

294. Die Konstitution von Roridin A

Verrucarine und Roridine, 11. Mitteilung [1]

von B. Böhner und Ch. Tamm

(12. X. 66)

Roridin A ist ein hochwirksames Cytostaticum, das wir aus Kulturen von mehreren Stämmen von *Myrothecium roridum* TODE ex FR. als Hauptmetaboliten isoliert haben [2]. Im Gegensatz zu den Verrucarinen A, B und J, die sich beim Erhitzen ohne vorheriges Schmelzen erst über 300° langsam zu zersetzen beginnen [2] [3], schmelzen die farblosen Kristalle von Roridin A ohne Zersetzung bei 198–204°¹⁾. Die Elementaranalysen stimmten auf die Bruttoformeln C₂₇H₃₈O₈ (490,6), C₂₉H_{40–42}O₉ (532,6–534,6) und C₃₅H_{48–50}O₁₁ (644,7–646,7). Die Molekulargewichtsbestimmung nach RAST in Campher erlaubte keine Entscheidung; wurden doch für alle diese Summenformeln passende Werte gefunden. Die vaporometrische Molekulargewichtsbestimmung [6]²⁾ in Dichlormethan ergab die Molgewichte 543 ± 11 und 527 ± 11. Damit übereinstimmend lieferten Di-O-acetyl-roridin A (s. unten) und Tetrahydro-roridin A (s. unten) die Werte von 605 ± 15 bzw. 531 ± 11. Im Einklang damit war auch das aus der Radioaktivität des mit [¹⁴C]-Benzoylchlorid bereiteten [¹⁴C]-Di-O-benzoylderivats (s. unten) bestimmte Molgewicht von 542³⁾. Nach diesen Ergebnissen kamen für Roridin A nur noch die Bruttoformeln C₂₉H₄₀O₉ (532,6) und C₂₉H₄₂O₉ (534,6) in Frage. Im Massenspektrum⁴⁾ lag die höchste Spitze bei *m/e* 532. Eine 50mal intensivere Spitze bei *m/e* 488 kommt nach den obigen Molekulargewichtsbestimmungen und den Elementaranalysen für das Molekular-Ion nicht in Frage⁵⁾. Roridin A besitzt somit die Summenformel C₂₉H₄₀O₉, die auch durch die weiteren Reaktionen bestätigt wird. Auf Grund der im folgenden beschriebenen physikalischen und chemischen Eigenschaften erteilen wir Roridin A die Strukturformel I.

A. Funktionelle Gruppen. – Das UV.-Spektrum von Roridin A ist durch ein intensives Absorptionsmaximum bei 263 nm, log ε = 4,31 (Äthanol), charakterisiert. Das IR.-Spektrum einer Lösung in Dichlormethan zeigt eine breite Carbonyl-Streckschwingung bei 1709–1715 cm⁻¹, die im KBr-Spektrum von Roridin-A-Kristallen zu

¹⁾ Bei der kürzlich von KISHABA *et al.* [4] ebenfalls aus *Myrothecium roridum* isolierten «Substanz 379-X» könnte es sich nach den physikalischen Daten um ein unreines Präparat von Roridin A handeln. Ein direkter Vergleich der Präparate ist bisher nicht vorgenommen worden. Die amerikanischen Autoren beobachteten bei ihrem Stoff insektizide Eigenschaften, insbesondere gegenüber dem mexikanischen Bohnenkäfer (Mexican bean beetle) *Epilachna varivestis* MULSANT. Diese Wirkung ist vermutlich nicht spezifisch, sondern dürfte auf die ausserordentlich hohe Allgemeintoxizität von Roridin A zurückzuführen sein [2]. Roridin A besitzt höchst wahrscheinlich sehr ähnliche biologische Eigenschaften wie das strukturell sehr nahe verwandte Verrucarine A (vgl. [5]).

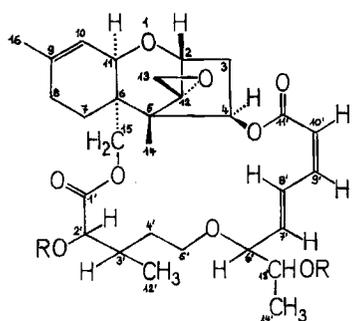
²⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. W. SIMON, ETH, Zürich, bestens für diese Bestimmungen.

³⁾ Die Messung der Radioaktivität verdanken wir Herrn Dr. F. KALBERER, SANDOZ, A.G., Basel.

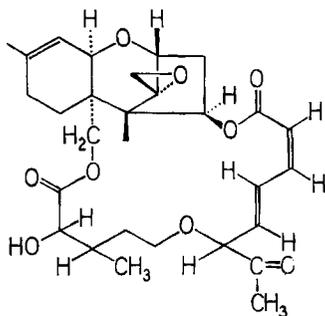
⁴⁾ Für die Aufnahme dieses Spektrums möchten wir Herrn Prof. Dr. K. BIEMANN, MIT, Cambridge, Mass., USA, unseren besten Dank aussprechen.

⁵⁾ Auf eine detailliertere Interpretation der Massenspektren werden wir in einer späteren Mitteilung zurückkommen.

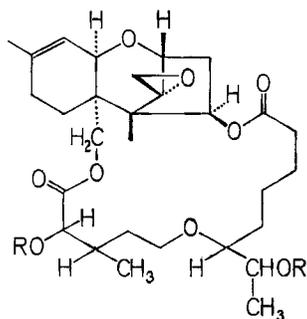
Formelschema 1



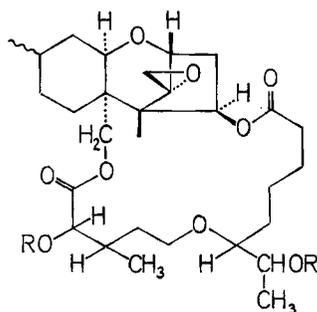
- 1 R = H: Roridin A
 2 R = Ac
 3 R = Bz



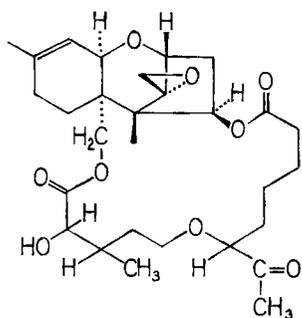
4



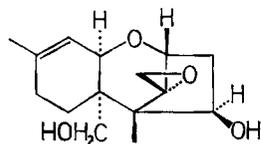
- 5 R = H: Tetrahydrororidin A
 6 R = Ac



- 7 R = H: Hexahydrororidin A
 8 R = Ac



9

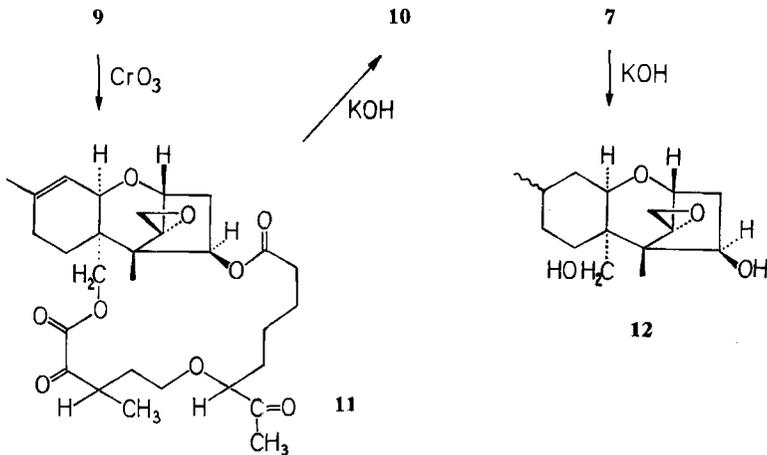


10 Verrucarol

11



12



Es bedeuten: Ac = $\text{CH}_3\text{CO}-$; Bz = $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}-$

einem Dublett bei 1704 und 1742 cm^{-1} aufgespalten ist (vgl. Fig. 1). Ferner treten in beiden Spektren zwei $\text{C}=\text{C}$ -Banden bei 1590 – 1597 cm^{-1} und 1615 cm^{-1} auf. Diese Absorptionen sind auf eine $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigte sowie auf eine gesättigte Estergruppierung zurückzuführen⁶⁾. Sehr ähnliche spektrale Eigenschaften zeigen die Verrucarine A, B und J. Sie alle enthalten eine *cis,trans*-Muconsäurediester-Gruppierung als Chromophor [7] [8] [9]. In den IR.-Spektren des Roridins A ist ausserdem noch eine starke Hydroxyl-Streckschwingung bei 3559 cm^{-1} sichtbar. Mit Acetanhydrid und Pyridin bei 22° lässt sich Roridin A (1) in Di-O-acetylroridin A (2) und mit Benzoylchlorid und Pyridin bei 22° in Di-O-Benzoyloridin A (3) überführen. In den IR.-Spektren beider Derivate sind die HO-Banden verschwunden. Roridin A (1) enthält somit zwei acylierbare Hydroxylgruppen. Dementsprechend ergab die ZEREWITINOFF-Bestimmung (bei 22°) zwei aktive H-Atome. Bei der Behandlung von Roridin A (1) mit $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ in Aceton (Methodik nach [10]) während 10 Min. bei 22° entstanden mehrere Produkte. Nach der Trennung mit Hilfe einer modifizierten präparativen Dünnschichtchromatographie (vgl. Exper. Teil) gelang es, das Hauptprodukt, das neutrale Monodehydrororidin A (4), rein zu erhalten⁷⁾. 4 zeigte im IR. immer noch eine HO-Bande bei 3521 – 3534 cm^{-1} . Monodehydrororidin A (4) enthält eine Methylketon-Gruppe, denn im NMR.-Spektrum findet man bei relativ tiefem Feld ($\tau = 7,7$) ein Singlett (3H), das in Roridin A (1) fehlt. Es ist an die Stelle eines in 1 bei $\tau = 8,83$ ($J = 6$ cps) erscheinenden Dubletts (3H) getreten, das einer sekundären Methylgruppe zuzuordnen ist (vgl. Tabelle 1). Dementsprechend fiel die Iodoform-Reaktion bei 4 positiv aus. Daraus folgt, dass die leichter dehydrierbare HO-Gruppe des Roridins A als $\text{CH}_3\text{-CH(OH)}$ -Gruppierung vorliegt. – Die katalytische Hydrierung von Roridin A

⁶⁾ Beide $\text{C}=\text{O}$ -Schwingungen zeigen gleiche Intensität. Bei den Verrucarinen A und B, die drei Esterbindungen enthalten, ist die Intensität der längerwelligen ungesättigten Estergruppe doppelt so gross wie diejenige der gesättigten. Vgl. [7] [8].

⁷⁾ Die Nebenprodukte wurden nicht rein erhalten. Es ist bisher nicht gelungen, auch die zweite HO-Gruppe selektiv zu dehydrieren. Alle Versuche Bisdehydrororidin A zu bereiten schlugen fehl; es entstanden immer Gemische, die nicht getrennt werden konnten. Offenbar werden gleichzeitig die Doppelbindungen angegriffen, denn bei der Oxydation von Tetrahydrororidin (5) wird unter den gleichen Bedingungen ein einheitliches Produkt erhalten (s. unten).

(1) mit Pt in Eisessig ergab in schlechter Ausbeute das auch schlecht kristallisierende Hexahydrororidin A (7). Ein grosser Teil des Rohprodukts blieb selbst nach chromatographischer Reinigung amorph. Acetylierung von 7 lieferte das Di-O-acetyl-Derivat 8. Wesentlich besser verlief die Hydrierung von Roridin A (1) in Äthanol mit Pd als Katalysator. Nach Aufnahme von 2 Mol-Äq. H_2 wurde das gut kristallisierende Tetrahydrororidin A (5) ohne Schwierigkeiten in guter Ausbeute erhalten.

Das NMR.-Spektrum von Roridin A (1) (vgl. Tabelle 1 und Fig. 2) zeigt zwischen $\tau = 2,32$ und $\tau = 4,55$ eine komplexe Signalgruppe, die den fünf Vinylprotonen an den folgenden C-Atomen zuzuordnen ist, nämlich ein doppeltes Dublett bei $\tau = 2,32$ ($J = 15,5$ bzw. 11 cps) an C-8', ein Triplet bei $\tau = 3,34$ ($J = 11$ cps) an C-9', ein Multiplett bei $\tau \approx 4,0$ an C-7', ein Dublett an C-10' ($J = 11$ cps) sowie ein Dublett bei $\tau = 4,55$ ($J = 5$ cps). Bei Tetrahydrororidin A (5) sind die vier Vinylprotonen zwischen $\tau = 2,32$ und $\tau = 4,22$ verschwunden, d. h. die beiden zur Ester-carbonylgruppe konjugierten Doppelbindungen sind nicht substituiert. Beim Hexahydroderivat 7

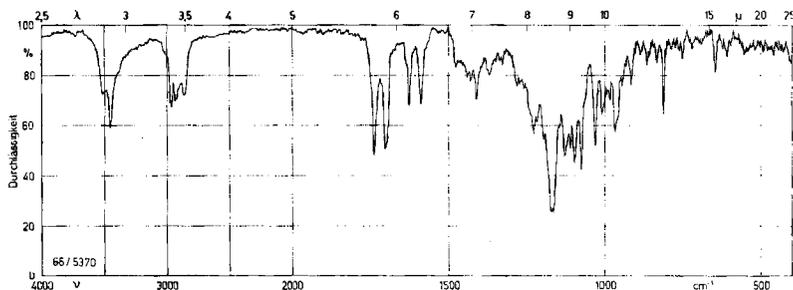


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von Roridin A (1) fest in KBr⁸⁾

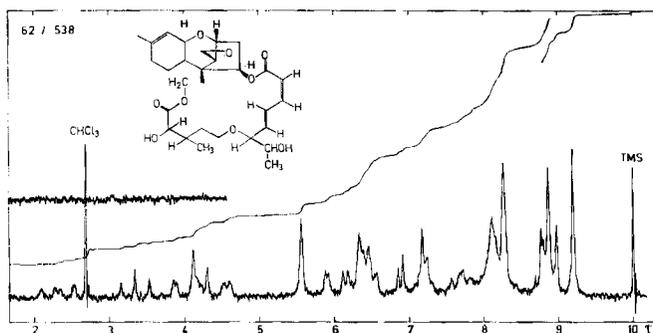


Fig. 2. NMR.-Spektrum von Roridin A (1) in Deuteriochloroform⁹⁾

verschwindet noch das fünfte Vinylproton, das sich an C-10, also im Verrucarolteil der Molekel befindet (s. unten). Die beiden Hydrierungsprodukte weisen im IR. nur noch eine einzige C=O-Streckschwingung von höherer Frequenz bei 1727 – 1736 cm^{-1} auf, die einer gesättigten Estergruppe entspricht. Bei der Hydrierung von Roridin A

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

⁹⁾ Aufgenommen mit einem VARIAN-Spektrometer A-60 (60 MHz) im physikal.-chem. Laboratorium der SANDOZ AG, Basel (Drs. K. FREI und P. NIKLAUS). Chemische Verschiebungen in τ -Werten nach TIERS [11], mit $Si(CH_3)_4$ (TMS) als internem Standard.

werden demnach zuerst die beiden konjugierten Doppelbindungen des Roridinsäureteils (s. unten) und erst später die isolierten Doppelbindungen des Verrucarolteils abgesättigt. Die hydrolytische Spaltung von Roridin A (**1**) und seiner beiden Hydrierungsprodukte **5** und **7** bestätigen diese Beobachtungen (s. unten). Analog zu Roridin A liess sich auch Tetrahydrororidin A (**5**) mit $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ in Aceton [10] in ein neutrales Monodehydroderivat **9** überführen, dessen IR.-Spektrum ebenfalls noch eine HO-Bande bei $3472\text{--}3571\text{ cm}^{-1}$ zeigte (NMR.-Spektrum vgl. Fig. 3). Diese Dehydrie-

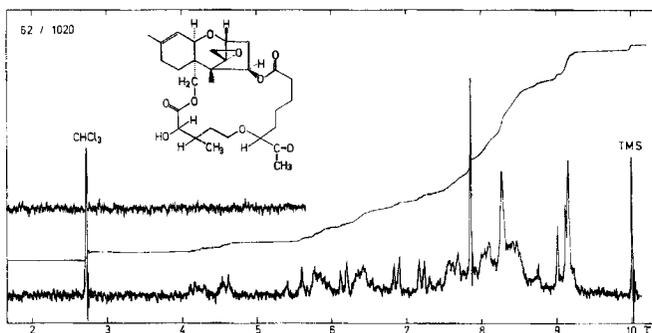


Fig. 3. NMR.-Spektrum von Monodehydro-tetrahydro-roridin A (**9**) in Deuteriochloroform⁹)

rung verlief unter diesen Bedingungen wesentlich glatter als bei Roridin A. Die weitere Dehydrierung von **9** zum Bisdehydroderivat **10** wird im Abschnitt C diskutiert.

Aus den NMR.-Spektren des Roridins A (**1**) und seiner Derivate ist ersichtlich, dass 4 C-Methylgruppen, aber keine O-Methylgruppen vorhanden sind, was mit den Resultaten der KUHN-ROTH- bzw. ZEISEL-Bestimmungen sehr gut übereinstimmt.

B. Hydrolytische Spaltungen. – Weiteren Aufschluss über die Struktur von Roridin A (**1**) gewährte die basenkatalysierte Hydrolyse. Nach 48stündiger Behandlung von Roridin A mit ca. 0,5N methanolischer KOH bei 22° liess sich mit Dichlormethan ein krist. Neutralstoff vom Smp. $156\text{--}158^\circ$ ausschütteln, der nach Smp., Misch-Smp., opt. Drehung, Dünnschichtchromatographie und IR.-Spektrum mit Verrucarol (**10**) [12] identisch war. Verrucarol ist ein Sesquiterpenalkohol, der erstmals bei der Hydrolyse von Verrucarol A erhalten worden ist. Aus den bei pH 3 mit Äther aus der Hydrolysenlösung extrahierten sauren Anteilen erhielten wir als einziges Produkt eine noch unbekannte Säure, die wir Roridinsäure nennen. Sie besitzt die Strukturformel **13** (Beweis s. unten). Wurde unter den gleichen Bedingungen Tetrahydrororidin A (**5**) hydrolysiert, so entstanden wieder Verrucarol (**10**) sowie die Tetrahydrororidinsäure (**17**). In analoger Weise ergab Hexahydorroridin A (**7**) das bekannte Dihydroverrucarol A (**12**) [12] und erneut die Tetrahydrororidinsäure (**17**). Die hydrolytischen Spaltungen lassen sich wie folgt formulieren:

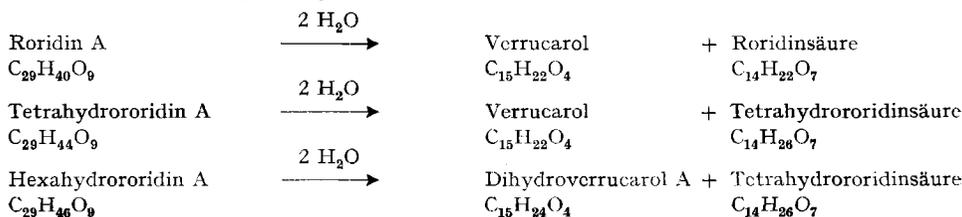


Tabelle 1. Zuordnung der H-Atome in den NMR.-Spektren^{9) 11) 12)}

Substanz	Fig.	C-4	C-10	C-13	C-14	C-15	C-16	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
Roridin A (1)	2	4,15 _m	4,56 _m	7,04 _{dd} (AB)(4)	9,20 _s	5,56 _s	8,26 _s	5,91 <i>d</i> (3)	a)	a)	a)	a)
Di-O-acetylroridin A (2)		—	—	7,03 _{dd} (AB)(4)	9,17 _s	5,59 _s	8,27 _s	5,18 <i>d</i> (3,5)	a)	a)	a)	a)
Di-O-benzoyloridin A (3)		—	—	—	—	—	—	5,12 <i>d</i> (3,5)	a)	a)	a)	a)
Monodehydroridin A (4)		4,2 _m	4,58 _m	—	9,13 _s	5,67 _s	8,26 _s	5,80 <i>d</i> (3)	a)	a)	a)	a)
Tetrahydroridin A (5)		4,2 _m	4,60 <i>d, br</i>	7,02 _{dd} (AB)(4)	9,16 _s	5,71 _s	8,27 _s	5,85 <i>d</i> (3)	a)	a)	a)	a)
Hexahydroridin A (7)		4,13 _m	—	7,01 _{dd} (AB)(4)	9,23 _s	5,59 _s	9,13 _d (5,5)	5,79 <i>d</i> (3,5)	a)	a)	a)	a)
Monodehydro-tetrahydroridin A (9)	3	4,2 _m	4,57 <i>d, br</i>	7,03 _{dd} (AB)(4)	9,16 _s	—	8,27 _s	b)	a)	a)	a)	a)
Roridinsäure (13)		—	—	—	—	—	—	5,84 <i>d</i> (3)	ca. 7,9 f)	8,3 _{dd} (6; <i>br</i>)	6,2–6,5 <i>m</i> b)	6,2–6,5
Roridinsäure-dimethylester (14)	5	—	—	—	—	—	—	5,75 <i>d</i> (3,5)	ca. 7,9 <i>m</i>	8,3 _{dd} (6; <i>br</i>)	6,3–6,7	6,3–6,7
Di-O-acetylroridinsäure-dimethylester (15)		—	—	—	—	—	—	4,94 <i>d</i> (3)	ca. 7,8 f)	8,4 (6; <i>br</i>) ¹⁾	ca. 6,5	6,08
Monodehydroridinsäure-dimethylester (16)		—	—	—	—	—	—	5,8	e)	e)	6,1–6,7 <i>m</i> b)	6,1–6,7
Tetrahydroridinsäure (17)		—	—	—	—	—	—	5,77 <i>d</i> (3)	7,5	8,7 ^{k)}	6,34 <i>t</i> (6)	6,23 <i>q</i> (6)
Tetrahydroridinsäure-dimethylester (18)		—	—	—	—	—	—	5,76 <i>d</i> (3) 1)	7,4	8,7 ^{k)}	6,25 <i>t</i> (6) m)	b)
Bisdehydro-tetrahydroridinsäure-dimethylester (19)	6	—	—	—	—	—	—	a)	7,6	8,6 ^{k)}	6,53 <i>t</i> (6)	6,40 <i>t</i> (6) m)
Substanz	Fig.	C-7'	C-8'	C-9'	C-10'	C-12'	C-13'	C-14'	CH ₃ O-	OH	CH ₃ CO-	
Roridin A (1)	2	ca. 4,0 <i>m</i> b)	2,32 _{dd} (15,5; 11)	3,34 <i>t</i> (11)	4,22 <i>d</i> (11)	8,92 <i>d</i> (6,5)	a)	8,83 <i>d</i> (5,5)	—	7,2 2 _s , <i>br</i>	—	
Di-O-acetylroridin A (2)		ca. 4,0 <i>m</i> b)	2,37 _{dd} (15,5; 11)	3,32 <i>t</i> (11)	4,18 <i>d</i> (11)	8,87 <i>d</i> (7)	4,89 <i>m</i>	8,82 <i>d</i> (6,5)	—	—	7,85 _s 7,93 _s	

Di-O-benzoylorridin A (3)	ca. 3,9 m ^{b)}	e)	3,29 t(11)	4,16 d(11)	8,68 d(6,5)	4,62 m	8,66 d(6)	—	—
Monohydrororidin A (4)	—	d)	—	—	9,09 d(6,5)	a)	7,70 s	—	e)
Tetrahydrororidin A (5)	—	—	—	—	9,04 d(6,5)	a)	8,86 d(6)	—	7,15 s, br ^{f)}
Hexahydrororidin A (7)	—	—	—	—	9,05 d(6,5)	a)	8,86 d(6)	—	e)
Monohydrotetrahydro- roridin A (9)	3	—	—	—	9,07 d(6,5)	a)	7,85 s	—	e)
Roridinsäure (13)	ca. 3,85 m	2,38dd (16; 11)	3,26 t(11)	4,29 d(11)	9,14 d(6,5)	6,67 quin(5)	8,92 d(6)	—	b)
Roridinsäure-dimethylester (14)	5	4,15dd (15,5; 7,5)	3,40 t(11)	4,28 d(11)	9,15 d(6,5)	6,3— 6,7	8,88 d(6)	6,20s 6,25s	ca. 6,9 s, br
Di-O-acetylroridinsäure- dimethylester (15)	—	4,09dd (15,5; 11)	3,35 t(11)	4,25 d(11)	9,03 d(7)	4,97 quin(6)	8,80 d(6,5)	6,24 s	7,86s 7,94s
Monohydrororidinsäure- dimethylester (16)	—	? (15,5; 11)	3,35 t(11)	4,25 d(11)	9,23 d(6)	6,1— 6,7 ^{b)}	7,8s 6,24s	6,10s 6,24s	e)
Tetrahydrororidinsäure (17)	—	—	—	—	9,12 d(6,5)	6,85 m	8,88 d(6)	—	h)
Tetrahydrororidinsäure- dimethylester (18)	—	—	—	—	9,14 d(6,5)	6,85 m	8,84 d(6,5)	6,18s 6,31s	e)
Bisdehydro-tetrahydro- roridinsäure-dimethylester (19)	6	—	—	—	8,82 d(6,5)	—	7,90 s	6,14s 6,34s	—

- a) Eine eindeutige Zuordnung ist nicht möglich, da sich Signale von Protonen des Verrucarolteils der Molekel überlagern. Hingegen stimmt die aus der Integrationskurve ermittelte Protonenzahl nach Substraktion der zum Verrucarol gehörenden Protonen sehr gut. Das Signal dieses Protons wird durch andere Signale ganz oder teilweise überdeckt.
- b) Die 10 Protonen der beiden Benzoylgruppen überdecken dieses Signal.
- c) Die Vinylprotonen sind nicht klar sichtbar.
- d) Das Proton kann nicht sicher lokalisiert werden.
- e) Die Signale verschwinden bei Zugabe von Säure.
- f) Vom Signal des Lösungsmittels (Aceton) resp. der Acetylgruppen überdeckt. Das darunter liegende Proton kann aber eindeutig zugeordnet werden.
- h) Da das Präparat nicht ganz wasserfrei war, sind die Protonen der Hydroxylgruppe nicht sichtbar. Das Signal des Wassers erscheint bei $\tau = 4,9$ (breit).
- i) Das bei **12** und **13** beobachtete doppelte Dublett ist hier zu einem breiten Triplet zusammengefallen.
- k) Bei den hydrierten Verbindungen tritt in diesem Gebiet ein Signalhaufen von 11 nicht völlig äquivalenten Methylen- und Methinprotonen auf.
- l) Da die Rotationsseitenbanden der CH_3O -Signale mit dem Dublett zusammenfallen, wird eine höhere Aufspaltung vorgetäuscht.
- m) Das eine Signal des Triplets dürfte unter dem CH_3O -Signal liegen.
- n) Die sehr schwachen bei $\tau = 5,67$ und $\tau = 5,77$ erscheinenden Signale sind die Rotationsseitenbanden der CH_3O -Gruppen.

zunächst das entsprechende Monohydroderivat (HO-Bande im IR.-Spektrum). Bei einer etwas längeren Reaktionszeit wurde aber der Bisdehydroester **19** als Hauptprodukt erhalten¹³⁾. Sein IR.-Spektrum zeigte wie erwartet keine Hydroxylbande mehr. Im NMR.-Spektrum (vgl. Fig. 6) war die erwartete Verschiebung der einen sekundären Methylgruppe (Dublett) nach tieferem Feld unter Bildung eines Singletts zu beobachten.

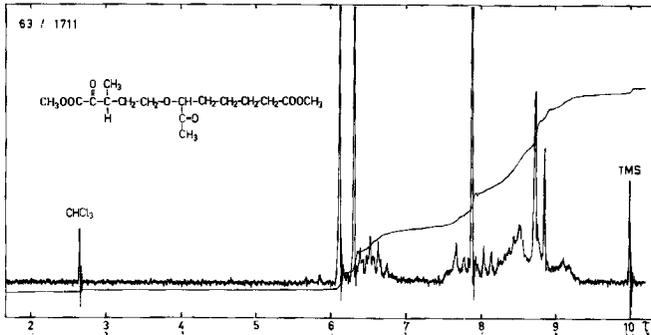


Fig. 6. NMR.-Spektrum des Bisdehydro-tetrahydro-roridinsäure-dimethylesters (**19**) in Deuteriochloroform⁹⁾

Die UV.-Spektren der Roridinsäure (**13**) und ihres Dimethylesters **14** zeigen wie Roridin A (**1**) ein intensives Absorptionsmaximum bei 256–258 nm; $\log \epsilon = 4,32$ (Äthanol). Die chromophore Gruppe des Antibioticums befindet sich somit im Roridinsäureteil der Molekel. Die beiden starken C=C-Banden bei 1600 und 1639 cm^{-1} und die Lage der einen C=O-Streckschwingung bei 1709–1715 cm^{-1} im IR.-Spektrum des Dimethylesters **14** sind mit dem Vorliegen eines α, β, γ - δ -ungesättigten Carbonsäureesters sehr gut zu vereinbaren. Die in den hydrierten Derivaten beobachteten spektralen Veränderungen bestätigen diese Annahme. Damit im Einklang sind auch die NMR.-Spektren von **13**, **14**, **15** und **16**, wo sich im Gebiet von $\tau = 2,2$ bis 4,3 Signale finden, die den vier Vinylprotonen an C-7', C-8', C-9' und C-10' zuzuordnen sind. Die Aufspaltungen und die Kopplungskonstanten der Protonen an C-8', C-9' und C-10' sind gleich wie beim *cis,trans*-Muconsäure-dimethylester und wie bei Verrucaridin A [7], wobei die beiden letzteren Protonen sogar die gleiche chemische Verschiebung zeigen¹⁴⁾. Das C-7'-Proton verursacht hingegen ein komplexeres Signal. Es ist in ein

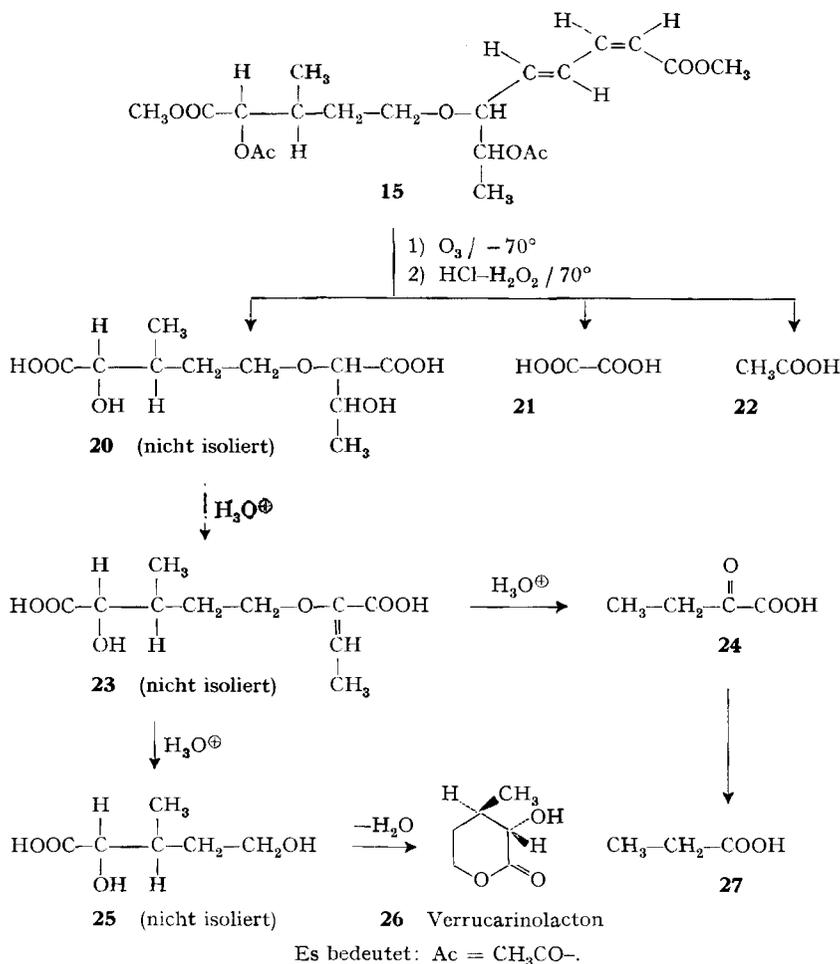
¹¹⁾ Alle Substanzen wurden in CDCl_3 gelöst, ausser Roridinsäure (**13**) und Tetrahydrororidinsäure (**17**), die in Deuteroaceton gemessen wurden. Beim Vergleich der in diesen beiden Lösungsmitteln erhaltenen Daten muss mit Abweichungen der chemischen Verschiebung bis zu 0,1 ppm gerechnet werden [13]. Bei eindeutig erkennbaren Feinstrukturen bedeuten: *s* = Singlett, *d* = Dublett, *dd* = doppeltes Dublett, *t* = Triplet; *q* = Quartett; *quin* = Quintett, *m* = Multiplett, *br* = breit. In Klammern sind die Spin-Spin-Kopplungskonstanten *J* in cps angegeben.

¹²⁾ Für die Einzelheiten der Zuordnung der Protonen des Verrucarolteils vgl. [12] [16].

¹³⁾ Die Bildung weiterer Nebenprodukte, wie sie bei der Oxydation von Roridin A (**1**) und des Roridinsäure-dimethylesters (**14**) unter diesen Bedingungen beobachtet wurde, war hier wegen des Fehlens der oxydationsempfindlichen olefinischen Doppelbindungen nicht möglich.

¹⁴⁾ Im *cis,trans*-Muconsäure-dimethylester und in Verrucaridin A erscheint das C-8' entsprechende Proton wegen des abschirmenden Effektes von zwei Estercarbonylgruppen bei wesentlich tieferem Feld als hier.

Formelschema 3



doppeltes Dublett aufgespalten, dessen grössere Kopplungskonstante aber mit dem entsprechenden Wert von *cis,trans*-Muconsäure-dimethylester übereinstimmt. Dies bedeutet, dass das benachbarte Kohlenstoffatom C-6' nicht als Carbonylgruppe vorliegt, sondern ein weiteres Proton trägt. Die Roridinsäure enthält somit die folgenden Strukturelemente:

sowie eine gesättigte Carboxylgruppe, eine sekundäre Methylgruppe, ein inertes Sauerstoffatom¹⁵⁾ sowie eine sekundäre Hydroxylgruppe. Das α-Proton der letzteren

¹⁵⁾ Die Stabilität der Roridinsäure und ihrer Derivate gegenüber Mineralsäuren schliesst eine Halbacetalgruppe aus.

erscheint in allen Verbindungen zwischen $\tau = 5,76$ und $5,91$ als Dublett¹⁶⁾. Infolgedessen kann an dem einen der beiden benachbarten C-Atome ebenfalls nur ein einziges Proton haften. Da weder die zur Diskussion stehende Hydroxylgruppe die Eigenschaften eines Allylkohols besitzt, noch der Bisdehydroester **19** diejenigen eines β -Diketons, ist das Nachbarproton weder identisch mit dem C-7'-Vinylproton, noch mit dem Proton an C-6' (C-6' trägt die C₂-Seitenkette)¹⁷⁾. In Wirklichkeit handelt es sich um das C-Atom, das die sekundäre Methylgruppe trägt. Damit findet auch die Verschiebung des Methylsignals bei $\tau = 9,12$ bis $9,23$ nach tieferem Felde nach Acetylierung ($\tau = 9,03$) und Dehydrierung ($\tau = 8,82$) der benachbarten HO-Gruppe eine plausible Erklärung. Für das andere, der sekundären HO-Gruppe benachbarte C-Atom kommt nur noch die Carboxylgruppe in Frage. Ihre Nachbarschaft erklärt auch gut, dass das Signal des α -Protons dieser sekundären HO-Gruppe bei ziemlich tiefem Feld ($\tau \approx 5,8$) erscheint. Damit ist die weitere Sequenz HOOC-CH(OH)-CH(CH₃)-festgelegt. Die normale chemische Verschiebung der sekundären Methylgruppe deutet darauf hin, dass das anschliessende Glied nicht die Ätherbrücke, sondern eine Methylengruppe¹⁸⁾ ist, woraus sich die Kette HOOC-CH(OH)-CH(CH₃)-CH₂- ergibt. Die Verknüpfung der ermittelten Teilstrukturen mit der noch nicht berücksichtigten Methylengruppe und des Äthersauerstoffs war aus den NMR.-Daten nicht mit Sicherheit abzuleiten. Immerhin waren sie am besten mit der Strukturformel **13** für die Roridinsäure vereinbar¹⁹⁾.

Einen chemischen Beweis für diese Struktur konnten wir durch einen oxydativen Abbau erbringen. Zu diesem Zwecke wurde der Di-O-acetylroridinsäure-dimethylester (**15**) bei -70° ozoniert und das Ozonid mit H₂O₂ in wässriger HCl auf 70° erhitzt. Aus dem Reaktionsgemisch liess sich durch Sublimation bei $40-60^\circ$ und 12 Torr in guter Ausbeute ein krist. Stoff abtrennen, der nach Smp., Misch-Smp., opt. Drehung, IR.-Spektrum und Dünnschichtchromatogramm mit dem Verrucarinsäurelacton (**26**) [7] identisch war. Gas-chromatographisch liessen sich ferner Essigsäure (**22**), Oxalsäure (**21**), α -Ketobuttersäure (**24**) und Propionsäure (**27**) nachweisen²⁰⁾. Der Abbau ist offenbar so verlaufen, dass die Ozonolyse zunächst 2 Mol-Äq. Oxalsäure, aus den Acetylgruppen 2 Mol-Äq. Essigsäure sowie die β -Hydroxydicarbonsäure **20** lieferte. Die Säure **20** ist unbeständig, da die β -ständige Hydroxylgruppe unter den stark sauren Reaktionsbedingungen sofort eliminiert wird. Es entsteht die α, β -ungesättigte Dicarbonsäure **23**, die ebenfalls nicht isoliert werden kann, da sie eine säureempfindliche Vinyläthergruppierung enthält. Die saure Spaltung liefert die Verrucarinsäure (**25**), die sofort in das stabile Verrucarinsäurelacton (**26**) übergeht. Damit sind die Lage des Äthersauerstoffs als Brücke zwischen C-5' und C-6' und die Verknüpfung der C₂-Seitenkette mit C-6' bewiesen.

¹⁶⁾ In den Acetylderivaten ist das Signal wie erwartet um ca. 0,86 ppm nach tieferem Feld verschoben.

¹⁷⁾ Auch die Anordnung der beiden Hydroxyle in einer Glykolgruppierung ist auszuschliessen, da die Roridinsäure (**13**) gegenüber HJO₄ beständig ist und der Bisdehydroester **19** sich nicht wie ein α -Diketon verhält.

¹⁸⁾ Da die Roridinsäure **13** und die Tetrahydrororidinsäure **17** keine Tendenz zur Lacton-Bildung zeigen, ist die Verknüpfung der CH₃-CH(OH)-Seitenkette mit diesem C-Atom unwahrscheinlich.

¹⁹⁾ Die Einzelheiten dieser Ableitung sind in der Dissertation B. BÖHNER, Basel 1964, beschrieben.

²⁰⁾ Wir danken Herrn Dr. H. WEHRLI, Sandoz A.G., Basel, bestens für diese Bestimmung.

Die Roridinsäure besitzt vier asymmetrische C-Atome. Da die relative und absolute Konfiguration der Verrucarinsäure (**25**) bekannt ist [7] [14], ist auch die absolute Konfiguration von C-2' und C-3' der Roridinsäure (**13**) bewiesen. Noch nicht abgeklärt hingegen ist die Stereochemie von C-6' und C-13'.

D. Verknüpfung der Hydrolysenprodukte: Konstitution von Roridin A. – Sowohl Roridin A (**1**) als auch die Hydrolysenprodukte Verrucarol (**10**) und Roridinsäure (**13**) besitzen je zwei Hydroxylgruppen. Die beiden Carboxylgruppen der Roridinsäure müssen infolgedessen mit zwei der insgesamt vier zur Verfügung stehenden Hydroxylgruppen verestert sein. Die eine freie HO-Gruppe von Roridin A (**1**) muss diejenige der $\text{CH}_3\text{-CH(OH)}$ -Seitenkette der Roridinsäure (**13**) sein, da bei der Dehydrierung von **1** und **5** die Methylketone **4** und **9** entstehen. Die andere befindet sich ebenfalls im Roridinsäureteil der Molekel, nämlich in α -Stellung zur gesättigten Estergruppe. Dies ist zunächst aus den NMR.-Daten ersichtlich, indem sich das Signal des α -Protons dieses C-2'-Hydroxyls nach der Acetylierung um 0,73 ppm (von $\tau = 5,91$ nach 5,18) nach tieferem Feld verschiebt, während die α -Protonen der primären und sekundären HO-Gruppe bzw. Estergruppe an C-4 und C-15 des Verrucarolteils unverändert bleiben. Diese auf der Interpretation von NMR.-Daten beruhende Annahme konnten wir chemisch beweisen, indem wir Monodehydro-tetrahydro-roridin A (**9**) mit $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ in Aceton [10] weiter dehydrierten und das gebildete Bisdehydroderivat **11**, dessen IR.-Spektrum keine freie Hydroxylgruppe mehr zeigte, mit methanolischem KOH hydrolysierten. Wir erhielten intaktes Verrucarol (**10**). Daraus folgt, dass in Roridin A (**1**) die beiden Carboxylgruppen der Roridinsäure (**13**) mit den beiden Hydroxylgruppen des Verrucarols (**10**) verestert sind. Für den resultierenden makrocyclischen Diester sind jetzt noch zwei Strukturen möglich. In der ersteren sind die gesättigte C-1'-Carboxylgruppe mit dem primären C-15-Hydroxyl und die konjugierte C-11'-Carboxylgruppe mit dem sekundären C-4-Hydroxyl des Verrucarols (**10**) verestert. In der zweiten Struktur sind die beiden Esterbindungen vertauscht. Zugunsten der ersten Struktur spricht, dass das doppelte Dublett des C-4-Protons bei ca. $\tau = 4,2$ sich in den Verbindungen **5**, **6**, **7** und **8** nach der Absättigung der C-7'- und C-9'-Doppelbindungen verändert, während das Singlett bei $\tau = 5,56$ der beiden C-15-Protonen gleich bleibt. Umgekehrt ist in Roridin D, das an Stelle des C-2'-Hydroxyls einen 2',3'-Oxidring enthält [15], dieses Signal in ein AB-System aufgespalten. Analog verhalten sich die entsprechenden Signale bei Verrucarol A [7] und Verrucarol B [8]. Im übrigen ist die chemische Verschiebung der beiden *cis*-Protonen an C-10' und C-11' in Roridin A (**1**) genau gleich wie in den Verrucarinen A [7], B [8] und J [9], wo sie denjenigen der *cis*-Doppelbindung der *cis,trans*-Muconsäure entsprechen. Die Verknüpfung der *cis,trans*-Muconsäure mit dem C-4-Hydroxyl des Verrucarols (**10**) ist in Verrucarol A durch einen oxydativen Abbau [16] und die RÖNTGEN-Analyse [14] und in Verrucarol J [9] durch partielle Hydrolyse bewiesen worden. Auf Grund der engen strukturellen Verwandtschaft zwischen den Verrucarinen und Roridinen dürfte die Sequenz der Bausteine im Makrocyclus in beiden Verbindungsreihen analog sein. Darum halten wir die für Roridin A vorgeschlagene Strukturformel **1** für gut begründet.

In Roridin A (**1**) liegt demnach ein makrocyclischer, 18gliedriger Diester vor, der eine C_2 -Seitenkette trägt. Das Antibioticum stellt eine biogenetisch interessante,

strukturelle Variante der Verrucarine dar, welche makrocyclische Triester des gleichen Sesquiterpenalkohols Verrucarol (**10**) sind, in denen aber die Seitenkette fehlt.

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 sowie der Molekulargewichte wurden 1 Std. bei 0,02 Torr und 40–60° getrocknet. Die UV.-Spektren wurden mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK 2, die IR.-Spektren mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125 und mit einem PERKIN-ELMER-Infracord-Spektrophotometer, Modell 137, mit NaCl-Optik (jeweils vermerkt), und die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrometer A-60 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 [17] diente Al_2O_3 der Fa. M. WOELM, Eschwege, oder Kieselgel MERCK der Korngrösse 0,05–0,2 mm in Anlehnung an die Methodik von DUNCAN [18]. Für die Dünnschichtchromatographie (DC) nach STAHL [19] [20] wurde Kieselgel G MERCK und für die Dickschichtplatte (zur Methodik vgl. [21]) Kieselgel-HF₂₅₄ MERCK als Träger und Chloroform mit 0,5–1,5% Methanol als Fließmittel verwendet. Die Flecke wurden durch J_2 -Dämpfe oder durch UV.-Licht, im Falle von Säuren auch durch Besprühen mit einer 0,04-proz. Lösung von Bromphenolblau in Äthanol und bei Ketonen mit einer Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthanol und HCl sichtbar gemacht.

1. Roridin A und Derivate des Roridins A

1.1 *Roridin A (1)*. Das verwendete Präparat zeigte die früher beschriebenen Eigenschaften [2]: aus Aceton-Äther Stäbchen vom Smp. 198–204°; $[\alpha]_D^{25} = +130^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,207$ in Chloroform); $[\alpha]_D^{25} = +192^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,380$ in Dioxan). UV.-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{max} = 263$ nm; $\log \epsilon = 4,31$. IR.-Spektrum u. a. Banden bei 3546 (OH); 1709–1701 (C=O); 1637 und 1597 cm^{-1} (C=C) (CH_2Cl_2), resp. 3472 (OH), 1742 (C=O, ges. Ester), 1704 (C=O, unges. Ester), 1631 und 1595 cm^{-1} (C=C) (KBr) vgl. Fig. 1. NMR.-Spektrum vgl. Fig. 2 und Tabelle 1. Mol.-Gew. Ber. 532,6; Gef.²¹⁾ 526 ± 11 und 543 ± 11 .

1.2 *Di-O-acetyloridin A (2)*. Eine Lösung von 233 mg Roridin A (**1**) in 5 ml Pyridin und 6 ml Acetanhydrid wurde 14 Std. bei 22° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum wurde der Rückstand in Chloroform aufgenommen und je einmal mit 2N HCl, Wasser, 2N Na_2CO_3 und noch zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum resultierten 240 mg Rohprodukt, welches nach Umkristallisieren aus Äther-Petroläther farblose Nadeln vom Smp. 165–166° lieferte. $[\alpha]_D^{25} = +168,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,108$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) u. a. Banden bei 1739 (C=O, ges. Ester), 1712 (C=O, unges. Ester), 1642 und 1600 cm^{-1} (C=C), keine HO-Bande. NMR.-Spektrum vgl. Tabelle 1. – Trocknung zur Analyse 1 Std. bei 100°.

$\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_{11}$	Ber. C 64,26	H 7,19	O 28,55%	Mol.-Gew. 616,7
	Gef. „ 64,22	„ 7,40	„ 28,21%	„ ²¹⁾ 604 ± 12

1.3 *Di-O-benzoyloridin A (3)*. Eine Lösung von 125 mg Roridin A (**1**) in 3 ml Pyridin wurde mit 0,12 ml (145 mg) Benzoylchlorid versetzt und 60 Std. bei 22° stehengelassen, wobei sich die Lösung orange färbte. Hierauf wurde bei 0° mit Methanol versetzt und 30 Min. stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum wurde der Rückstand je zweimal mit 2N HCl und Wasser, einmal mit 2N Na_2CO_3 und Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum wurde das Rohprodukt an 4 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Petroläther-Benzol-(1:1) eluierten Fraktionen bestanden aus Methylbenzoat und wenig Di-O-benzoyloridin A (**3**). Die mit Benzol und Dichlormethan eluierten Fraktionen lieferten aus Äther-Petroläther 87 mg reines **3** in Stäbchen vom Smp. 185–187°. $[\alpha]_D^{25} = +110^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,517$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2 , Infracord): u. a. Banden bei 1754 (C=O, ges. Ester); 1718 (C=O, unges. Ester); 1645 und 1600

²¹⁾ Vaporometrisch in CH_2Cl_2 ²⁾.

cm^{-1} (C=C). NMR.-Spektrum vgl. Tabelle 1. Keine HO-Bande. – Trocknung zur Analyse 2 Std. bei 90° .

$\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{O}_{11}$ (740,8) Ber. C 69,71 H 6,53 O 23,76% Gef. C 69,42 H 6,60 O 23,88%

1.4. [^{14}C]-Di-O-benzoyloridin A (3). Eine Lösung von 105 mg Roridin A (1) in 2 ml abs. Pyridin wurde mit 100 mg [^{14}C]-Benzoylchlorid 60 Std. bei 22° stehengelassen. Die wie oben beschriebene Aufarbeitung ergab 177 mg Rohprodukt, welches aus Äther-Petroläther kristallisierte. Die 4., 5. und 6. Kristallisation (Smp. $185\text{--}187^\circ$) zeigten eine konstante Radioaktivität von 4913 dpm/mg im Mittel.

Zum Vergleich wurde mit demselben [^{14}C]-Benzoylchlorid [^{14}C]-Benzanilid hergestellt: 0,1 ml Anilin, 0,14 ml [^{14}C]-Benzoylchlorid, 0,9 ml 2N NaOH und 1 ml Benzol wurden 10 Min. geschüttelt. Nach der Zugabe von Wasser wurde mit Äther ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt wurde mehrmals aus heissem Methanol umkristallisiert. Die 4. und 5. Kristallisation (Smp. $164\text{--}165^\circ$) zeigten eine konstante Radioaktivität von 1840000 dpm/mM im Mittel. Aus diesen Werten lässt sich für Di-O-benzoyloridin A (3) ein Mol.-Gew. von 750 errechnen, was einem Mol.-Gew. von 542 für Roridin A (1) entspricht.

1.5. Monodehydrororidin A (4). Eine Lösung von 235 mg Roridin A (1) in 15 ml Aceton wurde bei 22° unter Rühren mit 0,28 ml (entspricht 2 O-Äq.) CrO_3 -Stammlösung²²⁾ nach BOWDEN *et al.* [10] versetzt. Nach 10 Min. wurden 20 ml Wasser zugegeben und das Aceton im Vakuum weitgehend abgedampft. Nach Ausschütteln mit Dichlormethan, Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum resultierten 285 mg Rohprodukt. Weder durch Chromatographie an Al_2O_3 noch an Kieselgel nach DUNCAN [18] mit Dichlormethan-Methanol-(99:1) oder Äther als Eluierungsmittel war ein einheitliches Produkt zu gewinnen. Ein grösserer Teil blieb ausserdem auf den Säulen zurück, und zwar je mehr je länger die Chromatographie dauerte. Mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie [21] konnte schliesslich eine bessere Trennung erreicht werden. Glasplatten von der Grösse 20×50 cm wurden mit einer 2 mm dicken Schicht von Kieselgel HF_{254} MERCK bestrichen. An der Startlinie wurde mit einem Spatel ein 1 mm tiefer Graben ausgehoben. In diesen wurde die Lösung des Oxydationsgemisches in Dichlormethan-Methanol-(9:1) mittels einer 0,1-ml-Pipette, durch deren Spitze ein dünner Wollfaden eingezogen worden war, aufgetragen. Vorversuche zeigten, dass ohne Schwierigkeiten 4 mg Substanz pro cm aufgetragen werden kann. Zur Erreichung eines besseren Trenneffektes wurde horizontal in einer Apparatur nach BRENNER *et al.* [22] [20] unter Verwendung von Äther als langsam eluierendem Lösungsmittel nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Nach 1,5 Std. wurden die Zonen unter der UV.-Lampe (Uvanalys Fa. HOERNER, 254 μm) die Schicht an den betreffenden Stellen mit dem Spatel gelöst und mittels einer Vakuumsaugvorrichtung in einer Saugflasche gesammelt. Mit Dichlormethan, das wenig Methanol enthielt, wurden die Produkte vom Kieselgel herausgelöst. Es resultierte nach Eindampfen der Lösung gelbliches, amorphes Monodehydrororidin A (4), das im DC einheitlich war. Von 145 mg aufgetragenem Oxydationsgemisch (das z. T. schon durch verschiedene Säulen gelaufen war) wurden erhalten: 59 mg amorphes 4, 11 mg schneller laufende Produkte (nicht untersucht) und 70 mg an der Startlinie zurückgebliebene, intensiv gelb gefärbte saure Anteile (nicht untersucht). Monodehydrororidin A (4): $[\alpha]_D^{22} = +7^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,66$ in Chloroform). UV.-Spektrum: (in Cyclohexan) $\lambda_{\text{max}} = 278,5$ nm; $\log \epsilon = 4,25$; in Äthanol $\lambda_{\text{max}} = 262$ nm; $\log \epsilon = 4,18$. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei $3636\text{--}3676$ (schwach) und $3521\text{--}3546$ (OH); 1733 (C=O, ges. Ester); 1669 (C=O, unges. Keton?); 1629 und $1590\text{--}1595$ cm^{-1} (C=C). NMR.-Spektrum vgl. Tabelle 1. Die Iodoformprobe war positiv. Auf eine Analyse musste wegen der Empfindlichkeit der Substanz verzichtet werden.

1.6. Tetrahydrororidin A (5). Eine Lösung von 700 mg Roridin A (1) in 50 ml Äthanol wurde in Gegenwart von 200 mg 10-proz. Pd auf Kohle bei 22° hydriert. Nach 45 Min. waren genau zwei Mol.-Äq. H_2 aufgenommen worden, worauf die Hydrierung abgebrochen wurde. Nach Filtrieren durch eine Celite-Schicht und Eindampfen des Filtrats resultierten 705 mg Rohprodukt, das nicht kristallisierte. Nach Chromatographie an 30 g Al_2O_3 ergaben die mit Dichlormethan, welches 0,5–1% Methanol enthielt, eluierten Fraktionen aus Äther-Petroläther Nadeln vom Smp. $181\text{--}182^\circ$. $[\alpha]_D^{22} = +23^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,488$ in Chloroform). UV.-Spektrum (Äthanol): keine

²²⁾ Stammlösung: 2,67 g CrO_3 + 2,30 ml konz. H_2SO_4 mit H_2O auf 10 ml aufgefüllt.

selektive Absorption bei 260 nm. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 3534–3559 (OH); 1736 cm^{-1} (C=O, gesätt. Ester). NMR.-Spektrum vgl. Tabelle 1. Trocknung zur Analyse 3 Std. bei 100° .

$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_9$ Ber. C 64,90 H 8,26 O 26,84% Mol.-Gew. 536,6
Gef. „ 64,52 „ 8,43 „ 26,63% „ „ 531,2 \pm 11

1.7. *Di-O-acetyl-tetrahydro-roridin A (6)*. 140 mg Tetrahydrororidin A (4) wurden mit 3 ml Pyridin und 4 ml Acetanhydrid 16 Std. bei 22° stehengelassen. Nach der wie bei 2 beschriebenen Aufarbeitung resultierte 165 mg Rohprodukt, das auch nach Chromatographie an Al_2O_3 bisher nicht kristallisierte. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) u. a. Banden bei $1727\text{--}1739\text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester); keine HO-Bande (Infracord). Zur Analyse wurde das Präparat lyophilisiert und 3 Std. bei 25° getrocknet.

$\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_{11}$ (620,7) Ber. C 63,85 H 7,70 O 28,08% Gef. C 64,04 H 7,79 O 28,36%

1.8. *Monodehydro-tetrahydro-roridin A (10)*. Eine Lösung von 51 mg Tetrahydrororidin A (5) in 5 ml Aceton wurde mit 0,036 ml CrO_3 -Stammlösung²²⁾ (entspr. 1,5 O-Äq.) versetzt. Nach 10 Min. wurde wie bei 4 beschrieben aufgearbeitet. Es resultierten 43 mg Rohprodukt, das im DC zwei Flecke zeigte. Die Auftrennung erfolgte wieder mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie mit Äther als Lösungsmittel. Da die Oxydationsprodukte jedoch unter der UV.-Lampe nicht sichtbar waren, wurde zur Lokalisierung der Substanzzonen an drei Stellen der Platte das Oxydationsprodukt von Roridin A (1) aufgetragen (die Hauptprodukte der gesättigten und der ungesättigten Reihe liefen gleich schnell). Aus 70 mg aufgetragenem Rohprodukt wurden 37 mg amorphes, farbloses Monodehydro-tetrahydro-roridin A (10) erhalten. $[\alpha]_D^{22} = -4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,75$ in Chloroform). UV.-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{\text{max}} = 271\text{ nm}$; $\log \epsilon = 2,52$ (Verunreinigung?) IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei $3571\text{--}3597$ (OH); 1724 cm^{-1} (C=O, Ester und Keton). NMR.-Spektrum vgl. Tabelle 1. Jodoformprobe positiv.

1.9. *Hexahydro-roridin A (7)*. Eine Lösung von 149 mg Roridin A (1) in 20 ml Eisessig wurde in Gegenwart von 45 mg $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ bei 22° hydriert. Nach 11 Min. waren 32 ml H_2 (entspr. 3 Mol-Äq. ber. auf Roridin A) aufgenommen worden, worauf die Hydrierung abgebrochen wurde. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen des Filtrats im Vakuum wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, die Lösung mit $2\text{ N Na}_2\text{CO}_3$ und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt (143 mg) gab aus Äther-Petroläther nadelförmige Kristalle vom Smp. $148\text{--}152^\circ$ (z. T. Sintern ab 140°). $[\alpha]_D^{22} = +6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,04$ in Chloroform). UV.-Spektrum (Äthanol): keine selektive Absorption bei 260 nm. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei $3509\text{--}3534$ (OH); 1727 cm^{-1} (C=O, gesätt. Ester). NMR.-Spektrum vgl. Tabelle 1. – Trocknung zur Analyse 3 Std. bei 100° .

$\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_9$ (538,6) Ber. C 64,66 H 8,61 O 26,73% Gef. C 64,74 H 8,46 O 26,59%

1.10. *Di-O-acetyl-hexahydro-roridin A (8)*. 83 mg Hexahydrororidin A (7) wurde mit 2 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid 24 Std. bei 22° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum wurde der Rückstand in Chloroform aufgenommen und die Lösung mit 2 N HCl , $2\text{ N Na}_2\text{CO}_3$ und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 84 mg Rohprodukt, das im DC einheitlich war, aber auch nach Chromatographie an Al_2O_3 (neutral; Aktivitätsstufe I) bisher nicht kristallisierte. Im IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) u. a. Banden bei $1727\text{--}1736\text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester) keine HO-Banden.

2. Hydrolytische Spaltungen

2.1. *Hydrolyse von Roridin A (1) mit KOH*. Eine Lösung von 520 mg 1 in 65 ml $0,4\text{ N KOH}$ in Methanol wurde 68 Std. bei 22° stehengelassen. Sofort nach Zugabe der KOH-Lösung trat intensive Gelbfärbung ein. Am Ende der Reaktion war die Lösung nur noch schwach hellgelb. Nach Einengen im Vakuum und Zugabe von ca. 30 ml Wasser wurde 12mal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden zweimal mit wenig NaCl -Lösung gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Es resultierten 240 mg einheitliches, neutrales Rohprodukt, welches aus Äther in Stäbchen kristallisierte. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther wurde *Verrucarol (10)* in Nadeln vom Smp. $156\text{--}158^\circ$ erhalten. Nach Misch-Smp., DC, opt. Drehung und IR.-Spektrum mit authent. Material identisch.

Die obige wässrige Phase wurde unter Eiskühlung mit konz. HCl bis zur kongosauren Reaktion versetzt und 6mal mit Äther ausgeschüttelt. Nach zweimaligem Waschen der Auszüge mit

wenig NaCl-Lösung, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen resultierten 350 mg ölig, schwach gelb gefärbter Rückstand, der noch Wasser enthält. Nach dem Lösen in 5 ml abs. Äther, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen wurden 300 mg *Roridinsäure* (**13**) als Öl erhalten. Charakterisierung siehe unter 3.1.

2.2. *Bestimmung des Verseifungsäquivalents von Roridin A (1)*. Eine Lösung von 53 mg **1** in 3 ml Methanol und 1 ml 1N KOH wurde bei 22° stengelassen. Gleichzeitig wurde dieselbe Lösung ohne Roridin A als Blindprobe angesetzt. Nach 29 Std. war im DC kein Ausgangsmaterial mehr zu erkennen. Bei der Titration gegen Phenolphthalein verbrauchte die Lösung mit Roridin A 6,10 ml 0,1N HCl, die Blindprobe 8,26 ml 0,1N HCl. Berechnet für eine Estergruppe: 1,0 ml 0,1N HCl. Der gefundene Wert von 2,16 ml 0,1N HCl entspricht also zwei Esterbindungen.

2.3. *Hydrolyse von Tetrahydrororidin A (5) mit KOH*. Eine Lösung von 520 mg **5** in 60 ml 0,2N KOH in Methanol wurde 5 Tage bei 22° stengelassen. Durch Zugabe von 2N HCl wurde die Lösung auf pH=8 gebracht, dann wurde das Methanol im Vakuum weitgehend entfernt. Nach der Zugabe von 6 ml Wasser wurde 6mal mit Dichlormethan ausgeschüttelt, die Auszüge mit wenig NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Es resultierten 241 mg neutrales Rohprodukt, das aus Aceton-Äther krist. *Verrucarol* (**10**) vom Smp. 156–159° lieferte. Drei weitere Extraktionen lieferten noch 5 mg *Verrucarol*. Nach Misch-Smp., opt. Drehung, IR.-Spektrum identisch mit authent. Präparat. Hierauf wurde die wässrige Phase mit konz. HCl bis zur kongosauren Reaktion versetzt, 6mal mit Äther ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Nach einstündigem Trocknen im Hochvakuum bei 22° resultierten 280 mg *Tetrahydrororidinsäure* (**17**) als fast farbloses Öl. Charakterisierung siehe bei 3.5.

2.4. *Hydrolyse von Hexahydrororidin A (7) mit K_2CO_3* . Eine Lösung von 150 mg **7** in 5 ml Methanol und 5 ml 0,75N wässrigem K_2CO_3 wurde 22 Std. bei 22° stengelassen. Nach dreimaligem Ausschütteln mit Chloroform, Waschen mit wenig NaCl-Lösung, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum resultierten 64 mg kristallines, neutrales Rohprodukt. Weiteres gründliches Ausschütteln mit Chloroform lieferte weitere 5 mg Material. Nach Umkristallisieren aus Äther-Petroläther resultierte *Dihydroverrucarol A* (**12**) in feinen Nadeln vom Smp. 148–152° (ab 140° Sublimation). Nach Misch-Smp. und DC (Chloroform-Methanol-(85:15)) identisch mit authent. Material. – Die verbliebene wässrige Phase wurde mit konz. H_2SO_4 bis zur kongosauren Reaktion versetzt, dreimal mit Äther ausgeschüttelt und anschliessend noch 14 Std. im KURSCHER-STEUDEL-Extraktionsapparat mit Äther ausgezogen. Nach Trocknen der vereinigten Ätherauszüge und Eindampfen resultierten 87 mg saures Rohprodukt, das im DC (30-proz. Ammoniak-Wasser-Äthanol-(1:1:8)) den gleichen Rf-Wert aufwies wie *Tetrahydrororidinsäure* (**17**).

2.5. *Hydrolyse von Bisdehydro-tetrahydro-roridin A (11) mit KOH*. Eine Lösung von 65 mg Tetrahydrororidin A (**5**) in 5 ml Aceton wurde mit 0,03 ml CrO_3 -Stammlösung²²⁾ versetzt und 15 Min. bei 22° gerührt. Nach der wie bei 1.8. beschriebenen Aufarbeitung resultierten 45 mg Rohprodukt, das durch Dickschichtchromatographie getrennt wurde. Die Glasplatte (20 × 20 cm) war mit einer 2 mm dicken Schicht von Kieselgel HF₂₅₄-MERCK versehen. Als Lösungsmittel diente Dichlormethan mit 2-proz. Methanol. Aus der langsamer laufenden Zone wurde *Monodehydro-tetrahydro-roridin A* (**9**) als Hauptprodukt erhalten. Die am raschesten gewanderte Zone ergab 11 mg rohes *Bisdehydro-tetrahydro-roridin A* (**11**). Im IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. eine Bande bei 1736 cm^{-1} (C=O). HO-Banden fehlten. – 11 mg des Bisdehydroderivates **11** wurden mit 2 ml 0,5N KOH in Methanol bei 22° stengelassen. Nach 23 Std. war im DC kein Ausgangsmaterial mehr sichtbar. Hierauf wurde die Lösung mit Wasser versetzt und 6mal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Das nach Waschen der Extrakte mit NaCl-Lösung, Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen resultierende Rohprodukt ergab aus Aceton-Äther 5 mg reines krist. *Verrucarol* (**10**) vom Smp. 154–157°. Nach Misch-Smp., DC und IR.-Spektrum identisch mit authent. Material.

3. Roridinsäure und Derivate der Roridinsäure

3.1. *Roridinsäure* (**13**). Schwach gelb gefärbtes Öl; im DC (30-proz. Ammoniak-Wasser-Äthanol-(1:1:8)) einheitlich. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +47 \pm 2^\circ$ ($c = 0,825$ in Methanol). UV.-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ nm}$; $\log \epsilon = 4,32$. Im IR.-Spektrum (Film) u. a. Banden bei 3226–3571 (OH, assoz.), 1695–1724 (C=O, gesätt. und unges.), 1642 und 1600 cm^{-1} (C=C). NMR.-Spektrum vgl. Tab. 1. Das Öl destillierte bei 120° Badtemp. und 0,01 Torr, wobei es sich zum Teil zersetzte.

3.2. *Roridinsäure-dimethylester (14)*. Eine Lösung von 235 mg Roridinsäure (**13**) in 15 ml Äther und ca. 0,5 ml Methanol wurde bei 0° mit ätherischem Diazomethan versetzt. Nach 5 Min. wurde bei 0° das überschüssige Diazomethan im Vakuum entfernt, worauf nach Abdampfen des Lösungsmittels 250 mg hellgelbes Öl zurückblieben. Destillation bei 0,04 Torr im Bad von 130° lieferte Roridinsäure-dimethylester (**14**) als farbloses Öl. $[\alpha]_D^{25} = +62^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,995$ in Chloroform). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{max} = 258$ nm; $\log \epsilon = 4,32$; in Cyclohexan: $\lambda_{max} = 254$ nm; $\log \epsilon = 4,33$. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 3534–3559 (OH); 1724–1730 (C=O, gesätt. Ester); 1709–1715 (C=O, unges. Ester); 1639 und 1600 cm^{-1} (C=C) (vgl. Fig. 4). NMR.-Spektrum vgl. Tab. 1 und Fig. 5. – Trocknung zur Analyse 2 Std. bei 50°, vor der O-Bestimmung nochmals 2 Std. bei 50° getrocknet.

$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7$ (330,3) Ber. C 58,17 H 7,93 O 33,9% Gef. C 57,22 H 7,98 O 33,8%

3.3. *Di-O-acetylororidinsäure-dimethylester (15)*. Eine Lösung von 115 mg Roridinsäure-dimethylester (**14**) in 1 ml Pyridin und 0,8 ml Acetanhydrid wurde 16 Std. bei 35° stehengelassen. Die wie bei den obigen Acetylierungen durchgeführte Aufarbeitung ergab 108 mg gelbliches Öl, das im DC einheitlich war. Nach Destillation bei 80° Badtemp. und 0,01 Torr wurde der Di-O-acetylororidinsäure-dimethylester (**15**) als farbloses Öl erhalten. $[\alpha]_D^{24} = +58^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,838$ in Chloroform). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{max} = 256$ nm; $\log \epsilon = 4,30$; in Cyclohexan: $\lambda_{max} = 254$ nm; $\log \epsilon = 4,38$. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 1715–1754 (C=O, gesätt. und ungesätt. Ester, Acetyl), 1645 und 1603 cm^{-1} (C=C); keine HO-Bande (Infracorad). NMR.-Spektrum vgl. Tabelle 1. – Trocknung zur Analyse 13 Std. bei 40°.

$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_9$ Ber. C 57,95 H 7,30 O 34,75% Mol.-Gew. 414,4
Gef. „ 58,02 „ 7,49 „ 34,60% „ „ 428 \pm 15

3.4. *Monodehydrororidinsäure-dimethylester (16)*. Eine Lösung von 67 mg Roridinsäure-dimethylester (**14**) in 50 ml Aceton wurde unter Rühren mit 0,1 ml (entspr. 2 O-Äquiv.) CrO_3 -Stamm-lösung²²) versetzt. Nach 10 Min. war die Lösung dunkelgrün gefärbt, worauf mit 10 ml Wasser versetzt und das Aceton im Vakuum abgedampft wurde. Nach Ausschütteln mit Dichlormethan, Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen resultierten 60 mg schwach gelb gefärbtes Öl, das im DC (Chloroform-Methanol-(97:3)) zwei schneller als das Ausgangsmaterial laufende Flecke zeigte. Das Rohprodukt wurde deshalb während 15 Min. nachoxydiert, worauf nach gleicher Aufarbeitung wie oben 42 mg öliges Rohprodukt erhalten wurde, das im DC fast einheitlich war. Es wurde an 40 g Kieselgel mit Dichlormethan-Methanol-(97:3) als Lösungsmittel nach DUNCAN [18] gereinigt. Es wurden 36 mg reiner Monodehydrororidinsäure-dimethylester (**16**) als farbloses Öl erhalten. Jodoformprobe positiv. UV.-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{max} = 259$ nm; $\log \epsilon = 4,12$ mit Schulter bei $\lambda_{max} = 290$ nm. IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 3571 (schwach); 3472–3509 (OH); 1709–1727 (C=O, ges. und ungesätt. Ester), 1629–1634 und 1590–1595 cm^{-1} (C=C). NMR.-Spektrum vgl. Tabelle 1.

3.5. *Tetrahydrororidinsäure (17)*. Das Öl (s. 2.3.) destillierte bei 120° Badtemp. und 0,01 Torr. Im DC (30-proz. Ammoniak-Wasser-Äthanol-(1:1:8)) einheitlich. IR.-Spektrum (Film): u. a. Banden bei 2500–3571 (OH, assoz.) und 1709–1721 cm^{-1} (C=O). NMR.-Spektrum vgl. Tabelle 1. Titration: Eine Lösung von 26,8 mg **17** in 1 ml ca. 1N wässriger KOH verbrauchte zur Neutralisation gegen Phenolphthalein 7,04 ml 0,1N HCl. Die Blindprobe verbrauchte 8,94 ml 0,1N HCl. Differenz für Dicarbonsäure: Gef. 1,90 ml; Ber. 1,85 ml 0,1N HCl. – Trocknung zur Analyse 4 Std. bei 50°.

$\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_7$ (306,3) Ber. C 54,89 H 8,55 O 36,56% Gef. C 54,37 H 8,64 O 36,9%

3.6. *Tetrahydrororidinsäure-dimethylester (18)*. Eine Lösung von 54 mg Tetrahydrororidinsäure (**17**) in 5 ml abs. Methanol wurde bei 0° mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Nach 5 Min. wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (60 mg farbloses Öl, im DC – Chloroform-Methanol-(95:5) – einheitlich) lieferte nach Destillation bei 100° Badtemp. und 0,01 Torr reinen Tetrahydrororidinsäure-dimethylester (**18**) als farbloses Öl. $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,29$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u. a. Banden bei 3546–3559 (OH); 1724–1733 cm^{-1} (C=O, Ester). NMR.-Spektrum vgl. Tabelle 1. – Trocknung zur Analyse 2 Std. bei 50°.

$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_7$ Ber. C 57,46 H 9,05 O 33,49% Mol.-Gew. 334,4
Gef. „ 57,47 „ 9,31 „ 33,2% „ „ 349 \pm 7

3.7. *Bisdehydro-tetrahydro-roridinsäure-dimethylester (19)*. Eine Lösung von 91 mg Tetrahydrororidinsäure-dimethylester (**18**) in 20 ml Aceton wurde unter Rühren mit 0,068 ml CrO₃-Stammllösung²³) (entspr. 1 O-Äq.) versetzt, worauf die Lösung sofort grün wurde. Ein zweites O-Äquivalent war nach 10 Min. verbraucht. Nach der wie oben beschriebenen Aufarbeitung resultierten 82 mg farbloses Öl, das im DC (Chloroform-Methanol-(97:3)) zwei schneller laufende Flecke zeigte. Nach Chromatographie an Kieselgel mit Chloroform-Methanol-(97:3) als Lösungsmittel (Methodik nach DUNCAN [18]) wurden 61 mg reiner Bisdehydro-tetrahydro-roridinsäure-dimethylester (**19**) als farbloses Öl erhalten. $[\alpha]_D^{25} = +20^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,146$ in Chloroform). UV.-Spektrum (Cyclohexan): Schulter bei 275–300 nm; $\log \epsilon = 1,75$. IR.-Spektrum (CH₂Cl₂): u. a. Banden bei 1724–1730 cm⁻¹ (C=O, Ester und Keton); keine HO-Bande mehr. NMR.-Spektrum (CDCl₃) vgl. Tabelle 1 und Fig. 6.

3.8. *Ozonabbau von Di-O-acetylroridinsäure-dimethylester (15)*. – 1. *Versuch*: In eine Lösung von 39 mg reinstem Di-O-acetylroridinsäure-dimethylester (**15**) in 10 ml Dichlormethan, das 10% Methanol enthielt, wurde bei –70° bis zur deutlichen, bleibenden Blaufärbung Ozon eingeleitet (5 Min.). Hierauf wurde bei möglichst tiefer Temperatur im Vakuum eingedampft. Der teilweise kristalline Rückstand wurde mit 3 ml 2N wässriger HCl und 0,3 ml 30-proz. H₂O₂ versetzt und 3,5 Std. bei 65° gerührt. Nach 3maligem Ausschütteln mit Dichlormethan wurde mit wenig NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Im öligen Rückstand (24 mg) zeigten sich nach einiger Zeit Kristalle. Nach nochmaligem analogem Ausschütteln der wässrigen Lösung mit Dichlormethan wurden noch weitere 5 mg Öl erhalten. Die analoge Behandlung mit Äther lieferte weitere 3 mg Öl. Die vereinigten Rohprodukte ergaben durch Sublimation im Molekularkolben bei 80° Badtemp. und 16 Torr 5 mg farblose Kristalle. Nach Umkristallisieren aus Äther resultierte reines Verrucarinsäurelacton (**26**) vom Smp. 101–103°. Nach Misch-Smp., DC und IR.-Spektrum identisch mit authent. Material.

2. *Versuch*: Nach analoger Ozonisierung von 240 mg **15** resultierten: 70 mg Dichlormethanextrakt und 30 mg Ätherextrakt I (nach 3maligem Ausschütteln) und 30 mg Ätherextrakt II (nach weiteren 6 Ausschüttelungen) (noch Feuchtigkeit enthaltend). Die Auszüge wurden ohne

Tabelle 2. *Gas-Chromatographie der Ozonisierungsprodukte von 15*

Substanz	auth.	Dichlor-	Äther-	Äther-	Subl.-Prod.		
	Mat.	methan-	Extrakt I	Extrakt II	aus 1. Vers.		
		Extrakt	(1. Vers.)	(2. Vers.)			
	Ret.	Ret.	F%	Ret.	F%	Ret.	F%
Nicht identifizierte Spitze			734	16 (10)			
α -Ketobuttersäure I (24) ^{a)}	776,5	776	12,5				
α -Ketobuttersäure II (24) ^{a)}	800,8	800	8				
Essigsäure (22)	863			854	80 (78)	865	88
α -Ketobuttersäure III (24) ^{a)}	885	885	25				
Oxalsäure (21)	924					928	1,5
Propionsäure (27)	969			967	2 (11)		
Nicht identifizierte Spitze		1109	11,2			1109	3
Verrucarinsäurelacton (26)	1357	1357	36,6				1357 97,6

Abkürzungen: Ret. = Retentionsindex, F% = Flächenprozent.

a) Die α -Ketobuttersäure gibt drei Spitzen.

vorherige Sublimation direkt mit einem Gas-Chromatographen PERKIN-ELMER, Modell 116E (Säule: BA 2m derselben Fa; flüssige Phase Di-2-äthylhexylsebacat mit 10% Sebacinsäure) untersucht (Resultate s. Tab. 2).

SUMMARY

The antibiotic roridin A ($C_{29}H_{40}O_9$) yields on base catalysed hydrolysis verrucarol (**10**) and roridinic acid (**13**) ($C_{14}H_{22}O_7$), a hitherto unknown dicarboxylic acid whose structure was proved by degradation. In roridin A **10** and **13** are united to form a macrocyclic diester to which structure **1** is assigned.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 10. Mitteilung: E. FETZ & CH. TAMM, *Helv.* **49**, 349 (1966).
- [2] E. HÄRRI, W. LOEFFLER, H. P. SIGG, H. STÄHELIN, CH. STOLL, CH. TAMM & D. WIESINGER, *Helv.* **45**, 839 (1962).
- [3] B. BÖHNER, E. FETZ, E. HÄRRI, H. P. SIGG, CH. STOLL & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 1079 (1965).
- [4] A. N. KISHABA, D. L. SHANKLAND, R. W. CURTIS & M. C. WILSON, *J. Economic Entomology* **55**, 211 (1962).
- [5] M. E. RÜSCH & H. STÄHELIN, *Arzneimittel-Forsch.* **75**, 893 (1965).
- [6] Vgl. W. SIMON & W. TOMLINSON, *Chimia* **14**, 305 (1960); CH. CHYLEWSKY & W. SIMON, *Helv.* **47**, 515 (1964).
- [7] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 157 (1965).
- [8] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 177 (1965).
- [9] E. FETZ, B. BÖHNER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 1669 (1965).
- [10] K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* **1946**, 39.
- [11] G. V. D. TIERS, *J. physic. Chemistry* **62**, 1151 (1958).
- [12] CH. TAMM & J. GUTZWILLER, *Helv.* **45**, 1726 (1962); J. GUTZWILLER, R. MAULI, H. P. SIGG & CH. TAMM, *Helv.* **47**, 2234 (1964).
- [13] Vgl. L. M. JACKMAN, «Applications of NMR.-Spectroscopy in Organic Chemistry», New York 1959, p. 48.
- [14] A. T. MCPHAIL & G. A. SIM, *Chem. Comm.* **1965**, 350; *J. chem. Soc.* **1966**, 1394.
- [15] B. BÖHNER & CH. TAMM, *Helv.* **49**, 2547 (1966).
- [16] W. ZÜRCHER, J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* **48**, 840 (1965).
- [17] Vgl. T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc.* Nr. 7, 305 (1949).
- [18] G. R. DUNCAN, *J. Chromatography* **8**, 37 (1962).
- [19] E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962.
- [20] K. RANDEATH, «Dünnschichtchromatographie», Verlag Chemie, Weinheim 1962.
- [21] F. J. RITTER & G. M. MEYER, *Nature* **193**, 941 (1962); C. G. HONEGGER, *Helv.* **45**, 1409 (1962); H. HALPAAP, *Chem. Ing. Technik* **35**, 488 (1963).
- [22] M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* **17**, 237 (1961). Vgl. auch K. RANDEATH [19].