

246. Proxiphomin und Protophomin, zwei neue Cytochalasane

von Michael Binder und Christoph Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

Herrn Prof. Edgar Lederer zum 65. Geburtstag gewidmet

(25. VI. 73)

Summary. Two new cytochalasans, proxiphomin and protophomin have been isolated from cultures of a *Phoma* species (strain S 298). They are shown to possess the same skeleton as deoxaphomin (**4**), which has been isolated recently. Thus they represent lower states of oxidation of **4**. On the basis of the spectral data, the structures 16-methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-6 (**7**), 13^t, 21^t-triene-1, 23-dione (**1**) and 16-methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-5 (**6**), 13^t, 21^t-trien-1, 7, 23-trione (**2**) are proposed for proxiphomin and protophomin respectively. On treatment with perchloric acid, substance **1** is isomerized to give 16-methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-5 (**6**), 13^t, 21^t-triene-1, 23-dione (**3**). The assumption that the [13]cytochalasans are potential biogenetic precursors of the 24-oxa-[14]cytochalasans is discussed.

1. Einleitung. – Kürzlich haben wir über die Isolierung und Strukturaufklärung von Desoxaphomin (**4**) ((7*S*, 16*R*, 20*R*)-7, 20-Dihydroxy-16-methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-6(12), 13^t, 21^t-trien-1, 23-dion), dem ersten [13]Cytochalasan¹⁾, berichtet [2]. Dieser Nebenmetabolit einer *Phoma* Species (Stamm S 298) ist das (Nor-oxa)-Analogon des seit 1966 bekannten Anticytokinetikums Phomin (= Cytochalasin B: (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) (**5**) [3] [4]. Die aus den Spektraldaten abgeleitete Struktur von **4** konnte zusätzlich durch einen ozonolytischen Abbau und Verknüpfung der dabei erhaltenen Bruchstücke mit Phomin (**5**) und Cytochalasin D ((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) [5] bewiesen werden. Es ist uns nun gelungen, aus Kulturen der genannten *Phoma* Species zwei weitere, in geringer Menge gebildete Metabolite zu isolieren, die das gleiche carbocyclische Grundgerüst wie Desoxaphomin (**4**) besitzen, aber weniger Sauerstoff als dieses enthalten. Im folgenden berichten wir über die im wesentlichen mit spektroskopischen Methoden durchgeführte Strukturaufklärung der beiden neuen Cytochalasane, die wir Proxiphomin und Protophomin nennen, sowie über ihre mögliche Funktion im Rahmen der Biogenese der 24-Oxa-[14]cytochalasane.

2. Isolierung. – Als Ausgangsmaterial diente der Rohextrakt einer 100-Liter-Kultur des Mikroorganismus *Phoma* (Stamm S 298), aus dem das vorhandene Phomin (**5**) und Desoxaphomin (**4**) durch Ausfällen mit Methylenchlorid praktisch quantitativ entfernt worden waren. Der Rückstand (etwa 50 g) wurde an Kieselgel mit Methylenchlorid/Methanol (steigende Mengen Methanol) chromatographiert, was zu einer groben Trennung führte, wobei eine geringe Menge unpolarer Komponenten (~1 g), 7-Hydroxy-16-methyl-10-phenyl-24-oxa-[14]cytochalasa-6(12), 13^t, 21^t (und

¹⁾ Zur Nomenklatur vgl. [1].

21^o-trien-1,20,23-trion (= Dehydrophomin, Cytochalasin A; vgl. [3] [4]) und polares, z. T. aus dem für die Extraktion der Kulturen verwendeten Antischaummittel stammendes Material erhalten wurden. Erneute sorgfältige Säulenchromatographie der unpolaren Komponenten an Kieselgel lieferte schliesslich 180 mg einer dünn-schichtchromatographisch nahezu einheitlichen amorphen Fraktion (aus den mit Methylenchlorid eluierten Fraktionen) und 60 mg eines Öls, das beim Stehenlassen teilweise kristallisierte, nach den Dünnschichtchromatogrammen (DC.) aber noch aus mehreren Substanzen bestand (mit Methylenchlorid/Methanol 98:2 eluiert). Die zuerst isolierte Fraktion lieferte nach weiterer Reinigung durch präparative DC. ein einheitliches Präparat des Proxiphomins (**1**). Es zeigte sich, dass **1** sich beim Stehenlassen langsam zersetzt, was jedoch durch Aufbewahren bei 0° unter Lichtausschluss auf ein Minimum reduziert werden konnte. Das so erhaltene Präparat von **1**, das bisher nicht kristallisierte, wurde für alle spektroskopischen Untersuchungen verwendet. Aus dem später eluierten teilweise kristallinen Öl liess sich durch mehrfache präparative DC. in verschiedenen Fließmittelsystemen und Umkristallisieren des Rohprodukts (26 mg) aus Aceton oder Methanol Protophomin (**2**) in rechteckigen Plättchen vom Smp. 252–256° gewinnen. Das Kristallisat war nach den üblichen Kriterien einheitlich. Für unsere Untersuchungen standen somit 150 mg Proxiphomin (**1**) und 19 mg Protophomin (**2**) zur Verfügung.

3. Struktur der isolierten Metabolite. – Das IR.-Spektrum des Proxiphomins (**1**) in CCl₄ zeigt das Fehlen von HO-Gruppen. Dagegen tritt die typische Absorption des Fünfring-Lactams bei 3420 (und assoziiert bei 3200) cm⁻¹ auf. Die Carbonylab-sorptionen des Lactams und des Lactons fallen in einer breiten Bande um 1680 cm⁻¹ zusammen, ebenso die Absorption des α,β -ungesättigten Ketons (Doppelbindung) bei 1610 cm⁻¹ mit der Aromatbande bei 1600 cm⁻¹. Charakteristisch ist das Fehlen der für die 24-Oxa-[14]cytochalasane typischen C–O–C-Schwingung bei 1240 cm⁻¹. Das UV.-Spektrum von **1** in Äthanol zeigt Maxima bei 206, 217 und 243 nm, von denen das letztere von der α,β -ungesättigten Ketongruppierung herrührt.

Das 100-MHz-NMR.-Spektrum von **1** in CDCl₃ (vgl. Fig. 1) ist für die [13]Cytochalasane charakteristisch. Das bei $\delta = 7,26$ ppm zentrierte Multipllett der fünf Protonen des Benzolrings überlappt mit dem linken Teil des von den Protonen der 21, 22-Doppelbindung gebildeten *AB*-Systems. Der rechte Teil dieses Systems erscheint bei $\delta \approx 6,8$ ppm als 8-Linien-Signal, da zusätzlich zu der grossen *trans*-vinylischen Kopplung mit H–C(22) zwei weitere Kopplungen mit den Protonen an C(20) von 9 bzw. 5 Hz auftreten. Daraus folgt die Abwesenheit der HO-Gruppe an C(20) von Desoxaphomin (**4**), was durch das IR.-Spektrum von **1** bereits nahegelegt worden war. Ein weiteres *AB*-System, gebildet von den Protonen der 13, 14-Doppelbindung, tritt bei $\delta = 6,3$ (H–C(13)) und 5,24 ppm (H–C(14)) in Erscheinung. Das H–C(13) entsprechende Signal zeigt zusätzlich Kopplungen von 10 bzw. 2 Hz zu den Protonen an C(8) und C(15), das H–C(14) entsprechende, Kopplungen von 10 bzw. 4 Hz zu den Protonen an C(15). Bei $\delta = 5,84$ ppm liegt das breite Singulett des Protons an N(2), das langsam mit D₂O austauscht. Ein weiteres breites Singulett bei $\delta = 5,44$ ppm entspricht dem vinylischen Proton an C(7). Die Signale von H–C(3) und H–C(4) über-lappen bei $\delta = 3,24$ ppm, so dass kein klares Aufspaltungsmuster erkennbar ist. Die Benzylprotonen (C(10)) bilden ein *AB*-System, das durch Kopplung mit H–C(3) er-

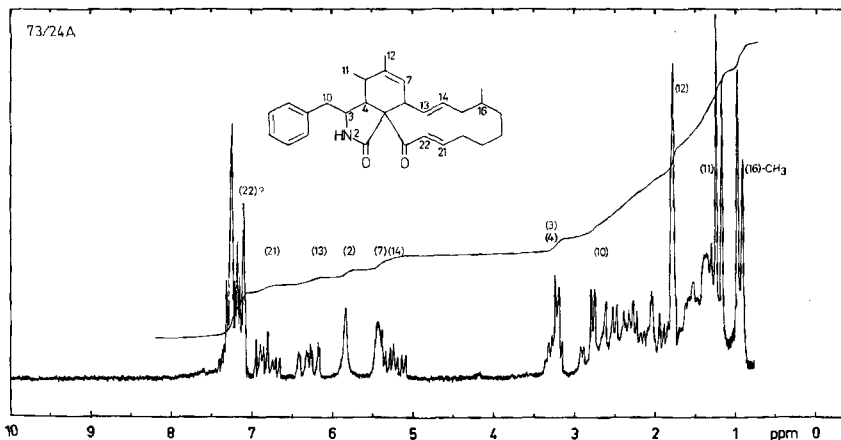
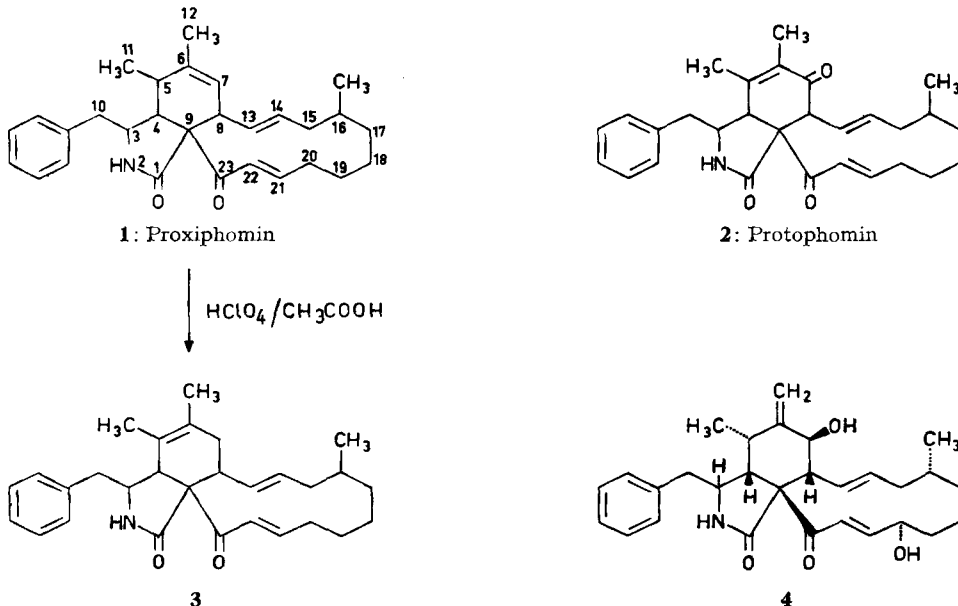


Fig. 1. 100-MHz-NMR.-Spektrum von Proxiphomin (1) in $CDCl_3$

neut aufgespalten ist. Seine beiden Hälften sind etwa bei $\delta = 2,87$ bzw. $2,52$ ppm zentriert. Bei $\delta = 1,80$ ppm folgt das breite Singulett einer vinylicsen Methylgruppe (C(12)), bei $\delta = 1,22$ ppm das Dublett der Protonen an C(11) und bei $\delta = 0,95$ ppm dasjenige der C(16)-Methylgruppe. Durch Einstrahlungsversuche konnten die Se-

Schema 1



quenzen der Protonen an C(10), C(3) und C(4), an C(13), C(14) und C(15), an C(20), C(21) und C(22), und die Kopplung zwischen H-C(7) und H-C(12) bewiesen werden. Aus dem Vergleich dieses Spektrums mit dem von Desoxaphomin (4) folgt das Fehlen

der beiden HO-Gruppen und der exocyclischen Methylengruppe C(12). Diese Doppelbindung ist bei **1** in die 6(7)-Stellung verschoben, was mit dem Auftauchen der Signale bei 5,44 (H-C(7)) und bei 1,80 ppm (H-C(12)), dem Vinylproton und der vinyllischen Methylgruppe im Einklang ist.

Die aufgrund des NMR.-Spektrums gerechtfertigte Annahme, dass es sich bei Proxiphomin um das 16-Methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-6(7), 13^t, 21^t-trien-1, 23-dion (**1**) handelt, wurde durch das hochaufgelöste Massenspektrum²⁾ der Verbindung bestätigt. Danach kommt der Molekel die Summenformel C₂₉H₃₇NO₂ (431, 283) zu. Die prominentesten Spitzen sind in der Tabelle dargestellt, wobei eine versuchsweise Zuordnung von Strukturen bei denjenigen Fragmenten vorgenommen wird, deren Summenformeln durch Hochauflösung bewiesen sind.

Aus **1** konnte durch Behandeln mit HClO₄ in Eisessig eine isomere Verbindung erhalten werden. Es handelt sich nach den Spektraldaten um das 16-Methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-5(6), 13^t, 21^t-trien-1, 23-dion (**3**).

So ist das IR.-Spektrum von **3** in CCl₄ bis auf geringe Unterschiede im «Finger-print»-Gebiet mit dem von **1** identisch. Das gleiche gilt auch für das UV.-Spektrum von **3**, bei dem lediglich das für das α , β -ungesättigte Keton charakteristische Maximum um 4 nm nach kürzerer Wellenlänge verschoben ist. Aus dem Massenspektrum von **3** folgten das Molekulargewicht von **3** (m/e des Molekel-Ions bei 431) und damit die Summenformel C₂₉H₃₇NO₂, identisch mit der von **1**.

Über die Frage, in welche der drei möglichen Stellungen (5(6); 6(12); 7(8)) die 6(7)-Doppelbindung von **1** bei **3** gewandert war, gab schliesslich das 100-MHz-NMR.-Spektrum Auskunft. Die wesentlichen Unterschiede zum Spektrum von **1** sind einerseits das Fehlen des Vinylprotons an C(7) von **1** und das Auftreten eines weiteren, einer vinyllischen Methylgruppe entsprechenden Singulets bei $\delta = 1,44$ ppm im Spektrum von **3**, das an die Stelle des bei $\delta = 1,21$ ppm zentrierten Dubletts der Methylgruppe C(11) von **1** getreten ist. Ferner tritt das Signal der Benzylprotonen (C(10)) bei **3** nicht als AB-System auf, sondern als scharfes, bei $\delta = 2,61$ ppm zentriertes Dublett. Eine Veränderung zeigt sich auch bei den Protonen an C(21) und C(22).

Das Vorhandensein einer zweiten vinyllischen Methylgruppe, das Fehlen des Vinylprotons an C(7) und die Abwesenheit des für die exocyclische Doppelbindung typischen doppelten Singulets (bei ~ 5 ppm) beweisen, dass die gewanderte Doppelbindung sich bei **3** in 5(6)-Stellung befindet.

Im IR.-Spektrum des Protophomin (**2**) in KBr tritt bei 3600–3200 cm⁻¹ eine breite assoziierte, bei 3320 cm⁻¹ eine scharfe Bande auf, die der Lactamgruppierung zugeordnet werden müssen. Die Carbonylbanden sind hier scharf getrennt: Lactam bei 1700 cm⁻¹, zwei α , β -ungesättigte Ketongruppen bei 1680 bzw. 1660 cm⁻¹. Die Doppelbindungsbanden der konjugierten Funktionen fallen wiederum bei 1615 cm⁻¹ mit der Absorption des Benzolrings zusammen. Auch hier fehlt die Esterbande der 24-Oxa-[14]cytochalasane bei 1240 cm⁻¹.

Das UV.-Spektrum von **2** in Äthanol zeigt Maxima bei 207 und 245 nm. Hier soll darauf hingewiesen werden, dass bei den bisher bekannten [13]Cytochalasanen **1**, **2**, **3** und Desoxaphomin (**4**) die Absorptionsmaxima der α , β -ungesättigten Ketongrup-

²⁾ Dieses, sowie die anderen hochaufgelösten Massenspektren verdanken wir Herrn Dr. H. Lichti, Sandoz AG, Basel.

Tabelle. Fragmente der hochaufgelösten Massenspektren von Proxiphomin (1) und Protophomin (2)⁰⁾

Proxiphomin (1) $\Delta^{6,7}$ R = H ₂			Protophomin (2) $\Delta^{5,6}$ R = O		
Spitzen m/e	Summenformel	Differenz	Spitzen m/e	Summenformel	Differenz
431,283	C ₂₉ H ₃₇ NO ₂		445,265	C ₂₉ H ₃₅ NO ₃	
416,259	C ₂₈ H ₃₄ NO ₂	(-CH ₃)	430*	C ₂₈ H ₃₂ NO ₃	(-CH ₃)
413,271	C ₂₉ H ₃₅ NO	(-H ₂ O?)			
403,291	C ₂₈ H ₃₇ NO	(-CO)	417*	C ₂₈ H ₃₅ NO ₂	(-CO)
388,264	C ₂₇ H ₃₄ NO	(-CO, CH ₃)	402*	C ₂₇ H ₃₂ NO ₂	(-CO, CH ₃)
340,229	C ₂₂ H ₃₀ NO ₂	(-C ₇ H ₇)	354,204	C ₂₂ H ₂₈ NO ₃	(-C ₇ H ₇)
322,218	C ₂₂ H ₂₈ NO	(-C ₇ H ₇ , H ₂ O)	336*	C ₂₂ H ₂₆ NO ₂	(-C ₇ H ₇ , H ₂ O)
			326*	C ₂₁ H ₂₅ NO ₂	(-C ₇ H ₇ , CO)
312,231	C ₂₁ H ₃₀ NO	(-C ₇ H ₇ , CO)	325,213	C ₂₁ H ₂₈ NO ₂	(-C ₇ H ₇ , CO)
			311*	C ₂₀ H ₂₆ NO ₂	(-C ₇ H ₇ , CO, CH ₃)
254,154	C ₁₇ H ₃₀ NO	(-C ₁₂ H ₁₇ O)	268,133	C ₁₇ H ₁₈ NO ₂	(-C ₁₂ H ₁₇ O)
176,109	C ₁₁ H ₁₄ NO		190,086	C ₁₁ H ₁₂ NO ₂	
105,071	C ₈ H ₉		120,082	C ₈ H ₁₀ N	
91	C ₇ H ₇	Basis-Signal	105,069	C ₈ H ₉	
91	C ₇ H ₇	Basis-Signal	91	C ₇ H ₇	Basis-Signal

⁰⁾ Die mit * bezeichneten Spitzen wurden nicht vermessen.

pierung durchweg bei grösseren Wellenlängen als berechnet [6] auftreten. Dieser bathochrome Effekt geht wohl darauf zurück, dass das chromophore System hier Teil eines grossen flexiblen Ringes ist und sterischen Effekten sowie Konformationswechseln eine beträchtliche Rolle zufällt.

Aus dem hochaufgelösten Massenspektrum von **2** folgten Summenformel und Molekulargewicht, $C_{29}H_{35}NO_3$ (445,265). Einige Fragment-Ionen von **2** sind in der Tabelle aufgeführt. Die Anordnung ist so gewählt, dass ein Vergleich der einander entsprechenden Fragmente von **1** und **2** möglich ist.

Die Ableitung der Struktur von Protophomin gelang schliesslich aus dem 90-MHz-NMR.-Spektrum⁴⁾ der Verbindung (vgl. Fig. 2). Bei $\delta = 7,24$ ppm erscheint das

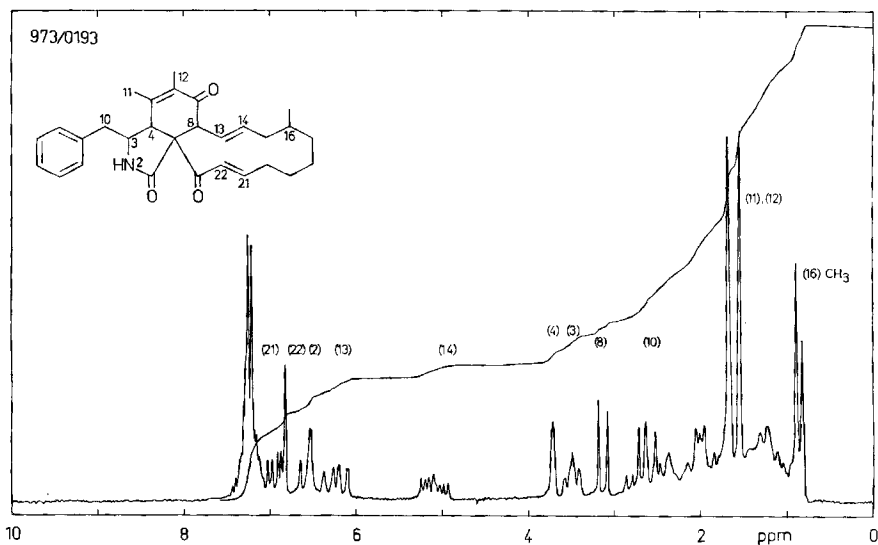


Fig. 2. 90-MHz-NMR.-Spektrum (mit Fourier-Transform) von Protophomin (**2**) in $CDCl_3$

Signal der 5 aromatischen Protonen, das eine Hälfte des linken Teils des von den Protonen an C(21) und C(22) gebildeten *AB*-Systems verdeckt. Der linke Teil dieses *AB*-Systems, H-C(21), ist bei $\delta = 7,07$ ppm zentriert und erscheint als 8-Linien-Signal, wobei die jeweiligen Kopplungen $J_{21,22} = 15$ Hz, $J_{21,20a} = 10$ Hz und $J_{21,20b} = 4$ Hz betragen. Der rechte Teil dieses Systems bei $\delta = 6,73$ ppm entspricht dem C(22)-Proton. Er zeigt keine zusätzliche Aufspaltung. Bei $\delta = 6,53$ ppm tritt das Signal des N(2)-Protons auf, welches bei Zugabe von D_2O langsam verschwindet. Das von den Protonen der 13,14-Doppelbindung gebildete *AB*-System zeigt das 13-Proton bei $\delta = 6,24$ ppm als 4-Linien-Signal mit den Kopplungen $J_{13,14} = 16$ Hz und $J_{8,13} = 10$ Hz, das 14-Proton bei $\delta = 5,09$ als 8-Linien-Signal. Die zusätzlichen Kopplungen zu den Protonen an C(15) betragen 8 bzw. 4 Hz. Bei $\delta = 3,71$ ppm folgt als breites Singulett das 4-Proton, bei $\delta = 3,5$ ppm das 3-Proton als Triplett ($J_{3,10} = 7$

⁴⁾ Das Spektrum verdanken wir Herrn H. R. Loosli, Sandoz AG, Basel. Es wurde auf einem Bruker HX-90-E-Gerät (mit Fourier-Transform) aufgenommen.

bzw. 9 Hz), dessen Linien durch die geringe Kopplung mit H-C(4) ($\Phi \approx 90^\circ$) etwas verbreitert sind. Ein scharfes Dublett bei $\delta = 3,13$ ppm entspricht dem Proton an C(8) ($J_{8,13} = 10$ Hz), woraus folgt, dass dieses Proton ausser H-C(13) keine direkten Nachbarn hat. Die Benzylprotonen an C(10) bilden wiederum ein *AB*-System bei $\delta = 2,7$ und 2,53 ppm mit den Kopplungen $J_{3,10} = 7$ bzw. 9 Hz und $J_{gem} = -14$ Hz. Bei $\delta = 1,7$ und 1,53 ppm erscheinen zwei breite Singulette, die den beiden vinylischen Methylgruppen C(11) und C(12) entsprechen. Das Dublett der C(16)-Methylgruppe ($J = 6$ Hz) tritt bei $\delta = 0,84$ ppm auf. Durch Einstrahlungsversuche liessen sich die Kopplungen zwischen den Protonen an C(8), C(13), C(14), C(15), den Protonen an C(10), C(3), C(4) und den Protonen an C(22), C(21) und C(20) beweisen. Aus diesen Daten folgte die Stellung der Doppelbindung von C(5) nach C(6) und diejenige des (im Vergleich zu **1**) zusätzlichen Sauerstoffatoms an C(7). Auf Grund dieser Befunde erteilen wir Protophomin die Struktur des 16-Methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-5(6),13^t,21^t-trien-1,7,23-trions (**2**).

Wegen der sehr geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge von **2** musste auf einen chemischen Beweis der vorgeschlagenen Struktur verzichtet werden. Unsere Überlegungen werden jedoch durch die in der Tabelle aufgeführten analogen Fragment-Ionenpaare von **1** und **2** gestützt. Dabei sind die jeweils angegebenen Summenformeln durch die hochaufgelösten Massenspektren bewiesen worden.

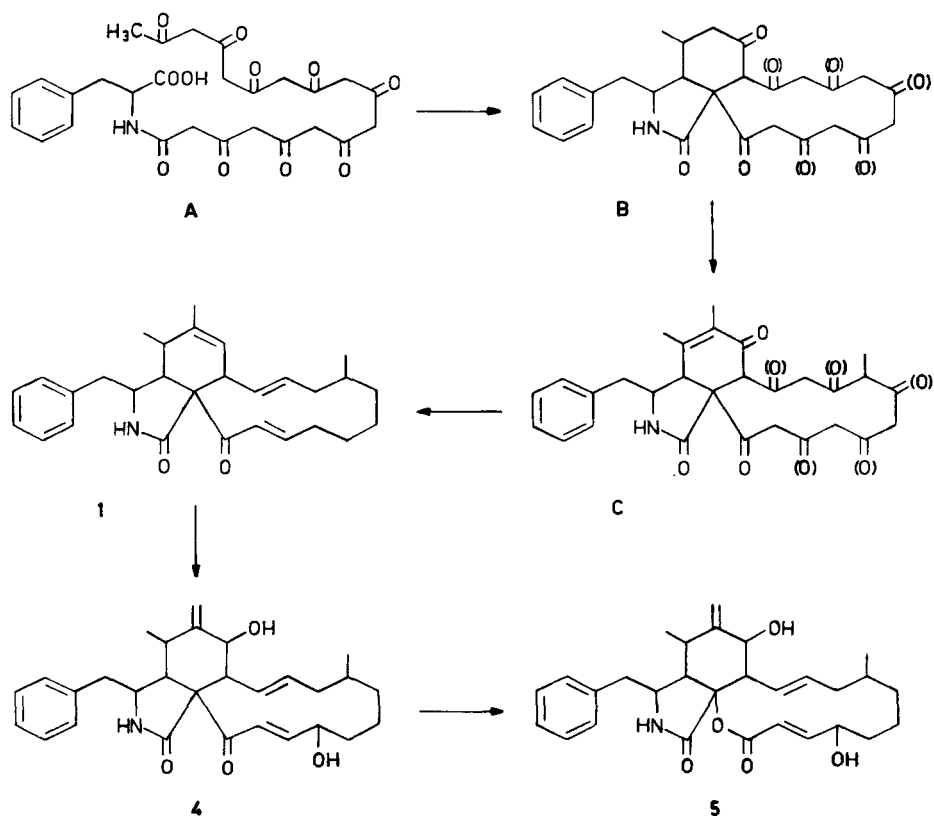
Über die Stereochemie der chiralen C-Atome von **1** und **2** kann ohne eine direkte Verknüpfung mit denjenigen Cytochalasanen, bei denen Röntgen-Strukturanalysen durchgeführt worden sind, oder mit Desoxaphomin (**4**) [1], keine abschliessende Aussage gemacht werden. Allerdings lassen die Kopplungskonstanten der NMR.-Spektren der [13]Cytochalasane mit grosser Wahrscheinlichkeit vermuten, dass bei **1** und **2** die gleiche Stereochemie verwirklicht ist wie bei Desoxaphomin.

4. Die [13]Cytochalasane als potentielle Vorläufer der 24-Oxa-[14]cytochalasane. – Wir haben in anderem Zusammenhang [7] Spekulationen zur Biogenese von Phomin (Cytochalasin B) (**5**) veröffentlicht. Dabei wurde aus der grundsätzlich bekannten Biogenese dieses Cytochalasans [8] ein Schema abgeleitet, nach welchem die Verknüpfung einer Molekel Phenylalanin mit einem aus Acetat (bzw. Malonat) aufgebauten Nonaketid zu **A** den ersten der zum Sekundärmetabolit Phomin führenden Schritte darstellt (vgl. Schema 2). Daraus entstünde ein carbocyclischer Grundtyp **B** der [13]Cytochalasane, dem dann die beiden zusätzlichen C₁-Einheiten (C(12)- und C(16)-Methyl) hinzugefügt würden. Die nächste Stufe wäre eine stark reduzierte Form **C** der [13]Cytochalasane, die zum Protophomin (**2**) führt, wobei die in 7-Stellung vorhandene Ketogruppe möglicherweise noch direkt aus dem Polyketid stammt. Reduktion dieser Ketogruppe führt dann zu Proxiphomin (**1**) und zwei nun folgende allylische Hydroxylierungen zu Desoxaphomin (**4**), aus dem dann schliesslich durch eine Sauerstoffinsertion das 24-Oxa-[14]cytochalasan Phomin (**5**) gebildet würde.

Einbauversuche mit geeigneten, markierten [13]Cytochalasanen, um die vorgeschlagene Sequenz zu beweisen, sind im Gange.

Ferner erwarten wir, dass in der nächsten Zeit aus den Kulturen des Mikroorganismus *Phoma* (Stamm S 298) weitere Cytochalasane isoliert werden, was unser Verständnis der Biogenese dieser Stoffklasse erweitern und vertiefen würde.

Schema 2. Die [13]Cytochalasane als Vorläufer von Phomin (5)



Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung* (Projekte Nr. 2.460.71 und 2.675.72) und der *Sandoz AG*, 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*-Gitterspektrometer, Modell 125, bzw. einem *Beckman*-D.K.2-Spektrophotometer im Spektrallaboratorium 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. Wulschleger* und *R. Wiesler*), die niederaufgelösten Massenspektren mit Geräten vom Typ *AEI* MS30 und *Hitachi-Perkin-Elmer* RMU-7 im Institut für Physikalische Chemie (*A. Raas*) vermessen. – Zur Säulenchromatographie diente «Kieselgel 0,05–0,2 mm» der Fa. *E. Merck AG*, Darmstadt. Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) verwendeten wir Fertigplatten (Kieselgel G), *E. Merck AG*, Darmstadt, für die präparative DC. dieselben Platten wie für DC. oder Platten mit «Kieselgel PF 254» derselben Firma. Zur Sichtbarmachung der Substanzen auf DC. dienten UV.-Licht bzw. J_2 -Dämpfe.

2. *Isolierung von Proxiphomin (16-Methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-6(7), 13^t, 21^t-trien-1, 23-dion) (1) und Protophomin (16-Methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-5(6), 13^t, 21^t-trien-1, 7, 23-trion) (2).* – Zur Züchtung des Mikroorganismus *Phoma* (Stamm S 298) und zur Isolierung der in der Kulturbrühe enthaltenen Metabolite Phomin (5) und Desoxaphomin (4) vgl. [2] [3] [8]. Der nach Abtrennung von Phomin und Desoxaphomin verbleibende harzige Rückstand (35 g) wurde an

1 kg Kieselgel chromatographiert. Die mit CH_2Cl_2 /Methanol 99:1 eluierten Frakt. Nr. 7-9 (je 1 l) enthielten 910 mg eines Gemisches zahlreicher unpolarer Komponenten, die Frakt. Nr. 10 und 11 (CH_2Cl_2 /Methanol 98:2) 1,224 g stark verunreinigtes 7-Hydroxy-16-methyl-10-phenyl-24-oxa-[14]cytochalasa-6(12), 13^t, 21^t (und 21^c)-trien-1, 20, 23-trion. Die folgenden, mit CH_2Cl_2 /Methanol 98:2 bis 90:10 eluierten Frakt. Nr. 12-40 enthielten u. a. grössere Mengen aus dem bei der Extraktion verwendeten Antischaummittel stammendes Polypropylenglykol und wurden bisher nicht näher untersucht. Die Frakt. Nr. 7, 8 und 9 wurden vereinigt und erneut an 100 g Kieselgel chromatographiert. Aus den Frakt. Nr. 17-26 (CH_2Cl_2 , je 100 ml) resultierten 180 mg Proxiphomin (**1**), das im DC. noch zwei Verunreinigungen zeigte (CH_2Cl_2 /Methanol 98:2). Die Frakt. Nr. 60-68 (CH_2Cl_2 /Methanol 98:2) enthielten nach DC. (CHCl_3 /Aceton/CHOOH 96:2:2; CH_2Cl_2 /Äthylacetat 85:15) neben Protophomin (**2**) noch zahlreiche Verunreinigungen.

60 mg **1** wurden zur weiteren Reinigung auf einer präp. DC.-Platte (20 × 20 × 0,1 cm) mit CH_2Cl_2 /Methanol 98:2 getrennt. Extraktion der Hauptzone mit CHCl_3 /Aceton 4:1 lieferte 55 mg DC.-einheitliches (CH_2Cl_2 /Methanol 98:2; CH_2Cl_2 /Äthylacetat 9:1) Proxiphomin (**1**) als amorphem farblosen Schaum. $[\alpha]_D^{24} = -140^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,156$, CHCl_3). UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 206 (4,364), 217 (4,090) und 243 (4,030) nm (log ϵ). IR.-Spektrum (CCl_4): u. a. Banden bei 3420 (N-H, Lactam); 3200 (Lactam, assoz.); 3080, 3060 und 3020 (Doppelbindungen, Aromat); 1700-1670 (C=O, Lactam, α, β -unges. Keton); 1610 ($-\text{CO}-\overset{|}{\text{C}}=\overset{|}{\text{C}}-$, Aromat); 1490 (Aromat) cm^{-1} . NMR.-Spektrum (100 MHz, CDCl_3): u. a. Signale bei 7,26 (*m*, 6H, Aromat, C(22)); 6,8 (8 Linien, 1H, C(21)), $J_{(AB)21,22} = 15$ Hz, $J_{21,20} = 9$ bzw. 5 Hz); 6,3 (8 Linien, 1H, C(13)), $J_{(AB)13,14} = 15$ Hz, $J_{13,8} = 10$ Hz, $J_{13,15} = 2$ Hz); 5,84 (*s*, 1H, N(2), tauscht mit D_2O aus); 5,44 (*s*, breit, 1H, C(7)); 5,24 (8 Linien, 1H, C(14)), $J_{14,15} = 10$ bzw. 4 Hz); 3,24 (*m*, 2H, C(3), C(4)); 2,85 und 2,52 (*A B*-System, je 1H, C(10)), $J_{AB} = -14$ Hz, $J_{10,3} = 8$ bzw. 4 Hz); 1,80 (*s*, 3H, C(12)); 1,22 (*d*, 3H, C(11)), $J_{4,11} = 7$ Hz) und 0,95 (*d*, 3H, C(16)-Methyl, $J = 7$ Hz) ppm. - MS.: vgl. Tabelle.

Die vereinigten **2** enthaltenden Frakt. Nr. 60-68 (59 mg) wurden auf DC.-Platten 20 × 20 × 0,02 cm mit Benzol/Methanol 95:5 getrennt, wobei 29 mg, nach DC. (CHCl_3 /Aceton/CHOOH 96:2:2; CH_2Cl_2 /Äthylacetat 85:15) immer noch unreines **2** erhalten wurde. Weitere Reinigungen auf DC.-Platten mit CHCl_3 /Aceton/CHOOH 96:2:2 (2mal) und CH_2Cl_2 /Methanol 98:2 (Extraktion der Zonen jeweils mit CHCl_3 /Aceton 3:1) lieferte schliesslich 19 mg nahezu DC.-einheitliches **2**, aus dem durch Kristallisation aus Aceton 15 mg reines Protophomin (**2**) resultierten. Smp. 252-256° (korr., Kofler-Block, Dunkelfeld). $[\alpha]_D^{24} = -112^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,042$, CHCl_3). - UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 207 (4,150) und 245 (4,121) nm (log ϵ). - IR.-Spektrum (KBr): u. a. Banden bei 3600-3200 (NH, assoz.); 1700, 1680 und 1660 (C=O, Lactam, α, β -unges. Ketone); 1610 ($-\text{CO}-\overset{|}{\text{C}}=\overset{|}{\text{C}}-$, Aromat) und 1490 (Aromat) cm^{-1} . - NMR.-Spektrum (90 MHz, CDCl_3): u. a. Signale bei 7,24 (*m*, 5H, Aromat); 7,07 (8 Linien, 1H, C(21)), $J_{21,22} = 15$ Hz, $J_{21,20} = 10$ bzw. 4 Hz); 6,73 (2 Linien, 1H, C(22)); 6,53 (*s*, 1H, N(2), tauscht mit D_2O aus); 6,24 (4 Linien, 1H, C(13)), $J_{13,14} = 16$ Hz, $J_{8,13} = 10$ Hz); 5,09 (8 Linien, 1H, C(14)), $J_{14,15} = 8$ bzw. 4 Hz); 3,71 (*s*, breit, 1H, C(4)); 3,5 (*t*, 1H, C(3)), $J_{3,10} \approx 9$ Hz); 3,13 (*d*, 1H, C(8)), $J_{8,13} = 10$ Hz); 2,7 und 2,53 (je 4 Linien, je 1H, C(10)), $J_{gem} = -14$ Hz); 1,7 und 1,53 (*s*, je 3H, C(11) und C(12)) und 0,84 (*d*, 3H, C(16)-Methyl, $J = 6$ Hz) ppm. - MS.: vgl. Tabelle.

3. 16-Methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-5(6), 13^t, 21^t-trien-1, 23-dion (**3**) aus **1**. Eine Lösung von 72 mg Proxiphomin (**1**) in 2 ml CH_3COOH wurde mit 0,75 ml 70proz. HClO_4 (in H_2O) versetzt und 24 Std. unter Lichtausschluss bei 23° stehengelassen. Das Gemisch wurde in 30 ml CHCl_3 aufgenommen und mit 40 ml 10proz. KHCO_3 -Lösung (in H_2O) extrahiert. Nach Waschen der CHCl_3 -Phase mit 30 ml H_2O und Trocknen über Na_2SO_4 resultierten 70 mg Rohprodukt, das im DC. (CH_2Cl_2 /Methanol 98:2; CH_2Cl_2 /Äthylacetat 9:1) neben wenig Edukt ein etwas langsamer laufendes Produkt zeigte. Diese Verbindung wurde auf 4 DC.-Platten 20 × 20 × 0,02 cm mit CHCl_3 /Aceton 96:4 von den Verunreinigungen getrennt. Extraktion der Hauptzone mit CHCl_3 /Aceton 4:1 lieferte 34 mg DC.-einheitliches **3**, das bisher nicht kristallisiert werden konnte. $[\alpha]_D^{24} = -86,7^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,16$, CHCl_3). - UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 205 (4,41), 218 (4,128) und 239 (4,04) nm (log ϵ). - IR.-Spektrum (CCl_4): u. a. Banden bei 3440, 3200 (NH, assoz.); 3100, 3080 und 3040 (Doppelbindungen, Aromat); 1710-1680 (C=O, Lactam, α, β -unges. Keton); 1620 ($-\text{CO}-\overset{|}{\text{C}}=\overset{|}{\text{C}}-$); 1610 und 1500 (Aromat) cm^{-1} . - NMR.-Spektrum (100 MHz, CDCl_3): u. a. Signale bei 7,26 (*m*, 5H, Aromat); 6,95 (*m*, 2H, C(21) und C(22)); 6,25 (4 Linien, 1H, C(13)), $J_{13,14} = 16$ Hz,

$J_{13,8} = 10$ Hz); 5,94 (s, 1H, N(2)); 5,18 (8 Linien, 1H, C(14), $J_{14,15} = 9$ bzw. 4 Hz); 3,4 (m, 2H, C(3) und C(4)); 2,61 (d, 2H, C(10), $J_{3,10} = 7$ Hz); 1,6 und 1,44 (s, je 3H, C(11), C(12)) und 0,95 (d, 3H, C(16)-Methyl, $J = 7$ Hz) ppm. – MS.: M^+ bei m/e 431 ($C_{28}H_{37}NO_2$), alle Zerfälle analog **1**, vgl. Tabelle.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *M. Binder, Ch. Tamm, W. B. Turner & H. Minato*, J. chem. Soc., Perkin Trans. I 1973, 1146.
 [2] *M. Binder & Ch. Tamm*, Helv. 56, 966 (1973).
 [3] *W. Rothweiler & Ch. Tamm*, Experientia 22, 750 (1966); Helv. 53, 696 (1970).
 [4] *D. C. Aldridge, J. J. Armstrong, R. N. Speake & W. B. Turner*, Chem. Commun. 1967, 26; J. chem. Soc. 1967 (C), 1667.
 [5] *D. C. Aldridge & W. B. Turner*, J. chem. Soc. (C) 1969, 923.
 [6] Vgl. *L. F. Fieser & M. Fieser*, «Steroids», S. 15 ff., Reinhold Publishing Corp., New York 1959; *A. I. Scott*, «Interpretation of Ultraviolet Spectra of Natural Products», S. 55. Pergamon Press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Paris, Frankfurt 1964.
 [7] *M. Binder & Ch. Tamm*, Angew. Chem. 85, 369 (1973); Internat. Edit. 12, 370 (1973).
 [8] *M. Binder, J. R. Kiechel & Ch. Tamm*, Helv. 53, 1797 (1970).

247. Über den Verlauf der Umsetzung von Steroid-3,5-dienaminen mit Formaldehyd

von **Fernand Schneider, Arthur Boller, Marcel Müller, Peter Müller**
und **Andor Fürst**

Chemische Forschungsabteilung der F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG, Basel

(22. VIII. 73)

Summary. Reaction of steroidal 3,5-dienamines (including 9 β ,10 α - and 19-nor-compounds) with formaldehyde gave 6-hydroxymethyl derivatives as major products. The latter compounds are valuable intermediates for the preparation of 6-methyl-3-keto- $\Delta^{4,6}$ -steroids.

Es ist bekannt, dass bei gewissen Steroiden eine Methyl-Gruppe am C(6) die biologische Wirksamkeit des entsprechenden Grundkörpers modifiziert. Beispielsweise bringt die Einführung von 6 α -Methyl in die Progesteron-Molekel eine Erhöhung der Aktivität [1].

Wir stellten uns die Frage, ob die Einführung der CH₃-Gruppe an C(6) auch in der 9 β ,10 α -(*retro*)-Reihe mit einer Veränderung der Wirksamkeit verbunden wäre. Deshalb haben wir eine Anzahl 6-Methyl-3-keto- $\Delta^{4,6}$ -9 β ,10 α -Verbindungen hergestellt, worüber hier berichtet werden soll¹⁾. Die für Steroide normaler (9 α ,10 β) Konfiguration beschriebenen Methoden (z. B. über 5,6-Epoxide direkt oder über 5-Hydroxy-6-ketone) erwiesen sich in der 9 β ,10 α -Reihe als ungünstig.

Eine Möglichkeit zur präparativ günstigeren Gewinnung der gewünschten Substanzen bot sich in der Umwandlung von 6-Hydroxymethyl-Derivaten, deren direkte Herstellung in der natürlichen Reihe erstmals durch *Beyler et al.* [2]²⁾ orientierend

¹⁾ Die biologischen Resultate werden später veröffentlicht.

²⁾ Für ergänzende, private Mitteilungen danken wir Prof. R. E. Beyler, Southern Illinois University, Carbondale, Illinois, USA.