



UOVS-SASOL-BIBLIOTEK 0102476



11109525310122000019

171141

DIE CHEMIESE ONDERSOEK VAN GIFTIGE

SKIMMELS WAT UIT VOEDINGSTOWWE

GEÏSOLEER IS

deur

PIETER JOZUA AUCAMP

PROEFSKRIF

voorgelê ter vervulling van die
vereistes vir die graad

DOKTOR SCIENTIAE

in die

FAKULTEIT NATUURWETENSKAPPE

aan die

UNIVERSITEIT VAN DIE ORANJE-VRYSTAAT

BLOEMFONTEIN

JANUARIE 1969

Promotor : Prof. dr. D.G. Roux

Mede-

promotor : Dr. C.W. Holzapfel

BRASO

HIERDIE EKSEMPLAAR MAG ONDER
GEEN OMSTANDIGHEDE UIT DIE
BIBLIOTEEK VERWYDER WORD NIE

Universiteit van die Oranje-Vrystaat
BLOEMFONTEIN
- 5-5-1969 *Auc.*
KLAS No. *102476*
No. 102476
BIBLIOTEEK

Hiermee wil ek my opregte dank betuig aan die volgende persone:

Die hoof van die Grondnavorsingsinstituut, Departement Landbou-Tegniese Dienste, en die direkteur van die Nasionale Chemiese Navorsingslaboratorium, W.N.N.R., vir toestemming om die resultate van die werk, in hul diens en laboratoria uitgevoer, as materiaal vir hierdie proefskrif te gebruik.

Dr. C. v.d. M. Brink vir sy belangstelling, hulp en aanmoediging gedurende die vroeë stadiums van die projek.

Prof. dr. D.G. Roux vir sy tegemoedkomendheid en hulpvaardige kommentaar oor die proefskrif.

Dr. C.W. Holzapfel vir sy leiding en hulp gedurende die ondersoek en by die skrywe van die proefskrif.

Mej. C. Clarke vir haar geduld en uiters bekwame tikwerk.

Dr. M.J. Pieterse vir sy hulp en raad gedurende die tydperk waarin die ondersoek uitgevoer is.

My kollegas van die Grondnavorsingsinstituut en die N.C.N.L. vir hul vriendelikheid en hulpvaardigheid.

My ouers en skoonouers vir hul opoffering en gedurige aanmoediging.

Isa vir al haar bystand, opoffering, geduld en hulp gedurende die afgelope paar jaar.

INHOUDSOPGAVE

OPSOMMING

AFKORTINGS

INLEIDING

| | | | |
|----------|-------|--|----|
| HOOFSTUK | 1. | <u>Fenoliese medemetaboliete van sterigmatosistien</u> | 1 |
| | 1 | Inleiding | 11 |
| | 2 | Hidroksiantraknone | |
| | 2.1 | Algemeen | 12 |
| | 2.2 | Groep A : Averufien, nidurufien en versikolorien C | |
| | 2.2.1 | Struktuur van averufien | 13 |
| | 2.2.2 | Massaspektrum van averufien | 19 |
| | 2.2.3 | Stereochemie van averufien | 27 |
| | 2.2.4 | Struktuur van nidurufien | 29 |
| | 2.2.5 | Massaspektrum van nidurufien | 35 |
| | 2.2.6 | Sirkulêre dichroïsme spektra van averufien en nidurufien | 37 |
| | 2.2.7 | Versikolorien C | 39 |
| | 2.3 | Groep B : Bipolarien en averufanien | |
| | 2.3.1 | Bipolarien | 41 |
| | 2.3.2 | Averufanien | 47 |
| | 2.4 | Groep C : 1'-O-metielaverantien | 47 |
| | 2.5 | Struktuur en biogenese van die hidroksi-antraknone | 49 |
| | 3 | Nidulol | 53 |
| | 4 | Kurvularien | 59 |

| | | |
|--|--|-----|
| 5 | Pogings om sterigmatosistien chemies te hidroksileer | 60 |
| HOOFSTUK 2. <u>Isolasie en struktuurbeplating van asperkolorien, 'n sikliese tetrapeptied uit <u>A. versicolor</u></u> | | |
| 1 | Inleiding | 63 |
| 2 | Isolasie van asperkolorien | 65 |
| 3 | Struktuurbeplating | |
| 3.1 | Identifikasie van die aminosuurkomponente | 66 |
| 3.2 | Optiese aktiwiteit van die aminosuurkomponente | 73 |
| 3.3 | Aminosuurvolgorde | 74 |
| HOOFSTUK 3. <u>Moontlike sinteses van asperkolorien</u> | | |
| 1 | Inleiding | 85 |
| 2 | Peptiedsintese | 85 |
| 3 | Sintese van 'n liniêre tetrapeptied met dieselfde aminosuurvolgorde as asperkolorien | 92 |
| 4 | Bereiding van ander liniêre tetrapeptiede wat in aminosuurvolgorde van asperkolorien verskil | 95 |
| HOOFSTUK 4. <u>Eksperimentele gedeelte</u> | | |
| 1 | Algemeen | 98 |
| 2 | Ekstraksie en voorlopige fraksionering | 98 |
| 3 | Skeiding van die fenoliese fraksies | |
| 3.1 | <u>A. nidulans</u> | 99 |
| 3.2 | <u>A. versicolor</u> | 102 |
| 3.3 | <u>Bipolaris sp.</u> | 103 |
| 4 | Skeiding van die neutrale fraksie van <u>A. versicolor</u> | 104 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 5 | Chemiese reaksies uitgevoer op die hidroksi-antrakinone | |
| 5.1 | Metilasie van die hidroksiantrakinone | 105 |
| 5.2 | Deuterering van averufien | 107 |
| 5.3 | Oksidasie van nidurufien | 107 |
| 5.4 | Behandeling van bipolarien met osmium-tetraoksied | 107 |
| 5.5 | Omskakeling van 1'-O-metielaverantien na averytrien | 108 |
| 6 | Chemiese reaksies uitgevoer op nidulol | |
| 6.1 | Metilasie | 108 |
| 6.2 | Oksidasie van O-metielnidulol | 109 |
| 6.3 | Selektiewe demetilasie van O-metielnidulol | 110 |
| 7 | Metilasie van kurvularien | 110 |
| 8 | Chemiese reaksies uitgevoer op sterigmato-sistien | 111 |
| 9 | Chemiese reaksies uitgevoer op asperkolorien | |
| 9.1 | Hidrolise | 113 |
| 9.2 | Sintese van L-difenielalaniendiketo-piperasien | 115 |
| 9.3 | Sintese van L-diproliendiketopiperasien | 116 |
| 9.4 | Sintese van 5-metoksiantranielsuur | 116 |
| 10 | Sintese van liniêre peptiede | |
| 10.1 | Bereiding van uitgangsstowwe | |
| 10.1.1 | Metielesters van die aminosure | 118 |
| 10.1.2 | Formilering van die aminosure | 118 |
| 10.1.3 | Etalofel-L-fenielalanien | 119 |
| 10.1.4 | Etalofel-L-fenielalaniensuurchloried | 119 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 10.1.5 | Formiel-L-fenielalanien-p-nitrofeniel- ester | 120 |
| 10.1.6 | L-fenielalanien-p-nitrofenielester- hidrobromied | 120 |
| 10.1.7 | 5-metoksi-2-nitrobensoësuur-p-nitro- fenielester | 120 |
| 10.1.8 | β -nitropropioonsuur | 121 |
| 10.2 | Koppeling van die aminosuurderivate | |
| 10.2.1 | o-Nitrobensoësuur en L-fenielalanienmetiel- ester | 121 |
| 10.2.2 | Sintese van ftaloëel-L-fenielalaniel- antraniëlsuurmetielester | 123 |
| 10.2.3 | Sintese van formiel- β -alaniel-L-prolien- metielester | 123 |
| 10.2.4 | Sintese van 5-metoksiantranofel-feniel- alanienmetielester | 124 |
| 10.2.5 | Sintese van β -nitropropioniel-L-prolien | 125 |
| 10.2.6 | Sintese van β -alaniel-L-proliel-5-metoksi- antranofel-L-fenielalanien | 125 |
| 10.2.7 | Sintese van 5-metoksiantranofel-L-feniel- alaniel-L-prolienmetielester | 126 |
| 10.2.8 | Sintese van formiel-L-fenielalaniel- antranofel- β -alanienmetielester | 127 |
| 10.2.9 | Sintese van formiel-L-fenielalaniel-L- prolienmetielester; verwydering van die formielgroep | 128 |

VERWYSINGS

OPSOMMING

'n Groot aantal van die skimmels wat plaaslik op voedingsstowwe voorkom is giftig. In hierdie proefskrif word die isolasie en die identifikasie van die gifstowwe van die skimmels, Aspergillus nidulans (Eidam) Wint., Aspergillus versicolor (Vuill) Tiraboschi en Bipolaris sp. beskryf. Die skimmels is op gesteriliseerde mielie-meel gekweek en die gifstowwe is met 'n chloroform-metanol mengsel geëkstraheer. Na verwydering van die nie-giftige vette, wateroplosbare stowwe en sure is die giftige ekstrak verdeel in fenoliese- (natriumkarbonaat oplosbare) en neutrale fraksies. Hierdie fraksies is verder onderverdeel deur middel van verdelings- en adsorpsiechromatografie. Die giftigheid van die verskillende fraksies is bepaal deur voedingseksperimente met dagoud eende- en hoenderkuikens.

Fenoliese gifstowwe:

Die fenoliese gifstowwe van hierdie skimmels is meestal hidrokسي-antrakinone. 'n Aantal, averufien (17), averufanien (33) en versikolorien C (29), is reeds voorheen uit A. versicolor stamme geïsoleer. Hierdie hidrokسي-antrakinone is nou vir die eerste maal uit A. nidulans en Bipolaris sp. stamme geïsoleer.

Die inligting en argumente wat voorheen aangevoer is ter staving van die struktuur (17) vir averufien is krities ontleed en die gevolgtrekking, dat die struktuur van averufien nie onomwonde bewys is nie, is gemaak. Aanvullende chemiese en spektroskopiese gegewens, wat bewys dat die struktuur wel korrek is, word bespreek.

Die isolasie van drie nuwe hidrokسي-antrakinone, nidurufien (uit A. nidulans), bipolarien (uit Bipolaris sp.) en 1'-O-metielaverantien (uit A. versicolor) word beskryf. Hierdie metaboliete kom in uiters klein hoeveelhede voor en die struktuurbevestiging het hoofsaaklik op moderne fisiese

tegnieke, veral kernmagnetiese resonans- en massaspektrometrie, berus. Die ultraviolet- en k.m.r.-spektra van hierdie verbindings het aangedui dat hulle almal, net soos averufien, averufanien en versikolorien C, 'n 1,3,6,8-suurstofsustituisiepatroon besit. Hulle verskil egter in die nie-aromatiese gedeelte van die struktuur.

Nidurufien (26, R = R' = H) : Analise van die massa- en k.m.r.-spektra van nidurufien ($C_{20}H_{16}O_8$) het aangedui dat dit, deur die teenwoordigheid van 'n sekondêre hidroksielgroep in die nie-aromatiese gedeelte, van averufien verskil. Dié sekondêre hidroksielgroep is selektief na 'n ketogroep geoksideer. Die sein van die proton, op posisie C-1', in die k.m.r.-spektrum van nidurufien kom as 'n swak opgeloste doeblet voor. Die sein, van die ooreenkomstige proton in die k.m.r.-spektrum van dehidronidurufien (27) is 'n skerp enkelsein. Na aanleiding van hierdie resultaat is die hidroksielgroep op posisie C-2' geplaas. Die Cotton effekte in die sirkulêre dichroïsme spektra van nidurufien en averufien is feitlik identies en die resultaat word in terme van die absolute stereochemie van averufien en nidurufien bespreek.

Bipolarien (32) : Hierdie verbinding met molekulêrformule $C_{18}H_{14}O_7$ se fisiese gegewens het getoon dat twee van die suurstofatome as karbonielgroepe en vier as fenoliese hidroksielgroepe teenwoordig is. Die infrarooispektrum het die afwesigheid van 'n alifatiese ketoon aangedui. Die tetra-O-metiel-derivaat is stabiel teenoor behandeling met osmiumtetrakoksied. Die nie-aromatiese gedeelte is dus versadig. Die sewende suurstofatoom is gevolglik aan 'n versadigde eterringsstelsel toegeken. Analise van die massa- en k.m.r.-spektra het bewys dat bipolarien 'n 1'-tetrahidroksifuraansustituent in die 2-posisie van die antrakinoonkern besit.

1'-O-metielaverantien (34) : Die massaspektrum van die verbinding $C_{21}H_{22}O_7$ het aangedui dat dit 'n C_6 -alkielsyketting, wat met 'n O-metielgroep gesubstitueer is, bevat. Die O-metielgroep is op koolstof C-1' geplaas na aanleiding van die voorkoms van die sein van die proton op C-1' in die k.m.r.-spektrum. Hierdie sein stem baie goed ooreen met die sein van 'n soortgelyke proton in averufanien. 'n Direkte bewys vir die struktuur is verkry deur die omskakeling van 1'-O-metielaverantien na averytrien deur die suurgekataliseerde uitsplitsing van metanol.

Twee ander fenoliese verbindings is ook geïsoleer. Die metaboliet kurvularien (52) is nou vir die eerste maal uit Bipolaris sp. geïsoleer. Hierdie verbinding is 'n bekende stofwisselingsproduk van Curvularia siddiqui en Penicillium steckii.

Nidulol (42, R = H) : Die verbinding $C_{10}H_{10}O_4$ se struktuur is vasgelê as 5-hidroksi-6-metiel-7-metoksiftalied op grond van die fisiese data van nidulol, O-metielnidulol (42, R = CH_3) en die ftaalanhidried (43a) wat by die oksidasie van O-metielnidulol met kaliumpermanganaat verkry is.

Neutrale gifstowwe:

Die giftigheid van die neutrale fraksies van al drie skimmels kan hoofsaaklik aan die teenwoordigheid van die karsinogene metaboliet, sterigmatosistien (13, $R_1 = R_2 = H$) toegeskryf word. Sterigmatosistien was voorheen slegs bekend as 'n stofwisselingsproduk van A. versicolor. Kwantitatiewe bepalinge van die sterigmatosistienproduksie van verskillende stamme van hierdie skimmels het getoon dat die sterigmatosistienproduksie aansienlik wissel. Die aanvoerwerk vir die omskakeling van sterigmatosistien na die verwante gifstof aspertoksien (13, $R_1 = H$, $R_2 = OH$) word beskrywe.

Afgesien van sterigmatosistien het die neutrale gedeeltes van hierdie skimmels geen ander gifstowwe, behalwe in die geval van A. versicolor, bevat nie. Uit A. versicolor is 'n groeivertragende, sikliese tetrapeptied,

genoem asperkolorien, geïsoleer.

Asperkolorien (80) : Die verbinding, $C_{25}H_{28}N_4O_5$, is as 'n sikliese tetrapeptied gekarakteriseer. Hidrolise van asperkolorien het L-fenielalanien, L-prolien, β -alanien en 'n aromatiese aminosuur gelewer. Laasgenoemde is geïdentifiseer as 5-metoksiantranielsuur en is nog nie voorheen uit 'n natuurlike bron geïsoleer nie. Deur 'n intensiewe analise van die krakingspatroon van asperkolorien in die massaspektrometer, is die aminosuurvolgorde van asperkolorien bepaal.

Sintese van liniêre peptiede:

Vier verskillende liniêre tetrapeptiede kan as moontlike sintetiese voorlopers van asperkolorien beskou word. Die sintese van een van hierdie tetrapeptiede word beskryf. 'n Begin is gemaak met die sintese van peptiede wat slegs in aminosuurvolgorde van asperkolorien verskil. Die sinteses is aansienlik bemoeilik as gevolg van die teenwoordigheid van 5-metoksi-antranielsuur in die peptiede. Die milde koppelingsmetodes, wat algemeen vir aminosure gebruik word, kan nie suksesvol op hierdie ongewone aminosuur toegepas word nie.

'n Gedeelte van die werk wat in hierdie proefskrif aangebied word het verskyn in die publikasie : „The constitution of nidulol, a metabolic product of Aspergillus nidulans (Eidam) Wint." deur P.J. Aucamp en C.W. Holzapfel in J. S. Afr. Chem. Inst., 21, 26 (1968).

A F K O R T I N G S

In hierdie proefskrif word van die volgende afkortings vir aminosure en hul derivate gebruik gemaak.

Die afkortings is in ooreenstemming met die erkende internasionale konferensies soos uiteengesit deur E. Schröder en K. Lübke in die eerste volume van "The Peptides" (bl. xiii - xxix).

| | | | |
|----------------------------|--------------------------------------|-----------------|------------------------------|
| Ala | - alanien | Hipro | - hidroksiprolien |
| β -Ala | - β -alanien | His | - histidien |
| Ant | - antranielsuur | Ileu | - Isoleusien |
| Asp | - aspertiensuur | Leu | - Leusien |
| Asp-NH ₂ | - aspertiensuur- α -amied | Niben | - nitrobensoësuur |
| Dichloropro | - 3,4-dichloroprolien | β -Niprop | - β -nitropropioonsuur |
| Fen | - β -fenielalanien | Nval | - norvalien |
| α -Fe- β -ala | - α -feniel- β -alanien | Orn | - ornitien |
| Glu | - glutamiensuur | Meant | - 5-metoksiantranielsuur |
| Glu-NH ₂ | - glutamien | Pro | - prolien |
| Gli | - glisien | Tir | - tirosien |
| Hiala | - hidroksialanien | Tri | - triptofaan |
| Hiasp | - hidroksiaspertiensuur | Val | - valien |

Tensy anders vermeld is dit altyd die L-vorm van die aminosure wat voorgestel word. Die aminosure word altyd geskryf met die karbonielgroep aan die regterkant en die aminogroep aan die linkerkant.

Vir die verskillende derivate word die volgende afkortings gebruik:

| | | | |
|--------|------------------------------|-------------------|----------------------|
| d.s.k. | - disikloheksielkarbodiimied | Kbo- | - karbobensoksi- |
| Form- | - formiel- | -OCH ₃ | - metielester |
| Fta- | - ftaloïel | -PNF | - p-nitrofenielester |

As voorbeelde van hoe die afkortings gebruik word, kan die volgende dien:

N-formielprolien - Form - Pro

β -fenielalanienmetielester - Fen - OCH₃

N-ftalofel- β -alanien-5-metoksiantranielsuurmetielester -

Fta - β - Ala - Meant - OCH₃

I N L E I D I N G

Siekteverskynsels wat veroorsaak word deur skimmels wat parasities in die gasheer groei, is lank reeds die onderwerp van intense studie. Tot redelik onlangs is daar egter geen sistematiese ondersoek na die effek van skimmelbesmette voedsel op die gesondheid van hoër organismes deurgevoer nie.

Teen die einde van die vorige eeu was dit reeds bekend¹ dat skimmels tot die vorming van giftige metaboliete in staat is, maar die verband tussen hierdie gifstowwe en sekere siekteverskynsels was in die algemeen nie herken nie. Siekteverskynsels wat ontstaan as gevolg van die inname van voedsel wat met die skimmelgifstowwe besmet is, staan as mikotoksikoses² bekend. Hierdie akute of chroniese siektetoestande van mens of dier is nie aansteeklik nie en word gekarakteriseer deur hul sporadiese voorkoms in verskillende streke en seisoene.

Ergotisme³ is waarskynlik die eerste siekteverskynsel wat as 'n mikotoksikose herken is. Hierdie siekte word veroorsaak deur die inname van brood, berei van graan wat met die skimmel Claviceps purpurea (Fr.) Tul. besmet is. Hierdie skimmel produseer 'n reeks biologies-aktiewe alkalofede⁴ soos ergotamien (1a), ergokristien (1b), ergokarmien (1c) en ergokriptien (1d), wat vir die vergiftiging verantwoordelik is.

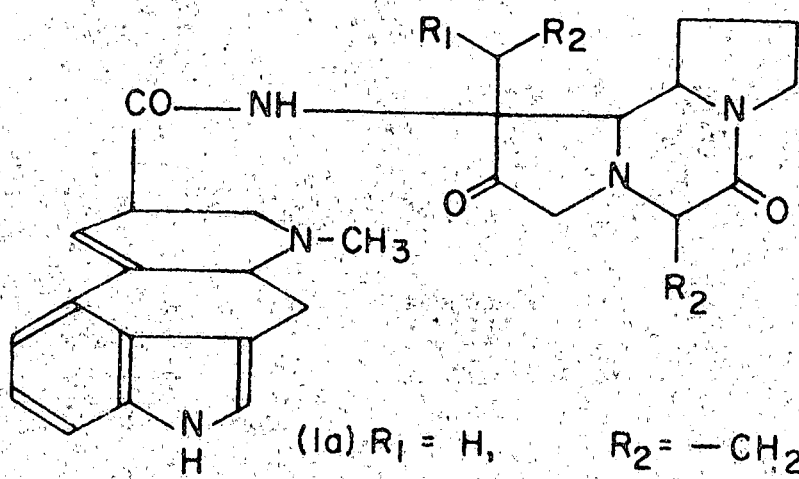
Daar bestaan twee verskillende soorte ergotisme naamlik gangrene- en krampagtige-ergotisme. Die eerste simptome van gangrene-ergotisme is prikkelbaarheid van die vel, vomering en buikloop. Na 'n paar dae verskyn daar duidelike tekens van gangreen, veral in die ledemate. Die vroeë simptome van krampagtige-ergotisme is feitlik identies met die van gangrene-ergotisme, maar word gevolg deur geweldige spierkrampe wat 'n epileptiese

aard aanneem. In die verlede het baie mense in Europa aan hierdie siekte beswyk.

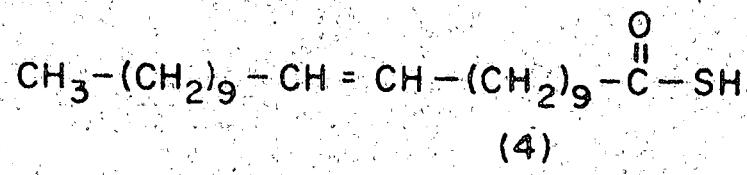
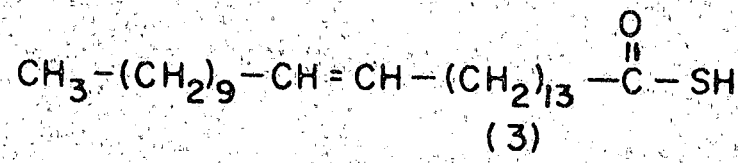
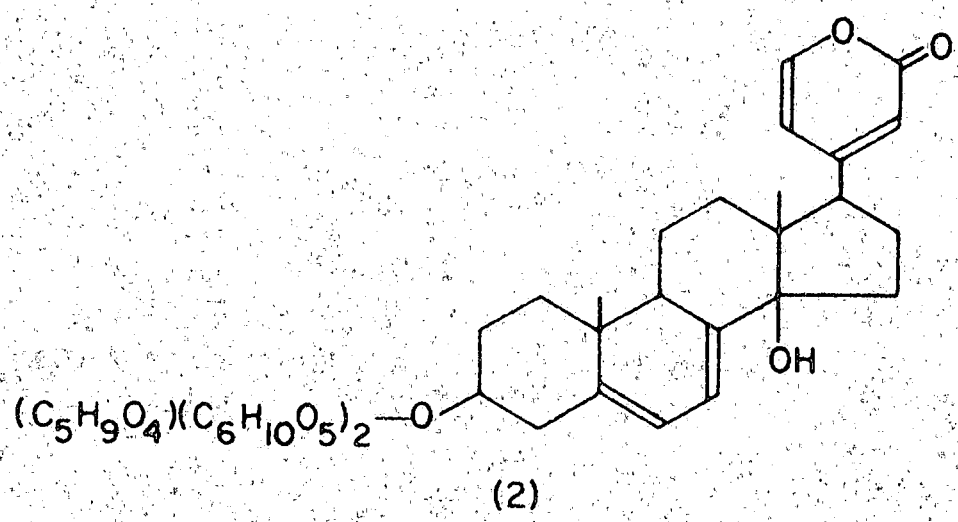
Nieteenstaande die feit dat dit bekend was dat ergotisme deur skimmelbesmette voedsel veroorsaak word, is daar tot redelik onlangs weinig pogings aangewend om vas te stel of enige ander siektes nie ook moontlik deur mikotoksiene veroorsaak word nie.

In Rusland is daar 'n begin gemaak met die ondersoek van giftige skimmels en wel na aanleiding van 'n studie van stachybotryotoksikose.⁵ Hierdie siekte tas verskillende veesoorte aan, maar kom veral voor onder perde. Dit word veroorsaak deur voer wat besmet is met die skimmel Stachyobotrys atra Cda. (S. alternans Bon.) wat 'n peptiedagtige metaboliet, stachyobotrystoksien, produseer.²

Verdere werk in Rusland het getoon dat die siekte „Alimentary toxic aleukia“, ook bekend as A.T.A.,⁶ ook 'n mikotoksikose is. A.T.A. het sporadies in 1917, 1932 en later gedurende die Tweede Wêreldoorlog in Rusland uitgebreek. In 1944⁹ het sowat tien persent van die distrik Orenburg se bevolking, aan hierdie siekte beswyk. Hierdie epidemies was veroorsaak deur die inname van brood berei van graan wat onder die sneeu oorwinter het en met die skimmels Fusarium sporotrichoides Sherb., Cladosporium epiphyllum (Pers.) Mart., en C. fagi. Oud. besmet is. Die skimmels is verantwoordelik vir die produksie van die gifstowwe fusariogenien (2), epikladosporiensuur (3) en fagikladosporiensuur (4).



- (Ia) R₁ = H, R₂ = -CH₂C₆H₅
- (Ib) R₁ = -CH₃, R₂ = -CH₂C₆H₅
- (Ic) R₁ = -CH₃, R₂ = -CH = (CH₃)₂
- (Id) R₁ = -CH₃, R₂ = -CH₂-CH = (CH₃)₂

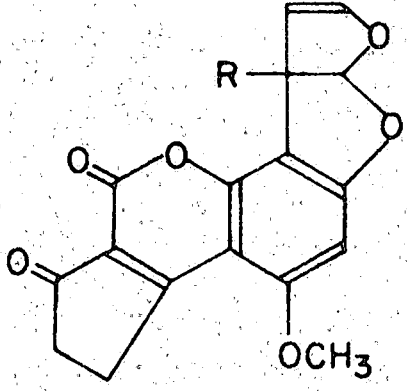
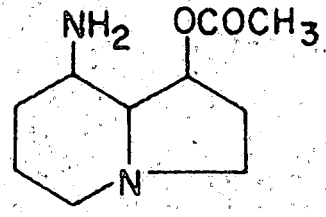
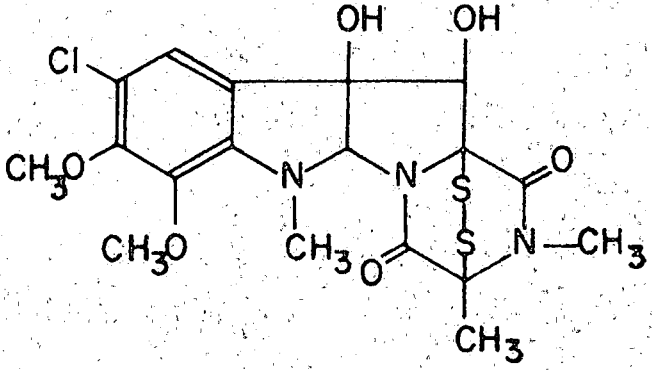


Nieu-Seeland en Australië^{8,9} ondervind jaarliks groot verliese van skape as gevolg van die siekte „facial eczema". Hierdie siekte is 'n hepatogeniese liggevoeligheid wat veroorsaak word deur die afskeiding van filoeritrien ('n metaboliese produk van chlorofiel) in die bloed as gevolg van lewerletsels. Die siekte ontstaan as gevolg van weiding op voergewasse wat met die skimmel Pithomyces chartarum (Berk & Curt.) M.B. Ellis, besmet is. Hierdie skimmel vorm die toksien sporodesmien (5), wat hoofsaaklik in die spore gekonsentreer is.

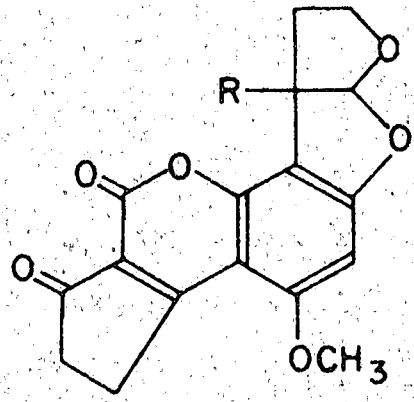
'n Wydverspreide vergiftigingsprobleem onder beeste in Amerika is teruggevoer na die inname van klawer wat met die skimmel¹⁰ Rhizoctonia leguminicola Gough & Elliot besmet is. Die gifstof wat vir hierdie siekte verantwoordelik is, is die alkalofed 1-asetoksi-8-amino-indolisidien (6).

Langtermyn toksikologiese studies wat sedert 1940 in Japan uitgevoer is, het getoon dat die hoë voorkoms van lewerkanker in die Verre Ooste waarskynlik aan die teenwoordigheid van karsinogene gifstowwe in die voedsel toegeskryf kon word. 'n Moontlike bron van die gifstowwe is die sogenaamde „geel rys" wat met verskeie Penicillia spesies, veral P. islandicum Sopp.¹¹ gekontamineer is. Uraguchi en sy medewerkers het getoon dat die giftige metaboliete van P. islandicum Sopp. naamlik luteoskyrien en 'n chloorbevattende peptied, ernstige lewerletsels in 'n proefdier veroorsaak.¹² Hierdie waarneming het gelei tot die vraag¹³ of die hoë voorkoms¹⁴ van lewer- en slukdermkanker onder die Bantoes in Afrika nie moontlik aan chroniese vergiftiging deur karsinogene mikotoksiene toegeskryf kan word nie.

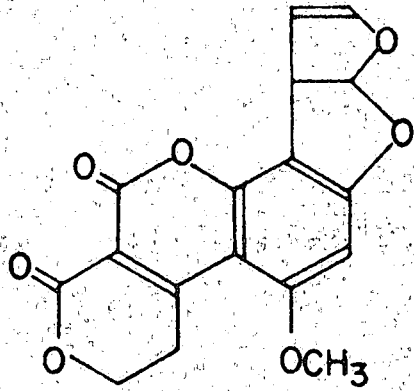
Die huidige groot belangstelling in giftige skimmelmetaboliete het in 1960 ontstaan na die uitbreek van die sogenaamde „Turkey 'X' disease" in Engeland.¹⁵ Hierdie siekte het kleinvee en veral pluimvee aangetas en



(7b) R = OH



(8b) R = OH



in 1960 het honderdduisend kalkoene in Engeland aan hierdie siekte gevrek. Dit is veroorsaak deur die gebruik van Brasiliaanse grondboonprodukte wat met die skimmel Aspergillus flavus Link besmet was. Chemiese- en mikologiese ondersoek¹⁶⁻²⁰ van die giftige materiaal het gelei tot die isolasie van die aktiewe bestanddele; aflatoksiene B₁ (7a), B₂ (8a), G₁ (9), G₂ (dihidro G₁) en onlangs M₁ (7b) en M₂ (8b). Langtermyn voedings-eksperimente het aangedui dat die aflatoksiene uiters potente hepatokarsinogene^{20,21} stowwe is.

Bostaande bespreking illustreer duidelik die werklike en potensiële gevaar van giftige skimmelmetaboliete vir mens en dier. Dit het dus noodsaaklik geword dat die hele probleem van giftige skimmelmetaboliete beter ondersoek moet word ten einde verband tussen skimmelbesmetting van voedsel en sekere vorms van kanker finaal te bepaal. Sedert 1962 is die W.N.N.R. in hierdie verband met 'n uitgebreide chemiese ondersoek besig. Die uitgangspunt van hierdie studie is die waarneming van Scott²³ en Gouws²⁴ dat 'n groot verskeidenheid toksigene skimmels; (Tabel I) op graan- en peulgewasse voorkom.

T a b e l I

Dominante Toksigene Skimmels

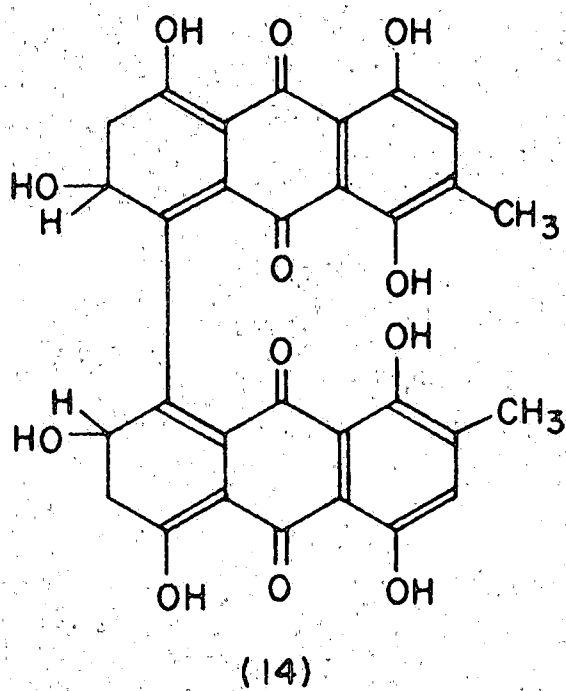
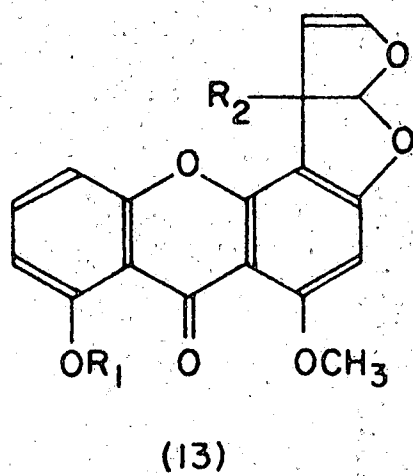
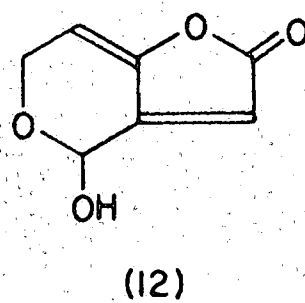
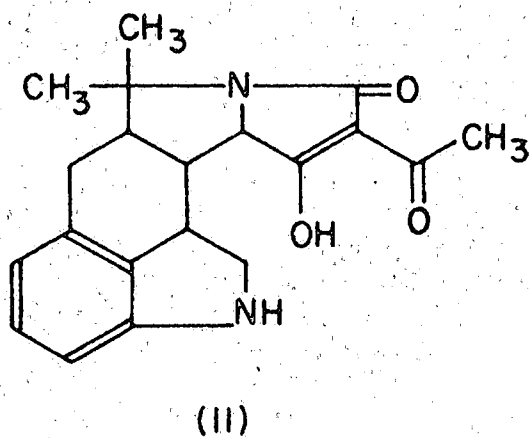
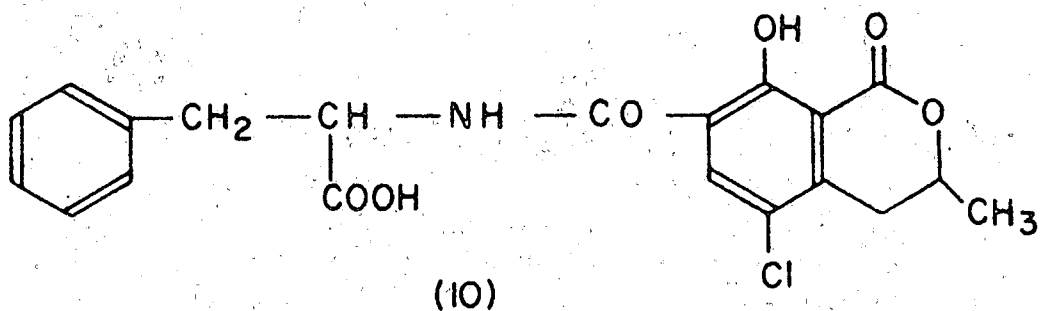
- Aspergillus avenaceus* G. Smith.
- A. carneus* (v. Tiegh.) emend Bloch.
- A. chevalieri* (Mang) Thom & Church.
- A. clavatus* Desm.
- A. flavipes* (Bain & Sart.) Thom & Church.
- A. flavus* Link.
- A. fumigatus* Fresenius.
- A. mangini* (Mangin) Thom & Raper.

Tabel I (vervolg)

- A. nidulans* (Eidam) Wint.
A. niveus Bloch.
A. ochraceus Wilhelm.
A. ruber Brem.
A. versicolor (Vuill.) Tiraboschi.
Penicillium islandicum Sopp.
P. cyclopium Westling.
P. oxalicum Currie & Thom.
P. piceum Raper & Fennell
P. rubrum Stoll.
P. variable Sopp.
Paecilomyces varioti Bainier
Fusarium roseum (Link) emend. Syd. & Hans.
F. moniliforme (Sheld.) emend. Syd. & Hans.
Trichothecium roseum Van Beyma.
Rhizopus arrhizus Fisher.
R. oryzae Wert. et Pr. Geerl.

By die studie van die gifstowwe wat deur skimmels geproduseer word, moet in gedagte gehou word dat die veranderde toestande waaronder die skimmel in die laboratorium gekweek word, gifstofproduksie sterk kan beïnvloed. Dit is dus raadsaam om die skimmels op 'n natuurlike voedingsbodem te kweek, aangesien daar 'n sterk moontlikheid bestaan dat die gifstof nie op 'n sintetiese vloeistofmedium (wat algemeen vir die produksie van antibiotika aangewend word) gevorm sal word nie.

'n Aantal van bogenoemde gifstige skimmels is alreeds plaaslik en in die buiteland ondersoek. Die hoofgifstowwe van Aspergillus ochraceus Wilhelm,²⁵ Penicillium cyclopium Westling,²⁶ en P. urticae Bain,^{22,31} is respektiewelik ochratoksien A (10), siklopiasoonsuur (11) en patulien (12).



Hierdie voorbeelde toon dat mikotoksiene nie tot enige bepaalde klas van organiese verbindings behoort nie. Dit verklaar nie alleen gedeeltelik die uiteenlopende aard van mikotoksikoses nie, maar maak dit ook onmoontlik om in die geval van 'n onbekende mikotoksien vooraf die geskikste chemiese isolasieprosedure te bepaal.

Soos in die geval van Aspergillus flavus Link bevat A. nidulans (Eidam) Wint., A. versicolor (Vuill.) Tiraboschi en Bipolaris sp.^{*} 'n verskeidenheid van gifstowwe. Die karsinogeen sterigmatosistien (13), kom algemeen in giftige isolate van hierdie skimmels voor. In hierdie proefskrif word die isolasie en struktuurbeplating van die newegifstowwe uit hierdie sterigmatosistien-produuserende skimmels bespreek.

Die giftige stamme is op gesteriliseerde meliemeel gekweek. Giftigheidsproewe met dagoud eende is na elke fraksioneringsstap gebruik om die suiwing van die gifstowwe te volg. Aangesien die gifstowwe in uiters klein hoeveelhede geproduseer word, is die opbrengste uit hierdie bron gewoonlik ontoereikend vir 'n uitgebreide chemiese ondersoek. Struktuurbeplatings het dus hoofsaaklik op moderne fisiese metodes, veral kernmagnetiese resonans-, ultraviolet- en massaspektrometrie berus.

Dit sal getoon word dat die meerderheid van die newegifstowwe uit Aspergillus nidulans (Eidam) Wint., A. versicolor (Vuill.) Tiraboschi en Bipolaris sp. hidroksiantrakinone is. Dit is bekend dat antrakinone^{29,30} en verwante stowwe toksies is bv. die antrakinoonpigmente³¹ van Penicillium brunneum Udagawa en P. concavorugulosum Abe. Die bishidroksiantrakinoon,

^{*} Die isolaat van Bipolaris sp. wat in hierdie proefskrif bespreek word, is geïsoleer vanaf 'n monster van Tribulus terrestris L. afkomstig uit die distrik Victoria-Wes.

luteoskryrien (14), wat deur P. islandicum Sopp¹¹ geproduseer word, is 'n kankerverwekkende gifstof. Dierproewe het aangetoon dat die hidroksiantra- kinone wat uit A. nidulans (Eidam) Wint., A. versicolor (Vuill.) Tiraboschi en Bipolaris sp. geïsoleer is, ernstige lewerletsels veroorsaak.

H O O F S T U K 1

FENOLIESE MEDEMETABOLIE TE VAN
STERIGMATOSISTIE N

1 INLEIDING

'n Groot aantal giftige stamme van Aspergillus nidulans (Eidam) Wint., A. versicolor (Vuill.) Tiraboschi en Bipolaris sp.²⁷ produseer die kankerverwekkende metaboliet, sterigmatosistien.^{27,28} In geen van die stamme wat tot dusver ondersoek is, kon die giftigheid uitsluitlik aan die teenwoordigheid van sterigmatosistien toegeskryf word nie. Die stamme verskil ook aansienlik in hul vermoë om sterigmatosistien te produseer (Tabel II).

T a b e l II

Sterigmatosistienproduksie deur
verskillende skimmels

| Skimmel | Stam | Sterigmatosistienproduk- sie in mg/Kg |
|-------------------------------|---------------|--|
| <u>Aspergillus nidulans</u> | G 106 | 500 |
| | M 835 | 80 |
| | I.M.I. 95489 | - |
| | I.M.I. 72731 | 800 |
| | I.M.I. 86806 | - |
| <u>Aspergillus versicolor</u> | M 716 | 200 |
| | G 179 | 750 |
| | G 202 | - |
| | I.M.I. 49124 | 350 |
| <u>Bipolaris sp.</u> | I.M.I. 115076 | 1,200 |

²⁷ Hierdie spesie van Bipolaris is nog nie voorheen beskrywe nie en is deur M.B. Ellis van die "Commonwealth Mycological Institute" geïdentifiseer. Dit toon ooreenkoms met die Bipolaris toestand van Cochlibolus nodulosus.

Pogings is aangewend om die newegifstowwe, wat deur hierdie skimmels geproduseer word, te isoleer. 'n Verteenwoordigende stam van elk van die drie skimmels is op gesteriliseerde meliemeel gekweek.²³ Die gifstowwe is met 'n chloroform-metanol mengsel geëkstraheer en die ekstrak verdeel in suur (natriumbikarbonaat oplosbare), fenoliese (kaliumkarbonaat oplosbare) en neutrale fraksies. Sterigmatosistien was hoofsaaklik in die neutrale fraksie teenwoordig, terwyl die fenoliese fraksie die grootste gedeelte van die newegifstowwe bevat het. Fraksionering van laasgenoemde deur verdelings- en adsorpsiechromatografie het gelei tot die isolasie van die aktiewe bestanddele, hoofsaaklik hidroksiantrakinone, en 'n aantal onaktiewe fenoliese verbindings.

2 HIDROKSIANTRAKINONE

2.1 Algemeen

Die meeste van die hidroksiantrakinone, wat bespreek sal word, is bekende metaboliete van A. versicolor³³⁻³⁵ maar is nou vir die eerste keer uit A. nidulans en Bipolaris sp. geïsoleer. Drie van die hidroksiantrakinone, naamlik nidurufien, bipolarien en 1'-O-metielaverantien is nog nie voorheen geïdentifiseer nie. As gevolg van die uiters klein hoeveelhede materiaal wat beskikbaar was, het die identifikasie van die bekende metaboliete en die struktuurbevestiging van die nuwe metaboliete hoofsaaklik op moderne fisiese tegnieke berus. Die massaspektra van die hidroksiantrakinone wat hier bespreek sal word, is nog nie voorheen breedvoerig gerapporteer nie en sal dus volledig behandel word. Ooreenkomstig die aard van die substituenten R en R' aan die antrakinoonkern (15), kan hierdie hidroksiantrakinone in drie groepe onderverdeel word, nl. :

- (A) Waar R' 'n heterosikliese sisteem verteenwoordig wat deur 'n eterbrug in die plek van R aan die kern verbind is;
- (B) Waar R = H en R' 'n heterosikliese ringsisteem is.
- (C) Waar R = H en R' 'n gesubstitueerde alkielsyketting is.

2.2 Groep A : Averufien, nidurufien en versikolorien C

2.2.1 Struktuur van averufien:- Die fisiese eienskappe (smeltpunt; infrarooi-, ultraviolet-, kernmagnetiese resonans- en massaspektra) van die verbinding, $C_{20}H_{16}O_7$, wat uit A. nidulans geïsoleer is, het aangedui dat dit moontlik identies aan averufien, 'n bekende metaboliet uit A. versicolor,³² kon wees. Die identiteit is bewys deur direkte vergelyking van die tri-O-metieleter met 'n egte monster van tri-O-metielaverufien wat van Dr. J.C. Roberts (Nottingham Universiteit) verkry is. Averufien is nog nie voorheen uit A. nidulans geïsoleer nie.

Die struktuur (16) is deur Roberts and Pusey³² aan averufien toegeken en berus hoofsaaklik op infrarooi-, ultraviolet- en kernmagnetiese resonans spektra. Die plasing van 'n proton op posisie 4 het berus op die feit dat hierdie proton by 'n lae veld (τ 2.43) in die k.m.r. spektrum absorbeer. Hierdie afleiding het ons bevestig deur 'n studie van die anioonverskuiwings van di-O-metielaverufien (verkry deur selektiewe metilasie van averufien) in dimetielsulfoksied.

Brown³⁶ en Highet³⁷ het die anioonverskuiwingstegniek beskryf. Hulle het getoon dat die chemiese verskuiwings van die aromatiese protone van fenole 'n hoëveldverskuiwing toon wanneer die fenole dissosieer om die ooreenstemmende fenoksiedione te vorm. Dit is aangetoon dat hierdie hoëveld- of

anioonverskuiwing karakteristiek van die posisie van die proton, ten opsigte van die fenol, is.³⁷ Aangesien die anioonverskuiwings van die protone in die orto- en paraposisies die grootste waardes aanneem, is dit voorgestel dat die verskuiwings te wyte is aan die toename van die elektronladingsdigtheid, wat aan die mesomeriese strukture van die verbindings toegeskryf kan word, in hierdie posisies. Die substitusiepatroon van die fenoliese verbinding het ook 'n aansienlike invloed op die verskuiwings.

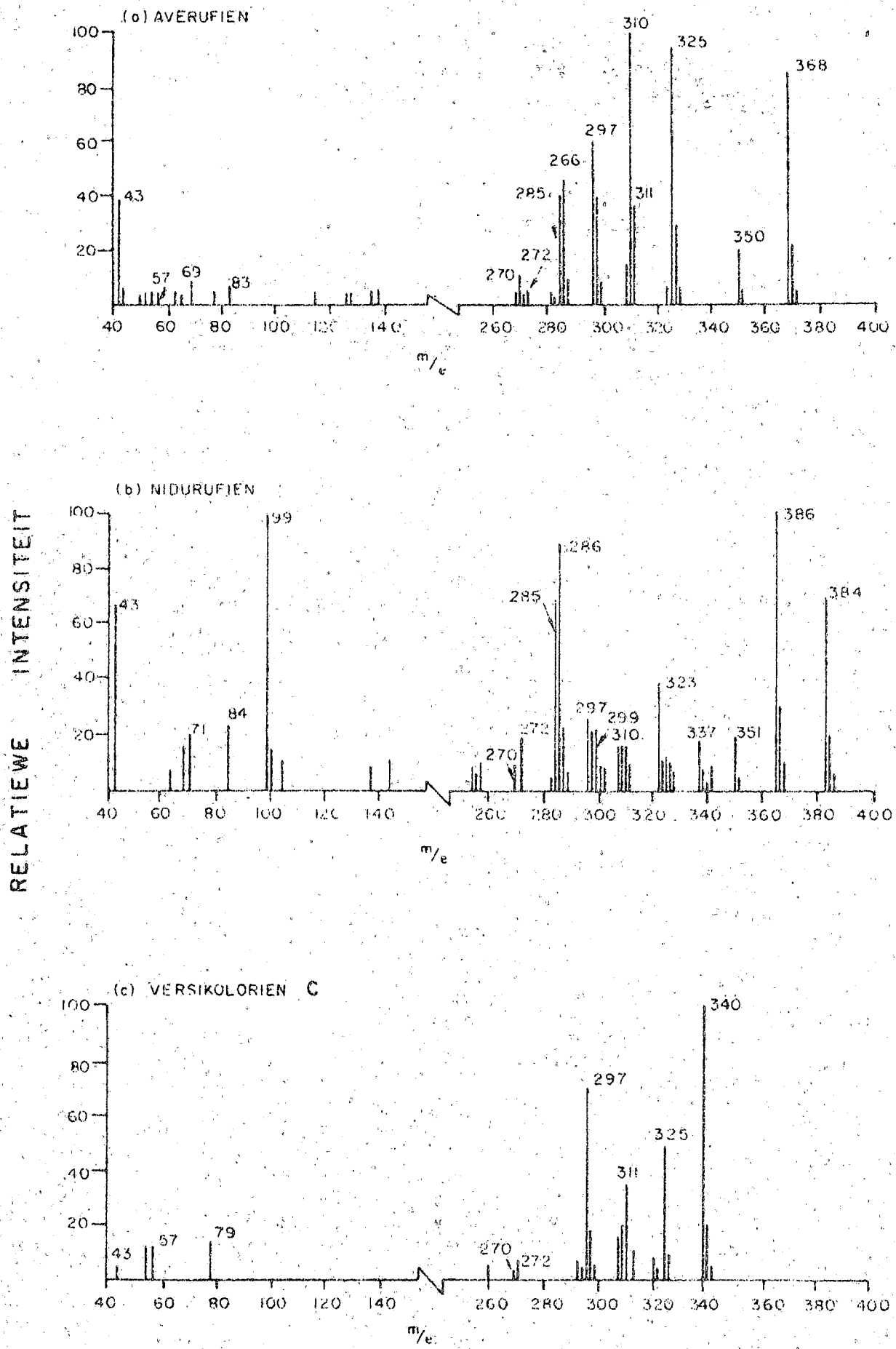
Dit is aangetoon dat dimetielsulfoksied die beste oplosmiddel vir die bepaling van anioonverskuiwings is, aangesien aansienlik hoër verskuiwings in dié oplosmiddel as in metanol of deuteriochloroform verkry word. Die waardes van die anioonverskuiwings vir alkiel- en alkoksiel gesubstitueerde fenole in dimetielsulfoksied is redelik konstant en word aangegee^{37,38} as orto 0.40 - 0.60 d.p.m.; meta 0.20 - 0.40 d.p.m. en para 0.70 - 0.80 d.p.m. Fenole wat 'n karbonielgroep of 'n viniel-karboniel-sisteem para ten opsigte van die fenoliese hidroksielgroep het, toon verskuiwings van orto 0.60 - 0.84 d.p.m. en meta 0.20 - 0.47 d.p.m. Die anioonverskuiwingstegniek is al voorheen³⁹⁻⁴¹ gebruik om die presiese posisie van die fenoliese hidroksielgroep vas te stel.

Die byvoeging van een ekwivalent NaOD by 'n oplossing van di-²O-metielaverufien (in dimetielsulfoksied-D₆) het veroorsaak dat die ongekoppelde proton (in posisie 2 of 4) sterk (0.8 d.p.m.) skuif na 'n hoër veld terwyl die metagekoppelde protone (in posisies 5 en 7) feitlik onveranderd bly. Hierdie waarneming het ontenseglik getoon dat die ongekoppelde proton para ten opsigte van die hidroksielgroep en dus in posisie 4 geplaas moet word.

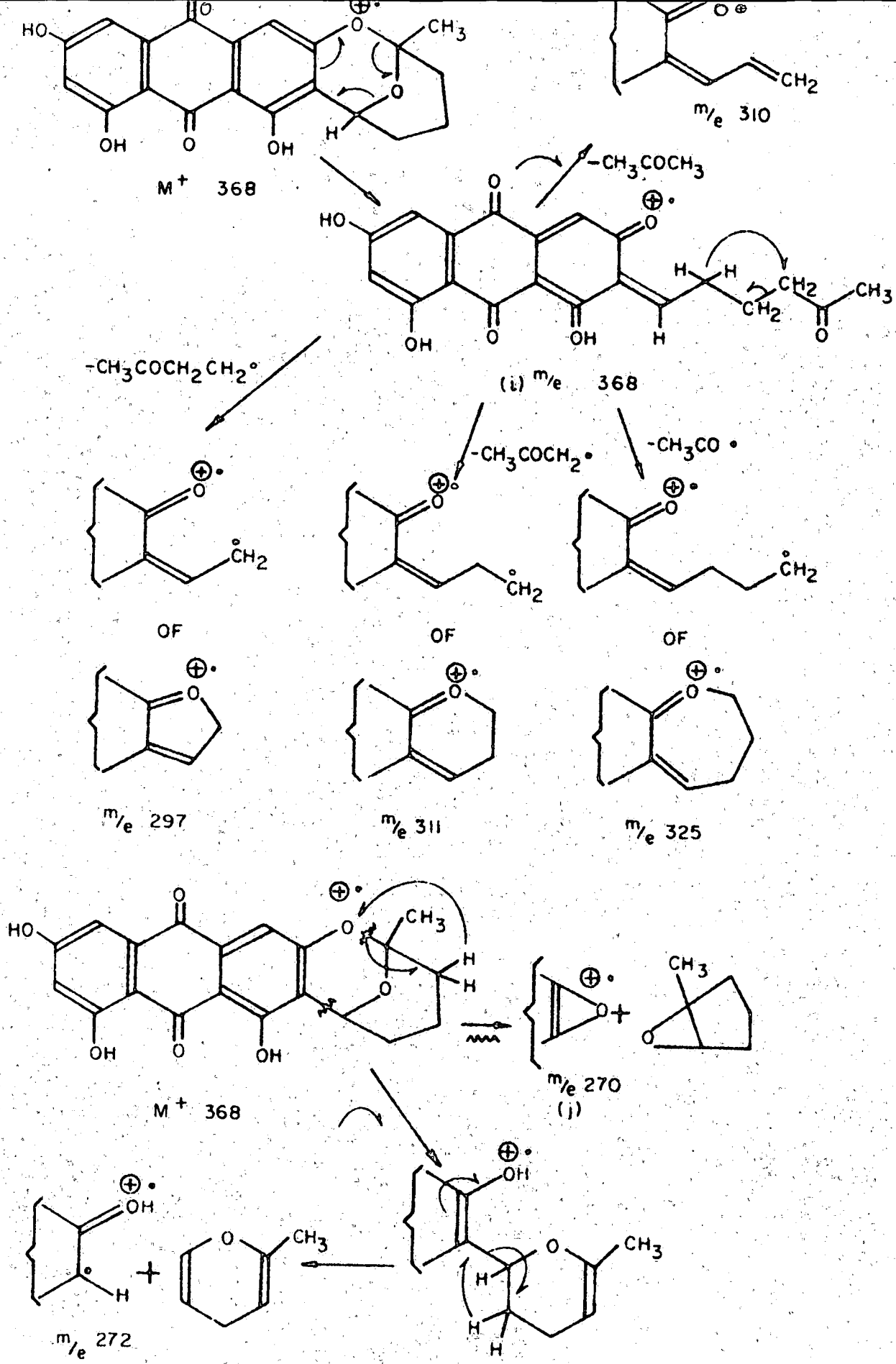
Kritiese ontleding van die data wat deur Roberts³² vir averufien aangegee is, het getoon dat geen onomstootlike bewys vir struktuur (16)

gelewer is nie en dat struktuur (17) ook oorweeg moet word. Die eenproton sein by τ 4.5 in die k.m.r. spektrum van tri-O-metielaverufien is toegeskryf aan 'n proton wat op 'n koolstofatoom tussen twee suurstofatome geleë is, analoog aan 'n soortgelyke proton in dihidroklerodien I (18) wat ook by τ 4.5 absorbeer. Die ooreenstemmende proton in aflatok sien B₂ (8a)⁴² absorbeer egter by τ 3.6. Dit is duidelik dat die aromatiese sisteem in (8a) 'n aansienlike ontskermende effek op die posisie van die proton het. Roberts het nie die moontlikheid dat so 'n ontskermende effek in averufien werkzaam is, oorweeg nie. Protone in die modelstof (19)⁴³ absorbeer by τ 5.2. Substitusie van een van die protone deur 'n alkielgroep sal 'n laeveldverskuiwing van die sein van die oorblywende proton veroorsaak. Op grond van bogenoemde inligting is dit dus duidelik dat meer inligting nodig is om tussen die twee moontlike strukture te onderskei.

Die massaspektrum van averufien is volledig geanaliseer in die hoop om tussen hierdie twee strukture te onderskei. Die mees intense pieke is die moederioon en brokstukke met m/e 325, 310 en 297 (Fig. 1A). Akkurate massabepalings het getoon dat laasgenoemde pieke ooreenstem met verliese van CH₃CO, CH₃COCH₂ en CH₃COCH₂CH₂. In terme van struktuur (17) kan hierdie pieke maklik verklaar word as die van die ioon (i) wat deur 'n retro Diels-Alder⁴⁴ omskakeling vanaf (17) ontstaan (Skema 1). As die fragmentasie hoofsaaklik via die ioon (i) plaasvind, kan die afwesigheid van 'n [M-CH₃COCH₂CH₂CH₂]⁺ fragment in die massaspektrum maklik verklaar word, aangesien kraking langs 'n dubbelbinding (sonder gelyktydige waterstof-oordrag) baie onwaarskynlik is. Dit is moeilik, maar nie onwaarskynlik, om 'n algemeen aanvaarbare meganisme vir die ontstaan van bogenoemde fragmente in terme van struktuur (16) voor te stel.

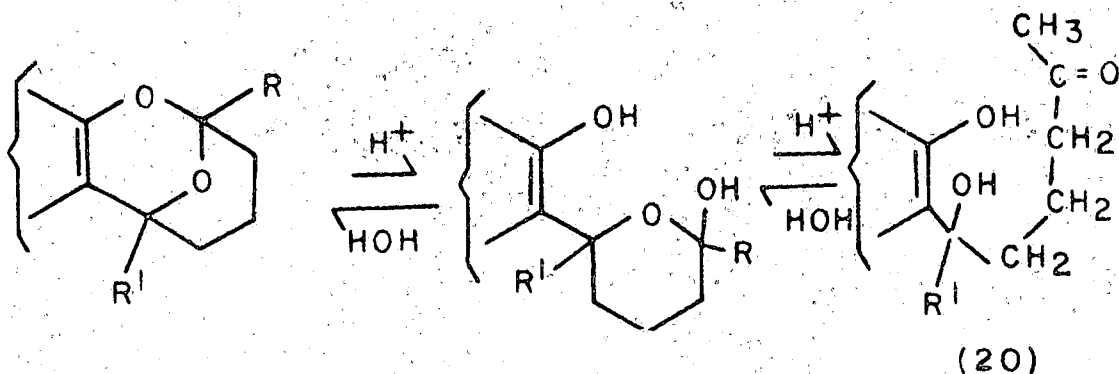


FIGUUR I
 MASSASPEKTRA VAN HIDROKSIANTRAKINONE



SKEMA I

Die massaspektrometriese gegewens het wel aangetoon dat die struktuur (17) waarskynlik meer korrek is, maar struktuur (16) kon nog nie uitgesluit word nie. Pogings is aangewend om die struktuur met behulp van chemiese metodes vas te lê. Die strukture (16) en (17) kan onderskeidelik as 'n sikliese asetaal en 'n sikliese ketaal beskou word. Averufien is baie stabiel in waterige suur medium. Hierdie stabiliteit is onverwags in die lig van moontlike asetaal of ketaal vorming. In die onderstaande ewewig moet die geslote vorm dus baie meer stabiel wees as die oop vorm (20).



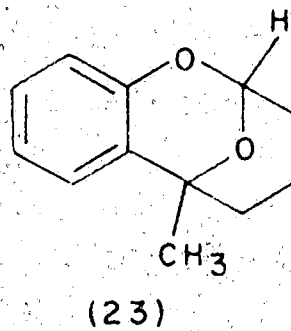
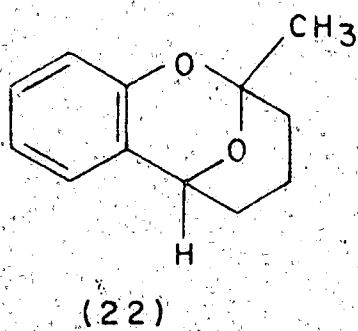
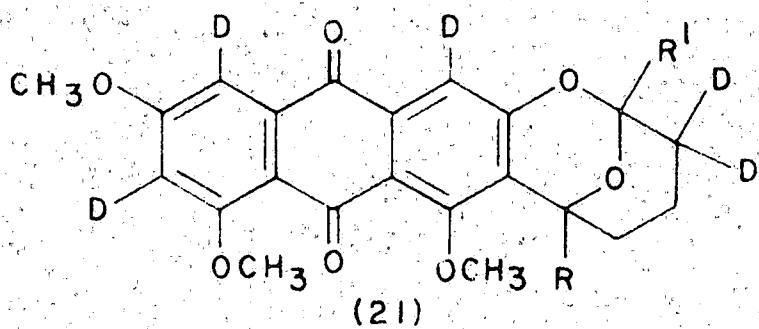
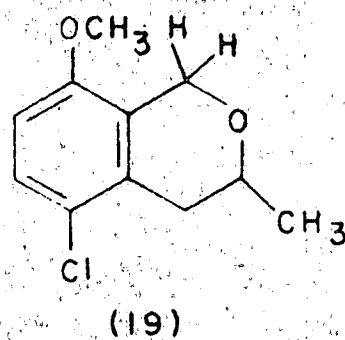
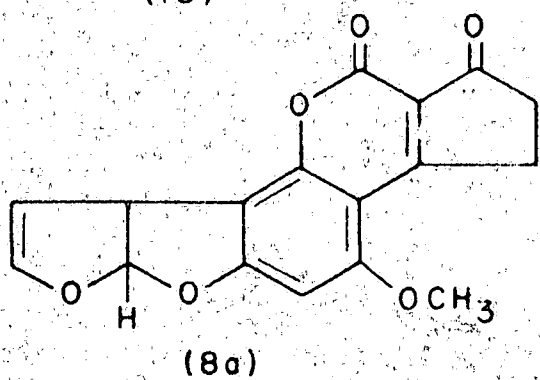
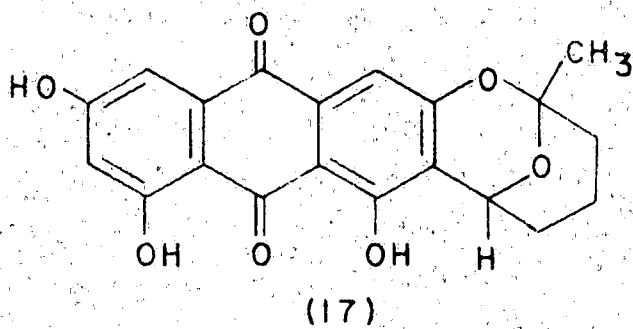
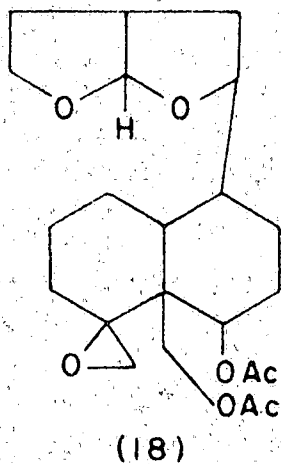
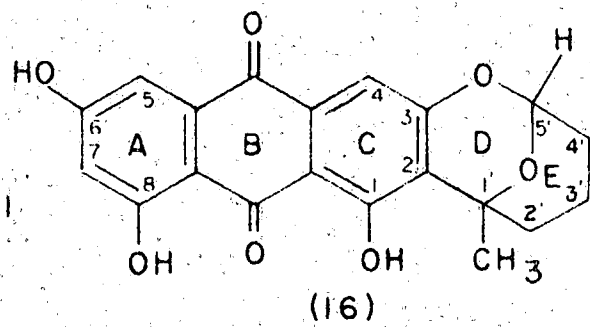
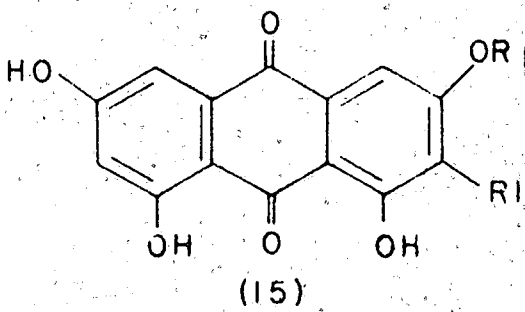
In pogings om die ewewig na regs te dwing is tri-O-metielaverufien met asynsuuranhidried en p-tolueensulfoonsuur behandel. Selfs onder drastiese reaksiekondisies was daar geen teken dat die oop vorm (20) gevorm word nie.

Hierdie pogings is gestaak na die verskyning van publikasies wat handel oor die hersiene struktuur van averufien.^{34,45} Roffey en Sargent^{45,46} het die modelstowwe (22) en (23) wat die twee moontlike alifatiese gedeeltes van die averufien molekule bevat gesintetiseer. Hulle het aangetoon dat die k.m.r. spektra van die alifatiese gedeeltes van averufien en (22) identies is. 'n Verdere bewys is gevind in die feit dat beide averufien en die modelstof (22) twee deuteriumatome uitruil in die alifatiese

gedeelte, by behandeling met fosforpentrachloried en deuteriumoksied. Dit lewer dus 'n onomstootlike bewys dat averufien wel struktuur (17) het. Holker en sy medewerkers³⁴ beweer dat averufien wel 'n sikliese ketaal is en in waterige suur medium in ewig met die oop vorm verkeer. Na behandeling van tri-O-metielaverufien met deuteriumoksied en fosforpenta-chloried het hulle 'n derivaat (21, R = H, R' = CD₃) geïsoleer wat vyf deuteriumatome in die alifatiese gedeelte bevat het. Die uitruiling van vyf waterstofatome met deuterium kan alleen in terme van struktuur (17) verklaar word. Onder dieselfde toestande kan 'n molekule met struktuur (16) 'n maksimum van slegs twee deuteriumatome uitruil. (21, R = CH₃, R' = H). Volgens Holker toon die massaspektrum van gedeutereerde tri-O-metielaverufien pieke wat ooreenstem met verliese van CD₃CO, CD₃COCD₂ en CD₃COCD₂CH₂. Hierdie eksperiment toon ook dat averufien struktuur (17) moet aanneem.

2.2.2 Die massaspektrum van averufien; verdere bespreking. - Aangesien

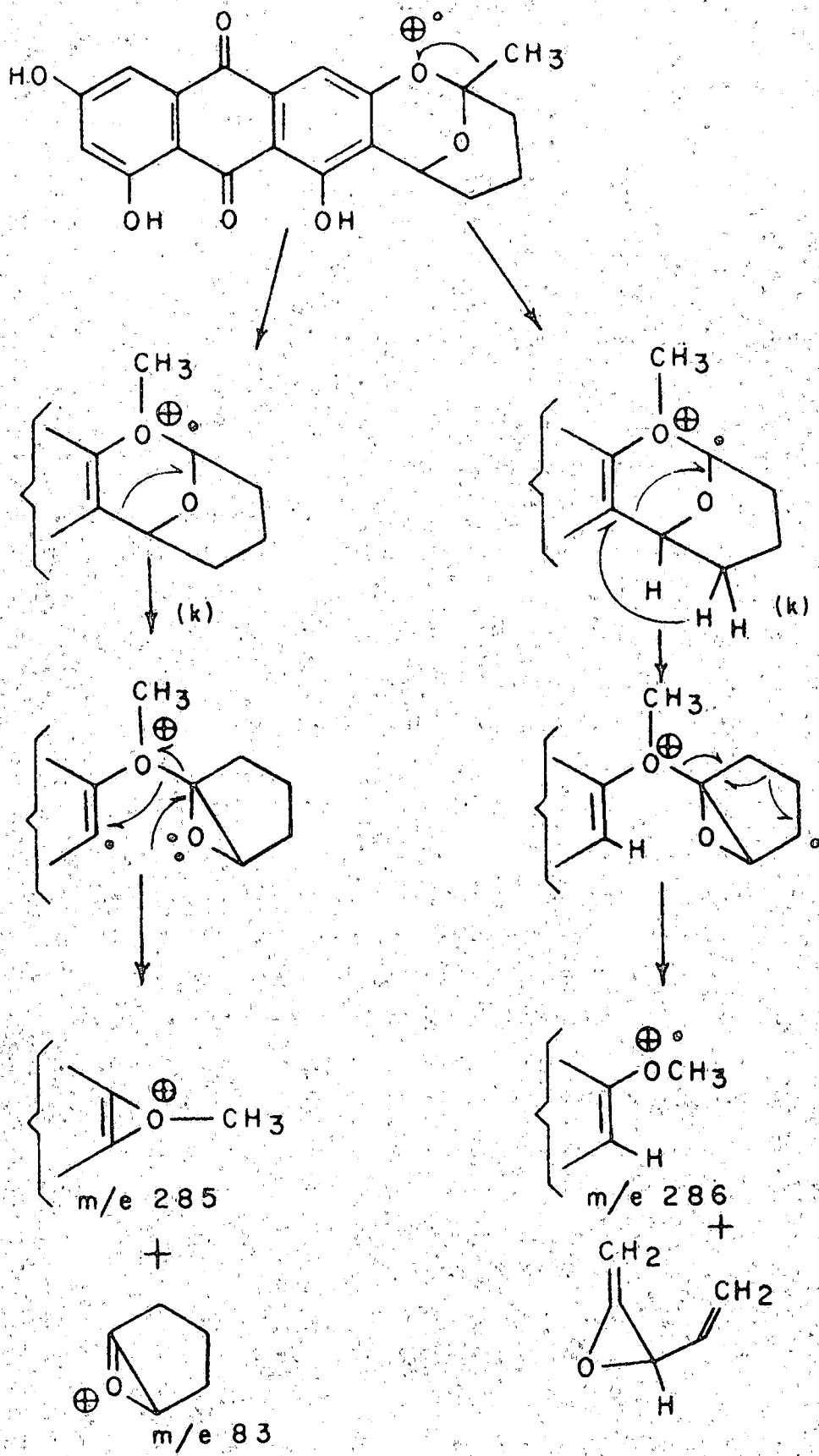
die struktuur van averufien nou onomstootlik bewys is, is dit nou moontlik om die massaspektrum volledig te behandel. Die ontstaan van die pieke met m/e 325, 311, 310 en 297 is reeds bespreek (Skema 1). Die fragment met m/e 270 (C₁₄H₆O₆) kan waarskynlik as die ioon (j) voorgestel word. (Skema 1). Die fragmentioon met m/e 272 (C₁₄H₈O₆) bevat twee waterstofatome meer as die met m/e 270 en dit is dus nodig om die oordrag van twee waterstofatome na die aromatiesse gedeelte aan te neem. Akkurate massabepalings het getoon dat die fragmente met m/e 285 en 286 die samestellings C₁₅H₁₀O₇ en C₁₅H₁₁O₇ onderskeidelik het. Hierdie ione bevat dus die antrakinoonkern en al die suurstof atome plus 'n addisionele koolstofatoom en drie of vier waterstofatome respektiewelik. Die beste verklaring vir die ontstaan van



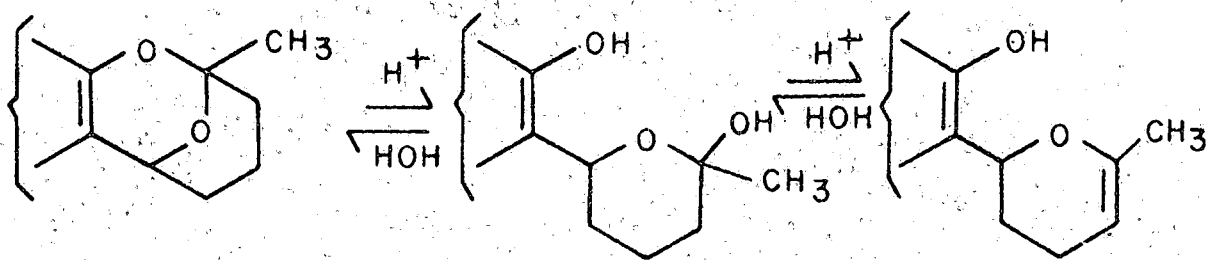
die ioon met m/e 286 is dat dit die oordrag van 'n metielgroep en 'n waterstofatoom na die aromatiese gedeelte behels (Skema 2). Die teenwoordigheid van 'n intense metastabielepiek het aangetoon dat die fragment met m/e 286 direk vanaf die moederioon afkomstig is. Daar is geen metastabielepiek vir die oorgang vanaf die moederioon na die ioon met m/e 285 nie en dit is moontlik dat laasgenoemde ontstaan vanaf die ioon met m/e 286 deur verlies van 'n waterstofatoom.

Vir die vertolking van hierdie massaspektrum is dit dus nodig om 'n metieloordrag te postuleer. Djerassi en Brown⁴⁷ het daarop gewys dat 'n metieloordrag baie selde plaasvind en dat dit dikwels onnodig by die vertolking van spektra aangeneem word. As die moontlikheid van 'n metieloordrag in averufien uitgesluit word, kan die brokstuk met m/e 286 alleen gevorm word deur 'n proses wat die oordrag van drie waterstofatome behels. Hierdie moontlikheid is onwaarskynlik weens die hoë intensiteit van die piek en die feit dat dit direk vanaf die moederioon ontstaan.

'n Direkte bewys vir die metieloordrag in averufien kan verkry word deur die metielgroep met deuterium te merk. Langdurige behandeling van averufien met fosforpentachloried in deuteriumoksied en tetrahidrofuraan het gelei tot 'n volledige uitruiling met deuterium van die aromatiese protone asook twee alifatiese protone. Analise van die massaspektrum van hierdie pentadeuterioaverufien het getoon dat die twee deuteriumatome in die alifatiese gedeelte op koolstofatoom 4' geplaas moet word ($21, R = H, R' = CH_3$). Hierdie resultaat stem ooreen met die van Roffey en Sargent.^{45,46} Hierdie uitruiling vind moontlik plaas volgens die volgende ewewig:



SKEMA 2

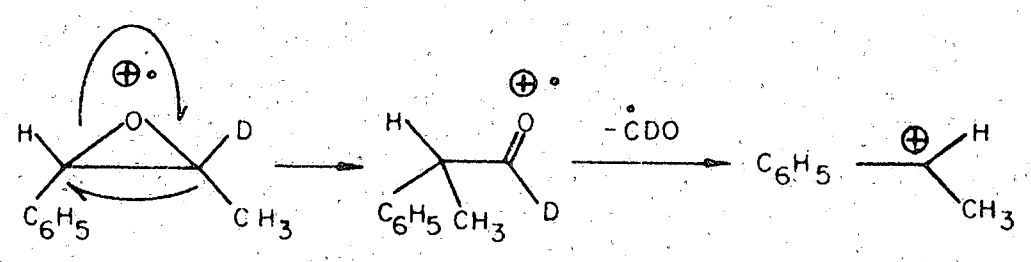
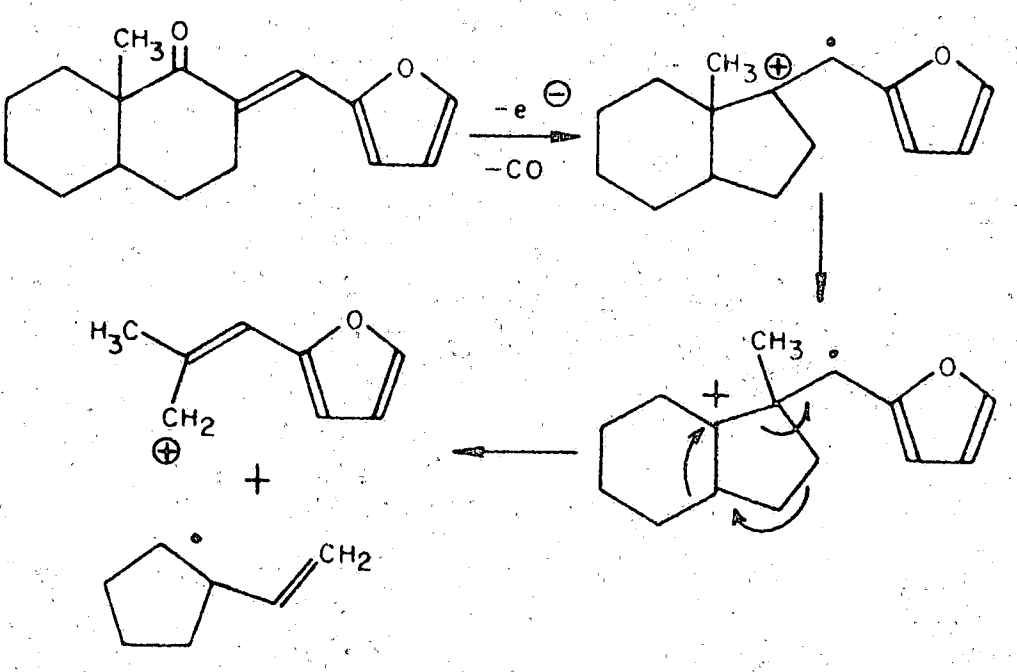
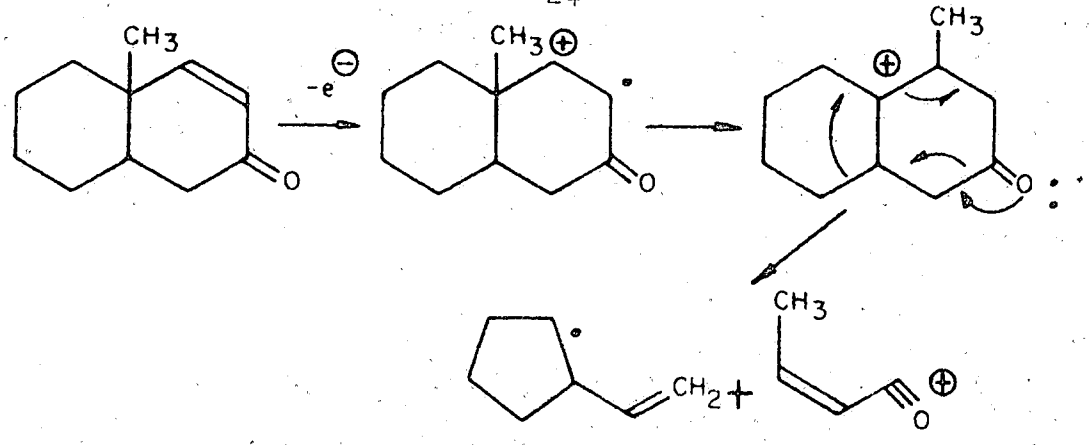


Holker en sy medewerkers³⁵ het nog geen eksperimentele besonderhede vir die bereiding van die oktadeuteriotri-O-metielaverufien gepubliseer nie. Hierdie derivaat bevat die deuterium gemerkte metielgroep.

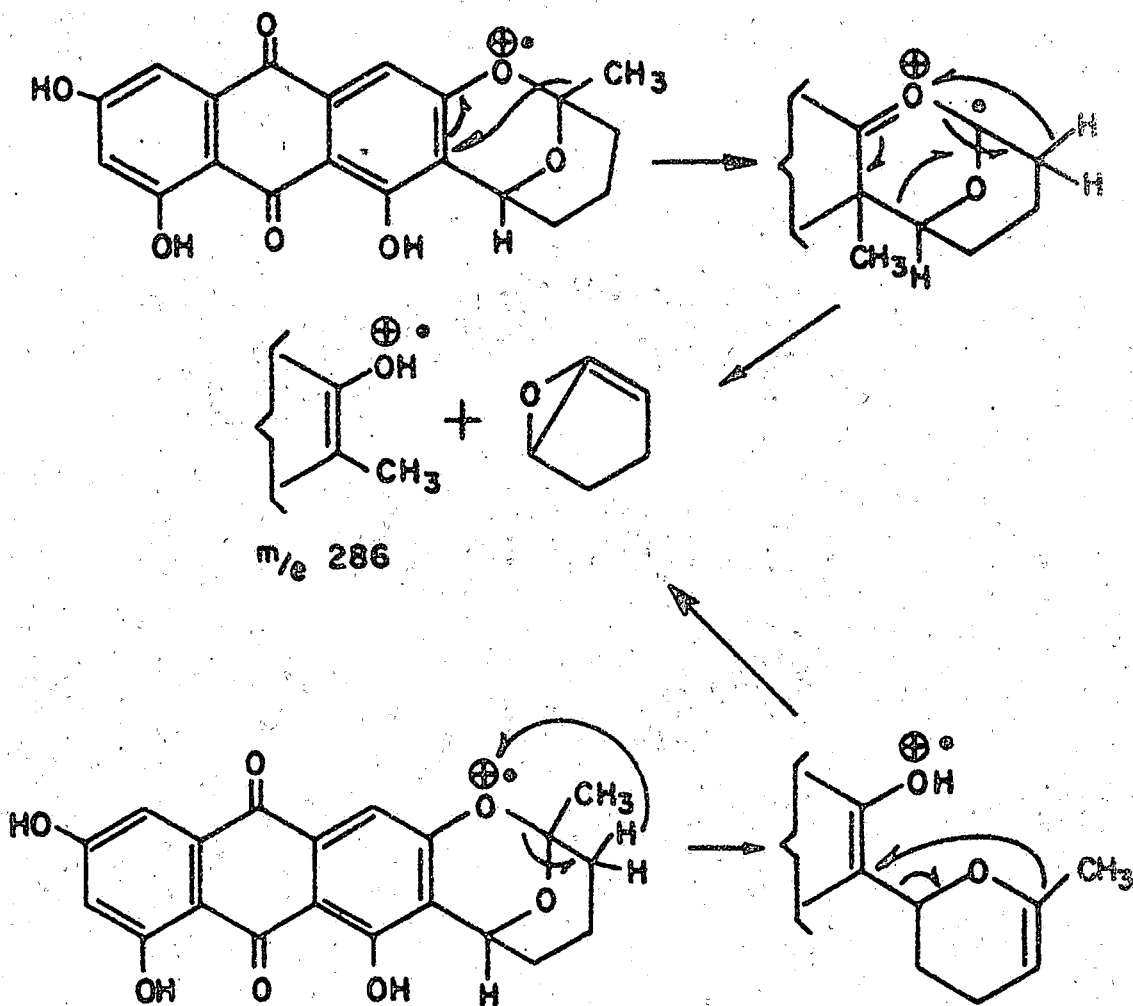
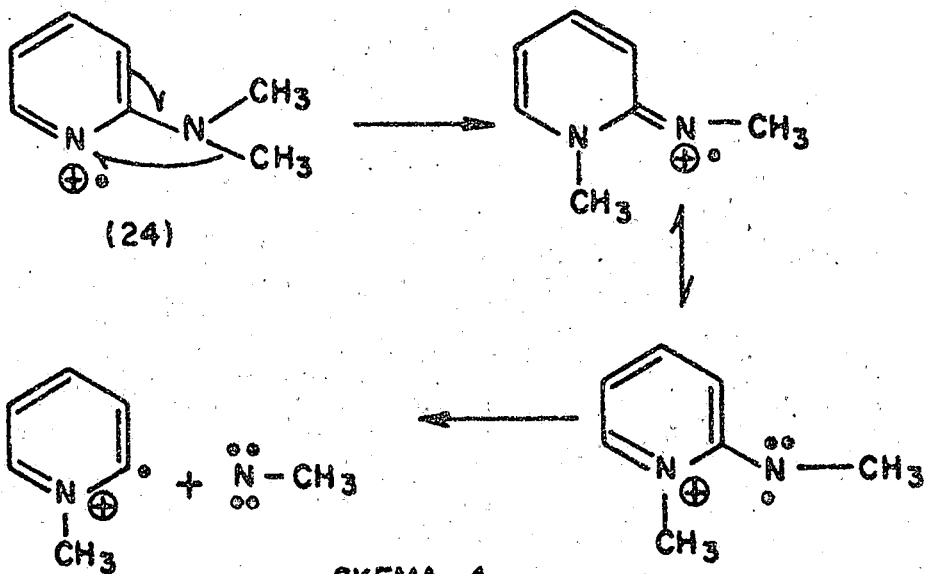
Daar is verskeie gevalle van metielloordragte, wat met behulp van isotoopmerking bewys is, bekend.⁴⁸⁻⁵⁰ In skema 3 word voorbeelde van hierdie prosesse aangegee. In al hierdie gevalle vind daar 'n 1,2 verskuiwing van die metielgroep plaas. Indien 'n soortgelyke 1,2 verskuiwing in die geval van averufien plaasvind, kan die vorming van die ione met m/e 286 en 285 voorgestel word soos in skema 2 aangedui is. 'n Dreiding model van averufien toon dat die waterstofatoom, wat oorgedra word, baie naby aan die koolstofatoom in posisie 2 geleë is. Die brokstuk met m/e 83 (C_5H_7) kan deur 'n soortgelyke krakingsproses ontstaan.

Metielloordrag kan ook oor 'n groter afstand plaasvind soos in die geval van 2-(N-dimetiel)-piridien (24) waar 'n metielloordrag⁵¹ tot die basispiek aanleiding gee. (Skema 4).

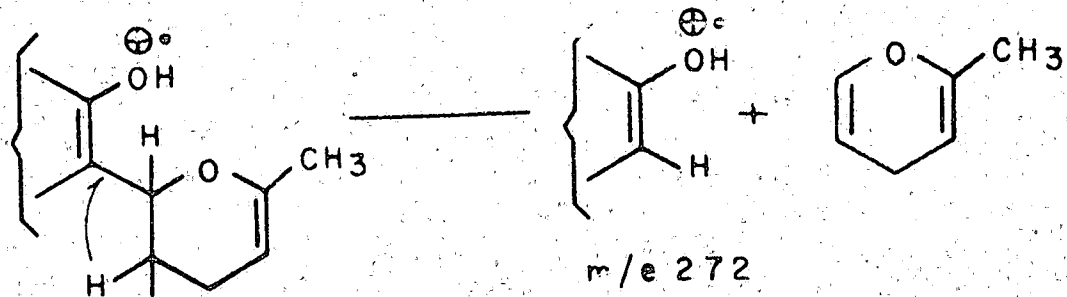
In die geval van averufien kan minstens twee meganismes neergeskryf word waarvolgens die ontstaan van die m/e 286 fragment 'n 1,4 metielloordrag behels. (Skema 5). Die eerste van die twee meganismes moet as onwaarskynlik



SKEMA 3



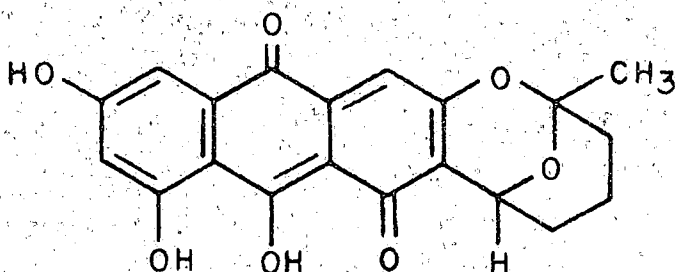
beskou word aangesien die Dreiding model toon dat die metielgroep baie ver van C-2 geleë is. Die tweede meganisme is ook baie onwaarskynlik aangesien dit oor 'n tussenstap gaan wat baie maklik deur 'n waterstofoordrag 'n fragment met m/e 272 sal lewer.



In gevalle waar beide 'n waterstof en 'n metieloordrag moontlik is, is eersgenoemde baie meer waarskynlik. Die intensiteit van die fragment met m/e 272 is egter baie laag in vergelyking met die van die fragment met m/e 286. By die gebrek aan verdere gegewens word dit dus tentatief voorgestel dat die vorming van die ioon met m/e 286 'n 1,2 metieloordrag behels. Dit is moeilik om te verklaar waarom hierdie metieloordrag so maklik plaasvind veral as dit met die prosesse, wat 'n waterstofoordrag behels, vergelyk word. 'n Moontlike verklaring is dat die tersiêre koolstofradikaal in die tussenstap k (Skema 2) aansienlik deur die wisselwerking met die twee suurstofatome gestabiliseer word.

In die massaspektrum van tri-O-metielaverufien het die pieke wat ooreenstem met die fragmente met m/e 270, 272, 285 en 286 in averufien 'n

baie lae intensiteit. 'n Moontlike verklaring is dat die fragmente in averufien ontstaan uit die kraking van 'n minderaromatiese tautomere (bv. 25).



(25)

Kraking van die vinylbindings ($C1'-C5'$) sal moontlik gunstiger wees in die geval van 'n tautomere vorm met 'n nie-aromatiese ring. In die geval van die tri-O-metieleter is tautomerisasie van die antrakinoonkern nie moontlik nie.

Die $[M-18]^+$ piek in die massaspektrum van averufien kan ook bevredigend verklaar word in terme van die tautomere vorm (25) as verlies van water vanaf twee peri-georiënteerde fenoliese groepe, analoog aan die sterk $[M-18]^+$ ioon in die massaspektrum van O-hidroksibensielalkohol.⁵² Dit is bewys deur die $[M-D_2O]^+$ fragment in die massaspektrum van trideuterio-averufien (uitruiling met CH_3OD). Dit is bekend⁵³ dat die tetrahidroksiantrakinoonkern baie stabiel is en glad nie verder afbreek nie. Dit verklaar die afwesigheid van pieke met m/e kleiner as 270.

2.2.3 Stereochemie van averufien.- Daar is geen informasie aangaande die absolute stereochemie van die $C1'$ en $C5'$ senters van averufien bekend nie.

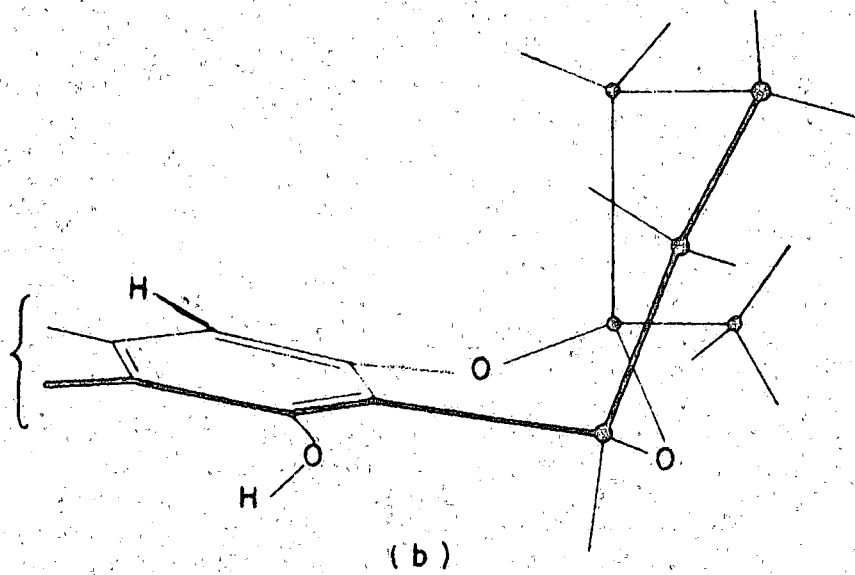
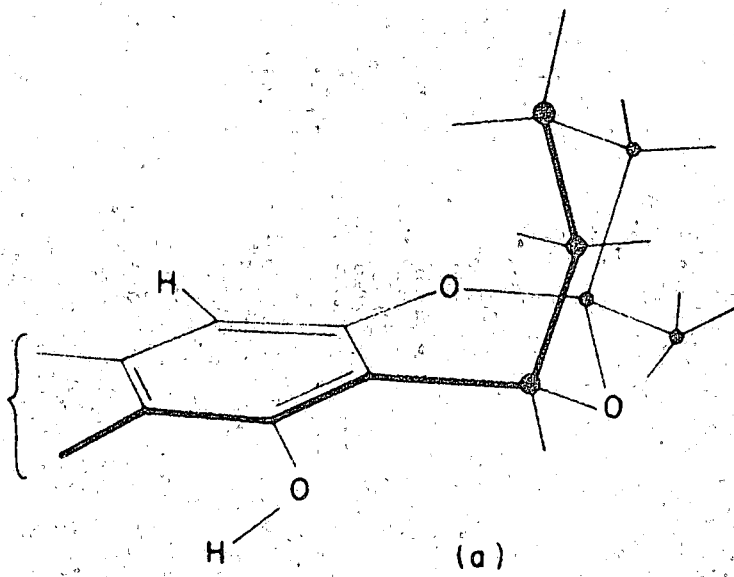


FIG. 2. AVERUFIEEN : MOONTLIKE KONFORMASIES

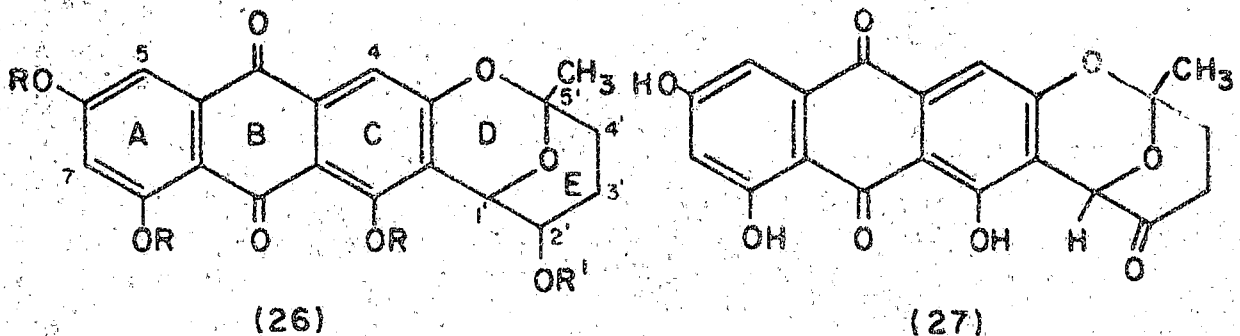
Hierdie gebrugde sisteem kan alleen gevorm word as C3' en C5' cis ten opsigte van ring D georiënteer is. 'n Dreiding model van averufien toon dat ring E in 'n stoel of 'n skewe boot konformasie kan bestaan. (Fig. 2). In die geval van die stoelkonformasie is die dihidrale hoek tussen die proton op koolstof 1' en die op koolstof 2' in die omgewing van 50° en 70° respektiewelik. Volgens die vergelyking van Williamson en Johnson,⁵⁴ vir die verband tussen 'n visinale koppelingskonstante en die dihidrale hoek tussen die protone, kan dit voorspel word dat die koppelingskonstantes[‡] ongeveer 1 en 4 Hz moet wees. Met ring E in 'n skewe boot konformasie is die dihidrale hoek tussen C1'-H en C2'-H₂ ongeveer 90° en 30° respektiewelik. Die ooreenkomstige koppelingskonstantes is ongeveer 0 en 8 Hz respektiewelik. Die k.m.r. gegewens vir averufien, soos Roberts aangegee het, kon nie tussen hierdie twee moontlikhede onderskei nie, aangesien die sein vir C1'-H in die 60 megasiklusspektrum as 'n breë spitsvormige band vertoon. In die 100 megasiklusspektrum van tri-O-metielaverufien (Fig. 3a) verskyn die C1'-H sein as 'n duidelike kwartet met koppelingskonstantes 1.5 en 4 Hz. Dit is dus duidelik dat ring E wel 'n stoelkonformasie aanneem soos ook op grond van konformasie analise voorspel kon word.

2.2.4 Struktuur van nidurufien.- 'n Nuwe metaboliet (C₂₀H₁₆O₈) is uit A. nidulans en A. versicolor geïsoleer. Hierdie metaboliet, waaraan die triviale naam nidurufien^{‡‡} toegeken is, is as (26 R = R' = H) geformuleer op /

[‡] Dit word tentatief aangeneem dat hierdie vergelyking ook vir die ongewone ringsisteme geld.

^{‡‡} Nidurufien is nie noodwendig sinoniem met 2'-hidroksiaverufien nie, aangesien dit nie direk met averufien gekorreleer kon word nie.

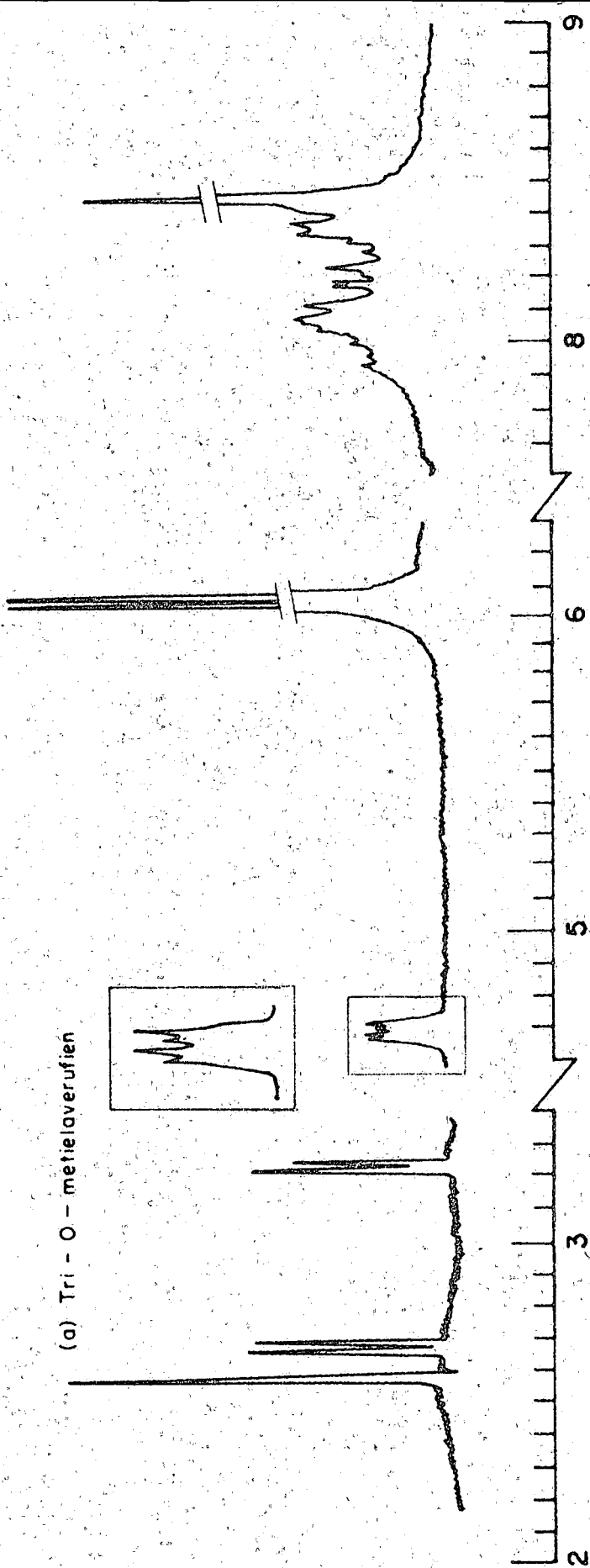
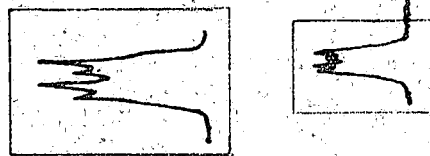
op grond van die volgende informasie:



Die u.v. absorpsie van nidurufien ($\lambda_{\text{maks}} 223, 264, 291$ en $448 \text{ m}\mu$) en die karbonielabsorpsie in die infrarooigebied ($\gamma_{\text{maks}} 1710$ en 1625 cm^{-1}) was feitlik identies aan die van averufien. (Tabel III). Die k.m.r. spektrum het geen metoksisiene bevat nie. Metilasie met metieljodiet en silweroksied het tri- en tetrametoksiderivate (26 $R = \text{CH}_3$, $R' = \text{H}$ en $R = R' = \text{CH}_3$ respektiewelik) gelever. Die k.m.r. spektrum van die tetrametoksiderivaat het die teenwoordigheid van drie aromatiese - (6 proton singlet by $\tau 6.05$, 3 proton singlet by $\tau 6.08$) en een alifatiese-O-metielgroep (3 proton singlet by $\tau 6.48$) aangedui.⁵⁵ Nidurufien bevat dus een alkoholiese- en drie fenoliesehidroksielgroepe. Die lae karbonielabsorpsie in die infrarooispektrum van nidurufien is in ooreenstemming met die van ander bekende hidroksiantrakinone waar een of beide van die karbonielgroepe, intramolekulêre waterstofbinding ondervind.⁵⁶⁻⁵⁸

Die k.m.r. spektrum van nidurufien (Fig. 3b) is in ooreenstemming met struktuur (26 $R = R' = \text{H}$) en stem ook ooreen met die van ander 1,3,6,8-tetrahidroksie antrakinone. (Tabel IV).

(a) Tri - O - metielaverufien



(b) Nidurufien

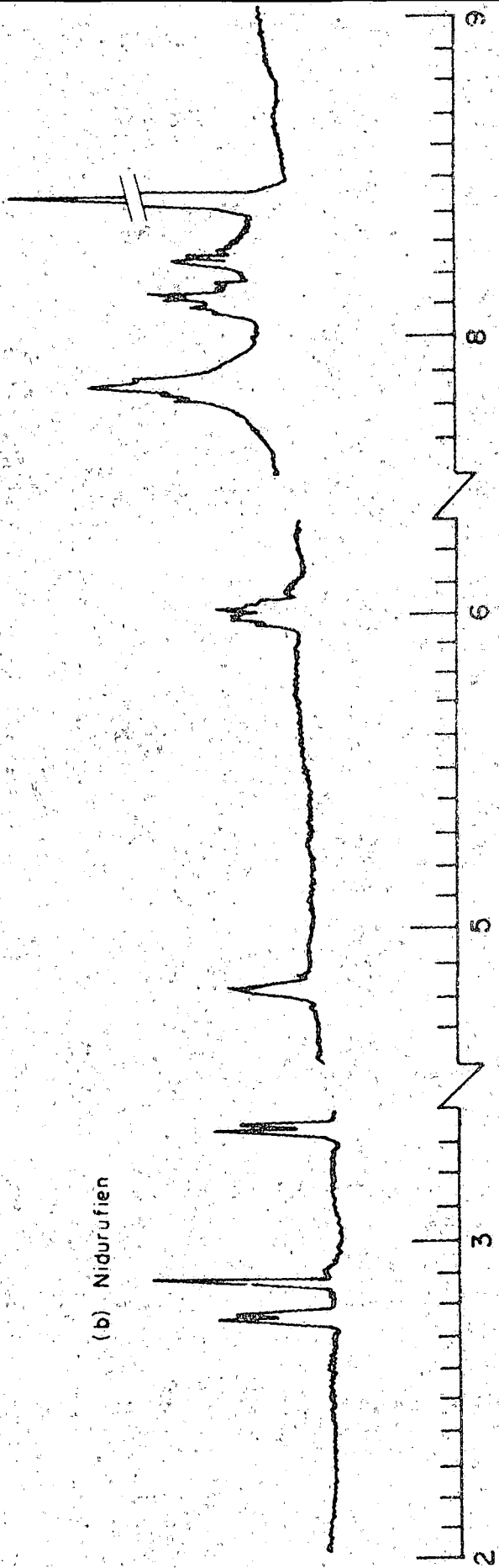


FIG.3 kmr. spektra

T a b e l III

Ultraviolet absorpsie maksima van die
hidroksiantrakinone

| Antrakinoon | $\lambda_{\text{maks}} \text{ m}\mu (10^3 \text{ \AA})$ | | | | | |
|--|---|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | 223 | 255 | 266 | 290 | 320 | 450 |
| 1,3,6,8-tetra- hidroksiantra- kinoon | 223(28.3) | 254(13.2) | 261(12.9) | 292(23.6) | 319(8.24) | 450(9.4) |
| Averufien | 223(32.7) | 253(15.9) | 264(17.8) | 291(30.0) | 316(10.7) | 448(9.9) |
| Nidurufien | 223(37.9) | 253(17.5) | 264(19.6) | 291(35.0) | 318(9.7) | 448(11.8) |
| Dehidro- nidurufien | 223(34.8) | 253(17.5) | 264(18.6) | 291(30.4) | 316(10.7) | 450(10.0) |
| Versikolo- rien C | 223(28.8) | 255(15.9) | 266(20.4) | 292(28.8) | 314(10.0) | 448(10.7) |
| Bipolarien | 223(35.2) | 253(17.5) | 264(19.6) | 292(28.6) | 314(10.6) | 448(9.7) |
| Averufanien | 223(30.7) | 253(13.9) | 265(16.2) | 292(28.5) | 320(8.8) | 450(9.2) |
| 1'-Metoksi- averantien | 223(28.6) | 253(14.9) | 264(16.2) | 291(29.0) | 316(8.4) | 450(9.3) |
| Averantien | 223(33.6) | 256(15.2) | 266(17.5) | 294(33.7) | 325(10.3) | 454(10.7) |
| Averytrien | 223(28.3) | 253(16.4) | 267(17.5) | 296(28.9) | 326(9.8) | 450(10.0) |

T a b e l IV

k.m.r. absorpsieposisies van die aromatiese
protone van hidroksiantrakinone

| Antrakinoon | Absorpsie-waarde in τ | | | | Oplosmiddel |
|----------------------|----------------------------|----------------|----------------|-----------------|------------------------------------|
| | H ₄ | H ₅ | H ₇ | H _{1'} | |
| Averufien | 3.14 | 3.03 | 3.55 | 4.75 | (CD ₃) ₂ SO |
| Nidurufien | 2.87 | 2.75 | 3.36 | 4.73 | (CD ₃) ₂ CO |
| Dehidronidurufien | 2.89 | 2.80 | 3.37 | 4.72 | CDCl ₃ |
| Versikolorien C | 2.75 | 2.68 | 3.31 | 4.71 | CDCl ₃ |
| Bipolarien | 2.82 | 2.89 | 3.43 | 4.67 | (CD ₃) ₂ SO |
| Averufanien | 2.90 | 2.92 | 3.44 | 5.02 | (CD ₃) ₂ SO |
| 1'-Metoksiaverantien | 2.91 | 2.82 | 3.43 | 5.05 | (CD ₃) ₂ CO |
| Averantien | 3.18 | 3.20 | 3.85 | 3.95 | D ₂ O-NaOD |
| Averytrien | 3.16 | 3.22 | 3.87 | 3.36 | D ₂ O-NaOD |

Die /

Die drie proton sein by τ 8.42 word toegeskryf aan die tersiêre metielgroep. 'n Skerp eenproton sein by τ 2.78 en eenproton doeblette by τ 2.75 en 3.36 ($J = 2$ Hz) word aan die aromatiese protone op posisies 4, 5 en 7 onderskeidelik toegeskryf. Die lae veld absorpsie van die protone in posisies 4 en 5 is waarskynlik te wyte aan die feit dat hulle in die peri-posisie ten opsigte van 'n karbonielgroep geleë is en dus sterk ontskerm word.⁵⁹ 'n Relatief skerp eenproton sein by τ 4.73 (breedte by halfhoogte 3 Hz) en 'n breë eenproton sein by τ 6.03 (breedte by halfhoogte 9 Hz) word aan die protone op posisies 1' en 2' respektiewelik toegeskryf. Die alkoholiese hidroksielgroep is op posisie 2' geplaas op grond van die verskil van die C1'-H sein met die van averufien. Die proton op C-1' in averufien vertoon 'n kwartet by τ 4.75 (J_4 en 1.5 Hz) as gevolg van die koppeling met die visinale metileen protone op C-2'. Indien die (endo-) proton op C2' wat verantwoordelik is vir die sterk koppeling met C1'-H, vervang word met 'n hidroksielgroep sal die C1'-H sein 'n swak opgeloste doeblet word. Indien die koppelingskonstantes vir hierdie visinale wisselwerking ongeveer dieselfde waarde het as in die geval van averufien sal dit baie klein (≈ 1.5 Hz) wees. Die feit dat die C1'-H sein in die oorspronklike k.m.r. spektrum die vorm van 'n effens verbreedte singlet aanneem is tentatief toegeskryf aan die swak oplosvermoë van die k.m.r. instrument. In 'n spektrum wat onlangs opgeneem is, vertoon die C1'-H sein as 'n doeblet ($J = 1.5$ Hz). Dit is dus duidelik dat die hidroksielgroep nie enige konformasieverandering in ring E veroorsaak nie.

Ten einde die posisie van die sekondêre hidroksielgroep vas te stel, is nidurufien selektief geoksideer. Behandeling met chroomsuur in asetoon lewer die gesogte ketoon, dehidronidurufien (27).

Die ultravioletspektrum van die produk was identies aan die van die aanvangsmateriaal (Tabel III). 'n Ekstra karbonielabsorpsie in die infrarooi-spektrum ($1,705 \text{ cm}^{-1}$) is aan die ketoongroep toegeskryf. Die absorpsie van die C1' proton in die k.m.r. spektrum vertoon nou as 'n skerp sein by τ 4.72 (breedte by halfhoogte 1.2 Hz). Dit is dus duidelik dat C2' geen protone dra nie en dus die alifatiese karboniel moet bevat.

Die sekondêre hidroksielgroep in nidurufien word baie stadig aangeval deur chroomsuur in aseton as dit vergelyk word met 'n soortgelyke reaksie van sekondêre hidroksielgroepe in terpene en sterofiede met die reagens. In laasgenoemde twee gevalle reageer die sekondêre hidroksielgroepe gewoonlik vinnig genoeg sodat 'n titrasie-metode van oksidasie toegepas kan word.⁶³ Nidurufien is egter oor 'n lang periode (30 minute) met 'n groot oormaat (10 ekwivalente) chroomsuur behandel ten einde die reaksie volledig te laat verloop. Die k.m.r. data van nidurufien toon dat die sekondêre hidroksielgroep 'n endo oriëntasie het (dit wil sê in die rigting van die antrakinoon sisteem georiënteer). 'n Dreidingmodel van nidurufien toon dat die proton van die sekondêre hidroksielgroep naby genoeg (1.8 \AA^0) aan die suurstofatoom van die C1 fenoliese groep kan kom om die vorming van 'n sterk waterstofbinding* te veroorsaak. Dit is bekend dat die spoed waarteen 'n sekondêre hidroksielgroep met chroomsuur reageer, deur waterstofbinding verlaag word aangesien die verestering van die hidroksigroep vertraag word.⁶⁵

Die hidroksiantrakinoon sisteme van nidurufien en averufien is besonder stabiel teenoor chroomsuur. Fenole soos α - en β -naftol word relatief vinnig deur chroomsuur vernietig.⁶⁵ Die elektrontrekkende invloed van die karbonielgroepe en waterstofbinding tussen die fenoliese hidroksielgroepe en die

* Die teenwoordigheid van vier hidroksielgroepe in nidurufien maak dit onmoontlik om 'n direkte bevestiging hiervoor op grond van k.m.r. en i.r. data te verkry.

karbonielgroep is waarskynlik verantwoordelik vir die stabiliteit van nidurufien en averufien.

Die waterstofgebinde fenoliese groepe in nidurufien is verantwoordelik vir skerp eenproton seine by τ 0.10 en 0.82 in die k.m.r. spektrum. Hierdie groepe kan nie met dimetielsulfaat en asetoon gemetileer word nie. Behandeling met silweroksied en metieljodied lewer wel volledige metilasie maar die metilasie van die C2'-OH groep verloop baie stadig en die hoofproduk van die reaksie was die tri-O-metielderivaat (26, R = CH₃, R' = H).

2.2.5 Die massaspektrum van nidurufien.- Die krakingspatroon van nidurufien

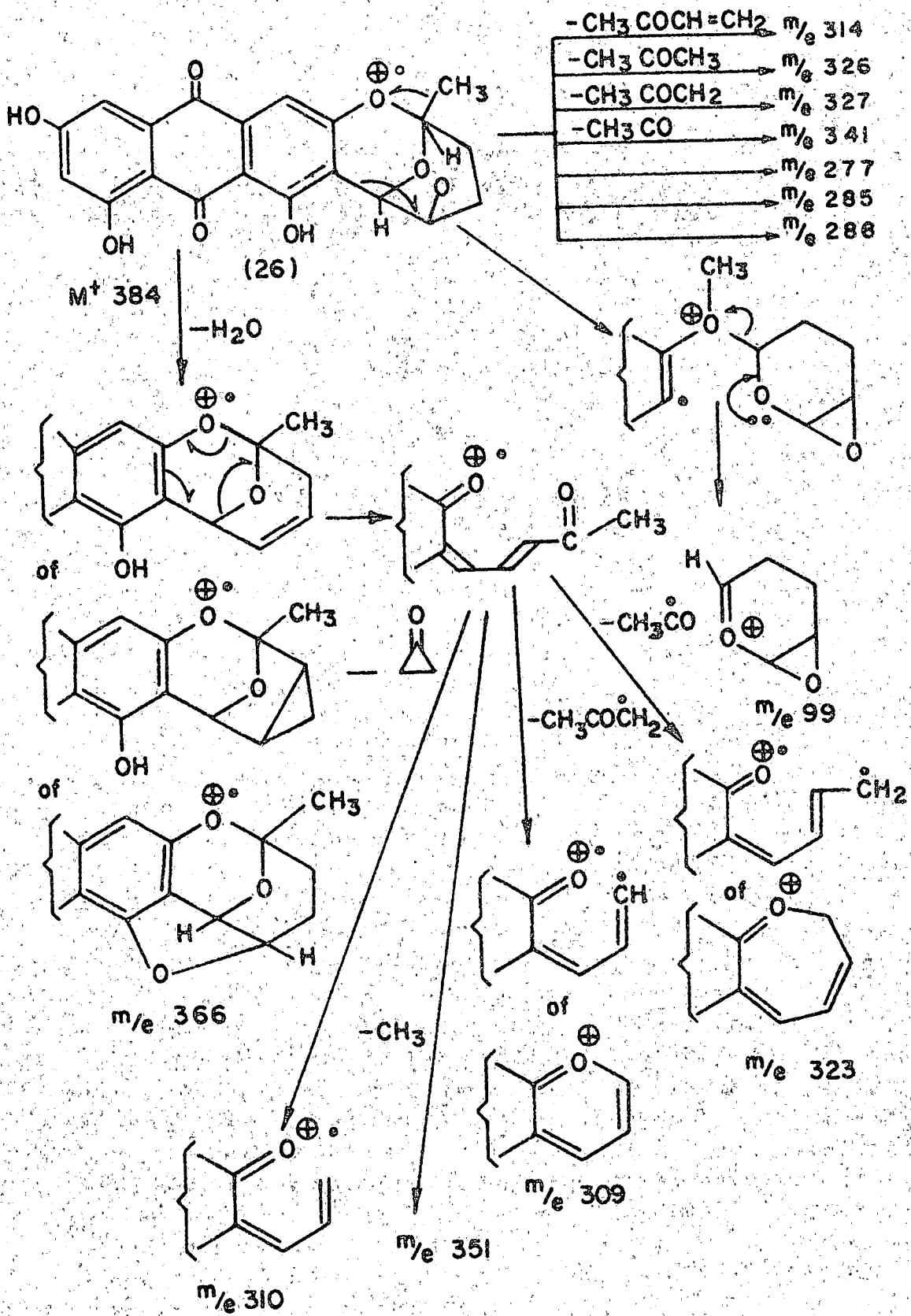
in die massaspektrometer (Fig. 1b) kan volledig in terme van struktuur (26 R = R' = H) verklaar word. Die mees intense fragment ontstaan deur die dehidrasie van nidurufien. Hierdie dehidrasie kan aan termiese ontbinding en/of elektronbotsing te wyte wees. Indien eersgenoemde die geval is, sal die gevormde [M-18]⁺ioon waarskynlik 'n C2' - C3' dubbelbinding bevat.*

Studies met deuteriumgemerkte 1-butanol^{60,61} en sikloheksanol⁶² het bewys dat nie-termiese dehidrasie hoofsaaklik 'n 1,3 of 1,4 uitsplitsings proses behels.

In die geval van nidurufien bestaan daar ook nog die moontlikheid dat die sekondêre hidroksielgroep en die fenoliese hidroksiel by C1 gesamentlik betrokke is by die watereliminasië. Minstens drie moontlike strukture kan dus vir die [M-18]⁺ioon neergeskryf word (Skema 6).

Die brokstukke met m/e 357, 337, 323, 310 en 309 ontstaan waarskynlik vanaf die [M-18]⁺ioon deur die verlies van CH₃, CHO, CH₃CO, $\overline{\text{CH}_2\text{COCH}_2}$ en CH₃COCH₂ respektiewelik (Skema 6). Die fragmente met m/e 341, 326 en 314 moet

* Volgens Bredt se reël sal dehidrasie in die gebrugde sisteem nie die vorming van 'n C1' - C2' dubbelbinding tot gevolg hê nie as gevolg van die hoër spanning wat dan in ring D sal ontstaan.

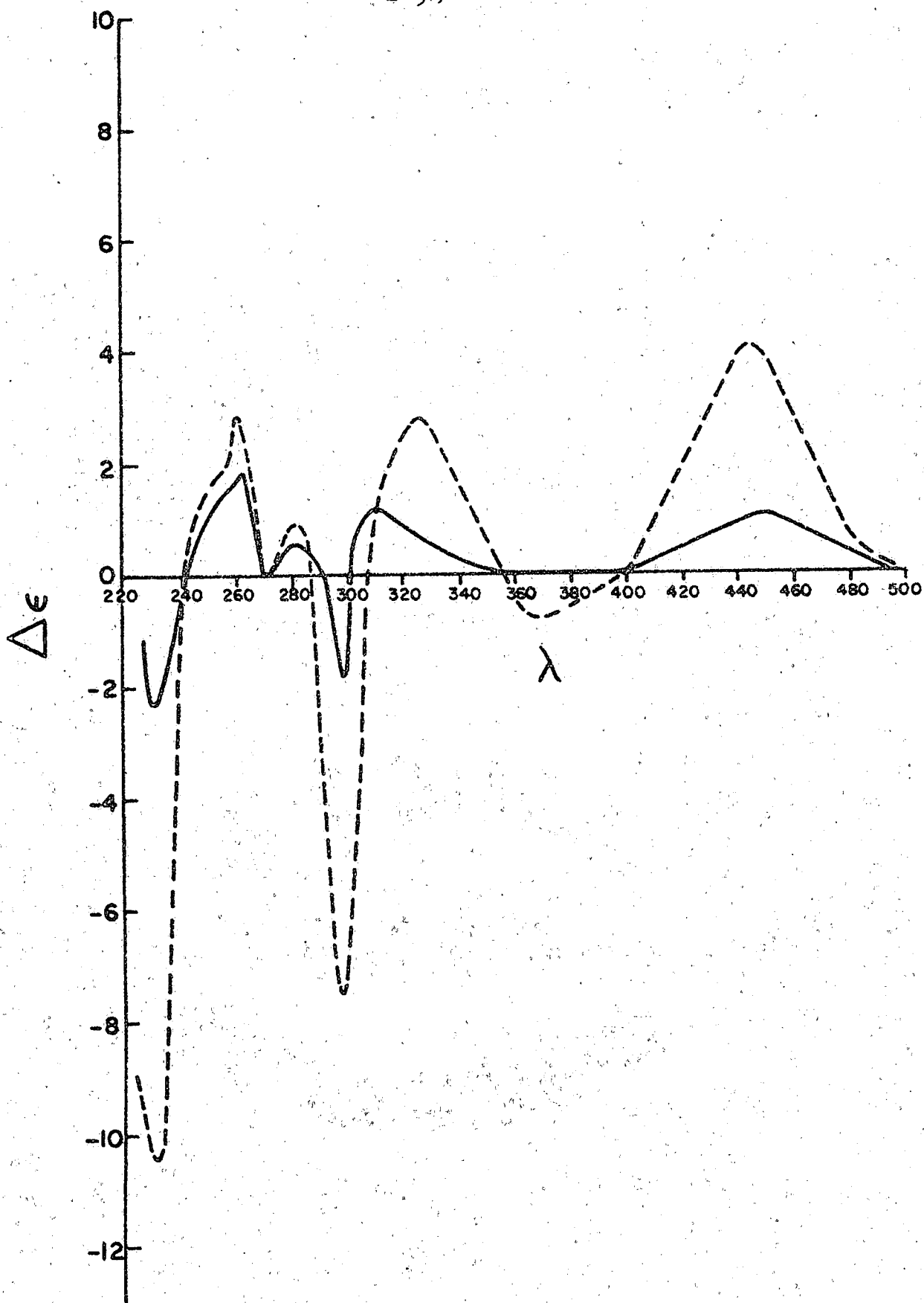


SKEMA 6

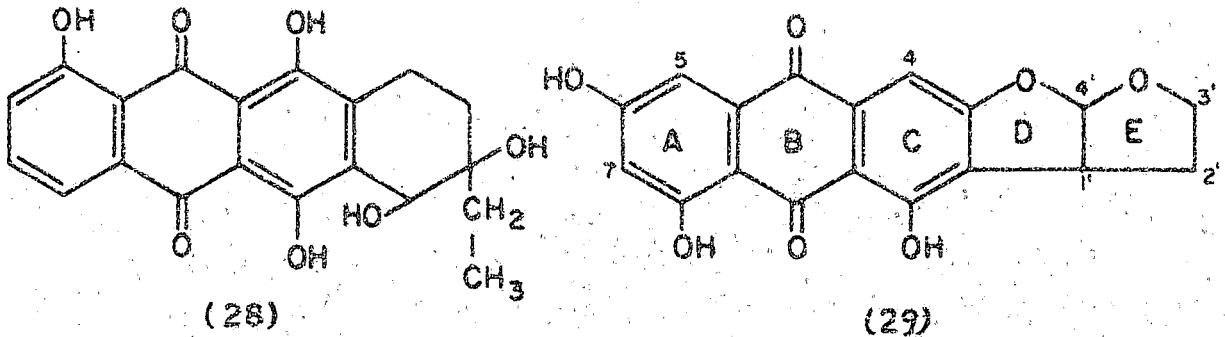
deur verliese van CH_3CO , CH_3COCH_2 en $\text{CH}_3\text{COCH} = \text{CH}_2$ vanaf die moederioon gevorm word. Die fragmente met m/e 272, 285 en 286 ontstaan waarskynlik op dieselfde wyse as die met dieselfde samestelling in die massaspektrum van averufien. Die fragment met m/e 99 ($\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2$) ontstaan moontlik deur 'n proses wat analoog is aan die wat aanleiding gee tot die fragment met m/e 83 in die spektrum van averufien. Die invloed van die sekondêre hidroksielgroep op die krakingsproses is moontlik verantwoordelik vir die veel hoër intensiteit van die m/e 99 brokstuk as die ooreenkomstige piek in averufien met m/e 83.

2.2.6 Die sirkulêre dichroïsmiese spektra van averufien en nidurufien. - Daar is geen inligting beskikbaar aangaande die absolute stereochemie van C1' en C5' in averufien en nidurufien nie. In A. nidulans kom beide saam voor. Hierdie metaboliete is heel waarskynlik biogeneties verwant en het waarskynlik dus dieselfde stereochemie by C1' en C5'. Die baie groter intensiteit van die Cotton effekte in die sirkulêre dichroïsmiese (s.d) spektrum van nidurufien in vergelyking met die van averufien (Fig. 4) moet dus aan die bydrae van die asimmetriese sentrum by C2' te wyte wees. Onderzoek van 'n groot aantal aromatiëse verbindings het getoon dat 'n asimmetriese sentrum, wat nie direk aan die chromofoor gebind is nie, gewoonlik net 'n klein bydrae tot die optiese aktiwiteit maak, tensy dit die stereochemie van die hele sisteem bepaal.⁶⁶ Daar is dus 'n direkte interaksie tussen die chromofoor en die asimmetriese sentrum by C2'. Argumente is reeds aangevoer vir die feit dat die alkoholiese hidroksielgroep naby die C1-OH groep geleë is. Die sekondêre hidroksigroep kan dus deur direkte interaksie met die chromofoor (bv. waterstofbinding) die elektronverspreiding in die chromofoor genoegsaam versteur om tot sterk optiese aktiwiteit aanleiding te gee.⁶⁷

Die tekens van die Cotton effekte van nidurufien en averufien in die 280 - 350 m μ gebied is identies met die van γ - rhodomysinoon (28) en sy derivate.⁶⁸



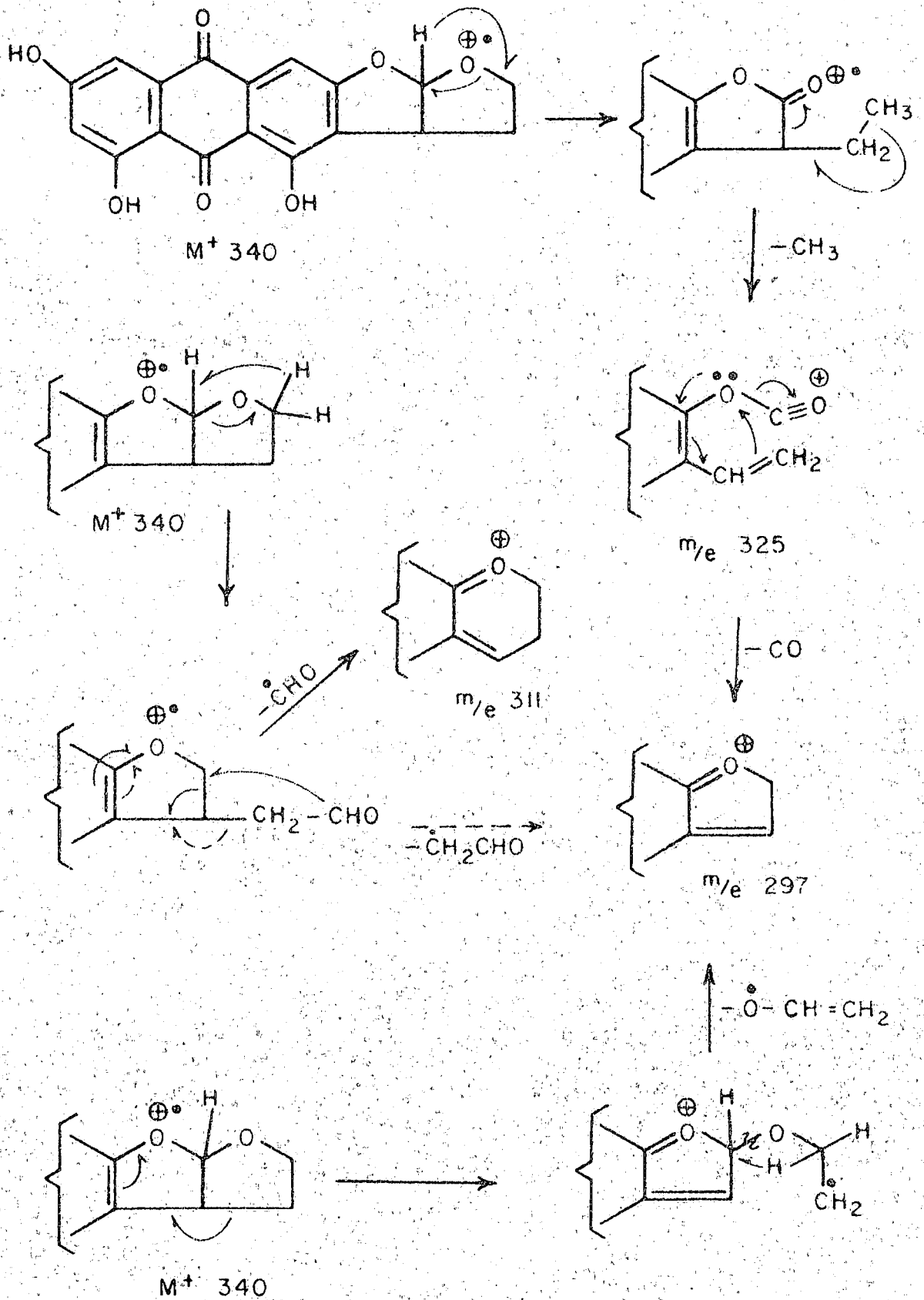
FIGUUR 4
SIRKULÊRE DICHROÏSME SPEKTRA VAN
AVERUFIEN (—) EN NIDURUFIEN (----)



Die optiese aktiwiteit van die chromofoor word waarskynlik in beide gevalle deur die naaste asimmetriese sentrum ($\text{Ar} - \overset{\text{O}}{\underset{|}{\text{C}}} - \text{R}$) bepaal. In die lig van die struktuurverwantskap en die noue ooreenstemming in u.v. absorpsie is dit moontlik dat die elektroniese oorgange van averufien en γ -rhodomysinoon nie veel sal verskil nie. Die feit dat die tekens van die Cotton effekte van averufien en γ -rhodomysinoon dieselfde is, kan dus moontlik daarop dui dat die asimmetriese sentra wat aan dié twee chromofore verbind is, dieselfde stereochemie het.

2.2.7 Versikolorien C.- Versikolorien C (29) is 'n bekende metaboliet van A. versicolor³³ en kom ook in die stam M716 voor. Hierdie metaboliet is nou ook vir die eerste keer uit A. nidulans en Bipolaris sp. geïsoleer. Die identifikasie van versikolorien C is gebaseer op sy molekulêre samestelling ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_7$) en die ooreenkoms van sy fisiese data - smeltpunt, u.v. (Tabel III), i.r.- en k.m.r. spektra (Tabel IV) met die van die gepubliseerde waardes.

Die massaspektrum van versikolorien C (Fig. 1c) is baie eenvoudig. Die vernaamste fragmente stem ooreen met die verlies van CH_3 , CHO en CH_2CHO . Die vernaamste fragmente in die massaspektra van dihidrosterigmatosistien en aflatoksien B_2 ontstaan op soortgelyke manier. In skema 7 word meganismes vir die krakingsprosesse voorgestel.



SKEMA 7

2.3 Groep B. Bipolarien en averufanien

2.3.1 Bipolarien.- 'n Nuwe antrakinoon ($C_{18}H_{14}O_7$) is uit Bipolaris sp.

geïsoleer. Hierdie metaboliet, waarvoor die triviale naam bipolarien voorgestel word, was duidelik 'n 1,3,6,8-tetrahidroksiantrakinoon op grond van

die volgende informasie: Na behandeling met CH_3OD bevat bipolarien vier deuterium atome. Dit dui aan dat bipolarien vier hidroksielgroepe bevat.

Bipolarien het ook 'n tipiese 1,3,6,8-tetrahidroksiantrakinoon ultraviolet spektrum^{69,70} (Tabel III). Behandeling van bipolarien met silweroksied en

metieljodied lewer 'n derivaat wat vier aromatiese metoksigroepe bevat.

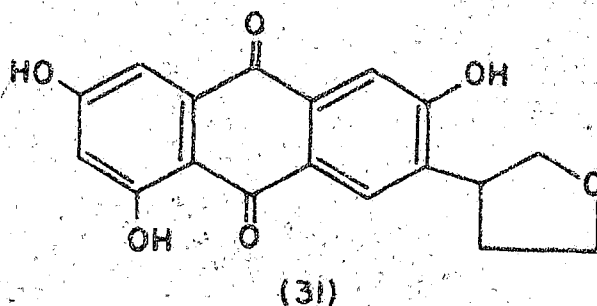
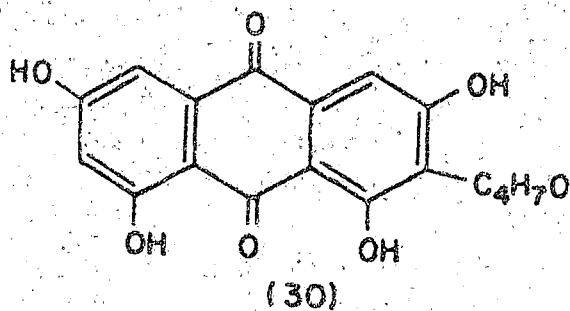
(k.m.r. seine ~ by τ 6.05). Die k.m.r. spektrum van bipolarien bevat twee skerp lae veld seine (τ - 0.82 en - 0.10) wat verdwyn na behandeling met

deuteriumoksied. Hierdie seine is te wyte aan twee hidroksielgroepe wat sterk waterstofbinding ondervind.⁷¹ Die aromatiese gedeelte van die k.m.r. spektrum

wat een ongekoppelde (τ 2.82) en twee metagekoppelde protone (τ 2.89 en 3.43, J 2 Hz) bevat en die ultraviolet- en karbonielabsorpsie is feitlik identies

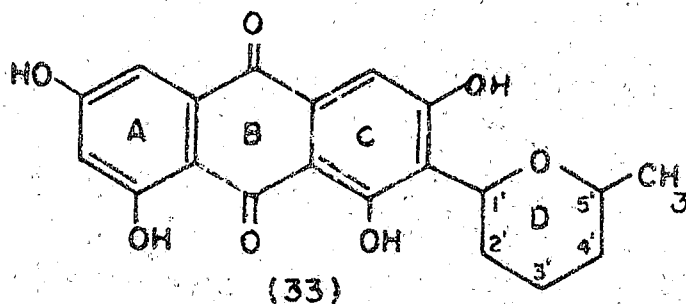
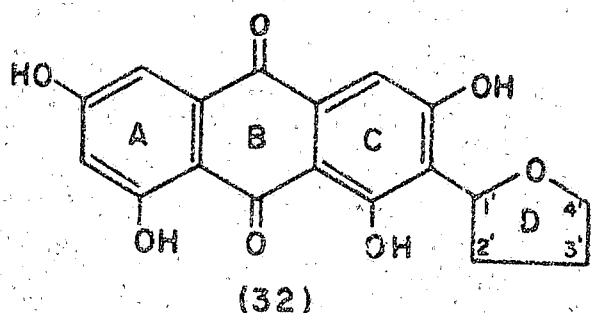
aan die van averufien en ander 1,3,6,8-tetrahidroksiantrakinone (Tabel IV).

Die deelstruktuur (30) kan dus aan bipolarien toegeken word.



Die infrarooi spektrum van bipolarien toon duidelik dat die nie-aromatiese gedeelte nie 'n ketoongroep bevat nie. Die deuteriumuitruiling het reeds bewys dat hierdie gedeelte ook nie 'n hidroksielgroep bevat nie. Die suurstoffunksie kan nie 'n epoksiedgroep bevat nie aangesien dit stabiel is teenoor behandeling met suur en alkali. Die suurstof moet dus in 'n etergroep wees. Die stabiliteit van tetrametoksibipolarien teenoor osmiumtetraoksied het die afwesigheid van 'n olefiniese dubbelbinding bewys.

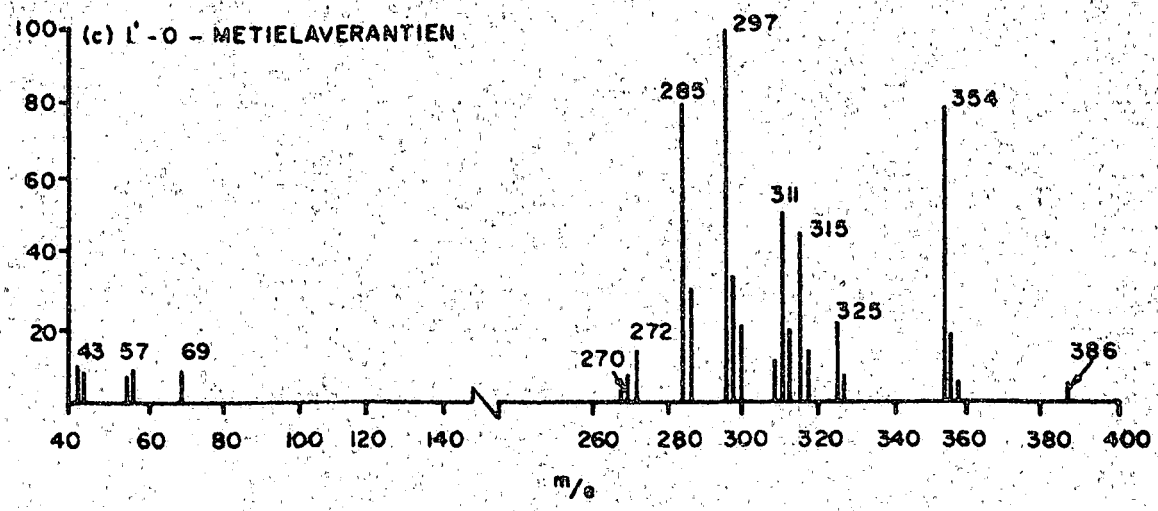
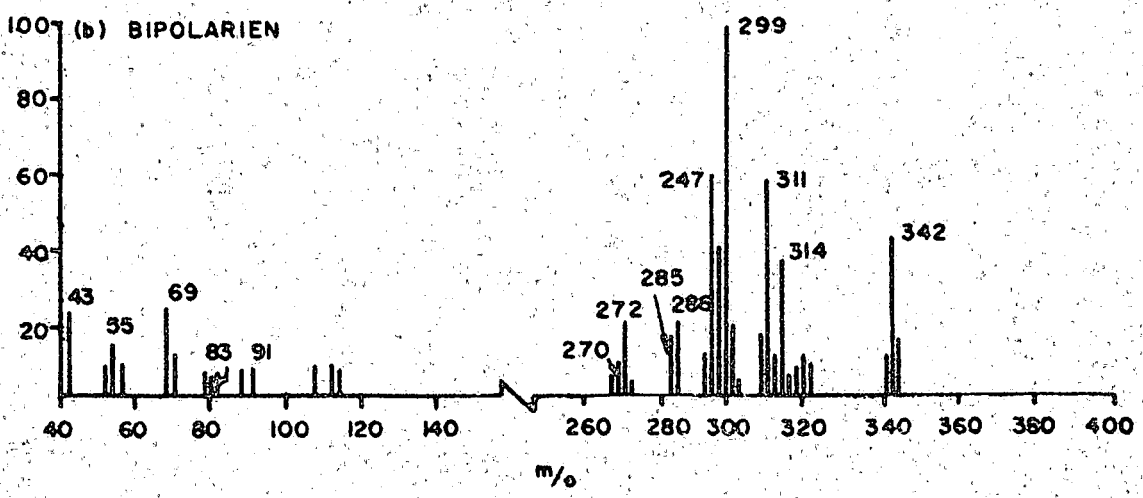
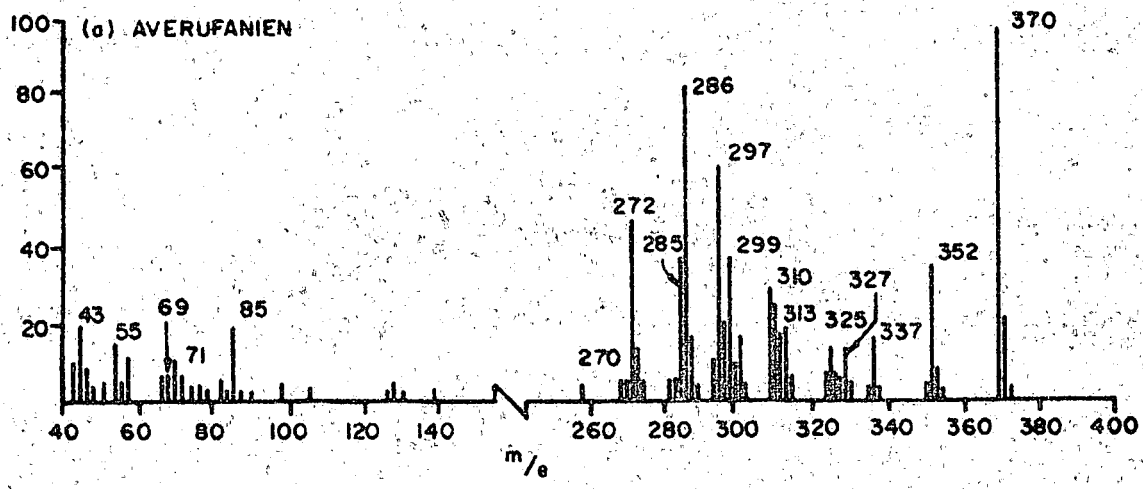
Bogenoemde feite het gelei tot die gevolgtrekking dat bipolarien 'n tetrahydrofuraan substituent bevat wat op een van twee maniere aan die kern gekoppel kan wees nl. soos in (31) of (32).



Struktuur (31) is 'n aantreklike moontlikheid aangesien die verwantskap tussen bipolarien en versikolorien C dan dieselfde sou wees as die tussen averufanien (33) en averufien (17).

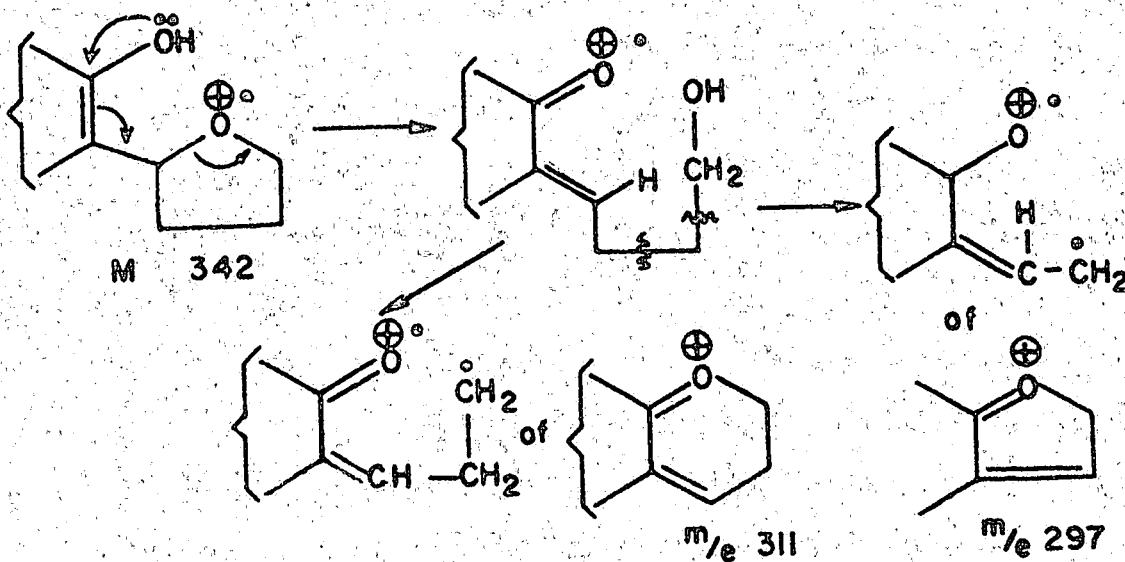
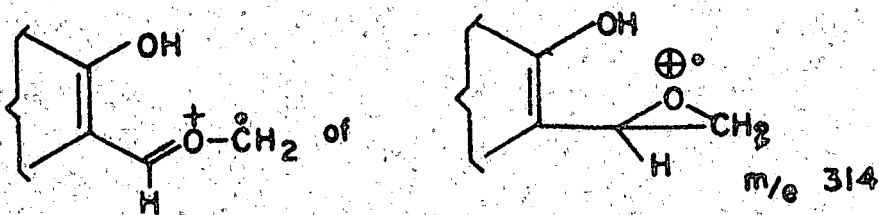
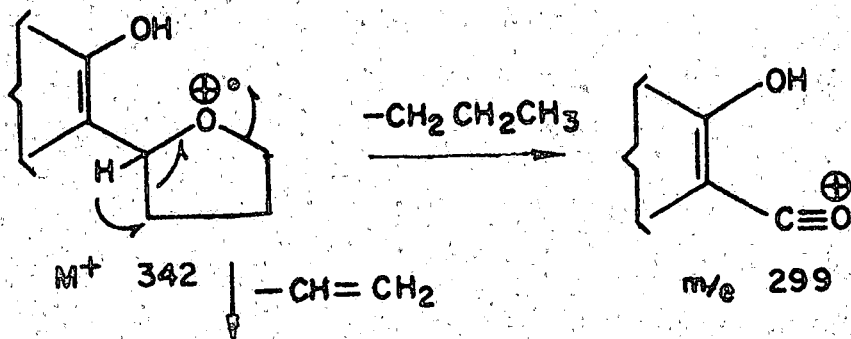
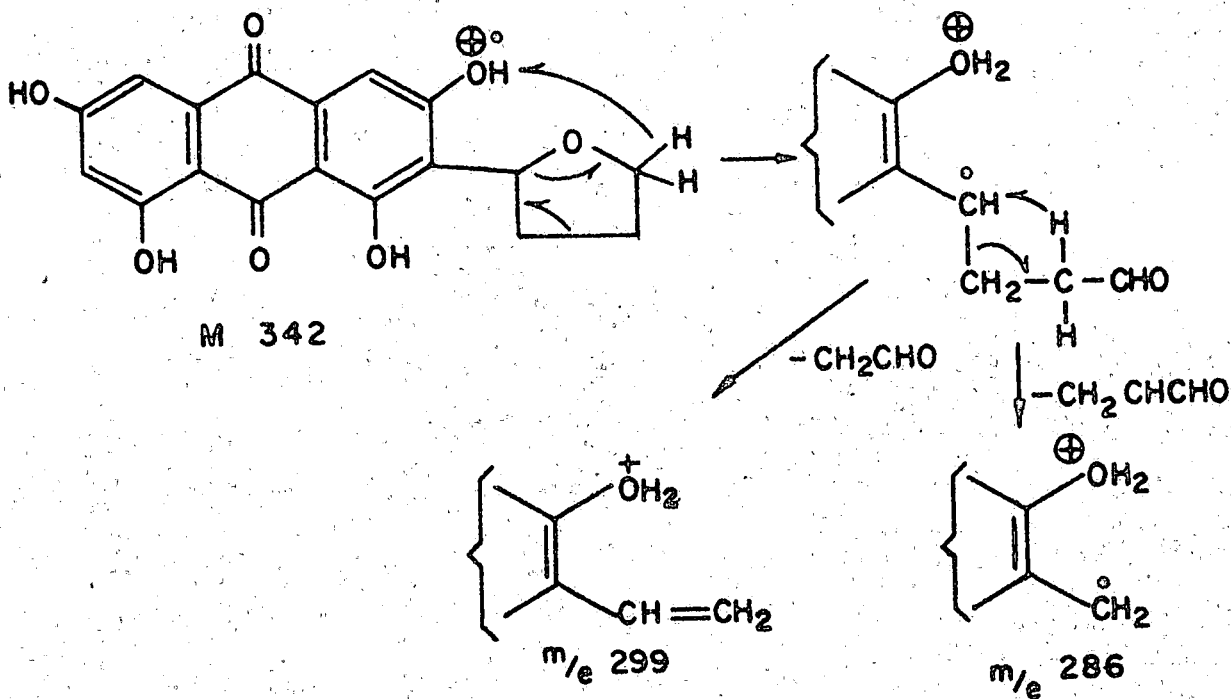
Hierdie struktuur is egter verwerp op grond van die volgende fisiese gegewens: Die massaspektrum van bipolarien (Fig. 6b) het 'n sterk piek met m/e 299 bevat. Akkurate massabepaling het getoon dat hierdie piek 'n doeblet is en dat die hoofkomponent die samestelling $C_{15}H_7O_7$ het. Hierdie fragment, wat al die suurstofatome van die molekule bevat, kan alleen verklaar word

RELATIEWE INTENSITEIT



FIGUUR 6

MASSASPEKTRA VAN HIDROKSIANTRAKINONE



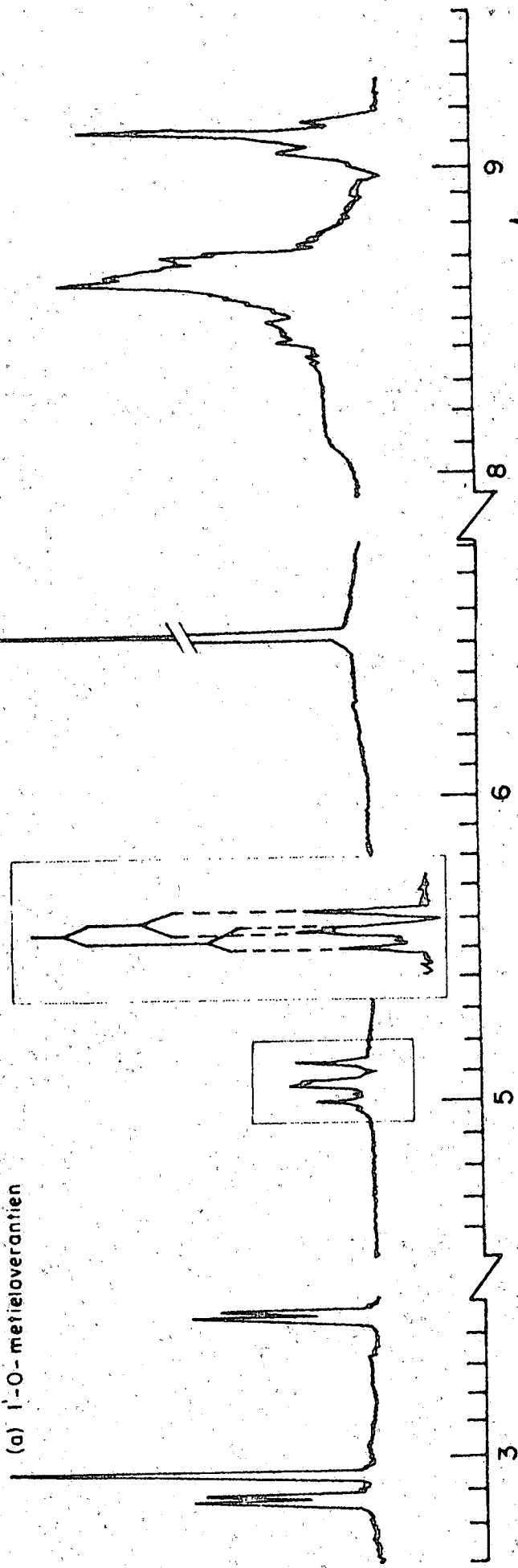
indien die koolstofatoom 1' 'n suurstofatoom dra soos in (32). Die posisie en patroon van die eenproton sein by τ 4.67 (kwartet $J = 4$ en 7 Hz) in die k.m.r. spektrum van bipolarien (Fig. 5b) bevestig die teenwoordigheid van 'n $\overset{O-}{-CH-CH_2-}$ groepering. Die $(-O-CH_2-)$ groep was verantwoordelik vir 'n breë sein by τ 7.91.

Die feit dat die C1'-H sein van bipolarien by 'n heelwat laer veld as die ooreenstemmende sein van averufanien verskyn, is moontlik gedeeltelik te wyte daaraan dat die α -protone in furane by 'n laer veld absorbeer as die van pirane.⁵⁵

'n Uitgebreide studie van pentafuranosederivate het getoon dat die koppelingskonstantes van visinale cis-waterstofatome wissel van 4.3 tot 6.8 Hz terwyl die waardes vir visinale transwaterstofatome wissel van 0.05 Hz tot 7.2 Hz.^{72a} Nog 'n groter koppelingskonstante is opgemerk^{72b} vir 3'-C- metieladenosien (8.2 Hz). Die koppelingskonstantes tussen C1'-H en C2'-2H in bipolarien val dus in hierdie gebied. 'n Koevertkonformasie van die furaanring met die suurstofatoom bokant die vlak van die ander ringatome en die C1'-Ar binding tussen die waterstofatome op C2' is een van die moontlike konformasies wat tot hierdie koppelingskonstantes kan aanleiding gee. Dit is moeilik om 'n definitiewe konformasie vir die furaanring voor te stel aangesien die koppelingskonstantes afhanklik is van die elektronegatiwiteit van die substituentte en omdat daar 'n groot aantal koevert- en skewekonformasies moontlik is.

In skema 8 word die fragmentasie van bipolarien (Fig. 6b) in die massaspektrometer uiteengesit. Die massaspektra van bipolarien toon 'n groot ooreenkoms met die van averufanien (Fig. 6a).

(a) 1'-O-metielaverantien



(b) Bipolarien

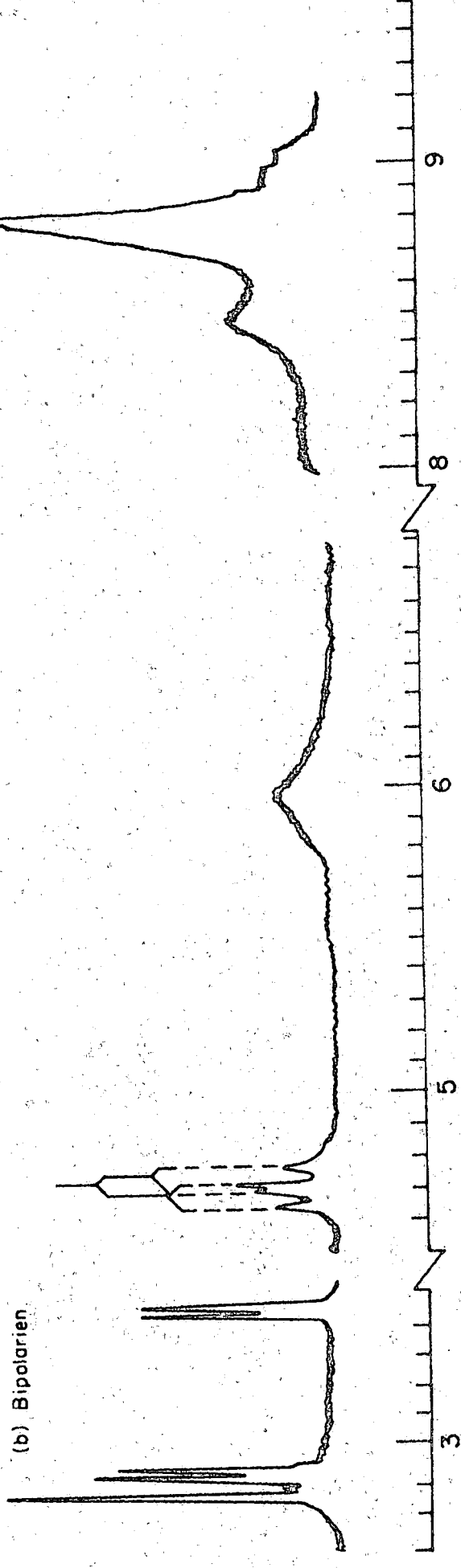


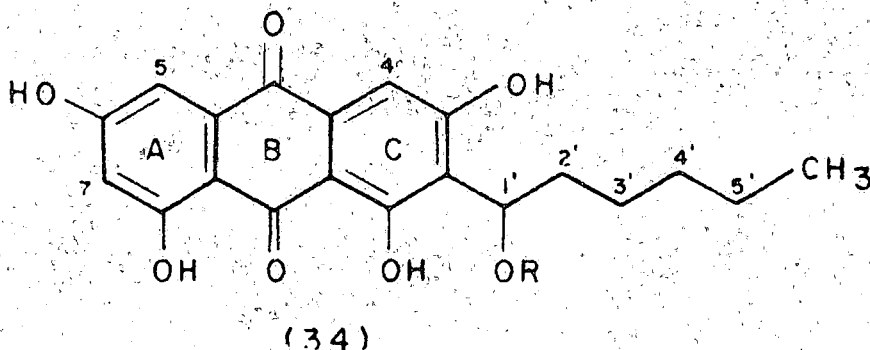
FIG. 5 kmr. spektro

2.3.2 Averufanien.- Die antrakinoon ($C_{20}H_{18}O_7$), wat geïsoleer is uit A. versicolor (stam M 716) en Bipolaris sp., se fisiese konstantes [smeltpunt, ultraviolet, (Tabel III), infrarooi- en k.m.r.- (Tabel IV), massaspektrum] het getoon dat dit moontlik identies kan wees aan die antrakinoon (33) wat deur Holker en sy medewerkers³⁴ uit 'n u.v. mutant van A. versicolor geïsoleer is. Die identiteit is bewys deur direkte vergelyking met 'n egte monster wat van dr. Holker (Liverpool) verkry is. Die triviale naam, averufanien, word vir hierdie metaboliet voorgestel.

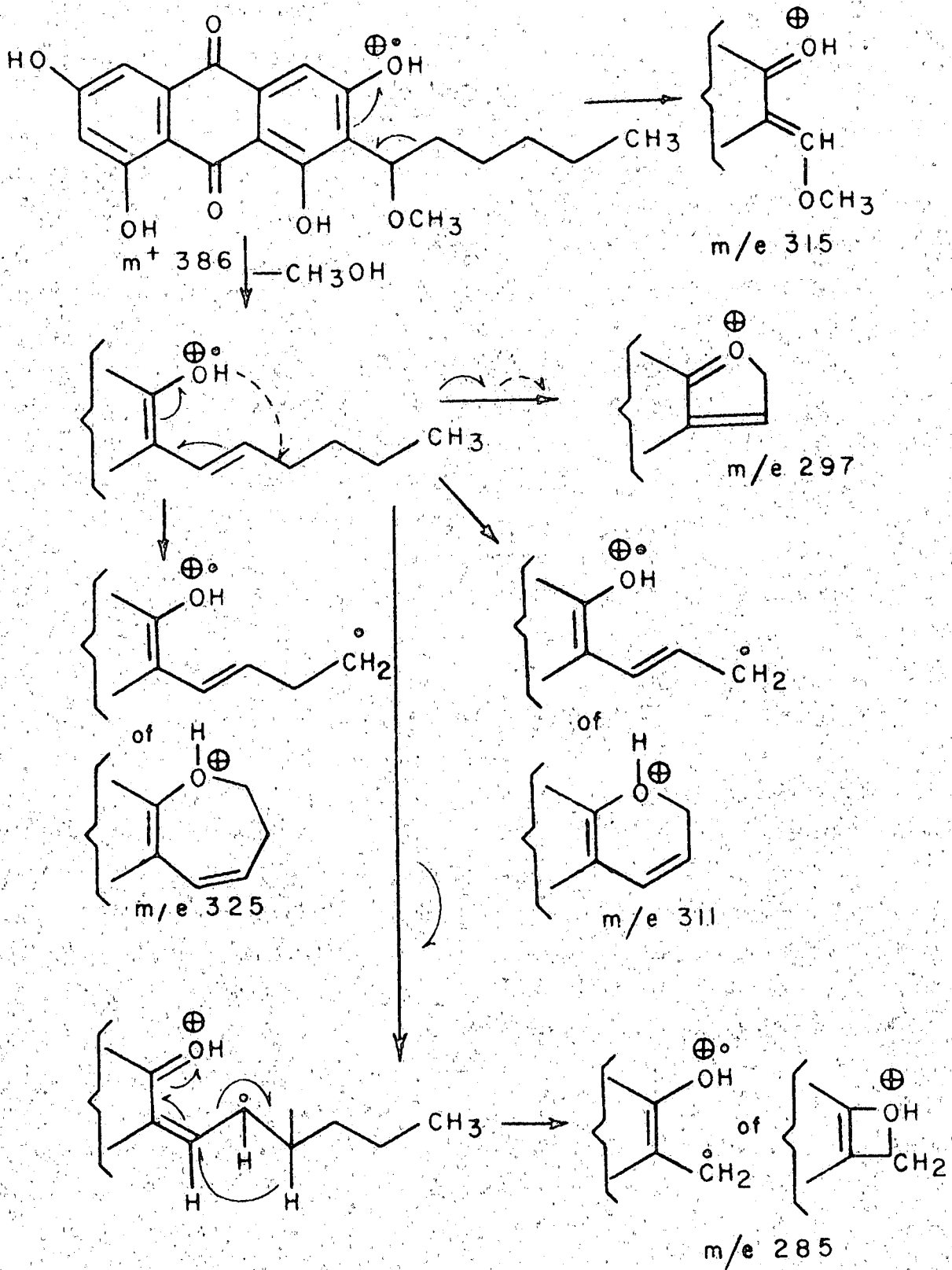
Die Cotton effekte van averufanien (270 - 340 m μ) het dieselfde tekens as die van averufien. [$\Delta \epsilon$ 0 (240 m μ), 0.82 (250 m μ), 0 (266 m μ), 3.08 (284 m μ), 0 (292 m μ), -1.54 (298 m μ), 0 (308 m μ), -0.82 (325 m μ), 0 (348 m μ), -0.5 (365 m μ), -0.02 (380 m μ), 0 (400 m μ)]. Dit versterk die argument dat die optiese aktiwiteit van averufien hoofsaaklik deur die C1' asimmetriese sentrum bepaal word.

2.4 Groep C : 1'-O-metielaverantien

'n Nuwe antrakinoon ($C_{21}H_{22}O_7$) is uit A. versicolor geïsoleer. Dit is geformuleer as 1'-O-metielaverantien^{**} (34, R = CH₃) op grond van die volgende gegewens:



^{**}Averantien het struktuur (34, R = H) en is 'n bekende metaboliet van A. versicolor.⁷³



SKEMA 9

Die ultraviolet absorpsie (λ_{maks} 223, 264 291 en 450 m μ) van die nuwe metabool was feitlik identies met die van die ander hidroksiantrakinone wat reeds bespreek is (Tabel III). Die teenwoordigheid van vier hidroksielgroepe is bewys met deuteriumuitruiling met deuteriometanol. Die k.m.r. spektrum (Fig. 5a) het die teenwoordigheid van 'n alifatiese-O-metielgroep by τ 6.53 en 'n primêre C-metielgroep by τ 9.13 (triplet $J = 5$ Hz). Die drie aromatiese protone se absorpsie was tipies die van die 1,3,6,8-tetrahidroksi-2-alkiel-antrakinoonsisteme wat reeds bespreek is (Tabel IV). Die eenproton kwartet by τ 5.05 ($J = 5.4$ en 7.4 Hz) is toegeskryf aan 'n (Ar - $\overset{\text{OCH}_3}{\text{CH}} - \text{CH}_2 -$) groepering.

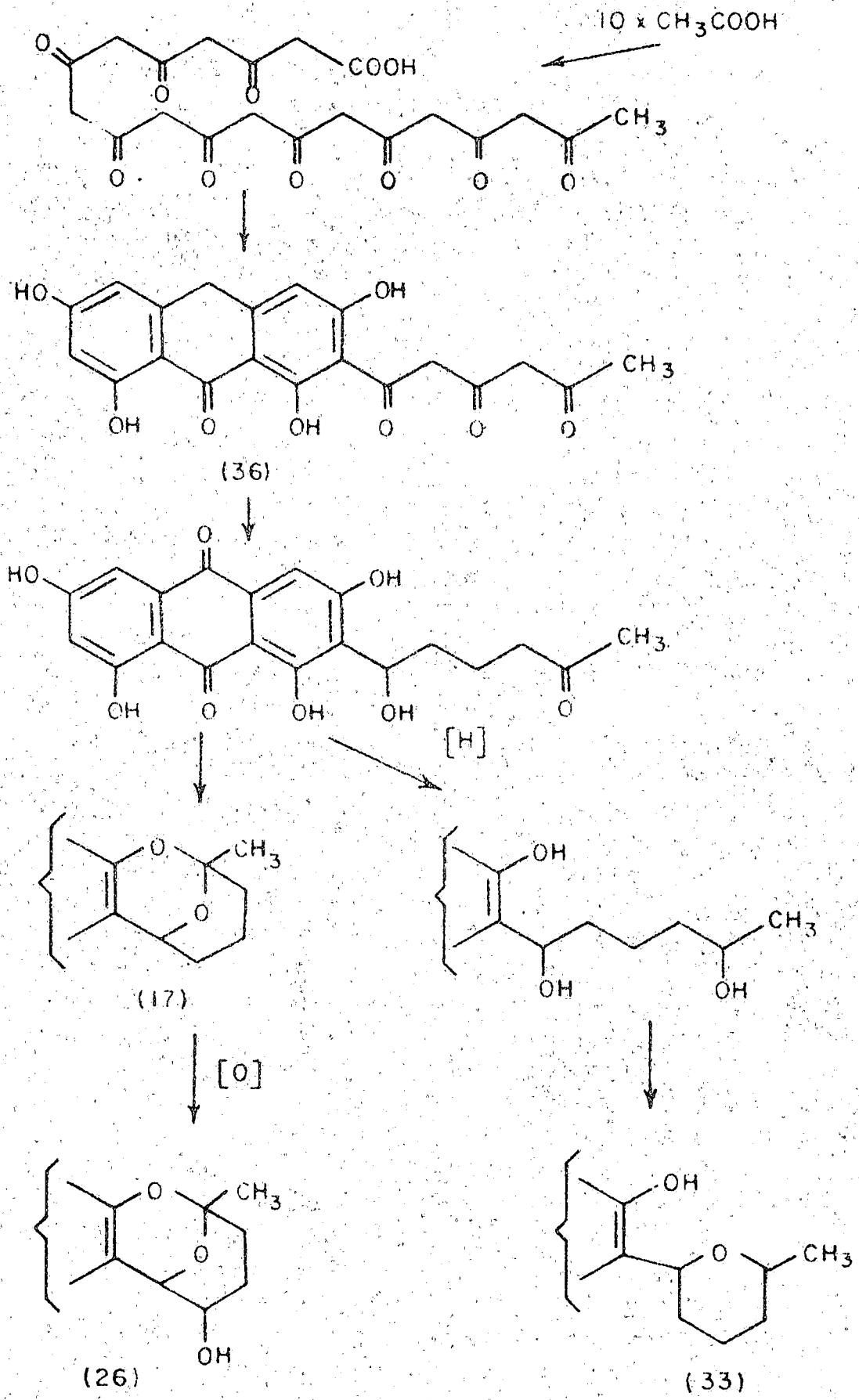
Deur metanol, (deur die behandeling van 1'-O-metielaverantien met p-tolueensulfoonsuur in dimetielsulfoksied), uit te splits, is 1'-O-metiel-averantien omgeskakel na die bekende averytien³⁵ (35). Dit het die struktuur onomstootlik bewys.

Die fragmentasie in die massaspektrometer (Fig. 6c) bevestig ook die struktuur. Die afbreekpatroon word in skema 9 uiteengesit.

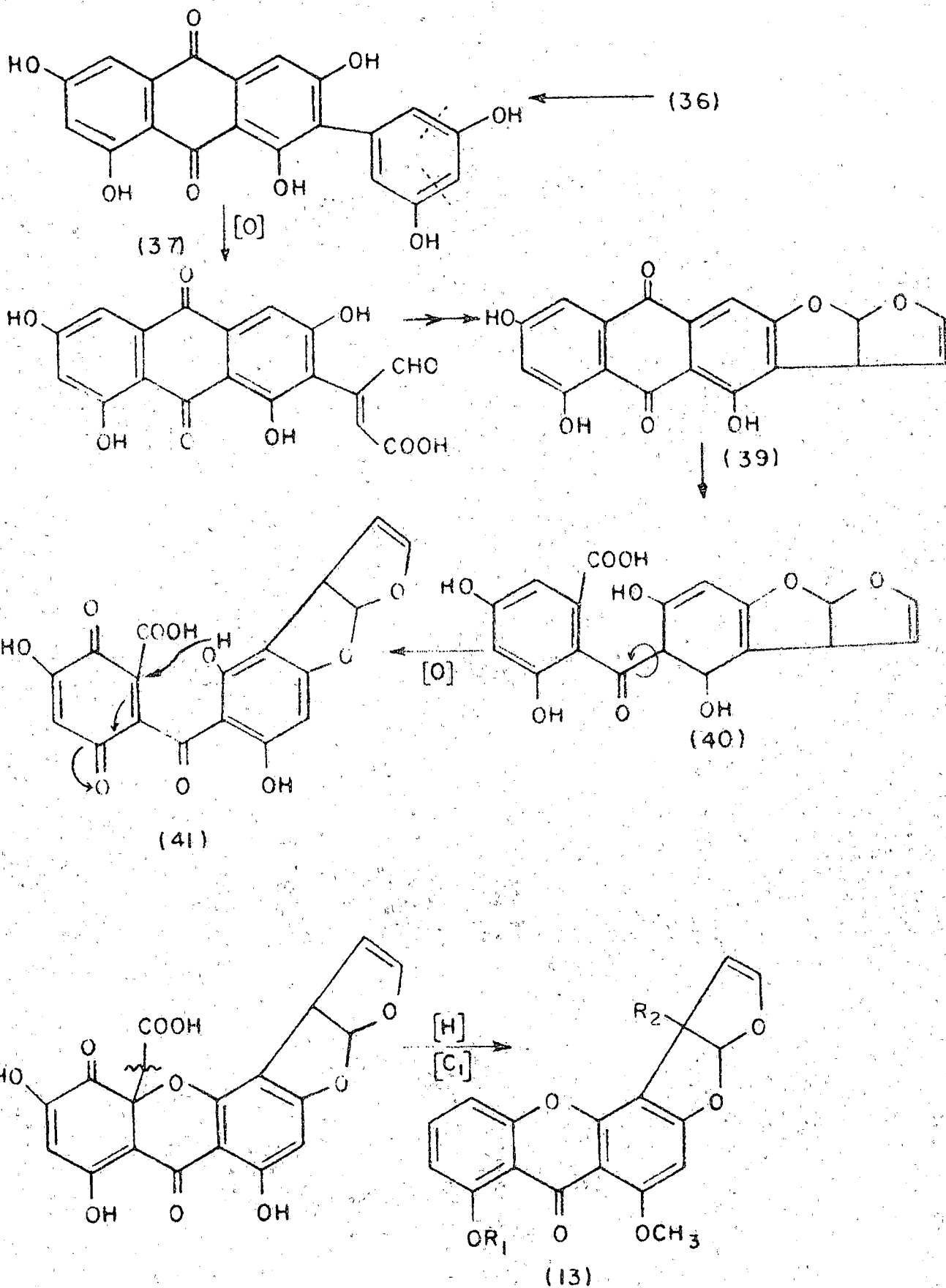
2.5 Struktuuranalise en biogenese van die hidroksiantrakinone

Struktuuranalise van averufien (17), averufanien (33) en averantien (34, R = H) toon dat hierdie metaboliëte volledig uit asynsuureenhede opgebou kan word. Die suurstofsubstitusiepatroon in die aromatiese gedeelte toon dit baie duidelik.

Gattenbeck^{74,75} het met isotoopgemerkte voorstowwe bewys dat antrakinone (van skimmeloorsprong) soos endokrosien en islandisien uit een β -poliketied ketting gevorm word. In die geval van die antrakinone wat hier bespreek word kan die direkte voorloper waarskynlik as (36) voorgestel word. Die verskillende modifikasies ontstaan dan waarskynlik deur oksidasie van die antroonsisteme en



SKEMA 10



SKEMA II

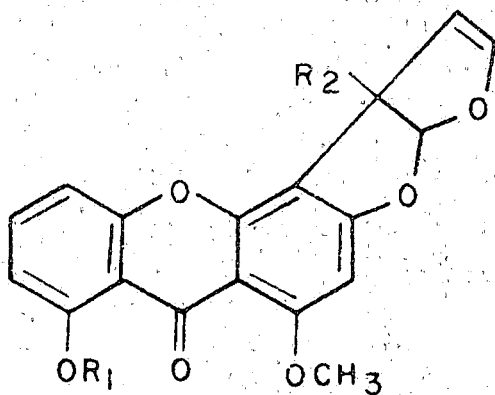
selektiewe reduksie van die syketting (Skema 10). Nidurufien (26, $R = R' = H$) kan nie direk vanaf die voorloper gevorm word nie en ontstaan waarskynlik deur oksidatiewe hidroksilasie van averufien.

Dit is moeiliker om 'n aanvaarbare biogenese vir versikolorien C en sterigmatosistien voor te stel. Hierdie metaboliëte kom in die skimmels saam met bogenoemde C_{20} -antrakinoone voor. 'n Voorstel is gemaak dat hierdie stowwe 'n gemeenskaplike voorloper het. Indien (36) hierdie voorloper is, kan die biogenese soos in Skema 11 voorgestel word. Die voorloper (36) kan na die resorsinol-derivaat (37) omgeskakel word deur aldolkondensasie van die syketting. Oksidatiewe splyting van die resorsinol-sisteem analoog aan die omskakeling van 6-metielsalisiesuur na patulien,⁷⁷ kan die vorming van 'n antrakinoon met 'n vertakte C_4 -syketting (38) tot gevolg hê. Deur selektiewe reduksie van die syketting gevolg deur intramolekulêre omskakeling kan (38) omgeskakel word na versikolorien A³³ (39). Analoog aan die vorming van solochrien vanaf emodien in *P. frequentes*⁷⁸ sal oksidatiewe splyting van die antrakinoonsisteem (39) die bensofenoon (40) lewer. Sterigmatosistien ($13, R_1 = R_2 = H$) kan nou gevorm word deur intramolekulêre oksidatiewe koppeling,⁷⁹ dekarboksilasie van die gevormde β -ketosuur (41), verwydering van die hidroksigroepe deur selektiewe reduksie en dehidrasie en metilasie (bv. deur metionien). Alternatiewe skemas wat verskil in die volgorde waarin die verskillende stappe plaasvind kan ook voorgestel word.

⁷⁹ 'n Nuwe sintese van xantone behels intramolekulêre fenol koppeling van hidroksibensofenone.⁷⁹ Die werk van Franck en sy medewerkers⁸⁰ met isotoop gemerkte voorstowwe het bewys dat die ergotpigmente deur 'n soortgelyke intramolekulêre oksidatiewe koppeling ontstaan.

Buchi en sy medewerkers⁸¹ het onlangs die inkorporasie van isotoop-gemerkte asynsuur in aflatoksin B₁ ondersoek. Hulle resultate ondersteun die teorie dat aflatoksin B₁ ontstaan deur oksidatiewe verandering van versikolorien A of 'n nou verwante antrakinoon. Dit is egter nodig om aan te neem dat versikolorien A van 'n C₁₈-poliketied en nie van 'n C₂₀-poliketied afkomstig is nie, dit wil sê averufien en versikolorien A het nie 'n gemeenskaplike voorloper nie. Volgens die skema wat Buchi en sy medewerkers voorstel, ontstaan versikolorien A deur oksidatiewe verandering van 'n polihidroksinaftaleen wat deur 'n Claisen kondensasie van die C₁₈ poliketied verkry word.

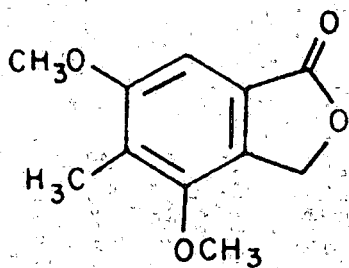
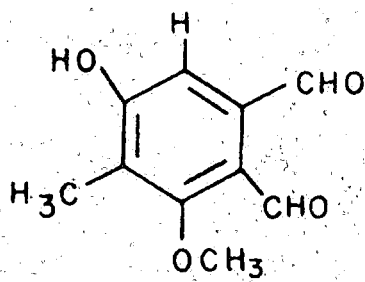
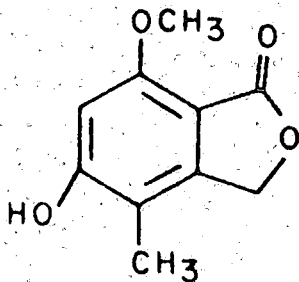
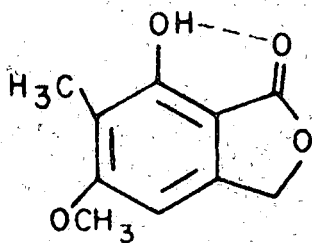
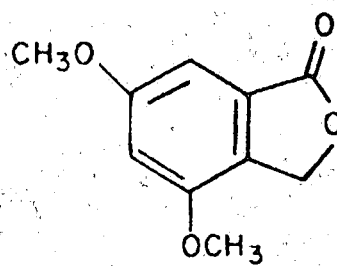
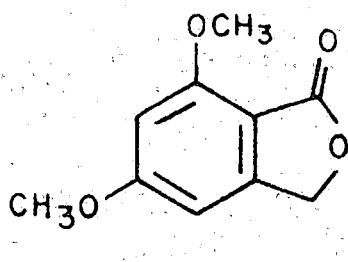
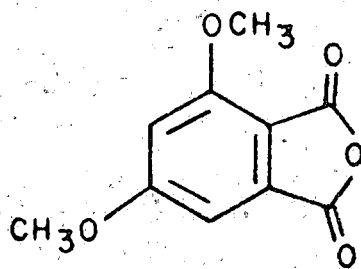
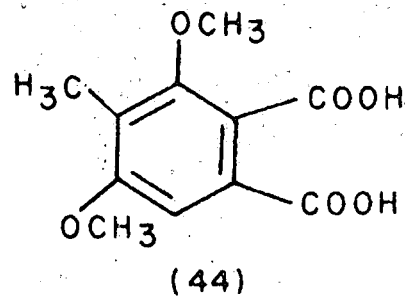
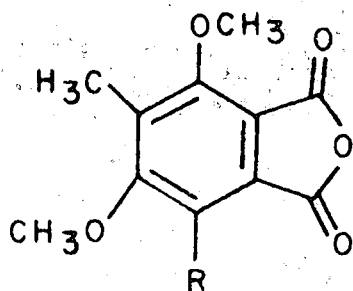
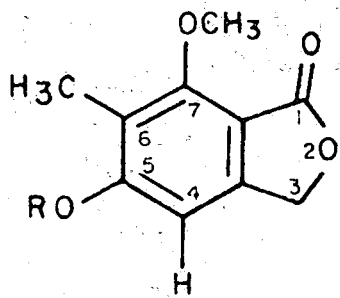
Holker en Underwood⁸² het voorgestel dat aflatoksin B₁ moontlik vanaf sterigmatosistien deur oksidatiewe splyting van ring A, gevolg deur herkondensasie en dekarboksilasie gevorm kan word. Burkhardt en Forgacs⁸³ het onlangs O-metielsterigmatosistien (13, R₁ = CH₃, R₂ = H) uit 'n aflatoksin B₁-produserende stam van Aspergillus flavus geïsoleer. Aspertoksin⁸⁴ (13, R₁ = H, R₂ = OH) is ook uit 'n A. flavus stam geïsoleer.



(13)

3 NIDULOL

3.1 Isolasie en struktuurbevestiging.- Saam met die hidroksiantrakinoon is 'n nuwe metaboliet waaraan die triviale naam, nidulol toegeken is, uit A.



nidulans geïsoleer.

Nidulol (42 R = H), $C_{10}H_{10}O_4$, is 'n opties onaktiewe fenol wat in waterige kaliumkarbonaat oplosbaar is. Die infrarooispektrum toon hidroksiel- (3560 cm^{-1}) en karbonielabsorpsie (1746 cm^{-1}) bande. Laasgenoemde kan aan 'n ftalied⁸⁵ toegeskryf word. Die ultravioletspektrum met maksima by 216, 261 en 290 m μ stem baie goed ooreen met die van 5,7-dimetoksiftalied.⁸⁶

Metilasië met diasmetaan of metieljodied en silweroksied lewer 'n O-metiel-derivaat, $C_{11}H_{12}O_4$, (1,2 R + CH_3) waarvan die ultravioletspektrum byna identies aan die van nidulol is, maar geen hidroksielabsorpsie kom in die infrarooispektrum voor nie. Die kernmagnetiese resonansspektrum van die O-metielnidulol toon twee aromtiese metoksigrøepe (τ 5.93 en 6.08), 'n aromtiese C-metielgroep (τ 7.83), 'n aromtiese proton as 'n singlet (τ 3.33) en twee ekwivalente protone by τ 4.80 wat aan die $-CH_2-$ groepering in (Ar - CH_2 - O - CO -) toegeskryf is.⁸⁷ Al die suurstoffunksies is dus verklaar.

Dit is onomstootlik bewys dat (42, R = CH_3) wel 'n ftalied is en wel as volg: Die verbinding is met natriumhidroksied gehidroliseer en die hidrolisaat met kaliumpermanganaat geoksideer. Die gevormde suur is, na aansuring van die reaksiedium met swaelsuur, geïsoleer. Hierdie produk is met asynsuur anhidried verhit ten einde dit na die ftaalanhidried (43a), $C_{11}H_{10}O_5$, om te skakel. Die hidroksimetielgroep van die hidrolisaat is dus vinnig en selektief geoksideer. Direkte oksidasie van die ftalied (42, R = CH_3) met alkaliese kaliumpermanganaat was stadig en nie-selektief. Dieselfde ftaalanhidried (43a) is na direkte oksidasie van die ftalied (42, R = CH_3) met chromtrioksied in asynsuur verkry. Die infrarooispektrum van die ftaalanhidried (43a) toon karbonielabsorpsie by 1770 en 1840 cm^{-1} . Dit is tipies van 'n ftaalanhidriedsisteem.⁸⁸ Die beëindiging van bogenoemde oksidasie met

gekonsentreerde soutsuur in plaas van swaelsuur het 'n chlorosuur, wat na die chloroanhidried (43b) omgeskakel kon word, gelewer. Die kernmagnetiese resonansspektrum van (43b) bevestig dat die aromtiese sisteem volledig gesubstitueer is. Die reaksie tussen kaliumpermanganaat en soutsuur lewer chloor wat dan die intermediêre disuur (44) kan chlorineer om die chlorosuur te vorm.

'n Studie van die oplosmiddel effekte in die kernmagnetiese resonansspektra van (42, R = CH₃) en (43a) het aansienlik lig gewerp op die posisie van die substituent in die aromtiese kern van die ftalied. Oplosmiddelverskuiwings van ketone in benseen relatief tot deuteriochloroform is alreeds intensief bestudeer.⁸⁹ Alle substituent agter 'n verwysingsvlak, deur die karbonielgroep, word beskerm en die voor die verwysingsvlak word ontskerm. Soortgelyke resultate is vir karboksiesuur-anhidriede en laktone bekend.^{90,91} Die positiewe oplosmiddelverskuiwing van die metileengroep in (42, R = H) (Tabel V) is dus in ooreenstemming met die verskuiwings wat met die karboniel-funksie geassosieer word.

T a b e l V

| Verbinding | Substituent | Chemiese verskuiwing τ | |
|------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| | | in CDCl ₃ | in C ₆ H ₆ |
| 43 R = CH ₃ | ArCH ₃ | 7.83 | 7.87 |
| | - O - CH ₃ | 5.93, 6.08 | 6.13, 6.83 |
| | Ar CH ₂ COO | 4.80 | 5.63 |
| | ArH | 3.33 | - |
| 44a | ArCH ₃ | 7.80 | 8.02 |
| | OCH ₃ | 5.83, 6.02 | 6.21, 6.92 |
| | ArH | 2.82 | - |

'n Sterk bewys vir die onsimmetriese rangskikking van die metoksigroepe in die anhidried (43a) is gevind in die merkbaar, verskillende oplosmiddelverskuiwing wat hulle ondervind het. Hierdie metoksigroepe moet dus geplaas word soos in (45) en die in O-metielnidulol soos in (46) of (47). In aromatiëse verbindings toon alle metoksigroepe verskuiwings na hoër gebiede afgesien van die teenwoordigheid of afwesigheid van naburige karbonielgroepe.⁹² Een van die metoksigroepe in O-metielnidulol toon egter 'n klein oplosmiddelverskuiwing. In kinone toon 'n metoksigroep orto ten opsigte van 'n karbonielgroep 'n heelwat kleiner oplosmiddelverskuiwing as die ander metoksigroepe.⁹² Dit is aan die effek van die peri-karbonielgroep, wat 'n negatiewe effek op die oplosmiddelverskuiwing het, te wyte. Dieselfde verskynsel tref ons aan by kumariene waar die metoksigroep peri ten opsigte van die karbonielgroep 'n klein verskuiwing ondervind terwyl die ander metoksigroepe 'n redelik groot (0.60 - 0.77 d.p.m.) positiewe verskuiwing ondervind.⁹³ Om die klein oplosmiddelverskuiwing, van een van die O-metielgroepe van O-metielnidulol, te verklaar is, na aanleiding van bogenoemde bewyse, een van die O-metielgroepe van O-metielnidulol tentatief orto ten opsigte van die karbonielgroep geplaas soos in (46). Ten einde hierdie afleiding te bewys is O-metielnidulol met aluminiumchloried in nitrobenseen behandel. Dit is een⁹⁴ van die metodes^{95,96} waarmee 'n metoksigroep, wat orto ten opsigte van 'n karbonielgroep geplaas is, gedemiteleer kan word. Die produk (48) $C_{10}H_{10}O_4$ is 'n isomeer van nidulol en gee 'n intense groen kleur by behandeling met ferrichloried. Die karbonielgroep van (48) absorbeer by 1729 cm^{-1} in die infrarooigebied in teenstelling van die van nidulol wat by 1750 cm^{-1} absorbeer. Dit is 'n duidelike bewys van waterstofbinding by (48).⁸⁵ In die kernmagnetiese resonansspektrum van (48) verskyn 'n skerp eenproton sein by τ 2.29. Hierdie sein verdwyn na behandeling met deuteriumoksied.

Hierdie sein en die infrarooi-absorpsie by 3450 cm^{-1} is te wyte aan 'n waterstofgebinde hidroksielgroep. Die hoof elektronoordragband toon 'n klein opwaartse verskuiwing in alkali (259 na 265 μ) terwyl die langgolfabsorpsie (tweede elektronoordragband) 'n sterk opwaartse verskuiwing toon (293 na 328 μ). Dit is wat mens vir 'n o-hidroksi-arofielstruktuur⁹⁷ verwag.

Op grond van die voorafgaande resultate kan struktuur (42, R = CH_3) of (49) aan O-metielnidulol toegeken word. Die sterk lae veld verskuiwing van die aromatiese proton (0.51 d.p.m.) in die ftaalanhidried (43a) in vergelyking met die van O-metielnidulol bewys⁵⁹ dat die proton orto ten opsigte van die nuwe karbonielgroep in (43a) moet wees. O-metielnidulol het dus die struktuur (42, R = H). Hierdie afleiding word verder ondersteun deur die feit dat O-metielnidulol en die ooreenstemmende ftaalanhidried se smeltpunte identies is aan die van die verbindings (42, R = CH_3) en (43a) respektiewelik. Laasgenoemde twee verbindings is deur Birkinshaw en sy medewerkers^{98,99} gesintetiseer.

Bogenoemde resultate bewys ook struktuur (42, R = H) vir nidulol. Die negatiewe ferrichloried toets en die normale ftaliedkarbonielabsorpsie kan ook nou maklik verklaar word aangesien die vry hidroksielgroep nie orto ten opsigte van die karbonielgroep geleë is nie. 4-Hidroksiftalied¹⁰⁰ gee 'n negatiewe ferrichloried toets en 7-hidroksiftalied¹⁰¹ gee 'n intense perskleur met ferrichloried. Die hoof elektronoordragband van nidulol toon 'n groot opwaartse verskuiwing (261 na 302 μ) in alkali soos van 'n p-hidroksi-arofiel struktuur verwag kan word. 'n Alkaliese oplossing van nidulol is met chloroform gerefluks om 'n o-hidroksialdehydderivaat te vorm. Hierdie derivaat kan aangetoon word deur dit na die aldasiën om te skakel.¹⁰² Die positiewe reaksie van nidulol met natriumkobaltinitriet lewer verdere getuienis dat nidulol 'n fenol met 'n vry orto posisie¹⁰² is.

Birkinshaw en sy medewerkers⁹⁹ het beweer dat hulle 'n produk met struktuur (42, R = H) berei het deur 'n sinkstofreduksie van die Doevre oksidasieproduk ('n aldehied suur) van quadrilineatien (50). Hulle rapporteer 'n smeltpunt van 198°C terwyl nidulol by 234°C smelt. Dit is baie onwaarskynlik dat die Doevre reagens (alkaliese merkurichloried in kaliumjodied oplossing) die aldehied groep in posisie 2 selektief sal oksideer. Die produk met smeltpunt 198°C kan dus bestaan uit 'n mengsel van die isomere (42, R = H) en 51, R = H). Birkinshaw en sy medewerkers¹⁰⁰ het geen bewys vir die suiwerheid van hierdie produk gelewer nie. 'n Monster vir direkte vergelyking met nidulol was ongelukkig nie beskikbaar nie.

Daar is al verskeie ftaliede uit skimmels geïsoleer^{84,103,104} maar behalwe nidulol is daar nog net een ftalied naamlik (51, R = H) uit 'n spesie van die A. nidulans groep geïsoleer en wel deur Birkinshaw en sy medewerkers¹⁰⁰ uit A. quadrilineatus Thom en Raper.

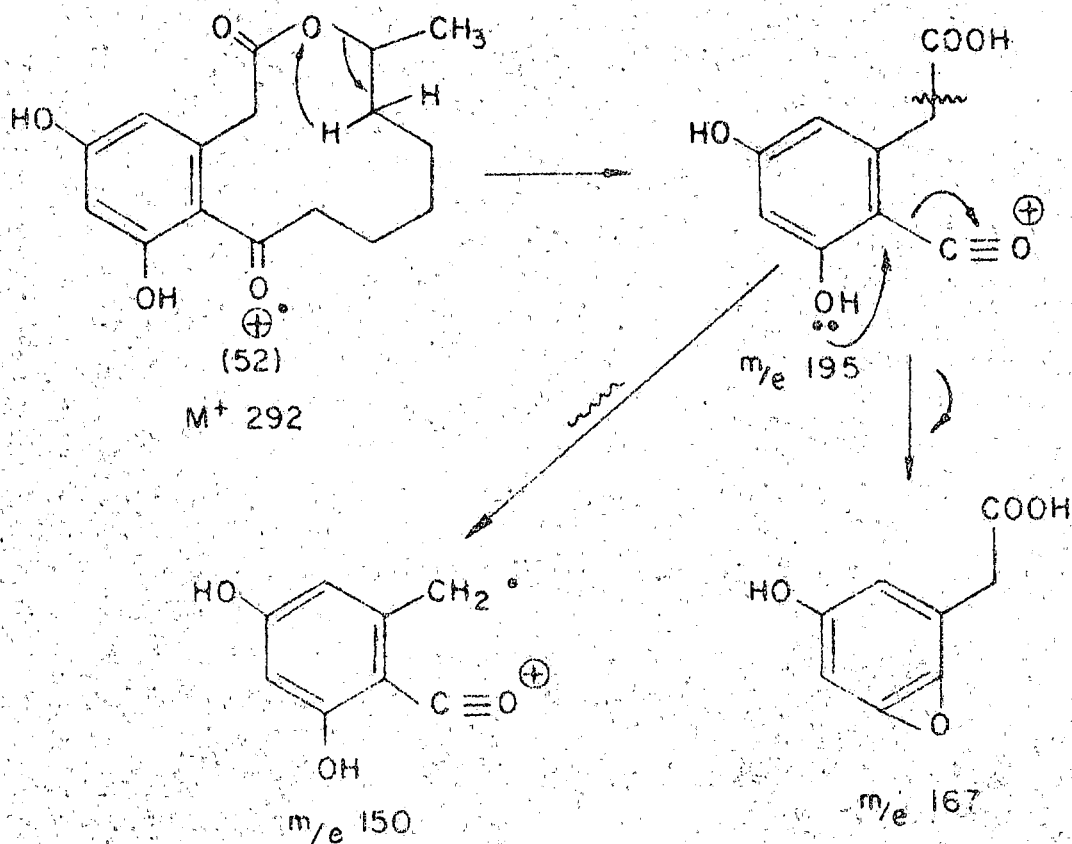
'n Verbinding ($C_{11}H_{12}O_4$) met dieselfde smeltpunt as die O-metielderivaat van (51, R = H) is na die metilasie van nidulol uit die moederloog geïsoleer. Die kernmagnetiese resonans spektrum toon absorpsies by τ 7.80 ($ArCH_{\equiv 3}$) τ 6.12 (twee aromatiese OCH_3 groepe) τ 4.63 ($Ar-CH_{\equiv 2}-O-CO$) en τ 2.92 (ArH_{\equiv}). Dit is in ooreenstemming met struktuur (51 R = CH_3).

4 KURVULARIEN

4.1 Isolasie en identifikasie

'n Fenoliese metaboliet, $C_{16}H_{20}O_5$, is uit Bipolaris sp. geïsoleer. Die fisiese konstantes (smeltpunt, ultraviolet- en infrarooispektrum) het goed ooreengestem met die wat vir kurvularien aangegee is.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ Kurvularien is 'n bekende metaboliet van Curvularia Siddiqui sp. novo, en Penicillium Steckii Zaleski.

Die fragmentasie van die verbinding het duidelik op struktuur (52) gedui. Die ontstaan van die vernaamste fragmente kan as volg uiteengesit word:



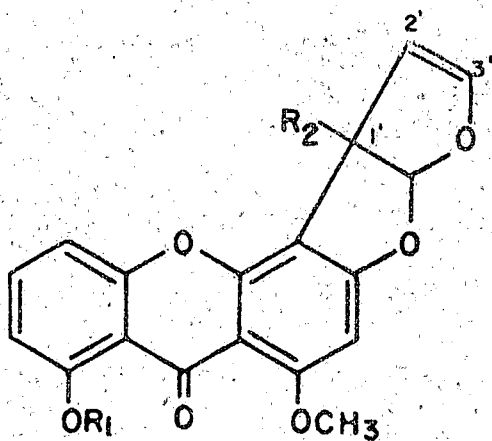
Metilasie van die metaboliet met metieljodied en silweroksied lewer 'n di-O-metielderivaat wat in alle opsigte identies aan 'n egte monster van O-metielkurvularien is.

5. POGINGS OM STERIGMATOSISTIEN CHEMIES TE HIDROKSILEER

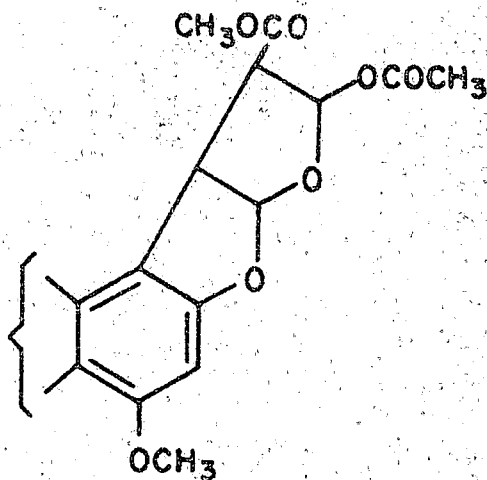
Aflatoksien B_1 (7a) en B_2 (8a) word in die lewer van proefdiere geoksideer na aflatoksien M_1 (7b) en M_2 (8b) respektiewelik,²⁰ wat dan in die melk en urine uitgeskei word. Aangesien 'n groot gedeelte van die aflatoksien B_1 molekule ook in die sterigmatosistienmolekule voorkom, bestaan die

moontlikheid dat dit ook op 'n soortgelyke manier in die lewer gehidroksi-
leer sal word. Bloed, melk en urine is komplekse mengsels en die ge-
hidroksileerde sterigmatosistien sal alleen aangetoon kan word deur
chromatografiese vergelyking met 'n egte monster.

Pogings is aangewend om die hidrokstierigmatosistien (13 , $R_1 = H$,
 $R_2 = OH$) chemies te berei. Die 1' posisie van sterigmatosistien is
allilies ten opsigte van beide die olefiniese dubbelbinding en die
aromatiese sisteem. Die posisie behoort dus maklik geasetoksileer te word
deur behandeling met loodtetra-asetaat.¹⁰⁸ Aangesien die loodtetra-
asetaat ook die fenoliese hidroksielgroep sou aanval is sterigmatosistien-
monobensoaat met loodtetra-asetaat behandel. Die enigste produkte van
hierdie reaksie was die asetate (53) en (54). Hierdie strukture is gegrond
op hul k.m.r. gegewens.



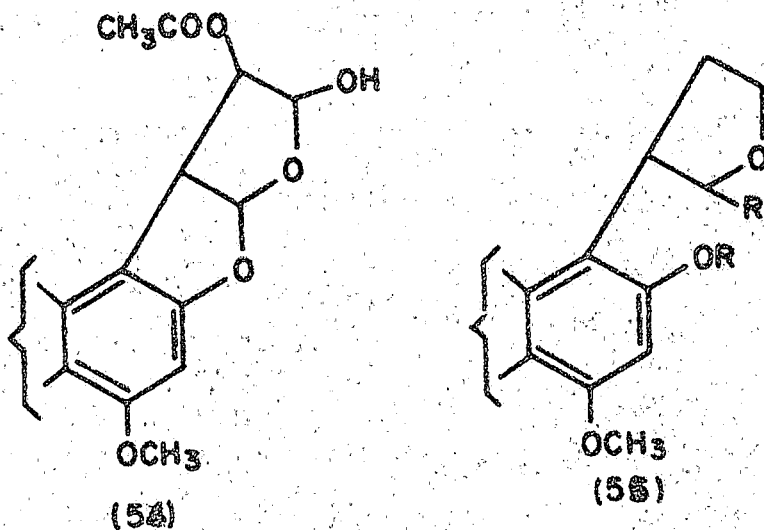
(13)



(53)

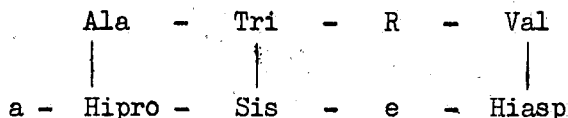
Die reaksie van loodtetra-asetaat met O-metiel-dihydrosterigmatosistien is hierna ondersoek. Die stof was egter volkome stabiel teenoor die loodtetra-asetaat onder 'n verskeidenheid van reaksie kondisies onder andere in die teenwoordigheid van bensofelperoksied. Met borontrifluoried as katalis was demetilasie van die O-metielgroep die enigste reaksie.

Die presiese meganisme waarvolgens die asetoksilasie van 'n alliliese posisie met loodtetra-asetaat plaasvind is nie met sekerheid bekend nie.¹⁰⁹ Daar bestaan 'n sterk moontlikheid dat die reaksie oor 'n radikaal tussenstap gaan. In die geval van sterigmatosistien en dihydrosterigmatosistien sal die radikaal op posisie 1' nie maklik gestabiliseer kan word nie, aangesien die resonanstoestande 'n baie gespanne ringsisteem tot gevolg sal hê.



As hierdie argumente korrek is behoort asetoksilasie plaas te vind in 'n verbinding waar een van die furan ringe oop is soos in (55).

So'n verbinding is berei deur dihydrosterigmatosistien met metanoliese kaliumhidroksied te reflux. Die produk (55 R = OCH₃, R' = H) is deur middel van sy k.m.r. spektrum geïdentifiseer. Die reaksie van (55, R = OCH₃, R' = H) met loodtetra-asetaat word tans ondersoek.

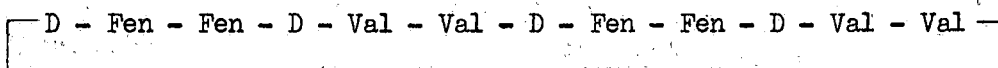


R = e - Dihileu = fallofdien

* e - Hileu = fallofen

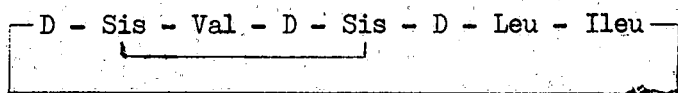
(58)

Daar is nog net 'n paar sikliese polipeptiede uit mikroskopiese fungi geïsoleer. Fungisporien ¹¹⁹ (59) is 'n onaktiewe metaboliet wat uit die spore van Penicillium en Aspergillus spesies geïsoleer is.



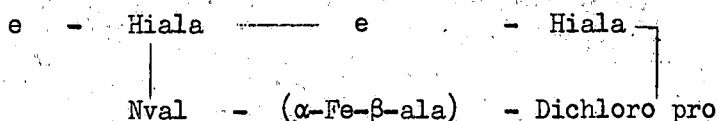
(59)

Die sikliese peptied uit Aspergillus niger, ¹²⁰ malformien (60) is verantwoordelik vir die misvorming van boontjies, maar is andersins biologies onaktief.



(60)

Die chloorbevattende sikliese peptied, islanditoksien (61) ¹²¹ wat uit Penicillium islandicum Sopp. geïsoleer is, is die enigste bekende giftige sikliese polipeptied wat tot dusver uit mikroskopiese fungi geïsoleer is.



(61)

Asperkolorien is dus een van 'n klein aantal sikliese polipeptiede van skimmeloorsprong en is nog verder belangrik in die opsig dat dit die kleinste bekende sikliesepolipeptied van natuurlike oorsprong is. Alle ander

sikliese tetrapeptiede is van sintetiese oorsprong.¹²²⁻¹²⁴ Een van die aminosuurkomponente van asperkolorien, 5-metoksiantranielsuur, word nie normaalweg as 'n aminosuur beskou nie. 5-Hidroksiantranielsuur is wel 'n normale tussenstap in die hidrositriptofaan metabolisme en het 'n antigewas werking.¹²⁵

Die huidige vordering in die kennis van die genetiese kode en die meganisme van proteïenbiosintese het die studie van die biogenese van verskillende polipeptiede gestimuleer. Die biosintese van gramisidien S uit Bacillus brevis¹²² en malformien uit Aspergillus niger¹²² is reeds intensief ondersoek. Daar is aanduidings dat die biosintese van hierdie klein sikliese polipeptiede verskil van dié van proteïene.¹²⁶ Asperkolorien is 'n eenvoudiger sikliese peptied as die wat hierbo genoem is en dit sal om hierdie rede nuttig wees vir biogenetiese studies.

2. ISOLASIE VAN ASPERKOLORIEN

Aspergillus versicolor, stam M716, is soos in die eerste hoofstuk beskryf, met 'n chloroform-metanol mengsel geëkstraheer. Die ekstrak is in suur-, fenoliese- en neutrale fraksies verdeel. Nadat alle sterigmatosistien deur chromatografie oor formamiedgeïmpregneerde sellulose of verdeling tussen heksaan (sterigmatosistien) en vyf-en-negentig persent waterige metanol verwyder is, het die neutrale nes 'n groeivertragende effek op eendekuikens getoon.

Chromatografie oor silikagel het gelei tot die isolasie van 'n blou fluoresserende komponent wat vir die groeivertragende effek verantwoordelik was.

3 STRUKTUURBEPALING VAN ASPERKOLORIEN

3.1 Identifikasie van die aminosuurkomponente

Asperkolien is 'n wit kristallyne stof, smeltpunt 158°C , met molekulêre formule $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5$. Die ultravioletspektrum (λ_{maks} 226, 260 en $315 \text{ m}\mu$) het aangetoon dat 'n aromtiese chromofoor waarskynlik in die molekule teenwoordig is. Hierdie afleiding is bevestig deur die k.m.r. spektrum (Fig. 7) wat absorpsie vir aromtiese protone by τ 2.64 - 2.70 (vyf protone) τ 2.02 (eenproton doeblet, J 10 Hz), τ 3.22 (eenproton kwartet, J 3.6 en 10 Hz), τ 3.82 (eenproton doeblet, J 3.6 Hz) getoon het. Die teenwoordigheid van 'n aromtiese O-metielgroep is bewys deur die driepron sein by τ 6.46.

Daar was dus nog vier suurstof- en vier stikstofatome wat verantwoord moes word. Hierdie atome is tentatief aan vier amiedgroepe toegeken aangesien asperkolorien 'n neutrale stof is (onoplosbaar in waterige suur of basis) en die infrarooispektrum slegs amiedbande (ν_{maks} 1675 cm^{-1}) in die karbonielgebied getoon het.

Bogenoemde gegewens het aangedui dat asperkolorien moontlik 'n sikliese tetrapeptied is en die stof is met 6 N soutsuur gehidroliseer. Na hidrolise kon vier ninhidrienpositiese ¹²⁷⁻¹³¹ komponente deur papierchromatografie aangetoon word. (Sisteem I ¹²⁹ Butanol : water : asynsuur :: 4:5:1 R_f 0.20, 0.28, 0.61 en 0.80. Sisteem II ¹³⁰ Kolluidien : lutidien :: 1:1, R_f 0.57, 0.50, 0.35, 0.30. Sisteem III ¹³¹ Fenol : water :: 8:3, R_f 0.86, 0.84, 0.82 en 0.48).

Vergelyking van die R_f waardes en kleurreaksies (met ninhidrien en Folin se reagens ¹²⁸) van hierdie komponente met die van bekende aminosure

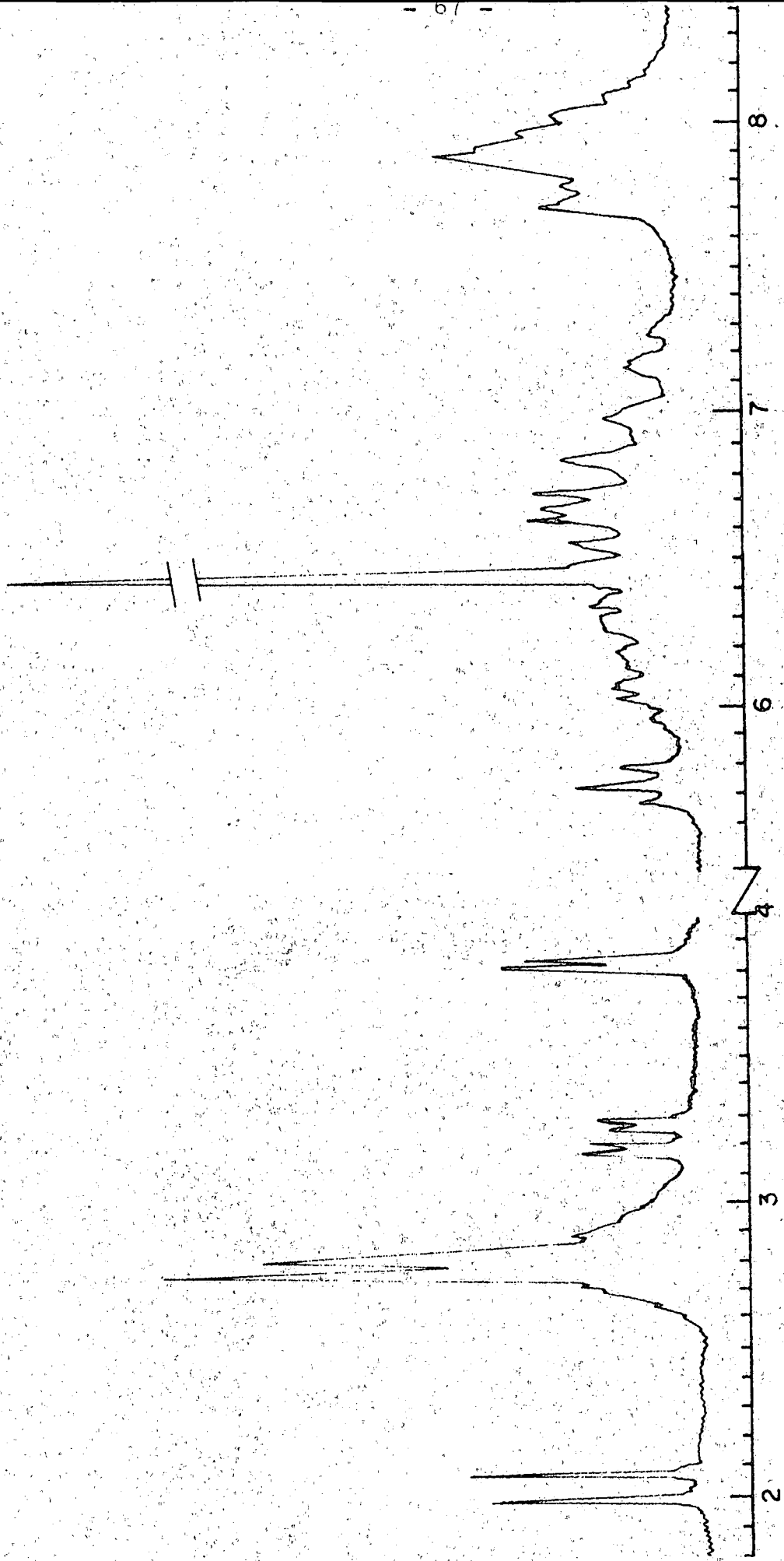
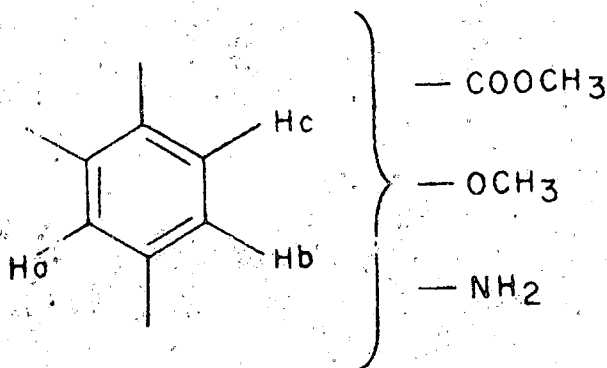


FIG 7

KMR SPEKTRUM VAN ASPERKOLORIEN

het aangedui dat fenielalanien (R_f 0.58, 0.60 en 0.86 in sisteme I, II en III respektiewelik) prolien (R_f 0.25, 0.40, 0.88) en β -alanien (R_f 0.21, 0.30 en 0.44) moontlik teenwoordig was. Hierdie afleiding is bevestig deur direkte papierchromatografiese vergelyking van die hidrolisaat met die genoemde aminosure, asook op grond van die chromatografiese gedrag van die aminsourkomponente op 'n ioonuitruilerharskolom^{132, 133} (Dowex AG 50 W X 8). Die vierde komponent van die hidrolisaat was 'n onbekende blou fluoresserende aminosuur.

Ten einde hierdie komponent te identifiseer is die hidrolise op groter skaal herhaal en die totale produk, na vriesdroging, gemetleer met absolute metanol en tioniolchloried.^{134, 135} Die metielesters is op 'n formamied geïmpregneerde papierchromatogram (1 : 1 benseen-heksaan as vloeibare fase) geskei. Die blou fluoresserende band (R_f 0.8) is uitgesny en met chloroform geëlueer en finaal deur dunlaagchromatografie oor silikagel (R_f 0.2, dichlorometaan) gesuiwer. Die blou fluoresserende kleurlose olie het stadig by 0° uit metanol/eter gekristalliseer. Akkurate massabepaling het aangetoon dat die stof 'n molekulêre formule van $C_9H_{11}NO_3$ het. Die u.v. spektrum van die ester (λ_{maks} 212, 220 (sk.), 258, 296 en 354 μ) het die aromatiese karakter van die stof aangedui. Die k.m.r. spektrum het die teenwoordigheid van 'n metielester en 'n aromatiese O-metielgroep (drieproton seine by τ 6.12 en 6.28) asook drie aromatiese protone aangedui. Van die koppelingspatroon was dit duidelik dat die aromatiese protone soos in (62) gerangskik moet wees.



(62)

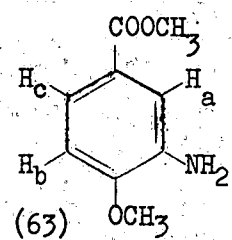
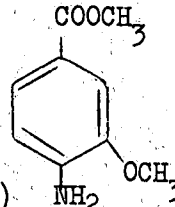
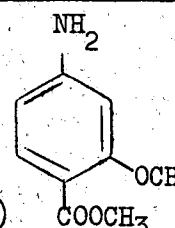
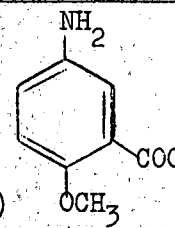
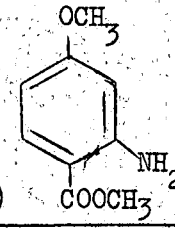
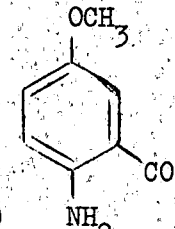
Proton H_a (τ 2.65) toon slegs metakoppeling (doeblet, J 3.6 Hz); H_b (τ 3.06) toon orto- sowel as metakoppeling (kwartet, J 3.6 en 10 Hz); H_c (τ 3.40) toon slegs ortokoppeling (doeblet, J 10 Hz). Dit was dus duidelik dat daar, op hierdie stadium, ses moontlike strukture (63 - 68 in Tabel VI) vir die onbekende aminosuurester was. Verskillende fisiese tegnieke is toegepas in 'n poging om die regte isomeer aan te dui.

In 'n bensoësuurester het die aard en posisie van verskillende substituentte 'n invloed op die absorpsiemaksima in die u.v. spektrum.¹³⁶ Dit is veral merkbaar in die posisie van die hoof elektronoordragband wat, in die geval van bensoësuur, by 230 $m\mu$ aangetref word. Om die posisie van die absorpsieraksima van gesubstitueerde bensoësuuresters teoreties te bepaal, word die waardes vir die substituentte, soos vanuit Tabel VII verkry, by die absorpsieposisie van bensoësuur (230 $m\mu$) getel. Die waardes wat verkry word, is gewoonlik binne vyf persent van die eksperimentele waardes.

T a b e l VII
Bydraes van substituentte tot die posisie
van die hoofelektronoordrag band

| Substituentte | S _{orto} | S _{meta} | S _{para} |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| - OCH ₃ | 7 | 7 | 25 |
| - NH ₂ | 13 | 13 | 58 |

Tabel VI

| Struktuur | τ waardes | | | | | | λ _{maks} (mμ) | |
|---|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|------------------------|--------|
| | H _a | | H _b | | H _c | | Be- reken | Gevind |
| | Be- reken | Gevind | Be- reken | Gevind | Be- reken | Gevind | | |
|  <p>(63)</p> | 2.55 | | 3.05 | | 2.55 | | 268 | |
|  <p>(64)</p> | 2.50 | 2.58 | 3.10 | 3.40 | 2.45 | 2.50 | 295 | 299 |
|  <p>(65)</p> | 3.45 | 3.95 | 2.15 | 2.26 | 3.40 | 3.86 | 295 | 300 |
|  <p>(66)</p> | 2.55 | 2.85 | 3.05 | 3.10 | 3.15 | 3.13 | 250 | 242 |
|  <p>(67)</p> | 3.45 | | 2.15 | | 3.45 | | 268 | |
|  <p>(68)</p> | 2.50 | 2.65 | 3.10 | 3.06 | 3.10 | 3.40 | 250 | 255 |

In Tabel VI is berekende waardes vir die verskillende moontlike isomere aangedui. Minstens vier van die berekende waardes lê binne vyf persent van die eksperimentele waarde (258 μ) vir die onbekende aminosuuremetielester en is dus as van min waarde vir die struktuuropklaring beskou.

'n Studie⁵⁹ van 'n groot aantal verbindings het getoon dat die chemiese verskuiwings-posisie van die aromatiese protone van eenvoudige aromatiese verbindings redelik akkuraat voorspel kan word. Verskillende substituentte het berekenbare beskermende- of ontskermende effekte op die aromatiese protone. Indien aangeneem word dat die bydraes van elke substituent additief is, kan die chemiese verskuiwings van die aromatiese protone in die ses isomere bereken word uit die waardes¹³⁶ wat in Tabel VIII aangegee word. Die berekende waardes vir die protone in die isomere is in Tabel VI aangegee.

T a b e l VIII

Substituent beskermings waardes
in d.p.m. vanaf benseen[#]

| Substituent | S _{orto} | S _{meta} | S _{para} |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| - O alkiel | 0.45 | 0.10 | 0.40 |
| - NH ₂ | 0.55 | 0.15 | 0.55 |
| - COOH (R) | -0.80 | -0.25 | -0.20 |

[#] 'n 10% Oplossing van benseen in CDCl₃ absorbeer by τ 2.70 en 'n negatiewe teken dui 'n verskuiwing na laerveld aan.

Die berekende waardes het in geen geval goed ooreengestem met die van die onbekende ester nie. Dit is duidelik dat die empiriese reëls nie sonder meer gebruik kan word vir die berekening van die chemiese verskuiwing van hooggesubstitueerde aromatiese verbindings nie. Hierdie gevolgtrekking is bevestig deur die eksperimentele bepaling van die chemiese verskuiwing

vir die isomere[#] (64), (65), (66). Die empiriese reëls kan egter wel gebruik word om die volgorde waarin die seine in die k.m.r. spektrum verskyn te voorspel. Hiervolgens moes die isomere (66) en (68) wel oorweeg word. Isomeer (66) was egter glad nie identies aan die onbekende aminosuurester nie. Op grond van bogenoemde argumente is struktuur (68) aan die onbekende ester toegeken. Die feit dat die onbekende ester in die massaspektrometer aanleiding gee tot 'n sterk $[M - CH_2OH]^+$ brokstuk het ook op 'n antranielsuurester struktuur gedui.¹³⁸⁻¹⁴¹ Die struktuur van die onbekende ester is finaal as (68) vasgelê deur direkte vergelyking (smeltpunt 33°C, mengsmeltpunt 33°C, infrarooi-, ultraviolet-, massa- en k.m.r.-spektra is vir alle praktiese doeleindes identies) met 'n egte monster wat sinteties berei is.

Die uitgangspunt vir die sintese^{142, 143} van (68) was 5-amino-2-nitrobensoësuur. Deur te reflux met kaliumhidroksied is 5-hidroksi-2-nitrobensoësuur verkry. Hierdie produk is gemetileer met dimetielsulfaat (in asetoon in die teenwoordigheid van kaliumkarbonaat) om 5-metoksi-2-nitrobensoësuurmetielester te verkry. Hierdie produk is ook verkry deur die metilisasie (diasometaan) van 5-metoksi-2-nitrobensoësuur wat as 'n neweproduk uit die nitrering¹³⁷ van m-metoksibensoësuur verkry is. Hidrogenasie van 5-metoksi-2-nitrobensoësuurmetielester oor Pd-C het die gesogte 5-metoksi-antranielsuurester gelewer.

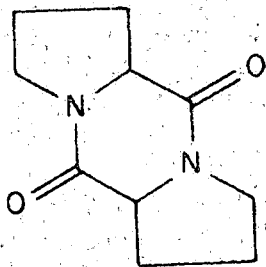
Asperkolorien bevat vier aminosure naamlik feniel-alanien, β-alanien, prolien en 5-metoksi-antranielsuur. Uit die molekulêre formule van asperkolorien, $C_{25}H_{28}N_4O_5$, is dit duidelik dat hierdie stof 'n sikliese tetra-

[#]Die isomere (65) en (66) was kommersieël beskikbaar en die isomeer (64) is berei volgens die voorskrif van Frölicher en Cohen¹³⁷ deur nitrering van O-metoksibensoësuur.

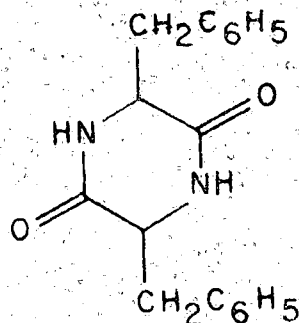
peptied moet wees. Die k.m.r. gegewens pas perfek hierby in. Behandeling van asperkolorien met deuteriometanol in die teenwoordigheid van trimetielamien het die verwagte teenwoordigheid van drie uitruilbare protone bevestig (massaspektrometrie).

3.2 Optiese aktiwiteit van die aminosuurkomponente

Die sirkulêre dichroïse spektrum van asperkolorien (Fig. 8) : $\Delta\epsilon$: 5.63 (225 m μ), 0 (228 m μ), -31.54 (245 m μ), -0.45 (282 m μ), -1.81 (314 m μ), 0 (345 m μ), 0.226 (356 m μ) en 0 (360 M μ) het getoon dat hierdie stof opties aktief is. Een of beide van die aminosuurkomponente, feniellalanien en prolien, was dus opties aktief.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ Pogings is aangewend om die opties aktiewe metielesters van hierdie aminosure uit die gemetileerde hidrolisaat van asperkolorien te isoleer. Die produkte wat wel geïsoleer is, was nie die gesogte metielesters nie, maar wel die ooreenkomstige diketopiperasiene (69) en (70).

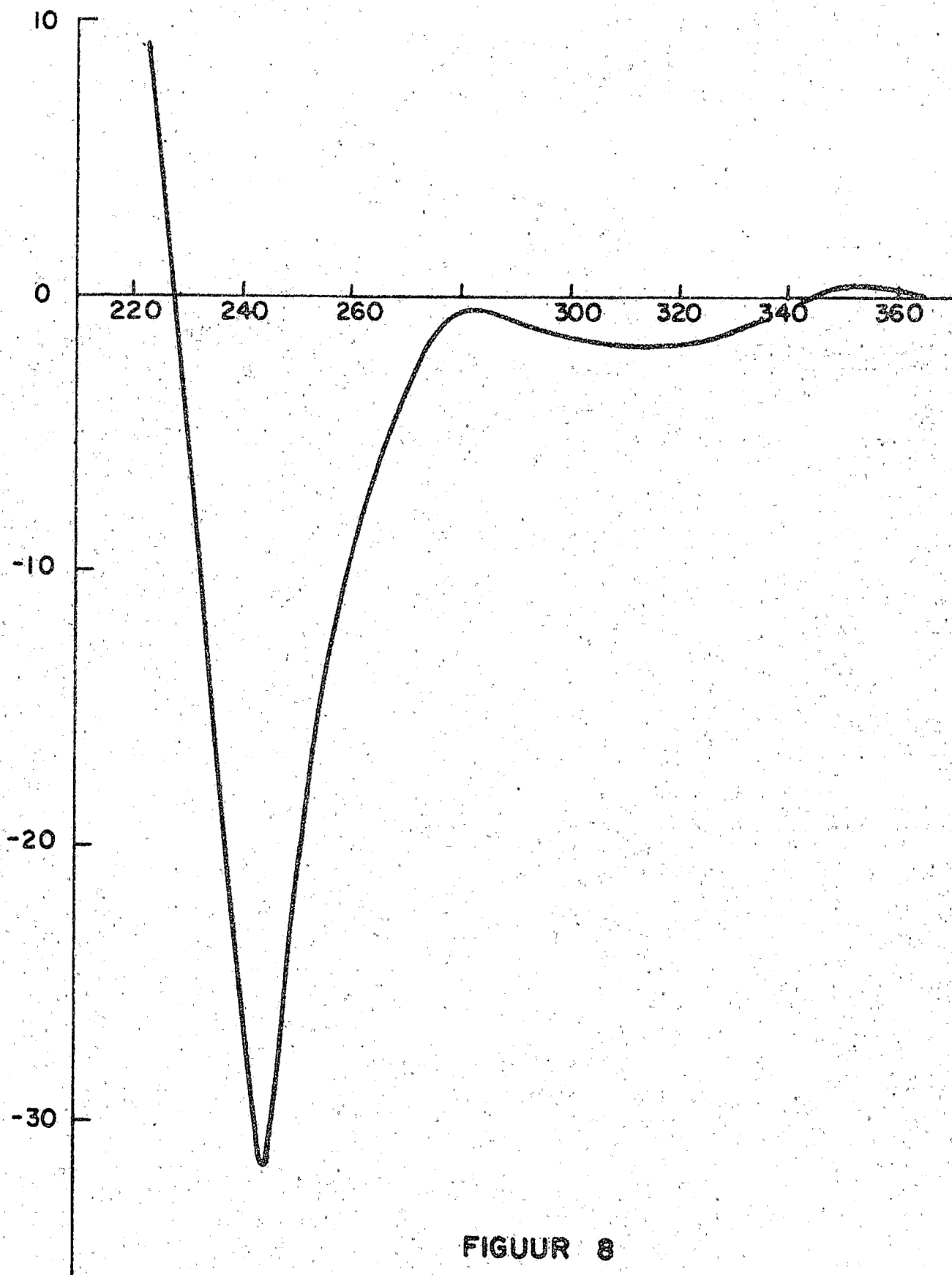


(69)



(70)

Hierdie diketopiperasiene het ontstaan deur kondensasie van die eenvoudige metielesters van die ooreenkomstige aminosure gedurende die isolasieprosedure. Eksperimente met L-prolien- en L-feniellalanienmetielesters



FIGUUR 8

S. d. spektrum van asperkolorien

het getoon dat dit selfs by kamertemperatuur betreklik vinnig na die diketopiperasiene omskakel. Die o.r.d. spektra van die diketopiperasiene (69) en (70) was feitlik identies (sterk negatiewe rotasie by lae golflengte) aan die van die diketopiperasiene^{148, 149} afkomstig van L-prolienmetielester en L-fenielalanienmetielester. Dit is dus duidelik dat beide die prolien- en fenielalanienkomponente van asperkolorien die L-konfigurasië het.

3.3

Aminosuurvolgorde van
asperkolorien

Asperkolorien is 'n sikliese tetrapeptied wat vier aminosure nl. fenielalanien, β -alanien, prolien en 5-metoksiantraniëlsuur, as boustone bevat. Ses strukture met verskillende aminosuurvolgordes kan vir asperkolorien voorgestel word. Selektiewe hidrolise na tri- en dipeptiedbrokstukke is die enigste chemiese metode (behalwe sintese) waarmee tussen die strukture onderskei kan word. Hidrolises onder verskillende reaksiekondisies het slegs enkelaminosuurbrokstukke en uitgangsmateriaal gelewer. Asperkolorien word dus baie stadiger gehidroliseer as die opeketting vorm wat relatief vinnig afgebreek word. Dit is bekend dat pogings tot selektiewe hidrolise¹⁵⁰ van sikliese polipeptiede anders as normale polipeptiede, aanleiding gee tot allerlei newereaksies.

Uit 'n studie van die ses moontlike strukture was dit duidelik dat die k.m.r. data nie tussen hierdie moontlikhede kon onderskei nie. Die massaspektrum van asperkolorien (Fig. 9) behoort egter waardevolle inligting aangaande die struktuur te lewer.

Die massaspektra van asiëlpolipeptiedesters kan gebruik word om die aminosuurvolgorde in die peptiede te bepaal.¹⁵¹⁻¹⁵⁴ Die vernaamste brokstukke ontstaan¹⁵¹ deur 'n krakingsproses wat vanaf die C-terminaal

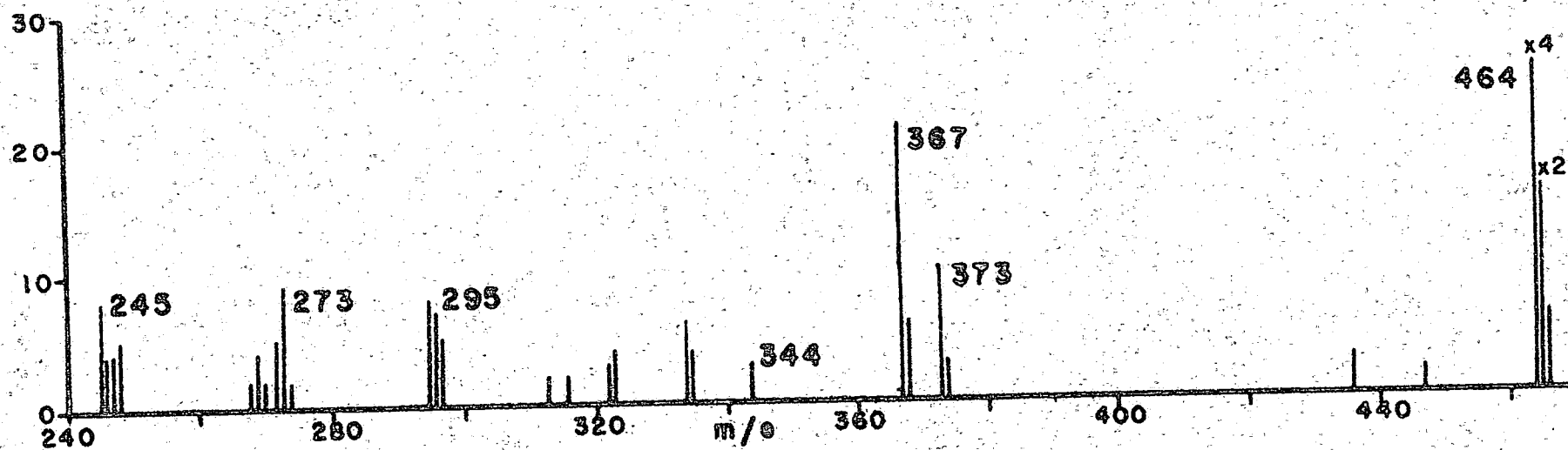
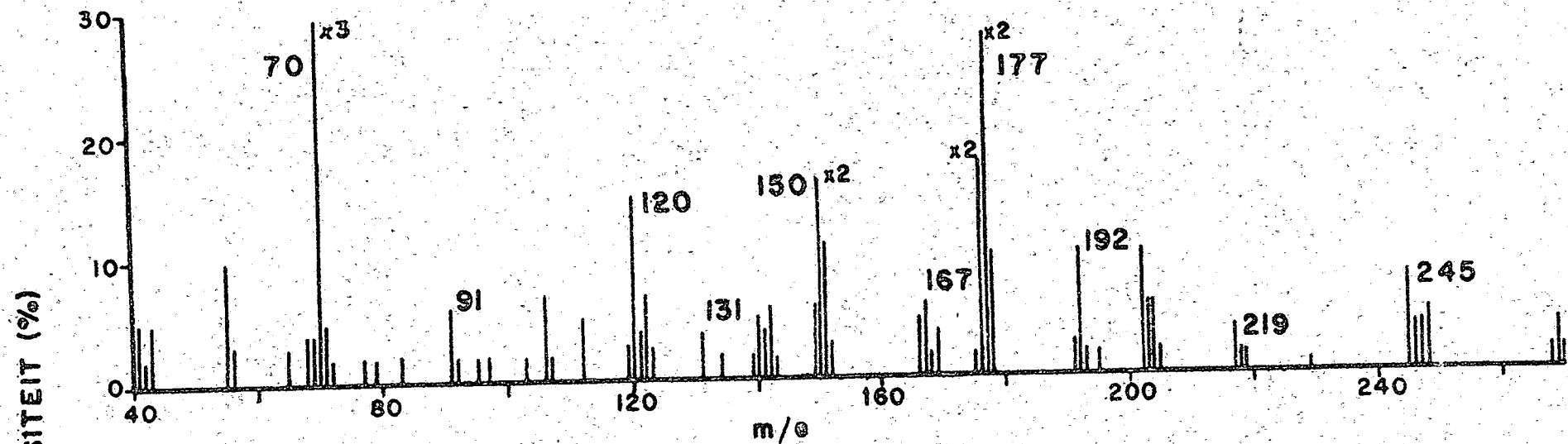
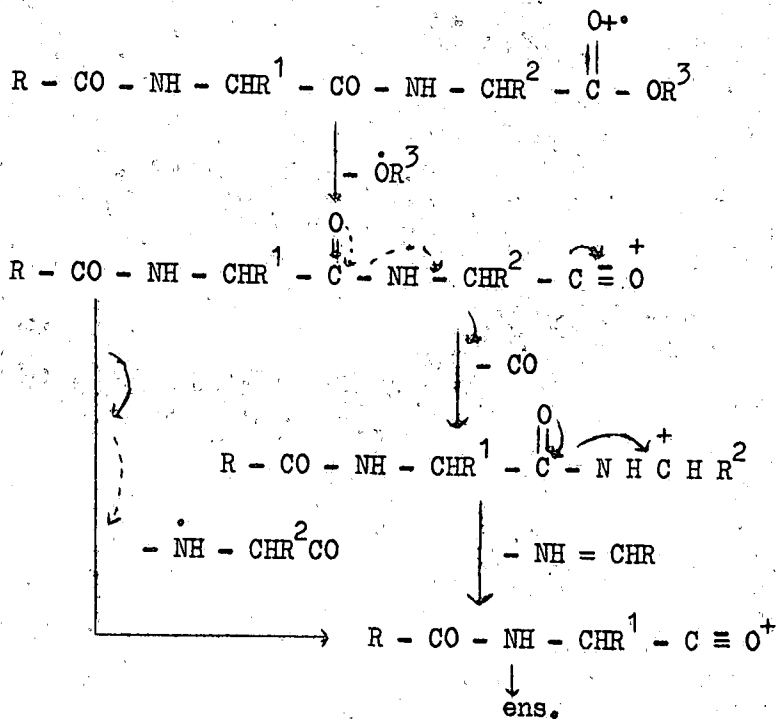


FIG. 8

MASSASPEKTRUM VAN ASPERKOLORIEN

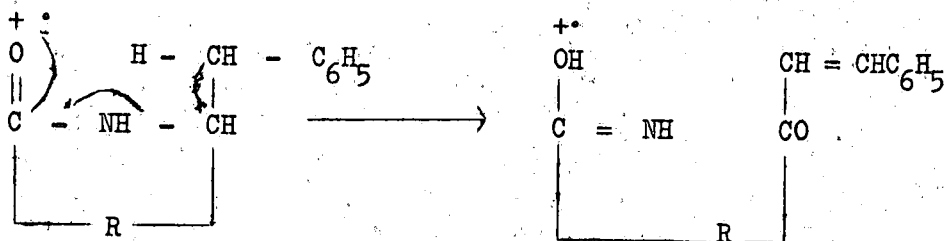
begin om 'n asiliumioon te vorm wat aminosuurbroksukke deur kraking van die amiedbindings verloor. (Skema 11).



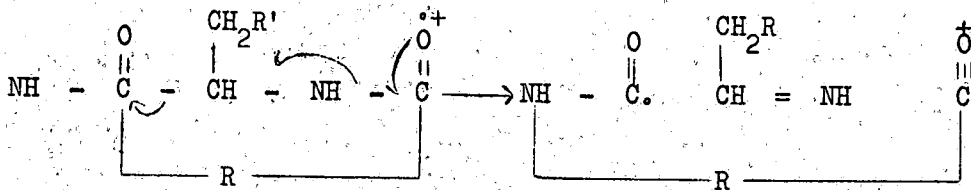
Skema 11

Daar is betreklik min bekend aangaande die krakingsmeganisme van sikliese polipeptiede. Die studies van Millard¹⁵⁵ en andere^{151, 156} dui daarop dat die vernaamste broksukke ontstaan nadat die ring oopgemaak is deur elektronbotsing. Verskillende meganismes vir die ringoopmaak is voorgestel nl.

- (i) by 'n feniellalaniënkomponeent vind ringoopmaak met 'n waterstof-oordrag plaas wat tot 'n oopketting ioon lei :



- (ii) deur verlies van 'n neutrale amienfragment (met of sonder waterstofoordrag) om 'n radikaalioon te gee. Hierdie kraking vind gewoonlik langs 'n groot aminosuursyketting plaas.



In teenstelling met die asiliumione, afkomstig vanaf die asielpeptiedesters, besit die opekettingione van sikliese polipeptiede beide ionenradikaalkarakter. Dit verklaar moontlik waarom waterstofoordrag so prominent by verdere krakingsprosesse van laasgenoemde is.

As bogenoemde reëls op al ses die moontlike strukture van asperkolorien toegepas word, kan in geen geval 'n krakingspatroon, wat perfek met die werklike massaspektrum ooreenstem, voorspel word nie. 'n Moontlike rede hiervoor is die teenwoordigheid van twee β -aminosure in asperkolorien. Al die sikliese polipeptiede wat voorheen ondersoek is, het slegs uit α -aminosure bestaan.

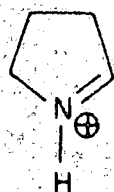
Die samestelling van 'n groot aantal brokstukke, wat met behulp van akkuratemasabepalings verkry is, het egter baie inligting aangaande die struktuur verskaf (Tabel IX).

Die strukture van die brokstukke met m/e 70, 91, 120, 131 en 150 word as (71), (72), (73), (74) en (75) voorgestel. Hierdie brokstukke is almal afkomstig van enkel aminosure.

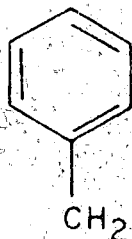
T a b e l. IX

Akkuratemassabepalings op
asperkolorienbrokstukke

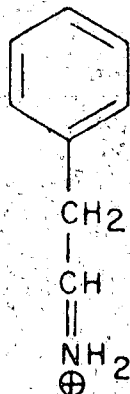
| Brokstuk | Samstelling | Akkurate massa | |
|----------|----------------------|----------------|---------|
| | | Bepaal | Bereken |
| 464 | $C_{25}H_{28}N_4O_5$ | 464.205 | 464.206 |
| 373 | $C_{18}H_{21}N_4O_5$ | 373.153 | 373.151 |
| 367 | $C_{20}H_{21}N_3O_4$ | 367.151 | 367.153 |
| 344 | $C_{17}H_{18}N_3O_5$ | 344.126 | 344.125 |
| 295 | $C_{17}H_{17}N_2O_3$ | 295.107 | 295.108 |
| 273 | $C_{16}H_{21}N_2O_2$ | 273.160 | 273.160 |
| 248 | $C_{12}H_{14}N_3O_3$ | 248.109 | 248.104 |
| 245 | $C_{13}H_{13}N_2O_3$ | 245.090 | 245.092 |
| 218 | $C_{12}H_{14}N_2O_2$ | 218.104 | 218.106 |
| 202 | $C_{12}H_{12}N_2O_2$ | 202.089 | 202.087 |
| 192 | $C_9H_8N_2O_3$ | 192.057 | 192.053 |
| 191 | $C_9H_7N_2O_3$ | 191.046 | 191.051 |
| 177 | $C_9H_9N_2O_2$ | 177.065 | 177.066 |
| 167 | $C_8H_{11}N_2O_2$ | 167.083 | 167.082 |
| 150 | $C_8H_8NO_2$ | 150.055 | 150.055 |
| 131 | C_9H_7O | 131.050 | 131.050 |
| 120 | $C_8H_{10}N$ | 120.081 | 120.081 |
| 91 | C_7H_7 | 91.056 | 91.055 |
| 70 | C_4H_8N | 70.065 | 70.066 |



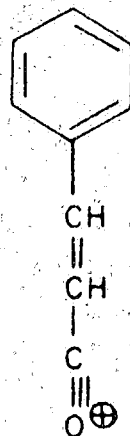
(71)



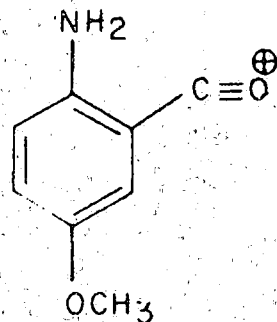
(72)



(73)

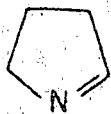


(74)

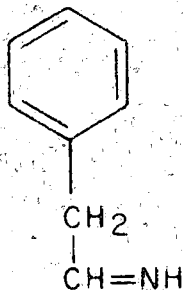


(75)

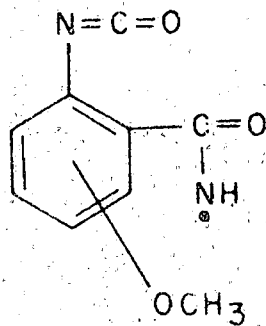
Die brokstuk met m/e 373 ontstaan deur die verlies van 'n bensielradikaal vanaf die fenielalaniengedeelte van die moederioon. Die tripeptiedbrokstuk met m/e 367 ontstaan deur verlies van die neutrale fragment (76) en CO vanaf die moederioon. Die tripeptiedbrokstuk met m/e 344 kan alleen verklaar word as aangeneem word dat die moederioon 'n neutrale brokstuk (77) verloor. Die samestelling van die brokstuk met m/e 273 toon dat dit waarskynlik ontstaan deur die verlies van die radikaal (78). Die brokstuk met m/e 248 ontstaan waarskynlik vanaf die $[M - 91]^+$ piek en bevat gedeeltes van β -alanien, fenielalanien en 5-metoksi-antranielsuur.



(76)



(77)



(78)

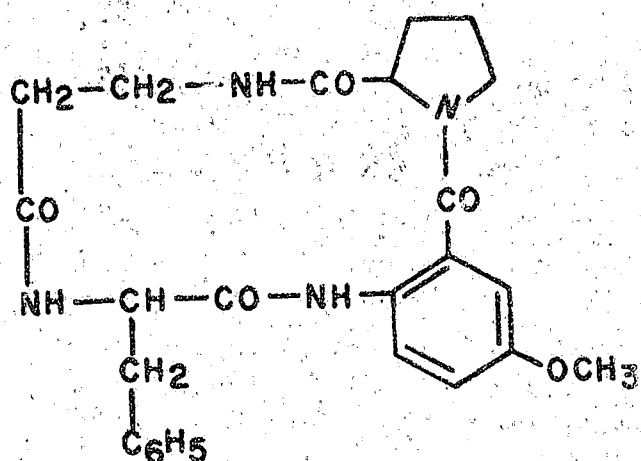
Die dipeptiedbrokstuk met m/e 167 kan slegs uit β -alanien en prolien gedeeltes bestaan, terwyl die met m/e 295 uit fenielalanien en 5-metoksi-antranielsuur moet bestaan. Die samestelling van die brokstuk met m/e 245 stem ooreen met die van 'n dipeptiedbrokstuk gevorm uit prolien- en 5-metoksiantranielsuurgedeeltes en die brokstukke met m/e 202 en 218 se samestelling toon dat dit uit fenielalanien en β -alanien gedeeltes bestaan.

Bogenoemde gegewens toon duidelik dat die moontlike strukture van asperkolorien nou tot (79) en (80) beperk moet word.

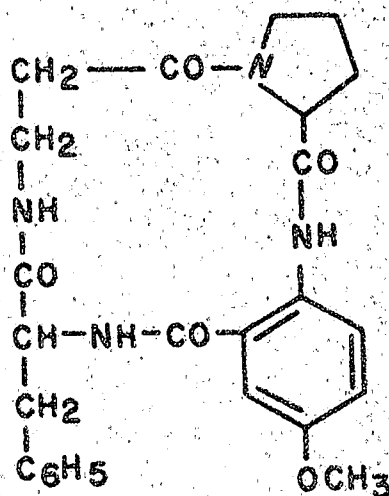
Die twee strukture (79) en (80) verskil slegs in die manier waarop die amiedbindings tussen die aminosuurkomponente gevorm is.

In skemas 12 - 14 word die krakingspatroon van (80) voorgestel. 'n Soortgelyke patroon kan vir (79) voorgestel word behalwe dat die pieke met m/e 177 en 192 slegs in terme van (80) verklaar kan word, alhoewel die betrokke krakingsmeganisme nie normaalweg in sikliese polipeptiede aange-tref word nie.

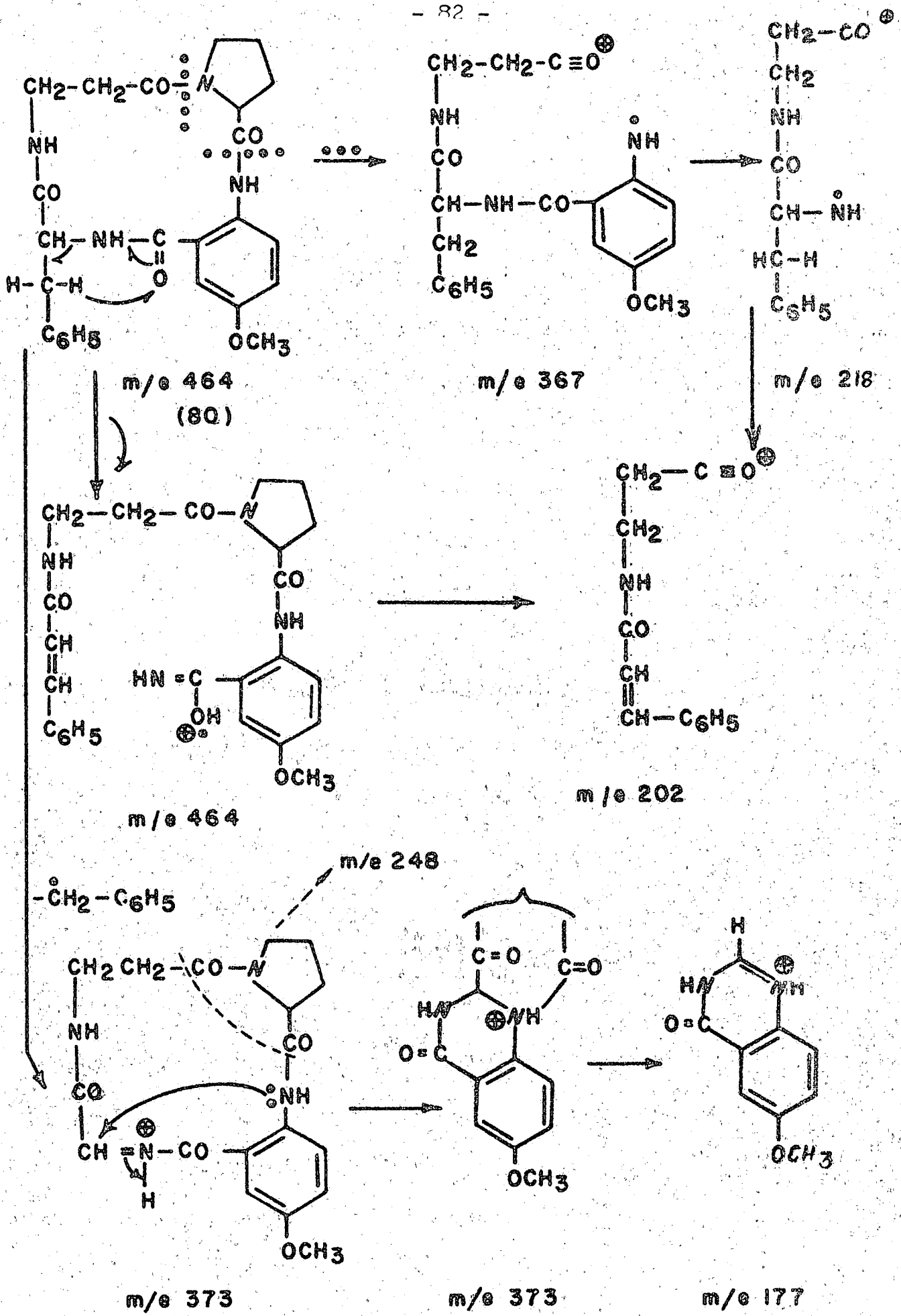
'n Studie van die krakingspatroon van asperkolorien toon dus duidelik dat die struktuur slegs as (80) voorgestel kan word. Selektiewe chemiese afboureaksies om die struktuur te bevestig kon nie uitgevoer word nie aangesien asperkolorien nie in genoegsame hoeveelhede beskikbaar was nie. Dié struktuur sal dus slegs deur sintese onteenseglik bewys kan word.



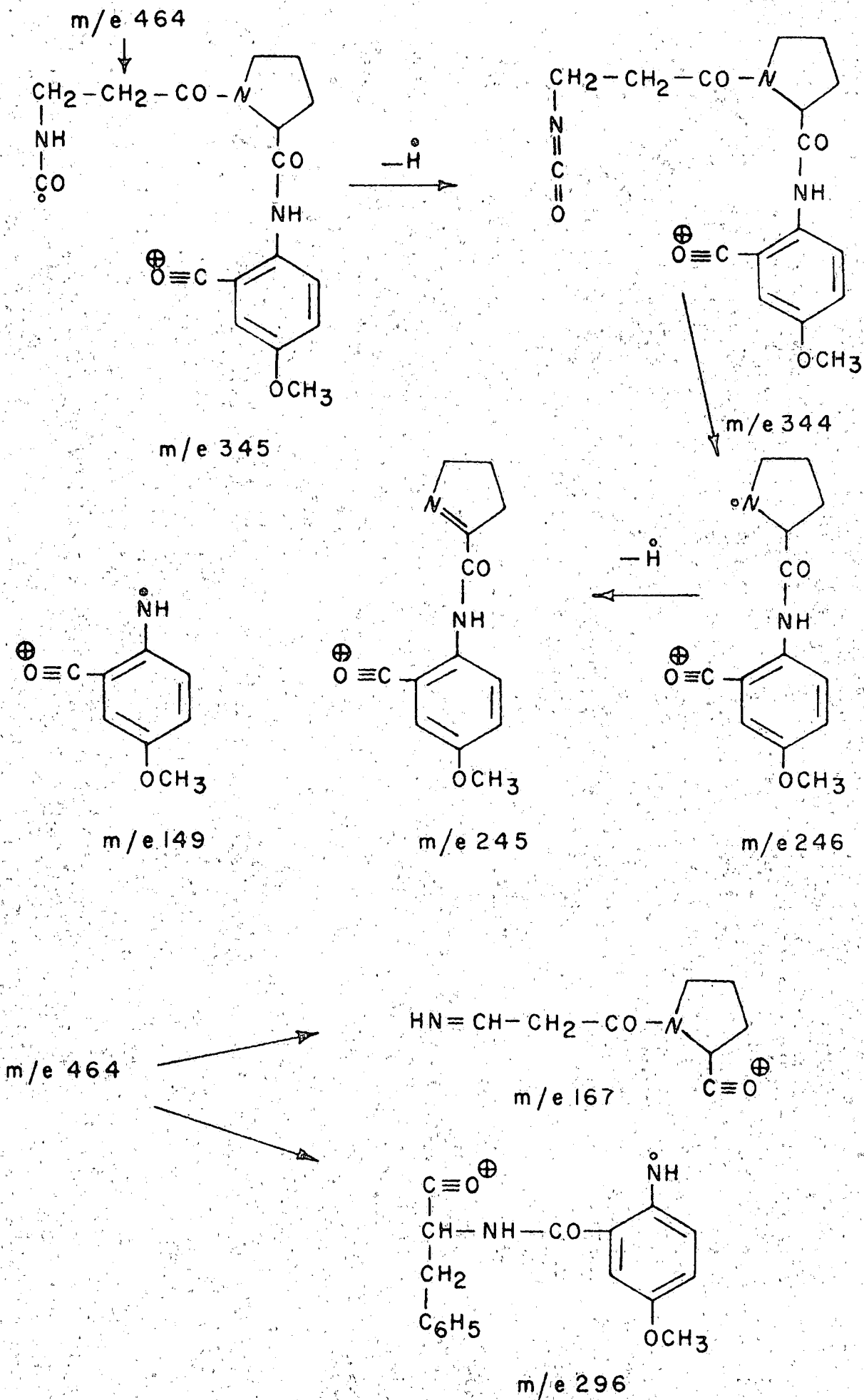
(79)



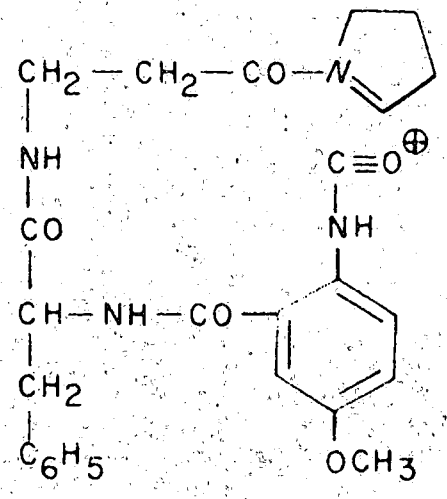
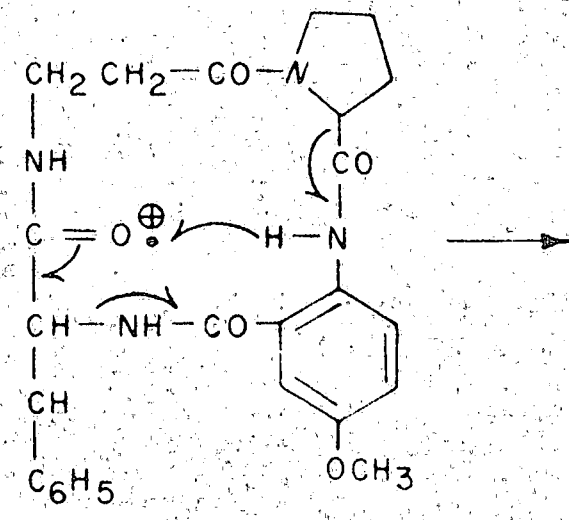
(80)



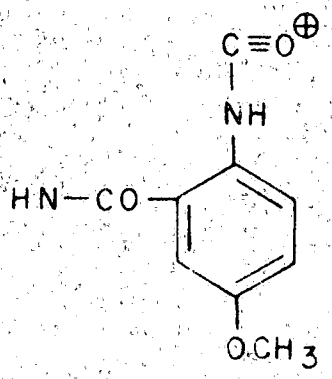
SKEMA 12



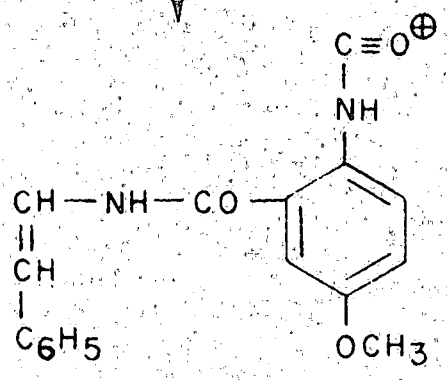
SKEMA 13



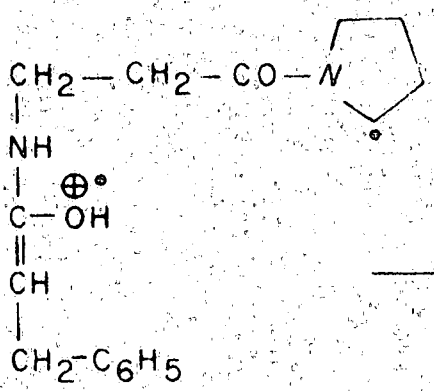
m/e 464



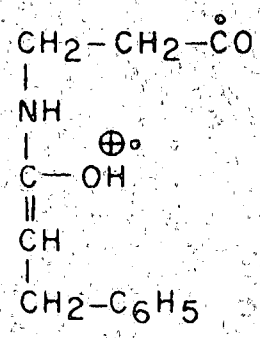
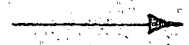
m/e 192



m/e 295



m/e 273



m/e 204

SKEMA 14

H O O F S T U K 3

MOONTLIKE SINTESES VAN ASPERKOLORIEN

1 INLEIDING

In hoofstuk 2 is inligting verskaf waarvolgens die struktuur van asperkolorien as (80) voorgestel word. Pogings om asperkolorien te sintetiseer word in hierdie hoofstuk bespreek. Slegs 'n klein aantal sikliese polipeptiede, wat uitsluitlik uit α -aminosure bestaan, is tot dusver massaspektrometrie ondersoek.^{150, 155, 156} Die meganisme waarvolgens die kraging in die massaspektrometer plaasvind, is nog nie baie duidelik vasgelê nie. Pogings sal dus aangewend word om ook ander sikliese tetrapeptiede wat slegs in aminosuurvolgorde van asperkolorien verskil, te sintetiseer vir massaspektrometriese studies.

2 PEPTIEDSINTESE¹⁵⁷⁻¹⁶⁰

Die sintese van 'n peptied behels die vorming van 'n amiedbinding tussen die suurgroep van die een aminosuur en die aminogroep van 'n tweede aminosuur. Hierdie reaksie is formeel 'n wateruitsplitsing en die karboniel-groep moet deur 'n negatiewe substituent geaktiveer word voordat die reaksie kan plaasvind. 'n Peptiedsintese met vry aminosure kan nie 'n spesifieke produk lewer nie, aangesien die geaktiveerde suurgroep nie slegs die aminogroep van die tweede aminosuur maar ook die aminogroep van 'n ander molekule van dieselfde soort sal aanval om 'n reeks polipeptiede te vorm. Dit is dus noodsaaklik dat die aminogroep van die eerste en die suurgroep van die tweede aminosuur beskerm moet word. Die groepe wat gebruik word vir die beskerming word amino- of N-beskermingsgroepe en karboniel- of C-beskermingsgroepe genoem. Na die reaksie tussen die twee gesubstitueerde aminosure kan een van die beskermingsgroepe selektief verwyder word en 'n

verdere koppelingsreaksie met 'n derde beskermende aminosuur kan uitgevoer word. Op hierdie wyse kan 'n lang polipeptied gesintetiseer word. 'n Sikliese polipeptied word gevorm deur die intramolekulêre koppeling van die suur- en aminogroepe van 'n polipeptiedmolekuul.

By enige peptiedsintese is die keuse van geskikte beskermingsgroepe van groot belang. Dit is noodsaaklik dat die beskermingsgroepe ingevoer en later selektief verwyder kan word sonder om degradasie of rasemisasie te veroorsaak. Suurgroepe kan beskerm word deur estervorming (bv. metiel-¹⁶¹, etiel-¹⁶², bensiel-¹⁶³, tersiêre butiel-¹⁶⁴ en ander¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ esters) of deur die vorming van amiede,¹⁶⁹ hidrasiede¹⁷⁰ en soute.¹⁷¹ Die belangrikste van hierdie beskermingsmetodes is estervorming. Die esters kan selektief verwyder word deur milde alkaliese hidrolise¹⁷² (metiel- en etielesters), hidrolise met soutsuurgas in metileenchloried¹⁷³ (tersiêre butielester) en hidrogenolise¹⁷⁴ (bensielester).

Daar is verskeie substituentte wat vir die beskerming van aminogroepe gebruik kan word. Die vernaamste tipes is asielgroepe ($\text{RCO}-$ en RSO_2-), uretaangroepe ($\text{R}-\text{O}-\text{CO}-$ en ROSO_2-) alkiel- en ariël-groepe ($\text{R}-$), arilideengroepe ($\text{R}-\text{CH}=\text{}$) en soutvorming.

Van die asielgroepe is dit slegs die formiel-¹⁷⁵, trifluoroasetiel-¹⁷⁶, ftaliel-¹⁷⁷ en p-tolueensulfoniël-groepe¹⁷⁸ (tosielgroep) wat algemeen gebruik word. Hierdie groepe kan selektief verwyder word deur hidrolise met metanoliêse soutsuur¹⁷⁹ (formielgroep), milde alkaliese hidrolise¹⁸⁰ (trifluoroasetielgroep), hidrasionolise¹⁸¹ (ftalielgroep) of deur reduktiewe splyting met natrium in vloeibare ammoniak¹⁸² (tosielgroep). Die nadele van hierdie eenvoudige asielgroepe is dat hulle maklik tot rasemisasie aanleiding gee.

Soortgelyke probleme word nie met die uretaantipe groepe ondervind nie. Die karbobensoksigroep¹⁸³ ($C_6H_5 - CH_2 - O - CO -$) word dikwels gebruik en kan selektief verwyder word deur hidrogenolise^{184, 185} of met behulp van HBr in asynsuur.¹⁸⁶ Die enigste koppelingsmetode wat tot newereaksies met die karbobensoksigroep aanleiding gee is die suurchloried-metode.¹⁵⁷

Alkieltipe beskermingsgroepe wat dikwels gebruik word is die tritiel-¹⁸⁷ (trifenielmetiel-) en bensielgroepe¹⁸⁸ wat onderskeidelik verwyder kan word deur milde suur hidrolise¹⁸⁹ en katalitiese hidrogenolise.¹⁹⁰ Die steriese grootte van hierdie groepe vertraag of verhoed egter dikwels die vorming van peptiedbindings.

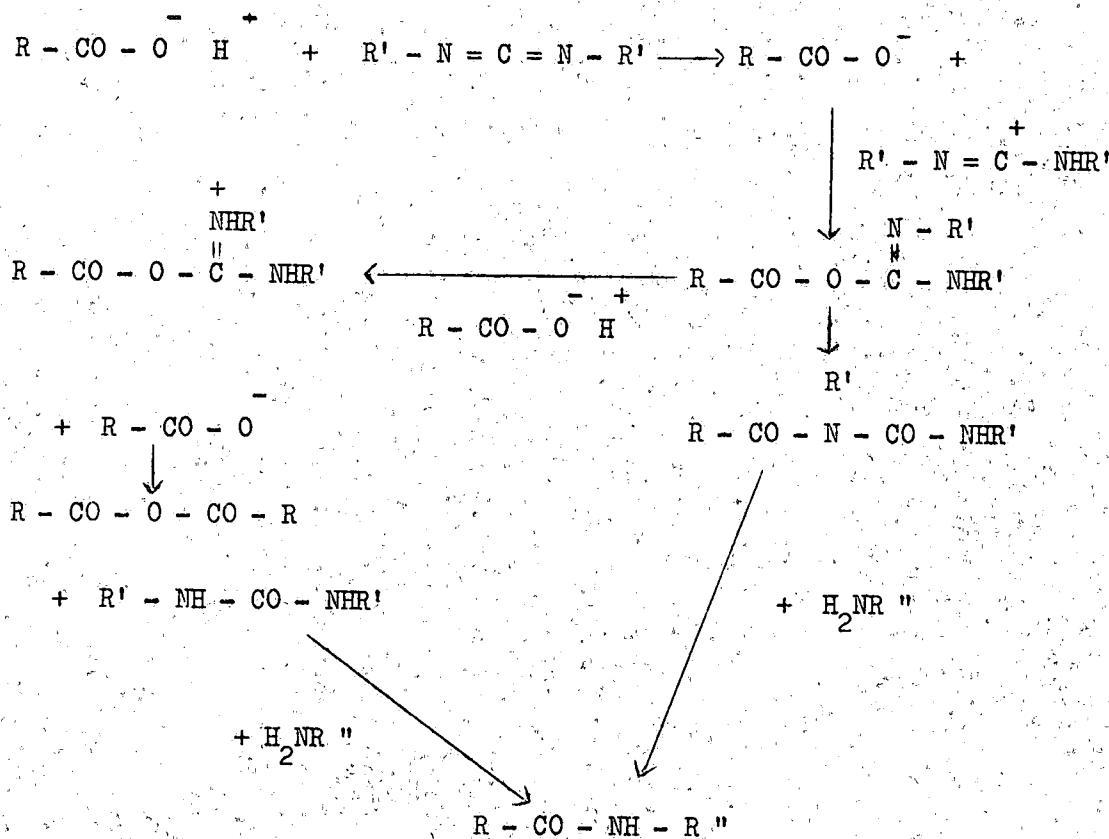
Die arilideentipe beskermingsgroepe word selde gebruik weens hulle relatiewe onstabiliteit. Die Schiffbasis van 1-hidroksibensaldehyd¹⁹¹ is egter met sukses aangewend. Beskerming van aminogroepe deur protonering word relatief min gebruik behalwe by die sintese van die metiel- en etiel-esters van aminosure waar die aminogroep deur protonering beskerm moet word om die ontstaan van diketopiperasiene¹⁹² te verhoed.

Daar is 'n groot aantal metodes, waarvolgens die karbonielgroep van 'n aminosuur of peptied geaktiveer kan word, bekend. Die oudste bekende metode¹⁹³ berus op die vorming van aktiewe gemengde anhidriede. Die anhidriede kan gevorm word met anorganiese sure (bv. die suurchloried vanaf soutsuur¹⁹⁴) of met organiese sure (bv. pivaliensuur¹⁹⁵) en isovaleriensuur¹⁹⁶). Onder hierdie afdeling val ook die suurasiede ($-CO - N = \overset{+}{N} = \overset{-}{N}$).

'n Tweede metode is die waar van aktiewe esters gebruik gemaak word. Hierdie metode is ook reeds baie lank bekend, maar dit was nie voor 1950 dat 'n werklik geskikte ester (die tiofenielester¹⁹⁸) gevind is nie. Hierna is

ontdek dat die p-nitrotiofeniel-¹⁹⁹, p-nitrofeniel-²⁰⁰ en sianometielesters²⁰¹ selfs nog meer aktief is en word dit vandag algemeen gebruik.

Die aktivering deur 'n - C = N - groep is relatief onlangs (1955)²⁰² vir die eerste keer gebruik. Disikloheksielkarbodiimied²⁰² (d.s.k.) is die metode wat die meeste aangewend word. Hierdie reagens word direk vir koppeling gebruik sonder om die aktiewe tussenstap te isoleer. Die meganisme^{203,204} waarvolgens die reaksie plaasvind is nog nie met sekerheid vasgestel nie, maar dit is voorgestel dat dit waarskynlik volgens die onderstaande prosesse plaasvind:

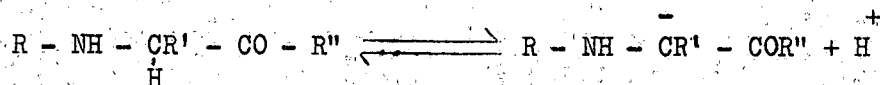


Die laaste groep wat hier genoem sal word, is aktivering deur middel van heterosikliese amiede²⁰⁵ soos imidasoliede.²⁰⁶ Hierdie proses wat eintlik 'n transamidasië behels word minder algemeen gebruik. Daar is nog 'n groot aantal metodes,²⁰⁷⁻²¹⁴ wat onlangs gepubliseer is, waarvolgens die

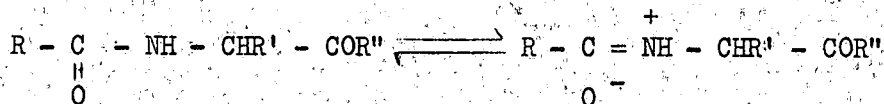
koppeling bewerkstellig kan word. Behalwe vir die vastefase of Merrifield²¹⁴ metode word hierdie metodes nog nie dikwels aangewend nie.

Dit is ook moontlik om die aminogroep in plaas van die karbonielgroepe te aktiveer deur isosianaat²¹⁵, en fosforasovorming²¹⁶ en deur esters met fosforig²¹⁷ en arsenigsure.²¹⁸ Hierdie metodes het tot dusver baie min toepassing gevind.

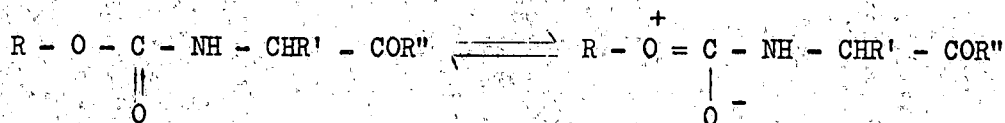
Die grootste enkele probleem wat by 'n peptiedsintese teengekom word, is dié van rasemisasie, veral wanneer reaksies in alkaliese medium uitgevoer word. Dit word aanvaar dat die rasemisasie die gevolg van die onttrekking van 'n proton vanaf die assimetriese koolstofatoom is.²¹⁹



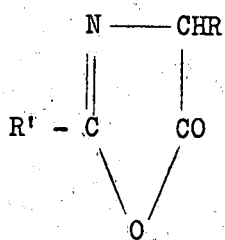
Rasemisasie vind uiters maklik plaas in die N-asielaminosure en word toegeskryf aan die aktivering van die assimetriese CH binding deur die mesomeriese vorm van die NCO groep.²¹⁹



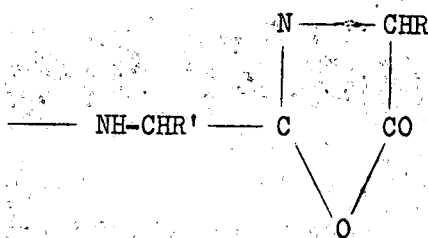
In teenstelling hiermee word die assimetriese CH binding in die derivate van die uretaantipe weer gestabiliseer deur mesomerie.²²⁰



Asielbeskermende aminosure (81) en alle dipeptiede (82) kan rasemiseer deur aslaktoonvorming, veral in die geval van gemengde anhidriede.



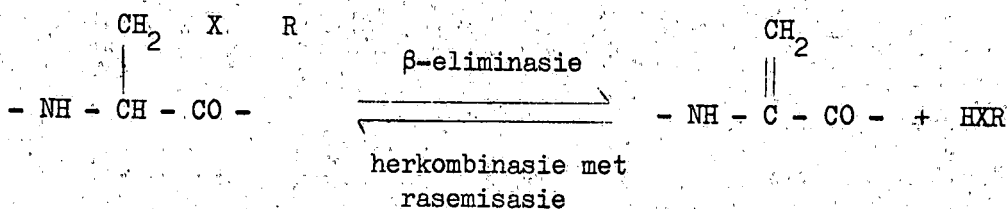
(81)



(82)

Volgens Siemion en andere²²¹ vind aslaktoonvorming plaas gedurende die gebruik van die gemengde anhidried-, karbodiimid- en tosielchloried-metodes, maar nie in die geval van die p-nitrofenielester- en imidasolied-metodes nie.

Addisionele funksionelegroepe (ω -groepe) kan ook aan reaksies deelneem om rasemisasie te veroorsaak. Die β -hidroksi- en β -merkaptogroepe veroorsaak rasemisasie deur β -eliminasië.²²² Rasemisasie word dikwels opgemerk by die alkaliese hidrolise van peptiede wat serien of S-bensielstien²²³ bevat.



X = S of O en

R = H of Bensiel.

Die neiging tot rasemisasie²²⁴ wat met die belangrikste koppelings-reaksies waargeneem is, word hieronder uiteengesit.

- (i) Asiedmetode - geen rasemisasie.
- (ii) p-Nitrofenielestermetode - geen rasemisasie onder perfekte toestande maar tot meer as 20% rasemisasie as polêre oplosmiddels en tersiêre basisse gebruik word. By alkaliese hidrolise word dikwels 100% rasemisasie aangetref.

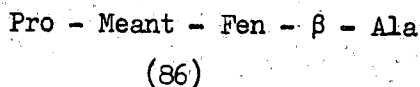
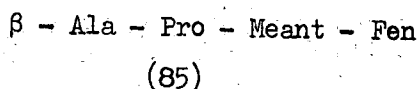
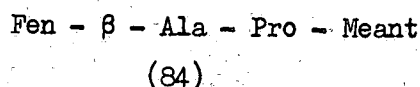
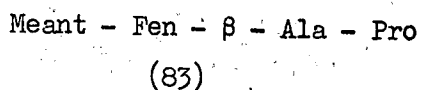
- (iii) Disikloheksielkarbodiimidmetode - uiters min rasemisasie onder gewone omstandighede maar as dimetielformamied as oplosmiddel gebruik word, veroorsaak dit tot 50% rasemisasie.
- (iv) Gemengde anhidriedmetode - veroorsaak dikwels rasemisasie, alhoewel reaksies met minder as 5% rasemisasie al volgens hierdie metode uitgevoer is. Die suurchloriedmetode gaan altyd met volledige of gedeeltelike rasemisasie gepaard.

Dit blyk dus duidelik uit bostaande bespreking dat 'n groot aantal faktore in ag geneem moet word by die keuse van beskermingsgroepe en koppelingsmetodes. By die siklisasie van 'n polipeptied is daar ook nog ander faktore wat in gedagte gehou moet word. Die effek van verdunning, op die opbrengs van die sikliese peptied, is sistematies ondersoek.^{225a}

'n Konsentrasie van een millimol per liter lewer meestal die hoogste opbrengs. Dit is noodsaaklik om by hierdie hoë verdunning te werk ten einde die sogenaamde vertweeling effek^{225b}, waar twee peptiede met mekaar reageer om 'n groter ring te vorm, te onderdruk. Hierdie effek word veral by peptiede wat 'n ongelyke aantal aminosure bevat opgemerk en kom veral by tri- en pentapeptiede voor. Behalwe by dipeptiede (wat maklik die stabiele diketopiperasiene vorm) ondervind peptiede met 'n gelyke aantal aminosure gewoonlik nie die vertweelingeffek nie. Alle peptiede kan egter nog steeds lang polipeptied kettings vorm deur met 'n tweede en derde peptied te reageer. Teoreties kan al die normale metodes wat vir peptiedsintese gebruik word, aangewend word om die ring te sluit mits daar geen groot groepe naby die ringsluitingspunt is wat die ringsluiting kan verhinder nie. Die metodes wat die meeste vir ringsluiting gebruik word is die van die aktiewe esters, gemengde anhidriede en disikloheksielkarbodiimid.

3 DIE SINTESE VAN 'N TETRAPEPTIED MET
DIESELFDE AMINOSUURVOLGORDE AS ASPERKOLORIEN

Vier liniêre tetrapeptiede naamlik (83), (84), (85) en (86) kan as sintetiese voorlopers vir asperkolorien oorweeg word.



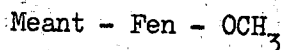
Die siklisasie van (83) en (84) sal waarskynlik moeilik wees aangesien beide die suur- en amingroepe van 5-metoksiantranielsuur steries gehinderd is.¹⁵⁹ Hierdie twee moontlikhede is dus nie as geskikte sintetiese voorlopers beskou nie.

By die sintese van die tetrapeptied (86) moet 'n N-beskernde prolien-derivaat aan 'n antranielsuurderivaat gekoppel word. Antranielsuurmetielester en N-formielprolien is as modelstowwe vir die studie van die koppelingsreaksie gebruik. Pogings om die koppeling te bewerkstellig met beide die d.s.k.- en p-nitrofenielestermetodes was nie suksesvol nie. Die onvermoë van die aromatische amien om met die geaktiveerde esters te reageer kan nie net aan steriese hindering toegeskrywe word nie, aangesien antranielsuurmetielester wel met die p-nitrofenielesters van aminosure reageer. Die onreaktiwiteit van 5-metoksiantranielsuurmetielester is waarskynlik te wyte aan die swak basisiteit van die aminogroep. Die gemengde anhidried en suurchloriedmetodes is nie ondersoek nie, aangesien die beskikbare N-beskermgsgroepe (bv. die formiel-, karbobensoksigroepe ens.) onstabiel onder hierdie reaksietoestande¹⁵⁷ is.

Daar is dus besluit om die tetrapeptied (85) te sintetiseer. Die eerste stap in hierdie sintese behels die koppeling van 5-metoksiantranielsuur met fenielalanien. As modelstowwe vir hierdie reaksie is N-asetiel-

antranielsuur en feniëlanienmetielester gebruik. Met die d.s.k.-metode is geen reaksie waargeneem nie. Die p-nitrofenielester van N-asetielantranielsuur kon selfs nie by hoë temperatuur berei word nie. Die onreaktiwiteit van N-asetielantranielsuur kan waarskynlik toegeskryf word aan steriese hindering van die karboksiesuurgroep. Die koppeling van o-nitrobensoësuur en 5-metoksi-2-nitrobensoësuur met feniëlanienmetielester is ook ondersoek. Weereens was die d.s.k.- en p-nitrofenielestermetodes nie suksesvol nie. Die asied van o-nitrobensoësuur is berei deur behandeling van die suurchloried met natriumasied. Hierdie asied het wel met die amien gereageer om die amied te lewer maar die koppelingsreaksie was stadig in vergelyking met die Curtius omskakeling²²⁹ van die asied wat o-nitroanilien (wat ontstaan deur hidrolise van die intermediêre isosianaat) as hoofproduk gelewer het. Die suurchloried van o-nitrobensoësuur het egter met feniëlanienmetielester gereageer om die gesogte amied in hoë opbrengs te lewer. Die nadeel van hierdie metode is dat gedeeltelike rasemisasie¹⁵⁷ gedurende die koppeling plaasvind. Die enigste ander metode wat die gesogte amied gelewer het (die asiedmetode) is nie verder gebruik nie weens die lae opbrengs wat verkry is.

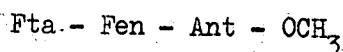
Die suurchloriedmetode is dus gebruik vir die bereiding van die dipeptied (87).



(87)

Die suurchloried van 5-metoksi-2-nitrobensoësuur is toegelaat om met feniëlanienmetielester by lae temperatuur te reageer. Die nitrogroep is na 'n aminogroep gereduseer deur katalitiese hidrogenasie. N-formielprolien in die teenwoordigheid van d.s.k. en karbobensoksiprolien-p-nitrofenielester

het geen reaksie met die dipeptied (87) getoon nie. Dit was duidelik dat die drastiese gemengde anhidried- of suurchloriedmetode vir die koppeling gebruik moes word. Die suurchloriedmetode verseker 'n goeie opbrengs en veroorsaak gewoonlik nie veel meer rasemisasie as die gemengde anhidriedmetode nie. Die suurchloriede van die meeste N-beskernde aminosure is egter onstabiel.¹⁹⁴ Sommige suurchloriede bv. die van N-ftalofelaminosure is wel stabiel en kan gebruik word. Byvoorbeeld reaksie van N-ftalofel-fenielalanien met fosforpentachloried het die stabiele suurchloried gelewer wat met antranielsuurmetielester gereageer het om die dipeptied (88) te gee.



(88)

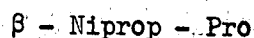
Die ftalofelgroep kan slegs verwyder word deur behandeling met hidrasien.¹⁸¹ Metielesters is nie stabiel onder hierdie reaksiekondisies nie en onder andere word die ooreenkomstige hidrasiede, wat baie moeilik hidroliseer, gevorm. Die suurchloriedmetode is wel met sommige aminosure, waarvan die amien beskerm is deur die karbobensoksi- of die suurlabiele tritielgroep, gebruik. Die dipeptied (89) kon dus moontlik met die suurchloriedmetode aan die dipeptied (87) gekoppel word.



(89)

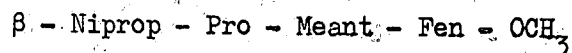
Die dipeptied (89) is berei deur die reaksie van N-formiel- β -alanien en prolienmetielester in die teenwoordigheid van d.s.k., gevolg deur hidrolise van die ester met verdunde alkali. Die suurchloried van hierdie dipeptied kon egter nie berei word nie aangesien behandeling van die dipeptied met fosforpentachloried ook die verwydering van die formielgroep veroorsaak het.

Om hierdie probleem te oorbrug is β -nitropropioonsuur in plaas van N-formiel- β -alanien gebruik om die beskermende prolienderivaat (89) te vorm. Die ooreenkomstige metielester is berei deur die reaksie van β -nitropropioonsuur en prolienmetielester in die teenwoordigheid van d.s.k. Die suur kon nie deur alkaliese hidroliese verkry word nie aangesien alkali β -eliminasië van die nitrogroep veroorsaak. Hidrolise met verdunde soutsuur het egter die verlangde produk (90) gelewer.



(90)

Die suurchloried van (90) is berei deur die reaksie met oksalielchloried. Koppeling met die dipeptied (87) het die tetrapeptied (91) gelewer.

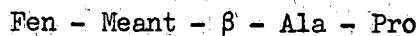


(91)

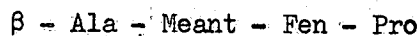
Hidrolise van die estergroep met verdunde soutsuur gevolg deur reduksie van die nitrogroep na 'n aminogroep (katalitiese hidrogenasië) het die gesogte tetrapeptied (85) gelewer.

4. BEREIDING VAN ANDER LINIERE TETRAPEPTIEDE WAT IN AMINOSUURVOLGORDE VAN ASPERKOLORIEN VERSKIL

Pogings is aangewend om die liniêre tetrapeptiede (92) en (93) te sintetiseer.

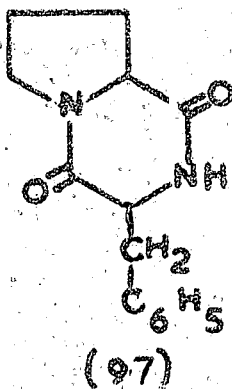


(92)



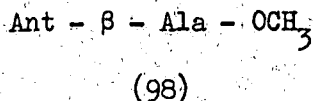
(93)

Siklisasië van hierdie tetrapeptiede sal verbindings lewer wat slegs in aminosuurvolgorde van asperkolorien verskil. Hierdie nuwe sikliese tetrapeptiede se massaspektra en fisiologiese aktiwiteit sal ondersoek word.



Dit word beoog om die tetrapeptied (93) te berei vanaf 'n tripeptied soortgelyk aan (95) (met 5-metoksi-antranielsuur in plaas van die antranielsuur) deur selektiewe alkaliese hidrolise van die metielester gevolg deur koppeling met prolienmetielester en verwydering van die beskermingsgroepe.

Die tripeptied (95) is as volg berei: Die suurchloried van o-nitrobensoësuur is by β -alaniëmetielester gevoeg en die produk is katalities gehidrogeneer om die dipeptied (98) te gee.



Die p-nitrofenielester van N-formielfeniëalanien en die dipeptied (98) het stadig gereageer om die gesogte tripeptied (95) in 'n lae opbrengs te lewer.

Na voltooiing van die sintese van die liniêre tetrapeptiede (85), (92) en (93) sal metodes vir die siklisasie van hierdie verbindings ondersoek word. Die siklisasieproduk van (85) sal direk met asperkolorien vergelyk word om die identiteit van asperkolorien onteenseglik te bewys.

H O O F S T U K 4

EKSPERIMENTELE GEDEELTE

1 ALGEMEEN

Smeltpunte is met 'n Koflerblok bepaal en is nie gekorrigeer nie. Infrarooispektra (Perkin-Elmer model 237 spektrofotometer) en ultraviolet-spektra (Unicam model S.P. 800 spektrofotometer) is respektiewelik in chloroform en metanol bepaal. Optiese draaiings is met 'n Hilger-Watts polarimeter en o.r.d. spektra met 'n Jasco u.v./o.r.d. 5 spektrofotometer opgeneem. Massaspektra is met 'n A.E.I., M.S. 9 dubbelfokus massaspektrometer en k.m.r. spektra met 'n Varian A60A of H A 100 spektrofotometer opgeneem.

„Kieselgel G nach Stahl" van Merck en Whatman Nr. 1 chromatografiepapier is onderskeidelik vir dunlaag- en papierchromatografie gebruik. Merck se silikagel (0.05 - 0.20 mm) en Whatman Chromedia sellulose is vir kolomchromatografie gebruik. Formamiedgeïmpregneerde sellulose is berei volgens die voorskrif van Enslin en andere.²²⁶

Gedistilleerde tegniese oplosmiddels is gebruik vir ekstraksie en chromatografie terwyl analities rein reagense vir sintetiese reaksies gebruik is.

2 EKSTRAKSIE VAN VERSKIMMELDE MEEL EN VOORLOPIGE FRAKSIONERING VAN DIE EKSTRAK

Aspergillus nidulans (Eidam) Wint., stam G106, is volgens die metode van Scott²³ op gesteriliseerde mieliemeel gekweek. Droë, fyngeaalde, verskimmelde meel (13 kg) is in 'n Soxhletapparaat met 'n 1 : 1 chloroform-metanol mengsel 72 uur lank geëkstraheer. Die ekstrak is onder vakuum gekonsentreer en die teeragtige residu (955 g) is tussen chloroform (3 l.) en water (4 l.) verdeel. Die chloroformfraksie is ingedamp en die residu

(450 g) tussen heksaan (3 l.) en 95% waterige metanol (1.5 l.) verdeel.

Indamping van die metanolfraksie het 'n bruin teer (56g), wat in chloroform opgeneem is, gelewer. Die oplossing is met 'n natriumbikarbonaatoplossing (3 x 300 ml) gewas en daarna met 'n versadigde kaliumparbonaatoplossing (4 x 250 ml) gëkstraheer. 'n Neutrale fraksie, A, (31 g) is na indamping van die chloroform verkry. Die karbonaatoplossing het na aansuring (HCl) en ekstraksie met chloroform 'n fenoliese fraksie, B, (7 g) gelewer.

A. versicolor (Vuill.) Tiraboschi, stam M716, is op dieselfde wyse as A. nidulans gekweek en die chloroform-metanol ekstrak van die verskimmelde meel (10 kg) verdeel in neutrale- (A) (24 g) en fenoliese (B) (6 g) fraksies.

Bipolaris sp. is op 'n soortgelyke manier behandel om neutralefraksie (A) (1.5 g/kg) en 'n fenoliese fraksie (B) (700 mg/kg) te lewer.

3 SKEIDING VAN DIE FENOLIESE FRAKSIES

3.1 A. nidulans

Die fenoliese fraksie (B) is oor formamiedgeïmpregneerde sellulose (1.2 kg) gechromatografeer. Eluering met heksaan (2 l.) het hoofsaaklik sterigmatosistien (66 mg) (sien isolasie uit neutrale gedeelte) gelewer. Heksaan-benseen mengsels (3 l., 20 : 1 → 1 : 2) het 'n reeks antrakinoonpigmente (1.459 g) (fraksie B₁) gelewer. Benseen (2 l.) het 'n fraksie (B₂) (590 mg), wat relatief min antrakinoonpigmente bevat, van die kolom verwyder. Benseen-chloroform mengsels (4 l., 9 : 1 → 1 : 4) het 'n tweede reeks antrakinoonpigmente (fraksie B₃) (1.638 g) gelewer. Chloroform-metanol mengsels (8 l., 9 : 1 → 1 : 4) het polêre rooi fenoliese (2.287 g) pigmente (wat nie verder ondersoek is nie) van die kolom verwyder.

Fraksie B₁ is oor silikagel (145 g) gechromatografeer. Geleidelike eluering met benseen-chloroform mengsels (2 l., 1 : 1 → 1 : 4) en chloroform-

metanol mengsels (3 l., 5 : 1 → 1 : 1) het die volgende produkte gelewer:

(i) Averufien (17) (403 mg) Na kristallisasië uit chloroform-metanol het die stof die volgende eienskappe : Smeltpunt 280° (Letter³² $280 - 282^{\circ}$), $\Delta\epsilon$: -2.35 (230 $m\mu$), 0 (242 $m\mu$), 1.41 (256 $m\mu$, sk.), 1.88 (262 $m\mu$), 0 (270 $m\mu$), 0.56 (280 $m\mu$), 0 (292 $m\mu$), -1.88 (298 $m\mu$), 0 (302 $m\mu$), 1.41 (310 $m\mu$), 0 (400 $m\mu$), 1.27 (450 $m\mu$) en 0.38 (480 $m\mu$), λ_{maks} 223, 253 (sk.), 264, 291, 316 (sk.) en 448 $m\mu$, ($\xi \times 10^{-4}$: 3,27, 1.597, 1.785, 3.007, 1.071, 0.9961 respektiewelik) M^+ 368 (bereken vir $C_{20}H_{16}O_7$: M^+ 368). Die molekulêre samestelling van 'n aantal van die belangrikste pieke in die massaspektrum van averufien is met behulp van akkurate massabepalings verkry : m/e 325.070, 310.045, 247.034, 286.045, 85.065, 85.101, 83.049 en 83.086. Bereken vir $C_{18}H_{13}O_6$, $C_{17}H_{10}O_6$, $C_{16}H_9O_6$, $C_{15}H_{10}O_6$, C_5H_9O , C_6H_{13} , C_5H_7O en C_6H_{11} : m/e 325.071, 310.047, 297.040, 286.048, 85.065, 85.101, 83.050 en 83.086 respektiewelik.

Metilasië³² van die stof met silweroksied en metieljodied het trimetoksiaverufien, identies (Smeltpunt $189^{\circ}C$, mengsmeltpunt $189^{\circ}C$, infrarooi- en massaspektrum) aan 'n egte monster verskaf deur dr. J.C. Roberts, as een van die produkte gelewer.

(ii) Versikolorien C (29) (1.5 g) Na kristallisasië uit metanol het dit die volgende eienskappe : Smeltpunt $310 - 330^{\circ}C$, $[\alpha]_D^{20}$ (C 1.0 in metanol), (Letter³³ Smeltpunt $310^{\circ}C$ [$\alpha]_D^{20}$) λ_{maks} 223, 255 (sk.), 266, 292, 314 en 448 $m\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 28.8, 15.9, 20.4, 28.8, 10.0 en 10.7), M^+ : 340 (bereken vir $C_{18}H_{12}O_7$: M^+ 340). Die molekulêre samestelling van die volgende pieke in die massaspektrum van versikolorien C is akkuraat bepaal : 325.033, 311.049, 297.036. (Bereken vir $C_{17}H_9O_7$, $C_{17}H_{11}O_6$ en $C_{16}H_9O_6$: 325.071, 311.054 en 297.040 respektiewelik).

Chromatografie van fraksie B₂ oor silikagel (60 g) en eluering met 1 : 1 benseen-chloroform het eers versikolorien C (29) (55 mg) en daarna nidulol (42, R = H) (390 mg) gelewer. Na kristallisasie uit chloroform-metanol het nidulol die volgende eienskappe : Smeltpunt 234°C, $[\alpha]_D^{20}$ (C 1.0 in metanol), λ_{maks} 216, 261 en 290 m μ ($\xi \times 10^{-3}$: 29.0, 13.65 en 2.8 respektiewelik). Na byvoeging van alkali skuif λ_{maks} na 238 en 302 m μ ($\xi \times 10^{-3}$: 13.9 en 25.6 respektiewelik), ν_{maks} 3560 en 1746 cm⁻¹, [C : 61.6; H : 5.25%; M⁺ 194 bereken vir C₁₀H₁₀O₄ : C : 61.85; H 5.2%; M⁺ 194].

Chromatografie van fraksie B₃ oor silikagel (100 g) en eluering met benseen-chloroform mengsels (4:1 → 1 : 4) het die volgende produkte gelewer:

(i) Nidurufien (26, R = R' = H) (75 mg) Na kristallisasie uit chloroform-metanol het die stof die volgende eienskappe : Smeltpunt 188°C, $\Delta\xi$: -10.4 (230 m μ), 0 (240 m μ), 1.90 (256 m μ), 2.84 (260 m μ), 0 (270 m μ), 0.95 (280 m μ), 0 (288 m μ), -7.6 (296 m μ), 0 (308 m μ), 2.8 (325 m μ), 0 (348 m μ), -7.6 (365 m μ), -0.57 (380 m μ), 0 (400 m μ), 4.17 (444 m μ), 0.76 (480 m μ), λ_{maks} 223, 253 (sk.), 264, 291, 318 (sk.) en 448 m μ ($\xi \times 10^{-4}$: 3.791, 1.754, 1.967, 3.506, 0.9767 en 1.185 respektiewelik), ν_{maks} 1710 en 1625 cm⁻¹, M⁺ 384.083 (bereken vir C₂₀H₁₆O₈ : M⁺ 384.084). Die molekulêrgewigte van die volgende pieke in die massaspektrum van nidurufien is akkuraat bepaal : m/e 286.041 en 99.043 (bereken vir C₁₅H₁₀O₆ en C₅H₇O₂ : m/e 286.047 en 99.045 respektiewelik).

(ii) Nidulol (42, R = H) (101 mg)

Eluasie van die kolom met meet polêre oplosmiddels het slegs komplekse mengsels van fenoliese verbindings gelewer. Hierdie mengsels is nie verder ondersoek nie.

3.2

A. versicolor

Die fenoliese fraksie (B) is oor silikagel (500 g) gechromatografeer soos reeds vir die fraksie B van A. nidulans beskryf is. Die volgende produkte is geïsoleer :

(i) Averufanien (33) (45 mg) Na kristallisasie uit chloroform-metanol het die stof die volgende eienskappe : Smeltpunt 254°C (Letter³⁴ 260°), $\Delta\epsilon$: 0 (240 $\text{m}\mu$), 0.82 (250 $\text{m}\mu$), 0 (266 $\text{m}\mu$), 3.08 (284 $\text{m}\mu$), 0 (292 $\text{m}\mu$), -1.54 (298 $\text{m}\mu$), 0 (308 $\text{m}\mu$), -0.82 (325 $\text{m}\mu$), 0 (348 $\text{m}\mu$), -0.51 (365 $\text{m}\mu$), -0.31 (380 $\text{m}\mu$), 0 (400 $\text{m}\mu$), λ_{maks} 223, 253 (sk.) 265, 292, 320 en 450 $\text{m}\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 30.78, 13.97, 16.24, 28.51, 8.874 en 9.251 respektiewelik), ν_{maks} 3410, 1620 en 1580 cm^{-1} , M^+ 370 (bereken vir $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_7$: M^+ 370). Die volgende molekulêre gewigte van die pieke in die massaspektrum se massas is akkuraat bepaal : 299.028 en 297.039 (bereken vir $\text{C}_{15}\text{H}_7\text{O}_7$ en $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{O}_6$ 299.019 en 297.040 respektiewelik). Die stof is geïdentifiseer deur direkte vergelyking (Smeltpunt 254°C , mengsmeltpunt 256°C , massa- en infrarooispektrum) met 'n egte monster wat deur dr. J.S.E. Holker verskaf is.

(ii) Versikolorien C (29) (100 mg) Geïdentifiseer deur direkte vergelyking (Smeltpunt $> 310^{\circ}\text{C}$, mengsmeltpunt $> 310^{\circ}\text{C}$, infrarooi- en massaspektrum) met die wat uit A. nidulans geïsoleer is.

(iii) 1'-Metoksiaverantien (34, $\text{R} = \text{CH}_3$) (28 mg) Na kristallisasie uit chloroform-metanol het die stof die volgende eienskappe : Smeltpunt 215° en 275°C , λ_{maks} 223, 253 (sk.), 264, 291, 316 en 450 $\text{m}\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 28.65, 14.97, 16.27, 8.42 en 9.39 respektiewelik) ν_{maks} 1625 en 1600 cm^{-1} , M^+ 386.136 (bereken vir $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$: M^+ 386.137.) Die molekulêre gewig van die volgende piek in die massaspektrum se massa is akkuraat bepaal : 354.111 (bereken vir $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$: 354.110).

(iv) Nidurufien (26, R = R' = H) (10 mg) Geïdentifiseer deur direkte vergelyking (Smeltpunt 188°C, mengsmeltpunt 187°C infrarooi- en massaspektrum) met die wat uit A. nidulans geïsoleer is.

(v) Polêre fenoliese verbindings wat nie verder ondersoek is nie.

3.3 Bipolaris sp.

Chromatografie van die fenoliese fraksie (B) oor silikagel (500 g) en eluasie soos reeds beskryf het tot die isolasie van die volgende produkte gelei :

(i) Averufanien (33) (50 mg) Geïdentifiseer deur direkte vergelyking (Smeltpunt 254°C, mengsmeltpunt 255°C, infrarooi- en massaspektra) met die uit A. versicolor.

(ii) Versikolorien C (29) (55 mg) Geïdentifiseer deur direkte vergelyking (Smeltpunt > 310°C, mengsmeltpunt > 310°C, massa- en infrarooispektra) met die uit A. nidulans.

(iii) Bipolarien (32) (70 mg) Hierdie stof het die volgende eienskappe na kristallisasie uit chloroform-metanol : Smeltpunt 261°C, λ_{maks} 223, 253 (sk.), 265, 292, 316 en 448 μm . ($\xi \times 10^{-3}$: 35.2, 17.5, 19.6, 28.6, 10.6 en 9.7); ν_{maks} : 3410, 1620 en 1580 cm^{-1} , M^+ 342.074 (bereken vir $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_7$: M^+ 342.074). Die volgende pieke se massas is akkuraat bepaal : m/e 299.018 en 272.031. Bereken vir $\text{C}_{15}\text{H}_7\text{O}_7$ en $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_6$: m/e 299.019 en 272.032.

(iv) Kurvularien (52) (120 mg) Die stof het die volgende eienskappe na kristallisasie uit metanol : Smeltpunt 203°C (Letter ^{106, 107} 206°), λ_{maks} 222, 236 (sk.), 272 en 304 μm ($\xi \times 10^{-3}$: 12.12, 9.43, 5.18 en 5.115 respektiewelik), ν_{maks} 1630 en 1610 cm^{-1} [C : 65.77; H : 6.80, M^+ : 292.129; bereken vir $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_5$: C : 65.74; H : 6.90 en M^+ 292.131].

Die molekulêrgewig van die volgende piek in die massaspektrum is akkuraat bepaal : m/e 195.025 (bereken vir $C_9H_7O_5$: m/e 195.029 respektiewelik).

Metilasing van hierdie stof met metieljodied en silweroksied³² het di-O-metielkurvularien, identies aan (Smeltpunt $72^\circ C$, mengsmeltpunt $72^\circ C$, infrarooi- en massaspektrum) in egte monster wat deur dr. J.C. Roberts verskaf is, gelever.

4 SKEIDING VAN DIE NEUTRALEFRAKSIE VAN
A. VERSICOLOR EN SY KOMPONENTE

Die neutrale fraksie (A) (24 g) is oor silikagel (1 kg) gechromatografeer. Eluasie met heksaan-benseen mengsels (1 : 9 \rightarrow 9 : 1) en benseen-chloroform mengsels (1 : 4 \rightarrow 4 : 1) lewer die volgende produkte:

(i) Sterigmatosistien (13, $R_1 = R_2 = H$) (510 mg) Na kristallisering uit metanol het hierdie stof die volgende eienskappe : Smeltpunt $246^\circ C$ (Letter^{27,28} 246°), λ_{maks} 205, 233, 246 en $325 \text{ m}\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 25.12, 30.90, 33.80 en 16.20 respektiewelik), M^+ 295 (bereken vir $C_{17}H_{11}O_5$: M^+ 295). Hierdie stof is geïdentifiseer deur direkte vergelyking (Smeltpunt $246^\circ C$, mengsmeltpunt $245^\circ C$, infrarooi- en massaspektrum) met 'n egte monster wat van dr. J.C. Roberts verkry is.

(ii) Asperkolorien (80) (400 mg) Na kristallisering uit metanol het hierdie stof die volgende eienskappe : Smeltpunt $158^\circ C$, $\Delta \xi$: 5.63 (225 $\text{m}\mu$), 0 (228 $\text{m}\mu$), - 31.54 (245 $\text{m}\mu$), -0.45 (sk.) (282 $\text{m}\mu$), -1.80 (314 $\text{m}\mu$), 0 (345 $\text{m}\mu$), 0.22 (356 $\text{m}\mu$), 0 (364 $\text{m}\mu$), λ_{maks} 210, 224 (sk.), 260 en 314 $\text{m}\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 28.08, 18.92, 13.62 en 4.17), ν_{maks} 3435, 3305, 1675 en 1645 cm^{-1} [C : 64.56; H : 6.35%, M^+ 464.205. Bereken vir $C_{25}H_{28}N_4O_5$: C : 64.56; H : 6.03, M^+ 464.210].

5 CHEMIESE REAKSIES UITGEVOER
OP DIE HIDROKSIANTRAKINONE

5.1 Metilasie van die hidroksiantrakinone

5.1.1 Metilasie van averufien: 'n Mengsel van averufien (117 mg), metieljodied (45 ml) en varsbereide silweroksied (700 mg; berei vanaf silwer-nitraat en natriumhidroksied) is 4 dae lank by kamertemperatuur geroer. Die neerslag is afgefiltreer en met chloroform (40 ml) gewas. Die oplosmiddel is afgedamp en die residu oor silikageldunlaagplate gechromatografeer (3% metanol in chloroform as vloeibare fase). Die vernaamste bande (R_f 0.77 en 0.59) is vanaf die plaat afgeskraap en met metanol geëkstraheer.

Die band met R_f 0.77 het na kristallasie uit chloroform di-O-metiel-averufien (60 mg) gelewer; Smeltpunt 208°C , λ_{maks} 223, 252, 286, 320 en 450 μ ($\xi \times 10^{-3}$: 36.1, 15.7., 27.2, 9.8 en 7.1 respektiewelik) ν_{maks} 1678, 1626 en 1601 cm^{-1} (Gevind : M^+ 396. Bereken vir $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_7$: M^+ 396). Die band met R_f 0.59 het, na kristallasie uit chloroform, tri-O-metielaverufien (23 mg) gelewer, identies aan (Smeltpunt 189°C , mengsmeltpunt 190°C , infra-rooi- en massaspektra). 'n egte monster³² wat van dr. J.C. Roberts verkry is.

5.1.2 Metilasie van nidurufien : Nidurufien (130 mg) is gemetileer met metieljodied en silweroksied net soos vir averufien beskrywe is. Die reaksieprodukt is op silikageldunlaagplate gechromatografeer (ontwikkel met 3% metanol in chloroform). Die twee vernaamste bande is met metanol geëkstraheer.

Die band met R_f 0.69 het na kristallasie uit chloroform tri-O-metielnidurufien (26, R = CH_3 , R' = H) (72 mg) gelewer. Smeltpunt 158°C , λ_{maks} 223, 251, 285, 313 en 440 μ ($\xi \times 10^{-3}$: 36.2, 16.7, 32.1, 10.5 en 7.4 respektiewelik) ν_{maks} 1670 en 1602 cm^{-1} (Gevind : M^+ 426. Bereken vir $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_8$: M^+ 426).

Die band met R_f 0.50 het tetra-O-metielnidurufien (26, $R = R' = CH_3$) (31 mg), as 'n geel olie, gelewer: λ_{maks} 223, 285, 344 en 407 $m\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 38.2, 38.0, 5.1 en 4.8 respektiewelik). ν_{maks} 1670 en 1601 cm^{-1} (Gevind : M^+ 440. Bereken vir $C_{24}H_{24}O_8$: M^+ 440). Hierdie produk kon nie in 'n kristallyne toestand verkry word nie.

5.1.3 Metilisasie van versikolorien C : Versikolorien C (140 mg) is, volgens die metode wat hierbo beskrywe is, met metieljodied en silweroksied gemetileer. Die produk is oor silikageldunlaagplate geskei en die twee ver-naamste bande met metanol geblueer.

Die band met R_f 0.73 het na kristallisasie uit chloroform di-O-metielversikolorien C (90 mg) gelewer : Smeltpunt 186°C, λ_{maks} 222, 251, 284, 315 en 450 $m\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 35.23, 15.4, 37.3, 8.78 en 5.7 respektiewelik) ν_{maks} 1665, 1630 en 1600 cm^{-1} (Gevind : M^+ 368. Bereken vir $C_{20}H_{16}O_7$: M^+ 368).

Die band met R_f 0.58 het na kristallisasie uit chloroform tri-O-metielversikolorien (20 mg) gelewer : Smeltpunt 209°C (letter. ³³ 212°C), λ_{maks} 223, 285, 346 en 410 $m\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 36.71, 39.31, 3.67 en 3.66 respektiewelik) ν_{maks} 1665 en 1600 cm^{-1} (Gevind : M^+ 382. Bereken vir $C_{21}H_{18}O_7$: M^+ 382).

5.1.4 Metilisasie van bipolarien : Bipolarien (30 mg) is, soos voorheen beskryf, met metieljodied en silweroksied gemetileer. Die produk is oor alumina (4g) gechromatografeer en eluasie met chloroform het tetra-O-metiel-bipolarien (26 mg), as 'n geel olie, gelewer : λ_{maks} 224, 287, 348 en 410 $m\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 32.53, 37.36, 5.24 en 3.98 respektiewelik) ν_{maks} 1669 en 1602 cm^{-1} (Gevind : M^+ 398. Bereken vir $C_{22}H_{22}O_7$: M^+ 398). Hierdie produk kon nie in 'n kristallyne toestand verkry word nie.

5.2 Deuterering van averufien

Averufien (31 mg) en fosforpentachloried (3 g) is opgelos in 'n mengsel van dioksaan (20 ml gedistilleer vanaf natrium) en deuteriumoksied (30 ml) en 3 dae lank onder terugvloei verhit. Die oplossing is ingedamp tot 20 ml en met chloroform (3 x 20 ml) geëkstraheer. Indamping van die chloroform en kristallisatie van die residu uit chloroform-metanol het pentadeuterio-averufien (21, R = H, R' = CH₃) (30 mg), gelewer (Gevind : M⁺ 373. Bereken vir C₂₀H₁₁D₅O₇ : M⁺ 373).

5.3 Oksidasie van nidurufien

Nidurufien (17 mg) in asetoon (30 ml, gedistilleer vanaf kaliumpermanganaat) is by 0°C met 0,08 N chroomsuur in 4 N swaelsuur (0,45 ml) behandel. Die oplossing is toegelaat om kamertemperatuur te bereik (na 30 minute), verdun met water en met chloroform geëkstraheer. Die chloroform is ingedamp en die residu oor 'n silikageldunlaagplaat geskei (vloeibare fase 3% metanol in chloroform). Die vernaamste band (R_f 0,40) is met metanol geëkstraheer. Kristallisatie van die residu uit asetoon het dehidro-nidurufien (27) (8 mg) gelewer : Smeltpunt : 226°C, λ_{maks} 223, 253, 264, 291, 316 en 450 mμ. (ε x 10⁻³ : 36,82, 16,45, 18,76, 34,60, 8,67 en 10,58 respektiewelik) ν_{maks} 1713, 1680 en 1605 cm⁻¹ (Gevind : M⁺ 382,069 en m/e 311,054. Bereken vir C₂₀H₁₄O₈ en C₁₇H₁₁O₆ : M⁺ 382,060 en 311,055 respektiewelik).

Averufien en versikolorien C is onveranderd teruggekry na behandeling met chroomsuur in asetoon soos hierbo beskrywe.

5.4 Behandeling van bipolarien met osmiumtetraksied

Bipolarien (10 mg) in 80% asynsuur (5 ml) is met osmiumtetraksied (20 mg) behandel en die reaksie mengsel 2 dae lank by kamertemperatuur gelaat.

Die mengsel is verdun met water en met chloroform geëkstraheer. Indamping van die chloroform en kristallasie uit chloroform-metanol het slegs onveranderde bipolarien (Smeltpunt 261°C) gelewer.

5.5 Omskakeling van 1'-O-metiel-
averantien na averytrien

1'-O-metiela-verantien (23 mg) en p-tolueensulfoonsuur (30 mg) is opgelos in dimetielsulfoksied (5 ml) en 2 dae lank by 80°C onder terugvloei verhit. Die oplossing is verdun met water en met chloroform geëkstraheer. Die chloroform is afgedamp en die residu uit chloroform gekristalliseer om averytrien (35) (17 mg) te lewer. Hierdie produk is geïdentifiseer deur direkte vergelyking met 'n egte monster van averytrien³⁵ wat van dr. J.C. Roberts verkry is. (Smeltpunt 231°C , mengsmeltpunt 231°C , infrarooi- en massaspektrum).

6 CHEMIESE REAKSIES UITGEVOER
OP NIDULOL

6.1 Metilasie van nidulol

Nidulol (42, R = H) (70 mg) en varsbereide silweroksied (500 mg) is in metieljodied (30 ml) gesuspendeer en 24 uur lank by kamertemperatuur geroer. Die neerslag is afgefiltreer en gewas met chloroform. Die chloroform is ingedamp en die residu gekristalliseer uit metanol om O-metielnidulol (42, R = CH_3) (49 mg) te lewer : Smeltpunt $172 - 173^{\circ}\text{C}$ (Letter^{99,100} $171.5 - 172.5^{\circ}\text{C}$) λ_{maks} 215, 259 en 288μ ($\xi \times 10^{-3}$: 26.0, 14.0 en 2.20 respektiewelik) ν_{maks} 1750 cm^{-1} (Gevind : C, 63.3; H, 6.0%; M^+ 208. Bereken vir $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$: C, 63.45%; H, 5.8; M^+ 208).

Hierdie verbinding is ook berei deur nidulol met 'n oormaat diasmetaan in 1 : 4 metanol-eter oornag te metileer.

Die residu (80 mg) vanaf die gekombineerde moederloë, van die kristallisatie van nidulol, is ook, net soos hierbo, met metieljodied en silweroksied gemetleer. Die reaksieproduk is oor 'n preparatiewe silika-geldunlaagplaat (ontwikkel met 2% metanol in chloroform) geskei en die twee vernaamste bande is met metanol geëkstraheer.

Die band met R_f 0.73 het na kristallisatie uit metanol 'n kristallyne di-O-metielftaalied (51, R = CH_3) (34 mg) gelewer. Smeltpunt : 157°C

λ_{maks} 217, 259 en 287 μ ($\xi \times 10^{-3}$: 30.50, 13.80 en 2.37 respektiewelik)

ν_{maks} 1749 cm^{-1} (Gevind : M^+ 208.073. Bereken vir $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$: M^+ 208.074).

Die band met R_f 0.67 het O-metielnidulol (40 mg) gelewer.

6.2 Oksidasie van O-metielnidulol

O-metielnidulol (85 mg) in 0.1 N natriumhidroksied (20 ml) is 2 uur lank onder terugvloei verhit. Die oplossing is afgekoel tot kamertemperatuur en 'n kaliumpermanganaatoplossing (42 mg in 2 ml) is drupsgewys oor 'n tydperk van vyf minute bygevoeg. Die reaksie is na 'n verdere tydperk van 20 minute by kamertemperatuur met 3 N swaelsuur (20 ml) aangesuur en met chloroform (4 x 50 ml) geëkstraheer. Indamping van die chloroform lewer 'n suur (79 mg) wat in asynsuuranhidried (2 ml) opgeneem is en 30 minute lank onder terugvloei verhit is, voordat die oplosmiddel afgedamp is. Die residu is uit eter gekristalliseer om die ftaalanhidried (43b) (51 mg) te lewer.

Smeltpunt : $165 - 166^\circ\text{C}$ (Letter^{99, 100} 166°C), λ_{maks} 217, 242 en 309 μ

($\xi \times 10^{-3}$: 17.80, 20.20 en 3.97 respektiewelik) ν_{maks} 1840 en 1770 cm^{-1}

[Gevind : C, 59.4; H, 4.35%; M^+ 222. Bereken vir $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$: C, 59.45; H 4.55%; M^+ 222].

In 'n soortgelyke eksperiment is O-metielnidulol (50 mg) onder identiese toestande geoksideer. Die oksidasie is egter beëindig deur die

byvoeging van soutsuur (10 ml) in plaas van die swaelsuur. Kristallisasie van die finale produk het 'n chloroftaalanhidried (43a) 18 mg gelewer : Smeltpunt 147°C , ν_{maks} 1850 en 1777 cm^{-1} [Gevind : C, 51.4; H, 3.5%; M^+ 256. Bereken vir $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5\text{Cl}$: C, 51.5; H, 3.5%; M^+ 256].

6.3. Selektiewe demetilasie van O-metielnidulol

O-metielnidulol (45 mg) in nitrobenseen (10 ml) is met aluminiumchloried (600 mg) behandel en die oplossing 12 uur lank by 65°C gehou. Die oplosmiddel is afgedamp, die residu met 10N HCl (20 ml) behandel en met chloroform geëkstraheer. Die chloroform is afgedamp en die residu uit chloroform-eter gekristalliseer om die demetoksiftalied (48) (18 mg) te lewer : Smeltpunt $142 - 143^{\circ}$, λ_{maks} 217, 259 en $293\text{ m}\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 31.00, 14.00 en 5.30 respektiewelik). Na byvoeging van alkali is λ_{maks} 232, 265 en $328\text{ m}\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 36.00, 7.60 en 5.30 respektiewelik), ν_{maks} 3450 en 1729 cm^{-1} (Gevind : M^+ 194.057. Bereken vir $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$: M^+ 194.058). In teëstelling met nidulol gee hierdie verbinding 'n intense groen kleur met metanoliese ferrichloried.

7 METILASIE VAN KURVULARIEN

Kurvularien (52) (30 mg) en varsbereide silweroksied (300 mg) is 3 dae lank in metieljodied (30 ml) geroer. Die neerslag is afgefiltreer en met chloroform gewas. Die oplosmiddel is afgedamp en die residu uit eter gekristalliseer om 'n wit kristallyne produk (35 mg) te gee.^{106,107} Hierdie produk is geïdentifiseer as di-O-metielkurvularien deur direkte vergelyking (Smeltpunt 72°C , mengsmeltpunt 71°C , infrarooi- en massaspektra) met 'n egte monster wat van dr. J.C. Roberts verkry is.

8 CHEMIESE REAKSIES UITGEVOER
OP STERIGMATOSISTIEN

8.1 Reaksie van sterigmatosistien-
bensoaat met loodtetra-asetaat

Sterigmatosistienbensoaat (Smeltpunt 259°C , berei volgens die metode van Roberts en andere²²⁷) (1 g) in asynsuur (99%, 30 ml) is met loodtetra-asetaat (1.2 g) behandel en die oplossing veertien uur lank by kamertemperatuur geroer. Die oplossing is met water (100 ml) verdun en met chloroform (3 x 50 ml) geëkstraheer. Die chloroformoplossing is met waterige natriumbikarbonaat en daarna met water gewas, gedroog (oor natriumsulfaat) en ingedamp. Die residu (1.1 g) is oor silikagel (100 g) gechromatografeer. Die kolom is met benseen-chloroform mengsels (4 : 1 → 1 : 4, 1.5 l.) ontwikkel. Hierna is twee fraksies met chloroform geëluëer.

Die eerste fraksie het na kristallisatie uit eter die di-asetaat (53) (250 mg) gelewer. Smeltpunt 230°C , ν_{maks} 1740, 1680, 1639, 1615, 1605 en 1600 cm^{-1} . Die k.m.r. spektrum (in CDCl_3) het onder andere die volgende seine getoon: drie protonseine by τ 6.22 (O-metiel), τ 7.82 (asetaat) en τ 8.36 (asetaat) [Gevind: C, 63.5; H, 4.0%; Bereken vir $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: C, 63.6; H, 4.0%].

Die tweede fraksie het na kristallisatie uit benseen die monoasetaat (54) (405 mg) gelewer: Smeltpunt 202°C , ν_{maks} 3400, 1737, 1680, 1615 en 1600 cm^{-1} . Die k.m.r. spektrum (in CDCl_3) het, onder andere, die volgende: drie protonseine by τ 6.38 (O-metiel) en τ 7.97 (asetaat) getoon; Die vier protone van die eterringsistiem het tot die volgende seine aanleiding gegee: doeblet ($J = 6\text{Hz}$) by τ 6.0 ($\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH} =$), doeblet ($J = 4\text{Hz}$ wat verval na 'n enkel sein na uitruiling met deuteriumoksied) by τ 4.65 ($-\text{O}-\text{CH}-\text{OH}$), 'n doeblet ($J = 6\text{Hz}$) by τ 3.50 ($\text{Ar}-\text{O}-\text{CH}-\text{O}-$) en 'n enkel sein by τ 4.82

($-\overset{|}{\text{CH}}-\text{OCOH}_3$). Dit is duidelik dat die dihidrale hoeke in hierdie sisteem sodanig is dat net twee van die vier protone visinaal gekoppel is. [Gevind : C, 64.1; H, 3.8%. Bereken vir $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$: C, 64.3; H, 4.0%].

8.2 Reaksie van O-metioldihidrosterigmatosistien met loodtetra-asetaat

O-metioldihidrosterigmatosistien (Smeltpunt 282°C ; berei volgens die metode van Roberts en andere.²²⁷) is onveranderd teruggekry na behandeling met loodtetra-asetaat in asynsuur (24 uur by kamertemperatuur of onder terugvloei verhit) of benseen (3 uur lank onder terugvloei verhit). Byvoeging van bensofelperoksied (5%) het nie die reaksie aangehelp nie terwyl byvoeging van borontrifluoriedeteraat (5%) as katalis slegs demetilasie na dihidrosterigmatosistien tot gevolg gehad het.

8.3 Reaksie van O-metioldihidrosterigmatosistien met alkali

'n Oplossing van O-metioldihidrosterigmatosistien (100 mg) in 10% metanoliese kaliumhidroksied (10 ml) is dertig uur lank onder terugvloei verhit. Die oplossing is ingedamp tot 'n klein volume, verdun met water, versigtig aangesuur met soutsuur en met chloroform geëkstraheer. Die chloroform is ingedamp en die residu (95 mg) gechromatografeer oor silikagel (10 g). Die kolom is ontwikkel met chloroform. Eluering met 5% metanol in chloroform en kristallasie uit metanol, het die fenol (55, $\text{R} = \text{OCH}_3$, $\text{R}' = \text{H}$) gelewer : Smeltpunt 194°C , λ_{maks} 237 en 311 ($\xi \times 10^{-4}$: 16.45 en 8.06 respektiewelik) λ_{maks} in alkali 236 en 340 μ . ($\xi \times 10^{-4}$: 14.17 en 8.05 respektiewelik), ν_{maks} 1650, 1620 en 1600 cm^{-1} . Die k.m.r. spektrum (in piridien) het onder andere die volgende seine getoon : drie drieproton seine by $\tau 6.21$ en $\tau 6.31$ (aromatiese OCH_3) en $\tau 6.60$ (alifatiese OCH_3); 'n eenproton doeblet ($J = 4\text{Hz}$) by $\tau 4.38$ ($-\text{CH}-\overset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}}-\text{OCH}_3$) en 'n breë eenproton sein

by τ 5.4 (- OH) wat na behandeling met deuteriumoksied verdwyn. (Gevind : M^+ 372. Bereken vir $C_{20}H_{20}O_7 : M^+$ 372).

9 CHEMIESE REAKSIES VAN ASPERKOLORIEN

9.1 Hidrolise van asperkolorien

'n Suspensie van asperkolorien (35 mg) in 6 N soutsuur (30 ml) is 30 uur lank onder terugvloei verhit. Die mengsel was volkome helder na 4 uur. Die oplossing is ingedamp tot 'n klein volume (2 ml) en papierchromatografies ondersoek. Drie verskillende sisteme is gebruik naamlik : butanol : asynsuur : water :: 4:1:5 (sisteem 1); kolluidien : lutidien :: 1 : 1 (sisteem 2) en fenol : water :: 8 : 3 (sisteem 3). Die chromatogramme is onder ultravioletlig besigtig en met ninhidrien¹²⁸ en Folin se reagens¹²⁸ gespuit. Die teenwoordigheid van die vier aminosuurkomponente in die hidrolisaat kon hierdeur aangedui word; naamlik

- (A) 'n bloufluoesserende komponent (R_f 0.80, 0.50 en 0.82 in sisteme 1, 2 en 3 respektiewelik),
- (B) 'n ninhidrienpositiewe komponent (R_f 0.61, 0.57 en 0.84 in sisteme 1, 2 en 3 respektiewelik),
- (C) 'n ninhidrien en Folinreagens positiewe komponent (R_f 0.28, 0.35 en 0.86 in sisteme 1, 2 en 3 respektiewelik) en
- (D) 'n ninhidrienpositiewe komponent (R_f 0.20, 0.30 en 0.48 in sisteme 1, 2 en 3 respektiewelik).

Die komponente is geskei deur ionuitruilingschromatografie op Dowex A.G. 50W X8 hars (in die natrium vorm). Die kolom is ontwikkel met sitraatbuffers soos beskrywe is deur Block en Weiss.¹³² Komponente B (geëlueer met buffer pH 4.2, 250 ml), C (geëlueer met buffer pH 3.2, 740 ml) en D (geëlueer met buffer pH 4.2, 550 ml) is hierna geïdentifiseer as fenielalanien,

prolien en β -alanien deur direkte papierchromatografiese vergelyking met egte monsters van hierdie aminosure. Die komponent A is geëluëer met buffer pH 6.0 (50 ml) en van die sitroensuur geskei deur absorpsie op Dowex AG 50 X8 hars (by pH 0.8) en nadat die hars goed met soutsuur (pH 0.8) gewas is, weer vrygestel met 1 N natriumhidroksied. Die oplossing is gevriesdroog en geëkstraheer met 1% soutsuur in kokende aseton. Die oplosmiddel is afgedamp en die residu opgeneem in absolute metanol (10 ml) wat tionielchloried (0.5 ml, bygevoeg by -10°C) bevat. Die mengsel is ses uur lank onder terugvloei verhit. Die oplosmiddel is afgedamp en die residu verdeel tussen 3 N soutsuur (5 ml) en chloroform (10 ml). Die suur is geneutraliseer (natriumbikarbonaat) en met chloroform (3 x 20 ml) geëkstraheer. Die chloroform is afgedamp en die residu uit eter gekristalliseer om 5-metoksiantranielsuurmetielester (66) (8 mg) te lewer : Smeltpunt 33°C , λ_{maks} 222, 255 en 355 m μ ($\epsilon \times 10^{-3}$: 22.0, 7.50 en 7.0 respektiewelik) ν_{maks} 1700 en 1620 cm^{-1} (Gevind : M^+ 181. Bereken vir $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$: M^+ 181). Hierdie stof is geïdentifiseer deur direkte vergelyking (massa-, infrarooi-, ultraviolet- en k.m.r. spektrum) met 'n egte monster wat sinteties berei is (sien 9.4).

In 'n ander eksperiment is asperkolorien (80 mg) gehidroliseer, soos reeds hierbo beskryf is. Die totale hidrolisaat is gevriesdroog en opgeneem in absolute metanol (10 ml) wat tionielchloried (0.5 ml; bygevoeg by -10°C) bevat. Die oplossing is 6 uur lank onder terugvloei verhit en daarna drooggedamp. Die residu is verdeel tussen chloroform (30 ml) en waterige natriumbikarbonaat (15 ml). Die chloroform is met water gewas, gedroog (natriumsulfaat) en afgedamp. Die residu (60 mg) is op formamied-geïmpregneerde Whatman nr. 3 MM chromatografiepapier gechromatografeer (ontwikkel met 25% benseen in heksaan). Na chromatografie is die chromatogram in ses

gelyke stroke verdeel (genommer van 1 tot 6 van bo na onder). Elke strook is met metanol geëkstraheer, die metanol afgedamp en die residu verdeel tussen chloroform en water. Die chloroform is afgedamp en kristallyne materiaal is vanaf stroke 2, 3 en 4 verkry.

Die materiaal afkomstig van band 2 het 5-metoksi-antranielsuurmetiel-ester (66) (10 mg, Smeltpunt 33°C) gelewer wat geïdentifiseer is deur direkte vergelyking met 'n egte sintetiese monster.

Die materiaal afkomstig van band 3 het na kristallisatie uit metanol L-difenielalaniendiketopiperasien (70) (9 mg) gelewer wat geïdentifiseer is deur direkte vergelyking (Smeltpunt 280°C , mengsmeltpunt 279°C , infrarooi- en o.r.d. spektrum) met 'n egte sintetiese monster.

Die materiaal afkomstig van band 4 het na kristallisatie uit chloroform-metanol L-diproliendiketopiperasien (69) (7 mg) gelewer, wat geïdentifiseer is deur direkte vergelyking (Smeltpunt 149°C , mengsmeltpunt 148°C , infrarooi- en o.r.d. spektrum) met 'n egte sintetiese monster.

9.2 Bereiding van L-difenielalanien-diketopiperasien

L-Karbobensoksifenielalanien-p-nitrofenielester (600 mg) is gesuspendeer in 'n oplossing van HBr in asynsuur (5 ml, 40%) by kamertemperatuur vir 30 minute. Die helder oplossing is verdun met eter (20 ml), gefiltreer en die kristallyne neerslag gewas met koue eter (3 x 10 ml). Die gevormde L-fenielalanien-p-nitrofenielesterhidrobromied (Smeltpunt 212°C) (400 mg) is met natriumbikarbonaat behandel om die amien vry te stel. Die amien is opgeneem in chloroform (10 ml) en oornag by kamertemperatuur gelaat.

Afdamping van die chloroform en kristallisatie van die produk uit chloroform het L-difenielalaniendiketopiperasien (70) (200 mg) gelewer. Smeltpunt 280°C

(Letter 149 280°C) λ_{maks} 208 en 258 $\text{m}\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 18.93 en 0.59 respektiewelik),
 ν_{maks} 1680 cm^{-1} , ϕ : 3997 (220 $\text{m}\mu$), 987.7 (240 $\text{m}\mu$), 399.8 (300 $\text{m}\mu$), 188.1
 (340 $\text{m}\mu$), 94.1 (380 $\text{m}\mu$) en 0 (400 $\text{m}\mu$). (Gevind: M^+ 294. Bereken vir
 $\text{C}_{18}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$: M^+ 294).

9.3 Bereiding van L-diprolien- diketopiperasien

L-Prolien (1 g) is opgelos in absolute metanol (10 ml) wat tionielchloried (0.5 ml, bygevoeg by -10°C) bevat en die oplossing is 3 uur lank onder terugvloei verhit. Die oplosmiddel is afgedamp en die residue opgeneem in chloroform (20 ml), behandel met waterige natriumbikarbonaat (om die amien vry te stel), gewas met water en gedroog (natriumsulfaat). Die oplosmiddel is afgedamp en die residu uit metanol/eter gekristalliseer om L-diproliendiketopiperasien (69) (950 mg) te lewer. Smeltpunt 149°C
 (Letter 192 149°C) λ_{maks} 203 $\text{m}\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 1.272), ν_{maks} 1660 cm^{-1} , ϕ :
 529.8 (230 $\text{m}\mu$), 414.7 (240 $\text{m}\mu$), 177.7 (280 $\text{m}\mu$), 103.6 (320 $\text{m}\mu$), 66.64
 (360 $\text{m}\mu$) en 44.42 (400 $\text{m}\mu$) (Gevind: M^+ 194. Bereken vir $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$:
 M^+ 194).

9.4 Sintese van 5-metoksi- antranielsuurmetielester

5-Amino-2-nitrobensoësuur (5 g, verkry van K. & K. Laboratories) is opgelos in 10% kaliumhidroksied (200 ml) en die oplossing 24 uur lank onder terugvloei verhit in 'n stikstofatmosfeer. Die oplossing is afgekoel en met yskoue swaelsuur (400 ml, 12N) aangesuur en geëkstraheer met etielasetaat. Die oplosmiddel is afgedamp en die residu gekristalliseer uit water om 5-hidroksi-2-nitrobensoësuur (4.6 g) te lewer. Smeltpunt 170°C (Letter 142
 169°C) (Gevind M^+ 183. Bereken vir $\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_5$: M^+ 183).

5-Hidroksi-2-nitrobensoësuur (2.8 g) is opgelos in droë aseton

(30 ml) waarby droë kaliumkarbonaat (10 g) gevoeg is. Dimetielsulfaat (5 ml) is drupsgewys oor 'n tydperk van een uur bygevoeg terwyl die oplossing geroer en onder terugvloei verhit is. Die oplossing is nog 48 uur lank onder terugvloei verhit voordat ammoniumhidroksied (15 ml) versigtig bygevoeg is om die oormaat dimetielsulfaat te vernietig. Die neerslag is afgefiltreer, gewas met aseton en drooggedamp. Die residu is opgelos in etielasetaat, met koue natriumhidroksied (10%, 2 x 100 ml) geëkstraheer, gewas met water, gedroog (natriumsulfaat) en die oplosmiddel afgedamp. Die residu (2.7 g) is oor silikagel (30 g) gechromatografeer. Die kolom is ontwikkel met heksaan-benseen mengsels (4 : 1 → 1 : 4). Eluasie met benseen en kristallisatie uit metanol het 5-metoksi-2-nitrobensoësuurmetielester (2.3 g) gelewer. Smeltpunt 55°C (Letter¹⁴² 55°C) (Gevind : M⁺ 211. Bereken vir C₉H₉N O₆ : M⁺ 211)

Hidroksie van hierdie stof (1.5 g) met N kaliumhidroksied (20 ml) by 100° (5 uur lank) het na neutralisasie en kristallisatie uit waterige metanol 5-metoksi-2-nitrobensoësuur (650 mg) gelewer. Smeltpunt 132°C (Letter¹³⁷ 133°C) (Gevind : M⁺ 197. Bereken vir C₈H₇NO₆ : M⁺ 197).

5-Metoksi-2-nitrobensoësuur (150 mg) is opgelos in metanol (20 ml) en palladium op koolstof katalis (50 mg, 30%) is bygevoeg. Die mengsel is 4 uur lank onder atmosferiese druk gehidrogeneer, die katalis afgefiltreer en die oplosmiddel afgedamp. Die residu is uit metanol-eter gekristalliseer om 5-metoksi-antranielsuur (100 mg) te lewer : Smeltpunt : 180° C (Letter²²⁸ 179°C) (Gevind : M⁺ 167. Bereken vir C₈H₉NO₃ : M⁺ 167).

5-Metoksi-2-nitrobensoësuurmetielester (100 mg) is opgelos in etielasetaat (10 ml) waarby platienoksied (20 mg) gevoeg is en 3 uur lank by atmosferiese druk gehidrogeneer. Die katalis is afgefiltreer en die oplos-

middel afgedamp. Die residu is uit eter gekristalliseer om 5-metoksi-antranielsuurmetielester (68) (85 mg) te lewer. Smeltpunt 33°C ; $\lambda_{\text{maks}}^{228}$ 222, 255 en $355 \text{ m}\mu$ ($\xi \times 10^{-3}$: 21.95, 7.22 en 6.73 respektiewelik), ν_{maks} 1700 en 1620 cm^{-1} (Gevind : M^+ 181. Bereken vir $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$: M^+ 181).

10 SINTESE VAN LINIERE PEPTIEDE

10.1 Bereiding van uitgangsstowwe

10.1.1 Bereiding van die metielesters van aminosure : Die aminosure (0.1 ml) is opgelos in absolute metanol (87 ml) waarby vooraf tionieelchloried (9.8 ml) by 0° bygedrup is. Die oplossing is drie uur lank onder terugvloei verhit en na afkoeling met vaste natriumbikarbonaat behandel om die oormaat suur te verwyder. Indamping van die filtraat het die aminosuurmetielesterhydrochloried in meer as 90% opbrengs gelewer:

Die metielesters van die volgende aminosure is volgens hierdie metode berei:

β -alanienmetielesterhydrochloried : Smeltpunt 93°C (uit metanol/eter. Letter $^{230} 94^{\circ}\text{C}$).

L- β -fenielalanienmetielesterhydrochloried : Smeltpunt 159°C (uit metanol/eter, Letter $^{115} 160^{\circ}\text{C}$).

L-prolienmetielesterhydrochloried as 'n kleurlose olie ($\nu_{\text{maks}} 1740 \text{ cm}^{-1}$).

10.1.2 Formilering van aminosure : Die aminosuur (0.1 mol) is opgelos in 98% mieresuur (210 ml). Hierby is asynsuuranhidried (78 ml) oor 'n tydperk van twee uur gevoeg en die mengsel twaalf uur lank by kamertemperatuur gelaat.

Na voltooiing van die reaksie is yswater (80 ml) bygevoeg. Afdamping van die oplosmiddels het die N-formiel-aminosure in meer as 90% opbrengs gelewer.

Die volgende verbindings is op hierdie wyse berei:

N-formiel- β -alanien : Smeltpunt 72°C (uit waterige etanol. Letter²³¹ 74°) [Gevind: M^+ 117. Bereken vir $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_3$: M^+ 117].

N-formiel-L- β -fenielalanien : Smeltpunt 166°C (uit waterige etanol. Letter²³² 167°) [Gevind: M^+ 193. Bereken vir $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$: M^+ 193].

N-formiel-L-prolien as 'n kleurlose olie [Gevind: M^+ 143. Bereken vir $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_3$: M^+ 143].

10.1.3 Ftalofel-L-fenielalanien : L-fenielalanien (2.48 g) en ftaalanhidried

(2.24 g) is baie fyn gemaal en goed gemeng. Die mengsel is veertig minute lank by 150°C gehou. Na afkoeling is die residu met metanol (15 ml) behandel. Die onopgeloste vaste stof is afgefiltreer en die metanol met 'n gelyke volume water verdun en oornag by 0°C gelaat sodat die produk kan kristalliseer.

Die N-ftalofel-L-fenielalanien (3.7 g) is afgefiltreer en gewas met yswater. Smeltpunt 183°C (Letter¹⁷⁷ 185°C) [Gevind: M^+ 295. Bereken vir $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_4$: M^+ 295].

10.1.4 Ftalofel-L-fenielalaniensuurchloried : N-ftalofel-L-fenielalanien

(740 mg) en fosforpentachloried (570 mg) is in benseen (8 ml) gesuspendeer en een uur lank onder terugvloei verhit. Die oormaat fosforpentachloried is afgefiltreer en die oplosmiddel afgedamp. Die residu (860 mg) is uit benseen/hekseen gekristalliseer om N-ftalofel-L-fenielalaniensuurchloried te gee.

Smeltpunt 82°C (Letter¹⁷⁷ 83°C) [Gevind: M^+ 313. Bereken vir $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{Cl}$: M^+ 313].

10.1.5 Formiel-L-fenielalanien-p-nitrofenielester : Formiel-L-fenielalanien

(965 mg) en p-nitrofenol (835 mg) is opgelos in dioksaan (20 ml) en afgekoel tot 0°C. D.s.k. (1.03 g) is bygevoeg en die mengsel dertig minute lank by 0°C en vier uur lank by kamertemperatuur geroer. Die gevormde disikloheksielurea is afgefiltreer en die oplosmiddel afgedamp. Die residu is opgeneem in chloroform (100 ml) en met waterige kaliumkarbonaat

(10 x 50 ml) en daarna met water (2 x 50 ml) gewas en drooggedamp. Kristallisatie uit etanol het N-formiel-L-fenielalanien-p-nitrofenielester

(1.5 g) gelewer. Smeltpunt 135°C $[\alpha]_D -29.25^\circ$ (c 0.4 in chloroform)

[Gevind : C : 61.14%; H : 4.49%; N : 8.87% en M^+ 314. Bereken vir

$C_{16}H_{14}N_2O_5$: C : 61.14%; H : 4.49% ; N : 8.91% en M^+ 314] .

10.1.6 L-Fenielalanien-p-nitrofenielesterhidrobromied : N-karbobensoksi-

fenielalanien-p-nitrofenielester (300 mg, verkry van Pierce Chemicals) is opgelos in 'n oplossing van H Br in asynsuur (1 ml, 45%) en een uur lank by kamertemperatuur gelaat. Eter (10 ml) is bygevoeg en die neerslag met

eter (10 ml) gewas om L-fenielalanien-p-nitrofenielesterhidrobromied (200 mg)

te lewer. Smeltpunt 213°C (Letter²³³ 215°C) [Gevind M^+ 367. Bereken vir

$C_{15}H_{15}N_2O_4Br$: M^+ 367] .

10.1.7 5-Metoksi-2-nitrobensoësuur-p-nitrofenielester : 5-metoksi-2-nitro-

bensoësuur (1.97 g) en p-nitrofenol (1.54 g) is opgelos in etielasetaat

(9 ml) en afgekoel tot 0°C. D.s.k. (3.0 g) is bygevoeg en die temperatuur

is dertig minute lank by 0°C gehou. Die reaksiemengsel is nog vier-en-

twentig uur lank by kamertemperatuur geroer. Die neerslag is afgefiltreer

en die filtraat met 'n kaliumkarbonaatoplossing (5 x 50 ml) in water gewas.

Die oplosmiddel is afgedamp en die residu uit etanol gekristalliseer om

5-metoksi-2-nitrobensoësuur-p-nitrofenielester (2.3 g) te lewer :

Smeltpunt 152°C , ν_{maks} 1760 en 1590 cm^{-1} [M^+ 317.976. Bereken vir $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_7 : M^+ 317.978$].

Hierdie aktiewe ester is onveranderd terug gekry na langdurige verhitting met fenielalanienmetielester in chloroform of dimetielformamied.

10.1.8 Bereiding van β -nitropropioonsuur : β -chloropropioonsuur (27 g) en natriumjodied (30 g) is opgelos in asetoon (300 ml) en 30 uur lank onder terugvloei verhit.²³⁴ Die neerslag is afgefiltreer en die oplosmiddel afgedamp. Die resulterende rooi olie is opgelos in chloroform (200 ml) en met verdunde swaelsuur (2 x 50 ml) geëkstraheer. Die chloroform is afgedamp en die residu uit water (15 ml) gekristalliseer om β -jodopropioonsuur (27 g) te lewer : Smeltpunt 83°C (Letter²³⁵ 85°C) [Gevind M^+ 200. Bereken vir $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{J} M^+ 200$].

β -Jodopropioonsuur (12 g) is opgelos in eter (15 ml) en by 0°C behandel²³⁶ met silwernitriet (10 g). Die suspensie is vier-en-twintig uur by 0°C gevolg deur ses-en-dertig uur by kamertemperatuur geroer. Bogenoemde proses is uitgevoer met die volkome uitsluiting van lig. Die neerslag is afgefiltreer en met eter gewas. Die eter is afgedamp en die resulterende olie in yskoue gekonsentreerde swaelsuur (80 ml) gegiet. Na vyf minute is yswater (80 ml) versigtig bygevoeg en die oplossing met etielasetaat geëkstraheer. Die etielasetaat is afgedamp en die residu uit chloroform gekristalliseer om β -nitropropioonsuur (1.5 g) te lewer. Smeltpunt 66°C (Letter²³⁷ 68°C) [Gevind M^+ 139. Bereken vir $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}_4 M^+ 139$].

10.2 Koppeling van die aminosuurderivate

10.2.1 Koppeling van o-nitrobensoësuur met fenielalanienmetielester :

10.2.1a o-Nitrobensoësuur (345 mg) en tioniëlchloried (8 ml) is dertig minute lank onder terugvloei verhit. Die oplosmiddel is afgedamp en die residu opgeneem in droë dimetielformamied (10 ml). Natriumasied (344 mg) is in klein porsies bygevoeg terwyl die temperatuur veertig minute lank by 0°C gehou is. Etielasetaat (10 ml) en water (5 ml) is bygevoeg en die waterige fase is na skeiding weer met etielasetaat gekstraheer. Die gekombineerde etielasetaatfraksies is stadig by 'n oplossing van L-feniëlalanienmetielesterhydrochloried (400 mg) en trietiëlamien (275 mg) in etielasetaat (10 ml) by 0°C gedrup. Die reaksiemengsel is sewe uur by 0°C en twaalf uur lank by kamertemperatuur geroer. Die oplossing is gewas met verdunde ammoniumhidroksied (20 ml) verdunde soutsuur (20 ml) en water (40 ml) gedroog (natriumsulfaat) en ingedamp. Die resulterende geel olie (402 mg) is oor silikagel (30 g) gekromatografeer. Eluering met benseen het o-nitroanilien (165 mg) gelewer. Smeltpunt 71°C (uit eter/heksaam, Letter²³⁸ 71.5°C). Dit is geïdentifiseer deur direkte vergelyking (Smeltpunt, mengsmeltpunt, infrarooi- en massaspektrum) met 'n egte monster. Eluering met chloroform het o-nitrobensoëfel-L-feniëlalanienmetielester (120 mg) wat uit eter gekristalliseer is, gelewer. Smeltpunt 115°C [α]_D 30° (c 2.5 in chloroform) v_{maks} 3360, 1740, 1699 en 1595 cm⁻¹. [Gevind : C : 62.0%; H : 4.80% en N : 8.2%. Bereken vir C₁₇H₁₆N₂O₅ : C : 62.2%; H : 4.90% en N : 8.5%].

10.2.1b o-Nitrobensoësuur (167 mg) en tioniëlchloried (8 ml) is dertig minute lank onder terugvloei verhit. Die oplosmiddel is afgedamp, die residu opgeneem in etielasetaat (5 ml) en drupsgewys gevoeg by 'n oplossing van L-feniëlalanienmetielesterhydrochloried (229 mg) en trietiëlamien (101 mg) in etielasetaat (10 ml) by 0°C.

Die oplossing is nog drie uur by 0°C en drie uur by kamertemperatuur geroer. Die oplossing is gewas met verdunde ammoniumhidroksied (10 ml), soutsuur (10 ml) en water (2 x 20 ml) en gedroog (natriumsulfaat). Die etielasetaat is afgedamp en die residu uit eter/heksaan gekristalliseer om o-nitrobensofel-L-fenielalaniemetielester (272 mg) te lewer. Die produk is geïdentifiseer deur direkte vergelyking (Smeltpunt 115°C , mengsmeltpunt 113°C , infrarooi- en massaspektrum) met die monster wat in die vorige eksperiment berei is. Die $[\alpha]_{\text{D}}$ waarde (18°) toon dat die metode meer rasemisasie veroorsaak het as die asiedmetode.

10.2.2 Bereiding van ftalofel-L-fenielalanielantranielsuurmetielester (88) :

Ftalofel-L-fenielalaniensuurchloried (313 mg) en antranielsuurmetielesterhydrochloried (187 mg) is opgelos in yskoue chloroform (8 ml). Trietielamien (202 mg) is bygevoeg en die oplossing is twee uur lank by kamertemperatuur geroer. Meer chloroform (30 ml) is bygevoeg en die chloroform gewas met 'n kaliumkarbonaatoplossing (4 x 25 ml), verdunde soutsuur (3 x 25 ml) en gedistilleerde water (50 ml) en gedroog (natriumsulfaat). Die oplosmiddel is afgedamp en die residu uit metanol gekristalliseer om ftalofel-L-fenielalanielantranielsuurmetielester (88) (385 mg) te lewer. Smeltpunt 135°C , ν_{maks} 3270, 1780, 1720, 1700 en 1600 cm^{-1} [Gevind : M^+ 428, C : 69.9%; H : 4.65% en N : 6.41%. Bereken vir $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$: M^+ 428, C : 70.08%; H : 4.71% en N : 6.54%].

10.2.3 Die sintese van formiel- β -alaniel-L-prolienmetielester (89) :

Formiel- β -alaniel (234 mg) en L-prolienmetielesterhydrochloried (330 mg) is opgelos in etielasetaat (10 ml) en trietielamien (158 mg) is bygevoeg. D.s.k. (750 mg) is by 0°C bygevoeg en die suspensie is dertig minute lank by 0°C geroer. Na nog twaalf uur by kamertemperatuur is die gevormde disikloheksielurea afgefiltreer en die etielasetaat gewas met 'n kalium-

karbonaatoplossing (3 x 15 ml), verdunde soutsuur (2 x 15 ml) en gedistilleerde water (15 ml) en gedroog (natriumsulfaat). Indamping van die oplosmiddel het formiel- β -alaniël-L-proliënmetielester (89) as 'n liggeel olie, wat nie gekristalliseer kan word nie, gelewer. ν_{maks} 3440, 1740, 1690 en 1650 cm^{-1} [Gevind M^+ 228.113. Bereken vir $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4 : M^+$ 228.111]. Hidrolise met kaliumhidroksied in dioksaan het die coreenkomstige suur (ν_{maks} 3440, 1710, 1690 en 1640 cm^{-1} , M^+ 214) gelewer wat nie volledig gekarakteriseer is nie aangesien dit nie geskik was vir die doel (bereiding van die formiel- β -alaniëlproliënsuurchloried) waarvoor dit berei is nie.

10.2.4 Sintese van 5-metoksiantranofel-L-feniëlalaniënmetielester (87) :

5-Metoksi-2-nitrobensoësuur (1.75 g) is opgelos in tionieëlchloried (75 ml) en twee uur lank onder terugvloei verhit. Die oplosmiddel is afgedamp, die residu opgeneem in chloroform (10 ml) en drupsgewys gevoeg by 'n yskoue oplossing van L-feniëlalaniënmetielesterhidrochloried (4 g) en trietiëlamien (4.5 ml) in chloroform (100 ml). Die mengsel is dertig minute by 0°C en drie uur lank by kamertemperatuur geroer. Die chloroform is gewas met verdunde ammoniumhidroksied (10 x 50 ml), verdunde soutsuur (3 x 50 ml) en water (100 ml) en gedroog (natriumsulfaat). Die oplosmiddel is afgedamp en die bruin olie (1.64 g ν_{maks} 3460, 1730, 1660 en 1595 cm^{-1}) is opgeneem in etielasetaat. Palladium op koolstof katalis (2 g, 10%) is bygevoeg en die mengsel is vier-en-twintig uur lank (totdat geen verdere waterstofopname waargeneem is nie) by een atmosfeer druk gehidrogeneer. Die katalis is deur filtrasie verwyder en die oplosmiddel is afgedamp. Die residu is opgeneem in chloroform en met soutsuur (50%, 8 x 50 ml) geëkstraheer. Die suurfraksies is gekombineer, geneutraliseer (natriumbikarbonaat) en met chloroform geëkstraheer. Afdamping van die chloroform het 5-metoksiantranofel-L-feniëlalaniënmetielester (87) as 'n olie, wat nie gekristalliseer kon word

nie, gelewer. ν_{maks} 3440, 3360, 1730, 1660 en 1600 cm^{-1} [Gevind M^+ 328.144.
Bereken vir $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$: M^+ 328.142].

10.2.5 Sintese van β -nitropropioniel-L-prolien (90) : β -Nitropropioonsuur

(618 mg), L-prolienmetielesterhydrochloried (906 mg) en trietielamien (606 mg) is opgelos in chloroform (100 ml) en die oplossing afgekoel tot 0°C . D.s.k. (1.236 g) is stadig by die oplossing gevoeg. Die oplossing is dertig minute by 0°C en ses uur lank by kamertemperatuur geroer. Die gevormde disikloheksielurea is afgefiltreer en met chloroform (25 ml) gewas. Die filtraat is gewas met verdunde ammoniumhidroksied (10 ml), verdunde soutsuur (10 ml) en water (2 x 10 ml) en gedroog (natriumsulfaat). Die oplosmiddel is afgedamp en die residuele olie (1.32 g, ν_{maks} 3440, 1750, 1660 en 1560 cm^{-1}) vier-en-twintig uur lank met soutsuur (1 ml, gekonsentreerd) in dioksaan (10 ml) by kamertemperatuur gehidroliseer. 'n Oormaat natriumkarbonaat-oplossing is bygevoeg en die mengsel met chloroform (4 x 20 ml) geëkstraheer. Die waterige fase is met soutsuur aangesuur en twee uur lank kontinueerlik met chloroform geëkstraheer. Indamping van die chloroform en kristallisasie van die residu uit metanol/chloroform het β -nitropropioniel-L-prolien (90) (745 mg) gelewer. Smeltpunt 164°C , ν_{maks} 3340 (breed) 1715, 1650 en 1560 cm^{-1} [Gevind : C : 44.2% ; H : 5.6% ; N : 12.6 % . Bereken vir $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$: C : 44.4% ; H : 5.6% ; N : 12.95%] .

10.2.6 Sintese van β -alaniel-L-protiel-5-metoksiantranofel-L-feniellalanien

(85) : β -Nitropropioniel-L-prolien (89) (442 mg) in oksalielchloried (10 ml) is dertig minute lank onder terugvloei verhit. Die oplosmiddel is afgedamp, die suurchloried in chloroform (6 ml) opgeneem en drupsgewys gevoeg by 'n yskoue oplossing van 5-metoksiantranofel-L-feniellalanienmetielester (87), (56 mg) en trietielamien (230 mg) in chloroform (10 ml). Die reaksiemengsel

is 'n verdere vier-en-twintig uur by 0°C geroer voordat die chloroform-oplossing met verdunde ammoniumhidroksied (5 ml), verdunde soutsuur (5 ml), en water (2 x 20 ml) gewas en gedroog (natriumsulfaat) is. Indamping van die chloroform het 'n bruin olie (378 mg) gelewer wat in benseen opgeneem en oor silikagel (20 g) gechromatografeer is. Die kolom is ontwikkel met benseen en benseen/chloroform mengsels (4 : 1 → 1 : 1, 1 l.) Die hoofkomponent, β-nitropropioniel-L-proliel-5-metoksiantranofiel-L-fenielalanienmetielester (305 mg) (91) (v_{maks} 1740, 1660 en 1658 cm^{-1} , M^+ 526) is met chloroform geëlueer as 'n kleurlose olie wat nie gekristalliseer kon word nie.

Bogenoemde ester (91) (250 mg) is vier-en-twintig uur lank met soutsuur (5 ml, gekonsentreerd) in dioksaan (5 ml) by kamertemperatuur gehidroliseer. Die reaksiemengsel is met chloroform (3 x 30 ml) geëkstraheer en die chloroform met 'n versadigde natriumbikarbonaatoplossing (2 x 8 ml) geëkstraheer. Die natriumbikarbonaatoplossing is aangesuur en met chloroform (3 x 30 ml) geëkstraheer. Die chloroform is ingedamp en die β-nitropropioniel-L-proliel-5-metoksiantranofiel-L-fenielalanien (185 mg) is in metanol (10 ml) opgeneem. Palladium op koolstof katalis (10%, 100 mg) is bygevoeg en die mengsel by een atmosfeer druk gehidrogeneer. Die katalis is afgefiltreer en die filtraat ingedamp. Kristallisasie van die residu uit metanol/chloroform het β-alanien-L-proliel-5-metoksiantranofiel-L-fenielalanien (85) (103 mg) gelewer. Smeltpunt 185° v_{maks} 3430, 1730, 1675, 1640 en 1600 cm^{-1} [Gevind : C : 62.0%; H : 6.1%; N : 11.3%. Bereken vir $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_6$: C : 62.2%; H : 6.3%; N : 11.6%].

10.2.7 Sintese van 5-metoksiantranofiel-L-fenielalanien-L-prolienmetielester

(94) : 2-Nitro-5-metoksibensoësuur (66 mg) in tionielchloried (10 ml) is twee uur lank onder terugvloei verhit. Die oplosmiddel is afgedamp, die

residu opgeneem in chloroform (2 ml) en trietielamien (67 mg) is bygevoeg. Hierdie oplossing is drupsgewys gevoeg by 'n yskoue suspensie van L-fenielalanien-p-nitrofenielesterhidrobromied (125 mg) in chloroform (2 ml). Die oplossing is dertig minute lank by 0°C geroer voordat L-prolienmetielesterhidrochloried (55 mg) en trietielamien (34 mg) bygevoeg is. Na twaalf uur by kamertemperatuur is die oplossing verdun met chloroform (30 ml) en gewas met 'n kaliumkarbonaatoplossing (6 x 15 ml), verdunde soutsuur (2 x 15 ml) en water (30 ml) en gedroog (natriumsulfaat). Die oplosmiddel is afgedamp en die residu (155 mg, ν_{maks} 3420, 1740, 1670, 1635, 1600 en 1580 cm^{-1}) opgeneem in etielasetaat (10 ml). Palladium op koolstof katalis (150 mg, 10%) is bygevoeg en die oplossing is vier uur lank by atmosferiese druk gehidrogeneer. Die katalis is afgefiltreer en die oplosmiddel afgedamp. Die residu is in chloroform (10 ml) opgeneem en met soutsuur (6N, 8 x 10 ml) geëkstraheer. Die gekombineerde suurfraksië is geneutraliseer en met chloroform geëkstraheer. Indamping van die chloroform het 5-metoksiantranseel-L-fenielalaniel-L-prolienmetielester (94) (120 mg) as 'n bruin olie, wat nie gekristalliseer kon word nie, gelever. ν_{maks} 3410, 1740, 1680, 1640 en 1602 cm^{-1} [Gevind M^+ 425.195. Bereken vir $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$: M^+ 425.195].

10.2.8 Bereiding van formiel-L-fenielalaniel-antranseel- β -alanienmetielester

(95) : o-Nitrobensoësuur (417 mg) in tionielchloried (10 ml) is twee uur lank onder terugvloei verhit. Die oplosmiddel is afgedamp, die residu opgeneem in chloroform (5 ml) en stadig by 'n yskoue oplossing van β -alanienmetielesterhidrochloried (103 g) en trietielamien (500 mg) in chloroform (10 ml) gevoeg. Die oplossing is vier uur lank by kamertemperatuur geroer, gewas met 'n kaliumkarbonaatoplossing (4 x 15 ml), verdunde soutsuur (2 x 15 ml) en water (30 ml) en gedroog (natriumsulfaat). Die oplosmiddel

is afgedamp en die residu (412 mg) opgeneem in etielasetaat. Platienoksied (60 mg) is bygevoeg en die oplossing drie uur lank by atmosferiese druk gehidrogeneer. Die katalis is afgefiltreer en die oplosmiddelafgedamp. Die residu is oor 'n silikageldunlaagplaat gechromatografeer (chloroform as vloeibare fase) en die blou fluoesserende band met R_f 0.5 is met metanol geëluëer. Kristallisasie uit eter lewer antranofel- β -alanienmetielester (98) (250 mg) Smeltpunt 56°C , ν_{maks} 3460, 3360, 1730, 1650 en 1600 cm^{-1} [Gevind M^+ 222.101. Bereken vir $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3$: M^+ 222.100].

Antranofel- β -alanienmetielester (97) (208 mg) en formiel-L-feniel-alanien-p-nitrofenielester (314 mg) is opgelos in chloroform (10 ml) en drie dae lank by kamertemperatuur geroer. Die chloroform is gewas met 'n kalium-karbonaatoplossing (4 x 15 ml), verdunde soutsuur (2 x 15 ml) en water (30 ml) en gedroog (natriumsulfaat). Die chloroform is afgedamp om formiel-L-fenielalaniel-antranofel- β -alanienmetielester (95) as 'n liggeel olie te lewer. ν_{maks} 3420, 3360, 1730, 1690, 1650 en 1601 cm^{-1} [Gevind M^+ 397.162. Bereken vir $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$: M^+ 397.164].

10.2.9 Sintese van formiel-L-fenielalaniel-L-prolienmetielester (96) en verwydering van die formielgroep : Formiel-L-fenielalanien-p-nitrofenielester (2.36 g), L-prolienmetielesterhidrochloried (1 g) en trietielamien (3.5 ml) is opgelos in chloroform (40 ml). Na twee dae by kamertemperatuur is die oplossing gewas met verdunde ammoniumhidroksied (5 x 30 ml), verdunde soutsuur (2 x 30 ml) en gedistilleerde water (60 ml) en gedroog. Afdamping van die chloroform het formiel-L-fenielalaniel-L-prolienmetielester (96) (1.79 g) as 'n kleurlose olie gelewer. ν_{maks} 3420, 1740, 1690, 1640 en 1600 cm^{-1} [Gevind M^+ 304.142. Bereken vir $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$: M^+ 304.142].

... (19) ...
 ... (20) ...
 ... (21) ...
 ... (22) ...
 ... (23) ...
 ... (24) ...
 ... (25) ...
 ... (26) ...
 ... (27) ...
 ... (28) ...
 ... (29) ...
 ... (30) ...

... (31) ...
 ... (32) ...
 ... (33) ...
 ... (34) ...
 ... (35) ...
 ... (36) ...
 ... (37) ...
 ... (38) ...
 ... (39) ...
 ... (40) ...

... (41) ...
 ... (42) ...
 ... (43) ...
 ... (44) ...
 ... (45) ...
 ... (46) ...
 ... (47) ...
 ... (48) ...
 ... (49) ...
 ... (50) ...

Hierdie ester (96) is opgelos in absolute metanol (10 ml) wat gekonsentreerde soutsuur (1 ml) bevat en die oplossing twee dae lank by kamertemperatuur gelaat. Die oplosmiddel is afgedamp, die residu opgeneem in chloroform en gewas met 'n versadigde natriumbikarbonaatoplossing. Indamping van die chloroform lewer L-fenielalaniël-L-prolienmetielester (1.5 g) as 'n kleurlose olie met v_{maks} 3425, 1738, 1645 en 1600 cm^{-1} . Selfs by kamertemperatuur vind siklisasie vinnig plaas om die kristallyne L-fenielalaniël-L-proliël-diketopiperasien (97) te lewer. Na kristallasie uit metanol/eter het hierdie verbinding: Smeltpunt 138°C v_{maks} 3400, 1680, 1660 en 1600 cm^{-1} . [Gevind M^+ 244.123. Bereken vir $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: M^+ 244.121].

VERWYSINGS

1. M. Woronin, Botan. Z., 49, 81 (1891).
2. J. Forgacs, Feedstuffs, 34, 124 (1962).
3. A. Stoll, Fortsch. Chem. Org. Naturstoffe, 9, 114 (1952).
4. A. Stoll, H. Hoffman, Helv. Chim. Acta, 26, 1570 (1943).
5. J. Forgacs, W.T. Carl, Adv. in Vet. Sci., 7, 273 (1962).
6. A.Z. Joffe in "Mycotoxins in Foodstuffs", red. G. Wogan, M.I.T. Press, Massachusetts (1965), bl. 77.
7. A.Z. Joffe, Plant Soil, 8, 31 (1963).
8. J.C. Percival, New Zealand J. Agr. Res., 2, 1041 (1959).
9. R.L.M. Synge, E.P. White, Chem. & Ind. 1546 (1959).
10. D.P. Rainey, E.B. Smalley, M.H. Crump en F.M. Strong, Nature, 205, 203 (1965).
11. M. Miyake, M. Saito, M. Enomoto, T. Shikato, T. Ishiko, K. Uruguchi, F. Sakai, T. Tatsuno, M. Tsukioka, Y. Sakai, Acta. Path. Jap., 10, 75 (1960).
12. K. Uruguchi, F. Sakai, M. Tsukioka, Y. Sakai, O. Yonemitsu, H. Ito, M. Miyake, M. Saito, M. Enomoto, T. Shikata, T. Ishiko, T. Tatsuno, Jap. J. Exp. Med., 31, 19 (1961).
13. C. Isaacson, S.A. Med. J., 40, 11 (1966) en verwysings daarin gemeld.
14. A.G. Oettlé, J. Nat. Cancer Inst., 33, 383 (1964).
15. P.C. Spensley, Endeavour, 22, 75 (1963).
16. T. Asao, G. Buchi, M.M. Abdel-Kader, S.B. Chang, E.L. Wick, G.N. Wogan, J. Am. Chem. Soc., 85, 1706 (1963).
17. E.L. Wick, G.N. Wogan, T. Asao, G. Buchi, M.M. Abdel-Kader, S.B. Chang, J. Am. Chem. Soc., 87, 882 (1965).

- 1. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 1-10.
- 2. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 11-20.
- 3. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 21-30.
- 4. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 31-40.
- 5. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 41-50.
- 6. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 51-60.
- 7. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 61-70.
- 8. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 71-80.
- 9. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 81-90.
- 10. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 91-100.
- 11. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 101-110.
- 12. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 111-120.
- 13. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 121-130.
- 14. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 131-140.
- 15. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 141-150.
- 16. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 151-160.
- 17. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 161-170.
- 18. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 171-180.
- 19. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 181-190.
- 20. Journal of the American Medical Association, 1950, 143: 191-200.

18. R.D. Hartley, B.F. Nesbitt, J. O'Kelly, Nature, 198, 1056 (1963).
19. D.A. v. Dorp, Rec. trav. Chim. Pays-Bas, 82, 587 (1963).
20. C.W. Holzapfel, P.S. Steyn, I.F.H. Purchase, Tetrahedron Letters, 25, 2799 (1966).
21. W.H. Butler, Brit. J. Cancer, 18, 756 (1964).
22. F. Dickens, H.E.H. Jones, ibid., 17, 691 (1963).
23. De B. Scott, Mycopath. et Mycolog. Appl., 25, 213 (1965).
24. L. Gouws, Vorderingsverslag van die W.N.N.R. Mikrobiologiese navorsingsgroep, 16 November 1966 - 15 Mei 1967.
25. K.J.v.d. Merwe, P.S. Steyn, L. Fourie, De B. Scott, J.J. Theron, Nature, 205, 1112 (1965); P.S. Steyn, C.W. Holzapfel, Tetrahedron, 23, 4449 (1967).
26. C.W. Holzapfel, Tetrahedron, 24, 2101, (1968).
27. C.W. Holzapfel, I.F.H. Purchase, P.S. Steyn, L. Gouws, S.A. Med. J., 40, 1100 (1966).
28. E. Bullock, J.C. Roberts, J.G. Underwood, J.C.S., 4179 (1962).
29. R.K. Ladish, Proc. Penn. Acad. Sci., 38, 144 (1964).
30. L.V. Putilina, E.G. Robachevskaya, C.A., 66, 108031n (1967).
31. P.J. Brook, E.P. White, Ann. rev. Phytopath., 4, 171 (1966).
32. D.F.G. Pusey & J.C. Roberts, J.C.S., 3542 (1963).
33. T. Hamasaki, Y. Hatsuda, N. Terashima, M. Renbutsu, Agr. Biol. Chem., 29, 166, 696 (1965);
T. Hamasaki, Y. Hatsuda, N. Terashima, M. Renbutsu, Agr. Biol. Chem., 31, 11 (1967).
34. J.S.E. Holker, S.A. Kagal, L.J. Mulheirn, P.M. White, Chem. Comm., 24, 911 (1966).
35. J.C. Roberts & P. Roffey, J.C.S., 3666 (1965).

1. ... (1987).

2. ... (1987).

3. ... (1987).

4. ... (1987).

5. ... (1987).

6. ... (1987).

7. ... (1987).

8. ... (1987).

9. ... (1987).

10. ... (1987).

11. ... (1987).

12. ... (1987).

13. ... (1987).

14. ... (1987).

15. ... (1987).

16. ... (1987).

17. ... (1987).

18. ... (1987).

19. ... (1987).

20. ... (1987).

21. ... (1987).

22. ... (1987).

23. ... (1987).

24. ... (1987).

25. ... (1987).

26. ... (1987).

27. ... (1987).

28. ... (1987).

29. ... (1987).

30. ... (1987).

31. ... (1987).

32. ... (1987).

33. ... (1987).

34. ... (1987).

35. ... (1987).

36. ... (1987).

37. ... (1987).

38. ... (1987).

39. ... (1987).

40. ... (1987).

41. ... (1987).

42. ... (1987).

43. ... (1987).

44. ... (1987).

45. ... (1987).

46. ... (1987).

47. ... (1987).

48. ... (1987).

49. ... (1987).

50. ... (1987).

36. J.M. Brown, Tetrahedron Letters, 2215 (1964).
37. R.J. & P.F. Highet, J. Org. Chem., 30, 902 (1964).
38. W.H. Baarschers, S.A. Chem. Proc. 2, 111 (1967).
39. K.G.R. Pachler, R.R. Arndt, W.H. Baarschers, Tetrahedron 21, 2159 (1965).
40. W.H. Baarschers & K.G.R. Pachler, Tetrahedron Letters, 3451 (1965).
41. E.C. Hanekom, D.Sc.-verhandeling U.O.V.S. (1967) bl. 83.
42. K.J. v/d Merwe, L. Fourie & de B. Scott, Chem. & Ind. 829 (1963).
43. P.S. Steyn, Ph.D.-verhandeling, U.N.I.S.A. (1966).
44. H. Budzikiewicz, J.M. Wilson, C. Djerassi, J. Am. Chem. Soc., 85, 3688 (1963).
45. P. Roffey & M.V. Sargent, Chem. Comm., 24, 913 (1966).
46. P. Roffey & M.V. Sargent, J.C.S., 2328 (1967).
47. P. Brown & C. Djerassi, Angew. Chem., 79, 481 (1967).
48. F. Komitsky, J.E. Gurst, C. Djerassi, J. Am. Chem. Soc., 87, 1398 (1965).
49. C. Djerassi, A.M. Duffield, F. Komitsky, L. Tökes, J. Am. Chem. Soc., 88, 860 (1966).
50. H. Audier, J.F. Dupin, M. Fetison, Y. Happilliard, Tetrahedron Letters, 2077, (1966).
51. C.P. Whittle, Tetrahedron Letters, 33, 3689 (1968).
52. J.S. Shannon, Aust. J. Chem., 15, 265 (1962).
53. J.H. Beynon, A.E. Williams, Appl. Spec. 14, 156 (1960).
- J.H. Beynon, G.R. Lester, A.E. Williams, J. Phys. Chem., 63, 1861 (1959).
54. K.L. Williamson & W.S. Johnson, J. Am. Chem. Soc., 83, 4623 (1961).
55. L.M. Jackman, Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, Pergamon (1959) bl. 55.
56. H. Lee, J.K. Wilmshurst, Aust. J. Chem. 19, 1529 (1966).

57. M.H.C. Flett, J.C.S., 1441 (1948).
58. H. Bloom, L.H. Briggs, B. Cleverley, J.C.S., 178 (1959).
59. J.A. Balantine, C.T. Pillinger, Tetrahedron, 23, 1691 (1967);
A.L. Porte, J. Org. Chem., 28, 3216 (1963).
60. W.H. McFadden, M. Lounsbury, A.L. Wahrhaftig, Can. J. Chem., 36,
990 (1958).
61. W.H. McFadden, D.R. Black, J.W. Corse, J. Phys. Chem., 67, 1517 (1963).
62. C.G. McDonald, J.S. Shannon, S. Sugowalz, Tetrahedron Letters., 807
(1963).
63. C.F. Garbers, H. Schmid, P. Karrer, Helv. Chim Acta., 37, 1336 (1954).
64. F.V. Brutcher, W.B. Bauer, J. Am. Chem. Soc., 84, 2236 (1962).
65. W.A. Waters, Quart. Rev., 227 (1958).
66. P. Crabbe, W. Klyne, Tetrahedron 23, 3449 (1967).
67. P. Crabbe, "Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in
Organic Chemistry" Holden-Day, San Francisco (1965) bl. 3.
68. H. Brockmann, M. Legrand, Tetrahedron, 19, 3951 (1963).
69. R.A. Morton, W.T. Earlam, J.C.S., 159, (1941).
70. J.H. Birkinshaw, Biochem J., 59, 685 (1955).
71. I.R.C. Bick, A.J. Blockmann, R.O. Hellyer, D.H.S. Horn, J.C.S.,
3690 (1965).
- 72a J.D. Stevens, H.G. Fletcher, J. Org. Chem., 33, 1799, (1968).
- 72b R.F. Nutt, M.J. Dickenson, F.W. Holly, E. Walton, J. Org. Chem.,
33, 1789 (1968).
73. J.H. Birkinshaw, J.C. Roberts, P. Roffey, J.C.S., 855 (1966).
74. S. Gattenbeck, Acta Chem Scand., 12, 1211 (1958).
75. S. Gattenbeck, Acta Chem Scand., 14, 296 (1960).
76. J.S.E. Holker, Persoonlike mededeling.

(1901) 1000 1000 1000 1000 1000

(1902) 1000 1000 1000 1000 1000

(1903) 1000 1000 1000 1000 1000

(1904) 1000 1000 1000 1000 1000

(1905) 1000 1000 1000 1000 1000

(1906)

(1907) 1000 1000 1000 1000 1000

(1908) 1000 1000 1000 1000 1000

(1909)

(1910) 1000 1000 1000 1000 1000

(1911) 1000 1000 1000 1000 1000

(1912) 1000 1000 1000 1000 1000

(1913) 1000 1000 1000 1000 1000

(1914) 1000 1000 1000 1000 1000

(1915) 1000 1000 1000 1000 1000

(1916) 1000 1000 1000 1000 1000

(1917) 1000 1000 1000 1000 1000

(1918) 1000 1000 1000 1000 1000

(1919) 1000 1000 1000 1000 1000

(1920)

(1921) 1000 1000 1000 1000 1000

(1922) 1000 1000 1000 1000 1000

(1923)

(1924) 1000 1000 1000 1000 1000

(1925) 1000 1000 1000 1000 1000

(1926) 1000 1000 1000 1000 1000

(1927) 1000 1000 1000 1000 1000

77. A.I. Scott, M. Yalpani, Chem. Comm., 945 (1967).
78. S. Gattenbeck, Abstracts 5th I.U.P.A.C. Symposium on the Chemistry of Natural Products London (1968) bl. 114.
79. R.C. Ellis, W.B. Whalley, K. Ball, Chem. Comm., 16, 803 (1967).
80. B. Franck, F. Häper, D. Gröger, D. Erge, Chem. Ber., 101, 1955 (1968).
81. M. Biollaz, G. Büchi, G. Milne, J. Am. Chem. Soc., 90, 5019 (1968).
82. J.S.E. Holker & J.G. Underwood, Chem. & Ind., 1865 (1964).
83. H.J. Burkhardt, J. Forgacs, Tetrahedron, 24, 717 (1968).
84. J.V. Rodricks, E. Lustig, A.D. Campbell, L. Staloff, K.R. Henery-Logan, Tetrahedron Letters, 25, 2975 (1968).
85. J.F. Grove & H.A. Willis, J.C.S., 877 (1951); L.A. Duncanson, J.F. Grove, J. Zeally, J.C.S., 1331 (1953).
86. W.R. Logan, G.T. Newbold, J.C.S., 1946 (1957).
87. W.D. Chandler, W. McFarlane Smith, R.Y. Moir, Can. J. Chem., 42, 2549 (1964).
88. L.J. Bellamy, "The Infrared Spectra of Complex Molecules" Methuen, London (1958) bl. 128.
89. D.H. Williams, N.S. Bhacca, Tetrahedron, 21, 2021 (1965).
90. G. Di Maio, P.A. Tardella, C. Tavarone, Tetrahedron Letters, 25, 2825 (1966).
92. J.H. Bowie, D.W. Cameron, P.E. Schütz, D.H. Williams, Tetrahedron, 22, 1711 (1966).
93. R. Grigg, J.A. Knight, P. Roffey, Tetrahedron, 22, 3301 (1966).
94. E. Hardegger, E. Widmer, K. Steiner, A. Pfiffner, Helv. Chim. Acta, 47, 2031 (1964).
95. W.M. Radionaw, S.J. Kanewskaya, A.B. Dewankoff, Chem. Ber., 1623 (1933).
96. W.J. Horton, J.T. Spence, J. Am. Chem. Soc., 80, 2453 (1958).

97. A.I. Scott, "Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products" Pergamon, Oxford (1964) bls. 109-115.
98. J.H. Birkinshaw, H. Raistrick, D.J. Ross, C.E. Stickings, Biochem I., 50, 610 (1952).
99. J.H. Birkinshaw, P. Chaplen, R. Lahoz-Oliver, Biochem J., 67, 155 (1957).
100. C.A. Buechler, T.A. Powers, J.G. Michels, J. Am. Chem. Soc., 66, 417 (1944).
101. J. Blair, J.J. Brown, G.T. Newbold, J.C.S., 708 (1955).
102. F. Feigl, "Spot tests in Organic Analysis" Elsevier, London (1956), bls. 185-188.
103. J.F. Grove, Biochem. J., 50, 648 (1952).
104. I.M. Campbell, C.H. Calzadilla, M.J. McCorkindale, Tetrahedron Letters, 42, 5107 (1966).
105. O.C. Musgrave, J.C.S., 4301 (1956).
106. D. Fennell, K.B. Roper, F.H. Stodola, Chem. & Ind., 1382 (1959).
107. A.J. Birch, O.C. Musgrave, R.W. Rickards, H. Smith, J.C.S., 3146 (1959).
108. K.B. Wiberg, "Oxidation in Organic Chemistry", Academic Press, London, (1965) Hoofst. 5.
109. D.R. Harvey, R.O.C. Norman, J.C.S., 4860 (1964).
110. M. Bodanzky en V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 81, 5688 (1959).
111. V. du Vigneaud, C. Ressler, J.M. Swan, C.W. Roberts en P.J. Katsoyannis, J. Am. Chem. Soc., 76, 3115 (1954).
112. M.E. Cox, H.G. Garg, J. Halloway, J.M. Hugo, P.M. Scopes en G.T. Young, J.C.S., 6806 (1965).
113. R.L.M. Synge, Biochem. J., 39, 363 (1945).
114. R. Schwyzer, P. Seiber, Helv. Chim. Acta., 40, 624 (1957).

115. R.A. Boissonnas, St. Guttman, P.A. Jaquenoud, J.P. Waller,
Helv. chim. acta, 39, 1421 (1956); M. Rothe, F.W. Kunitz,
Ann., 609, 88 (1957).
116. S. Braborek, J. Am. Chem. Soc., 86, 4477 (1964).
117. K. Hoffmann, H. Kappeler, A.E. Furlenmeier, M. Wooner, E.T. Schwarz,
T.A. Thomson, J. Am. Chem. Soc., 79, 1641 (1957).
118. T. Wieland, W. Schön, Ann., 593, 157 (1953); T. Wieland, H.W.
Schnabel, Ann., 657, 225 (1962).
119. Y. Sumiki, K. Miyao, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 26, 27 (1952);
K. Miyao, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 24, 23 (1960).
120. L. Martini, A. Pecile, J. Endocrinal, 24, xi (1962).
121. S. Marumo, Y. Sumiki, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 29, 305 (1955);
S. Marumo, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 19, 258 (1955);
23, 428 (1959).
122. R. Schwyzer in "Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity"
ed. G.E.W. Walstenholme, Churchill Ltd, London (1958) bl. 171.
123. A.W. Miller, P.W.G. Smith, J.C.S., 2140 (1967).
124. G.W. Kenner, J.N. Turner, Chem. & Ind., 602 (1955).
125. K. Yashida, H. Oshima, H. Sasaki, Y. Takasuda, Mie. Med. J., 9, 31
(1959) en C.A. 54, 23019C (1960).
126. E.W. Yemm, E.C. Cocking, Analyst, 80, 209 (1955).
127. S. Moore, W.H. Stein, J. Biol. Chem., 176, 367 (1948).
128. R.J. Bloch, K.W. Weiss, "Amino Acid Handbook", C. Thomas, Illinois
(1956) bl. 78.
129. A.L. Levy, D. Chung, Anal. Chem., 25, 396 (1953).
130. R.J. Bloch, K.W. Weiss, "Amino Acid Handbook", C. Thomas, Illinois
(1956) bl. 99.

131. Indem., ibid. bl. 93.
132. Indem., ibid. bl. 122.
133. S. Moore, W.H. Stein, J. Biol. Chem., 192, 663 (1951).
134. M. Brenner, W. Huber, Helv. chim. acta., 36, 1109 (1953).
135. E. Taschner, C. Wasielewski, Ann., 640, 136 (1961).
136. A.I. Scott, "Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products" Pergamon, London (1964) bl. 109.
137. V. Froelicher, J.B. Cohen, Trans J.C.S., 119, 1425 (1921).
138. H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D.H. Williams, "Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds" Holden-Day, San Francisco (1964), bl. 195.
139. F.W. Mich, "Mass Spectrometry of Organic Ions" Academic Press, New York (1963), bl. 337.
140. K. Biemann, Angew. Chem., 74, 102 (1962).
141. F.W. McLafferty, R.S. Gohlke, Anal. Chem., 28, 935 (1956).
142. P. Griess, Ber., 11, 1729 (1878).
143. P.H. Beyer, Rec. Trav. Chim., 40, 621 (1921).
144. J.C. Graig, S.K. Roy, Tetrahedron, 21, 391 (1965).
145. A.F. Beechmann, Tetrahedron Letters, 9, 957 (1966).
146. E.W. Gill, Biochem. et Biophys. acta., 133, 381 (1967).
147. D. Balasubramanian, D.B. Wetlanfer, Conform. Biopolym. Pap. Int. Symp. Madras, 1, 147 (1967).
148. D.E. Nitecki, B. Halpern, J.W. Westley, J. Org. Chem., 33, 864 (1968).
149. E. Fisher, Ber., 34, 433 (1901); M. Goodman, K.C. Stueben, J. Am. Chem. Soc., 84, 1279 (1962).
150. T. Wieland, G. Leuben, H. Ottenheym, J. Faesel, J.X. de Vries, A. Prox, J. Schmid, Angew. Chem., 7, 204 (1968).

151. J.H. Jones, Quart. Revs., 22(3), 302 (1968).
152. J.P. Flikweert, W. Heerma, T.J. Penders, G. Dijkstra, J.F. Arens, Rec. trav. chim., 86, 293 (1967).
153. H.C. Beyerman et al. „Peptides” North Holland, Amsterdam (1967), bl. 131.
154. M. Pais, X. Monseur, X. Lunsinchi, R. Gautarel, Bull. Soc. chim. France, 817 (1964).
155. B.J. Millard, Tetrahedron Letters, 34, 3041 (1965).
156. K. Heyns, H.F. Grützmacher, Ann., 669, 189 (1963).
157. E. Schröder, K. Lübke, „The Peptides”, Vol. I, Academic Press, London, (1965).
158. H.N. Rydon, „Peptide Synthesis” Royal Inst. Chem., London, (1962).
159. T. Wieland, H. Determann, Angew. Chem., 7, 358 (1963).
160. M. Bodanszky, A. Bodanszky, Am. Scientist, 55, 2 (1967).
161. S. Guttman, Helv. chim. acta., 44, 721 (1961).
162. M. Brenner, W. Huber, Helv. chim. acta., 36, 1109 (1953).
163. R.B. Merrifield, D.W. Woolley, J. Am. Chem. Soc., 80, 6635 (1958); J.E. Shields, W.H. McGregor, F.H. Carpenter, J. Org. Chem., 26, 1491 (1961).
164. E. Schröder, K. Lübke, Ann., 655, 211 (1962).
165. L. Birkhofer, W. Konkal, A. Ritter, Angew. Chem., 71, 701 (1959).
166. J.H. Jones, B. Liberek, G.T. Young, J.C.S., 2371 (1967).
167. F. Weygand, W. Steglich, J. Bjarnason, Tetrahedron Letters, 29, 3483 (1966).
168. T.B. Windholz, D.B.R. Johnson, Tetrahedron Letters, 27, 2555 (1967).
169. T. Yamashita, J. Biochem (Tokio), 48, 651 (1960).

170. R.A. Boissonas, S. Guttman, P.A. Jaquenaud, Helv. chim. acta., 43, 1349 (1960).
171. F. Weygand, J. Kaelicke, Ber., 95, 1031 (1962).
172. P.J. Katsoyannis, J. Am. Chem. Soc., 83, 4053 (1961).
173. E. Taschner, C. Wasielewski, T. Sokolowska, J.F. Biernat, Ann., 646, 127 (1961).
174. L. Benoiton, H.N. Rydon, J.C.S., 3328 (1960).
175. J.C. Sheenan, D.D.H. Young, J. Am. Chem. Soc., 80, 1154 (1958).
176. F. Weygand, E. Csendes, Angew. Chem., 64, 136 (1952).
177. J. Sheenan, D.W. Chapman, R.W. Rath, J. Am. Chem. Soc., 74, 3822 (1952).
178. B.C. Barras, D.T. Elmore, J.C.S., 3134 (1957).
179. V. du Vigneaud, R. Dorfmann, H.S. Loring, J. Biol. Chem., 98, 577 (1932).
180. H. Zahn, W. Pätzold, Ber., 96, 2556 (1963).
181. W. Grassmann, E. Schulte-Uebbing, Ber., 83, 224 (1950).
182. V. du Vigneaud, O.K. Behrens, J. Biol. Chem., 117, 27 (1937).
183. M. Bergman, L. Zervas, Ber., 65, 1192 (1932).
184. S.G. Woley, J. Watson, J.C.S., 475 (1953).
185. J. Kovacs, R.L. Rodin, J. Org. Chem., 33, 2418 (1968).
186. D. Ben-Ishai, J. Org. Chem., 19, 62 (1954).
187. G.C. Stelakatos, D.M. Theodoropoulos, L. Zervas, J. Am. Chem. Soc., 81, 2884 (1959).
188. L. Vellaz, J. Amiard, R. Heymes, Bull. Soc. Chim. France, 201 (1955).
189. R. Schwyzer, B. Inselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel, H. Zuber, Helv. chim. acta., 46, 1975 (1963).
190. H.J. Haas, Ber., 94, 2442 (1961).

| | | |
|-----|---|-----|
| 101 | 1. The Role of the State in Economic Development | 101 |
| 102 | 2. The Role of the State in Economic Development | 102 |
| 103 | 3. The Role of the State in Economic Development | 103 |
| 104 | 4. The Role of the State in Economic Development | 104 |
| 105 | 5. The Role of the State in Economic Development | 105 |
| 106 | 6. The Role of the State in Economic Development | 106 |
| 107 | 7. The Role of the State in Economic Development | 107 |
| 108 | 8. The Role of the State in Economic Development | 108 |
| 109 | 9. The Role of the State in Economic Development | 109 |
| 110 | 10. The Role of the State in Economic Development | 110 |
| 111 | 11. The Role of the State in Economic Development | 111 |
| 112 | 12. The Role of the State in Economic Development | 112 |
| 113 | 13. The Role of the State in Economic Development | 113 |
| 114 | 14. The Role of the State in Economic Development | 114 |
| 115 | 15. The Role of the State in Economic Development | 115 |
| 116 | 16. The Role of the State in Economic Development | 116 |
| 117 | 17. The Role of the State in Economic Development | 117 |
| 118 | 18. The Role of the State in Economic Development | 118 |
| 119 | 19. The Role of the State in Economic Development | 119 |
| 120 | 20. The Role of the State in Economic Development | 120 |

191. J.C. Sheenan, V.J. Grenda, J. Am. Chem. Soc., 84, 2417 (1962).
192. J. Kapfhammer, A. Matthes, Z. Physiol Chem., 223, 43 (1933).
193. E. Fisher, Ber., 40, 1754 (1907).
194. G. Losse, G. Müller, Ber., 94, 2768 (1961).
195. M.T. Leplawy, D.S. Jones, G.W. Kenner, R.C. Sheppard, Tetrahedron, 11, 39 (1960).
196. C. Ressler, V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 76, 3107 (1954).
197. W.E. Savige, Aust. J. Chem., 14, 694 (1958); L. Levy, J. Prak. Chem., 70, 109 (1904).
198. T. Wieland, W. Schäfer, E. Bockelmann, Ann., 573, 99 (1951).
199. J.A. Farrington, G.W. Kenner, J.M. Turner, Chem. & Ind., 601 (1955).
200. M. Bodanszky, Acta. Chim. Acad. Sci. Hung., 10, 335 (1956).
201. R. Schwyzer, M. Feurer, B. Inselin, H. Kägi, Helv. chim. acta., 38, 80 (1955).
202. J.C. Sheenan, G.P. Hess, J. Am. Chem. Soc., 77, 1067 (1955).
203. H.G. Khorana, Chem. Rev., 53, 145 (1953).
204. M. Smith, J.G. Moffat, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 80, 1212 (1960).
205. H.A. Staab, Angew. Chem., 74, 407 (1962).
206. K.D. Kopple, D.E. Nitechki, J. Am. Chem. Soc., 83, 4103 (1961).
207. H. Gregory, J.S. Marley, J.C.S., 910 (1968).
208. H. Gregory, J.S. Marley, J.M. Smith, M.J. Smithers, J.C.S., 715 (1968).
209. A.W. Miller, P.W.G. Smith, J.C.S., 2140 (1967).
210. G.W. Kenner, J.J. Mendive, R.C. Sheppard, J.C.S., 761 (1968).
211. B. Belleau, G. Meleti, J. Am. Chem. Soc., 90, 1651 (1968).
212. F.H.C. Steward, Aust. J. Chem., 21, 477 (1968).
213. R.B. Woodward, R.A. Olofson, H. Mayer, Tetrahedron Suppl. 8 (1), 321 (1966).

214. E. Bayer, G. Jany, H. Hagenmoier, Tetrahedron, 24, 4853 (1968);
A. Marglin, R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 88, 5051 (1966).
215. S. Goldschmidt, M. Wick, Ann., 575, 217 (1952).
216. W. Grossmann, E. Wunsch, Ber., 91, 449 (1958).
217. D.T. Gish, V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 79, 3579 (1957).
218. J.R. Vaughan, J. Am. Chem. Soc., 73, 1389 (1951).
219. A. Neuberger, Advan. Protein Chem., 4, 297 (1948).
220. A. Morawiecki, I.Z. Siemion, K. Nowak, Roczniki Chem., 36, 983 (1962).
221. I.Z. Siemion, K. Nowak, Z. Kozorowski, ibid., 36, 1191 (1962).
222. J.A. Maclaren, W.E. Savige, Aust. J. Chem., 11, 345 (1958);
M. Bodanszky, A. Bodanszky, Chem. Comm., 591 (1967).
223. E. Schnabel, H. Zahn, Ann., 614, 141 (1958).
224. F. Weygand, A. Prox, W. König, Ber., 99, 1451 (1966).
- 225a. E. Schröder, K. Lübke, "The Peptides" Vol. I, Academic Press, London
1965, bl. 325.
- 225b. R. Schwyzer, T.K. Aung, Helv. chim. acta., 45, 859 (1963).
226. P.R. Enslin, S. Rehm, D.E.A. Rivett, J. Sci. Food Agr., 12, 673
(1957).
227. J.E. Davies, D. Kirkaldy, J.C. Roberts, J.C.S., 2169 (1960).
228. R. Pschorr, Ann., 391, 28 (1912).
229. P. de Mayo, "Molecular Rearrangements" Vol. I, Interscience Publishers
New York (1963), bl. 459.
230. W.J. Hale, E.M. Honan, J. Am. Chem. Soc., 41, 775 (1919).
231. I. Muramatsu, A. Hagitani, Nippon Kagada Zasshi, 80, 1497 (1959);
C.A., 55, 6394g (1961).
232. E. Fischer, W. Schoelker, Ann., 357, 10 (1907).

| | | |
|------|------|------|
| 1000 | 1000 | 1000 |
| 1001 | 1001 | 1001 |
| 1002 | 1002 | 1002 |
| 1003 | 1003 | 1003 |
| 1004 | 1004 | 1004 |
| 1005 | 1005 | 1005 |
| 1006 | 1006 | 1006 |
| 1007 | 1007 | 1007 |
| 1008 | 1008 | 1008 |
| 1009 | 1009 | 1009 |
| 1010 | 1010 | 1010 |
| 1011 | 1011 | 1011 |
| 1012 | 1012 | 1012 |
| 1013 | 1013 | 1013 |
| 1014 | 1014 | 1014 |
| 1015 | 1015 | 1015 |
| 1016 | 1016 | 1016 |
| 1017 | 1017 | 1017 |
| 1018 | 1018 | 1018 |
| 1019 | 1019 | 1019 |
| 1020 | 1020 | 1020 |
| 1021 | 1021 | 1021 |
| 1022 | 1022 | 1022 |
| 1023 | 1023 | 1023 |
| 1024 | 1024 | 1024 |
| 1025 | 1025 | 1025 |
| 1026 | 1026 | 1026 |
| 1027 | 1027 | 1027 |
| 1028 | 1028 | 1028 |
| 1029 | 1029 | 1029 |
| 1030 | 1030 | 1030 |
| 1031 | 1031 | 1031 |
| 1032 | 1032 | 1032 |
| 1033 | 1033 | 1033 |
| 1034 | 1034 | 1034 |
| 1035 | 1035 | 1035 |
| 1036 | 1036 | 1036 |
| 1037 | 1037 | 1037 |
| 1038 | 1038 | 1038 |
| 1039 | 1039 | 1039 |
| 1040 | 1040 | 1040 |
| 1041 | 1041 | 1041 |
| 1042 | 1042 | 1042 |
| 1043 | 1043 | 1043 |
| 1044 | 1044 | 1044 |
| 1045 | 1045 | 1045 |
| 1046 | 1046 | 1046 |
| 1047 | 1047 | 1047 |
| 1048 | 1048 | 1048 |
| 1049 | 1049 | 1049 |
| 1050 | 1050 | 1050 |

233. M. Goodman, K.C. Stueben, J. Am. Chem. Soc., 81, 3980 (1959).
234. H. Finkelstein, Ber., 43, 1528 (1910).
235. O. Silberad, J.C.S., 611 (1904).
236. H. Raistrick, A. Stössl, Biochem J., 68, 647 (1958).
237. N. Kornblum, B. Taub, H. Ungnade, J. Am. Chem. Soc., 76, 3209 (1954).
238. R.C. Weast, S.M. Selby, "Handbook of Chemistry and Physics",
The Chemical Rubber Co. (1966), bl. C - 121.
-