

181. Die Konstitution von Verrucarin J

Verrucarine und Roridine, 9. Mitteilung [1]

von E. Fetz, B. Böhner und Ch. Tamm

(30. VIII. 65)

Verrucarin J ist ein mit dem Antibioticum Verrucarin A [2] [3] strukturell nahe verwandtes Stoffwechselprodukt von *Myrothecium verrucaria* (ALBERTINI *et* SCHWEINITZ) DITMAR *ex* FRIES und von *Myrothecium roridum* TODE *ex* FR., Gattungstyp bei FRIES [1]. Wie Verrucarin B [4] erscheint Verrucarin J meist als Begleiter von Verrucarin A. Es ist deshalb sehr schwierig, die drei Stoffe voneinander zu trennen und wirklich rein zu gewinnen [1]. Verrucarin J besitzt nach den Analysenwerten, der vaporometrischen Molekulargewichtsbestimmung und dem Massenspektrum¹⁾ die Bruttoformel $C_{27}H_{32}O_8$. Es enthält somit eine Molekel Wasser weniger als Verrucarin A, bzw. ein Sauerstoffatom weniger als Verrucarin B. Auf Grund der im folgenden beschriebenen physikalischen und chemischen Eigenschaften kommt Verrucarin J die Strukturformel **1** zu.

A. Funktionelle Gruppen. – Das UV.-Spektrum von Verrucarin J (**1**) ist durch drei intensive Absorptionsmaxima bei 196, 219 und 262 nm und das IR.-Spektrum durch eine starke Carbonylstreckschwingung bei ca. 1710 cm^{-1} ²⁾ und zwei C=C-Banden bei 1650 und 1630 cm^{-1} charakterisiert [1]. Das kurzwellige und das langwellige Maximum des UV.-Spektrums und die erwähnten Banden des IR.-Spektrums deuten auf das Vorliegen des gleichen chromophoren Systems wie in Verrucarin A und B, nämlich einer $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -ungesättigten Estergruppierung, hin. Das zusätzliche Maximum bei 219 nm, welches einzig bei Verrucarin J (**1**) beobachtet wird, lässt eine weitere α, β -ungesättigte Estergruppierung vermuten. Im IR.-Spektrum waren keine Hydroxylbanden erkennbar. Verrucarin J (**1**) veränderte sich dementsprechend bei der Behandlung mit Acetanhydrid und Pyridin nicht. Es enthält keine aktiven Wasserstoffatome (ZEREWITINOFF). Nach der KUHN-ROTH-Methode sind drei C-Methylgruppen nachweisbar. Das NMR.-Spektrum (s. unten) bestätigte diesen Befund. Die katalytische Hydrierung von Verrucarin J (**1**) mit Pt in Eisessig führte nach Aufnahme von 4 Mol. H_2 zu Octahydro-verrucarin J (**2**), das nach einiger Zeit auch in Kristallen erhalten wurde. Sein UV.-Spektrum wies keine selektive Absorption mehr auf. Im IR.-Spektrum hatte sich die Carbonylschwingung nach 1732 cm^{-1} verschoben, und die C=C-Banden waren verschwunden.

B. Hydrolytische Spaltung. – Wie bei den Verrucarin A und Verrucarin B, vermittelte die basenkatalysierte Hydrolyse weiteren Aufschluss über die Struktur von Verrucarin J (**1**). Allerdings erwies sich Verrucarin J (**1**) als merklich schwerer spaltbar als die beiden anderen Verrucarine. Nach Stehen mit 1,4 N K_2CO_3 in wässrigem Methanol während 4 Std. bei 20° war die Umsetzung noch nicht beendet und vor-

¹⁾ Wir danken Herrn Dr. W. VETTER, F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co., AG., Basel, bestens für die Aufnahme.

²⁾ Die Bande zeigt eine schwache Aufspaltung in ein Dublett.

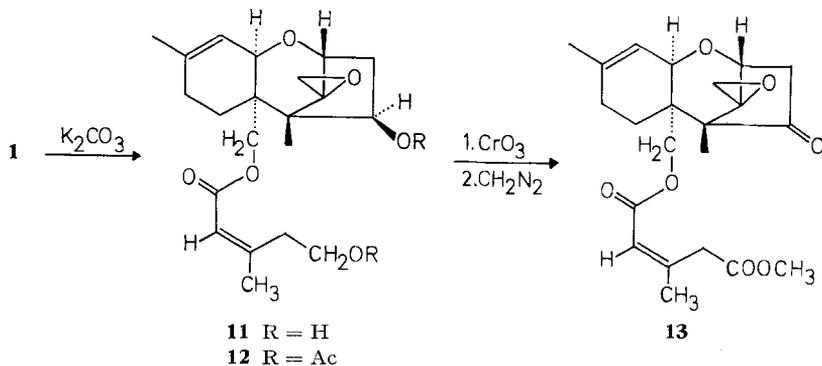
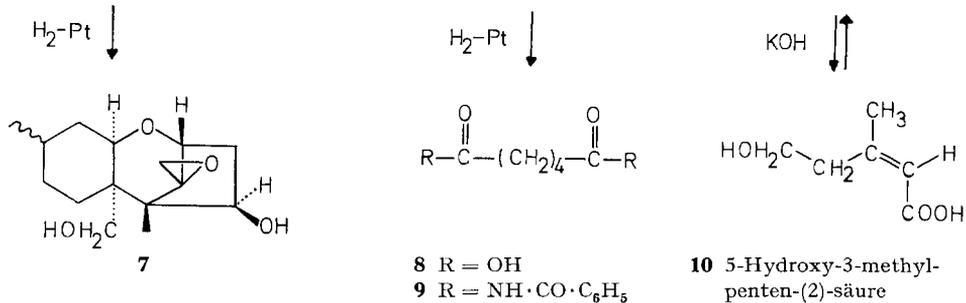
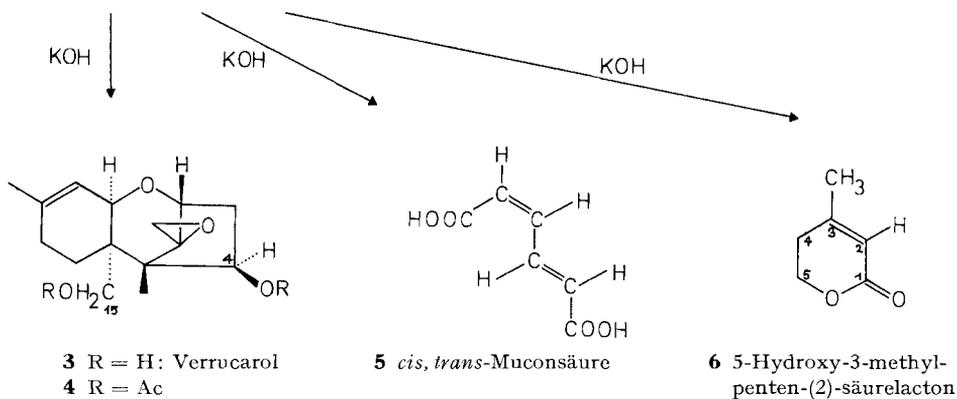
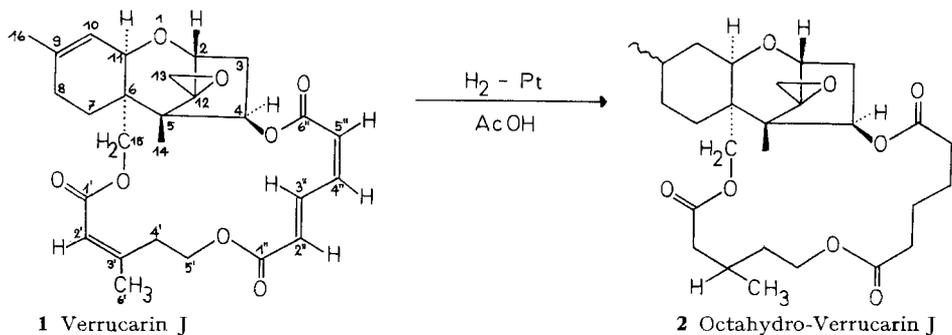
wiegend nur partielle hydrolytische Spaltung (s. auch unten) eingetreten. Als Spaltstücke resultierten Verrucarol (3) [5] und die *cis,trans*-Muconsäure (5) [2]. Bei 20° wurde vollständige Hydrolyse erst nach 6stdg. Behandeln mit 1,5N methanolischem KOH erzielt, worauf wir 5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurelacton (3-Anhydro-mevalolacton) (6) [6], als drittes Spaltprodukt erhielten. Die drei Stoffe wurden wie folgt isoliert und identifiziert:

1. Das aus den neutralen Anteilen isolierte *Verrucarol* (3) führten wir zur weiteren Identifizierung in die bekannten Derivate Di-O-acetylverrucarol (4) [5] und Dihydroverrucarol A (7) [5] über. Verrucarol (3) ist ein Sesquiterpenalkohol, der erstmals durch alkalische Hydrolyse von Verrucarin A erhalten worden ist [2].

2. *5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurelacton* (6): Aus den sauren Anteilen der KOH-Spaltung, die bei der Extraktion der Hydrolysenlösung mit Äther bei pH 1 angefallen waren, erhielten wir durch Destillation ein gelbliches Öl, das im Dünnschichtchromatogramm noch Flecke von Nebenprodukten zeigte. Die weitere Reinigung gelang am besten mittels «präparativer Dünnschichtchromatographie», d. h. durch Anwendung von dickeren Schichten auf grösseren Platten (s. Exper. Teil). Erneute Destillation der so gereinigten Hauptfraktion ergab ein farbloses, optisch inaktives Öl vom Sdp. 118–120°/14 Torr, der Formel $C_8H_8O_2$. Das UV.-Spektrum in Äthanol war durch ein intensives Absorptionsmaximum bei 214 nm ($\log \epsilon = 4,22$) charakterisiert. Es ist für die mittleren Absorptionsbanden von Verrucarin J (1) verantwortlich. Das IR.-Spektrum zeigte eine Bande bei 1722 cm^{-1} . Diese Lage ist typisch für eine C=O-Streckschwingung eines α, β -ungesättigten δ -Lactons. Die C=C-Bande erschien bei 1670 cm^{-1} . Diese Daten wiesen auf das Vorliegen von 5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurelacton (6) hin. In der Tat war das aus Verrucarin J (1) isolierte Öl nach Sdp., den UV-, IR.- und NMR.-Spektren identisch mit einem Präparat von 6, das wir nach CORNFORTH *et al.* [6] aus Mevalolacton (3,5-Dihydroxy-3-methylvalerolacton) durch Wasserabspaltung mit $KHSO_4$ bereitet hatten. Auch die Gas-Chromatogramme stimmten miteinander überein. Nach Behandeln mit KOH und anschliessendem Neutralisieren mit HCl lieferte das aus Verrucarin J (1) stammende ölige Lacton die krist. *cis*-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure (*cis*-3-Anhydromevalonsäure) (10)³⁾. Diese *cis*-Säure 10 ist kürzlich von KELLER-SCHIERLEIN [8] als Baustein des Antibioticums Ferrirhodin erkannt worden⁴⁾. Im NMR.-Spektrum von 5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurelacton (6) (vgl. Fig. 1) erscheint bei 8,0 τ ein 3-Protonensignal, das wir der an der Doppelbindung haftenden Methylgruppe zuordnen. Es zeigt eine schwache Aufspaltung in ein Dublett mit der Spin-Spin-Kopplungskonstante $J = 0,8$ cps, welche durch allylische long-range-Wechselwirkung (vgl. [9]) mit dem C-2-Vinylproton zustande kommt. Das Signal dieses Vinylprotons erscheint bei 4,2 τ als Quadruplett mit der gleichen Kopplungskonstante von 0,8 cps.

³⁾ VITTIMBERGA & VITTIMBERGA [7] beschrieben ganz kürzlich die Hydrolyse von Muconomycin B, das mit Verrucarin J höchstwahrscheinlich identisch ist (vgl. [1]). Sie erhielten ebenfalls Verrucarol (3) und *cis,trans*-Muconsäure (10). Es gelang ihnen aber nicht, aus dem Hydrolysen-gemisch das 5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurelacton (6) zu isolieren. Sie zogen daraus den irrtümlichen Schluss, dass die *trans*-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure am Aufbau des Antibioticums beteiligt sei (vgl. Diskussion weiter unten).

⁴⁾ Die isomere *trans*-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure ist am Aufbau von Desferrirubin beteiligt [8].



Analoge Signale findet man auch im NMR.-Spektrum von Verrucarín J (**1**) (vgl. Fig. 2). Die bei $7,6 \tau$ und $5,6 \tau$ auftretenden Signale (je 2 Protonen) sind infolge gegenseitiger Kopplung in Triplette ($J = 6$ cps) aufgespalten. Das Triplet bei $7,6 \tau$ dürfte der C-4-Methylengruppe entsprechen, während das bei tieferem Feld erscheinende Signal der C-5-Methylengruppe zukommen dürfte (Entschirmung durch den benachbarten Ringsauerstoff). Das Vinylproton muss infolgedessen an C-2 und die Methylgruppe an C-3 haften.

3. Aus den sauren ätherlöslichen Anteilen der Spaltung mit $1,4 N K_2CO_3$ kristallisierte die *cis,trans*-Muconsäure (**5**) aus. Die Identifizierung erfolgte durch Misch-Smp., UV-, IR- und NMR.-Spektren. Die katalytische Hydrierung der isolierten Säure mit Pt in Eisessig ergab Adipinsäure (**8**), die zur weiteren Identifizierung in das Dianilid **9** übergeführt wurde.

C. Verknüpfung der Hydrolysenprodukte: Struktur von Verrucarín J. – Da Verrucarín J ein Neutralstoff ist, der keine Hydroxylgruppen enthält, müssen die Hydrolysenprodukte esterartig miteinander verknüpft sein, wobei neben Verrucarol (**3**) und der *cis,trans*-Muconsäure (**5**) nicht das 5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurelacton (**6**), sondern die *cis*-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure (**10**) als Baustein auftritt. Das Lacton **6** ist ein nach der Hydrolyse von Verrucarín J (**1**) entstandenes Sekundärprodukt, das sich nur aus der *cis*-Säure **10**, nicht aber aus der isomeren *trans*-Säure bilden kann. Das NMR.-Spektrum von Verrucarín J (**1**) (vgl. Fig. 2 und Tab.) zeigt bei tiefem Feld das für *cis,trans*-Muconsäureester typische 11-Linien-Spektrum der vier Vinylprotonen. Die Lage dieser Signale ist praktisch gleich wie bei Verrucarín A [2] und Verrucarín B [4]. Dies beweist, dass die *cis,trans*-Geometrie des Muconsäureanteils auch im ursprünglichen Antibioticum vorhanden ist. Die Veresterung der drei zur Verfügung stehenden Carboxylgruppen mit den drei Hydroxylgruppen ergibt zwangsläufig die Struktur eines makrocyclischen Triesters. Wie bei Verrucarín B [4], schliesst die Zahl der vorhandenen funktionellen Gruppen eine nicht-cyclische, «lineare» Verknüpfung aus. Da alle drei Esterbindungen eine konjugierte Doppelbindung enthalten, zeigt das IR.-Spektrum von Verrucarín J (**1**) nur eine einzige, niederfrequente, aber intensive C=O-Streckschwingung bei 1710 cm^{-1} (vgl. [1]).

Die Sequenz der drei Bausteine liess sich mit Hilfe einer gezielten partiellen Hydrolyse des Verrucarins J (**1**) bestimmen⁵). Sie gelang durch Behandeln des Antibiotiums mit $0,004 N K_2CO_3$ in wässrigem Methanol, das etwas Methylenchlorid enthielt, bei 22° während 2,5 Std. Nach dieser Zeit erhielten wir aus den sauren Anteilen des Hydrolysenmischens die *cis,trans*-Muconsäure (**5**) in einer Ausbeute von 80% der Theorie. Die neutralen Anteile ergaben nach Chromatographie an Kieselgel nur 25% der theoretischen Menge an Verrucarol (**3**). Der Rest des Materials bestand aus einer neuen einheitlichen Verbindung $C_{21}H_{30}O_6$, die bisher nicht kristallisierte. Sie besitzt die Strukturformel **11** eines Dihydroxyesters. Im UV.-Spektrum fehlte das Absorptionsmaximum bei 260 nm (veresterte Muconsäure), während dasjenige der α, β -ungesättigten Estergruppierung der veresterten *cis*-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure zugehörige Maximum von 220 nm ($\log \epsilon = 4,2$; Äthanol) noch vorhanden war. Der Muconsäureanteil der Verrucarín-J-Molekel ist selektiv herausgespalten worden.

⁵) Bei Verrucarín A und B ist eine partielle Hydrolyse bisher nicht geglückt [2] [3] [4].

In Übereinstimmung damit waren im IR.-Spektrum Banden bei 1709 cm^{-1} und 1645 cm^{-1} sichtbar. Die neu aufgetretene HO-Streckschwingung bei 3636 cm^{-1} stammt von zwei Hydroxylgruppen her. Sie sind nicht tertiär, da sie beide mit Acetanhydrid und Pyridin bei 22° leicht acetylierbar sind. Das IR.-Spektrum des entstandenen Di-O-acetyl-Derivats **12** zeigt keine HO-Bande mehr. Die beiden Acetylgruppen sind im NMR.-Spektrum (vgl. Tab.) durch die Signale bei $7,92\ \tau$ und $7,94\ \tau$ (6 Protonen) zu erkennen. Die Entscheidung, ob in **12** die sekundäre HO-Gruppe an C-4 des Verrucarols (**3**) oder die primäre an dessen C-15 verestert ist, konnte bereits auf Grund der chemischen Verschiebungen der α -Protonen der beiden Hydroxyle in den NMR.-Spektren (vgl. Fig. 3) mit ziemlicher Sicherheit getroffen werden (vgl. Tab.). Aus ihnen folgt, dass die primäre Hydroxylgruppe des Verrucarols (**3**) den *cis*-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurerest trägt, denn die Signale der α -Protonen an C-15 treten

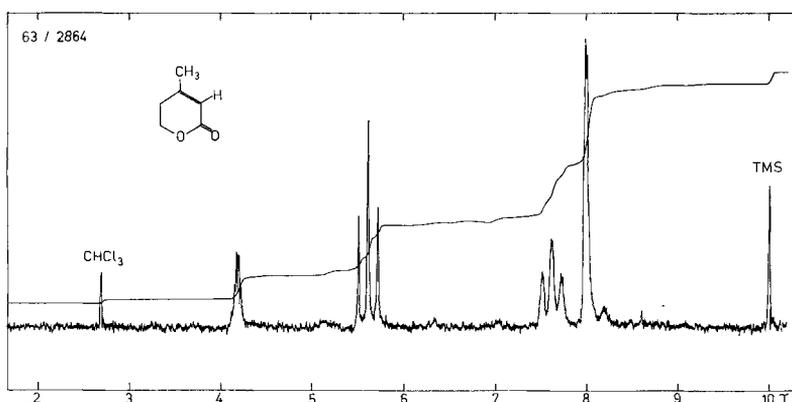


Fig. 1. NMR.-Spektrum von 5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurelacton (**6**) in Deuteriochloroform⁶⁾

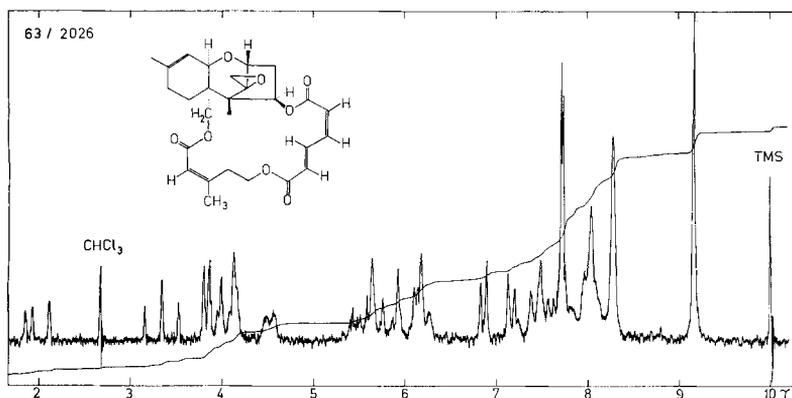


Fig. 2. NMR.-Spektrum von Verrucarol J (**1**) in Deuteriochloroform⁶⁾

⁶⁾ Aufgenommen mit einem VARIAN-Spektrometer A-60 (60 MHz) im physikal.-chem. Laboratorium der SANDOZ A.G., Basel (Dres. K. FREI und P. NIKLAUS). Chemische Verschiebungen in τ -Werten nach TIERS [10] mit $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ (TMS) als internem Standard.

Zuordnung der H-Atome in den

Alle Substanzen in CDCl_3 gelöst. *s* = Singlett; *d* = Dublett; *t* = Triplet; *m* = Multiplett.

Subst.	Fig.	C-2	C-4	C-10	C-11	C-13 ^{a)}	C-14	C-15	C-16
1 ^{b)}	1	—	4,1– 4,2 ^{c)}	4,53 <i>d</i>	—	7,02	9,17 <i>s</i>	5,7	8,28 <i>s</i>
11 ^{b)}	3	6,17 <i>d</i> (5) ^{d)}	5,43 <i>m</i> ^{e)}	4,55 <i>d</i>	6,34 <i>m</i>	7,04	9,14 <i>s</i>	5,93 <i>AB</i> (12) ^{f)}	8,30 <i>s</i>
12 ^{g)} ^{h)}		6,13 <i>d</i> (5) ^{d)}	4,25 ^{e)}	4,50 <i>d</i>	6,22 <i>m</i>	6,98	9,17 <i>s</i>	5,82 <i>AB</i> (12) ^{f)}	8,27 <i>s</i>
13 ⁱ⁾ ^{k)}		5,85 <i>m</i>	—	4,55 <i>d</i>	6,2 <i>m</i>	6,88	9,09 <i>s</i>	6,02 <i>s</i>	8,25 <i>s</i>

a) Schwerpunkt eines *AB*-Systems mit $J = 4$ cps; Abstand der Dublette $\approx 0,3$ ppm.

b) Die Methylprotonen von C-3, C-7 und C-8 erscheinen bei ca. 8,0 τ .

c) Das Signal ist weitgehend durch andere Signale überdeckt.

d) Nur vom 3β -Proton gekoppelt.

e) In Verrucarol (**3**) bei 5,3 τ *m*; in Di-O-acetylverrucarol (**4**) bei 4,19 τ *dd* (3,5; 7,5) [5].

f) In Verrucarol (**3**) bei 6,3 τ *AB* (12); in Di-O-acetyl-verrucarol (**4**) bei 5,85 τ *AB* (12) [5].

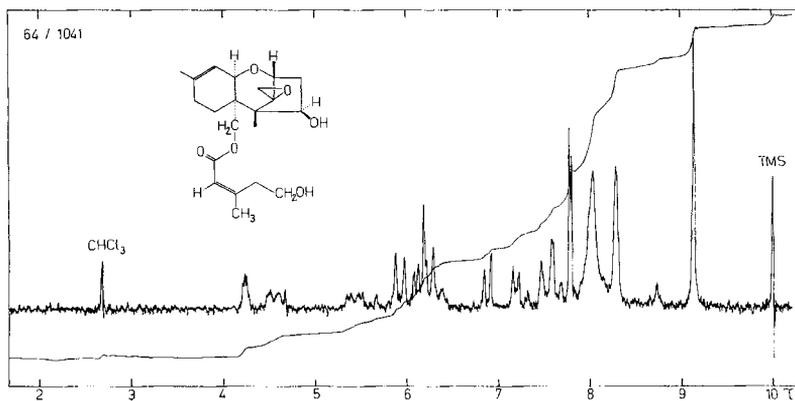


Fig. 3. NMR.-Spektrum des Dihydroxyesters **11** in Deuteriochloroform⁶⁾

sowohl bei **11** als auch beim Di-O-acetyl-Derivat **12** bei ca. 5,9 τ auf. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den chemischen Verschiebungen der entsprechenden Protonen im Di-O-acetyl-verrucarol (**4**) überein, während die Signale der α -Protonen der freien Hydroxylgruppen im Verrucarol (**3**) bei höherem Feld (6,35 τ) erscheinen [5]. Andererseits zeigen die in der Tabelle angegebenen Werte, dass die sekundäre Hydroxylgruppe des Verrucarol-Anteils frei ist: bei **11** ist das Signal des α -Protons an C-4 wie in Verrucarol (**3**) bei 4,2 τ sichtbar, während beim Di-O-acetyl-Derivat **12** erwartungsgemäss eine Verschiebung nach tieferem Feld in der gleichen Grössenordnung wie bei Di-O-acetyl-verrucarol (**4**) auftritt. In Übereinstimmung mit den aus den physikalischen Daten gezogenen Schlüssen konnte der Dihydroxyester **11** durch Oxydation mit $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ in Aceton [11] in eine Ketosäure übergeführt werden, die mit Diazomethan den Ketoester **13** lieferte. Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 4) von **13** waren keine Hydro-

NMR.-Spektren (ausgewählte Daten)⁶⁾

In runden Klammern sind die Spin-Spin-Kopplungskonstanten J in cps angegeben.

C-2'	C-4'	C-5'	C-6'	C-2''	C-3''	C-4''	C-5''
4,15 <i>d</i> (1,5)	7,50 <i>t</i> (6)	6,18 <i>t</i> (6)	7,72 <i>d</i> (1,5)	3,95 <i>d</i> (16)	1,88 <i>dd</i> (11; 16)	3,4 <i>t</i> (11)	3,9 <i>d</i> (11)
4,24 <i>d</i> (1)	7,58 <i>t</i> (6,5)	6,18 <i>t</i> (6)	7,80 <i>d</i> (1)				
4,24 <i>d</i> (1)	7,5 <i>t</i> (6)	5,73 <i>t</i> (6,5)	7,78 <i>d</i> (1)				
4,18 <i>s</i>	6,80 <i>s</i>	–	7,74 <i>s</i>				

g) 2 CH₃CO-Gruppen bei 7,92 τ s bzw. 7,94 τ s.

h) Die Methylenprotonen von C-3, C-7 und C-8 erscheinen bei 7,5–8 τ .

i) Die Methylenprotonen von C-3 erscheinen bei 7,33 τ *d* (2,5), diejenigen von C-7 und C-8 bei ca. 8,0 τ .

k) 1 CH₃O-Gruppe bei 6,24 τ s.

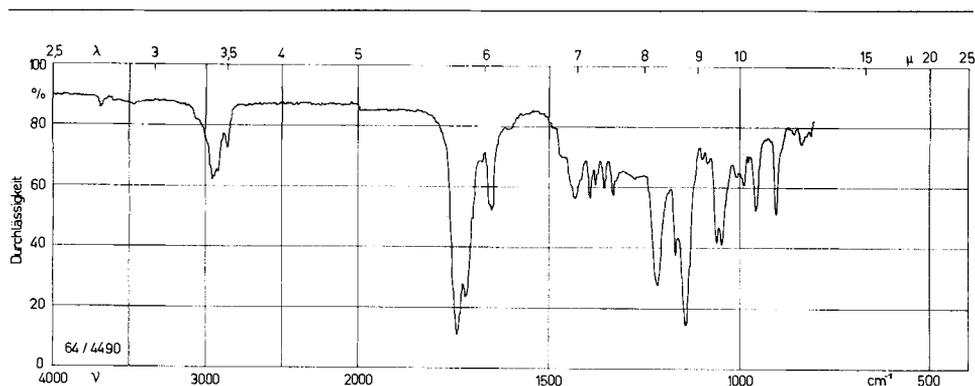


Fig. 4. IR.-Absorptionsspektrum des Ketoesters **13** in Methylenchlorid⁷⁾

xylgruppen mehr sichtbar; neben den Banden bei 1709 cm⁻¹ und 1645 cm⁻¹ (α , β -ungesättigter Ester) trat eine neue, sehr intensive C=O-Streckschwingung auf, die vom Methylester und Fünfringketon herrührt. Nach dem NMR.-Spektrum enthält der Ester nur eine einzige CH₃O-Gruppe. Das Proton an C-4 ist verschwunden. Wäre die Verknüpfung umgekehrt gewesen, so hätte bei der Oxydation statt der Monoketo-monocarbonsäure eine Dicarbonsäure, bzw. nach Methylierung ein Dimethylester entstehen müssen⁸⁾. Auch die α -Protonen an C-15 hätten verschwinden müssen. Damit ist die Sequenz der drei Bausteine in Verrucarol J (**1**) eindeutig bewiesen. Sie ist analog zu derjenigen des Verrucarins A, wo sie auf unabhängigem Wege durch

7) Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-Gitterspektrometer, Modell 125, im Spektrollaboratorium des Instituts (CH. SENN & W. SCHWAB).

8) Wäre die primäre Hydroxylgruppe des Verrucarol-Anteils nur bis zur Aldehydstufe oxydiert worden, wie es z. B. bei Verrucarol (**3**) der Fall ist [4], so hätte im NMR.-Spektrum ein entsprechendes Signal bei ca. 0,6 τ auftreten müssen.

einen selektiven oxydativen Abbau festgelegt werden konnte [3]⁹⁾. Chemisch nicht bewiesen ist die in Strukturformel **1** angegebene *cis,trans*-Sequenz im Muconsäurerest. Sie dürfte jedoch gleich sein wie in Verrucarin A, wo sie durch die RÖNTGEN-Analyse bestimmt wurde [12], und wie in Roridin A, wo die Stereochemie des entsprechenden Anteils der Roridinsäuremolekel mit Hilfe der NMR.-Spektren festgelegt werden konnte [13]. Im Einklang mit der abgeleiteten Konstitution **1** des Verrucarins J ist das komplexe NMR.-Spektrum (vgl. Fig.), das jetzt fast vollständig interpretiert werden kann (vgl. Tabelle).

Über die biogenetischen Beziehungen zwischen Verrucarin A, Verrucarin B und Verrucarin J werden wir später berichten.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG (Projekt Nr. 2627) und der SANDOZ A.G., Basel, bestens für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Die Smp. wurden auf dem KOFLER Block bestimmt; sie sind nicht korrigiert. Substanzproben zur Messung der spezifischen Drehung, der UV-, IR- und NMR.-Spektren wurden 1 Std. bei 0,02 Torr und 60–70° getrocknet. Die UV.-Spektren wurden mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK2, die IR.-Spektren mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 21 und einem PERKIN-ELMER-Infracord-Spektrophotometer, Modell 137, mit NaCl-Optik (wird jeweils vermerkt) aufgenommen. Substanzproben zur Elementaranalyse wurden bei 0,02 Torr bei der angegebenen Zeit und Temp. getrocknet. Wir verdanken die Analysen dem mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (E. THOMMEN). Zur Säulenchromatographie nach der Durchlaufmethode [14] diente neutrales Al₂O₃ der Aktivitätsstufe der Firma M. WOELM, Eschwege, oder Kieselgel MERCK der Korngrösse 0,05–0,2 mm, in Anlehnung an die Methodik von DUNCAN [15]. Für die Dünnschichtchromatographie nach STAHL [16] wurde Kieselgel G und für die Dickschichtplatten Kieselgel-HF₂₅₄ als Adsorbens und Chloroform mit 0,5 bis 15% Methanol als Fließmittel verwendet. Die Flecke wurden durch J₂-Dämpfe sichtbar gemacht.

1. *Verrucarin J (1)*. Das verwendete Präparat zeigte die bereits beschriebenen Eigenschaften [1]. NMR.-Spektrum vgl. Fig. 2 und Tabelle.

Acetylierungsversuch: Eine Lösung von 40 mg Verrucarin J (**1**) in 2 ml Pyridin wurde mit 5 ml Acetanhydrid 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Die Lösung wurde in Chloroform aufgenommen, mit 2N HCl, 2N Na₂CO₃ und Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand war unverändertes Ausgangsmaterial.

2. *Octahydroverrucarin J (2)*. Eine Lösung von 100 mg Verrucarin J (**1**) in 25 ml Eisessig wurde in Gegenwart von 30 mg PtO₂-H₂O bei 20° hydriert. Nach 4 Std. waren, nach Berücksichtigung des zur Reduktion des Katalysators verbrauchten Wasserstoffs, 3,9 Äquivalente H₂ aufgenommen worden. Nach Abfiltrieren des Katalysators durch eine Schicht Celite, das Filtrat im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, mit 2N Na₂CO₃ und Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt (120 mg) wurde an 100 g Kieselgel (0,3 mm) chromatographiert. Die mit Methylenchlorid-Methanol-(99:1) eluierten Fraktionen gaben aus Aceton-Äther 70 mg reine farblose Nadeln vom Smp. 121–122°. $[\alpha]_D^{22} = -5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,703$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH₂Cl₂): u. a. Banden bei: 2950–2870 cm⁻¹ (C–H), 1725 cm⁻¹ (C=O, Ester), 1081 cm⁻¹ (C–O), 965 cm⁻¹. UV.-Spektrum: keine selektive Absorption. Zur Analyse 5 Std. bei 110° getrocknet.

C₂₇H₄₀O₈ (492,6) Ber. C 65,77 H 8,20 O 26,03% Gef. C 65,52 H 8,21 O 25,80%

3. *Hydrolytische Spaltungen*. – 3.1. *Mit 1,4N KOH in Methanol*: 480 mg Verrucarin J (**1**) wurden mit einer Lösung von 1,4 g KOH in 65 ml Methanol 6 Std. bei 20° stehengelassen. Das Gemisch wurde auf das halbe Volumen eingengt, mit 50 ml Wasser versetzt, mit konz. HCl auf pH 7

⁹⁾ Die direkte Überführung von Verrucarin A in Verrucarin J (**1**) durch Wasserabspaltung ist bisher wegen der Empfindlichkeit des Verrucarol-Anteils der Molekel gegenüber Säuren nicht gelungen.

gebracht und 12mal mit je 50 ml Chloroform ausgeschüttelt, die Extrakte mit NaCl-Lösung und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Aus dem Rückstand kristallisierten aus Aceton-Äther 250 mg *Verrucarol* (**3**) in farblosen Nadeln vom Smp. 155–156°. $[\alpha]_D^{22} = -40^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,015$ in Chloroform). Der Misch-Smp. mit authentischem Material war gleich, ebenso die IR-, UV- und NMR.-Spektren. 40 mg dieses Materials, wie früher beschrieben [5] mit Acetanhydrid-Pyridin acetyliert und aufgearbeitet, lieferten 23 mg reines *Di-O-acetylverrucarol* (**4**) in Nadeln vom Smp. 148–149°, $[\alpha]_D^{22} = -15^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,937$ in Chloroform). Der Misch-Smp. mit authentischem Material war gleich, ebenso die IR- und NMR.-Spektren. Zur Analyse 5 Std. bei 100° getrocknet.

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_6$ (350,4) Ber. C 65,12 H 7,48 O 27,40% Gef. C 64,85 H 7,60 O 27,80%

30 mg des obigen Verrucarols (**3**), wie früher beschrieben [5] mit Pd-Kohle in Essigester hydriert, ergaben 20 mg reines *Dihydroverrucarol A* (**7**) vom Smp. 148–150°. Der Misch-Smp. mit authent. Material war gleich, ebenso das IR.-Spektrum und die Laufstrecke im Dünnschichtchromatogramm. Die wässrig-alkalische Phase wurde mit konz. H_2SO_4 auf pH 1 gebracht und 8mal mit je 100 ml Äther ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden mit NaCl-Lösung und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum vorsichtig eingedampft. Der erhaltene Rückstand wurde im Wasserstrahlvakuum destilliert. Es resultierten 110 mg leicht gelb gefärbte Flüssigkeit vom Sdp. 118–120°/14 Torr (Badtemp. 130°). Im Dünnschichtchromatogramm (System Chloroform-Methanol-(98:2)) erwies sich diese Flüssigkeit als ein Gemisch von 2 Komponenten. Das Gemisch wurde auf Kieselgel-Dickschichtplatten von 2 mm (System Chloroform-Methanol-(98:2)) getrennt. Auf eine 20 cm breite Platte wurden je 30 mg Gemisch aufgetragen. Die schneller laufende Zone absorbierte im UV.-Licht. Das die unpolare Substanz enthaltende Kieselgel wurde abgekratzt und mit Äther extrahiert. Nach Eindampfen der Ätherextrakte verblieben 110 mg reines, farbloses, flüssiges *5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurelacton (3-Anhydromevalolacton)* (**5**) vom Sdp. 118–120°/14 Torr (Badtemp. 130°). Im Gas-Chromatogramm (Kolonnen: Carbowax, Temp. 85°, Lösungsmittel CS_2) identisch mit einem aus Mevalolacton hergestellten Präparat. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei: 1722 cm^{-1} (C=O), 1670 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} (C=C). NMR.-Spektrum vgl. Fig. 1. Zur Analyse 12 Std. bei 20° getrocknet.

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$ (96,2) Ber. C 64,42 H 7,19 O 28,54% Gef. C 64,29 H 7,29 O 28,20%

Cis-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure (**10**): Eine Lösung von 60 mg Anhydromevalolacton (**5**) in 4 ml 1N KOH wurde 20 Min. auf dem Dampfbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde mit 2N HCl neutralisiert. Die neutrale Lösung wurde mit NH_4Cl gesättigt und 6mal mit je 10 ml Äther ausgeschüttelt. Die Ätherextrakte wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand ergab durch zweimaliges Umkristallisieren aus Benzol 45 mg reine *cis-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure* (**10**) vom Smp. 69°; Misch-Smp. mit authentischem Material ebenso. CORNFORTH *et al.* [6] fanden Smp. 72–73°.

3.2. Mit 1,4N K_2CO_3 in Methanol-Wasser: Eine Lösung von 300 mg Verrucarol J (**1**) in 50 ml Methanol wurde mit einer Lösung von 10 g K_2CO_3 in 50 ml Wasser versetzt und 4 Std. bei 20° stehengelassen. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt und die alkalische Lösung 6mal mit je 100 ml CH_2Cl_2 , dem 5% Methanol zugesetzt war, ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft: 130 mg neutraler und farbloser Lack, der im Dünnschichtchromatogramm (System Chloroform-Methanol-(98:2)) 2 Flecke zeigte. Dieses Gemisch konnte trotz viermaliger Chromatographie an Al_2O_3 und Kieselgel nicht getrennt werden. Es wurde deshalb mit 10 ml einer 1,5N methanolischen KOH-Lösung 30 Min. stehengelassen. Nach Zugabe von 10 ml Wasser wurde das Methanol im Vakuum entfernt und die alkalische Lösung 4 mal mit je 20 ml CH_2Cl_2 , das 3% Methanol enthielt, ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt lieferte aus Aceton-Äther 90 mg reines farbloses *Verrucarol* (**3**) vom Smp. 157–158°. Nach Misch-Smp., IR.-Spektrum und Dünnschichtchromatographie identisch mit authentischem **3**.

Die wässrig-alkalische Lösung der K_2CO_3 -Spaltung wurde mit konz. H_2SO_4 auf pH 2 gebracht. Hierauf wurde 10mal mit je 50 ml Äther ausgeschüttelt. Die Ätherextrakte wurden mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand ergab 200 mg Rohprodukt, die aus Benzol-Äther 162 mg *cis,trans-Muconsäure* (**5**) in farblosen Nadeln vom Smp. 175–180° lieferten; Misch-Smp. mit authentischer *cis,trans-Muconsäure* ebenso. IR.-Spektrum (Nujol): u. a. Banden bei: 1690 cm^{-1} (C=O, Carboxyl), 1625 cm^{-1} und 1600 cm^{-1}

(C=C, konj.). UV.-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{\max} = 259 \text{ nm}$ ($\log \epsilon = 4,35$). NMR.-Spektrum vgl. Fig. 1. Zur Analyse 5 Std. bei 100° getrocknet.

$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$	Ber. C 50,70	H 4,26	O 45,03%	Äq.-G. 142,1
(142,1)	Gef. „ 50,79	„ 4,34	„ 44,87%	„ 136,5

Eine Lösung von 35 mg Säure in 15 ml Eisessig wurde in Gegenwart von 10 mg $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ bei 20° hydriert. Nach 30 Min. waren, nach Berücksichtigung des für den Katalysator verbrauchten Wasserstoffs, 2 Äq. Wasserstoff verbraucht. Nach Abfiltrieren des Katalysators durch eine Schicht Celite wurde das Filtrat im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit Chloroform aufgenommen, mit 2N Na_2CO_3 und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Aus dem Rohprodukt kristallisierten aus Methanol-Äther-Petroläther 30 mg reine Adipinsäure (**8**) in flachen Kristallen vom Smp. 152° ; Misch-Smp. mit authentischer Adipinsäure ebenso.

Eine Lösung von 15 mg der obigen Adipinsäure in 50 ml frisch über Zn destilliertem Anilin wurde 2 Std. auf 180° erhitzt. Nach Erkalten wurde mit 50 ml Methanol-Äther (1:4) versetzt, zweimal mit je 35 ml 2N HCl und 2N NaOH ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand gab aus Wasser-Methanol 8 mg reines Adipinsäuredianilid vom Smp. $238\text{--}239^\circ$, Misch-Smp. mit authentischem Material ebenso.

3.3. Mit 0,004N K_2CO_3 in Methanol-Wasser-Methylenchlorid: Eine Lösung von 200 mg Verrucaridin (**1**) in 100 ml Methanol und 5 ml Methylenchlorid wurde mit 2 ml wässriger K_2CO_3 -Lösung (250 mg K_2CO_3) versetzt, wobei ein Teil des Carbonats ausfiel. Nachdem die Lösung 2,5 Std. bei 22° intensiv gerührt worden war, wurden 20 ml Wasser zugegeben und das Methanol im Vakuum entfernt, bis das Volumen der wässrigen Phase noch 30 bis 40 ml betrug. Sechsmaliges Ausschütteln mit Methylenchlorid (je ca. 30 ml) ergab 140 mg, bei der Wiederholung noch 10 mg neutrales Rohprodukt. Nach Chromatographie an 60 g Kieselgel (Methodik nach DUNCAN) mit Methylenchlorid, das 5% Methanol enthielt, wurden folgende Fraktionen erhalten: 1. 25 mg Öl, das im Dünnschichtchromatogramm mehrere Flecke zeigte, die schneller als Verrucaridin (**1**) liefen; aus dem Öl liess sich dennoch ein wenig Ausgangsmaterial kristallisiert gewinnen. 2. 95 mg roher Dihydroxyester **11**, der im Dünnschichtchromatogramm praktisch einheitlich war. 3. 28 mg Verrucarol (**3**), das nur noch sehr wenig **11** enthielt. Da das rohe **11** nicht kristallisierte, wurde es nochmals auf der gleichen Säule chromatographiert, wobei 90 mg einheitlicher Dihydroxyester **11** als farbloser Lack resultierte. $[\alpha]_D^{24} = -41^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,572$ in Chloroform). UV.-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{\max} = 220 \text{ nm}$ ($\log \epsilon = 4,20$). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei: 3597 cm^{-1} (OH); 1709 cm^{-1} (C=O, ungesätt. Ester); 1645 cm^{-1} (C=C, konj.). NMR.-Spektrum vgl. Fig. 3 und Tab. Zur Analyse 15 Std. bei 40° getrocknet.

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_6$ (378)	Ber. C 66,64	H 7,99%	Gef. C 66,41	H 8,09%
--	--------------	---------	--------------	---------

Zur Isolierung der sauren Hydrolysenprodukte wurde die wässrige Phase mit konz. HCl bis zur kongosauren Reaktion versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Nach den ersten drei Extraktionen wurden nach üblicher Aufarbeitung 37 mg, nach drei weiteren Extraktionen 7 mg weisse Pulver gewonnen. Nach Behandeln mit ätherischer Diazomethanlösung resultierten 45 mg *cis*, *trans*-Muconsäure-dimethylester vom Smp. $70\text{--}73^\circ$. Das IR.-Spektrum (CH_2Cl_2 , Infracord) stimmte mit demjenigen von auth. Material überein.

4. Di-O-acetyl-Derivat **12**. Eine Lösung von 26 mg Dihydroxyester **11** in 1 ml Pyridin und 0,25 ml Acetanhydrid wurde 16 Std. bei 22° stehengelassen. Da nach dieser Zeit das Produkt noch nicht einheitlich war, wurde die Lösung noch 4 Std. bei 60° stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung wurde das Rohprodukt mit Hilfe der präparativen Chromatographie auf einer 1 mm dicken Kieselgel-HF₂₅₄-Schicht (Platte $20 \times 20 \text{ cm}$) gereinigt. Es resultierten 13 mg Di-O-acetyl-derivat **12** als farbloser Lack. Im Dünnschichtchromatogramm (Chloroform, das 3% Methanol enthielt) einheitlich. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei: $1724\text{--}1736 \text{ cm}^{-1}$ (C=O Acetyl); 1712 cm^{-1} (C=O, ungesätt. Ester); 1642 cm^{-1} (C=C, konj.). NMR.-Spektrum vgl. Tab.

5. Ketoester **13**. Eine Lösung von 25 mg Di-O-acetylderivat **12** in 10 ml Aceton wurde nach JONES [11] mit $\text{CrO}_3 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ oxydiert (20-Äq. Stammlösung). Nach 2 Min. war die Lösung grün. Ein drittes O-Äquivalent war nach 5 Min. verbraucht, während ein viertes auch nach weiteren 10 Min. nicht ganz verbraucht war. Nach insgesamt 20 Min. wurde mit 10 ml Wasser versetzt, das Aceton teilweise im Vakuum abgedampft und die wässrige Lösung viermal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen resultierten 27 mg Roh-

produkt, welches im Dünnschichtchromatogramm (neutrale Systeme) praktisch quantitativ am Startfleck zurückblieb. In einem sauren System (Benzol-Methanol-Ameisensäure-(100:5:2) war ein praktisch einheitliches Produkt sichtbar. Zur Abtrennung der sehr wenigen, neutralen Verunreinigungen wurde das Rohprodukt in Methylenchlorid gelöst und mit 7 ml 0,5N Na₂CO₃-Lösung ausgeschüttelt, wobei sofort eine intensive Gelbfärbung auftrat. Nach dreimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mit Methylenchlorid wurden nur Spuren von neutralen Anteilen erhalten. Hierauf wurde die wässrige Phase mit 2N HCl bis zur kongosäuren Reaktion versetzt und mit Methylenchlorid gründlich ausgeschüttelt. Es resultierten nur noch 13 mg gelb gefärbtes Rohprodukt, das nicht mehr einheitlich war. Deshalb wurde mit ätherischem Diazomethan der Methyl-ester der Säure hergestellt, welcher mittels präparativer Dünnschichtchromatographie auf einer 1 mm dicken Kieselgelschicht (HF₂₅₄; Platte 20×20 cm) gereinigt wurde. Es resultierten 7 mg Ketoester **13** als farbloser, im Dünnschichtchromatogramm einheitlicher Lack. IR.-Spektrum (CH₂Cl₂): u. a. Banden bei: 1739 cm⁻¹ (C=O, doppelte Intensität der zweiten C=O-Bande; Methyl-ester und Fünfringketon), 1715 cm⁻¹ (C=O, ungesätt. Ester); 1650 cm⁻¹ (C=C, konj.); keine HO-Bande. (Vgl. Fig. 4.) UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 414 nm (log ε = 4,2) und 310 nm (log ε = 2,0). NMR.-Spektrum vgl. Tab.

SUMMARY

The antibiotic verrucarin J (C₂₇H₃₂O₉) yields on base catalysed hydrolysis verrucarol (**3**), *cis,trans*-muconic acid (**5**) and 5-hydroxy-3-methyl-2-pentenoic acid lactone (**6**). **6** is a secondary reaction product of the genuine *cis*-5-hydroxy-3-methyl-2-pentenoic acid (**10**). In the antibiotic the three fragments **3**, **5** and **10** are united to form a macrocyclic triester. Their sequence is deduced on the basis of the partial hydrolysis of verrucarin J leading to the dihydroxyester **11**. Structure **1** is assigned to verrucarin J.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 8. Mitteilung: B. BÖHNER, E. FETZ, E. HÄRRI, H. P. SIGG, CH. STOLL & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 1079 (1965).
- [2] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 157 (1965).
- [3] W. ZÜRCHER, J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 839 (1965).
- [4] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 177 (1965).
- [5] J. GUTZWILLER, R. MAULI, H. P. SIGG & CH. TAMM, *Helv.* **47**, 2234 (1964).
- [6] J. W. CORNFORTH, R. H. CORNFORTH, G. POPJAK & YOUHOSKY GORE, *Biochem. J.* **69**, 146 (1958).
- [7] J. S. VITTIMBERGA & B. M. VITTIMBERGA, *J. org. Chemistry* **30**, 746 (1965).
- [8] W. KELLER-SCHIERLEIN, *Helv.* **46**, 1920 (1963).
- [9] Vgl. die Übersicht von S. STERNHELL, *Rev. pure appl. Chemistry* **14**, 15 (1964).
- [10] G. V. D. TIERS, *J. physic. Chemistry* **62**, 1151 (1958).
- [11] Vgl. K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, *J. Chem. Soc.* **1946**, 39.
- [12] A. T. MCPHAIL & G. A. SIM, *Chem. Comm.* **1965**, 350.
- [13] B. BÖHNER & CH. TAMM, spätere Mitteilung in Vorbereitung.
- [14] Vgl. T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc.* Nr. 7, 305 (1949).
- [15] G. R. DUNCAN, *J. Chromatography* **8**, 37 (1962).
- [16] Vgl. E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962; K. RANERATH, «Dünnschichtchromatographie», Verlag Chemie, Weinheim 1962.