

190. Biosynthese der Cytochalasane. Teil II Die Grundbausteine von Cytochalasin D¹⁾

von **Claude-René Lebet** und **Christoph Tamm**

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(26. VI. 74)

Summary. A number of potential ¹⁴C- and ³H-labelled precursors were fed to growing cultures of *Zygosporium masonii* after the rate of formation of cytochalasin D had been measured. By chemical degradation of [¹⁴C]- and [³H,¹⁴C]-cytochalasin D the distribution of the radioactivity originating from incorporated [⁴'-³H, U-¹⁴C]-L-phenylalanine and [^{CH}₃-¹⁴C]-L-methionine was determined. The results demonstrate that the building blocks of cytochalasin D are 1 unit of phenylalanine, 3 units of methionine and acetate units.

1. Einleitung. – Die Cytochalasane sind chemisch eng verwandte Metabolite, die in den letzten Jahren aus Kulturen von verschiedenen Mikroorganismen isoliert worden sind [2]. Sie gehören einem neuartigen Strukturtyp an, indem eine Isoindolon-Einheit mit einem Makrocyclus verknüpft ist. Die Cytochalasane hemmen die Spaltung des Cytoplasmas in Zellkulturen von Säugetieren; einzelne Vertreter bewirken zusätzlich die Ausstossung der Zellkerne, beeinflussen die Phagocytose, wirken auf die Aggregation von Blutgerinnseln oder besitzen ödem- und abszesshemmende Eigenschaften. Sie sind darum bei den Zellbiologen auf grösstes Interesse gestossen [3].

Die ersten Untersuchungen über die Biosynthese der Cytochalasane wurden von *Binder et al.* [1] bei Phomin (Cytochalasin B) resp. Dehydrophomin (Cytochalasin A) durchgeführt. Sie zeigten, dass Phomin aus einer Phenylalanin-Einheit, 9 Acetat- resp. 1 Acetat- und 8 Malonat-Einheiten und 2 aus Methionin stammenden C₁-Einheiten aufgebaut wird (vgl. Fig. 1).

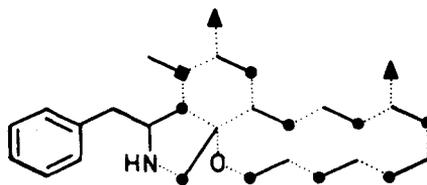


Fig. 1. Die Grundbausteine von Phomin (Cytochalasin B)

Die letzte Acetat-Einheit, die sich im Isoindolonteil befindet, ist isoliert, liegt aber möglicherweise ursprünglich mit den acht anderen verknüpft als Nonaketid oder einem biogenetischen Äquivalent vor und wird erst später durch Insertion eines Sauerstoffatoms abgetrennt. Diese Hypothese wird durch das natürliche Vorkommen der carbocyclischen [13]Cytochalasane Desoxaphomin, Proxiphomin und Proto-

¹⁾ Teil I vgl. [1].

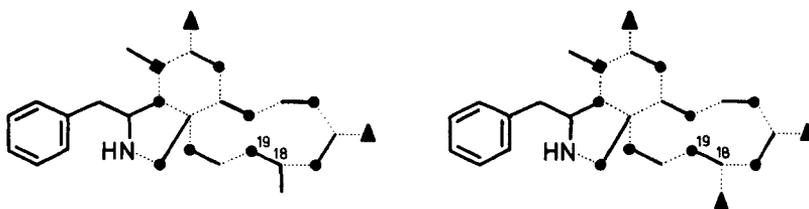
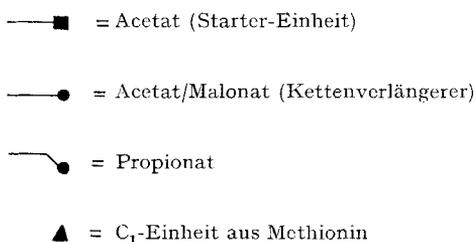


Fig. 2. Mögliche Kombinationen von Grundeinheiten im Gerüst von Cytochalasin D



phomin [4], die vermutlich die carbocyclischen Vorläufer des Phomin und Dehydrophomin sind, erhärtet.

Cytochalasin D ((7*S*, 16*S*, 18*R*, 21*R*)-21-Acetoxy-7, 18-dihydroxy-16, 18-dimethyl-10-phenyl-[11]cytochalasa-6(12), 13^t, 19^t-trien-1, 17-dion)²⁾ wurde von Aldridge & Turner [6] aus *Metarrhizium anisopliae* und von Minato & Matsumoto [7] aus *Zygosporium masonii* isoliert. Die absolute Konfiguration wurde durch eine Röntgen-Strukturanalyse bewiesen [8]. Die Stereochemie von Cytochalasin D erwies sich im Bereich gleicher Strukturteile mit derjenigen von Phomin als identisch.

Die strukturelle Analogie von Cytochalasin D mit Phomin lässt eine ähnliche Biosynthese vermuten. Mit grosser Wahrscheinlichkeit wird Cytochalasin D aus Phenylalanin und einem Octaketid resp. einem biogenetischen Äquivalent zusammengesetzt. Die zwei C₁-Einheiten, die in Phomin aus Methionin stammen, dürften hier denselben Ursprung aufweisen. Unklar ist indessen die Herkunft der Methylgruppe an C(18). Sie kann im relativ frühen Stadium der Polyketidsynthese durch eine Propionat- bzw. 2-Methylmalonat-Einheit in das Octaketid eingebaut oder erst nachträglich als C₁-Einheit eingeführt werden (vgl. Fig. 2).

2. Einbauversuche. – Um diese Frage zu klären, haben wir eine Anzahl potentieller ¹⁴C- und ³H-markierter Bausteine zu wachsenden Kulturen von *Zygosporium masonii* gegeben, das Cytochalasin D isoliert und bei Vorliegen einer signifikanten Radioaktivität mit Hilfe eines gezielten chemischen Abbaus deren Verteilung in der Molekel bestimmt.

Die Züchtung des Mikroorganismus *Zygosporium masonii* Hughes³⁾ (*Fungi imperfecti*) ATCC Nr. 20011 erfolgte im Fermenter auf einem Medium aus Glycose, Pepton und Kochsalz. Nach 5tägiger Inkubation bei 28° wurde das Kulturfiltrat mit Methylchlorid extrahiert und das gebildete Cytochalasin D durch Chromatographie an

²⁾ Zur Nomenklatur vgl. [5].

³⁾ Wir danken den Herren Dres. H. Minato und Y. K. Sawa, Shionogi & Co., Osaka, Japan, für die Überlassung einer Schrägagarkultur von *Zygosporium masonii*.

Kieselgel isoliert. Die Bildung von Cytochalasin D setzt nach 1,5 Wachstumstagen ein, steigt bis 4 Tage steil an und erreicht nach 5 Tagen einen Wert, der bis zum 12. Tag kaum mehr ansteigt (vgl. Fig. 3). Der Anfangswert der Kurve stammt aus

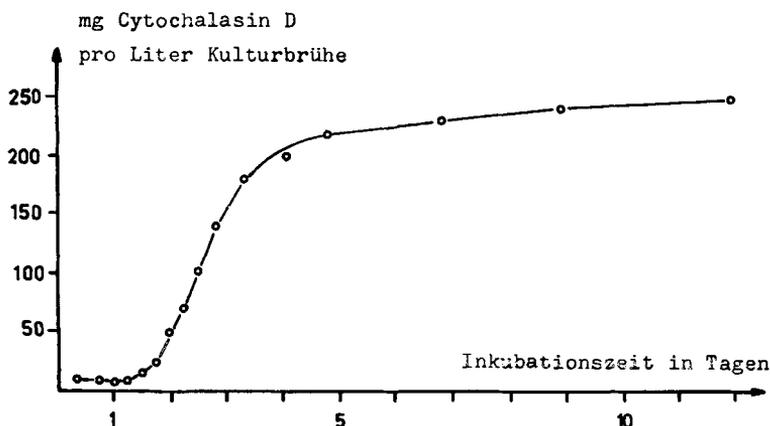


Fig. 3. *Bildungskurve von Cytochalasin D (1)*

dem Impfmateriail. Der geeignete Zeitpunkt für die Zugabe der biogenetischen Vorläufer liegt im unteren ansteigenden Teil der Kurve, also nach 1,5 bis 2 Tagen. Der Vorläufer kann auch vor dem Beimpfen des Ansatzes zugegeben werden. Wir machten von beiden Möglichkeiten Gebrauch.

Als biogenetische Vorläufer wurden [$4'$ - ^3H , U - ^{14}C]-L-Phenylalanin, [CH_3 - ^{14}C]-L-Methionin, [1 - ^{14}C]-Na-Malonat, [2 - ^{14}C]-Na-Malonat, [1 - ^{14}C]-Na-Acetat⁴⁾, [2 - ^{14}C]-Na-Acetat⁴⁾ und [2 - ^{14}C]-Na-Propionat⁴⁾ angeboten. Die Inkorporationszeitpunkte, die Radioaktivitäten der Vorläufer und die Einbauraten der jeweiligen Ansätze sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Ausser Na-Malonat wurden alle Vorläufer mit guten Einbauraten inkorporiert. Sehr hohe Einbauraten ergaben die Versuche mit Phenylalanin und Methionin.

3. Abbaureaktionen. – Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in Cytochalasin D wurden vorerst nur die nach Einbau von Phenylalanin und Methionin erhaltenen Präparate chemisch abgebaut, da sie sich durch besonders hohe Aktivitäten auszeichneten. Die anderen Versuche wurden mit ^{13}C -markierten Vorläufern wiederholt und die Isotopenverteilung soweit als möglich durch *Fourier* Transform (FT)- ^{13}C -NMR.-Spektroskopie bestimmt. Über diese Resultate wird in der folgenden Mitteilung berichtet [9]. Da beide Methoden Vor- und Nachteile aufweisen, schliessen sie sich gegenseitig nicht aus, sondern ergänzen sich und sollten zur gegenseitigen Kontrolle eingesetzt werden.

Wir führten fünf Abbausequenzen, die alle von Cytochalasin D ausgehen, durch (vgl. *Schema 1*).

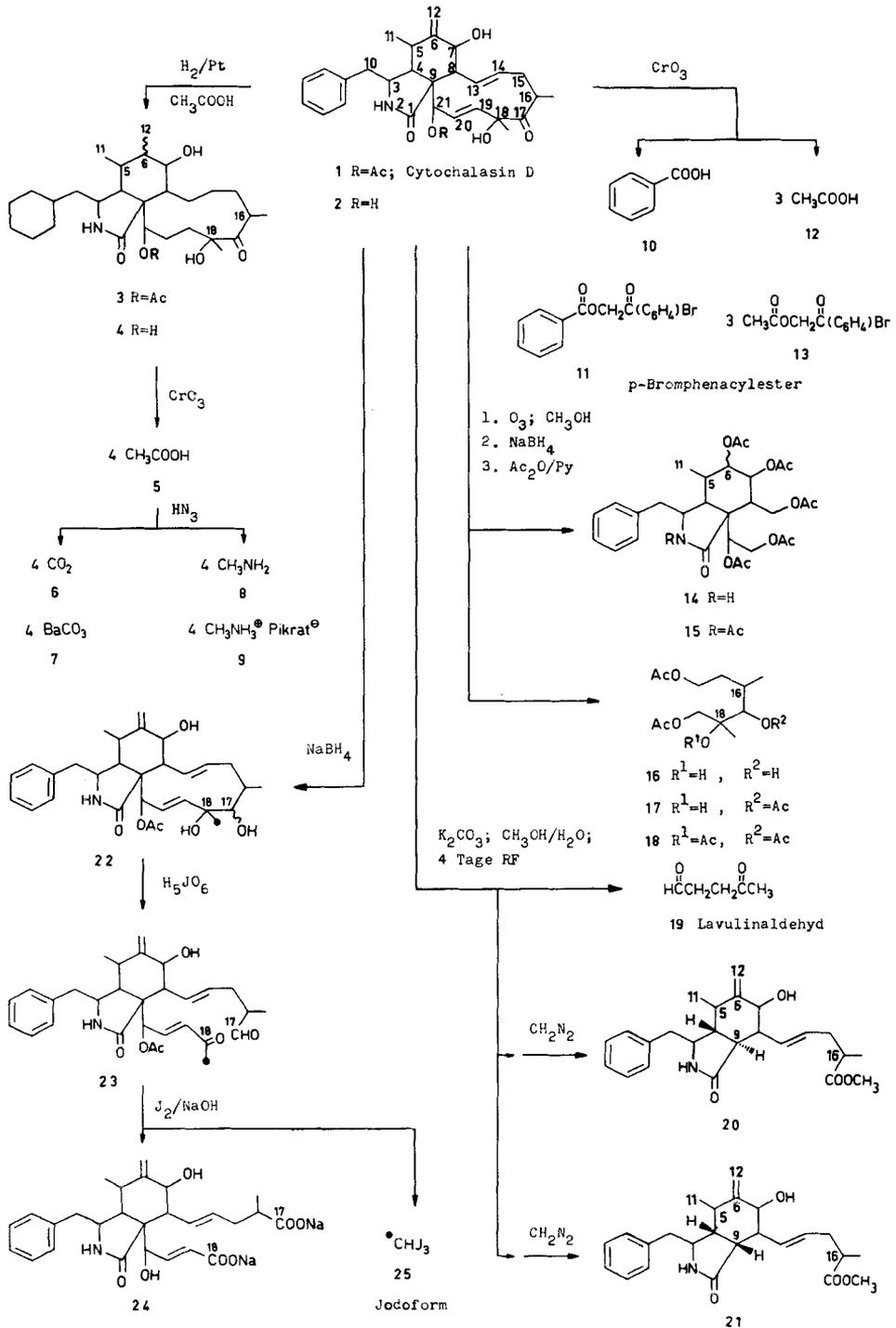
Abbausequenz 1. Katalytische Hydrierung von Cytochalasin D (**1**) mit PtO_2 in Eisessig führte zu den zwei an C(6) epimeren Dodecahydro-cytochalasinen D (**3**), aus

⁴⁾ Für die Durchführung dieser Versuche danken wir Herrn *W. Graf*.

Tabelle 1. Daten der biogenetischen Vorläufer und des aus den Kulturansätzen (je 6 l) gewonnenen Cytochalasins D (1)

Biogenetischer Vorläufer	Cytochalasin D						
	Aktivität gesamte in mCi	spezifische in mCi/mmol	Inkorp. Zeitpt. in Std.	Menge in mg	Aktivität in dpm/mg	Absolute Einbastrate in %	Spezifische Einbastrate in %
[4- ³ H, U- ¹⁴ C]-L-Phenylalanin	³ H: 1,0	21000	30	940	315300	13,35	3,43 · 10 ⁻⁴
	¹⁴ C: 0,1	475			33390	14,15	16,1 · 10 ⁻⁴
[CH ₃ - ¹⁴ C]-L-Methionin	0,1	60	30	690	52200	16,2	198 · 10 ⁻⁴
[1- ¹⁴ C]-Na-Malonat	0,1	14,5	38	540	515	0,125	8,11 · 10 ⁻⁴
[2- ¹⁴ C]-Na-Malonat	0,05	10,3	0	1010	268	0,244	5,95 · 10 ⁻⁴
[1- ¹⁴ C]-Na-Acetat	0,25	58	0	630	22700	2,58	89,3 · 10 ⁻⁴
[2- ¹⁴ C]-Na-Acetat	0,5	60	0	1450	10500	1,37	39,9 · 10 ⁻⁴
[2- ¹⁴ C]-Na-Propionat	0,25	15,6	0	1350	7410	1,80	108 · 10 ⁻⁴

Schema 1



welchen durch Hydrolyse mit K_2CO_3 die entsprechenden zwei Desacetyldodecahydrocytochalasin D-Isomeren (**4**) gewonnen wurden. Oxydation von **4** mit CrO_3 in H_2SO_4 nach *Kuhn-Roth* [10] lieferte vier Äquivalente Essigsäure (**5**) (C-Atompaare Nr. 5 und 11, 6 und 12, 16 und 16- CH_3 , 18 und 18- CH_3). Die Essigsäure (**5**) wurde weiter nach *Schmidt* [11] [12] mit NaN_3 in Polyphosphorsäure zu CO_2 (**6**) (C-Atome Nr. 5, 6, 16, 18) und Methylamin (**8**) (C-Atome Nr. 11, 12, 16- CH_3 , 18- CH_3) abgebaut, die als $BaCO_3$ (**7**) bzw. Methylaminpikrat (**9**) isoliert wurden.

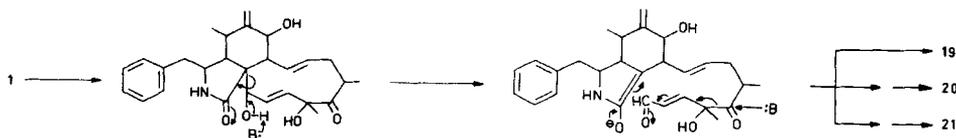
Abbausequenz 2. Hydrolyse von Cytochalasin D (**1**) mit K_2CO_3 ergab Desacetylcytochalasin D (**2**), aus welchem durch Oxydation nach *Kuhn-Roth* unter speziellen Bedingungen [1] ein Äquivalent Benzoesäure (**10**) (Phenyl-C(10)-Gruppierung) und drei Äquivalente Essigsäure (**12**) (C-Atompaare Nr. 5 und 11, 16 und 16- CH_3 , 18 und 18- CH_3) gewonnen wurden. Die beiden Säuren wurden in die *p*-Bromphenacyl-ester **11** bzw. **13** übergeführt und durch präparative Dünnschichtchromatographie getrennt.

Abbausequenz 3. Ozonolyse von Cytochalasin D (**1**) in Methanol bei -75° und reduktive Spaltung der Ozonide mit $NaBH_4$ lieferte ein Gemisch von Polyalkoholen, das nach Acetylieren durch mehrmalige Chromatographie an Kieselgel aufgetrennt wurde. Es resultierten zwei γ -Lactame, das Penta-O-acetyl- γ -lactam **14** und das N-Acetyl-penta-O-acetyl- γ -lactam **15**, und drei verschiedenen acetylierte Derivate desselben Hexantetrols, nämlich 1,6-Diacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2,3-diol (**16**), 1,3,6-Triacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2-ol (**17**) und 1,2,3,6-Tetraacetoxy-2,4-dimethyl-hexan (**18**). Die Strukturen der fünf Verbindungen wurden aus den Spektraldaten abgeleitet. Durch Acetylierung von **14** unter drastischen Bedingungen gelang die chemische Verknüpfung von **14** mit **15**. In analoger Weise wurden **16**, **17** und **18** miteinander verknüpft.

Abbausequenz 4. Hydrolyse von Cytochalasin D (**1**) mit K_2CO_3 unter drastischen Bedingungen ergab Lävulininaldehyd (**19**), der nicht gefasst werden konnte, und ein Gemisch von zwei isomeren Carbonsäuren. Mit Diazomethan liessen sich die Säuren in die entsprechenden isomeren Methyl-ester **20** und **21** überführen, die durch Chromatographie an Kieselgel getrennt wurden.

Der strukturelle Unterschied der Isomeren liegt in der Konfiguration von C(9). Die Ringverknüpfung ist bei **20**, wie bei allen natürlichen Cytochalasinen, *cis* und bei **21** *trans*. Demnach wird das C-Atom Nr. 9 in die Hydrolysenreaktion miteinbezogen, vermutlich nach folgendem Mechanismus (vgl. [7]): Cytochalasin D (**1**) wird zunächst zu Desacetylcytochalasin D (**2**) hydrolysiert, welches dann durch eine Art Retroaldol-Reaktion zwischen C(9) und C(21) gespalten wird. Die dabei entstehende Enolform im Fünfring erlaubt die Isomerisierung an C(9). Hierauf werden durch den Angriff der Base an C(17) – es handelt sich um ein vinyloges 1,3-Dicarbonylsystem – Lävulininaldehyd (**19**) freigesetzt und die isomeren Säuren gebildet (vgl. *Schema 2*).

Schema 2



Die hier verwendete Zuordnung der Strukturen von **20** und **21** stützt sich auf die Betrachtung der Gleichgewichtslage bei der Isomerisierung und auf die IR.- und NMR.-Spektren.

Abbausequenz 5. Reduktion von Cytochalasin D (**1**) mit NaBH_4 führte zu Dihydrocytochalasin D (**22**) in Form eines Epimerengemisches bezüglich der an C(7) neu entstandenen Hydroxygruppe. Behandeln von **22** mit Perjodsäure lieferte in etwa 30% Ausbeute den 17,18-*seco*-Aldehyd **23** und 50% Edukt **22**. Die Ausbeute an **23** ist trotz energischer Reaktionsbedingungen schlecht, weil vermutlich nur das Isomere mit der *cis*-1,2-Diolgruppierung gespalten wird. Umsetzung von **23** mit J_2 und NaOH (Halofom-Reaktion) ergab das Na-Salz der 17,18-Dicarbonsäure **24**, welches nicht isoliert wurde, und Jodoform (**25**), das aus der Methylgruppe an C(18) stammt.

4. Radioaktivitätsmessungen. – Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden von allen kristallinen Abbauprodukten drei sukzessive Kristallisate verwendet. Bei Flüssigkeiten und bei amorphen Verbindungen wurden grössere Mengen eingesetzt, die zweimal vermessen wurden. Die Radioaktivitäten wurden mittels Flüssigkeitsscintillation [13] gemessen⁵⁾. Die in den Tabellen 1–3 angegebenen Werte sind die korrigierten Mittelwerte der Mehrfachbestimmungen. Der mittlere quadratische Fehler beträgt bei ^{14}C -Messungen $\pm 3\%$, bei Messungen von ^3H neben ^{14}C $\pm 5\%$.

4.1. *Einbau von [$4\text{-}^3\text{H}$, $U\text{-}^{14}\text{C}$]-L-Phenylalanin* (vgl. Tab. 2). Die Radioaktivitätsverteilung wurde mittels der Abbausequenz 2 bestimmt. Endprodukt dieser Sequenz ist der Benzoesäure-*p*-bromphenacyl-ester (**11**), der die gesamte ^3H -Aktivität und 7/9 der ^{14}C -Aktivität des biogenetischen Vorläufers tragen sollte.

Die Erklärung der zwischen den zwei Messwerten von Cytochalasin D (**1** und **1'**) auftretenden Abnahme der ^3H -Aktivität (7%) liegt in der Zeitspanne von 644 Tagen zwischen diesen Messungen (theoretische Abnahme: 9,5%).

4.2. *Einbau von [$\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{C}$]-L-Methionin* (vgl. Tab. 3). Die Radioaktivität wird auf den C-Atomen Nr. 12, 16- CH_3 und 18- CH_3 vermutet (vgl. Fig. 2). Zur Bestimmung dieser Verteilung mussten alle fünf Abbausequenzen durchgeführt werden.

Durch die Abbausequenz 1 werden einerseits die C-Atome Nr. 5, 6, 16 und 18 als BaCO_3 (**7**), und andererseits die C-Atome Nr. 11, 12, 16- CH_3 und 18- CH_3 als Methylaminpikrat (**9**) jeweils gemeinsam erfasst. Die Messung zeigt, dass die gesamte Radioaktivität den Annahmen entsprechend nur auf den Methyl- und Methylengruppen lokalisiert ist (C-Atome Nr. 11, 12, 16- CH_3 und 18- CH_3).

Die Abbausequenz 2 führt zur Bestimmung der C-Atome Nr. 5, 11, 16, 16- CH_3 , 18 und 18- CH_3 zusammen als Essigsäure-*p*-bromphenacyl-ester (**13**). Durch Differenzbildung mit den Resultaten der Abbausequenz 1 lässt sich die Aktivität der exocyclischen Methylengruppe (C(12)) bestimmen.

Die Abbausequenz 3 erlaubt die Bestimmung der Methylgruppen an C(16) und C(18) zusammen (als **16** und **17**) und der 11-Methylgruppe einzeln (als **14**). Durch Addition dieser zwei Werte und Differenzbildung mit den Resultaten der Abbausequenz 1 wird wiederum das C-Atom Nr. 12 bestimmt.

Bei der Abbausequenz 4 werden die 11-Methyl-, die 12-Methylen- und die Methylgruppe an C(16) zusammen (als **20** und **21**) erfasst. Durch Differenzbildung mit der

⁵⁾ Die Durchführung der Radioaktivitätsmessungen verdanken wir den Herren Dr. F. Kalberer und H. Galliker, Sandoz AG, Basel.

Tabelle 2. Verteilung der Radioaktivität in Cytochalsin D (**1**) nach Verabreichung von [$4\text{-}^3\text{H}$, $U\text{-}^{14}\text{C}$]-L-Phenylalanin

Abbau-Sequenz	Substanz	Bezeichnung	C-Atome Nr.	Aktivität dpm/mg	dpm/mmol	% der G.A. a)	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Verhältnis
7	-	[$4\text{-}^3\text{H}$, $U\text{-}^{14}\text{C}$]-L- Phenylalanin (Precursor)	-	^3H : $22,0 \cdot 10^6$ b) ^{14}C : $2,23 \cdot 10^6$ b)	-	-	9,86
1		Cytochalsin D	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	^3H : 315 300 ^{14}C : 33 390	$160,0 \cdot 10^6$ $16,95 \cdot 10^6$	-	9,44
1'		Cytochalsin D	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	^3H : 294 000 ^{14}C : 35 260	$149,0 \cdot 10^6$ $17,85 \cdot 10^6$	100 100	8,34
2		Desacetyl-cytochalsin D	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	^3H : 297 300 ^{14}C : 35 860	$138,5 \cdot 10^6$ $16,65 \cdot 10^6$	93,0 93,2	8,29
11		Benzoesäure- <i>p</i> - bromphenacyl-ester	C ₆ H ₅ -C(10)	^3H : 443 300 ^{14}C : 42 130	$141,5 \cdot 10^6$ $13,45 \cdot 10^6$	95,0 75,4	10,52
13		Essigsäure- <i>p</i> - bromphenacyl-ester	5, 11, 16, 18, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	^3H : 800 ^{14}C : 80	205 000 20 500	0,138 0,115	10,0

a) G.A. = Gesamtaktivität.

b) Werte in dpm/ml, **1** → **1'**: Zeitdifferenz von 644 Tagen.

Abbausequenz 1 lässt sich die Methylgruppe an C(18) bestimmen. Werden die aus den vorherigen Abbausequenzen bekannten Radioaktivitätswerte der C-Atome Nr. 11 und 12 abgezogen, so lässt sich aus dieser Abbausequenz auch die Methylgruppe an C(16) ermitteln.

Die Abbausequenz 5 dient zur präziseren, direkten Bestimmung der Methylgruppe an C(18), die als Jodoform (**25**) als einzige aus diesem Abbau erfasst wird. Durch Differenzbildung mit dem gemeinsamen Messwert der Methylgruppen an C(16) und C(18) in der Abbausequenz 3 wird die Methylgruppe an C(16) wiederum bestimmt.

Die beschriebenen Abbaureaktionen ermöglichen eine direkte Bestimmung der Methylgruppe an C(18); die 11-Methyl-, die 12-Methylen- und die Methylgruppe an C(16) können nur durch Differenzbildung bestimmt werden.

Um genügende Mengen an Edukt für die fünf Abbausequenzen zu erhalten, waren wir gezwungen, das aktive Cytochalasin D (**1**) mit inaktivem zu verdünnen (**1'**). Beim letzten Abbauersuch musste das in sehr kleiner Menge anfallende Jodoform (**25**) für die Messung mit synthetischem Material ebenfalls verdünnt werden (**25'**).

Die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen C-Atome ergibt sich durch die oben beschriebenen Differenzrechnungen. Die Werte werden in Prozenten der Gesamtaktivität angegeben und sind, wo mehrere Bestimmungen vorlagen, gemittelt worden (vgl. Fig. 4).

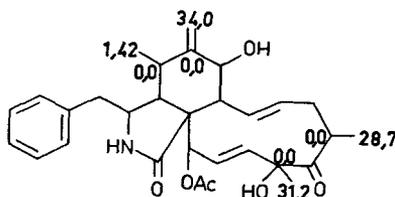


Fig. 4

5. Diskussion der Resultate. – Die hohe absolute Einbaurate von [$4\text{-}^3\text{H}$, $U\text{-}^{14}\text{C}$]-L-Phenylalanin (14,15%) weist auf einen direkten Einbau hin. Die Abnahme des $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses nach Einbau der Aminosäure ($^3\text{H}/^{14}\text{C} = 9,86$) in Cytochalasin D ($^3\text{H}/^{14}\text{C} = 9,44$) deutet darauf hin, dass der Einbau ohne Verlust der Carboxylgruppe erfolgt. Würde Phenylalanin vorher decarboxyliert, so müsste dieses Verhältnis ansteigen (da die ^3H -Aktivität gleich bleibt, jedoch die ^{14}C -Aktivität um 1/9 abnimmt).

Um auch einen partiellen Verlust der Carboxylgruppe auszuschliessen, wurde Cytochalasin D zu Benzoesäure abgebaut. Diese sollte noch die ganze ^3H -Aktivität und 7/9 der ^{14}C -Aktivität (7 der 9 C-Atome von Phenylalanin) aufweisen. Benzoesäure-*p*-bromphenacyl-ester (**11**) trägt 95,0% ^3H -Aktivität und 75,4% ^{14}C -Aktivität, was ein Verhältnis von 9:7,14 ergibt (Ber. 9:7,0). Es scheint damit bewiesen zu sein, dass Phenylalanin ohne Verlust der Carboxylgruppe und sehr wahrscheinlich ohne Gerüstumlagerungen in Cytochalasin D eingebaut wird.

[$\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{C}$]-L-Methionin weist eine noch höhere absolute Einbaurate auf (16,2%). Die 11-Methylgruppe am γ -Lactamteil enthält, wie erwartet, keine signifikante Aktivität. Die 12-Methylen- und die Methylgruppen an C(16) und C(18) tragen je ungefähr ein Drittel der Gesamtaktivität. Die Abweichungen von diesem theoretischen Wert sind nicht signifikant und werden den experimentellen Ungenauigkeiten zugeschrieben.

Tabelle 3. Verteilung der Radioaktivität in Cytochalsin D (1) nach Verabreichung von $[CH_3-^{14}C]-L\text{-Methionin}$

Abbausequenz Nr.	Substanz Bezeichnung	C-Atome Nr.	Aktivität dpm/mg	dpm/mmol	% der G.A. ^{a)}
1	Cytochalsin D	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	52200	26,4 · 10 ⁶	-
1'	Cytochalsin D, verdünnt	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	16270	8,25 · 10 ⁶	100
3	Dodecahydro-cytochalsin D	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	15570	8,08 · 10 ⁶	98,0
4	Desacetyldodecahydro-cytochalsin D	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	16530	7,89 · 10 ⁶	95,6
7	BaCO ₃	5, 6, 16, 18	-	-	-
9	Methylaminpikrat	11, 12, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	7930	2,06 · 10 ⁶	100,0
2	Desacetylcytochalsin D	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	16370	7,61 · 10 ⁶	92,3
11	Benzoessäure- <i>p</i> -bromphenacyl-ester	C ₆ H ₅ -C(10)	73	23290	0,283
13	Essigsäure- <i>p</i> -bromphenacyl-ester	5, 11, 16, 18, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	6400	1,645 · 10 ⁶	59,9
14	Penta-O-acetyl- γ -lactam	1-11, 13, 20, 21 10-C ₆ H ₅	244	140300	1,70
16	Diacetoxy-dimethyl-hexan-diol	14-19, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	19300	5,06 · 10 ⁶	61,3
17	Triacetoxy-dimethyl-hexanol	14-19, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	17750	5,39 · 10 ⁶	65,3
20	isomere Methyl-ester	1-17,	13150	5,22 · 10 ⁶	63,2
21	aus Abbausequenz 4	10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃	-	-	-
25'	Jodoform, verdünnt	18-CH ₃	565	222500	2,70
25	Jodoform	18-CH ₃	-	-	31,2

a) G.A. = Gesamtaktivität. 1 → 1': Verdünnungsparameter 3,21. 25 → 25': Verdünnungsparameter 11, 57.

Die Radioaktivitätsverteilung entspricht der Biosynthesesequenz, bei welcher die Gruppierung C(19)–C(18)–CH₃ aus einer Acetat- und einer C₁-Einheit entsteht (vgl. Fig. 2). Das Acetat wird während der Synthese des Octaketids resp. eines biogenetischen Äquivalents eingegliedert, später tritt die C₁-Einheit hinzu. Die Variante, diese Gruppierung aus Propionat zu beziehen und bereits während der Synthese der C₁₇-Kette einzubauen, scheint somit weniger wahrscheinlich.

Die absolute Einbaurrate von [1-¹⁴C]-Na-Malonat ist relativ niedrig (0,125%), was sich auf die geringe Spezifität des Vorläufers zurückführen lässt. Etwa doppelt so hoch ist die absolute Einbaurrate von [2-¹⁴C]-Na-Malonat (0,244%), was mit der Einbaurrate von [1-¹⁴C]-Malonat im Einklang ist, da dort die Hälfte der eingesetzten Aktivität durch Decarboxylierung verlorengeht. Wir haben die Radioaktivitätsverteilung wegen der geringen Aktivität beider Proben bisher nicht bestimmt.

[1-¹⁴C]-Na-Acetat wurde mit einer etwa zehnmal höheren absoluten Einbaurrate (2,58%) als [2-¹⁴C]-Na-Malonat inkorporiert; ähnlich liegt auch der Einbau von [2-¹⁴C]-Na-Acetat (1,37%) im Vergleich zu Malonat. Dieser gute Einbau ist für einen unspezifischen Precursor wie Acetat erstaunlich, ebenfalls die Steigerung der Einbaurrate in bezug auf [2-¹⁴C]-Na-Malonat. Bei der Biosynthese von Phomin [1] waren die Verhältnisse umgekehrt und die Einbauraten tiefer. Zur Zeit können wir diese Unterschiede nicht erklären. Sie bedürfen weiterer Untersuchungen.

Nach den Ergebnissen des Einbaus von [CH₃-¹⁴C]-L-Methionin sollte [2-¹⁴C]-Na-Propionat überhaupt nicht eingebaut werden. Die trotzdem signifikante Einbaurrate dieses Bausteins (1,80%) weist darauf hin, dass Propionat wie bei der Biosynthese von Phomin [1] in Form von Acetat eingebaut wird. Die Umwandlung zu Acetylcoenzym A erfolgt *via* Milchsäure und Brenztraubensäure, wobei die Carboxylgruppe der Propionsäure verlorengeht [14]. [2-¹⁴C]-Na-Propionat könnte demnach wie [1-¹⁴C]-Na-Acetat eingebaut werden.

Die Resultate der Einbauversuche stützen unsere Annahme, dass Cytochalasin D ähnlich wie Phomin aus Phenylalanin und einem hypothetischen resp. biogenetischen Äquivalent Polyketid aufgebaut wird. Die 12-Methylen- und die Methylgruppen an C(16) und C(18) leiten sich von Methionin ab, wobei allerdings andere C₁-Lieferanten nicht auszuschliessen sind.

Was die möglichen biogenetischen Reaktionswege betrifft, die von den erkannten Grundbausteinen zu den diversen Cytochalasinen führen, so verweisen wir auf entsprechende Diskussionen von *Binder & Tamm* [2] [4].

Für die grosszügige Unterstützung unserer Untersuchungen durch den *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* (Projekte No. 2.48.68, 2.460.71, 2.675.72) und durch die *Sandoz AG*, Basel, danken wir bestens.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* – Die Schmelzpunkte wurden auf dem *Kofler-Block* im Dunkelfeld bestimmt und sind korrigiert. – Substanzproben für Spektren, Drehungen, Mikroanalysen und Radioaktivitätsmessungen wurden mindestens 2 Std. bei 0,01 Torr/23° getrocknet. BaCO₃-Proben wurden 3 Std. unter einer IR.-Lampe getrocknet. – Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Labor des Instituts für organische Chemie (*E. Thommen*) ausgeführt. Die IR.-Spektren in KBr, die UV.- und 60-MHz-NMR.-Spektren wurden im Spektrollaboratorium desselben Instituts (*K. Aegerter*) aufgenommen, die IR.-Spektren mit einem *Perkin-Elmer-IR.-Gitterspektrometer*, Modell 125, die UV.-Spektren mit einem *Beckman-D.K.2-Spektrophotometer* und die 60-MHz-

NMR.-Spektren mit einem *Varian-A60*-Spektrometer. Im Spektrallaboratorium des physikalisch-chemischen Instituts wurden die 100-MHz-NMR.-Spektren mit einem *Varian-HA-100D*-Spektrometer (*E. Wullschlegler, E. Jutzi, R. Wiessler*) und die niederaufgelösten Massenspektren mit Geräten vom Typ *AEI-MS-30* und *Hitachi-Perkin-Elmer-RMU-7* (*Dr. J. Vogt, A. Raas*) vermessen. In den Spektrallaboratorien der Fa. *Sandoz AG*, Basel, wurden die 90-MHz-NMR.-Spektren mit einem *Bruker HX-90-E*-Gerät mit *Fourier-Transform* (*H. R. Loolli*) und die hochaufgelösten Massenspektren mit einem *CEC*-Massenspektrometer 21-110B (*Dr. H. Lichti*) aufgenommen. Einige 90-MHz-NMR.-Spektren verdanken wir auch Herrn *Dr. W. Niederberger*, Abteilung Biophysikalische Chemie des Biozentrums. Zur Aufnahme der IR.-Spektren in Lösung wurde ein *Beckman-IR-8*-Spektrometer benutzt, zur Bestimmung der optischen Drehung ein *Perkin-Elmer*-Polarimeter, Modell 141. – Zur Säulenchromatographie (SC.) diente «Kieselgel 0,05–0,20 mm» der Firma *E. Merck*, Darmstadt. Für die präparative Schichtchromatographie (PDC.) benutzten wir «Kieselgel PF₂₅₄» (*E. Merck*), sowie Fertigplatten der Fa. *E. Merck* (Schichtdicke 2 mm und 0,25 mm). Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) wurde «Kieselgel G nach Stahl» (*E. Merck*) unter Zusatz von Zinksilikat verwendet sowie Fertigplatten der Fa. *E. Merck* (Schichtdicke 0,25 mm). Zur Sichtbarmachung von Substanzen auf PDC. wurden UV.-Licht, auf DC. UV.-Licht, Jod-Dämpfe oder spezifische Sprühreagenzien verwendet. – Im allgemeinen wurde mit Methylchlorid extrahiert und mit 2N Na₂CO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Zur Trocknung von Substanzlösungen diente geglühtes Na₂SO₄; Eindampfen erfolgte im Rotationsverdampfer (RV.) bei einer Badtemperatur von 60°.

2. *Isolierung von Cytochalasin D (1)*. *Zygosporium masonii* wurde in einem 10 l-Fermenter gezüchtet. 6 l Nährlösung (pro 1 30 g D-Glucose, 20 g Pepton, 5 g NaCl und entionisiertes Wasser) wurden im Druckautoklaven sterilisiert und mit 250 ml einer ausgewachsenen Rotationskultur von *Zygosporium masonii* angeimpft. Fermenterbedingungen: 300 upm, Luftzufuhr 4,5 l/Min. bei 0,5 Atm. und 28°. Als Antischaummittel diente eine Lösung von 10% Polypropylenglycol 2020 in «Antimousse», *Sandoz*, die automatisch zugegeben wurde. Bei Einbauversuchen erfolgte die Zugabe der wässrigen Lösung des radioaktiven Vorläufers zwischen 0 und 45 Std. nach dem Animpfen. Inkubationsdauer: 4–5 Tage.

Die 6 l Kulturbrühe wurden mit 6 l Äthanol versetzt und über Nacht bei +2° stehengelassen. Anschliessend wurde das Mycel abfiltriert, mit Äthanol gewaschen und das Kulturfiltrat auf etwa 500 ml eingecngt. Diese Lösung lieferte nach Neutralisieren, Extrahieren und üblichem Aufarbeiten etwa 4 g öligen, gelben Rohextrakt, der, um das Antischaummittel zu entfernen, mit Petroläther ausgezogen wurde. Zurück blieb 1–1,5 g gelblicher Festkörper, der an der 50fachen Menge Kieselgel chromatographiert wurde (Elution mit Methylchlorid/Methanol 98:2). Eine zweite Trennung an Kieselgel (Elution mit Methylchlorid/Methanol 99:1) führte schliesslich zu reinem Cytochalasin D (**1**), welches aus Aceton/*n*-Hexan umkristallisiert wurde. Ausbeute: 80–260 mg/l Kulturbrühe.

Das isolierte Cytochalasin D (**1**) war DC.-einheitlich (Methylchlorid/Methanol/Ameisensäure 90:5:5) und bildete kleine, farblose Nadeln vom Smp. 259–260°, die nach Misch-Smp., [α]_D und DC. mit authentischem Material identisch waren⁶⁾. [α]_D²⁴ = +26° ± 2° (*c* = 0,86 in Methanol), [α]_D²⁴ = –8° ± 1° (*c* = 0,86 in Dioxan), [α]_D²⁴ = –42° ± 2° (*c* = 0,74 in Chloroform). – UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 226 (3,54), 258 (2,74), 261 (2,66), 264 (2,64), 268 (2,60) und 283 (2,57) nm (log ϵ). – IR.-Spektrum (KBr): u. a. Banden bei 3420 (NH); 3240; 3600–3200 (OH, NH assoz.); 3080 (C=CH₂); 3020 (Arom.); 2960, 2930, 2910, 2870, 2850 (CH); 1740, 1705, 1695 (C=O; Ester, Keton, Lactam); 1605, 1495 (Arom.); 1445, 1365, 1230 (C–O–C); 1050, 1010 (C–O–H); 960, 910, 750, 690 (monosubst. Arom.) cm⁻¹. – NMR.-Spektrum (100-MHz, Pyridin-d₅): u. a. Signale bei 7,25 (*s*, 5H Phenylrest); 6,78 (*AB*-System, verdoppelt, 1H C(19), *J*_{19,20} = 16 Hz, *J*_{19,21} = 3 Hz); 6,28 (*AB*-System, verdoppelt, 1H C(13), *J*_{13,14} = 16 Hz, *J*_{8,13} = 10 Hz); 5,98 (*t*, 1H C(21), *J*_{19,21} = *J*_{20,21} = 3 Hz); 5,85 (*m*, 1H N(2), tauscht mit D₂O aus); 5,55 (*AB*-System, verdoppelt, 1H C(20), *J*_{19,20} = 16 Hz, *J*_{20,21} = 3 Hz); 5,42 (*s*, 1H C(12)); 5,07 (*s*, 1H C(12)); 4,65 (*m*, 1H OH, tauscht mit D₂O aus); 4,35 (*d*, 1H C(7), *J*_{7,8} = 10 Hz); 3,55 (*m*, 1H), 3,33 (*t*, 1H, *J* = 10 Hz); 2,89 (*d*, 2H C(10), *J* = 6 Hz); 2,7 (*m*, 1H OH, tauscht mit D₂O aus); 2,66 (*t*, 1H C(8), *J*_{7,8} = *J*_{8,13} = 10 Hz); 2,44 (*t*, 1H, *J* = 3 Hz); 2,36 (*s*, 3H Acetoxy); 1,54 (*s*, 3H Methyl an

⁶⁾ Wir danken Herrn *Dr. W. B. Turner*, *Imperial Chemical Industries, Ltd.*, Macclesfield, England, für die Überlassung einer Probe Cytochalasin D.

C(18)); 1,06 (*d*, 3H Methyl an C(16), $J = 6$ Hz); 0,83 (*d*, 3H C(11), $J_{5,11} = 6$ Hz) ppm. – MS. (hochaufgelöst): u. a. Spitzen bei m/e 507,2616 (M^+) $C_{30}H_{37}NO_6$ (ber. 507,2621); 489 ($M^+ - 18, H_2O$); 479,268 ($M^+ - 28, CO$); 464,244 ($M^+ - 43, Acetyl$); 447,240 ($M^+ - 60, Essigsäure$); 416,208 ($M^+ - 91, Benzyl$); 338,213 ($C_{22}H_{28}NO_2$); 320,203 ($C_{22}H_{28}NO$); 254,154 ($C_{17}H_{20}NO$); 174,094 ($C_{11}H_{12}NO$); 120,085 ($C_8H_{10}N$); 105,073 (C_8H_9) und 91 (C_7H_7 , Tropyliumion, Basisspitze).

$C_{30}H_{37}NO_6$ (507) Ber. C 70,98 H 7,35% Gef. C 71,07 H 7,39%

3. *Dodecahydrocytochalasin D (3)*. Eine Lösung von 401 mg (0,790 mmol) Cytochalasin D (1) in 25 ml Eisessig wurde mit 200 mg PtO_2 während 5 Std. hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde der Eisessig durch mehrmaliges Abdampfen mit Benzol/Äthanol entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet: 411 mg Dodecahydrocytochalasin D (3) (100%) als Isomerenmischung in Form eines farblosen Schaums. Die Isomeren wurden durch PDC. in Äther/Methanol 96:4 getrennt, und anschließend das unpolare Isomere **3a** durch PDC. in Äther (2mal) und das polare Isomere **3b** durch PDC. in Äther/Methanol 95:5 gereinigt. Aus 44 mg Isomerenmischung **3** resultierten 10 mg **3a** und 18 mg **3b**.

Dodecahydrocytochalasin D **3a**: Rf = 0,65 (Äther/Methanol 96:4), amorph, $[\alpha]_D^{24} = -24^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,56$ in Methanol), $[\alpha]_D^{24} = -37^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,52$ in Chloroform). – UV.-Spektrum (Äthanol): Maximum bei 274 nm ($\log \epsilon = 1,88$). – IR.-Spektrum ($CHCl_3$): u. a. Banden bei 3630 (OH); 3430 (NH); 3600–3200 (OH, NH assoz.); 2980, 2930, 2860 (CH); 1730, 1705, 1690 (C=O; Ester, Keton, Lactam); 1445, 1380; 1240 (C–O–C); 1070, 1015 (C–O–H); 950 cm^{-1} . – NMR.-Spektrum (90-MHz mit *Fourier*-Transform, $CDCl_3$): u. a. Signale bei 6,10 (*s*, 1H); 5,20 (*m*, 1H); 4,55 (*s*, 1H); 3,63 (*m*, 1H); 3,33 (*m*, 1H); 2,83 (*m*, 1H); 2,04 (*s*, 3H Acetoxy an C(21)); 1,45 (*s*, 3H Methyl an C(18)); 1,24–0,95 (*m*, 9H Methyl an C(5), C(6) und C(16)) ppm. – MS.: u. a. Spitzen bei m/e 519 (M^+); 501 ($M^+ - 18, H_2O$); 491 ($M^+ - 28, CO$); 476 ($M^+ - 43, Acetyl$); 459 ($M^+ - 60, Essigsäure$); 262 (Basisspitze); 180, 126.

Dodecahydrocytochalasin D **3b**: Rf = 0,50 (Äther/Methanol 96:4), Smp. 214–216°, $[\alpha]_D^{24} = -25^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,63$ in Methanol), $[\alpha]_D^{24} = -37^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,64$ in Chloroform). – UV.-Spektrum (Äthanol): Maximum bei 274 nm ($\log \epsilon = 1,70$). – IR.-Spektrum ($CHCl_3$): identisch mit IR.-Spektrum von **3a**. – NMR.-Spektrum (90-MHz mit *Fourier*-Transform, $CDCl_3$): u. a. Signale bei 5,96 (*s*, 1H); 5,22 (*m*, 1H); 4,75 (*s*, 1H); 3,45 (*m*, 1H); 3,08 (*m*, 1H); 2,80 (*m*, 1H); 1,99 (*s*, 3H Acetoxy an C(21)); 1,46 (*s*, 3H Methyl an C(18)); 1,26–0,97 (*m*, 9H Methyl an C(5), C(6) und C(16)) ppm. – MS.: identisch mit MS. von **3a**.

4. *Desacetyldodecahydrocytochalasin D (4)*. Zu einer Lösung von 357 mg (0,687 mmol) Dodecahydrocytochalasin D (3) in 20 ml Methanol und 5 ml Wasser wurden 958 mg (6,95 mmol) K_2CO_3 gegeben. Nach 24 Std. Rühren bei 23° wurde die klare, farblose Lösung mit 2N Salzsäure sauer gestellt und im Vakuum eingengt. Desacetyldodecahydrocytochalasin D (4) kristallisierte in farblosen Nadeln (274 mg, 83%) aus. Die Mutterlauge lieferte nach üblicher Extraktion und Aufarbeitung weitere 37 mg (12%). Gesamtausbeute: 311 mg (95%). Entsprechend dem Edukt **3** bestand **4** aus einem Gemisch von zwei Isomeren, die nicht getrennt wurden, sondern gemeinsam durch Chromatographie an Kieselgel mit Methylenchlorid/Methanol 99:1 gereinigt und anschließend aus Aceton/Petroläther gefällt wurden. – IR.-Spektrum ($CHCl_3$): u. a. Banden bei 3600 (OH); 3430 (NH); 3600–3200 (OH, NH assoz.); 2930, 2860 (CH); 1705, 1670 (C=O; Keton, Lactam); 1450, 1375, 1080, 1015 (C–O–H); 940 cm^{-1} . – MS.: u. a. Spitzen bei m/e 477 (M^+); 459 ($M^+ - 18, H_2O$); 449 ($M^+ - 28, CO$); 441 ($M^+ - 36, 2H_2O$); 431 ($M^+ - 46, H_2O + CO$); 413 ($M^+ - 64, 2H_2O + CO$); 262 (Basisspitze); 180, 126.

5. *Kuhn-Roth-Abbau von Desacetyldodecahydrocytochalasin D (4)*. 58,6 mg (0,123 mmol) **4** wurden mit 10 ml Oxydationslösung nach *Kuhn-Roth* [10] (100 g CrO_3 , 150 ml H_2SO_4 konz., 600 ml H_2O) im Bombenrohr 2 Std. auf 135° erhitzt. Das Gemisch wurde mit Wasserdampf destilliert, und die im Destillat (400 ml) enthaltene Essigsäure (5) gegen Phenolphthalein mit 0,01N NaOH-Lösung (Verbrauch 42,38 ml, 0,413 mmol) titriert. Ausbeute: 84%. Die wässrige Lösung wurde eingedampft und das Na-Acetat (5a) nach *Schmidt* abgebaut.

6. *Schmidt-Abbau von Natriumacetat (5a)*. 41,3 mg (0,413 mmol) **5a** wurden in einer verschlossenen Spezialapparatur [12] bei 14 Torr mit 123 mg (1,9 mmol) NaN_3 und 3 g Polyphosphorsäure/Wasser 95:5 während 1,5 Std. auf 90° erwärmt. Das entstandene CO_2 (6) wurde in 30 ml $Ba(OH)_2$ -Lösung (48 g $Ba(OH)_2$ und 18 g $BaCl_2/l$) aufgefangen. Das $BaCO_3$ (7) wurde unter N_2 abzentrifugiert, mit Wasser und Methanol gewaschen und getrocknet: 71 mg $BaCO_3$ (7), 87%.

Die phosphorsaure Lösung von Methylamin (**8**) wurde mit 15 ml Wasser verdünnt und in einer geschlossenen Wasserdampfdestillations-Apparatur mit 10 ml 30proz. NaOH-Lösung basisch gestellt. Dann wurden mit Wasserdampf 300 ml destilliert, die in einer Lösung von 257 mg Pikrinsäure in 5 ml Äthanol und 25 ml Wasser aufgefangen wurden. Das Wasser wurde im Vakuum abdestilliert, der trockene Rückstand durch Aufkochen mit Benzol von der Pikrinsäure befreit und das Pikrat **9** aus Äthanol umkristallisiert: 73,5 mg reines Methylaminpikrat (**9**) (69%) vom Smp. 207–209° (Zers.), welches nach Misch-Smp. mit einem authentischen Präparat identisch war.

7. *Desacetylcytochalin D (2)*. Eine Lösung von 503 mg (0,991 mmol) Cytochalin D (**1**) in 30 ml Methanol und 6 ml Wasser wurde mit 1,363 g (9,90 mmol) K_2CO_3 versetzt. Nach 24 Std. Rühren bei 23° wurde die klare, gelbliche Lösung mit 2N Salzsäure neutral gestellt und im Vakuum eingengt. Desacetylcytochalin D (**2**) kristallisierte in farblosen Prismen (388 mg, 84%) aus. Die Mutterlauge lieferte nach üblicher Extraktion und Aufarbeitung weitere 71 mg (15%). Gesamtausbeute: 459 mg, 99%. PDC. mit Methylchlorid/Methanol 90:10 und anschliessendes Umkristallisieren aus Essigester lieferte **2** in kleinen, farblosen Prismen vom Smp. 185–187°. $[\alpha]_D^{25} = -15^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,58$ in Dioxan). - IR.-Spektrum ($CHCl_3$): u. a. Banden bei 3610, 3550 (OH); 3420 (NH); 3600–3200 (OH, NH assoz.); 3080 ($C=CH_2$); 3030 (Arom.); 2980, 2930 (CH); 1690 ($C=O$; Keton, Lactam); 1600, 1495 (Arom.); 1080, 1010 ($C-O-H$); 970, 910 cm^{-1} . - NMR.-Spektrum (60-MHz, $CDCl_3$): u. a. Signale bei 7,25 (*m*, 5H Phenylrest); 5,95 (*s*, 1H N(2), tauscht mit D_2O aus); 5,30 (*s*, 2H, C(12) + ?); 5,07 (*s*, 1H C(12)); 4,00 (*m*, 1H C(21)); 3,77 (*d*, 1H C(7)), $J_{7,8} = 11$ Hz); 3,2 und 2,6 (je 1H OH, tauscht mit D_2O aus); 1,52 (*s*, 3H Methyl an C(18)); 1,15 (*d*, 3H Methyl an C(16), $J = 7$ Hz); 1,02 (*d*, 3H C(11), $J_{5,11} = 7$ Hz) ppm. - MS.: u. a. Spitzen bei *m/e* 465 (M^+); 447 ($M^+ - 18, H_2O$); 437 ($M^+ - 28, CO$); 429 ($M^+ - 36, 2H_2O$); 419 ($M^+ - 46, H_2O + CO$); 401 ($M^+ - 64, 2H_2O + CO$); 374 ($M^+ - 91, Benzyl$); 338, 320, 254, 174, 120, 105, 91 (Basisspitze).

8. *Kuhn-Roth-Abbau von Desacetylcytochalin D (2)*. 64,1 mg (0,138 mmol) **2** wurden mit 10 ml verdünnter Oxydationslösung nach *Kuhn-Roth* (vgl. 5., aber 900 ml H_2O) im Bombenrohr 1 Std. auf 130° erhitzt. Die dabei entstandene Benzoesäure (**10**) und die Essigsäure (**12**) wurden mit Wasserdampf überdestilliert (400 ml) und gegen Phenolphthalein mit 0,01N NaOH-Lösung (Verbrauch 41,01 ml, 0,400 mmol) titriert. Ausbeute: 73%. Die Natriumsalze **10a** und **12a** der beiden Säuren wurden isoliert und in 2 ml Wasser und 4 ml Methanol bei pH 5–6 mit 222 mg (0,800 mmol) *p*-Bromphenacylbromid während 2,5 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Abdampfen der Lösungsmittel wurde das Reaktionsprodukt in Methylchlorid aufgenommen und die löslichen organischen von den unlöslichen anorganischen Verbindungen abfiltriert. Das Filtrat ergab 205 mg Rohprodukt, das durch aufeinanderfolgende PDC. mit Benzol/Methanol 97:3 und Benzol (2mal) getrennt wurde. Neben *p*-Bromphenacylalkohol und nicht umgesetztem *p*-Bromphenacylbromid wurden 23,5 mg Benzoesäurephenacylester (**11**) (54%) und 36 mg Essigsäurephenacylester (**13**) (34%) erhalten. Der aus Chloroform/Petroläther umkristallisierte Benzoesäurephenacylester (**11**) schmolz bei 116–117°, der aus Petroläther umkristallisierte Essigsäurephenacylester (**13**) bei 84–85°. Beide Derivate waren nach Misch-Smp. und DC. mit authentischen Präparaten identisch.

9. *Ozonolyse von Cytochalin D (1)*. Durch eine Lösung von 409 mg (0,806 mmol) **1** in 60 ml Methanol wurde bei -75° ein O_3/O_2 -Strom geleitet (200 ml $O_2/Min.$, O_3 -Gehalt 0,4 mmol/Min.) bis intensive Blaufärbung auftrat (175% O_3). Die kalte Lösung wurde unter Rühren portionenweise mit 1,01 g $NaBH_4$ versetzt. Nach 1 Std. hatte sie sich auf Raumtemp. erwärmt und enthielt keine Ozonide mehr. Sie wurde mit 30 ml 2N Schwefelsäure und 30 ml Wasser versetzt und im Vakuum auf 50 ml eingengt. Extraktion im *Kutscher-Stuedel*-Apparat mit Methylchlorid während 10 Tagen, Trocknen des Extrakts und Eindampfen lieferten 422 mg Ozonolysengemisch als fast farbloses, zähflüssiges Harz, welches im DC. (Methylchlorid/Methanol 80:20) im wesentlichen drei Flecke zeigte.

Das Ozonolysengemisch (422 mg) wurde zur Acetylierung 60 Std. bei 60° in 6 ml abs. Pyridin und 4 ml Acetanhydrid stengelassen. Abdampfen mit Benzol und Methylchlorid lieferte 587 mg acetylierte Ozonolysenprodukte als hellbraunes Harz. Dieses Gemisch wurde an 50 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Methylchlorid/Methanol 99:1 eluierten Fraktionen 8–22 (je 100 ml) enthielten das N-Acetyl-penta-O-acetyl- γ -lactam **15** (76 mg), 1,2,3,6-Tetraacetoxy-2,4-dimethyl-hexan (**18**) (74 mg), 1,3,6-Triacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2-ol (**17**) (39 mg) und das

Penta-O-acetyl- γ -lactam **14** (215 mg) in der aufgeführten Elutionsreihenfolge. Die Fraktionen 23–27 (Methylenchlorid/Methanol 98:2) enthielten 1,6-Diacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2,3-diol (**16**) (55 mg). Die Verbindungen wurden alle durch PDC. weitergetrennt oder gereinigt, die acetylierten Hexantetrole **16**, **17** und **18** zusätzlich durch Destillation im Kugelrohr (0,01 Torr/150°). Ausbeuten: Gemisch der Acetyl- γ -lactame **14** und **15** 62%, Gemisch der acetylierten Hexantetrole **16**, **17** und **18** 69%.

Penta-O-acetyl- γ -lactam **14**: $[\alpha]_D^{24} = -33^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,171$ in Chloroform). – IR.-Spektrum (CHCl_3) u. a. Banden bei 3600–3200 (NH, assoz.); 3420 (NH); 3050 (Arom.); 2980, 2950 (CH); 1740, 1705 (C=O, Ester, Lactam); 1610, 1500 (Arom.); 1430, 1370, 1240 (C–O–C) cm^{-1} . – NMR.-Spektrum (100-MHz, CDCl_3): u. a. Signale bei 7,3 (*m*, 5H Phenylrest); 5,9 (*s*, 1H N(2), tauscht mit D_2O aus); 4,3 (*AB*-System, verdoppelt, 2H C(13), $J_{gem} = -12$ Hz, $J_{8,13} = 6$ Hz); 6,0–3,5 (div. *m*, 6H); 3,5–2,5 (*m*, 3H); 2,1 (*m*, 15H Acetoxy); 1,2 (*d*, 1,2H) und 1,04 (*d*, 1,8H C(11), $J_{5,11} = 7$ Hz) ppm. – MS.: u. a. Spitzen bei *m/e* 575 (M^+); 532 ($M^+ - 43$, Acetyl); 516 ($M^+ - 59$, Acetoxy); 484 ($M^+ - 91$, Benzyl); 441 ($M^+ - 134$, Benzyl + Acetyl); 425 ($M^+ - 150$, Benzyl + Acetoxy); 382 ($M^+ - 193$, Benzyl + Acetoxy + Acetyl); 340, 174, 120, 105, 91 (Basisspitze).

N-Acetyl-penta-O-acetyl- γ -lactam **15**. – IR.-Spektrum (CHCl_3): u. a. Banden bei 3050 (Arom.); 2980, 2950 (CH); 1740, 1710 (C=O; Ester, Lactam); 1610, 1500 (Arom.); 1370; 1240 (C–O–C) cm^{-1} . – NMR.-Spektrum (60-MHz, CDCl_3): u. a. Signale bei 7,3 (*m*, 5H Phenylrest); 4,3 (*AB*-System, verdoppelt, 2H C(13), $J_{gem} = -12$ Hz, $J_{8,13} = 6$ Hz); 6,0–3,5 (div. *m*, 6H); 3,5–2,5 (*m*, 3H); 2,1 (*m*, 18H N-Acetyl und Acetoxy); 1,2 (*d*, 1,2H) und 1,04 (*d*, 1,8H C(11), $J_{5,11} = 7$ Hz) ppm. – MS.: u. a. Spitzen bei *m/e* 617 (M^+); 574 ($M^+ - 43$, Acetyl); 557 ($M^+ - 60$, Essigsäure); 526 ($M^+ - 91$, Benzyl); 514 ($M^+ - 103$, Essigsäure + Acetyl); 483 ($M^+ - 134$, Benzyl + Acetyl); 466 ($M^+ - 151$, Benzyl + Essigsäure); 423 ($M^+ - 194$, Benzyl + Essigsäure + Acetyl); 382, 216, 174, 120, 105, 91 (Basisspitze).

1,6-Diacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2,3-diol (**16**). – IR.-Spektrum (CHCl_3): u. a. Banden bei 3600–3200 (OH assoz.); 3520 (OH); 2970, 2940, 2890, 2850 (CH); 1730 (C=O); 1370, 1240 (C–O–C); 1040 (C–O–H) cm^{-1} . – NMR.-Spektrum (60-MHz, CDCl_3): u. a. Signale bei 4,2 (*AB*-System, 2H C(19), $J_{gem} = -12$ Hz); 4,1 (*t*, 2H C(14), $J_{14,15} = 6$ Hz); 4,0 (*d*, 1H C(17), $J_{16,17} = 5$ Hz); $\sim 2,8$ und $\sim 2,1$ (je 1H OH, tauscht mit D_2O aus); 2,1 (*s*, verdoppelt, 6H Acetoxy); 2,0–1,5 (*m*, 3H C(15) und C(16)); 1,3 (*s*, 3H Methyl an C(18)); 1,1 (*d*, 3H Methyl an C(16), $J = 7$ Hz) ppm. – MS.: u. a. Spitzen bei *m/e* 262 (M^+); 244 ($M^+ - 18$, H_2O); 226 ($M^+ - 36$, $2\text{H}_2\text{O}$); 202 ($M^+ - 60$, Essigsäure); 142 ($M^+ - 120$, 2 Essigsäure, Basisspitze).

1,3,6-Triacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2-ol (**17**). – IR.-Spektrum (CHCl_3): u. a. Banden bei 3600–3300 (OH assoz.); 2980, 2950, 2895 (CH); 1730 (C=O); 1370, 1250 (C–O–C); 1050 (C–O–H) cm^{-1} . – MS.: u. a. Spitzen bei *m/e* 286 ($M^+ - 18$, H_2O , Basisspitze); 245 ($M^+ - 59$, Acetoxy); 227 ($M^+ - 77$, Acetoxy + H_2O); 185 ($M^+ - 119$, 2 Acetoxy); 143 ($M^+ - 161$, 2 Acetoxy + Acetyl); 125 ($M^+ - 179$, 3 Acetoxy, Basisspitze).

1,2,3,6-Tetraacetoxy-2,4-dimethyl-hexan (**18**). – IR.-Spektrum (CCl_4): u. a. Banden bei 2980, 2940, 2890, 2850 (CH); 1740 (C=O); 1370, 1230 (C–O–C) cm^{-1} . – MS.: u. a. Spitzen bei *m/e* 174 ($M^+ - 172$, 4 Acetyl); 110 ($M^+ - 236$, 4 Acetoxy); 85 (Basisspitze).

10. *Hydrolytische Spaltung von Cytochalasin D (1)*. Eine Lösung von 334 mg (0,660 mmol) **1** in 20 ml Methanol und 4 ml Wasser wurde mit 508 mg (3,70 mmol) K_2CO_3 versetzt und unter N_2 während 96 Std. unter Rückfluss gekocht. Die braune Lösung wurde mit 30 ml Wasser verdünnt und auf die Hälfte eingedampft. Extraktion mit Chloroform im Basischen lieferte nach üblicher Aufarbeitung 44 mg Neutralkörper (gelbes Öl), das verworfen wurde. Die wässrige Phase wurde anschliessend mit 2N Salzsäure sauer gestellt, mit Chloroform und Äther extrahiert und auf übliche Weise aufgearbeitet. Das Rohprodukt (235 mg hellbrauner Schaum) zeigte im DC. (Methylenchlorid/Methanol 95:5 und Benzol/Methanol 90:10) im wesentlichen zwei Flecke. Es wurde in 10 ml Methanol gelöst und bei 0° mit trockener ätherischer Diazomethanlösung versetzt, bis keine N_2 -Entwicklung mehr beobachtet wurde. Eindampfen der Reaktionslösung, Aufnehmen in Essigester und übliches Aufarbeiten lieferten 234 mg Methylestergemisch (hellbrauner Schaum), das an 25 g Kieselgel chromatographiert wurde. Die mit Methylenchlorid/Methanol 99:1 eluierten Fraktionen 7–10 (je 50 ml) enthielten 62 mg *trans*-verknüpften Methyl-ester **21**, die Fraktionen 13–18 (Methylenchlorid/Methanol 98:2) 136 mg *cis*-verknüpften Methyl-ester **20**. Gesamtausbeute: 198 mg (76%). Nach Reinigung durch aufeinanderfolgende PDC. mit

Methylenchlorid/Methanol 92:8 und Benzol/Methanol 86:14 resultierten **21** als farbloses Öl (49 mg) und **20** als farbloser Schaum (108 mg), der aus Äther kristallisiert werden konnte.

cis-Methylester **20**: Rf = 0,30 (Methylenchlorid/Methanol 92:8), Smp. 108–110°, $[\alpha]_D^{24} = +56^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,14$ in Methanol), $[\alpha]_D^{24} = +18^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,17$ in Dioxan), $[\alpha]_D^{24} = +16^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,19$ in Chloroform). – IR.-Spektrum (CCl₄): u.a. Banden bei 3520 (OH); 3440 (NH); 3600–3200 (OH, NH assoz.); 3200, 3080 (C=CH₂); 3040 (Arom.); 2980, 2940, 2890, 2860 (CH); 1730, 1690 (C=O; Ester, Lactam); 1605, 1500 (Arom.); 1205, 1170 (C–O–C); 1030 (C–O–H); 980, 910, 705 (monosubst. Arom.) cm⁻¹. – NMR.-Spektrum (100-MHz, CDCl₃): u.a. Signale bei 7,25 (*m*, 5H Phenylrest); 6,04 (*AB*-System, verdoppelt und verbreitert, 1H C(13), $J_{13,14} = 15$ Hz, $J_{8,13} = 9$ Hz, $J_{au} = 1$ Hz); 5,78 (*s*, 1H N(2), tauscht mit D₂O aus); 5,56 (*AB*-System, verdreifacht und verbreitert, 1H C(14), $J_{13,14} = 15$ Hz, $J_{14,15} = 7$ Hz, $J_{au} = 1$ Hz); 5,27 (*s*, 1H C(12)); 5,08 (*s*, 1H C(12)); 4,03 (*d*, 1H C(7), $J_{7,8} = 9$ Hz); 3,67 (*s*, 3H Methoxy); 3,45 (*m*, 1H C(5)); 3,0–2,2 (*m*, 10H); 2,5 (1H OH, tauscht mit D₂O aus); 1,16 (*d*, 3H Methyl an C(16), $J = 9$ Hz); 1,10 (*d*, 3H C(11), $J_{5,11} = 9$ Hz) ppm. – MS.: u.a. Spitzen bei *m/e* 397 (*M*⁺); 379 (*M*⁺–18, H₂O); 366 (*M*⁺–31, Methoxy); 348 (*M*⁺–49, H₂O + Methoxy); 337 (*M*⁺–60, CH₃OCHO); 310 (*M*–87, CH₃OCO–CH–CH₃); 306 (*M*⁺–91, Benzyl); 288 (*M*⁺–109, Benzyl + H₂O); 274 (*M*⁺–123, Phenäthyl + H₂O); 246 (*M*⁺–151, Benzyl + CH₃OCHO); 179 (Basisspitze); 120, 105, 91.

trans-Methylester **21**: Rf = 0,45 (Methylenchlorid/Methanol 92:8), amorph, $[\alpha]_D^{24} = +39^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,69$ in Methanol), $[\alpha]_D^{24} = +11^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,68$ in Dioxan), $[\alpha]_D^{24} = -22^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,78$ in Chloroform). – IR.-Spektrum (CCl₄): u.a. Banden bei 3540 (OH); 3440 (NH); 3600–3200 (OH, NH assoz.); 3220, 3080 (C=CH₂); 3040 (Arom.); 2980, 2940, 2890, 2860 (CH); 1730, 1710 (C=O; Ester, Lactam); 1605, 1500 (Arom.); 1205; 1175 (C–O–C); 1040 (C–O–H); 970, 915, 705 (monosubst. Arom.) cm⁻¹. – NMR.-Spektrum (100-MHz, CDCl₃): u.a. Signale bei 7,25 (*m*, 5H Phenylrest); 5,89 (*s*, 1H N(2), tauscht mit D₂O aus); 5,69 (*AB*-System, verdoppelt, 1H C(13), $J_{13,14} = 16$ Hz, $J_{8,13} = 9$ Hz); 5,51 (*AB*-System, verdreifacht, 1H C(14), $J_{13,14} = 16$ Hz, $J_{14,15} = 7$ Hz); 5,23 (*t*, 1H C(12), $J_{au} = 2$ Hz); 4,94 (*t*, 1H C(12), $J_{au} = 2$ Hz); 3,86 (*dt*, 1H C(7), $J_{7,8} = 9$ Hz, $J_{au} = 2$ Hz); 3,68 (*s*, 3H Methoxy); 3,60 (*m*, 1H C(5)); 3,1–1,8 (*m*, 10H); ~2,8 (1H OH, tauscht mit D₂O aus); 1,22 (*d*, 3H Methyl an C(16), $J = 7$ Hz); 1,09 (*d*, 3H C(11), $J_{5,11} = 7$ Hz) ppm. – MS.: u.a. Spitzen bei *m/e* 397 (*M*⁺); 379, 366, 348, 337, 310 (Basisspitze); 306, 288, 274, 246, 174, 120, 105, 91.

11. *Dihydrocytochalasin D* (**22**). Eine Lösung von 401 mg (0,790 mmol) Cytochalasin D (**1**) in 80 ml Äthanol wurde unter Rühren bei 23° während 1 Std. mit 150 mg NaBH₄ in kleinen Portionen versetzt. Nach einer weiteren Std. Rühren wurde die Lösung 5 Std. stehengelassen. Dann wurde mit 50 ml Wasser verdünnt, das Äthanol abgedampft und, nach Ansäuern mit 2N Salzsäure, die wässrige Phase wie üblich extrahiert und aufgearbeitet. Das Rohprodukt (271 mg) wurde durch PDC. mit Äther/Methanol 92:8 gereinigt und lieferte ein Gemisch der beiden an C(17) isomeren Dihydrocytochalasine D (**22**) als farblosen Schaum (245 mg, 61%). – UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 245 (2,73), 252 (2,88), 258 (2,84), 264 (2,58) und 268 (2,42) nm (log ϵ). – IR.-Spektrum (CHCl₃): u.a. Banden bei 3600 (OH); 3420 (NH); 3600–3200 (OH, NH assoz.); 3090 (C=CH₂); 3050 (arom.); 2970, 2940, 2890 (CH); 1730, 1685 (C=O; Ester, Lactam); 1605, 1500 (Arom.); 1375, 1240 (C–O–C); 1020 (C–O–H); 915 cm⁻¹. – MS.: u.a. Spitzen bei *m/e* 509 (*M*⁺); 491 (*M*⁺–18, H₂O); 473 (*M*⁺–36, 2H₂O); 449 (*M*⁺–60, Essigsäure); 418 (*M*⁺–91, Benzyl); 400 (*M*⁺–109, Benzyl + H₂O); 358 (*M*⁺–151, Benzyl + Essigsäure); 340 (*M*⁺–169, Benzyl + Essigsäure + H₂O); 322 (*M*⁺–187, Benzyl + Essigsäure + 2H₂O); 240, 174, 172, 120, 105, 91 (Basisspitze).

12. *Periodatspaltung von Dihydrocytochalasin D* (**22**). Eine Lösung von 167 mg (0,327 mmol) **22** in 20 ml Methanol und 5 ml Wasser wurde mit 149 mg (0,654 mmol) H₅JO₆ versetzt und 24 Std. unter Rückfluss gekocht. Die Lösung wurde dann zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Extraktion mit Methylenchlorid lieferte einen violett gefärbten Auszug, der zur Entfärbung mit 1proz. Na₂S₂O₃-Lösung gewaschen wurde. Trocknen und Eindampfen ergab 160 mg gelben Schaum, der durch PDC. mit Methylenchlorid/Methanol 92:8 in 80 mg Edukt **22** (48%) und 52 mg 17,18-*seco*-Aldehyd **23** (31%) getrennt wurde. – UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 231 (3,95), 252 (2,87), 258 (2,79), 264 (2,55) und 268 (2,40) nm (log ϵ). – IR.-Spektrum (CHCl₃): u.a. Banden bei 3600 (OH); 3420 (NH); 3600–3200 (OH, NH assoz.); 3080 (C=CH₂); 3050 (Arom.); 2990, 2940, 2890, 2850 (CH); 2820, 2730 (CHO); 1740, 1725, 1705, 1695 (C=O);

Ester, Aldehyd, Keton, Lactam); 1640 (C=C konj.); 1610, 1500 (Arom.); 1380, 1240 (C—O—C); 1080 (C—O—H); 915 cm⁻¹.

13. *Haloform-Reaktion mit 23*. Zu einer Lösung von 50 mg (0,099 mmol) **23** in 2,5 ml Dioxan und 0,5 ml 10proz. NaOH-Lösung wurde eine KJ/J₂-Lösung (2 g KJ, 1 g J₂, 10 ml H₂O) solange zugetropft bis die Braunfärbung bei 60° beständig war. Dann wurde die Lösung mit 10proz. NaOH-Lösung wieder entfärbt und mit Wasser verdünnt. Es entstand eine milchige Trübung, wobei der typische Jodoformgeruch wahrnehmbar wurde. Übliche Extraktion und Aufarbeitung lieferte ein braunes Harz, aus dem durch Sublimation (0,01 Torr/130°) 3,50 mg Jodoform (**25**) (9%) gewonnen wurde. **25** kristallisierte aus Methanol in kleinen, gelben Plättchen vom Smp. 120–121°, die nach Misch-Smp. und DC. mit einem authentischen Präparat identisch waren. Das radioaktive Jodoform (**25**) (3,50 mg) wurde mit inaktivem Jodoform (37,00 mg) verdünnt und das Gemisch aus Methanol umkristallisiert. Es resultierten 36 mg eines Jodoform-Präparats **25'**, welches für die Radioaktivitätsmessung verwendet wurde.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *M. Binder, J. R. Kiechel & Ch. Tamm*, *Helv.* **53**, 1797 (1970).
 [2] Vgl. *M. Binder & Ch. Tamm*, *Angew. Chem.* **85**, 369 (1973); *Internat. Edit.* **12**, 370 (1973).
 [3] Vgl. *S. B. Carter*, *Endeavour* **113**, 77 (1972).
 [4] *M. Binder & Ch. Tamm*, *Helv.* **56**, 966 (1973); **56**, 2387 (1973).
 [5] *M. Binder, Ch. Tamm, W. B. Turner & H. Minato*, *J. C. S. Perkin I* **1973**, 1146.
 [6] *D. C. Aldridge & W. B. Turner*, *J. chem. Soc. (C)* **1969**, 923.
 [7] *H. Minato & M. Matsumoto*, *J. chem. Soc. (C)* **1970**, 38.
 [8] *Y. Tsukuda & H. Koyama*, *J. C. S. Perkin II* **1972**, 739.
 [9] *W. Graf, J. L. Robert, J. C. Vederas, Ch. Tamm, P. H. Solomon, I. Miura & K. Nakanishi*, *Helv.* **57**, 1801 (1974).
 [10] *F. Pregl & H. Roth*, «Quantitative Organische Mikroanalyse», 7. Auflage, Springer-Verlag, Wien 1958.
 [11] *Organic Reactions*, **3**, 307–336 (1947): The *Schmidt*-Reaction.
 [12] *J. J. Britt*, *Diss. ETH*, Nr. 2948, Zürich 1959.
 [13] *F. Kalberer & J. Rutschmann*, *Helv.* **44**, 1956 (1961).
 [14] Vgl. *H. R. Mahler*, in *K. S. Markley* (Edit.), «Fatty Acids», Interscience, New York 1964.

191. Biosynthesis of the Cytochalasins. Part III.

¹³C-NMR. of Cytochalasin B (Phomin) and Cytochalasin D.Incorporation of [1-¹³C]- and [2-¹³C]-Sodium Acetate¹⁾

by **Werner Graf, Jean-Louis Robert, John C. Vederas and Christoph Tamm**

Institut für Organische Chemie der Universität Basel, Schweiz

Philippa H. Solomon, Iwao Miura and Koji Nakanishi

Department of Chemistry, Columbia University, New York, New York, U.S.A.

(26. VI. 74)

Summary. Sequential single frequency decoupling and partially relaxed *Fourier* transform (PRFT) are used to assign the natural abundance ¹³C-NMR. spectra of cytochalasin B (phomin) (**1**) and cytochalasin D (**2**). Cultures of *Phoma spec.* S 298 were fed [2-¹³C]-sodium acetate, and the distribution of this precursor in cytochalasin B (phomin) (**1**) was determined by ¹³C-NMR. spectroscopy. Likewise, the labelling patterns in cytochalasin D (zygospurin A) (**2**) from *Zygos-*

1) Part. II. see [1].