

- [34] J. W. Corcoran & M. Chick, "Biosynthesis of Antibiotics", J. F. Snell, Ed., Vol. I, Academic Press, New York, N. Y., 1966, S. 159; W. D. Celmer, Pure Appl. Chemistry 28, 413 (1971); Z. Vankó & J. Majer in "Antibiotics", Vol. II, D. Gottlieb & P. D. Shaw, Ed., Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1967, S. 154; W. Keller-Schierlein, Fortschritte Chemie organischer Naturstoffe 30, 313 (1973).
- [35] R. J. White, E. Martinelli, G. G. Gallo, G. Lancini & P. Beynon, Nature 243, 273 (1973); M. Brufani, D. Kluepfel, G. C. Lancini, J. Leitich, A. S. Mesentsev, V. Prelog, F. P. Schmoock & P. Sensi, Helv. 56, 2315 (1973).
- [36] A. J. Birch, Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe 14, 186, 202 (1957).
- [37] G. C. Lancini & P. Sensi, Proceedings of the Vth International Congress of Chemotherapy. Vol. I, K. H. Spitzky & H. Haschek, Ed., Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, Wien 1967, S. 41.

241. Über die Konstitution und die Konfiguration der Rifamycine B, O, S und SV¹⁾

von Wolfgang Oppolzer und Vladimir Prelog

Laboratorium für Organische Chemie, Eidg. Technische Hochschule, Zürich

(7. VIII. 73)

Summary. Degradation experiments and spectroscopic (UV., VIS., IR., and ¹H-NMR.) evidence have led to the elucidation of the complete constitution and of a part of the configuration of rifamycins B, O, S, and SV.

In der vorangehenden Mitteilung [1] wurde zusammenfassend über die mikrobiellen Stoffwechselprodukte der Ansamycin-Gruppe berichtet. Die ersten Vertreter dieser Gruppe, deren Struktur aufgeklärt wurde, waren die Rifamycine B, O, S und SV. Die Konstitutionsbestimmung, die chemisch und spektroskopisch erfolgte, wurde vor mehr als 10 Jahren abgeschlossen, die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden jedoch bisher nur in Vorträgen [2], in vorläufigen Mitteilungen [3–4] und in einer nicht allgemein zugänglichen Promotionsarbeit [5] veröffentlicht.

Da das chemische Verhalten der Rifamycine bei ihrem Abbau von verschiedenen Standpunkten aus interessant ist, möchten wir es in der vorliegenden Mitteilung eingehender beschreiben. Man kann daraus, unter anderem, die grossen Fortschritte beurteilen, welche die Strukturaufklärung organischer Naturstoffe in den letzten zwei Dezennien gemacht hat. Obwohl uns damals für die Konstitutionsaufklärung weder die Entkopplungsmethoden der ¹H-NMR-Spektroskopie noch die ¹³C-NMR-Spektroskopie zur Verfügung standen, und die Massenspektroskopie sehr wenig verwendet wurde, gelang es, die Konstitution der ungewöhnlichen Molekeln in etwa 2 Jahren aufzuklären.

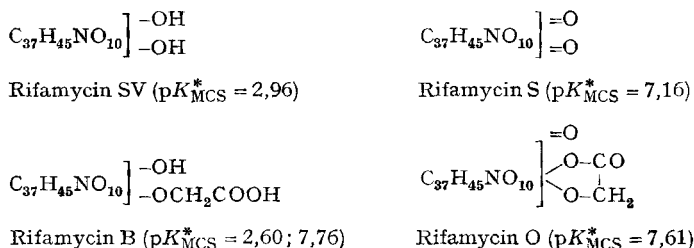
1. Die konstitutionellen Beziehungen zwischen den Rifamycinen B, O, S, SV und L. – Von den von Sensi *et al.* aus Kulturen von *Streptomyces mediterranei* isolierten Rifamycinen A bis F [6] wurde dem Rifamycin B als Ausgangsstoff für therapeutisch wirksame Verbindungen besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Dieses mikrobielle Stoffwechselprodukt wird durch Zugabe von Natrium-diäthylbarbiturat zum

¹⁾ 5. Mitteilung über Rifamycine, 4. Mitt. [1].

Nährmedium zur Hauptkomponente des Rifamycin-Komplexes [7]. Der Wirkungsmechanismus dieses Nährmedium-Zusatzes ist noch nicht aufgeklärt, man konnte jedoch feststellen, dass die mit ^{14}C am C-(2) oder C-(4) markierten Diäthylbarbiturate nicht in das Rifamycin B eingebaut werden [8].

Wie in den Laboratorien von *Lepetit* gefunden wurde [9], geht Rifamycin B, $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{NO}_{14}$, durch Oxydation mit Luft oder mit milden Oxydationsmitteln in Rifamycin O, $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{NO}_{14}$, über. Letzteres liefert durch saure Hydrolyse ein mol Glykolsäure und Rifamycin S, $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{NO}_{12}$, aus dem durch Reduktion Rifamycin SV, $\text{C}_{37}\text{H}_{47}\text{NO}_{12}$, entsteht [10]. Aufgrund von eingehenden chemischen und spektroskopischen Untersuchungen von *Sensi et al.* [11] lassen sich diese Umwandlungen durch folgende Teilformeln darstellen:

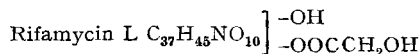
Schema 1



Aus diesem Schema und aus dem chemischen und spektroskopischen Verhalten folgt, dass Rifamycin SV zu Rifamycin S im Verhältnis eines Hydrochinons zum entsprechenden Chinon steht. Das Rifamycin B ist demnach ein Glykolsäureäther des Rifamycins SV und das Rifamycin O ist ein spirocyclischer Äther-ester von Glykolsäure mit Rifamycin S. Eine solche Dioxalanon-Konstitution für das Rifamycin O wurde unter anderem auch durch die Herstellung einfacher analog gebauter Derivate substituierter 1,4-Chinone und Glykolsäure gestützt [12].

Die Rifamycine O und SV werden, wie man später fand, von gewissen *Streptomyces*-Stämmen direkt produziert, sie sind demnach nicht nur *in vitro* Umwandlungsprodukte von Rifamycin B, sondern stellen selbst mikrobielle Stoffwechselprodukte dar [13].

Durch Inkubation des Rifamycins S mit *Streptomyces mediterranei* entsteht neben Rifamycin B ein Isomeres, das Rifamycin L, für welches *Lancini et al.* [14] die Konstitution eines Glykolsäureesters des Rifamycins SV beweisen konnten.



2. Der analytische und spektroskopische Nachweis der funktionellen Gruppen und Kohlenstoff-Gerüst-Fragmente in Rifamycinen. – Von den weiteren funktionellen Gruppen in den Rifamycinen B, O, S und SV lassen sich eine Methoxy- und eine Acetoxy-Gruppe sowohl mikroanalytisch als auch spektroskopisch eindeutig erkennen. Die pK_{MCS}^* -Werte (s. Schema 1) weisen darauf hin, dass ein Sauerstoffatom in einer stark sauren Phenolhydroxyl-Gruppe vorliegt, die in *peri*-Stellung zum Chinon- bzw. Hydrochinon-System steht. Dafür sprechen nicht nur die pK_{MCS}^* -Werte, sondern auch die Farbreaktion des Rifamycins S mit Boressigsäureanhydrid und die

^1H -NMR.-Signale δ 12,5 ppm und 12,7 ppm in den Spektren von Rifamycin O bzw. Rifamycin S (vgl. Fig. 1). Dieses Hydroxyl kann im Rifamycin S durch Methylierung mit Methyljodid und Silberoxid selektiv unter Entstehung eines 8-O-Methylrifamycins S methyliert werden. Durch energische Acetylierung der letzteren Verbindung entsteht ein Diacetyl-Derivat, was auf zwei weitere Hydroxyle hinweist. Da das IR.-Spektrum des Diacetyl-Derivates neben der scharfen NH-Bande bei 3360 cm^{-1} keine Hydroxyl-Bande aufweist, sind im Rifamycin S keine weiteren Hydroxyl-Gruppen anwesend. Durch Reduktion von 8-O-Methylrifamycin S entsteht 8-O-Methylrifamycin SV, das bei der Methylierung einen Trimethyläther liefert. Die Banden bei 3420 m , 1675 s und 1541 s im IR.-Spektrum dieser Verbindung weisen auf eine sekundäre Amid-Gruppe hin. Eine Stütze für diese Vermutung stellt das Nebenprodukt der Methylierung von Rifamycin S dar, das isomer mit O-Methylrifamycin S ist und aufgrund seines chemischen und spektroskopischen Verhaltens als Iminomethyläther des Rifamycins S identifiziert werden konnte. Somit bleibt nur die Funktion von 3 von den im Rifamycin B vorliegenden 14 Sauerstoffatomen unbestimmt.

Die ^1H -NMR.-Spektren der Rifamycine O und S gaben unabhängig von den chemischen Untersuchungen einige weitere sehr wichtige Auskünfte über die funktionellen Gruppen und über das Kohlenstoff-Gerüst. Im Spektrum des Rifamycins S (Fig. 1) liegen die 4 CH_3CH -Dublette ($J \sim 7$) teilweise bei ungewöhnlich hohem Magnetfeld ($\delta = 0,20, 0,64, 0,86$ und $1,00$ ppm) vor. Dies war der erste Hinweis darauf, dass es sich bei Rifamycinen um *ansa*-Verbindungen handeln könnte. Zwei der 5 CH_3 -Singulette (δ 1,72 (3 H); 2,0 (6 H); 2,32 (3 H) und 3,12 (3 H) ppm) lassen sich den analytisch nachgewiesenen Acetoxy- und Methoxy-Gruppen zuordnen. Von den Signalen der 5 olefinischen Protonen liegt eines als «Quadruplett» bei δ 5,09 ($J_1 = 7,5, J_2 = 12,5, 1\text{ H}$), die anderen 4 erscheinen als ein breiter Signalhaufen (5,7 bis 6,5). Ein scharfes einem «aromatischen» Proton entsprechendes Singulett liegt bei 7,8 vor. Die Singulette bei 8,42 (s, 1 H) und bei 12,50 (s, 1 H) sind dem sekundären Amid-Proton bzw. dem stark sauren Phenolhydroxyl-Proton zuzuordnen.

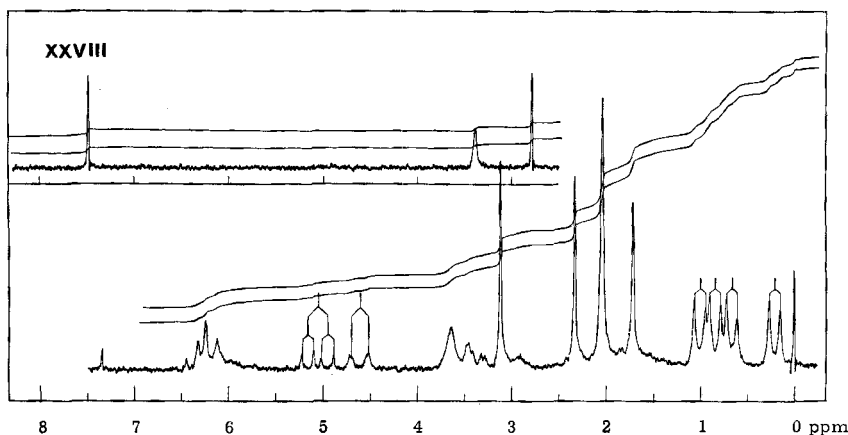


Fig. 1. ^1H -NMR.-Spektrum von Rifamycin S (XXVIII)

Das ^1H -NMR.-Spektrum des Rifamycins O ist, bis auf einen zusätzlichen Signalaufbau bei δ 4,5 ppm (2H), der offenbar den CH_2 -Protonen des Glykolsäureesters zuzuschreiben ist, dem Spektrum des Rifamycins S sehr ähnlich. Die ähnlichen $\text{p}K_{\text{MCS}}^*$ -Werte und die fast gleichen chemischen Verschiebungen des Phenolhydroxyl-Protons in beiden Spektren sprechen dafür, dass dieses Proton in den Rifamycinen O und B in *peri*-Stellung zu demjenigen Carbonyl steht, welches nicht durch die Glykolsäure blockiert ist.

Neuerdings wurden von *Martinelli et al.* die sehr gut aufgelösten ^{13}C -NMR.-Spektren der Rifamycine [15] untersucht. Aufgrund der bekannten Struktur konnten durch Vergleich der Spektren und durch Entkopplungsversuche die meisten Signale den einzelnen Kohlenstoffatomen zugeordnet werden. Dies hat ermöglicht, durch Untersuchung von Rifamycinen, die mit an ^{13}C angereicherten Vorläufern bereitet worden waren, die Biogenese der Rifamycine auf besonders elegante und erfolgreiche Weise zu studieren [16].

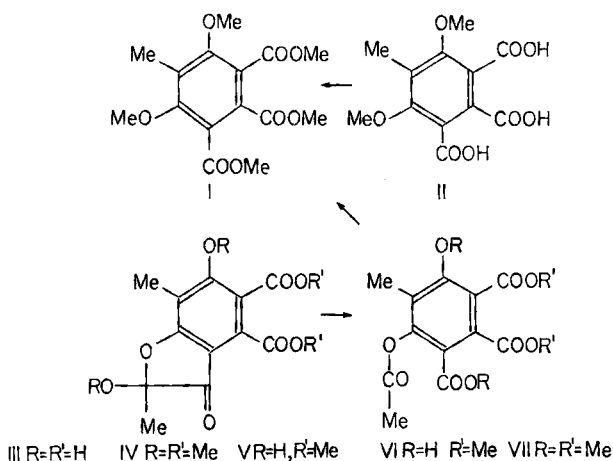
3. Konstitution des aromatischen Teiles der Rifamycine. – 3.1. *Oxydation des Rifamycins S mit Ozon.* Wie aus den vorhin genannten Befunden hervorgeht, enthalten die Rifamycine einen aromatischen Teil, der hauptsächlich für die Absorption im Sichtbaren und im UV. sowie für die Redox-Eigenschaften dieser Verbindungsklasse verantwortlich ist. Seine Konstitution liess sich zum grossen Teil aus den Ergebnissen des Abbaus von Rifamycin S mit Ozon ableiten. Aus dem durch Ozonisierung erhaltenen und anschliessend mit Perameisensäure behandelten Reaktionsgemisch konnten zwei aromatische Säuren isoliert werden: eine Tricarbonsäure $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_8$ und eine Dicarbonsäure $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_8$.

Die Tricarbonsäure $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_8$ wurde als 4,6-Dihydroxy-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure identifiziert. Sie liess sich durch Sublimation im Hochvakuum in ein Anhydrid $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_7$ (IR.-Spektrum: 1856 s und 1777 s) überführen, und gab bei der Umsetzung mit Diazomethan in Methanol einen Dimethyläther-trimethylester $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_8$. Dessen ^1H -NMR.-Spektrum weist das Signal einer Methylgruppe an aromatischem Kohlenstoff bei 2,22 (s, 3H) sowie zwei weitere Signale bei 3,79 (s, 9H) und 3,81 (s, 6H) (entsprechend drei bzw. zwei jeweils identischen Methoxygruppen an ungesättigtem Kohlenstoffatom) auf. Daraus folgt für diesen Äther-ester die Konstitution I. Ein Vergleichspräparat, das durch Behandlung der bekannten 4,6-Dimethoxy-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure (II)²⁾ mit Diazomethan in Methanol bereitet wurde, ist mit dem Äther-ester aus dem Abbauprodukt identisch.

Die Konstitution III der Dicarbonsäure $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_8$ wurde auf folgendem Weg ermittelt: Umsetzung der Dicarbonsäure mit Acetanhydrid/Pyridin führte zu einem Diacetyl-anhydrid $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_8$, dessen IR.-Spektrum intensive Banden bei 1865, 1777 und 1745 cm^{-1} aufweist. Die Säure ergab durch Behandlung mit einem Überschuss Methyljodid-Silberoxid einen Dimethyläther-dimethylester IV, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_8$, dessen Signale im ^1H -NMR.-Spektrum folgenden Gruppen zugeordnet werden können: einem Methyl an Acetal-Kohlenstoff: 1,52 (s, 3H), einem Methyl an aromatischem Kohlenstoff: 2,25 (s, 3H), einem Methoxyl an gesättigtem Kohlenstoff: 3,21 (s, 3H) sowie drei Methoxy-Gruppen an ungesättigtem Kohlenstoff: 3,80 (s, 3H) und 3,90 (s, 6H).

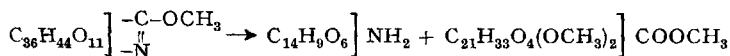
²⁾ Wir danken Herrn Professor *J. M. Birkinshaw* für ein Muster dieser Verbindung [17].

Schema 2



Die aufgrund dieser Daten abgeleitete Struktur III der Dicarbonsäure $C_{12}H_{10}O_8$ war durch einen Abbau des daraus mit einem Unterschuss Methyljodid/Silberoxid hergestellten Dimethylesters V $C_{14}H_{14}O_8$ leicht zu beweisen. Der Dimethylester liess sich mit Natriumperjodat zu einer Acetoxycarbonsäure VI abbauen, die nach Einwirkung von Diazomethan in Methanol den Trimethylester VII ergab. Die Acetoxygruppe in dieser Verbindung war im IR.- (1780 (s) cm^{-1}) und im 1H -NMR.-Spektrum (2,11 (s, 3H)) eindeutig nachweisbar. Aus dem Acetoxyester VII wurde schliesslich durch Methanolyse und anschliessende Behandlung mit Diazomethan in Methanol der vorhin beschriebene Dimethoxy-trimethylester I erhalten.

3.2. Methanolyse des Imino-methyläthers $C_{38}H_{47}NO_{12}$ aus Rifamycin S. Die früher erwähnte Verbindung $C_{38}H_{47}NO_{12}$ ($pK_{MCS}^* = 9,38$), die bei der Methylierung von Rifamycin S mit Methyljodid/Silberoxid als Nebenprodukt entsteht, wurde aufgrund ihrer Acidität und des spektroskopischen Vergleiches mit Rifamycin S als Imino-methyläther identifiziert. Die Iminoäther-Gruppierung lässt sich im IR.-Spektrum durch das Fehlen der NH-Bande sowie durch eine starke zusätzliche Bande bei 1632 cm^{-1} erkennen. Das 1H -NMR.-Spektrum der Verbindung weist neben anderen Signalen nach wie vor das scharfe Singulett des Phenolhydroxyl-Protons bei 13,3 (s, 1H) auf, während das breite Singulett der NH-Gruppe fehlt. Das Signal des neu eingeführten Methyls erscheint bei 3,96 (s, 3H), entsprechend einem Methoxyl an ungesättigtem Kohlenstoffatom. Im Gegensatz zu Rifamycin S liess sich dieser Imino-äther unter milden sauren Bedingungen methanolytisch in zwei Teilstücke spalten, wobei als Hauptprodukte eine aromatische Verbindung $C_{14}H_{11}NO_6$ und eine Verbindung $C_{25}H_{42}O_8$ entstanden. Die erstere enthält kein Methoxyl, die zweite dagegen 3 Methoxyle. In den beiden Spaltprodukten ist, wie aus weiteren Untersuchungen hervorgeht, das ganze Gerüst des Rifamycins enthalten. Die methanolytische Spaltung des Imino-methyläthers $C_{38}H_{47}NO_{12}$ spielte deshalb eine Schlüsselrolle in der

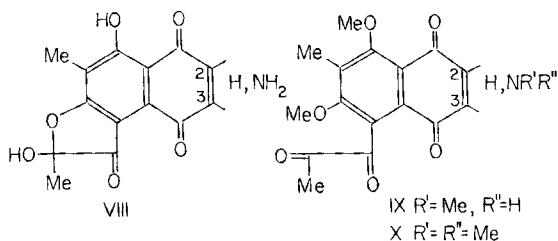


Konstitutionsaufklärung, indem sie eine gesonderte Untersuchung der beiden Teilstücke ermöglichte.

Neben der Verbindung $C_{25}H_{42}O_8$ wurden bei der Methanolyse des Imino-methyläthers in kleineren Mengen zwei Nebenprodukte erhalten: eine damit isomere Verbindung $C_{25}H_{42}O_8$ sowie eine nahe verwandte Verbindung $C_{24}H_{38}O_7$, die sich von den beiden ersteren formell durch Abspaltung einer Molekel Methanol ableiten lässt.

3.3. *Die Konstitutionsermittlung des aromatischen Spaltproduktes $C_{14}H_{11}NO_6$ (VIII).* Sie wurde zuerst in Angriff genommen, da über dieses Produkt aufgrund der Ergebnisse der Ozonisierung von Rifamycin S recht viel bekannt war. Die saure ($pK_{MCS}^* = 7,12$) dunkelrote Verbindung $C_{14}H_{11}NO_6$ zeigt im 1H -NMR.-Spektrum (CF_3COOH) die Signale einer Methylgruppe bei 1,93 (s, 3H), einer zweiten Methylgruppe bei 2,37 (s, 3H) sowie eines «olefinischen» Protons bei 6,55 (s, 1H). Bereits diese Daten erlaubten die Schlussfolgerung, dass sie das gesamte 12 Kohlenstoffatome umfassende Gerüst der Dicarbonsäure III enthält, welches sich durch Angliederung von zwei weiteren Kohlenstoffatomen zu einem 1,4-Naphthochinon-System vervollständigen lässt.

Schema 3



Diese Annahmen konnten durch folgende Reaktionen bestätigt werden. Das aromatische Spaltprodukt $C_{14}H_{11}NO_6$ gab bei der Methylierung mit Methyljodid und Kaliumcarbonat in Aceton ein O,O'-Dimethyl-N-methyl-Derivat $C_{17}H_{17}NO_6$ (IX) und ein O,O'-Dimethyl-N,N-dimethyl-Derivat $C_{18}H_{19}NO_6$ (X). Das IR.-Spektrum des ersteren zeigt bei 3390 cm^{-1} eine scharfe NH-Bande, während das zweite im 3μ -Gebiet keine Absorption aufweist. In beiden Methylierungsprodukten ist der Fünfring geöffnet, wie aus ihren 1H -NMR.-Spektren hervorgeht, von denen hier als Beispiel dasjenige der Verbindung X beschrieben sei.

Die chemischen Verschiebungen der Signale eines Methyls bei 2,27 (s, 3H) und zweier Methoxyle bei 3,72 (s, 3H) und 3,88 (s, 3H) weisen auf ihre Lage an einem aromatischen Kern hin. Das Singulett bei 3,18 (6H) kann einer Dimethylamino-Gruppe, das Singulett bei 5,53 (1H) einem Proton an einem ungesättigten Kohlenstoff und das Singulett bei 2,57 (3H) einer CH_3CO -Gruppe zugeordnet werden in Übereinstimmung mit der postulierten Konstitution.

Die N-Monomethyl-Verbindung IX gab durch saure Hydrolyse eine stickstofffreie Verbindung $C_{16}H_{14}O_7$, die sich anhand ihrer Acidität ($pK_{MCS}^* = 4,23$) sowie einer intensiven Farbreaktion mit Titan(III)-chlorid als ein α -Hydroxychinon-Derivat identifizieren liess. Diese Reaktionen bestätigen, dass in der Verbindung VIII ein α -Aminochinon-Derivat vorliegt, lassen allerdings die Frage offen, ob die Amino-Gruppe bzw. das im 1H -NMR.-Spektrum sichtbare «olefinische» Proton am C-(2) oder C-(3) sitzt.

3.4. Das «Chinon-diazid» aus Rifamycin O und die Lokalisierung des «olefinischen» Wasserstoffs.– Eine eindeutige Antwort über die Lage des «olefinischen» Wasserstoffs in Rifamycinen gab die folgende Reaktionsfolge: Die Umsetzung von Rifamycin O mit *p*-Toluolsulfonylhydrazin führte unter Abspaltung von Glykolsäure zu einer Verbindung $C_{37}H_{45}N_3O_{11}$ ³⁾, die sich durch eine charakteristische IR.-Bande bei 2120 cm^{-1} auszeichnet und aufgrund ihrer Entstehung und ihrer Eigenschaften als ein «Chinon-diazid» erkannt wurde. Dieses geht durch katalytische Hydrierung in eine Verbindung $C_{37}H_{51}NO_{11}$ über, wobei zwei konjugierte Doppelbindungen im aliphatischen Teil abgesättigt und die Diazogruppe im aromatischen Teil durch einen Wasserstoff ersetzt werden. Es handelt sich um eine relativ starke einbasische Säure ($pK_{MCS}^* = 4,44$), woraus auf eine unveränderte Stellung des Sauerstoffs am C-(1) in *peri*-Stellung zum Hydroxyl am C-(8) geschlossen wurde. Im $^1\text{H-NMR}$.-Spektrum (Fig. 2) liegen Signale

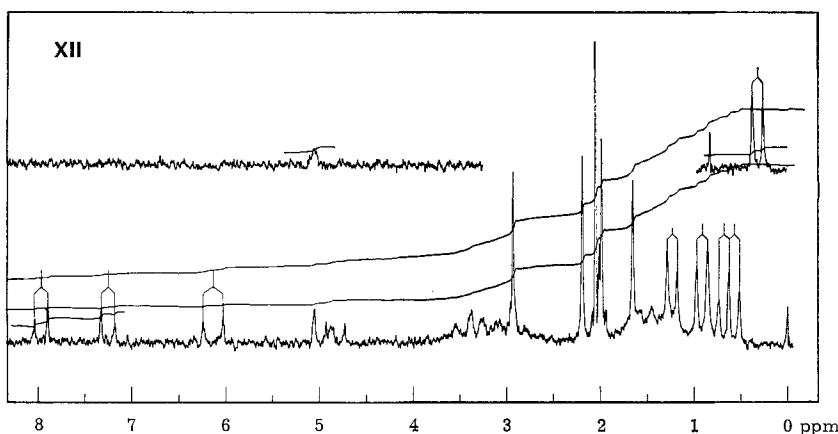
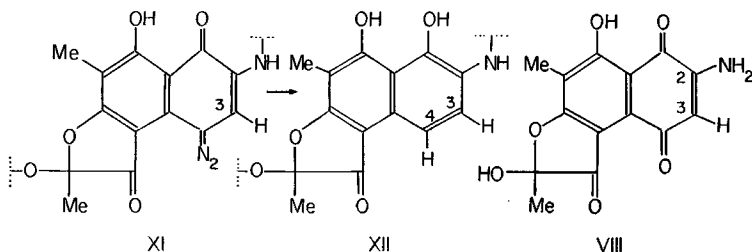


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$.-Spektrum des 4-Desoxy-tetrahydorrifamycins SV (XII)

bei 7,25 (*d*, $J = 8,5$, 1H) und bei 7,95 (*d*, $J = 8,5$, 1H) vor, die zwei aromatischen Protonen in *o*-Stellung entsprechen. Es folgt daraus, dass das «Chinon-diazid» die Teilkonstitution XI und sein Hydrogenolyseprodukt die Teilkonstitution XII eines 4-Desoxy-tetrahydorrifamycins-SV besitzt, in dem der neu eingeführte aromatische Wasserstoff am C-(4), der ursprünglich vorhandene aromatische Wasserstoff dazu

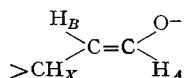
Schema 4



³⁾ Diese Verbindung wurde zuerst in Laboratorien der *Lepetit* auf einem anderen Wege erhalten.

in *o*-Stellung, also am C-(3), und der Stickstoff demnach am C-(2) sitzen muss. Für das aromatische Methanolyseprodukt $C_{14}H_{11}NO_6$ ist dadurch die Konstitution VIII bewiesen.

4. Konstitution des nichtaromatischen Teiles der Rifamycine. – 4.1. *Die energische Oxydation der Hydrierungsprodukte von Rifamycin S mit Salpetersäure.* Die ersten wichtigen Informationen über den aliphatischen Teil der Rifamycine wurden durch Hydrierung von Rifamycin S und oxydativen Abbau der Hydrierungsprodukte gewonnen. Das Rifamycin S absorbierte in Gegenwart von Palladium-Kohle-Katalysator drei mol-Äqu. Wasserstoff unter Bildung eines Hydrochinons, dessen milde Oxydation zum Tetrahydorrifamycin S führte. Durch Vergleich der Spektren des Rifamycins S mit denjenigen seines Tetrahydroderivates wurde folgendes festgestellt: Das Differentialspektrum im UV. ($\lambda_{\max}$: 220 ($\log \epsilon = 4,09$), 256 ($\log \epsilon = 4,04$) nm) deutet darauf hin, dass ein System von zwei konjugierten Doppelbindungen abgesättigt wurde. Aus den 1H -NMR.-Spektren ist ersichtlich, dass im Tetrahydroderivat drei olefinische Protonen fehlen und eine an olefinischem Kohlenstoff befindliche Methylgruppe in eine CH_3 -CH-Gruppe umgewandelt wurde. Die zwei verbliebenen olefinischen Protonen im Tetrahydorrifamycin S, deren Signale den *AB*-Teil eines *ABX*-Systems darstellen, δH_A 6,12 (*d*, $J_{AB} = 12$, $J_{AX} = 0,1$ H), δH_B 5,07 (*dd*, $J_{AB} = 12$, $J_{BX} = 5,2$, 1 H), lassen sich einem *trans*-Enoläther-Rest mit der folgenden Teilkonstitution zuordnen:



Durch Hydrierung von Rifamycin S in Gegenwart eines Platin-Katalysators konnte auch diese enolische Doppelbindung abgesättigt werden. Die milde Oxydation des entstandenen Hexahydorrifamycins SV ergab ein Hexahydorrifamycin S, dessen UV.-Spektrum identisch mit demjenigen des Tetrahydorrifamycins S ist, während im 1H -NMR.-Spektrum die im Spektrum des Tetrahydorrifamycins S vorliegenden Signale der zwei olefinischen Protonen verschwunden sind. Die Integrationskurve zeigt dafür in dem für α -ständige Wasserstoffatome von gesättigten Äthern charakteristischen Bereich zwischen $\delta 3,5$ und $4,0$ einen Zuwachs von zwei Protonen. Die energische Oxydation von Tetrahydorrifamycin S mit wässriger Salpetersäure ergab ein Säuregemisch, aus dem Oxalsäure, α -Methylbernsteinsäure (XIII), α -Methylglutarsäure (XIV), α -Methyladipinsäure (XV), die *meso*- und die rechtsdrehende α, α' -Dimethylpimelinsäure (XVI) sowie eine kristalline Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_9$ isoliert werden konnten. Das Vorliegen sowohl der *meso*- als auch der rechtsdrehenden α, α' -Dime-

XIII	HOOCCH ₂ CHMeCOOH
XIV	HOOCCH ₂ CH ₂ CHMeCOOH
XV	HOOCCH ₂ CH ₂ CH ₂ CHMeCOOH
XVI	HOOCCHMeCH ₂ CH ₂ CH ₂ CHMeCOOH
XVII	HOOCCHMeCH(COOH)-O-CH(COOH)CHMeCOOH
XVIII	MeOOCCHMeCH(OOCMe)CHMeCH ₂ CH ₂ CH ₂ CHMeCOOMe
	$\alpha \qquad \beta \qquad \qquad \gamma \qquad \qquad \eta$

thylpimelinsäure (getrennt und identifiziert als Dianilide!) im Oxydationsgemisch spricht dafür, dass durch Hydrierung der konjugierten Doppelbindungen von Rifamycin S ein Gemisch von zwei epimeren Tetrahydrorifamycinen S entsteht, welche nicht getrennt wurden. Die drei niedrigeren homologen α -Methyl-dicarbonsäuren sind teilweise racemisiert und entstehen wahrscheinlich durch oxydativen Abbau aus α, α' -Dimethylpimelinsäuren (XVI).

Für die optisch aktive Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_9$ wurde aus folgenden Daten die Konstitution XVII abgeleitet: a) Die Mikrotitration der Säure ergab zwei pK_{MCS}^* -Werte, 5,51 und 9,44. b) Im 1H -NMR.-Spektrum ihres Tetramethylesters (Fig. 3) findet man folgende Signale: ein Dublett bei $\delta 1,14$ (d , $J = 7, 6$ H) entsprechend zwei $CH_3CH<$ -Gruppen, ein sich von 2,6 bis 3,2 erstreckender Signalhaufen der zwei $CHCO$ -Protonen, vier Singulette zwischen 3,6 und 3,7 entsprechend vier Methoxylen und eine Überlagerung von zwei Dubletten mit dem Schwerpunkt bei $\delta 4,3$ der

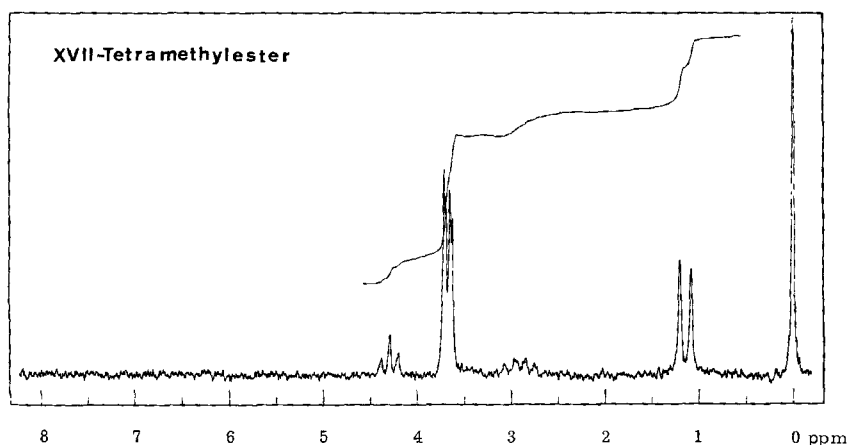


Fig. 3. 1H -NMR.-Spektrum des Tetramethylesters der Tetracarbonsäure XVII

zwei $>CH-O$ -Protonen. c) Die Säure liess sich durch Erhitzen mit 65proz. Bromwasserstoffsäure und katalytischer Hydrierung der Reaktionsprodukte mit Palladium-Kohle in alkalischer Lösung zu Methylbernsteinsäure abbauen.

Die Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_9$ besitzt eine symmetrische Konstitution XVII. Da die Säure optisch aktiv ist, sind die beiden Hälften nicht enantiomorph.

Das Hexahydrorifamycin SV lieferte durch Behandlung mit heisser Salpetersäure in Eisessig ein Säuregemisch, woraus nach Veresterung mit Diazomethan ein Dicarbonsäure-dimethylester $C_{16}H_{28}O_6$ isoliert wurde, der sich aufgrund folgender Befunde als β -Acetoxy- α, γ, η -trimethyl-azelainsäure-dimethylester (XVIII) identifizieren liess: Sein 1H -NMR.-Spektrum zeigt die Dublette von drei CH_3-CH -Gruppen im Bereich von $\delta 1$, die Signale einer CH_3COOCH -Gruppe bei 1,99 (s , 3 H) und 4,95 (dd , $J_1 = 5$, $J_2 = 7$, 1 H), wobei das letztere Signal den X-Teil eines ABX -Systems darstellt. Ein Singulett bei 3,60 (6 H) ist auf zwei CH_3OOC -Gruppen zurückzuführen. Ein Signalhaufen mit dem Schwerpunkt bei $\delta 2,5$ entspricht insgesamt zwei Methin-Protonen in α -Stellung zu Methoxycarbonyl-Gruppen. Die beiden Methin-Kohlen-

stoffatome tragen somit je eine Methyl-Gruppe. Das Massenspektrum bestätigte die α - und η -Stellung je einer Methylgruppe anhand eines intensiven «Umlagerungs»-Signals bei 88 m/e sowie durch die Abwesenheit eines entsprechenden Signals bei 74 m/e . Die dritte Methyl-Gruppe lässt sich bei Betrachtung der homologen Bruchstücke mit den Massenzahlen 101, 115, 129, –, 157 m/e aufgrund eines fehlenden Signals bei 143 m/e am γ -Kohlenstoffatom lokalisieren. Ein schwaches « $M + 1$ »-Signal bei 317 m/e ist mit den analytischen Daten im Einklang.

Die Pyrolyse der Verbindung $C_{16}H_{28}O_6$ ergab einen α,β -ungesättigten Ester, welcher im UV.-Spektrum ein Maximum bei 220 nm ($\log \epsilon = 4,4$) aufweist, womit die β -Position der Acetoxy-Gruppe gegenüber einem Methoxycarbonyl festgelegt ist. Der α,β -ungesättigte Ester liess sich durch successive Behandlung mit Ozon, Perameisensäure und heissem Alkali zu einer Dicarbonsäure abbauen, welche papierchromatographisch als Dimethylpimelinsäure identifiziert wurde.

4.2. Die Konstitution der durch Spaltung von Rifamycin S erhaltenen Verbindungen $C_{25}H_{42}O_8$ und $C_{24}H_{38}O_7$.⁴⁾ Die mit drastischen Abbaumethoden gewonnenen Resultate erleichterten die Konstitutionsbestimmung der Verbindungen $C_{25}H_{42}O_8$ und $C_{24}H_{38}O_7$, welche bei der Methanolyse des Imino-methyläthers $C_{38}H_{47}NO_{12}$ als Hauptprodukte entstehen. Wurde der Iminoäther mit 1proz. methanolischer Salzsäure nur 15 Min. behandelt, so bestand der neutrale Anteil des Reaktionsgemisches lediglich aus zwei, vermutlich stereoisomeren Verbindungen $C_{25}H_{42}O_8$ im Verhältnis 3:1, von welchen nur die vorherrschend gebildete näher untersucht wurde.

Das UV.-Spektrum dieser Verbindung deutet aufgrund eines Maximums bei 268 nm ($\log \epsilon = 4,5$) auf ein konjugiertes System hin. Im IR.-Spektrum sind bei 3520 cm^{-1} eine OH-Bande und bei 1740 cm^{-1} , sowie bei 1712 cm^{-1} intensive Carbonyl-Banden sichtbar. Nach Absättigung von zwei Doppelbindungen durch katalytische Hydrierung findet man nur eine starke Carbonyl-Bande bei 1740 cm^{-1} . Die Bande bei 1712 cm^{-1}

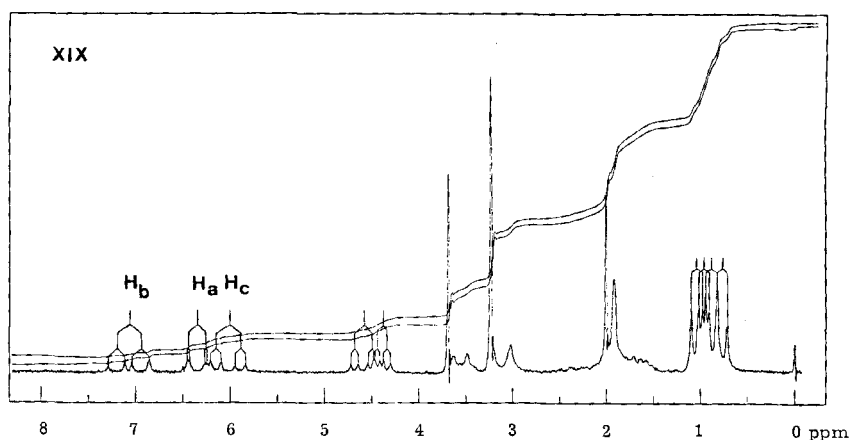


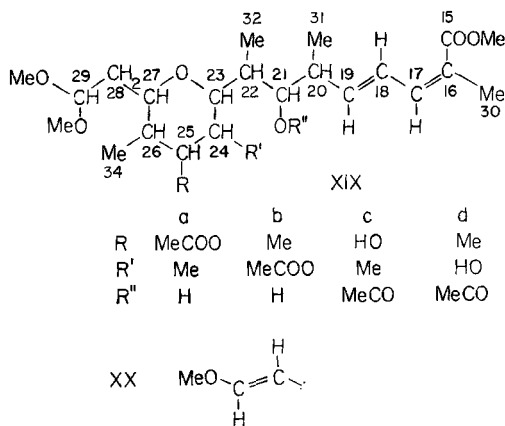
Fig. 4. 1H -NMR.-Spektrum der Verbindung $C_{25}H_{42}O_8$ (XIX)

⁴⁾ Zur Numerierung des Kohlenstoff-Gerüsts dieser Spaltprodukte verwenden wir im Anschluss an die Numerierung des aromatischen Spaltproduktes $C_{14}H_{11}NO_6$ und beginnend mit dem Carboxyl-Kohlenstoffatom die Nummern 15 bis 34.

kann demnach auf eine zu zwei Doppelbindungen linear konjugierte Estercarbonyl-Gruppe zurückgeführt werden.

Das ^1H -NMR.-Spektrum der Verbindung $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$ (Fig. 4) zeigt im Bereich von $\delta 1$ die Dublette ($J = 7$) von vier CH_3CH -Gruppen und bei 1,92 (3H) das breite Singulett eines ungesättigten Kohlenstoffatom gebundenen Methyls an. Ein scharfes Singulett bei 2,02 (3H) sowie ein Doppeldublett bei 4,58 ($J_1 = 4,5$, $J_2 = 10,5$, 1H) entsprechen einer CH_3COOCH -Gruppe und das Singulett bei 3,25 (6H) sowie das Signal bei 4,38 (dd , $J_1 = 4,5$, $J_2 = 6,5$, 1H) einer Dimethylacetal-Gruppierung. Die Signale bei 6,01 (dd , $J_1 = 15$, $J_2 = 6,5$, 1H), 6,34 (dd , $J_1 = 11$, $J_2 = 1,5$, 1H) und bei 7,06 (dd , $J_1 = 15$, $J_2 = 6,5$, 1H), welche anhand ihrer Multiplizität den drei olefinischen Protonen c, a und b im konjugierten ungesättigten System $-\text{H}_c\text{C}=\text{CH}_b-\text{CH}_a-\text{COOMe}$ zugeordnet wurden, gestatten es, die Stellung des an ungesättigten Kohlenstoffatomen gebundenen Methyls, sowie die Konfiguration der beiden $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindungen zu bestimmen. Die Grösse der Kopplungskonstante $J_{bc} = 15$ lässt keinen Zweifel übrig, dass die beiden Wasserstoffatome der γ, δ -Doppelbindung *trans* zueinander stehen. Wie aus $J_{ab} = 11$ ersichtlich, ist die Konformation um die β, γ -Bindung antiperiplanar. Die Konfiguration der Substituenten an der α, β -Doppelbindung lässt sich aus der Verschiebung des Signals von H_b gegenüber dem Signal von H_a um 0,7 Hz in Richtung niederer Magnetfeldstärken ableiten [18].

Schema 5



Wurde die Behandlung des Imino-methylesters mit 1proz. methanolischer Salzsäure auf eine Std. ausgedehnt, so resultierte neben dem Dimethylacetal-methylester in einer Ausbeute von etwa 10% eine Verbindung $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_7$, die aufgrund ihrer Spektren als der der Verbindung $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$ entsprechende Enolmethyläther-methylester erkannt wurde. Der Enolmethyläther zeigt im Unterschied zum Dimethylacetal im IR.-Spektrum eine zusätzliche Bande bei 1677 cm^{-1} . Im ^1H -NMR.-Spektrum (Fig. 5) ist das Signal des Protons am Acetal-Kohlenstoffatom abwesend. Man findet dagegen die Signale zweier zusätzlicher olefinischer Protonen H_A und H_B bei 6,47 (d , $J = 12,5$, 1H) bzw. 4,67 (dd , $J_1 = 12,5$, $J_2 = 7$, 1H), welche für eine Enoläther-Gruppierung typisch sind. Aus der Multiplizität der beiden Signale folgen die Anwesenheit eines

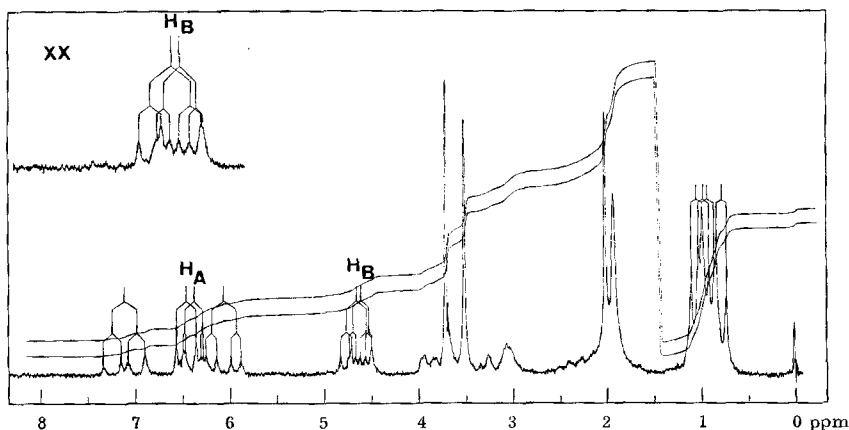


Fig. 5. ^1H -NMR.-Spektrum der Verbindung $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_7$ (XX)

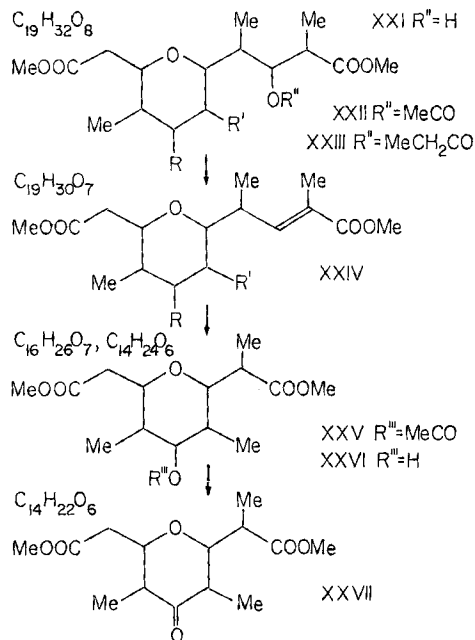
Methinprotonen in Allylstellung, sowie die *trans*-Konfiguration der Doppelbindung (vgl. Teilformel S. 2294).

Im Einklang mit den spektralen Befunden lässt sich der Enoläther-methylester $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_7$ durch Methanolyse in den Dimethylacetal-methylester $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$ überführen und aus der letzteren Verbindung durch Pyrolyse bei 300° zurückerhalten.

Wenn man die Ergebnisse des Abbaus von Hydrierungsprodukten des Rifamycins S mit Salpetersäure und die Information aus den spektralen Daten der Spaltprodukte $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$ und $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_7$ kritisch zusammenfasst, so folgt daraus für das Spaltprodukt $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$ die Formel XIX, in der man die drei Reste R, R' und R'' auf vier Arten (a, b, c und d) kombinieren kann. Die Verbindung $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_7$ ist der entsprechende Enoläther mit der Teilkonstitution XX. Diese Schlussfolgerung wurde durch einen systematischen Abbau des Spaltproduktes $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$ überprüft. Der systematische Abbau erlaubte auch zu entscheiden, wie die Reste R, R' und R'' lokalisiert sind. Der Dimethylacetal-methylester gab durch Ozonisierung, Nachoxydation mit Perameisensäure und Behandlung der sauren Oxydationsprodukte mit Diazomethan einen Hydroxy-acetoxy-dimethylester $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_8$, dessen Zusammensetzung die Lage des konjugierten Doppelbindungs-Systems in XX bestätigt. Im ^1H -NMR.-Spektrum dieser Verbindung sind bei $\delta 1$ die Dublette ($J = 7$) von vier CH_3CH -Gruppen deutlich zu sehen, ferner die Signale einer CH_3COOCH -Gruppe bei 2,02 (s, 3H) und bei 4,61 (dd, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 11$, 1H) sowie das Signal von zwei CH_3OOC -Gruppen bei 3,62 (s, 6H). Ein Hydroxyl liess sich durch das IR.-Spektrum ($\lambda_{\text{max}} = 3570 \text{ cm}^{-1}$) nachweisen und folgendermassen am C-(21) lokalisieren: Der aus dem Hydroxy-acetoxy-dimethylester mit Acetanhydrid/Schwefelsäure hergestellte Diacetoxy-dimethylester $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_9$, dessen IR.-Spektrum die Abwesenheit von Hydroxylen und dessen ^1H -NMR.-Spektrum die Signale der neuen Acetoxy-Gruppe bei 1,92 (s, 3H) und 5,27 (breites d, $J = 8,5$, 1H) anzeigen, gab beim Erhitzen auf 450° unter selektiver Eliminierung der β -ständigen Acetoxy-Gruppe einen α,β -ungesättigten Acetoxy-dimethylester $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_7$. Die $\text{C}=\text{C}-\text{O}$ -Gruppe folgt aus dem IR.-Spektrum ($\lambda_{\text{max}}: 1716, 1644 \text{ cm}^{-1}$) und aus dem UV.-Spektrum ($\lambda_{\text{max}}: 219 \text{ nm}$, $\log \epsilon = 4,13$). Das ^1H -NMR.-Spektrum des α,β -unge-

sättigten Esters zeigt die Signale von drei CH_3CH -Gruppen bei etwa $\delta 1$ sowie das geringfügig aufgespaltene Signal eines Methyls an ungesättigtem Kohlenstoffatom bei 1,80 (d , $J = 1,5$, 3 H). Die Anwesenheit einer CH_3COOCH -Gruppe zeigen die Signale bei 1,99 (s , 3 H) und 4,59 ($d \times d$, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 10,5$, 1 H) an. Das Signal eines olefinischen Protons bei 6,73 (m , $J_1 = 10$, $J_2 = 1,5$, 1 H) spricht durch seine chemische Verschiebung für dessen *cis*-Lage zur Methoxycarbonyl-Gruppe. Um zwischen den Formeln XXa und b einerseits und XXc und d andererseits zu entscheiden, wurde der Hydroxy-acetoxy-dimethylester $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_8$ mit Propionsäureanhydrid in einen Propio-

Schema 6



nyloxyacetoxy-dimethylester übergeführt, der durch Pyrolyse den α,β -ungesättigten Acetoxy-dimethylester und nicht das entsprechende Propionyloxy-Derivat lieferte. Daraus folgt, dass die freie Hydroxyl-Gruppe des Hydroxy-acetoxy-dimethylesters am C-(21) sitzt. Der ungesättigte Ester besitzt demnach die Konstitution XXIV und der Hydroxy-acetoxy-dimethylester und seine Derivate die Formeln XXI, XXII und XXIII. Die andere Frage, die sich aufgrund der Konstitution der Tetracarbonsäure $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_9$ nicht beantworten liess, d. h. ob die ursprüngliche Acetoxy-Gruppe des Dimethylacetals am C-(24) oder am C-(25) sitzt, konnte auf folgende Weise beantwortet werden: Der α,β -ungesättigte Acetoxy-dimethylester XXIV wurde ozonisiert, mit Perameisensäure nachoxydiert und die sauren Oxydationsprodukte mit Diazomethan behandelt.

Das ^1H -NMR.-Spektrum (Fig. 6) des so erhaltenen Acetoxy-dimethylesters $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7$ zeigt im Bereich um $\delta 1$ die Dublette ($J = 7$) von drei CH_3CH -Gruppen, bei 2,02 (s , 3 H) und 4,60 ($d \times d$, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 10,5$, 1 H) die Signale einer CH_3COOCH -

Gruppe, bei 3,62 (s, 6H) das Singulett der zwei Methoxycarbonyl-Gruppen sowie Signale bei 3,22 (dd, $J_1 = 2,5$, $J_2 = 10,5$, 1H) und bei 3,90 (m, $J_1 = 2,0$, $J_2 = 5,5$, $J_3 = 7,5$, 1H), welche Methinprotonen in α -Stellung zum Äther-Sauerstoff anzeigen. Der Acetoxy-dimethylester $C_{16}H_{26}O_7$ wurde zum entsprechenden Hydroxy-dimethylester

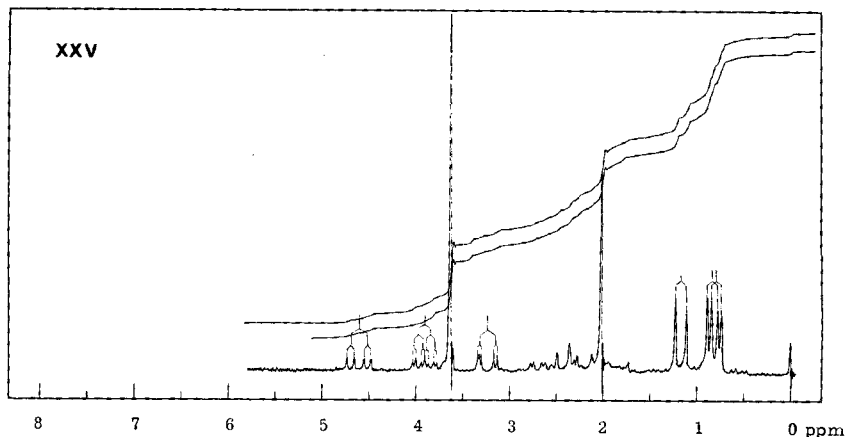


Fig. 6. ^1H -NMR.-Spektrum der Verbindung $C_{16}H_{26}O_7$ (XXV)

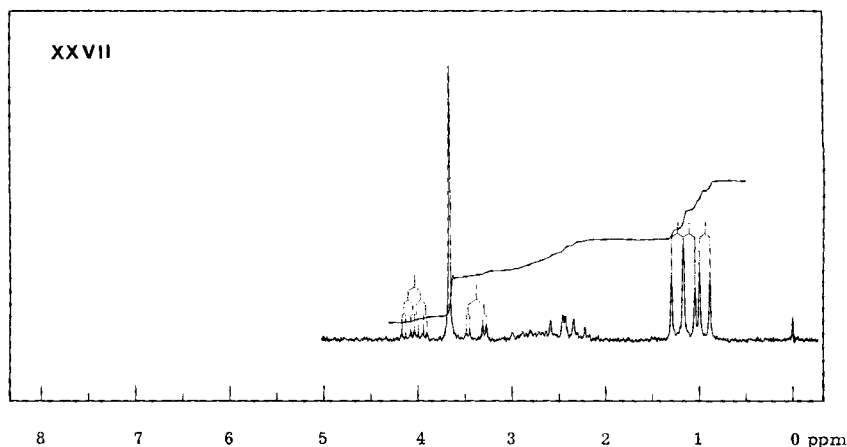


Fig. 7. ^1H -NMR.-Spektrum der Verbindung $C_{14}H_{22}O_6$ (XXVII)

$C_{14}H_{24}O_6$ methanolysiert, der mit Chrom(VI)-oxid in Pyridin den entsprechenden Oxodimethylester $C_{14}H_{22}O_6$ lieferte. Im ^1H -NMR.-Spektrum des Acetoxy-dimethylesters XXV (Fig. 6) einerseits und des Oxo-dimethylesters XXVII (Fig. 7) andererseits ist die Multiplizität der Signale von Methin-Protonen am C-(23) und C-(27) bei δ 3,2 bzw. 3,4 sowie bei 3,9 bzw. 4,0 praktisch unverändert, was nicht der Fall wäre, wenn die Sauerstoff-Funktionen am C-(24) wären. Es folgt daraus, dass diese Sauerstoff-Funktionen am C-(25) und die CH_3CH -Gruppe am C-(24) lokalisiert sein müssen (vgl. Formeln XXI bis XXVII). Die Konstitution XXVII für den Oxodimethylester wurde unter anderem auch durch sein Massenspektrum bestätigt, in dem

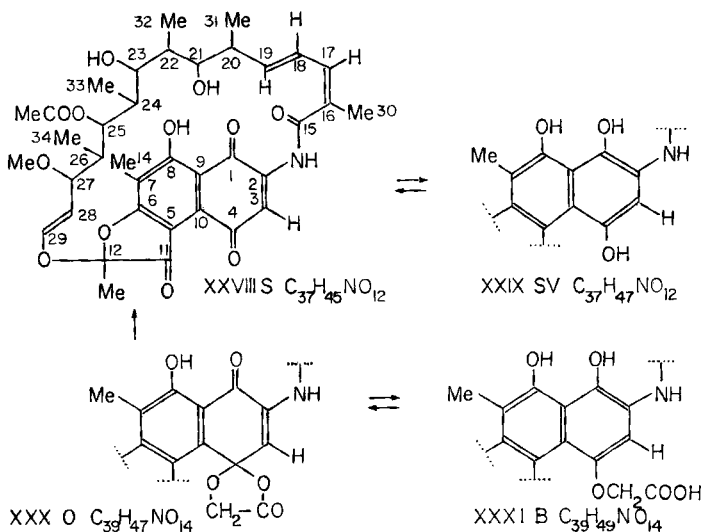
die Ionen $M - 73$ ($-\text{CH}_2\text{COOMe}$), $M - 87$ ($-\text{CHMeCOOMe}$) und $M - 161$ ($-\text{CH}_2\text{COOMe}$, $-\text{CHMeCOOMe}$, $-\text{H}$) vorkommen. Damit ist für das aus dem Imino-methyläther $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{NO}_{12}$ erhaltene Spaltprodukt $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$, welches das gesamte nichtaromatische Kohlenstoff-Gerüst der Rifamycine B, O, S und SV enthält, die Konstitution XIXa bewiesen.

5. Die *ansa*-Struktur der Rifamycine. Verknüpfung des aromatischen Teils mit der aliphatischen Brücke. – Den ersten, früheren Hinweis auf eine *ansa*-Struktur lieferten, wie schon erwähnt, die ^1H -NMR.-Spektren mit Methyl-Signalen bei ungewöhnlich hohem Magnetfeld. Es bleibt noch die Aufgabe übrig, die Verknüpfungsstellen des aromatischen und des aliphatischen Teilstückes, deren Konstitution aufgeklärt worden ist, eindeutig zu bestimmen. Im aromatischen Teil kann es sich nur um das Stickstoffatom am C-(2) und das Sauerstoffatom am C-(12) handeln. Durch den Nachweis einer Carboxyamid-Gruppierung ist auch das Carboxyl als eine Haftstelle der aliphatischen Brücke festgelegt. Als zweite Verknüpfungsstelle kommen aus sterischen Gründen – wegen der notwendigen Länge der Brücke – hauptsächlich C-(27) und C-(29) in Frage. Da jedoch bei der sauren Methanolyse nicht nur die C–O-Bindung am C-(12) gespalten, sondern auch, unter Verlust des Methyls der Methoxy-Gruppe, ein Tetrahydropyran-Ring gebildet wird, so lässt sich aus der Konstitution des Spaltproduktes die Verknüpfungsstelle nicht direkt ableiten.

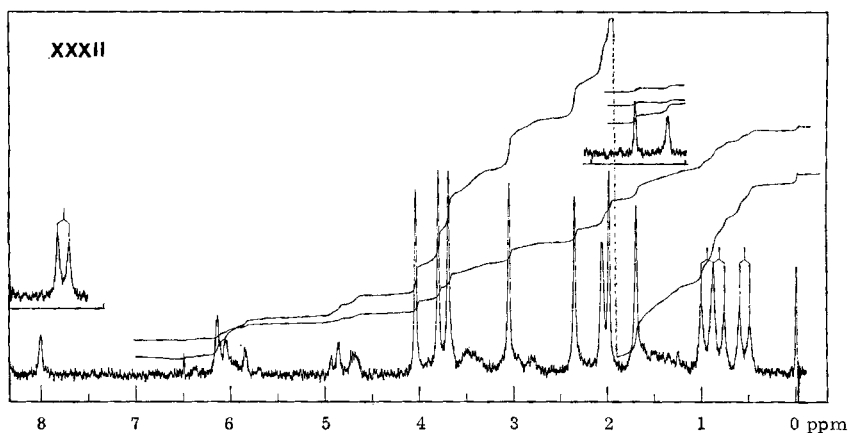
Aus den ^1H -NMR.-Spektren der Hydrierungsprodukte von Rifamycin S folgt jedoch, dass die Enol-Doppelbindung am Ende der Kette zwischen C-(28) und C-(29) liegen muss. Wenn die aliphatische Brücke mit dem aromatischen Teil am C-(27) verknüpft wäre, so müsste die Methoxy-Gruppe am ungesättigten C-(29) oder am gesättigten C-(23) sitzen. Das erste kann aber aufgrund der chemischen Verschiebung des CH_3O -Signals im ^1H -NMR.-Spektrum von Rifamycin S ($\delta \sim 3,1$) nicht zutreffen. Die Lage dieses Signals ändert sich auch kaum nach katalytischer Hydrierung der Doppelbindung. Man muss deshalb annehmen, dass C-(29) die gesuchte Verknüpfungsstelle ist. Die Methoxy-Gruppe sitzt demnach entweder am C-(27) oder am C-(23). Der glatte Verlauf der sauren Methanolyse und der Spaltung des Methoxyls deuten stark auf eine Allyl-Stellung dieser Gruppe, d. h. auf C-(27) hin. In diesem Falle kann man erwarten, dass sich durch Einwirkung von Säure unter relativ milden Bedingungen ein stabiles Allyl-Kation als Zwischenprodukt bildet, das mit dem Hydroxyl-Sauerstoffatom am C-(23) unter Ringbildung reagiert. Es entstehen dabei zwei am C-(27) epimere Verbindungen: das Dimethylacetal $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$ und das damit stereoisomere Nebenprodukt. Das dritte Methanolyseprodukt des Methyl-iminoäthers, der Enolmethyläther $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_7$, entsteht allem Anschein nach nicht durch Abspaltung von Methanol aus dem Dimethylacetal, da das letztere unter den Bedingungen der Methanolyse keine nachweisbaren Mengen des Enolmethyläthers liefert.

6. Die Konstitutionsformeln der Rifamycine B, O, S und SV. – Aus allen bisher besprochenen Tatsachen und ihrer Interpretation folgt, dass Rifamycin S die Konstitution XXVIII besitzt. Die Konstitutionsformeln der damit verknüpften Rifamycine SV, O und B sind durch die Formeln XXIX, XXX bzw. XXXI wiedergegeben. Wie schon erwähnt, lässt sich damit die starke Abschirmung der Signale von zwei CH_3CH -Gruppen in ^1H -NMR.-Spektren durch die π -Elektronen des aromatischen Teiles erklären.

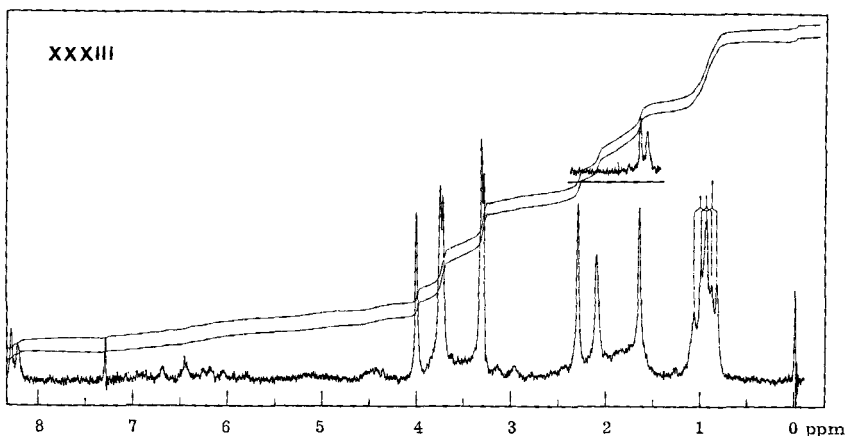
Schema 7



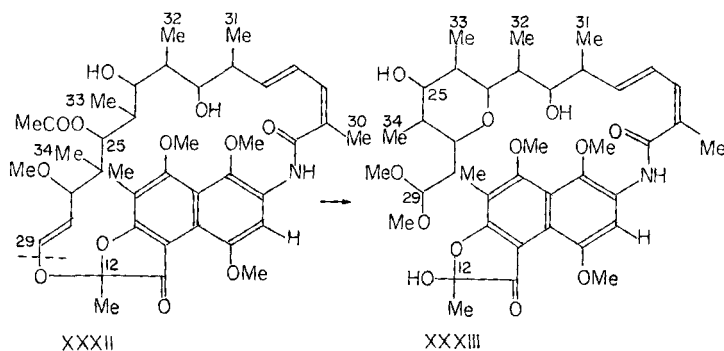
Besonders eindrücklich wird dieser Effekt, wenn man z.B. die 1H -NMR.-Spektren des Rifamycin SV-trimethyläthers XXXII (Fig. 8) mit demjenigen seines Methanololyseproduktes XXXIII (Fig. 9) vergleicht, in dem der *ansa*-Ring am C-(12) gespalten ist. Im Spektrum der ersten Verbindung findet man zwei CH_3CH -Dublette bei $-0,59$ und $+0,54$ ppm, während die Signale der entsprechenden Gruppen im Spektrum der Verbindung XXXIII alle bei etwa 1,0 ppm zu liegen kommen.

Fig. 8. 1H -NMR.-Spektrum des Rifamycin SV-trimethyläthers XXXII

7. Die relative und die absolute Konfiguration der Rifamycine B, O, S und SV. – Aus der Konstitution der Rifamycine B, S und SV folgt, dass es in diesen Verbindungen neun Chiralitätszentren und drei Doppelbindungen gibt, deren relative Konfigurationen bestimmt werden sollten. Die Konfiguration an den Doppelbindungen

Fig. 9. ^1H -NMR.-Spektrum der Verbindung XXXIII

Schema 8



liess sich wie besprochen auf Grund der ^1H -NMR.-Spektren der Rifamycine und ihrer Abbauprodukte festlegen. Die eindeutige Bestimmung der relativen Konfiguration an neun Chiralitätszentren auf chemischem und spektroskopischem Wege wäre eine zeitraubende mühevoll Arbeit, die durch die röntgenographische Strukturanalyse [19] überflüssig wurde. Es sei jedoch nicht unerwähnt, dass man aus den ^1H -NMR.-Spektren der Abbauprodukte schon vorher Schlüsse über die relativen Konfigurationen gewisser Molekelteile ziehen konnte, die durch die röntgenographische Strukturanalyse bestätigt wurden. So liessen sich z.B. die relativen Konfigurationen an C-(23), C-(24), C-(25) und C-(26) im Acetoxy-dimethylester $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7$ (XXV) aufgrund der gut getrennten Signale der Methin-Protonen an C-(22), C-(23) und C-(25) festlegen (vgl. Fig. 6, 10). Wenn man die plausible Annahme macht, dass das Oktett bei 2,7 ($J_1 = 2,5$, $J_2 = 7$) dem Proton am C-(22) entspricht, so ist J_2 auf die Kopplung mit dem Methyl ($J = 7$) zurückzuführen. J_1 ist demnach die Kopplungskonstante mit dem Proton am C-(23), welchem das Quadruplett bei 3,22 ($J_1 = 2,5$, $J_2 = 10,5$) zugeordnet werden kann. Die grössere Kopplungskonstante $J_2 = 10,5$ dieses Protons ist somit einem axialen Proton zuzuschreiben. Das Quadruplett des Protons am C-(25)

bei 4,60 ($J_1 = 4,5$, $J_2 = 10,5$) zeigt aufgrund von $J_2 = 10,5$, dass dieses ebenfalls die axiale Lage besitzen muss, woraus wegen der kleinen Kopplungskonstante $J_1 = 4,5$ folgt, dass das Proton am C-(26) in äquatorialer Lage sitzt.

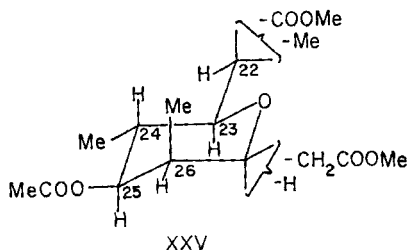


Fig. 10. Teilkonfiguration der Verbindung $C_{16}H_{26}O_7$ (XXV)

Die absolute Konfiguration der Rifamycine wurde durch chemische Verknüpfung der durch Abbau erhaltenen optisch aktiven (+)- α,α' -Dimethylpimelinsäure (XVI) mit der (S)- α -Methylönanthsäure bestimmt [4]; es ist dazu in dieser Mitteilung nichts hinzuzufügen.

Die relative und die absolute Konfiguration der acht von den neun Chiralitätszentren in Rifamycinen ist in der vorhergehenden 4. Mitteilung [1] durch die *Fischer'sche* Projektion wiedergegeben. Sie bilden die Grundlage für die Planung von synthetischen Versuchen und für die Überlegungen über die Biosynthese auf dem Gebiet der Rifamycine.

Wir danken Prof. P. Sensi von der *Lepetit SpA*, Milano, für die Förderung dieser Arbeit, die er durch Überlassung von Ausgangsmaterial, durch die Mitteilung unveröffentlichter Ergebnisse und durch ein Stipendium grosszügig unterstützte.

Experimenteller Teil

Die Smp. sind nicht korrigiert. Zur präparativen Chromatographie diente, wenn nicht anders angegeben, das «Kieselgel 0,05–0,20 mm für Chromatographie Merck». Die Papierchromatographie von Säuren wurde mit dem System 1-Propanol/Ammoniak/Wasser 6:3:1 an *Whatman-I*-Papier durchgeführt. Die Anfärbung der Flecke erfolgte mit Methylrot. Die Absorptionsspektren im UV. und im Sichtbaren (VIS.) wurden mit einem *Cary 14* Spektrophotometer in Feinsprit (wenn nicht anders angegeben) gemessen; $\lambda_{\max}$ in nm (loge). Die IR.-Spektren wurden mit einem *Perkin-Elmer*-Spektrographen Modell 21 aufgenommen; $\nu_{\max}$ in cm^{-1} . Die NMR.-Spektren wurden mit einem *Varian A-60*-Spektrometer aufgenommen; die chemischen Verschiebungen in ppm sind bezogen auf $\delta(\text{CH}_3)_4\text{Si} = 0$, Kopplungskonstanten J in Hz. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte auf einem *Hitachi-Perkin-Elmer*-RMU-6A- bzw. 6D-Spektrometer.

Rifamycin O (XXX). Von *Lepetit* zur Verfügung gestelltes Rifamycin O wurde 3mal aus Methylenchlorid/Methanol umkristallisiert und 5 Tage bei 50°/0,03 Torr getrocknet. – IR. (KBr): 1821 s, 1725 vs, 1680 w, 1665 s, 1630 s, 1600 s. – ^1H -NMR. (CDCl_3): 0,41 (d , $J = 7$, 3H); 0,75 (d , $J = 7$, 3H); 0,90 (d , $J = 7$, 3H); 1,00 (d , $J = 7$, 3H); 1,66 (s , 3H); 2,0 (s , 6H); 2,32 (s , 3H); 3,15 (s , 3H); 1,3–3,5 (sh , 9H); 4,3–4,7 (sh , 3H); 5,7–6,5 (sh , 3H); 7,77 (s , 1H); 8,38 (s , 1H); 12,8 (s , 1H).

$\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{NO}_{14}$	Ber. C 62,30	H 6,28	N 1,86	OCH_3 4,12	7CCH_3 13,93%
	Gef. „ 61,84	„ 6,35	„ 2,05	„ 4,39	„ 13,58%

Rifamycin S (XXVIII). Das von *Lepetit* erhaltene Rifamycin S wurde 4mal aus Methanol umkristallisiert und 7 Tage bei 100°/0,03 Torr getrocknet. – UV., VIS. (0,1 N HCl in Feinsprit): 219 (4,51), 281 (4,48), 340 (3,92), 410 (3,72). – IR. (CHCl_3): 3440 m, 3370 m, 1734 s, 1702 s, 1640 s,

1616 s, 1597 s. – $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3): Fig. 1. – pK_{MCS}^* : 7,16. Das Rifamycin S gibt einen dunkelroten Komplex mit Boressigsäureanhydrid.

$\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{NO}_{12}$ Ber. C 63,87 H 6,52% Gef. C 63,81 H 6,57%

Tetrahydorrifamycin S. 10 g Rifamycin S wurden mit 500 mg Pd/C-Katalysator bei 25°/1 Atm. in Äthanol hydriert, wobei die Wasserstoffaufnahme (2,96 mol-Äqu.) nach 4 Std. zum Stillstand kam. Das Gemisch wurde durch Celit filtriert, das Filtrat eingedampft, der Rückstand in 1 l Methanol gelöst, mit einer Lösung von 40 g Natriumnitrit in 250 ml Wasser versetzt und die Mischung anschliessend mit 2 N Salzsäure schwach angesäuert. Aus der Lösung fielen nach dem Abkühlen auf –10° 5 g dunkelgelbe Kristalle aus und nach dem Einengen im Vakuum weitere 4 g amorphes Pulver. Zur Analyse wurde 4mal aus Methanol umkristallisiert und 7 Tage bei 100°/0,01 Torr getrocknet. – UV. (0,1 N HCl in Feinsprit): 235 (4,35), 280 (4,32), 340 (3,92), 415 (3,67). Differential-UV. Rifamycin S/Tetrahydorrifamycin S (0,1 N HCl in Feinsprit): 220 (4,09), 256 (4,04). – IR. (Nujol): 3440 m, 3380 m, 1740 s, 1705 s, 1642 s, 1625 s, 1602 s.

$\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{NO}_{12}$ Ber. C 63,50 H 7,06 N 2,00% Gef. C 63,52 H 7,06 N 2,00%

Hexahydorrifamycin S. 6 g Rifamycin S wurden in 60 ml Äthanol mit 1 g vorhydriertem Platin-Katalysator 15 Std. bei 21°/723 Torr hydriert (Wasserstoffaufnahme 4,8 mol-Äqu.). Dann wurde vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingedampft. 0,50 g des Rückstandes wurden in 50 ml Methanol gelöst und mit einer Lösung von 2,5 g Natriumnitrit in 12 ml Wasser versetzt. Aus der mit 2 N Salzsäure schwach angesäuerten Lösung fiel nach Einengen im Vakuum ein gelbbrauner Niederschlag aus (0,45 g), der nach 3maliger Kristallisation aus Methanol 0,056 g (11% d. Th.) orangegelber Kristalle vom Smp. 161° lieferte, die 7 Tage bei 100°/0,03 Torr getrocknet wurden. – UV., VIS. (0,1 N HCl in Feinsprit): 236 (4,41), 272 (4,36), 337 (3,97), 410 (3,61). – $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3): 0,2 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 0,55 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 0,65 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 0,99 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 1,2–4,0 (sh); 1,35 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 1,65 (s, 3H); 2,0 (s, 3H); 2,3 (s, 3H); 3,2 (s, 3H); 4,85 (dd, $J_1 = 14, J_2 = 1, 1\text{H}$); 7,75 (s, 1H); 8,4 (s, 1H); 12,6 (s, 1H).

$\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{NO}_{12}$ Ber. C 63,32 H 7,33% Gef. C 63,29 H 7,41%

Methylierung von Rifamycin S. Eine Lösung von 40 g Rifamycin S in 800 ml Chloroform wurde nach Zusatz von 320 ml Methanol, 400 g Methyljodid und 60 g Silberoxid 45 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Filtration durch Celit und Eindampfen des Filtrates wurde der Rückstand an 1,2 kg Kieselgel chromatographiert (Methylenchlorid/Äther 1:1), wobei man Fraktionen zu 220 ml auffing und diese mittels Dünnschichtchromatographie (Methylenchlorid + 10% Aceton) untersuchte.

Imino-methyläther. Die Fraktionen 11–12 enthielten 4 g einer orangegelben Verbindung, die aus Äther kristallisiert und 5 Tage bei 100°/0,03 Torr getrocknet wurde. Smp.: 225°. – UV., VIS.: 221 (4,61), 279 (4,41), 337 (3,93), 405 (3,65). – IR. (CHCl_3): 3510 m, 1725 s, 1655 m, 1632 vs, 1590 vs. – $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3): 0,70 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 0,75 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 0,87 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 1,04 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 1,3–2,5 (sh, 5H); 1,70 (s, 3H); 2,00 (d, $J = 1, 2\text{H}$); 2,08 (s, 3H); 2,23 (s, 3H); 2,5–3,6 (sh, 4H); 3,15 (s, 3H); 3,96 (s, 3H); 4,2–6,3 (sh, 6H); 5,93 (s, 1H); 13,30 (s, 1H). – pK_{MCS}^* : 9,38.

$\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{NO}_{12}$ Ber. C 64,30 H 6,67% Gef. C 64,32 H 6,70%

8-O-Methyl-rifamycin S. Die Fraktionen 16–36 ergaben nach dem Eindampfen 32 g neutralen, gelben Rückstand, der zur Analyse 2mal aus Heptan umgefällt und eine Woche bei 100°/0,03 Torr getrocknet wurde. – UV., VIS.: 220 (4,48), 264 (4,40), sh 297 (4,26), sh 347 (3,88). – IR. (CCl_4): 3490 w, 3370 w, 1745 s, 1702 s, 1670 s, sh 1660 m, 1630 w, 1595 s, 1580 s. – $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3): 0,18 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 0,62 (d, $J = 6, 5, 3\text{H}$); 0,80 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 0,93 (d, $J = 7, 3\text{H}$); 1,3–2,6 (sh, 5H); 1,67 (s, 3H); 1,97 (s, 3H); 2,03 (s, 3H); 2,36 (s, 3H); 2,6–3,6 (sh, 4H); 3,08 (s, 3H); 3,94 (s, 3H); 4,48 (d, $J = 10, 5, 1\text{H}$); 4,95 (m, $J_1 = 8, J_2 = 13, 1\text{H}$); 5,5–6,4 (sh, 4H); 7,52 (s, 1H); 8,28 (s, 1H). $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{NO}_{12}$ Ber. C 64,30 H 6,67% Gef. C 64,05 H 6,98%

8-O-Methyl-rifamycin SV. Eine Lösung von 10 g 8-O-Methyl-rifamycin S in 500 ml Methanol wurde mit 10 g Ascorbinsäure in 60 ml Wasser versetzt, nach 30 Min. mit 3 l Wasser verdünnt und zweimal mit je 500 ml Benzol ausgeschüttelt. Die mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschenen Benzolauszüge wurden getrocknet und eingedampft, wobei man 10 g tiefroten amorphen Rückstand erhielt, der sich in 2 N Kaliumcarbonatlösung tiefblau löst. UV., VIS.: 226 (4,67), 317 (4,34), 470 (3,62). pK_{MCS}^* : 9,87.

1-O,4-O,8-O-Trimethyl-rifamycin SV (XXXII). 5 g 8-O-Methyl-rifamycin SV wurden mit 8 ml Methyljodid, 10 ml trockenem Aceton und 2,5 g trockenem Kaliumcarbonat 15 Std. im geschlossenen Rohr bei 113° geschüttelt. Das mit 500 ml Wasser verdünnte Gemisch lieferte durch Extraktion mit Äther und Eindampfen der Ätherauszüge 4,5 g orangegelben Rückstand, woraus nach mehrmaliger Chromatographie an Kieselgel (Äther) 0,47 g einer hellgelben amorphen Verbindung isoliert werden konnte, welche 50 Std. bei 25°/0,03 Torr getrocknet wurde. – UV., VIS.: 228 (4,65), 295 (4,50), 410 (3,70). – IR. (CCl₄): 3500 m, 3420 m, 1717 vs, 1675 s, 1600 m. – ¹H-NMR. (CCl₄): s. Fig. 8.

C₄₀H₅₃NO₁₂ Ber. C 64,93 H 7,22% Gef. C 64,70 H 7,47%

Methanolysenprodukt XXXIII von 1-O,4-O,8-O-Trimethyl-rifamycin SV. Die Lösung von 0,3 g 1-O,4-O,8-O-Trimethyl-rifamycin SV in 2 ml 1proz. methanolischer Salzsäure wurde nach 15 Std. auf Wasser gegossen. Der daraus erhaltene Ätherauszug ergab nach Eindampfen und 2maliger Chromatographie an Kieselgel (Äther) 0,119 g festen Schaum, der 70 Std. bei 20°/0,03 Torr getrocknet wurde. – UV., VIS.: 223 (4,60), 288 (4,52), 405 (3,74). – IR. (CHCl₃): 3620 w, 3490 m, 3420 m, 1705 vs, 1665 s, 1600 s. – ¹H-NMR. (CDCl₃): Fig. 9.

C₃₉H₅₅NO₁₂ Ber. C 64,18 H 7,60% Gef. C 63,84 H 7,74%

1-O,4-O-Dimethyl-rifamycin SV. 10 g Rifamycin SV wurden mit 50 g Methyljodid, 30 ml Aceton und 10 g Kaliumcarbonat im geschlossenen Rohr 15 Std. auf 100° erhitzt. Die Aufarbeitung ergab 7 g orangegelben Rückstand, woraus durch Chromatographie an Kieselgel (Äther) 2,15 g neutraler, orangefarbener, fester Schaum isoliert werden konnte, welcher 7 Tage bei 70°/0,01 Torr getrocknet wurde. – UV., VIS.: 230 (4,60), 305 (4,33), 440 (3,60). – IR. (CHCl₃): 3400 m, 1705 s, 1665 vs, 1595 m, 1570 s. – ¹H-NMR. (CDCl₃): wie 1-O,4-O,8-O-Trimethyl-rifamycin SV, jedoch fehlt Signal bei 4,05 (s, 3H), dafür zusätzlich: 11,90 (s, 1H).

C₃₉H₅₁NO₁₂ Ber. C 64,54 H 7,08% Gef. C 64,72 H 7,49%

8-O-Methyl-20-O,23-O-diacetyl-rifamycin S. Eine Lösung von 8 g 8-O-Methyl-rifamycin S in 160 ml Acetanhydrid/Pyridin 1:1 wurde 14 Tage bei 20° im Dunkeln stehengelassen und sodann auf Wasser gegossen. Nach 2 Std. wurde mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und der Auszug mit 15 proz. wässriger Essigsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser mehrmals gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde 2mal aus Äther und einmal aus Methylenchlorid/Hexan kristallisiert, wobei man 6 g hellgelbe Kristalle vom Smp. 252° erhielt, welche 7 Tage bei 100°/0,01 Torr getrocknet wurden. – IR. (CHCl₃): 3360 m, 1735 vs, 1695 m, 1668 vs, 1635 m, 1593 vs, 1578 vs. – ¹H-NMR. (CCl₄): –0,10 (d, J = 7, 3H); +0,70 (d, J = 7, 3H); 0,83 (d, J = 7, 3H); 0,97 (d, J = 7, 3H); 1,6–2,8 (sh, 2H); 1,75 (s, 3H); 1,87 (s, 3H); 1,97 (s, 6H); 2,05 (s, 3H); 2,34 (s, 3H); 3,30 (m, 1H); 3,95 (s, 3H); 4,4–5,3 (sh, 4H); 5,5–6,3 (sh, 4H); 7,78 (s, 1H); 8,26 (s, 1H).

C₄₂H₅₁NO₁₄ Ber. C 63,54 H 6,48% Gef. C 63,57 H 6,69%

Triacetyl-rifamycin SV. Eine Lösung von 15 g Rifamycin SV in 150 ml Acetanhydrid wurde nach Zusatz von 10 ml Pyridin eine Std. bei 25° stehengelassen, anschliessend im Vakuum eingengt und mit Wasser versetzt. Nach 90 Min. wurde das Gemisch mit Chloroform ausgeschüttelt. Der mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschene, dann getrocknete und eingedampfte Chloroformauszug ergab nach 2maliger Kristallisation aus Äther 5 g hellgelbes, neutrales Produkt vom Smp. 251°, welches 7 Tage bei 80°/0,03 Torr getrocknet wurde. – UV., VIS.: 229 (4,50), 300 (4,26), 360 (3,38), 421 (3,56). – IR. (Nujol): 3500 m, 1780 vs, 1730 vs, 1675 vs, 1640 m, 1605 w, 1575 w. – IR. (CHCl₃): 0,045–5proz.): 3508. – ¹H-NMR. (CDCl₃): –0,3 (d, J = 7, 3H); +0,75 (d, J = 6,5, 3H); 0,90 (d, J = 7, 3H); 1,00 (d, J = 7, 3H); 1,6–2,7 (sh, 4H); 1,81 (s, 3H); 2,05 (s, 6H); 2,12 (s, 3H); 2,25 (s, 6H); 2,40 (s, 3H); 3,02 (s, 3H); 2,7–4,1 (sh, 5H); 4,6–5,4 (sh, 2H); 5,5–6,7 (sh, 4H); 7,00 (s, 1H); 11,20 (s, 1H).

C₄₃H₅₃NO₁₅ Ber. C 62,68 H 6,48% Gef. C 62,48 H 6,81%

Abbau von Rifamycin S mit Ozon. In eine Lösung von 2,5 g Rifamycin S in 40 ml Methylenchlorid wurde bei –70° 45 Min. ein Überschuss Ozon eingeleitet. Die blaue Lösung wurde im Vakuum bei einer Temperatur unter –20° eingedampft, den Rückstand löste man in 20 ml 85proz. Ameisensäure, setzte 4 ml Perhydrol zu und liess über Nacht stehen. Nach Zerstörung des überschüssigen Perhydrols mit Pd/C-Katalysator wurde das abgedampfte Gemisch 3mal mit je

30 ml warmem Aceton ausgezogen. Der acetonunlösliche Rückstand wurde in heissem Wasser gelöst, filtriert und eingedampft. Den Rückstand (0,57 g) chromatographierte man an einer Cellulose-Säule ($r = 1$, 2 cm, $h = 30$ cm) mit dem System 1-Propanol/Ammoniak/Wasser 6:3:1, wobei man Fraktionen von 6 ml auffing. Die Fraktionen 19–23 enthielten 0,393 g eines Ammoniumsalzes, Rf 0,58 und die Fraktionen 26–30 0,2 g eines Ammoniumsalzes, Rf 0,34.

4,6-Dihydroxy-5-methyl-benzol-(1,2,3)-tricarbonsäure $C_{10}H_8O_8$. Die 198 mg des Ammoniumsalzes, Rf 0,34, wurden in wässriger Lösung an einer Säule von 10 ml Dowex-50 (H^+ -Form) in die freie Säure (151 mg) übergeführt, welche nach 3maligem Umlösen aus Wasser in farblosen Nadeln vom Smp. 189° kristallisierte. – UV., VIS.: 239 (4,46), 314 (3,56). – IR. (KBr): 1710 s, 1678 s, 1605 s. pK_{MCS}^* : 3,59/5,55/9,60. Aus 20 mg der freien Säure erhielt man nach Sublimation im Hochvakuum 15 mg kristallines Anhydrid, Smp. 189° . – IR. (KBr): ν_{max} 1830 m, 1750 s, 1670 s, 1620 s.

$C_{10}H_8O_7$ Ber. C 50,43 H 2,54% Gef. C 49,89 H 2,64%

O,O'-Dimethyl-trimethylester I. In eine Lösung von 50 mg der Tricarbonsäure in 2 ml Methanol wurde ein Überschuss ätherischer Diazomethanolung destilliert. Das eingedampfte Gemisch ergab nach Chromatographie an Kieselgel ($CHCl_3$) und Kristallisation aus Hexan 50 mg farblose Nadeln, Smp. 73° . – IR. (KBr): 1730 s, 1716 s, 1575 s. – 1H -NMR. (CCl_4): 2,22 (s, 3H); 3,79 (s, 9H); 3,81 (s, 6H).

$C_{15}H_{18}O_8$ Ber. C 55,21 H 5,56% Gef. C 55,02 H 5,51%

Zur Herstellung eines Vergleichspräparates wurde in eine Lösung von 4 mg 4,6-Dimethoxy-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure (II) in 1 ml Methanol ein Überschuss ätherischer Diazomethanolung destilliert, das Gemisch eingedampft und der Rückstand nach Chromatographie an Kieselgel ($CHCl_3$) aus Hexan umkristallisiert, wobei man 2 mg farblose Kristalle einer Substanz erhielt, die aufgrund von Smp., Misch-Smp. und IR.-Spektrum (KBr) mit dem O,O'-Dimethyl-trimethylester I identisch ist.

Dicarbonsäure $C_{12}H_{10}O_8$ (III). 393 mg Ammoniumsalz, Rf 0,58, wurden mittels einer Säule von 10 ml Dowex-50 (H^+ -Form) in die freie, amorphe Säure (314 mg) übergeführt. – UV., VIS.: 241 (4,43), 300 (3,87), 300 (3,94). – IR. (KBr): 1725 s, 1690 s (breit), 1607 vs. – pK_{MCS}^* : 3,04/6,64. Die Verbindung gibt die Jodoform-Reaktion.

O,O'-Diacetyl-dicarbonsäureanhydrid. Aus einer Lösung von 156 mg Dicarbonsäure in 3 ml Acetanhydrid fiel nach Zusatz von 0,2 ml Pyridin innerhalb von 15 Std. ein feinkristalliner Niederschlag aus, der nach dem Abpipettieren der überstehenden Lösung bei 100° im Vakuum getrocknet und dann 3mal aus Benzol umkristallisiert wurde, wobei man 65 mg farbloser Kristalle vom Smp. 227° erhielt. – IR. (KBr): 1856 s, 1777 s, 1745 s, 1632 m, 1603 m.

$C_{16}H_{12}O_9$ Ber. C 55,18 H 3,47% Gef. C 55,55 H 3,42%

O,O'-Dimethyl-dicarbonsäure-dimethylester IV. Eine Lösung von 144 mg Dicarbonsäure in 30 ml Chloroform wurde nach Zusatz von 10 ml Methanol, 10 ml Methyljodid und 1 g Silberoxid 15 Std. unter Rückfluss gekocht. Das durch Celit filtrierte und dann eingedampfte Gemisch ergab nach Chromatographie an Kieselgel ($CHCl_3$) und Kristallisation aus Hexan 110 mg farbloser Nadeln vom Smp. 109° . – IR. (CCl_4): 1735 vs, 1595 vs. – 1H -NMR. (CCl_4): 1,52 (s, 3H); 2,25 (s, 3H); 3,21 (s, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,90 (s, 6H).

$C_{16}H_{18}O_8$ Ber. C 56,80 H 5,36% Gef. C 56,49 H 5,23%

Dicarbonsäure-dimethylester V. Eine Suspension von 200 mg Dicarbonsäure in 4 ml Chloroform wurde nach Zusatz von 1 ml Methanol, 300 mg Methyljodid und 250 mg Silberoxid 15 Std. im geschlossenen Rohr bei 70° geschüttelt. Das filtrierte Gemisch wurde mit Methylenchlorid verdünnt, mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und eingedampft. Der Eindampfrückstand ergab nach Chromatographie an Kieselgel (Methylenchlorid + 5% Aceton) ein farbloses Harz, das bei $180^\circ/0,01$ Torr destilliert wurde. – IR. (CCl_4): 3450 m, 1732 s, 1675 s, 1604 s; 3- μ -Bereich gedehnt, 0,0166proz. Lösung: 3570, 3460 (breit). – 1H -NMR. (CCl_4): 1,55 (s, 3H); 2,10 (s, 3H); 3,6–4,4 (sh, 1H); 3,87 (s, 3H); 3,90 (s, 3H); 12,00 (s, 1H).

$C_{14}H_{14}O_8$ Ber. C 54,19 H 4,55% Gef. C 54,41 H 4,88%

4-O-Methyl-6-O-acetyl-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure-trimethylester (VII). Eine Lösung von 15 mg Dicarbonsäure-dimethylester V in 0,5 ml Äthanol wurde mit einer Lösung von 100 mg

Natriummetaperjodat in 0,5 ml Wasser versetzt, nach 5 Std. mit Wasser verdünnt und mit Äther ausgeschüttelt. Der eingedampfte Ätherauszug wurde in 1 ml Methanol aufgenommen und mit einem Überschuss ätherischer Diazomethanolösung versetzt. Das eingedampfte Gemisch (15 mg) lieferte nach Chromatographie an Kieselgel (Methylenchlorid + 3% Aceton) und anschliessender Destillation bei 160°/0,01 Torr ein zähflüssiges Öl. – IR. (CCl_4): 1780 s, 1240 vs, 1595 sh. – $^1\text{H-NMR}$. (CCl_4): 2,11 (s, 3H); 2,24 (s, 3H); 3,78 (s, 6H); 3,82 (s, 6H).

$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ Ber. C 54,24 H 5,12% Gef. C 54,39 H 5,25%

Methanolyse von VII. Eine Lösung von 52 mg des Acetylderivates VII in 8proz. methanolischer Salzsäure wurde nach 40 Std. eingedampft, der Rückstand in Methanol gelöst und mit einem Überschuss ätherischer Diazomethanolösung versetzt. Das eingedampfte Gemisch erwies sich nach Chromatographie an Kieselgel (Methylenchlorid + 5% Aceton) und 2maliger Kristallisation aus Hexan anhand von Smp., Misch-Smp. und IR.-Spektrum (CHCl_3) als identisch mit 4,6-Dimethoxy-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure-trimethylester (I).

Hydrierung des «Chinon-diazids XI» aus Rifamycin O zu XII. – «Chinon-diazid XI». Eine Lösung von 750 mg Rifamycin O in 20 ml Methanol wurde nach Zusatz von 200 mg *p*-Toluolsulfonylhydrazid 150 Min. unter Rückfluss gekocht, dann auf Wasser gegossen und mit Benzol ausgeschüttelt. Der eingedampfte Benzolauszug wurde an Kieselgel chromatographiert (Benzol/Aceton 4:1). Die ersten 30 ml dunkel gefärbtes Eluat ergaben beim Eindampfen 480 mg Rückstand, der nach 2maliger Kristallisation aus Benzol hellgelbe, filzige Kristalle lieferte, die 1 Woche bei 100°/0,01 Torr getrocknet wurde. – UV., VIS.: 230 (4,59), 285 (4,41), 318 (4,38), 408 (4,13). – IR. (Nujol): 3495 m, 3380 m, 2120 vs, 1730 sh, 1702 s, 1666 m, 1600 vs, 1575 vs. – $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3): 0,03 (d, $J = 7$, 3H); 0,64 (d, $J = 7$, 3H); 0,84 (d, $J = 7$, 3H); 1,01 (d, $J = 7$, 3H); 1,5–2,5 (sh, 4H); 1,74 (s, 3H); 2,03 (s, 3H); 2,06 (s, 3H); 2,26 (s, 3H); 2,8–3,9 (sh, 5H); 3,09 (s, 3H); 4,79 (d, $J = 10,5$, 1H); 5,11 (m, $J_1 = 6,5$, $J_2 = 12$, 1H); 5,9–6,4 (sh, 4H); 8,64 (s, 1H); 8,73 (s, 1H); 15,50 (s, 1H). – pK_{MCS}^* : 10,41.

$\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{11}$ Ber. C 62,79 H 6,41 N 5,95% Gef. C 62,73 H 6,57 N 5,43%

4-Desoxy-tetrahydorrifamycin SV (XII). Eine Suspension von 300 mg Chinon-diazid XI in 10 ml Essigester wurde nach Zusatz von 100 mg Pd/C-Katalysator über Nacht hydriert (Verbrauch: 2,18 mol-Äqu. H_2). Die durch Celit filtrierte Lösung wurde eingedampft und der Rückstand durch Verteilungschromatographie an 14 g Celit (System: Heptan/Chloroform/Methanol/Wasser 5:5:6, 6:3, 3; Fließmittel: organische Phase) und anschliessend durch Chromatographie an Kieselgel («unter 0,08 mm», Merck, CHCl_3 /Aceton 2:1) aufgetrennt, wobei man die erste fluoreszierende Zone auffing und eindampfte. Der Rückstand (52 mg) lieferte nach 3maliger Kristallisation aus Benzol/Heptan 1:1 44 mg hellgelbe Kristalle vom Smp. 172°, die 1 Woche bei 100°/0,01 Torr getrocknet wurden. – UV., VIS.: 217 (4,36), 239 (4,36), 290 (4,32), sh 325 (3,79), 409 (4,09). – IR. (CHCl_3): 3470 m, 3400 m, 3180 w (breit), 1705 sh, 1690 s, 1645 m, 1627 m, 1585 vs. – $^1\text{H-NMR}$. (Deuterioaceton): Fig. 2, in CDCl_3 zusätzliche (in Deuterioaceton nicht sichtbare) Signale: 8,27 (s, 1H); 12,10 (s, 1H); 12,70 (s, 1H). – pK_{MCS}^* : 4,44.

$\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{NO}_{11}$ Ber. C 64,80 H 7,50 N 2,04% Gef. C 64,74 H 7,69 N 2,04%

Oxydation der Hydrierungsprodukte von Rifamycin S mit Salpetersäure. 3 g Tetrahydorrifamycin S wurden mit 30 ml 40proz. wässriger Salpetersäure 40 Min. auf 105° erhitzt. Die eingengte Lösung wurde mit 5 ml Ameisensäure versetzt und einige Male unter Zusatz von Lignoïn eingedampft. Der Rückstand wurde 3mal mit je 50 ml heissem Benzol ausgezogen. Die vereinigten Benzolauszüge ergaben beim Eindampfen 1,20 g Säuregemisch, worin sich papierchromatographisch 4 Komponenten (Rf 0,63, 0,52, 0,49, 0,44) nachweisen liessen. Das benzolunlösliche Säuregemisch zeigte im Papierchromatogramm 2 Hauptkomponenten (Rf 0,34, 0,27).

Auftrennung des benzollöslichen Säuregemisches. Das benzollösliche Säuregemisch (1,20 g) wurde durch Verteilungschromatographie an 300 g Kieselgel (Mallinckrodt «100 mesh», mit 180 ml Wasser verrieben und mit Chloroform eingeschlämmt) aufgetrennt. Eluiert wurde nacheinander mit 2 l Chloroform, 2 l Chloroform/1-Butanol 20:1 und 2 l Chloroform/1-Butanol 10:1, alle mit Wasser gesättigt. Es wurden Fraktionen von 100 ml aufgefangen und papierchromatographisch untersucht.

Methyl-bernsteinsäure (XIII). 30 mg Eindampfrückstand aus den Fraktionen 46–58 (Rf 0,44) wurde bei 80°/0,03 Torr sublimiert, wobei man 21 mg farblose Kristalle erhielt, Smp. 111–113°

(nach Kristallisation aus Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff). – pK_{MCS}^* : 6,67/8,10. $[\alpha]_D^{20} = \pm 0^\circ$ ($c = 2,15$, Wasser).

$C_5H_8O_4$ Ber. C 45,45 H 6,10% Gef. C 45,60 H 6,28%

10 mg Säure (Smp. 111–113°) wurden durch aufeinanderfolgende Behandlung mit Diazomethan und Magnesiumanilid in Äther in Dianilid übergeführt, das sich nach Kristallisation aus Benzol anhand Smp., Misch-Smp. und IR.-Spektrum als identisch mit synthetisch hergestelltem *rac*-Methylbernsteinsäuredianilid erwies.

α -Methylglutarsäure (XIV). 39 mg kristalliner Eindampfrückstand aus den Fraktionen 31–34 (Rf 0,49) wurde bei 80°/0,03 Torr destilliert. Das Destillat lieferte nach Kristallisation aus Benzol/Hexan 22 mg farblose Plättchen vom Smp. 73–76°. – pK_{MCS}^* : 6,12/8,79. $[\alpha]_D^{20} = +6,5^\circ$ ($c = 2,75$, Wasser).

$C_6H_{10}O_4$ Ber. C 49,31 H 6,90% Gef. C 49,29 H 6,90%

Das IR.-Spektrum ($CHCl_3$) war identisch mit demjenigen von synthetischer *rac*- α -Methylglutarsäure. Die beiden Präparate waren auch im Papierchromatogramm nicht unterscheidbar.

α -Methyladipinsäure (XV). 19 mg Eindampfrückstand aus den Fraktionen 22–28 (Rf 0,52) wurden mit einem Überschuss Diazomethan und anschliessend mit Magnesiumanilid in Äther umgesetzt. Das Gemisch wurde mit Äther verdünnt, vom Ungelösten abzentrifugiert und die klare ätherische Lösung eingedampft. Der Rückstand ergab nach Chromatographie an 4 g Aluminiumoxid der Aktivität II (Benzol/Chloroform 1:1) und 4maliger Kristallisation aus Benzol/Äthanol 10 mg Kristalle vom Smp. 177°.

$C_{19}H_{22}N_2O_2$ Ber. C 73,52 H 7,15% Gef. C 73,57 H 7,27%

Die Identität mit synthetischem *rac*- α -Methyladipinsäure-dianilid ergab sich aufgrund von IR.-Spektrum (KBr), Smp., Misch-Smp. und DC.

α, α' -Dimethyl-pimelinsäure (XVI). – XVI-p-Phenyl-phenacyl-ester. 50 mg Eindampfrückstand aus den Fraktionen 1–7 (Rf 0,63) wurden in üblicher Weise mit *p*-Phenylphenacylbromid umgesetzt. Der rohe Ester wurde an Kieselgel (Benzol/Essigester 100:1) chromatographiert und anschliessend dreimal aus Äther im zugeschmolzenen Rohr umkristallisiert, wobei man farblose Kristalle vom Smp. 118° erhielt.

$C_{37}H_{36}O_6$ Ber. C 77,06 H 6,44% Gef. C 76,86 H 6,46%

XVI-Dimethylester. 50 mg Eindampfrückstand aus den Fraktionen 1–17 wurde mit einem Überschuss ätherischer Diazomethanlösung behandelt. Das eingedampfte Gemisch wurde 3mal bei 65°/0,03 Torr destilliert. – 1H -NMR. (CCl_4): 0,63–1,92 (*sh*, 6H); 1,10 (*d*, $J = 6,5$, 6H); 2,00–2,78 (*sh*, 2H); 3,37 (*s*, 6H).

$C_{11}H_{20}O_4$ Ber. C 61,09 H 9,32% Gef. C 61,16 H 9,26%

Trennung der diastereomeren XVI-Dianilide. 16 mg Säuregemisch aus den Fraktionen 1–17 ($[\alpha]_D^{20} = +15,2^\circ$, $c = 9,22$ in $CHCl_3$) wurden mit Thionylchlorid und anschliessend mit Anilin umgesetzt. Das rohe Anilidgemisch (40 mg) wurde an 10 g Aluminiumoxid der Aktivität II chromatographiert. Mit Benzol wurden 15 mg rechtsdrehendes Dianilid eluiert, das nach 4maliger Kristallisation aus Benzol bei 172–174° schmolz. – $[\alpha]_D^{20} = +100^\circ$ ($c = 1,42$, Chloroform).

$C_{21}H_{26}N_2O_2$ Ber. C 74,52 H 7,75% Gef. C 74,39 H 7,74%

Das optisch inaktive Dianilid (10 mg) vom Smp. 192°, das mit Benzol + 4% Chloroform eluiert wurde, erwies sich aufgrund von Misch-Smp. und IR.-Spektrum (KBr) als identisch mit synthetischem *meso*- α, α' -Dimethylpimelinsäuredianilid [20].

Auftrennung des benz unlöslichen Säuregemisches. Zu einer Lösung des benz unlöslichen Säuregemisches in 30 ml Wasser wurde bis zur schwach alkalischen Reaktion gesättigte Calciumhydroxidlösung eingetropft. Der durch Filtration abgetrennte Niederschlag wurde in verd. Salzsäure gelöst. Der aus der sauren Lösung erhaltene Äthylacetatauszug ergab nach dem Trocknen und Eindampfen einen Rückstand, der sich nach mehrmaliger Kristallisation aus Wasser als Oxalsäure erwies.

Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_9$ (XVII). Die von den unlöslichen Calciumsalzen abfiltrierte Lösung wurde durch eine Säule von 50 ml Dowex-50 (H^+ -Form) filtriert und anschliessend eingedampft. Der Rückstand (864 mg) wurde durch Verteilungschromatographie an 300 g, mit 180 ml Wasser

befeuchtetem Kieselgel (*Mallinckrodt* «100 mesh») mit wassergesättigtem Chloroform/1-Butanol-Gemischen (aufeinanderfolgend je 1:1 9:1, 4:1, und 2:1) als Fließmitteln aufgetrennt. Mit dem letzteren Lösungsmittel-Gemisch wurden 200 mg einer Säure Rf 0,27 eluiert, die nach 4maliger Kristallisation aus Äthylacetat 15 mg Kristalle vom Smp. 207° lieferten. – pK_{MCS}^* : 5,51/9,44.

$C_{10}H_{14}O_9$ Ber. C 43,17 H 5,07% Gef. C 42,91 H 4,99%

XVII-Tetramethylester. In eine Lösung von 7 mg kristalliner Tetracarbonsäure in 1 ml Methanol wurde ein Überschuss ätherischer Diazomethanol-Lösung destilliert. Das eingedampfte Gemisch wurde bei 120°/0,01 Torr destilliert. – IR. ($CHCl_3$): 1742 vs. – 1H -NMR. (CCl_4): s. Fig. 3.

Abbau der Tetracarbonsäure XVII. 28 mg Tetracarbonsäure wurde mit 2 ml 65proz. Bromwasserstoffsäure im geschlossenen Rohr 2 Std. auf 130° erhitzt. Die dunkel gefärbte Lösung ergab nach dem Eindampfen 23 mg Rückstand, der in 5 ml Feinsprit nach Zusatz von 1 ml 2N Kaliumhydroxidlösung und 30 mg Pd/C über Nacht hydriert wurde. Das durch Celit filtrierte Gemisch wurde eingengt, mit Wasser verdünnt, angesäuert und mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Der eingedampfte Auszug (8 mg, papierchromatographisch von Methylbernsteinsäure nicht unterscheidbar) lieferte nach aufeinanderfolgender Behandlung mit Diazomethan und Magnesiumanilid 12 mg Dianilid, das nach Chromatographie an 3 g Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 10:1) und 2maliger Kristallisation aus Benzol das gleiche IR.-Spektrum ($CHCl_3$) und chromatographische Verhalten zeigte, wie synthetisches *rac*-Methylbernsteinsäure-dianilid.

β -Acetoxy- α,γ,η -trimethyl-azelainsäure-dimethylester (XVIII). 4 g des durch Hydrierung von Rifamycin S in Gegenwart von Pt-Katalysator entstehenden Gemisches (s. Hexahydorrifamycin-S) wurden in einer Mischung von 16 ml 100proz. Salpetersäure + 24 ml Eisessig 30 Min. auf 90–100° erhitzt und anschliessend eingedampft. Der Rückstand, der im Papierchromatogramm die gleichen Flecke zeigte, wie das durch Oxydation von Tetrahydorrifamycin S mit wässriger Salpetersäure erhaltene Gemisch, sowie einen neuen Fleck Rf 0,70, wurde auf eine Säule von 300 g mit 180 ml Wasser befeuchtetem Kieselgel (*Mallinckrodt* «100 mesh») aufgetragen und mit 2,5 l Chloroform eluiert. Das eingedampfte Eluat (2,1 g) wurde durch Verteilungschromatographie an 250 g, mit 220 ml der polaren (unteren) Phase des Systems Heptan/Chloroform/Methanol/Wasser 5:5:5,5. 4,5 angefeuchteten Celit aufgetrennt, wobei die apolare Phase des gleichen Systems als Fließmittel diente. Es wurden Fraktionen zu 50 ml aufgefangen, die vereinigten Fraktionen 16–22 eingedampft, der Rückstand (248 mg, Rf 0,70) mit einem Überschuss ätherischer Diazomethanol-Lösung behandelt und das Gemisch eingedampft. Der ölige Rückstand ergab nach Chromatographie an Kieselgel («unter 0,08 mm», *Merck*, Chloroform) und Destillation bei 135°/0,03 Torr 20 mg öliges Destillat. – 1H -NMR. (CCl_4): 0,90 (d, $J = 7, 3$ H); 1,08 (d, $J = 7, 3$ H); 1,13 (d, $J = 7, 3$ H); 0,80–1,80 (sh, 7 H); 1,97 (s, 3 H); 2,1–2,9 (sh, 2 H); 3,60 (s, 6 H); 4,95 (m, $J_1 = 5, J_2 = 7, 1$ H).

$C_{16}H_{28}O_6$ Ber. C 60,74 H 8,92 $2OCH_3$ 19,62% Gef. C 60,31 H 8,33 OCH_3 19,37%

Abbau von β -Acetoxy- α,γ,η -trimethyl-azelainsäure-dimethylester (XVIII). 18 mg XVIII wurden in einem 8 mm weiten Pyrexrohr bei 0,05 Torr 7mal durch einen auf 470° erhitzten Glaswollepfropfen destilliert. Das Destillat (4 mg) ergab nach Chromatographie an 4 g Kieselgel (Chloroform) 2,5 mg eines α,β -ungesättigten Esters, UV., VIS.: 220 (4,4). In eine Lösung von 1 mg dieses Esters in 5 ml Methylenchlorid wurde bei –70° bis zur Blaufärbung Ozon eingeleitet. Dann wurde die Lösung vorsichtig eingengt, der Rückstand 1 Std. mit 1 ml Wasser gekocht, die wässrige Lösung mit Äther extrahiert, der getrocknete und eingedampfte Ätherauszug 15 Std. mit 1 ml 90proz. Ameisensäure und 0,1 ml Perhydrol stehengelassen, die überschüssige Persäure mit Pt-Katalysator zerstört, 5 ml Wasser zugesetzt, mit Äther ausgeschüttelt und der eingedampfte Ätherauszug 1 Std. mit 1 ml 10proz. wässriger Kalilauge gekocht. Die nach dem Ansäuern des Gemisches durch Ausziehen mit Äther gewonnene Säure liess sich papierchromatographisch von α,α' -Dimethylpimelinsäure nicht unterscheiden.

Methanolyse des Iminoäthers aus Rifamycin S. 3,9 g Imino-methyläther wurde in 30 ml 1proz. methanolischer Salzsäure gelöst, wobei sich die Lösung nach wenigen Sek. tiefrot färbte. Nach 1 Std. Stehen wurde das Gemisch mit 300 ml Eiswasser versetzt, mit 2N Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH=8 eingestellt und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Aus der wässrigen Phase konnten nach dem Ansäuern mit 2N Salzsäure 823 mg dunkelrote amorphe Verbindung $C_{14}H_{11}NO_6$ abzentrifugiert werden. Die Methylenchloridlösung ergab beim Eindampfen 2,9 g neutralen zähflüssigen Rückstand.

Verbindung C₁₄H₁₁NO₆ (VIII). Der dunkelrote Niederschlag wurde nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen über Calciumchlorid 2mal aus Methanol umkristallisiert und 18 Std. bei 135°/0,05 Torr getrocknet. Die violettroten Kristalle verkohlen bei Temperaturen über 200° ohne zu schmelzen. – UV., VIS.: 228 (4,42), 273 (4,26), 311 (4,04), 350 (4,05). – IR. (Nujol): 3320 s, 1725 s, 1660 s, 1610 vs, 1598 vs. – ¹H-NMR. (CF₃COOH): 1,93 (s, 3H); 2,37 (s, 3H); 6,55 (s, 1H). – $pK_{MCS}^* = 7,12$. Mikrotitration mit 0,1N HClO₄ in Eisessig: $pK_{AcOH}^* = 6,96$.

C₁₄H₁₁NO₆ Ber. C 58,13 H 3,83 N 4,84% Gef. C 58,22 H 3,68 N 5,13%

Methylierung der Verbindung C₁₄H₁₁NO₆. 800 mg VIII wurden mit 30 ml Aceton, 20 ml Methyljodid und 3 g Kaliumcarbonat 15 Std. im geschlossenen Rohr bei 100° geschüttelt. Das mit Wasser verdünnte Gemisch lieferte durch Extraktion mit Methylenchlorid und Eindampfen der Auszüge einen orangefarbenen Rückstand, der an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 20:1) chromatographiert wurde. Dabei erhielt man zwei Hauptprodukte, die sich im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, Methylenchlorid/Aceton 20:1) durch R_f-Werte von 0,55 bzw. 0,49 unterschieden.

O, O'-Dimethyl-N, N-dimethyl-Derivat X. Die insgesamt 85 mg Produkt, R_f 0,55 lieferten nach Kristallisation aus Äther 83 mg orangefarbener Kristalle vom Smp. 164°. – UV., VIS.: 207 (4,35), 236 (4,31), 282 (4,27), 458 (3,69). – IR. (CHCl₃): keine OH-Banden, 1700 s, 1680 s, 1608 s, 1565 vs. – ¹H-NMR. (CDCl₃): 2,27 (s, 3H); 2,57 (s, 3H); 3,18 (s, 6H); 3,72 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 5,53 (s, 1H).

C₁₈H₁₉NO₆ Ber. C 62,60 H 5,55% Gef. C 62,61 H 5,62%

O, O'-Dimethyl-N-methyl-Derivat IX. Die 250 mg Produkt, R_f 0,49, ergaben nach Kristallisation aus Heptan/Benzol orangefarbene Kristalle vom Smp. 154°. – UV., VIS.: 230 (4,45), 277 (4,30), sh 306 (4,08), sh 360 (3,53), 465 (3,56). – IR. (CHCl₃): 3395 m, 1700 s, 1678 s, 1615 vs. – ¹H-NMR. (CDCl₃): 2,30 (s, 3H); 2,65 (s, 3H); 2,91 (d, J = 5,5, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 5,56 (s, 1H); 6,38 (m, 1H).

C₁₇H₁₇NO₆ Ber. C 61,63 H 5,17 N 4,23% Gef. C 61,86 H 5,21 N 4,55%

5-Pyrwoyl-6,8-dimethoxy-2-hydroxy-7-methyl-naphthochinon-(1,4). 103 mg des O, O'-Dimethyl-N-methyl-Derivates IX wurden in 60 ml 10proz. wässriger Salzsäure 1 Std. bei 65° gerührt. Nach Extraktion der Lösung mit Methylenchlorid wurde der Auszug mit Natriumhydrogencarbonatlösung geschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft, wobei man 28 mg unverändertes Ausgangsmaterial erhielt. Aus der angesäuerten Natriumhydrogencarbonatlösung erhielt man durch Extraktion mit Methylenchlorid 70 mg einer gelben Verbindung, Smp. 170° (nach Kristallisation aus Benzol), deren methanolische Lösung sich nach Zusatz einer wässrigen Titan(III)-chloridlösung dunkelblau färbte. – UV., VIS. (0,1N HCl in Feinsprit): 215 (4,27), 262 (4,24), 298 (4,19), 369 (3,79). – IR. (CHCl₃): 3360 m, 1705 s, 1660 vs, 1638 s, 1570 s; 0,166proz. Lösung, 3μ-Bereich gedehnt: 3360. – ¹H-NMR. (CDCl₃): 2,24 (s, 3H); 2,56 (s, 3H); 3,68 (s, 3H); 3,80 (s, 3H); 6,03 (s, 1H). – $pK_{MCS}^* = 4,23$.

C₁₆H₁₄O₇ Ber. C 60,38 H 4,43% Gef. C 60,30 H 4,37%

Auftrennung der neutralen Anteile der Methanolyse. Die 2,9 g neutralen Anteile aus 3,9 g Iminomethyläther wurden an 100 g Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 20:1) chromatographiert, wobei man Fraktionen zu 17,5 ml auffing, die man durch DC. (Methylenchlorid/Aceton 20:1) untersuchte.

Enolmethyläther C₂₄H₃₈O₇ (XX). Die Fraktionen 12–13 enthielten 371 mg einer zähflüssigen Verbindung, R_f 0,70, die bei 195°/0,001 Torr destilliert wurde. – UV., VIS.: 268 (4,37). – IR. (CCl₄): 3540 m, 1742 s, 1712 s, 1677 w, 1658 m, 1639 w, 1605 w. – ¹H-NMR. (CCl₄): s. Fig. 5.

C₂₄H₃₈O₇ Ber. C 65,73 H 8,73% Gef. C 65,29 H 8,79%

Dimethylacetal C₂₅H₄₂O₈ (XIX). Die Fraktionen 15–25 ergaben insgesamt 906 mg farbloses zähflüssiges Öl, R_f 0,50, das bei 200°/0,001 Torr destilliert wurde. – UV., VIS.: 268 (4,48). – IR. (CCl₄): 3520 m, 1742 s, 1712 s, 1640 w. – ¹H-NMR. (CCl₄): s. Fig. 4. – $[\alpha]_D^{20} = -52,5^\circ$ (c = 0,61, CHCl₃).

C₂₅H₄₂O₈ Ber. C 63,80 H 9,00% Gef. C 63,56 H 8,92%

Hydrierung des Dimethylacetals XIX. 847 mg XIX wurden in einer Mikrohydrierapparatur mit Hilfe von 11 mg vorhydriertem Pt-Katalysator in Feinsprit bei Normaldruck hydriert, wobei die Wasserstoffaufnahme (2,00 mol-Äqu.) nach 80 Min. zum Stillstand kam. Dann wurde die Lösung

durch Celit filtriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand bei 200°/0,001 Torr destilliert. – IR. (CCl_4): 3550 m, 1740 vs, 1467 m.

$\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_8$ Ber. C 63,26 H 9,77% Gef. C 63,03 H 9,67%

Überführung des Dimethylacetals XIX in den Enolmethyläther XX. 200 mg XIX wurden in einem 8 mm weitem Pyrexrohr bei 0,01 Torr durch einen 80 mm langen auf 300° erhitzten Glaswollepfropfen destilliert. Das Destillat (150 mg) wurde an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 20:1) chromatographiert, wobei man neben 109 mg unverändertem Dimethylacetal 23 mg Enolmethyläther XX isolierte.

Überführung des Enolmethyläthers XX in das Dimethylacetal XIX. 40 mg XX wurden in 1 ml 1proz. methanolischer Salzsäure gelöst. Nach 1 Std. wurde die Lösung mit 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen und Eindampfen des Auszuges wurde der Rückstand an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 20:1) chromatographiert, wobei man neben 0,5 mg unverändertem Enolmethyläther 22 mg Dimethylacetal XIX erhielt.

Isodimethylacetal $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$. 1 g Imino-methyläther wurde in 5 ml 1proz. methanolischer Salzsäure gelöst. Nach 15 Min. wurde die Lösung mit Wasser verdünnt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH = 8 eingestellt und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Aus der wässrigen Phase konnten nach dem Ansäuern 210 mg rotes $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_6\text{N}$ (VIII) abzentrifugiert werden. Der eingedampfte Methylenchloridauszug (725 mg), welcher im DC. (Methylenchlorid/Aceton 20:1) zwei Flecke mit Rp 0,50 bzw. Rf 0,30 zeigte, wurde an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 20:1) chromatographiert. Dabei erhielt man neben 310 mg Dimethylacetal XIX, Rf 0,50, 95 mg eines farblosen Öls, Rf 0,30, das bei 190°/0,01 Torr destilliert wurde. – IR. (CCl_4): 3530 m, 1740 s, 1710 s, 1640 m, 1607 w. – $^1\text{H-NMR}$. (CCl_4): 0,91 (d, J = 7, 6H); 0,97 (d, J = 7, 6H); 1,5–2,9 (sh, 7H); 1,92 (s, 3H); 2,01 (s, 3H); 3,0–4,2 (sh, 3H); 3,23 (s, 3H); 3,27 (s, 3H); 3,70 (s, 3H); 4,45 (m, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 6,5$, 1H); 4,72 (m, $J_1 = 4$, $J_2 = 7,5$, 1H); 6,00 (m, $J_1 = 7$, $J_2 = 15$, 1H); 6,35 (m, $J_1 = 11$, $J_2 = 1,5$, 1H); 7,10 (m, $J_1 = 15$, $J_2 = 11$, 1H).

$\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$ Ber. C 63,80 H 9,00% Gef. C 63,73 H 8,98%

Tetracarbonsäure $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_9$ (XVII) aus Enolmethyläther XX. In eine Lösung von 371 mg XX in 30 ml Methylenchlorid wurde 30 Min. bei –40° Ozon eingeleitet. Nach vorsichtigem Eindampfen im Vakuum löste man den Rückstand in 5 ml 85proz. Ameisensäure, setzte 1 ml Perhydrol zu und liess über Nacht stehen. Nach Zerstörung der überschüssigen Persäure mit Pd/C wurde das durch Celit filtrierte, dann eingedampfte Reaktionsgemisch (305 mg) 1 Std. mit 30 ml 2N Salzsäure gekocht und anschliessend mit Methylenchlorid extrahiert. Der Eindampfrückstand des Auszuges wurde mit 1 ml 50proz. wässriger Salpetersäure 45 Min. auf 105° erhitzt, die eingeeengte Lösung mit 0,5 ml Ameisensäure versetzt und einige Male unter Zusatz von Benzol eingedampft. Der Rückstand (203 mg) wurde durch Verteilungschromatographie an 60 g, mit 36 ml Wasser verriebenem Kieselgel (Mallinckrodt «100 mesh») aufgetrennt. Als Fließmittel dienten wasser-gesättigte Chloroform/1-Butanol-Gemische (aufeinanderfolgend je 0,3 l 10:1, 0,5 l 5:1, 0,3 l 3:1), wobei man Fraktionen zu 15 ml auffing. Die Fraktionen 42–64 enthielten 40 mg einer Säure mit Rf 0,27, die nach Kristallisation aus Äthylacetat 15 mg farbloser Kristalle, Smp. 202–204°, $[\alpha]_D^{20} = +41^\circ$ ($c = 0,70$, Wasser) lieferte. Nach einer weiteren Kristallisation aus Äthylacetat gab die Kristalle, Smp. 204–206°, $[\alpha]_D^{20} = +38,5^\circ$ ($c = 0,61$, Wasser) mit der durch Oxydation aus Tetrahydrorifamycin S erhaltenen Tetracarbonsäure keine Smp.-Erniedrigung.

Systematischer Abbau des Dimethylacetals $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$ (XIX). – *Hydroxy-acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_8$ (XXI).* In eine Lösung von 900 mg XIX in Methylenchlorid wurde 30 Min. bei –30° Ozon eingeleitet. Dann wurde die Lösung vorsichtig eingedampft, der Rückstand in 5 ml 85proz. Ameisensäure gelöst, 1 ml Perhydrol zugesetzt, das Gemisch 15 Std. bei 25° stehengelassen, die überschüssige Persäure mit Pd-Katalysator zerstört, die Lösung durch Celit filtriert, das Filtrat eingedampft, in eine methanolische Lösung des Rückstandes im Überschuss ätherische Diazomethanlösung destilliert und das Gemisch eingedampft. Der ölige Rückstand (828 mg) ergab nach Chromatographie an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 20:1) 403 mg einer zähflüssigen Verbindung, die bei 160°/0,001 Torr destilliert wurde. – IR. (CCl_4): 3570 m, 1743 vs. – $^1\text{H-NMR}$. (CCl_4): 0,79 (d, J = 6,5, 3H); 0,92 (d, J = 7, 3H); 0,95 (d, J = 7, 6H); 1,5–2,6 (sh, 5H); 2,02

(s, 3H); 2,77 (s, b, 1H); 3,17 (m, $J_1 = 2$, $J_2 = 10$, 1H); 3,62 (s, 6H); 3,6–4,1 (sh, 2H); 4,61 (m, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 11$, 1H). – $[\alpha]_D^{20} = -53,6^\circ$ ($c = 1,48$, Feinsprit).

$C_{19}H_{32}O_8$ Ber. C 58,74 H 8,30% Gef. C 58,69 H 8,31%

Diacetoxy-dicarbonsäure-dimethylester $C_{21}H_{34}O_9$ (XXII). Eine Lösung von 360 mg des Hydroxy-acetoxy-dicarbonsäure-dimethylesters XXI in 10 ml Acetanhydrid wurde nach Zusatz von 10 Tropfen konz. Schwefelsäure 15 Std. bei 25° stehengelassen und dann mit 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Nach 1 Std. wurde das Gemisch mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und der Auszug mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand lieferte nach Chromatographie an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 20:1) und Kristallisation aus Hexan 334 mg farbloser Kristalle vom Smp. 93°. – IR. (CCl_4): 1741 vs. – 1H -NMR. (CCl_4): 0,77 (d, $J = 6,5$, 3H); 0,85 (d, $J = 7$, 3H); 1,03 (d, $J = 7$, 3H); 1,11 (d, $J = 7$, 3H); 1,6–2,8 (sh, 6H); 1,92 (s, 3H); 2,03 (s, 3H); 2,97 (m, $J_1 = 2,2$, $J_2 = 10,5$, 1H); 3,60 (s, 3H); 3,5–4,1 (sh, 1H); 4,57 (m, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 10,5$, 1H); 5,27 (d, $J = 8,5$, 1H). – $[\alpha]_D^{20} = -41,9^\circ$ ($c = 1,46$, Feinsprit).

$C_{21}H_{34}O_9$ Ber. C 58,59 H 7,96% Gef. C 58,72 H 8,01%

α, β -Ungesättigter *Acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester* $C_{19}H_{30}O_7$ (XXIV). 294 mg Diacetoxy-dicarbonsäure-dimethylester XXII wurden in einem 8 mm weiten Pyrexrohr bei 0,01 Torr durch einen 80 mm langen auf 450° erhitzten Glaswollepfropfen destilliert. Dann wurde das Destillat an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 50:1) chromatographiert und das vom weniger polaren Produkt abgetrennte unveränderte Ausgangsmaterial erneut unter den gleichen Bedingungen pyrolysiert und aufgetrennt. Nach einer weiteren Pyrolyse des nicht umgesetzten Diacetoxy-dicarbonsäure-dimethylesters erhielt man insgesamt 114 mg farbloser Kristalle vom Smp. 79° (nach Kristallisation aus Pentan). – UV., VIS.: 219 (4,13). – IR. (CCl_4): 1742 s, 1716 s, 1648 w. – 1H -NMR. (CCl_4): 0,73 (d, $J = 7$, 3H); 0,86 (d, $J = 7$, 3H); 1,05 (d, $J = 7$, 3H); 1,80 (d, $J = 1,5$, 3H); 1,99 (s, 3H); 1,3–2,9 (sh, 5H); 3,08 (m, $J_1 = 2,2$, $J_2 = 10,5$, 1H); 3,63 (s, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,5–4,2 (sh, 1H); 4,59 (m, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 10,5$, 1H); 6,73 (m, $J_1 = 10$, $J_2 = 1,5$, 1H). – $[\alpha]_D^{20} = -40,6^\circ$ ($c = 1,06$, Feinsprit).

$C_{19}H_{30}O_7$ Ber. C 61,60 H 8,16% Gef. C 61,41 H 8,23%

Propionyloxy-acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester XXIII. Eine Lösung von 106 mg des Hydroxy-acetoxy-dicarbonsäure-dimethylesters XXI in 5 ml Propionsäureanhydrid wurde nach Zusatz von 5 Tropfen konz. Schwefelsäure 15 Std. bei 25° stehengelassen und dann mit 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Nach 1 Std. wurde das Gemisch mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und der Auszug mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand ergab nach Chromatographie an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 20:1) 90 mg farbloses Öl. – 1H -NMR. (CCl_4): 0,77 (d, $J = 7$, 3H); 0,83 (d, $J = 7$, 3H); 1,00 (d, $J = 7$, 3H); 1,07 (t, $J = 7$, 3H); 1,12 (d, $J = 7$, 3H); 1,5–2,8 (sh, 8H); 2,02 (s, 3H); 2,95 (m, $J_1 = 2,2$, $J_2 = 10,5$, 1H); 3,59 (s, 3H); 3,61 (s, 3H); 3,80 (m, 1H); 4,56 (m, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 10,5$, 1H); 5,27 (d, $J = 9$, 1H).

Pyrolyse des Propionyl-acetoxy-dicarbonsäure-dimethylesters XXIII. 82 mg XXIII wurden in einem 8 mm weiten Pyrexrohr bei 0,01 Torr durch einen 80 mm langen auf 450° erhitzten Glaswollepfropfen destilliert. Durch Chromatographie des Destillates an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 100:1) und Kristallisation aus Pentan erhielt man 42 mg farblose Kristalle, die sich anhand von Smp., Misch-Smp., NMR.- und IR.-Spektrum als identisch mit dem α, β -ungesättigten Acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester XXIV erwiesen.

Acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester $C_{16}H_{26}O_7$ (XXV). In eine Lösung von 100 mg des α, β -ungesättigten Acetoxy-dicarbonsäure-dimethylesters XXIV in 30 ml Methylenchlorid wurde bei –75° bis zur Blaufärbung Ozon und dann 10 Min. Stickstoff eingeleitet. Dann wurde die Lösung im Vakuum vorsichtig eingedampft, der Rückstand in 5 ml 85proz. Ameisensäure gelöst, 1 ml Perhydrol zugesetzt, das Gemisch 15 Std. bei 25° stehengelassen, die überschüssige Persäure mit Pd/C zerstört, das Gemisch wiederholt mit Benzol eingedampft, die Lösung des Eindampfrückstandes in Methanol durch Celit filtriert, in das Filtrat im Überschuss ätherische Diazomethanlösung destilliert und das Gemisch eingedampft. Der Rückstand (80 mg) wurde an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 50:1) chromatographiert, wobei man 50 mg Öl erhielt, das bei 130°/

0,01 Torr destilliert wurde. – IR. (CCl_4): 1749 vs. – $^1\text{H-NMR}$. (CCl_4): s. Fig. 6. – $[\alpha]_D^{20} = -42,7^\circ$ ($c = 0,64$, Feinsprit).

$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7$ Ber. C 58,17 H 7,93% Gef. C 58,15 H 8,00%

Hydroxy-dicarbonsäure-dimethylester $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_8$ (XXVI). 40 mg Acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester XXV wurden mit 5 ml 8proz. methanolischer Salzsäure 1 Std. unter Rückfluss gekocht, dann wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand ergab nach Chromatographie an Kieselgel (Methylenchlorid/Aceton 10:1) und Kristallisation aus Hexan 33 mg Kristalle vom Smp. 88° . – IR. (CHCl_3): 3600 m, 3530 w (breit), 1732 s. – $^1\text{H-NMR}$. (CCl_4): 0,82 (*d*, $J = 7$, 3H); 0,88 (*d*, $J = 7$, 3H); 1,16 (*d*, $J = 7$, 3H); 1,4–2,2 (*sh*, 2H); 2,2–2,9 (*sh*, 4H); 3,12 (*m*, $J_1 = 2,5$, $J_2 = 10$, 1H); 3,37 (*m*, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 10,5$, 1H); 3,65 (*s*, 6H); 3,80 (*m*, 1H).

$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_8$ Ber. C 58,31 H 8,39% Gef. C 58,48 H 8,59%

Oxo-dicarbonsäure-dimethylester $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_8$ (XXVII). 55 mg Chrom(VI)-oxid wurde in 0,55 ml trockenes Pyridin eingetragen, das Gemisch 1 Std. geschüttelt und nach Zusatz einer Lösung von 27 mg Hydroxy-dicarbonsäure-dimethylester XXVI in 0,27 ml Pyridin weitere 15 Std. geschüttelt. Dann wurde das Gemisch mit Wasser verdünnt, mit Äther ausgeschüttelt, der Auszug mehrmals mit 15proz. Essigsäurelösung, anschließend mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, getrocknet, eingedampft und der zähflüssige Rückstand (20 mg) bei $120^\circ/0,01$ Torr destilliert. – IR. (CCl_4): 1743 vs, 1715 s. – $^1\text{H-NMR}$. (CCl_4): s. Fig. 7.

$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_8$ Ber. C 58,73 H 7,75% Gef. C 58,70 H 7,78%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] V. Prelog & W. Oppolzer, *Helv.* **56**, 2279 (1973).
- [2] V. Prelog, *Chemotherapia* **7**, 133 (1963); *Pure Appl. Chemistry* **7**, 551 (1963).
- [3] P. Sensi, "Research Progress in Organic-biological and Medicinal Chemistry", U. Gallo & L. Santamaria Ed., Soc. Ed. A. Farm., Milano 1963, S. 259; W. Oppolzer, V. Prelog & P. Sensi, *Experientia* **20**, 336 (1964).
- [4] J. Leitich, W. Oppolzer & V. Prelog, *Experientia* **20**, 343 (1964).
- [5] W. Oppolzer, Dissertation ETHZ, Prom. Nr. 3462, Juris-Verlag, Zürich 1963.
- [6] P. Sensi, P. Margalith & M. T. Timbal, *Il Farmaco*, Ed. Sci. **14**, 146 (1959); P. Sensi, M. A. Greco & R. Ballotta, *Antibiot. Annual* 1959–60, S. 262.
- [7] P. Margalith & H. Pagani, *Appl. Microbiology* **9**, 325 (1961).
- [8] D. Kluepfel, G. C. Lancini & G. Sartori, *Appl. Microbiology* **13**, 600 (1965).
- [9] P. Sensi, R. Ballotta & A. M. Greco, *Il Farmaco*, Ed. sci. **15**, 228 (1960).
- [10] P. Sensi, M. T. Timbal & C. Maffii, *Experientia* **16**, 412 (1960).
- [11] P. Sensi, R. Ballotta, A. M. Greco & G. G. Gallo, *Il Farmaco*, Ed. Sci. **16**, 165 (1961); G. G. Gallo, L. Chiesa & P. Sensi, *Analyt. Chemistry* **34**, 423 (1962); *Il Farmaco*, Ed. Sci. **17**, 668 (1962).
- [12] G. G. Gallo, C. R. Pasqualucci & P. Sensi, *Ann. di Chimica* **52**, 902 (1962).
- [13] S. Sugawara, K. Karasawa, M. Watanabe & T. Hidaka, *J. Antibiotics* [A] **17**, 29 (1964); G. C. Lancini & C. Hengeller, *ibid.* **22**, 637 (1969); J. Birner, P. R. Hodgson, W. R. Lane & E. H. Baxter, *ibid.* **25**, 356 (1972).
- [14] G. C. Lancini, G. G. Gallo, G. Sartori & P. Sensi, *J. Antibiotics* **22**, 369 (1969).
- [15] E. Martinelli, R. J. White, G. G. Gallo & P. J. Beynon, *Tetrahedron* (im Druck).
- [16] R. J. White, E. Martinelli, G. G. Gallo, G. C. Lancini & P. J. Beynon, *Nature* **243**, 273 (1973).
- [17] J. M. Birkinshaw, H. Raistrick, D. J. Ross & C. E. Stickings, *Biochem. J.* **50**, 612 (1952).
- [18] L. M. Jackman & S. Sternhell, "Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry", 2nd Ed., Pergamon Press, Oxford etc. 1969, S. 223 und 323.
- [19] M. Brufani, W. Fedeli, G. Giacomello & A. Vaciago, *Experientia* **20**, 339 (1964).
- [20] A. Fredga & B. Oestman, *Acta chem. scand.* **10**, 703 (1956).