

MS.: M^+ = 388 ($C_{23}H_{32}O_5$). IR. ($CHCl_3$): keine HO-Banden, $\sim 1745\text{ cm}^{-1}$ (Schulter) und $\sim 1709\text{ cm}^{-1}$. NMR. ($CDCl_3$): $\sim 4,86\text{ ppm}$ (C(21)–2H, s), $\sim 3,57\text{ ppm}$ (C(15)– α H, «s»), Breite bei halber Höhe 3 Hz), etwa $1,06\text{ ppm}$ (C(18)–3H und C(19)–3H, s).

Die IR.- (in $CHCl_3$), NMR.- (in $CDCl_3$) und Massen-Spektren von **9** aus Versuchen a) und b) waren identisch; Misch-Smp. $164\text{--}169^\circ$. Das DC. und Misch-DC (Petroläther/Aceton 7:3, Chloroform/Methanol 98:2) der aus a) und b) bereiteten Verbindungen **8** bzw. **9** waren ebenfalls identisch.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. Hauser, H. H. A. Linde & D. Živanov, *Helv.* **55**, 2625 (1972).
- [2] L. Ruzicka, US Patent 2362408 vom 7. 11. 1944.
- [3] J. Fried & R. C. Elderfield, *J. org. Chemistry* **6**, 566 (1941).
- [4] D. Bertin, L. Nédélec & J. Mathieu, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. **253**, 1219 (1961). D. Bertin & L. Nédélec, *Fr. Pat.* 1369962 vom 21. 8. 1964.
- [5] F. Sondheimer, W. McCrae & W. G. Salmond, *J. Amer. chem. Soc.* **91**, 1228 (1969).
- [6] U. Stache, K. Radscheit, W. Fritsch, H. Kohl, W. Haede & H. Ruschig, *Tetrahedron Letters* **1969**, 3033.
- [7] G. R. Pettit, L. E. Houghton, J. C. Knight & F. Bruschweiler, *Chem. Commun.* **1970**, 93.
- [8] G. R. Pettit, L. E. Houghton, J. C. Knight & F. Bruschweiler, *J. org. Chemistry* **35**, 2895 (1970).
- [9] M. Bharucha, H. Jäger, K. Meyer, T. Reichstein & O. Schindler, *Helv.* **42**, 1395 (1959).
- [10] Y. Kamano, H. Yamamoto & M. Komatsu, *Chem. pharmaceut. Bull.* **17**, 1246 (1969).
- [11] H. Kondo & S. Ohno, US Patent 3134772 vom 26. 5. 1964. Siehe auch *Chem. Abstr.* **67**, 5736 (1964).
- [12] R. Deghengi, A. Philipp & R. Gaudry, *Tetrahedron Letters* **1963**, 2045.
- [13] H. Lehmann & G. Zoellner, *Ger. Off.* 1807585, s. auch *Chem. Abstr.* **73**, 25765 y (1970).
- [14] H. Linde & K. Meyer, *Helv.* **42**, 807 (1959).
- [15] F. W. Villaeusca & G. R. Pettit, *J. org. Chemistry* **37**, 569 (1972).
- [16] H. F. G. Linde, O. Isaac, H. H. A. Linde & D. Živanov, *Helv.* **54**, 1703 (1971).

306. Vier neue Metabolite von *Gibberella zeae*: 5-Formyl-zearalenon, 7'-Dehydrozearalenon, 8'-Hydroxy- und 8'-*epi*-Hydroxy-zearalenon

von G. Bolliger und Ch. Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

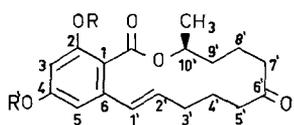
(18. IX. 72)

Summary. From cultures of *Gibberella zeae* ergosterol, zearalenone (**1**) and hitherto unknown minor metabolites, *i.e.* 5-formyl-zearalenone (**6**), 7'-dehydrozearalenone (**8**), 8'-hydroxyzearalenone (**9**) and 8'-*epi*-hydroxyzearalenone (**11**) were isolated. The production of zearalenone and its congeners proved to be very strongly dependent on the conditions of culture.

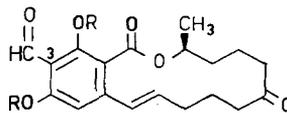
5-Formyl-zearalenone (**6**) as well as 3-formylzearalenone (**4**) were synthesized from zearalenone (**1**) and characterized by the di-O-methyl derivatives **7** and **5** respectively. The structure of 7'-dehydrozearalenone (**8**) was deduced from spectral data. The di-O-methyl derivatives **10** and **12** respectively of the two corresponding epimeric 8'-hydroxy derivatives **9** and **11** yielded the same β -diketone **13**. The keto-enol equilibrium of **13** was studied.

1. Einleitung. – Aus Kulturen von *Gibberella zeae* (Gordon) (Schw.) Petch. (*Fusarium graminearum* Schwabe) (*Fungi imperfecti*) sind bisher Zearalenon (**1**) [1] sowie die Pigmente Rubrofusarin [2] [3] und Aurofusarin [2] [4] isoliert worden. In der Literatur finden sich Hinweise, dass der Mikroorganismus auch Ergosterol zu synthe-

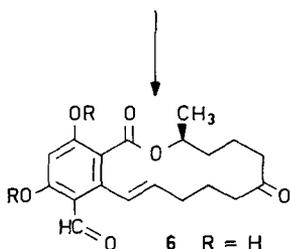
Schema 1



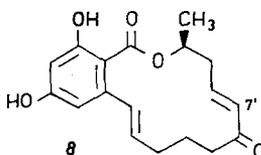
- 1 R = R' = H
- 2 R = H, R' = CH₃
- 3 R = R' = CH₃



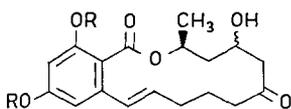
- 4 R = H
- 5 R = CH₃



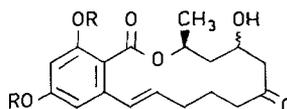
- 6 R = H
- 7 R = CH₃



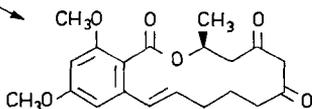
8



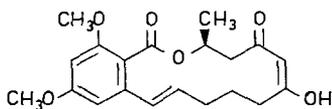
- 9 R = H: β' -Hydroxyzearalenon
F 210–212°
- 10 R = CH₃



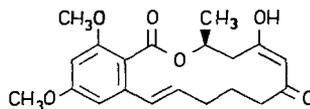
- 11 R = H: β' -epi-Hydroxyzearalenon
F 172–174°
- 12 R = CH₃



13



14



15

tisieren vermag [5]. Von diesen Stoffen hat Zearalenon (**1**) wegen seiner biologischen Eigenschaften (anabole und uterotrophe Aktivität) am meisten Beachtung gefunden. Deswegen sind auch mehrere Totalsynthesen [6] sowie zahlreiche strukturelle Modifikationen [7] [8] dieses Metaboliten beschrieben worden.

Im Zusammenhang mit Studien über die Biosynthese des Zearalenons (**1**) haben wir aus Kulturen von *Gibberella zeae* Ergosterol und vier neue Derivate des Zearalenons (**1**), nämlich 5-Formyl-zearalenon (**6**), 7'-Dehydrozearalenon (**8**), 8'-Hydroxyzearalenon (**9**) und 8'-*epi*-Hydroxyzearalenon (**11**) isolieren können. Die Bildung des Zearalenons (**1**) und der weiteren Metabolite ist ungewöhnlich stark von den Bedingungen abhängig, unter denen der Mikroorganismus gezüchtet wird.

2. Züchtung des Mikroorganismus. – Für die Kulturansätze dienten die Stämme CBS 18532¹⁾ und NRRL 2830²⁾ von *Gibberella zeae*. Die Züchtung zur Gewinnung von Zearalenon erwies sich in Ermangelung genauer Angaben in der Literatur als unerwartet schwierig. An sich scheint der Mikroorganismus für sein Wachstum keine besonderen Ansprüche an die Nährstoffe zu stellen. Als äusseres Zeichen einer normalen Entwicklung und metabolischen Leistung kann die Bildung von Ergosterol angesehen werden: sie ist von der Natur (fest oder flüssig) und Zusammensetzung des Kulturmediums weitgehend unabhängig. Zearalenon bildete sich hingegen nur unter sehr speziellen Bedingungen, wobei ein festes Nährmedium Voraussetzung ist. Eine optimale Produktion des Metaboliten wurde bei der Inkubation der Kulturen auf grobkörnigem Mais mit einem Feuchtigkeitsgrad von 45% während ca. 10 Wochen bei 12° erreicht. Befriedigende Ergebnisse können auch auf einem semisynthetischen Nährmedium, das an einem festen Träger, z.B. körniges, sehr leichtes Perlit, adsorbiert ist, erzielt werden (Einzelheiten der Optimierungsversuche vgl. [9]).

3. Isolierung und Struktur der Metabolite. – 3.1. *Ergosterol*. Der Metabolit liess sich durch Extraktion des getrockneten Mycel, das nach Züchtung des Mikroorganismus in Standkulturen auf einem üblichen flüssigen Nährmedium erhalten worden war, am besten mit Benzol extrahieren. Reinigung des Rohextrakts durch Säulenchromatographie ergab ein einheitliches krist. Präparat in Ausbeuten von 40–50 mg/l Kulturbrühe.

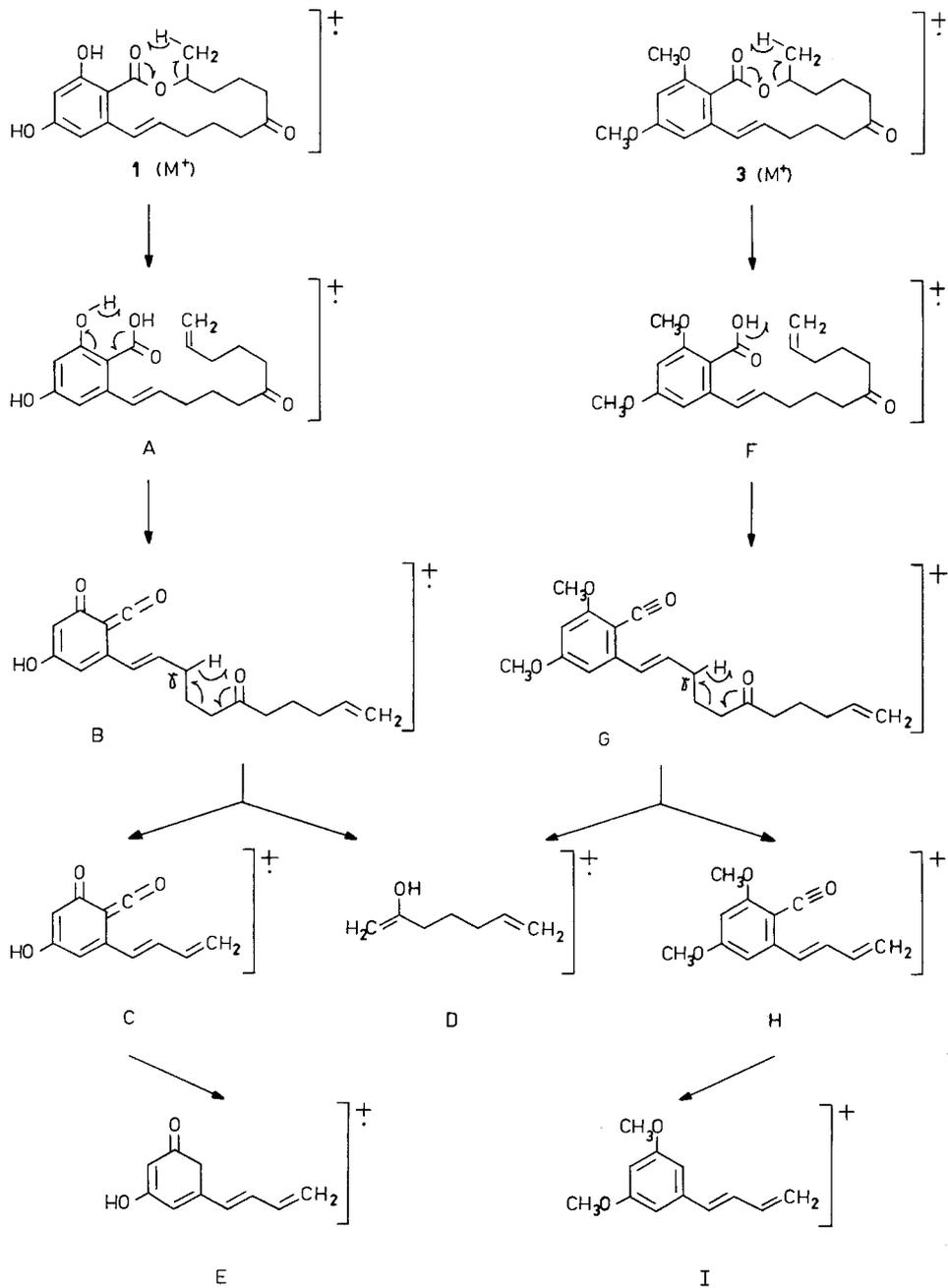
3.2. *Zearalenon* (**1**). Das mit Mycel stark durchwachsene Maisnährmedium wurde in Methylenchlorid mit dem Mixer fein zerkleinert und anschliessend im Soxhlet-Apparat extrahiert. Die vereinigten eingedampften Extrakte wurden in Äther aufgenommen und mit 2N Na₂CO₃-Lösung ausgeschüttelt. Die neutrale Ätherlösung enthielt Ergosterol. Der Na₂CO₃-Auszug enthielt neben sehr viel Zearalenon die vier neuen Metabolite. Die Trennung war wegen der geringen Polaritätsunterschiede schwierig. Sie gelang durch wiederholte Säulen- und Schichtchromatographie und fraktionierte Kristallisation. Aus 7,5 kg Mais (Trockengewicht) wurden 11,65 g Zearalenon (**1**), 0,07 g 5-Formyl-zearalenon (**6**), 0,05 g 7'-Dehydrozearalenon (**8**), 0,15 g 8'-Hydroxyzearalenon (**9**) und 0,14 g 8'-*epi*-Hydroxyzearalenon (**11**) erhalten. Die Identifizierung von Zearalenon (**1**) erfolgte durch Vergleich des Metaboliten selbst und dessen 4-Mono-O-methyläthers (**2**) und 2,4-Di-O-methyläthers (**3**) mit authentischem Material.

Im Hinblick auf die neuen verwandten Metabolite wurden die Massenspektren von Zearalenon (**1**) und dessen Dimethyläther **3** analysiert. Durch Bestimmung der

¹⁾ Bezogen von *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Baarn, Holland.

²⁾ Erhalten durch die Vermittlung von Herrn Dr. N. L. Wendler, *Merck Sharp & Dohme Research Laboratories*, Rahway, N. J., USA., wofür wir auch an dieser Stelle bestens danken.

Schema 2



genauen Massen zahlreicher Bruchstücke (vgl. Tab. 1) lässt sich eine mögliche Sequenz der Fragmentierungsreaktionen formulieren (vgl. Schema 2). Das Molekel-Ion (m/e 318) geht durch O–C-Spaltung unter Abstraktion eines β -ständigen H-Atoms in das offenkettige Ion **A** über, welches immer noch die Masse 318 besitzt. Dieses spaltet über einen sechsgliedrigen cyclischen Übergangszustand H_2O ab und geht in Ion **B** über. Diese Abspaltung von Wasser zu geladenen Radikalen ist typisch für substituierte Salicylate [10a]. Die Bruchstücke **C** (Basissignal) und **D** entstehen möglicherweise durch β -Spaltung mit Transfer eines γ -H-Atoms (*McLafferty*-Umlagerung, vgl. [10b]). Fragment **C** geht unter Verlust von CO in Ion **E** über. Im Massenspektrum von 2,4-Di-O-methylzearalenon (**3**) ist eine weitere Bruchstückfolge zu erkennen. Das Molekel-Ion (m/e 346) geht zunächst analog in das offenkettige Ion **F** der gleichen Masse über. Wegen der 2-Methoxygruppe spaltet sich in **F** kein Wasser ab, sondern es erfolgt Abspaltung eines Hydroxyl-Radikals [10c] zum Acylium-Ion **G**. *McLafferty*-Umlagerung führt zu den Fragment-Ionen **D** und **H**. Letzteres geht unter CO-Verlust in **I** über.

3.3. *5-Formyl-zearalenon* (**6**). Der neue Metabolit kristallisiert in farblosen Plättchen vom Smp. 188–190°; $[\alpha]_D^{24} = -42,0^\circ \pm 1^\circ$ (Chloroform). Das UV.-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 217 (4,16), 254 (4,49), 282 (4,00) und 317 (3,72) nm ($\log \epsilon$); sie weichen wesentlich von denen des Zearalenons (**1**) ab, was auf ein verändertes chromophores System schliessen liess. Das hochaufgelöste Massenspektrum (vgl. Tab. 1) zeigte eine Spitze für das Molekel-Ion bei m/e 346,143 \pm 0,01, was die Formel $C_{19}H_{22}O_6$ ergibt. Durch Verlust von CO entsteht das Fragment-Ion m/e 318. Dies spricht für einen aromatischen Aldehyd. Das Auftreten der gleichen Bruchstückfolge wie in Zearalenon (**1**) lässt auf eine identische Struktur des Lactonrings schliessen. Erwähnenswert ist das Erscheinen des Basissignals bei m/e 207 und nicht, wie man auf Grund der beiden postulierten Mechanismen erwarten würde, bei m/e 216 oder 217. Möglicherweise ist die bevorzugte Fragmentierung der C(2')–C(3')-Bindung dem Einfluss der Formylgruppe in 5-Stellung zuzuschreiben.

Das NMR.-Spektrum (in $CDCl_3$) (vgl. Tab. 2) zeigt zwei scharfe Ein-Proton-Singulette bei 12,62 und 12,58 ppm, die durch D_2O -Zugabe zum Verschwinden gebracht werden. Sie sind den beiden durch Wasserstoffbrücken fixierten Hydroxylgruppen zuzuordnen. Das Signal für das Aldehyd-Proton findet man bei 9,81 ppm, ebenfalls als Singulett. Das C(1')-Vinylproton erscheint als Dublett bei 7,00 ppm mit $J = 16$ Hz. Für das Singulett bei 6,42 ppm ist das aromatische Proton an C(3) verantwortlich.

Die weitere Zuordnung der einzelnen Protonen erfolgte auf Grund von Doppelresonanzversuchen. Im Bereich von 5,06–5,60 ppm lassen sich zwei komplexe Signalgruppen erkennen, die nach der Integrationskurve zwei Protonen entsprechen. Wird auf das Signal bei 5,20 ppm eingestrahlt, so wird das bei 1,42 ppm erscheinende Dublett (3H, $J = 6$ Hz) zu einem Singulett. Deshalb darf das Multipllett, dessen Zentrum bei 5,20 ppm liegt, dem C(10')-Methinproton und das Dublett bei 1,42 ppm den Methylprotonen an C(11') zugeordnet werden. Die Signalgruppe mit dem Zentrum bei 5,43 ppm entspricht infolgedessen dem Vinylproton an C(2'). Ein weiterer Entkopplungsversuch bestätigte diese Interpretation: wird bei 2,25 ppm, dem ungefähren Bereich für die allylischen Methylenprotonen an C(3'), eingestrahlt, so verwandelt sich das komplexe Signal bei 5,43 ppm in ein Dublett mit $J = 16$ Hz, was der *trans*-Kopplung mit dem Vinylproton an C(1') entspricht. Beim Einstrahlen an der Stelle

Tabelle 1. Massenspektren

Zearalenon (1)	2,4-Di-O-methyl- zearalenon (3)	3-Formyl- zearalenon (4)	5-Formyl- zearalenon (6)	8-Hydroxy- zearalenon (9)	8'-epi-Hydroxy- zearalenon (11)
<i>m/e</i> Fragment %	<i>m/e</i> Fragment %	<i>m/e</i> Fragment %	<i>m/e</i> Fragment %	<i>m/e</i> Fragment %	<i>m/e</i> Fragment %
318 C ₁₈ H ₂₂ O ₅	42,7 346 C ₂₀ H ₂₆ O ₅	17,4 346 C ₁₉ H ₂₂ O ₆	73,7 346 C ₁₉ H ₂₂ O ₆	93,2 334 C ₁₈ H ₂₂ O ₆	50,0 334 C ₁₈ H ₂₂ O ₆
301 C ₁₈ H ₂₁ O ₄	2,3 329 C ₂₀ H ₂₅ O ₄	3,2 329 C ₁₉ H ₂₁ O ₅	3,1 329 C ₁₉ H ₂₁ O ₅	1,3 317 C ₁₈ H ₂₁ O ₅	5,3 317 C ₁₈ H ₂₁ O ₅
300 C ₁₈ H ₃₀ O ₄	9,0 328 C ₂₀ H ₂₄ O ₄	16,9 328 C ₁₉ H ₃₀ O ₅	10,8 328 C ₁₉ H ₂₀ O ₅	5,6 316 C ₁₈ H ₃₀ O ₅	20,8 316 C ₁₈ H ₃₀ O ₅
189 C ₁₁ H ₉ O ₃	56,2 217 C ₁₃ H ₁₈ O ₃	100,0 217 C ₁₂ H ₉ O ₄	100,0 217 C ₁₂ H ₉ O ₄	18,5 189 C ₁₁ H ₉ O ₃	64,3 189 C ₁₁ H ₉ O ₃
188 C ₁₁ H ₈ O ₃	100,0 216 C ₁₃ H ₁₂ O ₃	4,6 216 C ₁₂ H ₉ O ₄	17,8 216 C ₁₂ H ₈ O ₄	16,4 188 C ₁₁ H ₈ O ₃	100,0 188 C ₁₁ H ₈ O ₃
161 C ₁₀ H ₉ O ₂	35,4 189 C ₁₂ H ₁₈ O ₂	96,4 189 C ₁₁ H ₉ O ₃	8,9 189 C ₁₁ H ₉ O ₃	67,5 161 C ₁₀ H ₉ O ₂	56,0 161 C ₁₀ H ₉ O ₂
160 C ₁₀ H ₈ O ₂	11,5 188 C ₁₂ H ₁₂ O ₂	5,5 188 C ₁₁ H ₈ O ₃	13,9 188 C ₁₁ H ₈ O ₃	5,0 160 C ₁₀ H ₈ O ₂	14,6 160 C ₁₀ H ₈ O ₂
112 C ₇ H ₁₂ O	59,6 112 C ₇ H ₁₂ O	15,6 161 C ₁₀ H ₉ O ₂	3,9 161 C ₁₀ H ₉ O ₂	5,0 128 C ₇ H ₁₂ O ₂	12,8 128 C ₇ H ₁₂ O ₂
		160 C ₁₀ H ₈ O ₂	3,1 160 C ₁₀ H ₈ O ₂	2,7 110 C ₇ H ₁₀ O	56,5 110 C ₇ H ₁₀ O
^a 179 C ₉ H ₇ O ₄	10,2 ^a 207 C ₁₁ H ₁₁ O ₄	33,9 112 C ₇ H ₁₂ O	41,1 112 C ₇ H ₁₂ O	33,2	
		318 ^b C ₁₈ H ₂₂ O ₅	1,6 ^b 318 C ₁₈ H ₂₂ O ₅	5,0	
		207 ^a C ₁₀ H ₇ O ₅	16,3 ^a 207 C ₁₀ H ₇ O ₅	100,0	
		179 ^c C ₉ H ₇ O ₄	1,5 ^c 179 C ₉ H ₇ O ₄	1,5	

^a Aromatisches Bruchstück, das durch Fragmentierung der C(2')-C(3')-Bindung entsteht.

^b *m/e* 346 (M⁺) -CO.
^c *m/e* 207 -CO

des Vinylprotons bei 5,43 ppm (C(2')) verändert sich das C(1')-Dublett bei 7,00 ppm in ein Singulett.

Es ist bemerkenswert, dass das C(2')-Vinylproton um 0,26 ppm bei höherem Feld erscheint als im Spektrum von Zearalenon (**1**). Unabhängig von der Stellung der Aldehydgruppe würde man auf Grund zusätzlicher Feldeffekte für die in der Ringebene des Aromaten liegenden Protonen eher eine paramagnetische Verschiebung erwarten. Wahrscheinlich sind für das unerwartete Verhalten sterische Gründe verantwortlich, indem entweder die Aldehydgruppe oder das C(2')-Proton etwas aus der Ringebene herausgedreht ist, damit die gegenseitige Beeinflussung durch *Van-der-Waals*-Kräfte möglichst gering bleibt.

Die physikalischen Daten sind im Einklang mit einer Formylgruppe; sie erlauben aber keine eindeutige Entscheidung über ihre Stellung. Deswegen wurden die beiden möglichen Isomeren aus Zearalenon (**1**) synthetisiert.

Wurde **1** in 16proz. Natronlauge mit einem Überschuss an Chloroform während vier Stunden nach *Reimer-Tiemann* umgesetzt, so liess sich ein Formyl-zearalenon in einer Ausbeute von 5% gewinnen, das nach Schmelzpunkt, Misch-Smp., Dünnschichtchromatogramm, optischer Drehung, UV-, IR-, NMR- und Massen-Spektrum mit dem natürlichen Formylderivat des Zearalenons identisch war. Das Isomere konnte nur in Spuren nachgewiesen werden. Die schlechte Ausbeute ist nicht überraschend, da die Formylierung nach dieser Methode bei hochsubstituierten Phenolen im allgemeinen schlecht verläuft [11], vor allem dann, wenn der Benzolring durch elektronenziehende Substituenten deaktiviert ist.

Die Aldehydsynthese nach *Gattermann-Adams* in der modifizierten Form von *Shah & Laiwalla* [12] sollte hauptsächlich zu 3-Formyl-zearalenon (**4**) führen. Bei der Umsetzung von Zearalenon (**1**) mit 2 Mol $Zn(CN)_2$ und 2 Mol $AlCl_3$ in abs. Äther unter Einleiten von HCl-Gas erhielten wir die beiden Isomeren **4** und **6**, etwa im Verhältnis 2:1. Die Gesamtausbeute betrug 89% der Theorie.

Das synthetische Isomere **4** war vom natürlichen Formyl-zearalenon verschieden. Es kristallisierte aus Methanol in farblosen Nadeln vom Smp. 171–172°; $[\alpha]_D^{24} = -130,2^\circ \pm 1^\circ$ (Chloroform). Die Absorptionsmaxima im UV-Spektrum erscheinen bei 250 (4,46), 302 (4,37) und 350 (3,79) nm ($\log \epsilon$), also bei längeren Wellenlängen und grösserer Intensität als bei **6**. Dies ist mit einer Formylgruppe in 3-Stellung gut vereinbar, wenn man annimmt, dass mindestens einer der für die Absorption verantwortlichen $\pi-\pi^*$ -Übergänge durch die *para*-Konjugation der 3-Formylgruppe mit der Doppelbindung an C(1') verursacht wird.

Im NMR-Spektrum ($CDCl_3$) (vgl. Tab. 2) findet man zwei signifikante Unterschiede zum Spektrum von **6**, die aber mit der Formylgruppe in 3-Stellung gut vereinbar sind. Das Aldehydproton erscheint bei 10,36 ppm, ist also um 0,55 ppm nach tieferem Feld verschoben. Diese bemerkenswert tiefe Lage ist durch starke Assoziationen zu den *ortho*-ständigen Hydroxylgruppen erklärbar. Das C(2')-Vinylproton findet man als komplexes Signal ($J = 4,5$ Hz, $J = 9$ Hz und $J = 16$ Hz) bei 5,88 ppm, also relativ zu Zearalenon (**1**) um 0,19 ppm nach tieferem Feld verschoben. Eine paramagnetische Verschiebung ist aber nur möglich, wenn das Proton an C(2') in der Ringebene liegt. Die Coplanarität des π -Systems ist nur gewährleistet, wenn die Formylgruppe in 3-Stellung steht.

Im hochaufgelösten Massenspektrum (vgl. Tab. 1) finden wir das Molekel-Ion, in Übereinstimmung mit der Bruttoformel $C_{19}H_{22}O_6$, bei m/e $346,141 \pm 0,008$. Interessanterweise erscheint das Basis-Signal bei m/e 217 und nicht wie im Spektrum von **6** bei m/e 207. Die Fragmentierung der C(2')–C(3')-Bindung ist im Falle von **4** offensichtlich weniger wahrscheinlich. Das entsprechende Bruchstück mit der Masse 207 tritt nur mit einer relativen Intensität von 16,3% auf.

Durch die Synthese der beiden Formylderivate des Zearalenons ist bewiesen, dass das natürliche Isomere eine am Benzolring haftende Formylgruppe besitzt, wobei die 5-Stellung auf Grund der bisherigen Ergebnisse sehr wahrscheinlich ist. Einen weiteren Beweis für die Struktur der beiden Formylderivate lieferten die NMR.-Spektren (in $CDCl_3$ und C_6D_6) ihrer Dimethyläther **5** und **7**. Sie wurden durch Umsetzung mit einem Überschuss an Methyljodid und K_2CO_3 in Aceton in Ausbeuten von etwa 80% erhalten.

Im NMR.-Spektrum von **7** ($CDCl_3$) (vgl. Tab. 2) findet man die Signale der beiden Methoxygruppen bei 3,98 und 3,95 ppm. Beim Wechsel von $CDCl_3$ zu C_6D_6 als Lösungsmittel verschieben sich beide Signale nach höherem Feld. Sie sind als Singulett, das nach der Integrationskurve sechs Protonen entspricht, bei 3,25 ppm wieder zu erkennen. Diese beachtliche diamagnetische Verschiebung bedeutet, dass sich in *ortho*-Stellung zu beiden Methoxygruppen ein Proton befinden muss und folglich die Formylgruppe in 5-Stellung sitzt (vgl. [13]).

Anders verhält sich der Dimethyläther **5**. Die chemischen Verschiebungen der beiden Methoxygruppen in $CDCl_3$ betragen 3,99 und 3,93 ppm (vgl. Tab. 2). Wird das Spektrum in C_6D_6 aufgenommen, so zeigt nur eine der beiden Gruppen eine starke Verschiebung nach höherem Feld. Wir finden die beiden Singulettts bei 3,90 und 3,24 ppm. Dieses unterschiedliche Verhalten beweist, dass sich die Formylgruppe in 3-Stellung befindet.

Nach Abschluss unserer Arbeit haben *Windholz et al.* [8] 3-Formyl-zearalenon (**4**) aus Zearalenon durch eine *Friedel-Crafts*-Reaktion hergestellt. Das isomere 5-Formyl-derivat **6** hat sich offenbar dabei nicht gebildet.

3.4. *7'-Dehydrozearalenon* (**8**). Dieses Stoffwechselprodukt konnte nur in sehr geringer Menge isoliert werden. Es kristallisierte aus Aceton/Äther 1:5 in farblosen Nadeln vom Smp. 197–200°; $[\alpha]_D^{24} = -133,8^\circ \pm 1^\circ$ (Chloroform). Im UV.-Spektrum (Äthanol) treten Banden bei 229 (4,45), 274 (3,97) und 313 (3,66) nm ($\log \epsilon$) auf, die durch Überlagerung des aromatischen Chromophors mit dem α, β -ungesättigten Keton zustande kommen. Die Intensität der Bande bei 229 nm spricht für eine transoide Anordnung des α, β -ungesättigten Ketons. Diese Gruppierung ist auch aus dem IR.-Spektrum ersichtlich, indem sich die 6'-Carbonyl-Streckschwingung von 1688 nach 1654 cm^{-1} verschoben hat.

Aus dem hochaufgelösten Massenspektrum geht eindeutig hervor, dass die Struktur des Lactonteils, abgesehen von der Doppelbindung in 7'-Stellung, mit der von Zearalenon (**1**) identisch ist. Das Molekel-Ion erscheint bei m/e $316,135 \pm 0,01$ und entspricht der Summenformel $C_{18}H_{20}O_5$. Die Fragmentierung läuft analog zu Zearalenon (**1**) ab, wobei die Intensität des Signals des **D** entsprechenden Bruchstücks (m/e 110) eine signifikant höhere relative Intensität aufweist, was als weiterer Beweis für die C(5')–C(11')-Partialstruktur des Lactonrings zu werten ist.

Im Einklang ist das NMR.-Spektrum (vgl. Tab. 2). In einem Gemisch von CDCl_3 und $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (1:1) zeigt es ein scharfes Singulett bei 11,41 ppm (1H) für das mit der Ester-Carbonylgruppe verbrückte Hydroxylproton an C(2) und ein breites Signal bei 8,78 ppm (1H) für das Hydroxylproton an C(4). Beide Signale verschwinden nach Zugabe von D_2O . Ein *AB*-System mit Zentren bei 6,51 und 6,39 ppm ($J \sim 2,5$ Hz; 2H) entspricht den beiden *meta*-ständigen Protonen am aromatischen Kern. Bei 1,48 ppm lässt sich ein 3-Protonen-Dublett erkennen mit $J = 6$ Hz, das der Methylgruppe an C(10') zugeordnet wird. Im Bereich von 5,45–6,0 ppm findet man zwei ineinandergeschobene Multiplette (2H). Wird bei 5,60 ppm eingestrahlt, so verändert sich das Dublett bei 1,48 ppm zu einem Singulett. Das Multiplett, dessen Zentrum bei 5,60 ppm liegt, kann deshalb dem C(10')-Proton zugeordnet werden.

Die Signale der Vinylprotonen, insbesondere des C(8')-Vinylprotons, liessen sich besser mit $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ als Lösungsmittel identifizieren. Geringfügig verdeckt durch ein Dublett (C(1')-Vinylproton) bei 6,95 ppm mit $J = 16$ Hz, lässt sich bei 7,03 ppm eine Signalgruppe erkennen, die aus vier asymmetrischen Dubletten besteht. Aus den 8 Linien lassen sich 3 verschiedene Kopplungskonstanten, $J = 2$ Hz, $J = 8$ Hz und $J = 16$ Hz ablesen. Daraus geht eindeutig hervor, dass die Signalgruppe dem C(8')-Vinylproton zugeordnet werden darf. Die Kopplungskonstante $J = 16$ Hz entspricht der *trans*-Kopplung mit dem C(7')-Vinylproton, das bei 6,12 ppm als Dublett mit $J = 16$ Hz gefunden wird. Die beiden kleineren Kopplungskonstanten sind auf Kopplungen mit den nicht äquivalenten allylischen Methylenprotonen an C(9') zurückzuführen. Das Erscheinen des C(8')-Vinylprotons bei so tiefem Feld ist gut vereinbar mit seiner β -Stellung zur Carbonylgruppe. Durch die Polarisation des α, β -ungesättigten Carbonylsystems wird die Elektronendichte am β -C-Atom erniedrigt und damit die Abschirmung des β -H-Atoms geschwächt. Wird bei 2,31 ppm, dem ungefähren Bereich für die allylischen Methylenprotonen an C(9') und C(3') eingestrahlt, so vereinfacht sich sowohl das 8-Linien-Signal bei 7,03 ppm (C(8')-Vinylproton) als auch das bereits erwähnte Multiplett bei 5,84 ppm (C(2')-Vinylproton) zu einem Dublett mit $J = 16$ Hz. Im Spektrum lassen sich jetzt, in Übereinstimmung mit den beiden aliphatischen *AB*-Systemen, vier Dublette mit $J = 16$ Hz erkennen.

3.5. *8'*-Hydroxyzearalenon (**9**) und *8'*-epi-Hydroxyzearalenon (**11**). Die hochaufgelösten Massenspektren (vgl. Tab. 1) der beiden Stoffe sind bis auf geringfügige Intensitätsunterschiede identisch (Molekel-Ion von **9** bei m/e 334,142 \pm 0,01 und von **11** bei m/e 334,14 \pm 0,01). Für beide Verbindungen ergibt sich damit die Bruttoformel $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6$. In beiden Spektren lässt sich wiederum die mehrfach beschriebene aromatische Bruchstückfolge mit dem Basis-Signal bei m/e 188 beobachten. Diese Tatsache bestätigt, dass sich die Ketogruppe an C(6') befindet und die aliphatische Hydroxylgruppe zwischen C(6') und C(10') lokalisiert sein muss. Dementsprechend tritt ein aliphatisches Bruchstück bei m/e 128 auf.

Die UV.-Spektren von **9** und **11** sind nicht nur unter sich, sondern auch mit dem Spektrum von **1** identisch. Ebenso lassen sich bei Zugabe von AlCl_3 resp. NaOH die gleichen, für das chromophore System charakteristischen Veränderungen wie in **1** erkennen.

In den NMR.-Spektren ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) treten zwei neue Signale auf, die je einem Proton entsprechen.

Bei **9** (vgl. Tab. 2) überlagern sich die beiden Signale und erscheinen zusammen bei 4,14 ppm als Multiplett (2H). Durch Zugabe von D₂O wird ein Proton, das der C(8')-Hydroxygruppe, austauschbar. Das nicht ausgetauschte Multiplett ist dem Methinproton an C(8') zuzuordnen. Diese Zuordnung liess sich am Dimethyläther **10**, der durch Umsetzung von **9** mit Methyljodid und K₂CO₃ in Aceton hergestellt wurde, bestätigen. – Im NMR.-Spektrum von **10** (CDCl₃) (vgl. Tab. 2) erscheinen die beiden Protonen getrennt, das Methinproton an C(8') bei 4,12 ppm als Multiplett und das C(8')-Hydroxylproton als Dublett bei 3,12 ppm mit $J = 4$ Hz. Beim Einstrahlen auf das Signal des C(8')-Methinprotons verwandelt sich das Dublett in ein Singulett. Wird bei 2,54 ppm eingestrahlt, so bleibt das Signal bei 4,12 ppm ein Multiplett. Wird der Entkopplungsversuch nach D₂O-Zugabe wiederholt, so verwandelt sich das Multiplett bei 4,12 ppm in ein Triplet ($J = 6$ Hz), was der Kopplung mit den Methylenprotonen an C(9') entsprechen dürfte. Weitere Entkopplungsversuche, die Auskunft über die Konfiguration an C(8') geben sollten, waren wegen der zu ähnlichen chemischen Verschiebungen der entsprechenden Protonen nicht erfolgreich.

Im NMR.-Spektrum von 8'-*epi*-Hydroxyzearalenon (**11**) in (CD₃)₂CO (vgl. Tab. 2) lässt sich bei 4,40 ppm das C(8')-Methinproton als Multiplett erkennen, während das C(8')-Hydroxylproton bei 3,83 ppm als Dublett ($J = 4$ Hz) zu finden ist. Doppelresonanzversuche bestätigen diese Zuordnung, erlauben aber ebenfalls keine Aussage über die Konfiguration am C(8')-Atom.

Die Epimerie der Hydroxyzearalene **9** und **11** wurde wie folgt bewiesen: 8'-*epi*-Hydroxyzearalenon (**11**) wurde analog zu **9** in den Dimethyläther **12** übergeführt. Die beiden Dimethyläther **10** und **12** ergaben nach Oxydation mit CrO₃-H₂SO₄ in Aceton das gleiche Diketon **13**, das keinen scharfen Schmelzpunkt zeigte.

Das Molekel-Ion im hochaufgelösten Massenspektrum trat bei m/e 360,161 ± 0,008 (**13** aus **10**), resp. m/e 360,160 ± 0,008 (**13** aus **12**) auf, was der Formel C₂₀H₂₄O₆ entspricht.

Nach den IR., UV.- und NMR.-Spektren enthält **13** eine β-Diketon-Gruppierung, was die 8'-Stellung der Hydroxyle in den beiden Metaboliten bestätigt. Dadurch ist die Ausbildung der zwei Enolformen **14** und **15** möglich. Über die Lage des Gleichgewichts zwischen der Ketoform und den beiden Enolformen geben die spektralen Daten Auskunft.

Nach dem IR.-Spektrum liegt das β-Diketon in festem Zustand ausschliesslich in der Ketoform **13** vor, denn bei 1728 cm⁻¹ tritt eine intensive, auf die Lacton- und nicht-enolisierte Diketogruppierung zurückzuführende C=O-Schwingung auf; HO-Banden fehlen.

Das UV.-Spektrum von 8'-Oxozearalenon (**13**) zeigt sowohl in Cyclohexan als auch in Äthanol die gleichen Absorptionsmaxima und log ϵ -Werte: 223 (4,40), 260 (4,29) und 290 (3,86) nm (log ϵ). Das identische Verhalten in einem unpolaren und polaren Lösungsmittel ist ein starker Hinweis dafür, dass das Diketon in Lösung bevorzugt in Enolform vorliegt. In alkalischer Lösung tritt eine neue sehr intensive Bande bei 299 nm auf, die durch die Absorption des Enolat-Ions verursacht wird.

Im NMR.-Spektrum von **13** (CDCl₃) (vgl. Tab. 2) findet sich anstelle der 8'-Methin- und 8'-Hydroxy-Protonen bei 5,53 ppm ein scharfes Singulett eines Protons, das mit D₂O sehr langsam austauscht. In der Annahme, dass **13** ausschliesslich in den Enolformen **14** und **15** vorliegt, kann dieses Signal dem Vinylproton an C(7') zugeordnet

Tabelle 2. Zuordnung der H-Atome in den NMR.-Spektren (100 MHz)^a

Verbindung	Lösungs- mittel	2-OH s	4-OH s	2-OCH ₃ ^{b)} 4-OCH ₃ s	C(3) und C(5) ^{c)} AB-System (J = 2,5 Hz)	C(1') d(16)	C(2') m	C(10') m	C(11') d(6)		
Zearalenon (1)	CDCl ₃	12,12	7,26	-	6,47	6,39	7,02	5,01	1,40		
3-Formyl- zearalenon (4)	CDCl ₃ C ₆ D ₆	2-OH 4-OH s	-	2-OCH ₃ ^{b)} 4-OCH ₃ s	C(3) s	3-CHO s	C(5) s	C(1') d(16)	C(2') m	C(10') m	C(11') d(6)
5-Formyl- zearalenon (6)	CDCl ₃ C ₆ D ₆	13,17 12,38 13,41 12,88	-	-	10,36 10,33	6,47 6,43	-	7,04 6,81	5,88 5,40	5,04 4,68	1,45 1,02
2,4-Di-O-methyl- 3-formyl- zearalenon (5)	CDCl ₃ C ₆ D ₆	12,59 12,55 13,13 12,99	-	-	6,42	-	9,81	7,00	5,43	5,20	1,42
2,4-Di-O-methyl- 3-formyl- zearalenon (5)	CDCl ₃ C ₆ D ₆	-	-	3,93 3,99	10,41	6,86	-	6,46	6,20	5,39	1,41
2,4-Di-O-methyl- 5-formyl- zearalenon (7)	CDCl ₃ C ₆ D ₆	-	-	3,90 3,24	10,50	6,45	-	6,52	5,78	5,26	1,14
2,4-Di-O-methyl- 5-formyl- zearalenon (7)	CDCl ₃ C ₆ D ₆	-	-	3,98 3,95	6,44	-	10,23	6,76	5,69	5,35	1,37
2,4-Di-O-methyl- 5-formyl- zearalenon (7)	CDCl ₃ C ₆ D ₆	-	-	3,25 3,25	6,83	-	10,49	6,94	5,74	5,29	1,20

	2-OH <i>s</i>	4-OH <i>s</i>	2-OCH ₃ ^{b)} 4-OCH ₃ <i>s</i>	C(3) und C(5) AB-System (<i>J</i> = 2,5 Hz)	C(1') <i>d</i> (16)	C(2') <i>m</i>	C(7') <i>m</i>	C(8') <i>m</i>	8'-OH	C(10') <i>m</i>	C(11') <i>d</i> (6)
7'-Dehydro- zearalenon (8)	11,14	9,14	–	6,51	6,95	5,84	6,12 <i>d</i> (16)	7,03	–	5,60	1,48
	11,41	8,87	–	6,51	6,95	5,84	6,12	7,03	–	5,60	1,48
8'-Hydroxy- zearalenon (9)	12,10	9,12	–	6,47	7,06	5,70	3,2–2,6 ^{d)}	4,14	4,14 ^{e)}	5,34	1,46
2,4-Di-O-methyl- 8'-hydroxy- zearalenon (10)	–	–	3,84 3,82	6,62	6,55 ^{f)}	6,03	2,8–2,4 ^{g)}	4,12	3,12 <i>d</i> (4)	6,48	1,40
8'- <i>epi</i> -Hydroxy- zearalenon (11)	11,90	9,11	–	6,51	7,08	5,86	3,2–2,8 ^{g)}	4,40	3,84 <i>d</i> (4)	5,60	1,43
2,4-Di-O-methyl- 8'- <i>epi</i> -hydroxy- zearalenon (12)	–	–	3,85 3,82	6,59	6,50 ^{f)}	6,00	2,9–2,6 ^{g)}	4,26	3,04 <i>d</i> (4)	5,45	1,43
8'-Oxo- zearalenon (13)	–	–	3,86 3,82	6,67	6,32 ^{f)}	6,18 ^{h)}	5,53 <i>s</i>	–	– ^{h)}	5,44	1,47
	–	–	3,39 3,25	6,70	6,61 ^{f)}	5,86 <i>s</i>	5,36 <i>s</i>	–	16	5,59	1,23

a) δ -Werte in ppm mit Si(CH₃)₄ (TMS) als internem Standard. Bei eindeutig erkennbaren Feinstrukturen bedeuten: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *m* = Multiplett. In Klammern sind die Spin-Spin-Kopplungskonstanten *J* in Hz angegeben.

b) Die Methoxy-Signale können nicht zugeordnet werden.

c) Die Signale für die aromatischen Protonen an C(3) und C(5) können nicht zugeordnet werden.

d) Diese Signale werden von denen der C(5')-Methylenprotonen überlagert; die Feinstruktur ist nicht erkennbar.

e) Das Signal dieses Protons wird durch das des C(8')-Protons überlagert.

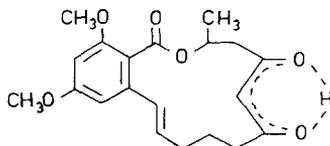
f) Das Dublett dieses Protons wird teilweise vom AB-System überlagert.

g) Dieses Signal wird teilweise durch andere Signale überdeckt.

h) Dieses Signal müsste vorhanden sein, konnte aber nicht gefunden werden. Es ist 8'-OH resp. 6'-OH zuzuordnen.

werden (vgl. [14]). Entsprechend sollte das Hydroxylproton bei sehr tiefem Feld zu finden sein; es konnte aber weder im Spektrum selber, noch im Bereich von 10–20 ppm entdeckt werden³⁾. Die C(7')-Methylenprotonen müssten bei etwa 3,5–4 ppm als Singulett erscheinen [14]; in diesem Bereich traten aber auch in C₆D₆-Lösung keine Signale auf. Dagegen konnten die Signale des 8'- bzw. 6'-Hydroxylprotons in diesen Lösungsmitteln bei 16 ppm (vgl. Tab. 2) lokalisiert werden.

Die spektroskopischen Messungen zeigen, dass das Diketon **13** in Lösung ausschliesslich enolisiert ist, wobei intramolekulare Assoziation entsprechend Formel **16** möglich ist.



16

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

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. – Alle *Schmelzpunkte* wurden auf dem *Kofler-Block* bestimmt und sind korrigiert (Fehler $\pm 1^\circ$). – *Substanzproben* für die UV-, IR-, NMR- und Massen-Spektren, ferner für Mikroanalysen und optische Drehungen wurden mindestens 16 Std. bei 0,01 Torr und 25° getrocknet, sofern nichts anderes angegeben ist. – Die *Mikroanalysen* wurden im Mikroanalytischen Laboratorium des Instituts für Organische Chemie (*E. Thommen*) durchgeführt. – Die *UV-Spektren* wurden mit einem *Beckman-UV-Spektrophotometer*, Modell DK 2, und die *IR-Spektren* mit einem *Perkin-Elmer-IR-Gitterspektrophotometer*, Modell 125, im Spektrollaboratorium des Instituts für Organische Chemie (*K. Aegerter*) aufgenommen.

Die *100-MHz-NMR-Spektren* wurden von *H. P. Huber* im Spektrollaboratorium des Physikalisch-chemischen Instituts der Universität Basel mit einem *Varian-HA-100-D-Spektrometer* gemessen, die *60-MHz-Spektren* im Spektrollaboratorium unseres Instituts (*K. Aegerter*) mit einem *Varian-A-60-Spektrometer*.

Die Aufnahmen der *Niederauflösungs-Massenspektren* besorgte Herr Dr. *C. Pascual* im Spektrollaboratorium des Physikalisch-chemischen Instituts mit einem *Hitachi-Perkin-Elmer-Gerät*, Modell RMU 7. – Die *Hochauflösungs-Massenspektren* verdanken wir Herrn Dr. *H. Lichti* von der Firma *Sandoz AG*, Basel. Sie wurden auf einem *CEC-Massenspektrometer* 21-110 B vermessen.

Zur Bestimmung der *optischen Drehungen* wurde ein *Perkin-Elmer-Polarimeter*, Modell 141, benützt.

Zur *Säulenchromatographie* diente «Kieselgel 0,05–0,20 mm (70–325 mesh ASTM)» der Firma *E. Merck AG*, Darmstadt. Für die *präparative Schichtchromatographie* benutzten wir «Kieselgel PF 254» (*E. Merck*) und für die *Dünnschichtchromatographie* «Kieselgel G nach Stahl» (*E. Merck*) unter Zusatz von Zinksilikat als Fluoreszenzindikator. Zur *Sichtbarmachung von Substanzen* auf PDC. wurden UV.-Licht («UV.-Analysis»-Gerät der Firma *Hoerner*), auf DC. UV.-Licht, J₂-Dämpfe oder spezifische Sprühreagenzien verwendet.

2. Isolierung von Ergosterol. – Die Züchtung von *Gibberella zeae* (*Gordon*) [Stamm NRRL 2830] erfolgte in Standkulturen zu je 100 ml Nährlösung (*Raulin-Thom-Medium*) (pro Liter: 50 g Glucose, 400 mg Weinsäure, 250 mg MgCO₃, 250 mg NH₄NO₃, 400 mg K₂CO₃, 400 mg

³⁾ Denkbar wäre, dass die Austauschgeschwindigkeit zufällig etwa in der gleichen Grössenordnung liegt wie die Relaxationszeit, und dadurch das Proton als so breites Signal erscheint, dass es übersehen wurde.

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 200 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mg FeSO_4 und 50 mg ZnSO_4). 5 l Nährlösung wurden auf 50 500-ml-*Erlenmeyer*-Kolben verteilt, im Druckautoklaven sterilisiert und nach dem Abkühlen mit einer Suspension von *Gibberella zeae*-Sporen angeimpft. Die Inkubationszeit betrug 18 Tage bei 23°.

Die Kulturbrühe wurde vom Mycel abfiltriert und die Mycelien dreimal mit je 500 ml Wasser gewaschen. Nach Gefriertrocknen des Mycelkuchens und anschliessendem Zerkleinern im Mörser erhielten wir 46,8 g trockenes Mycel. Die Extraktion des pulverigen Mycels erfolgte im *Soxhlet*-Apparat mit sechsmal je 1 l Benzol während insgesamt 48 Stunden. Die so gewonnenen Mycel-Extrakte wurden vereinigt, filtriert und im Vakuum auf ein Volumen von ca. 500 ml eingengt. Trocknen über Na_2SO_4 und völliges Einengen im Vakuum bei 60° lieferte 5,2 g eines viskosen, hellgelben Öls, das in 20 ml Benzol gelöst, auf 520 g Kieselgel aufgetragen wurde. Zur Elution diente Benzol mit steigenden Mengen Äther (Fraktionen zu 250 ml).

Die Fraktionen Nr. 41–49 (1,5% Äther) ergaben 240 mg grünlich-weiße Kristalle, die durch zweimaliges Umkristallisieren in abs. Äthanol weiter gereinigt werden konnten. Die Mutterlaugenrückstände wurden erneut an der 100fachen Menge Kieselgel chromatographiert und die sterolhaltigen Fraktionen aus abs. Äthanol kristallisiert. Total resultierten 186 mg Ergosterol vom Smp. 160–162°.

3. Isolierung von Zearalenon und der verwandten Metabolite. – 100-ml-*Erlenmeyer*-Kolben mit je 25 g sterilisiertem, grobkörnigem Mais mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 45% wurden mit je 0,5 ml einer Sporensuspension von *Gibberella zeae* (*Gordon*) [Stamm NRRL 2830] angeimpft und 3 Wochen bei 12° inkubiert. Am Ende der Wachstumsperiode wurde das mit Mycel stark durchwachsene Nährmedium durch kräftiges Schütteln wieder aufgelockert und für die Beimpfung der folgenden Grosskulturen bereitgestellt.

7,5 kg grobkörniger Mais wurden in Portionen zu 300 g auf 25 1-l-*Erlenmeyer*-Kolben verteilt. Durch Zugabe von je 135 ml entmineralisiertem Wasser unter kräftigem Schütteln konnte eine gleichmässige Befeuchtung der Maiskörner erreicht werden. Die so präparierten Nährmedien wurden im Druckautoklaven sterilisiert und nach dem Abkühlen mit je einer Vermehrungskultur angeimpft. Um eine möglichst gleichmässige Verteilung des Inokulats zu erreichen, wurden die Kolben nochmals kräftig geschüttelt. Die Inkubation erfolgte zuerst eine Woche bei 23°, dann 8–10 Wochen bei 12°. – Nach einer Wachstumsperiode von 8 Wochen bei 12° wurden täglich 2 Kulturen geerntet, in 2 l Methylenchlorid aufgeschlemmt und mit einem Mixer zermahlen.

Den erhaltenen Brei nutschte man über ein Nylontuch ab. Der Rückstand wurde in 4 Portionen zu ca. 100 g (bezogen auf das Maistrockengewicht) mit Methylenchlorid im *Soxhlet*-Apparat extrahiert, wobei 1-l-Fraktionen nach 1, 2, 4, 8 und 16 Stunden genommen wurden. Total 22 l roter Extrakt wurden durch Hyflo filtriert und im Vakuum auf 1,5 l eingengt. Nach dreimaligem Waschen mit je 500 ml destilliertem Wasser, wurde das Konzentrat mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum vollständig eingedampft. Aus den 25 Kulturen resultierten insgesamt 104,7 g dunkelroter, halbfester Extrakt, der in 3 l Äther aufgenommen und fünfmal mit 500 ml 2N KHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen wurde.

Die dunkelgelbe Ätherlösung wurde auf 1 l eingengt und zur Abtrennung der phenolischen Zearalenone siebenmal mit je 500 ml 2N Na_2CO_3 -Lösung unter Eiskühlung ausgeschüttelt. Die orangegelbe wässrige Phase wurde mit 25proz. H_2SO_4 unter Zugabe von Eis auf pH 6,0 gestellt und mit 1,5 l Äther ausgezogen. Diesen Vorgang wiederholte man dreimal, wobei der pH-Wert sukzessive auf 5,0 erniedrigt wurde. – In analoger Weise wurde auch die KHCO_3 -Phase aufgearbeitet.

Nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen resultierten folgende Rohextrakte: neutraler Ätherextrakt: 86,8 g orangerotes, z.T. festes Öl; KHCO_3 -Extrakt: 0,3 g gelber Lack; Na_2CO_3 -Extrakt: 15,2 g gelber Schaum.

Der orangerote Ätherextrakt (86,8 g) wurde in 500 ml 90proz. Äthanol gelöst, mit 300 ml einer 1proz. alkoholischen Digitoninlösung versetzt und über Nacht bei 0° stehengelassen. Das ausgefallene Digitonid wurde abgenutscht und dreimal mit je 50 ml 90proz. Äthanol gewaschen. Zur Spaltung [15] wurde das Digitonid in 100 ml $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ gelöst und während 15 Min. auf dem Dampfbad erhitzt. Nach dem Abkühlen extrahierte man das Gemisch fünfmal mit je 150 ml Petroläther. Aus den vereinigten Extrakten resultierten nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Abdampfen des Lösungsmittels 893 mg rohes Sterol. Zweimaliges Umkristallisieren aus abs. Äthanol lieferte 684 mg reines Ergosterol vom Smp. 160–163°.

Zur Isolierung von Zearalenon (**1**) und der verwandten Metabolite wurde der Na_2CO_3 -Extrakt (15,2 g) an 1,5 kg Kieselgel mit Benzol und steigendem Ätherzusatz als Lösungsmittel (1-l-Frak-tionen) chromatographiert.

Fractionen 1–20 (Benzol): verworfen.

Fractionen 21–28 (2–3% Äther): 103 mg farbloses Öl; nach Reinigung durch präparative Schichtchromatographie (Lösungsmittel Benzol mit 5% Methanol): 68 mg rohes 5-Formyl-zearalenon (**6**) als farbloser Schaum.

Fractionen 29–40 (3–5% Äther): 11,65 g farbloser Schaum, Zearalenon (**1**) enthaltend.

Fractionen 41–48 (6–8% Äther): 126 mg dunkelgelbes Öl; nach Reinigung durch präparative Schichtchromatographie (Lösungsmittel: 1. Chloroform/Äthanol, 97:3; 2. Benzol/Methanol 46:4): 46 mg krist. 7'-Dehydrozearalenon (**8**).

Fractionen 49–70 (10–30% Äther): 245 mg Öl, nicht aufgetrennt.

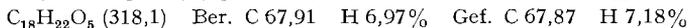
Fractionen 71–91 (30–50% Äther): 568 mg Öl; nach nochmaliger Chromatographie an 550 g Kieselgel mit Methylenchlorid und 0–2% Methanol als Lösungsmittel: Fractionen 41–47 (2% Methanol): 172 mg Schaum, aus Methanol-Chloroform 39 mg krist. 8'-Hydroxyzearalenon (**9**). – Die Mutterlaugen (129 mg) wurden mit den folgenden Fractionen 48–75 vereinigt. Fractionen 48–75 (2% Methanol): 314 mg, + 129 mg von Fractionen 41–47, nach Reinigung durch präparative Schichtchromatographie (Lösungsmittel: 1. Chloroform mit 4% Äthanol, 2. Benzol mit 5% Methanol): 141 mg krist. 8'-epi-Hydroxyzearalenon (**11**), 134 mg Gemisch von **9** und **11** (amorph) und 112 mg krist. 8'-Hydroxyzearalenon (**9**).

Fractionen 92–106 (55–80% Äther): 218 mg Lack, nicht aufgetrennt.

4. Charakterisierung der isolierten Metabolite. – 4.1. *Ergosterol*. Nach Umkristallisieren aus abs. Äthanol resultierten farblose Plättchen vom Smp. 161–163°; $[\alpha]_D^{24} = -132^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). Die IR-, UV- und NMR.-Spektren waren identisch mit denen einer authentischen Probe. Massenspektrum: Molekel-Ion bei m/e 396 (9,3%). Zur Analyse wurde 16 Std. bei 60° getrocknet.

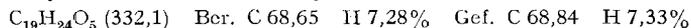


4.2. *Zearalenon* (**1**). Aus 11,65 g rohem Zearalenon (**1**) resultierten nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äther/Pentan 5:1 9,84 g farblose Prismen vom Smp. 163–164°; $[\alpha]_D^{24} = -134,2^\circ \pm 1^\circ$; $[\alpha]_{546}^{24} = -173,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Methanol); $[\alpha]_D^{24} = -191,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). Die IR-, UV- und NMR.-Spektren waren identisch mit denen einer authentischen Probe. Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl. Tab. 1): Molekel-Ion bei m/e 318,15 \pm 0,01.

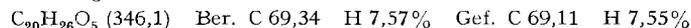


4.3. *4-O-Methylzearalenon* (**2**) und *2,4-Di-O-methylzearalenon* (**3**). Eine Lösung von 1,0 g Zearalenon (**1**) in 70 ml Aceton wurde mit 11,0 g K_2CO_3 und 19 ml Methyljodid 3 Std. unter Rückfluss erhitzt. Hierauf wurden die anorganischen Salze abgenutscht und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wurde in 300 ml Äther aufgenommen, mit Wasser neutral gewaschen, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Es resultierten 1,34 g hellgelber Lack, der an 150 g Kieselgel chromatographiert wurde. Eluiert wurde mit Benzol in Fractionen zu je 100 ml.

Die Fractionen 30–45 ergeben 289 mg **2** (27,7% d. Th.). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol, das eine Spur Wasser enthielt, resultierten 197 mg (19,0%) farblose Plättchen vom Smp. 120–122°; $[\alpha]_D^{24} = -176,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 236 (4,48), 273 (4,12) und 314 (3,84) nm ($\log \epsilon$). Massenspektrum: Molekel-Ion bei m/e 332. Zur Analyse wurde 24 Std. bei 45° getrocknet.



Die Fractionen 49–67 enthielten 643 mg **3** (60,1%). Zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol ergab 486 mg (44,7%) farblose Nadeln vom Smp. 113–114°; $[\alpha]_D^{24} = +49,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform); $[\alpha]_D^{24} = +24,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Methanol). UV.-Spektrum (in Äthanol): Maxima bei 223 (4,48), 256 (*sh*, 4,13) und 298 (3,38) nm ($\log \epsilon$). Massenspektrum: vgl. Tab. 1. Zur Analyse wurde 24 Std. bei 45° getrocknet.



4.4. *5-Formylzearalenon* (**6**). 68 mg durch präparative Schichtchromatographie gereinigtes Material wurden einmal aus Methanol umkristallisiert. Es resultierten 53 mg farblose Plättchen

vom Smp. 188–190°; $[\alpha]_D^{24} = -42,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3427–2727 (OH, assoz.); 2960 (CH und CH_2); 1701 (C=O, Keton); 1666; 1631 (C=O, Lacton und Aldehyd); 1613; 1569 (aromat.); 1463; 1431; 1392; 1365; 1278; 1251; 1208; 1181; 1131; 1120; 1013; 986; 934; 851; 820; 744; 666 und 566 cm^{-1} . UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 217 (4,15), 254 (4,49), 282 (*sh*, 4,00) und 315 (3,72) nm ($\log \epsilon$). NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl. Tab. 1): Molekel-Ion bei m/e 346,14 \pm 0,01.

$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$ (346,1) Ber. C 65,88 H 6,40% Gef. C 65,61 H 6,33%

4.5. *Synthese von 3-Formylzearealenon (4) und 5-Formylzearealenon (6)*. – *Methode a*: 5,1 g Zearealenon (1) und 5,2 g NaOH wurden in 30 ml destilliertem Wasser gelöst und in einem mit Rückflusskühler versehenen Sulfierkolben unter N_2 -Strom und Rühren portionenweise mit 12 ml Chloroform versetzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf Siedetemperatur gebracht und während 4 Std. unter Rückfluss gekocht.

Nach Ansäuern mit 2N H_2SO_4 -Lösung (pH 5) wurde das dunkelbraune Reaktionsprodukt dreimal mit 100 ml Äther ausgeschüttelt. Die Ätherextrakte wurden mit 2N KHCO_3 -Lösung neutral gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Eindampfen resultierten 7,2 g eines dunkelbraunen Öls, welches an 100 g Kieselgel chromatographiert wurde. Eluiert wurde mit Benzol mit steigenden Mengen Äther in Fraktionen zu je 100 ml.

Die Fraktionen 8–11 (eluiert mit Benzol/Äther 98:2) ergaben 31 mg mit 3-Formylzearealenon (4) verunreinigtes 5-Formylzearealenon (6).

Die Fraktionen 12–24 (eluiert mit Benzol/Äther 98:2) ergaben 268 mg 6 (5,15%). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol resultierten 183 mg (3,27%) farblose Plättchen vom Smp. 189–190°. Das so gewonnene synthetische Präparat war in jeder Hinsicht identisch mit dem natürlichen 5-Formylzearealenon (6).

Aus den Fraktionen 25–42 (eluiert mit Benzol/Äther 97:3 bis 95:5) wurden 1,42 g Ausgangsmaterial 1 zurückgewonnen.

Methode b: Zu einer gut gerührten, eisgekühlten Suspension von 1 g Zearealenon (1) und 740 mg wasserfreiem Zinkcyanid in 50 ml abs. Äther gab man 840 mg wasserfreies Aluminiumchlorid in 20 ml abs. Äther. In das hellgelbe Gemisch wurde bei 0° während 5 Std. trockenes HCl-Gas eingeleitet, wobei das Zinkcyanid langsam in Lösung ging und sich eine halb feste Masse abschied. Das Reaktionsgemisch liess man 16 Std. bei 0° stehen, dekantierte dann den Äther ab und hydrolysierte den Rückstand, indem man erst vorsichtig 100 ml eines Eis-Wasser-Gemisches zugab und anschliessend 20 Min. auf 80° erwärmte. Das hydrolysierte Produkt wurde unter Verwendung der abdekantierten Ätherphase dreimal mit je 200 ml Äther ausgeschüttelt und mit 2N KHCO_3 -Lösung und Wasser neutral gewaschen, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 1,14 g hellgelber Lack, der an 200 g Kieselgel chromatographiert wurde. Eluiert wurde mit Benzol/Äther 99:1 in Fraktionen zu je 100 ml.

Die Fraktionen 22–41 enthielten 654 mg (60,0%) 3-Formylzearealenon (4). Zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol lieferte 526 mg (48,4%) farblose Nadeln vom Smp. 171–172°; $[\alpha]_D^{24} = -130,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3377–2600 (OH, assoz.); 2927 (CH und CH_2); 1693 (C=O, Keton); 1626 (breit, C=O, Lacton, Aldehyd, aromat.); 1551 (aromat.); 1450; 1428; 1408; 1354; 1348; 1308; 1254; 1213; 1204; 1184; 1123; 1058; 1004; 988; 973; 922; 853; 800; 752; 623 und 532 cm^{-1} . UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 250 (4,46), 302 (4,37) und 350 (3,79) nm ($\log \epsilon$). NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl. Tab. 1): Molekel-Ion bei m/e 346,141 \pm 0,008.

$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$ (346,1) Ber. C 65,88 H 6,40% Gef. C 65,92 H 6,36%

Die Fraktionen 45–59 ergaben 311 mg (28,6%) 5-Formylzearealenon (6). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol konnten 248 mg (22,8%) farblose Plättchen vom Smp. 189–190° erhalten werden, die in jeder Hinsicht mit dem natürlichen Präparat identisch waren.

4.6. *2,4-Di-O-methyl-5-formylzearealenon (7)*. Eine Lösung von 230 mg 5-Formylzearealenon (6) in 25 ml Aceton wurde mit 2,3 g K_2CO_3 und 4 ml Methyljodid 4,5 Std. unter Rückfluss erwärmt. Hierauf wurden die anorganischen Salze abgenutscht und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wurde in 75 ml Äther aufgenommen, mit Wasser neutral gewaschen, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Es resultierten 273 mg gelber Lack, der schichtchromatographisch gereinigt wurde. (Kieselgel, Fließmittel: Benzol/Methanol 95:5). Aus den Zonen mit dem Rf-Wert 0,5 eluierte man 198 mg 7 (79,5%) als farblosen

Lack. Das Produkt war DC-einheitlich (Fließmittel: Benzol/Methanol 96:4). Durch Verreiben in Pentan und anschließende Zugabe von Äther wurde amorphes 2,4-Di-O-methyl-5-formylzearalenon (**7**) vom Smp. 111–112° gewonnen. $[\alpha]_D^{24} = +52,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 2930; 1724 (C=O, Lacton); 1705; 1688 (C=O, Keton, Aldehyd); 1671; 1574 (aromat.); 1470; 1433; 1381; 1318; 1270; 1211; 1164; 1129; 1090; 988; 965 und 838 cm^{-1} . UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 244 (4,38), 278 (4,01) und 316 (3,85) nm ($\log \epsilon$). NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. Massenspektrum: Molekel-Ion bei m/e 374 (25,3%). Weitere Spitzen bei m/e 356 (5,3%); 245 (37,2%); 235 (Basissignal); 217 (42,5%); 207 (11,5%); 189 (42,5%) und 112 (15,4%). Zur Analyse wurde 16 Std. bei 50° getrocknet.



4.7. 2,4-Di-O-methyl-3-formylzearalenon (**5**). Eine Lösung von 268 mg 3-Formylzearalenon (**4**) in 30 ml Aceton wurde mit 2,7 g K_2CO_3 und 4,7 ml Methyljodid versetzt und 5 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach Aufarbeiten wie bei 4.6. beschrieben, resultierten 316 mg gelber Lack, der mittels präparativer Schichtchromatographie gereinigt wurde (Kieselgel, Fließmittel: Benzol/Methanol 95:5).

Die Zonen mit dem Rf-Wert 0,5 ergaben 248 mg **5** (82,7%) als farblosen Lack. Das Produkt war DC-einheitlich (Fließmittel: Benzol/Methanol 96:4). Durch Verreiben mit Pentan und anschließende Zugabe von Äther wurde ein amorphes Präparat vom Smp. 113–115° erhalten. $[\alpha]_D^{24} = +75,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 2940; 1706 (C=O, Lacton, Keton); 1686 (C=O, Aldehyd); 1589; 1546 (aromat.); 1459; 1394; 1344; 1284; 1214; 1163; 1107; 1083; 978; 930; 856; 649 und 584 cm^{-1} . UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 218 (4,36), 292 (4,35) und 332 (*sh*, 3,73) nm ($\log \epsilon$). NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. Massenspektrum: Molekel-Ion bei m/e 374 (9,9%). Weitere Spitzen bei m/e 356 (5,3%); 245 (Basissignal); 235 (12,2%); 217 (21,8%); 207 (4,0%); 189 (24,4%) und 112 (49,3%). Zur Analyse wurde 16 Std. bei 50° getrocknet.



4.8. 7'-Dehydrozearalenon (**8**). 46 mg durch präparative Schichtchromatographie gereinigtes Material ergab nach Umkristallisieren aus Aceton/Äther 1:5 34 mg farblose Nadeln vom Smp. 197–200°; $[\alpha]_D^{24} = -133,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3360 (breit, OH); 2927; 1654 (C=O, Lacton, α, β -unges. Keton); 1618; 1578 (aromat.); 1454; 1438; 1354; 1342; 1314; 1259; 1191; 1166; 1113; 1069; 974; 959; 846; 834 und 696 cm^{-1} . UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 229 (4,45), 274 (3,97) und 313 (3,66) nm ($\log \epsilon$). NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. Massenspektrum (hochaufgelöst): Molekel-Ion bei m/e 316,135 \pm 0,01 ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_5$).

4.9. 8'-Hydroxyzearalenon (**9**). Aus 112 mg schichtchromatographisch gereinigtem Material resultierten nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol/Chloroform 1:6 77 mg farblose Kristalle vom Smp. 210–212°; $[\alpha]_D^{24} = -149,1^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Aceton). IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3417 (breit, OH); 2950; 2920; 1694 (C=O, Keton); 1641 (C=O, Lacton); 1611; 1580 (aromat.); 1461; 1440; 1371; 1344; 1311; 1256; 1203; 1169; 1147; 1066; 1013; 959; 858; 820 und 709 cm^{-1} . UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 236 (4,43), 274 (4,10) und 314 (3,78) nm ($\log \epsilon$); in Äthanol- AlCl_3 : Maxima bei 236, 284 und 324 nm; in Äthanol-NaOH: Maxima bei 236 (*sh*), 254 und 314 nm. NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl. Tab. 1): Molekel-Ion bei m/e 334,142 \pm 0,01. Zur Analyse wurde 16 Std. bei 50° getrocknet.



4.10. 2,4-Di-O-methyl-8'-hydroxyzearalenon (**10**). Eine Lösung von 102 mg **9** in 10 ml Aceton wurde mit 1,1 g K_2CO_3 und 1,9 ml Methyljodid 5 Std. unter Rückfluss erhitzt. Hierauf wurden die anorganischen Salze abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der hellgelbe, amorphe Rückstand wurde in 40 ml Äther aufgenommen, mit Wasser neutral gewaschen, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Man erhielt 116 mg Rohprodukt als hellgelben Lack, der schichtchromatographisch gereinigt wurde. (Fließmittel: Benzol/Methanol 96:4). Es resultierten nach Umkristallisieren aus Benzol/Äther 1:5 78 mg (70,5%) farblose Kristalle vom Smp. 162–164°; $[\alpha]_D^{24} = +11,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3500; 3460 (breit, OH); 2970; 2955; 2930; 1717 (C=O, Lacton); 1691 (C=O, Keton); 1590; 1568 (aromat.); 1450; 1412; 1333; 1315; 1280; 1247; 1192; 1147; 1087; 1037; 964;

957; 921; 827 und 820 cm^{-1} . UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 223 (4,44), 256 (*sh*, 4,11), 299 (3,37) nm ($\log \epsilon$). NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. Massenspektrum: Molekel-Ion bei m/e 362. Zur Analyse wurde 16 Std. bei 50° getrocknet.

$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$ (362,1) Ber. C 66,28 H 7,23% Gef. C 66,52 H 7,21%

4.11. *2,4-Di-O-methyl-8'-oxozearalenon (13) aus 10*. Eine Lösung von 100 mg **10** in 2 ml über KMnO_4 dest. Aceton wurde unter Rühren bei 10–15° tropfenweise mit CrO_3 -Oxydationslösung versetzt. Nach 2 Std. wurde mit wenig Methanol versetzt, die Lösung mit 20 ml H_2O verdünnt, das Aceton im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung dreimal mit je 30 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt, die organische Phase mit Wasser neutral gewaschen, über Watte filtriert und eingedampft. Es resultierten 103 mg rotbraunes Rohprodukt, das schichtchromatographisch getrennt wurde (Kieselgel, Fließmittel: Benzol/Methanol 97:3).

Die Zone mit dem Rf-Wert 0,6 lieferte 25 mg **13** (25,1%) als farblosen Lack, der beim Stehenlassen teilweise kristallisierte. Aus der Zone mit dem Rf-Wert 0,35 konnten 50 mg Ausgangsmaterial eluiert werden. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol resultierten farblose Plättchen vom Smp. 135–144°; $[\alpha]_D^{24} = -93,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 2927; 1728 (C=O, Lacton und Diketon); 1603; 1575 (aromat.); 1471; 1427; 1328; 1321; 1260; 1201; 1155; 1097; 1042; 1003; 968; 848; 812; 776 und 630 cm^{-1} . UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 223 (4,48), 260 (4,29) und 290 (Infl. 3,86) nm ($\log \epsilon$); in Cyclohexan: Maxima bei 223 (4,40), 260 (4,25) und 290 (Infl. 3,84) nm ($\log \epsilon$). NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. Massenspektrum (hochaufgelöst): Molekel-Ion bei m/e 360,161 \pm 0,008 ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$).

4.12. *8'-epi-Hydroxyzearalenon (11)*. 141 mg durch präparative Schichtchromatographie gereinigtes Material ergaben nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol/Chloroform 1:7 108 mg farblose Kristalle vom Smp. 172–174°; $[\alpha]_D^{24} = -53,1^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Aceton). IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3532–3316 (breit, OH); 2927; 1681 (C=O, Keton); 1644 (C=O, Lacton); 1611; 1579 (aromat.); 1444; 1387; 1356; 1311; 1256; 1200; 1169; 1106; 1059; 1022; 977 und 849 cm^{-1} . UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 237 (4,45), 276 (4,10) und 315 (3,74) nm ($\log \epsilon$); Äthanol- AlCl_3 : Maxima bei 237, 288 und 328 nm; in Äthanol-NaOH: Maxima bei 237 (*sh*), 249 und 315 nm. NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl. Tab. 1): Molekel-Ion bei m/e 334,14 \pm 0,01 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6$).

4.13. *2,4-Di-O-methyl-8'-epi-hydroxyzearalenon (12)*. 118 mg **11** wurden wie bei 4.10. beschrieben methyliert. Nach Trennung des Rohprodukts (134 mg) mittels präparativer Schichtchromatographie und Umkristallisieren aus Benzol/Äther 1:5 resultierten 88 mg farblose Kristalle vom Smp. 128–130°, $[\alpha]_D^{24} = +80,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3435 (OH); 2927; 1720 (C=O, Lacton); 1708 (C=O, Keton); 1595; 1577 (aromat.); 1451; 1422; 1358; 1335; 1320; 1254; 1202; 1154; 1087; 1042; 968 und 838 cm^{-1} . UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 222 (4,43), 255 (*sh*, 4,60) und 296 (3,32) nm ($\log \epsilon$). NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. Massenspektrum: Molekel-Ion bei m/e 362. Zur Analyse wurde 16 Std. bei 40° getrocknet.

$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$ (362,1) Ber. C 66,28 H 7,23% Gef. C 65,71 H 7,25%

4.14. *2,4-Di-O-methyl-8'-oxozearalenon (13) aus 12*. 101 mg **12** wurden wie bei 4.11. behandelt mit dem Unterschied, dass die Reaktion bereits nach 15 Min. durch Versetzen mit wenig Methanol beendet wurde. Es resultierten 39 mg farblosler Lack, die nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol 24 mg DC-reines **13** vom Smp. 134–144° lieferte. $[\alpha]_D^{24} = -92,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,000$ in Chloroform). Massenspektrum (hochaufgelöst): Molekel-Ion bei m/e 360,160 \pm 0,008 ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$). Die IR.-, UV.- und NMR.-Spektren waren identisch mit denen des aus **10** bereiteten Präparats.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Stob, R. S. Baldwin, J. Tuite, F. N. Andrews & K. G. Gillette, *Nature* 196, 1318 (1962); W. H. Urry, H. L. Wehrmeister, E. B. Hodge & P. H. Hidy, *Tetrahedron Letters* 1966, 3109; C. H. Kuo, D. Taub, R. D. Hoffsommer, N. L. Wendler, W. H. Urry & G. Mullenbach, *Chem. Commun.* 1967, 761.
- [2] J. N. Ashley, B. C. Hobbs & H. Raistrick, *Biochem. J.* 31, 385 (1937).
- [3] H. Tanaka & T. Tamura, *Tetrahedron Letters* 1967, 151; G. H. Stout, D. L. Dreyer & L. H. Jensen, *Chemistry & Ind.* 1967, 289.

- [4] S. Shibata, E. Morishita, T. Takeda & K. Sabata, *Tetrahedron Letters* 1966, 4855.
 [5] J. V. Fiore, *Arch. Biochem. Biophysics* 16, 161 (1948).
 [6] D. Taub, N. N. Girotra, R. D. Hoffsommer, C. H. Kuo, H. L. Slates, S. Weber & N. L. Wendler, *Chem. Commun.* 1967, 225; *Tetrahedron* 24, 2443 (1968); N. N. Girotra & N. L. Wendler, *Chemistry & Ind.* 1967, 1493; H. L. Wehrmeister & D. E. Robertson, *J. org. Chemistry* 33, 4173 (1968); N. N. Girotra & N. L. Wendler, *ibid.* 34, 3192 (1969); J. Vlattas, J. T. Harrison, L. Tokes, J. H. Fried & A. D. Cross, *ibid.* 33, 4176 (1968).
 [7] D. B. R. Johnston, C. A. Sawicki, T. B. Windholz & A. A. Patchett, *J. med. Chemistry* 13, 941 (1970); N. P. Jensen, R. D. Brown, S. M. Schmitt, T. B. Windholz & A. A. Patchett, *J. org. Chemistry* 37, 1639 (1972).
 [8] T. B. Windholz & R. D. Brown, *J. org. Chemistry* 37, 1647 (1972).
 [9] Georg Bolliger, *Diss. Universität Basel* 1971.
 [10] H. Budzikiewicz, D. Djerassi & D. H. Williams, «*Mass Spectroscopy of Organic Compounds*», Holden-Day Inc., 1967: a) pg. 200, b) pg. 196, c) pg. 219.
 [11] J. Renz, *Helv.* 30, 124 (1947).
 [12] R. C. Shah & M. C. Laiwalla, *J. chem. Soc.* 1938, 1928; W. B. Whalley, *ibid.* 1949, 3278; R. T. Seshadri & G. B. Venkatasubramanian, *ibid.* 1959, 1658.
 [13] R. G. Wilson, J. H. Bowie & D. H. Williams, *Tetrahedron* 24, 1407 (1968).
 [14] H. Suhr, *Anwendung der kernmagnetischen Resonanz in der organischen Chemie*, Springer-Verlag, Berlin 1965, pg. 300.
 [15] C. H. Issidorides, J. Katagawa & E. Mosettig, *J. org. Chemistry* 27, 4693 (1962).

307. Zur Kinetik der Perkow-Reaktion

von J. Konecny

CIBA-GEIGY Aktiengesellschaft, Basel

R. Dousse und J. Rosales¹⁾

CIBA-GEIGY Aktiengesellschaft, Werk Monthey, VS

(31. X. 72)

Summary. The Perkow reaction of $\text{CH}_3\text{COCHClCONHCH}_3$ with $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{P}$ is first order in both reactants. The reaction rates, the activation energies and the high negative entropies of activation have comparable values in benzene and in acetonitrile solutions.

Die Perkow-Reaktion [1] wurde trotz der vielseitigen Bearbeitung [2] erst in letzter Zeit kinetisch untersucht. Arcoria & Fisichella [3] stellten fest, dass die Geschwindigkeit der Reaktion *para*-substituierter Phenacylchloride mit Triäthylphosphit in Benzol durch elektronenanziehende Substituenten beschleunigt wird; in der eingehenden Arbeit mit kernsubstituierten α -Brom- und α -Chlorisobutyrophenonen haben Borowitz *et al.* [4] ähnliche Substituenteneffekte festgestellt. Geschwindigkeitsbestimmend ist vermutlich die Herstellung der Bindung zwischen Phosphoratom und Carbonylkohlenstoff, worauf unmittelbar eine schnellere Umlagerung an den benachbarten Carbonylsauerstoff und die Arbusow-Spaltung folgen.

In dieser Arbeit wird die Kinetik der Reaktion (1) von Chloracetessigsäuremethylamid (RCl) mit Trimethylphosphit (TMP) untersucht. Der Reaktionsverlauf wurde kolorimetrisch durch Messung des nicht umgesetzten RCl verfolgt. Bei der

¹⁾ Die experimentelle Arbeit wurde von den Herren A. Schneider und O. Devillaz ausgeführt.