

ZUSAMMENFASSUNG

4,5,6-Trimethoxy-N,N-dimethyl-tryptamin (XI) und zwei dem Mescaline nahe-stehende Verbindungen, β -(3,4,5-Trimethoxyphenoxy)-äthyl-amin (VI) und β -(3,4,5-Trimethoxyphenoxy)-äthyl-dimethylamin (III), wurden synthetisiert. Keine der drei Substanzen zeigte in vorläufigen Humanversuchen psychotrope Aktivität.

Pharmakologisches Institut der Universität Göteborg und
Biochemisches Forschungslaboratorium der AB HÄSSLE, Göteborg

139. Über die Isolierung neuer Stoffwechselprodukte aus *Penicillium brefeldianum* DODGE

von E. Härri, W. Loeffler, H. P. Sigg, H. Stähelin und Ch. Tamm¹⁾

(20. IV. 63)

Vor etwa 28 Jahren haben OXFORD *et al.*²⁾ aus dem Kulturfiltrat von *Penicillium brefeldianum* DODGE die Fulvinsäure (I)^{2) 3)} isoliert. Der gleiche Pilz produziert auch Griseofulvin³⁾. Bei der Untersuchung eines Stammes (S 464) dieses Pilzes haben wir als Hauptprodukt Palitantin (II)⁴⁾ gefunden. In kleinerer Menge konnten wir das mit Palitantin eng verwandte Frequentin (III)^{5) 6)} sowie zwei neue Stoffwechselprodukte isolieren, die wir Brefeldin A und Brefeldin B nennen. Fulvinsäure und Griseofulvin liessen sich bisher in keiner unserer Züchtungen, die unter den verschiedensten Bedingungen durchgeführt wurden, nachweisen. Dagegen konnten wir Brefeldin A auch aus dem Kulturfiltrat eines weiteren *Penicillium*-Stammes (S 498) als Hauptmetabolit gewinnen. Als Nebenprodukt erhielten wir aus diesem Stamme noch 1-O-Stearyl-glycerin (α -Monostearin). Die Isolierung der hier beschriebenen Stoffwechselprodukte erfolgte durch Extraktion der Kulturfiltrate mit einem organischen Lösungsmittel. Frequentin liess sich bereits mit Tetrachlorkohlenstoff oder tiefsiedendem Petroläther extrahieren, während die übrigen Produkte erst bei der nachfolgenden Extraktion mit Essigester oder Chloroform in die organische Phase übergangen. Die Auftrennung des so anfallenden Substanzgemisches gelang leicht durch Chromatographie an Silicagel.

Palitantin (II) wurde erstmals von BIRKINSHAW & RAISTRICK⁴⁾ aus Kulturfiltraten von *Penicillium palitans* WESTLING isoliert und charakterisiert. Als Nebenprodukt wurde von diesen Autoren auch eine Säure vom Schmelzpunkt 143° gefunden, die später mit dem von CURTIS, HEMMING & SMITH⁵⁾ aus *Penicillium*

1) Jetzige Adresse: Institut für Organische Chemie der Universität Basel.

2) A. E. OXFORD, H. RAISTRICK & P. SIMONART; *Biochem. J.* 29, 1102 (1935).

3) F. M. DEAN, R. A. EADE, R. A. MONBASHER & A. ROBERTSON, *J. chem. Soc.* 1957, 3497; *Nature* 179, 366 (1957).

4) J. H. BIRKINSHAW & H. RAISTRICK, *Biochem. J.* 30, 801 (1936).

5) P. J. CURTIS, H. G. HEMMING & W. K. SMITH, *Nature* 167, 557 (1951).

6) Wir danken Herrn Prof. J. H. BIRKINSHAW, London, für die Überlassung einer Probe von authentischem Frequentin.

frequentans WESTLING isolierten Frequentin identifiziert⁷⁾ werden konnte. Beide Substanzen wurden auch aus dem Kulturfiltrat verschiedener Stämme von *Penicillium cyclopium*⁸⁾ isoliert. Die Konstitutionsaufklärung von Palitantin verdanken wir BOWDEN, LYTHGOE & MARSDEN⁹⁾. Über die Struktur von Frequentin (III) haben wir kürzlich berichtet¹⁰⁾.

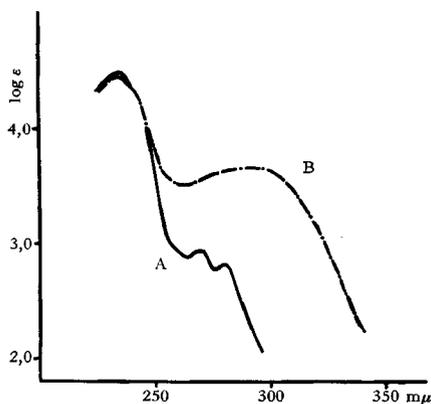
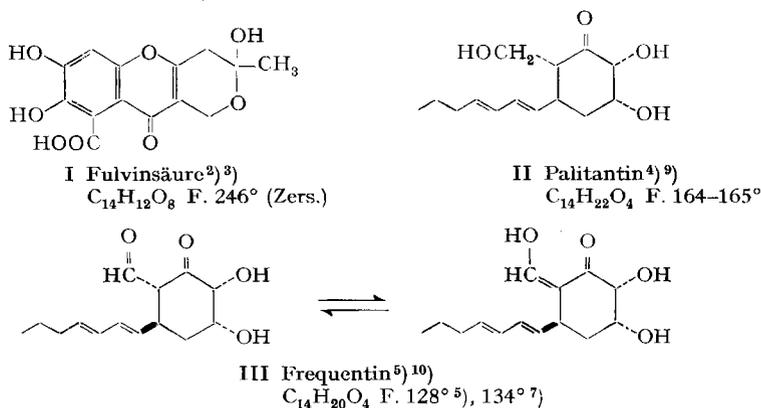


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektren in Dioxan

A: Palitantin, C₁₄H₂₂O₄ (254,32); Maxima bei 234,5 mμ (log ε = 4,46), 269,5 mμ (log ε = 2,92), und 280,5 mμ (log ε = 2,79).

B: Frequentin, C₁₄H₂₀O₄ (252,31); Maxima bei 232 mμ (log ε = 4,52) und 290 mμ (log ε = 3,74), Schulter bei 242 mμ (log ε = 4,3).

Charakterisierung der neuen Stoffe. - *Brefeldin A* wurde aus Methanol-Äther in farblosen Prismen vom Smp. 204–205° und $[\alpha]_D^{22} = +96^\circ$ (Methanol) erhalten. Es ist ein lipophiler Neutralstoff dessen Analysenwerte mit der Summenformel C₁₆H₂₄O₄ (M = 280,35) vereinbar sind. Die Mol.-Gewichtsbestimmung nach RAST in Campher ergab 285,5. Der Stoff enthält eine C-Methylgruppe (KUHN-ROTH), jedoch keine Meth-

⁷⁾ J. H. BIRKINSHAW, *Biochem. J.* 57, 271 (1952); P. J. CURTIS & L. A. DUNCANSON, *ibid.* 57, 276 (1952).

⁸⁾ A. BRACKEN, A. POCKER & H. RAISTRICK, *Biochem. J.* 57, 587 (1954).

⁹⁾ K. BOWDEN, B. LYTHGOE & D. J. S. MARSDEN, *J. chem. Soc.* 1959, 1662.

¹⁰⁾ H. P. SIGG, *Helv.* 46, 1061 (1963); vgl. J. F. GROVE & B. K. TIDD, *Chemistry & Ind.* 1963, 412.

IR.-Spektren

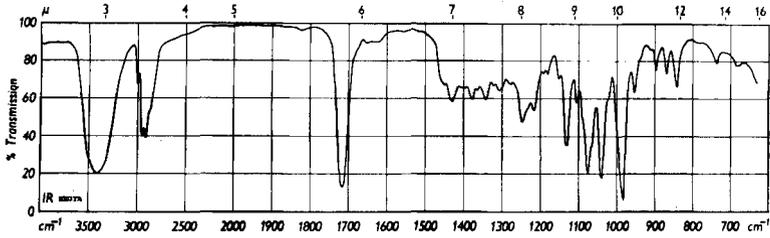


Fig. 2. *Palitantin* (1 mg in 300 mg KBr)

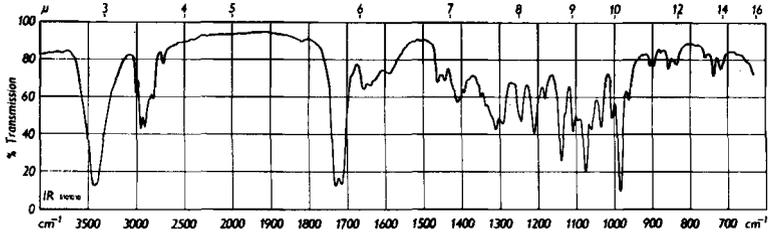


Fig. 3. *Frequentin* (1 mg in 300 mg KBr)

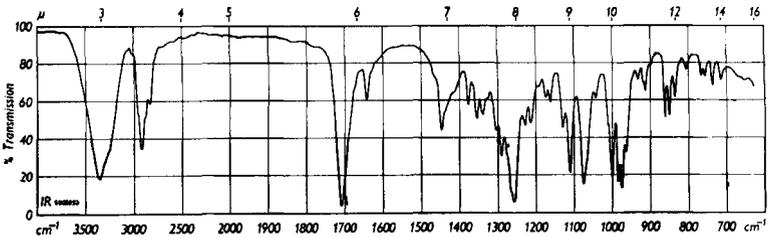


Fig. 4. *Brefeldin A* (1 mg in 300 mg KBr)

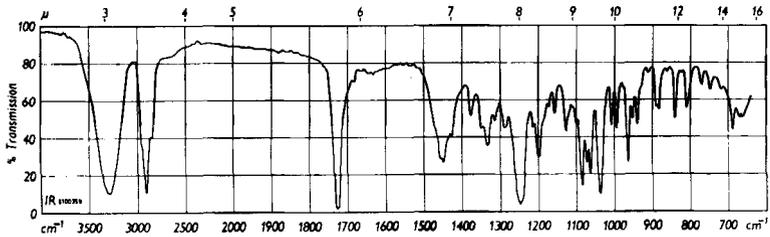


Fig. 5. *Tetrahydrobrefeldin A* (1 mg in 300 mg KBr)

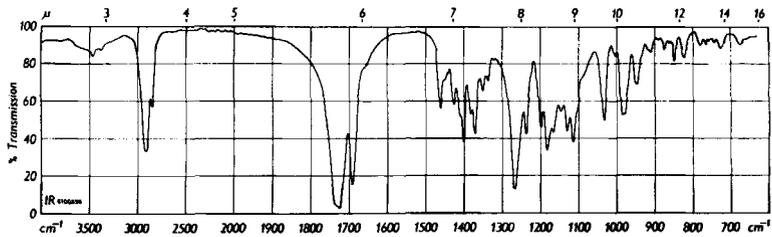
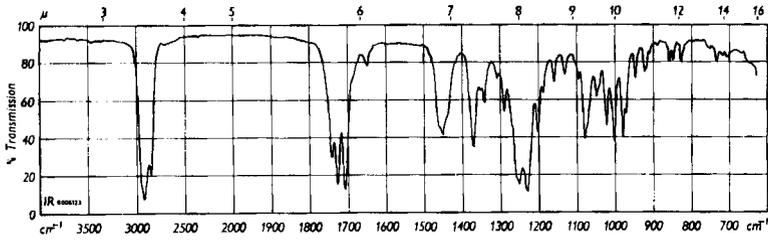
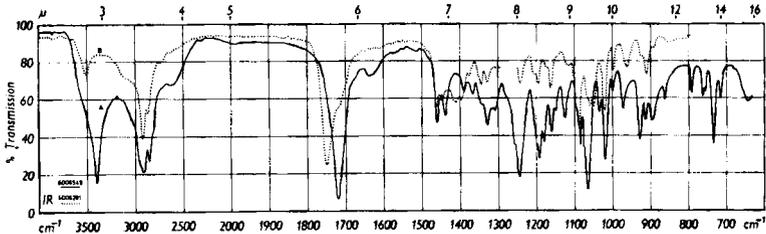
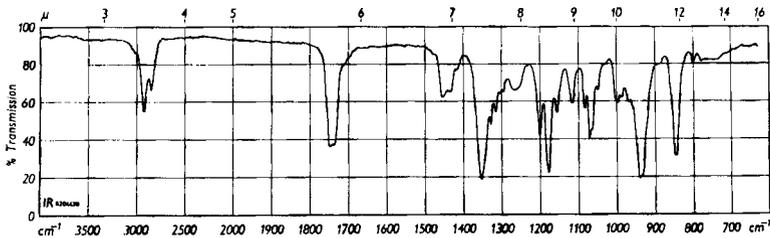
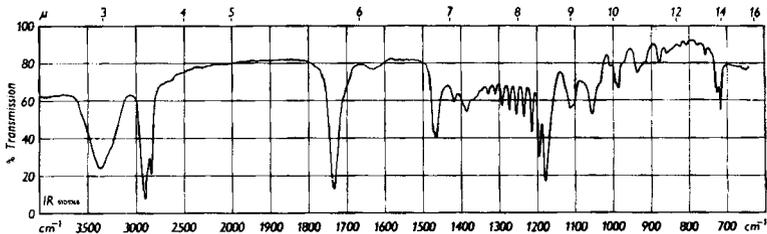


Fig. 6. *Diketon aus Tetrahydrobrefeldin A* (1 mg in 300 mg KBr)

Fig. 7. *Di-O-acetyl-brefeldin A* (Suspension in Nujol)Fig. 8. *Brefeldin B*

(A: 1 mg in 300 mg KBr) (B: 5% in Methylenchlorid, 0,1 mm Zelle)

Fig. 9. *Mono-O-mesyl-brefeldin-B-methylester*
(5% in Methylenchlorid, 0,1 mm Zelle)Fig. 10. *1-O-Stearylglycerin* (1 mg in 300 mg KBr)

oxylgruppe (ZEISEL). Das UV.-Spektrum zeigt ein Maximum bei 215μ , $\log \epsilon = 4,05$ (Äthanol). Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 4) sind die Anwesenheit von Hydroxylgruppen (3370 cm^{-1}), einer Ester- resp. Lacton-Funktion (1711 und 1260 cm^{-1}) sowie einer $\text{C}=\text{C}$ -Strettschwingung (1646 cm^{-1}) leicht erkennbar. Bei der katalytischen Hydrierung mit Pd-Kohle in Äthanol nahm Brefeldin A zwei Mol. Wasserstoff auf unter Bildung eines Tetrahydroderivats vom Smp. 134° , das im UV. keine selektive Absorption zwischen 210 und 360μ mehr zeigte. Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 5)

ist die C=C-Streckschwingung verschwunden und die C=O-Banden liegen jetzt bei 1730 und 1245 cm^{-1} . Tetrahydrobrefeldin A liess sich mit CrO_3 -Eisessig bei 20° glatt zu einem Diketon vom Smp. 75° dehydrieren. Das UV.-Spektrum zeigt ein Maximum bei 283 $\text{m}\mu$, $\log \epsilon = 1,73$, und das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 6) weist jetzt im Gebiet der C=O-Streckschwingungen drei Banden auf (1740 Schulter, 1727, 1695 cm^{-1}), während die $\nu(\text{O-H})$ -Schwingungen verschwunden sind. Mit Acetanhydrid in Pyridin lieferte Brefeldin A ein Di-O-acetyl-Derivat vom Smp. 130°, in dessen IR.-Spektrum (vgl. Fig. 7) ebenfalls keine $\nu(\text{O-H})$ -Schwingungen mehr vorhanden sind, während die $\nu(\text{C=O})$ -Schwingungen bei 1740, 1725 und 1707 cm^{-1} liegen. Mit Methansulfochlorid erhielten wir ein Di-O-mesylat vom Smp. 130° und mit *p*-Phenylazobenzoylchlorid ein Mono-O-(*p*-phenylazobenzoyl)-Derivat vom Smp. 192° und ein Di-O-(*p*-phenylazobenzoyl)-Derivat vom Smp. 154°.

Aus den physikalischen Eigenschaften und dem chemischen Verhalten kann geschlossen werden, dass Brefeldin A zwei Doppelbindungen und zwei sekundäre, alkoholische Hydroxylgruppen enthält. Die beiden anderen Sauerstoffatome liegen als Ester- resp. Lacton-Gruppierung vor, die mit der einen C=C-Doppelbindung konjugiert ist, da das Absorptionsmaximum bei 215 $\text{m}\mu$ nach der Hydrierung verschwunden ist und da die $\nu(\text{C=O})$ Schwingung in Tetrahydrobrefeldin A bei höheren Wellenzahlen (1730 cm^{-1}) erscheint als bei Brefeldin A (1710 cm^{-1}). Über weitere Abbaureaktionen von Brefeldin A soll später berichtet werden.

Brefeldin B kristallisierte aus Äther-Pentan in farblosen Nadeln vom Smp. 163–165° und $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -109^\circ$ (Dioxan) resp. -119° (Methanol). Die Analysenwerte passten auf die Formel $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_4$ ($M = 266,3$). Damit im Einklang waren die Resultate der Mol.-Gewichtsbestimmung nach RAST in Campher, die den Wert von 247 ergab, und die Mikrotitration, die ein Äquiv.-Gewicht von 275 errechnen liess ($\text{pK}_{\text{MCS}}^* = 6,77$). Im UV. war nur Endabsorption bei 210 $\text{m}\mu$ sichtbar. Das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 8) liess auf das Vorhandensein von Hydroxylgruppen ($\nu(\text{OH})$ bei 3400 cm^{-1}), einer Carboxylgruppe ($\nu(\text{OH})$ bei 2650 und $\nu(\text{C=O})$ bei 1720 cm^{-1} in KBr, resp. Schulter bei 1720 cm^{-1} in CH_2Cl_2) sowie einer Keto-Funktion ($\nu(\text{C=O})$ bei 1750 cm^{-1} in CH_2Cl_2) schliessen. Brefeldin B löst sich gut in 2N Sodalösung und bildet mit Diazomethan einen Methylester, der bisher nicht kristallisiert hat. Die Umsetzung des Methylesters mit Methansulfochlorid in Pyridin ergab ein krist. Mono-O-mesyl-Derivat vom Smp. 140°, in dessen IR.-Spektrum (vgl. Fig. 9) keine Bande im Gebiet der $\nu(\text{O-H})$ -Schwingungen auftritt, während bei 1745 und 1733 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$ -Schwingungen sichtbar sind, die wir der Keto- resp. Ester-Funktion zuordnen. Nach diesen Befunden handelt es sich bei Brefeldin B um eine Ketocarbonsäure, die noch eine alkoholische Hydroxylgruppe besitzt.

Biologische Aktivität. - 1. *Antibiotische Wirkung*¹¹⁾: Palitantin und Brefeldin B zeigten praktisch keine Wirkung gegen Sprosspilze und Bakterien bei Konzentrationen von 100 γ/ml ; dagegen konnte die schwache antibiotische Aktivität von Frequentin bestätigt werden. Folgende Mikroorganismen werden durch 100 γ/ml vollständig im Wachstum gehemmt: *Micrococcus pyogenes var. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichophyton gypsum* und *Achorion quinckeanum*.

¹¹⁾ Diese Untersuchungen wurden von Frl. Dr. WIESINGER durchgeführt.

CURTIS und Mitarbeiter⁵⁾ haben seinerzeit festgestellt, dass 2,5 γ /ml Frequentin die Keimung der Konidien von *Botrytis allii*, *Penicillium gladioli*, *Stachybotrys atra* und *Mucor mucedo* verhindern. Etwas höhere Konzentrationen (25–50 γ /ml) waren zur Hemmung bei *Absidia glauca* und *Aspergillus niger* notwendig. Bei Brefeldin A wurde eine Hemmung von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* schon bei einer Konzentration von 10 γ /ml festgestellt. Deutlich schwächer war die Wirkung gegenüber *E. coli* und *Proteus vulgaris*, und keine Hemmung (100 γ /ml) wurde an grampositiven Bakterien, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, Mycobakterien und Dermatophyten beobachtet.

2. *Cytostatische Wirkung*: Palitantin, Frequentin und Brefeldin B zeigten bei der *in vitro*-Prüfung auf Hemmung der Zellvermehrung des Mäuse-Mastzelltumors P-815 in der Gewebekultur¹²⁾, bei Konzentrationen von 100 γ /ml, keine Wirkung. Dagegen verursachte Brefeldin A bei einer Konzentration von 0,2 γ /ml eine 50-prozentige Hemmung der Zellvermehrung. Bei einer täglichen *i.p.* Injektion von 50 mg/kg bewirkte es eine starke Hemmung des Tumorwachstums bei EHRlich'schem Mäuse-Ascites-Tumor.

Brefeldin A ist relativ wenig toxisch, liegt doch bei der Maus die DL-50 höher als 200 mg/kg bei intraperitonealer Applikation.

Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden im evakuierten Röhrchen bestimmt und sind nicht korrigiert. Substanzproben zur Messung der spez. Drehung und der Spektren wurden 1 Std. bei 0,02 Torr und 60° getrocknet. Die UV.-Spektren wurden mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK 2, in methanolischer Lösung, und die IR.-Spektren mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Zweistrahlenspektrophotometer, Modell 21 mit NaCl-Optik, aufgenommen. Die Rotationsdispersion wurde mit einem automatischen Spektropolarimeter¹³⁾ gemessen. Sämtliche Chromatogramme wurden nach der Durchlaufmethode¹⁴⁾ an Silicagel (Korngrösse 0,2–0,5 mm, E. MERCK AG.) und Dünnschichtchromatogramme nach der von STAHL¹⁵⁾ beschriebenen Methode an Kieselgel G durchgeführt.

A. Organismen: Pilzstamm S 464 wurde aus einer afrikanischen Erdprobe von der Elfenbeinküste isoliert und als *Penicillium brefeldianum* DODGE bestimmt.

Stamm S 498 stammt aus einer Erdprobe von Tanganjika und gehört ebenfalls in die Gattung *Penicillium*, möglicherweise sogar zu *P. brefeldianum*. Eine eindeutige Identifizierung ist jedoch nicht möglich, da dieser Stamm keine Hauptfruchtform, sondern nur Konidien bildet.

B. Züchtung: a) Die Züchtung von *Penicillium brefeldianum* DODGE, Stamm S 464, erfolgte in einem Fermenter vom System Ultramix (Firma HEINRICH BERTRAMS AG., Basel) bei 27°, einer Belüftung von 1,5 m³/Std. und einer Rührergeschwindigkeit von 1450 Umdrehungen/Min. während 92 Std. in einem Nährmedium, das pro Liter 20 g Glucose, 2 g Malzextrakt SCHWEIZ. FERMENT AG., 2 g Bacto yeast extract DIFCO, 2 g Pepton CUDAHY, 2 g KH₂PO₄, 2 g MgSO₄·7 H₂O und entmineralisiertes Wasser enthielt (pH = 5,5).

b) Stamm S 498 wurde unter ähnlichen Bedingungen während 28 Std. fermentiert. Das Nährmedium enthielt im Liter 30 g Glucose, 8,5 g NaNO₃, 2,72 g KH₂PO₄, 1,23 g MgSO₄·7H₂O, 25 mg FeSO₄·7H₂O und entmineralisiertes Wasser.

C. Isolierung und Eigenschaften der Inhaltsstoffe - a) Aus *Penicillium brefeldianum* (Stamm S 464). Die Kulturbrühe aus einem 50-l-Gärtank wurde mit 500 g Hyflo-Super-Cel gut vermischt und filtriert. Das Kulturfiltrat wurde der Reihe nach je dreimal mit je 10 l Petroläther,

¹²⁾ Vgl. H. STÄHELIN, *Medicina experimentalis* 7, 92 (1962).

¹³⁾ TH. BÜRER, M. KOHLER & H. H. GÜNTARD, *Helv.* 41, 2216 (1958).

¹⁴⁾ T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc.* Nr. 7, 305 (1949).

¹⁵⁾ Vgl. E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962; K. RANERATH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim 1962; E. DEMOLE, *J. Chromatogr.* 7, 24 (1958).

10 l Äther und 10 l Essigester extrahiert und die über Na_2SO_4 getrockneten Extrakte eingedampft. Der Petrolätherextrakt (1,49 g) lieferte aus Äther-Pentan 200 mg Kristalle vom Smp. 125–129°. Nach mehrmaligem Umkristallisieren resultierte reines *Frequentin* vom Smp. 131–132°, $[\alpha]_D^{25} = +65^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,95$ in Chloroform) (Lit. 5): Smp. 128°; $[\alpha]_D^{26} = +68^\circ$ ($c = 0,5$ in Chloroform). Misch-Smp. mit authent. *Frequentin* vom Smp. 132–133°: 131–132°. UV.-Spektrum in Dioxan (vgl. Fig. 1): Maxima bei 232 $m\mu$ ($\log \epsilon = 4,52$) und 290 $m\mu$ ($\log \epsilon = 3,74$). IR.-Spektrum (in KBr) (vgl. Fig. 3): Banden bei 3450, 3020, 2960, 2920, 2740, 1735, 1720, 1660, 1640, 1140, 1080 und 990 cm^{-1} . Zur Analyse 4 Std. bei 60° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_4$ (252,30) Ber. C 66,6 H 8,0 O 25,4% Gef. C 66,2 H 8,0 O 25,4%

Der Ätherextrakt (7,5 g) gab durch direkte Kristallisation aus Methanol-Äther 720 mg rohes *Brefeldin A* vom Smp. 190–205°. Reinigung siehe weiter unten.

Die Mutterlaugenrückstände (6,8 g) wurden an 250 g Silicagel chromatographiert. Die mit Chloroform-Essigester-(4:1) eluierten Fraktionen (685 mg) ergaben aus Äther-Pentan 45 mg *Brefeldin B* in farblosen Nadeln vom Smp. 163–165°. $[\alpha]_D^{21} = -119^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,96$ in Methanol) bzw. $[\alpha]_D^{21} = -109^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,00$ in Dioxan). UV.-Spektrum: Endabsorption bei 210 $m\mu$. IR.-Spektrum (KBr) (vgl. Fig. 8): Banden bei 3400, 2920, 2850, 2650, 1720, 1247, 1067, 740 cm^{-1} , bzw. in CH_2Cl_2 -Lösung (vgl. Fig. 8): bei 3500, 2940, 2860, 1750, 1720 (Schulter), 1250, 1195, 1160, 1090, 1020 cm^{-1} . Zur Analyse 4 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_4$ (266,33) Ber. C 67,6 H 8,3 O 24,0% Gef. C 67,5 H 8,3 O 24,0%

Die mit Chloroform-Essigester-(1:1) eluierten Fraktionen (1,8 g) gaben nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Essigester-Pentan 370 mg *Palitantin* als farblose Nadeln vom Smp. 157–158°, $[\alpha]_D^{22} = +2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,10$ in Chloroform) (Lit. 2): Smp. 157–159°. Die Substanz sublimiert unzersetzt bei 100–120°/0,03 Torr. Die Reaktionen nach TOLLENS und FEHLING waren positiv; eine Chloroform-Lösung gab mit Tetranitromethan eine deutliche Gelbfärbung. Rotationsdispersion (in Dioxan): Maximum bei 300 $m\mu$ $[\text{M}]_{3000}^{20} = +8200^\circ$. UV.-Spektrum: Maximum bei 232 $m\mu$ ($\log \epsilon = 4,53$) (Lit. 9): 232 $m\mu$, $\log \epsilon = 4,53$. In Dioxan (vgl. Fig. 1): Maxima bei 234,5 $m\mu$ ($\log \epsilon = 4,46$), 269,5 $m\mu$ ($\log \epsilon = 2,92$) und 280,5 $m\mu$ ($\log \epsilon = 2,79$). IR.-Spektrum (KBr) (vgl. Fig. 2): Banden bei 3400, 3000, 2950, 2920, 1715, 1135, 1080, 1044, 988 cm^{-1} (Lit. 9): 3333, 1715, 984, 956 cm^{-1} in KCl). Zur Analyse 3 Std. bei 100° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_4$ Ber. C 66,1 H 8,7 O 25,2 1 C- CH_3 5,6%
(254,32) Gef. „ 66,1 „ 8,6 „ 25,1 „ 5,4%

2,4-Dinitrophenylhydraxon (BRADY's Reagens): Aus wässrigem Alkohol gelbe Nadeln vom Smp. 208° (Zers.) (Lit. 2): Smp. 209°.

Tetrahydropalitantin (10% Palladium auf Kohle in Alkohol): Aus wässrigem Alkohol farblose Nadeln vom Smp. 106–108° (Lit. 2): Smp. 116°.

Palitantinsäure (Oxydation nach DOEUVRE mit HgJ_2/KJ /verd. Natronlauge): Aus Wasser farblose Nadeln vom Smp. 147–149° (Lit. 2): Smp. 146–148°.

Die folgenden mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch eluierten Fraktionen (558 mg) gaben aus Methanol-Äther 237 mg *Brefeldin A* als farblose Prismen vom Smp. 200–203°. Diese wurden zusammen mit den durch direkte Kristallisation erhaltenen Kristallen nochmals an einer Silicagelsäule gereinigt (Elution mit $\text{Chf} - 2$ bis 5% Methanol) und ergaben nach Kristallisation aus Methanol-Äther 895 mg reines *Brefeldin A* vom Smp. 204–205°. $[\alpha]_D^{22} = +96^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,08$ in Methanol). UV.-Spektrum: Maximum bei 215 $m\mu$ ($\log \epsilon = 4,05$). IR.-Spektrum (KBr) (vgl. Fig. 4): Banden bei 3370, 1711, 1646, 1260, 1115, 1080, 1005, 990, 980 cm^{-1} . Zur Analyse 4 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ Ber. C 68,5 H 8,6 O 22,8 1 C- CH_3 5,36 O- CH_3 0%
(280,35) Gef. „ 68,4 „ 8,5 „ 22,9 „ 4,1 „ 0%

Molekulargewichtsbestimmung nach RAST (in Campher): 285 (Ber. 280,35).

b) Aus *Penicillium spec.* (S 498). Die Kulturbrühe aus einem 50-l-Gärtank wurde nach 28-stg. Fermentation durch eine Schicht Hyflo-Super-Cel filtriert. Der Rückstand wurde mit wenig Wasser nachgewaschen und die vereinigten Filtrate mit dreimal 10 l Essigester ausgezogen. Die Essigester-Lösungen wurden dann im Vakuum eingedampft. Der aus zwei Phasen bestehende ölige Rückstand wurde zwischen 85-proz. wässrigem Methanol und Petroläther verteilt. Der Petrolätherextrakt (22,2 g) wurde nicht weiter untersucht. Die Methanolextrakte wurden im Vakuum stark konzentriert, der Rückstand mit Wasser versetzt und dreimal mit Chloroform

extrahiert. Die mit Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge wurden im Vakuum eingedampft und der Rückstand (0,82 g) an 25 g Silicagel chromatographiert. Die mit Chloroform-Essigester-(4:1) eluierten Fraktionen (362 mg) gaben nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äther 115 mg α -Monostearin als farblose Blättchen vom Smp. 72–73°. Nach Mischprobe und Dünnschicht-Chromatogramm (System: Chloroform-Methanol-(9:1)) identisch mit authent. Material. IR.-Spektrum (KBr) (vgl. Fig. 10): 3350, 1735, 1195, 1180, 720 cm^{-1} . Zur Analyse 4 Std. bei 50° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_4$ (358,55) Ber. C 70,3 H 11,8 O 17,9% Gef. C 70,6 H 11,8 O 18,0%

Die mit Chloroform-Essigester-(7:3) eluierten Fraktionen (323 mg) gaben aus Methanol-Äther 271 mg *Brefeldin A* als farblose Prismen vom Smp. 204–205°, $[\alpha]_D^{25} = +95^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,81$ in Methanol). Misch-Smp. mit dem oben beschriebenen Material: 204–205°. UV.-Spektrum: Maximum bei 216 $m\mu$ ($\log \epsilon = 3,95$). IR.-Spektrum (Nujol-Suspension): Banden bei 3380, 2950, 2860, 1712, 1645, 1454, 1260, 1113, 1080, 1004, 990 und 978 cm^{-1} . Zur Analyse 15 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ (280,35) Ber. C 68,5 H 8,6 1 C–CH₃ 5,4% Gef. C 68,4 H 8,8 C–CH₃ 4,4%

c) *Derivate von Brefeldin A*. – *Di-O-acetyl-brefeldin A*: 800 mg *Brefeldin A* wurden mit 10 ml Pyridin und 5 ml Acetanhydrid 42 Std. bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 1030 mg Neutralteile. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Äther-Pentan farblose Kristalle vom Smp. 130–131°, $[\alpha]_D^{25} = +17^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,95$ in Methanol). IR.-Spektrum (Nujol-Suspension) (vgl. Fig. 7): 1740, 1725, 1707, 1650, 1455, 1370, 1252, 1230, 1080, 1020, 1005, 980 cm^{-1} . UV.-Absorptionsspektrum: Endabsorption bei 210 $m\mu$.

$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_6$ (364,42) Ber. C 65,9 H 7,7 O 26,3% Gef. C 65,6 H 7,7 O 26,5%

Di-O-mesyl-brefeldin A: Eine Lösung von 57 mg *Brefeldin A* in 2 ml Pyridin wurde bei 0° mit 0,09 ml Methansulfonylchlorid versetzt und 24 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung ergab 90 mg Neutralprodukt. Dreimaliges Umkristallisieren aus Äther gab 66 mg farblose Nadeln vom Smp. 130–131° (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = +4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,16$ in Methanol). UV.-Spektrum: Endabsorption bei 210 $m\mu$. IR.-Spektrum (KBr): Banden bei 1700, 1650, 1350, 1265, 1170, 975, 915, 780, 700 cm^{-1} . Zur Analyse 4 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{S}_2$ Ber. C 49,5 H 6,5 O 29,3 S 14,7%
(436,53) Gef. „ 49,5 „ 6,3 „ 29,0 „ 14,4%

Di-O-(p-nitrobenzoyl)-brefeldin A: Eine Lösung von 50 mg *Brefeldin A* in 1 ml Pyridin wurde mit 80 mg *p*-Nitrobenzoylchlorid versetzt und 24 Std. bei 20° stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde in Eiswasser gegossen und nach 20 Min. mit Chloroform extrahiert. Die mit verd. NaHCO_3 -Lösung, 2N HCl und Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge wurden im Vakuum eingedampft und gaben 107 mg Rückstand, der in Chloroform gelöst und durch eine kurze Silicagelsäule filtriert wurde. Das nach Dünnschicht-Chromatographie einheitliche Produkt kristallisierte bisher nicht. Zur weiteren Reinigung wurde zweimal aus benzolischer Lösung mit Pentan ausgefällt. Das beinahe farblose Pulver schmolz bei 87–95°. UV.-Spektrum: Maximum bei 258 $m\mu$ ($\log \epsilon = 4,42$). IR.-Spektrum (KBr): Banden bei 1715, 1610, 1528, 1350, 1275, 1120, 1105, 722 cm^{-1} . Zur Analyse 14 Std. bei 20° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_{10}\text{N}_2$ Ber. C 62,3 H 5,2 O 27,7 N 4,8%
(578,56) Gef. „ 62,5 „ 5,1 „ 27,3 „ 4,9%

Mono- und Di-O-(p-phenylazobenzoyl)-brefeldin A: Eine Lösung von 50 mg *Brefeldin A* in 1 ml Pyridin wurde mit 100 mg *p*-Phenylazo-benzoylchlorid versetzt und 27 Std. bei 20° stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde in Eiswasser gegossen und nach 20 Min. mit Chloroform extrahiert. Die mit verd. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschenen Auszüge gaben nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum 147 mg Rückstand, der an 8 g Silicagel chromatographiert wurde. Die mit Benzol eluierten Fraktionen (65 mg) gaben nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äther-Pentan 23 mg *Di-O-(p-phenylazobenzoyl)-brefeldin A* als orangefarbige Nadeln vom Smp. 154–155°. UV.-Spektrum: Maxima bei 226 $m\mu$ ($\log \epsilon = 4,76$) und 450 $m\mu$ ($\log \epsilon = 3,17$). IR.-Spektrum (KBr): Banden bei 1720, 1710, 1275, 1260, 1110, 865, 780, 700 cm^{-1} . Zur Analyse 3 Std. bei 100° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{42}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}_4$ Ber. C 72,4 H 5,8 O 13,8 N 8,0%
(696,77) Gef. „ 72,6 „ 5,7 „ 13,8 „ 8,2%

Die mit Chloroform-Methanol-(99:1) eluierten Fraktionen (53 mg) gaben nach Umkristallisieren aus Methanol bzw. Chloroform-Pentan 20 mg *Mono-O-(p-phenylazobenzoyl)-brefeldin A* als blass-orange-farbige Nadeln vom Smp. 192–194°.

Tetrahydrobrefeldin A: Eine Lösung von 141 mg Brefeldin A in 10 ml Äthanol wurde in Gegenwart von 30 mg 10-proz. Pd-Kohle hydriert. Wasserstoffaufnahme: 23,45 ml (= 2,08 Mol.). Der Katalysator wurde abfiltriert, das Äthanol im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Nach dem Waschen der Lösung mit Wasser, verd. NaHCO_3 -Lösung, Wasser und Eindampfen verblieben 146 mg Rohprodukt. Mehrmaliges Umkristallisieren aus Äther gab farblose Kristalle vom Smp. 134°. $[\alpha]_D^{22} = +1,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,00$ in Methanol). UV.-Spektrum: Keine selektive Absorption zwischen 210 und 360 μ . IR.-Spektrum (KBr): Banden bei 3300, 1730, 1245, 1093, 1045, 970, 850, 820, 700 cm^{-1} . Zur Analyse 4 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_4$ (284,38) Ber. C 67,6 H 9,9 O 22,5% Gef. C 67,4 H 9,8 O 22,9%

Diketon aus Tetrahydrobrefeldin A: Eine Lösung von 150 mg Tetrahydrobrefeldin A in 75 ml Aceton wurde unter starkem Rühren mit 1,5 ml CrO_3 -Reagens (100 ml enthalten 26,7 g CrO_3 , 21,3 ml konz. H_2SO_4 und Wasser) versetzt. Nach 5 Min. bei 20° setzte man 1,5 ml Methanol zu und goss nach weiteren 5 Min. auf 200 ml Eiswasser. Durch Extraktion mit dreimal je 150 ml Äther, der zweimal mit verd. NaHCO_3 -Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen wurde, erhielt man 148 mg Rohprodukt. Zweimaliges Umkristallisieren aus Äther-Pentan gab 129 mg farblose Kristalle vom Smp. 174,5–175°. $[\alpha]_D^{22} = -70^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,93$ in Methanol). UV.-Spektrum: Maximum bei 283 μ ($\log \epsilon = 1,73$). IR.-Spektrum (KBr) (vgl. Fig. 6): Banden bei 2940, 2860, 1740 Schulter, 1727, 1695, 1460, 1405, 1370, 1270, 1185, 1120, 1035, 985, 950 cm^{-1} . Zur Analyse 14 Std. bei 40° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ (280,35) Ber. C 68,5 H 8,6 O 22,8% Gef. C 68,8 H 8,8 O 22,5%

d) *Derivate von Brefeldin B*. – *Brefeldin-B-methylester*: Eine Lösung von 123 mg Brefeldin B in 5 ml Methylenchlorid wurde bei 0° mit ätherischem Diazomethan versetzt und nach 15 Min. im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand (146 mg) wurde an 5 g Silicagel chromatographiert. Die mit Benzol-Chloroform-(1:9) und Chloroform eluierten, nach Dünnschicht-Chromatogramm einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt (105 mg farbloses Öl). Keine der Fraktionen kristallisierte bisher. IR.-Spektrum (in CH_2Cl_2): Banden bei 3550, 2930, 2860, 1750, 1720, 1460, 1440, 1210, 1070, 1020 cm^{-1} .

Mono-O-mesyl-brefeldin-B-methylester: Eine Lösung von 47 mg Brefeldin-B-methylester in 2 ml Pyridin wurde bei 0° mit 0,1 ml Methansulfonsäurechlorid versetzt und 22 Std. bei 20° stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit 20 ml Chloroform verdünnt und der Reihe nach gewaschen mit: dreimal 2N HCl, zweimal 0,5N Na_2CO_3 und zweimal Wasser. Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum ergab 52 mg Neutralteil (gelbes Öl), der an 2,5 g Silicagel chromatographiert wurde. Die mit Benzol-Chloroform-(1:1) eluierten Fraktionen (39 mg) gaben aus Äther-Pentan 26 mg farblose Prismen vom Smp. 140–141°. IR.-Spektrum (in CH_2Cl_2) (vgl. Fig. 9): Banden bei 2920, 2840, 1745, 1733, 1350, 1200, 1175, 1070, 940, 930, 845 cm^{-1} . Zur Analyse 4 Std. bei 60° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{S}$ Ber. C 57,0 H 7,3 O 26,8 S 8,9%
(358,45) Gef. „ 56,9 „ 7,3 „ 26,4 „ 8,7%

SUMMARY

Two new mold metabolites, Brefeldin A ($\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_4$) and Brefeldin B ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$), have been isolated from the fermentation broth of a strain of *Penicillium brefeldianum* DODGE. Their chemical, physical and biological properties have been described.

The same mold also produced Palitantin and Frequentin, previously isolated from *P. palitans* WESTLING, *P. frequentans* WESTLING and *P. cyclopium* (Palitantin only).

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien und
Abteilung für Medizinisch-Biologische Forschung,
SANDOZ AG, Basel