

(3) There exists a difference between K and MK-4 inasmuch as MK-4 is absorbed better and reaches much higher values in the various organs, *e.g.* in the heart muscle.

Forschungsabteilung der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. A.G.,
Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] U. GLOOR, J. WÜRSCH, H. MAYER, O. ISLER & O. WISS, *Helv.* **49**, 2582 (1966).
 [2] F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, *Helv.* **44**, 1956 (1961).
 [3] O. WISS, R. H. BUNNELL & U. GLOOR, *Vitamins & Hormones* **20**, 441 (1962).

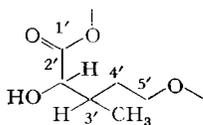
301. Isolierung von 2'-Dehydroverrucarin A als Metabolit von *Myrothecium roridum* TODE *ex Fr.*, Gattungstyp bei FRIES

Verrucarine und Roridine, 13. Mitteilung [1]

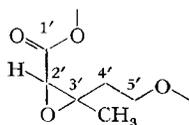
von W. Zürcher und Ch. Tamm

(25. X. 66)

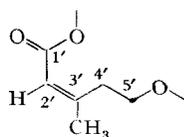
Aus Kulturen von *Myrothecium verrucaria* (ALBERTINI *et* SCHWEINITZ) DITMAR *ex* FRIES und von *Myrothecium roridum* TODE *ex Fr.*, Gattungstyp bei FRIES, haben wir in den letzten Jahren zahlreiche Antibiotica isoliert, die als makrocyclische Diester (Roridin-Reihe) und Triester (Verrucarine-Reihe) des Sesquiterpen-Alkohols Verrucarol erkannt wurden¹⁾. Als Derivate des Verrucarols unterscheiden sich diese Verbindungen lediglich im Bau bzw. der Oxydationsstufe des Säureanteils der Molekel, insbesondere an den Kohlenstoffatomen 2' und 3'. Verrucarin A und Roridin A besitzen eine 2'-Hydroxygruppe. In Verrucarin B und Roridin D ist sie durch einen 2',3'-Oxiraning ersetzt und in Verrucarin J und Roridin E liegen die 2'-Anhydroderivate des Verrucarins A bzw. des Roridins A vor:



Verrucarin A [4]
Roridin A [5]



Verrucarin B [6]
Roridin D [1]



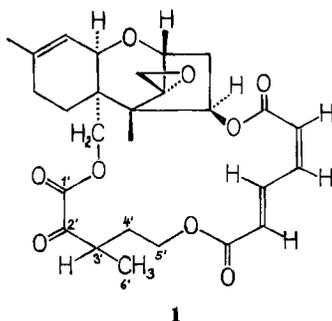
Verrucarin J [7]
Roridin E [8]

Fütterungsversuche mit 2-[¹⁴C]-Na-Mevalonat haben ergeben, dass die Kette der Kohlenstoffatome 1' bis 5' und die an C-3' haftende Methylgruppe aus der Mevalonsäure stammen [9]. Im Hinblick auf die Abklärung der Zwischenstufen, die bei der Umformung der Mevalonsäure in die bei den Verrucarinen und Roridinen vorliegenden

¹⁾ Zur Isolierung der Verrucarine und Roridine vgl. [2] [3].

Strukturen durchlaufen werden, kommt der in dieser Mitteilung beschriebenen Isolierung von 2'-Dehydroverrucarin A (**1**) besondere Bedeutung zu.

Nach der üblichen Extraktion eines Kulturansatzes eines Stammes (S 1135) von *Myrothecium roridum* und nach sorgfältiger chromatographischer Trennung der Rohextrakte an Silicagel erhielten wir zunächst Roridin A (220 mg/l) und Verrucarin A (83 mg/l) als Hauptprodukte, sowie in kleineren Mengen Roridin D (16 mg/l), Verrucarin B (5 mg/l) und Verrucarin J (0,5 mg/l). Nach weiterer Fraktionierung der nach der Abtrennung von Verrucarin A und B verbliebenen Mutterlaugenrückstände an einer Kieselgelsäule konnten wir eine weitere einheitliche Substanz [Nadeln vom Smp. 233–240°; $[\alpha]_D^{25} = +118^\circ \pm 2^\circ$ (Chloroform)] isolieren (2 mg/l). In den Dünnschichtchromatogrammen wanderte der Stoff etwas schneller als Verrucarin A, aber gleich wie die etwas weniger polaren Verrucarine B, J und H²⁾. Die vaporometrische Molekulargewichtsbestimmung³⁾ und das Massenspektrum⁴⁾ ergaben die Summenformel C₂₇H₃₂O₉ (500,5). Das UV.-Spektrum zeigte ein intensives Absorptionsmaximum bei 262 nm; log $\epsilon = 4,37$ (Äthanol). Das IR.-Spektrum war durch intensive C=O-Streckschwingungen bei 1710 und 1725 cm⁻¹ und durch starke C=C-Banden bei 1590 und 1630 cm⁻¹ sowie durch die Abwesenheit von Hydroxylschwingungen charakterisiert. Diese Eigenschaften, wie auch das NMR.-Spektrum, sprachen für das Vorliegen von 2'-Dehydroverrucarin A (**1**). Der direkte Vergleich der Spektren, der Laufstrecke im Dünnschichtchromatogramm und der Misch-Smp. bestätigten die Identität der isolierten Verbindung mit einem Präparat, das früher durch vorsichtige Dehydrierung von Verrucarin A mit CrO₃-H₂SO₄ in Aceton bereitet worden war [4]⁵⁾.



Nach den bei der Aufarbeitung des Kulturansatzes eingehaltenen Bedingungen ist das Vorliegen eines Artefaktes sehr unwahrscheinlich. Auch die nachgewiesene Menge von 2'-Dehydroverrucarin A, die in der Grössenordnung der anderen isolierten Nebenprodukte liegt, spricht dagegen. 2'-Dehydroverrucarin A (**1**) ist deshalb ein genuiner Metabolit von *Myrothecium roridum*.

²⁾ Die Dünnschichtchromatographie der Verrucarine und Roridine ist von BÖHNER *et al.* [3] genau beschrieben worden.

³⁾ Wir verdanken diese Bestimmung Herrn Prof. Dr. W. SIMON, ETH, Zürich.

⁴⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. K. L. RINEHART JR., University of Illinois, Urbana, Ill., USA, bestens für diese Messung.

⁵⁾ Figuren der IR.- und NMR.-Spektren von 2'-Dehydroverrucarin A sind bereits publiziert worden. Vgl. [4].

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

Experimentelles. – *Allgemeines:* 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 des Molekulargewichts wurden 1 Std. bei 40–60°/0,02 Torr getrocknet. Es wurden das UV.-Spektrum mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK 2, die IR.-Spektren mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, und das NMR.-Spektrum mit einem VARIAN-Spektrometer A-60 aufgenommen. Zur Säulenchromatographie nach der Durchlaufmethode [10] dienten Silicagel (engporig 0,15–0,30 mm Dr. BENDER & Dr. HOBEIN AG, Zürich) und, bei Anwendung der Methodik von DUNCAN [11], Kieselgel MERCK (Korngrösse 0,05–0,2 mm. Zur Dünnschichtchromatographie (DC) der Verrucarine und Roridine vgl. [3].

Isolierung von 2'-Dehydroverrucarin A (1). Die Züchtung des Stammes S 1135 von *Myrothecium roridum* wurde wie früher beschrieben, in 10-Liter-Fermentern (Typ F 314, NEW BRUNSWICK SC. CO., New Brunswick, N. J., USA) vorgenommen [2] [3]⁶⁾. 57 l Kulturbrühe aus 6 Kulturansätzen zu je 10 l wurden 4mal mit je 12 l Essigester extrahiert. Die Extrakte wurden im Vakuum eingedampft.

Chromatographie I: Der ölige Rückstand (158 g) wurde an 5 kg Silicagel (BENDER & HOBEIN)⁷⁾ chromatographiert. Zum Nachwaschen diente je 1 l Lösungsmittel pro Fraktion.

Die Fr. 1–63, eluiert mit Dichlormethan-Methanol-(99:1), ergaben inaktives Öl (Schaumbekämpfungsmittel aus der Fermentation); verworfen.

Die Fr. 64–67, eluiert mit Dichlormethan-Methanol-(98:2) (8,5 g), ergaben aus Aceton-Äther 4,0 g Rohkristallisat bestehend aus Verrucarin A, wenig Verrucarin B und wenig 2'-Dehydroverrucarin A. Weitere Trennung s. Chromatographie II. Trennung der Mutterlaugenrückstände s. Chromatographie IV.

Die Fr. 68–70, eluiert mit Dichlormethan-Methanol-(98:2) (5,5 g), lieferten aus Aceton-Äther 1,9 g Rohkristallisat bestehend aus Verrucarin A, Verrucarin B und Roridin D. Weitere Trennung s. Chromatographie III. Trennung der Mutterlaugenrückstände s. Chromatographie IV.

Die Fr. 71–78, eluiert mit Dichlormethan-Methanol-(98:2) ergaben 3,4 g Rohkristallisat, bestehend aus Verrucarin A, Verrucarin B, Roridin A und Roridin D.

Die Fr. 79–89, eluiert mit Dichlormethan-Methanol-(98:2) (13,5 g), lieferten aus Aceton-Äther 9,0 g reines krist. Roridin A.

Chromatographie II: Die 4 g Rohkristallisat aus den Fr. 64–67 der Chromatographie I wurden nach DUNCAN [11] an 1 kg Kieselgel (MERCK) mit Dichlormethan-Methanol-(99:5) als Lösungsmittel chromatographiert. Fr. 9 ergab aus Aceton-Äther 50 mg reines 2'-Dehydroverrucarin A (1) in Nadeln vom Smp. 233–240° $[\alpha]_D^{25} = +118^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,497$ in Chloroform). Misch-Smp. mit authent. Material [4] war gleich, ebenso die Laufstrecke im DC, das IR.- und NMR.-Spektrum⁸⁾.

Die Fr. 10 und 11 lieferten aus Aceton-Äther 190 mg reines krist. Verrucarin B und die Fr. 14–19 aus Aceton-Äther 2,2 g reines krist. Verrucarin A.

Chromatographie III: Die 1,9 g Rohkristallisat der Fr. 68–70 der Chromatographie I wurden nach DUNCAN [11] an 500 g Kieselgel (MERCK) mit Dichlormethan-Methanol-(99:1) als Lösungsmittel chromatographiert.

Fr. 2 ergab aus Aceton-Äther 50 mg reines krist. Verrucarin B.

Fr. 3 ergab aus Aceton-Äther 830 mg Rohkristallisat, bestehend aus Verrucarin A und B.

⁶⁾ Wir danken den Herren Dres. CH. STOLL und E. HÄRRI, SANDOZ AG, Basel, bestens für die Durchführung der Züchtungen.

⁷⁾ In späteren Versuchen wurde Kieselgel MERCK verwendet, womit schärfere Trennungen erzielt werden konnten.

⁸⁾ GUTZWILLER & TAMM [4] hatten für das teilsynthetische Präparat, hergestellt aus Verrucarin A, den Smp. 220° (Zers. ab 280°) (kristallisiert aus Äther) und $[\alpha]_D^{25} = +114^\circ \pm 3^\circ$ (Chloroform) gefunden.

Die Fr. 4–12 lieferten aus Aceton-Äther 600 mg reines krist. Verrucarın A.

Die Fr. 13–16 ergaben aus Aceton-Äther 360 mg reines krist. Roridin D.

Chromatographie IV: Die vereinigten Mutterlaugenrückstände der Fr. 64–70 der Chromatographie I (ca. 6 g) wurden nach DUNCAN [11] an 500 g Kieselgel mit Dichlormethan-Methanol (995:5) als Lösungsmittel chromatographiert. Es wurden 100 mg reines krist. Verrucarın B, 900 mg reines krist. Verrucarın A, 820 mg reines krist. Roridin D, 800 mg rohes krist. Roridin A und 100 mg Rohkristallisat, bestehend aus Verrucarın A und Verrucarın B, erhalten.

Die Identifizierung der isolierten Stoffe erfolgte durch Smp., Misch-Smp., spez. Drehung, DC, IR.- und NMR.-Spektren nach den Angaben der früher zitierten Lit.

Nach der weiteren chromatographischen Trennung der verbliebenen Kristallgemische und Mutterlaugen, analog zu den Chromatographien I–IV vorgenommen, wurden insgesamt in reinen Kristallen erhalten: 13,2 g Roridin A (entspr. 220 mg/l Kulturlösung), 5,0 g Verrucarın A (83 mg/l), 0,96 g Roridin D (16 mg/l), 0,3 g Verrucarın B (5 mg/l), 120 mg 2'-Dehydroverrucarin A (2 mg/l) und 0,03 g Verrucarın J (0,5 mg/l).

SUMMARY

From cultures of *Myrothecium roridum* TODE ex FRIES 2'-dehydroverrucarin (1) was isolated. 1 is a genuin metabolite of the micro-organism.

Institut für organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 12. Mitteilung: B. BÖHNER & CH. TAMM, *Helv.* 49, 2547 (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] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* 48, 157 (1965).
 - [5] B. BÖHNER & CH. TAMM, *Helv.* 49, 2527 (1966).
 - [6] J. GUTZWILLER & CH. TAMM, *Helv.* 48, 177 (1965).
 - [7] E. FETZ, B. BÖHNER & CH. TAMM, *Helv.* 48, 1669 (1965).
 - [8] W. ZÜRCHER & CH. TAMM, unpublizierte Versuche.
 - [9] R. ACHINI & CH. TAMM, spätere Mitteilung.
 - [10] Vgl. T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc.* Nr. 7, 305 (1949).
 - [11] G. R. DUNCAN, *J. Chromatography* 8, 37 (1962).
-