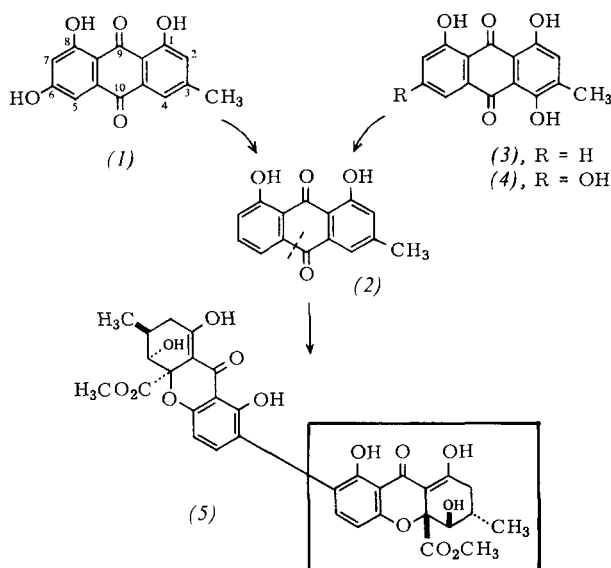


Entwicklung biomimetischer Synthesen. Durch Konkurrenz-Inkorporation^[1] konnten wir bei der Biosynthese der Mycotoxine vom Ergochrom-Typ^[2], z. B. von Secalonsäure D (5), alternative Zwischenstufen nachweisen und einer aufschlußreichen Sequenz zuordnen.

Ergochrome entstehen durch oxidative Ringöffnung^[2,3] des Anthrachinons Emodin (1), eines Schlüsselbausteins der Naturstoff-Biosynthese^[4]. Hierbei muß eine Hydroxygruppe von C-6 eliminiert und eine zusätzliche an C-4 eingeführt werden. Neben Emodin (1) kamen daher die natürlichen



Anthrachinone Chrysophanol (2), Islandicin (3) und Catenarin (4), deren Hydroxygruppenanordnung ganz oder teilweise derjenigen einer Molekülhälfte von (5) (eingerahmt) ähnelt, als Zwischenstufen in Betracht.

Für die Konkurrenz-Inkorporationen wurden Paare aus biosynthetisch gewonnenem, uniform markiertem [U-³H]Emodin (1) und einem der [U-¹⁴C]Anthrachinone (1) bis (4)^[5] an den Schimmelpilz *Penicillium oxalicum*^[6] verfüttert. Nach Isolierung und Reinigung von (5) bis zur konstanten Radioaktivität wurde das ³H/¹⁴C-Verhältnis im Szintillationszähler bestimmt (Tabelle 1).

Tabelle 1. Konkurrenz-Inkorporation der radioaktiven Anthrachinone (1) bis (4) in Secalonsäure D (5) durch *Penicillium oxalicum* [a].

Ver-such	Anthrachinon	Spez. Einbau [b] [%]	a/b
1	a) [U- ¹⁴ C]Emodin (1)	0.432	1.03
	b) [U- ³ H]Emodin (1)	0.418	
2	a) [U- ¹⁴ C]Chrysophanol (2)	3.42	3.56
	b) [U- ³ H]Emodin (1)	0.96	
3	a) [U- ¹⁴ C]Islandicin (3)	0.163	0.301
	b) [U- ³ H]Emodin (1)	0.541	
4	a) [U- ¹⁴ C]Catenarin (4)	0.008	0.022
	b) [U- ³ H]Emodin (1)	0.37	

[a] ATCC 10476. [b] Spezifische Radioaktivität der isolierten Secalonsäure D (5) dividiert durch die des verfütterten Anthrachinons sowie durch die Anzahl der Anthrachinon-Moleküle, die in (5) eingebaut werden können $\times 100$.

Wie Versuch 1 zeigt, verliert [U-³H]Emodin (1) bei der Umwandlung in (5) durch den Schimmelpilz nicht mehr als 3% seiner überwiegend in der Methylgruppe befindlichen Tritium-Radioaktivität. Es ist daher als Bezugsverbindung für Konkurrenz-Inkorporationen gut geeignet. Aus den auf

Emodin (1) bezogenen Einbauwerten (Verhältnis a/b) der weiteren Versuche geht signifikant und unbeeinträchtigt von Schwankungen der Enzymaktivität verschiedener Versuchsansätze hervor, daß Chrysophanol (2) (Versuch 2) 3.6mal besser als (1) und 11.8mal besser als (3) (Versuch 3) in (5) inkorporiert wird. Dagegen ist (4) (Versuch 4) als Biosynthese-Vorstufe auszuschließen^[7].

Diese Befunde ermöglichen die Schlußfolgerung, daß Emodin (1) und Islandicin (3) über Chrysophanol (2) in die Ergochrome, z. B. (5), umgewandelt werden. Die Hydroxygruppe an C-4 wird somit nach der oxidativen Ringöffnung eingeführt, die der Dimerisierung vorausgeht^[3,8]. Die bevorzugte Eignung von (2) für präparativ nützliche, biomimetische Ringöffnungsreaktionen ist bereits bekannt^[9].

Eingegangen am 20. März 1980 [Z 466a]

CAS-Registry-Nummern:

(1): 518-82-1 / (2): 481-74-3 / (3): 476-56-2 / (4): 476-46-0 / (5): 35287-69-5.

- [1] B. Franck, G. Fels, G. Ufer, Angew. Chem. 89, 677 (1977); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 16, 652 (1977).
- [2] B. Franck, H. Flasch, Fortschr. Chem. Org. Naturst. 30, 151 (1973).
- [3] B. Franck in P. S. Steyn: The Biosynthesis of Mycotoxins. Academic Press, New York, im Druck.
- [4] B. Franck, Angew. Chem. 91, 453 (1979); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 18, 429 (1979).
- [5] [U-¹⁴C]Islandicin (3) und [U-¹⁴C]Catenarin (4) ließen sich mit *Penicillium islandicum* (ATCC 10127) bzw. *Helminthosporium catenarium* (CBS 191.29) aus [2-¹⁴C]Acetat direkt gewinnen. [U-³H]- und [U-¹⁴C]Emodin (1) sowie [U-¹⁴C]Chrysophanol (2) wurden aus [2-³H]Acetat bzw. [2-¹⁴C]Acetat mit *Penicillium islandicum* (CBS 338.48) und *Talaromyces wortmannii* (ATCC 10517) durch reduktive und alkalische Spaltung der zunächst gebildeten Bis-anthrachinonyl Skyrin und Rugulosin erhalten (ATCC: American Type Culture Collection; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland).
- [6] P. S. Steyn, Tetrahedron 26, 51 (1970).
- [7] Da bisher keines der Anthrachinone (1) bis (4) in Kulturen Ergochrom-bildender Schimmelpilze gefunden wurde, dürften deren Einbauwerte nicht wesentlich durch unterschiedliche Poolgrößen bestimmt sein.
- [8] I. Kurobane, L. C. Vining, Tetrahedron Lett. 1978, 1379.
- [9] B. Franck, B. Berger-Lohr, Angew. Chem. 87, 845 (1975); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 14, 818 (1975).

Citreoviridine aus *Aspergillus terreus*^[**]

Von Burchard Franck und Henning-Peter Gehrken^[*]

Professor Rolf Huisgen zum 60. Geburtstag gewidmet

Das schwere Nervenstörungen bewirkende Mycotoxin Citreoviridin (1a) ist Urheber der in Ostasien epidemieartig auftretenden „Cardiac Beriberi“^[1]. Seine den Aflatoxinen vergleichbare akute Toxizität wird durch Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthetasen verursacht^[2]. (1a) wurde bisher in verschimmeltem Reis sowie in *Penicillium citreoviride* und verwandten *Penicillium*-Arten gefunden^[3].

Wir isolierten Citreoviridin (1a) und weitere, bisher unbekannte Abkömmlinge dieses Strukturtyps aus dem Schimmelpilz *Aspergillus terreus*, einem der im Erdboden, auf Getreidearten und zuckerhaltigen Nahrungsmitteln meistverbreiteten Organismen, der auch biotechnologisch verwendet wird^[4]. Es verdient besondere Beachtung, daß das Auftreten des zu den gefährlichsten Mycotoxinen gehörenden Citreoviridins somit nicht auf ostasiatische Schimmelpilze beschränkt ist, und daß die Citreoviridin-Bildung durch Stämme des *Aspergillus terreus* extrem hohe Werte – bis zu 2%

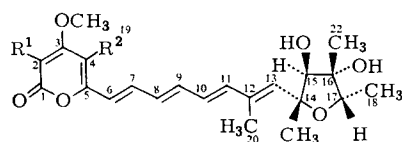
[*] Prof. Dr. B. Franck, Dr. H.-P. Gehrken
Organisch-chemisches Institut der Universität
Orléansring 23, D-4400 Münster

[**] Pilzinhaltsstoffe, 31. Mitteilung. – 30. Mitteilung: B. Franck, G. Bringmann, G. Flohr, Angew. Chem. 92, 483 (1980); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19, Nr. 6 (1980).

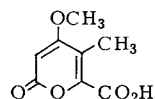
des Trockenmycels – erreicht. Dies ermöglichte auch eine genaue biogenetische Analyse des Mycotoxins.

Bei der Durchmusterung von *Aspergillus terreus* nach Wirkstoffen stießen wir bei 5 von 13 Stämmen^[5] auf leuchtend gelbe Metabolite mit typischem Polyen-UV/VIS-Spektrum. Der Hauptmetabolit (tiefgelbe Nadeln, Fp=109–110 °C aus MeOH, λ_{\max} = 237, 287, 295, 388 nm) erwies sich als identisch mit Citreoviridin (1a)^[6]; daneben fanden wir in geringeren Mengen fünf sehr ähnliche Metabolite. Wir bezeichnen daher Citreoviridin (1a) mit dem Zusatz „A“ und die anderen Komponenten in der Reihenfolge ihrer auf (1a) = 1.00 bezogenen R_f -Werte (1.44, 1.35, 1.24, 0.72, 0.62; Ethylacetat auf DC-Karten SI F-Riedel de Haen) mit B, C, D, E und F.

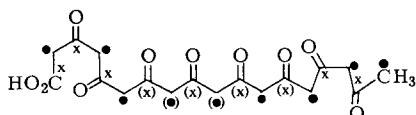
Den Komponenten C und D ließen sich u. a. aus spektroskopischen Daten die Strukturen (1b) bzw. (1c) zuordnen. Durch Spaltung der C-5/C-6-Bindung im Massenspektrometer gebildete Fragmente gaben zu erkennen, daß sich (1a), (1b) und (1c) nur durch Methylgruppen an C-2 und C-4 unterscheiden. Dementsprechend zeigten in den ¹³C-NMR-Spektren ([D₆]Aceton) nur die Signale von C-2 und C-4 signifikante Differenzen.



(1a), R¹ = H, R² = CH₃; (1b), R¹ = CH₃, R² = H;
(1c), R¹, R² = CH₃



(2)



(3)

x, ●: Markierung durch [1-¹³C]-
bzw. [2-¹³C] Acetat

Tabelle 1. ¹³C-NMR-Daten und ¹³C-Anreicherung der isotopomeren Citreoviridine A (1a), die nach Verfüttern von [1-¹³C]- und [2-¹³C]Acetat an *Aspergillus terreus* (CBS 503.65) erhalten wurden (gemessen in [D₆]Aceton. Angabe der Anreicherung in Vielfachen der natürlichen ¹³C-Häufigkeit [7]).

C-Atom	δ und Multi- plizität	¹³ C-Anreicherung	
		(1a) aus [1- ¹³ C]Acetat	(1a) aus [2- ¹³ C]Acetat
C-1	163.5 s	10.32	—
C-2	88.9 d	—	26.2
C-3	171.2 s	9.44	—
C-4	108.3 s	—	17.0
C-5	155.0 s	9.58	—
C-6	119.6 d	—	21.4
C-7 [a]	136.3 d	19.4	—
C-8 [b]	127.0 d	—	23.7
C-9 [a]	139.4 d	14.9	—
C-10 [b]	131.5 d	—	21.2
C-11 [a]	142.2 d	17.8	—
C-12	132.9 s	—	18.9
C-13 [a]	144.5 d	16.4	—
C-14	84.8 s	—	17.4
C-15	86.5 d	13.6	—
C-16	80.8 s	—	18.8
C-17	78.5 d	18.0	—
C-18	13.0 q	—	24.6
C-19	8.94 q	—	—
C-20	21.8 q	—	—
C-21	19.3 q	—	—
C-22	13.5 q	—	—
OCH ₃	56.8 q	—	—

[a, b] Diese Zuordnungen können untereinander vertauscht sein.

Die Struktur von Citreoviridin A (1a) legt die Annahme einer Biosynthese aus neun Acetateinheiten über Acetyl- und Malonyl-Coenzym A sowie das C₁₈-Polyketid (3) und dessen C-Methylierung an vier Positionen (C-4, C-12, C-14, C-16) nahe. In Einklang hiermit sind frühere Inkorporationsversuche^[3b] mit Acetat und Methionin, bei denen jedoch wegen der Markierung mit ¹⁴C nur wenige Einbaupositionen durch chemischen Abbau bestimmt werden konnten. Applikation von [1-¹³C]- und [2-¹³C]Acetat (90% ¹³C-Anreicherung; 200 mg/100 ml Nährlösung) an *Aspergillus terreus* (CBS 503.65)^[4] ergab isotopomere Citreoviridine A (1a). Deren ungewöhnlich hoher Einbau von 17.6 bzw. 25.7%^[7] ermöglichte genaue ¹³C-Positionsbestimmungen durch ¹³C-NMR-Spektren (Tabelle 1). Demnach stammen alle ungeradzahigen C-Atome (x) der Polyketidkette (3) von (1a) aus den Carboxygruppen der Acetatbausteine und die geradzahigen C-Atome (●) von (3) aus den Methylgruppen. Die C-Atome der Methoxy- und der C-Methylgruppen zeigten ebenso wie die unmarkierten C-Atome der C₁₈-Kette keine signifikanten Signale, entsprechend ihrer Herkunft aus dem C₁-Pool des Organismus.

Als fortgeschrittene Zwischenstufe der Citreoviridin-Biosynthese aus Acetateinheiten kommt Ölsäure in Betracht. Sie enthält ebenso viele C-Atome wie das Polyketid (3) und ist ein Schlüsselbaustein^[8] für die Biosynthese vieler Polydehydro-carbonsäuren^[9]. Die Radioaktivität des nach Verfüttern von [1-¹⁴C]Ölsäure an *Aspergillus terreus* isolierten Citreoviridins (1a) entsprach einem nur geringen spezifischen Einbau von 0.00093%. KMnO₄-Oxidation dieses Citreoviridins (1a) ergab ein Cumalinsäure-Derivat (2), das nicht, wie bei direktem Einbau zu erwarten, die gesamte Radioaktivität, sondern nur 36% enthält. Somit dürfte die geringe Inkorporation der [1-¹⁴C]Ölsäure über einen Abbau zu ¹⁴C-Acetat zu erklären sein.

Arbeitsvorschrift

Gewinnung von (1a): 200 Oberflächenkulturen von *Aspergillus terreus* (CBS 503.65) auf je 350 ml Czapek-Dox-Nährlösung^[11] in 11-Erlenmeyerkolben, die 21 d bei 26 °C gewachsen waren, ergaben 750 g gefriergetrocknetes Mycel. Dieses wurde nacheinander fünfmal mit jeweils 3.5 l Petroläther (126 g Extraktückstand) und Aceton (65.2 g Extraktückstand) digeriert. Den Acetonrückstand nahm man in Ethylacetat auf, trennte Ungelöstes durch Filtration ab und chromatographierte mehrfach mit Ethylacetat an Säulen aus Silicagel (Merck, Korngröße 0.063–0.2 mm). Der Eindampfrückstand der vereinigten Eluate wurde aus Methanol umkristallisiert; Ausbeute 15.1 g (2.01% des Trockenmycels) (1a), Fp=108–110 °C.

Eingegangen am 20. März 1980 [Z 466 b]

CAS-Registry-Nummern:

(1a): 25425-12-1.

- [1] Y. Ueno in I. F. H. Purchase: Mycotoxins. Elsevier, New York 1974, S. 283.
- [2] P. E. Linnett, A. D. Mitchell, M. D. Osselton, L. J. Mulheirn, R. B. Beechey. Biochem. J. 170, 503 (1978).
- [3] a) D. W. Nagel, P. S. Steyn, D. B. Scott, Phytochemistry 11, 627 (1972); b) D. W. Nagel, P. S. Steyn, N. P. Ferreira, ibid. 11, 3215 (1972).
- [4] K. B. Raper, D. I. Fennell: The Genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore 1965.
- [5] Die Citreoviridine-bildenden Stämme von *Aspergillus terreus* haben die Herkunftsbezeichnungen CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland) 503.65, 594.65, 130.55; ATCC (American Type Culture Collection) 16.792; CMI (Commonwealth Mycological Institute) 61.457. Davon ragt der erstgenannte durch die höchste bisher bekannt gewordene Bildung von Citreoviridin (1a) heraus.
- [6] N. Sakabe, T. Goto, Y. Hirata, Tetrahedron Lett. 27, 1825 (1964).
- [7] Der Einbau wurde massenspektrometrisch bestimmt. Zur Berechnung der ¹³C-Anreicherung in den Markierungspositionen der Citreoviridine (1a), die nach Verfüttern von [1-¹³C]- und [2-¹³C]Acetat erhalten wurden, divi-

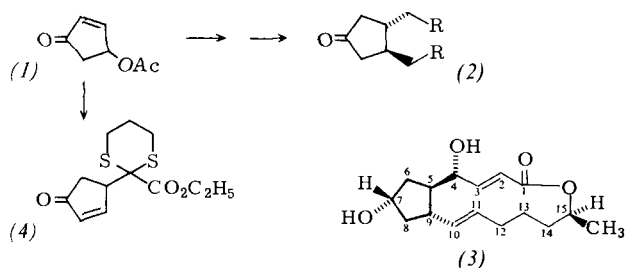
dierte man deren ^{13}C -NMR-Signalintensitäten durch die entsprechenden Intensitäten von nicht markiertem (1a). Die so erhaltenen reduzierten Intensitäten I_r wurden mit dem Quotienten \bar{A}_m/\bar{I}_r multipliziert (\bar{A}_m = massenspektrometrisch bestimmte, durchschnittliche ^{13}C -Anreicherung an den Markierungspositionen in Vielfachen der natürlichen ^{13}C -Häufigkeit).

- [8] B. Franck, Angew. Chem. 91, 453 (1979); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 18, 429 (1979).
 [9] F. Bohlmann, Fortschr. Chem. Org. Naturst. 25, 1 (1967); E. D. Korn, J. Biol. Chem. 239, 396 (1964).
 [10] O. W. Thiele: Lipide, Isoprenoide mit Steroiden. Thieme, Stuttgart 1979, S. 58.
 [11] Nach S. Gatenbeck, Acta Chem. Scand. 23, 3493 (1969).

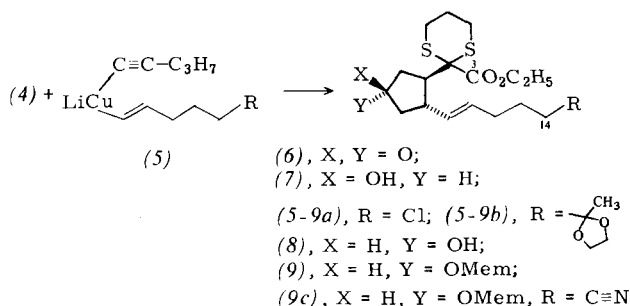
Ein neuer Weg zu Brefeldin A^[**]

Von Yetkin Köksal, Peter Raddatz und Ekkehard Winterfeldt^[*]

Um das synthetische Potential von 4-Oxo-2-cyclopentenylacetat (1) zum Aufbau *trans*-disubstituierter Cyclopentanone durch sukzessive Michael-Addition [(1) → (2)] auszunutzen, wählten wir das aus *Penicillium Brefeldianum* isolierte Makrolid-Antibioticum Brefeldin A (3)^[2] als Synthesziel. (3) hat antifungale und cytostatische Wirkung. Seine Konstitution wurde 1964 aufgeklärt^[3]; einige Totalsynthesen und spezielle Reaktionen sind bekannt^[4].



Da (1) als optisch aktive Verbindung zur Verfügung steht^[5], ist prinzipiell eine enantioselektive Synthese von (3) möglich, die bisher nur auf sehr vielstufigem Weg gelang^[4d]. Wir stellten zunächst die Zwischenprodukte (6a) und (6b) aus dem Oxoester (4)^[1b] durch Michael-Addition der Cuprate (5a) und (5b) her (siehe Tabelle 1).

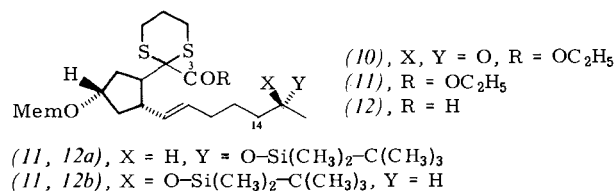


Die Alkohole (7) erhielten wir mit hoher Stereoselektivität durch Selektiridreduktion^[6] von (6), die Epimere (8) durch Walden-Inversion^[7] von (7). Beide Alkohole lassen sich auf

Tabelle 1. Einige physikalische Daten der Verbindungen (6a), (6b), (15a) + (15b) und (16a) + (16b); M^\oplus massenspektrometrisch bestimmt.

(6a), IR (CHCl ₃): 3040, 1600, 1740, 1720 cm ⁻¹ ; ¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 5.4 (2) m, 4.32 (2) q (J = 7 Hz), 3.53 (2) t (J = 6 Hz), 2.33–3.8 (6) m, 1.5–2.3 (10) m, 1.35 (3) t (J = 7 Hz); MS (80 °C): m/e = 376 (15%, M^\oplus), 329 (5), 303 (43), 191 (58), 145 (100); M^\oplus (³⁵ Cl bzw. ³⁷ Cl): ber. 376.0934, gef. 376.0935 bzw. ber. 378.0904, gef. 378.0910
(6b), IR (CCl ₄): 1750, 1730, 1070 cm ⁻¹ ; ¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 5.35 (2) m, 4.21 (2) q (J = 7 Hz), 3.97 (4) s, 2.35–3.6 (8) m, 1.44–2.3 (10) m, 1.23 (3) t (J = 7 Hz), 1.2 (3) s; MS (200 °C): m/e = 428 (5%, M^\oplus), 413 (5), 355 (19.5), 191 (73.5), 163 (23), 145 (100), 87 (96.5)
(15a) + (15b): IR (CCl ₄): 1712, 1630 cm ⁻¹ ; ¹ H-NMR (CCl ₄): δ = 6.96, 6.54 (1) d (J = 15.5 Hz), 5.99, 5.96 (1) d (J = 15.5 Hz), 5.2 (2) m, 4.9 (1) m (H-15), 4.6 (2) s (OCH ₂ O), 4.08 (1) m (H-7), 3.5 (4) m (OC ₂ H ₄ O), 3.3 (3) s (OCH ₃), 2.5–3.2 (4) m, 1.2–2.5 (12) m, 1.26, 1.22 (3) d (J = 6 Hz, C—CH ₃); MS (160 °C): m/e = 455 (4%, M^\oplus), 427 (2), 412 (1), 380 (7), 367 (14), 350 (11), 89 (100); M^\oplus ber. 456.2004, gef. 456.2004
(16a) + (16b): IR (CCl ₄): 1728, 1702, 1630 cm ⁻¹ ; ¹ H-NMR (CCl ₄): δ = 7.69, 7.32 (1) d (J = 16 Hz), 6.31, 6.30 (1) d, 5.5 (2) m, 5.2, 4.6 (1) m (H-15), 4.6 (2) s (OCH ₂ O), 4.1 (1) m (H-7), 3.5 (4) m (OC ₂ H ₄ O), 3.29 (3) s (OCH ₃), 1.2–2.3 (12), 1.3, 1.21 (3) d (J = 6 Hz, C—CH ₃); MS (380 °C): m/e = 366 (2%, M^\oplus), 290 (7.5), 261 (10), 89 (100); M^\oplus ber. 366.2042, gef. 366.2040

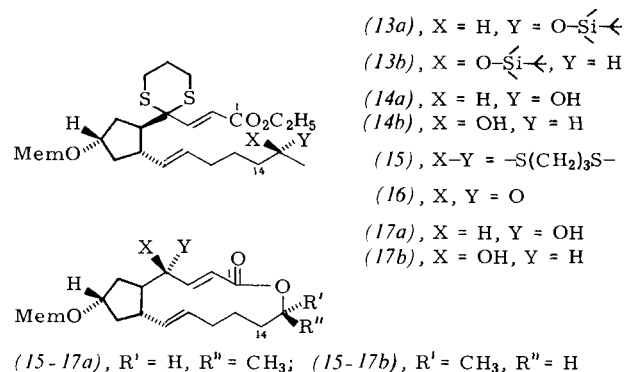
übliche Weise in die Mem-Ether (9)^[8] umwandeln. Durch Verlängerung der Seitenkette von (9a) entsteht (9c), das bei der Reaktion mit Methyllithium und anschließender Hydrolyse des Imins das Keton (10) ergibt. (10) kann auch durch Hydrolyse des Ketals (9b) erhalten werden.



Mit anderen Organometallverbindungen könnten andere Gruppen an C-15 eingeführt werden; prinzipiell besteht auch die Möglichkeit, über das Imin (direkte Reduktion!) zum Lactam zu gelangen. Reduktion der Carbonylgruppe in der Seitenkette von (10) liefert nach Schutz der Hydroxygruppen das Gemisch der epimeren Silylether (11a) und (11b).

Stereoselektivität wurde an dieser Stelle nicht angestrebt, da Corey^[4a] über eine deutlich höhere Bildungsgeschwindigkeit des Lacton-Derivats mit natürlicher Konfiguration an C-15 berichtet hatte, so daß es möglich schien, diesen Effekt zur Epimerentrennung zu nutzen.

Zur Vervollständigung der anderen Kette wird zunächst durch Reduktion von (11a) und (11b) mit LiAlH₄ und anschließende Reoxidation das Gemisch der Aldehyde (12a) und (12b) bereitet, das bei Wittig-Olefinierung die ungesättigten Ester vom Typ (13) ergibt.



[*] Prof. Dr. E. Winterfeldt, Dipl.-Chem. Y. Köksal, Dipl.-Chem. P. Raddatz
 Institut für Organische Chemie der Universität Hannover
 Schneiderberg 1B, D-3000 Hannover

[**] 3. Mitteilung über Cyclopentenone. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Dr. A. von Wartburg und Dr. H. Hauth, Sandoz AG, Basel, danken wir für natürliches Brefeldin A. – Als 1. und 2. Mitteilung gelten [1a] bzw. [1b].