

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *F. Arndt, B. Eistert & W. Partale*, Ber. deutsch. chem. Ges. *60*, 1364 (1927); *F. Arndt, B. Eistert & J. Amende*, *ibid.* *61*, 1949 (1928).
- [2] *W. E. Bachmann & W. S. Struwe*, «Organic Reactions», Vol. I, p. 38, J. Wiley and Sons, New York 1961.
- [3] *F. Weygand & H. J. Bestmann*, «Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie», Bd. III, S. 250, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse 1961.
- [4] *H. W. Dion et al.*, J. Amer. chem. Soc. *78*, 3075 (1956).
- [5] *J. F. Lane & E. S. Wallis*, J. org. Chemistry *6*, 443 (1941).
- [6] *K. Balenović*, Experientia *3*, 369 (1947); *K. Balenović et al.*, J. org. Chemistry *16*, 1308 (1951); J. chem. Soc. *1952*, 3316; Arhiv za Kemiju *23*, 1 (1951); Helv. *34*, 744 (1951); J. chem. Soc. *1954*, 2976; Rec. Trav. chim. Pays-Bas *75*, 1252 (1956); Croat. chem. Acta *28*, 303 (1956); *29*, 153 (1957).
- [7] *P. Karrer & G. Bussmann*, Helv. *24*, 645 (1941).
- [8] *F. Weygand, H. J. Bestmann & E. Klieger*, Chem. Ber. *91*, 1037 (1958).
- [9] *J. Rudinger & H. Farkašová*, Coll. czech. chem. Commun. *28*, 2941 (1963).
- [10] *D. S. Tarbell & J. A. Price*, J. org. Chemistry *22*, 245 (1957).
- [11] *D. Fleš & M. Markovac-Prpić*, Croat. chem. Acta *28*, 73 (1956); *29*, 79 (1957); *W. Jugelt & P. Falck*, J. prakt. Chem. *38*, 88 (1968).

## 123. Isolierung und Strukturaufklärung von Chaetocin

von D. Hauser, H. P. Weber und H. P. Sigg

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien, Sandoz AG, Basel

(5. V. 70)

*Summary.* The structure and absolute configuration of Chaetocin, a metabolite of the fungus *Chaetomium minutum* with antibacterial and cytostatic activity has been elucidated by chemical and X-ray methods.

**1. Isolierung und Struktur.** – Im Verlaufe unserer Arbeiten mit biologisch aktiven Pilzmetaboliten haben wir aus Fermentationen von *Chaetomium minutum* ein antibakteriell und cytostatisch wirksames Stoffwechselprodukt, das wir Chaetocin nennen, isoliert<sup>1)</sup>.

Chaetocin lässt sich mit Essigester aus dem Kulturfiltrat extrahieren, fällt aber beim Einengen der organischen Phase zum grössten Teil aus, da es in allen üblichen Lösungsmitteln ebenso wie in Wasser sehr schlecht löslich ist. Durch Umkristallisation aus Pyridin-Methanol erhält man farblose Nadeln mit einem Zersetzungspunkt von 240° und der Bruttoformel  $(C_{15}H_{14}N_3O_3S_2)_n$ .

Herkunft, biologische Aktivität und Summenformel liessen Ähnlichkeit mit Chaetomin vermuten, das vor längerer Zeit von *Waksman* und Mitarbeitern aus *Chaetomium cochliodes* isoliert [1] und von *Geiger* [2] näher untersucht worden war<sup>2)</sup>. Eine Identität der beiden Produkte konnte auf Grund von *Geiger's* [2] Angaben aber ausgeschlossen werden. Immerhin durften wir als Arbeitshypothese für die Struktur-

<sup>1)</sup> Die Bereitstellung grösserer Mengen Chaetocin verdanken wir Herrn Dr. *E. Hürri*, sowie den Herren *P. Furger* und *H. Hofmann*.

<sup>2)</sup> Die Bezeichnung wurde dabei auf Chetomin geändert [2].

aufklärung annehmen, dass Chaetocin ebenso wie Chetomin zur Klasse der 3,6-Epidithio-2,5-dioxopiperazine [3] gehört. Gliotoxin, die Sporidesmine [4], die Aranotine [5] und Oryzachlorin [6], sind bis heute als Vertreter dieser Naturstoffklasse bekannt.

Im NMR.-Spektrum (in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) von Chaetocin erkennt man das Singulett einer N-Methylgruppe ( $\delta = 3,02$ ), das  $AB$ -System einer Methylengruppe bei 2,92 und 3,64 ppm mit einer Kopplungskonstante von 15 Hz und ein  $A_2X$ -System bei 4,18 und 5,80 ppm. Letzteres kann einer Hydroxymethylengruppe ( $\nu_{\text{max}}$  3550, 3430  $\text{cm}^{-1}$ ) zugewiesen werden, da sich der  $A_2$ -Teil (Dublett,  $J = 5,5$  Hz) beim Deutieren in ein Singulett und bei der Acetylierung in ein  $AB$ -System bei tieferem Feld verwandelt. Die bis jetzt besprochenen Strukturelemente treten auch bei Gliotoxin (4) auf. Des weiteren befindet sich neben einem Singulett bei 5,30 ppm, das einem einzelnen Proton entspricht, noch ein komplexer Signalhaufen zwischen 6,5 und 7,5 ppm. Dieser kann vier aromatischen ( $\nu_{\text{max}}$  1610  $\text{cm}^{-1}$ ) und einem austauschbaren Proton (NH,  $\nu_{\text{max}}$  3330  $\text{cm}^{-1}$ ) zugewiesen werden.

Da die im NMR. gefundene Summe von 14 Protonen geradzahlig, die Summe der Stickstoffatome auf Grund der Elementaranalyse aber ungerade ist, muss für Chaetocin eine dimere, symmetrische Struktur mit der Bruttoformel  $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4$  angenommen werden. Dies wird erhärtet durch die vaporometrische Molekulargewichtsbestimmung, die für das Naturprodukt 654 (Theorie 696) und das Acetylderivat 786 (Theorie 780) ergab. Da Chaetocin optisch aktiv ist, kann es als Symmetrieelement nur eine zweizählige Achse aufweisen.

Das IR.-Spektrum von Chaetocin (Fig. 1) zeigt neben den bereits erwähnten Absorptionen noch Banden bei 1690, 1680 und 1660  $\text{cm}^{-1}$ , die Amidgruppen mit verschieden starker Wasserstoffbrückenbildung zugewiesen werden können.

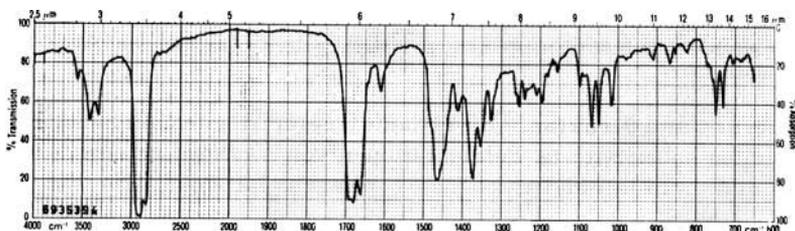
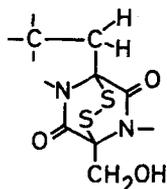
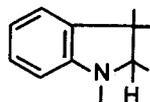


Fig. 1. IR.-Spektrum von Chaetocin (1) in Nujol

Während die Teilstruktur A, die an Gliotoxin (4) erinnert, auf Grund der NMR.- und IR.-Spektren möglich erscheint, weist das UV.-Spektrum von Di-O-acetylchaetocin (2) mit Maxima bei 203 und 301 nm und einer Schulter bei 240 nm grosse



A

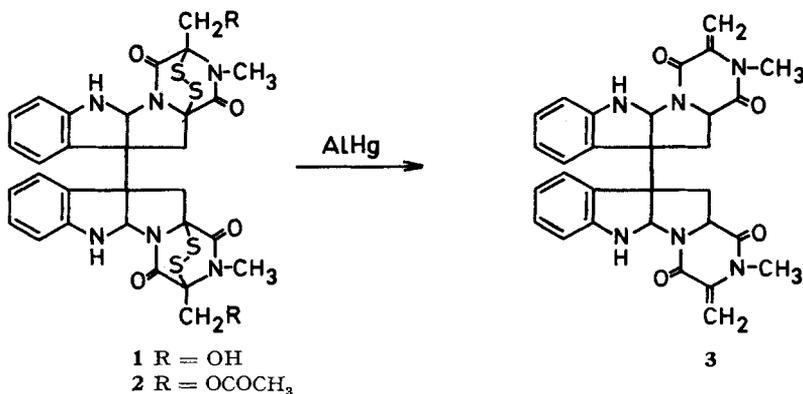


B

Ähnlichkeit mit demjenigen von Sporidesmin (5) (Maxima bei 254 und 302 nm) auf [4] und deutet damit auf die Indolin-Teilstruktur B<sup>3)</sup>.

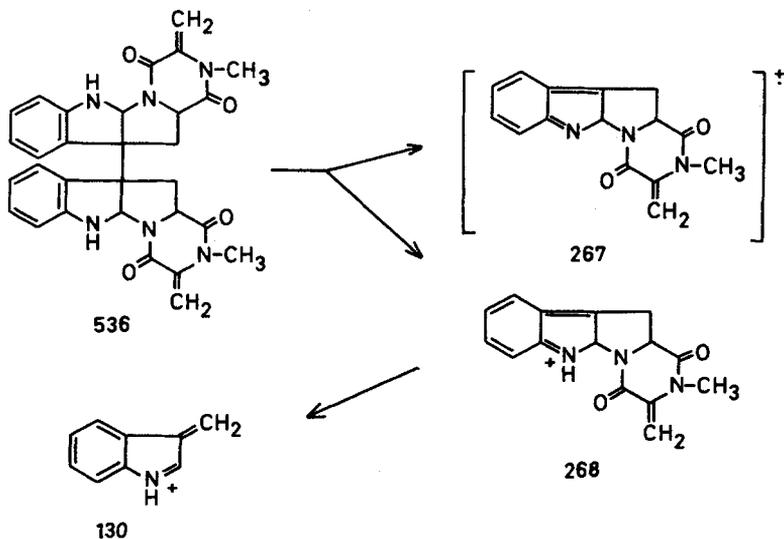
Aus diesen Teilstrukturen ergibt sich unmittelbar der Strukturvorschlag 1 (Formelschema 1) für Chaetocin, mit dem sich die angeführten spektralen Daten zwanglos erklären lassen. Allerdings kann eine Verknüpfung der beiden Molekelhälften analog derjenigen von Calycanthin [9] vorläufig nicht ausgeschlossen werden.

Formelschema 1



Ausgehend vom Strukturvorschlag 1 lassen sich die einzelnen Strukturelemente wie folgt sicherstellen: Für den dimeren Charakter von Chaetocin (1) ist das Massenspektrum der Desthioverbindung 3 beweisend, die neben anderen, nicht näher untersuchten Produkten bei der Behandlung von Di-O-acetylchaetocin (2), mit Aluminium-

Formelschema 2

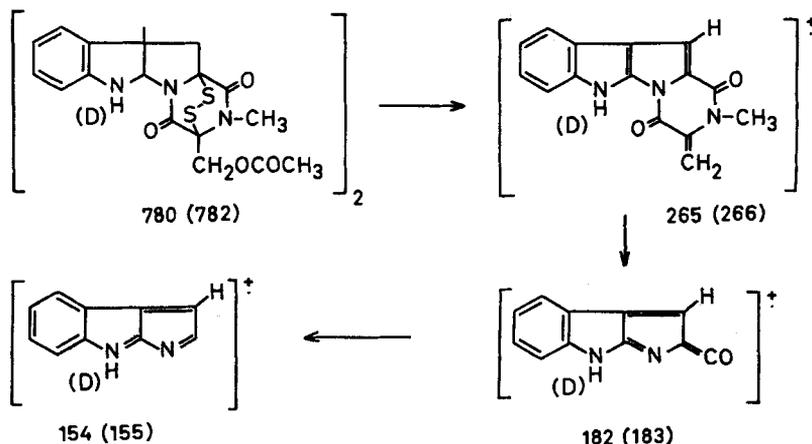


<sup>3)</sup> Vgl. dazu Scott [7] und Hesse [8].

amalgam<sup>4)</sup> entsteht. Im Massenspektrum von **3** ist der Molekularpik bei *m/e* 536 vorhanden, während bei Chaetocin (**1**) und dem Diacetylderivat **2** nur Fragmente der monomeren Form (höchster Pik bei 267) auftreten. Die wichtigsten Signale des Hochauflösungsspektrums von **3** lassen sich wie folgt interpretieren (Formelschema 2; vgl. auch Angaben im experimentellen Teil).

Die Lage der N-Methylgruppe, für die der Indolin- oder ein Amid-Stickstoff in Frage kommt, kann spektroskopisch wie folgt abgeleitet werden: Im NMR.-Spektrum von **3** lässt sich einerseits eine schwache Kopplung zwischen dem Methinproton bei 5,32 ppm (N-CH-N) und der NH-Gruppe ( $\delta = 5,20$ )<sup>5)</sup> vermuten, da sich das Signal des Methinprotons beim Deuterieren deutlich verschärfte. Andererseits zeigt die N-Methylgruppe beim Einstrahlen auf das näher liegende Vinylproton einen deutlichen Nuclear *Overhauser* Effect (10%) [12]. Den gleichen Effekt zeigen die geminalen Vinylprotonen auch unter sich (20%) [13]<sup>6)</sup>. Ausserdem fehlt in den IR.-Spektren von **1**, **2** und **3** eine Amid-II-Bande zwischen 1500 und 1600  $\text{cm}^{-1}$ . Besonders aufschlussreich für die Lage der N-Methylgruppe ist das Massenspektrum von **2**, dessen wichtigste Linien sich den im Formelschema 3 angegebenen Fragmenten zuweisen lassen<sup>7)</sup>, sowie das Spektrum seines Deuteriumderivates, das sich durch Behandlung von **2** mit  $\text{D}_2\text{O}$  leicht gewinnen lässt. Im letzteren Fall sind gegenüber der undeutierten Verbindung deutlich intensivere Linien bei den Massen 266, 183 und 155 erkennbar<sup>8)</sup>.

Formelschema 3



Alle diese Angaben deuten auf die in Formel **1** angegebene Stellung der N-Methylgruppe. Gleichzeitig lässt die hier vorgelegte Interpretation der Massenspektren eine bereits früher erwähnte Verknüpfung der beiden Molekelhälften analog wie bei Calycanthin als unwahrscheinlich erscheinen.

<sup>4)</sup> Vgl. dazu die analoge Reaktion bei Gliotoxin [10].

<sup>5)</sup> Das NMR.-Spektrum einer analogen Gruppierung findet sich bei *Casnati et al.* [11].

<sup>6)</sup> Wir möchten Herrn Dr. *P. Niklaus* für Messung und Interpretation des NOE bestens danken.

<sup>7)</sup> Vgl. Angaben im experimentellen Teil.

<sup>8)</sup> Der Deuteriumgehalt beträgt ca. 23%. Für Aufnahme und Interpretation dieser MS.-Spektren möchten wir Herrn Dr. *H. Lichti* bestens danken.

Eine zusätzliche Stütze für das vorgeschlagene Indolgerüst ergab sich aus biogenetischen Versuchen. Der Nachweis eines biosynthetischen Einbaus von Tryptophan müsste nämlich als ein weiterer Hinweis für die Indolinstruktur angesehen werden. Dieser Nachweis gelang sehr eindrücklich, indem bei der Zugabe eines Gemisches von [ $6\text{-}^3\text{H}$ ]-DL-Tryptophan und DL-Tryptophan-[alanin-3- $^{14}\text{C}$ ] zu wachsenden Kulturen von *Chaetomium minutum* nach Entfettung und Acetylierung des Rohextraktes Diacetylchaetocin (**2**) mit Einbauraten von über 20% isoliert wurde. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass das Aktivitätsverhältnis  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  vor der Zugabe 9:1, beim mehrmals umkristallisierten Diacetylderivat **2** aber 11:1 betrug. Dieser signifikante, ausserhalb der Fehlergrenze liegende Unterschied dürfte auf die teilweise Metabolisierung des Tryptophans zurückzuführen sein.

Um die Strukturhypothese **1** von Chaetocin sicherzustellen wurde eine Röntgen-Strukturanalyse durchgeführt:

Chaetocin kristallisiert aus Pyridin/Methanol in sehr schön ausgebildeten, orthorhombischen Prismen. Die Kristallstruktur gehört der azentrischen Raumgruppe  $P2_12_12_1$  an, und die Lösung der Struktur gelang durch Anwendung der Direkten Methode zur Phasenbestimmung [14]. Das Strukturmodell konnte einschliesslich der Wasserstoffatome bis zu einem Fehlerfaktor  $R = 0,042$  verfeinert werden. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der kleine, aber an ausgewählten

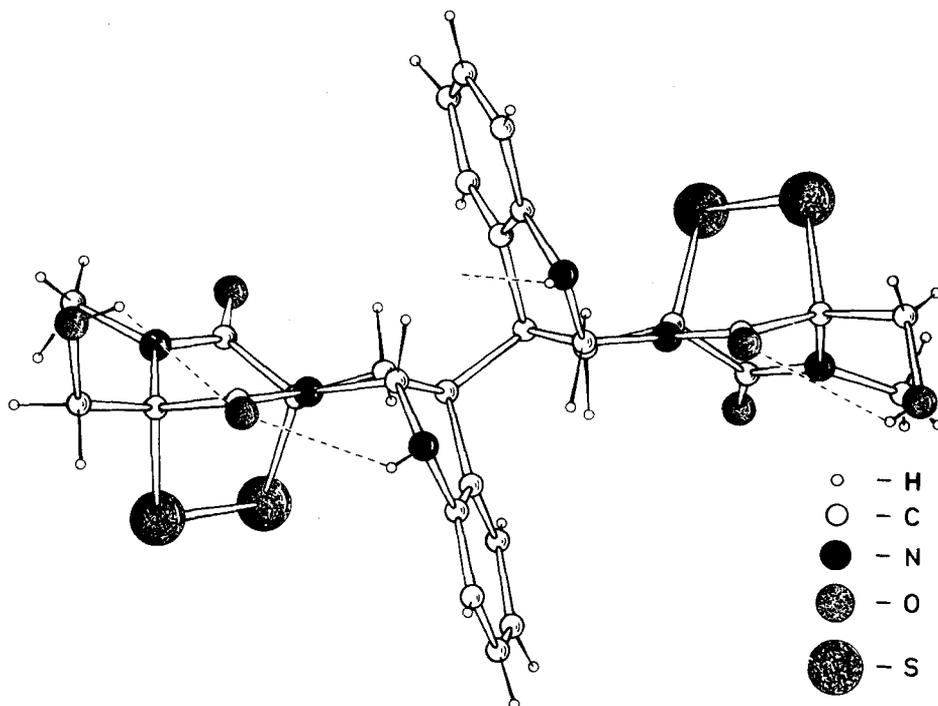


Fig. 2. *Parallelperspektivische Ansicht von Chaetocin, projiziert entlang der approximativen zwei-zähligen Achse.*

Mit gestrichelten Linien sind die Wasserstoffbrücken angegeben

Reflexpaaren dennoch gut messbare Effekt der anomalen Streuung von Schwefel bei  $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung ausgenutzt. (Strukturanalyse und Bestimmung der absoluten Konfiguration siehe im Exper. Teil.)

Das Resultat der Röntgen-Analyse (Fig. 2) bestätigt die postulierte Konstitution, die dimere Struktur sowie die Art der Verknüpfung der beiden monomeren Teile.

Wie schon auf Grund der NMR.-Spektren für den gelösten Zustand angenommen werden konnte, hat die Molekel auch im kristallinen Zustand beinahe vollständig die Punktsymmetrie 2 ( $C_2$ ). Die einzige signifikante Abweichung davon betrifft die Stellung der Wasserstoffe an den beiden pyramidalen Indolinstickstoffatomen: Im einen monomeren Teil neigt sich die N–H-Bindung gegen die benachbarte C-4-Oxo-Gruppe und bildet eine schwache *intramolekulare* Wasserstoffbrücke. Im andern monomeren Teil hingegen ist die pyramidale Konfiguration des Stickstoffatoms invertiert und das N–H bildet eine *intermolekulare* Wasserstoffbrücke zum C-1 Oxosauerstoff (Fig. 3 und 5). Es ist dies die einzige intermolekulare Wasserstoffbrücke im Kristallgefüge. Eine weitere, in beiden monomeren Teilen gleichermaßen ausgebildete intramolekulare Wasserstoffbrücke besteht zwischen der primären Hydroxylgruppe und dem benachbarten C-4-Oxosauerstoff. Überraschend ist dabei, dass die Hydroxymethylengruppe um ca.  $60^\circ$  aus der Ebene der Amidgruppe herausgedreht ist und sich in antiparalleler Lage zur Kohlenstoff-Schwefel-Bindung befindet, wo-

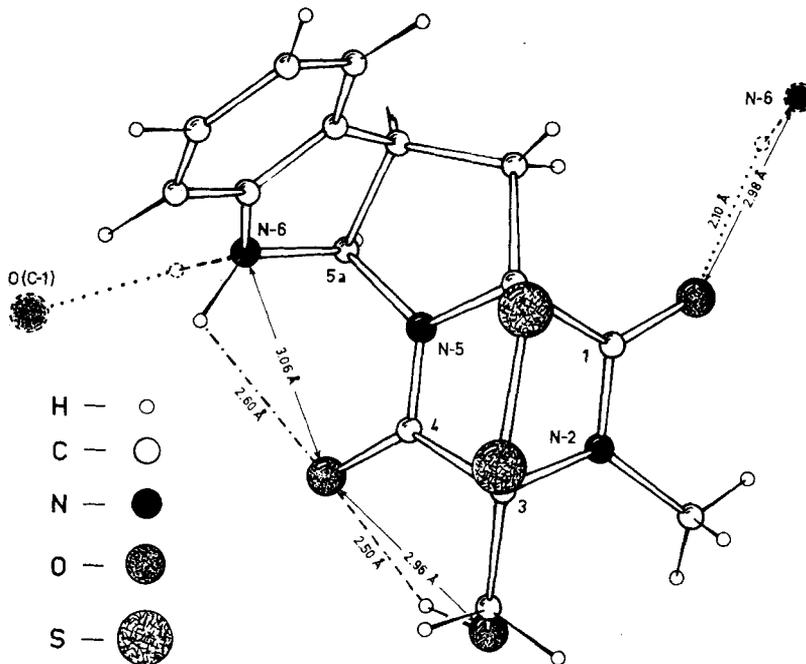


Fig. 3. Ansicht des monomeren Teiles von Chaetocin, projiziert auf die LS-Ebene C-1, N-2, C-4, N-5. Durch unterbrochene Linien sind die Wasserstoffbrücken angegeben:

--- in beiden Monomeren ausgebildet, *intramolekular*

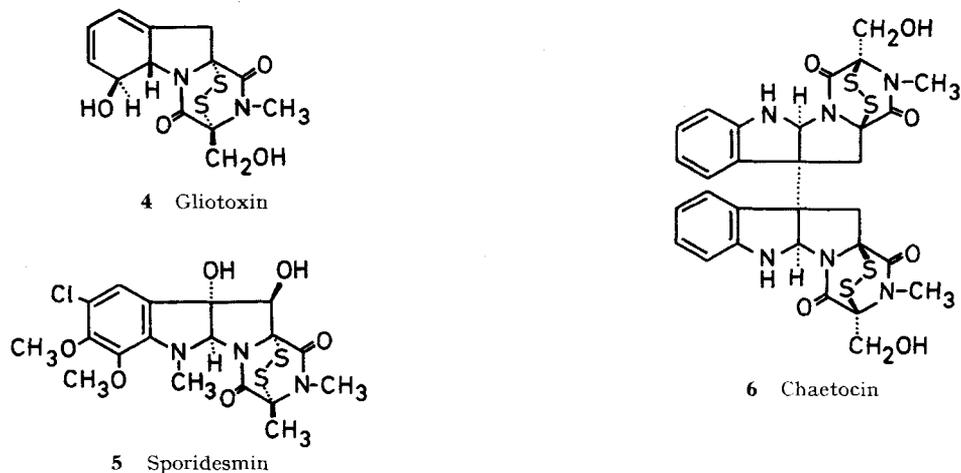
-.-.- nur im Monomeren A ausgebildet, *intramolekular*

..... intermolekulare H-Brücke, von N-6 im Monomeren B zum C-1 Oxosauerstoff im Monomeren A

durch der 0...0-Abstand auf beinahe 3 Å vergrößert wird. Von den vier Carbonylgruppen der dimeren Molekel sind also zwei durch intramolekulare Wasserstoffbrücken assoziiert, die dritte bildet eine intermolekulare Wasserstoffbrücke und die vierte ist frei. Dies zeigt sich, wie bereits früher erwähnt, auch im IR.-Spektrum, das im Carbonylbereich drei verschiedene Absorptionen aufweist.

Die Konformation des überbrückten Dioxopiperazinrings (Fig. 3) ist bei Chaetocin (6) gleich wie bei Gliotoxin (4), Sporidesmin (5) und Aranotin, mit der typischen Torsion der C–S–S–C-Brücke um etwa 10°.

Formelschema 4



Hingegen ist die absolute Konfiguration des überbrückten Systems gerade umgekehrt wie bei den bisher beschriebenen Verbindungen dieser Naturstoffklasse. Bei Chaetocin (6) ist die Chiralität [15] der beiden asymmetrischen Zentren im Dioxopiperazinring (S), bei Gliotoxin (4), Sporidesmin (5) und Aranotin aber (R) [5] [16] [17].

Im Lichte der nun sichergestellten Struktur und absoluten Konfiguration lässt sich die CD.-Kurve von Chaetocin (6) diskutieren, wobei die Messung aus Löslichkeitsgründen mit Diacetylchaetocin (2) in Methanol durchgeführt wurde<sup>9)</sup>. Alle bisher beschriebenen Epidithioxopiperazine weisen bei ca. 230 nm ein negatives Maximum auf (Tab. 1), während Diacetylchaetocin (2) bei 239 nm ein starkes positives Maximum zeigt (Fig. 4). Man kann deshalb annehmen, dass dieser Cotton-Effekt durch den  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang des Dioxopiperazinteils hervorgerufen wird.

Tabelle 1. Circular dichroismus von Diacetylchaetocin und verwandten Verbindungen

| Verbindung                          | Lit.          | Lösungs-<br>mittel | CD.-Maxima [ $\lambda_{max}$ (A $\epsilon$ )] |             |              |             |
|-------------------------------------|---------------|--------------------|---|-------------|--------------|-------------|
| Diacetylchaetocin (2) <sup>9)</sup> |               | Methanol           | 239 (+ 73,8)                                  | 270 (- 6,5) | 304 (+ 14,3) |             |
| Gliotoxin (4)                       | <sup>9)</sup> | Methanol           | 234 (- 30)                                    | 270 (+ 7,7) |              |             |
| Sporidesmin-B                       | [18]          | Äthanol            | 235 (- 28)                                    | 268 (+ 7,1) | 295 (+ 2,5)  | 360 (+ 0,2) |
| Acetylaranotin                      | [17]          | Methanol           | 229 (- 53)                                    | 268 (+ 5)   | 310 (- 0,3)  | 345 (- 0,5) |

<sup>9)</sup> Wir sind Prof. W. Klyne und Dr. P. M. Scopes, Westfield College, London, für die Aufnahme der CD.-Kurven zu grossem Dank verpflichtet.

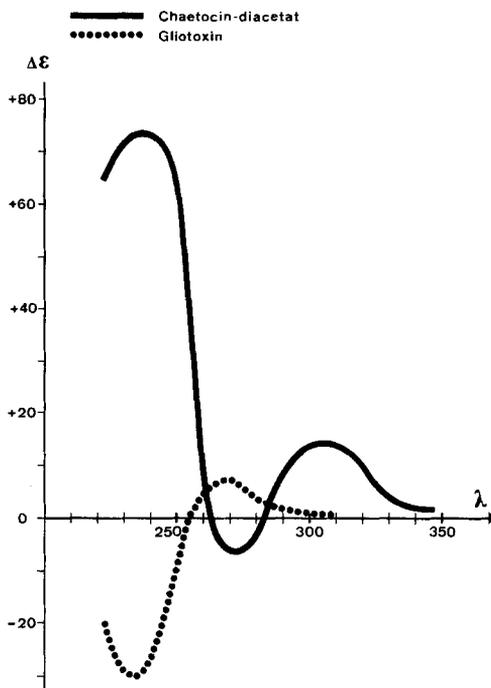


Fig. 4. CD.-Kurven in Methanol

**2. Biologische Aktivitäten.** – In der Tabelle 2 sind die minimalen Hemmkonzentrationen (MIC) von Chaetocin gegen eine Auswahl von Bakterien zusammengestellt:

Tabelle 2. Minimale Hemmkonzentrationen (MIC) von Chaetocin

| Bakterium  | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|--|--------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (penicillinempfindlich) | 0,01                     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (penicillinresistent)   | 0,001                    |
| <i>Sarcina lutea</i>                                 | 31,6                     |
| <i>Streptococcus faecalis</i>                        | 10                       |
| <i>Proteus mirabilis</i>                             | 50                       |
| <i>Shigella flexneri</i>                             | 50                       |
| <i>Escherichia coli</i>                              | 50                       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                        | >100                     |

Bei einer Konzentration von 0,013 mg/l bewirkt Chaetocin eine 50-proz. Hemmung der Zellvermehrung des Mäuse-Mastzelltumors P-815 in der Gewebekultur [19]<sup>10)</sup>. Im Gegensatz zu andern, mit Schwefel überbrückten Dioxopiperazinen [3], zeigt Chaetocin im Agardiffusionsversuch keine Hemmwirkung gegen Vaccinia-, Herpes- und Newcastle Disease-Virus<sup>10)</sup>.

Akute Toxizität: Die  $DL_{50}$  bei der Maus beträgt bei intraperitonealer Applikation 1,7 mg/kg, bei oraler Applikation >1000 mg/kg.

<sup>10)</sup> Wir möchten den Herren Dres. P. Gradwohl und G. Emödi für die Überlassung dieser Resultate bestens danken.

### Experimenteller Teil

unter Mitarbeit von G. Bamert und P. Meier

*Allgemeines:* Die Smp. wurden im Röhrchen bestimmt und sind nicht korrigiert. Die UV.-Spektren wurden mit einem Beckman-Spektrophotometer, Modell DK 2, die IR.-Spektren mit einem Perkin-Elmer-IR.-Zweistrahlspektrophotometer, Modell 21 mit NaCl-Optik bzw. mit einem Unicam SP. 200 und die NMR.-Spektren mit einem Varian-Spektrometer A-60 aufgenommen. Zur Aufnahme der Massenspektren diente ein CEC-21-110 B Massenspektrometer mit Direkt-einlass-System.

*Isolierung von Chaetocin (1):* 500 l einer Nährlösung (pro l 30 g Glucose, 1 g Hefe-Extrakt, 4 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 2,72 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,23 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 28 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O und entmineralisiertes Wasser) wurden mit 50 l einer Vorkultur (gleiches Medium wie Hauptkultur) von *Chaetomium minutum* angeimpft und in einem Stahlfermenter unter Rühren (Blattrührer, 200 U./Min.) und Belüftung (500 l/Min. und 0,5 atü Druck) 112 Std. bei 27° inkubiert. Die Brühe wurde filtriert und das Kulturfiltrat (290 l) zweimal mit je 300 l Essigester extrahiert. Die organischen Phasen wurden einmal mit 80 l Wasser gewaschen und dann im Vakuum auf 6 l eingedampft. Die Lösung wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und auf 300 ml eingeeengt. Der ausgefallene Niederschlag (9,5 g) abfiltriert und einmal aus Pyridin-Methanol umkristallisiert, ergab 6,6 g farblores Chaetocin, das sich bei 240° zersetzt.  $[\alpha]_D^{20} = +379^\circ$  ( $c = 1,00$  in Pyridin);  $+789^\circ$  ( $c = 1,00$  in Dimethylsulfoxid). UV.-Spektrum (Dimethylsulfoxid):  $\lambda_{max} = 306$  nm ( $\log \epsilon = 3,78$ ). IR.-Spektrum (KBr): u. a. Banden bei 3530, 3420, 3330, 1680 (breit), 1655, 1605 cm<sup>-1</sup> (siehe auch Fig. 1). NMR.-Spektrum ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): 3,02 S (6 H), 2,92 D + 3,64 D (AB, J = 15 Hz, 4 H), 4,18 D (J = 5 Hz, 4 H), 5,30 S (2 H), 5,80 T (J = 5 Hz, 2 H), 6,5–7,5 M (10 H, 2 H austauschbar). Massenspektrum (in Klammern relative Prozentzahlen): *m/e* 267 (5), 265 (6), 253 (25), 182 (25), 154 (15), 130 (7), 127 (10), 106 (35), 105 (28), 91 (70), 79 (30), 78 (100), 77 (40). Molekulargewicht: gef. 654 (vaporometrisch in Dimethylformamid); Äquivalenzgewicht: gef. 727, 730 (mit Kaliummethylat in Dimethylformamid). Zur Analyse 3 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

|  |             |       |        |        |         |
|--|-------------|-------|--------|--------|---------|
| C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub> | Ber. C 51,7 | H 4,1 | N 12,1 | O 13,8 | S 18,4% |
| (696,85)   | Gef. „ 51,9 | „ 4,2 | „ 11,9 | „ 14,0 | „ 18,0% |

*Di-O-acetylchaetocin (2):* 500 mg Chaetocin (1) wurden in 15 ml Pyridin gelöst und darauf mit 2 ml Ac<sub>2</sub>O versetzt. Die Lösung wurde 1 Std. bei 50° gehalten und anschliessend im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde einmal aus Aceton umkristallisiert. Smp. 220–225° (Zers.).  $[\alpha]_D^{20} = +679^\circ$  ( $c = 0,99$  in CHCl<sub>3</sub>). CD.: 239 nm ( $\Delta \epsilon = +73,8$ ), 263 (0), 270 (–6,52), 283 (0), 304 (+14,3). (0,36 mg/ml in Methanol bei 20°; Schichtdicke 0,1 cm.) UV.-Spektrum (Methanol):  $\lambda_{max} = 203$  nm ( $\log \epsilon = 4,7$ ), ca. 240 nm (Schulter;  $\log \epsilon = 4,15$ ), 301 nm ( $\log \epsilon = 3,73$ ). IR.-Spektrum (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): u. a. Banden bei 3410, 1750, 1690 (breit), 1610 cm<sup>-1</sup>. NMR.-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>): 2,02 S (6 H), 2,70 D + 3,80 D (AB, J = 15 Hz, 4 H), 2,97 S (6 H), 4,60 D + 4,84 D (AB, J = 12,5 Hz, 4 H), 5,35 S (4 H, davon 2 austauschbar), 6,5–7,4 M (8 H).

Massenspektrum (Hochauflösung):

| Gef.     | Ber.     | Summenformel  | relative Pik-Grösse |
|----------|----------|---|---------------------|
| 267,0996 | 267,1008 | C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> | 65                  |
| 265,0852 | 265,0851 | C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> | 100                 |
| 182,0515 | 182,0480 | C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O               | 50                  |
| 154,0524 | 154,0531 | C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub>                 | 45                  |

Molekulargewicht: gef. 786 (vaporometrisch in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Zur Analyse 3 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

|  |             |       |        |        |         |
|--|-------------|-------|--------|--------|---------|
| C <sub>34</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> S <sub>4</sub> | Ber. C 52,3 | H 4,1 | N 10,8 | O 16,4 | S 16,4% |
| (780,92)   | Gef. „ 52,1 | „ 4,1 | „ 10,6 | „ 15,8 | „ 16,5% |

*Entschwefelung von Di-O-acetylchaetocin (2):* Entsprechend einer Vorschrift [10] für Gliotoxin wurden ölfreie Aluminium-Späne mit verd. NaOH behandelt. Sobald die H<sub>2</sub>-Entwicklung stark war, wurde dekantiert und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Darauf behandelte man das Metall während 2 Min. mit einer 0,5-proz. Lösung von HgCl<sub>2</sub>. Das ganze Verfahren wurde einmal wiederholt, das Metall nacheinander mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und dann direkt

für die Reaktion verwendet. 280 mg Diacetylchaetocin (**2**) in 50 ml Tetrahydrofuran wurden mit 5g des Aluminiumamalgams und 1,5 ml H<sub>2</sub>O behandelt. Während 8Std. wurde N<sub>2</sub> durch die Lösung geblasen, dann wurde filtriert und das Filtrat eingedampft. Aus dem komplexen Reaktionsgemisch liess sich durch präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel G, System: CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH/49:1) die apolarste Komponente abtrennen. Es resultierten total 29 mg amorphes, aber dünnschichtchromatographisch einheitliches **3**. IR.-Spektrum (CHCl<sub>3</sub>): u.a. Banden bei 3420, 1685, 1620 cm<sup>-1</sup>. UV.-Spektrum (CHCl<sub>3</sub>): λ<sub>max</sub> = 241,5 nm (log ε = 4,53), 300 nm (log ε = 3,78). NMR.-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>): 3,12 S (6 H), 2,68 D + 3,97 T (A<sub>3</sub>B, J = 8,5 Hz, 6 H), 4,86 D + 5,68 D (AB, J = 1 Hz, 4 H), 5,20 S (unscharf, austauschbar, 2 H), 5,32 S (2 H), 6,5-7,3 M (8 H). Massenspektrum (Hochauflösung):

| Gef.     | Ber.     | Summenformel  | relative Pik-Grösse |
|----------|----------|---|---------------------|
| 536,2172 | 536,2172 | C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> | 21                  |
| 397,1628 | 397,1664 | C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | 2                   |
| 384,1603 | 384,1586 | C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | 4                   |
| 370,1551 | 370,1555 | C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> | 3                   |
| 268,1087 | 268,1086 | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> | 56                  |
| 267,1030 | 267,1008 | C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> | 100                 |
| 257,1093 | 257,1079 | C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub>                | 3                   |
| 250,0965 | 250,0980 | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O              | 4                   |
| 245,1091 | 245,1079 | C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub>                | 6                   |
| 232,0997 | 232,1000 | C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>                | 4                   |
| 185,0726 | 185,0715 | C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O               | 4                   |
| 184,0641 | 184,0637 | C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O               | 4                   |
| 183,0554 | 183,0558 | C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O               | 4                   |
| 182,0467 | 182,0480 | C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O               | 4                   |
| 158,0814 | 158,0844 | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>                | 4                   |
| 157,0751 | 157,0766 | C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub>                 | 10                  |
| 156,0670 | 156,0687 | C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>                 | 6                   |
| 155,0611 | 155,0609 | C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub>                 | 4                   |
| 130,0645 | 130,0657 | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N                               | 70                  |

Zur Analyse 3 Std. bei 70° im HV getrocknet.

C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (536,592) Ber. N 15,7% Gef. N 14,6%

*Fermentationsversuch unter Zusatz von radioaktivem Tryptophan:* 24 Erlenmeyer-Kolben mit je 120 ml Nährlösung wurden mit je 1 ml einer Sporensuspension von *Chaetomium minutum* angeimpft und auf einer Schüttelmaschine bei 27° inkubiert. 4 Erlenmeyer-Kolben wurden als Kontrolle verwendet. Die anderen 20 wurden nach 4 Tagen mit total 200 mg eines Gemisches von [6-<sup>3</sup>H]-DL-Tryptophan [4,68 mCi; 1,06 · 10<sup>10</sup> dpm/mMol] und DL-Tryptophan-[alanin-3-<sup>14</sup>C] [0,508 mCi; 1,15 · 10<sup>9</sup> dpm/mMol] in 40 ml 0,025N NaOH versetzt. Nach total 11 Tagen wurde die Brühe filtriert und das Filtrat dreimal mit dem gleichen Volumen Essigester extrahiert. Die organischen Phasen wurden einmal mit dem halben Volumen Wasser gewaschen, vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Man erhielt 173 mg Rohextrakt [<sup>3</sup>H: 1,71 · 10<sup>6</sup> dpm/mg; <sup>14</sup>C: 1,75 · 10<sup>5</sup> dpm/mg], der mehrmals mit Petroläther gewaschen wurde. 100 mg des entfetteten Extraktes liess man in 3 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid 16 Std. bei 25° stehen. Die Lösung wurde im HV. zur Trockene eingengt und der Rückstand durch präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel G; CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 49:1) gereinigt. Die dem Diacetylchaetocin (**2**) entsprechende Zone (10 mg) enthielt auf Grund des NMR.-Spektrums 3,0 ± 0,5 mg **2**. Dieses angereicherte Material [<sup>3</sup>H: 1,18 · 10<sup>6</sup> dpm/mg; <sup>14</sup>C: 1,06 · 10<sup>5</sup> dpm/mg] wurde mit 30 mg reinem, inaktivem **2** verdünnt (Verdünnung ca. 1:10) und aus Pyridin-Methanol kristallisiert. Man erhielt 30 mg **2** [<sup>3</sup>H: 3,07 · 10<sup>5</sup> dpm/mg; <sup>14</sup>C: 2,79 · 10<sup>4</sup> dpm/mg], das noch zweimal aus Pyridin-Methanol und anschliessend einmal aus Aceton umkristallisiert wurde [<sup>3</sup>H: 3,04 · 10<sup>6</sup> dpm/mg = 2,37 · 10<sup>8</sup> dpm/mMol; <sup>14</sup>C: 2,63 · 10<sup>4</sup> dpm/mg = 2,05 · 10<sup>7</sup> dpm/mMol]. Für das verdünnte Diacetat **2** betragen demnach die molaren Einbauraten 2,24% für <sup>3</sup>H und 2,02% für <sup>14</sup>C, was für das unverdünnte Präparat Einbauraten von über 20% ergab.

Beim eingesetzten Tryptophan betrug das Aktivitätsverhältnis  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  9,2 ( $\pm 0,5$ ) beim gereinigten Diacetat **2** hingegen 11,4  $\pm 0,5$ .

**Röntgenstrukturanalyse von Chaetocin**

*Kristalldaten:* Chaetocin,  $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4$  ( $M = 696,85$ ), prismatische, gelbliche Kristalle aus Pyridin/Methanol.

Zelldimensionen:  $a = 23,30$ ,  $b = 7,73$ ,  $c = 17,31$  Å,  $V = 3118$  Å<sup>3</sup> (alle  $\pm 0,01$  Å).

Raumgruppe:  $P2_12_12_1$  ( $Z = 4$  Formeleinheiten/Zelle),  $d_{exp.} = 1,47$  g/cm<sup>3</sup>,  $d_{calc.} = 1,48$  g/cm<sup>3</sup>.

Die Reflexe wurden auf einem linearen Diffraktometer mit  $\text{MoK}\alpha$ -Strahlungen gemessen (Graphitmonochromator); Anzahl gemessener Reflexe ( $\sin\theta/\lambda \leq 0,58$  Å<sup>-1</sup>) 2527; Anzahl Reflexe mit signifikanter Intensität 1704.

Reduktion der Daten auf absolute Werte (ohne Absorptionskorrekturen):  $B = 3,1$  Å<sup>2</sup>,  $\langle |E| \rangle = 0,854$ ,  $\langle |E^2 - 1| \rangle = 0,773$ ,  $\langle |E^2| \rangle = 0,984$ .

*Strukturanalyse:* Die ca. 2 Å langen S-S-Vektoren konnten in der Patterson-Funktion nicht lokalisiert werden.

Die Phasen der stärksten normalisierten Struktur Faktoren ( $E$ -Werte) wurden mittels der «Tangensformel» (1) bestimmt.

$$\text{tg } \varphi_h = \frac{\sum_k |E_k| \cdot |E_{h-k}| \cos(\varphi_k + \varphi_{h-k})}{\sum_k |E_k| \cdot |E_{h-k}| \sin(\varphi_k + \varphi_{h-k})} \tag{1}$$

Ausgehend von den willkürlich angenommenen Phasen der folgenden Reflexe

| $h$ | $k$ | $l$ | $ E $ | Phase        |
|-----|-----|-----|-------|--------------|
| 6   | 0   | 9   | 2,89  | $\pi/2$      |
| 15  | 0   | 15  | 2,70  | $\pi/2$      |
| 6   | 1   | 0   | 2,54  | 0            |
| 1   | 0   | 14  | 2,68  | 0            |
| 8   | 0   | 4   | 4,05  | $a = 0, \pi$ |
| 9   | 3   | 10  | 2,94  | $b$          |
| 3   | 6   | 5   | 2,48  | $c$          |
| 8   | 3   | 3   | 2,41  | $d$          |

} =  $\pm \pi/4, \pm 3\pi/4$

wurde für die 118 grössten  $E$ -Werten ( $|E| \geq 1,60$ ) nach der Formel (1) die Phasen berechnet für alle 64 Kombinationen mit den verschiedenen Werten für  $a, b, c$  und  $d$ . Jede Kombination ist mit Konsistenzkriterien charakterisiert, die jedoch nicht eindeutig auf die richtige Phasenkombination hindeuten. Erst die Extension der Phasenbestimmung und die Berechnung der  $E$ -Fourier-Synthese entscheiden über den Erfolg. In unserem Fall führte die vierte Wahl unter den 64 Kombinationen zu einer  $E$ -Fourier-Synthese (gerechnet mit 516  $E$ -Werten), in der alle 46 schweren Atome der Molekel gefunden werden konnten.

Die Verfeinerung der Struktur nach dem Verfahren der kleinsten Quadrate und durch Differenz-Fourier-Synthesen zur Lokalisierung der Wasserstoffatome führte schliesslich zu einem  $R$ -Faktor von 0,042 [alle 1704 signifikanten Struktur Faktoren eingeschlossen, 526 Atomparameter (S, O, N, C anisotrop, H isotrop) und ein Maßstabfaktor]. Die mittleren Standardabweichungen der Atomkoordinaten betragen bei diesem Stand der Verfeinerung für S 0,003, O 0,006, N 0,007, C 0,009, H 0,09 Å.

Eine detaillierte Besprechung und Dokumentation der Strukturanalyse wird an anderer Stelle veröffentlicht. Atomparameter und Struktur faktorlisten werden auf Wunsch zugestellt (H.P.W.).

*Bestimmung der absoluten Konfiguration:* Das anomale Streuvermögen von Schwefel bei  $\text{CuK}\alpha$ -Bestrahlung beträgt  $\Delta f'' = 0,6$  [20]. Zur experimentellen Messung dieses kleinen anomalen Streueffektes wurde, zur Vermeidung von Absorptionsfehlern, ein sehr kleiner Kristall verwendet. In der Tabelle 3 sind die experimentellen und die berechneten Werte zusammengestellt.

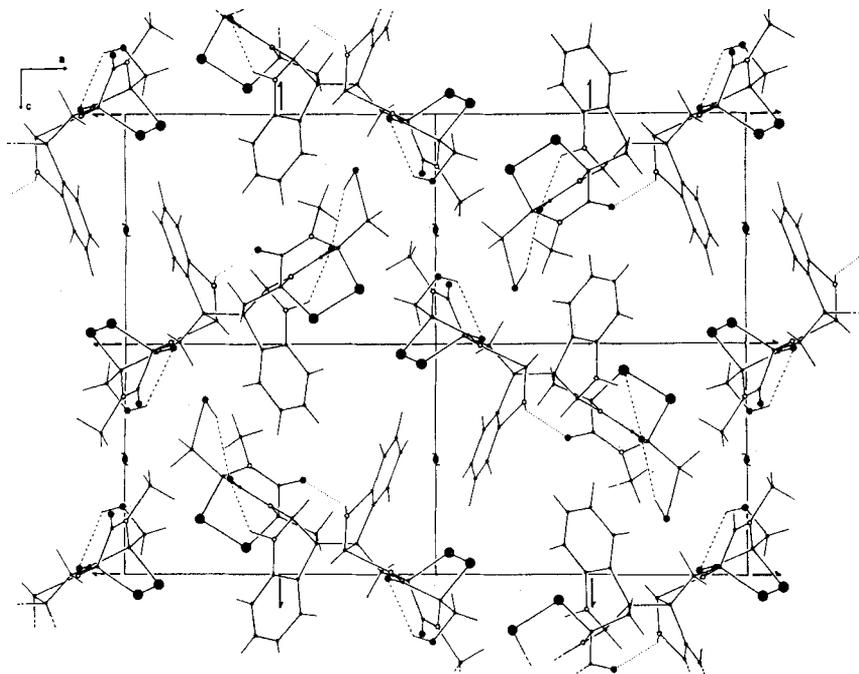
Die Intensitäten  $I(hkl)$  und  $I(\bar{h}\bar{k}\bar{l})$  sind Mittelwerte aus 10 Messungen an den Stellen  $hkl$  und  $\bar{h}\bar{k}\bar{l}$ , bzw.  $\bar{h}kl$  und  $h\bar{k}\bar{l}$ , im rechtshändigen reziproken Gitter.  $\Delta I = I(hkl) - I(\bar{h}\bar{k}\bar{l})$ .

$F^2_{calc.}$  ist der quadrierte Struktur faktor, berechnet auf der Grundlage des verfeinerten Strukturmodells in einem rechtshändigen Koordinatensystem, und  $\Delta F^2_{calc.}$  ist der durch die anomale

Tabelle 3. Werte zur Bestimmung der absoluten Konfiguration

| $h$ | $k$ | $l$ | $I(hkl)$ | $\bar{I}(hkl)$ | $\Delta I$ | $F^2_{calc.}$ | $\Delta F^2_{calc.}$ |
|-----|-----|-----|----------|----------------|------------|---------------|----------------------|
| 4   | 1   | 1   | 1300     | 1143           | +157       | 1226          | +268                 |
| 5   | 1   | 1   | 1287     | 1646           | -359       | 1457          | -311                 |
| 7   | 1   | 6   | 824      | 1024           | -200       | 1888          | -342                 |
| 8   | 1   | 1   | 3784     | 3506           | +278       | 6108          | +622                 |
| 3   | 1   | 3   | 2025     | 1787           | +238       | 1816          | +268                 |
| 2   | 1   | 3   | 2270     | 2026           | +244       | 2398          | +251                 |
| 1   | 1   | 4   | 5786     | 5300           | +486       | 4425          | +559                 |
| 8   | 1   | 5   | 529      | 668            | -139       | 1546          | -255                 |
| 5   | 1   | 5   | 2300     | 2061           | +239       | 2415          | +403                 |
| 9   | 2   | 1   | 1213     | 1137           | +76        | 1870          | +305                 |
| 6   | 2   | 2   | 2748     | 3335           | -587       | 3808          | -534                 |
| 10  | 2   | 3   | 1106     | 992            | +114       | 2506          | +425                 |
| 2   | 2   | 4   | 2436     | 2177           | +259       | 2293          | +294                 |
| 7   | 2   | 4   | 1109     | 1036           | +73        | 1700          | +259                 |
| 9   | 2   | 6   | 390      | 317            | +73        | 1080          | +169                 |
| 2   | 2   | 7   | 814      | 679            | +135       | 1964          | +250                 |

Streuung verursachte Intensitätsunterschied zwischen *Friedel*'schen Reflexpaaren. Die Auswahl der Reflexe wurde so getroffen, dass  $\Delta F^2_{calc.}$  mehr als 10% des Strukturfaktors  $F^2_{calc.}$  betrug. Zur Verminderung von Fehlern durch Extinktion wurden Reflexe mit niedrigen Indices vermieden. Wie die Werte für  $\Delta I$  und  $\Delta F^2_{calc.}$  zeigen, besteht eine gute Korrelation zwischen diesen beiden Grössen (die Intensitäten wären noch für *Lorentz*- und *Polarisation*seffekte zu korrigieren), und in

Fig. 5. Packungsdiagramm von *Chaetocin*.

Die ..... Linien deuten die *intermolekularen* H-Brücken N-H... O an, die - - - - Linien die *intramolekularen* H-Brücken

keinem Fall widersprechen sich die Vorzeichen. Die Chiralitäten der asymmetrischen Zentren bestimmen sich somit zu (3*S*:11*aS*:5*aR*:10*bR*).

Eine Berechnung aller intermolekularen Atomabstände ergab keine ungewöhnlich starken Kontakte. Der kürzeste intermolekulare Abstand, abgesehen von der oben beschriebenen intermolekularen Wasserstoffbrücke (Fig. 4), beträgt 2,2 Å zwischen zwei Wasserstoffatomen.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S. A. Waksman & E. Bugie, *J. Bacteriol.* 48, 527 (1944); W. B. Geiger, J. E. Conn & S. A. Waksman, *ibid.* 48, 531 (1944).
- [2] W. B. Geiger, *Arch. Biochemistry* 21, 125 (1949).
- [3] D. Brewer, D. E. Hannah & A. Taylor, *Canad. J. Microbiol.* 12, 1187 (1966); P. W. Trown, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 33, 402 (1968).
- [4] J. W. Ronaldson, A. Taylor, E. P. White & R. J. Abraham, *J. chem. Soc.* 1963, 3172; und spätere Arbeiten.
- [5] R. Nagarajan, L. L. Huckstep, D. H. Lively, D. C. Delong, M. M. Marsh & N. Neuss, *J. Amer. chem. Soc.* 90, 2980 (1968); D. B. Cosulich, N. R. Nelson, J. H. van den Hende, *ibid.* 90, 6519 (1968).
- [6] A. Kato, T. Saeki, S. Suzuki, K. Ando, G. Tamura & K. Arima, *J. Antibiotics* 22, 322 (1969).
- [7] A. I. Scott, «Ultraviolet Spectra of Natural Products», Pergamon Press (1964).
- [8] M. Hesse, «Indolalkaloide in Tabellen», Springer-Verlag, Berlin 1964.
- [9] R. B. Woodward, N. C. Yang, T. J. Katz, V. M. Clark, J. Harley-Mason, R. F. J. Ingleby & N. Sheppard, *Proc. Chem. Soc.* 1960, 76.
- [10] J. Dutcher, J. R. Johnson & W. F. Bruce, *J. Amer. chem. Soc.* 67, 1736 (1945).
- [11] G. Casnati, M. Francioni, A. Guareschi & A. Pochini, *Tetrahedron Letters* 1969, 2485.
- [12] F. A. L. Anet & A. J. R. Bourn, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 5250 (1965).
- [13] R. A. Bell & J. K. Saunders, *Canad. J. Chemistry* 46, 3421 (1968).
- [14] J. Karle & I. L. Karle, *Acta crystallogr.* 21, 849 (1966).
- [15] R. S. Cahn, C. K. Ingold & V. Prelog, *Angew. Chemie* 78, 413 (1966).
- [16] A. F. Beecham, J. Fridrichsons & A. Mcl. Mathieson, *Tetrahedron Letters* 1966, 3131.
- [17] R. Nagarajan, N. Neuss & M. M. Marsh, *J. Amer. chem. Soc.* 90, 6518 (1968).
- [18] H. Herrmann, R. Hodges & A. Taylor, *J. chem. Soc.* 1964, 4315.
- [19] H. Stähelin, *Medicina experimentalis* 7, 92 (1962).
- [20] «Int. Tables for X-Ray Crystallography», III, 251, The Kynoch Press (1962).

## 124. Die Photoelektron-Spektren der Monohalogenacetylene<sup>1)</sup>

von H. J. Haink, E. Heilbronner, V. Hornung und Else Kloster-Jensen

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel

(9. V. 70)

*Summary.* The photoelectron spectra of the four monohaloacetylenes X–C≡C–H with X = F, Cl, Br, I have been recorded. The first four bands of these spectra are assigned (in order of increasing ionization potentials) to the following states: band 1:  ${}^2\Pi_{3/2}(1)$ ,  ${}^2\Pi_{1/2}(1)$ ; band 2:  ${}^2\Pi_{3/2}(2)$ ,  ${}^2\Pi_{1/2}(2)$ ; band 3:  ${}^2\Sigma^+(3)$ ; band 4:  ${}^2\Sigma^+(4)$ . A correlation diagram based on a simple ZDO-MO model shows that the observed band positions and the size of the splits due to spin-orbit coupling can be satisfactorily explained in terms of such a model. It is found that the orbital energies  $A_X$  of the postulated halogen  $n p_z(X)$ -basis orbitals are a linear function of the ionization potentials  $I(X)$  of the free atoms X. The validity of the ZDO-MO-model is confirmed by the excellent qualitative agreement between the observed and predicted spacings of the vibrational fine structure of the  $\pi$ -bands.

<sup>1)</sup> 12. Mitteilung über Anwendungen der Photoelektron-Spektroskopie. 11. Mitteilung: [1].