

Ausgangsmenge betragen. Die auf diese Art gewonnene Essigsäure enthielt kein Acetanhydrid und ihr Wassergehalt, der durch Bestimmen des Schmelzpunktes auf $\pm 0,01$ Gew.-Proz. genau ermittelt wurde⁴⁵⁾, war durchwegs kleiner als 0,1 Gew.-Proz.

Zur Durchführung der vorliegenden Arbeit standen Mittel aus der ROBERT GNEHM-Stiftung und dem Schulmittelfonds der ETH zur Verfügung, wofür wir aufrichtig danken.

SUMMARY

The glass electrode is shown to respond to the concentration of protonated acetic acid within the ranges 0 to 0.50% (w/w) water and about 10^{-4} to 10^{-1} M perchloric acid. There exists a linear relationship between the alkaline error of glass electrodes and the logarithm of their potential drift in acetic acid. Some electrode glasses that are specially well suited for measurements in acetic acid are mentioned.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

99. Über die Verrucarine und Roridine, eine Gruppe von cytostatisch hochwirksamen Antibiotica aus *Myrothecium*-Arten

von E. Härri, W. Loeffler, H. P. Sigg, H. Stähelin, Ch. Stoll, Ch. Tamm¹⁾
und D. Wiesinger

(6. III. 62)

Die Gattung *Myrothecium* TODE ex FRIES gehört zu den *Fungi imperfecti*, Ordnung *Moniliales*, Familie *Tuberculariaceae*. Mehrere Arten auf pflanzlichen Substraten sind beschrieben worden. *Myrothecium roridum* TODE ex FR., Gattungstypus bei FRIES²⁾ 3), und, in unseren Versuchen sogar häufiger, *Myrothecium verrucaria* (ALBERTINI et SCHWEINITZ) DITMAR ex FRIES wurden auch aus dem Erdboden isoliert⁴⁾.

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass Kulturen der beiden erwähnten Arten cellulolytische Eigenschaften besitzen, die für die Vorbehandlung der Cellulose bei der Herstellung von Textilien nutzbar gemacht werden können⁵⁾. Die für diesen enzymatischen Abbau der Cellulose verantwortliche Cellulase ist von zahlreichen Autoren eingehend untersucht worden⁵⁾.

Die Unterscheidung von Species innerhalb der Gattung scheint oftmals Schwierigkeiten bereitet zu haben, und auch die Gattungszugehörigkeit untersuchter Stämme wurde nicht immer erkannt. So isolierten BRIAN & MCGOWAN⁶⁾ erstmals eine

¹⁾ Jetzige Adresse: Institut für Organische Chemie der Universität Basel.

²⁾ E. M. FRIES, *Systema Mycologicum*, Vol. 3¹, 216–218 (1829).

³⁾ Vgl. F. E. CLEMENTS & C. L. SHEAR, *The Genera of Fungi*. Hafner Publishing Co., New York 1957.

⁴⁾ J. C. GILMAN, *A Manual of Soil Fungi*, 2nd Ed., The Iowa State College Press 1957, Ames, Iowa, USA.

⁵⁾ Vgl. *inter alia*: G. A. GREATHOUSE, D. E. KLEMME & H. D. BARKER, *Ind. Eng. Chemistry (Anal. Ed.)* 14, 614 (1942); R. G. H. SIN, *Microbial Decomposition of Cellulose*, Reinhold Publishing Corp. 1951, New York, USA; D. R. WHITAKER, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 35, 733 (1957); G. HALLIWELL, *Nutrit. Abstr. Rev.* 29, 747 (1959); G. HALLIWELL, *Biochem. J.* 79, 185 (1961); K. SELBY, *Biochem. J.* 79, 562 (1961).

⁶⁾ P. W. BRIAN & J. G. MCGOWAN, *Nature* 157, 334 (1946).

kristalline Substanz mit antifungischer Wirksamkeit aus Kulturen von «*Metarrhizium glutinosum* S. POPE», die nicht unter 300° schmolz und die spez. Drehung $[\alpha]_D^{20} = +54^\circ$ (in Benzol) zeigte. Sie nannten den Stoff *Glutinosin* und erteilten ihm auf Grund der Elementaranalyse und einer Molekulargewichtsbestimmung nach RAST die Summenformel $C_{48}H_{60}O_{16}$. WHITE & DOWNING⁷⁾ betrachten den Stamm als zu *Myrothecium verrucaria* gehörend. NESPIAK, KOCÓR & SIEWINSKI⁸⁾ ordneten ihn jedoch der Species *M. roridum* zu. Nach THOMPSON & SIMMENS⁹⁾ lassen sich die in Frage stehenden Arten durch das nur bei *M. verrucaria* ausgebildete Konidienanhängsel von einander unterscheiden. Diese Beobachtung wurde neben anderen auch für unsere Untersuchungen von Anfang an als systematisches Merkmal berücksichtigt. Danach beurteilt, stellt die als Typusstamm von *Metarrhizium glutinosum* POPE angesehene Kultur ATCC 9095 einen Stamm von *Myrothecium verrucaria* dar. Vor einigen Monaten, als unsere Untersuchungen abgeschlossen waren, berichteten KOCÓR und Mitarbeiter⁸⁾ 10) über die antibiotischen Eigenschaften des Mycels von *M. roridum* und über die Isolierung von drei krist. Metaboliten aus der Kulturflüssigkeit. Das Hauptprodukt benannten sie *Myrothecin*. Es schmolz, ähnlich wie Glutinosin, nicht unter 350°, wies jedoch eine abweichende spez. Drehung von $[\alpha]_D^{20} = +174,6^\circ \pm 5^\circ$ (in Chloroform) auf. Aus den Analysenwerten und der Molekulargewichtsbestimmung nach RAST mit Campher leiteten die Autoren die Bruttoformel $C_{18}H_{22}O_6$ ab. Von den beiden anderen Komponenten wurden nur die Schmelzpunkte, 204–205° für den «*Metabolit II*» und 115–120° für den «*Metabolit III*», bekanntgegeben. Kulturen von *M. roridum* und die drei isolierten Stoffe waren gegen gewisse pflanzenpathogene Pilze wirksam. – Weitere chemische Untersuchungen über *Myrothecium*-Arten sind uns nicht bekannt.

Wir haben gefunden, dass Kulturen von *M. verrucaria* und *M. roridum* nicht nur antifungisch wirksam sind, sondern auch eine bemerkenswert hohe cytostatische Aktivität besitzen. Es ist uns gelungen, in den Kulturlösungen und dem Mycel einer Reihe von Stämmen mindestens 11 Stoffwechselprodukte nachzuweisen und 10 davon in chromatographisch einheitlicher, kristallisierter Form zu isolieren. Die gewonnenen Hauptprodukte sind Träger der antifungischen und antimittotischen Wirksamkeit der Organismen. Es handelt sich um eine Gruppe von chemisch nahe verwandten Verbindungen von unbekannter Struktur. Wir bezeichnen deshalb die zehn neuen Stoffe als *Verrucarine A, B, C, D, E, F, G* und *Roridine A, B* und *C*.

Isolierung der Verrucarine und Roridine

Die Stämme der genannten Mikroorganismen wurden auf Nährböden gezüchtet, welche die üblichen Nährstoffe enthielten. Die Züchtung kann in ruhender Oberflächenkultur oder submers unter Schütteln oder Rühren mit Luft oder Sauerstoff in Fermentern erfolgen. Für die Anreicherung und Isolierung der Wirkstoffe war weitgehend die biologische Testierung *in vitro* (Prüfung der antimittotischen Aktivität in Zellkulturen von embryonalen Fibroblasten des Huhns und der Hemmung der Ver-

⁷⁾ W. L. WHITE & M. H. DOWNING, *Mycologia* 39, 546 (1947).

⁸⁾ A. NESPIAK, M. KOCÓR & A. SIEWINSKI, *Nature* 192, 4798 (1961).

⁹⁾ K. V. A. THOMPSON & St. C. SIMMENS, *Nature* 193, 196 (1962).

¹⁰⁾ M. KOCÓR, A. NESPIAK & A. SIEWINSKI, *Bull. Acad. polon. Sci.* 9, 207 (1961).

mehrung von Maustumorzellen *in vitro*¹¹⁾ sowie die antifungische Wirksamkeit) wegleitend. Die cytostatisch aktiven Antibiotica liessen sich aus den Kulturfiltraten mit Äthylacetat extrahieren. Durch Waschen der Extrakte mit verd. Salzsäure¹²⁾ und verd. Natronlauge bei 0° wurden gefärbte, inaktive Verunreinigungen entfernt. Die Hauptmenge der Aktivität blieb im Essigester. Aus den so erhaltenen gelb bis braun gefärbten öligen Extrakten liess sich in der Regel, d. h. je nach der Menge der immer vorhandenen öligen Ballaststoffe, durch Versetzen mit Äther ein Rohkristallisat abtrennen, das auch nach mehrmaligem Umkristallisieren nach den spez. Drehungswerten und dem Dünnschichtchromatogramm (siehe unten) immer ein Stoffgemisch von wechselnder Zusammensetzung darstellte¹³⁾. Bei Ansätzen mit Kulturen von *M. verrucaria* bestand das Kristallisat hauptsächlich aus Verrucarinen A, das immer Verrucarinen B und manchmal noch Roridine B als Nebenprodukte enthielt. Das aus den Kulturfiltraten von *M. roridum* gewonnene Kristallisat setzte sich vorwiegend aus Roridine A mit Roridine B und Verrucarinen A und B als Begleitern zusammen. In den Mutterlaugenrückständen waren die Nebenprodukte Verrucarinen C, D und E, resp. Roridine C angereichert. Die Trennung der Rohkristallisate in die Komponenten und die Isolierung von reinen Stoffen aus den amorphen Anteilen erfolgte durch mehrfaches Chromatographieren an Al₂O₃- oder Silicagel-Säulen, wobei die Verrucarine und Roridine durch Chloroform oder Methylenchlorid, das 1–5% Methanol enthielt, eluiert wurden. Verrucarinen A und B liessen sich allerdings durch dieses Verfahren nicht voneinander trennen, sie wurden vielmehr als Mischkristallisat erhalten. Die

Tabelle I. Die aus verschiedenen Stämmen von *M. verrucaria* und *M. roridum* isolierten Stoffwechselprodukte (Metabolite)

<i>M. verrucaria</i>		<i>M. roridum</i>	
Stamm	Isolierte Metabolite	Stamm	Isolierte Metabolite
S 118	Verrucarinen A ¹⁴⁾ Verrucarinen B Verrucarinen C Verrucarinen F Verrucarinen G Roridine B ¹⁵⁾	S 973	Roridine A ¹⁴⁾
		S 1135	Roridine A ¹⁴⁾ Roridine B Roridine C Verrucarinen A Verrucarinen B
S 750	Verrucarinen A ¹⁴⁾ Verrucarinen B Roridine A		
S 833	Verrucarinen A ¹⁴⁾ Verrucarinen B Verrucarinen D Verrucarinen E		

¹¹⁾ Zur experimentellen Methodik vgl. A. CERLETTI, H. EMMENEGGER & H. STÄHELIN, *Actualités pharmacol.* 72, 103 (1959); H. STÄHELIN, spätere Mitteilung.

¹²⁾ Bei Extrakten, die aus Kulturflüssigkeiten mit pH-Werten unter 3,5 stammten, wurde das Waschen mit verd. Salzsäure weggelassen.

¹³⁾ Die Smp. eignen sich wegen der Tendenz zur Bildung von Mischkristallisaten nicht für die Differenzierung der Stoffe.

¹⁴⁾ Hauptprodukt.

¹⁵⁾ Nur aus dem Mycel dieses Stammes isoliert.

Tabelle II. *Eigenschaften der aus M. verrucaria und M. roridum isolierten Stoffwechselprodukte (Metabolite)*
 Abkürzungen der Lösungsmittel: Alk = Äthanol; Be = Benzol; Chf = Chloroform; Di = Dioxan; Py = Pyridin

Name	Smp.	$[\alpha]_D$	Bruttoformel	UV-Spektrum (Alk) λ_{max} (log ϵ) (vgl. Fig. 1)	IR-Spektrum λ_{max} (vgl. Fig. 2-9)
Glucosin ⁶⁾	> 300°	+ 54° (Be)	$C_{48}H_{60}O_{16}$	—	—
Myrothecin ^{8) 10)}	> 350°	+ 175° (Chf)	$C_{18}H_{22}O_6$	—	—
«Metabolit II» ^{8) 10)}	204-205°	—	—	—	—
«Metabolit III» ^{8) 10)}	115-120°	—	—	—	—
Verrucarin A	> 330°	+ 260° (Chf); + 208° (Di)	$C_{27}H_{34}O_9$	260 m μ (4,25)	2,84; 5,83; 6,12; 6,29 μ
Verrucarin B	> 330°	+ 94° (Chf); + 101° (Di); + 147° (Be)	$C_{27}H_{32}O_9$	258,5 m μ (4,37)	5,76; 5,88; 5,97(?); 6,16; 6,30 μ
Verrucarin C	223-224°	—	—	—	2,94(?); 5,85; 6,02; 6,18; 6,29 μ
Verrucarin D	127-128°	—	—	—	—
Verrucarin E	103-104°	—	—	—	—
Verrucarin F	237-238°	— 1° (Py)	—	202; 233; 308 m μ	6,22 μ
Verrucarin G	118°/131-135° oder 142-145°	0° (Chf)	—	208; 254; 300 m μ (Schulter)	5,59; 6,31 μ
Roridin A	198-204°	+ 129° (Chf)	$C_{29}H_{40-42}O_9$	263 m μ (4,27)	2,72; 2,81; 5,74; 5,84; 6,13; 6,27 μ
Roridin B	143-149°	— 123° (Chf); — 126° (Be)	$C_{29}H_{46}O$ (?)	leer	2,90-2,94; 6,04; 6,23 μ
Roridin C	117-119°	— 33° (Chf)	$C_{18}H_{22}O_3$	leer	2,78; 5,96 μ

Trennung der beiden sehr nahe verwandten Stoffe gelang erst mit Hilfe der Verteilungschromatographie mit Wasser als stationärer Phase und wassergesättigten Benzol-Chloroform-Gemischen als mobiler Phase. Als Träger der stationären Phase diente Kieselgel. In diesem System wurde zuerst Verrucarin B und in den späteren Fraktionen Verrucarin A eluiert.

Durch Extraktion des Mycels eines Kulturansatzes eines Stammes von *M. verrucaria* mit wässrigem Methanol wurde nach weiterer Reinigung des Extraktes durch Verteilen zwischen Wasser und Essigester aus den in Essigester löslichen Anteilen Verrucarin A und B sowie Roridin B erhalten. Das Mycel scheint demnach nur solche Antibiotika zu enthalten, die auch im Kulturmedium angetroffen werden.

Über die aus verschiedenen Stämmen der beiden *Myrothecium*-Arten isolierten Stoffwechselprodukte orientiert Tabelle I. Die Zahl der Stoffe und besonders die Mengenverhältnisse variierten auch innerhalb eines Stammes beträchtlich mit den Kulturbedingungen.

Für die qualitative Analyse der Rohextrakte oder von Fraktionen, wie auch für die Überprüfung der Einheitlichkeit der kristallisierten Substanzen, erwies sich die Dünnschichtchromatographie nach STAHL als ein ausgezeichnetes diagnostisches Hilfsmittel¹⁶⁾. So ist z. B. die Einheitlichkeit von Verrucarin A und B ohne eine empfindliche chromatographische Analyse sehr schwer zu erkennen. Die Verrucarine und Roridine geben in J₂-Atmosphäre charakteristische Färbungen und fluoreszieren im UV.-Licht.

Charakterisierung der isolierten Stoffe

Die wichtigsten physikalischen Eigenschaften und die bisher ermittelten Bruttoformeln sind in Tabelle II zusammengestellt. Für die UV.- und IR.-Absorptionsspektren vergleiche die Figuren 1–9. Die isolierten Stoffe lassen sich im Dünnschichtchromatogramm differenzieren. Über die relativen Laufstrecken und die Farbreaktionen orientiert Tabelle IV im experimentellen Teil. Verrucarin A und B sowie Roridin A und B enthalten weder N noch S noch Halogenen.

Verrucarin A: Charakteristisch für dieses gut kristallisierende farblose Antibiotikum ist das Verhalten beim Erhitzen, indem es nicht unter 330° schmilzt, sondern sich von etwa 280° an langsam zu zersetzen beginnt. Die Ermittlung der Bruttoformel wurde durch den Umstand erschwert, dass die Molekulargewichtsbestimmung nach RAST mit Campher und anderen Lösungsmitteln sowie die isotherme Destillation nach SIGNER stark streuende Werte lieferte. Verrucarin A reagierte mit den Lösungsmitteln beim Erhitzen. Viel zuverlässiger erwies sich die thermoelektrische Mikrobestimmung¹⁷⁾, die in Dichlormethan als Lösungsmittel das Molekulargewicht 527 ± 26 ergab¹⁸⁾. Damit im Einklang war das Resultat der Molekulargewichtsbestimmung, die aus der Radioaktivität des mit [¹⁴C]-Acetanhydrid hergestellten Mono-O-^{[14}C]-Acetylderivats berechnet wurde, nämlich 520 ± 10 . Auf Grund dieser Befunde und der Elementaranalysen ist die Bruttoformel C₂₇H₃₄O₉ (502,5) gesichert.

¹⁶⁾ Eine besonders geeignete Ausführungsform ist im experimentellen Teil beschrieben.

¹⁷⁾ Vgl. W. SIMON & W. TOMLINSON, *Chimia* 14, 301 (1960); W. SIMON, Internat. Sympos. on Microchemical Techniques, Aug. 13–18 (1961), The Pennsylvania State University.

¹⁸⁾ Die Bestimmungen nach dieser Methode wurden freundlicherweise von Herrn PD. Dr. W. SIMON, ETH, Zürich, ausgeführt. Wir möchten ihm auch an dieser Stelle dafür bestens danken.

Verrucarin A besitzt keine Methoxygruppen (ZEISEL), enthält wahrscheinlich 2 C-Methylgruppen (KUHN-ROTH) und mindestens 1 aktives H-Atom. Es nahm bei der Mikrohydrierung ca. 3 Mol. H_2 auf und entfärbte Lösungen von $KMnO_4$ in Aceton und Br_2 in Chloroform sofort. Die Reaktionen nach TOLLENS, FEHLING, MOLISCH, ZIMMERMANN und LEGAL fielen negativ aus. Es liegt ein lipoidlöslicher Neutralstoff vor. Das IR.-Spektrum deutet auf die Anwesenheit von Hydroxyl- und Carbonyl-Gruppen sowie von C=C-Doppelbindungen hin. Nach dem UV.-Absorptionsspektrum enthält Verrucarin A wahrscheinlich ein konjugiertes chromophores System.

Verrucarin B zeigt sehr ähnliche Eigenschaften wie Verrucarin A (mit dem es gerne Mischkristallise bildet). Beim Erhitzen verhält es sich genau gleich. Die Werte der optischen Drehung sind auffallenderweise stark von der Natur des Lösungsmittels abhängig. Die Analysenwerte passten auf die Formeln $C_{27}H_{32}O_9$ (500,5) und $C_{36}H_{38-40}O_{12}$ (662,7 resp. 664,7). Die Molekulargewichtsbestimmungen nach der kryoskopischen Methode ergaben wieder sehr unterschiedliche Werte, u. a. 629 und 645, die zuverlässigere thermoelektrische Methode in Dichlormethan als Lösungsmittel jedoch den Wert von 490 ± 10 . Wir geben deshalb der kleineren Bruttoformel $C_{27}H_{32}O_9$ den Vorzug. Das Antibioticum enthält mindestens eine C-Methylgruppe (KUHN-ROTH), hingegen weder Methoxygruppen (ZEISEL) noch aktiven Wasserstoff (ZEREWITINOFF). Bei der Mikrohydrierung verbraucht es 3–4 Mol. H_2 . Verrucarin B ist ebenfalls ein lipoidlöslicher Neutralstoff, der nach dem IR.-Spektrum Carbonylgruppen und C=C-Doppelbindungen, jedoch keine HO-Gruppen besitzen dürfte. Das UV.-Absorptionsspektrum deckt sich praktisch mit demjenigen von Verrucarin A.

Verrucarin C, D und *E* besitzen definierte Schmelzpunkte; sie wurden bisher nur in sehr geringen Mengen erhalten, so dass, abgesehen von der Aufnahme eines IR.-Spektrums von Verrucarin C, eine weitere Charakterisierung noch nicht möglich war. Das Spektrum lässt auf die Anwesenheit von Carbonylgruppen und zwei olefinischen Doppelbindungen schliessen. Die HO-Gruppe ist fraglich.

Verrucarin F war in den üblichen Lösungsmitteln schwer löslich. Das UV.-Spektrum einer gesättigten alkoholischen Lösung zeigte Banden bei 202, 233 und 308 $m\mu$, während im IR., abgesehen von der Fingerprint-Region, auffallenderweise nur eine einzige Bande bei 6,22 μ auftrat, die auf eine C=C-Bindung deutet. Hydroxyle und Carbonyle fehlen.

Verrucarin G zeigte im UV. zwei deutliche Absorptionsmaxima und im IR. eine sehr kurzwellige C=O-Schwingung sowie eine eventuelle C=C-Bande.

Roridin A: Die farblosen Kristalle dieses Antibioticums verhalten sich beim Schmelzen normal. Die Elementaranalysen passten auf die Bruttoformeln $C_{27}H_{36}O_9$ (490,6), $C_{29}H_{40-42}O_9$ (532,6–534,6) und $C_{35}H_{48-50}O_{11}$ (644,7–646,7). Die Molekulargewichtsbestimmung nach RAST (459 und 503) sprach für die kleinste Formel, die thermoelektrische Mikrobestimmung in Dichlormethan ergab jedoch das Molgewicht 543 ± 15 . Roridin A scheint demnach die Bruttoformel $C_{29}H_{40-42}O_9$ zu besitzen^{18a)}. Das Antibioticum enthält kein Methoxyl (ZEISEL), es enthält wahrscheinlich 4 C-Methylgruppen (KUHN-ROTH) und 2–3 aktive H-Atome (ZEREWITINOFF). Die Absorptionskurve im UV. ist derjenigen von Verrucarin A und B sehr ähnlich. Das IR.-Spek-

^{18a)} Anm. bei der Korrektur: Die Molekulargewichtsbestimmung auf Grund der Radioaktivität des Di-O- ^{14}C -benzoyl-Derivats ergab den Wert 542 ± 11 . Damit ist die Summenformel $C_{29}H_{40-42}O_9$ gesichert. Für Einzelheiten vgl. spätere Mitteilung.

trum lässt HO-Gruppen, C=C-Doppelbindungen und im Carbonylgebiet ein ausgeprägtes Dublett erkennen. Roridin A ist ein fettlösliches, neutrales Antibioticum mit einem chromophoren System, das dem der Verrucarine A und B sehr ähnlich ist.

Roridin B unterscheidet sich stark von den bisher besprochenen Stoffen. Sein Sauerstoffgehalt ist bemerkenswert niedrig. Die Analysenwerte stimmten auf die Bruttoformel $C_{28}H_{46}O$ (398,6). Sie wird durch die thermoelektrische Molekulargewichtsbestimmung gestützt, die den Wert von 426 ergab. Bei der Mikrohydrierung wurden ca. 4 Mol. H_2 aufgenommen. Im UV.-Gebiet zeigte Roridin B keine selektive Absorption. Nach dem IR.-Spektrum sind eine Hydroxylgruppe, C=C-Doppelbindungen, jedoch keine Carbonylgruppen vorhanden.

Roridin C: Die Analysenwerte des in farblosen Kristallen erhaltenen Metaboliten passten auf die Bruttoformel $C_{15}H_{22}O_3$ (250,3). Damit im Einklang war das Resultat der thermoelektrischen Molekulargewichtsbestimmung, die mit Dichlormethan als Lösungsmittel den Wert 254,3 ergab. Im UV. zeigte Roridin C keine selektive Absorption. Im IR. trat eine Bande bei $2,78 \mu$ auf, die auf die Anwesenheit einer HO-Gruppe deutet. Bei $5,96 \mu$ fand sich eine weitere, nur sehr schwache Schwingung (C=C?).

Nach den vorläufigen Angaben von NESPIAK *et al.*⁸⁾¹⁰⁾ weisen *Myrothecin* und «Metabolit II» gewisse Ähnlichkeiten mit Verrucarin A und B resp. mit Roridin A auf. Es lag deshalb nahe, die Stoffe direkt miteinander zu vergleichen. Herr Prof. KOCÓR hatte die Freundlichkeit, uns für diesen Zweck Proben von «Myrothecin» und seines «Metaboliten II» zu senden¹⁰⁾. Nach den Dünnschichtchromatogrammen ist Myrothecin kein einheitlicher Stoff, sondern ein Gemisch von Verrucarin A (Haupt-

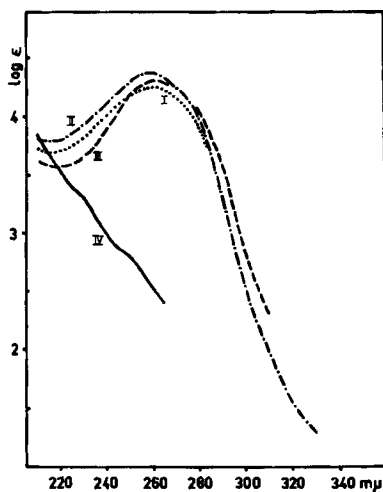


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektren in Äthanol²⁰⁾

- Kurve I: Verrucarin A; $\lambda_{max} = 260 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,25$), ber. auf $C_{27}H_{34}O_9$.
 Kurve II: Verrucarin B; $\lambda_{max} = 258,5 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,37$), ber. auf $C_{27}H_{32}O_9$.
 Kurve III: Roridin A; $\lambda_{max} = 263 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,27$), ber. auf $C_{29}H_{40-42}O_9$.
 Kurve IV: Roridin B, ber. auf $C_{28}H_{46}O$.

¹⁹⁾ Wir möchten ihm auch hier bestens dafür danken.

²⁰⁾ Aufgenommen in der Spektralanalytischen Abteilung (Leitung Dr. H. G. LEMANN) mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK 2.

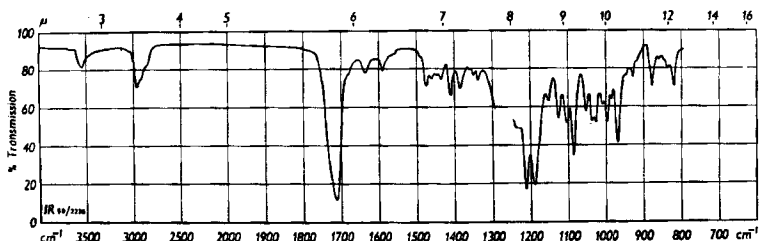


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von Verrucarin A in CH_2Cl_2 -Lösung²¹⁾

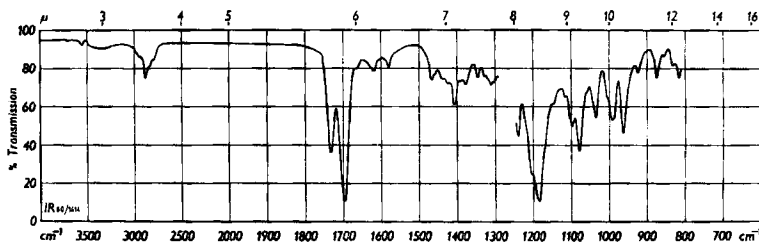


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektrum von Verrucarin B in CH_2Cl_2 -Lösung²¹⁾

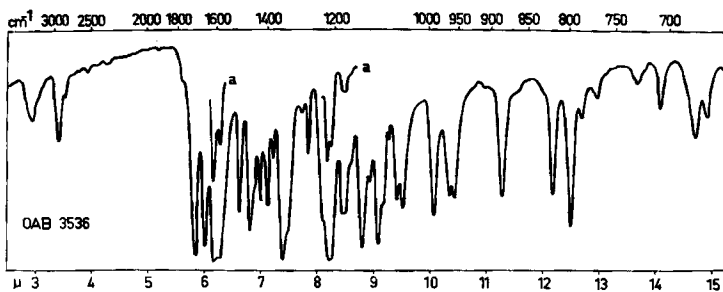


Fig. 4. IR.-Absorptionsspektrum von Verrucarin C, fest in KBr
($c = 1,2$ mg, Kurve a: $c = 0,4$ mg)²¹⁾

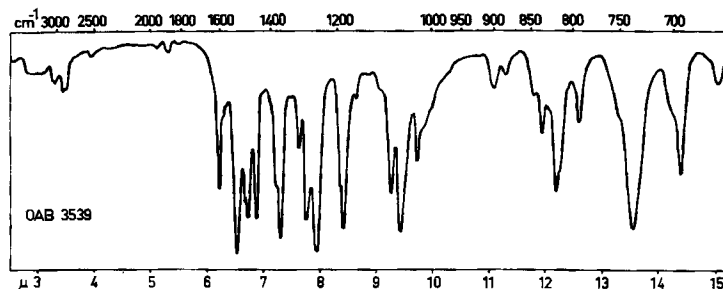


Fig. 5. IR.-Absorptionsspektrum von Verrucarin F, fest in KBr²¹⁾

²¹⁾ Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Zweistrahlenspektrophotometer, Modell 21 mit NaCl-Optik: Fig. 2, 3, 7, 8 und 9 in der Spektralanalytischen Abteilung (Leitung Dr. H. G. LEEMANN) und Fig. 4-6 im Spektrallabor des Instituts für Organische Chemie der Universität Basel.

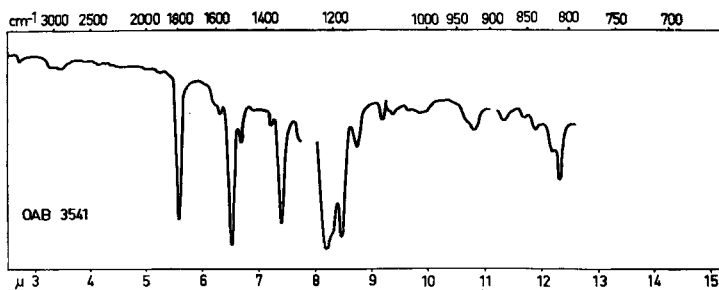


Fig. 6. IR.-Absorptionsspektrum von Verrucarin G in CH_2Cl_2 -Lösung²¹⁾

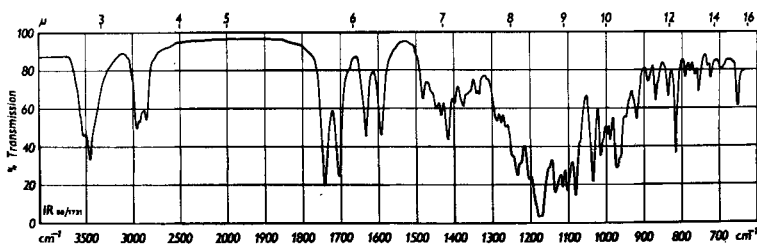


Fig. 7. IR.-Absorptionsspektrum von Roridin A, fest in KBr ²¹⁾

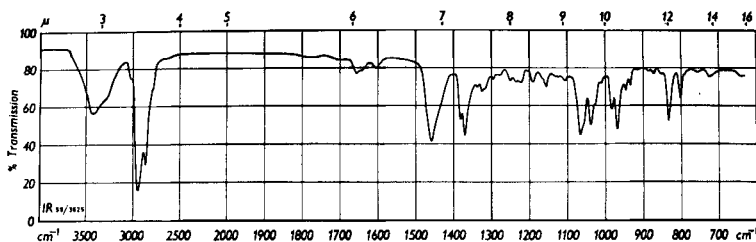


Fig. 8. IR.-Absorptionsspektrum von Roridin B, fest in KBr ²¹⁾

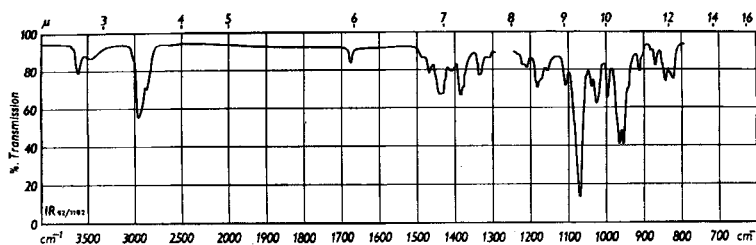


Fig. 9. IR.-Absorptionsspektrum von Roridin C in CH_2Cl_2 -Lösung²¹⁾

produkt) und Verrucarin B (Nebenprodukt). Dafür sprechen auch die Schmelzpunkte, die publizierten⁸⁾¹⁰⁾ Elementaranalysen und spez. Drehungswerte. Nach den letzteren setzt sich «Myrothecin» aus ca. 75% Verrucarin A und ca. 25% Verrucarin B zusammen.

«Metabolit II» erwies sich als chromatographisch einheitlich und war nach Mischprobe und Dünnschichtchromatogramm mit Roridin A identisch.

Biologische Aktivität

I. *Antibiotische Wirkung von Verrucarin A.* – a) *Bakteriostatische Wirkung:* Mit 50 γ /ml wurde keine Hemmwirkung erzielt gegenüber grampositiven Keimen (Streptokokken, Staphylokokken, *B. megaterium*, *B. subtilis*) und gegenüber Mycobakterien. Bei derselben Konzentration wurde das Wachstum gramnegativer Keime (*E. coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abortus equi*) partiell gehemmt.

b) *Fungistatische Wirkung:* Hefepilze (*Saccharomyces*, *Candida*) wurden z. T. bis zu Konzentrationen von 0,5 γ /ml total gehemmt; gegen eine Reihe anderer Pilze (*Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces brasiliensis* und andere), insbesondere gegen Hautpilze (*Trichophyton*, *Achorion*), war die Wirkung 10–100mal schwächer.

II. *Antibiotische Wirkung von Verrucarin B, Verrucarin C und Roridin B.* Verrucarin B zeigte ebenfalls einen fungistatischen Effekt, jedoch waren die benötigten Konzentrationen, insbesondere bei Hefepilzen, deutlich höher als bei Verrucarin A. Verrucarin C und Roridin B waren inaktiv gegenüber Hefepilzen und Bakterien.

III. *Cytostatische Wirkung der Verrucarine und Roridine.* Die Vermehrung von Tumorzellen der Maus (Mastocytom P-815) wurde in der Zellkultur durch die in Tabelle III angegebenen Konzentrationen zu 50% gehemmt:

Tabelle III. *Cytostatische Aktivität in vitro*

Substanz	Konz. (in γ /ml), die 50% Hemmung bewirkt	Substanz	Konz. (in γ /ml), die 50% Hemmung bewirkt
Verrucarin A	0,0006	Roridin A	0,001
Verrucarin B	0,003	Roridin B	>10
Verrucarin C	>3	Roridin C	0,05
Verrucarin E	0,006		

Die drei Stoffe Verrucarin A, Verrucarin B und Roridin A erwiesen sich auch als *in vivo* cytostatisch aktiv, indem sie das Wachstum von Impftumoren bei Mäusen (Sarkom 37 und EHRlich-Ascites-Tumor) und Ratten (WALKER-Carcinosarkom) hemmten. Toxizitätsbestimmungen mit diesen drei Substanzen ergaben folgende DL-50 für intravenöse Applikation bei der Maus: Verrucarin A: 1,5 mg/kg; Verrucarin B: 7,0 mg/kg und Roridin A: 1,0 mg/kg. – Die isolierten Hauptprodukte zeichnen sich somit durch eine bemerkenswert hohe cytostatische Aktivität *in vitro* aus.

Zum Schluss sei noch darauf hingewiesen, dass Kulturen, Rohextrakte und Reinsubstanzen Hautreizungen hervorrufen können. Besonders der Kontakt mit den Augen verursacht eine unangenehme Keratoconjunctivitis. Dieser Nebeneffekt ist allerdings bei den reinen Stoffen weniger stark ausgeprägt²²⁾.

Experimenteller Teil²³⁾

Allgemeines. – Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze bis $200^\circ \pm 2^\circ$, darüber $\pm 3^\circ$. Substanzproben zur Messung der spez. Drehung, zur Aufnahme der UV.- und IR.-Spektren wurden ca. 1 Std. bei 0,02 Torr und $60-70^\circ$ und zur Analyse bei $0,01$

²²⁾ Peinliche Sauberkeit, Schutzbrille, Gummihandschuhe und Schutzcremen sind für die Arbeit im Laboratorium unerlässlich.

²³⁾ Wir danken Herrn W. ZÜRCHER für seine geschickte und zuverlässige Mitarbeit bei den chemischen Versuchen.

Torr bei der angegebenen Zeit und Temperatur getrocknet. Die Mikroanalysen verdanken wir den Mikroanalytischen Laboratorien der SANDOZ AG. (Dr. W. SCHÖNIGER und des Instituts für Organische Chemie der Universität Basel (E. THOMMEN). Die Adsorptionschromatographie an Al_2O_3 (von Fa. M. WOELM Eschwege, Deutschland) und an Silicagel (Korngrösse 0,15–0,30 mm von BENDER und HOBEIN, Zürich) erfolgte nach der Durchlaufmethode²⁴), die Verteilungschromatographie nach STOLL *et al.*²⁵), die Dünnschichtchromatographie nach STAHL²⁶).

Züchtung der Mikroorganismen und Isolierung der Stoffwechselprodukte

1. *Versuch.* Der Stamm S 118 von *M. verrucaria* wurde in 50 l Nährlösung (20 g Glucose *puriss.*, Ph. H., 2 g Malzextrakt der SCHWEIZ. FERMENT AG., Basel, 2 g Yeast-Extract DIFCO, 2 g Pepton CUDAHAY, 2 g KH_2PO_4 , 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 1 l entmineralisiertem Wasser) in einem 50-Liter-Fermenter (System Ultramix, Typ FU 005, HCH. BERTRAMS AG., Basel) unter Rühren (1450 Umdrehungen pro Min.) und ständiger Belüftung (0,8 l pro Min. pro l Nährlösung) 63 Std. inkubiert. Nach Zugabe von Kieselgur (Celite) wurde die Kulturbrühe mit insgesamt 22 l Essigester extrahiert (Trennung der Phasen in der Zentrifuge). Nach Einengen des Extraktes im Vakuum auf 4 l wurde 4mal mit je 400 ml 2N Natronlauge und 3mal mit 300 ml Wasser gewaschen und eingedampft. Es resultierten 19,5 g gereinigter Essigester-Extrakt. Aus Äther liessen sich durch Kristallisation 2,31 g rohes krist. *Verrucaridin A* (noch *Verrucaridin B* enthaltend) gewinnen. Die Mutterlauge (17,2 g) wurden an 850 g Silicagel chromatographiert. Zum Nachwaschen der Fraktionen dienten 1,7 l Lösungsmittel pro Fraktion. Fraktion 1 (7,0 g, eluiert mit Benzol) lieferte aus Äther-Petroläther 19 mg *Verrucaridin F* vom Smp. 237–239° (noch nicht untersucht). Die Fraktionen 2–6 (4,15 g, eluiert mit Chloroform) ergaben aus Äther-Petroläther 60 mg krist. *Roridin B* in Nadeln vom Smp. 139–143°. Die Fraktionen 7–10 (eluiert mit Chloroform-Methanol-(99:1)) lieferten 1,09 g amorphes Material (verworfen). Die Fraktionen 11–18 (3,25 g, eluiert mit Chloroform-Methanol-(98:2)) ergaben aus Äther 2,18 g rohes krist. *Verrucaridin A* (noch *Verrucaridin B* enthaltend). Die folgenden Fraktionen wurden verworfen. Bei der Züchtung in Schüttelkulturen wurden nach analoger Extraktion und Chromatographie an Silicagel aus den ersten mit Chloroform eluierten Fraktionen 33 mg rohes *Verrucaridin G* vom Smp. 127–139° erhalten (aus 35 l Kulturfiltrat).

2. *Versuch.* Der Stamm S 118 von *M. verrucaria* wurde als ruhende Oberflächenkultur in 500-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 100 ml Nährlösung der im 1. Versuch beschriebenen Zusammensetzung unter Zugabe von 3,0 g NH_4Cl pro l bei 27° inkubiert. Nach Abfiltrieren der Kulturflüssigkeit vom Mycel wurden durch Extraktion von 30 l Kulturbrühe mit Essigester 14 g roher Extrakt erhalten. 12,7 g dieses Extraktes wurden in 1,5 l Chloroform gelöst und die Lösung bei 0° 3mal mit je 150 ml 2N Natronlauge und 2mal mit je 150 ml Wasser gewaschen und eingedampft. Es resultierten 9,5 g neutrales Rohprodukt, das an 250 g Silicagel chromatographiert wurde.

Zur Elution dienten jeweils 400 ml des Lösungsmittels pro Fraktion. Die Fraktionen 1–10 (eluiert mit Chloroform und Chloroform-Methanol-(99,5:0,5)) ergaben 1,46 g amorphes Material (verworfen). Die Fraktionen 11–20 (4,324 g, eluiert mit Chloroform-Methanol-(99:1)) 200 mg rohes krist. *Verrucaridin A*, das noch *Verrucaridin B* enthielt. Die Fraktionen 21–30 (eluiert mit Chloroform-Methanol-(98:2) und -(9:1)) ergaben 4,21 g amorphes Material (verworfen). Die Mutterlauge rückstände der Fraktionen 11–20 (3,56 g) wurden zur weiteren Reinigung an neutralem Al_2O_3 der Aktivitätsstufe II chromatographiert. Zum Eluieren dienten 400 ml Lösungsmittel pro Fraktion. Fraktion 1 (1,54 g, eluiert mit Chloroform-Benzol-(4:1)) gab aus Äther 25 mg rohes krist. *Verrucaridin A* (noch *Verrucaridin B* enthaltend). Die Fraktionen 2–19 (eluiert mit Chloroform-Benzol-(4:1), Chloroform, Chloroform-Methanol-(99:1), -(98:2) und -(95:5)) ergaben 1,54 g amorphes Material (verworfen). Fraktion 20 (61 mg, eluiert mit Chloroform-Methanol-(3:1)) ergaben aus Methanol-Äther 8 mg *Verrucaridin C* vom Smp. 226–228°.

²⁴) Vgl. T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Discuss. Farad. Soc. Nr. 7, 305 (1949).

²⁵) A. STOLL, E. ANGLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL & J. RENZ, Helv. 34, 1460 (1951).

²⁶) E. STAHL, Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958); Arch. Pharmaz. 292/64, 411 (1959); Angew. Chem. 73, 646 (1961); vgl. auch E. DEMOLE, J. Chromatography 1, 24 (1958).

Extraktion des Mycels: Das getrocknete Mycel wurde 3mal mit je 2 l Methanol und 200 ml Wasser 45 Min. bei 40–50° extrahiert, filtriert und eingedampft. Der Rückstand (12,8 g) wurde hierauf zwischen 500 ml Wasser und 1 l Essigester verteilt und die wässrige Phase noch 3mal mit je 1 l Essigester ausgeschüttelt. Die Essigester-Extrakte ergaben nach Eindampfen 5,20 g braunes Öl, das wie oben beschrieben an 120 g Silicagel chromatographiert wurde. Aus den mit Chloroform-Methanol-(99,5:0,5) eluierten Fraktionen (157 mg) wurden aus Äther 41 mg reines krist. *Roridin B* in Nadeln vom Smp. 147–152° erhalten. Aus späteren mit Chloroform-Methanol-(99:1) eluierten Fraktionen kristallisierten aus Äther 16 mg rohes *Verrucarina A* (noch *Verrucarina B* enthaltend) aus.

3. *Versuch.* Der Stamm S 833 von *M. verrucaria* wurde als Schüttelkultur (500-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 100 ml Nährlösung) in einem Medium inkubiert, das pro Liter 30 g Rohrzucker, 2,5 g NH_4Cl , 1,0 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KCl , 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und Wasser enthielt. 900 ml Kulturfiltrat wurden mit 2 l Essigester extrahiert. Der Extrakt lieferte nach Waschen mit Wasser, 2N Natronlauge und Wasser und nach Eindampfen im Vakuum 243 mg öliges Rohprodukt, das an 12 g Silicagel chromatographiert wurde. Aus den mit Chloroform eluierten Fraktionen wurden aus Äther-Petroläther 2 mg reines *Verrucarina D* in Nadeln vom Smp. 127–128° erhalten. Im Dünnschichtchromatogramm wanderte *Verrucarina D* etwa gleich rasch wie *Verrucarina A*. Aus den folgenden mit Chloroform-Methanol-(99:1) eluierten Fraktionen wurden 38 mg rohes krist. *Verrucarina A* erhalten, das noch *Verrucarina B* enthielt.

4. *Versuch.* 100 Schüttelkulturen (500-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 100 ml Nährlösung) mit RICHARD'Scher Nährlösung, modifiziert nach LUZ²⁷⁾, wurden mit einer Konidien suspension des Stammes S 833 von *M. verrucaria* beimpft. Nach Inkubation während 9 Tagen bei 27° auf einer Schüttelmaschine mit Amplituden-Bewegung (100 Bewegungen pro Min.) wurde vom Mycel abgenutscht und das klare Kulturfiltrat 2mal mit je 1 l Essigester ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden je einmal mit 2N Salzsäure, 2N Natronlauge und Wasser gewaschen und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 115 mg braun gefärbtes Rohprodukt, das zur weiteren Reinigung an 6 g Silicagel chromatographiert wurde. Zur Elution dienten 12 ml Lösungsmittel pro Fraktion. Die Fraktionen 1–5 (eluiert mit Benzol, Chloroform und Chloroform-Methanol-(99:1)) ergaben 3,6 mg amorphes Material (verworfen). Die Fraktionen 6 und 7 (26 mg, eluiert mit Chloroform-Methanol-(99:1)) gaben aus Äther 8 mg rohes krist. *Verrucarina A* (noch *Verrucarina B* enthaltend). Die Fraktionen 9 und 10 (eluiert mit Chloroform-Methanol-(99:1)) ergaben aus Äther 13 mg krist. *Verrucarina E* vom Smp. 103–104°. Die Fraktionen 16–24 (eluiert mit Chloroform-Methanol-(99:1) und -(98:2)) ergaben 15 mg amorphes Material (verworfen).

5. *Versuch.* Der Stamm S 1135 von *M. roridum* wurde in einem 10-Liter-Fermenter (System Ultramix, Typ FU 001, HCH. BERTRAMS AG., Basel) mit 10 l Luft pro Min. bei 0,4 atü und einer Temperatur von 27° in einer Nährlösung inkubiert, die pro Liter 30,0 g Glucose *puriss.*, Ph. H. V, 1,0 g Yeast-Extract DIFCO, 4,0 g NH_4NO_3 , 2,72 g KH_2PO_4 , 1,23 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,028 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,003 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und entmineralisiertes Wasser enthielt. Die Kulturbrühe (10 l) wurde durch eine Schicht Kieselgur (Celite) filtriert, und das klare, gelbgefärbte Kulturfiltrat 3mal mit je 10 l Essigester extrahiert. Die mit 1 l Wasser gewaschenen Extrakte wurden im Vakuum vollständig eingedampft, der Rückstand in 1 l Chloroform gelöst und die Lösung 3mal mit je 100 ml 2N Natronlauge und 4mal mit je 100 ml Wasser gewaschen. Nach Eindampfen der gewaschenen Chloroformlösung resultierten 12,0 g gelbgefärbtes Rohprodukt, das zur weiteren Auftrennung an 250 g Silicagel chromatographiert wurde.

Chromatogramm I: Zur Elution diente je 500 ml Lösungsmittel pro Fraktion. Die Fraktionen 1 und 2 (eluiert mit Benzol) enthielten 7,88 g Öl (verworfen). Die Fraktionen 3–6 (482 mg, eluiert mit Chloroform) ergaben aus Äther oder Petroläther 23 mg krist. *Roridin B* vom Smp. 140–147°. Die Fraktionen 7 und 8 (eluiert mit Chloroform-Methanol-(99:1)) ergaben 101 mg amorphes Material (verworfen). Die Fraktionen 9 und 10 (1,48 g, eluiert mit Chloroform-Methanol-(99:1)) ergaben aus Äther 646 mg Kristalle vom Smp. 122–143°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther resultierte 400 mg Kristallisat vom Smp. 130–138°, das hauptsächlich aus *Roridin A*, sowie aus *Verrucarina A* und *Roridin C* bestand. Die weitere Trennung des Kristallisats erfolgte im Chromatogramm III (siehe unten). Fraktion 11 (305 mg, eluiert mit Chloroform-Methanol-(99:1)) lieferte aus Äther 106 mg krist. *Roridin A*, das noch Spuren von Begleitstoffen ent-

²⁷⁾ G. Luz, Phytopathol. Z. 7, 589 (1934).

hielt. Die weitere Reinigung erfolgte durch das Chromatogramm III, die der Mutterlaugenrückstände der Fraktionen 9-11 durch das Chromatogramm II. Die Fraktionen 12-20 (eluiert mit Chloroform-Methanol-(99:1), -(98:2) und -(1:1)) lieferten keine Kristalle. Die weitere Reinigung der Fraktionen 12 und 13 (330 mg) erfolgte im Chromatogramm II.

Chromatogramm III: Die Mutterlaugenrückstände der Fraktionen 9, 10 und 11 sowie die Fraktionen 12 und 13, insgesamt 1,39 g Material, wurden vereinigt und der Verteilungschromatographie mit 700 g Kieselgel-Wasser-(1:1) als stationärer Phase und mit den folgenden wasser-gesättigten Lösungsmitteln (200 ml pro Fraktion) als mobiler Phase unterworfen. Die Fraktionen 1-19 (eluiert mit Benzol und Benzol-Chloroform-(95:5)) lieferten 269 mg amorphes Material (verworfen). Die Fraktionen 20-25 (91 mg, eluiert mit Benzol-Chloroform-(95:5)) ergaben aus Äther 13 mg reines krist. *Verrucarín B*. Die Fraktionen 26-30 (eluiert mit Benzol-Chloroform-(95:5)) ergaben 62 mg amorphes Material (verworfen). Die Fraktionen 31-38 (130 mg, eluiert mit Benzol-Chloroform-(95:5)) ergaben aus Äther 12 mg reines krist. *Verrucarín A*. Aus den Mutterlaugenrückständen wurden aus Äther 20 mg reines krist. *Roridin C* vom Smp. 117-121° erhalten. Die Fraktionen 39-43 (60 mg, eluiert mit Benzol-Chloroform-(95:5)) führten nach fraktionierter Kristallisation mittels Äther zu 28 mg reinem krist. *Verrucarín A* und 17 mg reinem krist. *Roridin C*. Die Mutterlaugen enthielten *Verrucarín B* und *Roridin C*. Die Fraktionen 44-75 (269 mg, eluiert mit Benzol-Chloroform-(95:5), -(9:1) und -(4:1)) lieferten nach fraktionierter Kristallisation 48 mg reines krist. *Verrucarín A*. Die Mutterlaugen enthielten *Verrucarín B* und *Roridin C*. Die Fraktionen 76-125 (eluiert mit Benzol-Chloroform-(1:1) und Chloroform) ergaben 526 mg amorphes Material (verworfen). Die Fraktionen 126-133 (350 mg, eluiert mit Chloroform-Essigester-(9:1)) lieferten aus Äther 305 mg reines krist. *Roridin A* vom Smp. 194-202°. Die Fraktionen 134-159 (eluiert mit Chloroform-Essigester-(9:1) (4:1) und Essigester) ergaben 278 mg amorphes Material (verworfen).

Chromatogramm III: 800 mg Kristallgemisch der Fraktionen 9-11 des Chromatogramm I wurden an 80 g Aluminiumoxid chromatographiert. Zur Elution dienten 100 ml Lösungsmittel pro Fraktion. Die Fraktionen 1-11 (eluiert mit Chloroform) ergaben Spuren von amorphem Material (verworfen). Die Fraktionen 12-21 (eluiert mit Chloroform-Methanol-(99,5:0,5)) lieferten aus Äther 200 mg Kristallgemisch von *Roridin A* und *Roridin C*. Die Fraktionen 22-51 (eluiert mit Chloroform-Methanol-(99:1)) lieferten aus Äther 432 mg einheitliches krist. *Roridin A*. Die Fraktionen 52-67 (eluiert mit Chloroform-Methanol-(95:5), -(9:1) und -(4:1)) ergaben 46 mg amorphes Material (verworfen).

6. *Versuch.* Der Stamm S 750 von *M. verrucaria* wurde in einem Fermenter (NEW BRUNSWICK Co, Typ FS 307, New Brunswick, N. J., USA) mit 5 l RICHARD'scher Nährlösung (vgl. 1. Versuch) unter Belüftung (5 l Luft pro Min.) und Rühren (300 Umdrehungen pro Min.) bei 27° gezüchtet. Nach Extraktion des Kulturfiltrates mit Essigester (vgl. Versuche 1-5) resultierten 680 mg Extrakt, der nach Chromatographie an Silicagel 34 mg reines krist. *Verrucarín A*, 72 mg krist. Gemisch von *Verrucarín A*, *B* und *Roridin A* lieferte.

7. *Versuch.* Der Stamm S 973 von *M. roridum* wurde, wie im 6. Versuch beschrieben, gezüchtet. Nach Extraktion des Kulturfiltrats und Chromatographie der Extrakte resultierten 533 mg reines krist. *Roridin A* vom Smp. 191-196°, sowie 700 mg krist. Gemisch von *Roridin A* und *Verrucarín A*.

Trennung des Mischkristallisats von *Verrucarín A* und *B*. - 9,53 g rohes krist. *Verrucarín A* (*Verrucarín B* enthaltend) wurden der Verteilungschromatographie an 5,4 kg Kieselgel-Wasser-(1:1) unterworfen. Die zur Elution dienenden Lösungsmittel waren mit Wasser gesättigt (1,2 l pro Fraktion). Die Fraktionen 1-20 (eluiert mit Benzol und Benzol-Chloroform-(95:5)) ergaben 445 mg öliges Material (verworfen). Die Fraktionen 21-34 (1,20 g, eluiert mit Benzol-Chloroform-(95:5)) ergaben aus Aceton-Äther 747 mg reines krist. *Verrucarín B* (im Dünnschichtchromatogramm einheitlich). Die Fraktionen 35-37 (172 mg, eluiert mit Benzol-Chloroform-(95:5)) lieferten aus Aceton-Äther 126 mg Kristallgemisch von ca. 50% *Verrucarín A* und ca. 50% *Verrucarín B*. Die Fraktionen 38-40 (eluiert aus Benzol-Chloroform-(95:5)) ergaben 406 mg Material, das vorwiegend aus *Verrucarín A* (Hauptprodukt) und 3-4 weiteren nicht identifizierten Nebenprodukten besteht. Die Fraktionen 41-84 (8,6 g, eluiert mit Benzol-Chloroform-(9:1), -(8:2), -(3:2), -(7:3) und Chloroform) lieferten aus Aceton-Äther 6,13 g reines krist. *Verrucarín A* (im Dünnschichtchromatogramm einheitlich).

Charakterisierung der isolierten Stoffe

1) *Verrucarin A*: Aus Methanol-Äther oder Aceton-Äther farblose Blättchen, die nicht unter 360° schmelzen. Bei ca. 280° beginnen sich die Kristalle braun zu färben. $[\alpha]_D^{22} = +206^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,012$ in Chloroform); $+207^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,199$ in Chloroform) und $+208^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,281$ in Dioxan). UV.-Spektrum vgl. Fig. 1, IR.-Spektrum vgl. Fig. 2. Trocknung zur Analyse 5 Std. bei 100°.

$C_{27}H_{34}O_9$ (502,5)	Ber. C 64,5 Gef. „ 64,5	H 6,8 „ 6,9	O 28,65 „ 29,0	2 (C)CH ₃ 6,0 „ 5,5 ²⁸⁾	1 akt. H 0,20% „ 0,17% (20°)
	Gef. „ 64,7	„ 7,0	„ 28,4		„ 0,25% (80°)
	Gef. „ 64,2	„ 6,7	„ 28,7		

Mono-O-[¹⁴C]-acetylderivat²⁹⁾: 53 mg krist. *Verrucarin A* wurden mit 0,3 ml Pyridin und 0,33 ml 10-proz. Lösung von [¹⁴C]-Acetanhydrid in Benzol 3 Tage bei 22° stehengelassen. Das nach Eindampfen im Vakuum resultierende Rohprodukt wurde durch Chromatographie an Al₂O₃ gereinigt. Nach 5mal Umkristallisieren aus Äther-Petroläther wurden 20 mg Kristalle vom Smp. 213–215° mit konstanter Radioaktivität erhalten: spez. Radioaktivität³⁰⁾: 15530 dpm/mg. Ein Präparat von [¹⁴C]-Acetanilid, mit demselben [¹⁴C]-Acetanhydrid hergestellt, besass eine spez. Aktivität von 64540 dpm/mg = 8723000 dpm/mMol. Daraus berechnet sich für die monoacetylierte Verbindung ein Molgewicht von 562 (Ber. für C₂₉H₃₆O₁₀ = 544,6) bzw. für *Verrucarin A* 520 (bei 502,5). Der Fehler beträgt ± 2%.

2) *Verrucarin B*: Aus Aceton-Äther farblose Nadeln, die nicht unter 330° schmelzen. Bei ca. 280° beginnen sich die Kristalle braun zu färben. $[\alpha]_D^{23} = +94^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,990$ in Chloroform); $+93^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,137$ in Chloroform); $[\alpha]_D^{22} = +101^\circ \pm 1,5^\circ$ ($c = 1,416$ in Dioxan); $[\alpha]_D^{23} = +147^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,066$ in Benzol); $[\alpha]_D^{22} = +148^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,345$ in Benzol). UV.-Spektrum vgl. Fig. 1, IR.-Spektrum vgl. Fig. 3. Trocknung zur Analyse 5 Std. bei 100°.

$C_{27}H_{32}O_9$ (500,5)	Ber. C 64,8 Gef. „ 65,4	H 6,4 „ 6,5	O 28,8 „ 28,1	1 (C)CH ₃ 3,0% „ 3,7% ²⁸⁾
	Gef. „ 64,7	„ 6,4	„ 28,9	„ 2,9% ²⁸⁾

0,0% aktiver Wasserstoff (ZEREWITINOFF).

3) *Verrucarin C*: Aus Methanol-Äther oder Aceton-Äther farblose Prismen vom Smp. 223–224°. IR.-Spektrum vgl. Fig. 4.

4) *Verrucarin D*: Aus Äther-Petroläther farblose Nadeln vom Smp. 127–128°.

5) *Verrucarin E*: Aus Aceton-Äther-Petroläther farblose Nadeln vom Smp. 103–104°.

6) *Verrucarin F*: Aus Aceton-Äther oder Methanol mit wenig Chloroform Rhomben vom Smp. 237–238°. $[\alpha]_D^{23} = -1^\circ \pm 3,5^\circ$ ($c = 0,643$ in Pyridin). Der Stoff ist sehr schwer löslich in den üblichen Lösungsmitteln, ausser in Pyridin. Absorptionsmaxima des UV.-Spektrums in einer gesättigten Lösung in Äthanol vgl. Tabelle II; IR.-Spektrum vgl. Fig. 5.

7) *Verrucarin G*: Aus Aceton-Äther farblose Nadeln vom Doppel-Smp. 118°/131–135°, und aus Methanol mit wenig Chloroform farblose Nadeln vom Smp. 142–145°; $[\alpha]_D^{23} = 0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,812$ in Chloroform). Absorptionsmaxima des UV.-Spektrums vgl. Tabelle II; IR.-Spektrum vgl. Fig. 6.

8) *Roridin A*: Aus Aceton-Äther farblose Stäbchen vom Smp. 198–204°. $[\alpha]_D^{22} = +130^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,361$ in Chloroform); $+128^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,207$ in Chloroform). UV.-Spektrum vgl. Fig. 1, IR.-Spektrum vgl. Fig. 7. Trocknung zur Analyse 5 Std. bei 100°.

$C_{29}H_{40}O_9$ (532,6)	Ber. C 65,4 Ber. „ 65,2	H 7,6 „ 7,9	O 27,0 „ 26,9	4 (C)CH ₃ 11,3 „ 11,3	2 akt. H 0,38% 3 akt. „ 0,56%
$C_{29}H_{42}O_9$ (534,6)	Gef. „ 65,1	„ 7,4	„ 27,4	„ 11,2	akt. „ 0,30% (20°)
	Gef. „ 66,0	„ 7,7	„ 26,9	„ 11,2	akt. „ 0,57% (80°)
	Gef. „ 65,4	„ 7,7	„ 26,9		

²⁸⁾ Die Substanz löste sich sehr schwer in siedender Chromschwefelsäure und war auch nach 4–5 Std. nicht vollständig in Lösung gegangen.

²⁹⁾ Dieser Versuch wurde von Herrn J. GUTZWILER durchgeführt. Weitere Charakterisierung siehe spätere Mitteilung.

³⁰⁾ Die Bestimmung der Radioaktivität verdanken wir Herrn Dr. F. KALBERER.

9) *Roridin B*: Aus Aceton-Chloroform-Methanol Nadeln oder Blättchen vom Smp. 143–149°. $[\alpha]_D^{23} = -123^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,876$ in Chloroform); $-126^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,767$ in Benzol). UV.-Spektrum vgl. Fig. 1, IR.-Spektrum vgl. Fig. 8. Trocknung zur Analyse 3 Std. bei 100°.

$C_{28}H_{46}O$ Ber. C 84,4 H 11,6 O 4,0 %
(398,6) Gef. „ 83,8 „ 11,1 „ 4,4; 4,8%

10) *Roridin C*: Aus Äther-Petroläther farblose flache Nadeln vom Smp. 117–119°. $[\alpha]_D^{23} = -33^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,086$ in Chloroform). Im UV. keine Absorptionsmaxima, nur schwache Endabsorption; IR.-Spektrum vgl. Fig. 9.

Trocknung zur Analyse 3 Std. bei 65°.

$C_{15}H_{22}O_3$ (250,3) Ber. C 72,0 H 8,8 O 19,2% Gef. C 72,0 H 8,9 O 19,3%

Dünnschichtchromatographie²⁶⁾ der Verrucarine und Roridine. – Die in der folgenden Tabelle angeführten Rf-Werte können etwas variieren³¹⁾. Sie sind angegeben, um die Laufstrecken der einzelnen Substanzen miteinander vergleichen zu können. Identifizierungen sind nur beim direkten Vergleich mit den authent. Substanzen eindeutig.

Tabelle IV. *Dünnschichtchromatographie*

Substanz	Rf-Werte			Farbreaktion mit J_2	Farbe in UV.-Licht
	a)	b)	c)		
Verrucarín A . .	0,70	0,28	0,59	gelbbraun	hell
Verrucarín B . .	0,83	0,47	0,69	gelbbraun	hell
Verrucarín C . .	0,74	0,28	0,52	gelbbraun	hell-leuchtend
Verrucarín D . .	0,70	0,28	0,55	gelbbraun	dunkel
Verrucarín E . .	0,0	0,0	0,09	violett	dunkel
Verrucarín F . .	—	0,54	—	schwach gelbbraun	dunkel
Verrucarín G . .	—	0,49	—	braun	nicht sichtbar
Roridin A . . .	0,70	0,18	0,21	gelbbraun	dunkel
Roridin B . . .	0,55	0,26	0,49	grün-schwarz	dunkel
Roridin C . . .	—	—	0,41	gelbbraun	dunkel

a) Träger: Aluminiumoxid; Fließmittel: Chloroform-Methanol-(98:2).

b) Träger: Kieselgel G; Fließmittel: Chloroform-Methanol-(98:2).

c) Träger: Kieselgel G; Fließmittel: Chloroform-Methanol-(97:3).

Reihenfolge der Substanzen nach abnehmender Laufgeschwindigkeit (Rf-Wert) in den Systemen b) und c): Verrucarín F, Verrucarín G, Verrucarín B, Verrucarín A, Verrucarín D, Verrucarín C, Roridin B, Roridin C, Roridin A und Verrucarín E.

SUMMARY

From cultures of *Myrothecium verrucaria* (ALBERTINI *et* SCHWEINITZ) DITMAR *ex* FRIES and *Myrothecium roridum* TODE *ex* FRIES (*Fungi imperfecti*) a group of 10 new metabolites has been isolated in pure crystalline form and characterized by analytical and spectroscopic data: Verrucarín A ($C_{27}H_{34}O_9$), B ($C_{27}H_{32}O_9$), C, D, E, F, G, and Roridin A ($C_{29}H_{40-42}O_9$), B ($C_{28}H_{46}O?$) and Roridin C. They are neutral lipophilic compounds. The main constituents, Verrucarín A and B and Roridin A, show *in vitro* antifungal and high cytostatic activity.

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien
und Abteilung für Medizinisch-Biologische Forschung, SANDOZ AG., Basel

³¹⁾ Zur Reproduzierbarkeit der Rf-Werte vgl. M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI & A. R. FAHMY, *Experientia* 18, 104 (1962).