

- [8] A. WINDAUS & G. STEIN, Ber. deutsch. Chem. Ges. 67, 2436 (1928); F. HUNZIKER & T. REICHSTEIN, Helv. 28, 1472 (1945).
- [9] a) S. SMITH, J. chem. Soc. 1930, 508; b) M. STEIGER & T. REICHSTEIN, Helv. 27, 828 (1938); c) S. PATAKI, K. MEYER & T. REICHSTEIN, Helv. 36, 1295 (1953).
- [10] H. HENBEST, G. D. MEAKINS, D. NICHOLLS & K. J. TAYLOR, J. Chem. Soc. 1957, 1459; H. SCHRÖTER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. 47, 720 (1958); vgl. auch [6].
- [11] T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Discuss. Farad. Soc. Nr. 7, 305 (1949).
- [12] G. R. DUNCAN, J. Chromatogr. 8, 37 (1962).
- [13] Vgl. E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962; K. RANDEKATH, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1962.
- [14] D. LAWDAY, Nature 170, 415 (1952); P. ZOLLER & CH. TAMM, Helv. 36, 1744 (1953); H. R. URSCHELER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. 38, 883 (1955); R. BOLLIGER & K. MEYER, Helv. 40, 1659 (1957).

249. Umwandlung von Krötengiften (Bufadienoliden) durch Mikroorganismen

III. 12 β -Hydroxymarinobufagin¹⁾

13. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]²⁾

von M. Schüpbach und Ch. Tamm

(14. X. 64)

Mit Hilfe mikrobieller Enzyme ist es möglich, neue Bufadienolidderivate zu bereiten, die man auf rein chemischem Wege nicht oder nur über sehr viele Stufen synthetisieren kann. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese neuen Verbindungen oder von ihnen abgeleitete Ester und Glykoside später auch in tierischen oder pflanzlichen Materialien entdeckt werden, womit ihre Identifizierung vereinfacht ist. Ausserdem können diese neuen Stoffe unsere Kenntnisse über die Beziehungen zwischen Konstitution und biologischer Wirksamkeit vertiefen. Nachdem wir in der vorausgegangenen Mitteilung [1] über die 12 β -Hydroxylierung von Resibufogenin mit Kulturen von *Fusarium lini* (BOLLEY) berichtet hatten, beschreiben wir jetzt die Resultate, die bei der Inkubation von Marinobufagin (1) mit dem gleichen Organismus erzielt wurden³⁾. Marinobufagin (1) unterscheidet sich von Resibufogenin lediglich durch eine zusätzliche Hydroxygruppe an C-5 [2].

Da nach den bisherigen Erfahrungen [3] die Hydroxylierungsgeschwindigkeiten mit zunehmender Zahl von HO-Gruppen rasch abnehmen, war es nicht verwunderlich, dass auch bei 1 mit *F. lini* nur eine sehr langsame Reaktion stattfand. Erst bei Zusatz von KCN zur Nährlösung (10⁻³M KCN) trat in Analogie zu früheren Beobachtungen [4] eine befriedigende Umsetzung ein. Sie wurde wie üblich unter Belüftung in Schüttelkulturen bei 27° vorgenommen. Nach 17 Tagen zeigte das Dünnschichtchromato-

¹⁾ Über diese Untersuchungen wurde am «International Symposium on the Chemistry of Natural Products», Kyoto, Japan, 12.-18. April 1964, berichtet [1a].

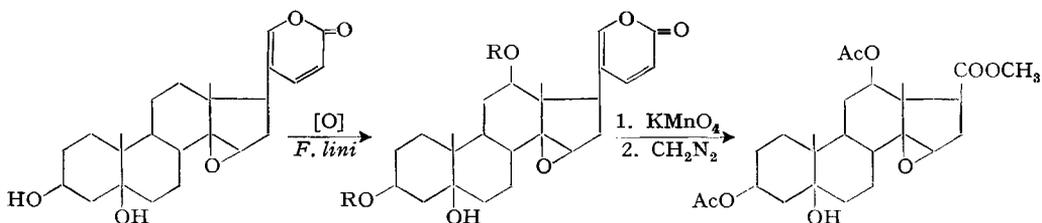
²⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2233.

³⁾ Wir möchten Herrn Prof. Dr. KUNO MEYER, Basel, erneut für die grosszügige Überlassung einer grösseren Menge Marinobufagin danken.

gramm einen neuen starken langsamer laufenden, sowie drei weitere neue schwache Flecke. Nach Chromatographie an Silicagel wurde in 65-proz. Ausbeute ein Stoff vom Smp. 250–254° erhalten, dem wir auf Grund der folgenden Beobachtungen die Konstitution des noch unbekanntenen 12β-Hydroxymarinobufagins (2) erteilen. Die Analysenwerte passten auf die Formel C₂₄H₃₂O₆. Nach dem UV.-Spektrum (λ_{max} = 298 mμ; log ε = 3,69 und λ_{max} = 195 mμ; log ε = 4,08) war der Cumalinring intakt geblieben. Mit Acetanhydrid in Pyridin bei 37° lieferte 2 das Di-O-acetyl-derivat 3, dessen IR.-Spektrum (vgl. Fig. 1) u. a. eine HO-Gruppe bei 2,79 μ und bei 3,29 μ die CH-Streckschwingung zeigte, die für das 15αH-Atom der 14β,15β-Epoxygruppe typisch ist [5].

Zur Abklärung der Stellung des mikrobiologisch eingeführten Hydroxyls wurde das Diacetat 3 mit KMnO₄ abgebaut und der saure Anteil der Reaktionsprodukte mit

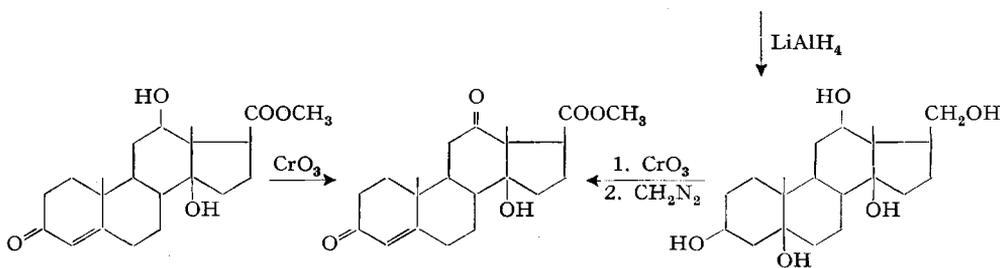
Formelschema



1 Marinobufagin
F. 224–227° (+10 Chf) [2]

2 (R = H) 12β-Hydroxymarinobufagin F. 250–254° (+14 Me)⁴⁾
3 (R = Ac) F. 236–238° (+47 Me)⁴⁾

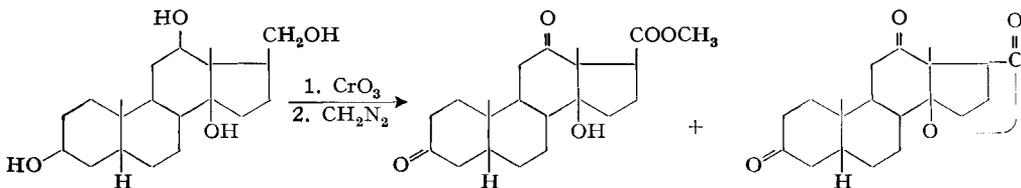
4 F. 195–206°
(+49 Me)⁴⁾



5 F. 201–203°/207° (+131 Chf) [6]

6 F. 190–191° (+194 Chf)⁴⁾

7 F. 199–207°
(+14 Me)⁴⁾



8 F. 247–250° (+2 Me) [1]

9 F. 174–178° [7] (+135 Chf)⁴⁾

10 F. 252–256°⁴⁾

Ac = CH₃CO–; Chf = Chloroform; Me = Methanol. Die Zahlen in runden Klammern geben die spez. Drehungen für Na-Licht an.

⁴⁾ Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

Diazomethan verestert⁵⁾. Es gab zwei Produkte, die sich im Dünnschichtchromatogramm zwar sehr ähnlich verhielten, aber durch wiederholte Chromatographie an der Kieselgelsäule getrennt werden konnten. Als Hauptprodukt wurde der krist. $3\beta, 12\beta$ -Diacetoxy-5-hydroxy-14,15 β -epoxy-5 $\beta, 14\beta, 17\alpha$ H-ätiansäure-methylester (**4**) erhalten, dessen IR.-Spektrum (vgl. Fig. 2) neben den C=O-Streckschwingungen wieder die Hydroxylbande bei $2,79 \mu$ und bei $3,30 \mu$ die CH-Schwingung des Oxiranrings erkennen liess. Das Nebenprodukt der Abbaureaktion konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Es wurde bisher nur amorph, jedoch chromatographisch einheitlich erhalten. Sein IR.-Spektrum glich dem des Esters **4** sehr stark; doch fehlte die CH-Schwingung der 14,15-Oxidogruppe. Die Anwesenheit einer HO-Gruppe an C-14 oder einer Keto-Gruppe an C-15 ist wegen der normalen Lage der C=O-Streckschwingung der 17-Carbomethoxygruppe bzw. des Fehlens der entsprechenden Absorptionsmaxima in den IR.- und UV.-Spektren wenig wahrscheinlich.

Um die Konstitution des Abbauesters **4** zu beweisen, wurde er mit LiAlH_4 reduziert. Es entstand das Pentol **7**, das mit CrO_3 in Eisessig bei 22° unter kontrollierten Bedingungen (s. unten) oxydiert wurde. Die sauren Anteile dieser Reaktion wurden mit CH_2N_2 behandelt, worauf nach chromatographischer Reinigung der 3,12-Dioxo-14-hydroxy- Δ^4 -14 β -ätiansäure-methylester (**6**) in Kristallen erhalten wurde. Neben der Oxydation der 17-Hydroxymethylgruppe und der Dehydrierung der Hydroxyle an C-3 und C-12 ist auch die erwünschte Elimination des 5-Hydroxyls eingetreten. Der erhaltene Ketoester **6** war nun identisch mit dem Ester, den wir durch Dehydrierung des bekannten 3-Oxo-12 $\beta, 14$ -dihydroxy- Δ^4 -14 β -ätiansäure-methylesters (**5**) mit CrO_3 erhielten⁶⁾. Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3) des Esters **6** waren die typischen Absorptionsmaxima aller funktionellen Gruppen erkennbar, nämlich bei $2,93 \mu$ die 14-Hydroxygruppe; bei $5,90 \mu$ die 12-Ketogruppe, überlagert durch die wegen Assoziation mit dem 14 β -Hydroxyl verschobene 17 β -Carbomethoxygruppe (vgl. [8]); bei $5,99 \mu$ das Δ^4 -3-Keton und bei $6,19 \mu$ die Δ^4 -Doppelbindung. Durch diese Verknüpfung ist die 12-Stellung der durch *F. lini* in die Marinobufaginmolekel eingeführten Hydroxylgruppe eindeutig bewiesen. Nicht streng bewiesen, aber auf Grund der zahlreichen bekannten 12 β -Hydroxylierungen von Cardenoliden und Bufadienoliden durch *F. lini* [1] [3] [4] sehr wahrscheinlich, ist die β -Konfiguration dieses Hydroxyls.

Da für die CrO_3 -Oxydation des Pentols **7** nur sehr wenig Material zur Verfügung stand, wurden zuerst die besten Reaktionsbedingungen anhand des Tetrols **8** ermittelt. Sowohl mit $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ in Aceton nach der Methodik von BOWDEN *et al.* [9] wie auch mit CrO_3 -Eisessig entstand auch bei versch. Temperaturen und Reaktionszeiten neben der gewünschten Ätiansäure immer noch ein Neutralstoff, bei dem es sich um das

⁵⁾ Um die Konstitution von 12 β -Hydroxymarinobufagin (**2**) zu beweisen, erwogen wir, den Oxidring mit NaBH_4 nach ВНАРУСНА *et al.* [6] zu öffnen. Da uns nur sehr wenig Material zur Verfügung stand, verzichteten wir auf entsprechende Versuche, denn bei der Reduktion von Marinobufagin war das gewünschte Telocinobufagin nur in einer Ausbeute von 5,2% erhalten worden [6]. Nach den Papierchromatogrammen waren eine Anzahl weiterer Produkte entstanden, die weder getrennt noch aufgeklärt wurden [6]. Die Reaktion mit NaBH_4 verläuft demnach sehr unübersichtlich.

⁶⁾ Für die Überlassung einer kleinen Probe des Esters **5** sind wir Herrn Prof. Dr. T. REICHSTEIN zu Dank verpflichtet.

Diketolacton **10** handeln muss^{6a)}. Sein IR.-Spektrum zeigte neben der C=O-Schwingung bei $5,86 \mu$ der 3- und 12-Ketogruppe eine weitere bei $5,57-5,59 \mu$, die von der γ -Lactongruppe herrührt. Die kleinste Menge dieses Nebenprodukts bildete sich, wenn das Tetrol **8** mit einer 1-proz. CrO_3 -Essigsäurelösung 90 Min. bei 22° stehen gelassen wurde.

Zum Schluss seien noch die Inkubationsversuche erwähnt, die mit Bufotalin [10] Cinobufagin [11] und Cinobufotalin [12] als Substrate durchgeführt wurden. *F. lini* vermochte keine dieser Bufadienolide zu hydroxylieren. Hingegen wurde bei allen die 16-Acetoxygruppe quantitativ hydrolysiert unter Bildung der bekannten Desacetyl-derivate⁷⁾.

Herr Dr. K. K. CHEN, Indianapolis, war so liebenswürdig, die Toxizität von 12β -Hydroxymarinobufagin (**2**) an der Katze nach HATCHER-BRODY orientierend zu prüfen⁹⁾. Er fand als geometrisches Mittel der letalen Dosis bei zwei Katzen die Werte von

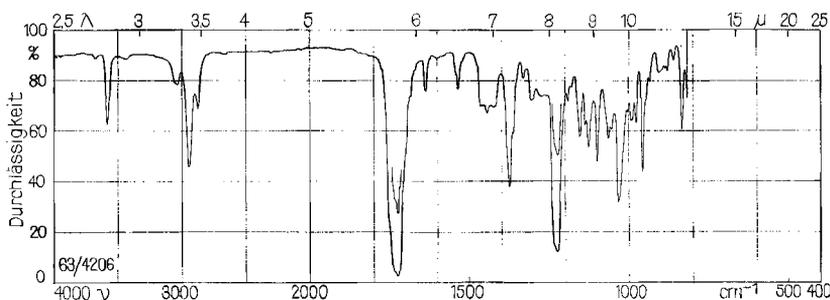


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von 3,12-Di-O-acetyl- 12β -hydroxy-marinobufagin (**3**) in CH_2Cl_2 -Lösung⁸⁾

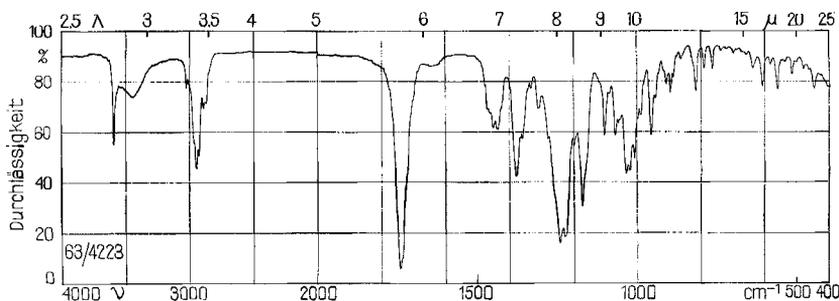


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum des $3\beta,12\beta$ -Diacetoxy-5-hydroxy-14,15 β -epoxy-5 $\beta,14\beta,17\alpha$ H-ätiansäure-methylesters (**4**) (fest in KBr)⁸⁾

^{6a)} Die Bildung eines $20 \rightarrow 14$ -Lactons in der Ätiansäurereihe wurde erstmals von LINDE & MEYER [10a] bei der CrO_3 -Oxydation von 3β -Acetoxy-14 $\beta,20$ -dihydroxy-21-nor-5 β -pregnan beobachtet (Vgl. auch [10b]).

⁷⁾ Diese Versuche wurden von G. JUHASZ [13] durchgeführt.

⁸⁾ Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125 im Spektrollabor unseres Instituts (CH. SENN und W. SCHWAB).

⁹⁾ Wir danken Herrn Dr. K. K. CHEN, Indianapolis, Ind., USA, bestens für die biologische Prüfung.

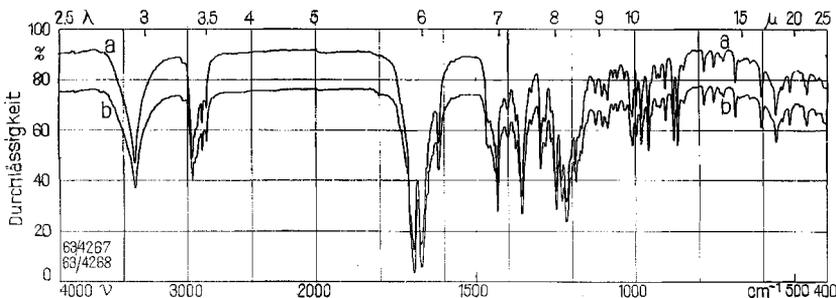


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektrum des 3,12-Dioxo-14-hydroxy- Δ^1 -14 β ,17 α H-ätiensäure-methylesters (6) (fest in KBr)⁸⁾; Kurve a aus 5; Kurve b aus 7

2,663 bzw. 3,35 mg/kg. **2** zeigt demnach eine eindeutige, wenn auch schwache cardio-toxische Aktivität, wobei die für das Marinobufagin (**1**) (geometrisches Mittel der letalen Dosis: 1,489 bis 1,552 [14]) typische Krampfwirkung scheinbar nicht zu beobachten war.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN (Projekt Nr. 2535) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze etwa $\pm 2^\circ$. Substanzproben zur Messung der Spektren und der spez. Drehungen wurden ca. 1 Std. bei 0,02 Torr/60–70° und zur Elementaranalyse 5 Std. bei 0,01 Torr/110° mit Einwaage im Schweinchen getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium unseres Instituts (Leitung E. THOMMEN). Die Adsorptions-Chromatographien wurden nach der Durchlaufmethode [15] an Silicagel (SiO_2 , Korngrösse 0,15–0,30 mm) und nach DUNCAN [16] an Kieselgel (SiO_2 , Korngrösse 0,05–0,20 mm) durchgeführt. Dünnschichtchromatographie (DC) mit Kieselgel als Adsorbens nach STAHL [17]. Entwickeln der Flecke durch Besprühen mit 20-proz. SbCl_3 -Lösung in Chloroform [18] oder Sättigen mit J_2 -Dampf. Abkürzungen: Me = Methanol, Md = Methylenchlorid.

2. *Kultur der Mikroorganismen.* Kulturen-Proben einer Schrägagarkultur von *Fusarium lini* (BOLLEY) (Herkunft: CENTRALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Baarn, Niederlande (CBS)) wurden direkt als Impfmateriale für die Nährlösung verwendet oder zur Sporulierung auf Reismährmedium (13 g polierter Reis und 25 ml Wasser im ERLLENMEYER-Kolben von 500 ml sterilisiert) überimpft. Im letzteren Falle wurde eine wässrige Suspension der drei Wochen alten, bei 27° inkubierten Kulturen als Impfmateriale verwendet. Zum Versuch wurden 100-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 20 ml Nährlösung benützt. Die Gefässe wurden 30 Min. bei 120° im Dampfautoklav sterilisiert und dann beimpft. Die ERLLENMEYER-Kolben wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) bei 27° 3–10 Tage inkubiert, worauf das in Aceton gelöste Substrat nach Sterilfiltration zugegeben wurde.

Nährlösung nach CZAPEK: 30 g Saccharose; 3,0 g NaNO_3 ; 1 g KH_2PO_4 ; 0,5 g MgSO_4 , 7 H_2O ; 0,5 g KCl und 10 mg FeSO_4 , 7 H_2O mit dest. Wasser ad 1000 ml; pH auf 7,3 eingestellt.

3. *Umsetzung von Marinobufagin (1) mit Fusarium lini.* Eine Lösung von 500 mg Marinobufagin (**1**) vom Smp. 224–227° in 96 ml Aceton wurde, gleichmässig verteilt, steril zu 96 100-ml-ERLENMEYER-Kolben gegeben. Jeder Kolben wurde mit 1 ml einer sterilen Lösung von 156 mg KCN in 120 ml Wasser versetzt (10^{-3} M KCN in Nährlösung). Hierauf wurde 17 Tage bei 27° auf der rotierenden Maschine geschüttelt, dann jeder Kolben mit 5 ml Methanol versetzt und 1 Std. stehengelassen. Es wurde abgenutscht und der Mycelrückstand noch zweimal mit je 400 ml Methanol geschüttelt. Nach Abnutschen wurden die vereinigten Filtrate im Vakuum vom Methanol befreit und auf ca. 600 ml eingengt. Die so erhaltene trübe, wässrige Suspension wurde fünfmal mit Chloroform-Äthanol-(85:15) ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig

Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum resultierten 720 mg Rohprodukt, das im DC (Fließmittel: Md-Me-(93:7)) einen starken blauschwarzen Fleck von 12 β -Hydroxymarinobufagin (**2**) (Rf-Wert 0,15), einen schwachen, rosavioletten Fleck von Marinobufagin (**1**) (Rf-Wert 0,36), sowie drei weitere sehr schwache Flecke mit den Rf-Werten 0,63; 0,22 und 0,02 zeigte. Das Rohprodukt wurde an 35 g Silicagel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 50 ml Lösungsmittel pro Fraktion.

Die Fraktionen 1–6 (eluiert mit Md-Me-(99:1)) ergaben ca. 50 mg gelbes Öl, verworfen.

Die Fraktionen 7–9 (eluiert mit Md-Me-(97:3)) ergaben ca. 60 mg amorphes Material. Nach DC Gemisch von wenig Edukt **1** und verschiedenen Nebenprodukten. Nicht weiter aufgetrennt.

Die Fraktionen 10 und 11 (eluiert mit Md-Me-(97:3)) enthielten noch Edukt **1**, das aber nicht kristallisierte (ca. 30 mg).

Die Fraktionen 12–15 (eluiert mit Md-Me-(95:5)) ergaben 26 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 16–19 (335 mg) eluiert mit Md-Me-(94:6) lieferten aus Aceton 327 mg Kristalle vom Smp. 207–211°. Nach Umkristallisieren aus Aceton resultierte reines 12 β -Hydroxymarinobufagin (**2**) in Prismen vom Smp. 250–254° (Sintern bei 190°). $[\alpha]_D^{25} = +14^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,140$ in Me). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{max} = 298 \mu\text{m}$; $\log \epsilon = 3,69$ und $\lambda_{max} = 195 \mu\text{m}$; $\log \epsilon = 4,08$.

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (416,5) Ber. C 69,21 H 7,74% Gef. C 68,96 H 7,71%

4. 3,12-Di-O-acetyl-12 β -hydroxymarinobufagin (**3**) aus **2**. 380 mg 12 β -Hydroxymarinobufagin (**2**) vom Smp. 207–211° wurden mit 6 ml abs. Pyridin und 4 ml Acetanhydrid 22 Std. bei 35° stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand viermal mit Benzol abgedampft. Das resultierende Rohprodukt (ca. 450 mg) wurde an 20 g Silicagel mit Md-Me-(98:2) als Lösungsmittel chromatographiert. Aus Aceton-Äther wurden 408 mg Kristalle erhalten, die nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther grobe Quader vom Smp. 236–238° ergaben. $[\alpha]_D^{25} = +47^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,699$ in Me). Das IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) (vgl. Fig. 1) zeigte Banden bei 2,79 μ (OH); 3,26–3,30 μ (CH, Epoxid); 5,79 μ (C=O, Acetyl + Cumalinring); 6,11 μ (C=C, Cumalinring) und 8,15 μ (–OCOCH₃).

$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (500,6) Ber. C 67,18 H 7,25% Gef. C 67,28 H 7,26%

5. KMnO_4 -Abbau von 3,12-Di-O-acetyl-12 β -hydroxymarinobufagin (**3**). Eine Lösung von 300 mg **3** vom Smp. 234–237° in 7 ml Aceton (frisch über KMnO_4 destilliert) wurde unter Rühren während 4 Std. portionsweise mit insgesamt 660 mg fein gepulvertem KMnO_4 versetzt (zu Beginn 350 mg unter kurzer Kühlung, nach 15 Min. 160 mg, nach 1 Std. 90 mg, nach 2 Std. 60 mg KMnO_4). Das braun gefärbte Reaktionsgemisch wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand zerrieben, in 40 ml Wasser suspendiert und mit 2 N H_2SO_4 auf pH 1 gebracht. Hierauf wurde unter Kühlung SO_2 bis zur völligen Entfärbung eingeleitet und mit Chloroform-Äther-(4:1) ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig Wasser und Trocknen über Na_2SO_4 resultierte 270 mg Rohprodukt, das in Äther gelöst und mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt wurde. Nach Stehen während 15 Min. wurde eingedampft und der Eindampfrückstand (270 mg) an 15 g Silicagel mit Md-Me-(99:1) als Lösungsmittel chromatographiert (30 ml pro Fraktion).

Die Fraktionen 8–10 ergaben 150 mg amorphes Material, das im DC (Fließmittel: zweimal Äther) neben dem Hauptfleck des Esters **4** einen sehr ähnlich laufenden Begleitfleck zeigte.

Die Fraktionen 11 und 12 lieferten aus Md-Äther 35 mg rohen krist. Ester **4** und 28 mg amorphen Mutterlaugenrückstand, dessen DC noch eine Spur des Nebenprodukts enthielt.

Da schon eine Spur des Nebenprodukts die Kristallisation des Esters **4** verhindert, wurden die Fraktionen 8–10 und der Mutterlaugenrückstand der Fraktionen 11 und 12 vereinigt und dreimal an einer Säule mit 100 g Kieselgel nach DUNCAN mit Md-Me-(99:1), (98:2) und (97:3) als Lösungsmittel chromatographiert. Auf diese Weise konnte jedesmal ein Teil des Esters **4** rein abgetrennt werden. So wurden insgesamt 126 mg reiner 3 β ,12 β -Diacetoxy-5-hydroxy-14,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-äthansäure-methylester (**4**) in feinen Nadeln vom Smp. 195–206° erhalten. $[\alpha]_D^{24} = +49^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,218$ in Me). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 2) zeigte Banden bei 2,78 μ (OH); 3,30 μ (CH, Epoxid); 5,75 μ (C=O, Ester) und 8,05 μ und 8,15 μ (–OCOCH₃).

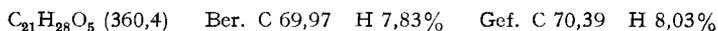
$\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (464,5) Ber. C 64,63 H 7,81% Gef. C 64,65 H 8,00%

Einige Fraktionen enthielten das Nebenprodukt in DC-einheitlicher Form. Es kristallisierte bisher nicht. Das IR.-Spektrum (in KBr) zeigte Banden bei 2,78 μ (OH); 5,75 μ (C=O, Ester) und 8,10 μ (–OCOCH₃). Im UV.-Spektrum (Äthanol) war keine selektive Absorption zu erkennen.

6. *3 β ,5,12 β ,14,20*-Pentahydroxy-5 β ,14 β -21-nor-pregnan (7) aus 4. Eine Lösung von 40 mg Ester 4 vom Smp. 191–206° in 10 ml abs. Äther und 5 ml Tetrahydrofuran (frisch durch basisches Al₂O₃ filtriert) wurde unter Rühren mit 120 mg LiAlH₄ versetzt und 3 Std. durch Rückfluss gekocht. Hierauf wurde unter Kühlung mit Eis zerlegt, mit 2N H₂SO₄ auf pH 1 gebracht und die Lösung 15mal mit Chloroform-Äthanol-(9:1) ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum resultierten 15 mg Rohprodukt. Die verbliebene wässrige Reaktionslösung und die Waschwasser wurden vereinigt und im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat mit Chloroform extrahiert. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen der Extrakte im Vakuum wurden noch weitere 20 mg Rohprodukt erhalten. Die vereinigten Rohprodukte lieferten aus Me-Aceton 16 mg rohes krist. Pentol 7. Die Mutterlauge wurde, nachdem sie mit gleichviel analogem Material aus einem weiteren Reduktionsversuch vereinigt worden war (insgesamt 30 mg), an 2 g Al₂O₃ der Aktivitätsstufe II chromatographiert. Aus den mit Md-Me-(95:5) eluierten Fraktionen kristallisierten noch 10 mg Pentol 7 aus. Nach Umkristallisieren aus Me-Aceton wurde reines Pentol 7 in prismatischen Nadeln, die bei 144–152° Blasen bildeten und bei 162–172° sinterten, erhalten. Bei 199–207° schmolz die Hauptmenge und bei 226–228° der Rest der Kristalle. Dieses Verhalten dürfte auf Einschluss von Aceton in das Kristallgitter beruhen. $[\alpha]_D^{23} = +14^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,726$ in Methanol). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte neben der breiten Hydroxylbande bei 2,97 μ auch nach intensiver Trocknung immer noch eine C=O-Schwingung bei 5,86 μ , die vom eingeschlossenen Aceton herrührt. Sie verschwand, nachdem die Substanzprobe vor der Messung zweimal aus Md und zweimal aus Äther eingedampft worden war.

7. *3,12-Dioxo-14-hydroxy- Δ^4 -14 β ,17 α H*-ätiensäure-methylester (6) aus 7. Eine Lösung von 30 mg Pentol 7 vom Smp. 199–226° in 4 ml Eisessig wurden portionsweise mit insgesamt 2,5 ml 1-proz. CrO₃-Essigsäurelösung (Lösung: 250 mg CrO₃ in ca. 1 ml Wasser heiss gelöst und mit reinstem Eisessig auf 25 ml verdünnt) versetzt (Zugabe der Portionen nach 3, 10, 20 und 50 Min.). Nach Stehen während 1,5 Std. bei 22° wurde mit 6,5 ml Wasser versetzt und viermal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherextrakte wurden mit Wasser, einmal mit 2N NaOH und dreimal mit 2N Na₂CO₃-Lösung und mit Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierten 2 mg neutrale Anteile (nicht untersucht). Die NaOH- und Na₂CO₃-Lösungen wurden vereinigt, mit 2N H₂SO₄ bis zur kongosauren Reaktion versetzt und sechsmal mit Md ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum wurden 10 mg saure Anteile erhalten, die in Äther gelöst und mit ätherischer Diazomethanolösung versetzt wurden. Nach 15 Min. wurde eingedampft und das Rohprodukt an 8 g Kieselgel mit Äther als Lösungsmittel chromatographiert (4 ml pro Fraktion). Aus den Fraktionen 7–13 wurden aus Md-Äther 3,0 mg Ester 6 in prismatischen Nadeln vom Smp. 183–186° erhalten. Die 1,6 mg Mutterlaugenrückstände enthielten praktisch reinen Ester 6.

Die ursprüngliche saure Reaktionslösung wurde im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat mit Äther nachextrahiert. Das nach Eindampfen erhaltene Rohprodukt (10 mg) wurde mit ätherischer Diazomethanolösung versetzt und nach 15 Min. eingedampft. Der Rückstand zeigte im DC nur Flecke, die langsamer als der Ester 6 wanderten. Das gesamte Material wurde deshalb mit 2 ml Eisessig 20 Min. unter Rückfluss gekocht. Hierauf wurde eingedampft, der Rückstand mit Chloroform versetzt, die Lösung mit 2N Na₂CO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Eindampfrückstand (11 mg) enthielt nach dem DC etwas Ester 6. Er wurde zusammen mit den oben erhaltenen Mutterlaugenrückständen an 6 g Kieselgel mit Äther als Lösungsmittel chromatographiert. Aus den Fraktionen 9–12 wurden so noch 1,7 mg Ester 6 vom Smp. 183–187° erhalten. $[\alpha]_D^{21} = +194 \pm 5^\circ$ ($c = 0,382$ in Chloroform) (zusammen mit Präparat aus 5). Das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3) zeigte u. a. Banden bei 2,93 μ (OH); 5,90 μ (C=O, 12-Keto + 17-Carbomethoxy); 5,99 μ (Δ^4 -3-Keton) und 6,19 μ (Δ^4). Der Misch-Smp. mit dem aus dem Ester 5 gewonnenen Präparat war gleich, ebenso die Laufstrecke im DC und das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3).



8. *3,12-Dioxo-14-hydroxy- Δ^4 -14 β ,17 α H*-ätiensäure-methylester (6) aus 5. Eine Lösung von 2,8 mg vom 3-Oxo-12 β ,14-dihydroxy- Δ^4 -14 β ,17 α H-ätiensäure-methylester (5) vom Smp. 201–203/207° *) in 0,5 ml reinstem Eisessig wurde unter starkem Rühren mit insgesamt 0,07 ml 1-proz. CrO₃-Eisessiglösung in 4 Portionen versetzt und 75 Min. bei 22° stehengelassen (CrO₃ noch nachweisbar). Hierauf wurde mit 3 ml Wasser verdünnt und die Reaktionslösung dreimal mit Äther

ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen ergaben nach Waschen mit 2N H₂SO₄, 2N Na₂CO₃-Lösung und Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen 3,0 mg Rohprodukt, das an 1,5 g Kieselgel mit Md-Me-(99:1) chromatographiert wurde (5 ml Lösungsmittel pro Fraktion). Aus den Fraktionen 8 und 9 wurde aus Md-Äther 2,7 mg reiner Ester **6** in Nadeln vom Smp. 190–191° erhalten. Der Misch-Smp. mit einem Präparat bereitet aus **7** war gleich, ebenso die Laufstrecke im DC und das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3). Das Material wurde deshalb mit dem dort erhaltenen zur Bestimmung der spez. Drehung und der C, H-Analyse vereinigt.

9. CrO₃-Oxydation von 3β, 12β, 14, 20-Tetrahydroxy-5β, 14β-21-nor-pregnan (**8**). Eine Lösung von 25 mg Tetrol **8** vom Smp. 242–248° in 2,5 ml reinstem Eisessig wurde portionsweise mit insgesamt 2,0 ml 1-proz. CrO₃-Eisessiglösung unter Rühren versetzt und 90 Min. bei 22° stehengelassen (CrO₃ noch nachweisbar). Hierauf wurde mit 6 ml Wasser verdünnt und die Reaktionslösung dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen wurden viermal mit 2N Na₂CO₃-Lösung ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Das rohe Neutralprodukt (7 mg) wurde an 5 g Kieselgel mit Md-Me-(98:2) als Lösungsmittel chromatographiert. Es wurden so aus Aceton-Äther 2 mg reines Lacton **10** in Nadeln vom Smp. 252–256° erhalten. Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte Banden bei 5,57–5,59 μ (C=O, γ-Lacton) und 5,85 μ (C=O, 3,12-Diketon). – Die obigen Na₂CO₃-Lösungen wurden mit konz. H₂SO₄ auf pH 1 gebracht und mit Äther ausgeschüttelt. Nach Waschen der Ätherlösungen mit Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen wurde der Rückstand mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt, 15 Min. stehengelassen und eingedampft. Das Rohprodukt (17 mg) wurde an 8 g Kieselgel mit Md-Me-(98:2) als Lösungsmittel chromatographiert. Aus Md-Äther wurde reiner 3,12-Dioxo-14-hydroxy-5β, 14β, 17αH-äthansäure-methylester (**9**) in Nadeln vom Smp. 172–177° erhalten. $[\alpha]_D^{25} = +135 \pm 2^\circ$ ($c = 0,842$ in Chloroform). Literaturwert [7]: Smp. 174–178°, keine Drehung bekannt.

SUMMARY

Incubation of marinobufagin (**1**) with cultures of *Fusarium lini* (BOLLEY) gave the unknown 12β-hydroxymarinobufagin (**2**). The structure of **2** was proved by the degradation of its diacetyl derivative **3** to methyl 3,12-dioxo-14-hydroxy-Δ⁴-14β, 17αH-etianate (**6**) which was prepared from the known methyl 3-oxo-12β, 14-dihydroxy-Δ⁴-14β, 17αH-etianate (**5**).

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 12. Mitteilung: M. SCHÜPBACH & CH. TAMM, *Helv.* **47**, 2217 (1964).
 [1a] Internat. Symposium Chemistry nat. Products, Kyoto 1964, Abstr. Papers, p. 285.
 [2] S. PATAKI & K. MEYER, *Helv.* **38**, 1631 (1955); H. SCHRÖTER, R. REES & K. MEYER, *Helv.* **42**, 1385 (1959).
 [3] Vgl. CH. TAMM, *Angew. Chem.* **74**, 225 (1962); *ibid.* International Edition in English **1**, 178 (1962).
 [4] E. WEISS-BERG & CH. TAMM, *Helv.* **46**, 1166 (1963).
 [5] H. SCHRÖTER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **41**, 720 (1958).
 [6] J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* **46**, 142 (1963).
 [7] M. STEIGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **21**, 828 (1938).
 [8] W. SCHLEGEL & CH. TAMM, *Helv.* **40**, 160 (1957).
 [9] Vgl. K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* **1946**, 39.
 [10] K. MEYER, *Helv.* **32**, 1993 (1949).
 [10a] H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **42**, 807 (1959).
 [10b] A. LARDON & T. REICHSTEIN, *Helv.* **45**, 949 (1962).
 [11] P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **43**, 1955 (1960).
 [12] F. BERNOULLI, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **45**, 240 (1962).
 [13] Dissertation G. JUHASZ, Basel, 1961.

- [14] H. R. URSCHELER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 883 (1955).
 [15] T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc.* Nr. 7, 305 (1949).
 [16] G. R. DUNCAN, *J. Chromatogr.* **8**, 37 (1962).
 [17] Vgl. E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962; K. RANDEATH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim 1962.
 [18] D. LAWDAY, *Nature* **170**, 415 (1952); P. ZOLLER & CH. TAMM, *Helv.* **36**, 1744 (1953); H. R. URSCHELER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 883 (1955); R. BOLLIGER & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1659 (1957).

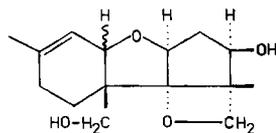
250. Die Konstitution von Verrucarol und Roridin C

Verrucarine und Roridine, 4. Mitteilung [1]¹⁾

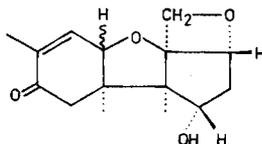
von J. Gutzwiller, R. Maul, H. P. Sigg und Ch. Tamm

(15. X. 64)

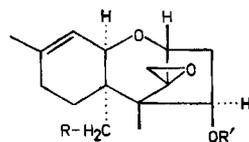
Verrucarol ist ein neuer Sesquiterpenalkohol der Bruttoformel $C_{15}H_{22}O_4$, der erstmals durch basische Hydrolyse des antifungisch und cytostatisch wirksamen Antibiotiums Verrucarin A [2] erhalten worden ist [3]. Seither wurde er auch als Baustein zahlreicher weiterer Verrucarine und Roridine erkannt [4]. Auf Grund von chemischen Reaktionen und physikalischen Daten haben kürzlich GUTZWILLER & TAMM in einer vorläufigen Mitteilung [1] [5] für Verrucarol die Strukturformel A vorgeschlagen. Im Verlaufe weiterer Untersuchungen haben wir aber Resultate erhalten, die mit dieser Formel nicht vereinbar sind. Die grosse Ähnlichkeit der chemischen und physikalischen Eigenschaften von Verrucarol und von Trichothecolon, dem sesquiterpenoiden Baustein des Pilzmetaboliten Trichothecin [6], für das die Strukturformel B vorgeschlagen wurde [7] [8], haben uns veranlasst, die beiden Stoffe miteinander zu verknüpfen. Dies gelang mit Hilfe einer mehrstufigen Reaktionsfolge. Inzwischen haben ABRAHAMSSON & NILSSON [9] sowie GODTFREDSSEN & VANGEDAL [10]²⁾ für Trichodermin, einen neuen von ihnen aus einem *Trichoderma*-Stamm isolierten antifungischen Metaboliten, mit Hilfe einer RÖNTGEN-Analyse des *p*-Brombenzoylderivats **4** die Struktur **2** bewiesen. Da sie gleichzeitig Trichodermin mit Trichothecolon in eindeutiger Weise verknüpfen konnten, musste auch die Formel B von Trichothecolon revidiert werden. Die dänischen Autoren erteilten infolgedessen diesem Stoff die Struktur **26** (s. Seite 2242).



A Verrucarol,
alte Formel



B Trichothecolon,
alte Formel



- 1** R = OH; R' = H: Verrucarol
2 R = H; R' = Ac: Trichodermin
3 R = H; R' = H: Trichodermol
 = Roridin C
4 R = H; R' = -CO-C₆H₄-Br (*p*)

¹⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2261.

²⁾ Wir danken Herrn Dr. W. O. GODTFREDSSEN, LEO PHARMACEUTICAL PRODUCTS, Ballerup, Dänemark, für das Manuskript seiner Publikation.