

269. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

160. Mitteilung¹⁾

Conocandin, ein fungistatisches Antibiotikum aus *Hormococcus conorum* (SACC. et ROUM.) ROBACK

von Johannes M. Müller, Hermann Fuhrer, Johannes Gruner
und Walter Voser

Departement Forschung, Division Pharma und Physikalische Abteilung,
Funktion Forschung, Ciba-Geigy AG, Basel

(13. VIII. 76)

Metabolites from Microorganisms. 160th Communication. **Conocandin, a new Fungistatic Antibiotic.** – *Summary.* From a strain of *Hormococcus conorum* (SACC. ET ROUM.) ROBACK A 32'287, conocandin, a novel type C₁₈-fatty acid with high and specific in vitro fungistatic activity was isolated by means of counter current distribution and silicagel chromatography. The antibiotic is a viscous oil with the molecular formula C₁₈H₃₀O₃. It is characterized by IR. and NMR. spectra, ester derivatives and the products of acid rearrangement and ozonolytic degradation. The structure of (*E*)-2-methylidene-10-methyl-*trans*-3,4-epoxy-9-hexadecenoic acid (**1**) is proposed.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen an Antibiotikaproduzenten wurde das neue Antibiotikum Conocandin isoliert und seine Struktur aufgeklärt. Conocandin ist *in vitro* gut wirksam gegenüber Pilzen und Hefen, vor allem gegen *Candida albicans*, nur schwach wirksam gegenüber grampositiven und unwirksam gegenüber gramnegativen Bakterien. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) bei *Candida albicans* beträgt 0,1 γ /ml im Reihenverdünnungstest. Gegenüber Hühnerfibroblasten zeigt Conocandin eine mittlere Cytotoxizität. Im Test auf akute Toxizität an der Maus sind 300 mg/kg *subcutan* noch verträglich. Bei der systemischen *Candida*-Infektion an der Maus zeigt Conocandin jedoch *subcutan* wie auch *peroral* keine Wirkung. Der Produzent des Antibiotikums A-32'287, konnte als *Hormococcus conorum* (SACC. ET ROUM.) ROBACK (Fam. *Melanconiales*) [2] identifiziert werden²⁾.

Der Wirkstoff lässt sich durch aerobe Fermentation gewinnen und ist mit Essigester extrahierbar. Der Rohextrakt wird auf ein Adsorberharz (z.B. Amberlite XAD-7) aufgezogen, selektiv desorbiert, und die Eluat Spitze einer Gegenstromverteilung unterworfen. Anschliessende wiederholte Chromatographie der Spitzenfraktionen an Kieselgelsäulen und -dickschichtplatten führt zum reinen Antibiotikum.

Conocandin bildet ein nahezu farbloses, dickflüssiges Öl, das sich bei der Elektrolyse wie eine Säure verhält. Es besitzt die Summenformel C₁₈H₃₀O₃ und das

¹⁾ 159. Mitteilung s. [1].

²⁾ Die Bestimmung wurde dankenswerterweise von Herrn Prof. E. Müller, Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich, vorgenommen.

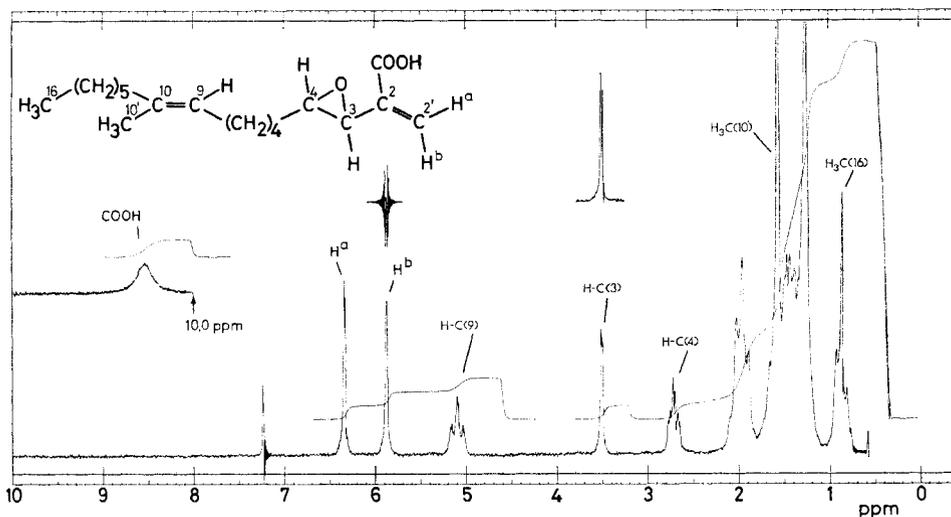
massenspektroskopisch ermittelte Mol.-Gew. 294. Die Grundelemente der Struktur von Conocandin **1** lassen sich grösstenteils aus den ^1H - und ^{13}C -NMR.-Spektren ableiten.

Das ^1H -NMR.-Spektrum (vgl. Figur) zeigt bei 6,36 ppm [H(a)] und 5,86 ppm [H(b)] die für eine Methyliden-Gruppe [C(2')] charakteristischen Signale. Durch Doppelresonanz kann gezeigt werden, dass H(a) und H(b) gekoppelt sind. Ferner koppelt H(b) mit H-C(3) (3,54 ppm) und dieses seinerseits mit H-C(4) (2,74 ppm). Aufgrund der chemischen Verschiebung von H(a) ist die Carboxylgruppe (10,8 ppm) vermutlich *cis*-ständig zu H(a). Wird bei 5,86 ppm eingestrahlt, so geht das Signal für H-C(3) in ein Dublett über. Die Kopplungskonstante $J = 2$ Hz ist charakteristisch für *trans*-ständige H-Atome einer Epoxidgruppierung. Für *cis*-ständige H-Atome ist J_{vic} in Epoxiden normalerweise *ca.* 4–5 Hz [3]. Die Multiplizität des Signals von H-C(4) weist darauf hin, dass anschliessend an den Epoxid-Ring eine Methylengruppe (C(5) der Alankette) folgt. Damit steht die Partialstruktur C(1) bis C(4) bzw. C(5) im Einklang mit dem ^1H -NMR.-Spektrum. Letzterem kann ferner entnommen werden, dass Conocandin eine weitere Doppelbindung enthalten muss (vinylische H-C(9) bei 5,1 ppm und vinylische Methylgruppe C(10') bei 1,6 ppm). Ihre genaue Lage innerhalb der Kohlenstoffkette wurde durch Ozonspaltung ermittelt (vgl. *Schema*, rechte Seite). Durch Einwirkung von Ozon bei -70° und anschliessende Behandlung mit Zinkstaub entstanden Formaldehyd (**6**) und Octan-2-on (**8**), wobei letzteres durch seinen charakteristischen Geruch auffiel und sich gas-chromatographisch mit authentischem Material identisch erwies. Beide wurden als 2,4-Dinitrophenylhydrazon gefasst und charakterisiert³⁾. Aufgrund der gesicherten Struktur von **8** muss die zweite Doppelbindung zwischen C(9) und C(10) liegen. Ihre Konfiguration lässt sich aus dem ^{13}C -NMR.-Spektrum ableiten.

In Tabelle 1 wird die Zuordnung der Signale für die 18 C-Atome vorgenommen. Die Signale im Bereich der sp^2 -Kohlenstoffatome und der Epoxid-Zuordnung bestätigen die Partialstruktur C(1) bis C(4) und die zweite Doppelbindung. Im Bereich der sp^3 -Kohlenstoffatome erscheinen die aus der Summenformel errechneten 9 Methylengruppen zwischen 40 und 22 ppm. Davon heben sich die beiden Methylgruppen C(10') und C(16) deutlich ab. Aufgrund des Verschiebungswertes von C(10') kann die Isomerie an der zweiten Doppelbindung eindeutig als *seq-trans* (*E*-Konfiguration) festgelegt werden. Nach der Inkrementenregel von Roberts *et al.* [4] lässt sich nämlich die chemische Verschiebung für die vinylische Methylgruppe berechnen. Der so ermittelte Betrag von 15,9 ppm für die zum H-C(9) *trans*-ständige Methylgruppe C(10') steht in guter Übereinstimmung mit der gemessenen chemischen Verschiebung von 15,91 ppm. Für eine *seq-cis* Anordnung (*Z*-Konfiguration) an dieser Doppelbindung wäre ein Wert von *ca.* 23,9 ppm zu erwarten.

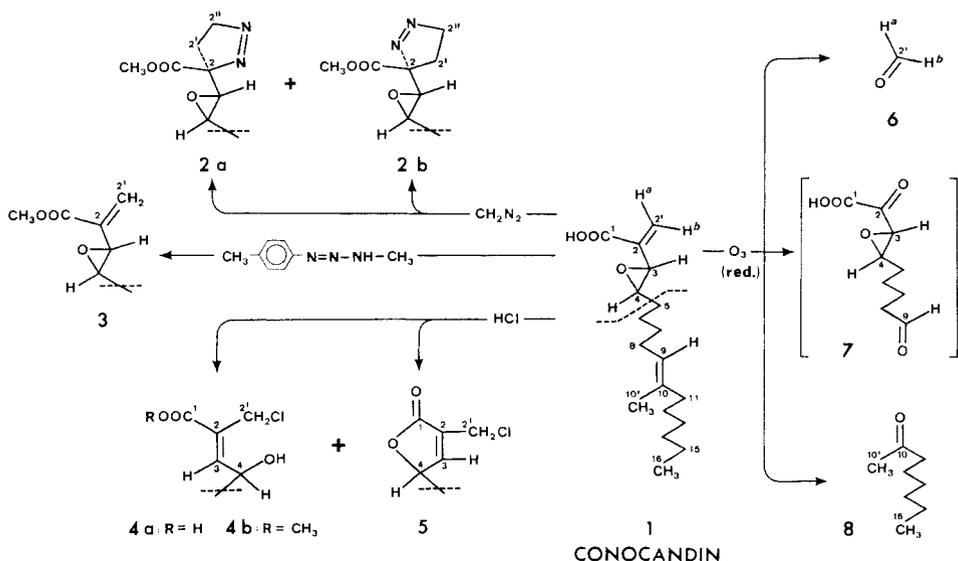
In der Absicht, die Struktur **1** chemisch zu bestätigen und gleichzeitig die für die biologische Aktivität verantwortliche Partialstruktur zu ermitteln, wurden die im *Schema* (linke Seite) gezeigten Reaktionen durchgeführt.

³⁾ Das Mittelstück mit der hypothetischen Formel **7** konnte nicht gefasst werden. Ein Versuch zur Isolierung als 2,4-Dinitrophenylhydrazon führte zu Derivaten eines veränderten Grundkörpers.

Figur. ¹H-NMR.-Spektrum von Conocandin (1)Tabelle 1. ¹³C-NMR.-Spektrum von Conocandin (1) (Lösung in CDCl₃; Varian XL-100, rausch-entkoppelt; chemische Verschiebung in ppm relativ zu Tetramethylsilan)

δ	Intensität	Multiplizität (off resonance)	Zuordnung
170,99	37	<i>s</i>	C(1) } Carboxyl
137,21	39	<i>s</i>	C(2) } vinylisch
135,62	36	<i>s</i>	C(10) }
126,64	72	<i>t</i>	C(2') }
124,04	120	<i>d</i>	C(9) }
62,96	130	<i>d</i>	C(3) } Epoxid
54,96	150	<i>d</i>	C(4) }
39,77	79	<i>t</i>	} —CH ₂ — C(5) bis C(8) und C(11) bis C(15)
32,01	146	<i>t</i>	
31,86	112	<i>t</i>	
29,62	139	<i>t</i>	
29,02	127	<i>t</i>	
28,03	101	<i>t</i>	
27,78	133	<i>t</i>	
25,40	120	<i>t</i>	
22,71	97	<i>t</i>	
15,91	78	<i>q</i>	} —CH ₃
14,12	73	<i>q</i>	

Schema. Reaktionen zur Strukturermittlung des Conocandins (1)



Die Einwirkung von überschüssigem Diazomethan führt zu den zwei diastereomeren Pyrazolinderivaten **2a** und **2b** im molaren Verhältnis von *ca.* 2:1. Das Gemisch bildet ein destillierbares Öl, worin sich die beiden Komponenten hinsichtlich ihrer Protonensignale für H-C(3) und H-C(4) eindeutig unterscheiden (s. Tabelle 2 im exper. Teil).

Soll die Methylidengruppe am C(2) erhalten bleiben, so sind alle Reagentien zu vermeiden, welche sich an dem hochreaktiven System C(2')-C(2)-C(3)-C(4) anlagern können. 1-Methyl-3-(*p*-tolyl)-triazen eignet sich zur selektiven Synthese des Conocandin-Methylesters **3**. Dieser ist biologisch schwach aktiv, im Gegensatz zu den völlig inaktiven Pyrazolinderivaten.

Durch Einwirkung von ätherischer Salzsäure entstehen unter Epoxidöffnung und Verschiebung der Doppelbindung die Produkte **4a** und **5** in Mengenverhältnis von *ca.* 1:1. Die Strukturermittlung des Chlorhydrins **4a** wird mit Hilfe seines Methylesters **4b** durchgeführt. Für das vinyliche H-C(3) tritt im NMR.-Spektrum beider Verbindungen bei 6,9 ppm ein Dublett mit $J = 8,5$ Hz auf. Diese starke Verschiebung nach tieferem Feld lässt sich nur mit einer *cis*-Anordnung zur Carboxylgruppe C(1) erklären. Das vicinale H-C(4) erscheint bei beiden Verbindungen als Multipllett bei 4,6 ppm. Nach Zugabe von Trichloracetylisocyanat zum Methylester wird die C(4)-ständige Hydroxyl-Gruppe in das Urethan übergeführt, wodurch das Signal für H-C(4) nach tieferem Feld verschoben wird (5,61 ppm) und gleichzeitig ein NH-Signal bei 8,45 ppm erscheint. Andererseits lässt diese Reaktion das Signal für die beiden H-C(2') praktisch unverändert, d.h. das Chloratom muss an C(2') stehen. Die Struktur des γ -Lactons **5** wird aus den IR- und ¹H-NMR.-Spektren abgeleitet (vgl. exper. Teil). Die Verbindungen **4a** und **5** sind mikrobiologisch inaktiv und liefern, zusammen

mit den Verbindungen **2a** und **2b**, den direkten Nachweis, dass die neuartige Partialstruktur C(1) bis C(4) Voraussetzung für die biologische Aktivität ist.

Alle analytischen Daten und Reaktionsprodukte sind vereinbar mit der für Conocandin vorgeschlagenen Formel **1** (*(E)-2-Methyliden-10-methyl-trans-3,4-epoxy-9-hexadecensäure*).

Wir danken den Herren Dres. *H. Bickel* und *J. Nüesch* für das Interesse, das sie dieser Untersuchung entgegengebracht haben.

Experimenteller Teil⁴⁾

Allgemeines. – Sofern nicht anders vermerkt, gelten folgende Angaben: *Chromatographie:* Präparativ an Säulen: Kieselgel *Merck* 60 (0,063–0,20 mm) wird vor dem Gebrauch mit konz. Salzsäure, anschliessend mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen und während 30 Std. bei 120 bis 130° i.V. getrocknet. Präparativ an Platten: Kieselgel PF 254 *Merck*, Schichtdicke 1 mm (getrocknet), Grösse 20×100 cm. Dünnschicht, analytisch: Fertigplatten ANTEC SL 254 Typ 60 (Kieselgel PF 254 *Merck*) 20×20 cm, Anfärbung im Joddampf. *Analysensubstanzen:* Trocknung: 18 Std. bei 20°/10⁻² Torr. *IR.-Spektren:* Gerät: *Perkin Elmer* 221. Aufnahmen: als Film oder in Methylenchlorid gelöst. Angabe der wichtigsten Banden in cm⁻¹. *NMR.-Spektren:* 100 MHz (Geräte: *Varian* XL-100, HA-100, HA-100-D), Substanzen gelöst in CDCl₃; chemische Verschiebung (δ) in ppm relativ zu Tetramethylsilan (intern.), *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *m* = Multiplett, *br.* = breit, Kopplungskonstante *J* in Hz. Die den Verbindungen **1–5** gemeinsamen neun Methylengruppen C(5) bis C(8) und C(11) bis C(15) werden nicht aufgeführt (δ zwischen 1,2 und 2,1 ppm). *Massenspektren:* Gerät: *Varian* MAT CH7, Direkteinlass, Elektronenenergie 70 eV. Angegeben sind Massenzahl und Zuordnung des Molekel-Ions und der wichtigen Fragment-Ionen oberhalb der Massenzahl 200.

1. Fermentation. – Der Produktionsstamm wird in lyophilisierter Form oder auf einem Agar folgender Zusammensetzung aufbewahrt: Pepton 0,1%, Malzextrakt 2%, Glucose 2%, Agar 2%, pH nach Sterilisation 6,5. Eine Lyophilat-Ampulle bzw. die Myzel-Sporensuspension eines Schräg-Agar-Röhrchens dient als Inoculum für einen, mit einer Eindellung versehenen 500-ml-Erlenmeyerkolben, der 100 ml Nährlösung von folgender Zusammensetzung enthält: Sojamehl 2%, Mannit 2%, pH nach Sterilisation 7,0. Dieser Vorkulturkolben wird während 72 Std. bei 25° und 250 Upm auf einer Rundschtüttelmaschine inkubiert. Für die zweite Vor-, wie auch für die Hauptkultur wird die gleiche Nährlösung verwendet. Als zweite Vorkultur werden in einem 2-l-Erlenmeyerkolben mit vier Eindellungen 500 ml Nährlösung mit 5% der 72stdg. Myzelsuspension der ersten Vorkultur beimpft. Die Inkubation erfolgt bei 25° und 120 Upm während 48 Std. Diese Kultur dient als Inoculum (5%) für 30 l Nährlösung in einem 50-l-Fermenter aus rostfreiem Stahl. Nach 48 Std. Inkubation bei 23°, 725 Upm, 1 atü und 1:1 V/VN Luftdurchfluss wird die Hauptkultur, 400 l Nährlösung in einem 500-l-Fermenter aus rostfreiem Stahl, mit 5% der 48stdg. Kultur aus dem 50-l-Fermenter beimpft. Die Inkubation geschieht bei 23°, 450 Upm, 1 atü und 1:1 V/VN Luftdurchfluss. Die Produktion von Conocandin wird mit der bekannten Agardiffusionstestmethode verfolgt. Der Testkeim ist *Candida albicans*. Der Zeitpunkt maximaler Aktivität wird nach *ca.* 190 Std. bei einem pH-Wert von *ca.* 5,5 erreicht.

2. Extraktion und Anreicherung des Wirkstoffes. – 320 l Kulturlösung von pH 4,9 werden mit 400 l Essigester verrührt und dann mittels Schlammseparator LAVAL BRPX-207 getrennt. Die wässrige Phase (420 l) wird mit Natronlauge auf pH 7,0 gestellt, nochmals mit 400 l Essigester extrahiert und wie oben abgetrennt. Die beiden Essigesterphasen enthalten die gesamte Aktivität. Sie werden vereinigt und i.V. zu einem violetten Öl (2,7 kg) eingecngt. Dieses

4) Unter Mitarbeit der Herren *A. Borer*, *H. Leubin*, *P. Rheinberger*, *J. Scheidegger* und *K. Weiss*, welchen auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

wird in 15 l Methanol eingetragen, worauf sich zwei flüssige Phasen bilden. Die untere ist nur schwach aktiv und wird verworfen. Die überstehende Methanolphase wird i.V. zur Trockne eingedampft, wobei ein violettes, dickflüssiges Öl (1,17 kg) anfällt (*Konzentrat A*), das sich fast vollständig in 5 l Heptan löst. Die Lösung wird über Hyflo Supercel klar filtriert und dann in 7 Portionen zu 710 ml an in Methanol gequollenem und auf Heptan umklimatisiertem Amberlite XAD-7 (4 l) gereinigt. Dabei wird die Adsorberharz-Säule (Durchmesser 10 cm, Füllhöhe 50 cm) jeweils mit 20 l Heptan, 20 l Heptan/2-Propanol 9:1 und 15 l Methanol nachgewaschen. Vor Auftrennung der nachfolgenden Charge werden jeweils 20 l Heptan durchperkoliert. Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt 6l/Std. Die Eluate werden in Fraktionen zu 5 l aufgefangen. Die Fraktionen 1 bis 4 und 7 bis 11 enthalten wenig Aktivität und werden verworfen. Sämtliche vereinigten Fraktionen 5 und 6 ergeben nach Entfernung des Lösungsmittels 158 g *Konzentrat B*. Das Öl unterwirft man in Portionen zu 79 g einer Gegenstromverteilung nach *Craig* (Phasenvolumen je 100 ml) über 200 Stufen in einem Lösungsmittelsystem, das aus gleichen Volumenteilen Heptan und 95% Methanol besteht. Die Aktivitätsspitzen (Fraktionen 51–80) werden i.V. vom Lösungsmittel befreit und ergeben 9,23 g aktives, gelbbraunes Öl = *Konzentrat C*.

3. Reinisolierung und Eigenschaften von Conocandin (1). – Das *Konzentrat C* lässt sich durch Dünnschichtchromatographie mit dem System Chloroform/Methanol 7:3 (15 cm Laufstrecke) in seine Komponenten zerlegen, die mit Jod angefärbt werden. Neben Conocandin (R_f 0,46) enthält es noch weitere Jod-positive Substanzen. Bei der am schwierigsten abtrennbaren Komponente (R_f 0,54) dürfte es sich um Linolsäure handeln⁵⁾. Die präparative Gewinnung von Conocandin wird mit einer Säulenchromatographie eingeleitet. 1,0 g *Konzentrat C* bringt man auf eine Säule von 100 g Kieselgel (Durchmesser 2,7 cm, Füllhöhe 35 cm) und entwickelt zuerst mit 550 ml Hexan/Aceton 95:5 und dann mit 200 ml Hexan/Aceton 9:1. Nach einer praktisch leeren Vorfraktion von ca. 370 ml wird im restlichen 95:5-Eluat und in den ersten 100 ml 9:1-Eluat der Wirkstoff, hauptsächlich noch verunreinigt durch Linolsäure, eluiert (0,4 g). Diese Fraktion wird durch wiederholte Chromatographie an Kieselgel-Dickschichtplatten in die Reinsubstanz übergeführt. In der letzten Phase der Anreicherung leistet die massenspektroskopische Reinheitskontrolle wertvolle Dienste. Man trägt 60–80 mg Substanz pro Platte (1 m) auf und entwickelt 2mal (11 und 15 cm) in Chloroform/Methanol 7:3. Im Unterschied zu den Verunreinigungen absorbiert der Wirkstoff im UV.-Licht (254 nm) nicht; er wird aber mit Jod stark angefärbt. Das substanzhaltige Trägermaterial wird mit Chloroform/Methanol 1:1 extrahiert. Der Extrakt wird mit Aktivkohle (Norit) verrührt und durch Hyflo Supercel oder Kieselgel filtriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhält man Conocandin als leicht gelbliches dickflüssiges Öl (0,13 g), welches in kleiner Menge im Sublimator bei 60°/0,03 Torr nahezu unzersetzt destilliert. Dünnschichtchromatographie: R_f -Werte für 15 cm Laufstrecke: 0,2 in Hexan/Aceton 1:1 und 0,46 in Chloroform/Methanol 7:3. Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -7 \pm 1^\circ$ ($c = 0,557\%$ in 96% Äthanol). – MS.: 294 (M , <1), 277 ($M - OH$, 3), 276 ($M - H_2O$, 3), 259 ($M - H_2O - OH$, 2), 231 ($M - H_2O - COOH$, 3). – UV.: keine spezifische Absorption. – IR. (Film): 2940 und 2865 (C–H(ν)), 2700–2560 (COOH), 1705 ((COOH), dimer), 1630 (C=C), 1460–1380 (C–H(δ)), 1285 (OC–O(ν)), 1175, 960 und 820 (Epoxid, *trans*). – NMR.: 10,8 (s, br., COOH); 6,36 (*d*, $J_{a,b} = 1$, 1H, H(a)); 5,86 (*m*, 1H, H(b)); 5,1 (*m*, br., $J_{8,9} = 7$, H–C(9)); 3,54 (*m*, $J_{b,3} = 1$, $J_{3,4} = 2$, H–C(3)); 2,74 (*m*, $J_{4,5} = 5$, H–C(4)); 1,6 (s, br., 3H, 3H–C(10')); 2,1–1,2 (*m*, 9 CH₂); 0,88 (*t*, 3H 3H–C(16)).

C₁₈H₃₀O₃ (294,42) Ber. C 73,43 H 10,27 O 16,30% Gef. C 73,05 H 10,09 O 16,64%

Mikrohydrierung (Pt in Äthanol, 22°): 7,103 mg Conocandin nehmen 1,66 ml H₂ (reduziertes Volumen) auf, entsprechend 3,07 mol. Für die Gas-Chromatographie ist die Säure als solche ungeeignet. Nach der Behandlung mit überschüssigem Diazomethan erhält man den charakteristischen Doppel-Pik des Diastereomerenmischens von **2a** und **2b** (siehe dort), welcher einen Nachweis auch in Rohkonzentraten erlaubt. Säurestärke: Conocandin ist eine schwache, lipophile Säure, welche nicht in wässriger Lösung und nicht in Methylcellosolve/Wasser [5] titriert werden kann. Um dennoch einen Vergleich mit andern Fettsäuren anstellen zu können, titrierten wir

5) Im Gas-Chromatogramm hat der Methyl ester die gleiche Retentionszeit wie Linolsäuremethyl ester; vgl. Angaben bei **2a/2b**.

eine ca. 1proz. Lösung in Äthanol mit wässriger 0,1N Natronlauge. Die so bestimmten pK -Werte der scheinbaren Dissoziationskonstanten sind für Conocandin = 6,8, Linolensäure (*Fluka puriss.*) = 7,4, Linolensäure (*Fluka purum*) = 7,2, Essigsäure = 6,7.

4. Chemische Reaktionen des Conocandins. – *Umsetzung mit Diazomethan zu 2a und 2b.* 70 mg Conocandin werden während 1 Std. in überschüssiger ätherischer Diazomethanlösung bei RT. reagieren gelassen. Dann wird das Lösungsmittel i.V. entfernt und der ölige Rückstand an einer Säule von 15 g Kieselgel nach dem bei der Isolierung des Conocandins beschriebenen Schema chromatographiert. Mit Hexan/Aceton 95:5 werden kleine Mengen von Verunreinigungen, mit dem (9:1)-Gemisch wird das Methylierungsprodukt eluiert (55 mg). Es kann bei 60°/0,03 Torr i. HV.-Sublimator unzersetzt destilliert werden und bildet ein farbloses, dickflüssiges Öl. Dünnschichtchromatogramm: R_f 0,63 in Hexan/Aceton 1:1 (15 cm). Gas-Chromatogramm⁶⁾: Retentionszeiten für Gemisch **2a** + **2b**: Doppel-Pik 27,4' + 29,8'; vergleichsweise für Linolensäuremethylester: 15,2' und für Linolensäuremethylester: 16,2'. – MS.: 350 ($M, 1$), 304 ($M-H_2O-N_2 < 1$), 291 ($M-COOCH_3$), 273 ($M-COOCH_3-H_2O, 5$) – IR. (Film): 2940 und 2865 (C–H (ν)), 1745 ($COOCH_3$), 1560 (N=N), 1460–1380 (C–H (δ)), 1260 (OC–O (ν)).

$C_{20}H_{34}N_2O_3$	Ber. C 68,53	H 9,78	N 7,99	O 13,70%
(350,49)	Gef. „ 68,50	„ 9,81	„ 8,12	„ 13,77%

Tabelle 2. NMR.-Spektrum von **2a** und **2b**

δ (ppm)	Struktur des Signals	Anzahl Protonen	Zuordnung	Art
5,1	<i>m</i>	1	an C(9)	Vinyl-Proton
4,63	<i>t</i> ($J_{2',2''} = 8$)	} 2	an C(2'')	(2b)
4,62	<i>t</i> ($J_{2',2''} = 8$)		an C(2')	
3,81	<i>s</i>	} 3	$COOCH_3$	(2b)
3,80	<i>s</i>		$COOCH_3$	
3,68	<i>d</i> ($J_{3,4} = 2$)	} 1	an C(3)	H } Proton
3,38	<i>d</i> ($J_{3,4} = 2$)		an C(3)	
3,22	<i>m</i> ($J_{4,5} = 5$)	} 1	an C(4)	H } Epoxid-
2,70	<i>m</i> ($J_{4,5} = 5$)		an C(4)	
1,58	<i>s, br.</i>	3	an C(10')	
0,88	<i>t</i>	3	an C(16)	

Methylierung mit 1-Methyl-3-(p-tolyl)-triazen zu 3. 23,9 mg Conocandin werden in 1 ml Äther gelöst und mit 0,45 ml einer 2M Lösung von 1-Methyl-3-(*p*-tolyl)-triazen⁷⁾ versetzt. Nach 1 Std. wurden weitere 0,45 ml Reagens zugegeben und 24 Std. bei 20° stehen gelassen. Dann wird das Gemisch in 15 ml Äther aufgenommen und im Scheidetrichter 3mal mit 10 ml 20proz. Essigsäure durchgeschüttelt. Die wässrigen Phasen werden 2mal mit je 15 ml Äther geschüttelt und alle

⁶⁾ Gerät: Gas-Chromatograph *Varian-Aerograph 1520* mit Flammenionisationsdetektor. Kolonne: Glas 1000×1,5 mm, gefüllt mit Gas-Chrom Q 100–120 mesh, beladen mit 20% Diäthylenglycoladipat (DEGA); Temperaturen: Kolonne 150–230°, 4°/Min., Detektor 200°, Injektor 150°; Trägergas: N_2 , 24 ml/Min.

⁷⁾ Hersteller: *Willow Brook Labs. Inc.*, Waukesha, Wisc. USA., vgl.: *Organic Syntheses Coll. Vol. V*, 797.

Ätherphasen 3mal mit 10 ml Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das dunkelgelbe Harz wird in Hexan/Aceton 95:5 gelöst, durch eine Schicht von 5 g Kieselgel filtriert und mit 20 ml Hexan/Aceton 95:5 nachgewaschen. Das Eluat ergibt nach dem Eindampfen i. V. 12,5 mg farbloses Öl, welches an der Luft bald gelb wird. Dünnschichtchromatogramm: Rf 0,8 in Chloroform/Methanol 7:3 (15 cm). - MS.: 308 (*M*). - IR. (Film): 2950 und 2875 (C-H (*v*)), 1740 (COOCH₃), 1635 (C=C), 1460-1380 (C-H (*δ*)), 1280 (OC-O (*v*)), 1150, 950 und 840 (Epoxid, *trans*). - NMR.: 6,18 (*d*, *J*_{a,b} = 1, 1H, H-C(2')); 5,73 (*m*, 1H, H(b)-C(2')); 5,1 (*m*, br., *J*_{8,9} = 7, 1H, H-C(9)); 3,78 (*s*, COOCH₃); 3,48 (*m*, *J*_{b,3} = 1, *J*_{3,4} = 2, 1H, H-C(3)); 2,70 (*m*, *J*_{4,5} = 5, 1H, H-C(4)); 1,6 (*s*, 3H, 3H-C(10')) und 0,9 (*t*, 3H, 3H-C(16)).

C₁₉H₃₂O₃ (308,45) Ber. C 73,98 H 10,46 O 15,56% Gef. C 73,80 H 10,57 O 15,76%

Reaktion mit ätherischer Salzsäure zu 4a und 5. 180 mg Conocandin werden in 30 ml abs. Äther gelöst, mit 9,25 ml 1N ätherischer Salzsäure versetzt und 48 Std. im Dunkeln bei RT. stehengelassen. Dann wird die Lösung durch eine dünne Schicht von Hyflo-Supercel klarfiltriert, mit Äther auf 100 ml Volumen verdünnt und 3mal mit je 20 ml Wasser ausgeschüttelt. Die Wasserphasen werden mit 40 ml Äther rückgewaschen. Die Ätherphasen werden mit Natriumsulfat getrocknet. Der Eindampfrückstand (188 mg) wird in wenig Hexan/Aceton 9:1 gelöst und an einer Säule von 64 g Kieselgel (Durchmesser 2,7 cm) chromatographiert. Aus dem (9:1)-Eluat (250 ml) lassen sich 53 mg Chlor-*γ*-lacton **5** als farbloses Öl isolieren. Aus den nachfolgenden Eluaten mit Hexan/Aceton 4:1 und 1:1 werden 55 mg Chlorhydrin **4a** als farbloses Öl gewonnen. Rf in Chloroform/Methanol 7:3 (15 cm): 0,4 für **4a** und 0,78 für **5**.

Chlorhydrin 4a aus Conocandin.

C₁₈H₃₁ClO₃ Ber. C 65,34 H 9,44 Cl 10,71 O 14,51%
(330,90) Gef. ,, 65,41 ,, 9,26 ,, 10,54 ,, 14,70%

IR. (Film): 3335 (OH, dimer), 2655 (COOH), 1705 (COOH, dimer), 1655 (C=C). - NMR.: 6,98 (*d*, *J*_{3,4} = 8,5, 1H, H-C(3)); 5,45 (*m*, br., 2H, COOH und OH); 5,1 (*m*, br., *J*_{8,9} = 7, 1H, H-C(9)); 4,60 (*m*, *J*_{4,5} = 7, 1H, H-C(4)); 4,38 [*s*, br., 2H, 2H-C(2')]; 1,57 (*s*, br., 3H, 3H-C(10')); 0,88 (*t*, 3H, 3H-C(16)).

Methylester des Chlorhydrins 4b. 50 mg Chlorhydrin werden in 2,7 ml Äther gelöst und mit 3,2 ml einer 0,2 M Lösung von 1-Methyl-3-(*p*-tolyl)-triazon versetzt. Nach 48 Std. (20°) ist die Reaktion beendet. Das Reaktionsgemisch wird in der bei Conocandin-methylester **3** beschriebenen Weise aufgearbeitet und ergibt 55 mg Rohextrakt. Dieser wird an einer Säule von 11 g Kieselgel (Durchmesser 1,5 cm) mit Gemischen aus Hexan und steigenden Mengen von Aceton chromatographiert. Mit Hexan/Aceton 8:2 wird der Methylester **4b** eluiert (23,5 mg). - NMR.: 6,86 (*d*, *J*_{3,4} = 8,5, 1H, H-C(3)); 5,1 (*m*, br., *J*_{8,9} = 7, 1H, H-C(9)); 4,57 (*m*, *J*_{4,5} = 7, 1H, H-C(4)); 4,38 (*s*, br., 2H, 2H-C(2')); 3,81 (*s*, 3H (?), COOCH₃); 1,57 (*s*, br., 3H, 3H-C(10')); 0,88 (*t*, 3H, 3H-C(16)).

NMR.-Spektrum des Methylesters nach Zugabe von Trichloracetylisocyanat: 7,40 (*m*, *J*_{2',3} = 1, *J*_{3,4} = 1, 1H, H-C(3)); 5,1 (*m*, br., *J*_{8,9} = 7, 1H, H-C(9)); 5,0 (*m*, *J*_{2',4} = 1, 1H, H-C(4)); 4,23 (*t*, 2H, 2H-C(2')); 1,57 (*s*, br., 3H, 3H-C(10')); 0,88 (*t*, 3H, 3H-C(16)).

*Chloro-*γ*-lacton 5 aus Conocandin.*

C₁₈H₂₉ClO₂+1/2H₂O Ber. C 67,17 H 9,39 O 12,43 Cl 11,01%
(321,89) Gef. ,, 67,23 ,, 9,24 ,, 12,14 ,, 11,09%

IR. (Film): Breite Bande 3570-3225 (Wasser), 1765 (*γ*-Lacton), 1655 (C=C). Die Lage der *γ*-Lactonbande hängt von den Aufnahmebedingungen ab; in Methylenchlorid gelöst liegt sie bei 1760, in 2-Propanol bei 1752 cm⁻¹. - NMR.: 8,45 (*s*, NH des Urethans); 6,87 (*d*, *J*_{3,4} = 9, 1H, H-C(3)); 5,61 (*m*, *J*_{4,5} = 7, 1H, H-C(4)); 5,1 (*m*, br., *J*_{8,9} = 7, 1H, H-C(9)); 4,48 (*s*, br., 2H, 2H-C(2')); 3,82 (*s*, COOCH₃); 1,57 (*s*, br., 3H, 3H-C(10')); 0,88 (*t*, 3H, 3H-C(16)).

5. Reduktive Ozonolyse von Conocandin. - Man löst 54 mg Conocandin (0,18 mmol) in 10 ml Hexan und lässt während 2 1/2 Min. unter intensivem Rühren in einem Ozonstrom (ca. 0,3

mmol O₃ pro Minute)⁸⁾ bei –70° reagieren. Dann wird die Lösung während 10 Min. mit 0,5 g Zinkstaub und 3 ml Wasser weiter gerührt. Der Zinkstaub wird abgenutscht (Fritte G4) und mit 5 ml Hexan und 5 ml Wasser nachgewaschen. Nach der Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Chloroform nachextrahiert. Als Eindampfrückstand der vereinigten organischen Phasen erhält man 17 mg eines farblosen Öls von charakteristischem Geruch. Durch vergleichende Gaschromatographie⁹⁾ mit authentischem Material (Retentionszeit 37,9 Min.) wird es als Octan-2-on (8) identifiziert.

In einem zweiten analogen Ansatz versetzt man die vereinigten organischen Phasen (vor dem Abdampfen des Lösungsmittels) direkt mit 2 ml Äthanol und fällt das 2,4-Dinitrophenylhydrazon mit «Brady's Reagens» [6] im Überschuss. Das Rohpräzipitat (71 mg) wird an einer Säule von 10 g Kieselgel (Durchmesser 1,5 cm) mit Benzol/Essigester 9:1 chromatographiert und die Pik-Fraktion (20,5 mg) aus heissem Alkohol umkristallisiert; 16 mg Kristalle, identisch mit synthetischem Octan-2-on-2,4-dinitrophenylhydrazon (IR., Mischschmelzpunkt). – DS.: Rf = 0,62 in Benzol/Essigester 83:17 (15 cm). – MS.: 308 (M).

Die oben beschriebene wässrige Phase wird mit «Brady's Reagens» [6] im Überschuss gefällt und das Präzipitat sorgfältig mit Wasser gewaschen. Der Trockenrückstand (35 mg) wird in 0,3 ml Essigester gelöst, mit 2,7 ml Benzol verdünnt und an einer Säule von 10 g Kieselgel (Durchmesser 1,5 cm) chromatographiert. Mit Benzol/Essigester 9:1 wird das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Formaldehyds (6) eluiert; 4 mg Kristalle, identisch mit synthetischem Material. – DS.: Rf = 0,47 in Benzol/Essigester 83:17 (15 cm). – MS.: 210 (M).

Für Aufnahme und Diskussion von Spektren danken wir den Herren Dres. *J. Bersier*, *H. Hüzzeler* und *G. Rist*. Herrn Dr. *W. Padowetz* danken wir für die Mikroanalysen, Herrn *E. von Arx* für Gas-Chromatogramme und präparative Dickschichtchromatogramme und den Herren Dres. *J. Regös* und *O. Zak* für die biologischen Prüfungen.

LITERATURVERZEICHNIS:

- [1] *W. Keller-Schierlein & J. Widmer*, *Helv.* 59, 2021 (1976).
- [2] *H. Roback*, *Friesia* 5, 379 (1956).
- [3] *L. M. Jackman & S. Sternhell*, *Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*, Pergamon Press, 2nd Edition, 1969, S. 272.
- [4] *D. E. Dorman, M. Jautelat & J. D. Roberts*, *J. org. Chemistry* 36, 2757 (1971).
- [5] Vergl. *W. Simon*, *Helv.* 41, 1835 (1958).
- [6] *O. L. Brady*, *J. chem. Soc. (London)* 1931, 756.

⁸⁾ Gerät: Ozon-Generator OZ II, *Fischer*, Bonn-Bad Godesberg.

⁹⁾ Gerät: *Varian-Aerograph* 1700 mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor, Kolonne: Glas 1800 × 1,5 mm, Porapak Q, Temperatur: Kolonne 100–250° C 4°/Min., Detektor 200°, Injektor 140°, Trägergas: 24 ml/Min. He.