ein blättriges Triacetat C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>N(COCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·HClO<sub>4</sub> vom Zers. Pkt. 258° bildet, bei welchem sich der pKa'-Wert bis 10.50

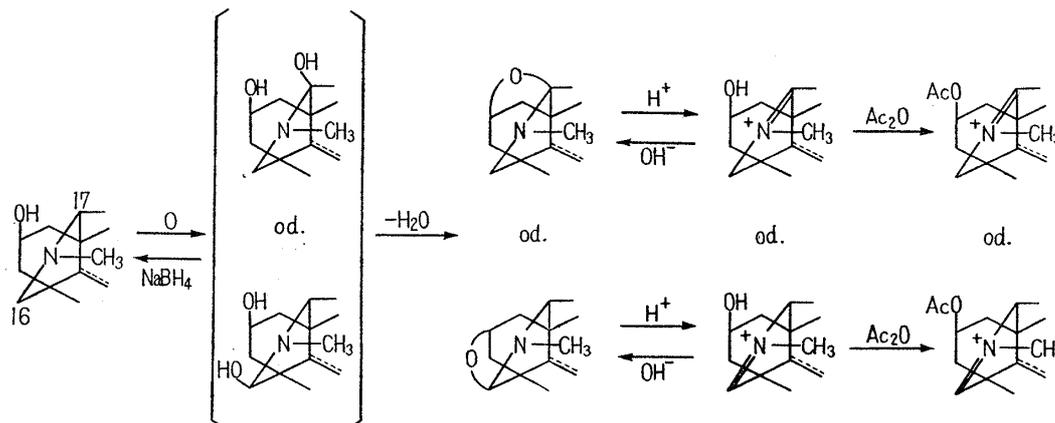
7) S. Sakai: Dieses Bulletin, **5**, 1(1957).

8) Modifiziert nach S. M. McElvain, *et al.*: J. Am. Chem. Soc., **76**, 607(1954).

9) P. Karrer, C. F. Garbers, H. Schmid: Helv. Chim. Acta, **37**, 1336(1954).

10) Die Differenz der Leichtigkeit der Entstehung der Essigsäure zwischen dem Hypognavinol und seiner Des-N-base könnte auf der Differenz der Leichtigkeit der Laktamisierung der C-16-Methylengruppe beruhen, die beim Hypognavin einen Widerspruch zu der Bredt'schen Regel aufweist.

(in 50% Methylcellosolve-Wasser) vergrößert hat. Diese Tatsachen zeigen, dass die neu entstandene Base ein Carbinolaminanhydrid ist. Sie wurde daher mit Anhydrohydroxy-des-N-methylhypognavinol bezeichnet. Die Entstehung dieser Carbinolaminäther kann man dadurch erklären, dass die Oxydation zuerst C-16 oder C-17 angreift und die Hydroxylgruppe des neu gebildeten Carbinolamins sofort mit einer schon vorhandenen Hydroxylgruppe einen Äther-Ring gebildet hat. Dieser Ringschluss ist sterisch nur mit der axialen Hydroxylgruppe auf C-3 möglich. Ob dabei C-16 oder C-17 oxydiert hat, kann man noch nichts sicheres sagen. Die Entstehung der Anhydrohydroxybase sowie ihrer Veränderungen kann man somit wie folgt veranschaulichen.



Anhydrohydroxy-des-N-methylhypognavinol ergab bei der Oxydation mittels Mangandioxyds nach Ball<sup>11)</sup> oder mittels Chromtrioxyd in Pyridin-Lösung prismatische Kristalle vom Schmp. 259~260°, dessen Analysenzahlen mit der Formel  $C_{21}H_{25}O_4N$  übereinstimmten. Das Absorptionsmaximum seines UV-Spektrums ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  230 m $\mu$  bei log  $\epsilon$  3.98) sowie die Banden seines IR-Spektrums bei 1692 und 1625  $\text{cm}^{-1}$  (CO, C=C) zeigt, dass es das durch Oxydation der 19-Hydroxylgruppe entstandene  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Keton ist.

In der vorigen Mitteilung<sup>1)</sup> wurde es gezeigt, dass die beide Diketoalkamine aus dem Ketodihydrohypognavinon im Gegensatz zum letzteren innerhalb von 20 Stunden gerade 1 Mol  $\text{HJO}_4$  verbraucht. Das ist sehr merkwürdig, weil Hypognavinol unter gleicher Bedingung kaum  $\text{HJO}_4$  verbraucht. Die Oxydation des Hypognavinols mittels Perjodsäure sowie Bleitetraacetates wurde somit derjenigen des Hypognavins, Ketodihydrohypognavinons und Des-N-methylhypognavinols näher vergleichend untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen werden samt den vorher erhaltenen Daten der beiden Diketoalkamine<sup>1)</sup> in der Tabelle I gezeigt.

TABELLE I.  
Verbrauchte Mol  $\text{HJO}_4$  oder  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$

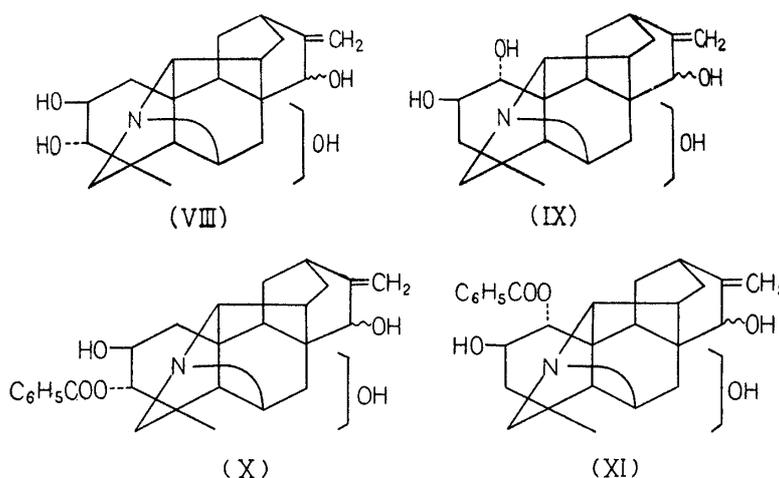
Probe Oxydiert mit Nach Stdn.	Hypognavinol		Hypognavin		Diketoalkamine <sup>g)</sup>		Des-N-methyl- hypognavinol
	$\text{Pb}(\text{OAc})_4$	$\text{NaJO}_4$ in 1% $\text{NaHCO}_3$	$\text{NaJO}_4$ in 10% AcOH				$\text{HJO}_4$
20	0	0	0.04	0	A 0.93 <sup>a)</sup>	B 0.99 <sup>b)</sup>	0
45			0.07				
80		0.01					
120				0.11			
170	0.43						
210	0.74	1.10 <sup>c)</sup>	0.30 <sup>d)</sup>	0.28 <sup>e)</sup>			
880		2.16					1.39 <sup>f)</sup>

a) Schmp. 251~253°    b) Zers. Pkt. 274~277°    c) Nach 264 Stunden    d) Nach 256 Stunden  
e) Nach 237 Stunden    f) Nach 550 Stunden    g) Vgl. dazu dieses Bulletin, 7, 50 (1959).

11) S. Ball, T. W. Goodwin, R. A. Morton: Biochem. J., **42**, 516(1948).

Aus diesen Daten kann man entnehmen, dass Hypognavinol bzw. Des-N-methylhypognavinol, obwohl mit einem sehr grossen Widerstand, wirklich 1 Mol  $\text{HJO}_4$  oder  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$  verbraucht. Hieraus folgt, dass die benachbarten Hydroxylgruppen in Hypognavinol in *trans*-Stellung liegen. Da die axiale Hydroxylgruppe auf C-3 an der Seite des E-Rings liegt, muss die andere Hydroxylgruppe auf C-2 oder C-4 axial nach der hinteren Seite liegen, die höchstwahrscheinlich im Hypognavin dessen Benzoylgruppe trägt, weil sie dann sterisch weniger gehindert sein könnte.

Diese Tatsachen zusammenfassend möchte ich für die Konstitution des Hypognavinols die Formel (VIII) oder (IX) und dementsprechend für Hypognavin die Formel (X) oder (XI) aufstellen. Für die Stellung der vierten Hydroxylgruppe sind nur C-8, -6, -11 und -13 möglich.



Diese Arbeit wurde unter der gütigen Leitung von Herrn Prof. E. Ochiai und Herrn Prof. T. Okamoto durchgeführt, wofür ich mich zu Dank verpflichtet fühle.

### Experimentell.

**Selen-Dehydrierung des Des-N-methylhypognavinols**—Eine innige Mischung aus 1 g Des-N-methylbase und 10 g Se wurde innerhalb von 10 Min. bis auf 340° erhitzt und dann 4.5 Stdn. bei 340~350° gehalten. Hierbei wurde während der ersten 30 Min. zwischen 280~340° ein lebhaftes Schäumen bemerkt. Das Reaktionsprodukt wurde mit Äther ausgezogen, der Äther-Auszug (300 mg) ganz analog wie bei der Se-Dehydrierung des Hypognavinols<sup>2)</sup> aufgearbeitet und 56 mg neutraler Teil, 86 mg stark basischer Teil (in 5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung löslich), 19 mg schwach basischer Teil (in 5%  $\text{H}_2\text{PO}_4$ -Lösung unlöslich) und 4 mg saurerer Teil gewonnen.

Der schwach basische Teil wurde durch eine 3-ccm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule chromatographiert, wobei als das Lösungsmittel, Benzol, 10%  $\text{CHCl}_3$ -Benzol, 50%  $\text{CHCl}_3$ -Benzol,  $\text{CHCl}_3$  und 3% MeOH- $\text{CHCl}_3$  der Reihe nach angewandt wurden. Jede 3-ccm Fraktion wurde dabei gesondert und ihr UV-Spektrum in EtOH- und in N HCl-Lösung gemessen.

Frakt. Nr.	Entwickelt mit	Menge (mg)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (m $\mu$ )	$\lambda_{\text{max}}^{\text{N HCl}}$ (m $\mu$ )
1~3	Benzol	ca. 1	251	233, 260
4~5	"	ca. 1	nichts	—
6~8	10% $\text{CHCl}_3$ -Benzol	1	226~227	—
9~16	50% $\text{CHCl}_3$ -Benzol	1	nichts	—
17~39	$\text{CHCl}_3$	5	nichts	—
40~50	3% MeOH- $\text{CHCl}_3$	9	—	—

Die Frakt. Nr. 1~3 wurde nochmals mit einer 7-ccm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule analoger Weise chromatographiert und UV-spektroskopisch gemessen.

Frakt. Nr.	Entwickelt mit	Bemerkung	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (m $\mu$ )	$\lambda_{\text{max}}^{\text{N HCl}}$ (m $\mu$ )
1~6	50 ccm Petroläther	Spur, ölig	nichts	
7~9	30 ccm 10% Benzol-Petroläther	"	258	

10	50% Benzol-Petroläther	Spur, ölig	254	232~234, 262~264
11	"	"	258~260	232~234, 262~264, 367
12	"	"	251~252	233~234, 262~264
13~14	"	"	251	—
15	"	"	—	—
16	"	"	255~256	233, 255
17~21	"	"	—	—
22~30	5% MeOH-Benzol	braunes Öl	—	—

**3-Azaphenanthren**—200 mg Pyridintetrahydro-3-azaphenanthren (Sdp<sub>5</sub> 160°; Pikrat, Schmp. 225~226°<sup>6</sup>) wurden mit Pd-Kohle (aus 10 ccm 1-proz. PdCl<sub>2</sub>-Lösung und Kohle bereitet) 2 Stdn. auf 280~300° erhitzt und das Produkt mit Äther ausgezogen. Die Äther-Lösung wurde mit 5-proz. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung gewaschen und nach dem Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingedampft. Der kristallinisch erstarrte Rückstand (100 mg) wurde aus Petroläther umgelöst. Prismen vom Schmp. 57~59°. C<sub>18</sub>H<sub>9</sub>N—Ber.: C, 87.12; H, 5.06; N, 7.82; Mol. Gew., 179.2. Gef.: C, 87.43; H, 5.03; N, 8.12; Mol. Gew., 173. UV λ<sup>EtOH</sup><sub>max</sub> mμ: 246~250, 300, 328, 343; λ<sup>NHCl</sup><sub>max</sub> mμ: 231~232, 263, 336~338.

Pikrat: Nadeln aus MeOH, Schmp. 227~229°. C<sub>18</sub>H<sub>9</sub>N·C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>—Ber.: C, 55.89; H, 2.96; N, 13.72. Gef.: C, 55.55; H, 2.78; N, 13.19.

**Dibenzoyl-des-N-methylhypognavinol und Tribenzoyl-des-N-methylhypognavinol-laktam** — Zu einer Lösung von 529 mg Des-N-methylbase in Pyridin wurden 5 ccm BzCl zugesetzt und nach dem Stehenlassen über Nacht bei Zimmertemperatur 30 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Die durch übliche Aufarbeitung erhaltene Rohbase (1.2 g) wurde durch eine 30-ccm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Säule chromatographiert. Lösungsmittel: CHCl<sub>3</sub>.

Frakt. Nr.	Menge (mg)	Bemerkung
1~3	720	amorph
4~7	172	Schmp. 224~227°

Die Fraktionen 1~3 wurden nochmals durch eine 20-ccm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Säule chromatographiert. Lösungsmittel: CHCl<sub>3</sub>.

Frakt. Nr.	Menge (mg)	Bemerkung
1~5	615	amorph
6~17	6	amorph
18~19	97	Schmp. 225°.

Beide kristallisierte Teile wurden zusammen (269 mg) nach nochmaliger chromatographischer Reinigung zweimal aus Aceton umkristallisiert. Prismen vom Schmp. 234° (122 mg). C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>N(COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>—Ber.: C, 74.05; H, 6.57. Gef.: C, 74.08; H, 6.76.

Der amorphe Teil (615 mg) wurde auf einer Mischung von 20 ccm Pyridin und 500 mg CrO<sub>3</sub> zugesetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stengelassen. Die Reaktionsmischung wurde mit MeOH verdünnt, mit verd. NH<sub>4</sub>OH zugesetzt, filtriert und das Filtrat mit CHCl<sub>3</sub> ausgezogen. Der CHCl<sub>3</sub>-Auszug ergab bei der chromatographischen Reinigung und Umkristallisieren aus MeOH 51 mg Prismen vom Schmp. 244~245°. C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>N(COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>—Ber.: C, 73.56; H, 5.73; N-CH<sub>3</sub>, 2.41. Gef.: C, 73.82; H, 5.73; N-CH<sub>3</sub>, 0.58. IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$  cm<sup>-1</sup>: 3589, 1714, 1656.

20 mg Probe wurden mit 7 mg CrO<sub>3</sub> in 1 ccm Pyridin analogerweise weiter oxydiert und 20 mg Ausgangsmaterial vom Schmp. 245° regeneriert.

20 mg Probe gaben beim Verseifen mit methanolischer KOH-Lösung 10 mg amorphes Produkt, welches sich nicht kristallisieren liess. IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ : 1616 cm<sup>-1</sup>.

**Tri-p-nitrobenzoyl-des-N-methylhypognavinol-laktam** — 100 mg Des-N-methylbase wurden mit 520 mg p-Nitrobenzoylchlorid in Pyridin-Lösung analogerweise behandelt und 135 mg amorphes in MeOH schwer lösliches Produkt (Schmp. ca. 165~180°) erhalten. Das letztere wurde ganz analog wie bei der Oxydation des Tribenzoates mit 70 mg CrO<sub>3</sub> in 3 ccm Pyridin oxydiert und weiter aufgearbeitet. 36 mg Prismen vom Schmp. 241~242°. C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>N(COC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>—Ber.: C, 61.47; H, 4.42; N, 6.82. Gef.: C, 61.30; H, 4.77; N, 6.86. IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ : 1727, 1630 cm<sup>-1</sup>.

**Triacetyl-des-N-äthylhypognavinol**—395 mg Des-N-äthylbase wurden mit 3 ccm Ac<sub>2</sub>O in Pyridin-Lösung acetyliert. 450 mg Nadeln aus MeOH, Schmp. 165~170° (bei ca. 160° Sintern). C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N(COCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>—Ber.: C, 67.31; H, 7.47. Gef.: C, 67.03; H, 6.88.

**Triacetyl-des-N-äthylhypognavinol-laktam**—432 mg Triacetyl-des-N-äthylbase wurden mit 260 mg CrO<sub>3</sub> in 10 ccm Pyridin ganz analogerweise oxydiert und das Produkt durch Chromatographie und Umkristallisation aus Aceton gereinigt. Blättchen, Schmp. 261~262°. C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>N(COCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>—Ber.: C, 65.48; H, 6.87; 3CH<sub>3</sub>CO, 25.14. Gef.: C, 65.62; H, 6.82; CH<sub>3</sub>CO, 25.25.

**Des-N-äthylhypognavinol-laktam**—180 mg wie oben erhaltenes rohes Triacetylaktam wurden in MeOH gelöst, 100 mg KOH und einige Tropfen Wasser zugesetzt und 30 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde unter vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand mit wenig Wasser behandelt, mit 10-proz. MeOH-CHCl<sub>3</sub> ausgezogen und der Auszug (133 mg) aus Aceton umkristallisiert. 97 mg Prismen vom Schmp. 257~259°. C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub>N—Ber.: C, 68.19; H, 7.54; CH<sub>3</sub>CO, 11.11. Gef.: C, 68.39; H, 7.37; CH<sub>3</sub>CO, 0.

**Anhydrohydroxy-des-N-methylhypognavinol**—(i) 50 mg Des-N-methylhypognavinol wurden in 2 ccm EtOH gelöst, 2 ccm Wasser zugesetzt und hierauf eine Lösung von 250 mg K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> und 200 mg NaOH in 5 ccm Wasser auf einmal zugesetzt und unter öfterem Umschütteln 1 Std. stehengelassen. Die rotbraune Reaktionslösung wurde mit CHCl<sub>3</sub> ausgezogen und damit 38 mg kristallinisches Produkt erhalten, welches beim Umkristallisieren aus MeOH 20 mg Prismen vom Schmp. 234~235° bildete. C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>N—Ber.: C, 70.56; H, 7.61; N-CH<sub>3</sub>, 4.20. Gef.: C, 70.86; H, 8.03; N-CH<sub>3</sub>, 5.95.

(ii) Einer EtOH-Lösung von 100 mg. Des-N-methylbase wurde aus 1 g AgNO<sub>3</sub> frisch bereitetes Ag<sub>2</sub>O zugesetzt und unter Umschütteln auf dem Wasserbad erhitzt. Nach 2 Std. wurde die Reaktionsmischung filtriert, mit verd. MeOH gewaschen und das Filtrat und die Waschlösung zusammen mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Der CHCl<sub>3</sub>-Auszug (62 mg) wurde durch Chromatographie und Umkristallisation aus MeOH gereinigt und 27 mg Prismen vom Schmp. 230~233° erhalten, die bei einer Mischprobe mit dem Präparat von (i) keine Depression des Schmelzpunktes zeigten. Perchlorat: Prismen aus MeOH-Äther, Zers. Pkt. 266°. C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>N·HClO<sub>4</sub>—Ber.: C, 55.08; H, 6.16. Gef.: C, 54.99; H, 6.77.

50 mg Base wurden in wenig MeOH gelöst und mit frisch destilliertem MeJ in einem Rohr 2 Std. auf dem Wasserbad erhitzt. Der Rohrinhalt wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand auf MeOH-Äther umkristallisiert. 46 mg Prismen vom Zers. Pkt. 252° (sint. 245°). C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>N·HJ·1½H<sub>2</sub>O—Ber.: C, 51.02; H, 5.91. Gef.: C, 50.77, H, 5.97.

30 mg Probe wurden in MeOH-haltigem Wasser gelöst und durch eine Schicht von Amberlite IRA-400 filtriert, mit demselben Lösungsmittel gewaschen und das Filtrat und die Waschlösung zusammen im Vakuum eingedampft. Der Rückstand ergab beim Umkristallisieren aus MeOH 18 mg Prismen vom 233~234°, die bei einer Mischprobe mit der freien Base des Ausgangsprodukts keine Depression des Schmelzpunktes zeigen.

Triacetat-Perchlorat: 90 mg Perchlorat wurden mit 5 ccm Ac<sub>2</sub>O 30 Min. im Sieden gehalten und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand ergab beim Umkristallisieren aus MeOH Blättchen vom Zers. Pkt. 258°. C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>N(COCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·HClO<sub>4</sub>—Ber.: C, 55.52; H, 5.87. Gef.: C, 55.38; H, 5.71. IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$  1686 cm<sup>-1</sup> (C=N<sup>+</sup>).

11.915 mg Probe wurden in 2 ccm MeOH gelöst, 1 ccm N NaOH zugesetzt und 1 Std. auf dem Wasserbad erhitzt. Die Reaktionslösung wurde durch eine Säule von Amberlite IRA-120 filtriert und die durchgeflossene Säure-Lösung mit 0.02N NaOH titriert. 0.02N NaOH-Verbrauch: 4.22 ccm. Ber. für 4×H<sup>+</sup>: 4.08 ccm.

50 mg Triacetat-Perchlorat wurden in CHCl<sub>3</sub> gelöst, mit verd. NH<sub>4</sub>OH gewaschen, die CHCl<sub>3</sub>-Lösung nach dem Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingedampft und 35 mg amorpher Rückstand erhalten, der sich nicht kristallisieren liess und dessen Perchlorat und Jodhydrat ebenfalls nicht mehr kristallisierten. pK<sub>a</sub>': 4.67 (in 50% MeOH-H<sub>2</sub>O).

10 mg Triacetat-Perchlorat gaben beim Verseifen mit methanolischer KOH-Lösung 5 mg Anhydrohydroxy-des-N-methylhypognavinol vom Schmp. 232~235°.

**Reduktion des Anhydrohydroxy-des-N-methylhypognavinols mittels NaBH<sub>4</sub>**—Zu einer Lösung von 50 mg Anhydrohydroxy-des-N-methylbase in 5 ccm 80-proz. MeOH-Wasser wurden 70 mg NaBH<sub>4</sub> zugesetzt und 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser verdünnt und mit CHCl<sub>3</sub> ausgezogen. Der CHCl<sub>3</sub>-Auszug wurde aus Aceton umkristallisiert. 50 mg Prismen vom Schmp. 205~206°. Eine Mischprobe mit Des-N-methylhypognavinol schmolz bei 205~206°.

**Anhydrohydroxy-des-N-methylhypognavinolon**—(i) Zu einer Lösung von 50 mg Anhydrohydroxy-N-methylhypognavinol in 20 ccm CHCl<sub>3</sub> wurden 500 mg aktives MnO<sub>2</sub> unter Umrühren innerhalb von 1 Std. zugesetzt und 3 Std. weiter bei Zimmertemperatur umgerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand (37 mg) aus MeOH umkristallisiert. 15 mg Prismen vom Schmp. 259~260°. C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>N—Ber.: C, 70.96; H, 7.09. Gef.: C, 70.68; H, 7.16.

Chlorhydrat: Prismen, Zers. Pkt. 296° (sint. 290°). C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>N·HCl—Ber.: C, 64.36; H, 6.69. Gef.: C, 63.89; H, 6.79.

(ii) 50 mg Anhydrohydroxy-des-N-methylhypognavinol wurden in Pyridin-Lösung mit 50 mg CrO<sub>3</sub> bei Zimmertemperatur oxydiert. 8 mg Prismen vom Schmp. 253°. Eine Mischprobe mit dem Präparat von (i) zeigte keine Depression des Schmelzpunktes.

**C-Methyl-Bestimmung nach Kuhn-Roth**—(i) Hypognavinol: 16.741 mg. Probe verbrauchte 0.2 ccm 0.02N NaOH (F=1.225). Gef.: CH<sub>3</sub>, 0.10. 16.274 mg Probe wurden unter Zusatz eines Pt-Plättchens (5 mm<sup>2</sup>) oxydiert. Verbrauchte 0.02N NaOH (F=1.225): 0.875 ccm. Gef.: CH<sub>3</sub>, 0.46. 15.700 mg. Probe verbrauchte bei Anwendung Pt-Katalysator 1.2 ccm 0.02N NaOH (F=1.225). Gef.: CH<sub>3</sub>, 0.64.

Des-N-methylhypognavinol. 16.898 mg Probe verbrauchte 0.67 ccm 0.02N NaOH ( $F=1.225$ ). Gef.:  $\text{CH}_3$ , 0.35. Der Säure-Teil der titrierten Lösung wurde papierchromatographisch geprüft. Rf 0.17. Kontrollversuch mit AcOH: Rf 0.18.

### Zusammenfassung

Durch Selen-Dehydrierung des Des-N-methylhypognavinols wurde eine schwach basische aromatische Fraktion in sehr kleiner Menge erhalten, deren UV-Spektrum demjenigen des 3-Azaphenanthrens ähnlich ist. Durch Oxydation des Tribenzoyl-des-N-äthylhypognavinols und darauffolgende Verseifung wurde ein 6-gliedriges Laktam  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{N}$  erhalten. Anhydrohydroxy-des-N-methylhypognavinol  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{N}$ , ein Carbinolaminäther, wurde durch Oxydation des Des-N-methylhypognavinol mit Kaliumferricyanid erhalten. Für die Konstitution des Hypognavinols wurde die Formel (VIII) oder (IX) und für Hypognavin die Formel (X) oder (XI) aufgestellt.

(Eingegangen am 10. Juli, 1958)

UDC 577.158.34:576.851.48:547.466.6

### 13. Komei Miyaki, Makoto Hayashi, Tadao Wada, and Yaeko Matsumoto: $\beta$ -Hydroxyglutamic Acid Decarboxylase in *Escherichia coli*.

(Institute of Food Microbiology,\* University of Chiba)

The enzymatic decarboxylation of  $\beta$ -hydroxyglutamic acid by various strains of *Escherichia coli* has already been reported by Umbreit and Heneage.<sup>1)</sup> They seemed to conclude that  $\beta$ -hydroxyglutamic acid decarboxylase is different from glutamic acid decarboxylase, which is always found to be present in the bacteria, for the following reasons. First, the two enzymes are found in various ratios distributed in the strains of *E. coli*. Second, the formation ratio of two enzymes seems to be associated with the condition of bacterial growth. The third reason lies in the peculiar effect of pH upon the activity of  $\beta$ -hydroxyglutamic acid decarboxylase.

The work described in this paper was undertaken with the object of obtaining a more precise information on the distinction between the  $\beta$ -hydroxyglutamic and glutamic acid decarboxylases in *E. coli*.

### Materials and Methods

**Enzyme Preparation and Measurement of Activity**—The source of enzyme was an acetone-dried powder of *E. coli*, strain No. 1 (isolated by Dr. D. Mizuno of the National Institute of Health, Tokyo), cultured in a synthetic medium containing 0.01M sodium glutamate, 1% glucose, 0.05M phosphate, 0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , and 0.001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , at 30° for 16~18 hrs. Conventional manometric techniques were used to measure the decarboxylase activity at 30°. The reaction mixture in each vessel was 2.0 cc. and the  $Q_{\text{CO}_2}$  values represented  $\text{CO}_2$   $\mu\text{L.}/\text{mg. Kjeldahl-N/hr.}$  in all experiments.

**Materials**— $\beta$ -Hydroxy-DL-glutamic acid used in these studies was synthesized by the method of Izumi.<sup>2)</sup> L-Glutamic acid was the commercial product of Takara Pharmaceutical Co. 4-Amino-3-hydroxybutyric acid was synthesized by Dr. N. Ikeda of the Faculty of Pharmacy, University of Chiba.

\* Okubo, Narashino, Chiba-ken (宮木高明, 林 誠, 和田忠男, 松本八重子).

1) W. W. Umbreit, P. Heneage: J. Biol. Chem., **201**, 15(1953).

2) Y. Izumi, S. Konishi: Nippon Kagaku Zasshi, **74**, 960(1953).