

Recherches Toxicologiques sur les Substances Toxiques de *Fusarium nivale*: Etude Chimique des Toxins Principales, Nivalenol, Fusarenon-X et Nivalenol-4,15-di-O-acétate

YASUO FUJIMOTO, YUKO MORITA et TAKASHI TATSUNO

L'Institute de la Recherche Physique et Chimique¹⁾

(Reçu le 24 Novembre, 1971)

The chemical structures of nivalenol, fusarenon-X and diacetylnivalenol, toxic principles produced by *Fusarium nivale* Fn-2-B, have been confirmed as 3 α ,4 β ,7 α ,15-tetrahydroxy-scirp-9-en-8-one, 3 α ,7 α ,15-trihydroxy-4 β -acetoxy-scirp-9-en-8-one and 3 α ,7 α -dihydroxy-4 β ,15-diacetoxy-scirp-9-en-8-one respectively by the interconnection with the scirpene type compounds and their physico-chemical properties. The some aspects with respect to ketoform and non-keto-form on C-8-carbonyl of nivalenol were described. The mass spectrometric fragmentation processes of nivalenol and its derivatives were also described.

Dans une publication antérieure, nous avons décrit l'isolement du nivalenol,²⁾ du fusarenon-X,³⁾ du nivalenol-diacétate⁴⁾ à partir de riz moisi et du milieu de culture de Czapek additionné de 1% de peptone. En même temps, nous avons montré que ces substances provoquent des lésions graves de la cellule des tissus en prolifération, c'est-à-dire des lésions radiomimétiques⁵⁾ quand on les administre à la souris et au rat par la voie intrapéritonéale, buccale ou sous-cutanée.

Nous allons maintenant décrire les recherches chimiques que nous avons effectuées et discuter quelques aspects de nos résultats.

I. Détermination de la Structure Chimique

i) **Nivalenol**—Le nivalenol récrystallisé par le méthanol est obtenu sous forme de cristaux en aiguilles, incolores, mais sans point de fusion précis. L'examen de bande de vibration de valance de l'hydroxyle nous présente une absorption importante et large, et le résultat nous fait supposer que le cristal contient beaucoup de méthanol.

Quand on sèche le cristal à 80—90° en présence de P₂O₅ pendant une journée, le poids devient constant et le point de fusion est 223—225° (decomp.).

Il présente des bandes caractéristiques en infra-rouge (IR): $\nu_{3500-3200}$, $\nu_{C=O}$ 1675 et $\nu_{C=O}$ 1615 cm⁻¹.

Le spectre de masse et l'analyse élémentaire nous suggère que le poids moléculaire est de 312 et la formule moléculaire C₁₅H₂₀O₇.

TABLEAU I(a). IR (KBr, cm⁻¹) et UV (méthanol, m μ (ϵ))

	IR	UV
niv.	3300—3500, 1675, 1615	218 (7500)
fus. -X	3400, 1715, 1680	220 (6500)
Di-Ac-niv.	3516, 1735, 1720, 1680	220 (6200)
Tétra-Ac-niv.	1740, 1685	227 (7900)

1) Location: *Wako-shi, Saitama*.

2) T. Tatsuno, M. Saito, M. Enomoto et H. Tsunoda, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **16**, 2519 (1968).

3) Y. Ueno, I. Ueno, T. Tatsuno, K. Ohokubo et H. Tsunoda, *Experientia*, **25**, 1062 (1969).

4) T. Tatsuno, Y. Morita, H. Tsunoda et M. Umeda, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **18**, 1485 (1970).

5) T. Tatsuno, *J. Jap. Biochem. Soc.*, **41**, 153 (1969).

En considérant les résultats des mesures physico-chimiques que nous rassemblons dans le tableau I, nous présumons qu'il y a des groupes de $\text{CH}_3\text{-C-}$, $\text{CH}_3\text{-CH=CH-}$, et O=C-C=C- .

TABLEAU I(b): RMN de Nivalenol et ses Acétates (δ , ppm) (J = cps)

	C_2	C_3	C_4	C_7	C_{10}	C_{11}	C_{13}	C_{14}	C_{15}	C_{16}	OAc	J_{2-3}	J_{3-4}
niv. ^{a)}	3.50 (1H, d, $J=6$)	^{b)} —	4.37 (1H, d, $J=3$)	4.70 (1H, s)	6.58 (1H, dd, $J=5, 1$)	4.57 (1H, d $J=5$)	2.87 2.97 (chaque 1H, d, $J=5$)	0.95 (3H, s)	3.64 (2H, d, $J=5$)	1.77 (3H, d, $J=1$)	—	5 ^{b)}	3 ^{b)}
fus- X ^{c)}	3.38 (1H, d, $J=6$)	4.38 (1H, dd, $J=6.3$)	5.62 (1H, d, $J=3$)	4.88 (1H, s)	6.73 (1H, dd, $J=6.15$)	4.84 (1H, d, $J=6$)	3.08 3.14 (chaque 1H, d, $J=4$)	1.10 (3H, s)	3.63 4.06 (chaque 1H, d, $J=12$)	1.93 (3H, d, $J=1.5$)	2.17 (3H, s)	6	3
Di-Ac- niv. ^{c)}	3.85 (1H, d, $J=5$)	4.27 (1H, dd, $J=5.3$)	5.28 (1H, d, $J=3$)	4.90 (1H, s)	6.69 (1H, dd, $J=6, 1$)	4.77 (1H, d, $J=6$)	3.11 (2H, s)	1.10 (3H, s)	4.21 4.44 (chaque 1H, d, $J=12$)	1.90 (3H, d, $J=1$)	1.94 (3H, s) 2.17 (3H, s)	5	3.
Tetra- Ac- niv. ^{d)}	4.03 (1H, d, $J=5$)	5.25 (1H, dd, $J=5.3$)	5.87 (1H, d, $J=3$)	6.09 (1H, s)	6.62 (1H, dd, $J=6, 1.5$)	4.70 (1H, d, $J=4$)	2.70 3.13 (chaque 1H, d, $J=4$)	0.85 (3H, s)	4.28 4.67 (chaque 1H, d, $J=12$)	1.88 (3H, d, $J=1.5$)	2.0 (3H, s) 2.12 (3H, s) 2.18 (3H, s) 2.22 (3H, s)	5	3

a) $\text{DMSO-}d_6\text{-D}_2\text{O}$,

b) non-détaché par l'absorption de solvant

c) $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$

d) CDCl_3

Le nivalenol est sensible au réactif de Tollen, et si on chauffe le nivalenol à 60° dans une solution à 50% d'acétone de phenolphthaleine $-0.2\text{N-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, la solution rougit. Ces ré-

sultats nous suggèrent l'existence de groupes O=C-CH-OH et C-CH_2 . On peut attribuer les pics de résonance magnétique nucléaire (RMN) du nivalenol à 2.87 ppm et à 2.97 ppm (chaque 1H, d, $J=5$ cps) à l'époxide de méthylène.

Quand on réduit le nivalenol avec du Pd noire et de l'hydrogène, le nivalenol absorbe 1 mol d'hydrogène. On obtient le dihydronivalenol, point de fusion 254° , cristaux en aiguilles incolores.

Le spectre de masse du dihydronivalenol nous montre M^+ (m/e) 314 et l'analyse élémentaire nous montre que la formule moléculaire est $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_7$.

L'absorption IR de ce composé nous montre qu'il y a $\nu_{\text{C=O}}$ à 1700 cm^{-1} et qu'il n'y a pas de $\nu_{\text{C=C}}$.

On peut dériver le nivalenol en tétra-acétate en employant l'anhydride de l'acide acétique-pyridine; le point de fusion est $168\text{--}170^\circ$, cristaux en aiguilles, incolores, M^+ (m/e) 480 et la formule moléculaire est $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$. Comme on voit dans le tableau I, le tétra-acétate de nivalenol a quatre acétyles.

Calculant le degré d'insaturation en tenant compte de la formule moléculaire du nivalenol, $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_7$, on peut déduire celui-ci est un composé tétra-cyclique. D'autre part, il a encore un oxygène en plus des oxygènes du carbonyl, de l'époxide, et des quatre hydroxyles acétylables. Nous supposons que cet oxygène est l'oxygène de l'ether cyclique. En considérant le déplacement chimique et les constantes de couplages de RMN du tétra-acétate de nivalenol et le résultat de la résonance double de ce composé, nous pouvons caractériser la liaison de chaque carbone à qui on peut attribuer ses protons respectifs comme on le voit sur la Fig. 1.

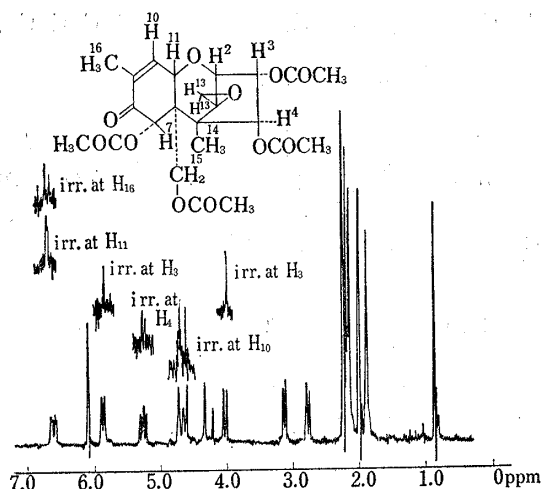


Fig. 1. Spectres RNM et RDNM du Tétracétate de Nivalenol

On sait que la résonance de l'absorption du méthyle en C-14 se déplace vers la région de haute fréquence quand l'hydroxyle a été acétylé si les deux groupes sont voisins.

En comparant les déplacements chimiques du méthyle en C-14 du nivalenol avec ceux du tétra-acétate de nivalenol, nous trouvons que la résonance d'absorption du méthyle en C-14 de tétra-acétate se déplace plus haut que celle du nivalenol de 20 cps. Nous en concluons que la configuration du C-7-hydroxyle est α , c'est-à-dire, que la structure du nivalenol est la suivante: $3\alpha,4\beta,7\alpha,15$ -tétrahydroxy-scirp-9-en-8-one.

sigg, et al. :

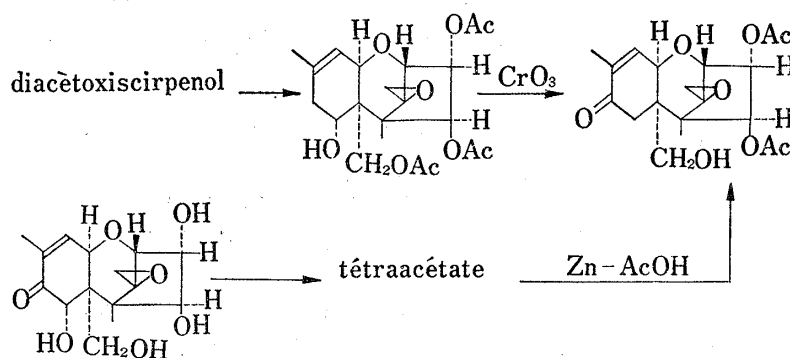


Schéma 1

ii) **Fusarenon-X**—La toxine principale de la culture de *Fusarium nivale* Fn-2-B dans la solution de Czapek additionnée 1% de peptone a été isolée par Ueno, sous forme de cristaux en aiguilles incolores. Les valeurs du R_f de la chromatographie en couche mince, examinée en utilisant quatre différents systèmes de solvant, sont tout à fait égales à celles du fusarenon⁷⁾ déjà isolé par Morooka à partir de riz moisé. Ueno a nommé cette substance le fusarenon-X.

Recristallisant le fusarenon-X par le dichlorométhane-*n*-pentane ou le dichloroéthane, on obtient des cristaux, en aiguilles, incolores, f. 91–92°, mais quand on les sèche sur P_2O_5 -paraffine sous pression réduite à 60°, ce point de fusion montre à 181–184°. Le spectre de

6) H.P. Sigg, R. Mauli, E. Flury et D. Hauser, *Helv. Chim. Acta*, **48**, 962 (1965).

7) N. Morooka et T. Tatsuno, Proc. 1st U.S.-Japan Conf. Toxic Microorganisms, Honolulu, Hawaii, 1968, p. 114.

masse, et l'analyse élémentaire nous suggèrent M^+ (m/e) 354 et $C_{17}H_{22}O_8$ comme formule moléculaire de ce composé.

Comme on le voit sur le tableau 1, l'absorption IR, et le RMN nous montre qu'il y a un groupe acétyle et que la substance est très semblable au nivalenol.

Hydrolysant le fusarenon-X avec une solution méthanolique d'ammonia 1N, nous avons pu obtenir le nivalenol avec un rendement théorique, et nous avons pu le dériver en tétra-acétate de nivalenol en utilisant l'anhydride de l'acide acétique-pyridine.

Nous pouvons donc penser que le fusarenon-X a le même noyau que le nivalenol, et qu'il a un groupe acétoxy au lieu d'hydroxyles en C-3, C-4, C-7, ou C-15.

En comparant le pics d'absorption de RMN du fusarenon-X avec ceux du nivalenol, ou avec ceux du tétra-acétate de nivalenol, les pics des protons que nous avons attribué à C-2, C-3, C-7, C-10, C-11, C-13, et C-15 correspondent tout à fait à ceux du nivalenol, mais, le pic de proton de C-4 est déplacé vers la basse résonance de 1.2 ppm. En effet, la structure du fusarenon-X est: nivalenol-4-O-acétate, c'est-à-dire que c'est un $3\alpha,7\alpha,15$ -trihydroxyl- 4β -acétoxy-scirp-9-en-8-one.

iii) Diacétylnivalenol—Quand on cultive *F. nivale* Fn-2-B dans la solution de Czapek additionnée de 1% de peptone, à 15° pendant 2 semaines, on peut isoler une autre substance toxique, le diacétylnivalenol, accompagné du fusarenon-X. En recristallisant ce composé par un mélange de dichlorométhane-*n*-hexane, et en le séchant sur P_2O_5 à 60° sous pression réduite, on obtient des cristaux en aiguilles, incolores, f. 136°. Spectre de masse M^+ (m/e) 396, l'analyse élémentaire nous suggèrent la formule moléculaire suivante pour ce composé: $C_{19}H_{22}O_9$.

Comme on voit sur le tableau I, les bandes d'absorption IR et les pic de RMN de ce composé nous montrent qu'il y a deux groupes acétyle, et qu'il est ressemblé beaucoup au fusarenon-X.

Quand on l'hydrolyse avec une solution méthanolique d'ammonia 1N, on peut aisément obtenir le nivalenol et on peut le dériver en tétra-acétate de nivalenol en employant l'anhydride de l'acide acétique-pyridine. En effet, ce composé est le diacétylnivalenol.

Pour vérifier les positions acétylées, nous avons comparé le déplacement chimique de ce composé avec ceux du nivalenol, du fusarenon-X, et du tétra-acétate de nivalenol. Le protons que nous attribuons du méthylène-C-15, apparaissent clairement sur le type AB (d,d) et en comparant le déplacement chimique de ceux du nivalenol, les pics des protons du méthylène-C-15 subissent un déplacement vers la résonance de basse fréquence de 0.38 ppm.

De plus le proton que nous attribuons au méthine-C-4, correspond à celui du fusarenon-X et du tétra-acétate de nivalenol. Mais les protons de méthine C-3 et C-7 apparaissent respectivement vers la région de haute fréquence de 0.35 et 1.0 ppm si on les compare avec ceux du tétra-acétate de nivalenol. Considérant ces résultats on peut conclure que le diacétylnivalenol est un $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxyle- $4\beta,15$ -di-O-acétoxy-scirp-9-en-8-one. Ce composé a déjà été isolé par Dawkins, Grove et Tidd⁸⁾ à partir des substances métabolique de *F. equiseti* comme substance mineure.

Nous avons identifier notre substance au témoin que Grove nous a donné, au moyen du spectre IR, de la chromatographie en couche mince et du point de fusion mixte.

II. Vérification de la Structure des Substances obtenues en Étudiant leurs Spectres de Masse:

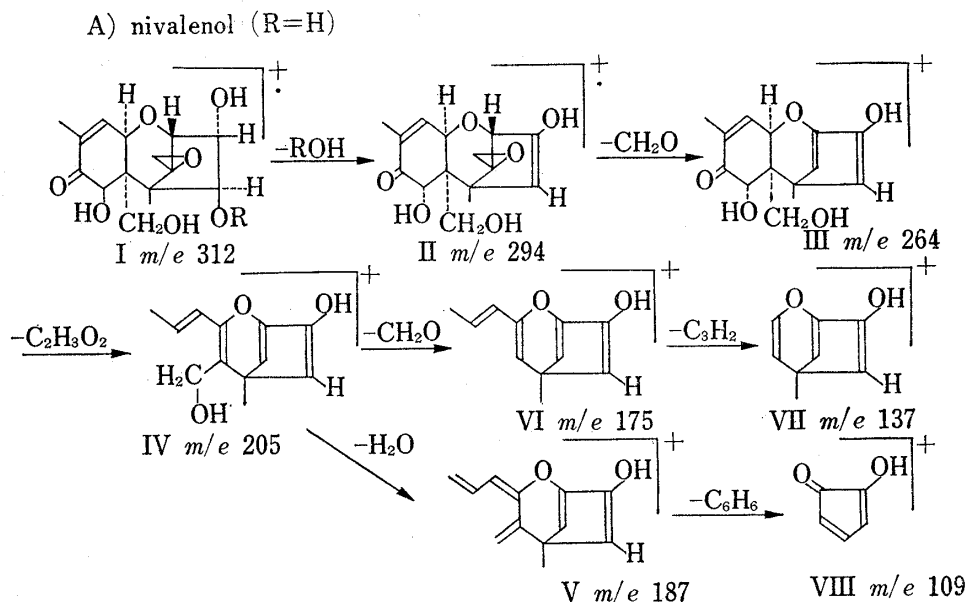
Les substances que nous avons isolées donnent des pics moléculaires de leur spectre de masse à 75 eV. De plus, il nous a semblé que l'aspect de la dégradation de toutes ces substances était comparable. Nous avons essayé de vérifier l'aspect de cette fragmentation sur les composée scirpenoides que nous avons pu obtenir: nivalenol, fusarenon-X, diacétylnivalenol, tétra-acétate de nivalenol, diacétoxy-scirpenol, 7-désoxy-nivalenol et dérivés hydrogènes.

8) A.W. Dawkins, J.F. Grove et B.K. Tidd, *Chem. Comm.*, 1965, 27.

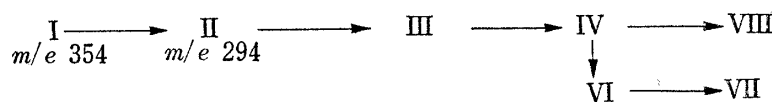
Quand au spectre de masse du nivalenol et du fusarenon-X, nous avons cherché les pics d'ions fragmentaires et nous discutons le procédé de fragmentation correspondant à chaque composé.

Nous supposons deux procédés que nous représentons sur les schémas II et III.

i) L'ion moléculaire perd une molécule d'acide à partir de l'hydroxyle en C-4 (acétyle du fusarenon-X) et du proton en C-3, de ce fragment l'époxide est ensuite éliminé (m/e 264).



B) fusarenon-X (R=-COCH₃)



C) diacetylnivalenol (R=R'=-COCH₃)

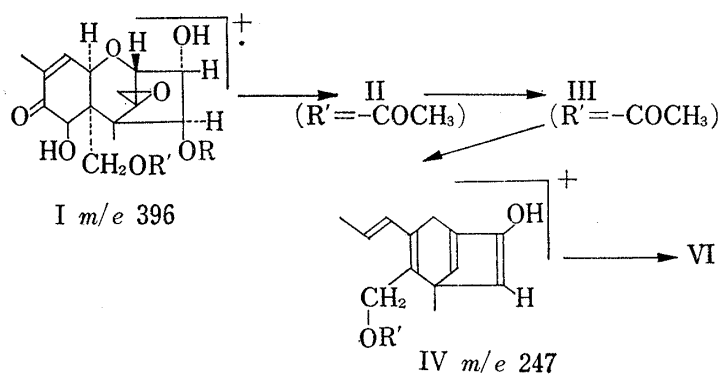
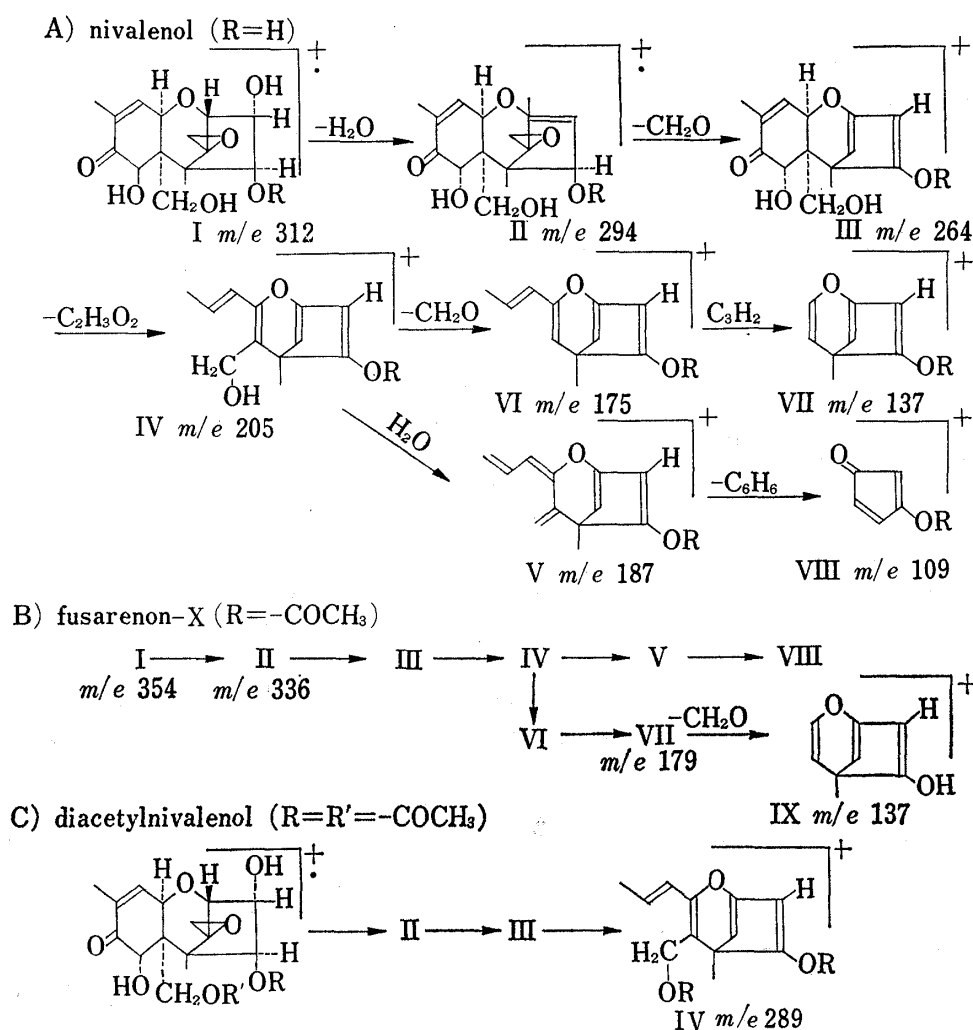


Schéma 2

Par coupure des liaisons C-6—C-7 et C-8—C-9, l'ion (m/e 264) perd le fragment, C₂H₃O₂, et il apparaît à m/e 205. Puis l'élimination de CH₂O à partir du méthylol-C-15, et sa déshydratation sont provoquées successivement, il apparaît l'ion (m/e 187). Mais le pic d'ion métastable nous suggère qu'il existe une autre voie, m/e 205 $\xrightarrow{-CH_2O}$ m/e 175. Enfin, l'ion (m/e 187) perd le fragment C₆H₆, et l'ion est dérivé à l'ion (m/e 109).

ii) L'ion moléculaire perd d'abord une molécule d'eau à partir du C-3-OH et du proton en C-2 et puis, comme on le voit en i) les étapes suivantes sont l'élimination de l'époxide,



et la perte de $C_2H_2O_2$, accompagnée de la fission des liaisons C-6—C-7 et C-8—C-9 qui donnent finalement naissance à l'ion (m/e 205—dans le cas du nivalenol) ou à l'ion (m/e 247—dans le cas du fusarenon-X). Puis le fragment CH_2O est éliminé à partir du méthylol en C-15 et l'ion de fragment (m/e 175—nivalenol), (m/e 217—fusarenon-X) apparaît. A partir de cet ion le fragment de propylène s'élimine, il devient l'ion fragmentaire m/e 237 (nivalenol) et m/e 179 (fusarenon-X). Le pic d'ion métastable nous suggère qu'il y a encore une autre voie, m/e 205 (nivalenol) ou m/e 247 (fusarenon-X) $\xrightarrow{-H_2C_6}$ m/e 109 (nivalenol) ou m/e 151 (nivalenol).

Quand aux autres dérivés scirpénoides, diacétylnivalenol, tétra-acétate du nivalenol, diacétoxyscirpenol, 3 α ,4 β ,15-triacétoxy-scirp-9-en-8-one, dihydronivalenol et dihydrofusarenon-X, tous utilisent une voie analogue de dégradation. Par exemple, dans le cas du diacétylnivalenol, nous trouvons les pics d'ion m/e 289 \rightarrow m/e 217, m/e 179 \rightarrow m/e 137, ces résultats nous montrent en effet les positions ou les groupes acétyles sont attachés.

Discussion

Dans les section I et II, nous avons élucidé les structures chimiques des substances toxique de *Fusarium nivale* Fn-2-B, ce faisant nous avons rencontré des faits très intéressants. Le nivalenol cristallisé par le méthanol ne montre pas de bande d'absorption IR ($\nu_{C=O}$) et de plus il n'a pas de point de fusion précis. Après le séchage à 80—90°, sur P_2O_5 sous pression réduite pendant 24 heure, le nivalenol montre une bande d'absorption, $\nu_{C=O}$ à 1675 cm^{-1} et son point de fusion est 223—225°.

Pour tirer les faits au clair, nous avons revu les propriétés physiques et chimiques du nivalenol en séchant le nivalenol cristallisé avec du méthanol sous diverses conditions.

Le nivalenol cristallisé par le méthanol ne montre pas de point de fusion précis, mais quand on le sèche avec P_2O_5 à 60° pendant 24—48 hre sous pression réduite, le poids du cristal devient constant et il a un point de fusion de 220 — 224° , mais il ne montre pas encore une absorption $\nu_{C=O}$. Mais si on le sèche encore à 80 — 90° pendant 24 hre, on obtient finalement un produit cristallisé, f. 223 — 225° , qui montre une absorption IR, $\nu_{C=O}$ à 1675 cm^{-1} .

On sait que J. Grove⁹⁾ a déjà publié une série de recherches sur les substances métaboliques de *F. equiseti*.

A partir de ce petit champignon, il a isolé avec le diacétoxy-scirpenol une substance mineure, et il a constaté que sa structure était: $4\beta,15$ -diacétoxy- $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy-scirp-9-en-8-one. Nous avons pu identifier notre diacétoxy-nivalenol avec l'échantillon qu'il nous avait obligeamment donné. A l'étape de l'acétate, ces deux substances que nous avons isolés indépendamment, sont tout à fait identiques, mais les constantes physico-chimiques du tétra-ol que J. Grove a préparé et'il a publié sont partiellement divergentes: il a préparé le tétra-ol à partir du $4\beta,15$ -diacétoxy- $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy-scirp-9-en-8-one en hydrolysant avec une solution de KOH-méthanol-1N, puis il a recristallisé l'hydrolysate avec de l'acétate d'éthyle anhydride. Selon ses descriptions, le tétra-ol cristallisé par l'acétate d'éthyle anhydride montre un point de fusion 190° et une absorption IR, $\nu_{C=O}$ à 1675 cm^{-1} , mais si ce tétra-ol-cétoforme a été recristallisé par l'acétate d'éthyl humide, il est transformé en tétra-ol-hydrate que a un point de fusion triple, 138 — 140° , 190° et 223 — 225° , et pas d'absorption $\nu_{C=O}$.

Il a ensuite obtenu le tétra-ol-hémicétal-forme, f. 223 — 225° , sans l'absorption $\nu_{C=O}$ en chauffant cet hydrate sous une pression de 10^{-1} mmHg à 100° .

Il s'agit maintenant s'occuper du carbonyl-8 du nivalenol ou du tétra-ol. Nous avons suivi, d'abord, la diminution du poids du cristal de nivalenol pendant un certain laps de temps où celui a été conservé dans un dessiccateur avec P_2O_5 sous pression réduite, à 60° .

Après 24 heures, le poids du cristal devient constant, et à cette étape, le nivalenol a montré un point de fusion 220 — 224° , mais pas d'absorption IR $\nu_{C=O}$. L'analyse élémentaire correspondait à la forme moléculaire, $C_{15}H_{20}O_7 \cdot H_2O$ (mono-hydrate).

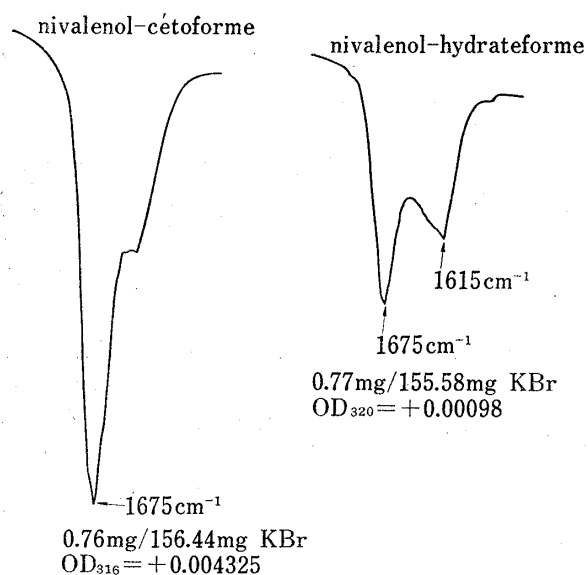


Fig. 2. DC d'un Comprimé-KBr de Nivalenol-cétoforme et de Nivalenol Hydrateforme

Après préparation d'un comprimé-KBr de nivalenol mono-hydrate, nous avons mesuré le dichroïsme circulaire (DC) en vérifiant l'absorption IR. Nous avons trouvé une petite absorption à 1675 cm^{-1} de $\nu_{C=O}$, et la courbe de DC correspondant à la cétone $\alpha\beta$ -unsaturé montrait qu'il y avait une petite quantité, nous avons pensé qu'un peu de déshydratation pendant la préparation du comprimé. Nous montrons l'aspect de la courbe de DC et d'IR sur la Fig. 2. D'un autre côté, le cristal, f. 223 — 225° , obtenu après séchage à 80 — 90° poursuivi 24 hre, nous a montré une importante absorption IR de $\nu_{C=O}$ à 1675 cm^{-1} , et l'analyse élémentaire suggère la formule moléculaire $C_{15}H_{20}O_7$.

La courbe de DC d'un comprimé-KBr de ce cristal nous a montré une courbe rationnelle comme on le voit sur la Fig. 2.

Considérant ces résultats, nous pouvons penser que certains groupes masquant le car-

9) J. Grove; *J. Chem. Soc. (c)*, 1970, 375.

bonyl-8 du nivalenol-monohydrate ont été éliminés par le séchage. Comme J. Grove l'a déjà suggéré, on pourrait donner la forme d'un hémicétal au nivalenol-nocéto-forme, mais, il n'y a pas d'arguments positifs en la forme de l'hémicétal, et de plus, chez nous, dans les conditions de dessiccation maxima, nous avons trouvé la céto-forme du nivalenol.

Nous devons cependant discuter encore le fait que nous nous trouvions en désaccord avec J. Grove sur la structure du nivalenol et du tétra-ol qui ont un point de fusion à 223—225°.

J. Grove a publié qu'il avait obtenu le tétra-ol en hydrolysant le diacétate avec du KOH-méthanol-1N. Nous craignons que dans ce conditions l'épimérisation du C-7 n'ait été provoquée. Si c'avait été possible, nous aurions voulu éclaircir ce point de désaccord entre nous.

Pour cela, nous avons procédé aux examens suivants: nous avons mesuré le DC et le dispersion rotatoire optique (DRO) de trois échantillons de tétra-ols, c'est-à-dire, le nivalenol naturel, le nivalenol qui a hydrolysé le fusarenon-X par KOH-méthanol-1N, et le nivalenol qui a hydrolysé le fusarenon-X par NH₄OH-méthanol-1N.

Comme nous en présentons les résultats dans le tableau II, ces trois échantillons du nivalenol nous montrent presque les mêmes courbes.

TABLEAU II. DRO du Nivalenol et de ses Dérivés

	Concentration	Temperature (°C)	Solvent	Maximum négatif (m μ)	Maximum positif (m μ)
Nivalenol naturel	0.00128	26	MeOH	-6730 (260)	+1173 (347)
Nivalenol hydrolysé par KOH-1N	0.00086	26	MeOH	-6530 (260)	+1051 (347)
Nivalenol hydrolysé par NH ₄ OH-1N	0.00100	26	MeOH	-6396 (260)	+1092 (347)
Fusarenon-X	0.01025	26	MeOH	-6007 (260)	+1543 (347)
Diacétyl-nivalenol	0.01025	28	EtOH	-14525 (260)	+1972 (347)

En résumé, ces résultats nous montrent que l'on a pas provoqué l'épimérisation en position-7 dans les conditions où on chauffe l'acétate de nivalenol avec KOH-méthanol-1N, ou NH₄OH-méthanol-1N.

Nous n'avons pas complètement élucidé ce désaccord entre nos résultats par l'étude que nous venons de décrire. Il est certainement possible d'attribuer la structure (A), forme hydrate du carbonyl ou la structure (B), forme hémicétal avec une mole d'eau de cristallisation au nivalenol monohydrate, mais nous ne pouvons pas penser que la structure (A) soit stable aussi qu'en solution, et d'autre part, nous avons du mal à accepter que l'hémicétal monohydrate soit seul stable car s'il perdait une molécule d'eau en séchant sous pression réduite à 80—90°, il se transformait en céto-forme.

Cependant, si nous ne pouvons pas donner de structure définitive au nivalenol monohydrate, nous pouvons dire que l'on attribue la structure (C) au nivalenol-cétoforme, f. 223—225°, $\nu_{O=O}$ 1675 cm⁻¹.

Expérimentale¹⁰⁾

Nivalenol (1)—Le nivalenol brut que l'on a obtenu du riz moizi est récrystallisé par le méthanol, et séché sur P₂O₅ à 80° pendant 24 hre sous pression réduite. Le nivalenol pur a un point de fusion de 223—225° (decomp.), *Anal.* Calc. pour C₁₅H₂₀O₇: C, 57.69; H, 6.45; poids mol. 312.1; Obs.: C, 56.29; H, 6.01. Spectrométrie de masse, Calc. comme C₁₅H₂₀O₇: *m/e* 312.1209 (M⁺); Obs. *m/e* 312.1227 (M⁺). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ m μ (e)

10) Nous avons employé les appareils des spectromètres respectivement; IR: Parkin Elmer IR-521, NMR: Varian HA-100D, UV: Cary 14R, et Mass: Nihon-Denshi JMS-015G. Quant aux DRO et DC, nous avons employés l'appareil qui est fabriqué à l'essai par le Monsieur Takuwa, Nihon-Bunko.

218 (7500). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} 3300—3500 (OH), 1675, 1610 (cétone $\alpha\beta$ -insaturé). RMN (DMSO- d_6 - D_2O) ppm: 0.95 (3H, s), 1.77 (3H, d, $J=1$ cps), 2.87 et 2.97 (chaque 1H, d, $J=5$ cps), 3.50 (1H, d, $J=5$ cps), 3.64 (2H, d, $J=5$ cps), 4.37 (1H, d, $J=3$ cps), 4.57 (1H, d, $J=5$ cps), 4.70 (1H, s), 6.58 (1H, dd, $J=5$ cps, 1 cps). $[\alpha]_D^{25} +21.5$ ($c=12.7$ mg/ml, éthanol).

Dihydronivalenol (2)—On fait dissoudre le nivalenol (310 mg) dans l'éthanol (30 ml) et on le met en contact avec de l'hydrogène gazeux et du palladium noir sous une pression ordinaire. Après absorption de 1 mol d'hydrogène, on sépare le catalyseur, et on évapore le solvant sous pression réduite.

On récrystallise le résidu blanc avec un mélange éthanol-*n*-hexane, et on obtient 273 mg de substance cristalline en aiguilles, incolore. F. 252—254°, *Anal.* Calc. pour $C_{15}H_{22}O_7$: C, 57.32; H, 7.05; poids de mol. 314.1: Obs.: 0.57.31; H, 7.06. Spectrométrie de masse m/e 314 (M^+). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500 (s), 2980, 1700 (s), 1340, 1220, 1180 1080, 1050, 955, 830, 710.

Tétraacétate de Nivalenol (3)—On fait dissoudre le nivalenol (156 mg) dans la pyridine (3 ml) puis on ajoute à la solution réfrigérée dans la glace et sous agitation l'anhydride de l'acide acétique goutte à goutte. Après l'avoir laissé deux jours à la température ordinaire, on verse la solution dans la glace. On extrait l'acétate avec du chloroforme, et après avoir séché la solution de chloroforme avec Na_2SO_4 -anhydride, on évapore le solvant. On purifie l'acétate par chromatographie préparative en couche mince sur du gel silice dans un système benzène-chloroforme (1:10).

On récrystallise l'acétate chromatographié avec l'éthanol, on obtient des cristaux en aiguilles, incolores (101.2 mg); f. 168—170°, *Anal.* Calc. pour $C_{23}H_{28}O_{11}$: C, 57.50; H, 5.87; poids de mol.: 480, Obs.: C, 57.23; H, 5.50. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ $m\mu$ (ϵ): 227 (7900). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2930, 1740, 1370, 1235, 1220, 1180, 1080, 1040, 960. RMN ($CDCl_3$) ppm: 0.85 (3H, s), 1.88 (3H, d, $J=1.5$ cps), 2.70 et 3.13 (chaque 1H, d, $J=4$ cps), 4.03 (1H, d, $J=5$ cps), 4.28 et 4.67 (chaque 1H, d, $J=12$ cps), 4.70 (1H, d, $J=4$ cps), 5.25 (1H, dd, $J=5$ cps, 3 cps), 5.87 (1H, d, $J=3$ cps), 6.09 (1H, s), 6.62 (1H, dd, $J=6$ cps, 1.5 cps).

3,4,15-Triacétyl-7-déoxy-nivalenol (4)—On fait dissoudre 20 mg de tétra-acétat de nivalenol dans un mélange d'acide acétique (10 mg) et d'anhydride de l'acide acétique (3 gouttes), et tout en agitant la solution réfrigérée, on ajoute 1 g de Zn. Après l'avoir laissée 3 hres à la température ordinaire, on filtre la solution et on évapore l'acide acétique et son anhydride.

On purifie le résidu par chromatographie préparative en couche mince sur gel de silice en utilisant un système benzène-chloroforme (1:10).

On obtient le 3,4,15-triacétyl-7-déoxy-nivalenol f. 138—139° avec 10% de rendement, et on récupère le tétra-acétate de nivalenol (10%).

Le point de fusion, la chromatographie, et l'absorption IR sont tout à fait identiques à l'échantillon que nous a été offert par Sigg.

Fusarenon-X (5)—Le fusarenon-X brut que l'on obtenu de la solution de culture est récrystallisé par le dichloroéthane et séché sur P_2O_5 -paraffine à 60° pendant 48 hres sous pression réduite. Le fusarenon-X pur, cristaux en aiguilles incolores, a un point de fusion de 181—184°. *Anal.* Calc. pour $C_{17}H_{22}O_8$: C, 57.62; H, 6.26; poids de mol., 354; Obs.: C, 57.18; H, 6.37. Spectrométrie de masse: m/e 354 (M^+). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ $m\mu$ 220 (6500). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400, 1715, 1680, 1380, 1265, 1250, 1175, 1085, 1070, 1040, 965, 930, 715. RMN ($CDCl_3$ - D_2O) ppm: 1.1 (3H, s), 1.93 (3H, d, $J=1.5$ cps), 2.17 (3H, s), 3.08 et 3.14 (chaque 1H, d, $J=4$ cps), 3.63 et 4.06 (chaque 1H, d, $J=12$ cps), 3.83 (1H, d, $J=6$ cps), 4.38 (1H, dd, $J=6$ cps, 3 cps), 4.84 (1H, d, $J=6$ cps), 4.88 (1H, s), 5.62 (1H, d, $J=3$ cps), 6.73 (1H, dd, $J=6$ cps, 1.5 cps). $[\alpha]_D^{25} +56.1$ ($c=10$ mg/ml, éthanol).

Dihydrofusarenon-X (6)—On fait dissoudre le fusarenon-X (40 mg) dans l'éthanol (8 ml) et on le met en contact avec de l'hydrogène gazeux et du palladium noir sous une pression ordinaire. Après l'absorption de 1 mol d'hydrogène, on retire le catalyseur et on évapore le solvant sous pression réduite. On récrystallise le résidu blanc avec un mélange de dichlorométhane-*n*-hexane, on obtient 35 mg de cristaux en aiguilles incolores. F. 167—169°, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3320, 1740, 1230, 1040, 880.

Hydrolyse du Fusarenon-X—i) On fait dissoudre le fusarenon-X (812 mg) dans le méthanol, et on ajoute 2 ml d'ammoniaque à 28%. Après avoir laissé reposer la solution pendant une nuit on la neutralise avec de l'acide chlorhydrique à 20%, on évapore le solvant. On récrystallise le résidu par le méthanol et on obtient 539 mg de nivalenol cristallisé.

i) On fait dissoudre le fusarenon-X (500 mg) dans l'éthanol (7.5 ml) et après avoir ajouté KOH-0.1 N (60 ml) dans la solution éthanolique, on abandonne la solution pendant 18 hres à la température ordinaire. Après neutralisation et évaporation, on purifie chromatographiquement le résidu sur gel de silice en utilisant un système chloroforme-méthanol (5:1). On récrystallise par le méthanol et on obtient le nivalenol pur (129 mg).

Acétylation du Fusarenon-X—On fait dissoudre le fusarenon-X (220 mg) dans la pyridine (2 ml), et on ajoute l'anhydride de l'acide acétique goutte à goutte dans le réfrigérant. On abandonne la solution à la température de la pièce pendant une nuit. Après neutralisation et évaporation, on purifie le résidu par chromatographie en couche mince sur gel de silice dans un système benzène-dichlorométhane (3:10). En récrystallisant la substance obtenue par l'éthanol, on obtient le tétraacétate de nivalenol pur (186 mg).

Diacétylnivalenol (7)—Le diacétylnivalenol brut que l'on a isolé de la solution de culture est récrystallisé par l'éthanol ou par l'acétone-*n*-hexane, et séché sur P_2O_5 -paraffine à 60° pendant 48 hres sous pression

réduite.

Le diacétylnivalenol pur a un point de fusion de 135—136°. *Anal.* Calc. pour $C_{19}H_{22}O_7$: C, 57.57; H, 6.10; poids de mol., 396. Obs. C, 57.91; H, 6.21. Spectrométrie de masse: m/e 396 (M^+). UV λ_{max}^{MeOH} $m\mu$ (ϵ): 220 (6200). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3515, 1735, 1720, 1680, 1235, 1040. RMN ($CDCl_3$ - D_2O) ppm: 1.10 (3H, s), 1.90 (3H, d, $J=1$ cps), 1.94 (3H, s), 2.17 (3H, s), 3.11 (3H, s), 3.85 (1H, d, $J=5$ cps), 4.21 et 4.44 (chaque 1H, d, $J=12$ cps), 4.27 (1H, dd, $J=5$ cps, 3 cps), 4.77 (1H, d, $J=6$ cps), 4.90 (1H, s), 5.28 (1H, d, $J=3$ cps), 6.69 (1H, dd, $J=6$ cps, 1 cps). $[\alpha]_D^{25} +64.3$ ($c=24$ mg/ml, éthanol).

On identifie le diacétate de nivalenol au 3 α ,7 α -dihydroxyle-4 β , 15-di-acétoxyle-scirp-9-en-8-one, dont la structure chimique a déjà été déterminée par J. Grove par IR et le point de fusion mixte.

Hydrolyse du Diacétylnivalenol—On fait dissoudre le diacétylnivalenol (20 mg) dans le méthanol (1 ml) et on ajoute 4 gouttes d'ammoniaque. Après avoir laissé la solution à la température ordinaire pendant une nuit, on évapore le solvant et on sèche le résidu. On récrystallise le résidu par le méthanol et on obtient le nivalenol pur (10 mg).

Remerciements Nous sommes très reconnaissants envers les Dr. Saito, Dr. Ohkubo, Dr. Tsunoda, Dr. Ueno, Dr. Enomoto et Dr. Suzuki et le M. Takakuwa, pour nous avoir fait profiter au maximum de son expérience et pour les conseils qu'ils nous ont donnés.

Nous remercions le Dr. Uruguchi pour ses suggestions et l'encouragement qu'il nous a donné.