

- [19] *M. E. Wacks & V. H. Dibeler*, J. chem. Physics *31*, 1557 (1959).
[20] *C. E. Melton & W. H. Hamill*, J. chem. Physics *41*, 3464 (1964).
[21] *H. Baba, I. Omura & K. Higasi*, Bull. chem. Soc. Japan *29*, 521 (1956).
[22] *J. D. Morrison & A. J. C. Nicholson*, J. chem. Physics *20*, 1021 (1952).
[23] *K. Watanabe*, J. chem. Physics *26*, 542 (1957).
[24] *M. I. Al-Joboury & D. W. Turner*, J. chem. Soc. London *1964*, 4434.
[25] *A. G. Harrison, P. Kebarle & F. P. Lossing*, J. Amer. chem. Soc. *83*, 777 (1961).
[26] *F. I. Vilesov & A. N. Terenin*, Dokl. Akad. Nauk. SSSR *115*, 744 (1957).
[27] *R. Bralsford, P. V. Harris & W. C. Price*, Proc. Roy. Soc. A, *258*, 459 (1960).
[28] *F. I. Vilesov*, Dokl. Akad. Nauk. SSSR *132*, 632 (1960).
[29] *H. C. Brown & Y. Okamoto*, J. Amer. chem. Soc. *80*, 4979 (1958).
[30] *J. Collin*, Mém. Soc. Roy. Sci., Liège, *14*, 9 (1967).
[31] *F. H. Field & J. L. Franklin*, «Electron Impact Phenomena and Properties of Gaseous Ions», Table 45, Academic Press, New York 1957.
[32] *D. C. Frost & C. A. McDowell*, Canad. J. Chemistry *36*, 39 (1958).

242. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

85. Mitteilung [1]

Zur Konstitution des Coprogens

von **W. Keller-Schierlein** und **H. Diekmann**¹⁾

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule Zürich

(24. IX. 70)

Summary. The structure of coprogen, a fungal sideramine, has been determined by spectroscopic investigations and chemical degradation.

Von allen bisher isolierten und charakterisierten *Sideraminen* [2] ist das Coprogen das am längsten bekannte; es wurde etwa gleichzeitig mit dem Ferrichrom [3] zum erstenmal beschrieben [4]. Während für zahlreiche später aufgefundene Sideramine gültige Strukturformeln vorliegen [2] und einige davon auch synthetisch zugänglich sind [5], ist über die Chemie des Coprogens bisher kaum etwas bekannt geworden.

Im Verlaufe unserer systematischen Untersuchungen über Sideramine sind wir auf mehrere Pilzstämme gestossen, die ebenfalls Coprogen produzieren [6]²⁾. Auch in anderen Laboratorien scheint es gelegentlich aufgefunden worden zu sein. So erwies sich insbesondere das von *Padmanaban & Sarma* [7] aus *Neurospora crassa* isolierte Sideramin als Coprogen³⁾, und eine eigene Züchtung von *Neurospora crassa* lieferte ebenfalls dieses Sideramin.

Coprogen, eine neutrale Verbindung, fiel bei uns als chromatographisch einheitliches, amorphes, braunes Pulver an; die Kristallisation gelang im Gegensatz zu den Angaben von *Pidacks & Mitarb.* [4b] nicht. Trotzdem gaben unsere Präparate Analysen, die mit denen der amerikanischen Arbeitsgruppe befriedigend überein-

¹⁾ Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, der Universität Tübingen.

²⁾ Eine Vergleichsprobe authentisches Coprogen verdanken wir Herrn Dr. *N. Bohonos*, Pearl River, N. Y.

³⁾ Wir danken Herrn Prof. *Padmanaban*, Bangalore, für eine Vergleichsprobe.

stimmten. Immerhin sei darauf hingewiesen, dass das Coprogen stark hygroskopisch ist und eine Molekel Wasser erst nach längerem Trocknen abgibt. Die mit den Analysen vereinbare Bruttoformel $C_{35}H_{53}FeN_6O_{13}$ wird durch Abbauergebnisse und NMR.-Spektren von Derivaten bestätigt. Das IR.-Absorptionsspektrum (Fig. 1) zeigt neben den für viele Sideramine charakteristischen Banden bei 1660 , 1540 und 1450 cm^{-1} [8] ein schwächeres Maximum bei 1730 cm^{-1} , das einer Estergruppe zugeordnet wird. Die Absorptionsbanden zwischen 1400 und 1700 cm^{-1} stimmen besser mit denen von Ferrirubin und Ferrirhodin [8] überein als mit denen von Ferrichrom, Ferrichrysin und Ferricrocin [9]. Auch die Absorptionsbanden im UV. und Sichtbaren bei 217 , 250 und 440 nm weichen von denen der Acethydroxamate Ferrichrom, Ferrichrysin usw. ab, stimmen aber gut überein mit denen von Ferrirhodin, Ferrirubin und Ferrichrom A. Es darf daraus geschlossen werden, dass auch beim Coprogen den Hydroxamatgruppen α, β -ungesättigte Säurereste zu Grunde liegen.

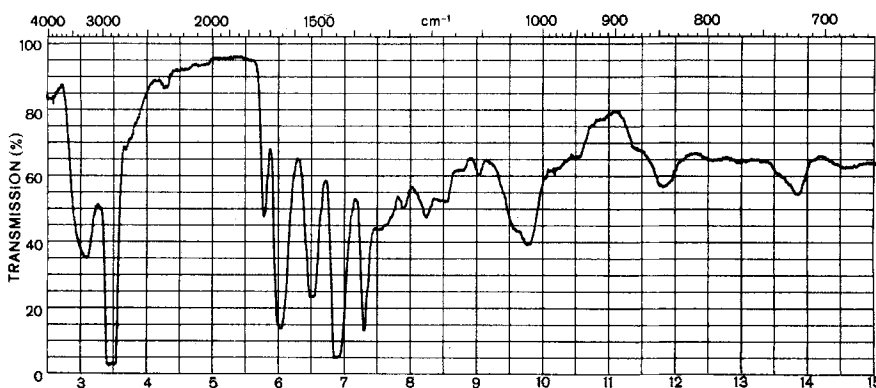
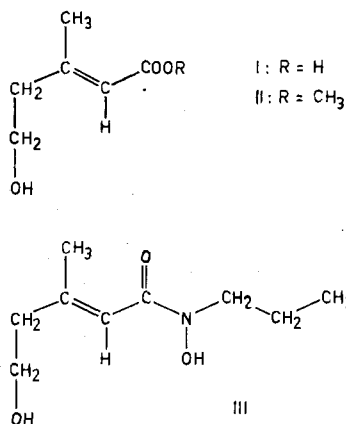


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von Coprogen in Nujol

Analog zu unseren früheren Untersuchungen über Sideramine [2] liess sich auch aus dem Coprogen das Eisen mittels 8-Hydroxychinolin entfernen. Das farblose Desferricoprogen gab mit Eisen(III)-chlorid Coprogen zurück. In den Produkten der sauren Hydrolyse von Desferricoprogen wurde neben Spuren von Ornithin⁴⁾ als einzige Aminosäure δ -N-Hydroxyornithin gefunden. Wenn Rohhydrolysate vor der Analyse katalytisch reduziert wurden, liess sich als einzige Aminosäure L-Ornithin nachweisen. Neutrale Aminosäuren, insbesondere Glycin und Serin, die für die bisher untersuchten Sideramine aus Pilzen neben δ -N-Hydroxyornithin charakteristisch sind [2], fehlten gänzlich. Dies war der erste Anhaltspunkt dafür, dass Coprogen in seinem Aufbau von den bekannten Sideraminen der Ferrichromgruppe abweicht. Als weitere Bausteine liessen sich durch Hydrolyse bzw. Abbau von Desferricoprogen mit Perjodsäure 1 Mol. Essigsäure sowie die *trans*-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure (I) nachweisen. Diese ist bereits als Baustein des Ferrirubins erhalten worden [8] und kommt in manchen Pilzkulturen in geringer Menge auch frei vor [10]. Synthetisch

⁴⁾ Es entspricht unseren Erfahrungen, dass Hydroxylaminogruppen unter den Hydrolysebedingungen in geringem Masse zu Aminogruppen reduziert werden. Die Annahme, dass die geringe Menge Ornithin auch in diesem Falle ein Artefakt ist, ist daher gut begründet.

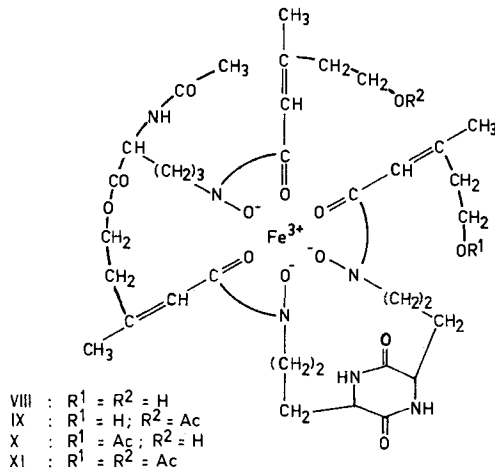
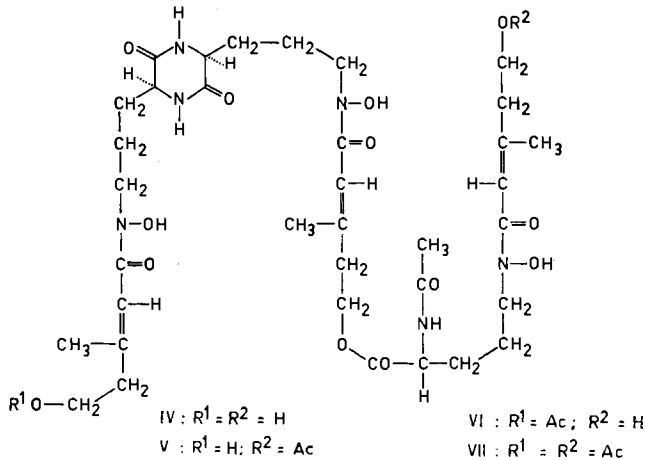
lässt sie sich durch alkalische Isomerisierung des entsprechenden *cis*-Lactons, das auf fermentativem Wege leicht zugänglich ist [11], bereiten [10].



Andere Abbauprodukte ausser den erwähnten liessen sich nicht nachweisen, und auch die NMR.-Spektren von Desferricoprogen und weiterer Derivate (s. unten) lassen keine Signale erkennen, die nicht auf die genannten Bausteine zurückführbar sind. Sowohl die Elementaranalysen des Coprogens und seiner Derivate wie auch die NMR.-Spektren von Desferricoprogen und weiterer Derivate lassen sich widerspruchsfrei interpretieren, wenn man annimmt, dass sich das Coprogen aus drei Molekeln *trans*-Fusarinin (III)⁵⁾, einer Molekel Essigsäure und einem Eisen(III)-Ion unter Abzug von 4 Molekeln Wasser und drei Protonen zusammensetzt. Insbesondere das schon früher abgebildete NMR.-Spektrum von Desferricoprogen in schwerem Wasser [6] erfährt nun folgende Deutung: δ 1,5–1,9 ppm (*b*, 6 CH₂ in β und γ von δ -N Hydroxyornithin-Resten); 1,93 ppm (*bs*, 9 H; 3 CH₃-C=C); 2,03 ppm (*s*, 3 H; CH₃-CO; Integral von 1,5–2,2 ppm 24 H); 2,40 ppm (*t*, $J = 6, 6$ H; 3 CH₂-C=C); 3,5–4,0 ppm (*k*, 10 H; 2 CH₂-OH; 3 CH₂-N); 4,0–4,6 ppm (*k*, 5 H; 1 CH₂-O-CO; 3 N-CH-CO); 5,8–6,4 ppm (*b*, 3 H; H-C=C).

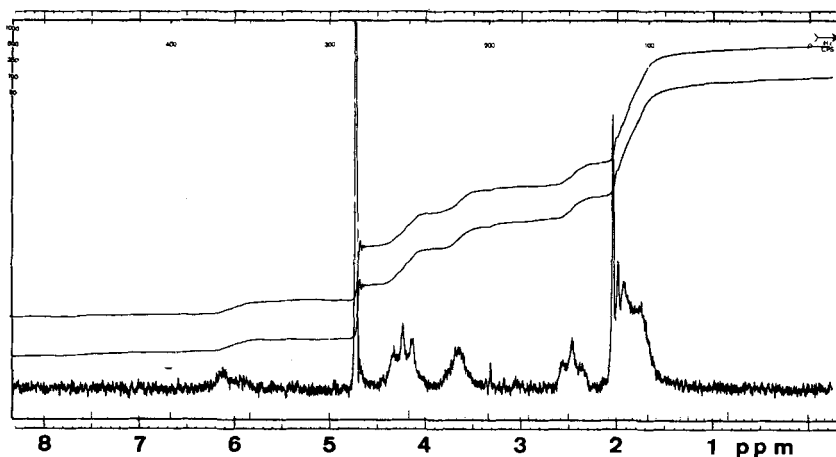
Aus den vier Bausteinen – drei *trans*-Fusarininresten und einem Acetylrest – ist die Strukturformel des Desferricoprogens derart zu konstruieren, dass sowohl Ester- wie Amid-Bindungen am Aufbau beteiligt sind. Wegen der geringen Intensität der Esterbande (1730 cm⁻¹, Fig. 1) herrschen die Amidbindungen vor. Es sind offenbar drei Amidbindungen und eine Esterbindung beteiligt. Damit im Einklang stehen die Resultate der Acetylierung, die weiter unten eingehender diskutiert werden und die zeigen, dass nur zwei der drei alkoholischen Hydroxyle der *trans*-Fusarininreste frei vorliegen. Derselbe Schluss kann auch aus dem oben erwähnten NMR.-Spektrum gezogen werden. Von den verschiedenen Möglichkeiten, die Bausteine in diesem Sinne zusammensetzen, kommt aus den nachfolgenden Gründen nur die Formel IV, aus der für das Coprogen selbst die Formel VIII folgt, in Frage.

⁵⁾ Wir nennen die Verbindung III *trans*-Fusarinin in Analogie zum Fusarinin mit gleicher Konstitution, aber *cis*-Konfiguration an der Doppelbindung. Fusarinin wie auch *trans*-Fusarinin sind als Naturstoffe nachgewiesen worden [12] [13].



Die partielle Acetylierung von Coprogen mit Essigsäureanhydrid in Methanol führt zu zwei weniger polaren Produkten, die neben dem Ausgangsmaterial durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen wurden. Die Auftrennung mittels einer *Craig*-Verteilung führte zu den reinen Verbindungen, von denen die unpolarste, das Di-O-acetylderivat XI, kristallisiert werden konnte. Die Analysen passen auf die entsprechende Bruttoformel, $C_{30}H_{57}FeN_6O_{15}$, und die NMR.-Spektren der Desferriverbindung (VII) in D_2O (Fig. 2) und in Pentadeuteropyridin (vgl. Tabelle) sind mit der angenommenen Strukturformel im Einklang.

Das zweite Acetylierungsprodukt, dessen R_f -Wert und Verteilungskoeffizient zwischen denen von Coprogen und seinem Di-O-acetylderivat liegen, wurde nur in amorpher Form erhalten. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Gemisch der beiden isomeren Monoacetate IX und X. Dass Monoacetate vorliegen, ergibt sich aus den NMR.-Spektren des Desferriderivates (V + VI) in D_2O und Pentadeuteropyridin (Tab.).


 Fig. 2. NMR.-Spektrum von Desferri-di-O-acetylprogen in D_2O ; 60 MHz

NMR.-Spektrien von Desferricoprogen, Desferri-mono-O-acetylprogen und Desferri-di-O-acetylprogen in Pentadeuteropyridin, 100 MHz

ppm	Desferricoprogen Multipl. Integral	Monoacetat Multipl. Integral	Diacetat Multipl. Integral	Zuordnung
1,92	—	—	s	OAc
2,10	s	ca. 3	s	NAc
2,22	bs	ca. 9, 30*)	bs	$CH_3-C=C$
ca. 2,4	t, J = 6	?	m	$CH_2-C=C$
1,9–2,6	b	?	b	6 CH_2 (β und γ v. –N–OH–Orn.)
4,0	t, J = 6	10	b	3 CH_2N ; 2–0 $CH_2-O(H)$
4,3	b	4	k	2 N–CH–CO; 1–3 CH_2-O-CO
4,9	b	1	b	1 (Ac)–N–CH–CO
6,75	b	1	2	} 3 H–C=C
6,9	b	2	b	

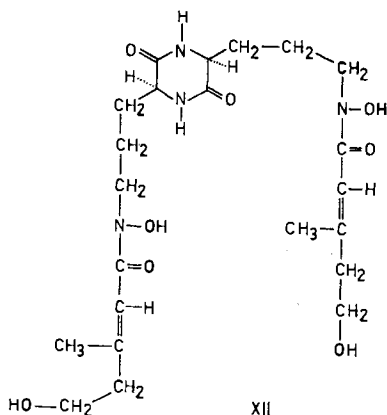
*) Da die Signale im Bereich von δ 1,9 bis 2,6 ppm überlappen, lassen sich die Integrale der Einzelsignale nur grob abschätzen. Eine genaue Integralmessung ist dagegen für die gesamte Signalgruppe möglich.

Mit Essigsäureanhydrid und Pyridin wurde nur das Diacetat XI erhalten, allerdings in schlechter Ausbeute, da das Reagens teilweise auch die Hydroxamatgruppen angreift. Aus der Bildung eines Diacetats lässt sich erkennen, dass von den drei Hydroxylgruppen der *trans*-Fusarinreste nur zwei in freier Form vorliegen, während die dritte offenbar an der Esterbindung teilnimmt.

Von Bedeutung ist der Befund, dass die NMR.-Signale der bei der Acetylierung neu hinzugekommenen Acetylgruppen von dem der ursprünglichen Acetylgruppe abweichen. Sie liegen in D_2O bei etwas tieferen, in Pentadeuteropyridin (Tab.) bei etwas höheren Feldstärken. Es darf daraus geschlossen werden, dass die ursprüngliche Acetylgruppe nicht ester-, sondern amidartig gebunden ist. Für die Esterbindung bleibt demnach nur die Carboxylgruppe eines *trans*-Fusarinin-Bausteins entsprechend der Formel IV übrig.

Die daraus folgende Formel VIII für Coprogen wird aufs Beste bestätigt durch die Reaktion mit Ammoniak in Methanol. Wir erhielten dabei einen Eisenkomplex der Zusammensetzung $C_{35}H_{56}FeN_7O_{13}$, was einer Addition von NH_3 an die Molekel des Coprogens entspricht. Das Produkt zeigt die für Estercarbonyle charakteristische IR.-Absorptionsbande bei 1730 cm^{-1} nicht mehr. Die Reaktion ist demnach eine ammonolytische Spaltung der Esterbindung, das Produkt nennen wir dementsprechend Coprogensäureamid. Bei der Entfernung des Eisens mittels 8-Hydroxychinolin erhielten wir ein farbloses kristallines Produkt $C_{22}H_{36}N_4O_8$, das demnach aus zwei *trans*-Fusarininresten, die durch zwei Amidbindungen zusammengehalten werden, aufgebaut ist. Im NMR.-Spektrum fällt insbesondere das Fehlen der *N*-Acetylgruppe auf, die demnach zusammen mit dem dritten *trans*-Fusarininrest abgespalten worden war.

An sich wären die Analysen des Abbauproduktes auch mit der Formel $C_{33}H_{54}N_6O_{12}$ eines cyclischen Tripeptids aus drei *trans*-Fusarininresten vereinbar, sofern wir zugehen wollen, dass Molekulargewichtsbestimmungen hydrophiler Verbindungen nicht immer zuverlässig sind. Dann aber müsste der Acetylrest im Coprogen esterartig gebunden sein, was einerseits mit den NMR.-Spektren der Desferri-acetylderivate (s. oben), andererseits mit der Bildung von Coprogensäureamid nicht vereinbar ist. Die spektroskopischen Eigenschaften des Produktes $C_{22}H_{36}N_4O_8$ werden einzig widerspruchsfrei durch die Formel eines Dioxopiperazins (XII) ausgedrückt, dessen Bildung aus Coprogen gemäss Formel VIII erklärbar ist. Das Dioxopiperazin XII ist kürzlich ebenfalls aus der Natur isoliert und unter dem Namen Dimerumsäure beschrieben worden [13]. Ein mit der Dimerumsäure verwandtes Dioxopiperazin der Siderochrom-Reihe ist die Rhodotorulasäure [14].



Das Coprogen (VIII) steht einerseits den peptidischen Sideraminen aus Pilzen [2], andererseits dem Fusigen und seinen Nebenkomponenten [12] nahe, bei denen zwei bzw. drei Fusarininreste ausschliesslich durch Esterbindungen zusammengehalten werden. Die Konstitutionsaufklärung des Coprogens ist auch im Zusammenhang mit der kürzlich mitgeteilten Isolierung des Coprogens B (Desacetylcoprogen) von Bedeutung [13]. Coprogen ist demnach keineswegs ein Aussenseiter unter den Sideraminen, sondern ein Vertreter eines neuen Sideramin-Typus.

Herrn Prof. Dr. H. Zähler, Tübingen, danken wir für das Coprogen, der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, für finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Die *Smp.* wurden in offener Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Die *IR.-Absorptionsspektren* wurden mit einem *Perkin-Elmer*-Spektrometer, Modell 21, die *NMR.-Spektren* mit *Varian*-Spektrometern, Modell A60 bzw. HA100, aufgenommen. Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten gegenüber Tetramethylsilan, Kopplungskonstanten in Hz angegeben. Es bedeuten: *s* = Singulett, *bs* = breites Singulett, *t* = Triplett, *m* = Multiplett, *k* = komplex aufgespaltene Signalgruppe, *b* = breiter, nicht aufgelöster Signalhaufen.

Für die *Papierchromatographie* von Sideraminen wurden die früher angegebenen Lösungsmittel [6] verwendet. Für die *Dünnschichtchromatographie* benützten wir Kieselgel *Merck*.

Coprogen (VIII). – 2,8 g Rohsideramin, das nach unseren früheren Angaben [6] aus ca. 10 l Kulturfiltrat von *Penicillium citrinum* (Stamm ETH M 3614) gewonnen worden war, wurden mit einem Lösungsmittelgemisch aus 1,8 l *n*-Butanol, 1,8 l Benzylalkohol, 3 l 0,001 *n* wässr. Salzsäure und 1 l gesätt. wässr. NaCl-Lösung im Gegenstromverfahren nach *Craig* über 100 Stufen verteilt; Verteilungsmaximum in Stufe 66 (*k* ca. 2,0). Die Aufarbeitung der Fraktionen 56 bis 76 nach dem früher mitgeteilten Verfahren [6] gab 892 mg ziegelrotes amorphes Pulver, das sich bei der Papierchromatographie in 2 Lösungsmitteln [6] einheitlich verhielt und gleiche *Rf*-Werte zeigte wie eine authentische Probe von Coprogen²). Die gleiche Verbindung wurde bei analoger Aufarbeitung von Kulturen folgender Stämme erhalten: *Penicillium urticae* (ETH 4277), *P. notatum* (ETH 1613), *P. camemberti* (ETH M 98), *P. chrysogenum* (ETH 4360) und *Neurospora crassa* (Tü 154). Zur Analyse wurden aus Aceton-Petroläther umgefällte Proben 24 Std. bei Zimmertemperatur bzw. 72 Std. bei 50–60° im Hochvakuum getrocknet. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{max} in nm (log ϵ) 217 (4,46), 250 (4,22), 440 (3,47). IR.-Absorptionsspektrum in Nujol: Fig. 1. Coprogen gab bei der Mikrotitration mit Tetramethylammoniumhydroxid keine Stufe und verhielt sich bei der Papierelektrophorese bei pH 8,0 und 3,0 wie eine neutrale Verbindung.

$C_{35}H_{53}FeN_6O_{13}$	Ber.	C 51,16	H 6,50	Fe 6,80	N 10,23%
$C_{35}H_{53}FeN_6O_{13} \cdot H_2O$,, ,,	50,05	,, 6,60	,, 6,65	,, 10,01%
	Gef.	50,18	,, 6,72	,, 6,64	,, 9,36%
	,, ,,	51,53	,, 6,69	,, 6,69	,, 10,25%

Desferricoprogen (IV). – 971 mg Coprogen in 50 ml Wasser und 1,5 g 8-Hydroxychinolin in 15 ml Methanol wurden 24 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Der schwarze Niederschlag (Hydroxychinolin-Eisenkomplex) wurde mit Hilfe von Celite abfiltriert und das gelbliche Filtrat fünfmal mit Chloroform ausgeschüttelt, um das überschüssige Reagens zu entfernen. Die wässrige Phase gab beim Eindampfen 843 mg eines blass gelblichen amorphen Pulvers, das sich nicht umkristallisieren liess. IR.-Absorptionsspektrum in KBr: ν_{max} 1733 (*m*), 1677 (*st*), 1650 (*st*), 1605 (*m*, infl.) cm^{-1} . NMR.-Spektrum in D_2O , 60 MHz, *s.* [6], NMR.-Spektrum in Pyridin- d_5 , 100 MHz, *s.* Tabelle.

Hydrolysereaktionen. – *a) Nachweis von L-Ornithin.* 15 mg Desferricoprogen wurden in 4 ml 6 *N* Salzsäure 4 Std. auf 110° erhitzt und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand hydrierte man in 9 ml Feinsprit in Gegenwart von 20 mg Platinoxid und dampfte nach dem Abfiltrieren erneut zur Trockne ein. Papierchromatographie in *n*-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1 und in Phenol-Wasser 4:1 zeigte einen einzigen ninhydrin-positiven Fleck, der mit dem von authentischem Ornithin übereinstimmte. Eine Aminosäureanalyse nach *Moore* und *Stein* zeigte die Anwesenheit von viel Ornithin neben einer Spur Ammoniak.

Ein in gleicher Weise aus 300 mg Desferricoprogen hergestelltes und mit Platinoxid hydriertes Hydrolyseprodukt wurde in 10 ml gesättigter wässr. Natriumhydrogencarbonat-Lösung mit 220 mg 2,4-Dinitrofluorbenzol in 10 ml Alkohol 2 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Extraktion des überschüssigen Reagens mit Äther wurde die wässrige Phase angesäuert und mit Äthylacetat ausgeschüttelt, der tiegelbe Extrakt gewaschen, getrocknet und eingedampft. Nach der chromatographischen Reinigung [9] wurden aus Aceton-Petroläther ca. 100 mg gelbe Kristalle gewonnen, die in der Dünnschichtchromatographie mit Chloroform-Benzylalkohol-Eisessig 70:30:3 bzw. Chloroform-Methanol-Eisessig 95:5:1 [15] sowie im Infrarot-Absorptionsspektrum mit Bis-2,4-dinitrophenyl-L-ornithin übereinstimmten. $[\alpha]_D^{20}$ vor der Kristallisation – 80°, nach dem Umkristallisieren – 87,1° (*c* = 0,49% in Aceton) [9].

b) Nachweis von δ -N-Hydroxyornithin. Eine Probe Desferricoprogen wurde 16 Std. mit 6 *N* Salzsäure auf 110° erhitzt, dann wurde mit Wasser verdünnt und mit Äther ausgeschüttelt. Die

wässrige Lösung wurde im Vakuum eingedampft. Papierchromatographie mit Phenol-Wasser 4:1 zeigte mit Ninhydrin einen starken Fleck mit R_f 0,13 (δ -N-Hydroxyornithin) und einen schwachen mit R_f 0,23 (Ornithin). Mit alkalischem Triphenyltetrazoliumchlorid war nur der Fleck mit R_f 0,13 erkennbar. Papierelektrophorese bei pH 3,0 und 120 V ($2\frac{1}{2}$ Std.) gab einen starken Fleck für δ -N-Hydroxyornithin, ninhydrin-pos., triphenyltetrazolium-pos., 1,6 cm, und einen schwachen Fleck für Ornithin, ninhydrin-pos., triphenyltetrazolium-neg., 3,2 cm. Als Vergleichsproben dienten ein Hydrolysat von Ferrichrysin sowie käufliches Ornithin-dihydrochlorid.

c) *Nachweis von Essigsäure*. 250 mg Coprogen wurden mit 20 ml 20-proz. Schwefelsäure 1 Std. unter Rückfluss erhitzt. Dann wurden im Verlauf von 5 Std. ca. 25 ml Wasser abdestilliert, wobei die abdestillierte Flüssigkeit von Zeit zu Zeit durch dest. Wasser ersetzt wurde (Apparatur nach Weissenberger für Kuhn-Roth-Bestimmungen). Das Destillat verbrauchte zur Neutralisation (Phenolphthalein) 2,50 ml 0,1N NaOH, entsprechend 0,84 Mol Essigsäure pro Mol Coprogen.

Das neutralisierte Destillat wurde nach Entfernung des Phenolphthaleins durch mehrmaliges Ausschütteln mit Äther im Vakuum abgedampft. Den Rückstand löste man zusammen mit 70 mg *p*-Phenylphenacylbromid in 10 ml Feinsprit und kochte 1 Std. unter Rückfluss. Dann wurde mit Wasser verdünnt, mit Benzol ausgeschüttelt, der Auszug mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand, 51 mg, gab nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äther-Petroläther farblose Kristalle mit Smp. 107–108°, die gemäss Dünnschichtchromatographie, Misch-Smp. und IR.-Absorptionsspektrum mit *p*-Phenylphenacylacetat identisch waren.

d) *Nachweis der trans-5-Hydroxy-3-methylpenten-(2)-säure (trans- Δ^2 -Anhydromevalonsäure)*. Aus 609 mg Coprogen wurden wie oben mit 1 g 8-Hydroxychinolin eine wässrige Lösung von Desferricoprogen bereitet. Nach dem Ausschütteln mit Chloroform wurde die wässrige Lösung mit 612 mg Perjodsäure in 7 ml Wasser versetzt und die saure Lösung nach 2 Std. fünfmal mit Äther ausgezogen. Die neutralgewaschene und getrocknete ätherische Lösung wurde auf 5 ml eingengt und mit 5 ml ätherischer Diazomethanlösung 1 Std. stehengelassen. Der Rückstand nach dem Eindampfen wurde in Äther aufgenommen, mit 1-proz. wässriger Natriumthiosulfatlösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand, 81 mg, wurde bei 130–160° Blocktemperatur im Vakuum destilliert. Die farblose Flüssigkeit war nach IR.- und NMR.-Spektrum identisch mit *trans*- Δ^2 -Anhydromevalonsäure-methylester (II) aus Ferrirubin [8] [11].

Acetylierung von Coprogen. – a) *In Methanol*. 800 mg Coprogen und 30 mg Natriumacetat in 30 ml Methanol wurden mit 30 ml Essigsäureanhydrid 7 Std. stehengelassen und dann im Vakuum eingedampft. Das Dünnschichtchromatogramm (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1) zeigte drei braune Flecke mit R_f 0,13 (Coprogen), 0,19 und 0,26. Das Rohprodukt wurde im Lösungsmittelsystem aus 2 l Tetrachlorkohlenstoff, 4 l Chloroform, 4,5 l Methanol und 1,5 l Wasser über 220 Stufen im Gegenstromverfahren nach Craig verteilt. Farbstoffmaxima fanden sich in den Fraktionen 95 ($k_1 = 0,75$), 135 ($k_2 = 1,57$) und 172 ($k_3 = 3,51$; Coprogen).

Di-O-acetylcoprogen (XI). Die Fraktionen 83–108 gaben beim Eindampfen 292 mg Rückstand, der aus Methanol in feinen braunen Nadeln kristallisierte. Smp. nach viermaligem Umkristallisieren aus Methanol 205–206°. IR.-Absorptionsspektrum in KBr: ν_{max} 1725, 1655, 1540 cm^{-1} .

$C_{38}H_{57}FeN_6O_{15}$	Ber. C 51,71	H 6,34	Fe 6,17	N 9,27%
	Gef. „ 51,54	„ 6,51	„ 5,84	„ 9,06%

Desferri-di-O-acetylcoprogen (VII). Aus 130 mg des Diacetats XI wurde, wie für Coprogen beschrieben, mittels 8-Hydroxychinolin die Desferriverbindung, eine farblose glasige Masse, bereitet. NMR.-Spektrum in D_2O , 60 MHz: δ 1,4–2,0 ppm (k , 21 H; CH_2 in β und γ von δ -N-Hydroxyornithin-Resten; $3CH_3-C=C$); 1,98 ppm (s , 3 H; N-Ac); 2,05 ppm (s , 6 H; 2OAc); 2,45 ppm (t , J ca. 6, 6 H; $3CH_2-C=C$); 3,65 ppm (b , 6 H; $3CH_2-N$); 4,23 ppm (t , $J = 6, 9$ H; $3CH_2-O-CO$), 3 H in α von δ -N-Hydroxyornithin-Resten); 5,8–6,2 ppm (b , 3 H; $3H-C=C$); vgl. Fig. 2. NMR.-Spektrum in Pyridin- d_5 , 100 MHz, vgl. Tabelle.

Monoacetylcoprogen (IX + X). Die Fraktionen 124–145 der Craig-Verteilung gaben 315 mg Eindampfrückstand als amorphes braunes Pulver, das sich bei der Dünnschichtchromatographie einheitlich verhielt, R_f 0,19. Bei der erneuten Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Methanol bildete sich ein Gemisch mit den R_f -Werten 0,19 (Mono-O-acetylcoprogen) und 0,26 (Di-O-acetylcoprogen). Das *Desferri-derivat (V + VI)* wurde wie oben mit 8-Hydroxychinolin bereitet und bildete ein amorphes farbloses Pulver. NMR.-Spektrum in Pyridin- d_5 , 100 MHz, vgl. Tabelle; NMR.-

Spektrum in D_2O , 60 MHz: δ 1,5–1,9 ppm (*b*, 12H; CH_2 in β und γ von δ -N-Hydroxyornithin-Resten), 1,93 ppm (*bs*, 9H; $3CH_3-C=C$); 2,01 ppm (*s*, 3H; N-Ac); 2,08 ppm (*s*, 3H; OAc); 2,45 ppm (*m*, 6H; $3CH_2-C=C$); 3,7 ppm (*b*, 8H; $3CH_2-N$; $1CH_2-OH$); 4,3 ppm (*b*, 7H; $2CH_2-O-CO$; $3N-CH-CO$); 5,9–6,3 ppm (*b*, 3H; $H-C=C$).

Coprogen. Die Fraktionen 162–180 der *Craig*-Verteilung gaben 101 mg braunes Pulver, das nach Dünnschichtchromatographie, Papierchromatographie in 2 Lösungsmitteln und IR.-Absorptionsspektrum unverändertes Coprogen war.

b) In Pyridin. 475 mg Coprogen wurden mit 2,5 ml Essigsäureanhydrid in 16 ml Pyridin 7 Std. bei Zimmertemperatur acetyliert. Das Dünnschichtchromatogramm zeigte einen einzigen braunen Fleck mit R_f 0,26. Bei der *Craig*-Verteilung im oben erwähnten Lösungsmittelgemisch wurde bei 160 Überführungen ein einziges Farbstoffmaximum in der Stufe 69 ($k = 0,76$) erhalten. Eindampfen der Fraktionen 60–79 gab 178 mg braunen Rückstand, der sich aus Methanol umkristallisieren liess und mit dem oben beschriebenen *Di-O-acetylcoprogen* (XI) identisch war.

Coprogensäureamid. – 155 mg Coprogen in 10 ml abs. Methanol und 40 ml mit Ammoniak gesättigtes Methanol wurden zusammen 24 Std. stehengelassen und dann eingedampft. Der Rückstand, ein amorphes Pulver, erwies sich bei der Papierchromatographie als einheitlich, R_f 0,28 (Coprogen R_f 0,46). Nach 3- und 6-stdg. Reaktionszeit war dagegen noch unverändertes Coprogen nachweisbar. IR.-Absorptionsspektrum in Nujol: ν_{max} 1660, 1540, 1450, 1370 cm^{-1} , kein Maximum bei 1700–1750 cm^{-1} . UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{max} in nm ($\log \epsilon$) 218 (4,43), 256 (infl. 4,18), 440 (3,43).

$C_{35}H_{56}FeN_7O_{13}$	Ber. C 50,12	H 6,73	Fe 6,66	N 11,69%
	Gef. „ 50,17	„ 6,77	„ 6,73	„ 11,69%

Dimerumsäure (XII). – Das aus 825 mg Coprogen bereitete Coprogensäureamid wurde in 45 ml Wasser gelöst und mit 1,5 g 8-Hydroxychinolin in 15 ml Methanol wie oben behandelt. Das blass gelbliche Rohprodukt wurde aus heissem Methanol umkristallisiert und gab 345 mg farblose Kristalle, Smp. 167–167,5° nach fünfmaligem Umkristallisieren. IR.-Absorptionsspektrum in KBr: ν_{max} 1678, 1650, 1607 cm^{-1} ; $\nu_{infl.}$ 1690, 1575 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in D_2O , 60 MHz: δ 1,6–1,9 ppm (*b*, 8H; $4CH_2$); 1,95 ppm (*bs*, 6H; $2CH_3-C=C$); 2,42 ppm (*t*, $J = 6, 4$ H; $2CH_2-C=C$); 3,71 ppm (*b*, 4H; $2CH_2-N$); 3,78 ppm (*t*, $J = 6; 4$ H; $2CH_2-O$) 4,2 ppm (*b*, 2H; $2N-CH-CO$); 6,1 ppm (*b*, 2H; $H-C=C$). $[\alpha]_D = -17,75^\circ$ ($c = 0,2\%$ in Wasser). Die Verbindung war nach Misch-Smp., Dünnschichtchromatographie und IR.-Absorptionsspektrum identisch mit natürlicher Dimerumsäure, die inzwischen ebenfalls kristallin erhalten wurde.

$C_{22}H_{36}N_4O_8$	Ber. C 54,53	H 7,49	N 11,57%	Mol.-Gew. 484
	Gef. „ 54,42	„ 7,79	„ 11,45%	„ 455 ⁶⁾

Die Mikroanalysen wurden in unserer analytischen Abteilung (Leitung *W. Manser*) ausgeführt. Die IR.- und NMR.-Spektren verdanken wir unserer Abteilung für Instrumentalanalyse (Leitung Prof. *W. Simon*), die Massenspektren Herrn Dr. *J. Seibl*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 84. Mitteilung: *R. Muntwyler, J. Widmer & W. Keller-Schierlein*, *Helv.* 53, 1544 (1970).
- [2] *W. Keller-Schierlein, V. Prelog & H. Zähler*, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* (Ed. *L. Zechmeister*) 22, 279 (1964).
- [3] *J. B. Neilands*, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 4846 (1952).
- [4] *C. W. Hesselatine, C. Pidacks, A. R. Whitehill, N. Bohonos, B. L. Hutchings & J. H. Williams*, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 1362 (1952); *C. Pidacks, A. R. Whitehill, L. M. Pruess, C. W. Hesselatine, B. L. Hutchings, N. Bohonos & J. H. Williams*, *ibid.* 75, 6064 (1953).
- [5] *V. Prelog & A. Walsler*, *Helv.* 45, 631, 1732 (1962); *W. Keller-Schierlein, P. Mertens, V. Prelog & A. Walsler*, *Helv.* 48, 710 (1965); *W. Keller-Schierlein & B. Maurer*, *Helv.* 52, 603 (1969).
- [6] *H. Zähler, W. Keller-Schierlein, R. Hütter, K. Hess-Leisinger & A. Deér*, *Arch. Mikrobiol.* 45, 119 (1963).
- [7] *G. Padmanaban & P. S. Sarma*, *Arch. Biochem. Biophysics* 108, 362 (1964).
- [8] *W. Keller-Schierlein*, *Helv.* 46, 1920 (1963).

⁶⁾ Dampfdruckosmometrie in Wasser.

- [9] *W. Keller-Schierlein & A. Deér*, *Helv.* **46**, 1907 (1963).
 [10] *H. Diekmann*, *Arch. Mikrobiol.* **62**, 322 (1968).
 [11] *W. Keller-Schierlein, H. Zähler, V. Pünter-Streit & H. Bär*, *Biochem. Z.* **341**, 378 (1965).
 [12] *T. Emery*, *Biochemistry* **4**, 1410 (1965); *J. M. Sayer & T. Emery*, *ibid.* **7**, 184 (1968); *H. Diekmann & H. Zähler*, *Europ. J. Biochemistry* **3**, 213 (1967).
 [13] *H. Diekmann*, *Arch. Mikrobiol.* (im Druck).
 [14] *C. L. Atkin & J. B. Neilands*, *Biochemistry* **7**, 3734 (1968).
 [15] *G. Pataki*, *Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie*, S. 154–156, De Gruyter & Co., Berlin 1966.

243. Die Glykoside der Wurzeln von *Xysmalobium dilatatum* Weimarck.

2. Mitteilung: Teilstruktur der Dilatoside¹⁾

Glykoside und Aglykone, 328. Mitteilung²⁾

von **L. Meister**, **W. Stöcklin** und **T. Reichstein**

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(24. IX. 70)

Summary. The four dilatosides A, B, C and D (ester glycosides isolated from *Xysmalobium dilatatum*) differ from each other only in the sugar portion. They all contain the same aglycone: 12-O-acetyl-17-isolineolone (= 12-O-acetyl-17-isodeacetyl-cynanchogenin (6)). Its mass spectrum is discussed. In dilatoside A (1) three molecules of D-oleandrose (7) are linked to this aglycone, in dilatoside B (2) one D-canarose (8) and two oleandrose units, in dilatoside C (3) two canarose and three oleandrose, and in dilatoside D (4) probably three canarose and two oleandrose units.

Kürzlich wurde gezeigt [1], dass die Wurzeln von *Xysmalobium dilatatum* Weimarck im Gegensatz zu denjenigen des besser bekannten *X. undulatum* (L.) Ait. neben sehr viel Cardenoliden auch merkliche Mengen von Ester-glykosiden enthalten. Diese leiten sich von hoch hydroxylierten Pregnanderivaten ab, die teilweise verestert und mit einer Reihe von 2-Desoxyzuckern verknüpft sind. Vier solcher Stoffe, die Dilatoside A, B, C und D wurden amorph aber rein oder nahezu rein isoliert, davon Dilatosid D in sehr kleiner Menge und nicht ganz einheitlich. Hier wird über die vermutliche Struktur dieser Stoffe berichtet.

Milde saure Hydrolyse [2] gab nach Papierchromatogramm (PC.) und Dünnschichtchromatogrammen (DC.) bei allen vier Dilatosiden als Hauptprodukt dasselbe Aglykon, das als 12-O-Acetyl-17-isolineolon (6) erkannt werden konnte (siehe unten). Es war jeweils von kleinen Mengen des freien 17-Isolineolons (5) begleitet. Für die präparative Isolierung der zwei Stoffe 5 und 6 wurde daher ein Gemisch der Dilatoside A–D verwendet. Es liess sich weiter feststellen, dass 12-O-Acetyl-17-isolineolon (6) unter den angewandten Hydrolysebedingungen bereits spurenweise zum freien 17-Isolineolon (5) verseift wird, so dass wir annehmen, dass die Bildung der kleinen Mengen des letzteren auf Hydrolyse beruht und dass alle vier Dilatoside ausschliesslich 6 als Aglykon enthalten. Dasselbe Aglykon 6 wurde kürzlich auch von *Kapur et al.* [3b] aus *Kanahia laniflora* erhalten; die vermutliche Struktur wurde daher

¹⁾ Auszug aus Dissertation *L. Meister*, Basel 1967.

²⁾ 327. Mitt.: *Meister, Kaufmann, Stöcklin & Reichstein* [1].