

118. Über die Isolierung von Verrucarin H, Verrucarin J, Roridin D und Roridin E aus *Myrothecium*-Arten

Verrucarine und Roridine, 8. Mitteilung [1]

von B. Böhner, E. Fetz, E. Härri, H. P. Sigg, Ch. Stoll und Ch. Tamm

(14. V. 65)

Aus den Kulturen einer Reihe von Stämmen von *Myrothecium verrucaria* (ALBERTINI et SCHWEINITZ) DITMAR ex FRIES und von *Myrothecium roridum* TODE ex FR., Gattungstyp bei FRIES, sind bisher zehn einheitliche, kristallisierte Substanzen isoliert worden, nämlich Verrucarin A, B, C, D, E, F und G sowie Roridin A, B und C [2]. Die Struktur von Verrucarin A und B ist kürzlich aufgeklärt worden [1] [3] [4]. Im folgenden berichten wir über die Isolierung von vier weiteren, bisher unbekanntem Stoffwechselprodukten aus *Myrothecium verrucaria* und *Myrothecium roridum*, die wir Verrucarin H, Verrucarin J, Roridin D und Roridin E nennen¹⁾. Die vier Antibiotica zeigen ähnliche cytostatische und fungistatische Aktivitäten wie Verrucarin A und B und Roridin A [2], was ihre Anreicherung und Isolierung erleichterte. Verrucarin H fand sich hauptsächlich im Mycel des Stammes S 1198 von *Myrothecium verrucaria*; es ist sein Hauptmetabolit. Die drei anderen Stoffe waren vorwiegend in den Kulturfiltraten enthalten. Verrucarin J wurde in der Kulturlösung des Stammes S 833, Roridin D in denen der Stämme S 1135 und S 1775 gefunden und Roridin E aus dem Kulturfiltrat des Stammes S 1198 gewonnen. Roridin D und E sind meist in relativ kleinen Mengen auftretende Nebenprodukte von Verrucarin A und Roridin A. Die vier neuen Metabolite liessen sich aus dem Mycel resp. aus den Kulturlösungen leicht mit Äthylacetat oder halogenierten aliphatischen Kohlenwasserstoffen extrahieren. Die Rohextrakte wurden durch Gegenstromverteilung und Chromatographie an Kieselsäule weiter aufgetrennt. Die enge strukturelle Verwandtschaft mit Verrucarin A erschwerte die Abtrennung der neuen Begleitstoffe von den Hauptprodukten und dem häufig auftretenden Begleiter Verrucarin B. Sie gelang nur durch wiederholtes sorgfältiges Chromatographieren. Für die Reinheitsprüfung genügte die Dünnschichtchromatographie (s. unten) allein nicht. Am zuverlässigsten erwies sich die Kombination von Dünnschichtchromatographie mit der IR.- und NMR.-Spektroskopie. Im folgenden werden die isolierten Stoffe kurz charakterisiert.

Verrucarin H: Wie die Verrucarine A und B zeigt auch das gut kristallisierende Verrucarin H keinen definierten Schmelzpunkt; bei ca. 240° beginnen sich die Kristalle zu zersetzen. Auffallend ist ferner die starke Abhängigkeit der optischen Drehwerte vom Lösungsmittel: $[\alpha]_D^{24} = +32^\circ$ in Chloroform und $[\alpha]_D^{23} = +59^\circ$ in Benzol. Nach den Analysenwerten und der vaporometrischen Molekulargewichtsbestimmung

¹⁾ Über die Isolierung von Verrucarin H und J wurde im Juli 1963 am XIX. Internationalen Kongress der IUPAC in London [5], und von Verrucarin H, J und Roridin D im April 1964 am Symposium «Chemistry of Microbial Products» in Tokyo, Japan [6], erstmals berichtet, wo auch einige Einzelheiten über die Struktur dieser Verbindungen bekannt gegeben wurden.

[7]²⁾ besitzt Verrucarín H die Bruttoformel $C_{29}H_{36}O_8$. Sein UV.-Spektrum (vgl. Fig. 1) zeigt intensive Absorptionsmaxima bei 195, 223 und 259 nm. Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 2) sind keine Hydroxylbanden zu erkennen. Hingegen treten bei 1708 cm^{-1} eine starke C=O-Streckschwingung und bei 1645 und 1596 cm^{-1} C=C-Banden auf. Diese Charakteristika deuten auf das Vorliegen von ungesättigten Estergruppierungen hin.

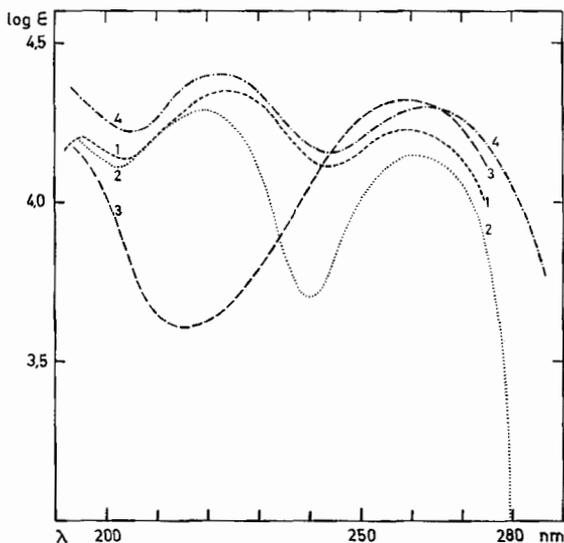


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektren in Äthanol³⁾

Kurve 1: Verrucarín H ($C_{29}H_{36}O_8$): $\lambda_{max} = 195$ (4,2); 223 (4,35); 259 (4,21) nm ($\log \epsilon$)

Kurve 2: Verrucarín J ($C_{27}H_{32}O_8$): $\lambda_{max} = 196$ (4,19); 219 (4,30); 262 (4,16) nm ($\log \epsilon$)

Kurve 3: Roridin D ($C_{29}H_{38}O_8$): $\lambda_{max} = 260$ nm ($\log \epsilon = 4,33$)

Kurve 4: Roridin E ($C_{29}H_{38}O_8$): $\lambda_{max} = 195$ (4,2); 223 (4,40); 263 (4,30) nm ($\log \epsilon$)

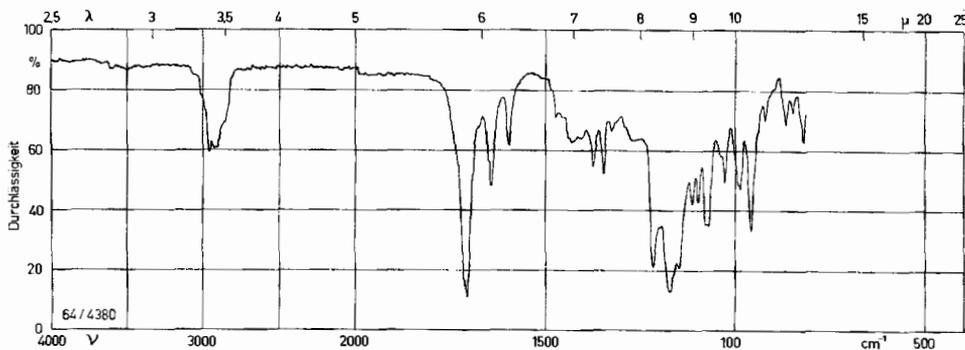


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von Verrucarín H in Methylenchlorid⁴⁾

²⁾ Wir danken Herrn PD Dr. W. SIMON, ETH Zürich, bestens für die Ausführung dieser Bestimmung.

³⁾ Aufgenommen mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK 2, im Institut für Organische Chemie (CH. SENN & W. SCHWAB).

⁴⁾ Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-Gitterspektrophotometer, Modell 125, im Institut für Organische Chemie (CH. SENN & W. SCHWAB).

Verrucarin J: Auch die Kristalle von Verrucarin J beginnen sich erst bei 270° zu zersetzen und schmelzen nicht unter 320°. Die optischen Drehwerte variieren ebenfalls mit dem Lösungsmittel: $[\alpha]_D^{23} = +19^\circ$ in Chloroform und $[\alpha]_D^{23} = +41^\circ$ in Benzol. Die Analysenwerte und die vaporometrischen Molekulargewichtsbestimmungen [7]²⁾ sind am besten mit der Formel $C_{27}H_{32}O_8$ im Einklang. Das UV.-Spektrum von Verrucarin J (vgl. Fig. 1) ist durch drei intensive Absorptionsmaxima bei 196, 219 und 262 nm charakterisiert. Es deckt sich praktisch mit demjenigen von Verrucarin H. Nach dem IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3) enthält auch Verrucarin J keine Hydroxylgruppen. Es zeigt eine starke Carbonylbande bei 1710 cm^{-1} , sowie zwei C=C-Banden bei 1650 und 1630 cm^{-1} . Verrucarin J dürfte somit das gleiche chromophore System wie Verrucarin H besitzen⁵⁾.

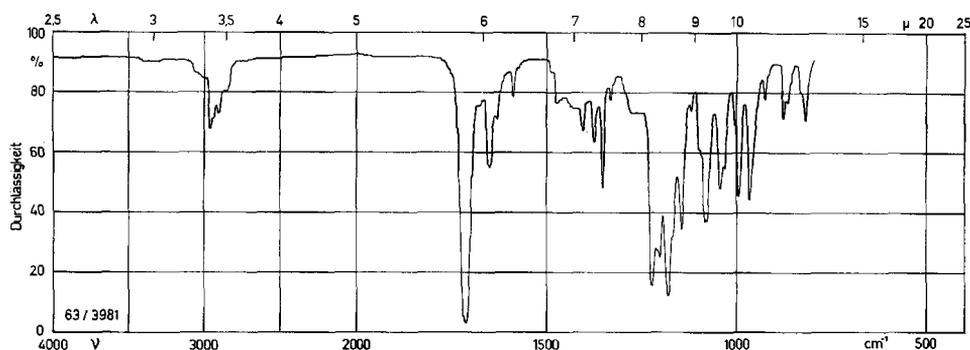


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektrum von Verrucarin J in Methylenchlorid⁴⁾

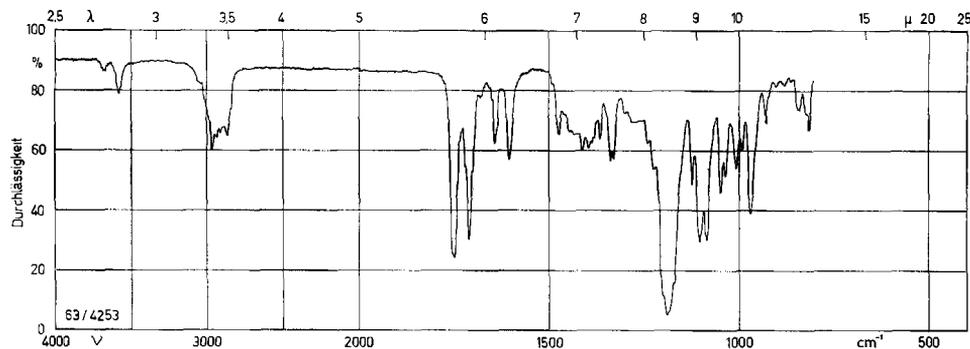


Fig. 4. IR.-Absorptionsspektrum von Roridin D in Methylenchlorid⁴⁾

Roridin D: Im Gegensatz zu den Verrucarinen besitzen die Roridine definierte Schmelzpunkte. Die Analysenwerte und die vaporometrische Molekulargewichtsbestimmung [7]²⁾ ergaben für Roridin D die Summenformel $C_{29}H_{38}O_9$. Im ultravio-

⁵⁾ In einer soeben erschienenen Publikation beschreiben VITTIMBERGA & VITTIMBERGA [8] die Isolierung von «Muconomycin B». Nach den mitgeteilten Daten dürfte «Muconomycin B» mit Verrucarin J identisch sein. Nachdem wir schon 1963 und 1964 über Verrucarin J berichtet hatten (vgl. 1)), ist eine erneute Benennung der Verbindung überflüssig. Wie wir bereits früher erwähnten [3], scheint uns ausserdem die Verwendung der Endung «mycin» für einen nicht aus Actinomyceten isolierten Metaboliten irreführend.

letten Bereich zeigt Roridin D nur ein einziges selektives Absorptionsmaximum bei 260 nm. Das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 4) zeigt bei 3670–3680 cm^{-1} eine Hydroxylbande, bei 1750 und 1711 cm^{-1} zwei starke C=O-Streckschwingungen, sowie bei 1642 und 1604 cm^{-1} C=C-Banden. Aus diesen Daten folgt, dass Roridin D mindestens eine gesättigte und eine ungesättigte Estergruppe enthält.

Roridin E kann in zwei Modifikationen mit den Schmelzpunkten 177–178° bzw. 220–221° kristallisieren. Die Analysenwerte und die vaporometrische Molekulargewichtsbestimmung [7]²⁾ sind am besten mit der Bruttoformel $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_8$ verträglich. Das UV.-Spektrum (vgl. Fig. 1) ist durch starke Absorptionsmaxima bei 195, 223 und 263 nm gekennzeichnet. Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 5) finden sich eine Hydroxylbande bei 3570 cm^{-1} , sowie eine Carbonylschwingung bei 1712 cm^{-1} und C=C-Banden bei 1645 und 1598 cm^{-1} . Auch hier liegt eine ungesättigte Estergruppierung vor.

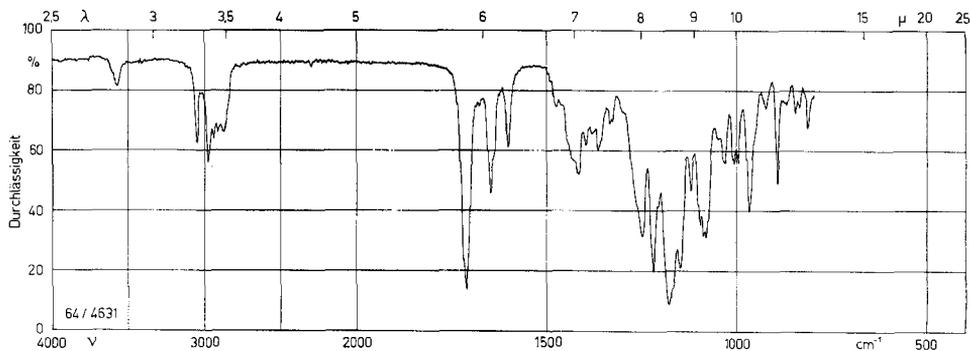
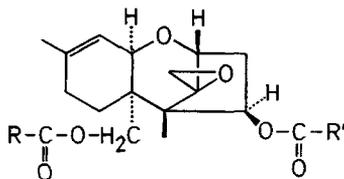


Fig. 5. IR.-Absorptionsspektrum von Roridin E in Methylenechlorid⁴⁾

Aus den erwähnten physikalischen Daten und aus der Tatsache, dass alle vier Verbindungen bei der alkalischen Hydrolyse den Sesquiterpenalkohol Verrucarol [9] liefern, ist zu schliessen, dass die Verrucarine H und J und die Roridine D und E mit Verrucarin A und B [1] [3] [4] strukturell eng verwandt sind und deshalb die folgende allgemeine Formel besitzen:



In Fig. 6 und der anschliessenden Tabelle sind die relativen Laufgeschwindigkeiten der oben beschriebenen Stoffe im Dünnschichtchromatogramm für drei verschiedene Fliessmittel angegeben und mit den R_f -Werten von Verrucarin A, Verrucarin B und Roridin A verglichen. Daraus ist ersichtlich, dass die am wenigsten polaren Verrucarine B, H und J sich kaum voneinander unterscheiden lassen. Die besten Resultate werden mit Äther (zweimal⁸⁾) als Fliessmittel erzielt. Verrucarin B kann jedoch von den Verrucarinen J und H eindeutig durch sein typisches Carbonyldublett im

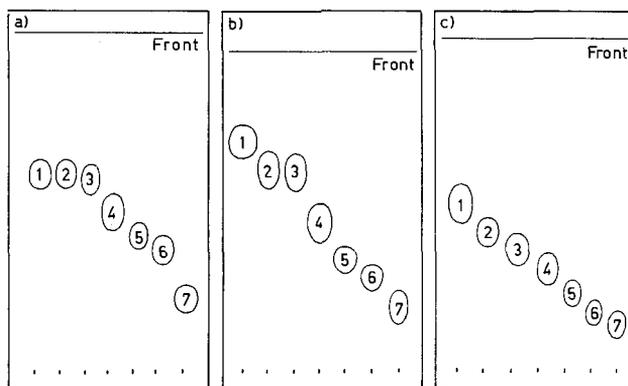


Fig. 6. Dünnschichtchromatogramme

Rf-Werte im Dünnschichtchromatogramm

Fleck	Substanz	Rf-Werte ⁶⁾		
		a)	b)	c)
1	Verrucarín H	0,59	0,72	0,51
2	Verrucarín J	0,59	0,64	0,42
3	Verrucarín B	0,58	0,63	0,37
4	Verrucarín A	0,47	0,47	0,31
5	Roridin E	0,40	0,35	0,24
6	Roridin D	0,35	0,29	0,18
7	Roridin A	0,21	0,20	0,14

Träger: Kieselgel G⁷⁾

Fliessmittel: a) Chloroform-Methanol-(98:2)

b) Benzol-Tetrahydrofuran-(85:15)

c) Äther, zweimal⁸⁾

Die Flecke wurden durch J₂-Dämpfe sichtbar gemacht.

IR.-Spektrum differenziert werden, indem die letzteren nur ein Carbonylsinglett aufweisen. Auch die Rf-Werte der Roridine D und E liegen sehr nahe beieinander; diese letzteren Verbindungen laufen jedoch deutlich rascher als das am langsamsten wandernde Roridin A.

Die Arbeiten an der Universität wurden durch einen Beitrag des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN unterstützt, wofür wir bestens danken (Projekt Nr. 2627).

⁶⁾ Die Rf-Werte können etwas variieren. Zur eindeutigen Identifizierung ist es nötig, authentische Vergleichssubstanzen mitlaufen zu lassen. Zur Reproduzierbarkeit von Rf-Werten in Dünnschichtchromatogrammen vgl. [10].

⁷⁾ Mit Al₂O₃ als Träger konnten wir keine besseren Trennungen erzielen.

⁸⁾ Man liess den Äther wie üblich bis zur oberen Front wandern, trocknete hierauf die Platte kurz an der Luft und wiederholte den Vorgang.

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Alle Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind nicht korrigiert. Substanzproben zur Messung der Spektren und der optischen Drehungen wurden ca. 1 Std. bei 0,02 Torr und 60–70° und zur Mikroanalyse bei 0,01 Torr bei der angegebenen Zeit und Temp. getrocknet. Die IR.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Zweistrahl-Spektrophotometer, Modell 21 mit NaCl-Optik (P. E. Nr. 21) und einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125 (P. E. Nr. 125), und die UV.-Spektren mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK aufgenommen. Die Mikroanalysen verdanken wir den mikroanalytischen Laboratorien der SANDOZ AG., Basel, (Dr. W. SCHÖNIGER) und des Instituts für Organische Chemie (E. THOMMEN). Die Adsorptionschromatographien wurden nach der Durchlaufmethode [11] an Kieselgel MERCK der Korngrösse 0,15–0,3 mm und der Korngrösse 0,05–0,2 mm durchgeführt. Für die Dünnschichtchromatographie nach STAHL [12] diente Kieselgel G als Adsorbens. Die Flecke wurden durch J₂-Dämpfe sichtbar gemacht.

Züchtung der Mikroorganismen und Isolierung der Stoffwechselprodukte

1. *Isolierung von Verrucarín H.* Der Stamm S 1198 von *Myrothecium verrucaria* wurde in 50 l Nährlösung (20 g Glucose, 2 g Malzextrakt der SCHWEIZ. FERMENT AG., Basel, 2 g Bacto-Yeast-Extrakt DIFCO, 2 g Pepton CUDAHAY, 2 g KH₂PO₄, 2 g MgSO₄·7H₂O, 4,25 g NaNO₃ und entmineralisiertes Wasser ad 1 l) in einem 50-l-Fermenter (System Ultramix, Typ FU 005, H. BERTRAMS A.G., Basel) unter Rühren (1400 Umdrehungen/Min.) und Belüftung (25 l/Min.) 44 Std. bei 27° inkubiert. Filtration von 14 l Kulturbrühe ergab 2,5 l feuchtes Mycel. Dieses wurde viermal mit je 2 l Essigester extrahiert. Die mit Wasser gewaschenen und über MgSO₄ getrockneten Auszüge lieferten 4,2 g Rohextrakt. Dieser wurde an 250 g Kieselgel (Korngrösse 0,05–0,2 mm) chromatographiert.

Die Fraktionen 1–19 (eluiert mit Chloroform und Chloroform-Alkohol-(99:1) (je 200 ml)) ergaben 1,06 g fettartiges Material, das nicht näher untersucht wurde. Die Fraktionen 20–22 (eluiert mit Chloroform-Alkohol-(99:1) (je 200 ml)) ergaben 854 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 392 mg krist. *Verrucarín H.*

Aus dem Kulturfiltrat wurden in analoger Weise nur 28 mg krist. *Verrucarín H* isoliert.

2. *Isolierung von Verrucarín J.* 8 Penicillinflaschen mit je 100 ml Nährboden (20,0 g Malzextrakt der SCHWEIZ. FERMENT AG., Basel, 4 g Bacto-Yeast-Extrakt DIFCO, 30 g Agar-Agar in 1 l entmineralisiertem Wasser) wurden nach Sterilisation (20 Min./120°/1 atü) mit einer Konidien-suspension des Stammes S 833 von *Myrothecium verrucaria*, isoliert aus einer Bodenprobe von Bingerville, Africa, beimpft und während 10 Tagen bis zur guten Sporulierung bei 27° bebrütet. Hierauf wurden die Konidien in 1,6 l entmineralisiertem Wasser suspendiert und mit dieser Aufschwemmung ein Fermenter zu 1500 l Nährlösung (3 g NH₄Cl *purum*, 2 g KH₂PO₄ *purum*, 2 g MgSO₄·7H₂O *purum*, 2 g Malzextrakt der SCHWEIZ. FERMENT AG., Basel, 2 g Pepton CUDAHAY, 20 g Glucose *purum* und entmineralisiertem Wasser ad 1 l) nach Sterilisation (20 Min./120°/1 atü) beimpft. Im mit zwei 8-blättrigen Turbinenrührern (turbin mixer impeller) versehenen Gärtank wurde mit 75 Umdrehungen pro Min. gerührt, mit 1500 l Luft pro Min. bei 0,5 atü belüftet und bei 27° während 45 Std. bebrütet. Infolge starker Schaumbildung mussten vor der Sterilisation 7,5 l und während der Gärung jede Stunde weitere 270 ml Antifoam Silicone (Dow CORNING Emulsion B), total 19,0 l Schaumbekämpfungsmittel, zugesetzt werden. Die sehr viskose, leicht graue Brühe aus Kulturlösung und Mycel wurde auf 12° abgekühlt. Hierauf wurde das Mycel durch Zentrifugation vom Kulturfiltrat abgetrennt und die klare Kulturflüssigkeit zweimal mit je 750 l Essigester extrahiert. Die Auszüge wurden einmal mit 300 l Wasser gewaschen und im Vakuum vollständig eingedampft. Der Eindampfrückstand (500 g) wurde im Gegenstrom zwischen dreimal je 10 l Petroläther und dreimal je 3,5 l 90-proz. wässrigem Methanol verteilt. Die wässrig-methanolischen Phasen wurden im Vakuum stark eingeengt und dreimal mit je 3 l Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Auszüge wurden der Reihe nach gewaschen mit 1 l Wasser, dreimal je 1 l 5-proz. wässriger NaHCO₃-Lösung und 1 l Wasser, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Eindampfrückstand (234 g) wurde einer 10-stufigen Gegenstromverteilung im System 70-proz. wässriges Methanol-Tetrachlorkohlenstoff-(1:1) nach CRAIG unterworfen (2,7 l Lösungsmittel pro Phase). *Verrucarín A* zeigt in diesem System eine Verteilungszahl von 0,97 und das Rohprodukt eine solche von 1,48.

Aus den Fraktionen 5–8 resultierte nach Eindampfen 6 g rohes, krist. *Verrucarín A* und aus den Fraktionen 9–10 7,5 g rohes, krist. *Verrucarín J*. Die Filtration von 1,0 g rohem *Verrucarín J* durch 50 g Kieselgel (Korngrösse 0,2–0,5 mm) mit Hilfe von Methylenchlorid, ergab nach Kristallisation aus Chloroform-Äther 700 mg reines *Verrucarín J*.

3. *Isolierung von Roridin D*. Der Stamm S 1775 von *Myrothecium roridum* wurde in 10 l Nährlösung (20 g Glucose, 2 g Malz, 2 g Yeast, 2 g Pepton, 2 g KH_2PO_4 , 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,675 g NH_4Cl und entmineralisiertem Wasser ad 1 l) in einem 10-l-Fermenter (Typ F 314, New BRUNSWICK Sc. Co., New Brunswick, N.J., USA) unter Rühren (450 Umdrehungen/Min.) und Belüftung (5 l/Min.) 96 Std. bei 27° inkubiert. Nach Zugabe von 100 g «Hyflo» wurde das Mycel auf einer Nutsche abgetrennt und das Filtrat viermal mit je 6 l Äthylenchlorid extrahiert. Die mit Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben 3,9 g eines roten Öls. Dieses wurde im Gegenstrom zwischen je dreimal 100 ml 90-proz. wässrigem Methanol und Petroläther verteilt. Die drei Methanolphasen wurden im Vakuum stark eingengt und das Konzentrat dreimal mit je 100 ml Chloroform extrahiert. Die mit Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben 1,96 g eines rötlichen Schaums. Dieser wurde einer 10-stufigen Gegenstromverteilung unterworfen (System: 80-proz. wässriges Methanol/Tetrachlorkohlenstoff-(1:1), je 40 ml pro Phase).

Die Fraktionen 4–7 gaben aus Aceton-Äther 340 mg Kristalle. Diese wurden an 340 g Kieselgel (0,05–0,2 mm) chromatographiert. Als Lösungsmittel diente Methylenchlorid-Methanol-(99:1) (10-ml-Fraktionen). Die Fraktionen 297–300 ergaben 7 mg *Verrucarín B*; die Fraktionen 311–323 (209 mg) ergaben 144 mg krist. *Verrucarín A* und die Fraktionen 324–350 (23 mg) lieferten aus Aceton-Äther-Pentan 16 mg *Roridin D*. – Die Mutterlaugen der Fraktionen 4–7 (350 mg) aus der Gegenstromverteilung wurden analog chromatographiert und ergaben weitere 16 mg krist. *Roridin D*.

4. *Isolierung von Roridin E*. Ein Fermenter, Typ FB 01 (HCH. BERTRAMS AG., Basel) mit 100 l Nährlösung (20 g Glucose, 2 g Malzextrakt der SCHWEIZ. FERMENT AG., Basel, 2 g Bacto-Yeast-Extrakt 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 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und Leitungswasser ad 1 l) wurde nach Sterilisation (20 Min./120°/1 atü) mit einer Kultur des Stammes S 1198 von *Myrothecium verrucaria* beimpft und bei 200 Umdrehungen des Rührers pro Min. und unter Belüftung (100 l pro Min.) 113 Std. bei 27° inkubiert. Die gelbe, dickflüssige Kulturbrühe wurde durch Zentrifugation geklärt und die Lösung viermal mit je 25 l Essigester extrahiert. Die Extrakte wurden im Vakuum eingedampft und der ölige Eindampfrückstand (35 g) dreimal zwischen 200 ml 90-proz. wässrigem Methanol und 200 ml Petroläther im Gegenstrom verteilt. Die Petrolätherphasen wurden verworfen. Die vereinigten Methanollösungen wurden im Vakuum stark eingengt, mit 100 ml Wasser versetzt und mit 200 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge wurden im Vakuum eingedampft. Der Eindampfrückstand (25 g) wurde einer 10-stufigen Gegenstromverteilung unterworfen. Als Lösungsmittel diente 80-proz. wässriges Methanol-Tetrachlorkohlenstoff-(1:1), wobei die schwere Phase wanderte. Pro Phase und Stufe wurden je 100 ml Lösungsmittel verwendet. Nach Eindampfen im Vakuum ergaben die Stufen 1–4 (7,5 g) 200 mg rohes, krist. *Verrucarín A*, die Stufen 5–7 (4,0 g) ein Rohkristallinat bestehend aus *Verrucarín A*, *J* und *Roridin E*, die Stufen 8 und 9 3,4 g Rohprodukt. Dieses wurde an 150 g Silicagel (Korngrösse 0,2–0,5 mm) chromatographiert. Aus der mit Methylenchlorid-Äthanol-(99:1) eluierten 8. Fraktion (2,0 g) resultierten 1,65 g krist. *Verrucarín J*. Die Fraktionen 9–10 (eluiert mit Methylenchlorid-Äthanol-(99:1) 529 mg) lieferten aus Äther-Pentan 220 mg krist. *Roridin E*. – Die Stufe 10 der obigen Verteilung lieferte noch 390 mg krist. *Verrucarín J*.

Charakterisierung der isolierten Stoffe

1. *Verrucarín H*: Aus Benzol-Petroläther oder Aceton-Äther oder Methanol-Äther farblose Nadeln und aus Methylenchlorid-Äthanol farblose, rechteckige Platten, die nicht unter 320° schmelzen. Bei ca. 240° beginnen sich die Kristalle gelb und braun zu verfärben (Zers.). $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +31^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,425$ in Chloroform); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +33^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,397$ in Chloroform); $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +32^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,055$ in Chloroform); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +60^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,228$ in Benzol); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +58^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,998$ in Benzol); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +42^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,227$ in Dioxan); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +44^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,187$ in Dioxan). – UV.-Spektrum vgl. Fig. 1. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2 , P. E. Nr. 125) u. a. Banden bei: 2960, 1708, 1645, 1596, 1377, 1368, 1215, 1175, 1115, 1099, 1075, 1029, 988, 962, 920, 868, 855 und

823 cm^{-1} (vgl. Fig. 2). IR.-Spektrum (KBr, P. E. Nr. 21) u. a. Banden bei: 2967, 2899, 1706, 1653, 1603, 1439, 1374, 1351, 1220, 1179, 1148, 1116, 1101, 1085, 1031, 1003, 990, 967, 871 und 833 cm^{-1} . – Zur Analyse 8 Std. bei 110° getrocknet.

$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_8$	Ber. C 67,97	H 7,08	O 24,97	4(C)CH ₃ 11,8	3(C)CH ₃ 8,8%
(512,6)	Gef. „ 67,88; 68,22	„ 7,09; 6,99	„ 24,91; 24,79		(C)CH ₃ 9,8%

Aktiver H (ZEREWITINOFF) Gef. 0%; $-\text{OCH}_3$ (ZEISEL) Gef. 0% Mol.-Gew. Gef. 490 ± 25 (vaporometrische Mikromethode in CH_2Cl_2) [7]²).

2. *Verrucarín J*: Aus Chloroform-Äther oder Aceton-Äther farblose Nadeln, die nicht unter 315° schmelzen. Bei 270° beginnen die Kristalle zu sintern und färben sich bei 305° gelb (Zers.). $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +20^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,011$ in Chloroform); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +18^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,230$ in Chloroform); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +41^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,784$ in Benzol); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +30^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,997$ in Dioxan). – UV.-Spektrum vgl. Fig. 1. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2 , P. E. Nr. 125) u. a. Banden bei: 2810, 1710, 1650, 1630, 1588, 1352, 1221, 1180, 1147, 1070–1088, 1042, 995, 968, 877 und 820 cm^{-1} (vgl. Fig. 3). IR.-Spektrum (KBr, P. E. Nr. 21) u. a. Banden bei: 2959, 2907, 1715, 1678, 1592, 1435, 1414, 1375, 1344, 1254, 1220, 1183, 1147, 1121, 1042, 994, 966, 879, 864 und 829 cm^{-1} . – Zur Analyse 5 Std. bei 100° getrocknet.

$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_8$	Ber. C 66,86	H 6,86	O 26,39	3(C)CH ₃ 9,3%
(484,5)	Gef. „ 67,00; 66,70	„ 6,89; 6,80	„ 26,40; 26,14	„ 6,3; 6,2%

Aktiver H (ZEREWITINOFF) Gef. 0%; $-\text{OCH}_3$ (ZEISEL) Gef. 0% Mol.-Gew. Gef. 468 ± 20 (vaporometrische Mikromethode in CH_2Cl_2) [7]²).

3. *Roridin D*: Aus Aceton-Äther Nadeln vom Smp. 232–235° $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +29^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,71$ in Chloroform). – UV.-Spektrum vgl. Fig. 1. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2 , P. E. Nr. 125) u. a. Banden bei: 3680–3670, 2970, 1750, 1711, 1642, 1604, 1340–1330, 1191, 1115, 1086, 970 cm^{-1} (vgl. Fig. 4). IR.-Spektrum (KBr, P. E. Nr. 125) u. a. Banden bei: 3540–3440, 2970, 1747, 1711, 1641, 1601, 1420, 1190, 1105, 1083, 968, 818, 753, 660 cm^{-1} . – Zur Analyse 3 Std. bei 120° getrocknet.

$\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_9$ (530,6)	Ber. C 65,64	H 7,22	O 27,14%	Gef. C 65,39	H 7,32	O 26,90%
	Mol.-Gew. Gef. 528 ± 11 (vaporometrische Mikromethode in CH_2Cl_2) [7] ²).					

4. *Roridin E*: Aus Äther-Pentan farblose Nadeln vom Smp. 177–178° oder 211–212°. Aus Äther Nadeln vom Smp. 220–221°. Bei 270° beginnen sich die Kristalle gelb und braun zu verfärben (Zers.). $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -27^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,30$ in Chloroform); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -21^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,852$ in Chloroform); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -24^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,798$ in Chloroform). – UV.-Spektrum vgl. Fig. 1. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2 , P. E. Nr. 125) u. a. Banden bei: 3570, 3050, 2975, 1712, 1647, 1603, 1365, 1220, 1180, 1148, 1142, 1096, 1090, 1080, 966, 814 cm^{-1} (vgl. Fig. 5). IR.-Spektrum (KBr, P. E. Nr. 125) u. a. Banden bei: 3500, 2970, 1715, 1645, 1598, 1218, 1176, 1080, 1030, 1000, 965, 810 cm^{-1} . – Zur Analyse 14 Std. bei 100° getrocknet.

$\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_8$	Ber. C 67,7	H 7,4	O 24,9	$-\text{OCH}_3$ 0%
(514,6)	Gef. „ 68,0	„ 7,2	„ 25,3	„ 0%

Mol.-Gew. Gef. 519 ± 20 (vaporometrische Mikromethode in CH_2Cl_2) [7]²).

SUMMARY

From cultures of *Myrothecium verrucaria* (ALBERTINI *et* SCHWEINITZ) DITMAR *ex* FRIES and *Myrothecium roridum* TODE *ex* FRIES four additional metabolites have been isolated: verrucarín H ($\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_8$), verrucarín J ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_8$), roridin D ($\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_9$) and roridin E ($\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_8$). They are closely related to verrucarín A and B, since they contain the sesquiterpenoid alcohol verrucarol as structural element.

Institut für Organische Chemie der Universität Basel
(B. B., E. F., and CH. T.)
Pharmazeutisch-chemische
Forschungslaboratorien SANDOZ AG., Basel
(E.H., H. P. S. and CH. ST.)

LITERATURVERZEICHNIS

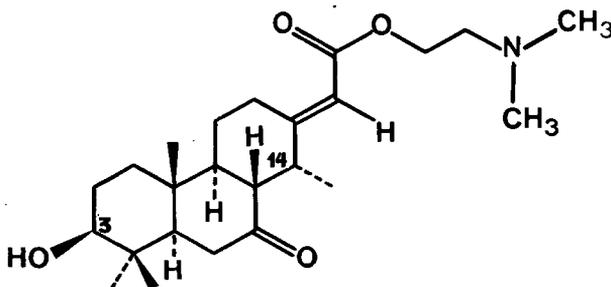
- [1] 7. Mitteilung: W. ZÜRCHER, J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* 48, 840 (1965).
 [2] E. HÄRRI, W. LOEFFLER, H. P. SIGG, H. STÄHELIN, CH. STOLL, CH. TAMM & D. WIESINGER, *Helv.* 45, 839 (1962).
 [3] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* 47, 157 (1964).
 [4] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* 47, 177 (1964).
 [5] CH. TAMM, J. GUTZWILLER, B. BÖHNER & E. FETZ, XIXth Congress of Pure and Applied Chemistry, London, 10.–17. Juli 1963, Abstracts A, p. 311.
 [6] CH. TAMM, I.A.M. Symposia on Microbiology, Number 6 «Chemistry of Microbial Products», Tokyo, Japan, 24.–25. April 1964, Preprint p. 194.
 [7] Vgl. W. SIMON & W. TOMLINSON, *Chimia* 14, 305 (1960); CH. CHYLEWSKI & W. SIMON, *Helv.* 47, 515 (1964).
 [8] J. S. VITTIMBERGA & B. M. VITTIMBERGA, *J. org. Chemistry* 30, 746 (1965).
 [9] J. GUTZWILLER, R. MAULI, H. P. SIGG & CH. TAMM, *Helv.* 47, 2234 (1964).
 [10] M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI & A. R. FAHMY, *Experientia* 18, 104 (1962).
 [11] Vgl. T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc.* Nr. 7, 305 (1949).
 [12] Vgl. E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962; K. RANDERATH, «Dünnschichtchromatographie», Verlag Chemie, Weinheim 1962.

119. Zur absoluten Konfiguration von Cassain

von H. Hauth¹⁾, D. Stauffacher¹⁾, P. Niklaus¹⁾ und A. Melera²⁾

(15. V. 65)

Die Stereochemie der Alkaloide aus *Erythrophleum*-Arten war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [1] [2]. Dabei konnte für Cassain (I), den bekanntesten Vertreter dieser Alkaloidklasse, die absolute Konfiguration der C-Atome 3, 5, 8, 9 und 10 abgeleitet werden, während die bisher angenommene axiale Stellung der Methylgruppe an C-14 kürzlich wieder angezweifelt wurde [2]. Über die Konfiguration der α,β -ungesättigten Estergruppierung lagen dagegen bisher keinerlei Untersuchungsergebnisse vor. Gestützt auf eine eingehende Untersuchung von Protonenresonanzspektren gelang es uns nun, für Cassainsäure-methylester und somit auch für das Cassain die aus Formel I ersichtliche Stereochemie der Seitenkette zu beweisen und die axiale Stellung der Methylgruppe an C-14 zu bestätigen.



Cassain (I)

¹⁾ Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien, SANDOZ AG., Basel

²⁾ Forschungslaboratorium der VARIAN AG., Zürich.