

25. Die Konstitution von Epoxydon

von Annemarie Closse, R. Mauli und H. P. Sigg

(6. X. 65)

Die Gattung *Phoma* gehört zur Klasse der *Fungi Imperfecti*, Familie *Sphaerioidaceae*, und ist bisher erst in wenigen Fällen chemisch untersucht worden. F. KOEGL *et al.* [1] isolierten aus *Phoma terrestris* HANSEN Phomazarin, ein Naphtochinon-Derivat [2]. Cynodontin, 1,4,5,8-Tetrahydroxy-2-methyl-anthrachinon [3], wurde von WRIGHT & SCHOFIELD [4] aus dem gleichen Pilz isoliert.

Wir haben ebenfalls einige Stämme der Species *Phoma* untersucht: während Stamm S 1186 in guter Ausbeute den bekannten, gegen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hämolyticus* und *Escherichia coli* aktiven [5] Gentisinalkohol (3) [6] produziert, konnte aus dem Kulturfiltrat von Stamm S 1019 neben sehr wenig Gentisinalkohol ein neues Produkt, Epoxydon, isoliert werden, das eine antimittotische Aktivität aufweist¹⁾.

Epoxydon, $C_7H_8O_4$, ist eine neutrale Substanz vom Smp. 40–45° und $[\alpha]_D^{20} = +93^\circ$. Die Bruttoformel wurde durch ein Massenspektrum bestätigt.

Epoxydon ist gut löslich in Wasser, Aceton, Essigester und schwer löslich in Chloroform, Hexan. Es lässt sich bei 0,01 Torr und einer Badtemperatur von 100° destillieren.

Das UV.-Spektrum, mit Maxima bei 239 nm ($\log \epsilon = 3,71$) und 333,5 nm ($\log \epsilon = 1,65$), weist auf das Vorliegen eines α, β -ungesättigten Ketons hin. Bei Zusatz von

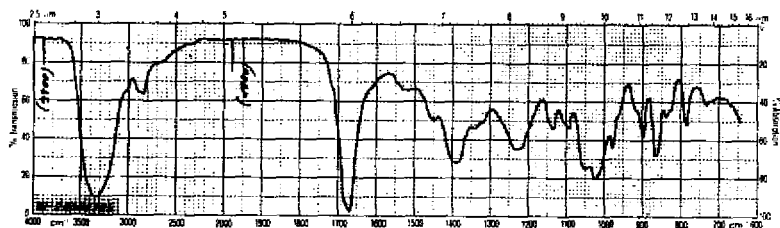


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von Epoxydon (1) in KBr

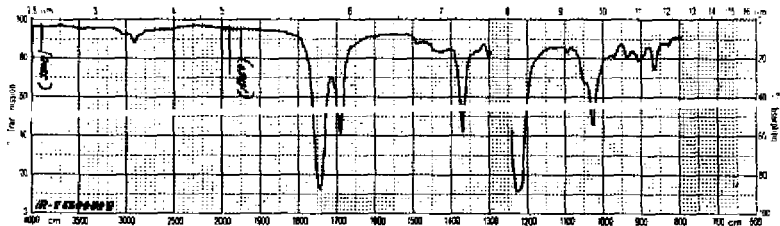


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von Di-O-acetyl-epoxydon (2) in CH_2Cl_2

¹⁾ Die mikrobiologischen Arbeiten verdanken wir den Herren Drs. CH. STOLL und W. LOEFFLER aus der Abteilung für Mikrobiologie der SANDOZ AG.

verdünnter Natronlauge entsteht ein für aromatische Systeme typisches Spektrum mit einem Maximum bei 271 nm ($\log \epsilon = 3,7$).

§ Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 1) bestätigt eine starke Bande bei 1670 cm^{-1} (Schulter bei 1685 cm^{-1}) das α, β -ungesättigte Keton. Eine intensive Absorption bei 3350 cm^{-1}

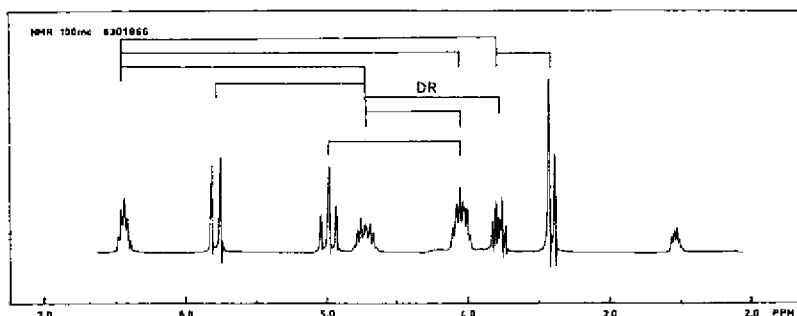


Fig. 3. NMR.-Spektrum von Epoxydon (I) in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

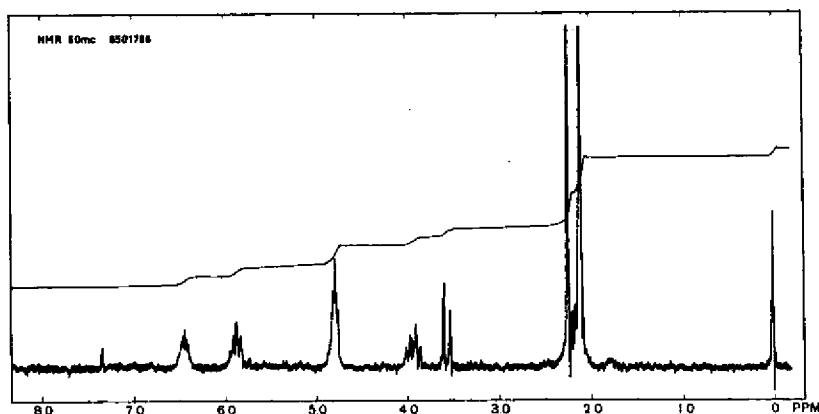


Fig. 4. NMR.-Spektrum von Di-O-acetyl-epoxydon (2) in CDCl_3

spricht zudem für das Vorliegen von Hydroxylgruppen. Das NMR.-Spektrum (vg. Fig. 3 und Tab.) ist bedeutend komplexer, als man es für eine Molekel mit 8 Wasserstoffen erwarten sollte. Zuordnungen waren erst nach Spin-Spin-Entkopplungs Experimenten²⁾ möglich. Das Dublett bei $\delta = 5,75$ und das Triplet bei $\delta = 4,9$ werden von zwei Hydroxylgruppen verursacht, von denen die eine sekundär und die andere primär sein muss. Dem Multiplett bei $\delta = 6,12$ ordnen wir das β Proton des α, β -ungesättigten Ketons zu. Das Proton der primären Hydroxylgruppe koppelt mit zwei Protonen, die bei $\delta = 4,03$ ein Multiplett verursachen; das Proton der sekundären Hydroxylgruppe koppelt mit einem Proton, das bei $\delta = 4,72$ ebenfalls ein Multiplett hervorruft. Zwei weitere, vicinale Protonen sind für das Dublett bei $\delta = 3,4$ und das Multiplett bei $\delta = 3,77$ verantwortlich. Das Spektrum wird vor allem durch

²⁾ Herrn Dr. A. MELERA, VARIAN A.G., Research Laboratory, Zürich, danken wir bestens für die Durchführung der Doppelresonanz-Experimente auf einem HR-100-Spektrometer.

zahlreiche «long-range»-Kopplungen, auf die wir weiter unten zu sprechen kommen, kompliziert.

Bei der Acetylierung von Epoxydon (**1**) mit Acetanhydrid-Schwefelsäure erhält man eine optisch aktive ($[\alpha]_D = +48^\circ$), flüssige Diacetylverbindung.

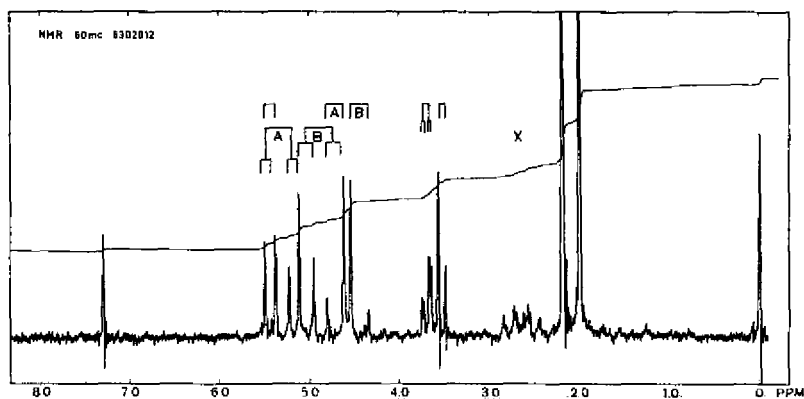


Fig. 5. NMR.-Spektrum vom acetylierten Diazomethan-Anlagerungsprodukt (**12**) in CDCl_3

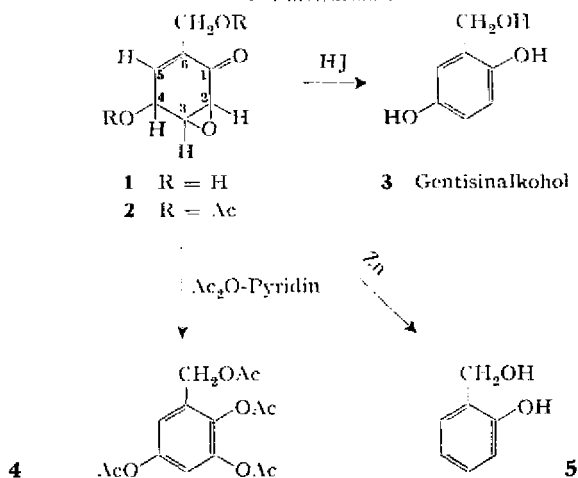
Das UV.-Spektrum, mit Maxima bei 227 nm ($\log \epsilon = 3,85$) und 329 nm ($\log \epsilon = 1,64$), Schulter bei 275 nm ($\log \epsilon = 2,3$), und das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 2) bestätigen das Vorliegen eines α, β -ungesättigten Ketons. Im NMR.-Spektrum (vgl. Fig. 4 und

Zuordnung der H-Atome in den NMR.-Spektren^{a)}

Substanz	Fig.	MC	Lösungs- mittel	C-2	C-3	C-4	C-5	C-7	Diverse
Epoxydon 1	3	100	$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	3,40 D (4)	3,77 M	4,72 M	6,42 M	4,03 M	$-\text{CH}_2-\text{OH}$: 4,98 T (5) $-\text{CH}-\text{OH}$: 5,75 D (6)
Di-O- acetyl- epoxydon 2	4	60	CDCl_3	3,56 D (4)	3,9 M	5,89 M	6,42 M	4,79 M	$-\text{OAc}$: 2,11 S, 2,26 S
11	-	60	$(\text{CD}_3)_2\text{SO} +$ D_2O	3,45 D (5)	3,62 DD (5+1,5)	4,38 D (7)	2,7	3,88 S	$\text{N}-\text{CH}_2-$: 4,9 ABX (10+10+7)
12	5	60	CDCl_3	3,55 D (5)	3,68 DD (5+1,5)	5,43 D (7)	2,65 M	4,50 D + 4,67 D AB (12)	$\text{N}-\text{CH}_2-$: 5,1 ABX (18+10+7) $-\text{OAc}$: 2,0 S, 2,18 S

^{a)} Chemische Verschiebungen in δ -Werten (ppm relativ zu Tetramethylsilan, $\delta = 0$, als internem Standard. In Klammern ist die Kopplungskonstante J in cps angegeben. Zur Charakterisierung der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: S = Singlett, D = Dublett, T = Triplet, M = Multiplett, AB = AB-Kopplungssystem, ABX = ABX-Kopplungssystem.

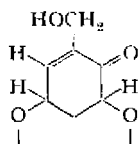
Formelschema 1



Tab.) sind Signale für zwei Acetylgruppen ($\delta = 2,11$ S und $2,26$ S), eine Acetoxymethylengruppe ($\delta = 4,79$ M), das β -Proton des α, β -ungesättigten Ketons ($\delta = 6,42$ M), das Proton der sekundären Acetoxygruppe ($\delta = 5,89$ M) und die vicinalen Protonen (Dublett bei $\delta = 3,56$, $J = 4$ und Multipllett bei $\delta = 3,9$) erkennbar.

Sehr aufschlussreich für die Strukturaufklärung ist das Produkt der Acetylierung in Gegenwart von Pyridin. Dabei entsteht ein optisch inaktives Tetra-acetat, dem wir auf Grund der Spektren Struktur 4 zuordnen konnten: Das UV.-Spektrum (Maximum bei 267 nm ($\log \epsilon = 2,89$), Schulter bei 273 nm ($\log \epsilon = 2,87$)) ist fast deckungsgleich mit demjenigen von 1,2,4-Triacetoxy-benzol (267 nm, $\log \epsilon = 2,85$) [7]. Die Banden des IR.-Spektrums bei 1760 und 1730 cm^{-1} werden von aromatischen bzw. aliphatischen Acetoxygruppen verursacht. Im NMR. ist neben den 4 Acetylgruppen und der Methylengruppe bei $\delta = 5,10$ (Singlett) ein AB-System bei $\delta = 7,15$ mit einer Kopplungskonstante ($J = 3$ cps), die für meta-Kopplungen typisch ist, sichtbar. Durch Synthese konnte die Struktur 4 sichergestellt werden. Es ist ein acetyliertes Isomerisierungsprodukt der Ausgangsverbindung und gibt Einblick in das Kohlenstoffgerüst und die Verteilung der Sauerstoffatome. Von den vier Sauerstoffen ist eines als primäre und eines als sekundäre Hydroxylgruppe sowie ein drittes als α, β -ungesättigtes Keton charakterisiert worden. Das vierte Sauerstoffatom dürfte als inerte Äther vorliegen. Aus der Summenformel und den funktionellen Gruppen folgt, dass Epoxydon eine bicyclische Verbindung sein muss.

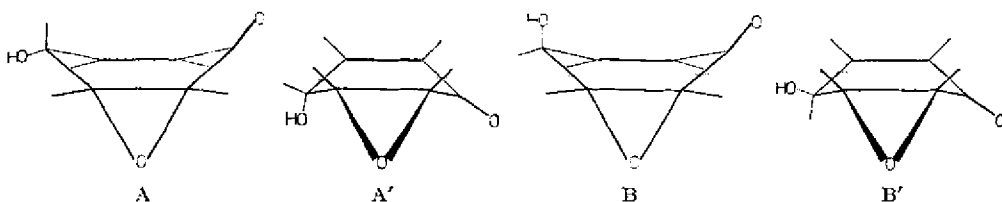
Auf Grund der bisherigen Resultate ergibt sich folgende Leitstruktur:



Da Epoxydon gegen Perjodat stabil ist, kann die zum Keton α -ständige Sauerstofffunktion keine Hydroxylgruppe sein, woraus sich für Epoxydon zwangsläufig

Formel 1 ableiten lässt. Eine Bestätigung dieser Struktur haben wir durch folgende Reduktionsreaktionen erhalten: durch Behandlung mit Zink in Eisessig entstand *o*-Hydroxy-benzylalkohol (5), d. h. sowohl die γ -Hydroxylgruppe als auch die Epoxyd-funktion werden reduziert, während nach Behandlung mit KJ in Eisessig Gentisin-alkohol (3) isoliert werden konnte. Die Reduktion von α,β -Epoxyketonen oder von γ,δ -Epoxy- α,β -ungesättigten Ketonen mit KJ-Eisessig führt unter Eliminierung des Äthersauerstoffs zur Einführung einer weiteren Doppelbindung, wie z. B. von CAMERINO *et al.* [8] am Testosteron-4,5-epoxid und von WOODWARD *et al.* [9] bei der Strukturklärung des Carbomycins gezeigt werden konnte.

Für Epoxydon (1) lassen sich vier diastereoisomere Formen (6–9) schreiben. Jede dieser Strukturen kann zudem in zwei Wannen-Konformationen vorliegen. Bevor wir uns der Interpretation der NMR.-Spektren bzw. des Zirkulardichroismus zuwenden können, gilt es, die bevorzugten Konformationen festzulegen. Für die Enantiomeren 6 und 7 ziehen wir aus folgenden Gründen Konformation A bzw. deren Spiegelbild vor: die Wasserstoffe an C-3 und C-4 sind synklinal und die Hydroxylgruppe

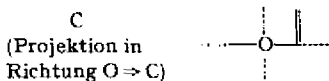


«äquatorial» angeordnet. Vor allem aber liegt die Ebene des Oxiranrings parallel zu derjenigen der π Orbitale der Carbonylgruppe, was die bestmögliche Resonanz zwischen den delokalisierten Elektronen des Dreirings und den π -Elektronen der Carbonylgruppe [10] ermöglicht. In der alternativen Konformation A' sind die Wasserstoffe an C-3 und C-4 syn-periplanar angeordnet, und eine Resonanz zwischen dem Oxiranring und der Carbonylgruppe ist nicht mehr möglich. Für die Enantiomeren 8 und 9 ziehen wir die Konformation B vor. In dieser sind wiederum die besseren Bedingungen für eine Resonanz zwischen dem Oxiranring und der Carbonylgruppe gegeben. Die Wasserstoffe an C-3 und C-4 stehen ebenfalls synklinal, dafür ist allerdings die sekundäre Hydroxylgruppe in axialer Anordnung. Konformation B' zeigt dagegen ungünstige Bedingungen für eine Resonanz. Zudem sind das Proton an C-3 und die sek. Hydroxylgruppe syn-periplanar angeordnet.

Das Zirkulardichrogramm³⁾ von Epoxydon (1) weist bei 341 nm einen positiven ($\Delta\epsilon = +4,70$) und bei 245 nm einen negativen ($\Delta\epsilon = -5,86$) COTTON-Effekt auf. Für die Diastereomeren 6 und 8 ist ein negativer $\pi \rightarrow \pi^*$ -COTTON-Effekt bei ca. 250 nm zu erwarten [11]. Für den $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei transoiden Cyclohexanonon hat WHALLEY [12] die Regel aufgestellt, dass Strukturen vom Typ C einen positiven COTTON-Effekt verursachen. Dem Typ C entsprechen wiederum unsere Diastereoisomeren 6 und 8. Eine weitere Bestätigung unserer Zuordnung ergibt die Oktant-Regel für Epoxy-ketone [10], welche besagt, dass Cyclohexanone mit dem Epoxid-Ring im untern, linken Oktanten einen positiven COTTON-Effekt verursachen. Das

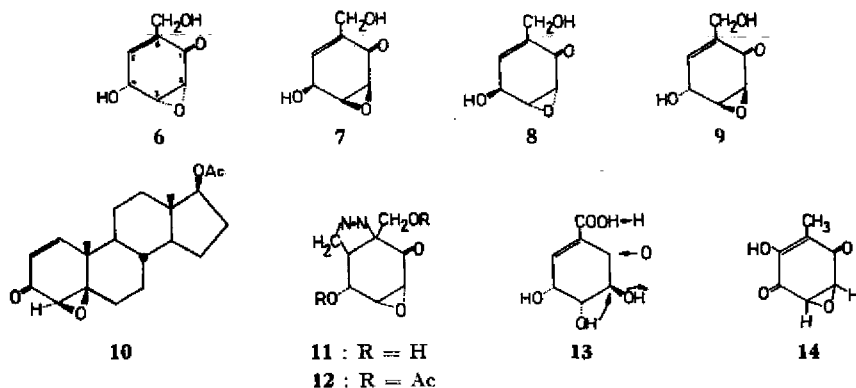
³⁾ Herrn Prof. G. SNATZKE, Universität Bonn, danken wir bestens für die Aufnahme und Diskussion der Zirkulardichrogramme.

beste Analogon von Epoxydon, das wir in der Literatur finden konnten, ist 4 β ,5 β -Oxido- Δ^1 -pregnen-17 β -ol-3-on-acetat (**10**) [13]. Dieses weist ebenfalls einen positiven COTTON-Effekt auf (bei 340 nm ist $\Delta\epsilon = +5,92$) [14].



Zur Abklärung der Konfiguration der sekundären Hydroxylgruppe benutzten wir vor allem die NMR.-Spektren. Wie bereits erwähnt, werden diejenigen von **1** und **2** durch «long-range»-Kopplungen (vgl. Fig. 3) kompliziert. Sowohl in **6** als auch in **8** weisen die Protonen an C-3 und C-5 die verlangte W-Konformation [15] auf. Die Grösse der Kopplungskonstante der Protonen an C-3 und C-4 liess sich aber nicht in genügender Genauigkeit ablesen, um den Torsionswinkel zu bestimmen. Mit Sicherheit kann aber gesagt werden, dass es sich eher um eine kleine Konstante handeln dürfte. Mehr Information konnten wir aus dem (kristallinen) Δ^1 -Pyrazolin **11** gewinnen, das durch Anlagerung von Diazomethan an Epoxydon **1** entstanden ist. Acetylierung

Formelschema 2



lieferte das Di-O-acetat **12**. Bei beiden Produkten kann man aus den NMR.-Spektren (vgl. Tab. und Fig. 5) ersehen, dass das Proton an C-3 nicht mit demjenigen an C-4 koppelt, dafür aber mit dem Proton an C-5. Das bedeutet, dass die beiden Protonen an C-3 und C-4 einen Torsions-Winkel von ungefähr 90° aufweisen, und das ist nur der Fall, wenn die sekundäre Hydroxylgruppe α -Konfiguration aufweist. Die Bedingungen für eine «long-range»-Kopplung der Protonen an C-3 und C-5 sind weitaus am besten erfüllt, wenn man eine Anlagerung von der α -Seite an Epoxydon annimmt. Dies ist etwas überraschend, doch ist das Modell praktisch spannungsfrei herstellbar. Die beiden Verbindungen **11** und **12** besitzen recht bemerkenswerte UV.-Spektren. So weist **11** Maxima bei 239,5 nm ($\log \epsilon = 3,01$) und 330 nm ($\log \epsilon = 2,50$) auf, welche mit grosserer Wahrscheinlichkeit durch eine $\pi \rightarrow \pi^*$ - bzw. eine $n \rightarrow \pi^*$ -Homokonjugation zwischen der Carbonylgruppe und der N,N-Doppelbindung verursacht werden. Eine solche Konjugation wäre aber nur bei α -ständigem Pyrazolinring möglich. Vielleicht ist das Anlagerungsprodukt mit β -ständigem Pyrazolinring ebenfalls entstanden, aber nicht isoliert worden. Fasst man alle diese Argumente zusammen, so darf man für Epoxydon die Struktur **6** annehmen.

Epoxydon (6) fällt durch die grosse Strukturähnlichkeit mit Shikimisäure (13) auf. Ob aber Epoxydon aus dem Shikimisäurestoffwechsel stammt oder ein Acetogenin [16] ist, dürfte nur auf Grund von experimentellen Befunden zu entscheiden sein. Auch in der Annahme, dass Gentsinalkohol, der in unseren Ansätzen als Nebenmetabolit isoliert worden ist, analog synthetisiert wird wie Epoxydon, ist ein sicherer Entscheid nicht möglich; denn GATENBECK [17] hat darauf hingewiesen, dass die Gentsinsäure aus *Polyporus tumulosus* vermutlich aus Shikimisäure gebildet wird, dass aber die Gentsinsäure aus *Penicillium urticae* mit Sicherheit via 6-Methylsalicylsäure aus Acetat-Einheiten aufgebaut wird.

*Pharmakologische Aktivität*⁴⁾: Epoxydon (1) hemmt die in vitro-Zellvermehrung des Mäuse-Mastzelltumors P-815 bei einer Konzentration von 1 γ /ml zu 50%. Therapieversuche an Mäusen mit Sarkom 37 oder Leukämie L 1210 zeigten nur sehr geringe Wirkungen. Die akute Toxizität an der weissen Maus wurde zu DL-50 = 70 mg/kg i.v. bestimmt.

Terreinsäure (14) [18], die relativ grosse Strukturähnlichkeit mit Epoxydon aufweist, zeigt in vitro ebenfalls eine cytopathogene Wirkung [19].

Experimenteller Teil

unter Mitarbeit von H. GSCHWIND und R. WERDER

Die Smp. wurden im Röhrchen bestimmt und sind nicht korrigiert. Substanzproben wurden 2 Std. bei Zimmertemperatur im HV getrocknet. Für die Analysen wurden die Substanzen bei der jeweils angegebenen Temperatur und Zeitdauer bei 0,01 Torr getrocknet. Die IR.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-IR-Zweistrahlenspektrophotometer Modell 21 (NaCl-Optik), bzw. mit einem Unicam SP. 200, die UV.-Spektren mit einem BECKMANN-Spektrophotometer, Modell DK2, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrometer A-60 bzw. einem HR-100-Spektrometer⁵⁾ und die Zirkulardichrogramme³⁾ mit dem Dichrographen von ROUSSEL-JOUAN, Paris, aufgenommen.

Zur Säulenchromatographie diente Kieselgel MERCK der Korngrösse 0,2–0,5 mm. Für die Dünnschichtchromatographie nach STAHL [20] wurden Kieselgel G als Adsorbens und Chloroform-Methanol-Gemische als Fließmittel verwendet. Die Flecke wurden mit dem Reagens nach ZAK [21] sichtbar gemacht.

Isolierung von Gentsinalkohol aus Stamm S 1186: 10 l einer Nährlösung (pro l 20 g Glucose, 2 g Malzextrakt (Schweiz. Ferment AG., Basel), 2 g Hefe-Extrakt, 2 g KH_2PO_4 , 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und entmineralisiertes Wasser) wurden mit einer Mycel-Sporen-Suspension von Stamm S 1186 angeimpft und in einem Fermenter Typ FS 314 (New Brunswick Co., USA) 94 Std. lang bei 27° unter Rühren (450 U./Min.) und Belüftung (10 l Luft/Min.) inkubiert. Das Mycel wurde abgenutscht und das Kulturfiltrat zweimal mit je 7 l Benzin und dreimal mit je 5 l Essigester extrahiert. Der Essigesterextrakt gab unter Trocknen und Eindampfen 7,10 g Rückstand. Davon wurden 500 mg an Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Methanol-(95:5) wurden 296 mg eluiert, die nach zweimaliger Kristallisation aus Aceton-Chloroform 110 mg rötliche Kristalle vom Smp. 102–104° ergaben. 650 mg Essigester-Rückstand wurden an 60 g Perlon-Pulver chromatographiert. Mit Wasser-Äthanol-(1:1) wurden 467 mg Öl eluiert, das aus Äther-Chloroform 240 mg farblose Kristalle vom Smp. 100–103° ergab. Die Kristalle sind nach Misch-Smp., Dünnschichtchromatogramm und IR.-Spektrum identisch mit Gentsinalkohol (3).

Isolierung von Epoxydon und Gentsinalkohol aus Phoma spec., Stamm S 1019: 10 Erlenmeyer à 200 ml mit je 100 ml Nährlösung (pro l 20 g Glucose, 2 g Malzextrakt (Schweiz. Ferment AG., Basel), 2 g Pepton, 2 g KH_2PO_4 , 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und entmineralisiertes Wasser) wurden mit einer Mycel-Sporen-Suspension von Stamm S 1019 angeimpft und 17 Tage lang bei 24° auf einer

⁴⁾ Wir danken Frau Dr. M. KALBERER und Herrn Dr. H. STÄHELIN aus der Medizinisch-biologischen Forschungsabteilung (Leitung: Dr. A. CERLETTI) bestens für die Überlassung dieser Resultate.

alternierenden Schüttelmaschine inkubiert. Die Kulturen wurden mit Hilfe von Hyflo-Super-Cel filtriert und das Filtrat in einem Apparat nach KUTSCHER-STEUDEL während 185 Std. mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschliessend noch dreimal mit je 8 l Essigester ausgerührt. Die organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Äther-Auszug ergab 1,76 g und der Essigesterauszug 2,40 g Rohextrakt. 3,91 Rohextrakt wurden zunächst mit Petroläther geknetet. Nach Dekantation wurde der Rückstand in wenig Aceton gelöst und mit Hexan versetzt. Dabei schieden sich 2,9 g nahezu reines Epoxydon als Öl ab.

Reinste Substanz wurde nach Chromatographie an Kieselgel erhalten, wobei das Produkt mit Chloroform-Methanol-(95:5) eluiert wurde. Kristallisation aus Aceton-Äther lieferte farblose Kristalle vom Smp. $40-45^\circ$ und $[\alpha]_D^{25} = +93^\circ$ ($c = 0,29$ in Methanol). Zirkulardichrogramm ($c = 0,72$ in Dioxan bei 20° , Schichtdicke 2 cm): 395 nm ($\Delta\epsilon = 0$), 341 nm ($\Delta\epsilon = +4,70$), 278 nm ($\Delta\epsilon = 0$) und bei $c = 0,012$: 245 nm ($\Delta\epsilon = -5,86$).

UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 239,5 nm ($\log\epsilon = 3,71$) und 333,5 nm ($\log\epsilon = 1,65$); nach Zusatz verd. NaOH: Maximum bei 271 nm ($\log\epsilon = 3,73$). IR.-Spektrum (vgl. Fig. 1) u. a. Banden bei 3350, 2900-2850, 1685 Schulter, 1670, 1450, 1390, 1230, 1135, 1095, 1050, 1020, 980, 900, 860, 840, 785, 735 cm^{-1} . NMR.-Spektrum: vgl. Fig. 3 bzw. Tab.

Zur Analyse 14 Std. bei 20° getrocknet.

$C_7H_8O_4$ (156,13) Ber. C 53,8 H 5,2 O 41,0% Gef. C 53,9 H 5,4 O 40,6%

Bei einer Aufarbeitung, in welcher das Kulturfiltrat erschöpfend mit Essigester extrahiert und der Rohextrakt an Kieselgel chromatographiert wurde, liessen sich aus den späteren Fraktionen in geringerer Menge Kristalle vom Smp. $98-101^\circ$ isolieren, die nach Misch-Smp., Dünnschichtchromatogramm und IR.-Spektrum als Gentsinalkohol (3) identifiziert werden konnten.

Acetylierung von Epoxydon. a) Mit Acetanhydrid- H_2SO_4 (1 \rightarrow 2): 184 mg 1 (4 Std. bei 20° und 0,01 Torr getrocknet) wurden mit 2 ml Acetanhydrid und 1 Tropfen konz. H_2SO_4 50 Min. auf dem Dampfbad erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde in 30 ml Wasser gegossen und kurz erwärmt. Extraktion mit dreimal 50 ml Essigester gab nach Waschen, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen 382 mg helles Öl. Durch präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Chloroform-Methanol-(99:1)) konnte ein einheitliches, farbloses Öl 2 gewonnen werden, das sich nicht kristallisieren liess. $[\alpha]_D^{25} = +48^\circ$ ($c = 0,5$ in $CHCl_3$).

IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 2900, 1745, 1690, 1370, 1300, 1230, 1215, 1025, 938, 908, 865 cm^{-1} . UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 227,5 nm ($\log\epsilon = 3,85$); 275 nm ($\log\epsilon = 2,3$ Schulter) und 329 nm ($\log\epsilon = 1,64$). NMR.-Spektrum: vgl. Fig. 4 bzw. Tab.

Zur Analyse wurde das Produkt bei 45° Badtemperatur und 0,01 Torr destilliert.

$C_{11}H_{12}O_6$ (240,21) Ber. C 55,0 H 5,0% Gef. C 54,3 H 5,4%

Das bei der Acetylierung entstehende Nebenprodukt (ca. 15%) liess sich nicht rein erhalten.

b) Mit Acetanhydrid-Pyridin (1 \rightarrow 4): Eine Lösung von 49 mg 1 in 1,5 ml Pyridin und 1,0 ml Acetanhydrid wurde 18 Std. bei 25° stehengelassen. Dann wurde das Reaktionsgemisch im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand gab aus Äther-Hexan 10 mg farblose Kristalle 4 vom Doppel-Smp. $87-89^\circ/92-94^\circ$. Die Mischprobe mit synthetischem Tetra-O-acetyl-2,3,5-trihydroxy-benzylalkohol (s. unten) gab keine Depression, und die IR.- bzw. NMR.-Spektren waren deckungsgleich.

IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 1760, 1730, 1600, 1482, 1370, 1315, 1195, 1175, 1120, 970, 915 cm^{-1} . UV.-Spektrum (Äthanol): Maximum bei 267 nm ($\log\epsilon = 2,89$), Schulter bei 273 nm ($\log\epsilon = 2,87$). NMR.-Spektrum ($(DCl_4, 60 MC)$): $\delta = 7,14$ D (3) und 7,16 D (3) von H-4 und H-6; $\delta = 5,10$ S von der Methylengruppe und $\delta = 2,09$ S, 2,28 S, 2,32 S von 4' O-Acetylgruppen.

Zur Analyse 2 Std. bei 35° getrocknet.

$C_{15}H_{16}O_8$ (324,28) Ber. C 55,6 H 5,0 O 39,5% Gef. C 56,0 H 5,2 O 39,6%

Reduktionen von Epoxydon. a) Zink-Eisessig (1 \rightarrow 5): 120 mg Epoxydon wurden in 10 ml Eisessig gelöst und mit 300 mg Zinkstaub portionenweise versetzt. Nach dreitägigem Rühren wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde an 3 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol-(19:1) eluierten Fraktionen wurden, da sie hauptsächlich Ausgangsmaterial enthielten, nochmals mit 200 mg Zinkstaub in 1 ml Eisessig reduziert. Nach erneuter Chromatographie an Kieselgel konnten die mit Chloroform-Metha-

nol (49:1) eluierten Fraktionen aus Benzol kristallisiert werden. Umkristallisation aus Benzol ergab 27 mg farblose Kristalle vom Smp. 83–85°, die als *o*-Hydroxybenzylalkohol (**5**) identifiziert werden konnten (Misch-Smp., Dünnschichtchromatogramm und IR.-Spektrum).

b) *KJ-Eisessig* (**1** → **3**): 90 mg Epoxydon wurden in 5 ml Eisessig gelöst, mit 500 mg fein pulverisiertem KJ versetzt und 40 Min. auf 83° erwärmt. Danach wurde abgekühlt und in kaltes Wasser gegossen, das ausgeschiedene Jod mit einer Spatelspitze $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ reduziert, die Lösung mit Hydrogencarbonat auf pH 4,5 abgestumpft und über Nacht im Apparat nach KUTSCHNER-STEUDEL mit Äther extrahiert. Der Rückstand nach Trocknen und Eindampfen wog 84 mg. Er wurde mehrmals mit siedendem Chloroform extrahiert. Beim Erkalten schieden sich 25 mg farblose Nadeln vom Smp. 99–100° aus, die nach Misch-Smp., Dünnschichtchromatogramm, IR.- und NMR.-Spektrum als Gentisinalkohol (**3**) identifiziert werden konnten.

Oxydation von 1 mit Perjodat: Die Lösung von 5,00 mg Epoxydon (**1**) in 2 ml Wasser wurde, mit 1,5 ml 0,025 *M* Natriumperjodatlösung versetzt und auf 25 ml mit Wasser aufgefüllt. Die Reaktionsmischung hatte einen pH von 5,9. Nach 1 und 3 Std. wurden je 4 ml entnommen, titriert und mit einer Blindprobe verglichen. Es wurde kein Perjodat verbraucht. Nun wurde mit 0,5 *N* H_2SO_4 auf pH 3,5 angesäuert und nach 1,3 und 6 Std. titriert. Nach 1 Std. kein Verbrauch an Perjodat, nach 3 Std. 0,029 Mol Perjodat/Mol Substanz, nach 6 Std. 0,068 Mol Perjodat/Mol Substanz.

Anlagerung von Diazomethan an 1 (**1** → **11**): Die Lösung von 335 mg Epoxydon (**1**) in abs. Dioxan wurde bei –17° mit ätherischer Diazomethanlösung im Überschuss versetzt. Nach 1 Std. bei –17° wurde im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand (423 mg) wurde mit Aceton versetzt und filtriert. Das Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand an 17 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Methanol-(97:3) liessen sich 230 mg Öl eluieren, das aus Aceton-Äther 105 mg farblose Kristalle vom Smp. 140–143° gab. $[\alpha]_D^{20} = +686^\circ$ ($c = 0,3$ in Methanol).

UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 239,5 nm ($\log \epsilon = 3,01$) und 330 nm ($\log \epsilon = 2,50$). IR.-Spektrum (Nujol): u. a. Banden bei 3400 Sch., 3300, 1720, 1570, 1230, 1080, 1050, 1000, 980, 930, 870, 730 cm^{-1} . NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 1.

Zur Analyse 2 Std. bei 60° getrocknet.

$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ (198,18) Ber. C 48,5 H 5,1 N 14,1 O 32,3% Gef. C 48,3 H 5,0 N 13,8 O 31,5%

113 mg krist. **11** wurden in 3,5 ml Pyridin und 2 ml Acetanhydrid gelöst. Nach 2 Std. bei 20° wurde im Vakuum zur Trockne eingengt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Methanol-(99:1) liessen sich 152 mg dünnschichtchromatographisch einheitliches **12** eluieren, das aber nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. $[\alpha]_D^{20} = +399^\circ$ ($c = 0,3$ in Methanol).

UV.-Spektrum (CH_2Cl_2): Maxima bei 241,5 nm ($\log \epsilon = 3,07$) und 327 nm ($\log \epsilon = 2,54$). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 1750, 1720, 1570, 1380, 1050, 950, 870 cm^{-1} . NMR.-Spektrum: vgl. Fig. 5 bzw. Tab. 1.

*Synthese von Tetra-*O*-acetyl-2,3,5-trihydroxybenzylalkohol* (**4**): 2,3,5-Trihydroxybenzoesäure wurde nach BAKER *et al.* synthetisiert [22].

265 mg Triacetylbenzoesäure [23] wurde in 8 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und unter Eiskühlung zu einer Mischung von 420 mg Lithiumaluminiumhydrid in 8 ml Tetrahydrofuran getropft. Die Mischung wurde über Nacht in einem Bad von 55–60° erhitzt. Überschüssiges LiAlH_4 zerstörte man mit Wasser und Säure. Durch Extraktion mit Äther im Apparat nach KUTSCHNER-STEUDEL wurden nach 24 Std. 137 mg bräunlichen Öls erhalten. Dieses wurde im HV. getrocknet, mit 6 ml Pyridin und 2 ml Acetanhydrid versetzt und über Nacht bei 20° stehengelassen. Nach Abziehen der Reagenzien bei 0,02 Torr blieben 137 mg hellbraunen Öls zurück. Diese war ein komplexes Gemisch, aus dem sich das gewünschte Tetraacetat mittels präparativer Dünnschichtchromatographie in Chloroform-Methanol 99:1 nach Mehrfachentwicklung isolieren liess. Es kristallisierte aus wenig Äther in farblosen Nadelbüscheln vom Smp. 90–92°.

Das synthetische Produkt ist nach Misch-Smp., Dünnschichtchromatographie, IR.- und NMR.-Spektrum identisch mit dem Tetra-acetat **4**, das durch basenkatalysierte Acetylierung von **1** erhalten wurde.

SUMMARY

The structure of epoxydon (1), isolated from the culture filtrate of *Phoma spec.* S 1019, has been established. On the grounds of physical measurements, we propose the constitution and the absolute configuration 6 for epoxydon. Gentisin alcohol (3) is a minor metabolite of *Phoma spec.* S 1019, but the main metabolite in *Phoma spec.* S 1186.

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien
SANDOZ AG., Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. KOEGL & J. SPARENBERG, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 59, 1180 (1940).
 [2] A. J. BIRCH, D. N. BUTLER & R. W. RICKARDS, Tetrahedron Letters 1964, 1853.
 [3] H. RAISTRICK, R. ROBINSON & A. R. TODD, Biochem. J. 27, 1170 (1933); W. K. ANSLOW & H. RAISTRICK, *ibid.* 34, 1546 (1940).
 [4] D. E. WRIGHT & K. SCHOFIELD, Nature 188, 233 (1960).
 [5] A. BRACK, Helv. 30, 1 (1947); vgl. [6].
 [6] J. H. BIRKINSHAW, A. BRACKEN & H. RAISTRICK, Biochem. J. 37, 726 (1943).
 [7] R. A. MORTON & Z. SAWIRES, J. chem. Soc. 1940, 1052.
 [8] B. CAMERINO, B. PATELLI & A. VERCELLONE, J. Amer. chem. Soc. 78, 3540 (1956); vgl. auch L. A. SHCHUKINA & M. M. SHENYAKIN, Ž. obšč. Chim. 19, 193-194 (1949).
 [9] R. B. WOODWARD, Festschrift ARTHUR STOLL; Birkhäuser, Basel, 1957.
 [10] C. DJERASSI, W. KLYNE, T. NORIN, G. OHLOFF & E. KLEIN, Tetrahedron 21, 163 (1965).
 [11] C. DJERASSI, R. RECORDS, E. BUNNENBERG, K. MISLOW & A. MOSCOWITZ, J. Amer. chem. Soc. 84, 870 (1962).
 [12] W. B. WHALLEY, Chemistry & Ind. 1962, 1024; vgl. auch G. SNATZKE, Tetrahedron 21, 413 (1965) und [14].
 [13] C. LEHMANN, K. SCHAFFNER & O. JEGER, Helv. 45, 1031 (1962).
 [14] G. SNATZKE, Tetrahedron 21, 421 (1965).
 [15] A. RASSAT, C. W. JEFFORD, J. M. LEHN & B. WAEGELL, Tetrahedron Letters 1964, 233.
 [16] Vgl. J. H. RICHARDS & J. B. HENDRICKSON, «The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins», W.A. Benjamin Inc., New York-Amsterdam 1964.
 [17] S. GATENBECK & I. LÖNNROTH, Acta chem. scand. 16, 2298 (1962).
 [18] Vgl. J. C. SHEEHAN, W. B. LAWSON & R. J. GAUL, J. Amer. chem. Soc. 80, 5536 (1958).
 [19] S. TAKAHASHI, K. NITTA, Y. OKAMI & H. UMEZAWA, J. Antibiot. Jap. A14, 107 (1961).
 [20] Vgl. E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962.
 [21] A. ZLATKIS, B. ZAK & A. J. BOYLE, J. Lab. clin. Med. 41, 486 (1953).
 [22] W. BAKER & N. C. BROWN, J. chem. Soc. 1948, 2303.
 [23] R. U. SCHOCK & D. L. TABERN, J. org. Chemistry 16, 1772 (1951-1952).