

88. Desoxaphomin, das erste [13]Cytochalasan, ein möglicher biogenetischer Vorläufer der 24-Oxa-[14]cytochalasane

von Michael Binder und Christoph Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(19. II. 73)

Summary. From cultures of a *Phoma* species (strain S 298) the hitherto unknown metabolite deoxaphomine has been isolated. On the basis of the spectral data, structure **1** of the (7*S*, 16*R*, 20*R*)-7, 20-dihydroxy-16-methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-6(12), 13^t, 21^t-triene-1, 23-dione is assigned to deoxaphomine. This structure is confirmed by the chemical degradation of **1**, yielding the products **4** and **6** which are identical with derivatives of phomine (**2**) ((7*S*, 16*R*, 20*R*)-7, 20-dihydroxy-16-methyl-10-phenyl-24-oxa-[14]cytochalasa-6(12), 13^t, 21^t-triene-1, 23-dione) and cytochalasin D (**8**) ((7*S*, 16*S*, 18*R*, 21*R*)-21-acetoxy-7, 18-dihydroxy-16, 18-dimethyl-10-phenyl-[11]-cytochalasa-6(12), 13^t, 19^t-triene-1, 17-dione). Deoxaphomine (**1**) is a potential biogenetic precursor of the 24-oxa-[14]cytochalasans. Preliminary results of the biological activity of deoxaphomine are reported.

1. Einleitung. – Im Jahre 1966 berichteten *Rothweiler & Tamm* [1] über die Struktur eines aus Kulturen einer *Phoma*-Species (Stamm S 298) (*Fungi imperfecti*) isolierten, anticytokinetisch wirksamen Metaboliten, der den Namen Phomin (**2**) ((7*S*, 16*R*, 20*R*)-7, 20-Dihydroxy-16-methyl-10-phenyl-24-oxa[14]cytochalasa-6(12), 13^t, 21^t-trien-1, 23-dion) (zur Nomenklatur vgl. [2]) erhielt. Unabhängig davon wurde die Struktur von **2** 1967 auch von *Aldridge et al.* [3] aufgeklärt, die die Substanz Cytochalasin B (**2**) nannten. Neuartig war bei dieser Struktur die Verknüpfung eines grossgliedrigen Lactonringes mit einer hochsubstituierten partiell hydrierten Isoindolon-Einheit. 1969 folgte durch *Aldridge & Turner* [4] die Aufklärung einer verwandten Verbindung, Cytochalasin D (**8**) ((7*S*, 16*S*, 18*R*, 21*R*)-21-Acetoxy-7, 18-dihydroxy-16, 18-dimethyl-10-phenyl-[11]cytochalasa-6(12), 13^t, 19^t-trien-1, 17-dion), bei der an die Stelle des 14-gliedrigen Lactonringes von Phomin (**2**) ein 11-gliedriger Carbocyclus getreten ist.

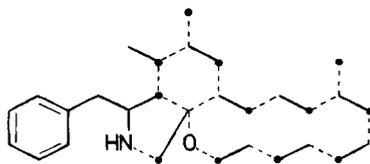


Fig. 1. Grundbausteine der Biogenese von Phomin (**2**)

Untersuchungen über die Biogenese von Phomin (**2**) [5] zeigten, dass die Molekel aus einer Phenylalanin-Einheit, 9 Acetat- resp. 1 Acetat- und 8 Malonat-Einheiten und 2 C₁-Einheiten aufgebaut wird. Diese Resultate (vgl. Fig. 1), sowie die Existenz der carbocyclischen [11] Cytochalasane, machten aus eine der letzten Stufen der Biogenese von Phomin (**2**) ein ebenfalls carbocyclisches Analogon wahrscheinlich, bei dem die 9 C₂-Einheiten in Form eines hypothetischen Nonaketids (in mehr oder weniger reduzierter Form) verknüpft wären. Aus diesem Analogon entstünde durch

eine Sauerstoffinsertion im Sinne einer *Baeyer-Villiger*-Oxydation schliesslich Phomin. Für detaillierte Spekulationen zur Biogenese der Cytochalasane verweisen wir auf unseren Übersichtsartikel [6].

Es ist uns kürzlich gelungen, eben dieses Analogon, das mit seinem 13-gliedrigen carbocyclischen Ring einen neuen Cytochalasan-Grundtypus darstellt, aus Kulturen der genannten *Phoma*-Species (Stamm S 298) zu isolieren. Über die Aufklärung der Struktur dieses Metaboliten, den wir Desoxaphomin (**1**) nennen, soll im folgenden berichtet werden.

2. Isolierung von Desoxaphomin (1). – Der Mikroorganismus *Phoma* (Stamm S 298) wurde in Standkulturen auf einem Nährmedium aus Glucose, Malz, Pepton, Hefe-Extrakt und anorganischen Salzen (vgl. [1], [5]) 12 Tage bei 19° inkubiert. Die aus einem 100-Liter-Ansatz¹⁾ resultierende Kulturbrühe wurde homogenisiert und mit Äthylacetat erschöpfend extrahiert. Der nach dem Abdampfen des Lösungsmittels erhaltene Rohextrakt wurde zwischen Petroläther und Methanol/Wasser 9:1 verteilt. Der polare Anteil lieferte schliesslich durch Ausfällen mit Methylenchlorid ca. 5 g rohes Phomin (**2**), das aus Aceton kristallisiert wurde. Diese Kristallisate zeigten bei sorgfältiger Prüfung im Dünnschichtchromatogramm eine stark UV.-aktive etwas langsamer als Phomin laufende Verunreinigung, die durch erneute fraktionierte Umkristallisation aus Aceton in der Mutterlauge angereichert werden konnte. Es resultierten somit ca. 4 g reines Phomin und 1 g Mutterlauge, aus der nach 5maliger präparativer Schichtchromatographie in verschiedenen Fließmittelsystemen 96 mg der polaren UV.-aktiven Verunreinigung in dünn-schichtchromatographisch einheitlicher Form gewonnen werden konnten. Das farblose Präparat von Desoxaphomin (**1**) kristallisierte bisher nicht. Alle weiteren Untersuchungen wurden mit diesem nach den üblichen Kriterien einheitlichen Präparat durchgeführt.

3. Ableitung der Struktur von Desoxaphomin (1) aus den Spektraldaten. – Das IR.-Spektrum von Desoxaphomin (**1**) zeigt (in CH₂Cl₂) neben den HO-Banden bei 3590 und 3540 cm⁻¹ eine für Lactame charakteristische NH-Schwingung bei 3410 cm⁻¹. Neben den Carbonylabsorptionen zwischen 1710 und 1670 cm⁻¹

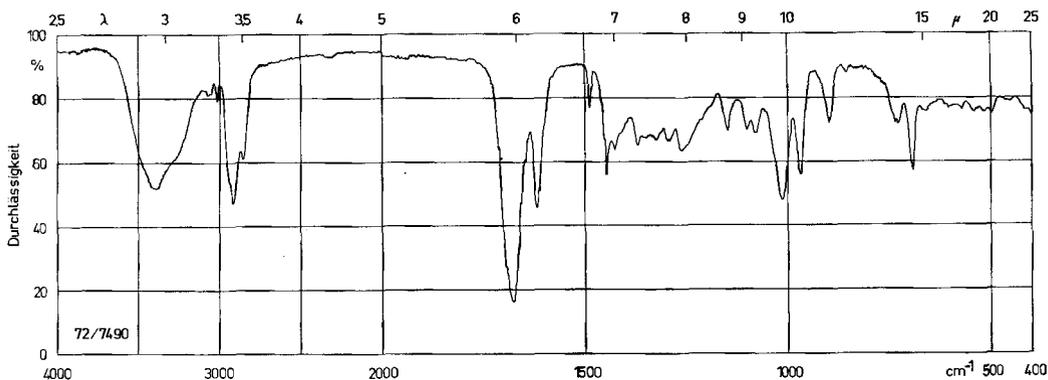


Fig. 2. IR.-Spektrum von Desoxaphomin (**1**) in KBr

¹⁾ Für die Durchführung dieses Grossansatzes danken wir Herrn Dr. E. Härri, Sandoz AG, Basel.

findet sich eine intensive Bande bei 1622 cm^{-1} , die auf ein α,β -ungesättigtes Keton hinweist. Das Vorhandensein eines Aryl-Rests folgt aus den Banden bei 1600 und 1490 cm^{-1} , dagegen fehlt die für Phomin (**2**) typische Lacton-Bande bei 1240 cm^{-1} .

Das IR.-Spektrum in KBr (vgl. Fig. 2) zeigt nur geringe Abweichungen. Die NH-Absorption fällt hier mit der der assoziierten HO-Gruppen zusammen.

Das UV.-Spektrum von **1** in Methanol zeigt zwei Maxima bei $\lambda = 217\text{ nm}$ ($\log \epsilon = 4,15$) und $\lambda = 234\text{ nm}$ ($\log \epsilon = 3,94$), deren letzteres wiederum auf ein α,β -ungesättigtes Keton hinweist.

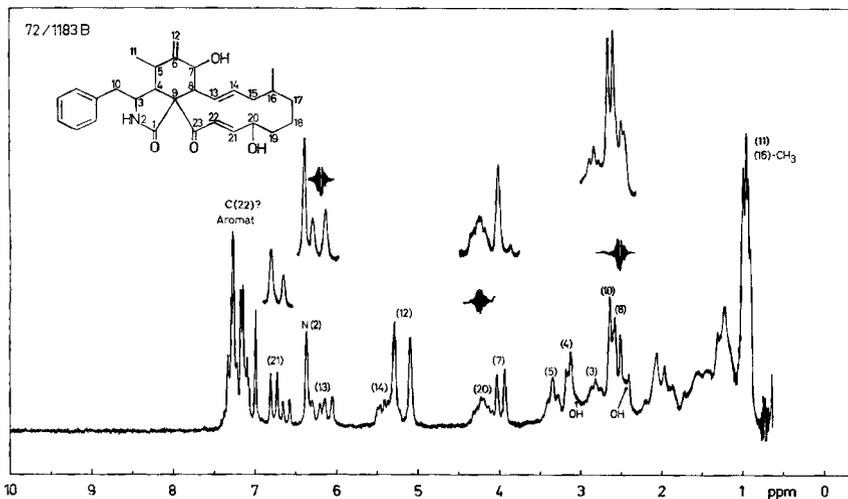
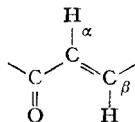


Fig. 3. 100-MHz-NMR.-Spektrum von Desoxaphomin (**1**) in CDCl_3

Das 100-MHz-NMR.-Spektrum²⁾ von Desoxaphomin (**1**) (vgl. Fig. 3) zeigt bei $\delta = 7,2\text{ ppm}$ ein Multiplett, das den 5 aromatischen sowie einem weiteren Proton entspricht. Dem folgt bei $\delta = 6,77\text{ ppm}$ ein doppeltes Dublett, das dem durch eine Kopplung von 9 Hz mit dem 20-Proton weiter aufgespaltenen rechten Teil des von den Protonen an C(21) und C(22) gebildeten *AB*-Systems ($J_{21,22} = 16\text{ Hz}$) (*trans*-disubstituierte Doppelbindung) entspricht. Der linke Teil des *AB*-Systems, das 22-Proton, das unter den Aromatprotonen verborgen ist, konnte auch bei Zusatz von C_6D_6 nicht von diesen getrennt werden. Üblicherweise [7] erscheint bei der Partial-



struktur das zur Carbonylgruppe β -ständige Proton bei höherem δ -Wert als das α -ständige. Bei Desoxaphomin (**1**) liegen die Verhältnisse umgekehrt. Eine Betrachtung des *Dreiding*-Modells von **1** zeigt, dass das hier an C(21) befindliche

²⁾ Dieses Spektrum sowie die Doppelresonanzversuche verdanken wir Herrn E. Wullschleger, Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel.

β -Proton in der Mehrzahl der für den Makrocyclus möglichen Konformationen in den Abschirmkegel der 13,14-Doppelbindung zu liegen kommt, was die Inversion der beobachteten chemischen Verschiebungen hinreichend erklärt.

Das Signal bei $\delta = 6,36$ ppm stammt vom Proton der N-H-Gruppierung; es tauscht mit D_2O aus. Die Protonen der 13,14-Doppelbindung bilden ein weiteres *AB*-System ($J_{13,14} = 15$ Hz), dessen linker Teil (H an C(13)) bei $\delta = 6,18$ ppm durch Aufspaltung mit dem 8-Proton ($J_{8,13} = 10$ Hz) als doppeltes Dublett erscheint. Das Signal des 14-Protons tritt bei $\delta = 5,4$ ppm auf. Die Protonen der exocyclischen Doppelbindung absorbieren als breite Singulette bei $\delta = 5,29$ und $5,09$ ppm. Die Signale bei $\delta = 4,20$ (Multipllett) und $3,97$ ppm (Dublett, $J_{7,8} = 10$ Hz) entsprechen den Protonen an C(20) bzw. C(7). Bei $\delta = 2,6$ ppm erscheint das Dublett der Benzylprotonen ($J = 7$ Hz) an C(10), bei $\delta = 2,50$ ppm ein Triplet ($J_{7,8} = 10$ Hz; $J_{8,13} = 10$ Hz), das dem Proton an C(8) zuzuordnen ist. Bei $\delta = 3,1$ und $2,35$ ppm treten die Signale der beiden HO-Gruppen auf; beide Protonen tauschen mit D_2O aus. Die Methylgruppen an C(5) und C(16) erscheinen jeweils als Dublette bei $\delta = 0,98$ bzw. $0,94$ ppm.

Durch Doppelresonanz-Versuche²⁾ (vgl. Fig. 3) konnten die Sequenzen der Protonen an C(7), C(8), C(13) und C(14) und an C(20) und C(21) bewiesen werden. Auch hier gelang es nicht, das 22-Proton zu lokalisieren, da die Unterschiede in der chemischen Verschiebung zu gering sind.

Alle gemessenen Kopplungskonstanten sind mit den für Phomin (**2**) gefundenen Werten in guter Übereinstimmung [1]. Eine auf Analogieschlüssen zu Phomin beruhende versuchsweise Zuordnung weiterer Signale findet sich im exp. Teil.

Den ersten Hinweis auf die richtige Struktur von Desoxaphomin (**1**) lieferte das im niederaufgelösten Massenspektrum bei m/e 463 auftretende Molekel-Ion. Phomin (**2**) hat ein Molekulargewicht von 479, die Differenz entspricht einem Sauerstoffatom. Da nach den bisherigen spektralen Daten alle funktionellen Gruppen (Hydroxyle, Lactam, Carbonyl-Funktion) von Phomin auch bei Desoxaphomin vorhanden sind, kann es sich bei dem fehlenden O-Atom nur um den Lacton-Sauerstoff handeln. Eine Bestätigung dieser Überlegung lieferte das hochaufgelöste Massenspektrum³⁾ von **1**. Die dabei gefundenen Spitzen und die ihnen entsprechenden Fragment-Summenformeln sind in der Tabelle zusammengefasst.

Diese Daten erlauben eine Spekulation über die Strukturen der Fragment-Ionen und mögliche Zerfallsmechanismen.

Das Molekel-Ion von Desoxaphomin (**1**) kann verschiedene Primär-Zerfallsreaktionen eingehen, z.B. Abspaltung von H_2O , CO, C_7H_7 , was zu den Fragment-Ionen m/e 445, 435 bzw. 372 führt. Alle 3 können weiter H_2O abspalten, wobei die Ionen von m/e 427, 417 und 354 entstehen (vgl. Schema 1). Das Fragment-Ion 354 kann eine α -Spaltung zwischen C(22) und C(23) eingehen und verliert dann das Fragment C_5H_6 (m/e 288). Aus dem Ion von m/e 288 entsteht nach Verlust von Wasser (m/e 270) und C_3H_6 (m/e 228) schliesslich nach Abspaltung von CO das Bruchstück bei m/e 200.

Eine weitere denkbare Sequenz ist die Spaltung des Ions von m/e 435, das unter Verlust von C_7H_7 (m/e 344) und nach zweimaliger Abspaltung von Wasser in das Fragment bei m/e 308 übergeht.

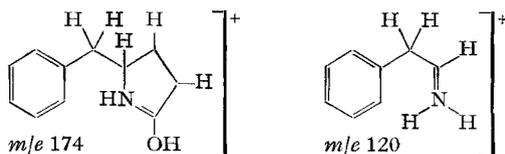
³⁾ Dieses Massenspektrum verdanken wir Herrn Dr. H. Lichti, Sandoz AG, Basel.

Fragmente des hochaufgelösten Massenspektrums von Desoxaphomin (1)⁴⁾

Fragmente bei m/e	Intensität in %	Summenformel	Differenz zwischen ber. u. gc. Wert	Differenz zu M^+	Abgespaltene Bruchstücke
463,267	8	$C_{29}H_{37}NO_4$	0,004		
445*	15			18	H_2O
435*	2			28	CO
427*	3			36	$2H_2O$
417*	>1			46	CO, H_2O
372,215	30	$C_{22}H_{30}NO_4$	0,002	91	C_7H_7
354*	20			109	C_7H_7, H_2O
344*	4			129	C_7H_7, CO
336,194	5	$C_{22}H_{26}NO_2$	0,002	127	$C_7H_7, 2H_2O$
326,211	5	$C_{21}H_{26}NO_2$	0,0006	137	C_7H_7, CO, H_2O
308,201	5	$C_{21}H_{26}NO$	0,0002	155	$C_7H_7, CO, 2H_2O$
288,159	5	$C_{17}H_{22}NO_3$	0,001	175	C_7H_7, H_2O, C_5H_6
270,148	6	$C_{17}H_{20}NO_2$	0,0006	193	$C_7H_7, 2H_2O, C_5H_6$
228,102	8	$C_{14}H_{14}NO_2$	0,0002	235	$C_7H_7, 2H_2O, C_8H_{12}$
200,103	10	$C_{13}H_{14}NO$	0,003	263	$C_7H_7, 2H_2O, CO, C_8H_{12}$
174,091	18	$C_{11}H_{12}NO$	0,0003	289	
120,081	17	$C_8H_{10}N$	0,0002	343	
105,069	15	C_8H_9	0,001	358	
91*	100	C_7H_7		372	

Die Strukturen der genannten Fragmente dürfen aufgrund des hochaufgelösten Massenspektrums als gesichert gelten, die Zerfalls-Sequenzen sind spekulativ.

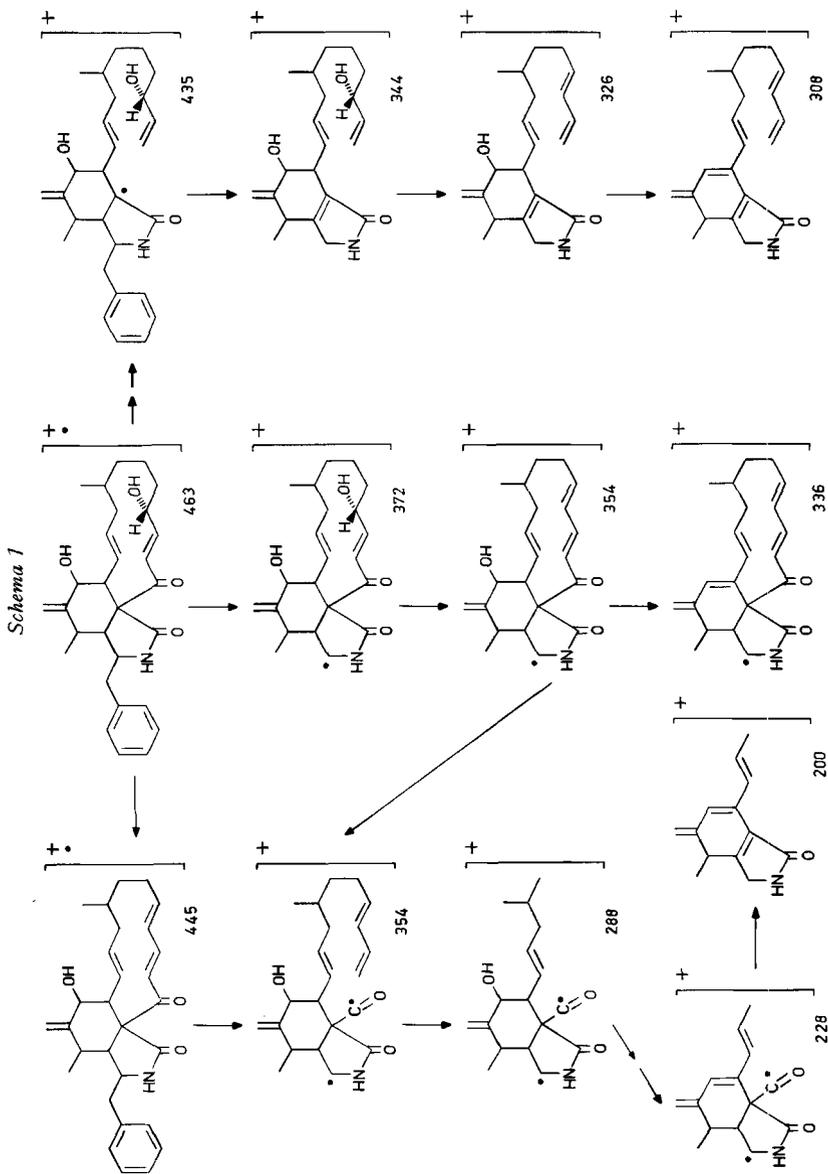
In Analogie zu Aldridge *et al.* [3] halten wir es ferner für wahrscheinlich, dass den Fragmenten m/e 174 bzw. 120 die folgenden Strukturen zukommen:



Aufgrund der Spektraldaten erachten wir die postulierte Struktur von Desoxaphomin (1) als gesichert. 1 ist demnach 7,20-Dihydroxy-16-methyl-10-phenyl-[13]-cytochalasa-6(12), 13^t, 21^t-trien-1, 23-dion. Die Daten erlauben noch keine Aussage über Stereochemie und absolute Konfiguration von Desoxaphomin, wengleich die Kopplungskonstanten des NMR.-Spektrums von 1 es wahrscheinlich machen, dass dieselbe absolute Konfiguration wie bei Phomin (2) vorliegt. Aus diesem Grund versuchten wir, Desoxaphomin chemisch mit Phomin und Cytochalasin D (8) zu verknüpfen, deren absolute Konfiguration durch Röntgen-Diffraktion aufgeklärt worden ist [8] [9].

4. Chemischer Beweis der Struktur von Desoxaphomin (1). – Es wurde zunächst versucht, Desoxaphomin (1) in Analogie zur vermuteten biogenetischen Sequenz oxydativ in Phomin (2) umzuwandeln (vgl. Schema 2). 1 wurde einmal in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure, einmal ohne, mit einem Moläquivalent Peressig-

4) Die mit * bezeichneten Fragmente wurden nicht ausgemessen.

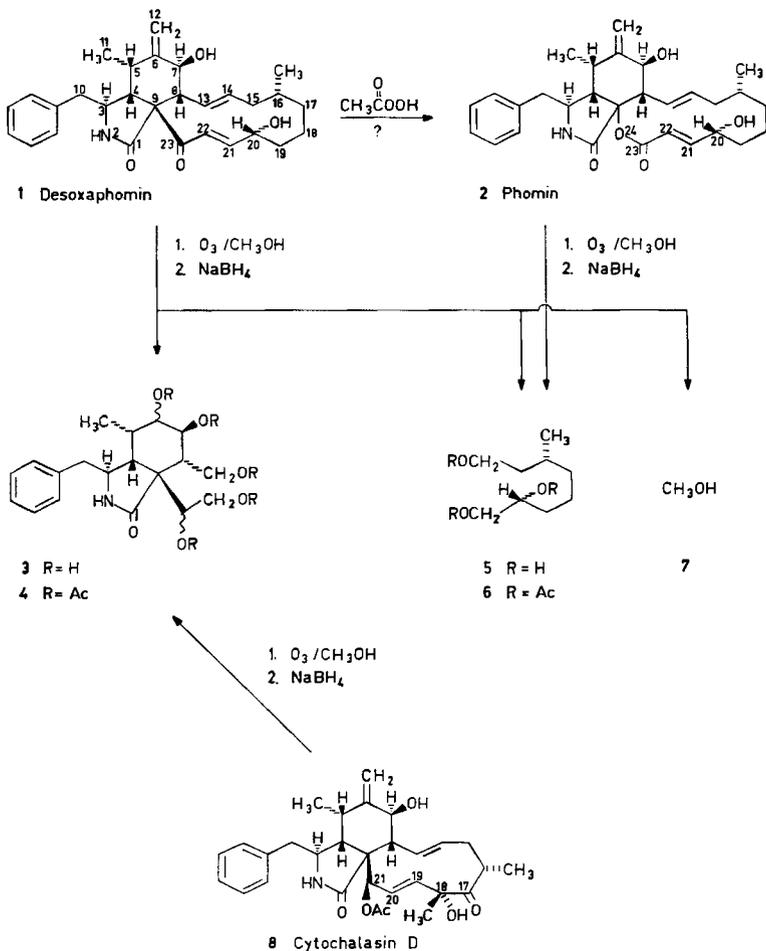


säure behandelt. In beiden Fällen entstanden etwa 10 Produkte, von denen eines in zwei Fließmittelsystemen denselben Rf-Wert zeigte wie Phomin. Die Substanz wurde dünnschichtchromatographisch isoliert, wobei aus 2,2 mg **1** insgesamt 60 μ des entsprechenden Produkts gewonnen wurden. Das IR.-Spektrum dieses Präparats in KBr (Ultramikropille) zeigt eine starke Lactonbande bei 1250 cm^{-1} , genügt jedoch aufgrund noch vorhandener Verunreinigungen nicht, um die Verbindung als Phomin zu identifizieren. Da zu wenig Desoxaphomin zur Verfügung stand, wurde vorläufig

darauf verzichtet, die Reaktion mit den weiteren, üblicherweise für die *Baeyer-Villiger*-Oxydation verwendeten Reagentien durchzuführen.

Eindeutige Resultate lieferte hingegen die Ozonolyse von Desoxaphomin (1). Die Verwendung des ozonolytischen Abbaus als Strukturbeweis beruht auf der Überlegung, dass Desoxaphomin bezüglich der Doppelbindungen im Makrocyclus als

Schema 2



strukturelles Hybrid von Phomin (2) und Cytochalasin D (8) betrachtet werden kann. Bei der Ozonolyse von Desoxaphomin und reduktiver Spaltung der Ozonide mit NaBH_4 erwarteten wir einerseits das Pentahydroxy- γ -Lactam **3**, andererseits das 3-Methyloctan-1,7,8-triol (**5**), daneben aus der exocyclischen Methylengruppe entstandenes Methanol. Das Pentahydroxy- γ -Lactam **3** ist durch Ozonolyse (und anschließende Spaltung mit NaBH_4) von Cytochalasin D erhalten und als Pentaacetyl-

Derivat **4** isoliert worden [10]⁵). Das Octantriol **5** sowie das Triacetyl-Derivat **6** sind bekannte Abbauprodukte von Phomin [1], die in genügender Menge zur Verfügung standen.

Die Ozonolyse von Desoxaphomin (**1**) bei -70° in Methanol lieferte nach Acetylierung des rohen Ozonolysengemischs mit Acetanhydrid in Pyridin etwa 6 Produkte, von denen zwei nach dünnschichtchromatographischem Vergleich in mehreren Fließmittelsystemen mit den Vergleichssubstanzen **4** bzw. **6** identisch waren. Die Isolierung beider Produkte gelang durch mehrfache präparative Schichtchromatographie, wobei das 1,7,8-Triacetoxy-3-methyl-octan (**6**) zusätzlich durch Destillation gereinigt wurde. Das Pentaacetoxy- γ -Lactam **4** wurde, wie die Referenzsubstanz, nur amorph erhalten.

Das 1,7,8-Triacetoxy-3-methyl-octan (**6**) war nach IR.-Spektrum (in CCl_4), NMR.- und Massen-Spektrum mit dem aus Phomin (**2**) bereiteten Präparat identisch. Die $[\alpha]_D$ -Werte in Chloroform stimmten ebenfalls überein, womit gezeigt ist, dass die Stereochemie der chiralen Zentren C(16) und C(20) von Desoxaphomin (**1**) derjenigen von Phomin entspricht.

Massen- und IR.-Spektrum (in KBr) des Pentaacetoxy- γ -Lactams **4** waren ebenfalls mit den unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Spektren der Vergleichssubstanz identisch. Das IR.-Spektrum von **4** zeigt an typischen Absorptionen die NH-Schwingung bei $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ (asso.), die Carbonylbanden von Acetat (1740 cm^{-1}) und γ -Lactam (1695 cm^{-1}), den Aromaten bei $3020, 1600$ und 1490 cm^{-1} und die Esterbande bei 1230 cm^{-1} . – Im Massenspektrum von **4** tritt das Molekel-Ion bei m/e 575, entsprechend der Summenformel $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_{11}$, auf. Ferner sind die charakteristischen Abspaltungen von CH_3CO , CH_3COO , C_7H_7 , und die daraus resultierenden Sequenzen zu erkennen. Basissignal ist das Tropylium-Ion bei m/e 91.

Aus den 100-MHz-NMR.-Spektren von **4** und der Referenzsubstanz aus Cytochalasin D (**8**) ging hervor, dass beide Abbauprodukte als Isomerengemisch bezüglich der an C(6)⁶ neu eingeführten Acetoxygruppe vorliegen, die sowohl α - als auch β -ständig angeordnet sein kann. Das Signal der 11-Methylgruppe erscheint nämlich zweimal als Dublett. Bei **4** ist das Verhältnis der Isomeren etwa 8:2, bei dem aus Cytochalasin D (**8**) erhaltenen Pentaacetoxy- γ -Lactam 6:4, weshalb die Spektren nicht deckungsgleich waren. Unter Berücksichtigung konzentrationsbedingter Verschiebungen konnten jedoch alle Signale in beiden Spektren gefunden werden. Eine Aussage über die Stereochemie des mehrheitlich gefundenen Isomeren an C(6) ist aufgrund der Spektren nicht möglich. Eine auf Analogieschlüssen zu einem ähnlichen Derivat von Phomin (**2**) basierende versuchsweise Zuordnung der Signale des NMR.-Spektrums von **4** wird im experimentellen Teil vorgenommen. – Die unterschiedliche Zusammensetzung der Isomerengemische von **4** erklärt auch die Beobachtung, dass die beiden Substanzen verschiedene $[\alpha]_D$ -Werte zeigen. Da es wahrscheinlich ist, dass **4** im Gegensatz zur Referenzsubstanz auch an C(23) als Epimerengemisch vorliegt, darf den Drehwerten keine zu grosse Bedeutung beigemessen werden.

Aufgrund der Spektraldaten und der chemischen Verknüpfung von Desoxaphomin (**1**) mit Phomin (**2**) und Cytochalasin D (**8**) betrachten wir die vorgeschlagene

⁵) Für die Überlassung einer Vergleichsprobe danken wir Herrn C. R. Lebel.

⁶) Die Numerierung entspricht der von Desoxaphomin (**1**), um die Vergleiche zu erleichtern.

Struktur als bewiesen. Damit liegt auch die absolute Konfiguration von Desoxaphomin (**1**) fest, die mit der von Phomin (**2**) identisch ist. In der Perhydroisoindolon-Einheit sind die Ringverknüpfungen bei **1** die gleichen wie bei allen anderen untersuchten Cytochalanen. An C(7) ist die S-, an C(16) und an C(20) die R-Konfiguration verwirklicht.

Eine Prüfung der biologischen Wirksamkeit von Desoxaphomin (**1**)⁷⁾ zeigte qualitativ die gleichen Resultate wie bei Phomin (**2**). Desoxaphomin war jedoch durchweg bei etwas geringeren Konzentrationen als Phomin aktiv. Die drei durchgeführten Tests ergaben folgende Werte, wobei zum Vergleich jeweils die entsprechenden Werte für Phomin in Klammern angegeben werden: Untersuchung der Cytostase *in vitro* von P-815 Mastocytomzellen ergab eine DE-50 von 0,29 mg **1**/l (0,47 mg/l). Im TCDT (Target Cell Destruction Test) trat bei Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 mg/l eine Hemmung von 100 (93), 76 (40) bzw. 9 (13) % auf. Beide Substanzen bewirkten bei einer Konzentration von 1 mg/l eine 100proz. Hemmung der Wanderung von Leukozyten im Chemotaxis-Test.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt Nr. 2.460.71) sowie der Sandoz A.G., Basel, für die gewährte Unterstützung.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. – *Substanzproben* für Spektralanalysen wurden mindestens 30 Min. bei 70°/12 Torr getrocknet. – *IR.-Spektren* in KBr und *UV.-Spektren* wurden mit einem Perkin-Elmer-IR.-Gitterspektrometer, Modell 125, bzw. einem Beckman-D.K.2-Spektrophotometer im Spektrollabor des Instituts für Organische Chemie (K. Aegerter) aufgenommen, IR.-Spektren in Lösung mit einem Beckman-IR.-8. Die 100-MHz-NMR.-Spektren wurden mit einem Varian HA 100 im Institut für Physikalische Chemie (E. Wullschlegel), die niederaufgelösten Massenspektren mit Geräten vom Typ AEI MS 30 und Hitachi-Perkin-Elmer RMU-7 im Institut für Physikalische Chemie (A. Raas) vermessen. – Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) verwendeten wir Fertigplatten (Kieselgel G), E. Merck AG, Darmstadt, für die präparative Schichtchromatographie (PDC.) dieselben Platten wie für DC. oder Platten mit «Kieselgel PF 254» derselben Firma. Zur Sichtbarmachung der Substanzen auf DC. und PDC. dienten UV.-Licht bzw. J₂-Dämpfe.

2. Isolierung von Desoxaphomin (1). – Zur Züchtung des Mikroorganismus *Phoma* (Stamm S 298) vgl. [1] [5]. – Die Extraktion der Metabolite erfolgte nach Homogenisierung der 100-l-Kulturbühe durch 4maliges Ausrühren mit je 70 l Äthylacetat. Als Antischaummittel wurde ein Gemisch aus Siliconöl und Propylenglykol verwendet. Der nach Abdampfen des Lösungsmittels resultierende Rohextrakt (110 g) wurde im 3-Scheidetrichter-Verfahren zwischen Petroläther und Methanol/Wasser 9:1 verteilt. Der unpolare Anteil wurde zurückgestellt, der polare Anteil durch Filtration an Al₂O₃ (Akt. Stufe II, 200 g) in Methylenchlorid/Methanol 9:1 gereinigt. Der so erhaltene Extrakt (~35 g) wurde mit Methylenchlorid versetzt, wobei das vorhandene Phomin (**2**) praktisch quantitativ ausfiel. Kristallisation aus Aceton lieferte ca. 4,5 g **2**, welches im DC. (Methylenchlorid/Methanol 95:5) eine polare, stark UV.-aktive Verunreinigung zeigte. Erneute fraktionierte Kristallisation von **2** aus Aceton ergab 4 g reines **2**. Die Mutterlauge wurde mit derjenigen der ersten Kristallisation vereinigt (ca. 1 g) und die Verunreinigung **1** auf 4 PDC.-Platten (20 × 20 cm, 2 mm) mit Chloroform/Aceton 3:1 grob abgetrennt. Das so erhaltene unreine **1** wurde durch 4malige PDC. (Chloroform/Aceton 3:1, 2mal Chloroform/Aceton/Ameisensäure 90:5:5; Chloroform/Aceton 3:1) weiter gereinigt. Die Extraktion der Substanz erfolgte mit Chloroform/Aceton 1:1, die Extrakte wurden jeweils mit Chloroform/Aceton 3:1 und Chloroform/Aceton/Ameisensäure 90:5:5 im DC. auf ihre Reinheit untersucht. Es resultierten 96 mg *amorphes 1*, das DC.-einheitlich war. $[\alpha]_D^{24} = -50,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,178$, CHCl₃). – IR.-Spektrum

⁷⁾ Wir danken Herrn Dr. J. F. Borel, Medizinisch-Biologische Forschung, Sandoz AG, Basel, für die Durchführung dieser Versuche.

(CH₂Cl₂): u.a. Banden bei 3590, 3540 (OH); 3410 (NH); 3060 (C=C, *trans* disubstit.); 3020 (Aromat); 1710–1670 (breit, C=O, Lactam, α,β -unges. Keton); 1622 (C=C, konjugiert); 1600, 1490 (Aromat) und 1020 (C–O) cm⁻¹. (KBr): u.a. Banden bei 3600–3200 (OH, NH, assoz.); 3080, 3060 (C=C, *trans* disubstit., exocycl. C=CH₂) cm⁻¹. – UV.-Spektrum (CH₃OH): **Maxima** bei 217 (4,15) und 234 (3,938) nm (log ϵ). – NMR.-Spektrum (100 MHz, CDCl₃): u.a. Signale bei 7,2 (*m*, 6H, Phenyl-Rest, C(2)); 6,77 (*dd*, 1H, C(21), $J_{21,22} = 16$ Hz, $J_{20,21} = 9$ Hz); 6,36 (*s*, 1H, N(2), tauscht mit D₂O aus); 6,18 (*dd*, 1H, C(13), $J_{8,13} = 10$ Hz, $J_{13,14} = 15$ Hz); $\sim 5,4$ (*m*, 1H, C(14)); 5,29 und 5,09 (2*s*, je 1H, C(12)); 4,20 (*m*, 1H, C(20)); 3,97 (*d*, 1H, C(7)), $J_{7,8} = 10$ Hz); 3,44 (*m*, 1H, C(5)); 3,15 (*dd*, 1H, C(4), $J_{3,4} = 2$ Hz, $J_{4,5} = 6$ Hz); 3,1 (1H, OH, tauscht mit D₂O aus); 2,81 (*t*, 1H, C(3), $J_{3,10} = 7$ Hz, $J_{3,4} = 2$ Hz); 2,60 (*d*, 2H, C(10), $J_{3,10} = 7$ Hz); 2,50 (*t*, 1H, C(8), $J_{7,8} = J_{8,13} = 10$ Hz); 2,35 (1H, OH, tauscht mit D₂O aus); 0,98 und 0,94 (2*d*, je 3H, C(11)- und C(16)-Methyl) ppm. – Massenspektrum vgl. Tabelle.

3. Baeyer-Villiger-Oxydation von Desoxaphomin (1). – Je 2,2 mg **1** wurden mit 0,3 ml einer 0,0157 N Lösung von Peressigsäure in Eisessig versetzt, einer der Proben 1 mg *p*-Toluolsulfonsäure beigegeben und 110 Std. bei 23° unter Lichtabschluss stehengelassen. Beide Proben wurden in 5 ml Äthylacetat aufgenommen, mit 10 ml 20proz. KHCO₃-Lösung und 2 \times 10 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft, wobei je 2,5 mg Produkt resultierten. Die mit *p*-Toluolsulfonsäure behandelte Probe zeigte im DC. (Chloroform/Aceton 3:1; Chloroform/Äthylacetat 7:3) einen Fleck mit dem *Rf* von *Phomin* (**2**). Dieser Fleck wurde quantitativ isoliert (~ 60 μ). IR.-Spektrum (KBr, Ultramikropille): u.a. Banden bei 3600–3200 (OH, NH); 3060 (C=C); 1710, 1690 (C=O); 1620 (C=C, schwach); 1250 (C–O–C, Lacton); 790 und 690 cm⁻¹.

4. Ozonolytischer Abbau von Desoxaphomin (1). – Eine Lösung von 40 mg **1** in 25 ml Methanol wurde bei –65° mit einem O₃/O₂-Gemisch (200 ml O₂/Min., O₃-Gehalt 0,4 mmol/Min.) durchspült, bis tiefe Blaufärbung auftrat. Die kalte Lösung wurde unter Rühren portionenweise mit 300 mg NaBH₄ versetzt (30 Min.) und anschließend bei 23° weitere 30 Min. gerührt. Nach Zusatz von 25 ml H₂O wurde mit 2 N H₂SO₄ kongosauer gestellt und das Methanol unter mehrmaligem H₂O-Zusatz im Vakuum abgedampft. Die wässrige Lösung (20 ml) wurde mit 20proz. KHCO₃-Lösung und 2 N H₂SO₄ auf pH 5 eingestellt und im *Kutscher-Stuedel*-Extraktor 168 Std. mit Chloroform extrahiert. Der Rohextrakt (43 mg) wurde mit 1 ml abs. Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid versetzt und unter Lichtabschluss 48 Std. bei 60° stehengelassen. 5maliges Abdampfen mit Benzol im Vakuum lieferte 60 mg rohes Acetylierungsgemisch, das im DC. in Methylenchlorid/Methanol 97:3 oder Chloroform/Aceton 95:5 6 Produkte zeigte, von denen zwei die gleichen *Rf*-Werte wie die Referenzsubstanzen **4** bzw. **6** aufwiesen.

4.1. *1,7,8-Triacetoxy-3-methyl-octan* (**6**). **6** wurde durch PDC. in Chloroform/Aceton 95:5 abgetrennt und zur Reinigung bei 100°/0,05 Torr im Molekularkolben destilliert (21 mg). $[\alpha]_D^{25} = +2,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,209$, CHCl₃). IR.-Spektrum (CCl₄): u.a. Banden bei 2960, 2940, 2880 (CH); 1735 (C=O, Acetat); 1460, 1430; 1230 (C–O–C) cm⁻¹. NMR.-Spektrum (100 MHz, CDCl₃): u.a. Signale bei 5,1 (*m*, 1H, C(7)); 4,15 (*m*, 4H, C(1), C(8)); 2,1 (*s*, 6H, Acetyl) und 2,08 (*s*, 3H, Acetyl); 0,97 (*d*, 3H, C(3)-Methyl) ppm. Massenspektrum: u.a. Signale bei *m/e* 302 (*M*⁺), 259, 243, 242, 229, 215, 199, 188, 187, 169, 155 und 140.

Die parallel aufgenommenen Daten eines aus **2** erhaltenen Musters von **6** waren identisch.

4.2. *Pentaacetoxy- γ -Lactam 4* (5,6-Diacetoxy-7-acetoxy-methyl-3-benzyl-7a-(α,β -diacetoxy-äthyl)-4-methyl-perhydroisindol-1-on). **4** wurde durch 3malige PDC. (2mal in Methylenchlorid/Methanol 97:3, einmal in Methylenchlorid/Methanol 98:2) in DC.-einheitlicher Form erhalten (15 mg). $[\alpha]_D^{25} = -48^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,145$, CHCl₃). IR.-Spektrum (KBr): u.a. Banden bei 3600–3200 (NH, assoz.); 3020 (Aromat); 1740 (C=O, Acetat); 1695 (C=O, Lactam); 1600, 1490 (Aromat); 1230 (C–O–C); 750 und 695 cm⁻¹. NMR.-Spektrum (100 MHz, CDCl₃)⁶): u.a. Signale bei 7,3 (*m*, 5H, Phenyl-Rest); 4,3 (*AB*-System, verdoppelt, 2H, C(13), $J_{gem} = -12$ Hz, $J_{8,13} = 6$ Hz); 6,0–3,5 (div. *m*, 6H); 5,9 (*s*, 1H, N(2)); 3,5–2,5 (*m*, 6H); 1,2 (*d*, 0,6H) und 1,04 (*d*, 2,4H, C(11)) ppm. Massenspektrum: u.a. Spitzen bei *m/e* 575 (*M*⁺), 532, 516, 484, 443, 425, 382, 340, 91 (Basis-signal).

Die parallel aufgenommenen Daten eines aus **8** erhaltenen Musters von **4** waren bis auf den Drehwert identisch. $[\alpha]_D^{25} = -33^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,171$, CHCl₃) [10].

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *W. Rothweiler & Ch. Tamm*, *Experientia* 22, 750 (1966); *Helv.* 53, 696 (1970).
[2] *M. Binder, Ch. Tamm, W. B. Turner & H. Minato*, *J. chem. Soc., Perkin Trans. I* 1973, im Druck.
[3] *D. C. Aldridge, J. J. Armstrong, R. N. Speake & W. B. Turner*, *Chem. Commun.* 1967, 26; *J. chem. Soc.* 1967 (C), 1667.
[4] *D. C. Aldridge & W. B. Turner*, *J. chem. Soc.* 1969 (C), 923.
[5] *M. Binder, J. R. Kiechel & Ch. Tamm*, *Helv.* 53, 1797 (1970).
[6] *M. Binder & Ch. Tamm*, *Angew. Chem.* 85, (1973), im Druck.
[7] *B. Bhacca & D. Williams*, *Applications of NMR.-Spectroscopy in Organic Chemistry*, Holden-Day, London 1964.
[8] *G. M. McLaughlin, G. A. Sim, J. R. Kiechel & Ch. Tamm*, *Chem. Commun.* 1970, 1398.
[9] *Y. Tsukuda & H. Kayama*, *J. chem. Soc., Perkin Trans. II* 1972, 739.
[10] *C. R. Lebel & Ch. Tamm*, Unpublizierte Versuche.

89. Identifizierung von sechs Komponenten des Spurpheromons der Ameisenart *Lasius fuliginosus*

Vorläufige Mitteilung

von **Siegfried Huwyler, Kurt Grob** und **Max Viscontini**

Organisch-chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(23. II. 73)

Summary. Hexanoic acid, heptanoic acid, octanoic acid, nonanoic acid, decanoic acid, and dodecanoic acid are components of the trail pheromone of the ant species *Lasius fuliginosus*. The acids were extracted from the contents of the rectal *ampullae* and identified by the mass spectra and gas chromatographic retention times of the corresponding methyl esters.

Lasius fuliginosus gehört zu jenen Ameisenarten, die ihren Futterweg durch die Exkretion von Spurpheromonen kennzeichnen. Untersuchungen von *Hangartner & Bernstein* [1] hatten ergeben, dass sich das Spurpheromon von *L. fuliginosus* in der Rektalampulle sammelt und durch die Analöffnung ausgeschieden wird.

Für die chemische Untersuchung dieses Naturstoffs beschränkten wir gleichzeitig zwei voneinander unabhängige Wege. Als Ausgangsmaterial diente im einen Fall der Inhalt der aus den Ameisen herauspräparierten Rektalampullen und im andern die Gesamtheit der von den Ameisen einer Laboratoriumskolonie auf dem Futterweg ausgeschiedenen Stoffe [2]. Im folgenden werden die bisherigen Ergebnisse unserer Analyse des Rektalampulleninhaltes mitgeteilt.

Für die meisten Versuche genügten 5 bis 20 Rektalampullen, die aus den Abdomina der Ameisen herauspräpariert und an der Innenwand eines Glasröhrchens ausgedrückt wurden. Extraktionsexperimente mit der so erhaltenen wässrigen Lösung wiesen darauf hin, dass ein erheblicher Teil des aktiven Materials saurer Natur sein müsse, so dass wir beschlossen, die Rektalampullenflüssigkeit in Richtung auf den sauren Anteil hin aufzuarbeiten. Man liess die Flüssigkeit eintrocknen und extrahierte den Rückstand mit Äther. Der Ätherextrakt wurde mit Diazomethan umgesetzt [3] und anschliessend unter Verwendung einer Glas-Trennkapillare gas-chromatogra-