

Untersuchungen an Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen, XII<sup>1)</sup>

## Michigazon, ein neues Phenoxazon aus *Streptomyces michiganensis* — Konstitutionsermittlung und Synthese

Hans Achenbach\* und Jürgen Wörth

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.,  
Albertstr. 21, D-7800 Freiburg

Eingegangen am 12. April 1976

---

Spektroskopische Untersuchungen und chemischer Abbau führten für Michigazon zur Konstitution 7. 7 und einige weitere bisher noch nicht beschriebene Phenoxazone wurden durch *Kehrman*-Synthese dargestellt.

Investigations on Metabolites of Microorganisms, XII<sup>1)</sup>

Michigazone, a New Phenoxazone Pigment from *Streptomyces michiganensis* —  
Structure Determination and Synthesis

By spectroscopic methods and chemical degradation michigazone has been shown to possess structure 7. 7 and some further related phenoxazones have been synthesized by the *Kehrman*-method.

---

*Streptomyces michiganensis*\*<sup>1)</sup> produziert in flüssigem Nährmedium einen Farbstoffkomplex mit antibiotischer Wirkung. Die Trennung dieses Pigmentgemisches führte zur Isolierung einer violetten und einer roten Komponente<sup>2)</sup>.

Das violette Pigment ist Träger der antibiotischen Wirkung und konnte als Mitomycin A<sup>3)</sup> identifiziert werden<sup>2)</sup>.

Bei dem roten Pigment handelt es sich um ein neues Phenoxazon, das wir Michigazon genannt haben; es ist antibiotisch nicht aktiv<sup>2)</sup>. Im folgenden wird über seine Konstitutionsermittlung und Synthese berichtet.

Michigazon (7) — Schmp. 211–213°C; C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub> — besitzt IR- und Elektronenspektren ( $\lambda_{\max}$  226, 261, 384 und 460 nm), die mit dem Grundgerüst eines Phenoxazons 1 gut korrelierbar sind<sup>4, 2)</sup>. Bei der katalytischen Hydrierung geht Michigazon unter Aufnahme von 1 Moläquiv. Wasserstoff in ein farbloses Phenoxazin 2 über, das beim Stehenlassen an der Luft schnell wieder rückerodiert wird.

---

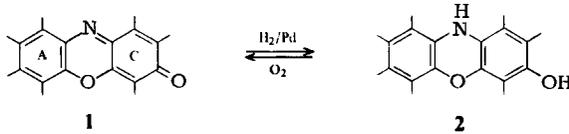
\*<sup>1)</sup> Tü 1074 aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie I an der Universität Tübingen.

<sup>1)</sup> XI. Mittel.: H. Achenbach, W. Kohl und H. Reichenbach, Chem. Ber. 109, 2490 (1976).

<sup>2)</sup> G. Wolf, J. Wörth und H. Achenbach, Arch. Microbiol. 106, 245 (1975).

<sup>3)</sup> J. S. Webb, D. B. Cosulich, J. H. Mowat, J. B. Patrick, R. W. Broschard, W. E. Meyer, R. P. Williams, C. F. Wolf, W. Fulmor und C. Pidacks, J. Amer. Chem. Soc. 84, 3185 (1962).

<sup>4)</sup> H. Musso und H.-G. Matthies, Chem. Ber. 90, 1814 (1957).



Mit einem hochkonjugierten Ringsystem wie 1 ist das Massenspektrum von 7 zu vereinbaren: Man findet ein intensives Molekülion (=Base Peak) mit nur geringer Fragmentierungstendenz; bevorzugt werden 15 ME ( $\cdot\text{CH}_3$ ) und – in metastabilem Übergang – 18 ME ( $\text{H}_2\text{O}$ ) abgespalten. Durch Deuteriomethanol läßt sich massenspektrometrisch ein austauschbares Proton feststellen. Die überraschende Beobachtung, daß dieses austauschbare Proton an der erwähnten sehr ausgeprägten Wasser-Eliminierung aus dem Molekülion nicht beteiligt ist, hat uns zu einer eingehenderen Untersuchung der MS-Fragmentierung von Phenoxazonen veranlaßt, über die später ausführlich berichtet werden soll.

Das austauschbare Proton muß in einer Hydroxyl-Funktion vorliegen, denn 7 läßt sich zu einem Monoacetyl-Derivat ( $\nu_{\text{C}=\text{O}}$   $1745\text{ cm}^{-1}$ ) acetylieren.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 7 findet man ein Singulett (2H) bei  $\delta$  4.58, das im Zuge der Acetylierung nach  $\delta$  5.18 verschoben wird: Damit ist die Gruppierung  $\cong\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$  nachgewiesen.

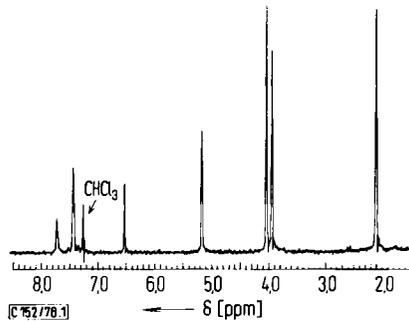


Abb.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (100 MHz) von Acetyl-7

Die Resonanzen des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von Acetyl-7 (Abb.) sind folgendermaßen zuzuordnen:

2.13 (3H, s)	$\text{COCH}_3$	5.18 (2H, s)	$\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$
3.94 (3H, s)	$\text{OCH}_3$	6.54 (1H, s)	} Ringprotonen
4.04 (3H, s)	$\text{OCH}_3$	7.34 bis 7.74 (3H)	

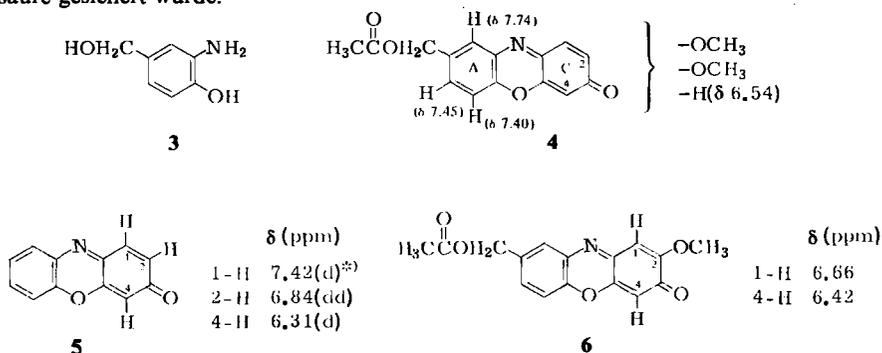
Das Phenoxazon-Grundgerüst 1 trägt im Michigazon also eine Hydroxymethyl- und zwei Methoxyl-Gruppen. Zur Klärung der Stellung dieser Substituenten haben wir 7 in Mikroansätzen alkalisch abgebaut.

Im Prinzip entsteht bei der alkalischen Spaltung aus Ring A von 1 ein *o*-Aminophenol, während der chinoide Ring C als Hydroxy-*p*-benzochinon anfallen sollte<sup>5,6)</sup>. Das Hy-

<sup>5)</sup> A. Butenandt, J. Keck und G. Neubert, Liebigs Ann. Chem. 602, 61 (1957).

<sup>6)</sup> J. Gripenberg, Acta Chem. Scand. 13, 1305 (1959).

droxybenzochinon kann sich einem Nachweis aber offensichtlich leicht entziehen: So haben wir als Modellsubstanz 2-Acetoxyphenoxazon<sup>7)</sup> unter verschiedenen Bedingungen alkalisch abgebaut und konnten dabei stets nur *o*-Aminophenol fassen. Auch die entsprechende Spaltung von Michigazon führte ausschließlich zur Isolierung des *o*-Aminophenols **3**, dessen Konstitution durch Synthese aus 4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure gesichert wurde.



\*<sup>1</sup> Durch Spin-tickling am 2-H ermittelt.

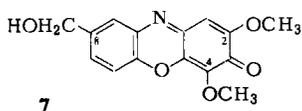
Man kommt damit für Acetyl-7 zur Partialstruktur **4** und kann jetzt aufgrund der Kopplungsverhältnisse (Abb.) eine eindeutige Zuordnung der aromatischen Protonen im Ring A treffen.

Die Klärung des Substitutionsmusters im Ring C stützt sich ebenfalls auf <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Studien: Um den Einfluß der Substituenten auf die Resonanzen der Protonen im Ring C kennenzulernen, haben wir die Spektren von **5** und **6**, das zu diesem Zwecke als Modellsubstanz synthetisiert worden ist, aufgenommen und die angegebenen Signallagen gefunden.

Durch Einführung einer Methoxyl-Gruppe im Ring C (**5** → **6**) wird das *ortho*-ständige 1-H um 0,7 ppm nach höherem Feld verschoben. Diese Situation ist offensichtlich für chinoiden Systeme charakteristisch (Tabelle) und läßt den Schluß zu, daß **4**, das im Ring C zwei Methoxyl-Gruppen trägt, entweder 1,2- oder 2,4-substituiert sein muß: Denn bei der weiteren noch möglichen 1,4-Anordnung der beiden Methoxyl-Gruppen wäre das Resonanzsignal für 2-H um ca. 6,0 ppm zu erwarten. Die beobachtete Signallage des Singulets bei δ 6,54 in **4** schließt aber diese Variante aus und verlangt somit eine Methoxyl-Substitution in Position 2.

Die Tabelle zeigt, daß in chinoiden Systemen auch alle Ringprotonen in größerer Entfernung von Methoxyl-Gruppen erwartungsgemäß eine Hochfeldverschiebung (ca. 0,1 ppm) erfahren. Dieser Effekt ist für 4-H in **6** offenbar von dem Einfluß der veresterten Hydroxymethylgruppe an C-8 überlagert. Durch einen weiteren Methoxyl-Substituenten in den Positionen 1 oder 4 von **6** gelangt man zu **4**; dabei sollte sich das Signal des verbleibenden Protons (4-H oder 1-H) geringfügig nach höherem Feld, keinesfalls aber nach tieferem Feld verändern. Diese Forderung wird nur von 1-H erfüllt, dessen Resonanz in **6** bei δ 6,66 und in **4** bei δ 6,54 erscheint. Damit kommt man für Michigazon zur Konstitution **7**.

<sup>7)</sup> E. Diepolder, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **35**, 2816 (1902).



Tab. <sup>1</sup>H-NMR-Signale ( $\delta$ -Werte in ppm) in methoxy-substituierten *p*-Benzochinonen (in [D<sub>6</sub>]DMSO)

	2-H	3-H	5-H	6-H	OCH <sub>3</sub>
			6.83 (4H)		
		6.1	6.76 (2H)		3.77
		5.97		5.97	3.77
			5.97 (2H)		3.77
				5.92	3.77 3.83 3.95

Für die bekannten Phenoxazone aus Mikroorganismen, zu denen auch die Actinomycine<sup>8)</sup> gehören, ist eine Amino-Funktion an C-2 typisch. Außerdem sind sie im allgemeinen C-substituiert, und zwar bevorzugt in den Positionen 1 und 9<sup>8,9)</sup>. Aus biogenetischer Sicht diskutiert man aufgrund dieser Strukturcharakteristika eine Bildung des Phenoxazon-Ringsystems durch oxidative Kopplung von zwei gleichen *o*-Aminophenolen aus dem Tryptophan-Stoffwechsel<sup>10-12)</sup>.

In dieses Schema läßt sich Michigazon nicht ohne weiteres einordnen: Ungewöhnlich sind an 7 die 2-Methoxy- und die 8-C-Substitution.

<sup>8)</sup> H. Brockmann, Fortschr. Chem. Org. Naturst. **18**, 1 (1960).

<sup>9)</sup> N. N. Gerber in Handbook of Microbiology, Bd. III, S. 333, Herausgeber: A. J. Laskin und H. A. Lechevalier, Chemical Rubber Company Press, Cleveland, Ohio 1973.

<sup>10)</sup> A. Butenandt, E. Biekert und B. Linzen, Z. Physiol. Chem. **305**, 284 (1956); A. Butenandt, Angew. Chem. **69**, 16 (1957).

<sup>11)</sup> A. Sivak, M. L. Meloni, F. Nobili und E. Katz, Biochim. Biophys. Acta **57**, 283 (1962).

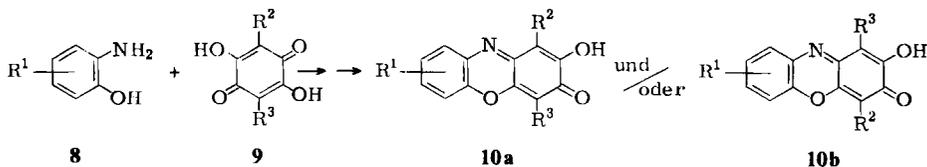
<sup>12)</sup> H. R. Schütte in Biosynthese der Alkaloide, S. 665 ff., VEB Deutscher Verlag d. Wissenschaften, Berlin 1969.

## Synthesen

Im Zusammenhang mit unseren Strukturuntersuchungen haben wir **7** und einige andere bisher noch nicht beschriebene 8-substituierte Phenoxazone synthetisiert.

Für die Darstellung von Phenoxazonen sind verschiedene Verfahren bekannt<sup>13-17</sup>). Für unser Problem schien die *Kehrmann-Reaktion*<sup>18)</sup> mit 2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinonen besonders vorteilhaft, da sie zu 2-Hydroxyphenoxazonen führt, relativ gute Ausbeuten liefert und die Ausgangsverbindungen leicht zugänglich sind.

Bei diesem Verfahren wird in Umkehrung der Alkali-Spaltung ein *o*-Aminophenol (**8**) mit einem 2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinon (**9**) zum 2-Hydroxyphenoxazon (**10**) unter sauren Bedingungen kondensiert. Der Mechanismus dieser Reaktion wurde genauer untersucht<sup>16,19)</sup>.



Im Prinzip können bei der Umsetzung von **8** mit unsymmetrisch substituierten 2,5-Dihydroxychinonen **9** ( $R^2 \neq R^3$ ) die isomeren Phenoxazone **10a** und **10b** entstehen. Ob und in welchem Mengenverhältnis die beiden Isomeren gebildet werden, ist offensichtlich von den sterischen und elektronischen Einflüssen der Substituenten  $R^2$  und  $R^3$  abhängig<sup>8,16)</sup>.

Die Reaktion läuft auch mit 2,5-Dimethoxychinonen – also ohne freie Hydroxyl-Gruppen – ab<sup>16,20)</sup>. Bei gleichzeitigem Vorliegen beider Strukturelemente im chinoiden Reaktionspartner (z. B. 2,5-Dihydroxy-3,6-dimethoxy-1,4-benzochinon (**11**)) könnte im Prinzip sowohl ein hydroxyl-substituiertes C-Atom als auch ein methoxyl-substituiertes Ring-C-Atom primärer Angriffspunkt für die *Kehrmann*-Kondensation sein. Entsprechende experimentelle Untersuchungen sind nicht bekannt. Wir fanden ausschließlich dasjenige Reaktionsprodukt, das durch Angriff an einem hydroxyl-substituierten C-Atom zustande kommt. Die *Kehrmann*-Reaktion wird im allgemeinen in Alkohol oder Wasser durchgeführt<sup>5,20)</sup>.

Bei Verwendung von Alkohol als Lösungsmittel können allerdings Derivatisierungsreaktionen an funktionellen Gruppen eintreten: So erhielten wir bei der Umsetzung des *o*-Aminophenols **3** mit 2,5-Dihydroxy-3,6-dimethoxy-1,4-benzochinon (**11**) nicht das erwartete Phenoxazon **12**, sondern dessen Ethylether **13**.

Über das 2-Chlorphenoxazon **14** kann aus **13** die freie Hydroxyl-Gruppe entfernt werden<sup>8,13)</sup>. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des dabei anfallenden Phenoxazons **15** erscheint das Signal des Protons 2-H bei  $\delta$  6.05 und bestätigt damit nachträglich unsere Argumentation im Zusammenhang mit <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischen Überlegungen an der Partialstruktur **4** (s. o.) des Michigazons.

<sup>13)</sup> W. Schäfer, Prog. Org. Chem. 6, 135 (1964).

<sup>14)</sup> H. Brockmann und F. Seela, Chem. Ber. 104, 2751 (1971), und vorangegangene Mitteilungen in dieser Reihe.

<sup>15)</sup> V. Stuzka, M. Martinek und L. Čáp, Monatsh. Chem. 100, 1670 (1969).

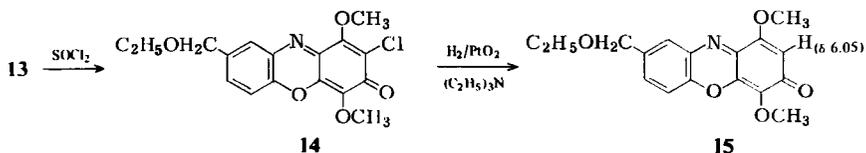
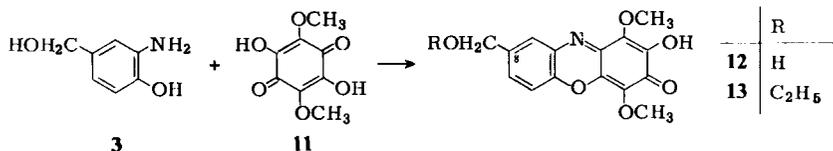
<sup>16)</sup> W. Schäfer und H. Schlude, Tetrahedron 27, 4721 (1971).

<sup>17)</sup> E. Ružička, V. Bekárek und P. Heinz, Collect. Czech. Chem. Commun. 37, 1905 (1972).

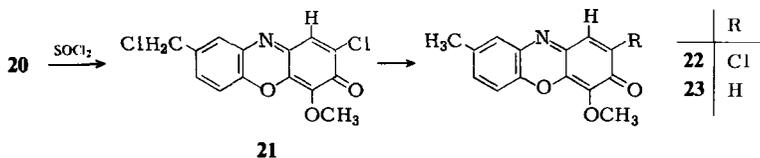
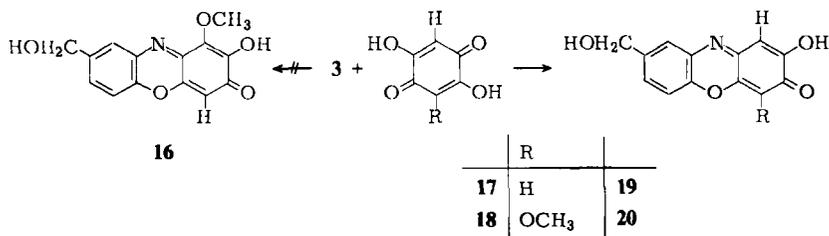
<sup>18)</sup> F. Kehrmann, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 28, 353 (1895).

<sup>19)</sup> H. Musso, D. Döpp und J. Kuhls, Chem. Ber. 98, 3937 (1965).

<sup>20)</sup> W. Schäfer und H. Schlude, Tetrahedron Lett. 1968, 2161.



Bei Reaktion von 3 mit den 2,5-Dihydroxychinonen 17 und 18 in Wasser fallen als Reaktionsprodukte die Phenoxazone 19 bzw. 20 an.



Die Bildung des bei der Umsetzung von 3 mit 18 prinzipiell auch möglichen isomeren Phenoxazons 16 wurde nicht beobachtet.

Der Konstitutionsbeweis für 20 erfolgte <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch an 23, das bei der Dehalogenierung von 21 entsteht. Dabei kann als Zwischenprodukt auch 22 isoliert werden. Wie das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 23 zeigt, müssen die Protonen des chinoiden Ringes *ortho*-ständig sein: AB-System (*J* = 10 Hz).

Durch Methylierung von 20 mit Diazomethan erhält man 7, das mit Michigazon aus *Strept. michiganensis* identisch ist.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für Sachbeihilfen. Herrn Prof. Dr. H. Zähler und Frau Dr. G. Wolf, Tübingen, danken wir für die früher<sup>2)</sup> durchgeführten Fermentationen.

## Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Kofler-Heiztischmikroskop (Fa. Reichert); unkorrigiert.

IR-Spektren (in KBr): Spektralphotometer Perkin-Elmer 457; UV-Spektren (in MeOH p.a.): Spektralphotometer DMR 21 (Fa. Zeiss). <sup>1</sup>H-NMR-Spektren: Geräte vom Typ HA 100 und HR 220 (Fa. Varian) sowie WH 90 (Fa. Bruker-Physik) in CDCl<sub>3</sub>-Lösung, soweit nicht anders vermerkt. Innerer Standard Tetramethylsilan.

Massenspektren: CH<sub>4</sub>-Massenspektrometer (Fa. Varian-MAT); Ionenquelle TO 4; Ionisierungsenergie 70 eV; Einlaß der Substanzen über die Ofenschleuse. Angegeben sind die Daten im allgemeinen für  $m/e > 100$  und für relat. Intensitäten  $> 10\%$ . Die hochaufgelösten Daten bestimmten wir mit einem doppeltfokussierenden Massenspektrometer vom Typ SM1B (Fa. Varian-MAT) nach der „Peak-matching“-Methode bei einer Auflösung von  $M/\Delta M = 14000$  (10% Tal).

Als Gaschromatograph stand ein Gerät der Baureihe 5750 (Fa. Hewlett & Packard) zur Verfügung; Detektor: WLD. Wir benutzten 2-m-Säulen aus Glas (1/8") mit 2% SE 30 (soweit nicht anders vermerkt) auf Chromosorb W (AW-DMCS 60/80 mesh). Trägergas He (ca. 100 ml/min). Temperaturen: Einspritzblock 230°C, Detektor 300°C.

Zur Dünnschichtchromatographie verwendeten wir – soweit nicht anders vermerkt – Platten beschichtet mit Kieselgel H (Fa. Merck); Schichtdicke: 0.25 mm. Für die präp. DS-Chromatographie wurden die Platten vor der Aktivierung nacheinander in MeOH und CHCl<sub>3</sub>/MeOH (90/10, v/v) gewaschen.

*Michigazon (7) aus Strept. michiganensis*: Aus den Trenn- und Isolierarbeiten<sup>2)</sup> an Fermentationsansätzen von *Streptomyces michiganensis* standen insgesamt ca. 30 mg **7** zur Verfügung. Michigazon kristallisiert aus Methanol in roten Nadeln vom Schmp. 211–213°C.

MS:  $m/e$  (%) 287 (100, M<sup>+</sup>), 286 (18), 272 (41), 270 (18), 269 (72), 258 (27), 257 (16), 256 (11), 244 (29), 241 (21), 240 (11), 228 (19), 211 (12), 173 (19). Durch H/D-Austausch mit CH<sub>3</sub>OD wird massenspektrometrisch ein austauschbares Proton nachgewiesen. – UV:  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 226 (4.46), 261 (4.14), 384 (4.30), 460 nm (3.81). – IR: 3400 (breit), 1635, 1580, 1310, 1232, 1105 cm<sup>-1</sup>. – <sup>1</sup>H-NMR (100 MHz, in [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  7.67 ppm (1H, s), 7.51 (1H, s), 7.50 (1H, s), 6.72 (1H, s), 4.58 (2H, s), 3.88 (6H, s), 3.84–3.50 (breites Signal, verschwindet nach H/D-Austausch).

*Hydrierung von 7*: 1 mg **7** in 3 ml Methanol wird nach Zusatz von Pd (5% auf Kohle) hydriert (760 Torr H<sub>2</sub>/Raumtemp./10 min). Die Aufarbeitung des entfärbten Ansatzes erfolgte unter Stickstoff: Nach Abfiltrieren des Katalysators wird das Filtrat i. Vak. eingengt und der Rückstand massenspektrometrisch untersucht. Das Molekülion im MS erscheint bei  $m/e$  289.

Bei Luftzutritt tritt sofortige Rotfärbung des Hydrierungsproduktes infolge Rückoxidation ein.

*Acetyl-7*: 10 mg **7** werden in 2 ml Acetanhydrid/Pyridin (1:1) gelöst. Nach Stehenlassen über Nacht bei Raumtemp. wird i. Vak. zur Trockne eingengt und DS-chromatographisch gereinigt (Chloroform/Methanol 99/1; R<sub>F</sub> 0.3); Ausb. ca. 10 mg. Nach Gaschromatographie kondensiert man rote Nadeln vom Schmp. 191–192°C.

MS:  $m/e$  (%) 329 (100, M<sup>+</sup>), 328 (12), 314 (25), 312 (15), 311 (60), 300 (17), 286 (11), 283 (10), 270 (13), 43 (13). – Hochaufgelöste MS-Daten:  $m/e$  329.0906, ber. für C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub> (M<sup>+</sup>) 329.0899. – UV: qualitativ wie **7**. – IR: 1745 cm<sup>-1</sup> (C=O). – <sup>1</sup>H-NMR (100 MHz):  $\delta$  7.74 ppm (1H, s), 7.45 (1H, d,  $J = 8$  Hz), 7.40 (1H, d,  $J = 8$  Hz), 6.54 (1H, s), 5.18 (2H, s), 4.04 (3H, s), 3.94 (3H, s), 2.13 (3H, s).

*2-Acetoxyphenoxazon*: Zunächst wurde 2-Hydroxyphenoxazon in Anlehnung an Lit.<sup>5)</sup> dargestellt. Dazu haben wir 220 mg *o*-Aminophenol-hydrochlorid und 100 mg 2,5-Dihydroxy-

1,4-benzochinon (17)<sup>21)</sup> in 10 ml Wasser gelöst und unter Zusatz von 2 Tropfen konz. Salzsäure 15 min zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen trennt man den Niederschlag durch Zentrifugieren ab, wäscht ihn zweimal mit Wasser, trocknet und wäscht dann mehrmals mit Chloroform. Beim erneuten Zentrifugieren und Trocknen verbleiben 30 mg 2-Hydroxyphenoxazon, geringfügig verunreinigt mit Triphendioxazin.

MS:  $m/e$  (%) 213 (100,  $M^+$ ), 185 (60), 144 (28), 78 (15), 77 (11), 69 (10), 51 (15), 50 (16). — <sup>1</sup>H-NMR (60 MHz, in [ $D_6$ ]DMSO):  $\delta$  7.3–8.0 ppm (4H, m), 6.7 (1H, s), 6.4 (1H, s).

30 mg rohes 2-Hydroxyphenoxazon wurden in 3 ml Acetanhydrid/Pyridin (1:1) 30 min auf 60°C erhitzt und anschließend i. Vak. zur Trockne eingeengt. Aus dem Chloroformextrakt des Rückstandes erhielten wir DS-chromatographisch (Chloroform/Methanol 95/5;  $R_F$  0.8) 20 mg orangefarbenes 2-Acetoxyphenoxazon, das massenspektrometrisch rein war.

MS:  $m/e$  (%) 255 (7,  $M^+$ ), 214 (15), 213 (100), 185 (50), 51 (10), 50 (18), 43 (34).

*Abbau von 2-Acetoxyphenoxazon:* In Anlehnung an Lit.<sup>5,6)</sup> werden 5 mg 2-Acetoxyphenoxazon und 2 ml 5 N NaOH in einem Spitzkölbchen mit Rückflußkühler in ein 110°C warmes Ölbad eingebracht und unter Rühren 6 min gekocht. Man beobachtet zunächst Farbwechsel von rot nach rotviolett; die Lösung wird schließlich homogen und fast farblos. Nach dem Abkühlen und Verdünnen mit Wasser wird mit 5 N HCl neutralisiert und i. Vak. zur Trockne eingeengt. Man extrahiert zweimal mit wenig Methanol. Der Methanolextrakt wird DS-chromatographisch getrennt (Chloroform/Methanol 9/1 — zweimal entwickelt) in zwei Zonen mit  $R_F$  0.5 (Fluoreszenzlöschung) und  $R_F$  0.7 (gelb-braune Farbe). Elution dieser Zonen mit Methanol ergibt bei  $R_F$  0.5: 0.8 mg; MS:  $m/e$  109 ( $M^+$ ); identisch (MS, DC) mit *o*-Aminophenol.  $R_F$  0.7: ca. 0.5 mg; MS:  $m/e$  212 ( $M^+$ ); identisch (MS, DC) mit 2-Aminophenoxazon, das nach Lit.<sup>22)</sup> hergestellt wurde.

*Abbau von Michigazon (7):* 5 mg 7 wurden mit 2 ml 5 N NaOH in gleicher Weise umgesetzt und aufgearbeitet. Bei der DS-chromatographischen Trennung fiel nur eine wesentliche Komponente (Fluoreszenzlöschung) an mit  $R_F$  0.12; MS:  $m/e$  139 ( $M^+$ ); identisch (MS, DC) mit 3-Amino-4-hydroxybenzylalkohol (3) (s. u.).

*3-Amino-4-hydroxybenzylalkohol (3):* 36.6 g 4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure (0.2 mol) werden unter Zugabe von 19.2 g Methanol und 3 ml konz. Schwefelsäure in 80 ml Tetrachlorkohlenstoff verestert (10 h/Rückfluß). Nach Aufarbeitung erhält man aus Methanol/Wasser 27.6 g (70%) Methylester in hellgelben Kristallen vom Schmp. 71–73°C (Lit.<sup>23)</sup> 74°C). 25 g des Methylesters werden in Methanol an 1.2 g Pd (5% auf Kohle) hydriert. Nach 12 h ist die ber. Menge  $H_2$  aufgenommen. Aufarbeiten und Kristallisieren aus Methanol/Chloroform (1:3) ergibt 20 g (95%) 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure-methylester in farblosen Kristallen vom Schmp. 113°C (Lit.<sup>24)</sup> 110–111°C (aus Chloroform) und 142°C (aus Benzol)).

Zu einer Lösung von 1.4 g Lithiumaluminiumhydrid in 40 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran tropft man eine Lösung von 6 g 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure-methylester in 40 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran bei +5 bis 10°C innerhalb 1 h. Danach wird der Ansatz 1 h bei 40°C gehalten, mit 100 ml Tetrahydrofuran versetzt und überschüssiges Reduktionsmittel durch Wasserzugabe zerstört. Man neutralisiert mit verd. Salzsäure und rührt noch 30 min. Nach Filtern wird zur Trockne eingeengt, mit Methanol aufgenommen, nach Behandlung mit Aktivkohle erneut eingeengt und aus Chloroform/Methanol (9:1) kristallisiert: 1.8 g (35%) farblose Kristalle vom Schmp. 143–145°C (Lit.<sup>25)</sup> 112–114°C).

$C_7H_9NO_2$  (139.1) Ber. C 60.41 H 6.52 N 10.07

Gef. C 60.33 H 6.67 N 9.81 Mol.-Masse 139 (MS)

<sup>21)</sup> R. G. Jones und H. A. Shonle, J. Amer. Chem. Soc. 67, 1034 (1945).

<sup>22)</sup> O. Fischer und O. Jonas, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 27, 2782 (1894).

<sup>23)</sup> A. Hantzsch, Liebigs Ann. Chem. 492, 65 (1932).

<sup>24)</sup> A. Einhorn und B. Pfyf, Liebigs Ann. Chem. 311, 34 (1900).

<sup>25)</sup> Beilstein, Hauptwerk, Bd. 13, S. 800.

Vergleich des durch Abbau von **7** erhaltenen Phenols (Mol.-Masse 139) mit 3-Amino-4-hydroxybenzylalkohol: MS und DC-Verhalten beider Verbindungen sind identisch. Beide Verbindungen liefern unter den üblichen Acetylierungsbedingungen einheitliche Tetraacetyl-Derivate, die gaschromatographisch und massenspektrometrisch identisch sind.

8-Acetoxyethyl-2-methoxyphenoxazon (**6**)

a) 2-Hydroxy-8-(hydroxymethyl)phenoxazon: 250 mg 2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinon (**17**) und 300 mg **3** werden unter Zusatz von 3 Tropfen konz. Salzsäure in 4 ml Wasser 15 min zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen saugt man den schwarzbraunen Niederschlag ab und wäscht mit Wasser. Dieses Rohprodukt (300 mg) ist DS-chromatographisch (Chloroform/Methanol 8/2;  $R_F$  0.15) nur geringfügig verunreinigt und kann ohne weitere Reinigung zur Synthese eingesetzt werden (s. u.).

Hochaufgelöste MS-Daten:  $m/e$  243.0526, ber. für  $C_{13}H_9NO_4$  ( $M^+$ ) 243.0532.

2-Acetoxy-8-(acetoxyethyl)phenoxazon: Zur Charakterisierung werden ca. 20 mg des erhaltenen Rohproduktes in üblicher Weise acetyliert und nach Aufarbeitung über DC-Platten getrennt (Chloroform/Methanol 95/5). Man erhält mit  $R_F$  0.2 ein Monoacetat ( $M^+$  285) und mit  $R_F$  0.6 als Hauptprodukt das Diacetat ( $M^+$  327). Nach abschließender Reinigung über Merckogel OR-PVA-500 (mit Chloroform/Methanol 3/7) fielen ca. 15 mg Diacetat amorph mit Schmp. 196–199°C an. — IR: 1780 (C=O), 1730 (C=O), 1630 und 1580  $cm^{-1}$ .

$C_{17}H_{13}NO_6$  (327.1) Ber. C 62.40 H 4.00 N 4.28

Gef. C 61.86 H 4.14 N 4.00 Mol.-Masse 327 (MS)

b) 8-Hydroxymethyl-2-methoxyphenoxazon: 40 mg 2-Hydroxy-8-(hydroxymethyl)phenoxazon werden in 2–3 ml Methanol mit einem kleinen Überschuß etherischer Diazomethan-Lösung versetzt. 10 min nach beendeter Zugabe wird aufgearbeitet und DS-chromatographisch getrennt (Chloroform/Methanol 8/2). Als Hauptprodukt isoliert man aus der zitronengelben Zone mit  $R_F$  0.75 20 mg (45%) 8-Hydroxymethyl-2-methoxyphenoxazon. — Hochaufgelöste MS-Daten: 257.0684, ber. für  $C_{14}H_{11}NO_4$  ( $M^+$ ) 257.0688.

c) 8-Acetoxyethyl-2-methoxyphenoxazon (**6**): 20 mg 8-Hydroxymethyl-2-methoxyphenoxazon werden in üblicher Weise acetyliert, aufgearbeitet und DS-chromatographisch getrennt (Chloroform/Methanol 95/5). Als Hauptprodukt isoliert man aus der zitronengelben Zone mit  $R_F$  0.7 ca. 11 mg **6**, das nach GC-Passage kristallin kondensiert wird mit Schmp. 240–241°C.

**6** und auch 8-Hydroxymethyl-2-methoxyphenoxazon sind als Festsubstanzen stabil, zersetzen sich aber in Lösung.

MS:  $m/e$  (%) 299 (36,  $M^+$ ), 271 (12), 270 (55), 240 (11), 228 (19), 212 (11), 211 (28), 210 (15), 169 (12), 140 (10), 105 (12). — Hochaufgelöste MS-Daten: 299.0801, ber. für  $C_{16}H_{13}NO_5$  ( $M^+$ ) 299.0794. — UV:  $\lambda_{max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 223 (4.51), 250 sh (4.39), 384 (4.32), 440 sh nm (4.02). — IR: 1730, 1620, 1580, 1245, 1175, 870, 815  $cm^{-1}$ . —  $^1H$ -NMR (100 MHz):  $\delta$  7.78 ppm (1H, d,  $J$  = 2 Hz), 7.52 (1H, dd,  $J$  = 8 Hz und 2 Hz), 7.37 (1H, d,  $J$  = 8 Hz), 6.66 (1H, s), 6.42 (1H, s), 5.20 (2H, s) 3.98 (3H, s), 2.14 (3H, s).

2,3,5-Trimethoxy-1,4-benzochinon: 100 mg 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon (**18**)<sup>26)</sup> werden in Methanol wie üblich mit einem kleinen Überschuß etherischer Diazomethan-Lösung umgesetzt (s. o.). Nach Einengen chromatographiert man an einer Kieselgelsäule (Kieselgel 40; Fa. Merck) mit Chloroform/Methanol (95/5). 2,3,5-Trimethoxy-1,4-benzochinon wird als orange-rote Bande zuerst eluiert und fällt aus Dimethylsulfoxid in roten Nadeln vom Schmp. 156–157°C (Lit.<sup>27)</sup> 160–161°C) an; Ausb. 80 mg (75%).

<sup>26)</sup> G. Aulin und H. Erdtman, Sven. Kem. Tidskr. **49**, 208 (1937) [C. A. **32**, 4552 (1938)].

<sup>27)</sup> H. O. Huisman, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **69**, 1133 (1950).

**2,5-Dihydroxy-3,6-dimethoxy-1,4-benzochinon (11)**

a) **Tetramethoxy-1,4-benzochinon**: 3.4 g Tetrahydroxy-1,4-benzochinon<sup>28)</sup> werden in Methanol mit etherischer Diazomethanlösung methyliert. Nach Umkristallisation aus Methanol erhält man 3.2 g (70%) orangefarbene Nadeln vom Schmp. 135–137°C (Lit.<sup>29)</sup> 145°C).

b) 1.0 g Tetramethoxy-1,4-benzochinon wird nach Lit.<sup>29)</sup> zu **11** umgesetzt. Aus Ethanol 500 mg (57%) Kristalle vom Schmp. 234–236°C (Lit.<sup>29)</sup> 236°C).

**1,4-Dimethoxy-8-ethoxymethyl-2-hydroxyphenoxazon (13)**: 150 mg **11** und 110 mg **3** werden unter Zusatz von 4 Tropfen konz. Salzsäure in 5 ml Ethanol über Nacht unter Rückfluß gekocht. Nach Neutralisieren mit wäßr. Natriumhydrogencarbonatlösung engt man i. Vak. zur Trockne ein und extrahiert das Produkt mit Methanol. Durch Reinigung über 100 g Kieselgel (Kieselgel 40, Fa. Merck) mit Chloroform/Methanol (9/1) erhält man 90 mg fast reines **13**, das zu den weiteren Umsetzungen (s. u.) eingesetzt wurde. Für die spektroskopischen Untersuchungen wurde DS-chromatographisch (Chloroform/Methanol 8/2;  $R_F$  0.5) nochmals gereinigt.

Hochaufgelöste MS-Daten: 331.1057, ber. für  $C_{17}H_{17}NO_6$  ( $M^+$ ) 331.1056.

**8-Ethoxymethyl-1,2,4-trimethoxyphenoxazon**: 30 mg **13** werden in 2 ml Methanol in der üblichen Weise (s. o.) mit einem kleinen Überschuß etherischer Diazomethan-Lösung versetzt und aufgearbeitet. DS-chromatographische Trennung (Chloroform/Methanol 95/5;  $R_F$  0.75) und abschließende Reinigung über 15 g Sephadex LH-20 mit Chloroform/Methanol (3:7) ergibt 6 mg Produkt, das am Ausgang des Gaschromatographen in roten Kristallen vom Schmp. 128–129°C kondensiert.

MS:  $m/e$  (%) 345 (100,  $M^+$ ), 344 (10), 331 (10), 330 (35), 327 (30), 315 (11), 314 (10), 312 (31), 302 (10), 300 (20). – UV:  $\lambda_{max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 226 (4.36), 255 sh (4.27), 385 (4.30), 480 nm (3.65). – IR: 1620, 1585, 1285, 1080, 1050, 825  $cm^{-1}$ .

$C_{18}H_{19}NO_6$  (345.1) Ber. C 62.60 H 5.55 N 4.06

Gef. C 61.99 H 5.61 N 4.03 Mol.-Masse 345 (MS)

**2-Chlor-1,4-dimethoxy-8-(ethoxymethyl)phenoxazon (14)**: 20 mg **13** werden in Anlehnung an Lit.<sup>30)</sup> zusammen mit 30 mg Chloranil und 3 ml Thionylchlorid in 15 ml Benzol suspendiert und 30 min unter Rückfluß erhitzt. Nach Einengen i. Vak. wird in Chloroform aufgenommen und über DC-Platten mit Chloroform/Methanol (99/1) getrennt, wobei zwei Hauptprodukte als violett-rote Banden mit  $R_F$  0.5 und 0.6 erscheinen. Während in der Zone mit  $R_F$  0.6 ein Dichlorphenoxazon ( $M^+$ : 383/385/387) vorliegt, das nicht weiter untersucht wurde, erhält man durch Elution der Zone mit  $R_F$  0.5 **14**, von dem nach Rechromatographie im gleichen System und anschließender Reinigung über Sephadex LH-20 mit Chloroform/Methanol (3:7) 4 mg anfielen. Am Ausgang des Gaschromatographen kondensiert **14** in violett-roten Kristallen vom Schmp. 139–140°C.

Hochaufgelöste MS-Daten: 349.0716, ber. für  $C_{17}H_{16}NO_5Cl$  ( $M^+$ ,  $^{35}Cl$ ) 349.0717.

**1,4-Dimethoxy-8-(ethoxymethyl)phenoxazon (15)**: 3 mg **14** werden in 2 ml Triethylamin unter Zusatz einer Spatelspitze  $PtO_2$  hydriert (760 Torr/70°C). Nach 1 h wird unter Luftzutritt aufgearbeitet (dabei Rückfärbung der im Zuge der Hydrierung entfärbten Lösung) und DS-chromatographisch (Chloroform/Methanol 99/1) getrennt. Man erhält neben nicht umgesetztem **14** ( $R_F$  0.5) 2 mg **15** mit  $R_F$  0.3, das am Ausgang des Gaschromatographen in violett-roten Kristallen vom Schmp. 164–166°C kondensiert.

<sup>28)</sup> A. J. Fatiadi und W. F. Sager, Org. Synth., Coll. Vol. V, 1011 (1973).

<sup>29)</sup> K. Wallenfels und K. Friedrich, Chem. Ber. 93, 3070 (1960).

<sup>30)</sup> H. Brockmann, H. Gröne und G. Pampus, Chem. Ber. 91, 1916 (1958).

MS: *m/e* (%) 315 (100, M<sup>+</sup>), 300 (26), 286 (35), 256 (11). — Hoचाufgelöste MS-Daten: 315.1107, ber. für C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> (M<sup>+</sup>) 315.1107. — UV: λ<sub>max</sub> (lg ε) = 222 (4.32), 260 (4.31), 365 (4.27), 490 nm (3.81). — <sup>1</sup>H-NMR (90 MHz-FT): δ 7.81 ppm (1H, d, *J* = 2 Hz), 7.2–7.5 (2H, m), 6.05 (1H, s), 4.55 (2H, s), 4.03 (3H, s), 3.95 (3H, s), 3.56 (2H, q, *J* = 7 Hz), 1.27 (3H, t, *J* = 7 Hz).

2,4-Dimethoxy-8-(hydroxymethyl)phenoxazon (7): 280 mg **3** und 340 mg 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon (**18**) werden in 20 ml Wasser unter Zusatz von 4 Tropfen HCl zum Phenoxazon **20** umgesetzt (5 min Rückflußkochen). Beim Kühlen auf 0°C fallen 300 mg rohes 2-Hydroxy-8-hydroxymethyl-4-methoxyphenoxazon (**20**) aus (MS: *m/e* 273 (M<sup>+</sup>)) mit einer DS-chromatographischen Reinheit von ca. 90% (Chloroform/Methanol 8/2; R<sub>F</sub> 0.3).

100 mg rohes **20** werden in Methanol mit Diazomethan in üblicher Weise (s. o.) verethert. Das Produkt wird über Säulen zunächst an Kieselgel 40 (Fa. Merck) mit Chloroform/Methanol (97/3) und dann an Sephadex LH-20 mit Chloroform/Methanol (3/7) gereinigt. Aus Methanol erhält man 50 mg (50%) orangefarbene Nadeln vom Schmp. 212–214°C.

C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub> (287.1) Ber. C 62.78 H 4.52 N 4.88

Gef. C 62.84 H 4.70 N 5.04 Mol.-Masse 287 (MS)

Die Substanz und ihr Acetylierungsprodukt waren in allen Eigenschaften (DC, MS, <sup>1</sup>H-NMR, UV, IR, Misch-Schmp.) mit Michigazon aus *Strept. michiganensis* bzw. Acetyl-michigazon identisch.

2-Chlor-8-chlormethyl-4-methoxyphenoxazon (**21**): 100 mg des Rohproduktes **20** werden wie oben zusammen mit 100 mg Chloranil und 3 ml Thionylchlorid in 8 ml Benzol suspendiert und 30 min unter Rückfluß erhitzt. Nach Einengen i. Vak. wird in Chloroform gelöst und auf eine Kieselgelsäule (150 g Kieselgel 40; Fa. Merck) gegeben. Man eluiert mit Chloroform zunächst ein gelbes Nebenprodukt und dann 30 mg violettes **21**, das DS-chromatographisch (Chloroform/Methanol 99/1; R<sub>F</sub> 0.5) gereinigt wird. — Hoचाufgelöste MS-Daten: 308.9963, ber. für C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> für <sup>35</sup>Cl<sub>2</sub>) 308.9959.

2-Chlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon (**22**): 10 mg **21** werden in 2 ml Triethylamin unter Zugabe einer Spatelspitze PtO<sub>2</sub> bei 40°C (760 Torr H<sub>2</sub>) hydriert. Nach 30 min ist quantitative Umsetzung zu **22** erfolgt. R<sub>F</sub> 0.5 (Chloroform/Methanol 99/1).

Hoचाufgelöste MS-Daten: 275.0356, ber. für C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub>Cl (M<sup>+</sup> für <sup>35</sup>Cl) 275.0349. — <sup>1</sup>H-NMR (220 MHz): δ 7.58 ppm (2H, s), 7.25–7.40 (2H, m), 4.04 (3H, s), 2.43 (3H, s).

4-Methoxy-8-methylphenoxazon (**23**): Hydriert man 10 mg **21** wie oben 2 h lang bei 70°C, so entstehen neben wenig **22** als Hauptprodukt 6 mg **23**, das im DC (Chloroform/Methanol 99/1) mit R<sub>F</sub> 0.45 läuft. Die Hydrierung von **22** führt unter diesen Bedingungen ebenfalls zu **23**. Nach Gaschromatographie kondensiert man violette Kristalle vom Schmp. 159–160°C.

MS: *m/e* (%) 241 (100, M<sup>+</sup>), 240 (14), 212 (24), 198 (27), 195 (19), 183 (17). — Hoचाufgelöste MS-Daten: 241.0742, ber. für C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> (M<sup>+</sup>) 241.0739. — UV: λ<sub>max</sub> (lg ε) = 258 (4.13), 350 (4.03), 490 nm (3.79). — <sup>1</sup>H-NMR (100 MHz): δ 7.58 ppm (1H, s), 7.35 (1H, d, *J* = 10 Hz), 7.31 (2H, s), 6.88 (1H, d, *J* = 10 Hz), 4.04 (3H, s), 2.44 (3H, s).

[152/76]