

## 215. Die Struktur des Antibioticums Roridin H

Verrucarine und Roridine, 20. Mitt. [1]

von P. Traxler und Ch. Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

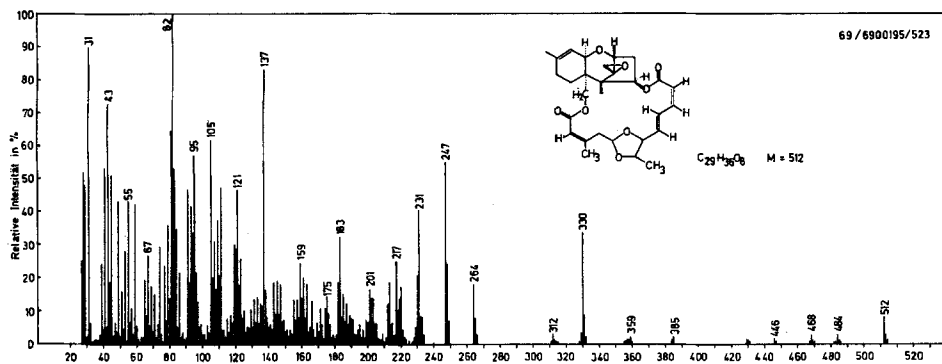
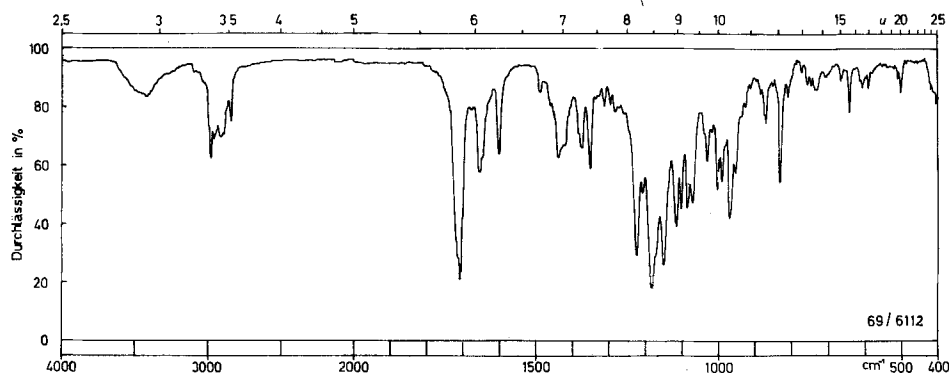
(4. IX. 70)

*Summary.* Structure **1** has been established for roridin H ( $C_{29}H_{36}O_8$ ), an antibiotic isolated from *Myrothecium verrucaria* and formerly named verrucaridin H [3]. Base catalysed hydrolysis of **1** gave the known terpene alcohol verrucarol (**8**;  $C_{15}H_{22}O_4$ ) and myrothecinic acid (**3**;  $C_{14}H_{18}O_6$ ), a previously undescribed dicarboxylic acid. The structure of **3** was determined by spectral methods and by chemical cleavage of the unusual acetal group of dimethyl hexahydromyrothecinoate (**6**) by hydrolysis with HCl in the presence of 2,4-dinitrophenylhydrazine, producing the 2,4-dinitrophenylhydrazone **13** of 3-methylglutaric acid semialdehyde **10** and methyl 6,7-dihydroxy-octanoate (**11**). **13** was transformed into dimethyl 3-methylglutarate (**15**). Cleavage of **11** with  $HIO_4$  gave acetaldehyde and adipic acid semialdehyde (**17**) which was oxidized to adipic acid (**19**). The 220 MHz NMR. spectra of roridin H (**1**) and dimethyl hexahydromyrothecinoate (**6**) allowed unequivocal assignment of the signals to the majority of the protons in the antibiotic.

Roridin H ist eines der zahlreichen cytotatisch wirksamen Stoffwechselprodukte, die in den vergangenen Jahren aus Kulturen von *Myrothecium*-Arten isoliert worden sind [2] [3] [4]. Erstmals wurde Roridin H aus dem Mycel des Stammes S 1198 von *Myrothecium verrucaria* gewonnen und damals als Verrucaridin H bezeichnet. Die jetzt vorgenommene Umbenennung erfolgt im Hinblick auf die nunmehr erkannte Struktur des Antibioticums. Roridin H ist der Hauptmetabolit des Stammes S 1198 von *M. verrucaria*. Daneben produziert dieser Stamm noch Verrucaridin A [5], Verrucaridin B [6], Verrucaridin J [7], Roridin A [8], Roridin D [9] und Roridin E [10]. Diese Stoffe lassen sich am besten durch Extraktion der gesamten Kulturbrühe mit Essigester oder chlorierten Kohlenwasserstoffen und anschliessende Chromatographie der Rohextrakte an Kieselsäulen gewinnen.

**1. Summenformel.** – Roridin H kristallisiert in farblosen Nadeln. Es zeigt wie die Verrucaridine A und B keinen definierten Schmelzpunkt. Nach beginnender Gelbfärbung bei ca.  $220^\circ$  tritt bei ca.  $270^\circ$  langsame Zersetzung ein. Unter  $325^\circ$  schmilzt das Antibioticum nicht. Die optische Drehung ist vom Lösungsmittel abhängig:  $[\alpha]_D^{23} = +31^\circ$  in Chloroform,  $[\alpha]_D^{23} = +40^\circ$  in Benzol und  $[\alpha]_D^{23} = +31^\circ$  in Dioxan. Die Ermittlung der Bruttoformel von Roridin H bereitete Schwierigkeiten: Vaporometrisch (vgl. [11]) wurde für das Mol.-Gewicht  $490 \pm 25$  gefunden und zahlreiche Elementaranalysen lieferten damit übereinstimmend Werte, die am besten auf die Formel  $C_{27}H_{34}O_8$  (486,6) passten. Im hochaufgelösten Massenspektrum<sup>1)</sup> (vgl. Fig.1) hingegen wurde das Molekel-Ion bei  $m/e$   $512,2443 \pm 0,011$  gefunden, was der Formel  $C_{29}H_{36}O_8$  entspricht. Das hochaufgelöste Massenspektrum von Octahydrororidin H (s. unten) bestätigte diese Formel; das Molekel-Ion fand sich bei  $m/e$   $520,3028 \pm 0,011$ .

<sup>1)</sup> Wir danken Herrn Dr. H. Lichti, Sandoz AG, Basel, für die Aufnahme dieses Massenspektrums (CEC-Massenspektrometer 21-110 B).


 Fig. 1. Massenspektrum von Roridin H (1)<sup>1)</sup>

 Fig. 2. IR-Spektrum von Roridin H (1) fest in KBr<sup>2)</sup>

Auf Grund der im folgenden beschriebenen Reaktionen erteilen wir Roridin H die Strukturformel 1.

**2. Funktionelle Gruppen.** – Das UV.-Spektrum von Roridin H (1) ist durch drei intensive Absorptionsmaxima bei 195, 224 und 260 nm charakterisiert. Das IR.-Spektrum in KBr (vgl. Fig. 2) zeigt eine breite Carbonyl-Streckschwingung bei  $1710\text{ cm}^{-1}$  und zwei C=C-Banden bei  $1656$  und  $1603\text{ cm}^{-1}$ . Diese Spektren deuten auf eine  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigte Estergruppierung, wie sie in den bisher beschriebenen Verrucarinen und Roridinen vorkommt. Das zusätzliche Maximum bei 224 nm wurde bisher erst bei Verrucarin J und Roridin E beobachtet und weist auf eine weitere zusätzliche  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Estergruppierung [7] [10] hin. Die Carbonylbande ist in KBr nicht wie in Verrucarin A [5], Roridin A [8] und Roridin D [9], wo neben der ungesättigten eine gesättigte Estergruppierung vorhanden ist, zu einem Dublett aufgespalten, was auf die Abwesenheit einer gesättigten Estergruppierung deutet. Das 220-MHz-NMR.-Spektrum<sup>3)</sup> von Roridin H (vgl. Tab. 1 und Fig. 3) lässt vier Methyl-

<sup>2)</sup> Aufgenommen mit einem Perkin-Elmer-Gitterspektrophotometer Mod. 125.

<sup>3)</sup> Wir verdanken das Spektrum Herrn Dr. H. Fritz, J. R. Geigy AG, Basel, der es mit einem Varian HR-SC-220-Spektrographen im Institut für Makromolekulare Chemie, Freiburg i. Br. (Herr Prof. H. J. Cantow) aufnehmen konnte.

gruppen erkennen, eine tertiäre als Singulett bei 0,85 ppm, die C-14 im Verrucarolteil entspricht, eine sekundäre als Dublett bei 1,32 ppm mit  $J = 6$  Hz (C-14') und zwei an olefinischen Doppelbindungen haftende Methylgruppen, die als Singulette bei 1,69 und 2,27 ppm auftreten. Der erste der beiden Werte entspricht der 16-Methylgruppe

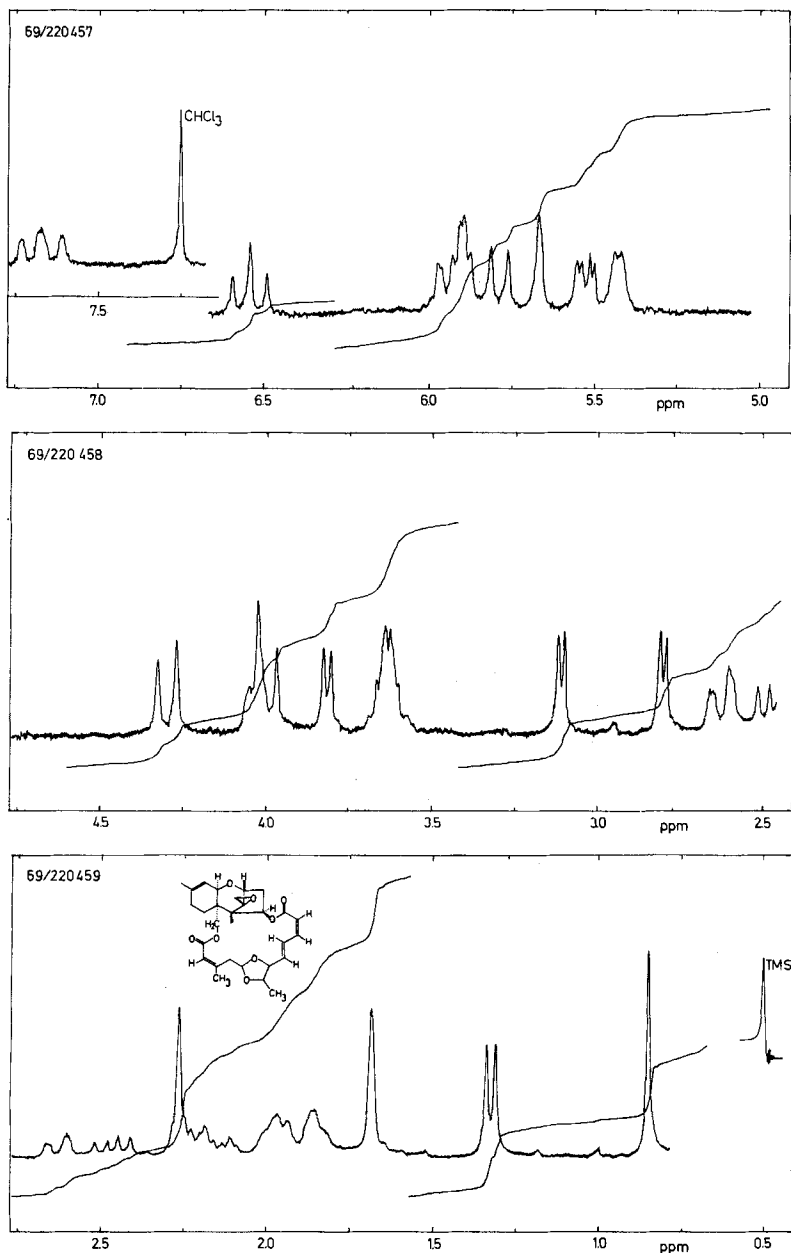


Fig. 3. 220-MHz-NMR.-Spektrum von Roridin H (1) in  $CDCl_3$

im Verrucarol-Teil. Der Vergleich mit dem NMR.-Spektrum von Verrucarol J [7] zeigt, dass der zweite Wert der Methylgruppe entspricht, die an der Doppelbindung C-3' sitzt<sup>4)</sup>.

Im Bereich zwischen 5,42 und 7,68 ppm sind sechs Vinylprotonen zu finden, die folgenden C-Atomen zugeordnet werden können: ein Dublett bei 5,42 ppm mit  $J = 4$  Hz an C-10 im Verrucarol-Teil, ein Singulett bei 5,67 ppm an C-2', ein Dublett bei 5,79 ppm mit  $J = 11$  Hz an C-10', ein Triplett bei 6,55 ppm mit  $J = 11$  Hz an C-9', ein doppeltes Dublett bei 7,68 ppm mit  $J = 15,5$  und 11 Hz an C-8' und zum Schluss ein Multiplett bei 5,9 ppm an C-7', das aber von anderen Signalen überlagert wird. Die letzten vier Signale zeigen die gleichen chemischen Verschiebungen und Spin-Spin-Kopplungen (vgl. Tab. 1 und Fig. 3), wie Roridin A und Roridin D. Die beiden zur Estergruppe konjugierten Doppelbindungen sollten demnach wie in den bekannten Verrucarinen und Roridinen *cis,trans*-Geometrie besitzen.

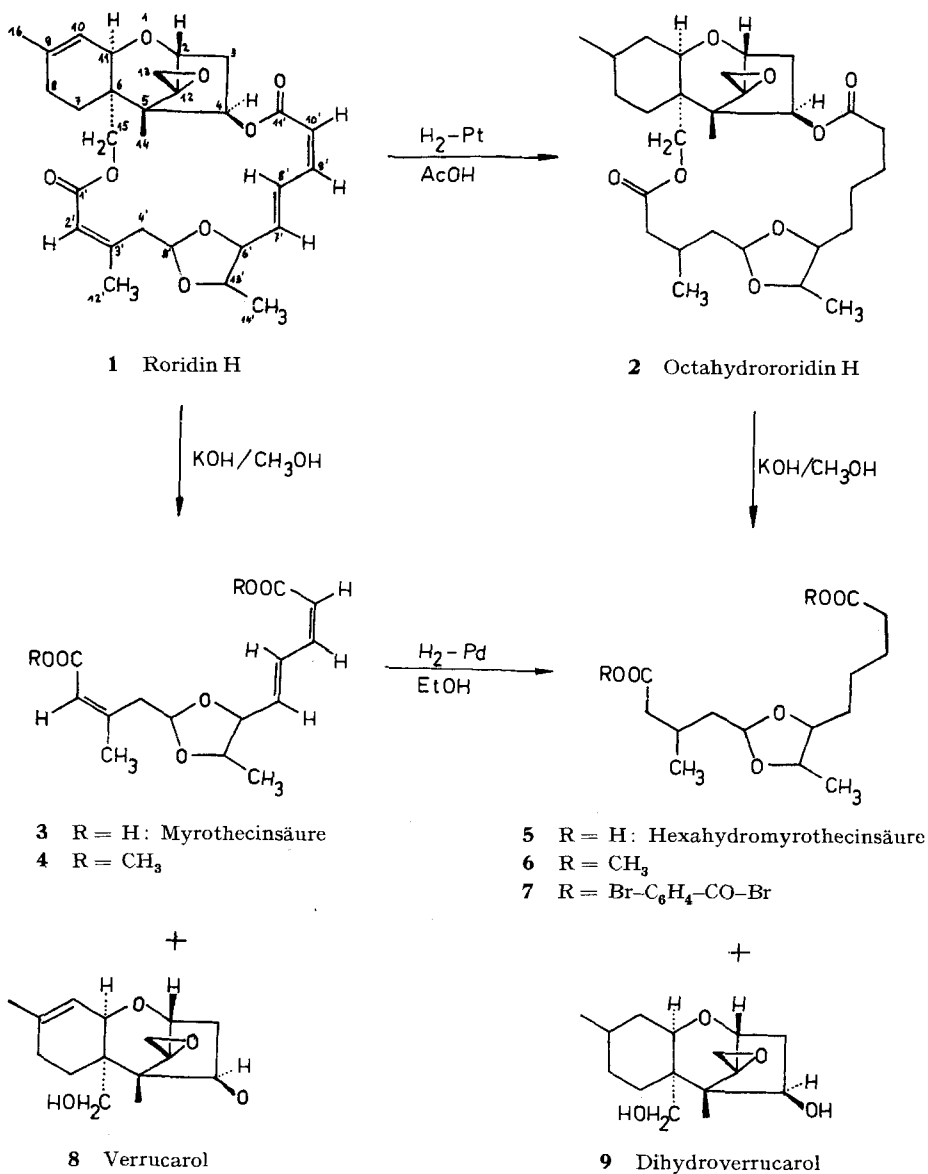
Das doppelte Dublett mit  $J = 3,5$  und 8 Hz bei 5,58 ppm rührt vom H-Atom an C-5' her. Die komplexe Signalgruppe bei 3,64 ppm, die zwei Protonen entspricht, dürfte einerseits das Proton an C-11 im Verrucarolteil enthalten, während das zweite Proton hier noch nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Sein Auftreten bei tiefem Feld lässt aber eine benachbarte Sauerstofffunktion vermuten. Ein Doppelresonanzversuch<sup>5)</sup> zeigte, dass dieses Proton mit der sekundären Methylgruppe bei 1,32 ppm koppelt.

Ebenfalls noch nicht eindeutig zuordnen liess sich ein Proton, dessen Signal bei 4,03 ppm erschien, das aber vom rechten Teil des AB-Systems der beiden C-15-Protonen überdeckt wurde. Immerhin lässt auch seine Lage bei tiefem Feld eine benachbarte Sauerstofffunktion vermuten. Doppelresonanzversuche mit dem Myrothecinsäuredimethylester erlaubten die eindeutige Zuordnung dieser Protonen (s. unten).

Bei der Mikrohydrierung mit  $PtO_2$  in Eisessig nahm Roridin H (1) 4 Mol.-Äquivalente Wasserstoff auf. Die Hydrierung im präparativen Maßstab lieferte Octahydrororidin H (2), das bisher nicht kristallisierte. Das Massenspektrum bestätigte, wie erwähnt, die Formel  $C_{29}H_{44}O_8$ . Octahydrororidin H zeigt im UV.-Spektrum keine selektive Absorption mehr. Im IR.-Spektrum hat sich die Carbonylbande von  $1710\text{ cm}^{-1}$  auf  $1725\text{ cm}^{-1}$  verschoben. Das entspricht der Lage einer gesättigten Estergruppe. Die C=C-Schwingungen sind verschwunden. Im 60-MHz-NMR.-Spektrum von Octahydrororidin H (vgl. Fig. 4) sind die Signale aller sechs Vinylprotonen ebenfalls verschwunden. An Stelle des doppelten Dubletts des C-5'-Protons bei 5,58 ppm ist bei 5,06 ppm ein Triplett mit  $J = 4$  Hz zu finden. Das Auftreten dieses Signals bei so tiefem Feld deutet auf die Nachbarschaft von mindestens einem Sauerstoffatom, die Form des Signals auf eine benachbarte Methylengruppe (C-4') hin. An Stelle der beiden olefinischen Methylgruppen, die im Spektrum von Roridin H als Singuletts bei 1,69 ppm und 2,27 ppm erschienen, sind nun bei höherem Feld zwei Dublette von sekundären Methylgruppen bei 0,93 ppm mit  $J = 4$  Hz und 1,12 ppm mit  $J = 4$  Hz getreten. Sie entsprechen C-16 und C-12'.

4) Im 60-MHz-Spektrum ist das Singulett dieser Methylgruppe zu einem Dublett mit der Kopplungskonstante  $J = 1,5$  Hz aufgespalten (Fernkopplung mit dem Vinylproton an C-2').

5) Wir danken Herrn Dr. P. Niklaus, SANDOZ AG, Basel, für die Durchführung dieser Versuche.

Formelschema 1. *Hydrolytische Spaltungen*

**3. Hydrolysen.** – Weiteren Aufschluss über die Struktur von Roridin H (1) ergab die basenkatalysierte Hydrolyse. Dabei erwies sich Roridin H als schwerer spaltbar als z. B. Roridin A. Vollständige Spaltung trat mit 1N KOH-Lösung in Methanol nach ca. 9 Std. bei 22° ein. Es konnten jeweils nur zwei Bruchstücke isoliert werden, nämlich das bekannte Verrucarol (8) [12] aus den neutralen Anteilen und eine unbekannte Dicarbonsäure, die Myrothecinsäure (3) genannt wird, aus den sauren Anteilen.

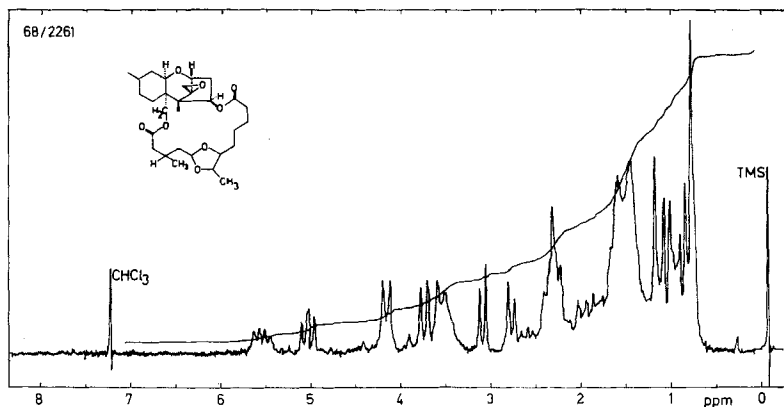
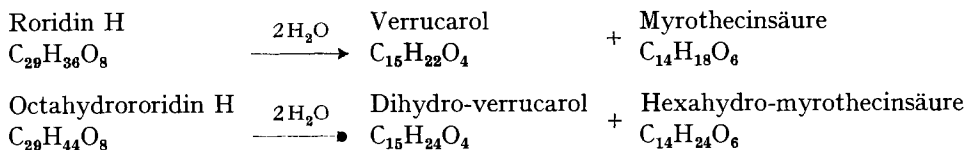


Fig. 4. NMR.-Spektrum von Octahydrororidin H (2) in Deuteriochloroform<sup>6)</sup>

Wesentlich leichter liess sich Octahydrororidin H (2) spalten. Mit 0,5N KOH-Lösung in Methanol war die Hydrolyse bei 22° nach 14 Std. beendet und ergab das bekannte Dihydroverrucarol (9) [12] sowie Hexahydromyrothecinsäure (5).

Diese Spaltungen lassen sich folgendermassen formulieren:



**4. Myrothecinsäure (3).** – Nach Entfernung des Verrucarols (8) aus der wässrig-alkalischen Hydrolysenlösung durch Ausschütteln mit Dichlormethan wurde mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 2 angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Das resultierende Rohprodukt zeigte im Dünnschichtchromatogramm mehrere Flecke, worunter hauptsächlich die recht zersetzliche Myrothecinsäure (3). Sie konnte aus dem Gemisch trotz mehrmaliger präparativer Dickschichtchromatographie auf Kieselgelplatten nicht rein erhalten werden. Deshalb wurden die sauren Anteile der Hydrolyse sofort mit Diazomethan bei 0° verestert<sup>7)</sup> und an einer Kieselgelsäule oder auf Kieselgel-Dickschichtplatten chromatographiert. Als Hauptprodukt<sup>8)</sup> resultierte Myrothecinsäure-

<sup>6)</sup> Aufgenommen mit einem Varian-Spektrometer A-60 (60 MHz) im Spektrollabor des Instituts (K. Aegerter).

<sup>7)</sup> Diazomethan greift bei Zimmertemperatur die konjugierten Doppelbindungen an.

<sup>8)</sup> Die zweite isolierte Substanz war nach Dünnschicht ebenfalls einheitlich. Sie zeigte im IR.-Spektrum ebenfalls die charakteristischen C=C-Banden bei 1652 und 1610 cm<sup>-1</sup>. Die C=O-Schwingung hingegen war in ein Dublett bei 1722 und 1737 cm<sup>-1</sup> aufgespalten. Im Gas-Chromatogramm jedoch erwies sich das Präparat als ein Gemisch von mindestens fünf Substanzen. Im NMR.-Spektrum waren zwar die charakteristischen Signale der fünf Vinylprotonen feststellbar. Es traten jedoch weitere Signale auf, die nicht zugeordnet werden konnten. Es könnte sich bei diesem Gemisch um die *cis,cis*- oder *trans,trans*-Isomeren des «Muonsäure-Teils» handeln. Es ist bekannt, dass *cis,cis*- oder *cis,trans*-Muonsäure beim Erwärmen oder in Lösung bei Tageslicht oder im UV.-Licht leicht in die thermodynamisch stabilste *trans,trans*-Form übergeht [13]. Das Gemisch wurde nicht weiter untersucht.

dimethylester (**4**) als schwach gelb gefärbtes Öl, das weniger empfindlich als die freie Säure ist. Im UV.-Spektrum in Äthanol zeigen sich zwei intensive Absorptionsmaxima bei 220 nm ( $\log \epsilon = 4,13$ ) und bei 255,5 nm ( $\log \epsilon = 4,36$ ), die den  $\alpha, \beta$ -ungesättigten und den  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -ungesättigten Estergruppierungen entsprechen. Die beiden starken C=C-Banden bei  $1637 \text{ cm}^{-1}$  und  $1598 \text{ cm}^{-1}$  und die Bande der C=O-Streckschwingung bei  $1710 \text{ cm}^{-1}$  im IR.-Spektrum lassen sich damit sehr gut vereinbaren. Es sind also in Roridin H die gleichen chromophoren Gruppen wie in Verrucarin J [7] und Roridin E [10] vorhanden.

Der Myrothecinsäure-dimethylester (**4**) war zwar nach Dünnschichtchromatogramm in verschiedenen Lösungsmitteln einheitlich, erwies sich aber im Gas-Chromatogramm als ein Gemisch und zwar, wie das NMR.-Spektrum (vgl. Fig. 5) zeigt, von zwei geometrischen Isomeren.

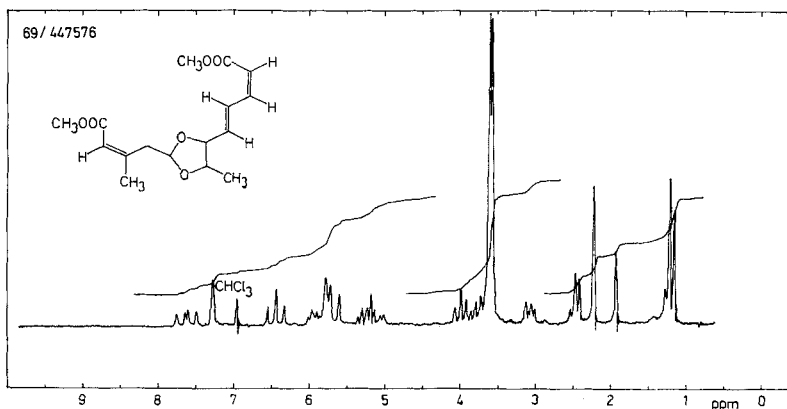


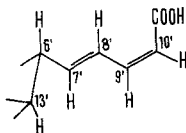
Fig. 5. 100-MHz-NMR.-Spektrum von Myrothecinsäure-dimethylester (**4**) in Deuteriochloroform-Deuterobenzol-(3:1)<sup>9)</sup>

Die an einer Doppelbindung haftende 12'-Methylgruppe erscheint nicht wie in Roridin H als ein einziges Dublett bei 2,27 ppm, sondern es sind zwei Dublette bei 1,98 ppm und 2,25 ppm mit den gleichen Kopplungskonstanten  $J = 1,5 \text{ Hz}$  (Fernkopplung) vorhanden. Das entspricht einer Differenz der beiden  $\delta$ -Werte von 0,27 ppm. Ein Vergleich der beiden  $\delta$ -Werte dieser Methylgruppe mit denjenigen von  $\beta, \beta$ -Dimethylacrylsäure [14] ergibt für die Methylgruppe bei *trans*-Konfiguration einen Wert von 1,93 ppm und bei *cis*-Konfiguration von 2,18 ppm. Daraus resultiert für die beiden Methylgruppen wieder eine Differenz der Feldwerte von 0,25 ppm. Das Vinylproton an C-2' hingegen bildet in **4** nur ein unscharfes Signal bei 5,75 ppm. Die Unterschiede der  $\delta$ -Werte eines zur Carboxylgruppe  $\alpha$ -ständigen Vinylprotons bei *cis*, *trans*-Isomerie betragen hingegen nur 0,03 ppm. Dies geht aus dem Vergleich der Daten der beiden NMR.-Spektren von 3-Chlorcrotonsäure und 3-Chlorisocrotonsäure [15] hervor, wo die Werte der zur Säuregruppe  $\alpha$ -ständigen Protonen bei 6,07 ppm bzw. 6,10 ppm gefunden werden. Die Differenz der beiden  $\delta$ -Werte der *cis*- und *trans*-Methylgruppe

<sup>9)</sup> Aufgenommen mit einem Varian-HA-100-D-Spektrometer der Firma SANDOZ AG, Basel (Herr Dr. P. Niklaus).

beträgt hier wiederum 0,28 ppm. Das würde das unscharfe Signal des C-2'-Vinylprotons bei 5,75 ppm erklären. Daraus folgt, dass es sich beim Dimethylester **4** um ein Gemisch von *cis,trans*-Isomeren, und zwar an der Doppelbindung zwischen C-2' und C-3', handeln muss. Diese Vermutung wird durch Doppelresonanzversuche im 100-MHz-Spektrum bestätigt<sup>5)</sup>. Beim Einstrahlen an der Stelle des Vinylprotons C-2' bei 5,75 ppm gehen die beiden Dublette bei 1,98 ppm und 2,25 ppm der 12'-Methylgruppe je in ein Singulett über. Umgekehrt verwandelt sich das unscharfe Signal des Vinylprotons in ein scharfes Singulett, wenn bei 1,98 und 2,25 ppm eingestrahlt wird. Da die 12'-Methylgruppe im NMR.-Spektrum von Roridin H (**1**) bei 2,27 ppm auftritt, darf aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, dass in Roridin H die 2',3'-Doppelbindung *cis*-Konfiguration besitzt. Die partielle Isomerisierung tritt offenbar während der hydrolytischen Spaltung ein.

Die Signale der vier Vinylprotonen des  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Esterteils erscheinen als Dublett bei 5,72 ppm mit  $J = 11$  Hz (C-10'), als Triplet bei 6,56 ppm mit  $J = 11$  Hz (C-9') und als doppeltes Dublett bei 7,60 ppm mit  $J = 11$  Hz und 15,5 Hz (C-8') (vgl. Fig. 6). Die Aufspaltungen und die Kopplungsverhältnisse dieser Protonen sind gleich wie bei den bisher gefundenen Verrucarinen und Roridinen und im *cis,trans*-Muconsäure-dimethylester [16]. Im *cis,trans*-Mucosäure-dimethylester erscheint allerdings das C-8' entsprechende Proton wegen des abschirmenden Effekts von zwei Ester-carbonylgruppen bei wesentlich tieferem Feld (8,4 ppm) als hier. Hingegen tritt es bei gleichem Feld und mit gleicher Aufspaltung wie bei Roridin A, Roridin D und Roridin E [8] [9] [10] auf. Das vierte Vinylproton, das C-7'-Proton, hingegen verursacht ein komplexes Signal. Es bildet ein doppeltes Dublett bei 5,96 ppm mit  $J = 7,5$  Hz und 15,5 Hz. Die grössere der beiden Kopplungskonstanten stimmt mit dem entsprechenden Wert von *cis,trans*-Muconsäure-dimethylester überein. Dies bedeutet, dass das benachbarte Kohlenstoffatom C-6' in Myrothecinsäure (**3**) nicht als Carbonylgruppe vorliegen kann, sondern ein weiteres Proton trägt. Dieses wurde auch als Triplet mit  $J = 7$  Hz bei 4,10 ppm gefunden. Doppelresonanzversuche zeigten die Kopplung dieses Protons mit demjenigen an C-7'. Daraus ergibt sich die Kopplungskonstante von 7,5 Hz für die Protonen C-7' und C-6'. Durch die Doppelresonanzversuche konnte auch eindeutig gezeigt werden, dass das C-6' Proton *nicht* mit der 12'-Methylgruppe koppelt. Das tiefe Feld des Signals dieses Protons lässt ein benachbartes Sauerstoffatom vermuten. Da es als Triplet erscheint, dürfte ein weiteres benachbartes H-Atom vorhanden sein. Damit ist die folgende Sequenz gesichert:



Sie entspricht der Sequenz in Roridin A [8], Roridin D [9] und Roridin E [10].

Noch nicht genau abgeklärt war bis dahin die Lage der 14'-Methylgruppe, die als Dublett bei 1,25 ppm mit  $J = 6$  Hz auftritt und nach Entkopplungsversuchen im NMR.-Spektrum von Roridin H mit einem Proton koppelt, das bei 3,65 ppm liegt. Dieses Proton wurde hier bei ca. 3,78 ppm gefunden und C-13' zugeordnet. Die Signale werden aber teilweise von denjenigen der beiden Methylestergruppen überlagert.



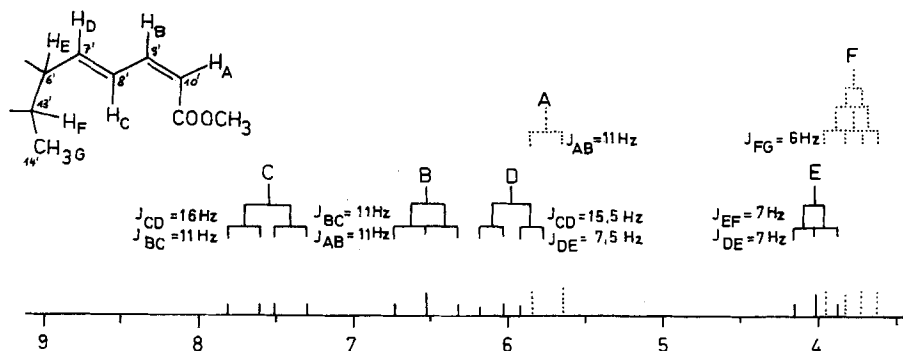
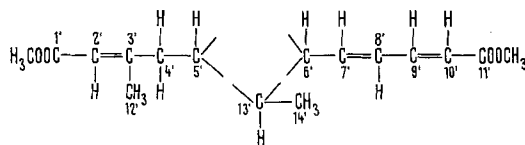


Fig. 6. Schematische Darstellung der 4 Vinylprotonen des NMR.-Spektrums von Myrothecinsäure-dimethylester (4)

Durch Aufnahme des 100-MHz-Spektrums in einem Gemisch von Deuteriochloroform und Deuterobenzol konnte gezeigt werden, dass dieses Signal annähernd die Form eines Quartetts besitzt<sup>5)</sup>. Doch waren die Kopplungskonstanten nicht eindeutig bestimmbar. Die dem C-6'-Proton ähnliche Lage deutet ebenfalls auf ein benachbartes Sauerstoffatom. Die Kopplung von C-13' mit der 14'-Methylgruppe wurde wiederum durch Doppelresonanzversuche bestätigt.

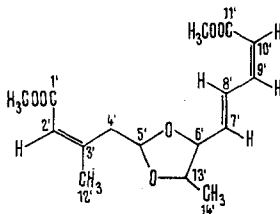
Es bleibt noch die Lage der H-Atome an C-5' und C-4' abzuklären. Das C-5'-Proton erscheint als eine komplexe Signalgruppe bei 5,25 ppm. Ihre Lage bei tiefem Feld lässt zwei benachbarte Sauerstoffatome vermuten. Doppelresonanzversuche zeigten, dass das C-5'-Signal mit einem Dublett bei 2,47 ppm ( $J = 5$  Hz) koppelt. Dieses entspricht der C-4'-Methylengruppe. Die *cis,trans*-Isomerie der Doppelbindung könnte ebenfalls eine kleine Verschiebung und damit Überlagerung der Signale des C-5'-Protons verursachen. Dies würde das unscharfe Signal bei 5,25 ppm erklären.

Aus der Interpretation des NMR.-Spektrums und den Versuchen zur Spin-Spin-Entkopplung lassen sich für die Myrothecinsäure (3) folgende Strukturelemente mit Sicherheit ableiten:



In diesen Teilstrukturen sind noch zwei Sauerstoffatome unterzubringen.

Da im IR.-Spektrum von 4 keine HO-Banden vorhanden sind, darf man annehmen, dass die zwei noch fehlenden Sauerstoffatome ätherartig gebunden sind. Postuliert man für 4 ein analoges C-Skelett, wie es in Roridin A [8], Roridin D [9] und Roridin E [10] vorliegt, nämlich eine Sauerstoffbrücke zwischen C-5' und C-6' und direkte Verknüpfung von C-6' mit C-13', so müssen auch C-5' und C-13' durch ein Sauerstoffatom miteinander verbunden sein. Damit ergibt sich für den Myrothecinsäure-dimethylester folgende Struktur 4:



Den Beweis für diese Struktur lieferten das hochaufgelöste Massenspektrum und der chemische Abbau des Hexahydromyrothecinsäure-dimethylesters (s. unten).

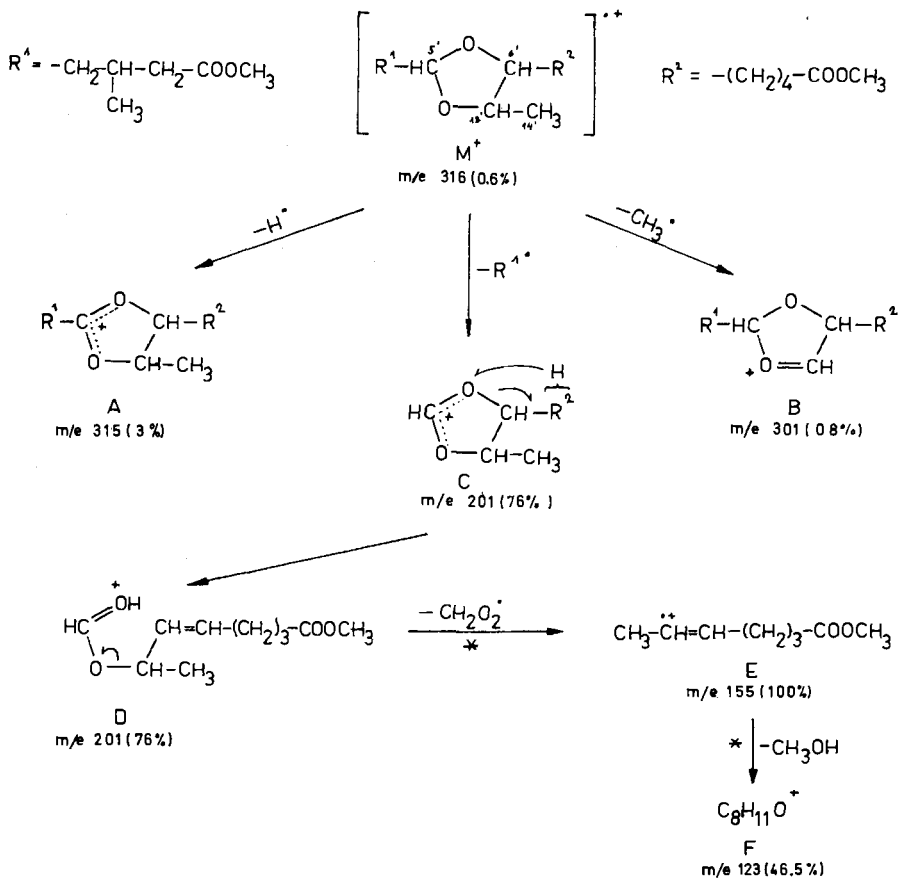
Das Gemisch von *cis,trans*-Myrothecinsäure-dimethylester ergab bei der katalytischen Hydrierung mit Pd-C in Äthanol den einheitlichen Hexahydromyrothecinsäure-dimethylester (**6**), der nach Gas-Chromatogramm, Dünnschichtchromatogramm und IR.-Spektrum identisch mit einem Präparat war, das durch Methylierung der bei der alkalischen Hydrolyse von Octahydrororidin H (**2**) gebildeten Säure erhalten wurde. Die bei der Hydrolyse von **2** anfallende Säure ergab durch präparative Chromatographie auf Kieselgel-Dickschichtplatten reine Hexahydromyrothecinsäure (**5**) als farbloses Öl;  $[\alpha]_D^{23} = -10,7^\circ \pm 1^\circ$  (in Chloroform). Die Säure **5** liess sich im Hochvakuum destillieren, wobei sie sich aber teilweise zersetzte.

Auf Grund der Elementaranalyse des Di-*p*-bromphenacylestere **7** besitzt die Säure **5** die Bruttoformel  $C_{14}H_{24}O_6$ . Ihr IR.-Spektrum enthält keine C=C-Banden mehr. Die C=O-Schwingung tritt als breite Bande bei  $1705\text{ cm}^{-1}$  auf. Behandlung von **5** mit Diazomethan ergab den Dimethylester **6** als farblose Flüssigkeit von  $[\alpha]_D^{23} = -10,0^\circ \pm 1^\circ$  (Chloroform). Er war im Gas-Chromatogramm einheitlich.

Im IR.-Spektrum von **6** sind keine C=C-Banden vorhanden. Die C=O-Streckschwingung erscheint bei  $1730\text{ cm}^{-1}$ . Sie entspricht der Lage einer gesättigten Estergruppierung.

Im 220-MHz-NMR.-Spektrum von **6**<sup>3</sup>) (vgl. Tab. 1 und Fig. 7) sind alle Vinylprotonen verschwunden. Die 12'-Methylgruppe, die in der ungesättigten Säure **3** bei 2,25 ppm auftritt, ist nach höherem Feld verschoben und nun als Dublett mit  $J = 6\text{ Hz}$  bei 1,01 ppm zu finden. Das Triplett mit  $J = 5\text{ Hz}$  bei 5,06 ppm entspricht dem H-Atom an C-5'. Die Kopplung mit den C-4'-Protonen ist nicht zu sehen, da diese durch das Fehlen der benachbarten Doppelbindung nach höherem Feld verschoben und nun im Bereiche von ca. 1,6 ppm nicht genau lokalisierbar sind. Die komplexe Signalgruppe bei 3,48 ppm, die ein Quartett mit der Kopplungskonstante  $J = 6\text{ Hz}$  sein könnte, dürfte dem H-Atom an C-13' entsprechen, während das Signal des benachbarten Protons an C-6' von den  $\text{CH}_3\text{O}$ -Signalen fast ganz zugedeckt wird. Die im NMR.-Spektrum von Myrothecinsäure-dimethylester (**4**) vorgenommenen Zuordnungen werden durch dieses Spektrum bestätigt.

Im Einklang mit der auf Grund der NMR.-Spektren vorgeschlagenen Struktur der Myrothecinsäure war das Massenspektrum von **6**<sup>1</sup>) (vgl. Fig. 8). Durch die Bestimmung der genauen Massen zahlreicher Bruchstücke ist es möglich, Zerfallsreaktionen zu formulieren, die die vorgeschlagene Acetalstruktur bestätigen. Das Massenspektrum zeigt nur eine schwache Spitze für das Molekel-Ion bei  $m/e\ 316,1861 \pm 0,008$  (0,6%)<sup>10</sup>), das der Formel  $C_{16}H_{28}O_6$  entspricht. Für das Molekel-Ion lassen sich folgende Zerfallsreaktionen formulieren (Formelschema 2) (vgl. [17a] [18]).

Formelschema 2. Zerfall von Hexahydromyothecinsäure-dimethylester (6)<sup>10)</sup>

Die Abspaltung des C-5'-Protons ergibt eine ( $M^+ - 1$ )-Spitze (Ion A), die schon im Massenspektrum von Octahydrororidin H (2), aber nicht in dem von Roridin H (1) gefunden wurde. Die schwache Spitze bei  $m/e$  301 (0,8%) dürfte dem Verlust der Methylgruppe C-14' entsprechen (Ion B).

Der Hauptzerfall ist der für Acetale charakteristische Verlust des Restes R' in einer homolytischen Spaltung. Das ergibt Bruchstück C mit  $m/e$  201 (76%). Beim Fragment C sind die folgenden weiteren Zerfallsreaktionen wahrscheinlich (Formelschema 2): Eine O-C-Spaltung von C verbunden mit einer H-Wanderung eines zum Sauerstoff  $\beta$ -ständigen H-Atoms ergibt das Oxonium-Ion D, welches immer noch die Masse 201 besitzt. Dieses spaltet in einem metastabilen Übergang  $CH_2O_2$  ab und geht in E über. Die entsprechende metastabile Spitze wurde bei  $m/e$  119,6 und das Ion E bei  $m/e$  155 gefunden. E bildet die Basis-Spitze. E verliert wiederum in einem metastabilen Übergang  $CH_3OH$ . Das ergibt das Fragment-Ion F mit der Masse 123 (46,5%)

<sup>10)</sup> Die Procente in Klammern geben die relative Intensität an.

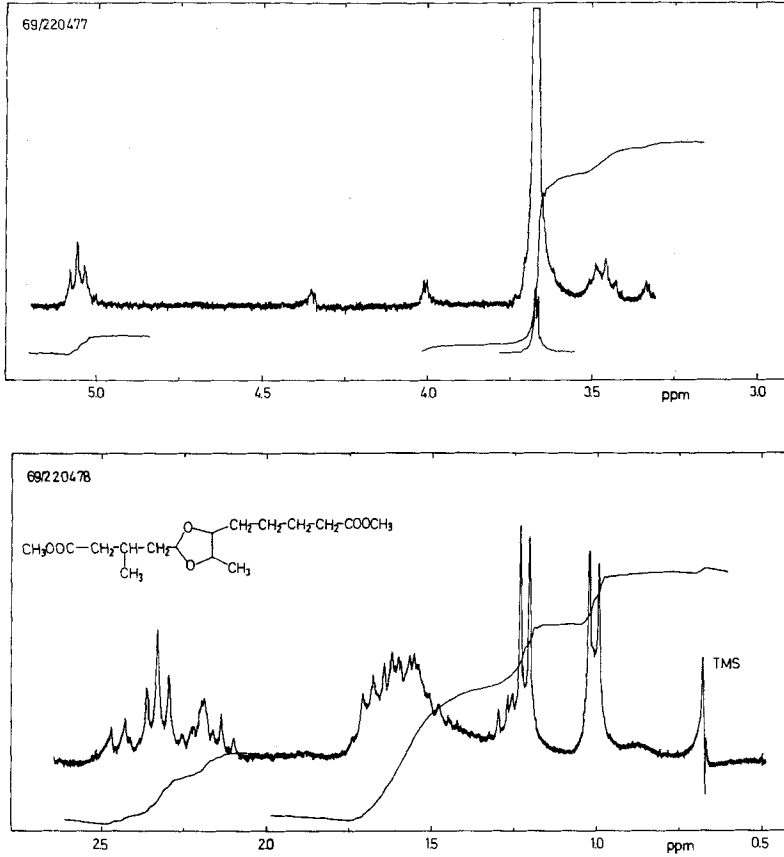


Fig. 7. 220-MHz-NMR.-Spektrum von Hexahydromyrothecinsäure-dimethylester (6) in Deuterochloroform<sup>3)</sup>

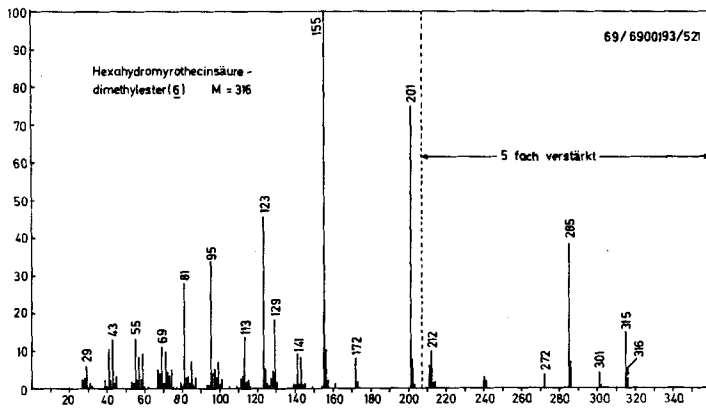
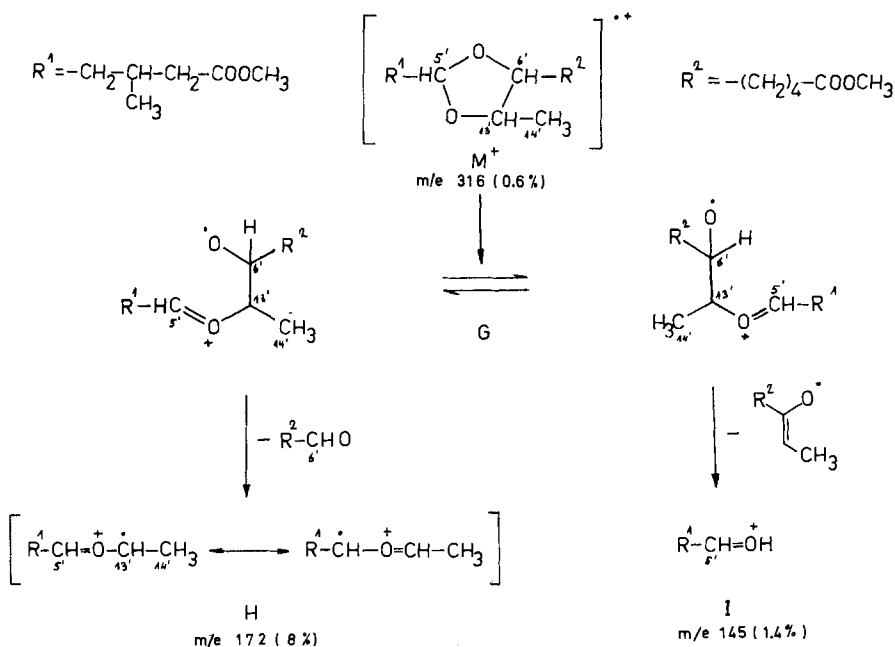


Fig. 8. Massenspektrum von Hexahydromyrothecinsäure-dimethylester (6)<sup>1)</sup>

Formelschema 3. Zerfall von Hexahydromyrothecinsäure-dimethylester (6)<sup>10)</sup>

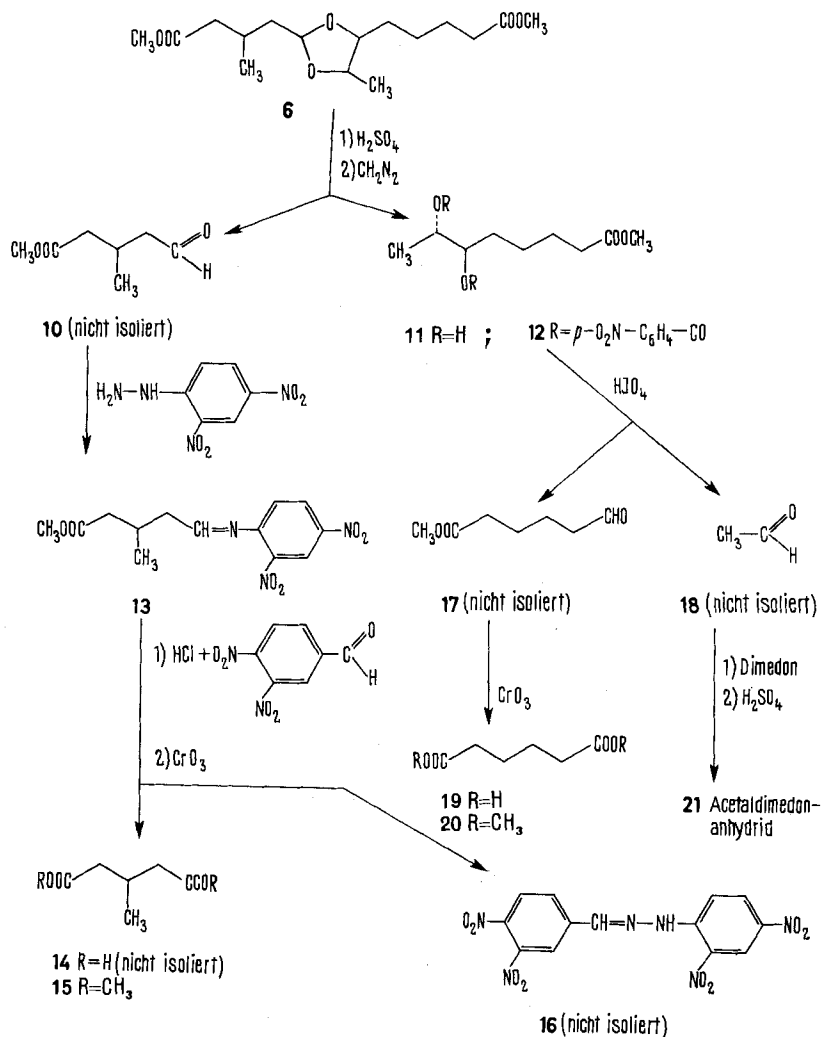
und ein Übergangssignal bei  $m/e$  97,7. Diese Abspaltung von Methanol aus geladenen Radikalen wird in den Spektren von Methylestern oft beobachtet [17c].

In Analogie zu einer von *Weiss et al* [19] gefundenen Zerfallsreaktion für Äthylenacetale kann die Fragmentierung von  $M^+$  auch wie folgt ablaufen (vgl. Formelschema 3): Das Molekel-Ion  $M^+$  bildet durch eine C–O-Spaltung Ion G, das wir aus anschaulichen Gründen in zwei konformerer Formen darstellen. G kann nun entweder durch Spaltung der aktivierten C-6'–C-13'-Bindung mit nachfolgender Elimination von  $R^2$ -CHO in Ion H mit  $m/e$  172 (8,0%) übergehen, das durch Resonanz stabilisiert ist, oder es kann die schon oben formulierte, für Äther charakteristische C–O-Spaltung, verbunden mit einer  $\beta$ -H-Wanderung eintreten, wobei ein Fragment J mit der Masse 145 (1,4%) entsteht.

Weitere beobachtete Zerfälle sind die Abspaltung von  $-OCH_3$  entweder aus der Methylestergruppe in  $R^1$  oder in  $R^2$ . Das führt zu einem Bruchstück mit  $m/e$  285 (7,7%). Ein Fragment mit  $m/e$  74 (5,3%) dürfte das Produkt einer *McLafferty*-Umlagerung sein [17b]. Diese Zerfallsreaktionen sind im Einklang mit der vorgeschlagenen Struktur für die Hexahydromyrothecinsäure (5).

**5. Abbau von Hexahydromyrothecinsäure-dimethylester (6).** – Durch den Abbau des Hexahydromyrothecinsäure-dimethylesters (6) gelang es, die vorgeschlagene Struktur 3 der Myrothecinsäure auch chemisch zu beweisen. Zunächst versuchten wir, den Myrothecinsäure-dimethylester (4) mit Ozon abzubauen. Nach Behandlung von 4 mit  $O_3/O_2$  bei  $-70^\circ$ , Erhitzen des Ozonids mit  $H_2O_2$  in wässriger HCl auf  $70^\circ$  und Umsetzung mit Diazomethan konnte lediglich Oxalsäure-dimethylester, der aus dem «Muconsäure-Teil» von 3 stammt, isoliert werden. Das andere Bruchstück hat

Formelschema 4. Abbau von Hexahydromyrothecinsäuredimethylester (6)

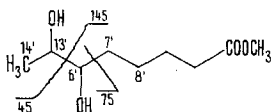


vermutlich weiterreagiert. Nach diesem Misserfolg erschien uns die hydrolytische Spaltung der Acetalgruppierung im weniger empfindlichen Hexahydromyrothecin-säure-dimethylester (6) aussichtsreicher.

Das Acetal 6 erwies sich als sehr schwer spaltbar. Längeres Erhitzen mit 3N HCl, Trifluoressigsäure oder 0,2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Methanol-Wasser-(1:1) ergab nur Spuren des Diols 11. Der Aldehyd 10 konnte nicht isoliert werden. Erst nachdem die Lösung des Acetals 6 in 0,2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Methanol-Wasser-(1:1) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin versetzt worden war, um den gebildeten Aldehyd sofort abzufangen, verlief die Reaktion erfolgreich. Nach Erhitzen während 12 Std. war kein Edukt mehr vorhanden. Chromatographie des Hydrolysegemisches ergab in 93% Ausbeute das krist. 2,4-Dinitrophenylhydrazon 13 des 3-Methylglutaraldehyds (10). Das Diol 11 wurde in

einer Ausbeute von 75% erhalten. Der Strukturbeweis von **13** stützt sich auf die Elementaranalysen und das Massenspektrum, die die Formel  $C_{13}H_{16}N_4O_6$  ergaben, sowie auf das IR.-Spektrum (C=O-Streckschwingung bei  $1730\text{ cm}^{-1}$ , NH-Valenzschwingung bei  $3300\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{NO}_2$ -Valenzschwingungen bei  $1515$  und  $1333\text{ cm}^{-1}$ ) und das NMR.-Spektrum (vgl. Tab. 1). Im Massenspektrum tritt das Molekel-Ion bei  $m/e$  324 auf. Die Spitze bei  $m/e$  289 entspricht der für 2,4-Dinitrophenylhydrazone charakteristischen Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  plus  $\text{OH}^\cdot$  in einen metastabilen Übergang [17d], der bei  $m/e$  257 gefunden wird.

Das zweite Produkt der Acetalspaltung, der 6,7-Dihydroxy-octansäure-methylester (**11**), war eine gas-chromatographisch einheitliche, ohne Zersetzung destillierbare Flüssigkeit. Sie lieferte das Di-O-*p*-Nitrobenzoylderivat **12**. Im Einklang mit der vorgeschlagenen Struktur sind das IR.-Spektrum (asso. HO-Gruppen bei  $3300\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$ ; C=O-Streckschwingung bei  $1730\text{ cm}^{-1}$ ) sowie das NMR.-Spektrum und Massen-



spektrum. Im NMR.-Spektrum von **11** (vgl. Tab. 1) erscheint die 14'-Methylgruppe wieder als Dublett mit  $J = 6\text{ Hz}$  bei  $1,25\text{ ppm}$ . Das Signal bei ca.  $3,3\text{ ppm}$  ist nach Entkopplungsversuchen dem C-6'-Proton zuzuordnen, dasjenige bei ca.  $3,6\text{ ppm}$  dem C-13'-Proton. Im Massenspektrum von **11** treten die für Dirole charakteristischen Fragmentierungen ein. Die  $\alpha$ -Spaltung ist bei Diolen zwischen den beiden C-Atomen bevorzugt, die die Hydroxylgruppe tragen (C-6' und C-13'). In diesem Fall entstanden zwei Bruchstücke mit  $m/e$  145 (18,8%) und  $m/e$  45 (34,6%). Das Fragment mit  $m/e$  75 (7,5%) entstand durch Spaltung der Bindung zwischen C-6' und C-7'.

Die Spaltung des Hydrazons **13** zum Aldehyd **10** war schwierig. Sie gelang erst durch 12-stdg. Erhitzen äquivalenter Mengen von **13** und 2,4-Dinitrobenzaldehyd mit  $3\text{ N HCl}$  im Einschlussrohr auf  $150\text{--}200^\circ$ . Der freigesetzte Aldehyd **10** wurde aber nicht isoliert, sondern das Reaktionsprodukt wurde mit  $\text{CrO}_3\text{--H}_2\text{SO}_4$  in Aceton oxydiert. Nach Behandeln mit Diazomethan konnte in ca. 10% Ausbeute 3-Methylglutarsäure-dimethylester (**15**) isoliert werden, der jedoch wegen der geringen Menge nur in 70-proz. Reinheit erhalten wurde. Das Präparat war aber nach allen üblichen Kriterien mit authent. Material identisch. Damit ist die Struktur des einen Spaltstückes des Hexahydromyrothecinsäure-dimethylesters (**6**) gesichert.

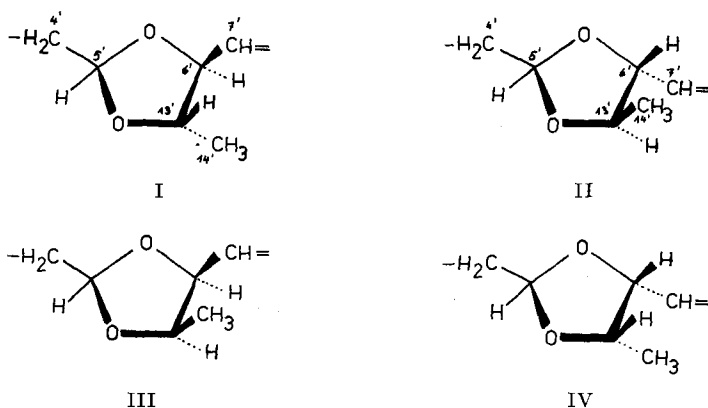
Um auch die Struktur des 6,7-Dihydroxy-octansäure-methylesters (**11**), des zweiten Spaltstückes von **6**, sicherzustellen, wurde er mit  $\text{HJO}_4$  behandelt. Es resultierten Adipinsäurealdehyd (**17**) und Acetaldehyd (**18**). Die beiden Produkte konnten aber nicht direkt und gleichzeitig isoliert werden. Der Acetaldehyd (**18**) wurde aus der wässrigen Reaktionslösung in eine Lösung von Dimedon in wässrigem Äthanol destilliert und das gebildete Acetaldimedon durch Erwärmen mit  $\text{HCl}$  in Äthanol in das leichter zu reinigende krist. Acetaldimedonanhydrid (**21**) übergeführt. Das erhaltene Präparat war nach allen Kriterien mit authent. Material identisch. – Der aus einem zweiten Versuch gewonnene Adipinsäurealdehyd (**17**) wurde mit  $\text{CrO}_3\text{--H}_2\text{SO}_4$  in Aceton oxydiert und die rohe Säure mit Diazomethan methyliert.

Nach Reinigung des erhaltenen Adipinsäure-dimethylesters (**20**) ergab die Hydrolyse reine krist. Adipinsäure (**19**), die ebenfalls mit einem authent. Präparat identisch war.

Damit ist die Struktur der Myrothecinsäure (**3**) bewiesen. Sie ist sehr eng mit der Roridinsäure [8] und der 2',3'-Epoxy-2'-anhydro-roridinsäure [9] verwandt, indem alle drei Säuren das gleiche Kohlenstoffgerüst und eine Sauerstofffunktion an C-13' besitzen.

Die Myrothecinsäure (**3**) enthält drei chirale C-Atome: C-5', C-6' und C-13'. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist eine Aussage über die Konfiguration von C-5' nicht möglich. Hingegen erlauben die NMR.-Daten Schlüsse bezüglich der relativen Konfiguration der Chiralitätszentren C-6' und C-13'. Theoretisch sind 4 optische Isomeren möglich, die durch die Teilformeln I–IV dargestellt sind:

In I und II bilden die beiden H-Atome an C-6' und C-13' einen Diederwinkel von ca. 120°, während er in III und IV ca. 0° beträgt. Nach Karplus [20] sind für diese Winkel Kopplungskonstanten von ca. 2,0 Hz bzw. ca. 8,5 Hz zu erwarten. Aus den Doppelresonanzversuchen ermittelten wir für die Kopplung des C-6'- mit dem C-13'-



Proton den Wert von 6 Hz. Dieser spricht für die *cis*-ständige Anordnung der beiden H-Atome, den Teilformeln III und IV entsprechend. Die Konfigurationen I und II scheiden aus. Die Erniedrigung des gefundenen Wertes gegenüber dem theoretischen dürfte durch die benachbarten elektronegativen Substituenten bedingt sein. Eine Entscheidung zwischen den beiden Diastereoisomeren III und IV ist vorderhand nicht möglich.

**6. Verknüpfung der Hydrolysenprodukte.** – In Roridin H müssen die beiden Hydroxylgruppen von Verrucarol mit den beiden Carboxylgruppen der Myrothecinsäure verestert sein. Für den daraus resultierenden Diester sind damit zwei Strukturen möglich. In der einen ist die C-1'-Carboxylgruppe mit der primären C-15-Hydroxylgruppe und die doppelt konjugierte C-11'-Carboxylgruppe mit der sekundären C-4-Hydroxylgruppe von Verrucarol verestert. In der anderen Struktur sind die beiden Esterbindungen vertauscht.

Die Verknüpfung der *cis*, *trans*-Muconsäure mit dem C-4-Hydroxyl des Verrucarols ist in Verrucararin A durch oxydativen Abbau [21] und die Röntgen-Strukturanalyse [22], in Verrucararin J durch partielle Hydrolyse [7] und in Roridin A ebenfalls durch



Tabelle 1. Zuordnung der H-Atome in den NMR.-Spektren<sup>a)</sup>

Substanz	C-2	C-4	C-5'	C-6'	C-7'	C-8'	C-9'	C-10	C-11	C-13	C-14	C-15	C-16
Roridin H (1)	3,8 d (5)	ca. 5,9 c)				5,42 d (4)	3,64 c)	2,96 dd (AB(4))	0,85 s (AB(12))	4,15 dd (AB(12))	1,69 s		
Octahydro- oridin H (2)	3,8 d (5)	5,6 dd (4/8)				ca. 1,5 c)	ca. 3,6 c)	2,97 dd (AB(4))	0,83 s (AB(12))	4,2 dd (AB(12))	0,85 d (6) c)		
Substanz	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'	C-8'	C-9'	C-10'	C-12'	C-13'	C-14'	
Roridin H (1)	5,67 s	-	2,64 d (11)	5,58 dd (3,5/8)	4,03 c)	ca. 5,9 m c)	7,68 dd (11/15,5)	6,55 t (11)	5,79 d (11)	2,27 s c)	ca. 3,65 m c)	1,32 d (6) l)	
Octahydro- roridin H (2)	ca. 2,3 c)	ca. 1,6 c)	ca. 1,5 c)	5,09 t (4)	ca. 3,6 c)	ca. 1,5 c)	ca. 1,5 c)	ca. 1,5 c)	ca. 2,3 c)	1,01 d (6)	ca. 3,6 c)	1,18 d (6)	
Myrothecinsäure- dimethylester (4)	5,78 s c) l)	-	2,50 d (5)	ca. 5,2 f) m)	4,1 t (7,0) k)	5,96 dd k) (7,0/15,5)	7,60 dd (11/15,5)	6,56 t (16)	5,72 d (11) c)	2,01 s g) l) und 2,24 s	ca. 3,18 h) l)	1,28 d (6) l)	
Hexahydro- myrothecinsäure (5)	ca. 2,35 c)	ca. 1,6 c)	ca. 1,6 c)	5,10 t (4,5)	3,4- 3,9 c)	ca. 1,6 c)	ca. 1,6 c)	ca. 1,6 c)	ca. 2,35 c)	1,05 d (6)	3,4-3,9 c)	1,20 d (6)	
Hexahydro- myrothecinsäure-dimethylester (6) b) (7)	2,32 t (6) c)	1,26 q (6) c)	1,5-1,7 c)	5,06 t ca. (5)	3,7 c)	1,5-1,7 c)	1,5-1,7 c)	1,5-1,7 c)	2,19 m (6)	1,01 d (6)	3,48 br, q (6)	1,21 d (6)	
3-Methylglutarsäure- aldehyd-hydraton (13)	2,38 c)	1,17 m c)	2,38 c)	7,58 t (5)	-	-	-	-	ca. 1,1 c)	-	-	-	
6,7-Dihydroxy-octan- säuremethylester (11) g)	-	-	-	-	3,33 m k)	ca. 1,5 c) k)	ca. 1,5 c)	ca. 1,5 c)	2,53 t (6)	-	3,58 q (6) l)	1,17 d (6) l)	
Roridinsäure- dimethylester [8]	4,25 d (3,5)	ca. 2,1 (6)	1,7 dd (6)	3,5-3,8 m (7,5; 15,5)	3,5-3,8 m (7,5; 15,5)	5,85 dd (11/15,5)	6,40 t (16)	5,72 d (11)	0,85 d (6,5)	5,5-5,7 (6,5)	1,12 d (6)		

a)  $\delta$ -Werte in ppm mit  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$  als internem Standard. Alle Substanzen wurden in  $\text{CDCl}_3$  gemessen. Bei eindeutig erkennbaren Feinstrukturen bedeuten: s = Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breit. In Klammern sind die Spin-Spin-Kopplungskonstanten  $J$  in Hz angegeben.

b) 220-MHz-Spektrum. c) Das Signal wird durch andere Signale ganz oder teilweise überdeckt.

d) Im 60-MHz-Spektrum Fernkopplung mit  $J = 1,5$  Hz. e) Unscharfes Signal. f) Unscharfes Signal, vermutlich Triplett mit  $J = 5$  Hz.

g) Im 60-MHz-Spektrum zwei Dublette mit Fernkopplung von  $J = 1,5$  Hz bei 1,98 und 2,25 ppm.

h) Die Signale werden z. T. von den Signalen der  $-\text{OCH}_3$ -Gruppe überdeckt. Nach NMR.-Spektrum in einem Gemisch von Deuteriochloroform/Deuterobenzol vermutlich ein Quartett mit  $J = 6$  Hz.

i) Durch Doppelresonanzversuche konnte die Kopplung von C-13' mit C-14' gezeigt werden. Sie ergab  $J_{6',13'} = 6$  Hz.

k) Durch Doppelresonanzversuche wurde die Kopplung von C-6' mit C-7' festgestellt. Sie ergab  $J_{6',13'} = 6-7$  Hz.

l) Durch Doppelresonanzversuche wurde die Kopplung von C-2' mit C-12' festgestellt.

m) Durch Doppelresonanzversuche wurde die Kopplung von C-4' mit C-5' gezeigt.

oxydativen Abbau [23] bewiesen worden. Eine partielle Hydrolyse von Roridin H ist bisher nicht gelungen.

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 H vorgeschlagene Strukturformel 1 für sehr gut begründet. In Roridin H liegt ein makrocyclischer Diester in Form eines Äthylenacetals vor. Das Antibioticum stellt damit eine biogenetisch interessante, strukturelle Variante der anderen Roridine dar.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* (Projekte Nr. 3945 und 2.48.68) sowie der *SANDOZ AG*, Basel, für die gewährte Unterstützung.

### Experimenteller Teil

**Allgemeines.** – Die Smp. wurden auf einem *Kofler*-Block bestimmt und sind korrigiert. Substanzproben zur Messung der Spektren und der spez. Drehungen wurden ca. 2 Std. im Hochvakuum, zur Elementaranalyse bei 0,01 Torr bei der angegebenen Zeit und Temperatur getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (*E. Thommen*).

Die opt. Drehungen wurden auf einem *Perkin-Elmer*-Polarimeter, Modell 141, aufgenommen. Die IR.-Spektren wurden mit einem *Perkin-Elmer*-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, oder einem *Beckman*-IR.-Spektrophotometer, Modell IR 8, und die 60-MHz-NMR.-Spektren mit einem *Varian*-Spektrometer A-60 im Spektrollaboratorium unseres Instituts (*K. Aegerter*) aufgenommen.

Die Gas-Chromatogramme (GC.) wurden mit einem F + M-Labor-Gas-Chromatographen, Modell 700, Säule: 10% SE-30 auf Chrom. W silan., 80–100 mesh, 2 m × 2 mm ausgeführt.

Für die Säulenchromatographie nach der Durchlaufmethode diente Kieselgel der Fa. *Merck*, Darmstadt, Korngrösse 0,05–0,2 mm. Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) wurde Kieselgel G der Fa. *Merck* als Adsorbens verwendet. Die Flecke wurden im Allgemeinen durch J<sub>2</sub>-Dämpfe oder unter der UV.-Lampe sichtbar gemacht. Für die präparative Dickschichtchromatographie diente Kieselgel PF<sub>254</sub> der Fa. *Merck*. Bei UV.-inaktiven Substanzen wurde 3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium als Fluoreszenzindikator verwendet.

Aufarbeiten bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen des Rückstandes in Methylenchlorid oder Äther, Waschen mit 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>O, Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder CaCl<sub>2</sub> und Eindampfen der Lösung im Vakuum.

**1. Roridin H (1) und Octahydrororidin H (2).** – 1.1. *Züchtung und Isolierung von Roridin H (1) [2]<sup>11)</sup>*. Der Stamm S1198 von *Myrothecium verrucaria* wurde in 100 l Nährlösung (40 g Glucose, 4 g Malzextrakt der *Schweiz. Ferment AG*, Basel, 4 g Bacto-Yeast-Extrakt *Difco*, 4 g Pepton *Cudahay*, 4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 8,5 g NaNO<sub>3</sub> und entmineralisiertes Wasser ad 1 Liter) in einem 100-Liter-Fermenter unter Rühren (300 Umdrehungen/Min.) und Belüftung (<sup>2</sup>/<sub>3</sub>–1 Liter/Min.) 44 Std. bei 27° inkubiert. Die Kulturbrühe wurde viermal mit Essigester ausgerührt. Die mit Wasser gewaschenen und über MgSO<sub>4</sub> getrockneten Auszüge lieferten 55 g Rohextrakt. Dieser wurde dreimal in Petroläther aufgenommen, um das Antischaummittel Antifoam B zu entfernen. Der Rohextrakt wurde an 1600 g Kieselgel chromatographiert.

Die Fraktionen 1–20 (eluiert mit Methylenchlorid und Methylenchlorid-Methanol-(100:0,1 bis 100:1) (je 1600 ml)) ergaben 10,31 g fettartiges Material, das nicht näher untersucht wurde.

Die Fraktionen 21 und 22 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(100:1) (je 1500 ml)) ergaben 12,55 g Rohprodukt, das nach DC. (Systeme: Benzol-Tetrahydrofuran-(85:15), Äther oder Methylenchlorid-Methanol-(100:2)) zum grossen Teil Roridin H (1) neben Verrucaridin B, J und A und Roridin E enthielt.

Die Fraktionen 23–26 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(100:1) (je 1500 ml)) ergaben 8,03 g Material, das die Roridine D, E und ev. A enthielt, und die Fraktionen 27–31 (eluiert mit

<sup>11)</sup> Die Züchtung erfolgte im mikrobiologischen Laboratorium der Firma *SANDOZ AG*, Basel (Leitung Herr *J. Bianchi*). Wir danken Herrn *J. Bianchi* an dieser Stelle bestens für die Durchführung dieses Versuches.

Methylenchlorid-Methanol-(100:1,5 bis 100:6)) ergaben 5,90 g Material, das nach DC. aus Roridin D und A und UV.-inaktivem Material bestand.

Die Fraktionen 32–38 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(100:7 bis 100:10) (je 1500 ml)) ergaben noch 11,59 g polares Material, das noch nicht näher untersucht wurde.

Das Mycel wurde nach Filtration von der Kulturbrühe im Mixer fein vermahlen und mit Essigester extrahiert. Es resultierten nochmals 13 g Rohextrakt, der an 400 g Kieselgel chromatographiert wurde.

Die Fraktionen 17–18 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(100:1) (je 400 ml)) ergaben nochmals 1,96 g Material, das nach DC. Roridin H enthalten konnte.

Die vereinigten Roridin H enthaltenden Fraktionen der beiden Säulen (14,51 g) wurden nochmals an 1500 g Kieselgel chromatographiert.

Die Fraktionen 33–46 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(100:0,25) (je 1000 ml)) ergaben 5,73 g Roridin H, das nach DC. nur noch Spuren Verrucaridin B und J enthält. Aus Methylenchlorid-Äther oder Methylenchlorid-Methanol wurden insgesamt 4,72 g reines, krist. Roridin H erhalten, das nach UV.-, IR.- und NMR.-Spektrum identisch war mit früher isoliertem **1** [8] [14].

1.2. *Charakterisierung von Roridin H (1)*. Roridin H kristallisiert aus Aceton-Äther, Methylenchlorid-Methanol oder Methylenchlorid-Äther in farblosen Nadeln. Es zeigt keinen def. Smp. Bei ca. 220° beginnt es sich gelb und braun zu verfärben. Bei ca. 270° beginnt langsame Zersetzung. Die Substanz schmilzt nicht unter 325°.  $[\alpha]_D^{25} = +31^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,160$  in Chloroform);  $[\alpha]_D^{25} = +40,3^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,065$  in Benzol);  $[\alpha]_D^{25} = +31,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 0,855$  in Dioxan). UV.-Spektrum:  $\lambda_{max}$  bei 195 (4,2); 224 (4,39); 260 (4,26) nm (log $\epsilon$ ). IR.-Spektrum (Methylenchlorid, Beckman IR 8) u. a. Banden bei: 2970–2910, 1710, 1645, 1600, 1380, 1355, 1220, 1175, 1115, 1105, 1075, 1035, 995 und 965  $\text{cm}^{-1}$ ; IR.-Spektrum (KBr, P. E. Nr. 21) u. a. Banden bei 2960, 2880, 2830, 1710, 1656, 1603, 1440, 1375, 1352, 1225, 1182, 1150, 1115, 1101, 1087, 1071, 1033, 1005, 992, 971 und 832  $\text{cm}^{-1}$ . (vgl. Fig. 2). 220 MHz-NMR.-Spektrum vgl. Fig. 3 und Tab. 1. Massenspektrum:  $M^+$  bei  $m/e$  512, 244, 346  $\pm 0,11$  (vgl. Fig. 1). Zur Analyse wurde 12 Std. bei 70° getrocknet.

$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_8$  Ber. C 67,97 H 7,08% Gef. C 66,86; 66,78; 66,34 H 7,07; 7,18; 7,10%  
(512,24) „ „ 66,61; 66,85; 66,40 „ „ 7,13; 6,98; 7,08%

Mikrohydrierung: 6,544 mg reines Roridin H in 2 ml Eisessig wurden mit 12 mg  $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  bei 0°/760 Torr hydriert.  $\text{H}_2$ -Aufnahme: 1,270 ml; ber. (4 Doppelbindungen) 1,260 ml.

1.3. *Octahydrororidin H (2) aus Roridin H (1)*. Eine Lösung von 300 mg Roridin H in 50 ml Eisessig wurde in Gegenwart von 100 mg vorhydriertem  $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  bei 23°/760 Torr hydriert. Nach 1,5 Std. war die Hydrierung zum Stillstand gekommen, wobei 4,2 Mol-Äqu. Wasserstoff aufgenommen worden waren. Nach Abfiltrieren des Katalysators durch eine Schicht Celite lieferte das Filtrat nach Eindampfen 300 mg rohes Octahydrororidin H (2).

170 mg rohes **2** wurden an 100 g Kieselgel chromatographiert. Die Fraktionen 1–7 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(100:1) (je 200 ml)) ergaben 4,3 mg Material; verworfen. Die Fraktionen 8–14 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(100:1) (je 50 ml)) ergaben 106 mg farbloses Octahydrororidin H (2), das im DC. einheitlich war. Trotz mehrmaliger Chromatographie auf Dickschicht-Kieselgelplatten konnten bisher keine Kristalle von **2** erhalten werden.  $[\alpha]_D^{25} = -4,45^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,074$  in Chloroform);  $[\alpha]_D^{25} = -4,25^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,012$  in Chloroform). IR.-Spektrum (Methylenchlorid, Beckman IR 8) u. a. Banden bei: 2930, 2870, 1725 (ges. C=O), 1480, 1160, 1085, 1035, 965  $\text{cm}^{-1}$  (vgl. Fig. 5). NMR.-Spektrum vgl. Fig. 4 und Tab. 1. Massenspektrum:  $M^+$  bei  $m/e$  520, 302, 2786  $\pm 0,11$ . Zur Analyse wurde 14 Std. bei 110° getrocknet.

$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_8$  (520,3) Ber. C 66,89 H 8,51% Gef. C 66,21 H 8,34%

**2. Hydrolysen.** – 2.1. *Hydrolyse von Roridin H (1)*. Eine Lösung von 1010 mg **1** in 90 ml 1*N* methanolischem KOH wurde 9 Std. bei 22° gerührt. Sofort nach Zugabe der KOH-Lösung zur Substanz trat intensive Gelbfärbung ein. Nach Zugabe von ca. 90 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und Einengen im Vakuum wurde sechsmal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}$ , Trocknen über  $\text{MgSO}_4$  und Eindampfen resultierten 494 mg einheitliches Rohprodukt, das nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther reines farbloses Verrucarol (**8**) in Nadeln vom Smp. 157–158° und  $[\alpha]_D^{25} = -38,6^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,046$  in Chloroform) ergab. Nach Misch-Smp., DC., opt. Drehung, IR.-Spektrum und NMR.-Spektrum identisch mit einem authent. Präparat [5].

Zur Isolierung der sauren Produkte wurde die wässrige alkalische Phase mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  unter Eiskühlung auf pH 2 angesäuert und zehnmal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherextrakte er-

gaben nach Waschen mit wenig  $H_2O$  und Trocknen über  $Na_2SO_4$  520 mg schwach gelb gefärbtes Öl, das Myrothecinsäure (3) enthalten sollte.

Dieses Rohprodukt wurde sofort bei  $0^\circ$  mit ätherischem Diazomethan versetzt. Nach 5 Min. wurde bei  $0^\circ$  das überschüssige Diazomethan im Vakuum entfernt, worauf nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum 525 mg hellgelbes Öl zurückblieben, das im DC. (Lösungsmittel: Äther-Pentan-(6:4); Benzol-Äther-(7:3); Methylenchlorid-Methanol-(100:1,5)) einen Hauptfleck und einen polarerer Nebenleck zeigte. 270 mg des Rohproduktes wurden an 250 g Kieselgel chromatographiert.

Die Fraktionen 1–28 (eluiert mit Benzol-Äther-(100:1 bis 100:2) (je 250 ml)) ergaben 12,6 mg, die verworfen wurden.

Die Fraktionen 29–36 (eluiert mit Benzol-Äther-(100:2 bis 100:3) (je 250 ml)) ergaben 103 mg Material, das zur Hauptsache aus *Myrothecinsäure-dimethylester* (4) bestand. Nach Chromatographie auf Dickschicht-Kieselgelplatten (System Benzol-Äther-(2:3)) wurde 4 als schwach gelb gefärbtes Öl erhalten. Charakterisierung siehe bei 3.2.

Die Fraktionen 38–47 (eluiert mit Benzol-Äther-(100:3 bis 100:8) (je 250 ml)) ergaben 34,1 mg Material. Durch Chromatographie auf Kieselgel-Dickschichtplatten konnte daraus neben 4 eine zweite im DC. (Lösungsmittel: Benzol-Äther-(7:3)) einheitliche Substanz erhalten werden. Charakterisierung siehe unten.

Die Fraktionen 48–54 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(100:5 bis 100:10) (je 250 ml)) ergaben noch 108 mg; im DC. nicht einheitlich, nicht näher untersucht.

Die aus den Fraktionen 38–47 isolierte Substanz zeigt im IR.-Spektrum (Methylenchlorid, Beckman IR 8) u. a. Banden bei: 2965, 1740, 1720, 1650, 1610  $cm^{-1}$ . Nach NMR.-Spektrum und GC. (Ofentemp.:  $195^\circ$ , Injekttemp.:  $225^\circ$ , Trägergas: Helium) muss es sich um ein Gemisch mehrerer Substanzen (Isomerengemisch) handeln. Es wurde nicht weiter untersucht.

2.2. *Hydrolyse von Octahydrovoridin H* (2). 943 mg rohes 2 wurden mit 150 ml 1N KOH-Lösung in Methanol versetzt und 15 Std. bei  $22^\circ$  gerührt. Dann wurde mit 150 ml  $H_2O$  versetzt und das Methanol im Vakuum entfernt. Die alkalische wässrige Lösung wurde zehnmal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und wie bei 2.1. beschrieben aufgearbeitet: 437 mg rohes *Dihydroverrucarol* (9), das aus Aceton-Äther reines 9 in farblosen Kristallen vom Smp.  $148-152^\circ$  lieferte.  $[\alpha]_D^{23} = -8,8^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,033$  in Chloroform). 9 war nach Misch-Smp., opt. Drehung, DC. und IR.-Spektrum identisch mit einem authent. Präparat [5].

Die alkalisch wässrige Phase wurde darauf mit konz.  $H_2SO_4$  auf pH 3 gebracht und zehnmal mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Äther-Extrakte ergaben nach Aufarbeitung analog zu 2.1. 549 mg rohe Säure 5 als schwach gelb gefärbtes Öl. 39 mg dieses Materials ergaben durch zweimalige Chromatographie auf Dickschicht-Kieselgelplatten (Lösungsmittel: Benzol-Methanol-Ameisensäure-(50:10:1)). 34 mg reine *Hexahydromyrothecinsäure* (5) als farbloses Öl. Weitere Charakterisierung siehe bei 3.3.

**3. Myrothecinsäure (3) und Derivate.** – 3.1. *Myrothecinsäure* (3). Schwach gelb gefärbtes Öl. Im DC. in folgenden Lösungsmitteln einheitlich: Methylenchlorid-Methanol-Ameisensäure-(100:5:2); Benzol-Methanol-Ameisensäure-(50:10:2); nicht einheitlich in Äther-Pentan-Ameisensäure-(60:40:2). UV.-Spektrum (Äthanol):  $\lambda_{max}$  bei 219 (3,86); 252 (4,19) nm ( $\log \epsilon$ ). IR.-Spektrum (Methylenchlorid, Beckman IR 8): u. a. Banden bei 2400, 3400 (OH, assoz.), 1690 (breit, C=O unges.), 1640 und 1602 (C=C)  $cm^{-1}$ . Das NMR.-Spektrum deutet auf ein Substanzgemisch. Das Produkt wurde nicht weiter aufgetrennt; es zersetzt sich beim Stehen.

3.2. *Myrothecinsäure-dimethylester* (4). Schwach gelb gefärbtes Öl, das sich bei längerem Stehen zersetzt. Im DC. in folgenden Lösungsmitteln einheitlich: Benzol-Äther-(7:3); Methylenchlorid-Methanol-(100:1). UV.-Spektrum (Äthanol):  $\lambda_{max}$  bei 220 (4,13); 255,5 (4,36) nm ( $\log \epsilon$ ). IR.-Spektrum (Film, Beckman IR 8): u. a. Banden bei 2975, 2875, 1710 (C=O, unges.), 1637, 1598 (C=C), 1430, 1372, 1350, 1315, 990 und 960  $cm^{-1}$ . Im GC. (Ofentemp.  $195^\circ$ , Injekttemp.:  $225^\circ$ , Trägergas: Helium) nicht einheitlich (vgl. Fig. 9). Nach NMR.-Spektrum (vgl. Fig. 5 und Tab. 1) handelt es sich um ein *cis,trans*-Isomerengemisch.

3.3. *Hexahydromyrothecinsäure* (5). Farbloses Öl, das im DC. (Lösungsmittel: Benzol-Methanol-Ameisensäure-(50:10:1)) einheitlich ist.  $[\alpha]_{589}^{23} = -10,7^\circ \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{578}^{23} = -11,2^\circ \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{23} = -12,6^\circ \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{436}^{23} = -18,9^\circ \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{365}^{23} = -24,1^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,325$  in Chloroform). IR.-Spektrum (Methylenchlorid, Beckman IR 8): u. a. Banden bei 2800–3350 (OH, assoz.), 1705 (C=O, ges.)

$\text{cm}^{-1}$ . NMR. - Spektrum vgl. Tab. 1. **5** lässt sich bei 0,01 Torr/80–100° Badtemp. destillieren, wobei es sich aber zum Teil zersetzt.

3.4. *Hexahydromyrothecinsäure-dimethylester (6)*. Eine Lösung von 510 mg **5** (aus Versuch 2.2.) in 20 ml Äther wurde bei 0° bis zur bleibenden Gelbfärbung mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum verblieben 523 mg roher Hexahydromyrothecinsäure-dimethylester (**6**) als schwach gelb gefärbtes Öl, das an 50 g Kieselgel chromatographiert wurde.

Die Fraktionen 8–10 (eluiert mit Methylenechlorid-Methanol-(100:0,5) (je 100 ml)) lieferten 304 mg reines **6** als farbloses Öl, im DC. einheitlich (Lösungsmittel: Methylenechlorid-Methanol-(100:1,5); Äther-Pentan-(1:1)). Im GC. einheitlich (Ofentemp.: 170–190°, Injekttemp.: 225°, Trägergas: Helium).  $[\alpha]_D^{23} = -10,0^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 8,60$  in Chloroform). IR.-Spektrum (Methylenechlorid, Beckman IR 8): u. a. Banden bei 2950, 2870, 1730 (C=O, ges.), 1435, 1370, 1170, 1115 und 1015  $\text{cm}^{-1}$ . 220-MHz-NMR.-Spektrum siehe Fig. 7 und Tab. 1. Massenspektrum (vgl. Fig. 8):  $M^+$  bei  $m/e$  316, 186135  $\pm 0,008$ .

3.5. *p-Bromphenacyl-ester 7 von Hexahydromyrothecinsäure (5)*. 28 mg **5** wurden mit 0,3 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und mit 6 Tropfen 2N NaOH-Lösung neutralisiert. Dann wurde die Lösung mit 2N HCl angesäuert, bis blaues Lackmuspapier gerade angefärbt wurde. Nach Versetzen mit einer Lösung von 56 mg *p*-Bromphenacylbromid in 0,6 ml Äthanol wurde 2 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Erkalten wurde eingedampft und der Rückstand zweimal aus Äthanol-Wasser umkristallisiert: 36 mg Kristalle vom Smp. 81–83,5°. Zur Analyse wurde 4 Std. bei 80° getrocknet.

$\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{Br}_2\text{O}_8$  (744,4) Ber. C 52,80 H 5,02 Br 23,42% Gef. C 52,67 H 5,02 Br 23,5%<sup>12)</sup>

3.6. *Hydrierung von Myrothecinsäure-dimethylester (4)*. Eine Lösung von 13 mg **4** in 10 ml Äthanol wurde in Gegenwart von 10 mg vorhydriertem 10-proz. Pd auf Aktivkohle bei 25°/742 Torr hydriert. Nach 3 Std. waren 3,2 Mol-Äqu. Wasserstoff aufgenommen worden, worauf die Reaktion zum Stillstand kam. Der Katalysator wurde durch eine Schicht Celite abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Es resultierten 12 mg Hexahydromyrothecinsäure-dimethylester (**6**), der nach DC., GC. und IR.-Spektrum mit **6** identisch war, das durch Veresterung der Säure resultierte, die bei der Hydrolyse von Octahydrororidin H (**2**) nach 2.2. erhalten wurde.

**4. Weitere Abbaureaktionen.** – 4.1. *Ozonolyse von Myrothecinsäure-dimethylester (4)*. In eine Lösung von 57 mg **4** in wenig Essigester wurde bei –70° bis zur deutlichen bleibenden Blaufärbung Ozon eingeleitet. Hierauf wurde bei Zimmertemp. im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mit 8 ml 2N HCl und 0,75 ml 30-proz.  $\text{H}_2\text{O}_2$  versetzt und 3,5 Std. bei 65° gerührt. Nach sechsmaligem Ausschütteln der wässrigen Lösung mit Methylenechlorid und Waschen mit Sodälösung und Wasser wurden 4,4 mg öliges Rückstand erhalten, der sich mit Diazomethan verestern liess und im DC. UV.-aktiv war. Er war identisch mit **4**.

Die restliche Lösung wurde darauf sechsmal mit Äther ausgeschüttelt, was nach Aufarbeitung 29,0 mg Rohprodukt ergab, das sich mit Diazomethan verestern liess. Es war nach GC. und IR.-Spektrum identisch mit authent. *Oxalsäure-dimethylester*.

Die restliche Lösung wurde während 24 Std. mit Äther im *Kutscher-Stuedel*-Apparat extrahiert. Nach Eindampfen der Extrakte wurden noch 5,0 mg Material erhalten, das sich aber nicht mit Diazomethan verestern liess. Es wurde nicht weiter untersucht.

4.2. *Acetalspaltung von Hexahydromyrothecinsäure-dimethylester (6)*. Eine Lösung von 290 mg **6** in 30 ml Methanol wurde mit 30 ml 0,4N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 10 ml einer Lösung von 2,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 4 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 100 ml Methanol 16 Std. unter Rückfluss erhitzt. Die wässrige Lösung wurde darauf dreimal mit Methylenechlorid ausgeschüttelt, die Extrakte mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 499 mg Öl, das im DC. mehrere Flecke zeigte. Es wurde an 50 g Kieselgel chromatographiert.

Die Fraktionen 1–4 (eluiert mit Methylenechlorid, je 50 ml) ergaben 29 mg; im DC. nicht einheitlich, verworfen.

Die Fraktionen 5 und 6 (eluiert mit Methylenechlorid, je 50 ml) lieferten 241 mg DC. reines 3-Methylglutaraldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon (**13**), das aus Essigester-Pentan umkristallisiert wurde. Charakterisierung siehe bei 4.3.1.

<sup>12)</sup> Die Brom-Bestimmung wurde im analytischen Laboratorium der Firma SANDOZ AG, Basel, durchgeführt (Leitung Dr. W. Schöniger).

Die Fraktionen 7–9 (eluiert mit Methylenechlorid, je 50 ml) ergaben 61 mg **13**, das noch mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin verunreinigt war. Durch Trennung auf Kieselgel-Dickschichtplatten wurden weitere 37 mg reines **13** erhalten.

Die Fraktionen 10–29 (eluiert mit Methylenechlorid und steigenden Mengen Methanol, bis 2%, je 100 ml) ergaben 40 mg Gemisch, das verworfen wurde.

Die Fraktionen 30–33 (eluiert mit Methylenechlorid-Methanol-(100:4) (je 100 ml)) lieferten 121 mg rohes **11**. Durch Destillation bei 0,01 Torr/80° Badtemp. wurden 111 mg reiner 6,7-Dihydroxy-octansäure-methylester (**11**) als farblose Flüssigkeit erhalten. Charakterisierung siehe bei 4.3.2.

Die Fraktionen 34–37 (eluiert mit Methylenechlorid-Methanol-(100:5 bis 100:10) (je 100 ml)) ergaben noch 6 mg Gemisch, verworfen.

Die restliche wässrige Lösung wurde noch sechsmal mit Äther ausgeschüttelt. Nach Aufarbeitung wurden 24 mg rohes **11** erhalten, das nach Destillation bei 0,01 Torr/80° Badtemp. weitere 21 mg reines **11** lieferte.

4.3. Charakterisierung der Bruchstücke der Acetalspaltung. – 4.3.1. 3-Methylglutaraldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon (**13**) kristallisiert aus Essigester-Pentan oder Methylenechlorid-Pentan in rötlich-gelben Nadeln vom Smp. 87–89,5°. IR.-Spektrum (Methylenechlorid, Beckman IR 8): u. a. Banden bei 3300 (NH-Valenzschwingung), 2945, 1730 (C=O, ges.), 1615, 1590, 1515, 1330 (NO<sub>2</sub>-Valenzschwingung), 1305, 1220, 1170, 1145, 1080, 920 und 835 cm<sup>-1</sup>. NMR.-Spektrum vgl. Tab. 1. Massenspektrum: M<sup>+</sup> bei m/e 324. Zur Analyse wurde 16 Std. bei 50° getrocknet.

C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (324). Ber. C 48,15 H 4,97 N 17,28% Gef. C 48,06 H 4,93 N 17,22%

4.3.2. 6,7-Dihydroxyoctansäure-methylester (**11**). Farblose Flüssigkeit. Im DC. (Lösungsmittel: Methylenechlorid-Methanol-(100:5)) einheitlich. Im GC. (Ofentemp.: 150°, Injekt.-Temp. 195°, Trägergas: Helium) einheitlich.  $[\alpha]_{589}^{23} = -15,5^\circ \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{578}^{23} = -16,2^\circ \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{23} = -18,2^\circ \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{436}^{23} = -29,5^\circ \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{365}^{23} = -44,2^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,223$  in Chloroform). IR.-Spektrum (Methylenechlorid, Beckman IR 8): u. a. Banden bei 3300–3700 (OH, assoz.), 2940, 2865, 1730 (C=O, ges.), 1430, 1365, 1200, 1170, 1095 und 1045 cm<sup>-1</sup>. 100-MHz-NMR.-Spektrum vgl. Tab. 1.

4.3.3. Di-O-p-nitrobenzoylderivat **12** von 6,7-Dihydroxyoctansäure-methylester (**11**). Eine Lösung von 18 mg **11** in 1,4 ml abs. Pyridin wurde mit 72 mg p-Nitrobenzoylchlorid 4 Std. unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde dann mit Äther verdünnt, filtriert, dreimal mit 2N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und eingedampft. Der Rückstand (46 mg), an 5 g Kieselgel chromatographiert (Lösungsmittel: Methylenechlorid), ergab 36 mg DC.-reines Di-O-p-nitrobenzoylderivat **12**, das bisher nicht kristallisierte. IR.-Spektrum (Methylenechlorid, Beckman IR 8): u. a. Banden bei 1725 (C=O, ges.), 1605, 1527 und 1348 (NO<sub>2</sub>-Schwingung), 1250 (C–O–C-Schwingung), 870, 840 (p-Subst.) cm<sup>-1</sup>, keine OH-Bande mehr vorhanden.

4.4. 3-Methylglutarsäure-dimethylester (**15**) aus **13**. 30 mg **13**, 30 mg 2,4-Dinitrobenzaldehyd und 3 ml 2N HCl wurden im Einschlussrohr 6 Std. auf 150–160° erhitzt. Da nach DC. immer noch viel Ausgangsmaterial vorhanden war, wurde weitere 6 Std. auf 196–200° erhitzt. Im DC. waren danach nur noch Spuren **13** vorhanden. Die saure Lösung wurde mit Äther ausgeschüttelt, die Äther-Extrakte mit H<sub>2</sub>O gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Es resultierten 40 mg rotbraun gefärbtes Rohprodukt, das mit ätherischem Diazomethan behandelt, eingedampft und nach Lösen in 3 ml Aceton mit 0,2 ml CrO<sub>3</sub>-Oxydationslösung<sup>13)</sup> 5 Min. bei 15° stehengelassen wurde. Nach Ausschütteln der Lösung mit Äther und Aufarbeiten wurde der Rückstand nochmals mit Diazomethan behandelt und anschließend auf einer Kieselgel-Dickschichtplatte aufgetrennt (Fließmittel: Methylenechlorid-Methanol-(100:1)). Es resultierten 10 mg roher 3-Methylglutarsäure-dimethylester (**15**), der im GC. eine starke Spitze zeigte, die mit derjenigen von authentischem **15** identisch war. Das Präparat wurde im Molekularkolben bei 18 Torr/80° Badtemp. zweimal destilliert. Dadurch wurden 4,4 mg Öl erhalten, das ca. 70% Dimethylester **15** enthielt. Es wurde nicht weiter gereinigt. Das Präparat war nach DC., GC., IR.-Spektrum und Massenspektrum identisch mit authent. **15**.

## 5. Spaltung von 6,7-Dihydroxyoctansäure-methylester (**11**) mit Perjodsäure. –

5.1. Isolierung von Acetaldimedonanhydrid (**21**). Eine Lösung von 12 mg Diol **11** in 1,25 ml H<sub>2</sub>O wurde mit 20 mg HJO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 7 Std. bei 22° gerührt. Nach Versetzen der Lösung mit 6 ml H<sub>2</sub>O wurde der Acetaldehyd in eine Vorlage mit 25 mg Dimedon in 1,25 ml Äthanol-H<sub>2</sub>O-(2:3) (pH 4–5)

<sup>13)</sup> Oxydationslösung: 13,33 g CrO<sub>3</sub> + 11,5 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O ad 50 ml.

destilliert. Nachdem ca. 4 ml Flüssigkeit destilliert hatten, wurde das Destillat 30 Min. auf 65–70° erwärmt. Da sich nach Abkühlen nur eine Trübung bildete, wurde die wässrige Lösung dreimal mit Äther ausgeschüttelt und die Äther-Auszüge eingedampft. Der Eindampfrückstand wurde mit 1 ml Äthanol und 2 Tropfen konz. HCl 5 Min. unter Rückfluss erhitzt. Hierauf wurde mit H<sub>2</sub>O verdünnt und dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Nach Eindampfen der Äther-Auszüge resultierten 23,5 mg Rohprodukt, das im DC. einen Fleck zeigte, der mit Acetaldimedonanhydrid identisch war. Das Präparat, dreimal auf Kieselgel-Dickschichtplatten chromatographiert (Fließmittel: Methylenchlorid-Methanol-(100:6) und Benzol-Äther-(4:6)), ergab 6,0 mg Kristalle, die aus Methanol-H<sub>2</sub>O 2,5 mg reines Acetaldimedonanhydrid (**21**) vom Smp. 165–171° lieferten, Misch-Smp. mit authent. Material: 165–172°. IR.-Spektrum (KBr, *P. E.*, Mod. 125): u. a. Banden bei 2904, 1661, 1651, 1621, 1377, 1250, 1211, 1170, 1141, 1026, 1006 und 911 cm<sup>-1</sup>. Massenspektrum: Molekularion bei *m/e* 288. Nach DC., IR.- und Massenspektrum identisch mit authent. **21**.

5.2. *Isolierung der Adipinsäure (19)*. Eine Lösung von 30 mg Diol **11** in 2,5 ml H<sub>2</sub>O wurde mit 40 mg HJO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 8 Std. bei 22° stehengelassen. Dann wurde die Lösung mit 2N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 5 gebracht, mit NaCl gesättigt und mit ges. NaCl-Lösung auf 5 ml verdünnt. Nach sechsmaligem Ausschütteln mit Äther, Trocknen und Eindampfen der Äther-Auszüge wurde das Rohprodukt (21,7 mg) in 3 ml frisch über KMnO<sub>4</sub> dest. Aceton gelöst und unter Rühren bei 50° mit 0,2 ml Oxydationslösung<sup>19</sup> versetzt. Nach 10 Min. wurde mit ca. 5 ml H<sub>2</sub>O verdünnt, das Aceton im Vakuum entfernt und das Gemisch mit NaCl gesättigt und sechsmal mit Äther ausgeschüttelt. Die Äther-Auszüge wurden getrocknet und eingedampft und der Eindampfrückstand mit ätherischem Diazomethan verestert. Es resultierten 19,0 mg Adipinsäure-dimethylester (**20**), der im GC. identisch war mit authent. Präparat.

In einem anderen Versuch wurden 26 mg Dimethylester **20** durch 1-stdg. Erhitzen mit 0,25 ml 20-proz. NaOH-Lösung 1 Std. hydrolysiert. Die Lösung wurde anschliessend mit H<sub>2</sub>O verdünnt, angesäuert, mit NaCl gesättigt und mit Äther ausgeschüttelt, die Äther-Auszüge getrocknet und eingedampft. Es wurden 12 mg rohe Adipinsäure (**19**) erhalten, die bei 0,01 Torr/140° sublimiert wurde. Das Sublimat ergab nach dreimal Umkristallisieren aus Methanol-Äther-Petroläther 4,8 mg reine Adipinsäure (**19**) vom Smp. 148–151°. Nach Misch-Smp. und IR.-Spektrum identisch mit authent. Präparat. Zur Analyse wurde 14 Std. bei 50° getrocknet.

C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (146,1) Ber. C 49,31 H 6,90% Gef. C 49,42 H 7,04%

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 19. Mitteilung: P. Pfäffli & Ch. Tamm, *Helv.* 52, 1921 (1969).
- [2] E. Härvi, W. Loeffler, H. P. Sigg, H. Stähelin, Ch. Stoll, Ch. Tamm & D. Wiesinger, *Helv.* 45, 839 (1962).
- [3] B. Böhner, E. Fetz, E. Härvi, H. P. Sigg, Ch. Stoll & Ch. Tamm, *Helv.* 48, 1079 (1965).
- [4] W. Zürcher & Ch. Tamm, *Helv.* 49, 2594 (1966).
- [5] J. Gutzwiller & Ch. Tamm, *Helv.* 48, 157 (1965).
- [6] J. Gutzwiller & Ch. Tamm, *Helv.* 48, 177 (1965).
- [7] E. Fetz, B. Böhner & Ch. Tamm, *Helv.* 48, 1669 (1965).
- [8] B. Böhner & Ch. Tamm, *Helv.* 49, 2527 (1966).
- [9] B. Böhner & Ch. Tamm, *Helv.* 49, 2547 (1966).
- [10] P. Traxler, W. Zürcher & Ch. Tamm, unpublizierte Versuche.
- [11] W. Simon & W. Tomlinson, *Chimia* 14, 305 (1960); W. Simon, Internat. Symp. on Microchem. Techn., Aug. 13–18, 1961, The Pennsylvania State Univ.
- [12] J. Gutzwiller, R. Mauli, H. P. Sigg & Ch. Tamm, *Helv.* 47, 2234 (1964).
- [13] C. Grundmann, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 69, 1756 (1936).
- [14] *Varian-Katalog*, Vol. 1, Spektrum Nr. 114.
- [15] *Varian-Katalog*, Vol. 1, Spektren Nr. 53 und 54.
- [16] J. A. Elvidge & L. M. Jackman, *Proc. Chem. Soc.* 1959, 89.
- [17] H. Budzikiewicz, D. Djerassi & D. H. Williams, «Mass Spectroscopy of Org. Comp.», Holden-Day, Inc., San Francisco, Cambridge, London, Amsterdam 1967, a) p. 258–262; b) p. 176; c) p. 180; d) p. 402.
- [18] D. H. Williams & I. F. Fleming, «Spektroskop. Methoden in der Org. Chemie», G. Thieme-Verlag, Stuttgart 1968, p. 153.

- [19] *F. Weiss, A. Isard, A. Lantz, G. Bonnard & J. Serpinet*, Bull. Soc. chim. France, 1965, 3677.  
[20] *M. Karplus*, J. chem. Physics 30, 11 (1959); *M. Karplus*, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2870 (1963);  
vgl. *S. Sternhell*, Quart. Reviews 23, 236 (1969); *L. M. Jackman & S. Sternhell*, «Applications  
of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry», Pergamon Press, Oxford,  
London, Edinburgh, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig, 2nd. Ed. 1969.  
[21] *W. Zürcher, J. Gutzwiller & Ch. Tamm*, Helv. 48, 840 (1965).  
[22] *A. T. Mc Phail & G. A. Sim*, Chem. Commun. 1965, 350; J. chem. Soc. 1966, 1394.  
[23] *R. S. Achini & Ch. Tamm*, Helv. 51, 1712 (1968).

## 216. Steric Rate-Retardation in the Chromium Trioxide Oxidation of 4,6-Dimethyl-benzocyclobutenol<sup>1)</sup>

by **Paul Müller**

Institut de Chimie Organique de l'Université, 1211 Genève 4

(11. IX. 70)

*Summary.* The rate of oxidation of 4,6-dimethyl-benzocyclobutenol<sup>1)</sup> (**1**) with chromium trioxide has been measured. After correction for the influence of the two methyl substituents the rate of oxidation of **1** is lower than that of 1-tetralol (**9**) and 1-indanol (**10**) by factors of 3 and 5 respectively. The lower oxidation rate of **1** as compared to **9** and **10** is interpreted in terms of a steric rate retardation arising from angle strain in the developing carbonyl function of 4,6-dimethylbenzocyclobutenone (**4**).

Rate accelerations due to steric effects are well known phenomena in the chromium trioxide oxidation of primary and secondary alcohols, and they have been discussed extensively in the literature [3] [4]. They are believed to be caused by relief of non-bonded interactions by changing the hybridization at the reacting carbon from  $sp^3$  to  $sp^2$ , with a considerable amount of  $sp^2$  hybridization developed in the transition state. Thus, axial hydroxyl groups on the cyclohexane ring react approximately 3 times faster than their equatorial epimers and further increase of steric ground-state interactions leads to even more impressive rate accelerations [5]. The hypothesis of a transition state resembling the carbonyl product has been challenged [6] [7] on the grounds that it requires a rate retardation in the oxidation of an alcohol leading to a strained ketone. In fact, no correlation could be established until now between oxidation rates of alcohols and strain in the resulting ketones as measured by the value of the carbonyl stretching frequency [8]. In particular, the oxidation rate of cyclobutanol is higher than that of cyclopentanol [9], although the corresponding ketone is much more strained in the 4-membered ring. Moreover, in the solvolysis reaction where, except in some isolated situations [10], the reactivity parallels the reactivity towards oxidation [3], cyclopentyl tosylate reacts faster than cyclobutyl tosylate [11]. The unexpected behaviour of cyclobutanol presents a serious problem for the understanding of the oxidation mechanism, and no satisfactory explanation has yet been found for this discrepancy.

It was therefore of interest to investigate whether benzocyclobutenol would show similar reactivity compared with 1-indanol as cyclobutanol does compared with

<sup>1)</sup> This nomenclature is preferred in the literature [1] [2] to the more systematic name (7-hydroxy-3,5-dimethyl-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene).