

212. Isolierung von 11 α , 11' α -Dihydroxychaetocin aus *Verticillium tenerum*

von D. Hauser, H. R. Loosli und P. Niklaus

Pharmazeutisch-Chemische Forschungslaboratorien, Sandoz AG, Basel

(29. VI. 72)

Summary. Based on ^{13}C -NMR. and other physico-chemical evidence, the structure of 11 α , 11' α -dihydroxychaetocin (**3**) has been assigned to a new antibacterial and antimetabolic metabolite, isolated from the fungus *Verticillium tenerum*.

Kürzlich berichteten wir über die Isolierung von Chaetocin (**1**) aus *Chaetomium minutum* [1]. In der Zwischenzeit haben wir aus Kulturfiltrat und Mycel von *Verticillium tenerum* einen weiteren Vertreter der 3,6-Epidithiadiketopiperazin-Klasse isoliert. Das neue Stoffwechselprodukt, das mit Melinacidin IV [2] nahe verwandt sein dürfte, ist ebenso wie Chaetocin (**1**) in den üblichen organischen Lösungsmitteln und in Wasser sehr schlecht löslich.

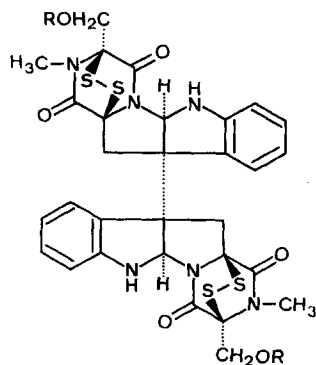
Die Bruttoformel $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2]_n$, sowie der intensive Massenpik¹⁾ bei m/e 64 (S_2) lassen eine nahe Verwandtschaft mit Chaetocin (**1**, $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4$) vermuten. Auch hier muss es sich um eine dimere, symmetrische Molekel handeln, da sich die im ^1H -NMR.-Spektrum ermittelte, geradzahlige Summe von 14 Protonen nicht mit einer ungeraden Anzahl Stickstoffatome vereinbaren lässt. Im ^1H -NMR.-Spektrum (in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) stimmen die Singulette bei 2,98 (N- CH_3) und 4,85 ppm (N- CH -N), die beiden Signalgruppen bei ca. 4,1 und bei 5,70 ppm ($-\text{CH}_2-\text{OH}$) sowie die Signale im aromatischen Bereich (6,3–7,6 ppm) weitgehend mit denjenigen von Chaetocin (**1**) überein. Hingegen fehlt das AB-System für die C(11)-Methylengruppe. An seiner Stelle sind zwei Dublette bei 5,43 und 6,35 ppm ($J = 4$ Hz) zu erkennen, die einer sekundären Carbinolgruppierung zugeordnet werden können, da bei Zusatz von D_2O das Signal bei 6,35 ppm verschwindet und sich das andere zu einem Singulett vereinfacht.

Aufgrund dieser Daten lässt sich für das neue Stoffwechselprodukt die Struktur eines 11,11'-Dihydroxychaetocins (**3**) postulieren. Gestützt wird diese Hypothese durch nachfolgende Resultate:

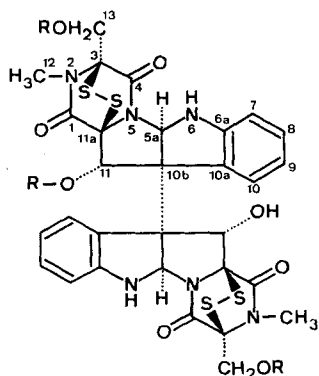
Die dimere Struktur von **3** ergibt sich, zusätzlich zu den bereits erwähnten Argumenten, aus der vaporometrischen Molekulargewichtsbestimmung (Gef.: 839)²⁾ und dem ^1H -NMR.-Spektrum des Tri-O-acetyl-Derivates **4**. Auf Grund von Modellbetrachtungen muss man annehmen, dass die in der einen Molekelhälfte zuerst acylierte sekundäre Hydroxylgruppe die Einführung einer weiteren Acetylgruppe in der andern Molekelhälfte sterisch verunmöglicht. Die gleiche Situation wurde bereits bei *Verticillin A* (**5**) vorgefunden [3]. Durch diese einseitige Reaktion geht die Identität der beiden Molekelhälften verloren, so dass im ^1H -NMR.-Spektrum von **4** alle 34 Protonen der Doppelmolekel zu erkennen sind.

¹⁾ Vgl. exp. Teil.

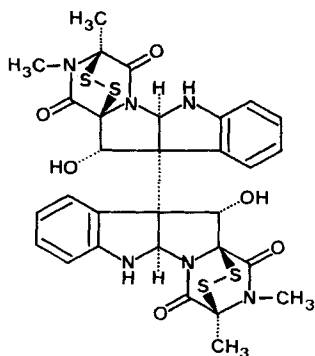
²⁾ Wegen der schlechten Löslichkeit liess sich diese mit **3** nicht durchführen.



- 1 R = H *Chaetocin*
 2 R = -COCH₃



- 3 R = H *11α,11'α-Dihydroxychaetocin*
 4 R = -COCH₃



5 *Verticillin A*

Spezielle Erwähnung verdienen im ¹H-NMR.-Spektrum (in CDCl₃) von **4** die beiden Dublette bei 7,64 ppm ($J = 7$ Hz) und 7,92 ppm ($J = 7$ Hz), die den Protonen an C(10) bzw. C(10') zugeordnet werden können. Die Entschirmung dieser Protonen dürfte auf die Nachbarschaft der Sauerstoffe an C(11'), bzw. C(11) zurückzuführen sein. Auffallend sind auch die chemischen Verschiebungen der Acetylgruppe ($\delta = 2,49$) und des zugehörigen α -ständigen Protons ($\delta = 6,98$) an C(11)³⁾.

Die grosse Ähnlichkeit von Chaetocin (**1**) und dem neuen Stoffwechselprodukt (**3**) zeigt sich auch im Carbonylbereich der IR.-Spektren. Ebenso stimmen die UV.-Spektren mit λ_{max} bei 306 nm bzw. 308 nm weitgehend überein. Ausserdem lassen die fast deckungsgleichen CD-Kurven von **2** und **4** erkennen, dass beide Metabolite denselben Chiralitätssinn besitzen⁴⁾.

³⁾ Das IR.-Spektrum von **4** (in CCl₄) zeichnet sich durch die ungewöhnlich hohe Wellenzahl der sekundären Acetoxygruppe bei 1775 cm⁻¹ aus. Möglicherweise ist dies auf eine Verdrehung der Carbonylgruppe aus der CH-O-CO-CH₃-Ebene zurückzuführen.

⁴⁾ Siehe exp. Teil. Die Messung und Interpretation der CD.-Kurven verdanken wir Herrn Prof. G. Snatzke, Universität Bonn.

Ein zusätzlicher Hinweis für die Analogie der beiden Stoffwechselprodukte ergibt sich aus dem Vergleich der ^{13}C -NMR.-Spektren⁵⁾ von **1**, **2** und **3** (vgl. Fig. 1 und 2 sowie Tab. 1). Mit Hilfe von «off resonance»-Protonenentkopplung sowie der Theorie der chemischen Verschiebungen von ^{13}C -NMR.-Spektren [4] lässt sich ein Teil der Kohlenstoffatome eindeutig zuordnen. Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, stimmen die chemischen Verschiebungen der sich entsprechenden Signale von **1**, **2** und **3** weitgehend überein.

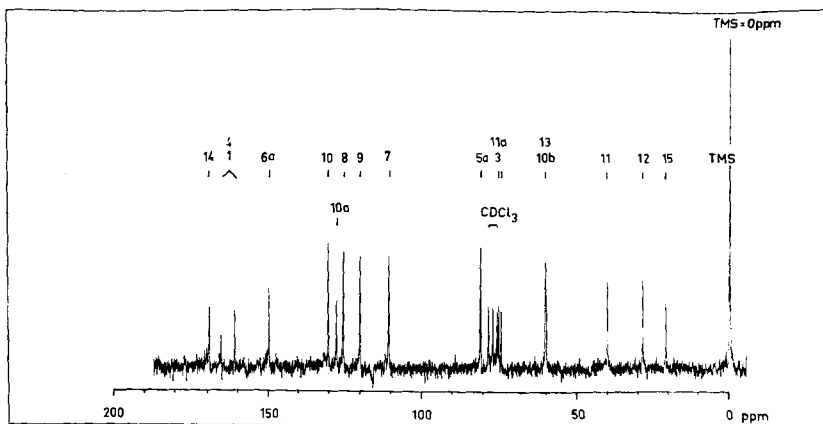


Fig. 1. ^{13}C -NMR.-Spektrum von **2** in CDCl_3

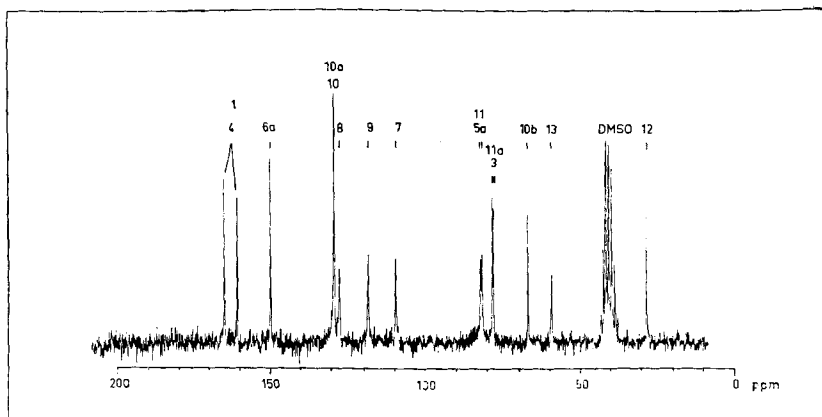


Fig. 2. ^{13}C -NMR.-Spektrum von **3** in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

Die Verschiebung des C(11)-Signals von Dihydroxychaetocin (**3**) gegenüber denjenigen von Chaetocin (**1**) oder Diacetylchaetocin (**2**) um ca. 42 ppm lässt sich mit der postulierten Struktur von **3** gut vereinbaren und entspricht den Analogiefällen Cyclohexan/Cyclohexanol [5] und Cyclopentan/Cyclopentanol [6] (Tab. 2).

⁵⁾ Die Aufnahme der ^{13}C -NMR.-Spektren (Bruker HFX-90) verdanken wir Herrn Dr. R. Price, Bruker-Physik AG, Karlsruhe.

Tabelle 1. ^{13}C -chemische Verschiebungen von Di-O-acetylchaetocin (2), Chaetocin (1) und 11 α ,11' α -Dihydroxychaetocin (3) in ppm (TMS = 0)

	Di-O-acetyl chaetocin (2)	Chaetocin (1)	11 α ,11' α - Dihydroxy- chaetocin (3)	$\Delta\delta^b$
	(in CDCl_3)	(in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)	(in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)	
C(1)	160,9 od. 165,5	160,6 od. 165,4	161,5 od. 165,8	-0,9 od. -0,4
C(3)	74,3 od. 75,1	73,4 od. 77,1	78,2 od. 78,4	-4,8 od. -1,3
C(4)	165,5 od. 160,9	165,4 od. 160,6	165,8 od. 161,5	-0,4 od. -0,9
C(5a)	81,0	79,5	81,9 od. 82,4	-2,4 od. -2,9
C(6a)	149,7	149,9	150,5	-0,6
C(7)	110,8	109,1	110,0	-0,9
C(8)	125,4	124,6	128,2	-3,6
C(9)	120,1	117,9	119,1	-1,2
C(10)	130,4	129,4	129,9	-0,5
C(10a)	127,8	127,8	129,9	-2,1
C(10b)	59,9	59,5	66,9	-7,4
C(11)	39,8	ca. 40	82,4 od. 81,9	ca. -42
C(11a)	75,1 od. 74,3	77,1 od. 73,4	78,4 od. 78,2	-1,3 od. -4,8
C(12)	28,1	27,5	28,0	-0,5
C(13)	59,9	58,6	59,1	-0,5
C(14)	169,4			
C(15)	20,5			

^{b)} $\delta_{\text{Chaetocin}} - \delta_{\text{Dihydroxychaetocin}}$ in ppm.

Tabelle 2. Substitutionseffekte einer Hydroxylgruppe auf die ^{13}C -chemischen Verschiebungen in ppm (Negative Werte entsprechen einer Entschirmung)

^{13}C -Atom	$\Delta\delta$ (Cyclohexan- Cyclohexanol)	$\Delta\delta$ (Cyclopentan- Cyclopentanol)	$\Delta\delta$ (Chaetocin- Dihydroxy- chaetocin)
Carbinol-Kohlenstoff	-42,4	-48,0	ca. -42
α -ständiges C	-8,4	-9,7	-7,4 bzw. -4,8 od. -1,3
β -ständiges C	+2,6	+1,9	-0,4 bis -1,9

Die postulierte Zuordnung der Signale der aromatischen Kohlenstoffe C(7) bis C(10) beruht auf dem Vergleich mit *o*-Toluidin [7] und 2-Desoxo-2,2,18,19-tetrahydrogelsemin [8] (Tab. 3).

Tabelle 3. ^{13}C -chemische Verschiebungen von aromatischen Kohlenstoffatomen in ppm (TMS = 0)

	<i>o</i> -Toluidin	2-Desoxogelsemin	Chaetocin (1)	Dihydroxy- chaetocin (3)
C(7)	116,7	100,2	109,1	110,0
C(8)	129,8	129,1	124,6	128,2
C(9)	120,2	110,5	117,9	119,1
C(10)	133,2	129,1	129,4	129,9

Die in **3** dargestellte stereochemische Anordnung der sekundären Hydroxylgruppe stützt sich lediglich auf den früher erwähnten Befund, dass nur eines der beiden sekundären Alkoholgruppen acylierbar ist.

Biologische Aktivitäten: Die beiden Stoffwechselprodukte **1** und **3** gleichen sich auch hinsichtlich ihrer biologischen Wirkungen sehr stark. Die minimalen Hemmkonzentrationen (MIC) von 11 α ,11' α -Dihydroxychaetocin gegen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus aronson* und *Bacillus subtilis* betragen 0,1, 0,01 bzw. 1 γ /ml. 11 α ,11' α -Dihydroxychaetocin bewirkt eine 50-proz. Hemmung der Zellvermehrung des Mäuse-Mastzelltumors P-815 in der Gewebekultur [9] bei 0,038 mg/l.

Die DL₅₀ bei der Maus beträgt bei intraperitonealer Applikation 4 mg/kg, bei oraler Applikation 51 mg/kg.

Experimenteller Teil

(Unter Mitarbeit von Frl. S. Rominger und A. Arnold)

Allgemeines. Die Smp. wurden im Röhrchen bestimmt und sind nicht korrigiert. ¹H-NMR.-Spektren (Varian HA-100): δ -Werte (ppm relativ zu TMS als interner Standard). Abkürzungen: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *m* = Multiplett, *b* = breites Signal.

Isolierung von 11 α ,11' α -Dihydroxychaetocin (3**)⁷:** 3000 l einer Nährlösung (pro l 20 g Cerelese, 2 g Malzextrakt, 2 g Hefeextrakt, 2 g MgSO₄·7H₂O, 2 g KH₂PO₄) wurden mit 300 l einer Vorkultur (gleiches Medium wie Hauptkultur) von *Verticillium tenerum* angeimpft und in einem Stahlfermenter unter Rühren (Blattrührer, 100 U/min) und Belüftung (1 l/min/l Med. und 0,5 atü Druck) 136 Std. bei 27° inkubiert. Die Brühe wurde filtriert und das Kulturfiltrat zweimal im Gegenstromextraktor mit Äthylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wurde eingedampft und der Rückstand zwischen Methanol/Wasser 9:1 und Petroläther verteilt. Der dabei erhaltene Niederschlag (47 g) wurde abfiltriert und aus Pyridin/Methanol umkristallisiert. Man erhielt 14,2 g farbloses 11 α ,11' α -Dihydroxychaetocin (**3**). Extraktion des Mycels mit Methanol und übliche Aufarbeitung des Extraktes ergaben weitere 18 g 11 α ,11' α -Dihydroxychaetocin. Zur Analyse wurde eine Probe noch zweimal aus Dimethylsulfoxid/Methanol umkristallisiert und anschliessend 3 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet. Smp. 232–234° (Zers.). $[\alpha]_D^{20} = +758^\circ$ ($c = 1.02$ in Dimethylsulfoxid); $+730^\circ$ ($c = 1.07$ in Pyridin).

IR.-Spektrum (Nujol): u.a. Banden bei 3580, 3500, 3390, 1690, 1665, 1655 (Schulter), 1610, 1595 cm⁻¹.

UV.-Spektrum (Dimethylsulfoxid): $\lambda_{\max} = 308$ nm ($\log \epsilon = 3,76$). ¹H-NMR.-Spektrum ((CD₃)₂SO): 2,98 *s* (6H); ca. 4,1 *m* (4H); 4,85 *s* (2H); 5,43 *d* ($J = 4$ Hz, 2H); 5,70 *t* ($J = 5$ Hz, 2H, austauschbar); 6,3–6,6 *b* (8H, 4H austauschbar); 6,95 *t* (2H); 7,65 *d* ($J = 7,5$ Hz, 2H).

Massenspektrum (in Klammern relative Prozentzahlen): *m/e* 294 (4), 262 (5), 261 (5), 260 (8), 256 (4), 232 (100), 231 (45), 224 (3), 204 (17), 192 (8), 184 (18), 160 (12), 156 (14), 128 (8), 64 (94).

CD. [λ_{\max} ($\Delta\epsilon$)]: 253 (+47,8), 274 (–4,68), 307 (+19,4), 372 (–0,95) (in Dimethylformamid).

C ₃₀ H ₂₈ N ₆ O ₈ S ₄	Ber. C 49,4	H 3,9	N 11,5	O 17,6	S 17,6%
(728,84)	Gef. „ 49,1	„ 4,1	„ 11,2	„ 17,6	„ 17,9%

11 α -Acetoxy-13,13'-di-O-acetyl-11' α -hydroxy-chaetocin (4**):** 200 mg 11 α ,11' α -Dihydroxychaetocin (**3**) wurden in 3 ml Pyridin und 3 ml Acetanhydrid 48 Std. bei 22° stehengelassen. Die Lösung wurde am Hochvakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (System: Chloroform/Methanol/Essigsäure 93:5:2) gereinigt. Man erhielt 154 mg amorphes, dünnschichtchromatographisch einheitliches **4**.

IR.-Spektrum (CCl₄): u.a. Banden bei 3410, 1775, 1755, 1700, 1680 (Schulter) cm⁻¹.

UV.-Spektrum (CH₂Cl₂): $\lambda_{\max} = 302$ nm ($\log \epsilon = 3,68$).

NMR.-Spektrum (CDCl₃): 2,13 *s* (6H, 2 –COCH₃); 2,49 *s* (3H, –COCH₃); 3,00 *s* (3H, N–CH₃); 3,06 *s* (3H, N–CH₃); 4,64 + 4,85 AB ($J = 12$ Hz, 4H, 2 –CH₂–OAc); 5,06 *s* (1H, >CH–OH);

⁷) Die Bereitstellung grösserer Mengen von **3** erfolgte unter der Leitung von Herrn Dr. E. Härrli und Herrn H. Hofmann.

5,20 s (2H, 2 N—CH—N); 5,21 s (1H, austauschbar); 5,24 s (1H, austauschbar); 5,51 s (1H, austauschbar); 6,98 s (vermutlich $>CH-OAc$); 6,6–7,2 b (6H); 7,64 d ($J = 7,5$ Hz, 1H); 7,92 d ($J = 7,5$ Hz, 1H).

CD. [λ_{max} ($\Delta\epsilon$): Schulter bei 205 (+21), 238 (+87,9), 274 (–2,5), 305 (+18,0), 375 (–0,7) (in Äthanol).

Molekulargewicht: Gef. 839 (vaporometrisch in CH_2Cl_2). Zur Analyse 1 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{36}H_{34}N_6O_{11}S_4$	Ber. C 50,6	H 4,0	N 9,8	O 20,6	S 15,0%
(854,96)	Gef. „ 49,9	„ 3,9	„ 9,4	„ 19,5	„ 15,0%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. Hauser, H. P. Weber & H. P. Sigg, *Helv.* 53, 1061 (1970).
- [2] A. D. Argoudelis, *J. Antibiotics* 25, 171 (1972).
- [3] H. Minto, M. Matsumoto & T. Katayama, *Chem. Commun.* 1971, 44.
- [4] J. W. Emsley, J. Feeney & L. H. Sutcliffe, *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Vol. 2, Pergamon Press, Oxford (1966); D. M. Grant & E. G. Paul, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 2984 (1964); D. K. Dalling & D. M. Grant, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 6612 (1967).
- [5] M. Christl, H. J. Reichund & J. D. Roberts, *J. Amer. chem. Soc.* 93, 3463 (1971).
- [6] T. Pekk & E. Lipmaa, *Org. Mag. Resonance* 1971, 679.
- [7] P. C. Lauterbur, *J. chem. Physics* 38, 1415 (1963).
- [8] E. Wenkert, Ch.-J. Chang, A. O. Clause & D. W. Cochran, *Chem. Commun.* 1970, 961.
- [9] H. Stähelin, *Medicina experimentalis* 7, 92 (1962).

213. α -Chlor-nitrone I:

Darstellung und Ag^+ -induzierte Reaktion mit Olefinen

Über synthetische Methoden, 5. (vorläufige) Mitteilung¹⁾

von U. M. Kempe, T. K. Das Gupta, K. Blatt, P. Gygax,
Dorothee Felix und A. Eschenmoser

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

(26. VI. 72)

Summary. Organic synthesis may be said to be in need of *enophiles*, i.e. reagents that would undergo cycloaddition reactions with any isolated olefinic double bond, in contrast to most of the classical *Diels-Alder* or 1,3-dipolar addition reagents which, as a rule, require activated olefins in order to participate smoothly in cycloaddition processes. This paper introduces α -chloro-nitrones as precursors of a new class of such reagents; they undergo an Ag^+ -induced reaction with unactivated olefins with great ease to give products considered to result from 1,4-cycloadditions of N-alkyl-N-vinyl-nitrosonium ions to the carbon-carbon double bond (see scheme 2). This process is believed to have a number of synthetic applications, two of them being illustrated in two subsequent communications.

Eine einschneidende Beschränkung der synthetischen Möglichkeiten im Aufbau von Kohlenstoffgerüsten durch die klassische *Diels-Alder* Cycloaddition ist durch die bekannte Tatsache gegeben, dass Olefine mit isolierten, unaktivierten Doppelbindungen sich in der Regel nicht als Dienophile verhalten. Analoges gilt auch für den

¹⁾ 4. Mitteilung: « α,β -Epoxyketon \rightarrow Alkinon-Fragmentierung II. Thermischer Zerfall der Hydrazone aus α,β -Epoxy-carbonylverbindungen und N-Amino-aziridinen» [1].