

176. Welkstoffe und Antibiotika

22. Mitteilung¹⁾Verwendung radioaktiver Fusarinsäure und Synthese von
Fusarinsäure-[2,5¹⁻¹⁴C]

von H. Biland, F. Lohse und E. Hardegger

(14. VI. 60)

Der Welkstoff Fusarinsäure wurde, z. T. neben andern Welketoxinen²⁾, aus Kulturfiltraten mehrerer *in vitro* gezüchteter Erreger von infektiösen Pflanzenkrankheiten, z. B. *Gibberella fujikuroi* (SAW.) WOLL.³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾, dem Erreger der Bakanaë-Krankheit von Reis, *Fusarium lycopersici* SACC.⁴⁾⁵⁾, dem Erreger der Tomatenwelke, *Fusarium vasinfectum* ATK.⁴⁾⁵⁾, dem Erreger einer Baumwollkrankheit, *Nectria cinnabarina*⁷⁾, dem Erreger der Rotpustelkrankheit auf Alleebäumen, *Fusarium orthoceras* APP. et WOLL.⁸⁾, dem Erreger einer Erbsen- und Kartoffelkrankheit, *Fusarium oxysporum f. cubense*⁹⁾, dem Erreger der Bananenwelke, aber auch aus allgemein verbreiteten, unspezifischen parasitären Pilzen isoliert⁸⁾.

Fusarinsäure wurde als 5-Butyl-pyridin-2-carbonsäure erkannt³⁾⁴⁾. Sie ist auch synthetisch auf verschiedenen Wegen zugänglich⁴⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾.

Die Biogenese¹³⁾ und die biologische Wirkungsweise der Fusarinsäure werden im Institut für spezielle Botanik der ETH (Leitung Prof. Dr. E. GÄUMANN) seit mehreren Jahren eingehend untersucht¹⁴⁾. Diese Untersuchungen werden einerseits infolge der einfachen Struktur der Fusarinsäure erleichtert, andererseits aber sehr erschwert, da aus vergifteten oder erkrankten höheren Pflanzen, z. B. Tomatenpflanzen, die Metaboliten der Fusarinsäure nur in minimalen Mengen erhältlich sind. Es war deshalb naheliegend, für die biologischen Versuche radioaktive Fusarinsäure zu verwenden. Wir stellten in der Folge eine in der Carboxylgruppe mit ¹⁴C stark radioaktiv markierte Fusarinsäure (XI) her¹¹⁾. Nach Verabreichung dieser im Carboxyl mar-

¹⁾ 21. Mitt.: Helv. 40, 2428 (1957).

²⁾ Z. B. Dehydrofusarinsäure, Lycomarasmin, Vasinfuscarin.

³⁾ T. YABUTA, K. KAMBE & T. HAYASHI, J. agric. chem. Soc. (Japan) 10, 1059 (1934); Chem. Abstr. 29, 1132 (1935).

⁴⁾ PL. A. PLATTNER, W. KELLER & A. BOLLER, Helv. 37, 1379 (1954).

⁵⁾ E. GÄUMANN, ST. NAEF-ROTH & H. KOBEL, Phytopathol. Z. 20, 1 (1952).

⁶⁾ CH. STOLL, Phytopathol. Z. 22, 233 (1954).

⁷⁾ E. GÄUMANN, Endeavour 13, 198 (1954).

⁸⁾ Vgl. die zusammenfassende Arbeit von E. GÄUMANN, Phytopathol. Z. 29, 1 (1957).

⁹⁾ O. T. PAGE, Phytopathology 49, 230 (1959), Abstracts.

¹⁰⁾ E. HARDEGGER & E. NIKLES, Helv. 39, 505 (1956); 40, 1016, 2428 (1957); K. SCHREIBER & G. ADAM, Chem. Ber., im Druck.

¹¹⁾ E. HARDEGGER & E. NIKLES, Helv. 39, 223 (1956).

¹²⁾ E. HARDEGGER & E. NIKLES, Helv. 40, 1016 (1957).

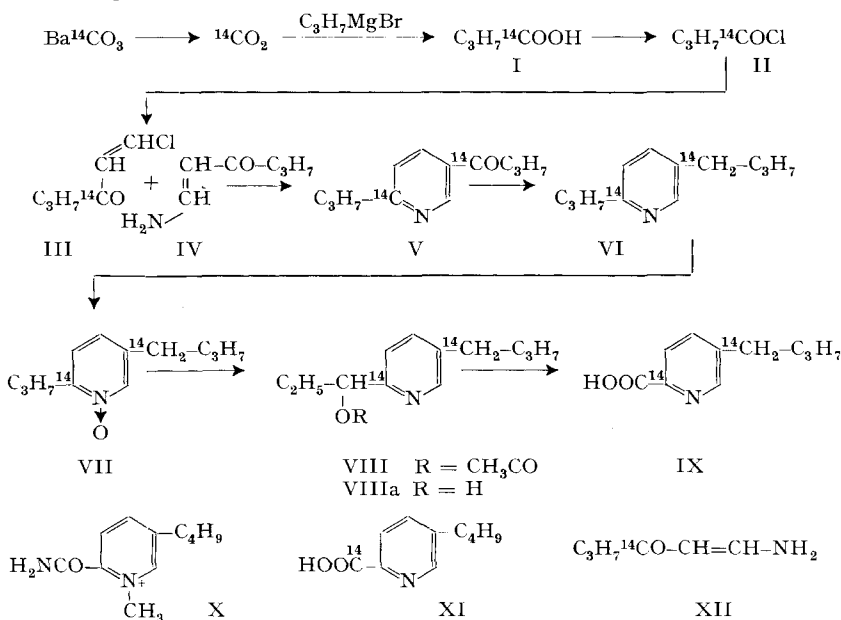
¹³⁾ R. S. SANDHU, Phytopathol. Z. 37, 1 (1959); V. FLÜCK & K. H. RICHLER, *ibid.* 24, 455 (1955).

¹⁴⁾ Vgl. die zusammenfassende Arbeit von E. GÄUMANN, Phytopathol. Z. 32, 359 (1958); ferner J. SIVADJIAN & H. KERN, *ibid.* 33, 241 (1958).

kierten Fusarinsäure liess sich u. a. die Ausbreitung der radioaktiven Produkte in der Tomatenpflanze durch Radio-autographie und andere Methoden lokalisieren¹⁵). Ferner konnten auf Grund der Radioaktivität aus Extrakten vergifteter Tomatenpflanzen papierchromatographisch neben Fusarinsäure-[carboxyl-¹⁴C] (XI)¹⁶)¹⁷) drei biologische Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure nachgewiesen und deren Rf-Werte bestimmt werden¹⁷). Rf-Werte, Löslichkeit und Verteilungsversuche führten im Vergleich mit synthetisch hergestellten Verbindungen¹¹) zur Identifizierung von einem der drei in unwägbarer Menge vorliegenden Metaboliten als 5-Butyl-N-methylpyridinium-2-carbonamid (X)¹⁷).

Die Radioaktivität der drei Metaboliten zusammen mit der unveränderten Fusarinsäure-[carboxyl-¹⁴C] entspricht ca. 90% der als Fusarinsäure-[carboxyl-¹⁴C] verabreichten Radioaktivität¹⁴)¹⁷). Die fehlenden 10% Radioaktivität werden, wie in Atmungsversuchen festgestellt wurde, als ¹⁴CO₂ von der vergifteten Tomatenpflanze ausgeschieden¹⁴). Die teilweise Decarboxylierung, welche Fusarinsäure oder ihre biologischen Umwandlungsprodukte in Tomatenpflanzen erleiden, entzog bisher die decarboxylierten, nicht-radioaktiven Metaboliten dem Nachweis. Für die weiteren biologischen Versuche ergab sich daraus die Notwendigkeit, eine im Pyridinkern und evtl. auch in der Butylseitenkette mit ¹⁴C markierte Fusarinsäure (IX) herzustellen.

Unter Berücksichtigung der durch die Ausbeute der Synthese bedingten Kosten für ¹⁴C erschien die Ausarbeitung einer von uns schon früher publizierten Synthese¹²) tragbar, trotzdem dabei die Einführung der Radioaktivität schon in der ersten Reaktionsstufe erfolgen muss.



¹⁵) H. KERN, B. D. SANWAL, V. FLÜCK & D. KLUEPFEL, *Phytopathol. Z.* 30, 31 (1957).

¹⁶) B. D. SANWAL, *Phytopathol. Z.* 25, 333 (1956).

¹⁷) D. KLUEPFEL, *Phytopathol. Z.* 29, 349 (1957).

Ausgehend von $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ stellten wir in bekannter Weise über eine GRIGNARD-Reaktion Carboxyl-markierte Buttersäure (I) her, welche als Butyrylchlorid (II) mit Acetylen zu dem in der Carbonylgruppe markierten Propyl-chlorvinyl-keton (III) umgesetzt wurde. Aus inaktivem Propyl-chlorvinyl-keton hergestelltes Propyl-aminovinyl-keton (IV) wurde mit dem radioaktiven Propyl-chlorvinyl-keton (III) zu 2-Propyl-5-butyryl-pyridin (V) kondensiert und letzteres nach Reduktion der Carbonylgruppe zum N-Oxyd VII oxydiert. Das N-Oxyd VII konnte infolge seines hohen Siedepunkts leicht von den tiefer siedenden Ausgangs- und Nebenprodukten abgetrennt werden. Umlagerung des N-Oxyds VII mit Acetanhydrid zum 2- α -Acetoxypropyl-5-butyl-pyridin (VIII) und saure Verseifung führten zum 2- α -Hydroxypropyl-5-butyl-pyridin (VIIIa), welches mit Bromlauge die gesuchte, im Pyridinkern am C-2 radioaktive Fusarinsäure gab.

Die von $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ ausgehende Synthese führte über 10 Reaktionsstufen zum Endprodukt IX. Die durchschnittliche Ausbeute jeder Stufe erreichte 88% d. Th., was für die gesamte Synthese über alle 10 Stufen einer Ausbeute von 28% entspricht. Dies bedeutet gegenüber unseren früheren¹²⁾ Ergebnissen eine bedeutende Verbesserung.

Bemerkenswerterweise gilt die oben erwähnte Ausbeute von 28% nicht für die Radioaktivität. Von den als $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ eingesetzten 25 mc ^{14}C wurden nicht 28% (6,9 mc) ^{14}C in die Fusarinsäure IX eingebaut, sondern überraschenderweise nur ca. $\frac{1}{7}$ dieser Menge, d. h. ca. 1 mc. Von diesem einen mc ^{14}C wurden ca. $\frac{3}{4}$, d. h. 0,75 mc ^{14}C , in das C-Atom 2 und ca. $\frac{1}{4}$, d. h. 0,25 mc ^{14}C , in das mit dem Pyridinring verbundene C-Atom der Butylseitenkette (C-5¹) eingebaut.

Die Ursache des grossen Verlustes an Radioaktivität konnte lokalisiert werden. Sie liegt, ebenso wie die eigenartige, unerwartete Verteilung der Radioaktivität auf die C-Atome 2 und 5¹ der Fusarinsäure, in der Kondensation des am Carbonyl-C markierten Propyl-chlorvinyl-ketons (III) mit dem inaktiven Propyl-aminovinyl-keton (IV), welche in der Folge genauer untersucht wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchung, über die demnächst berichtet werden soll, lehren u. a., dass sich die beobachteten Verluste an Radioaktivität vollständig vermeiden lassen, wenn für die Kondensation anstelle des radioaktiven Propyl-chlorvinyl-ketons (III) das am Carbonyl-C markierte Propyl-aminovinyl-keton (XII) eingesetzt wird. Die Ausbeute an Radioaktivität erreicht dann mit 28% die stoffliche Ausbeute der Synthese.

Die von uns für die oben erwähnten biologischen Versuche hergestellte, am C-2 und C-5¹ markierte Fusarinsäure (IX) hat eine spezifische Radioaktivität von ca. 0,06 mc pro Millimol. Die Radioaktivität wurde sowohl durch Vergleich mit der früher hergestellten Fusarinsäure-[carboxyl- ^{14}C]¹¹⁾ (XI) wie durch Verbrennung und Bestimmung der Radioaktivität des entstehenden $^{14}\text{CO}_2$ ermittelt¹⁸⁾ und führte in beiden Bestimmungen zu denselben Resultaten.

Wir danken der FRITZ HOFFMANN-LA ROCHE-STIFTUNG ZUR FÖRDERUNG WISSENSCHAFTLICHER ARBEITSGEMEINSCHAFTEN IN DER SCHWEIZ und der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG. in Basel für die Unterstützung dieser Arbeit.

¹⁸⁾ Zur Verbrennung vgl. R. CH. ANDERSON, Y. DELABARRE & A. A. BOTHNER-BY, *Analyt. Chemistry* 24, 1298 (1952). Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach J. RUTSCHMANN, *Helv.* 40, 433 (1957). Wir danken Herrn P.D. Dr. J. JORDAN für die Durchführung von Mikroanalyse und Radioaktivitätsbestimmung.

Experimentelles¹⁹⁾. – *Buttersäure*-[carboxyl-¹⁴C] (I). In einem evakuierten Rundkolben mit Tropftrichter, 2 Kühlvorlagen und Manometer wurden 200 mg Ba¹⁴CO₃, entsprechend 25 mc ¹⁴C, mit 13,0 g inaktivem Bariumcarbonat gut vermischt. Zur Mischung wurden innert 1 Std. 750 ml konz. H₂SO₄ gegeben. Das freigesetzte ¹⁴CO₂ wurde in den Kühlvorlagen bei –80° getrocknet und bei –190° kondensiert. Gegen Ende der Reaktion wurde die Mischung mit freier Flamme stark erhitzt. Der anfängliche Druck im System stieg von 0,1 Torr auf 5 Torr.

85 ml einer filtrierten, frisch hergestellten, titrierten ätherischen Lösung von 15,3 g Propylmagnesiumbromid wurden unter Stickstoff auf –80° gekühlt. Das auf 1 Torr evakuierte Reaktionsgefäß wurde mit der evakuierten CO₂-Vorlage verbunden und das ¹⁴CO₂ innert 20 Min. unter stetigem Rühren der ätherischen Lösung verdampft. Der Höchstdruck während der Carboxylierung betrug 140 Torr. Die Mischung wurde zweimal auf 20° erwärmt und wieder auf –80° gebracht, Enddruck 120 Torr. Das erstarrte Reaktionsprodukt wurde bei 0° mit verd. Salzsäure zersetzt und nach Sättigung mit Kochsalz 5mal mit Äther ausgeschüttelt. Das Präparat destillierte bei 150–159°, Hauptmenge bei 158–159°. Ausbeute 5,25 g (90%).

Butyrylchlorid-[¹⁴C] (II). Zu 5,25 g Buttersäure-[carboxyl-¹⁴C] (I) wurden bei –20° 8,0 g Thionylchlorid gegeben. Die Mischung wurde 2 Std. bei –10°, 1 Std. bei 20° und 30 Min. bei 90° gehalten. Die leichtflüchtigen Anteile wurden bei 20° im Wasserstrahlvakuum entfernt und das Butyrylchlorid im VIGREUX-Kolben destilliert (Sdp. 93–100°). Ausbeute 6,0 g (94,5%).

Propyl-chlorvinyl-keton-[carbonyl-¹⁴C] (III). Zu 6,0 g Butyrylchlorid-[¹⁴C] (II) in 100 ml Tetrachlorkohlenstoff wurden bei –15° unter Durchleiten von Acetylen und starkem Vibrieren im Laufe einer Std. 10 g wasserfreies Aluminiumchlorid gegeben. Nach weiterem 5-stdg. Durchleiten von Acetylen wurde das nun zweiphasige Reaktionsgemisch mit Eis und wenig verd. Salzsäure zersetzt. Es entstand eine braune feste Masse, die sich bei intensivem Rühren auflöste. Die Mischung wurde dreimal mit Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden nacheinander je 1mal mit 0,2M Sodalösung, verd. Salzsäure und Wasser gewaschen und im Wasserstrahlvakuum eingeeengt. Das Propyl-chlorvinyl-keton-[carbonyl-¹⁴C] destillierte im Wasserstrahlvakuum bei 60–65°. Ausbeute 5,0 g (67%).

2-Propyl-5-butyl-pyridin-[2,5-¹⁴C] (V). Die Mischung von 5,0 g Propyl-chlorvinyl-keton-[carbonyl-¹⁴C] (III) und 10,0 g inaktivem Propyl-aminovinyl-keton (IV) wurde 48 Std. bei 20° aufbewahrt und dann mit 30 ml 20-proz. Schwefelsäure zum Sieden erhitzt. Die Mischung wurde nach Zugabe von weiteren 70 ml 20-proz. H₂SO₄ zweimal mit je 40 ml Äther ausgeschüttelt und mit 100 ml 40-proz. Natronlauge alkalisch gemacht. Nun wurde viermal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt, der Ätherauszug mit K₂CO₃ getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Das Pyridinderivat V destillierte im Hochvakuum bei 101–113°. Ausbeute 6,12 g (85%).

2-Propyl-5-butyl-pyridin-[2,5-¹⁴C] (VI). 5,87 g 2-Propyl-5-butyl-pyridin-[2,5-¹⁴C] (V) wurden in 60 ml Triäthylenglycol mit 7 g KOH und 8 g Hydrazinhydrat 15 Min. auf 135° erhitzt, wobei die Reaktion unter Aufschäumen einsetzte. Die Mischung wurde noch 1 Std. bei 135–140° gehalten und dann in 40 Min. auf 220° erhitzt, wobei Wasser und überschüssiges Hydrazin abdestillierten. Die Mischung wurde noch 2 Std. bei 220° gehalten, abgekühlt und nach Zugabe von 500 ml Wasser viermal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit K₂CO₃ getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Der Rückstand wog 5,68 g (5,44 g = 100%).

2-Propyl-5-butyl-pyridin-N-oxyd-[2,5-¹⁴C] (VII). Das noch etwas Äther enthaltende 2-Propyl-5-butyl-pyridin-[2,5-¹⁴C] (VI) (5,68 g) wurde mit 25 ml Eisessig und 4 ml 30-proz. Wasserstoffperoxyd versetzt, 3 Std. bei 80–82° und nach Zugabe von weiteren 4 ml 30-proz. Wasserstoffperoxyd noch 1½ Std. bei 75–80° gehalten. Nach Entfernung der im Wasserstrahlvakuum bei 90° flüchtigen Anteile wurde der Rückstand mit Pottasche versetzt und mit Chloroform extrahiert. Das vom Chloroform befreite N-Oxyd VII destillierte im Hochvakuum bei 128–141°. Ausbeute 5,33 g (90% ber. auf Propyl-butyl-pyridin-[2,5-¹⁴C] (V)).

2-(α-Acetoxypropyl)-5-butyl-pyridin-[2,5-¹⁴C] (VIII). 5,33 g 2-Propyl-5-butyl-pyridin-N-oxyd-[2,5-¹⁴C] (VII) wurden mit 20 ml Acetanhydrid im Verlauf von 1½ Std. auf 135° erhitzt, worauf die Umlagerung unter Aufkochen und Dunkelwerden einsetzte. Die Mischung wurde

¹⁹⁾ Alle Smp. sind korrigiert. Die Sdp. sind nicht korrigiert.

2¹/₂ Std. unter Rückfluss gekocht, nach dem Erkalten vorsichtig mit überschüssigem Methanol versetzt und im Wasserstrahlvakuum eingengt. Der Rückstand wog 7,0 g (6,5 g = 100%).

2-(α -Hydroxypropyl)-5-butyl-pyridin-[2,5¹⁻¹⁴C] (VIIIa). 7,0 g rohes 2-(α -Acetoxypropyl)-5-butyl-pyridin-[2,5¹⁻¹⁴C] (VIII) wurden mit 25 ml konz. Salzsäure 17¹/₂ Std. unter Rückfluss gekocht, nach Erkalten mit 12 g NaOH in 40 ml Wasser versetzt und viermal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt. Nach Trocknen der ätherischen Lösung mit K₂CO₃ und Eindampfen wurde das Präparat im Hochvakuum destilliert (Sdp. 99–112°). Ausbeute 4,55 g (85,5%, ber. auf 2-Propyl-5-butyl-pyridin-N-oxyd-[2,5¹⁻¹⁴C] (VII)).

Fusarinsäure-[2,5¹⁻¹⁴C] (IX). Bei –5° hergestellte Bromlage aus 200 ml Wasser, 20 g NaOH und 7 ml Brom wurde mit 4,55 g 2-(α -Hydroxypropyl)-5-butyl-pyridin-[2,5¹⁻¹⁴C] (VIIIa) 20 Min. bei –15° und 27 Std. bei 20° energisch gerührt. Nach Zugabe von NaHSO₃ bis zur Entfärbung und dreimaligem Ausschütteln mit wenig Äther wurde die Mischung mit Salzsäure auf pH 4 gebracht. Die Fusarinsäure-[2,5¹⁻¹⁴C] wurde fünfmal mit Chloroform ausgeschüttelt und einmal aus Essigester umkristallisiert. Smp. 95–96°, Ausbeute 3,19 g (75,5%). Das Präparat für die Elementaranalyse und die Bestimmung der Radioaktivität wurde im Hochvakuum sublimiert.

C₁₀H₁₃NO₂ Ber. C 67,05 H 7,26% Gef. C 67,17 H 7,43%

Bestimmung der Radioaktivität (Fehler höchstens \pm 10% des betr. Wertes). Ba¹⁴CO₃, bzw. 2-Propyl-5-butyryl-pyridin-[2-¹⁴C], bzw. Fusarinsäure-[2-¹⁴C] Ber. 0,38 mc/mMol = 100%

2-Propyl-5-butyryl-pyridin-[2,5¹⁻¹⁴C] Gef. 0,065 mc/mMol = 17,1%

Fusarinsäure-[2,5¹⁻¹⁴C] Gef. 0,058 mc/mMol = 15,3%

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Angaben über die Verwendung des mit ¹⁴C markierten Welkstoffs Fusarinsäure für biologische Untersuchungen wird die Synthese von Fusarinsäure-[2,5¹⁻¹⁴C] beschrieben. Aus Ba¹⁴CO₃ wurde Propyl-chlorvinyl-ke-ton-[carbonyl-¹⁴C] hergestellt, dessen Kondensation mit inaktivem Propyl-aminovinyl-ke-ton nach NESMEJANOW zum 2-Propyl-5-butyryl-pyridin-[2,5¹⁻¹⁴C] führte, welches in Fusarinsäure umgewandelt wurde. Die substanzielle Ausbeute der Synthese betrug 28%, die radioaktive Ausbeute ca. 4%. Der Grund des Radioaktivitätsverlustes wurde erkannt; er kann durch geeignete Massnahmen vermieden werden.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

177. Zur Struktur des Aucubins

(Vorläufige Mitteilung)

von M. W. Wendt, W. Haegle, E. Simonitsch und H. Schmid

(20. VI. 60)

Eine kürzlich erschienene Mitteilung von FUJISE, OBARA & UDA¹⁾ und eine soeben veröffentlichte Abhandlung von GRIMSHAW & JUNEJA²⁾ veranlassen uns, kurz über unsere, durch äussere Umstände wiederholt unterbrochenen Untersuchungen des Aucubins zu berichten, die uns zur Aufstellung der Formel Ia bzw. Ib für den Pflanzenstoff führten. Die Formel Ia ist ebenfalls von den japanischen und englischen Autoren vorgeschlagen worden.

¹⁾ S. FUJISE, H. OBARA & H. UDA, Chemistry & Ind. 1960, 289.

²⁾ J. GRIMSHAW & H. R. JUNEJA, Chemistry & Ind. 1960, 656.