

- [23] W. HÜCKEL *et al.*, Liebigs Ann. Chem. **624**, 142 (1959).
 [24] S. WINSTEIN & N. J. HOLNESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 5562 (1955).
 [25] H. STETTER, M. SCHWARZ & A. HIRSCHHORN, Chem. Ber. **92**, 1629 (1959).
 [25a] K. GERZON, E. V. KRUMKALNS, R. A. BRINDLE, F. J. MARSHALL & M. A. ROOT, J. med. Chemistry **6**, 760 (1963).
 [26] H. STETTER & E. RAUSCHER, Chem. Ber. **93**, 2054 (1960).
 [27] V. N. IPATIEFF, H. PINES & R. C. OLBERG, J. Amer. chem. Soc. **68**, 1709 (1946).
 [28] C. A. GROB, H. P. FISCHER, H. LINK & E. RENK, Helv. **46**, 1190 (1963).
 [29] A. STREITWIESER, «Solvolytic Displacement Reactions», New York 1962, S. 96ff.
 [30] A. STREITWIESER JR. & A. C. WAISS JR., J. org. Chemistry **27**, 290 (1962).
 [31] S. NISHIDA, J. Amer. chem. Soc. **82**, 4290 (1960).
 [32] A. H. NETHERCOT JR. & A. JAVAN, J. chem. Physics **21**, 363 (1953); J. J. MACFARLANE & I. G. ROSS, J. chem. Soc. **1960**, 4169.
 [33] R. C. FORT JR. & P. V. R. SCHLEYER, Abstracts of Papers Presented at the 17th Meeting ACS, Philadelphia, April 1964, pp. 22N.
 [34] C. A. GROB, H. P. FISCHER, W. RAUDENBUSCH & J. ZERGENYI, Helv. **47**, 1003 (1964).
 [35] W. SIMON, Chimia **14**, 189 (1960).
 [36] I. ALKONYI, Chem. Ber. **92**, 1130 (1959). a) Dieser Autor erhielt bei der Äthanolyse 61% Olefin.
 [37] E. L. ELIEL & H. HAUBENSTOCK, J. org. Chemistry **26**, 3504 (1961).
 [38] R. B. SCOTT & J. B. GAYLE, J. org. Chemistry **21**, 391 (1956).
 [39] H. H. BOSSHARD, R. MORY, M. SCHMID & HCH. ZOLLINGER, Helv. **42**, 1653 (1959).
 [40] P. D. BARTLETT & L. H. KNOX, J. Amer. chem. Soc. **61**, 3184 (1939).
 [41] P. V. R. SCHLEYER, J. Amer. chem. Soc. **79**, 3292 (1957); P. V. R. SCHLEYER & M. M. DONALDSON, *ibid.* **82**, 4645 (1960); P. V. R. SCHLEYER *et al.*, Organic Syntheses **42**, 8 (1962).
 [42] S. HALA & S. LANDA, Collect. Czechoslov. chem. Commun. **25**, 2692 (1960).
 [43] E. KNOEVENAGEL & C. FISCHER, Liebigs Ann. Chem. **297**, 185 (1897).

152. Die Konstitution von Brefeldin A¹⁾

von H. P. Sigg

(16. V. 64)

Kürzlich berichteten wir [1]^{1a)} über die Isolierung von Brefeldin A aus dem Kulturfiltrat von *Penicillium brefeldianum*. Dieser Metabolit zeigt eine mässige antibiotische Aktivität gegen Sprosspilze und besitzt eine cytostatische Wirkung bei relativ geringer Toxizität.

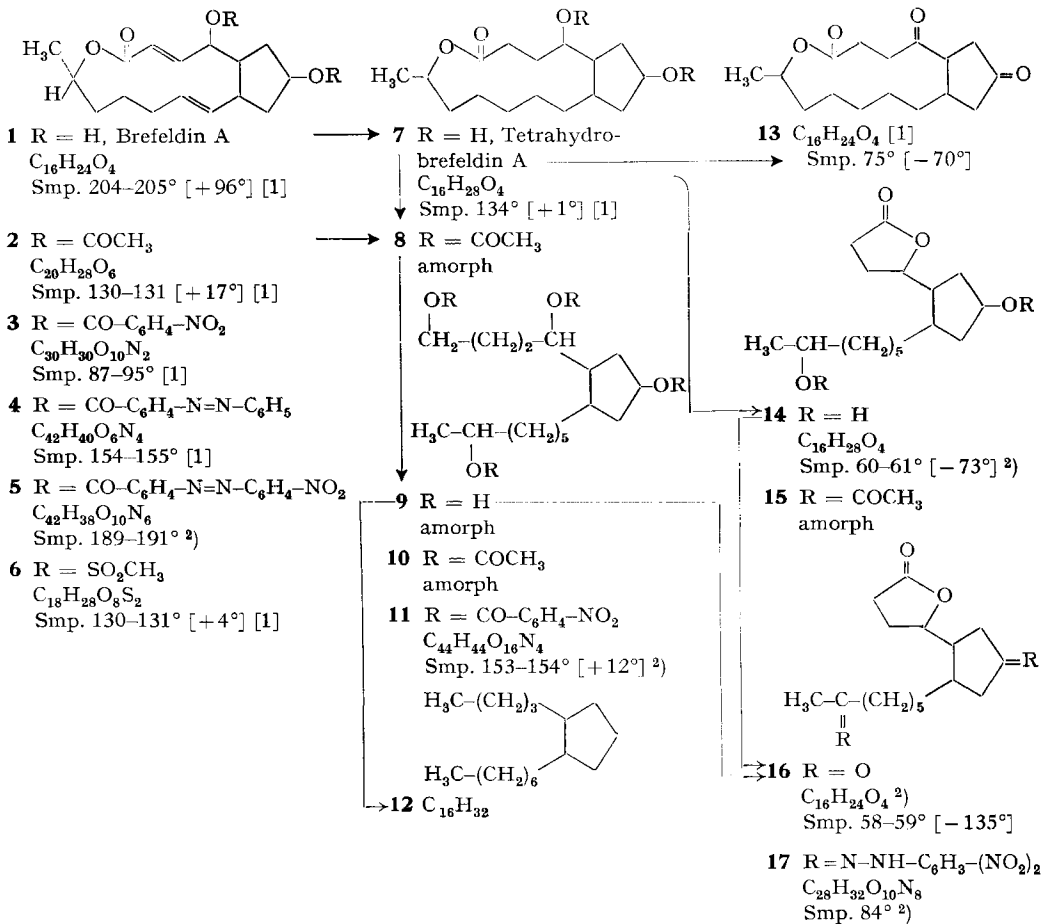
Brefeldin A ist ein lipophiler Neutralstoff der Summenformel C₁₆H₂₄O₄, dessen analytische Daten und chemisches Verhalten auf das Vorhandensein von zwei sekundären Hydroxylgruppen, einer Ester- resp. Lacton-Funktion sowie von zwei Doppelbindungen, deren eine in Konjugation zur Carboxylgruppe stehen muss, schliessen lassen [1].

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Resultate des Abbaus von Brefeldin A, die zur Aufstellung der Konstitutionsformel **1** geführt haben.

¹⁾ Anmerkung bei der Korrektur (7. VIII. 64): *Decumbin*, ein Stoffwechselprodukt von *Penicillium decumbens* THOM [19], wurde kürzlich genauer beschrieben [20] und ist mit Brefeldin A identisch. Wir danken Hrn. Dr. N. BOHONOS, LEDERLE LABORATORIES, Pearl River, N. Y., USA, für den direkten Vergleich der beiden Substanzen.

^{1a)} Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1415.

Formelschema 1



Um einen Einblick in die Natur der Carboxylfunktion zu erhalten, reduzierten wir Di-O-acetyl-tetrahydrobrefeldin A (**8**) mit LiAlH₄. Den resultierenden polyfunktionellen Alkohol **9** setzten wir mit Acetanhydrid zum Acetat **10** und mit *p*-Nitrobenzoylchlorid zum kristallinen Ester **11** um, dessen Analysen auf die Summenformel (C₁₁H₁₁O₄N)_n passten. Da aber die mehrfach durchgeführten Molekulargewichtsbestimmungen (RAST, thermoelektrische Methode) keine eindeutigen Resultate ergaben, haben wir den Alkohol **9** durch eine Folge weiterer Reduktionsstufen (HJ, LiAlH₄, H₂-Pt) [2] zum Kohlenwasserstoff abgebaut. Obwohl das Gas-Chromatogramm die Anwesenheit von zwei kaum trennbaren Hauptprodukten im Verhältnis 7:1 aufzeigte, gab das Massenspektrum³⁾ (Molekularspitzen bei *M* = 224 resp. 222, entsprechend C₁₆H₃₂ und C₁₆H₃₀) den eindeutigen Hinweis, dass noch das

²⁾ Experimenteller Teil dieser Arbeit.

³⁾ Wir danken Herrn Dr. J. SEIBL, ETH Zürich, bestens für die Aufnahme der Massenspektren (Massenspektrometer AEI, Modell MS-2-H).

gesamte Kohlenstoffgerüst von Brefeldin A vorhanden sein musste und demzufolge eine Lacton- und keine Ester-Funktion vorgelegen haben muss. Der Kohlenwasserstoff **12** enthält zwei Äthylgruppen, da das NMR.-Spektrum⁴⁾ bei $\delta = 0,88$ ein Signal zeigt, das 6 Protonen entspricht. Zu diesem indirekten Wege der Beweisführung mussten wir Zuflucht nehmen, da die Hydrolysenversuche mit Brefeldin A kein kristallines Produkt ergaben. Die Verseifung mit methanolischer Kalilauge gab nach Ansäuern des Reaktionsgemisches hauptsächlich ein Neutralprodukt, das im IR.-Spektrum Banden bei 3600, 3500 und 1770 cm^{-1} , resp. im NMR.-Spektrum u. a. ein Singlett bei $\delta = 3,26$ (3 Protonen) und ein Dublett bei $\delta = 1,20$ (3 Protonen) zeigte. Eine Interpretation dieser Daten soll weiter unten erfolgen.

Die Oxydation von Alkohol **9** mit überschüssigem CrO_3 ergab ein Neutralprodukt **16** der Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$, Smp. 58–59° und $[\alpha]_D^{21} = -135^\circ$. Das IR.-Spektrum liess auf das Vorhandensein eines γ -Lactons (1770, 1190 cm^{-1}), eines Fünfringketons (1735 cm^{-1}) und eines Ketons in einer Kette oder einem grösseren Ring (1710 cm^{-1}) schliessen. **16** gab erwartungsgemäss ein Di-(2,4-dinitrophenylhydrazon) **17**, sowie eine positive Haloform-Reaktion, was die Postulation eines Methylketons erlaubt. **16** ist isomer mit dem Diketolacton **13**, das bei der Oxydation von Tetrahydrobrefeldin A (**7**) erhalten wurde [1] und im IR.-Spektrum Banden für ein Fünfringketon (1740 cm^{-1}), ein Lacton (1720 cm^{-1}) und ein Keton (1700 cm^{-1} , Schulter) zeigte. Das Diketo- γ -lacton **16** liess sich auch auf folgendem Wege aus Tetrahydrobrefeldin A (**7**) erhalten: Verseifung mit methanolischer Kalilauge und Isolierung des Produktes aus der angesäuerten Lösung gab ein neutrales Dihydroxylacton **14** vom Smp. 60–61° und der Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_4$. **14** ist also isomer mit dem Ausgangsmaterial und dürfte aus diesem durch Umlagerung des Lactonringes entstanden sein, denn im IR.-Spektrum zeigt es Banden für die Hydroxylgruppen bei 3600 resp. 3500 cm^{-1} und für das neu entstandene Lacton bei 1760 cm^{-1} . Die Acetylierung von **14** ergab ein nicht kristallisierendes Di-O-acetylderivat **15**, während die Oxydation mit CrO_3 zu dem bereits oben erwähnten Diketo- γ -lacton **16** führte.

Die Entstehung eines Fünfringlactons bei der Verseifung von **7**, resp. bei der Oxydation von **9**, beweist, dass in γ -Stellung zum Lacton in Brefeldin A, resp. zum entsprechenden primären Alkohol in **9**, eine Hydroxylgruppe vorhanden sein muss⁵⁾. Zusätzliche Informationen ergaben sich aus den NMR.-Spektren dieser Substanzen:

Von Brefeldin A selbst konnten wir zufolge seiner ungünstigen Lösungseigenschaften kein Spektrum mit genügend starken Signalen aufnehmen. In den nicht umgelagerten Derivaten wie **2** (vgl. Fig. 1), **6**, **7** und **8** war jeweils ein Dublett bei ca. $\delta = 1,25$ mit einer Kupplungskonstante von 6,5 cps sichtbar. Es handelt sich offensichtlich um eine Methylgruppe an einem gesättigten Kohlenwasserstoff, deren Signal durch Kopplung mit einem Proton aufgespalten wird. Mit Hilfe der Spin-

4) Aufgenommen mit einem VARIAN-Kernresonanzspektrographen A-60. Chemische Verschiebung in δ -Werten (ppm relativ zu Tetramethylsilan als internem Standard). Substanzen jeweils in CDCl_3 gelöst.

5) Analog interpretieren wir die Verseifung von Brefeldin A: auch hier findet die Umlagerung zu einem γ -Lacton statt (1770 cm^{-1}), wobei zusätzlich eine Mol. Methanol, vermutlich in β -Stellung zur Carboxylgruppe, angelagert wird (Singlett für drei Protonen bei $\delta = 3,26$).

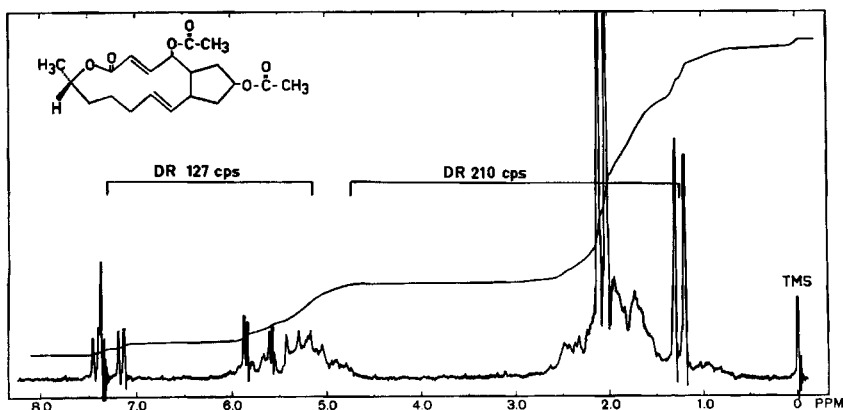
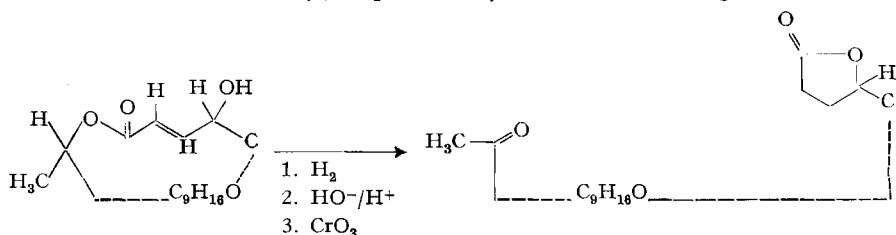


Fig. 1. NMR.-Spektrum von Di-O-acetyl-brefeldin A (2) (DR = Doppelresonanz)

Entkopplungsmethode (Doppelresonanz) [3] konnten wir zeigen⁶⁾, dass dessen Signal bei ca. $\delta = 4,75$ liegen muss, was dafür spricht, dass das entsprechende Kohlenstoffatom auch eine Sauerstofffunktion trägt. Im umgelagerten Dihydroxy- γ -lacton **14** liegt das Dublett der Methylgruppe bei $\delta = 1,16$, während es im Diketo- γ -lacton **16** zu einem Singlett bei $\delta = 2,13$ reduziert wird, was eine schon früher postulierte Methylketo-Gruppe in dieser Verbindung beweist. Da im Diketo- γ -lacton **13** die Methylgruppe ein Dublett verursacht, muss die Sauerstofffunktion am benachbarten Kohlenstoff durch das Lacton maskiert sein.

Im NMR.-Spektrum von **2** (vgl. Fig. 1) lässt sich auch ein *AMX*-Spin-System erkennen. Die entsprechenden aufgespaltenen Dublette liegen bei $\delta = 5,2$, $\delta = 5,8$ und $\delta = 7,2$, mit Kopplungskonstanten von $J_{AM} = 1,8$ cps, $J_{AX} = 3,5$ cps und $J_{MX} = 15,5$ cps. Der *X*-Komponente bei $\delta = 7,2$ ordnen wir das β -Proton des α, β -ungesättigten Lactons zu. Die Kopplungskonstante J_{MX} von 15,5 cps beweist die *trans*-Stellung dieser beiden Protonen. Die Lage von Wasserstoff A wurde durch eine Spin-Entkopplungs-Untersuchung⁶⁾ zu $\delta = 5,2$ bestimmt, was eine Sauerstofffunktion am betreffenden Kohlenstoff (in γ -Stellung zum Lacton) verlangt. Die Signale der beiden anderen Vinylprotonen fallen mit anderen Banden zusammen und konnten nicht zugeordnet werden.

Wenn wir alle bisherigen Argumente berücksichtigen, so können wir die folgenden Teilformeln für Brefeldin A (**1**) resp. Diketo- γ -lacton **16** vorschlagen:



⁶⁾ Wir danken Herrn Dr. A. MELERA, VARIAN A.G. Research Laboratory, Zürich, bestens für die Ausführung und Interpretation dieser Spektren.

Alle Versuche zur Dehydrierung von Brefeldin A (CrO_3 -Eisessig, CrO_3 - H_2SO_4 , MnO_2 , Pt-O_2) ergaben komplexe Gemische, aus denen keine einheitliche, gut charakterisierbare Substanz isoliert werden konnte.

Einen tieferen Einblick in die Struktur von Brefeldin A erhielten wir durch den oxydativen Abbau. Behandlung von **1** mit Kaliumpermanganat nach vorausgehender Verseifung mit 2N NaOH führte einzig zur Isolierung von Oxalsäure und zum Nachweis von Glutar-, Bernstein- und Malonsäure (als ihre Methylester) im Gas-Chromatogramm.

Etwas mehr Aufschluss gab uns die Ozonisation der Diacetylverbindung **2**. Bei oxydativer Aufarbeitung mit H_2O_2 - HCOOH und nachfolgender Verseifung, Veresterung und Nachoxydation mit CrO_3 erhielten wir ein komplexes Estergemisch, dessen teilweise Auftrennung uns nur im Gas-Chromatographen gelang. Eine der so erhaltenen Fraktionen konnte durch Interpretation der Spektren (NMR.: vgl. Fig. 2; IR.: 1750 Schulter, 1740 cm^{-1} , vgl. Fig. 3) als Cyclopentanon-3,4-*trans*-dicarbonsäure-dimethylester (**26a**) [4] erkannt und mit einem synthetischen, racemischen Präparat identifiziert werden.

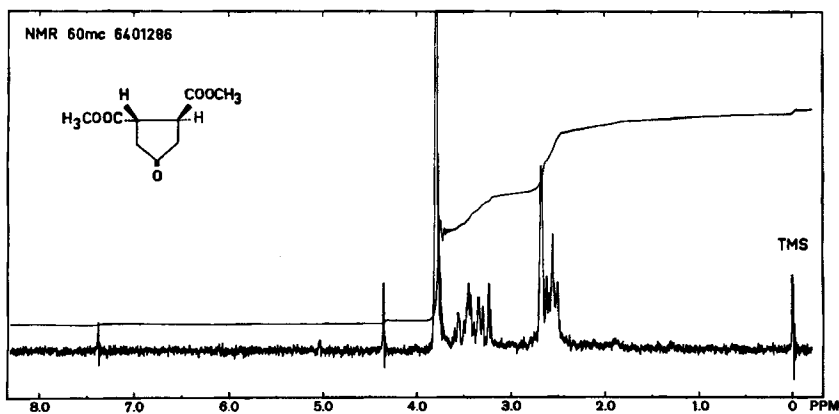


Fig. 2. NMR.-Spektrum von Cyclopentanon-3,4-*trans*-dicarbonsäure-dimethylester (**26a**) (Signale bei $\delta = 4,3$ und $\delta = 3,2$ sind Rotations-Seitenbänder)

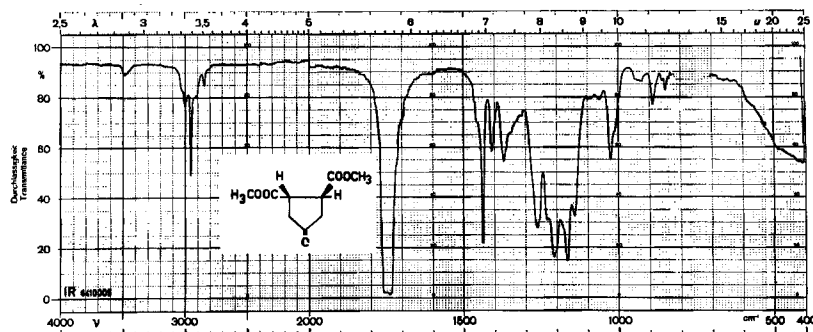
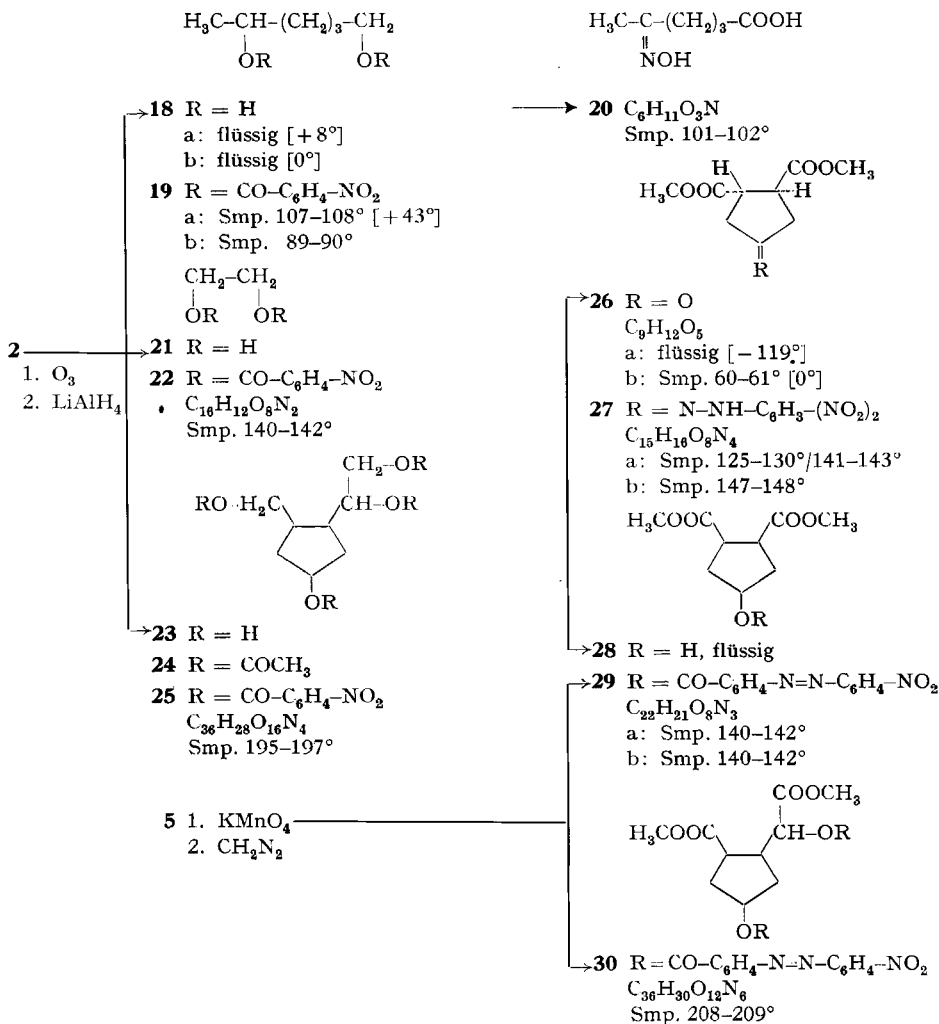


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektrum von Cyclopentanon-3,4-*trans*-dicarbonsäure-dimethylester (**26a**) (Tetrachlorkohlenstoff)

Formelschema 2



Bedeutend einfacher war die Isolierung der Produkte bei der reduktiven Aufarbeitung (LiAlH₄) [5] des Ozonisierungsgemisches. Kontinuierliche Extraktion der angesäuerten Reaktionslösung mit Äther ergab den schwach positiv drehenden Alkohol **18a**, dessen Di-O-(*p*-nitrobenzoat) **19a** mit dem entsprechenden authentischen (±)-Hexandiol-(1,5)-Derivat **19b** identifiziert werden konnte. Die Oxidation des Diols **18a** mit CrO₃ ergab δ-Ketocapronsäure, deren Oxim **20** ebenfalls mit einem authentischen Produkt [6] identisch war. Dem (+)-Hexandiol-(1,5) kommt die (*S*)-Konfiguration zu, da das entsprechende (+)-(*S*)-Hexanol-2 mit der (-)-(*R*)-Milchsäure resp. dem (+)-(*R*)-Glycerinaldehyd in Beziehung gebracht worden ist [7].

Die extrahierte wässrige Phase der LiAlH₄-Reaktionslösung wurde mit einem Mischbett-Ionenaustauscher entsalzt und im Vakuum eingedampft. Das Produkten-

gemischt wurde ohne weitere Reinigung zu einem flüssigen Tetraacetat **24** und zum kristallinen Tetra-(*p*-nitrobenzoat) **25** der Summenformel $C_8H_{12}O_4(C_7H_4O_3N)_4$ umgesetzt. In den bei der Chromatographie anfallenden Nebenfraktionen war jeweils noch das entsprechende Derivat des Äthylenglykols nachweisbar.

Dass dem Hauptprodukt die Struktur **23** zukommen muss, wurde auf folgendem Wege bewiesen: Obwohl weder mit Phosgen noch mit Thionylchlorid ein einheitliches Cyclo-carbonat resp. -sulfit erhalten werden konnte, ergab sich die Glykol-Gruppierung aus der Oxydierbarkeit mit Perjodat. Auf die Isolierung des Formaldehyds wurde verzichtet, da im Ausgangsmaterial ja auch noch Äthylenglykol enthalten war. Die Oxydation des Spaltproduktes mit Chromsäure und anschliessende Methylierung mit Diazomethan ergab wiederum den Cyclopentanon-3,4-*trans*-dicarbonsäure-dimethylester (**26a**) mit $[\alpha]_D = -119^\circ$. Eine Bestätigung der vorgeschlagenen Formel **23** erhielten wir beim Permanganat-Abbau des Di-O-acyl-Derivates **5** [8]. Das Hauptprodukt **30**, isoliert als Methylester vom Smp. 208–209° und der Summenformel $C_{36}H_{30}O_{12}N_6$, enthält zwei Carboxylgruppen und die bereits im Ausgangsmaterial vorhandenen zwei O-Acylgruppen. Als Nebenprodukt wurde eine Substanz **29a** der Summenformel $C_{22}H_{21}O_8N_3$ isoliert, die ebenfalls zwei Carboxyl-, aber nur noch eine O-Acyl-Gruppe enthält. Dieses Produkt konnte mit dem synthetischen Derivat **29b**, das durch Reduktion des (\pm)-Cyclopentanonderivates **26b** mit $NaBH_4$ und Acylierung mit *p*-(*p*'-Nitrophenylazo)-benzoylchlorid erhalten wurde, identifiziert werden. Damit kommt für die um eine $CHO(C_{13}H_8O_3N_3)$ -Einheit grössere Formel **30** nur die vorgeschlagene Strukturformel in Frage. Die NMR.-Spektren dieser Abbauprodukte sind vollständig im Einklang mit allen vorgeschlagenen Konstitutionen, doch liessen sie sich meist zufolge Komplexizität der Banden nicht im Detail interpretieren. Der Ozonabbau hat uns somit drei Bruchstücke gegeben, die alle 16 Kohlenstoffe von Brefeldin A enthalten, nämlich: (+)-(S)-Hexandiol-(1,5) (**18a**), Äthylenglykol (**21**) und 3,4-*trans*-3-hydroxymethyl-4-(1',2'-dihydroxyäthyl)-cyclopentanol (**23**).

Unter Berücksichtigung der auf Seite 1404 vorgeschlagene Teilstruktur lassen sich diese Bruchstücke in eindeutiger Weise zur Konstitutionsformel **1** für Brefeldin A zusammenfügen. Über die Stereochemie der beiden Hydroxylgruppen und der isolierten Doppelbindung können wir keine Angaben machen, da die NMR.- und IR.-Spektren keine eindeutigen Aussagen ermöglichen. Doch geht aus dem Abbau hervor, dass der Cyclopentanring *trans*-artig mit dem Lactonring verknüpft ist.

Brefeldin A mit seinem 13-gliedrigen Lactonring gehört somit zur Klasse der Makrolide [9], deren Ringgrössen von 12 (Methymycin, Pikromycin) bis 30 (Filipin) schwanken [10]. Bei höheren Pilzen ist diese Substanzklasse nur wenig vertreten: Curvularin [11], $C_{16}H_{20}O_5$, besitzt einen 12-gliedrigen Lactonring und Radicol [12] (= Monorden [13]), $C_{18}H_{17}O_6Cl$, einen 14-gliedrigen. Ein typischer Unterschied zu den Makroliden aus Actinomyceten besteht in der Abwesenheit von Zuckerresten und der Substitution des Lactonrings durch eine einzige Methylgruppe.

Die Biogenese von Brefeldin A dürfte in üblicher Weise dem Schema des Aufbaus aus Acetat- resp. Malonat-Einheiten entsprechen [14], doch soll diese Aussage, insbesondere um die Verhältnisse im Cyclopentanring sicherzustellen, noch experimentell überprüft werden.

Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden im evakuierten Röhrchen bestimmt und sind nicht korrigiert. Substanzproben zur Messung der spezifischen 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 Chromatogramme wurden nach der Durchlaufmethode [15] an Kieselgel MERCK (0,2–0,5 mm) und Dünnschichtchromatogramme nach der von STAHL [16] beschriebenen Methode auf Kieselgel G durchgeführt. Das CrO₃-Reagens [17] enthält auf 100 ml 26,7 g CrO₃, 21,3 ml konz. H₂SO₄ und Wasser.

1. Derivate von Brefeldin A. – 1.1. *Di-O*-[*p*-(*p'*-nitrophenylazo)-benzoyl]-brefeldin A (**5**): Zu einer Lösung von 260 mg Brefeldin A (**1**) in 10 ml Pyridin wurde unter Kühlung mit Eis eine Lösung von 1050 mg *p*-(*p'*-Nitrophenylazo)-benzoylchlorid (4 äq.) in 20 ml Benzol getropft. Anschliessend wurde 72 Std. bei 20° stehengelassen, alsdann das Reaktionsgemisch auf zerstoßenes Eis gegossen und mit dreimal 300 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wurde der Reihe nach mit dreimal 2N H₂SO₄, zweimal 2N Sodalösung und zweimal Wasser gewaschen, wobei in den wässrigen und organischen Phasen ein Niederschlag entstand. Das Chloroform wurde filtriert, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand (824 mg) wurde mit total 80 ml Benzol durch 25 g Alox neutral (Aktivität 3) filtriert. Der Rückstand aus dem Filtrat gab nach zweimaligem Umkristallisieren aus Benzol-Äther 655 mg blassrote Kristalle **5** vom Smp. 189–191°. UV.-Spektrum: Maxima bei 333 m μ ($\log \epsilon = 4,77$) und 466 m μ ($\log \epsilon = 3,16$) (Chloroform). IR.-Spektrum: Banden bei 1710, 1650, 1610, 1530, 1350, 1110, 1010, 970, 860 cm⁻¹ (Methylenchlorid). Zur Analyse 3 Std. bei 100° und 0,01 Torr getrocknet.

C₄₂H₃₆O₁₀N₆ (786,81) Ber. C 64,1 H 4,9 N 10,7% Gef. C 64,2 H 5,0 N 10,8%

1.2. *Mono-O*-[*p*-(*p'*-nitrophenylazo)-benzoyl]-brefeldin A: Der Umsatz von 150 mg Brefeldin A (**1**) in 5 ml Dioxan und 126 mg Pyridin (3 äq.) mit 384 mg *p*-(*p'*-Nitrophenylazo)-benzoylchlorid (2,5 äq.) in 10 ml Benzol während 64 Std. gab bei analoger Aufarbeitung 253 mg Rückstand, der an 7 g Alox neutral (Aktivität 3) chromatographiert wurde. Die mit Petroläther-Benzol und Benzol eluierten Fraktionen (62 mg) gaben aus Benzol-Äther 50 mg **5** vom Smp. 189–191°.

Die mit Benzol-Chloroform-(1:1) und Chloroform eluierten Fraktionen (73 mg) gaben aus Chloroform-Äther 51 mg *Mono-O*-[*p*-(*p'*-nitrophenylazo)-benzoyl]-brefeldin A als blassrosa Kristalle vom Smp. 208,5–209°. UV.-Spektrum: Maxima bei 328 m μ ($\log \epsilon = 4,54$) und 462 m μ ($\log \epsilon = 2,85$). IR.-Spektrum: Banden bei 1710, 1640, 1610, 1590, 1530, 1350, 1110, 1070, 1010, 980, 970, 870 cm⁻¹ (Methylenchlorid). Zur Analyse 3 Std. bei 100° und 0,01 Torr getrocknet.

C₂₆H₃₁O₇N₃ (533,59) Ber. C 65,3 H 5,9 N 7,9% Gef. C 65,1 H 5,9 N 7,6%

Mit Chloroform-Methanol-(99:1) bis (98:2) liessen sich noch 70 mg Ausgangsmaterial **1** eluieren.

2. Derivate von Tetrahydrobrefeldin A (7). – 2.1. *Reduktion zu Tetrol 9*: 275 mg Tetrahydrobrefeldin A (**7**) wurden mit 5 ml Pyridin und 2,5 ml Acetanhydrid 15 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 321 mg Neutralteil als farbloses Öl, das an 10 g Kieselgel chromatographiert wurde. Die mit Chloroform eluierten, dünnschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt und gaben 295 mg **8** als farbloses Öl. IR.-Spektrum: Banden bei 1730, 1450, 1380, 1030, 950 cm⁻¹ (Methylenchlorid).

Eine Lösung von 360 mg *Di-O*-acetyl-brefeldin A (**2**) in 15 ml reinem Äthanol wurde in Gegenwart von 100 mg 10-proz. Pd-Kohle hydriert. Wasserstoffaufnahme: 47 ml (= 2,1 Mol.). Der Katalysator wurde abfiltriert, das Äthanol abdestilliert und der in Chloroform gelöste Rückstand durch 5 g Kieselgel filtriert. Nach dem Eindampfen erhielten wir ein farbloses Öl (347 mg), das nach Dünnschichtchromatogramm und IR.-Spektrum mit **8** identisch war.

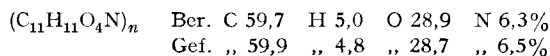
Zur Lösung von 282 mg **8** in 50 ml abs. Äther wurden 500 mg LiAlH₄ in 40 ml Äther gegeben und 15 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Zerstören des überschüssigen Reduktionsmittels mit Wasser wurde mit 2N H₂SO₄ auf pH 2 gebracht, mit Na₂SO₄ gesättigt und 16 Std. im Apparat nach KUTSCHER-STEUDEL ausgeäthert. Nach dem Verdampfen des Äthers erhielten wir **9** als farbloses Öl (178 mg).

13,4 mg **9** in 14 ml Methanol-Wasser-(6:1) wurden mit 5 ml HJO₄-Reagens (1,25 g Natriumparaperjodat wurden in 70 ml Wasser und 4 ml 2N H₂SO₄ gelöst, filtriert und mit Wasser auf

100 ml aufgefüllt) versetzt und die Lösung mit Methanol auf 25 ml gebracht. Titration von 5-ml-Aliquoten nach 4 bzw. 7,5 Std. mit 0,02N Natriumthiosulfat-Lösung ergaben keinen Verbrauch von HJO_4 .

2.1.1. Derivate von Tetrol 9. – Di-O-acetylderivat von 9: 40 mg Tetrol **9** wurden mit 1 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid 16 Std. bei 22° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 55 mg Rohprodukt, das an Kieselgel chromatographiert wurde. Die mit Methylenchlorid eluierten, dünn-schichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt und gaben 37 mg **10** als farbloses Öl. IR.-Spektrum: Banden bei 1725, 1380, 1250, 1020, 950 cm^{-1} (Methylenchlorid). NMR.-Spektrum: u. a. Singlette bei $\delta = 2,05$ (6 Protonen) und $\delta = 2,02$ (6 Protonen); Dublett bei $\delta = 1,21$ ($J = 6,5$ cps, 3 Protonen).

Di-O-(p-nitrobenzoyl)-Derivat von 9: Zur Lösung von 130 mg **9** in 5 ml Pyridin wurden 600 mg *p*-Nitrobenzoylchlorid gegeben und 24 Std. bei 22° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 557 mg Rohprodukt, das an 17 g Kieselgel chromatographiert wurde. Die mit Chloroform eluierten Fraktionen (298 mg) wurden in Methylenchlorid gelöst und durch 6g Alox neutral perkoliert. Das Filtrat wurde sehr stark eingeeengt und mit Äther versetzt, worauf spontan Kristallisation einsetzte. Das aus Methylenchlorid-Äther umkristallisierte Produkt **11** gab Prismen vom Smp. 153–154° und $[\alpha]_D^{25} = +12^\circ$ ($c = 1,02$ in Chloroform). UV.-Spektrum: Maximum bei 260 μ ($\log \epsilon = 4,73$) (in Chloroform). IR.-Spektrum: Banden bei 1715, 1610, 1530, 1350, 1120, 1110, 1020, 840, 830 cm^{-1} (Methylenchlorid). Zur Analyse 4 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet.



Molekulargewichtsbestimmungen nach RAST: 478, 658, 659,5, bzw. nach der thermoelektrischen Methode: 868⁷⁾. Das Molekulargewicht für $n = 4$ beträgt 884,84.

2.1.2. Reduktion zum Kohlenwasserstoff 12: 224 mg Tetrol **9** und 250 mg roter Phosphor wurden in 10 ml konz. HJ während 24 Std. am Rückflusskühler gekocht. Das rotbraune Reaktionsprodukt wurde auf zertossenes Eis gegossen und dreimal mit 50 ml Äther extrahiert. Die zweimal mit 2-proz. Natriumthiosulfat-Lösung und Wasser gewaschenen Auszüge gaben nach Trocknen über Na_2SO_4 259 mg Rückstand.

Dieser wurde in 30 ml peroxidfreiem Tetrahydrofuran gelöst und mit 500 mg LiAlH_4 15 Std. am Rückflusskühler gekocht. Nach Zerstörung des überschüssigen Reaktionsmittels mit Essigester wurde mit 30 ml kalter 2N H_2SO_4 angesäuert und mit dreimal 200 ml Äther extrahiert. Die mit Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben 194 mg Rückstand. Dieser wurde mit total 50 ml *n*-Hexan durch 6 g neutrales Alox (Aktivität 1) filtriert. Zum Filtrat wurden 10 mg $\text{PtO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ gegeben und während 16 Std. hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Hexan abdestilliert und der Rückstand (90 mg) bei 80–120° Badtemperatur und 0,03–0,1 Torr destilliert. Das farblose Destillat (68 mg) wurde im Gas-Chromatographen⁸⁾ geprüft und ergab folgende Zusammensetzung:

- ca. 70 Gew. % mit $I_{203,5}^P = 1595$ resp. $I_{197,6}^A = 1582$.
- ca. 20 Gew. % mit $I_{203,5}^P = 1637$ resp. $I_{197,6}^A = 1626$.
- ca. 10 Gew. % mit $I_{203,5}^P = 1763$ resp. $I_{197,6}^A = 1708$.

Das Hauptprodukt zeigt somit einen ΔI -Wert von 13 Einheiten. Für einen Kohlenwasserstoff der Konstitution **12** errechnet sich ein ΔI -Wert von 10 Einheiten [18]. IR.-Spektrum: 2900, 2850, 1465, 1380, 720 cm^{-1} (Film). NMR.-Spektrum: Signale bei $\delta = 1,27$ (26 Protonen) und $\delta = 0,88$ (6 Protonen). Massen-Spektrum: Signale der Molekular-Ionen bei m/e 224 resp. 222 resp. 220.

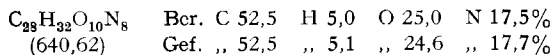
2.1.3. Oxydation von Tetrol 9 zu Diketo- γ -Lacton 16: Die Lösung von 157 mg Tetrol **9** in 50 ml Aceton wurde unter starkem Rühren mit 5 ml CrO_3 -Reagens versetzt. Nach 5 Min. bei 20° wurden 5 ml Methanol zugegeben und nach weiteren 5 Min. goss man auf 200 ml Eiswasser. Übliche Aufarbeitung gab 33 mg Neutralteil. Aus den basischen Phasen (NaHCO_3) wurden nach Ansäuern

⁷⁾ Wir danken Herrn Dr. W. SIMON, ETH Zürich, bestens für die Ausführung dieser Bestimmung.

⁸⁾ PERKIN-ELMER-Fraktometer 116 E mit Thermistor-Detektor, mit folgenden Kolonnendimensionen: A: $l = 100$ m, $\varnothing = 1$ mm; P: $l = 1$ m, $\varnothing = 4,65$ mm. Träger: A: keiner; P: Celite 200–250 μ . Stationäre Phase: A: Apiezon-L; P: Emulphor-O. Trägergas: Helium; Λ : 10 ml/Min.; P: 30 ml/Min.

und Extraktion im Apparat nach KUTSCHER-STEUEDEL mit Äther noch 135 mg Material extrahiert, von dem kein einheitliches Derivat erhalten werden konnte. Der Neutralteil gab aus Äther 20 mg **16** als farblose Nadeln vom Smp. 58–59° (vgl. 2.2.2.). IR.-Spektrum: Banden bei 1770, 1735, 1710, 1470, 1410, 1190, 1040, 1020, 990, 930 cm^{-1} (Methylenchlorid).

15 mg **16** in 2 ml Äthanol wurden mit 1 ml einer 5-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (85-proz. H_3PO_4 -Äthanol-(3:2)) versetzt. Nach 15 Std. bei 20° wurde der Niederschlag abfiltriert, gut mit Wasser gewaschen, getrocknet und an 1,1 g Alox neutral chromatographiert. Die mit Chloroform-Benzol-(1:1) eluierten Fraktionen (28 mg) wurden zweimal aus Methylenchlorid-Benzol-Aceton umgefällt und ergaben 23 mg **17** als oranges Pulver vom Smp. 84–86° (KOFLER-Block). IR.-Spektrum: Banden bei 3300, 1770, 1615, 1590, 1520, 1510, 1420, 1340, 1310, 1140, 920, 830 cm^{-1} (Methylenchlorid). Zur Analyse 16 Std. bei 50° und 0,01 Torr getrocknet.

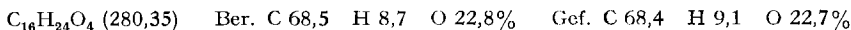


2.2. *Verseifung von Tetrahydrobrefeldin A (7) zum γ -Lacton 14*: Zur Lösung von 300 mg Tetrahydrobrefeldin A (**7**) in 6 ml Methanol wurden 6 ml 20-proz. methanolische KOH-Lösung gegeben und 16 Std. bei 20° stehengelassen. Nach Zugabe von 20 ml Wasser wurde das Methanol *i. v.* abdestilliert, die wässrige Phase mit 2N H_2SO_4 sauer gestellt und im Apparat nach KUTSCHER-STEUEDEL ausgeäthert. Der Extrakt (305 mg) wurde an 15 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Chloroform-Äthanol-(9:1) eluierten Fraktionen (270 mg) gaben aus Äther 205 mg **14** als farblose Kristalle vom Smp. 60–61°; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -73^\circ$ ($c = 0,49$ in Methanol). IR.-Spektrum: Banden bei 3600, 3500, 1760, 1190 cm^{-1} (Methylenchlorid; IR.-Spektrophotometer UNICAM SP-200). NMR.-Spektrum: Dublett bei $\delta = 1,16$ ($J = 6,5$ cps, 3 Protonen). Zur Analyse 4 Std. bei 30° und 0,01 Torr getrocknet.



2.2.1. *Di-O-Acetylderivat von γ -Lacton 14*: 40 mg **14** wurden in 1 ml Methylenchlorid gelöst, mit 0,5 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid versetzt und 24 Std. bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 40 mg Neutralteil **15**, der sich nach dünn-schichtchromatographischer Kontrolle (Chloroform-Methanol-(9:1)) als einheitlich erwies, aber nicht kristallisiert werden konnte. IR.-Spektrum: Banden bei 1770, 1720, 1250, 1190, 1030, 930 cm^{-1} (Methylenchlorid; IR.-Spektrophotometer UNICAM SP-200). NMR.-Spektrum: Singlett bei $\delta = 2,02$ (6 Protonen) und Dublett bei $\delta = 1,20$ ($J = 6,5$ cps, 3 Protonen).

2.2.2. *Diketolacton 16*: Zur Lösung von 162 mg **14** in 20 ml Aceton wurde 1 ml CrO_3 -Reagens gegeben, und nach 5-min. Rühren bei 20° wurde 1 ml Äthanol zugesetzt. Nach Zugabe von 250 ml Wasser wurde wie üblich aufgearbeitet. Der Neutralteil (158 mg) wurde bei 150° Badtemperatur und 0,6 Torr sublimiert; das farblose Sublimat gab aus Äther 126 mg **16** in farblosen Kristallen vom Smp. 58–59°, $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -135^\circ$ ($c = 0,60$ in Methanol). IR.-Spektrum: Banden bei 1770, 1735, 1710, 1190, 1150, 1030, 930 cm^{-1} (Methylenchlorid; Spektrophotometer UNICAM SP-200). Nach Mischprobe, IR.-Spektrum und Dünn-schichtchromatogramm identisch mit Oxydationsprodukt von Tretol **9** (vgl. 2.1.3.). NMR.-Spektrum: Linien bei $\delta = 4,70$ (1 Proton) und Singlett bei $\delta = 2,13$ (3 Protonen). Massenspektrum: Signal des Molekular-Ions bei m/e 280. Zur Analyse 4 Std. bei 30° und 0,01 Torr getrocknet.



11 mg **16** in 2 ml Äthanol wurden mit 1 ml 5-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (85-proz. H_3PO_4 - Äthanol-(3:2)) versetzt. Nach 5 Std. bei 20° wurde der Niederschlag abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen, getrocknet und dann an 1 g Alox-neutral chromatographiert. Die mit Benzol-Chloroform-(7:3) eluierten Fraktionen (8 mg) erwiesen sich nach IR.- und Dünn-schichtchromatogramm (Chloroform-Methanol-(98:2)) als identisch mit dem Di-hydrazon **17** (vgl. 2.1.3.).

3. *Oxydativer Abbau von Brefeldin A. - 3.1. Oxydation von Brefeldin A mit KMnO_4* : 26 mg Brefeldin A, 145 mg KMnO_4 und 20 ml 3-proz. Natronlauge wurden 24 Std. bei 20° geschüttelt. Dann wurde das MnO_2 über Hyflo abfiltriert und dieses mit dreimal 2 ml 2N NaOH nachgewaschen. Die Filtrate wurden mit peroxidfreiem Äther extrahiert, die wässrigen Phasen mit konz. H_2SO_4 -Wasser-(1:1) sauer gestellt und im Apparat nach KUTSCHER-STEUEDEL mit Äther extrahiert. Der Rückstand (48 mg) wurde in Methanol gelöst und mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt.

Nach vorsichtigem Eindampfen im Vakuum verblieben noch 30 mg Methylester-Gemisch (der grösste Anteil des Oxalsäure-dimethylesters dürfte abdestilliert sein) die im Gas-Chromatographen⁹⁾ untersucht wurden, wobei die folgenden Komponenten eindeutig festgestellt werden konnten: $I_{130}^R = 1014$ (Oxalsäure-dimethylester), 1118 (Malonsäure-dimethylester), 1202 (Bernsteinsäure-dimethylester), 1318 (Glutarsäure-dimethylester).

3.2. *Permanganatabbau von Di-O-[p-(p'-nitrophenylazo)-benzoyl]-brefeldin A (5)*: Zu einer Lösung von 685 mg **5** in 150 ml Aceton wurden während 5 Std. 15 g KMnO_4 in Portionen gegeben. Anschliessend wurde noch 5 Std. am Rückflusskühler gekocht, alsdann das Aceton bei 14 Torr und 25° Badtemperatur abdestilliert. Eine Probe des Kondensats wurde mit BRADY's Reagens versetzt. Der Niederschlag erwies sich im Dünnschichtchromatogramm als einheitlich und identisch mit *Aceton-2,4-dinitrophenylhydrazon*. Bei 1 Torr und 25° Badtemperatur destillierte nochmals eine kleine Menge Substanz. Diese wurde mit 100 ml BRADY-Reagens versetzt und gab einen roten Niederschlag, der nach zweimaliger Umkristallisation bei 200–202° schmolz und sich nach Dünnschichtchromatogramm, IR.- und Mischprobe als identisch mit *Mesityloxid-2,4-dinitrophenylhydrazon* erwies.

Der Destillationsrückstand wurde in kleinen Portionen mit total 140 ml 1,2N Ameisensäure versetzt, so dass er ein pH von 6,0 aufwies. Anschliessend wurden 20 ml 3,6N K_2CO_3 zugegeben und der Niederschlag abzentrifugiert. Dieser wurde mehrmals mit 0,9N K_2CO_3 und dann fünfmal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten basischen Filtrate wurden lyophilisiert, der braune Rückstand mit 30 ml 2N H_2SO_4 versetzt und mit Äther im Apparat nach KURSCHER-STEUDEL 16 Std. extrahiert. Der Extrakt (248 mg) wurde in 30 ml Dioxan gelöst und mit ätherischem Diazomethan methyliert. Der nach dem Eindampfen erhaltene Rückstand (287 mg) wurde an 8,7 g Alox (neutral, Aktivität III) chromatographiert. Mit Petroläther-Benzol-(1:1) liessen sich zuerst 67 mg eluieren, die aus Benzol-Pentan 37 mg Kristalle vom Smp. 187–188° ergaben. Diese waren nach Dünnschichtchromatogramm, IR.- und Mischprobe identisch mit *p-(p'-Nitrophenylazo)-benzoesäure-methylester*.

Die folgenden, mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch eluierten Fraktionen (23 mg) gaben aus Benzol-Pentan nach zweimaliger Umkristallisation 12 mg orange Kristalle **29a** vom Smp. 140–143°. IR.-Spektrum: 1740, 1710, 1610, 1530, 1350, 1280, 1210, 1120, 870, 780, 700 cm^{-1} (Nujol). NMR.-Spektrum: Signale bei $\delta = 5,5$ (1 Proton), Singlette bei $\delta = 3,74$ und $\delta = 3,69$ (je 3 Protonen). Nach Dünnschichtchromatogramm, IR.- und NMR.-Spektrum identisch mit (\pm) -7-[p-(p'-Nitrophenylazo)-benzoyloxy]-cyclopentan-3,4-dicarbon säure-dimethylester (**29b**).

Die mit Petroläther-Benzol-(1:4) eluierten Fraktionen (57 mg) gaben aus Benzol-Pentan 44 mg blassorange Kristalle **30** vom Smp. 208–208,5°. UV.-Spektrum: Maxima bei 333 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,80$) und 462 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,27$) (Chloroform). IR.-Spektrum: Banden bei 1720, 1610, 1590, 1530, 1350, 1270, 1210, 1110, 1010, 860, 770, 690 cm^{-1} (KBr). NMR.-Spektrum: Signale bei $\delta = 5,5$ (2 Protonen), Singlette bei $\delta = 3,83$ und $\delta = 3,74$ (je 3 Protonen). Zur Analyse 4 Std. bei 100° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{12}\text{N}_6$	Ber. C 58,6	H 4,1	O 26,0	N 11,4%
(738,68)	Gef. „ 58,6	„ 4,4	„ 25,2	„ 11,3%

Der bei der Zentrifugation erhaltene und nach Waschen mit K_2CO_3 -Lösung verbliebene Rückstand wurde in 100 ml 1N H_2SO_4 suspendiert, auf 0° gekühlt und während 7 Min. mit SO_2 behandelt. Dabei geht das Mangandioxid in Lösung, und es erscheint ein orangeroter Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert, mit Wasser gut gewaschen und getrocknet. Nach Suspension in Dioxan und Versetzen mit ätherischer Diazomethanlösung wurde filtriert, im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand (358 mg) an 11 g Alox (neutral, Aktivität III) chromatographiert. Die mit Petroläther-Benzol-(1:4) und Benzol eluierten Fraktionen (114 mg) gaben aus Benzol-Pentan noch 78 mg **30** vom Smp. 208°.

3.3. *Ozonabbau von Di-O-acetyl-brefeldin A (2)*. - 3.3.1. *Mit oxydativer Aufarbeitung*: Durch die Lösung von 300 mg **2** in 100 ml Essigester wurde bei -70° ein O_3 - O_2 -(5:95)-Gemisch geleitet, bis sich die Lösung leicht blau färbte. Nach 21 Std. bei -70° wurde im Vakuum zur Trockne

⁹⁾ PERKIN-ELMER-Fraktometer 116 E mit FID-Detektor, mit folgenden Kolonnendimensionen: $l = 50$ m, $\varnothing = 0,25$ mm; stationäre Phase R: Polypropylenglykol; Trägergas: Helium, 2,5 ml/Min.

gebracht, der Rückstand in 20 ml Methanol gelöst, mit 1 ml 30-proz. H_2O_2 und 1 ml Ameisensäure versetzt und 19 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurden vorsichtig 200 mg 10-proz. Pd-Kohle zugegeben, geschüttelt, filtriert, mit 6 ml Methanol und 20 ml Wasser nachgewaschen und das Filtrat einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Der Rückstand wurde im Vakuum zur Trockne gebracht, in 15 ml Wasser-Methanol-(1:2) gelöst, mit 2 ml 50-proz. KOH-Lösung versetzt und 2 Std. am Rückflusskühler gekocht. Nach Zugabe von 20 ml Wasser wurde das Methanol im Vakuum abdestilliert und die wässrige Phase durch eine Säule von 20 ml Dowex 50 W-8x (H⁺-Form) perkoliert. Das Eluat und 100 ml Waschwasser gaben nach Eindampfen im Vakuum 260 mg braunes Öl. Dieses wurde in 3,5 ml Methanol gelöst, bei 0° mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt und nach 20 Min. im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde zwischen 2 × 20 ml Wasser und 3 × 50 ml Äther verteilt. Die Ätherphasen gaben 85 mg und die wässrigen Phasen 96 mg Rückstand.

Letztere 96 mg Rückstand aus der Methylierung wurden in 5 ml Aceton gelöst und mit 0,5 ml CrO_3 -Reagens versetzt. Nach 10 Min. bei 20° wurde 0,5 ml Methanol zugegeben, mit 50 ml 2N- H_2SO_4 angesäuert und mit 3 × 50 ml Chloroform extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 verblieben beim Eindampfen 55 mg eines farblosen, im Vakuum z. T. flüchtigen Öls. Dieses wurde im Gas-Chromatographen (Kolonne: $l = 200$ cm, $\varnothing = 0,6$ cm; Träger: Celite 250–300 μ ; stationäre Phase: 40-proz. Apiezon-L; Gas: Helium, 100 ml / Min.) aufgetrennt und gab folgende Fraktionen: $I_{175^\circ}^A = 1054$ (1 mg); 1340 (4 mg); 1392–1409 (3 mg); 1516 (5 mg). Die Fraktion mit $I_{125^\circ}^A = 1340$ war identisch mit (\pm)-Cyclopentanon-3,4-dicarbon säure-dimethylester. IR.-Spektrum: vgl. Fig. 2. NMR.-Spektrum: vgl. Fig. 3. Massen-Spektrum: Signale bei m/e 200 (Molekular-Ion), 169, 141, 140, 114 (100%), 113, 112, 86, 71, 59, 55.

Ganz analog wurde der ätherlösliche Rückstand aus der Methylierung oxydiert, wobei 45 mg eines farblosen, ebenfalls im Vakuum z. T. leicht flüchtigen Öls erhalten wurden. Die Auftrennung im Gas-Chromatographen ergab Fraktionen mit Retentionsindices von $I_{170^\circ}^A = 1380$ (4 mg), 1401 (6 mg).

3.3.2. Mit reduktiver Aufarbeitung: Durch die Lösung von 1,4 g Di-O-acetyl-brefeldin A (2) in 500 ml Essigester wurde bei -70° unter Wasserausschluss ein O_3 - O_2 -(5:95)-Gemisch geleitet, bis eine leichte Blaufärbung eintrat (50-proz. O_3 -Überschuss). Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der glasige Rückstand in 100 ml reinem Tetrahydrofuran gelöst. Während 60 Min. wurde eine klarfiltrierte Lösung von 2 g $LiAlH_4$ in 30 ml Tetrahydrofuran zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch noch $2\frac{1}{2}$ Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Zerstören des Überschusses an Reduktionsmittel mit Essigester wurden 70 ml 2N H_2SO_4 zugegeben, das Tetrahydrofuran im Vakuum abdestilliert und die verbliebene wässrige Phase in einem Apparat nach KUTSCHER-STEUDEL ausgeäthert. Nach Trocknen des Äthers über Natriumsulfat und Eindampfen verblieb ein farbloser, flüssiger Rückstand (825 mg), der im wesentlichen aus 1,5-Hexandiol (18) bestand. Die ausgeätherte wässrige Phase wurde mit einem Ionenaustauschergemisch ($\frac{1}{3}$ Vol. IR-120- H^+ + $\frac{2}{3}$ Vol. IRA-410- OH^-) auf pH 9,3 gebracht und anschliessend über eine Mischbettsäule (250 ml) der gleichen Zusammensetzung filtriert. Die Säule wurde mit 200 ml Wasser nachgewaschen und das Filtrat vom pH 5,0 im Vakuum eingedampft. Der ölige Rückstand (718 mg) bestand zum grössten Teil aus 23 und etwas Äthylenglykol (21).

815 mg rohes 18a wurden an 40 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Methanol-(25:5) liessen sich zuerst 145 mg 1-O-Acyl-hexandiol-(1,5) und dann 393 mg Hexandiol-(1,5) (18a) als farblose Flüssigkeiten eluieren. $[\alpha]_D^{20} = +8^\circ$ ($c = 0,55$ in Methanol). IR.-Spektrum: Banden bei 3650, 3500, 1380, 1080, 1050, 950 cm^{-1} (Methylenchlorid). Das IR.-Spektrum von 18a ist identisch mit dem von racemischem Hexandiol-(1,5) (18b). NMR.-Spektrum: Signale bei $\delta = 3,9$ – $3,5$ (3 Protonen), 3,4 (2 Protonen), 1,70–1,35 (6 Protonen) und Dublett bei $\delta = 1,17$ ($J = 6,0$ cps; 3 Protonen).

Zur Lösung von 27 mg 18a in 2 ml Pyridin wurden 230 mg *p*-Nitrobenzoylchlorid gegeben und 20 Std. bei 20° stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde auf Eiswasser gegeben und dieses nach 20 Min. dreimal mit Äther extrahiert. Die mit 2N HCl, ges. $NaHCO_3$ und Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben nach dem Eindampfen 74 mg Rückstand. Dieser wurde an 2 g Alox (neutral, Aktivität I) chromatographiert. Die mit Benzol-Pentan-(1:1) eluierten Fraktionen (49 mg) gaben nach zweimaliger Umkristallisation aus Methylenchlorid-Pentan 40 mg

19a vom Smp. 107–108°, $[\alpha]_D^{20} = +43^\circ$ ($c = 0,43$ in Chloroform). UV.-Spektrum: Maximum bei 260,5 m μ ($\log \epsilon = 4,42$); Schulter bei 350 m μ ($\log \epsilon = 2,55$) (in Chloroform). IR.-Spektrum: Banden bei 1705, 1605, 1530, 1350, 1120, 1100, 1015, 880, 850 cm $^{-1}$ (Methylenchlorid, Spektrophotometer UNICAM SP-200). NMR.-Spektrum: Signale bei $\delta = 8,2$ (8 Protonen), 5,22 (1 Proton), 4,40 (2 Protonen), 2,0–1,6 (6 Protonen), und Dublett bei $\delta = 1,40$ ($J = 6$ cps, 3 Protonen). Zur Analyse 4 Std. bei 60° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_{20}H_{20}O_8N_2$	Ber. C 57,7	H 4,8	O 30,7	N 6,7%
(416,38)	Gef. „ 57,9	„ 5,0	„ 30,6	„ 6,7%

Nach Dünnschichtchromatogramm, IR.- und NMR.-Spektrum identisch mit racem. *Di-O*-(*p*-nitrobenzoyl)-hexandiol-(1,5) vom Smp. 89–90°.

130 mg **18a** wurden in 30 ml Aceton gelöst und bei 20° unter starkem Rühren mit 0,95 ml CrO $_3$ -Reagens versetzt. Nach 5 Min. wurden 1 ml Methanol zugegeben und nach weiteren 5 Min. auf 250 ml Wasser gegossen. Extraktion mit Äther im Apparat nach KUTSCHER-STEUDEL gab 135 mg Säuregemisch. Destillation im Kugelrohr bei 12 Torr und 145–150° Luftbadtemperatur gab 77 mg 5-Ketocapronsäure. IR.-Spektrum: 3100 breit, 2900, 2650, 1720 Schulter, 1700, 1420, 1380, 1240, 1190, 1170, 1070, 1050, 960, 900, 850, 750 cm $^{-1}$ (Film).

Zur Lösung von 77 mg 5-Ketocapronsäure und 61 mg NH $_2$ OH.HCl in 1 ml Wasser wurde eine konz. Lösung von 98 mg K $_2$ CO $_3$ in Wasser gegeben. Nach 24 Std. bei 20° wurde mit 2 N H $_2$ SO $_4$ sauer gestellt, mit Ammoniumsulfat gesättigt und im Apparat nach KUTSCHER-STEUDEL ausgeäthert. Der Rückstand (80 mg) wurde aus Benzol umkristallisiert. Die farblosen Kristalle (**20**) schmolzen bei 101–102°. Eine Mischprobe mit authentischem Material schmolz gleich, und die IR.-Spektren waren deckungsgleich. IR.-Spektrum: Banden bei 1730 Schulter, 1700, 1660, 1440, 1420, 1370, 970 cm $^{-1}$ (Chloroform, Spektrophotometer UNICAM SP-200).

74 mg rohes **23** wurden mit 2 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid 24 Std. bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 43 mg Neutralprodukt, die an 2 g Kieselgel chromatographiert wurden. Mit Cl. roform-Methanol-(99:1) liessen sich 29 mg **24** eluieren. IR.-Spektrum: Banden bei 1730, 1370, 1230, 1040 cm $^{-1}$ (Methylenchlorid). NMR.-Spektrum: Singlette bei $\delta = 2,08$ (6 Protonen), 2,05 (3 Protonen) und 2,02 (3 Protonen).

Eine Lösung von 102 mg rohem **23** in 6 ml Pyridin wurde mit 800 mg *p*-Nitrobenzoylchlorid versetzt und 28 Std. bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 507 mg Neutralteil, die an 15 g Alox (neutral, Aktivität I) chromatographiert wurden. Die mit Benzol-Methylenchlorid-(4:1) eluierten Fraktionen (17 mg) gaben aus Methylenchlorid-Äther 10 mg *Di-O*-(*p*-nitrobenzoyl)-äthylenglykol (**22**) vom Smp. 139–141° (KOFLER-Block); Misch-Smp. mit authentischem Material 140–142°. IR.-Spektrum und Rf im Dünnschichtchromatogramm waren identisch. Die mit Benzol-Äthylchlorid-(1:1) eluierten Fraktionen (210 mg) gaben aus Methylenchlorid-Äther 183 mg gelbliche Kristalle **25** vom Smp. 195–197°. IR.-Spektrum: Banden bei 1710, 1600, 1530, 1350, 1110, 1100, 1010, 870 cm $^{-1}$ (Methylenchlorid). Zur Analyse 4 Std. bei 100° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_{36}H_{28}O_{16}N_4$	Ber. C 56,0	H 3,7	O 33,1	N 7,3%
(772,63)	Gef. „ 56,4	„ 3,7	„ 32,9	„ 7,2%

Molekulargewichtsbestimmung: 770 (thermoelektrisch).

Eine Lösung von 301 mg **23** in 10 ml 50-proz. wäss. Methanol wurde im Laufe von 7 Std. bei 20° mit total 80 ml HJO $_4$ -Lösung (vgl. 2.1.) versetzt. Danach liess sich überschüssige Perjodsäure nachweisen (2 Tropfen Reaktionsgemisch gaben beim Erwärmen mit 2 Tropfen ges. MnSO $_4$ und 2 Tropfen 87-proz. H $_3$ PO $_4$ eine Violettfärbung). Nach Versetzen mit 10 ml Wasser wurde das Methanol *i.v.* abdestilliert, die wässrige Phase mit Kochsalz gesättigt und im Apparat nach KUTSCHER-STEUDEL während 20 Std. ausgeäthert. Der so erhaltene Extrakt (193 mg) wurde an 10 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol-(99:5) bis (4:1) eluierten Fraktionen (129 mg) zeigten im Dünnschichtchromatogramm noch Verunreinigungen, wurden aber trotzdem direkt weiter oxydiert.

Zur Lösung von 129 mg Rohprodukt in 40 ml Aceton wurde unter Rühren bei 20° 1 ml CrO $_3$ -Reagens gegeben. Nach 5 Min. wurde der Überschuss an Oxydationsmittel mit Äthanol zerstört, Wasser zugegeben und mit Äther im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat extrahiert. Der Rohextrakt (104 mg) wurde mit Diazomethan methyliert und an 5 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Chloroform eluierten Fraktionen (61 mg) wurden am kalten Finger bei 12 Torr und 50–100° Badtemperatur destilliert. Das so erhaltene Produkt **26a** liess sich aber nicht zur Kristallisation bringen.

gen, obwohl es nach Dünnschichtchromatographie einheitlich war. $[\alpha]_D = -119^\circ$ ($c = 0,55$ in Chloroform). IR.-Spektrum: vgl. Fig. 3. NMR.-Spektrum: vgl. Fig. 2. **26a** war nach Dünnschichtchromatogramm, IR.- und NMR.-Spektrum identisch mit (\pm)-Cyclopentanon-3,4-dicarbon säure-dimethylester.

17 mg **26a** wurden in 2 ml Methanol gelöst und mit 20 ml BRADY's Reagens versetzt. Nach 3 Std. bei 20° wurden die Kristalle abfiltriert und gut mit Wasser nachgewaschen. Umkristallisation aus Methylenechlorid-Pentan, dann Äther gab 10 mg **27a** vom Smp. $125-130^\circ/141-143^\circ$ als gelbe Prismen. IR.-Spektrum: Banden bei 3350, 1730, 1620, 1600, 1530, 1520, 1450, 1350, 1320, 1220, 1140, 930, 840 cm^{-1} (Methylenechlorid). **27a** war nach Dünnschichtchromatogramm und IR.-Spektrum identisch mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazon von (\pm)-Cyclopentanon-3,4-dicarbon säure-dimethylester (**27b**) (vgl. 4.2.).

4. Synthese von Abbau-Produkten. - 4.1. (\pm)-Di-O-(*p*-nitrobenzoyl)-hexandiol-(1,5) (**19b**): 54 mg (\pm)-Hexandiol-(1,5) wurden mit 3 ml Pyridin und 460 mg *p*-Nitrobenzoylchlorid 20 Std. bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 200 mg Rohprodukt, das an 10 g Alox-neutral (Aktivität I) chromatographiert wurde. Die mit Benzol und Chloroform eluierten Fraktionen (157 mg) gaben aus Äther-Pentan 127 mg Kristalle vom Smp. $80-89^\circ$. Nach mehrmaliger Umkristallisation schmolz die Substanz **19b** konstant bei $89-90^\circ$. IR.-Spektrum: Banden bei 1705, 1605, 1530, 1350, 1120, 1100, 1015, 880, 850 cm^{-1} (Methylenechlorid, Spektrophotometer UNICAM SP-200). UV.-Spektrum: Maximum bei $260,5\text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,41$) und Schulter bei $350\text{ m}\mu$ ($\log \epsilon \sim 2,55$). Zur Analyse 4 Std. bei 60° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{N}_2$ (416,39)	Ber. C 57,7 Gef. „ 58,2	H 4,8 „ 4,8	O 30,7 „ 30,5	N 6,7% „ 6,8%
--	----------------------------	----------------	------------------	------------------

4.2. 2,4-Dinitrophenylhydrazon **27b**: Zur Lösung von 19 mg (\pm)-Cyclopentanon-3,4-dicarbon säure-dimethylester (**26b**) in 2 ml Methanol wurden 20 ml BRADY's Reagens gegeben. Nach 2 Std. bei 20° wurde der Niederschlag abfiltriert und dreimal mit je 3 ml Wasser gewaschen. Der getrocknete Rückstand gab nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methylenechlorid-Pentan 10 mg **27b** als gelbe Nadeln vom Smp. $146,5-148^\circ$. IR.-Spektrum: Banden bei 3330, 1730, 1620, 1600, 1530, 1520, 1450, 1350, 1320, 1220, 1140, 930, 840 cm^{-1} (Methylenechlorid).

4.3. 1-[*p*'-nitrophenylazo]-benzoyloxy]-cyclopentan-3,4-dicarbon säure-dimethylester (**29b**): Zur Lösung von 100 mg (\pm)-Cyclopentanon-3,4-dicarbon säure-dimethylester (**26b**) in Tetrahydrofuran wurden 100 mg NaBH_4 gegeben und 6 Std. bei 20° gerührt. Nach Ansäuern mit $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ wurde das Tetrahydrofuran im Vakuum abdestilliert und die wässrige Phase fünfmal mit Äther extrahiert. Die mit Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben 110 mg Rückstand, der an 3 g Kieselgel chromatographiert wurde. Die mit Chloroform-Methanol-(99:1) eluierten Fraktionen (73 mg) waren nach Dünnschichtchromatogramm (Chloroform-Methanol-(95:5)) einheitlich, konnten aber nicht kristallisiert werden (**28**). IR.-Spektrum: Banden bei 3600, 3500, 1730, 1600, 1450, 1380, 1200, 1180, 1040 cm^{-1} (Methylenechlorid).

73 mg Alkohol **28** wurden in 3 ml Pyridin gelöst und zur Lösung von 300 mg *p*-(*p*'-Nitrophenylazo)-benzoylchlorid in 3 ml Benzol gegeben. Nach 45 Std. bei 20° ergab übliche Aufarbeitung 157 mg Rohprodukt. Nach Filtration der Chloroformlösung durch eine kurze Kieselgel-Säule und Kristallisation aus Benzol-Pentan schmolz das Derivat **29b** bei $140-142^\circ$. IR.-Spektrum: Banden bei 1730, 1610, 1530, 1440, 1350, 1210, 1110, 1010, 860 cm^{-1} (Methylenechlorid). NMR.-Spektrum: Signale bei $\delta = 5,54$ (1 Proton), 3,6-3,2 (2 Protonen), 2,6-2,1 (4 Protonen), und Singlette bei $\delta = 3,74$ und 3,69 (je 3 Protonen). Zur Analyse 4 Std. bei 100° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_8\text{N}_3$ (455,43)	Ber. C 58,0 Gef. „ 58,2	H 4,6 „ 4,8	O 28,1 „ 28,1	N 9,2% „ 9,5%
--	----------------------------	----------------	------------------	------------------

SUMMARY

The constitution of Brefeldin A, a mold metabolite from *Penicillium brefeldianum* DODGE, has been elucidated as **1** by chemical degradation.

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien,
SANDOZ AG, Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. HÄRRI, W. LOEFFLER, H. P. SIGG, H. STÄHELIN & CH. TAMM, *Helv.* **46**, 1235 (1963).
 [2] Vgl. A. C. COPE, R. K. BLY, E. P. BURROWS, O. J. CEDER, E. CIGANEK, B. T. GILLIS, R. F. PORTER & H. E. JOHNSON, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 2170 (1962).
 [3] R. FREEMAN & D. WHIFFEN, *Mol. Physics* **4**, 321 (1961).
 [4] K. AUWERS, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **26**, 370 (1893).
 [5] Vgl. J. A. SOUSA & A. L. BLUHM, *J. org. Chemistry* **25**, 108 (1960).
 [6] W. H. BENTLEY & W. H. PERKIN, *J. chem. Soc.* **69**, 1510 (1896); D. VORLÄNDER & A. KNÖTZSCH, *Liebigs Ann. Chem.* **294**, 317 (1897).
 [7] P. A. LEVENE & H. L. HALLER, *J. biol. Chemistry* **69**, 165 (1926); **79**, 475 (1928).
 [8] Vgl. E. HECKER, *Chem. Ber.* **88**, 1666 (1955); A. BUTENANDT, D. STAMM & E. HECKER, *ibid.* **94**, 1931 (1961).
 [9] R. B. WOODWARD, *Festschr. ARTHUR STOLL*, S. 524 (1957).
 [10] Vgl. M. BERRY, *Quart. Rev.* **17**, 343 (1963).
 [11] O. C. MUSGRAVE, *J. chem. Soc.* **1956**, 4301; **1957**, 1104; A. J. BIRCH, O. C. MUSGRAVE, M. W. RICHARDS & H. SMITH, *ibid.* **1959**, 3146.
 [12] R. N. MIRRINGTON, E. RITCHIE, C. W. SHOPPEE, W. C. TAYLOR & S. STERNHELL, *Tetrahedron Letters* **1964**, 365.
 [13] F. McCAPRA, A. I. SCOTT, P. DELMOTTE & J. DELMOTTE-PLAQUÉE, *Tetrahedron Letters* **1964**, 869.
 [14] Vgl. W. B. WHALLEY in «Biogenesis of Natural Compounds», P. BERNFELD edit., Pergamon Press, Oxford–London–New York–Paris 1963.
 [15] T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc.* Nr. 7, 305 (1949).
 [16] E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin–Göttingen–Heidelberg 1962.
 [17] K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* **1946**, 39.
 [18] A. WEHRLI & E. KOVATS, *Helv.* **42**, 2710 (1959).
 [19] V. L. SINGLETON, N. BOHONOS & A. J. ULLSTRUP, *Nature* **187**, 1072 (1958).
 [20] V. L. SINGLETON & N. BOHONOS, *Agr. biol. Chemistry* **28**, 77 (1964).

**153. Zur Kenntnis der sogenannten «Alkalicarbonyle» IV [1]¹⁾.
 Über die Reaktion von geschmolzenem Kalium mit Kohlenmonoxid
 von W. Büchner und E. Weiss**

(20. V. 64)

In vorhergehenden Mitteilungen wurde über die Zusammensetzung der aus Kohlenmonoxid und in flüssigem Ammoniak gelösten Alkalimetallen erhältlichen «Alkalicarbonyle» berichtet. Diese farblosen oder nur schwach gefärbten Produkte erwiesen sich als Substanzgemische [1], bestehend aus Acetylendiolaten $\text{MOC}\equiv\text{COM}$ ($\text{M} = \text{Li}, \text{Na}, \text{K}$ [2], Rb [3], Cs [3]) und metallorganischen Verbindungen mit gleicher Bruttuzusammensetzung.

Dagegen ist die Natur des aus Kalium und Kohlenmonoxid in Abwesenheit eines Lösungsmittels entstehenden tiefgefärbten Produktes der Zusammensetzung $(\text{KCO})_n$ [4] [5] noch immer unbekannt, obwohl die Reaktion bereits von LIEBIG [6] zum ersten Mal beschrieben wurde. Seit NIETZKI & BENCKISER [7] fasst man das sog. «Kohlenoxidkalium» auf Grund des bei der Hydrolyse gefundenen Hexahydroxy-

¹⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1423.