

chromatographiert. 6-Polyhydroxypropyl-pterine werden vollständig zum Pterin-6-aldehyd oxydiert. 2. *auf Papier*: Um wertvolle Substanz zu sparen, sowie bei Vorliegen sehr geringer Mengen, lässt sich die Perjodat-Oxydation auch auf Filtrierpapier durchführen. Auf für die Chromatographie vorbereitete Papierstreifen werden 3–5 μg eines Pterins aufgetragen. Nach Trocknung des Flecks wird er sorgfältig mit einer 5-proz. Natriumperjodat-Lösung betupft. Dabei ist darauf zu achten, dass keine allzu starke Vergrößerung des Pterinflecks eintritt. Nach einmaliger Wiederholung wurde bei den hier untersuchten Polyhydroxy-pterinen ein vollständiger Abbau zu Pterin-6-aldehyd erreicht, der mit Hilfe von Vergleichssubstanzen in den vorstehend genannten Laufmitteln nachgewiesen werden kann.

Diese Ultramikromethode macht es möglich, dass für Konstitutionsaufklärungen nun weitaus weniger der ohnehin meist nur in sehr geringen Mengen isolierbaren Pterine benötigt werden als bisher. Wir sind bestrebt, diese Methode weiter auszubauen.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Männchen der Art *Formica polyctena* FOERST. wurden mit Hilfe chromatographischer Verfahren an Cellulosepulver D- oder L-6-(*threo*-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin und Pterin-6-carbonsäure isoliert. Die Identifizierung erfolgte mittels ihrer UV.-Spektren, Rf-Werte, elektrophoretischen Wanderung sowie einiger Abbaureaktionen. Pterin-6-carbonsäure wird als biogenes Produkt angesehen.

Institut für Angewandte Zoologie
der Universität Würzburg
Organisch-Chemisches Institut
der Universität Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, *Helv.* 45, 1571 (1962); 47, 2049 (1964).
- [2] M. VISCONTINI, M. POUTEAU-THOUVENOT, R. BÜHLER-MOOR & M. SCHROEDER, *Helv.* 47, 1948 (1964).
- [3] H. REMBOLD & L. BUSCHMANN, *Liebigs Ann. Chem.* 662, 72 (1963).
- [4] T. GOTO, *Japan. J. Zoolog.* 14, 83, 91 (1963).
- [5] W. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 75, 993 (1963).
- [6] M. VISCONTINI & E. MÖHLMANN, *Helv.* 42, 836 (1959).
- [7] M. VISCONTINI, E. LOOSER & P. KARRER, *Helv.* 41, 440 (1958).

40. Die Konstitution von Verrucarin E

Verrucarine und Roridine, 10. Mitteilung [1]

von E. Fetz und Ch. Tamm

(8 X 65)

Die bisher aus *Myrothecium*-Arten isolierten Stoffwechselprodukte lassen sich auf Grund ihrer molekularen Zusammensetzung bzw. Struktur in drei chemische Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umfasst makrocyclische Di- und Tri-ester, die den Sesquiterpenalkohol Verrucarol [2] als gemeinsamen Baustein enthalten. Zu ihr gehören Verrucarin A [3] [4], Verrucarin B [5], Verrucarin H [6] [7], Verrucarin J [1] sowie Roridin A [7] [8], Roridin D [6] [7] und Roridin E [6] [7]¹⁾. Sie sind die

¹⁾ Zu dieser Gruppe ist auch Roridin C [2] (= Trichodermol [9]), das die Struktur des 15-Desoxyverrucarols besitzt, zu zählen.

Hauptmetabolite, die sich durch antifungische und hohe cytostatische Aktivität, aber auch durch grosse Toxizität²⁾ auszeichnen. In der zweiten Gruppe sind die Stickstoff-haltigen Nebenmetabolite enthalten. Wir haben bisher nur zwei derartige Antibiotica gefunden, nämlich Verrucarine E [8] und Verrucarine G [8]. Zu einer dritten Gruppe vereinigen wir vorderhand weitere, in sehr geringen Mengen auftretende, Stickstoff-freie Stoffe, die in keine der beiden obigen Gruppen passen. Es handelt sich teils um Sterine, z.B. um Ergosterin (= Roridin B [8]), teils um Verbindungen, die anderen Stoffklassen angehören [7].

Im folgenden berichten wir über die Strukturaufklärung von Verrucarine E, einem Metaboliten, der *in vitro* ebenfalls cytostatisch wirksam ist [8]. Das Antibioticum kristallisiert in farblosen Nadeln vom Smp. 90,5–91° und ist optisch inaktiv. Es zersetzt sich am Tageslicht und in der Wärme sehr rasch unter Bildung von stark rosa bis braun gefärbten Produkten. Gegen Säuren ist Verrucarine E sehr empfindlich. Diese Eigenschaften und die geringen, bis anhin einzig vom Stamm S 833 von *Myrothecium verrucaria* (ALBERTINI *et* SCHWEINITZ) DITMAR *ex* FRIES nur unter Einhaltung bestimmter Kulturbedingungen (vgl. Exper. Teil) produzierten Mengen erschwerten die Isolierung und Reinigung erheblich. Nach den Analysenwerten, der vaporometrischen Molekulargewichtsbestimmung³⁾ und dem Massenspektrum⁴⁾ besitzt Verrucarine E die Bruttoformel $C_7H_9O_2N$ (139,2). Auf Grund der im folgenden beschriebenen physikalischen und chemischen Eigenschaften erteilen wir ihm die Struktur des 2-Hydroxymethyl-4-acetyl-pyrrols (1).

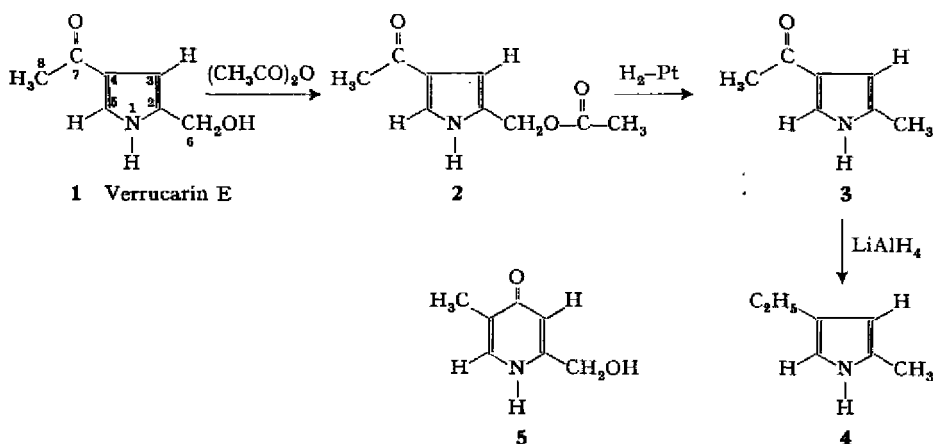
Verrucarine E (1) gab bei der ZEREWITINOFF-Bestimmung zwei aktive H-Atome. Es waren weder Methoxyl- noch Methylimid-, noch O-Acetyl-Gruppen nachweisbar. Die Farbreaktion mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd nach EHRLICH fiel positiv aus (intensive Rotfärbung), was bereits auf das Vorliegen eines Pyrrolderivates deutete. Gegen Basen ist Verrucarine E beständig. Sein UV.-Spektrum (vgl. Fig. 1) ist durch intensive Absorptionsmaxima bei 198 nm ($\log \epsilon = 4,02$) und 249 nm ($\log \epsilon = 4,0$) und eine Inflexion bei 270 nm ($\log \epsilon = 3,75$) charakterisiert. Das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 2) zeigt eine scharfe Bande von hoher Intensität bei 3450 cm^{-1} , die von einer monomeren NH-Streckschwingung eines sekundären Amins herrührt. Die breite Bande bei $3220\text{--}3230\text{ cm}^{-1}$ kann sowohl assoziierten NH- als auch assoziierten HO-Gruppierungen zugeordnet werden. Die Absorption bei 1640 cm^{-1} entspricht der C=O-Streckschwingung eines sekundären Amides (Amid-I-Bande). Die bei 1520 cm^{-1} sichtbare Schwingung dürfte einer Amid-II-Bande entsprechen [11]. Nach Deuterierung von Verrucarine E mit D_2O findet wie erwartet eine Verschiebung der Banden bei 3450 und $3220\text{--}3230\text{ cm}^{-1}$ nach längeren Wellen statt. Die neuen Banden erscheinen bei 2550 cm^{-1} (monomere ND-Streckschwingung) und bei 2400 cm^{-1} (assoziierte ND-Schwingungen), was ebenfalls für das Vorhandensein einer sekundären NH-Gruppierung spricht [12]. Das NMR.-Spektrum von Verrucarine E in $CDCl_3$ -Lösung (vgl. Fig. 3 und Tab.) lässt 9 Protonen erkennen. In D_2O -Lösung sind jedoch nur noch 7 Protonen sichtbar (vgl. Fig. 4 und Tab.), d.h. zwei Wasserstoffatome sind leicht durch Deuterium austauschbar. Das bei $\delta = 2,45$ sichtbare Singlett (3 H) kann einer CH_3 -Gruppe, die

²⁾ Zur biologischen Wirksamkeit von Verrucarine A vgl. RÜSCH & STÄHELIN [10].

³⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. W. SIMON, ETH Zürich, bestens für diese Messung.

⁴⁾ Herrn Prof. Dr. K. BIEMANN, MIT, Cambridge, Mass., USA, sind wir für diese Bestimmung zu Dank verpflichtet.

an einer Doppelbindung haftet, zugeordnet werden. Bei $\delta = 4,6$ ist ein Singlett (2 H) mit breiter Basis sichtbar, das von einer Methylengruppe stammt. Sie haftet an einer C=C-Doppelbindung, in deren nächsten Nachbarschaft sich aber kein weiteres Proton mehr befinden kann. Das Multipllett bei $\delta = 5,23$ ordnen wir einer Hydroxylgruppe zu, denn mit D_2O tritt Austausch des Wasserstoffatoms ein. Die beiden Signale bei $\delta = 6,66$ und $\delta = 7,4$ rühren von je einem Vinylproton her. Schliesslich ist bei sehr tiefem Feld, bei $\delta = 10,1$ ein breites Multipllett (1 H) sichtbar, das in D_2O verschwindet. Es handelt sich um das Signal der NH-Gruppe (Linienverbreiterung durch Quadrupol-induzierte Relaxation des ^{14}N). Wird das NMR.-Spektrum von Verrucarín E in D_2O aufgenommen, so wird eine wesentlich bessere Auflösung einiger Signale erzielt. Während die Methylgruppe unverändert bleibt, ist das Signal der Methylengruppe in ein Dublett mit der Spin-Spin-Kopplungskonstante $J = 0,8$ cps gespalten. Das Vinylproton-Signal bei $\delta = 6,87$ erscheint als Multipllett mit den Kopplungskonstanten $J = 1,8$ cps und $J = 0,8$ cps und die Bande bei $\delta = 7,66$ als Dublett ($J = 1,8$ cps). Diese zeigt, dass die beiden Vinylprotonen sich gegenseitig beeinflussen und ein *AX*-System mit der Kopplungskonstante $J = 1,8$ cps darstellen. Die Aufspaltung des Signals der Methylengruppe in ein Dublett mit der Kopplungskonstante $J = 0,8$ cps ist auch im Signal des Vinylprotons bei $\delta = 6,62$ zu finden. Seine Feinstruktur ist einerseits durch Kopplung mit dem bei tiefem Feld erscheinenden Vinylproton und andererseits durch Kopplung mit der Methylengruppe bedingt. Die Verbreiterung des Signals der Methylengruppe im $CDCl_3$ -Spektrum ist auf die unmittelbare Nachbarschaft einer HO-Gruppe zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, tauscht der Hydroxylwasserstoff in D_2O aus, womit sein Einfluss auf die beiden Methylenprotonen verschwindet. Die Aufspaltung des bei $\delta = 7,4$ auftretenden Vinylprotons in ein Multipllett in $CDCl_3$ -Lösung einerseits und in ein reines Dublett ($J = 1,8$ cps) in D_2O -Lösung andererseits deutet darauf hin, dass es sich in nächster Umgebung der NH-Gruppe befinden muss. Das Vinylproton bei $\delta = 7,4$ koppelt sowohl mit dem Vinylproton bei $\delta = 6,62$ wie auch mit dem Proton am Stickstoff. Der benachbarte Stickstoff ist für die ausserordentlich grosse Verschiebung des Vinylprotons nach tiefem Feld verantwortlich. Der entschirmende Effekt des Stickstoffs ist unabhängig vom Lösungsmittel. Der Austausch des an den Stickstoff gebundenen



H-Atome durch Deuterium vereinfacht jedoch die Multipllettstruktur des Vinylprotons, indem die Kopplung aufgehoben wird. Weiteren Aufschluss über die Bindungsverhältnisse lieferte das in CDCl_3 -Lösung aufgenommene NMR.-Spektrum des deuterierten Verrucarins E (vgl. Tab.). Das Signal des Vinylprotons bei $\delta = 7,45$ erscheint nun ebenfalls als Dublett ($J = 1,8$ cps), denn es kann infolge des Deuteriumaustausches nicht mehr mit der ND-Gruppe koppeln. Damit können wir das bei $\delta = 10,1$ auftretende Signal des nicht-deuterierten Verrucarins E eindeutig der NH-Gruppe zuordnen.

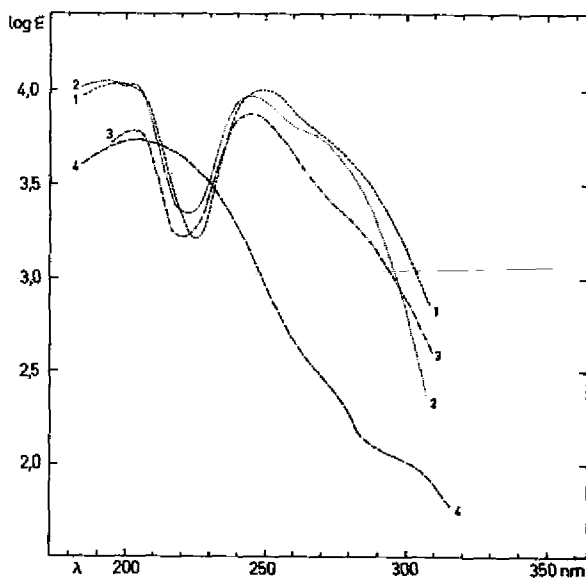


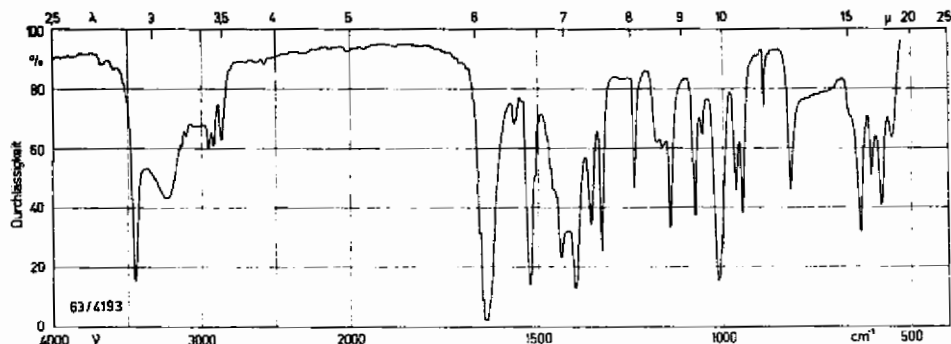
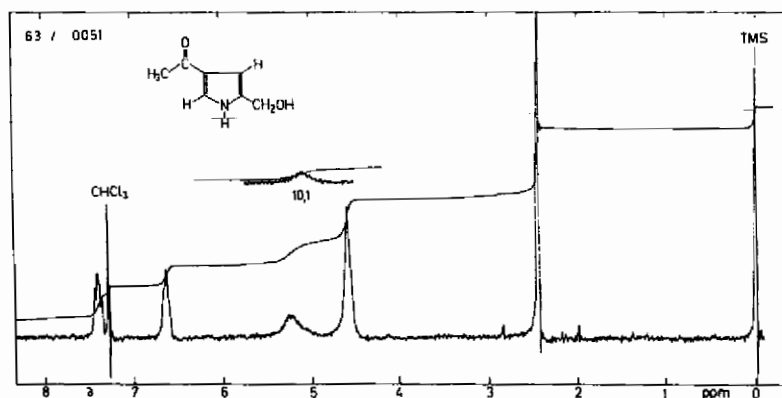
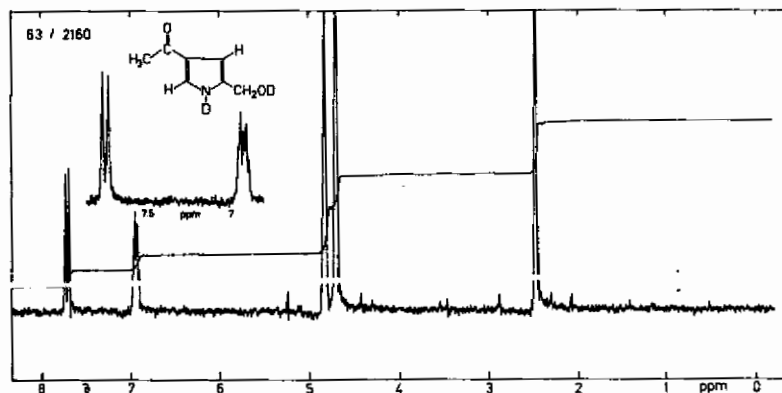
Fig. 1. UV.-Absorptionsspektren in Äthanol⁵⁾

- Kurve 1: Verrucarin E (1): $\lambda_{\text{max}} = 198$ (4,02); 249 (4,0); Inflexion bei 270 (3,75) nm (log ϵ)
 Kurve 2: Mono-O-acetyl-verrucarin E (2): $\lambda_{\text{max}} = 194$ (4,04); 245 (3,97); Inflexion bei 270 (3,72) nm (log ϵ)
 Kurve 3: 2-Methyl-4-acetyl-pyrrol (3): $\lambda_{\text{max}} = 204$ (3,79); 246 (3,89); Inflexion bei 270 (3,72) nm (log ϵ)
 Kurve 4: 2-Methyl-4-äthyl-pyrrol (4): $\lambda_{\text{max}} = 202$ nm (log $\epsilon = 3,75$); Inflexionen bei 279 (2,27) und 302 (2,00) nm (log ϵ)

Nach Stehen mit Acetanhydrid bei 22° während 6 Tagen lieferte Verrucarin E (1) das krist. Mono-O-acetylderivat 2 ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$)⁶⁾. Das UV.-Spektrum (vgl. Fig. 1) hat sich praktisch nicht verändert. Das IR.-Spektrum zeigt im kurzwelligen Gebiet nur noch eine scharfe monomere NH-Bande bei 3450 cm^{-1} sowie eine neue Carbonylbande bei 1735 cm^{-1} der O-Acetylgruppe und bei 1660 cm^{-1} die ursprüngliche C=O-Streckschwingung. Das in CDCl_3 aufgenommene NMR.-Spektrum (vgl. Tab.) lässt die folgenden Signale erkennen: Ein neues Singlett bei $\delta = 2,1$ der Acetylgruppe, das bereits in Verrucarin E vorhandene Singlett der Methylgruppe bei $\delta = 2,45$, dasjenige

⁵⁾ Aufgenommen mit BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK 2 (CH. SENN & W. SCHWAB).

⁶⁾ Bei der Behandlung mit Acetanhydrid bei höheren Temperaturen oder mit Acetanhydrid-Pyridin bei 22° trat sofort Zersetzung ein.

Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von Verrucarine E in Methylenchlorid⁶⁾Fig. 3. NMR.-Spektrum von Verrucarine E (1) in Deuteriochloroform⁷⁾Fig. 4. NMR.-Spektrum von Verrucarine E (1) in Deuteriumoxid⁷⁾

⁶⁾ Aufgenommen mit PERKIN-ELMER-Gitterspektrophotometer, Modell 125 (CH. SENN & W. SCHWAB).

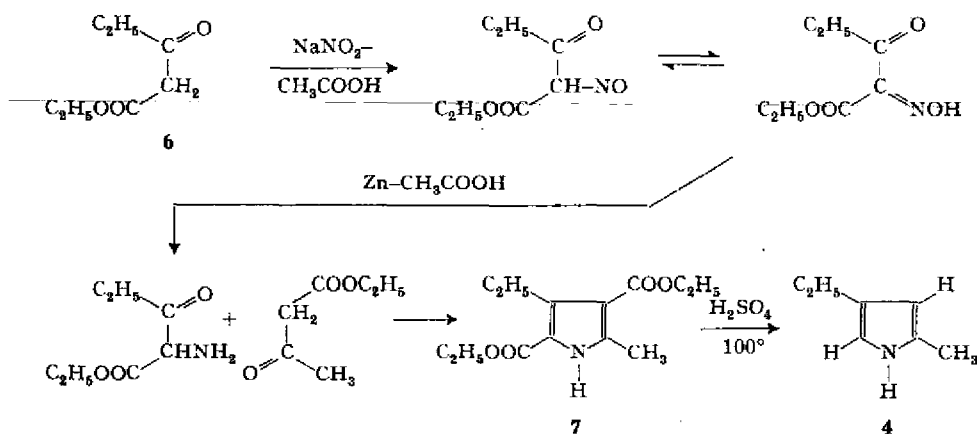
⁷⁾ Aufgenommen mit einem VARIAN-Spektrometer A-60 (60 MHz) im physikal.-chem. Laboratorium der SANDOZ AG., Basel (Dres. K. FREI und P. NIKLAUS). Chemische Verschiebungen in δ -Werten mit $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ (TMS) als internem Standard ($\delta = 0$).

der Methylengruppe, welches jetzt aber bei $\delta = 5,46$ als Singlett erscheint. Diese Verschiebung nach tieferem Feld wird durch die Acetylierung der primären Hydroxylgruppe verursacht. In der Regel tritt dabei eine Verschiebung von ca. 0,5 ppm ein. Die Differenz beträgt im vorliegenden Fall aber 0,8 ppm. Dieser grosse Unterschied dürfte dadurch zustande kommen, dass im freien Verrucarin E das Signal wegen der Bildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke des primären Hydroxyls, die eine zusätzliche Abschirmung verursacht, um 0,2–0,3 ppm nach höherem Feld verschoben ist. Tatsächlich finden wir im IR.-Spektrum von Verrucarin E (vgl. Fig. 2) breite konzentrationsunabhängige Banden, wie sie für assoziierte NH- und HO-Gruppen typisch sind. Im NMR.-Spektrum ist das Signal der Hydroxylgruppe verschwunden. Die beiden Vinylprotonen erscheinen als Multipllett bei $\delta = 6,9$ ($J = 1,8$ cps) und als Quadruplett bei $\delta = 7,5$ ($J = 1,8$ und 2,5 cps), während das NH-Signal als breites Multipllett bei $\delta = 10$ zu erkennen ist. In D_2O -Lösung ändert sich nur das Signal des bei tieferem Feld erscheinenden Vinylprotons, welches nur noch als Dublett ($J = 1,8$ cps) zu erkennen ist. Die nicht mehr vorhandene Kopplung von 2,5 cps musste daher vom Proton der NH-Gruppe herrühren.

Die katalytische Hydrierung von Verrucarin E (1) mit Pt in Eisessig führte zu keinen definierten Produkten. Mit Pt in Äthylacetat oder RANEY-Ni in Äthanol war keine Wasserstoffaufnahme zu beobachten. Hingegen ergab Mono-O-acetylverrucarin E (2) bei der Hydrierung mit Pt in Alkohol ein neues krist. Produkt der Summenformel C_7H_9ON . 2 hat bei dieser Reaktion 1 Mol. Essigsäure verloren. Das Hydrierungsprodukt besitzt die Struktur des 2-Methyl-4-acetylpyrrols (3), und zwar aus folgenden Gründen: Das UV.-Spektrum ist unverändert, d.h. das chromophore System ist erhalten geblieben (vgl. Fig. 1). Im IR.-Spektrum sind die Banden der Acetoxygruppe verschwunden. An die Stelle der acetylierten Hydroxymethylgruppe ist eine Methylgruppe getreten. Dies war sofort aus dem NMR.-Spektrum von 3 (vgl. Tab.) ersichtlich, wo die 5 Protonen der Acetoxy-methylgruppe verschwunden sind. Statt dessen erscheint neben dem Singlett der ursprünglichen Methylgruppe das neue Signal einer neuen Methylgruppe, die infolge einer allylischen «long-range»-Kopplung [13] eine schwache Aufspaltung in ein Dublett ($J = 0,8$ cps) erlitten hat. Das Vinylproton bei $\delta = 6,6$ tritt jetzt als komplexes Multipllett zu Tage, das andere bei $\delta = 7,4$ als Quadruplett ($J = 2,7$ und 1,8 cps). Bei $\delta = 9,5$ ist das breite Multipllett der NH-Gruppe erkennbar, das in D_2O -Lösung verschwindet. In D_2O ist auch Entkoppelung des Vinylprotons bei $\delta = 7,62$ zu einem Dublett ($J = 1,8$ cps) sowie die stärkere Auflösung der Feinstruktur des Vinylprotons bei $\delta = 6,7$ zu beobachten. – Durch die katalytische Hydrierung von Mono-O-acetylverrucarin E (2) ist also lediglich Hydrogenolyse der allylischen Acetoxygruppe eingetreten unter Erhaltung des chromophoren Systems.

Aus den bisherigen Ergebnissen folgt, dass Verrucarin E (1) eine sekundäre Amidgruppierung, eine Hydroxy-methylgruppe und eine Methylgruppe, die beide an einer C=O-Doppelbindung haften, ferner zwei nicht benachbarte vinylische Wasserstoffatome enthält. Da im NMR.-Spektrum des Verrucarins E in D_2O -Lösung, bzw. des deuterierten Verrucarins E in $CDCl_3$ -Lösung, das bei $\delta = 7,6$ erscheinende Vinylproton entkoppelt wird, befindet es sich in Nachbarstellung zur NH-Gruppierung. Mit den geschilderten chemischen und spektroskopischen Eigenschaften sind auf den ersten Blick für Verrucarin E sowohl die Pyrrol-Struktur 1 wie auch die Struktur 5

eines γ -Pyridons vereinbar. Die Strukturen **1** und **5** sind isoelektronisch; beide stellen vinyloge Säureamide dar. Doch liess der hohe Wert der Kopplungskonstante von 1,8 cps der beiden Vinylprotonen die Struktur **5** weniger möglich erscheinen, da in aromatischen Systemen bisher nie so hohe Werte für eine Spin-Spin-Wechselwirkung zwischen Protonen in *para*-Stellung beobachtet worden sind. Der Wert passt hingegen sehr gut auf eine *meta*-Kopplung, wie sie in der Pyrrolformel **1** verwirklicht ist. Dass Verrucarín E tatsächlich diese Struktur besitzt, konnten wir durch eine eindeutige chemische Reaktion beweisen. Das Hydrolysenprodukt **3** lieferte nämlich bei der Reduktion mit LiAlH_4 ⁹⁾ das bekannte 2-Methyl-4-äthylpyrrol (**4**) [15]. Das Vergleichspräparat stellten wir nach einem an die KNORR'sche Pyrrolsynthese anlehenden verbesserten Verfahren her, das vom Propionyllessigsäure-äthylester (**6**) ausging und über das 2-Methyl-4-äthyl-3,5-dicarbäthoxy-pyrrol (**7**) [16] führte:



Das UV.-Spektrum von 2-Methyl-4-äthyl-pyrrol (**4**) weist nur noch ein einziges kurzwelliges Absorptionsmaximum bei 202 nm ($\log \epsilon = 3,75$) mit Inflexionen bei 279 nm ($\log \epsilon = 2,27$) und 302 nm ($\log \epsilon = 2,00$) auf (vgl. Fig. 1). Im IR.-Spektrum zeigt **4** eine intensive NH-Streckschwingung bei 3462 cm^{-1} und bei 1710 cm^{-1} und 1585 cm^{-1} die C=C-Schwingung des Pyrrolkerns [14] [17]. Das NMR.-Spektrum (vgl. Tab.) lässt folgende Signale erkennen: ein Triplett der primären Methylgruppe bei $\delta = 1,2$ ($J = 5\text{ cps}$), bei $\delta = 2,22$ das Singlett der tertiären Methylgruppe, ein Quadruplett von 2 Protonen bei $\delta = 2,5$ ($J = 5\text{ cps}$), das der Methylengruppe entspricht. Die Vinylprotonen erscheinen bei $\delta = 5,82$ und $\delta = 6,44$ als breites Singlett, wobei das bei tieferem Feld auftretende der NH-Gruppe benachbart ist. Das Proton der NH-Gruppe erzeugt bei $\delta = 7,6$ ein breites Signal.

Durch die Überführung von Verrucarín E (**1**) in 2-Methyl-4-äthyl-pyrrol (**4**) ist seine Struktur eindeutig bewiesen und die Interpretation der NMR.-Spektren gesichert.

⁹⁾ Zur Reduktion von Pyrrolcarbonsäuren, Pyrrolaldehyden und C-Acetylpyrrolen mit LiAlH_4 vgl. TREIBS & SCHERRER [14].

Zuordnung der H-Atome in den NMR.-Spektren¹⁰⁾

| Substanz | Lösg.-mittel | Fig. | N | C-3 | C-5 | C-6 | C-7 | C-8 | OH |
|------------------------------------|-------------------|------|--------|----------------------|-------------------|-----------------|--------------|--------------|-----------------|
| Verrucarín E (1) | CDCl ₃ | 3 | 10,1 m | 6,62 b | 7,4 q (2; 1,5) | 4,6 s | - | 2,45 s | 5,23 m |
| Verrucarín E (1) | D ₂ O | 4 | - | 6,87 q (1,8; 0,8) | 7,66 d (1,8) | 4,66 d (0,8) | - | 2,45 s | - |
| Deutero- verrucarín E (1) | CDCl ₃ | - | - | 6,66 q (1,8; 0,8) | 7,45 d (1,8) | 4,6 b | - | 2,47 s | - |
| Mono-O-acetyl- verrucarín E (2) | CDCl ₃ | - | 10,0 m | 6,9 m | 7,5 q (3; 1,2) | 5,46 s | - | 2,45 s | - ^{a)} |
| Mono-O-acetyl- verrucarín E (2) | D ₂ O | - | - | 7,05 m | 7,76 d (2) | 5,28 b | - | 2,48 s | - ^{a)} |
| 2-Methyl-4-acetyl- pyrrol (3) | CDCl ₃ | - | 9,5 m | 6,6 m | 7,4 q (3; 1,8) | 2,32 d (0,8) | - | 2,4 s | - |
| 2-Methyl-4-acetyl- pyrrol (3) | D ₂ O | - | - | 6,7 q (1,8; 0,8) | 7,62 d (1,8) | 2,2 d (0,8) | - | 2,4 s | - |
| 2-Methyl-4-äthyl- pyrrol (4) | CDCl ₃ | - | 7,6 m | 5,82 d (1,9) | 6,44 d (1,9) | 2,22 s | 2,5 q (5) | 1,2 t (5) | - |

a) CH₃-CO-O-Gruppe bei $\delta = 2,1$ s

Den Herren Prof. Dr. P. DIEHL, Basel, und PD Dr. W. VON PHILIPSBORN, Zürich, danken wir bestens für die anregenden Diskussionen der NMR.-Spektren. Die Arbeit wurde durch die SANDOZ AG., Basel, und den SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG (Projekt Nr. 2627) unterstützt, wofür wir ebenfalls unseren besten Dank aussprechen.

Experimenteller Teil

Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt; sie sind nicht korrigiert. Die IR.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, aufgenommen. Die Analysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (E. THOMMEN). Zur Säulenchromatographie nach der Methodik von DUNCAN [18] diente Kieselgel MERCK der Korngrösse 0,05–0,2 mm. Für die Dünnschichtchromatographie (DC) nach STAHL [19] verwendeten wir Kieselgel G als Adsorbens. Die Flecke wurden durch J₂-Dämpfe sichtbar gemacht.

1. Isolierung von Verrucarín E (1) (verbessertes Verfahren, vgl. [8])¹¹⁾. – 100 Schüttelkulturen (100-ml-ERLENMEYER-Kolben) mit RICHARD'scher Nährlösung modifiziert nach LUZ [20] wurden mit einer Konidiensuspension des Stammes S 833 von *Myrothecium verrucaria* beimpft. Nach Inkubation während 9 Tagen bei 27° auf einer Schüttelmaschine mit Amplitudenbewegung (100 Bewegungen pro Minute) wurde vom Mycel abgenutscht und das klare Kulturfiltrat viermal mit Essigester extrahiert. Der Essigesterextrakt wurde zweimal mit 2N NaOH und zweimal mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (2,7 g) wurde an 300 g Kieselgel (0,05–0,2 mm) chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 600 ml des Lösungsmittels pro Fraktion. Die Säule wurde gegen Lichtbestrahlung geschützt.

Die Fraktionen 1–8 (681 mg gelbes Öl, eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(99:1)) wurden verworfen. Die Fraktion 9 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(99:1)) ergab 225 mg Rohkristalle von Verrucarín A, begleitet von Verrucarín B. Die Fraktionen 10–12 (eluiert mit Methylen-

¹⁰⁾ Es bedeutet: s = Singlett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quadruplett, m = Multipllett, b = breites Signal. Die Zahlen in runden Klammern sind die Spin-Spin-Kopplungskonstanten *J*, in cps angegeben.

¹¹⁾ Den Herren Dres. CH. STOLL, E. HÄRRI und W. LOEFFLER, SANDOZ AG., Basel, danken wir bestens für die Züchtungen.

chlorid-Methanol-(99:1) gaben 72 mg Öl, das verworfen wurde. Die Fraktionen 13–14 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(98:2)) lieferten 38 mg Rohkristalle Roridin A. Die Fraktion 15 (95 mg Öl, eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(98:2)) wurde verworfen. Die Fraktionen 16–19 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(98:2)) ergaben 438 mg rotgefärbten Lack, der z. T. in Nadeln kristallisierte. Nochmalige Chromatographie an 400 g Kieselgel (0,05–0,2 mm) ergab 280 mg reines, farbloses, kristallines Verrucaridin E. Die Fraktionen 19–23 (105 mg braunes Öl, eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(95:5)) wurden verworfen.

Unter diesen Kulturbedingungen resultieren in der Regel pro Liter Ausgangsvolumen: 10–22 mg Verrucaridin A (noch Verrucaridin B enthaltend), 3,5–7,5 mg Roridin A und 8–25 mg Verrucaridin E.

2. Charakterisierung von Verrucaridin E (1). – Aus Aceton-Äther farblose Nadeln, vom Smp. 90,5–91¹²⁾. Durch Tageslicht und Wärme tritt rasch Zersetzung ein. Im Dünnschichtchromatogramm (DC) mit Chloroform-Methanol-(98:2) als Fließmittel, Rf-Wert = 0,2. Wird die Dünnschichtplatte nach der Entwicklung dem Tageslicht ausgesetzt, so färbt sich der Verrucaridin-E-Fleck violett. Verrucaridin E ist optisch inaktiv. UV.-Spektrum vgl. Fig. 1. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2 und KBr): u. a. Banden bei 3457 cm^{-1} (monomeres NH), 3220 cm^{-1} (assoz. OH bzw. NH) 2950 cm^{-1} (CH), 1640 cm^{-1} (C=O), 1520 cm^{-1} (C=C) (vgl. Fig. 2). NMR.-Spektrum: vgl. Fig. 3 und 4 und Tab. Zur Analyse 10 Std. bei 20° und 0,01 Torr getrocknet.

| | | | | |
|--|---------------------|--------------|--------------|---------------|
| $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$ | Ber. C 60,42 | H 6,51 | N 10,07 | O 23,0% |
| (139,2) | Gef. „ 60,22; 60,97 | „ 6,94; 6,92 | „ 10,4; 10,3 | „ 22,7; 22,7% |

Aktiver H (ZEREWITINOFF) Ber. 2 akt. H 1,5% 3 akt. H 2,2% Gef. 2,2%

– OCH_3 (ZEISEL) Gef. 0,0%; NCH_3 Gef. 0,0%; N-Acetyl Gef. 0,0% (vaporometrische Mikromethode in CH_2Cl_2 [21]³⁾).

Mol.-Gew.: Gef. 154 ± 15.

2.1. Prüfung gegen HCl: Eine Lösung von 6 mg Verrucaridin E (1) in 5 ml 2N HCl wurde 2 Std. bei 20° stehengelassen. Hierauf wurde das dunkelbraun gefärbte Reaktionsgemisch mit Chloroform ausgeschüttelt, die Auszüge mit 2N Na_2CO_3 und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierte ein braun gefärbtes Harz, das nicht weiter untersucht wurde.

2.2. Prüfung gegen KOH: Eine Lösung von 5 mg Verrucaridin E (1) in 5 ml 10N KOH wurde 24 Std. bei 20° stehengelassen. Die wie oben beschriebene Aufarbeitung lieferte unverändertes Ausgangsmaterial.

2.3. Versuche zur katalytischen Hydrierung. – Mit Pt-Essigester: Eine Lösung von 12 mg Verrucaridin E (1) in 10 ml Essigester wurde in Gegenwart von 15 mg $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ bei 20° hydriert. Die Aufarbeitung ergab unverändertes Ausgangsmaterial.

Mit RANEY-Ni: Eine Lösung von 25 mg Verrucaridin E (1) in 10 ml abs. Alkohol wurde in Gegenwart von 15 mg frisch hergestelltem RANEY-Ni bei 20° hydriert. Es konnte keine Wasserstoffaufnahme beobachtet werden. Das Ausgangsmaterial wurde unverändert zurückerhalten.

Mit Pt-Eisessig: Eine Lösung von 55 mg Verrucaridin E (1) in 20 ml Eisessig wurde bei 20° in Gegenwart von 24 mg $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ hydriert. Nach Aufnahme von 26,2 ml Wasserstoff innerhalb von 2 Std. wurde die Hydrierung abgebrochen. Die Aufnahme betrug 2,1 Mol. H_2 . Nach Abfiltrieren durch eine Schicht Celite wurde eingedampft. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen, die Lösung mit 2N Na_2CO_3 und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der harzige Rückstand (40 mg) ergab trotz mehrmaligem Chromatographieren an Kieselgel kein einheitliches Produkt.

2.4. Deuterierung: Eine Lösung von 40 mg Verrucaridin E (1) in 5 ml Aceton wurde mit 2 ml D_2O (99-proz.) versetzt und im Vakuum bei 30° eingedampft. Nach dreimaliger Wiederholung dieser Operation wurden 35 mg farblose Kristalle Deuteroverrucarin E isoliert. Zur Methodik vgl. [22].

3. Mono-O-acetyl-verrucarin E (2). – 70 mg Verrucaridin E (1) wurden mit 3 ml Acetanhydrid bei 20° stehengelassen. Nach 74 Std. wurde die klare Lösung in Chloroform aufgenommen, mit 2N HCl, 2N Na_2CO_3 und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt wurde zur Reinigung an 80 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Methylen-

¹²⁾ Der früher [8] angegebene Smp. 103–104° wurde nicht mehr beobachtet.

chlorid-Methanol-(99,5:0,5) eluierten Fraktionen lieferten aus Aceton-Äther 62 mg farblose Nadeln vom Smp. 102°. Optisch inaktiv. UV.-Spektrum vgl. Fig. 1. NMR.-Spektrum vgl. Tab. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 3450 cm^{-1} (monomeres NH), 1735 cm^{-1} (C=O, Acetat), 1660 cm^{-1} (C=O), 1520 cm^{-1} (C=C), 1360 cm^{-1} und 1230 cm^{-1} . Zur Analyse 12 Std. bei 20° und 0,01 Torr getrocknet.

| | | | | |
|---|--------------|--------|--------|----------|
| $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$ | Ber. C 59,66 | H 6,12 | N 7,73 | O 26,49% |
| (181,2) | Gef. „ 59,65 | „ 6,24 | „ 7,2 | „ 26,3% |

4. 2-Methyl-4-acetyl-pyrrol (3). – Eine Lösung von 45 mg Mono-O-acetyl-verrucarin E (2) in 10 ml Methanol wurde in Gegenwart von 10 mg PtO_2 , H_2O bei 22° hydriert. Nach 2 Std. waren 7,8 ml H_2 verbraucht, was unter Berücksichtigung des vom Katalysator verbrauchten Wasserstoffs der Aufnahme von 1,1 Mol. H_2 entspricht. Nach Abfiltrieren des Katalysators durch eine Schicht Celite wurde das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen, mit 2 N Na_2CO_3 und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt (41 mg) wurde an 30 g Kieselgel chromatographiert. Aus den mit Methylenchlorid-Methanol-(99:1) eluierten Fraktionen wurden aus Aceton-Äther 31 mg farblose Nadeln vom Smp. 112° erhalten. Optisch inaktiv. UV.-Spektrum vgl. Fig. 1. NMR.-Spektrum vgl. Tab. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 3460 cm^{-1} (monomeres NH), 1660 cm^{-1} (C=O), 1520 cm^{-1} (C=C), 1390 cm^{-1} . Zur Analyse 12 Std. bei 20° und 0,01 Torr getrocknet.

| | | | | |
|---------------------------------|--------------|--------|--------|---------|
| $\text{C}_7\text{H}_9\text{ON}$ | Ber. C 68,22 | H 7,38 | N 11,4 | O 13,0% |
| (123,1) | Gef. „ 68,11 | „ 7,42 | „ 11,6 | „ 12,5% |

5. Reduktion von 2-Methyl-4-acetyl-pyrrol (3) mit LiAlH_4 : 2-Methyl-4-äthyl-pyrrol (4). – Zu einer Lösung von 130 mg 2-Methyl-4-acetyl-pyrrol (3) in 75 ml abs. Äther-Dioxan-(1:1) wurde eine Suspension von 40 mg LiAlH_4 in 50 ml abs. Äther gefügt und 8 Std. unter Rückfluss gekocht. Die Reaktion wurde im Dunkeln ausgeführt, um einer Zersetzung durch Lichtbestrahlung vorzubeugen. Die Reaktionslösung färbte sich rot. Hierauf wurde vorsichtig mit Eiswasser versetzt, wobei $\text{Al}(\text{OH})_3$ als grobkörniger Niederschlag ausfiel. Das Reaktionsgemisch wurde 12mal mit je 50 ml Äther extrahiert und die ätherischen Phasen abdekantiert. Nach Trocknung mit Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum wurden 90 mg rötlich gefärbtes Öl erhalten. Nach Destillation im Wasserstrahlvakuum resultierten 70 mg reine, farblose Flüssigkeit vom Sdp. 78°/14 Torr, die sich aber nach kurzer Zeit an der Luft rotbraun färbte¹³⁾. UV.-Spektrum vgl. Fig. 1. NMR.-Spektrum vgl. Tab. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 3468 cm^{-1} (NH-Streckschwingung), 2962 cm^{-1} (CH_3), 2925 cm^{-1} (CH_2), 2870 cm^{-1} (CH_3), 1610 cm^{-1} (C=C) und 1585 cm^{-1} (C=C). Zur Analyse 10 Std. bei 20° und 0,01 Torr getrocknet.

| | | | | | | |
|---|--------------|---------|----------|--------------|---------|----------|
| $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}$ (109,1) | Ber. C 77,01 | H 10,16 | N 12,83% | Gef. C 77,25 | H 10,00 | N 13,02% |
|---|--------------|---------|----------|--------------|---------|----------|

6. Synthese von 2-Methyl-4-äthyl-pyrrol (4). – Eine Lösung von 10 g Propionylessigester in 50 ml Eisessig wurde unter Rühren und Eiskühlung (-10° bis $+5^\circ$) vorsichtig mit einer konz. wässrigen Lösung von 5 g NaNO_2 versetzt. Hierauf wurde eine Std. bei 20° geführt, dann 9 g Acetessigester und 12 g Zn-Staub zugegeben. Die Temperatur wurde unter 70° gehalten. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde 2 Std. auf 100° erwärmt, worauf der Zn-Staub vollständig gelöst war. Das Reaktionsgemisch wurde in 500 ml Eiswasser gegossen und 10 Std. stehengelassen, dann der gelbe Niederschlag abgenutscht und aus Alkohol umkristallisiert. Es resultierten 6 g 2-Methyl-4-äthyl-3,5-dicarbäthoxy-pyrrol vom Smp. 119°¹⁴⁾. Eine Lösung von 4 g dieses Esters in 20 ml Wasser wurde mit 10 ml konz. H_2SO_4 versetzt und 3 Std. auf 100° erwärmt. Unter starker Rührung wurde nherauf mit Soda neutralisiert und das Reaktionsgemisch 5mal mit je 100 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach Trocknung der Extrakte mit Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum wurden 2,9 g rotbraunes Öl erhalten, welches an Kieselgel chromatographiert wurde. Es resultierten aus den mit Methylenchlorid eluierten Fraktionen 500 mg 2-Methyl-4-äthyl-pyrrol (4), als rötlich gefärbte Flüssigkeit, die durch Destillation bei 14 Torr, wie oben beschrieben, gereinigt wurde. Sdp. 78°¹³⁾. Im Dünnschichtchromatogramm einheitlich. UV.-, IR.- und NMR.-Spektren identisch mit denen des obigen Präparats.

¹³⁾ FISCHER & KLARER [15] fanden den Sdp. 86°/20 Torr, bzw. 73–74°/10 Torr.

¹⁴⁾ FISCHER & STANGLER [16] fanden den Smp. 115°.

SUMMARY

The structure of the antibiotic verrucarin E ($C_7H_9O_2N$) is shown to be that of 2-hydroxymethyl-4-acetyl-pyrrole (1).

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 9. Mitteilung: E. FETZ, B. BÖHNER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 1669 (1965).
 [2] J. GUTZWILLER, R. MAULI, H. P. SIGG & CH. TAMM, *Helv.* **47**, 2234 (1964).
 [3] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 157 (1965); W. ZÜRCHER, J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 840 (1965).
 [4] A. T. MCPHAIL & G. A. SIM, *Chem. Commun.* **1965**, 350.
 [5] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 177 (1965).
 [6] B. BÖHNER, E. FETZ, E. HÄRRI, H. P. SIGG, CH. STOLL & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 1079 (1965).
 [7] CH. TAMM *et al.*, spätere Mitteilung.
 [8] E. HÄRRI, W. LOEFFLER, H. P. SIGG, H. STÄHELIN, CH. STOLL, CH. TAMM & D. WIESINGER, *Helv.* **45**, 839 (1962).
 [9] W. O. GODTFREDSSEN & S. VANGEDAL, *Proc. chem. Soc.* **1964**, 188.
 [10] M. E. RÜSCH & H. STÄHELIN, *Arzneimittel-Forschung* **15**, 893 (1965).
 [11] Vgl. L.-J. BELLAMY, *The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*, London, New York 1954, p. 212ff.
 [12] J. COHEN, J. DALY & H. KNY, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 2184 (1960).
 [13] Vgl. S. STERNHELL, *Rev. pure appl. Chemistry (Australia)* **14**, 15 (1964).
 [14] A. TREIBS & H. SCHERRER, *Liebigs Ann. Chem.* **577**, 139 (1952); **589**, 188 (1954).
 [15] H. FISCHER & J. KLARER, *Liebigs Ann. Chem.* **450**, 181 (1926); H. FISCHER & H. ORTH, *Die Chemie des Pyrrols*, Leipzig 1936, Bd. 7, S. 46.
 [16] H. FISCHER & G. STANGLER, *Liebigs Ann. Chem.* **459**, 81 (1927).
 [17] A. R. KATRITZKY, *Quart. Rev.* **13**, 353 (1959).
 [18] G. R. DUNCAN, *J. Chromatography* **8**, 27 (1962).
 [19] Vgl. E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962; K. RANDEATH, «Dünnschichtchromatographie», Verlag Chemie, Weinheim 1962.
 [20] G. LUZ, *Phytopathol. Z.* **7**, 589 (1934).
 [21] Vgl. W. SIMON & W. TOMLINSON, *Chimia* **14**, 305 (1960); CH. CHYLEWSKI & W. SIMON, *Helv.* **47**, 515 (1964).
 [22] D. COOK, *Canad. J. Chemistry* **41**, 8 (1963).

41. Synthese und Eigenschaften von Aziridincarbonsäureestern

von E. Kyburz, H. Els, St. Majnoni, G. Englert, C. von Planta, A. Fürst
und Pl. A. Plattner

(8. X. 65)

Vor mehreren Jahren ist von unserer Arbeitsgruppe eine einfache Synthese des Antibiotikums Cycloserin entwickelt worden, das direkt durch Einwirkung von Hydroxylamin auf α -Amino- β -chlor-propionsäure-methylester (1, R = CH₃) erhalten wurde [1]. Das Ausgangsmaterial 1 musste aber aus dem relativ schwer zugänglichen Serin über mehrere Stufen hergestellt werden.

Bei der Suche nach einfacheren Synthesen von 1 dachten wir an die Verwendung der 2-Aziridincarbonsäureester (2), die zu Beginn unserer Arbeiten noch unbekannt