

STUDIORUM PROGRESSUS

Konstitution des Rifamycins B und verwandter Rifamycine

Rifamycin B ist ein Stoffwechselprodukt des *Streptomyces mediterranei* n. sp.¹. Es besitzt die Formel $C_{39}H_{49}O_{14}N^2$ und stellt eine gelbe, zweibasische Säure (pK_{MCS}^3 2,6 und 7,76) dar. Die spektralen Daten (UV, Sichtb., IR und NMR⁴) weisen auf einen aromatischen Chromophor und auf mehrere verschiedenartige Funktionen hin, von welchen ein Methoxyl und ein Acetoxyl analytisch nachweisbar sind. Auf Grund der physikalischen und chemischen Eigenschaften seiner zahlreichen Umwandlungs- und Abbauprodukte konnte für das Rifamycin B die ungewöhnliche Konstitution I abgeleitet werden. Die wichtigsten Reaktionen, welche zu dieser Konstitution führten, sind in der Formelübersicht zusammengestellt. Milde Oxydationsmittel in neutralen gepufferten Lösungen geben eine gelbe einbasische Säure $C_{39}H_{47}O_{14}N$ (pK_{MCS}^3 7,61), das Rifamycin O (II), aus dem durch milde Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure) das Rifamycin B zurückerhalten werden kann. Oxydation des Rifamycins B oder Stehenlassen von Rifamycin O in wässrigen sauren Lösungen liefern unter hydrolytischer Abspaltung von Glykolsäure eine gelbe, einbasische Säure $C_{37}H_{45}O_{12}N$ (pK_{MCS}^3 7,16), das Rifamycin S (III), welches durch milde Reduktionsmittel zum Rifamycin SV, einer gelben, einbasischen Säure $C_{37}H_{47}O_{12}N$ (pK_{MCS}^3 2,96) reduziert werden kann⁵. Das letztere (IV) wird durch milde Oxydationsmittel in das Rifamycin S (III) zurückverwandelt. Es handelt sich hier offenbar um eine Chinon-Hydrochinon-Reaktion, wobei das Vorliegen eines *o*-chinoiden Systems sehr unwahrscheinlich ist, da das Rifamycin S auch unter energischen Reaktionsbedingungen von Blei(IV)-acetat nicht angegriffen wird. Der Verlust einer sauren Funktion und das Auftreten einer neuen, charakteristischen Bande im IR bei 1820 cm^{-1} beim Übergang von Rifamycin B in O führen zum Schluss, dass die Oxydation zum Chinon in diesem Falle mit der Bildung eines Spiro-Systems am C-4 (II) verknüpft ist⁶.

Die meisten weiteren Reaktionen, die wir näher untersuchten, gingen von Rifamycin S (III) aus, dessen NMR eine Anzahl typischer Signale aufweist, welche folgenden Gruppen zugeordnet werden konnten: 4 CH_3CH (C-31, -32, -33, -34): δ 0,22; 0,65; 0,80; 1,01 (J 7, je 3H), CH_3 (C-13): δ 1,70 (3H), CH_3 (C-30) + CH_3COO : δ 2,03 (6H), CH_3 (C-14): δ 2,35 (3H), CH_3O : δ 3,10 (3H), CH (C-3): δ 7,8 (1H), NH : δ 8,3 (1H), OH (C-8): δ 12,5 (1H). Die Banden im 3μ -Gebiet des IR weisen auf OH- und NH-Gruppen, diejenigen im 6μ -Gebiet auf mehrere Carbonyle hin.

Rifamycin S gibt mit Methyljodid und Silberoxid als Hauptprodukt einen Monomethyläther $C_{38}H_{47}O_{12}N$, der mit Acetanhydrid ein Diacetylderivat $C_{42}H_{51}O_{14}N$ liefert. Im IR des letzteren befindet sich im 3μ -Gebiet keine OH-Bande mehr, woraus folgt, dass darin und somit auch im Rifamycin S keine weiteren, nichtacetylierbaren Hydroxyle anwesend sind. Als Nebenprodukt der Methylierung von Rifamycin S mit Methyljodid und Silberoxid entsteht der Iminomethyläther $C_{38}H_{47}O_{12}N$ (V), welcher die Schlüsselrolle bei der Konstitutionsaufklärung der Rifamycine spielte. Im Gegensatz zu Rifamycin S lässt sich der daraus hergestellte Iminomethyläther unter milden Bedingungen methanolytisch spalten, wobei als Hauptprodukte ein Naphthochinonderivat $C_{14}H_{11}O_6N$ (VI) und ein Dimethylacetal-methylester $C_{25}H_{42}O_8$ (VII) entstehen. Als Nebenprodukte der Methanolyse wurden

ein weiterer, stereoisomerer Dimethylacetal-methylester $C_{25}H_{42}O_8$ und ein Enolmethyläther-methylester $C_{24}H_{38}O_7$ (VIII) isoliert. Das Dimethylacetal VII geht durch Pyrolyse in den Enoläther VIII über und dieser gibt durch saure Methanolyse das Dimethylacetal VII zurück. Die funktionellen Gruppen in den erwähnten Methanolyseprodukten VII und VIII, die Methoxyle und die Acetoxyle lassen sich spektral nachweisen und bestimmen. Im UV ist die Absorption des mit der Carbomethoxygruppe konjugierten Doppelbindung-Systems sichtbar (λ_{max} 268 m μ , $\log \epsilon$ 4,48), welches durch katalytische Hydrierung leicht abgesättigt werden kann. Das NMR erlaubt nicht nur die drei olefinischen Protonen am C-17, C-18 und C-19 zu erkennen, sondern man kann aus der Multiplizität der Signale, ihren chemischen Verschiebungen, sowie aus den Kupplungskonstanten⁷ ihre Konfiguration eindeutig ableiten, so wie sie in VII angegeben ist. Im NMR des Enolmethyläthers VIII sind darüber hinaus die Signale der zwei olefinischen Protonen der Enoldoppelbindung ersichtlich⁸.

In den Spaltprodukten VI und VII ist das ganze Gerüst des Rifamycins enthalten, welches demnach aus zwei grossen Teilstücken, die lose miteinander verknüpft sind, besteht. Die Feststellung dieser Tatsache hat die weitere Konstitutionaufklärung bedeutend erleichtert.

Das aromatische Methanolyseprodukt VI $C_{14}H_{11}O_6N$, gibt bei der Methylierung mit Methyljodid und Kaliumcarbonat in Aceton ein O,O'-Dimethyl-N-methylderivat $C_{17}H_{17}O_6N$ (IXa) und ein O,O'-Dimethyl-N,N-dimethylderivat $C_{18}H_{19}O_6N$ (IXb), in welchen anhand des NMR die Bindung zwischen C-13 und 6-O gespalten ist. Die Verbindung IXa gab durch saure Hydrolyse das N-freie α -Hydroxy-naphthochinonderivat $C_{16}H_{14}O_7$ (X). Diese Reaktionen bestätigen, dass in der Verbindung VI ein α -Amino-chinonderivat vorliegt.

Die Konstitution des Kohlenstoffgerüsts des aromatischen Methanolyseproduktes VI liess sich zum grossen Teil aus den Ergebnissen des energischen Abbaus des Rifamycins S mit Ozon ableiten. Dieser Abbau liefert als

¹ P. SENSI, A. M. GRECO und R. BALLOTTA, *Antibiotics Annual* (1959–1960), p. 262. Über die in Forschungslaboratorien durchgeführten Untersuchungen wurde verschiedentlich berichtet; vgl. 27. Mitt. über Rifamycine, G. G. GALLO, C. R. PASQUALUCCI und P. REDAELLI, *Farmaco*, Ed. prat. 18, 78 (1963) und frühere Mitt. dieser Reihe.

² Alle erwähnten Verbindungen gaben entweder direkt oder in Form ihrer Derivate übereinstimmende Mikroanalysen.

³ Definition von pK_{MCS}^3 : W. SIMON, E. KOVATS, L. H. CHOPARD-DIT-JEAN und E. HEILBRONNER, *Helv. chim. Acta* 37, 1872 (1954).

⁴ Für Absorptionsspektren in Ultraviolett, Sichtbarem, Infrarot und für Kernresonanzspektren verwenden wir in dieser Mitteilung die Abkürzungen UV, Sichtb., IR bzw. NMR. Die chemischen Verschiebungen im NMR sind in ppm, bezogen auf das Signal der Protonen in Tetramethylsilan = 0 angegeben, die J-Werte sind in cps. Die NMR wurden mit Varian A 60 in $CDCl_3$ -Lösung aufgenommen.

⁵ Das Natriumsalz des Rifamycins SV ist das im Handel befindliche Antibioticum Rifocin®.

⁶ Diese Schlussfolgerung wurde durch Modellversuche mit einfachen *p*-Hydroxyphenyl-glykolsäure-äthern gestützt: G. G. GALLO, C. R. PASQUALUCCI und P. SENSI, *Annali Chim.* 52, 902 (1962).

⁷ NMR analoger konjugierter Systeme wurden von M. S. BARBER, A. HARDISSON, L. M. JACKMAN und B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* 1961, 1627, untersucht.

⁸ Beispiele für NMR der Enoläther finden sich z.B. bei N. S. BRACCA, L. F. JOHNSON und J. N. SHOOLERY, *Varian NMR Spectra Catalog*, Varian Associates 1962, Spectra Nos. 110, 111.

Hauptprodukte zwei aromatische Säuren: eine Dihydroxy-dicarbonsäure $C_{12}H_{10}O_8$ und eine Dihydroxy-tricarbonsäure $C_{10}H_8O_8$. Aus der letzteren Verbindung wurde der kristalline Dimethyläther-trimethylester $C_{16}H_{18}O_8$ hergestellt, welcher auf Grund seines NMR und des Vergleiches mit einem durch Behandlung der bekannten⁹ Dimethoxy-tricarbonsäure XII mit Diazomethan in Methanol bereiteten Ester als 5-Methyl-4,6-dimethoxybenzol-1,2,3-tricarbonsäure-trimethylester XI identifiziert werden konnte.

Die Dicarbonsäure $C_{12}H_{10}O_8$ XIIIa wurde mit einem Unterschuss von Methyljodid und Silberoxid in Chloroform-Methanol in den Dimethylester $C_{14}H_{14}O_8$ XIIIc übergeführt, der sich mit Natriumperjodat zur Verbindung XIVc oxydieren liess. Diese wurde mit Diazomethan in Methanol in den Methoxy-trimethylester $C_{16}H_{18}O_8$ XIVb verwandelt und durch IR (ν_{max} 1770 cm^{-1}) und NMR (s 2,3:3H) als Acetoxy-Derivat identifiziert. Da daraus durch Methanolyse und anschliessende Behandlung mit Diazomethan in Methanol der bekannte Dimethoxy-trimethylester XI erhalten wurde, besitzt die Dicarbonsäure $C_{12}H_{10}O_8$ die Konstitution XIIIa.

Weitere wichtige Auskunft über die Konstitution des aromatischen Teiles der Rifamycine wurde durch Umsetzung des Rifamycins O (II) mit *p*-Toluolsulfonylhydrazin und katalytische Hydrierung des dabei erhaltenen 'Chinondiazids'¹⁰ $C_{37}H_{45}O_{11}N_3$ XV erhalten. Im Hydrogenolyseprodukt $C_{37}H_{51}O_{11}N$ sind die konjugierten Doppelbindungen abgesättigt und die Diazo-Stickstoffatome durch einen Wasserstoff ersetzt. Es handelt sich um eine relativ starke einbasische Säure (pK_{MCS} 4,44), woraus man schliessen kann, dass der Sauerstoff am C-1 in peri-Stellung zum Hydroxyl am C-8 noch anwesend ist. Im NMR liegen Signale vor, welche für zwei aromatische Protonen in *o*-Stellung typisch sind. Es folgt daraus, dass das Hydrogenolyseprodukt die Konstitution XVI eines Desoxy-tetrahydro-rifamycins SV besitzt, in dem der neu eingeführte aromatische Wasserstoff am C-4, der ursprünglich vorhandene aromatische Wasserstoff in *o*-Stellung dazu, also am C-3, und der Amidstickstoff demnach am C-2 sitzen muss. Für das aromatische Methanolyseprodukt $C_{14}H_{11}O_6N$ ist dadurch die Konstitution VI bewiesen.

Über die Konstitution des übrigen Teiles des Rifamycins S gab die energische Oxydation mit Salpetersäure des durch katalytische Hydrierung mit Palladium-Kohle-Katalysator in Alkohol und milde Oxydation des Hydrierungsproduktes erhaltenen Tetrahydro-rifamycins S $C_{37}H_{49}O_{12}N$ (XVII) Auskunft. Aus dem Oxydationsgemisch konnten folgende Produkte isoliert und identifiziert werden: die homologen aliphatischen α -Methyl-dicarbonsäuren XVIII-XX, die meso- und die rechtsdrehende α, α' -Dimethyl-pimelinsäure (XXI)¹¹ und eine kristalline Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_8$. Aus der Bildung der α, α' -Dimethyl-pimelinsäuren bei der Oxydation lässt sich eindeutig die Konstitution der Kohlenstoffkette von C-15 bis C-21 ableiten. Das Differentialspektrum im UV des Rifamycins S und seiner Tetrahydroderivate zeigt, dass die durch Hydrierung abgesättigten zwei Doppelbindungen mit dem Amid-Carbonyl ein konjugiertes System bilden, was durch weitere Abbauprobe bestätigt werden konnte. Das Vorliegen sowohl der meso- als auch der rechtsdrehenden α, α' -Dimethyl-pimelinsäuren (getrennt als Dianilide)¹¹ im Oxydationsgemisch spricht dafür, dass durch Hydrierung der konjugierten Doppelbindungen ein Gemisch von zwei am C-16 epimeren Tetrahydro-rifamycinen S entsteht, welche nicht getrennt werden konnten.

Die Konstitution XXII für die Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_8$ folgt aus ihren pK_{MCS} -Werten (5,51; 9,44), aus

dem NMR ihres Tetramethylesters, sowie aus der Überführung in die Methyl-bernsteinsäure durch Erhitzen auf 130° mit 65prozentiger Bromwasserstoffsäure und katalytische Hydrierung der Reaktionsprodukte mit Palladiumkohle in alkalischer Lösung. Die Tetracarbonsäure XXII stammt offenbar aus dem Teil der Molekel zwischen C-21 und C-28. Man muss, um ihre Entstehung zu erklären, die auf Grund weiterer Erfahrungen in der Rifamycinreihe plausible Annahme machen, dass in saurer Lösung zuerst zwischen C-23 und C-28 unter Abspaltung des Methoxyls ein Tetrahydropyran-Ring entsteht, der dann zwischen C-24 und C-25 unter Verlust des Methyls C-33 oxydativ aufgespalten wird. Das Methyl C-33 könnte demnach entweder am C-24 oder am C-25 sitzen und seine Lage musste durch besondere Versuche bestimmt werden.

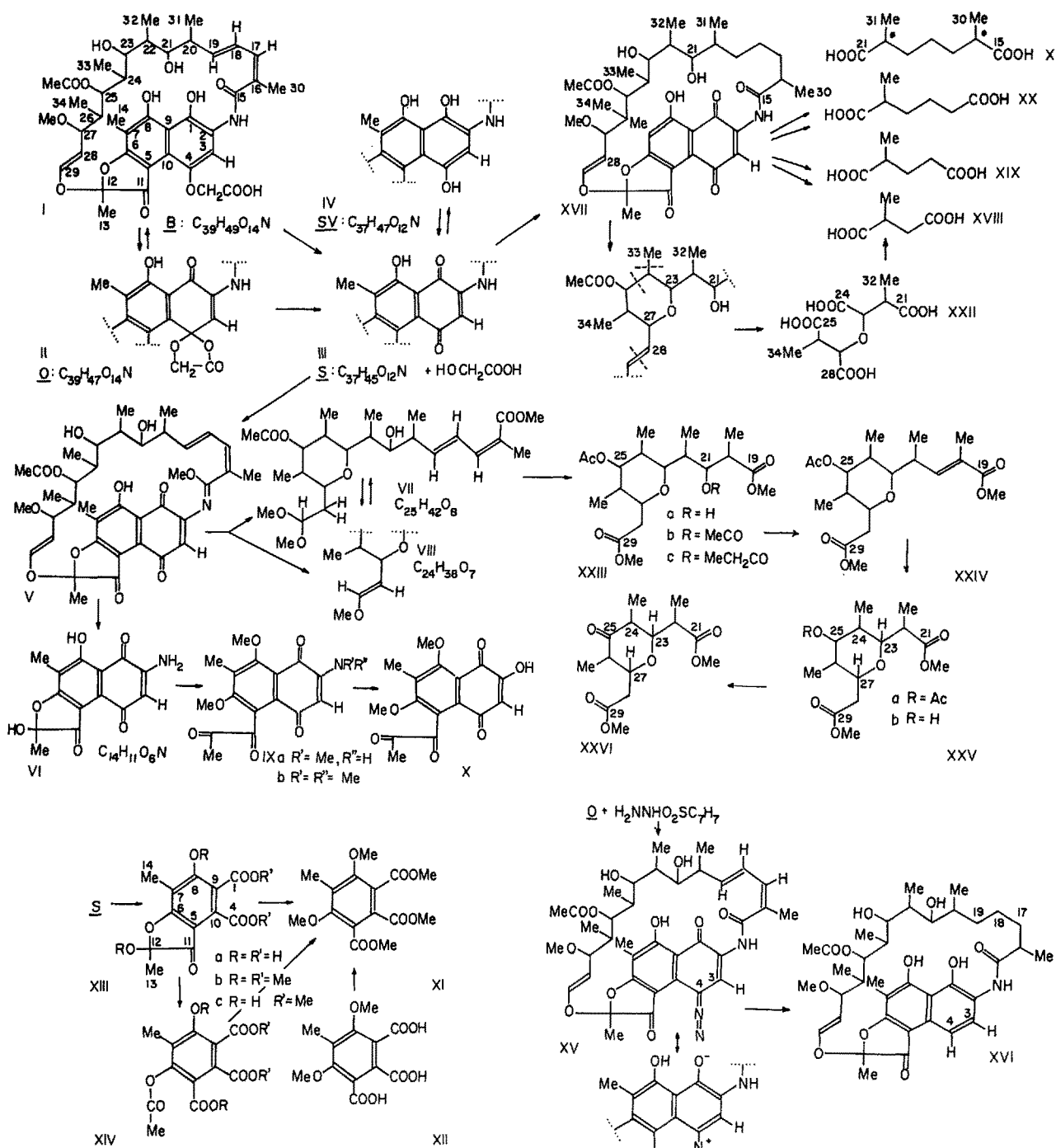
Der Dimethylacetal-methylester $C_{26}H_{42}O_8$ VII gibt durch Ozonisierung, Nachoxydation mit Perameisensäure und Behandlung der sauren Oxydationsprodukte mit Diazomethan einen Hydroxy-acetoxy-dimethylester $C_{16}H_{32}O_8$ XXIIIa, dessen Zusammensetzung die Lage des konjugierten Doppelbindung-Systems bestätigt. Das durch Acetylierung des Hydroxyls erhaltene O-Acetyl-derivat XXIIIb liefert bei der pyrolytischen Zersetzung einen α, β -ungesättigten Acetoxy-dimethylester $C_{16}H_{30}O_7$ XXIV (λ_{max} 219 m μ , $\log \epsilon$ 4,13). Die gleiche Verbindung entsteht auch durch pyrolytische Zersetzung des analogen *o*-Propionyl-Derivates XXIIIc, woraus folgt, dass die freie Hydroxyl-Gruppe in Rifamycinen am C-21 sitzt. Die Frage, die auf Grund der Konstitution der Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_8$ offen blieb, d.h. ob die ursprüngliche Acetoxy-Gruppe in Rifamycinen am C-24 oder am C-25 sitzt, lässt sich auf folgendem Wege beantworten. Der α, β -ungesättigte Acetoxy-dimethylester $C_{16}H_{30}O_7$ XXIV wurde ozonisiert, mit Perameisensäure nachoxydiert und die sauren Produkte mit Diazomethan behandelt. Man erhielt auf diese Weise einen gesättigten Acetoxy-dimethylester $C_{16}H_{26}O_7$ XXVa. Der Hydroxy-dimethylester $C_{14}H_{24}O_6$ XXVb, welcher daraus durch Methanolyse entsteht, wurde mit Chrom(VI)-oxid zum entsprechenden Oxo-dimethylester $C_{14}H_{22}O_6$ XXVI oxydiert. Die Signale, welche den Protonen am C-23 und C-27 zugeordnet werden können, haben im NMR der Verbindungen XXVa und XXVI die praktisch gleiche Lage und Multiplizität, was nicht der Fall wäre, wenn Acetoxy- bzw. Carbonylsauerstoff am C-24 sitzen würde. Es folgt daraus, dass die Acetoxygruppe in Rifamycinen am C-25 und das Methyl C-33 am C-24 lokalisiert werden müssen. Die Konstitution des Oxo-dimethylesters XVI wurde unter anderem auch durch das Massenspektrum bestätigt, in dem die Ionen M-73 (CH_2COOMe) und M-84 ($CHMeCOOMe$) auftreten.

Um aus der Konstitution der Hauptprodukte der Methanolyse des Imino-methyläthers V – der Verbindungen VI und VII – diejenige des Rifamycins S abzuleiten, musste man besonders noch die Verknüpfungsstelle der Brücke mit dem Sauerstoff am C-12 des aromatischen Teilstückes und die Lage des Methoxyls bestimmen, da diese aus den bisher erwähnten Tatsachen nicht direkt ersichtlich sind.

⁹ J. H. BIRKINSHAW, H. RAISTRICK, D. J. ROSS und C. E. STICKINGS, *Biochem. J.* 50, 612 (1952). Wir danken Professor J. H. BIRKINSHAW für die freundliche Überlassung eines authentischen Vergleichspräparates.

¹⁰ Über die Entstehung von Chinondiaziden aus Chinon-*p*-toluolsulfonylhydrazonen vgl. W. RIED und R. DIETRICH, *Chem. Ber.* 94, 387 (1961).

¹¹ A. FREDGA und B. ÖSTMAN, *Acta chem. scand.* 10, 703 (1956).



Als Sitz des Methoxyls stehen C-23, C-27 und C-29 und als Ringverknüpfungsstelle aus sterischen Gründen nur C-27 und C-29 zur Diskussion. Da das Signal der Methoxyl-Protonen in dem durch Hydrierung mit Platinoxid-Katalysator in Alkohol und nachfolgende milde Oxydation erhaltenen Hexahydorifamycin S, in dem neben den konjugierten Doppelbindungen auch die Enoldoppelbindung abgesättigt ist, die gleiche Lage besitzt wie im Rifamycin S, handelt es sich nicht um einen Enol-methyl-äther; die Ringverknüpfungsstelle ist deshalb C-29. Die rasche und glatte Eliminierung des Methoxyls bei der

Entstehung des Tetrahydropyranringes unter dem Einfluss von Säuren, weist auf eine Allylstellung des Methoxyls am C-27 hin, obwohl C-23 nicht ganz ausgeschlossen werden kann.

Die Rifamycine B, O, S und SV sind nach den vorgeschlagenen Formeln I bis IV natürliche ansa-Verbindungen¹², in welchen der aromatische Teil durch eine aliphatische Kette so überbrückt ist, dass diese durch die Ebene des aromatischen Systems nicht durchschwingen kann. Die Kette liegt deshalb fast senkrecht darauf im magnetischen Felde seiner π -Elektronen, was im NMR aus einer auffallenden Verschiebung der Doublette zweier CH_2CH -Gruppen ersichtlich ist (im Rifamycin S 0,64 und 0,22). Viel stärker als bei chinoiden Verbindungen ist die Verschiebung bei den entsprechenden Hydrochinonderivaten z.B. in der Verbindung XXVII (0,5 und -0,6). Durch methanolitische Spaltung des grossen Ringes erhält man aus der Verbindung XXVII die Verbindung XXVIII. Alle vier CH_2CH -Doublette der letzteren befinden sich erwartungsgemäss in einem dichten Signalaufen, dessen Schwerpunkt bei 1 liegt.

Auf Grund der Konstitution I lässt sich vermuten, dass das Rifamycin B zum grossen Teil, ebenso wie viele andere Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen aus biogenetischen Äquivalenten der Essigsäure und der Propionsäure aufgebaut ist. Die Konstitution der aliphatischen Brücke erinnert an diejenige gewisser Makrolide. Trotz

dieser biogenetischen Verwandtschaft stellen Rifamycine eine strukturell neuartige Gruppe von Naturstoffen dar und geben ein weiteres Zeugnis von der Fähigkeit der Mikroorganismen, ungewöhnliche Verbindungen und besonders solche mit vielgliedrigen Ringen zu synthetisieren.

Wie aus der nachfolgenden Mitteilung von BRUFANI, FEDELI, GIACOMELLO und VACIAGO¹³ folgt, konnte die auf Grund des chemischen Abbaus und der spektroskopischen Untersuchungen abgeleitete Konstitution I durch die Röntgenstrukturanalyse des Rifamycin B-*p*-jodanilids voll bestätigt werden.

Summary. Constitution I, based on extensive degradation studies, is proposed for Rifamycin B, a metabolite of *Streptomyces mediterraneus* n. sp.

W. OPPOLZER, V. PRELOG
und P. SENSI

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich (Schweiz) und Forschungslaboratorium der Lepetit SpA, Milano (Italien), 10. März 1964.

¹² A. LÜTTRINGHAUS und H. GRALHEER, Liebigs Ann. 550, 67 (1941).

¹³ M. BRUFANI, W. FEDELI, G. GIACOMELLO und A. VACIAGO, Exper. 20, 339 (1964).

The X-Ray Analysis of the Structure of Rifamycin B¹

The crystal structure of *p*-iodoanilide of rifamycin B has been elucidated in our laboratory in order to obtain an independent determination of the molecular structure of the antibiotic compound rifamycin B, $\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{NO}_{14}$, a product of the metabolism of *Streptomyces mediterraneus* n. sp. (see preceding paper).

Crystallographic measurements were started in 1962 when knowledge of the chemical structure was still slight. However, enough was then known to prepare a variety of heavy-atom derivatives of rifamycin B and other related rifamycins. A preliminary study of these derivatives² indicated that the *p*-iodoanilide of rifamycin B, $\text{C}_{45}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{I}$, was the most promising for X-ray analysis. In fact, crystals of this compound, grown from a water-acetone solution and kept in a sealed capillary tube in the presence of mother liquor, were fairly stable and suitable for our measurements.

Crystal data: $\text{C}_{45}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{I} + \text{C}_3\text{H}_8\text{O} + 5\text{H}_2\text{O}$, $M = 956.83 + 58.08 + 90.08 = 1104.99$, Orthorhombic disphenoidal, $a = 9.06 \pm 0.03$, $b = 23.66 \pm 0.08$, $c = 25.45 \pm 0.09$ Å, $U = 5456$ Å³, $D_m = 1.23$ gcm⁻³ (by flotation), $Z = 4$, $D_c = 1.34^3$ gcm⁻³ (taking solvent molecules into account), $F(000) = 1976 + 128 + 200 = 2304$. Space group, $P2_12_12_1$ (D_2^4 , No. 19). $\text{CuK}\alpha$ -radiation, $\mu = 53.2^5$ cm⁻¹, single crystal oscillation and Weissenberg photographs.

2175 reflections for intensity measurements were measured by eye from photographic records made by Weissenberg cameras at room temperature, using specimens measuring about $1.0 \cdot 0.3 \cdot 0.3$ mm and rotating around the *a* (6 layers) and *c* (6 layers) axes. They amounted to about 33% of the reflections theoretically

possible in the $\text{CuK}\alpha$ sphere. Even the best crystals were of medium reflecting power and deteriorated noticeably in the X-ray beam; no reflections were observed beyond a spacing limit of 0.83 Å around the *c* axis and of 1.00 Å (with an average cut-off at about 1.2 Å) around the *a* axis. Absorption corrections are small and were not applied.

The iodine atom co-ordinates were determined without ambiguity from a three-dimensional unsharpened Patterson synthesis; a section of the Patterson function at $U = \frac{1}{2}$ is shown in Figure 1.

With phase angles calculated from these coordinates⁴ ($x/a = 0.548$, $y/b = 0.087$, $z/c = 0.491$, $R = 41\%$), a three-dimensional Fourier synthesis was evaluated, including at this early stage all the structure-amplitudes without any weighing scheme. 61 maxima were interpreted as carbon atoms, giving an *R* value of 36%, but no information on the chemical structure could safely be given by the electron distribution at this stage. 17 maxima out of the 61 proved later to be spurious.

The elucidation of the structure continued by Fourier methods: the benzene ring of the anilide could be clearly

¹ A brief preliminary report on this structure has been read at a meeting of the Accademia Nazionale dei Lincei, Rome, on December 14, 1963².

² M. BRUFANI, W. FEDELI, G. GIACOMELLO, and A. VACIAGO, Rend. Acc. Lincei, 36, 113 (1964).

³ M. BRUFANI, W. FEDELI, G. GIACOMELLO, and A. VACIAGO, Chemotherapia (Basel) 7, 145 (1963).

⁴ It is noteworthy that the iodine atom coordinates from the Patterson function did not change much during refinement (see Table), and that they were such that there was no 'mirror image' problem.