

Hans Achenbach, Helmut Strittmatter und Werner Kohl

Die Strukturen der Xanthocilline Y1 und Y2

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

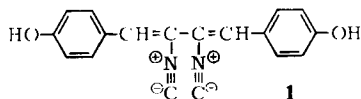
(Eingegangen am 12. Juni 1972)

Für die Xanthocilline Y1 und Y2 aus *Penicillium notatum* Westling werden die Strukturen 6 und 7 abgeleitet.

The Structures of the Xanthocillins Y1 and Y2

Structures 6 and 7 were elucidated for the xanthocillins Y1 and Y2 from *Penicillium notatum* Westling.

Bei der Fermentation und Aufarbeitung eines speziellen Stammes von *Penicillium notatum* Westling fällt Roh-Xanthocillin als ein Gemisch mehrerer ähnlicher Verbindungen an¹⁾, aus dem sich die Hauptkomponente Xanthocillin-X (1) relativ leicht gewinnen läßt^{2,3)}.



1966 berichteten Tönjes und Pötter⁴⁾ über die säulenchromatographische Auftrennung der Xanthocilline (= Brevicide) an Polyamid und die Isolierung der reinen Komponenten Y1 (C₁₈H₁₂N₂O₃) und Y2 (C₁₈H₁₂N₂O₄).

Während Formel 1 für Xanthocillin-X schon 1957 abgeleitet wurde⁵⁾, liegen endgültige Strukturen für die wenig stabilen Y-Komponenten noch nicht vor⁶⁾.

Im Laufe unserer Arbeiten zur Biogenese des Xanthocillins-X⁷⁾ haben wir aus dem mit Diazomethan behandelten Roh-Xanthocillin dünn-schichtchromatographisch auch die entsprechenden Derivate der Komponenten Y1 (= Y1) und Y2 (= Y2) isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt.

Der Vergleich der Massenspektren von methyliertem 1, Y1 und Y2 zeigt eine große Ähnlichkeit des MS-Fragmentierungsverhaltens, was nur erklärbar ist, wenn die Verbindungen vom gleichen Struktur-Typ sind. Man beobachtet in Übereinstimmung mit einer hochkonjugierten Struktur in allen drei Spektren sehr intensive Molekül-Ionen und im oberen Massenbereich analoge Fragmente bei M – 15ME (M – Methyl), M – 26ME (M – Nitril oder Isonitril) und M – 31ME (M – Methoxyl).

¹⁾ W. Rothe, Pharmazie 5, 190 (1950).

²⁾ N. Kaniss, Pharmazie 9, 203 (1954).

³⁾ H. Achenbach und H. Grisebach, Z. Naturforsch. 20b, 137 (1965).

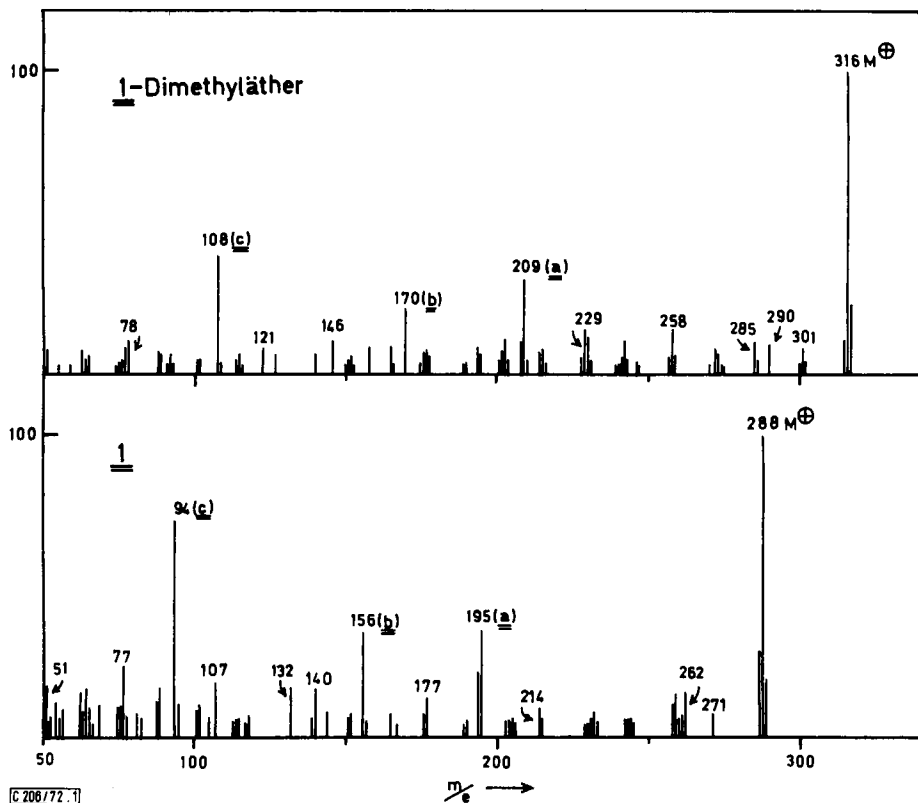
⁴⁾ H. Tönjes und H. Pötter, Pharmazie 21, 217 (1966).

⁵⁾ I. Hagedorn und H. Tönjes, Pharmazie 12, 567 (1957).

⁶⁾ J. Zarnack, H. Tönjes und H. Pötter, Pharmazie 26, 503 (1971).

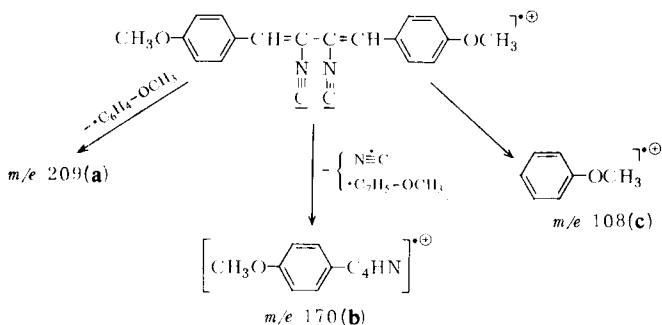
⁷⁾ H. Achenbach und F. König, Chem. Ber. 105, 784 (1972).

Im mittleren Massenbereich von 1-Dimethyläther (Abbild. 1, oben) werden Fragmente bei m/e 209 (a), 170 (b) und 108 (c) bevorzugt gebildet.



Abbild. 1. Massenspektren von 1-Dimethyläther und 1

Diesen Ionen ordnen wir in Übereinstimmung mit hochaufgelösten MS-Messungen folgende Molekül-Bereiche zu:



Die getroffene Zuordnung wird bestätigt durch das MS von nichtmethyliertem 1 (Abbild. 1, unten), in dem die entsprechenden Fragmente 14 ME niedriger auftreten.

Im Massenspektrum von methyliertem **Y1** ($M^+ = 346.1213$; $C_{21}H_{18}N_2O_3$) findet man die Schlüsselfragmente **a**, **b** und **c** verdoppelt: Sie treten auf bei den gleichen Massen wie in 1-Dimethyläther und außerdem noch um 30 ME nach höherer Masse verschoben. Im MS von methyliertem **Y2** ($M^+ = 376.1417$; $C_{22}H_{20}N_2O_4$) werden diese Fragmente ausschließlich 30 ME höher als in 1-Dimethyläther beobachtet (Tab. 1).

Tab. 1. Massenzahlen charakteristischer Ionen in den Massenspektren von permethyliertem **1**, **Y1** und **Y2**

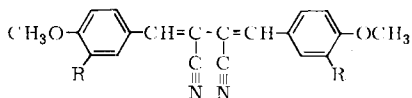
Permethylderivat von	M^+	Massenzahlen der Ionen		
		a	b	c
1	316	209	170	108
Y1	346	209 und 239	170 und 200	108 und 138
Y2	376	239	200	138

Diese Befunde sprechen dafür, daß **Y1** und **Y2** das gleiche Kohlenstoffgerüst wie **1** haben und sich nur durch die Anzahl der Sauerstoff-Funktionen an den Benzolringen von diesem unterscheiden: In 1-Dimethyläther sind beide Benzolringe des 1,4-Diphenyl-butadien-Systems monomethoxyliert, in methyliertem **Y1** trägt einer der Benzolringe eine zusätzliche Methoxylgruppe, während in methyliertem **Y2** beide Benzolringe mit je zwei Methoxylgruppen vorliegen.

Den Massenspektren kann nicht entnommen werden, ob in **Y1** und **Y2** die Kohlenstoffatome 2 und 3 des Butadiens mit Cyan- oder Isonitril-Funktionen substituiert sind.

Daß Isonitrilgruppen vorhanden sind, zeigen in Übereinstimmung mit den publizierten Daten⁶⁾ die IR-Spektren: Man beobachtet die Absorption der $C\equiv N$ -Schwingungen in allen untersuchten Xanthocillin-Äthern zwischen 2114 und 2108/cm, einem Bereich, der für Isonitrile typisch ist⁸⁾.

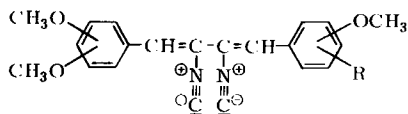
Demgegenüber erscheinen die $C\equiv N$ -Banden in den synthetischen Nitrilen **2**⁹⁾ und **3** bei 2220 und 2210/cm.



2: R = H

3: R = OCH₃

Man kommt damit für permethyliertes **Y1** zur Strukturordnung **4** und für das entsprechende Derivat von **Y2** zu **5**:



4: R = H

5: R = OCH₃

⁸⁾ I. Ugi und R. Meyr, Chem. Ber. **93**, 239 (1960).

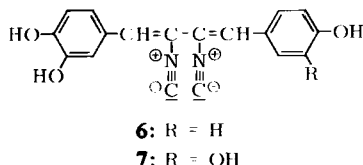
⁹⁾ I. Hagedorn, U. Eholzer und A. Lüttringhaus, Chem. Ber. **93**, 1584 (1960).

Die Positionen der Methoxyl-Substituenten wurden durch oxydativen Abbau und GC-Analyse der anfallenden Benzoesäuren geklärt: Man erhält aus **Y1**-Permethyläther 4-Methoxy-benzoesäure und 3,4-Dimethoxy-benzoesäure im Mengenverhältnis 1 : 1, während bei der Oxydation von **Y2**-Permethyläther nur 3,4-Dimethoxy-benzoesäure entsteht.

Zur Beantwortung der Frage, inwieweit die Methoxylgruppen schon genuin in Xanthocillin-Y1 und Xanthocillin-Y2 enthalten sind oder erst unter der Einwirkung von Diazomethan aus Hydroxylfunktionen gebildet wurden, haben wir Roh-Xanthocillin mit Diazoäthan behandelt und die Reaktionsprodukte nach DC-chromatographischer Trennung massenspektrometrisch untersucht: Neben dem Äther von 1 (Mol.-Gew. 344) waren nur zwei Komponenten mit den Mol.-Gewichten 388 (= Peräthyläther von **Y1**) und 432 (= Peräthyläther von **Y2**) nachweisbar.

Dieses Ergebnis verlangt, daß sowohl in **Y1** als auch in **Y2** die Äther-Gruppen ausnahmslos im Zuge der Alkylierung des Roh-Xanthocillins eingeführt worden sind.

Daraus folgen für Xanthocillin-Y1 und Xanthocillin-Y2 die Strukturen **6** und **7**:



In Übereinstimmung hiermit ist auch das NMR-Spektrum von **Y1**-Permethyläther: Die Methoxyl-Protonen erscheinen als Singulets bei δ 3.95 (6H) und 3.87 (3H). Die Signale des 1,4-substituierten Benzolringes erkennt man als Dubletts (je 2H) bei δ 7.79 ($J = 9$ Hz) und 6.98 ($J = 9$ Hz). Die Protonen des 1,3,4-substituierten Benzolringes geben Anlaß zu folgenden Signalen: δ 6.93 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 7.36 (q, 1H, $J_o = 9$ Hz, $J_m \sim 2$ Hz) und 7.49 (d, 1H, $J_m \sim 2$ Hz). Schließlich ist ein relativ scharfes Signal bei δ 7.01 den beiden olefinischen Protonen an den C-Atomen 1 und 4 des Butadiens zuzuordnen.

Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemie* danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Die Massenspektren wurden aufgenommen mit einem CH 4-Massenspektrometer der Firma Varian-MAT. Ionenquelle TO 4; Ionisierungsenergie 70 eV; Einlaßsystem direkt (Ofeneinsatz). Die Temperatur der Proben wurde so gewählt, daß der Dampfdruck zur Messung der Spektren gerade ausreichte (ca. 180 bis 220°). Die elementare Zusammensetzung von Ionen ermittelten wir durch „Peak-matching“ mit einem hochauflösenden Massenspektrometer vom Typ SM1-B der Firma Varian-MAT bei einer Auflösung $M/\Delta M = 12000$ (10% Tal). Die erhaltenen Werte sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Das ^1H -NMR-Spektrum erhielten wir mit einem Impulskernresonanzspektrometer der Firma Bruker bei 90 MHz. Lösungsmittel Deuteriochloroform; innerer Standard Tetramethylsilan.

Tab. 2. MS-Messungen bei Hochauflösung

Substanz	nominale Masse	Gef.	exakte Masse Ber.	Zusammen- setzung
1	288 (M ⁺)	288.0899	288.0899	C ₁₈ H ₁₂ N ₂ O ₂
	195	195.0550	195.0558	C ₁₂ H ₇ N ₂ O
	156	156.0442	156.0449	C ₁₀ H ₆ NO
	107	107.0489	107.0497	C ₇ H ₇ O
	94	94.0418	94.0419	C ₆ H ₆ O
1-Dimethyläther	316 (M ⁺)	316.1215	316.1212	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₂
	209	209.0712	209.0714	C ₁₃ H ₉ N ₂ O
	170	170.0602	170.0605	C ₁₁ H ₈ NO
	121	121.0651	121.0653	C ₈ H ₉ O
	108	108.0561	108.0575	C ₇ H ₈ O
6-Trimethyläther	346 (M ⁺)	346.1323	346.1317	C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₃
7-Tetramethyläther	376 (M ⁺)	376.1417	376.1423	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₄

Die Registrierung der IR-Spektren erfolgte an KBr-Preßlingen mit einem IR-Spektralphotometer Perkin-Elmer 457. UV-Spektren wurden aufgenommen in Methanol p.a. mit einem Spektralphotometer DMR 21 der Firma Carl Zeiss.

Zur Dünnschichtchromatographie verwendeten wir Platten, beschichtet mit Kieselgel H (Fa. Merck), Schichtdicke 0.5 mm. Die Platten wurden vor der Aktivierung mit Methanol gewaschen. Sichtbarmachung der Substanzen erfolgte durch Fluoreszenz im UV (366 nm). Für die Gaschromatographie stand ein Gaschromatograph der Baureihe 5750 (Fa. Hewlett & Packard) zur Verfügung; Detektor WLD.

Gaschromatographie: Eingesetzt wurden 2m-Säulen (Glas, 1/4"), gefüllt mit Silikon-gummi SE 30 2proz. auf Chromosorb W 60/80 AW/DMCS. Trägergas Helium; Durchflußgeschwindigkeit 125 ccm/Min.; Temperaturprogrammierung 100–170° mit 10°/Min.; WLD 300°; Einspritzblock 210°. Unter diesen Bedingungen fanden wir für authentische methoxylsubstituierte Benzoessäure-methylester folgende Durchbruchstemperaturen:

2-Methoxy-benzoessäure-methylester	125°
3-Methoxy-benzoessäure-methylester	125°
4-Methoxy-benzoessäure-methylester	130°
2.3-Dimethoxy-benzoessäure-methylester	141°
2.4-Dimethoxy-benzoessäure-methylester	155°
2.5-Dimethoxy-benzoessäure-methylester	149°
3.4-Dimethoxy-benzoessäure-methylester	133°

Gewinnung von Roh-Xanthocillin

a) Die *Fermentation von Penicillium notatum* Westling erfolgte in Submerskulturen, wie in l. c.⁶⁾ angegeben. Aus 800 ccm Kulturmedium ernteten wir in der beschriebenen Weise am 6. Tage der Fermentation 11 g Mycel (gefriergetrocknet). Zu diesem Zeitpunkt betrug der UV-spektrometrisch ermittelte Xanthocillin-Gehalt ca. 100 mg Xanthocillin pro l Medium.

b) *Extraktion des Mycels:* Das pulverisierte Mycel wurde am Soxhlet-Extraktor mit 500 ccm Äther erschöpfend extrahiert. Der Ätherauszug hinterließ nach Einengen und dreimaligem Waschen des Rückstandes mit je 3 ccm kaltem Chloroform ca. 50 mg Roh-Xanthocillin.

Methylierung des Roh-Xanthocillins — Isolierung der Permethylläther von 1, 6 und 7: Das Roh-Xanthocillin wurde in Methanol mit ätherischer Diazomethan-Lösung versetzt. Nach

Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank engten wir auf ca. 2 ccm ein, kühlten die dabei entstehende Suspension auf -10° (2 Std.) und filtrierten ab. Der Niederschlag (ca. 30 mg) wurde in wenig Chloroform gelöst und DS-chromatographisch aufgetrennt (Benzol/Essigester, 95 : 5). Als Hauptkomponenten fallen die gelb-gefärbten und im UV (366 nm) stark fluoreszierenden Permethyläther von **1**, **6** und **7** mit den R_F -Werten 0.63, 0.40 und 0.25 an. Wiederholte Extraktion der jeweiligen Zonen mit Chloroform führte zur Isolierung der reinen Äther. Ausb. ca. 12 mg 1-Permethyläther, ca. 5 mg 6-Permethyläther und ca. 2 mg 7-Permethyläther.

6-Permethyläther: MS: 346.1223 (M^+ : $C_{21}H_{18}N_2O_3$). IR: $\nu_{N\equiv C}$ 2112(± 2)/cm. UV: $\lambda_{\max}$ 365 nm.

7-Permethyläther: MS: 376.1417 (M^+ : $C_{22}H_{20}N_2O_4$). IR: $\nu_{N\equiv C}$ 2110(± 2)/cm.

Herstellung der Peräthyläther von 1, 6 und 7: Roh-Xanthocillin wurde in Methanol mit ätherischer Diazoäthan-Lösung versetzt, sodann wurde aufgearbeitet und anschließend DS-chromatographisch im gleichen System getrennt, wie oben für die Permethyläther beschrieben. Die gelb-gefärbten und im UV (366 nm) fluoreszierenden Peräthyläther von **1**, **6** und **7** unterscheiden sich in den R_F -Werten nur unwesentlich von den entsprechenden Permethyläthern und wurden durch wiederholte Extraktion der jeweiligen Zonen mit Chloroform isoliert.

6-Peräthyläther: MS: M^+ 388.

7-Peräthyläther: MS: M^+ 432.

Oxydation der Permethyläther: 1 mg des Permethyläthers wurde in 2 ccm Pyridin mit 1 ccm H_2O sowie 15 mg festem $KMnO_4$ versetzt. Nach Kochen unter Rückfluß (2 Std.) entfernten wir das MnO_2 durch Filtration und reduzierten im schwach violetten Filtrat überschüssiges $KMnO_4$ durch Zugabe von $KHSO_3$ -Lösung bis zur Entfärbung. Am Rotationsverdampfer engten wir das alkalisch gestellte Reaktionsgemisch auf ca. 1 ccm ein und säuerten mit 2 n H_2SO_4 an. Die organischen Säuren wurden dann mit Äther extrahiert und nach Veresterung mit ätherischer Diazomethan-Lösung gaschromatographisch untersucht.

Gaschromatographische Analyse der Methylester: Die im Zuge der Aufarbeitung aus den Oxydationsansätzen erhaltenen Methylester wurden in wenig Chloroform in den Gaschromatographen (s. o.) injiziert.

Das Oxydationsprodukt von 6-Permethyläther erwies sich als ein Gemisch aus zwei Komponenten im Flächenverhältnis etwa 1 : 1, die durch Mischinjektion mit authentischem 4-Methoxy-benzoesäure-methylester und 3.4-Dimethoxy-benzoesäure-methylester identifiziert wurden.

Das Oxydationsprodukt aus 7-Permethyläther war einheitlich und im Mischchromatogramm mit 3.4-Dimethoxy-benzoesäure-methylester identisch.

1.4-Bis-[3.4-dimethoxy-phenyl]-2.3-dicyan-butadien-(1.3) (3): Die Verbindung wurde synthetisiert aus 6.7 g 3.4-Dimethoxy-benzaldehyd und 3.2 g Bernsteinsäuredinitril in 15 ccm *n* Kaliummethyllat in Anlehnung an l. c.⁸⁾. Nach 3stdg. Stehenlassen wurde das ausgefallene Kristallisat abgesaugt und mit Methanol gewaschen. Ausb. 310 mg (5%). Aus Eisessig und Chloroform/Methanol erhielt man gelbe Prismen vom Schmp. 259–260°.

$C_{22}H_{20}N_2O_4$ (376.4) Ber. C 70.20 H 5.35 N 7.44 Gef. C 70.10 H 5.52 N 7.19