

12)); 134,90 (C(11)); 141,17, 142,16, 142,79 und 144,26 (C(3, 4, 15 und 16)); 145,52 (C(8)); 163,08 (C(9)); 168,05, 168,15 und 168,40 (doppelte Intensität) ( $4 \times$  Acetat-CO).

3. 100 mg frisch isolierte Fraktion von Dopaldehyd-kaffecat wurden in 1 ml Äthanol gelöst und mit 2 ml 5proz. Salzsäure versetzt und während 4 Std. auf  $80^\circ$  erwärmt. Darauf Zugabe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin(DNP)-Lösung in Salzsäure, darauf verdünnen mit Wasser, abfiltrieren, aufnehmen des Rückstandes mit Chloroform und chromatographieren an 30 g  $\text{SiO}_2$ . Das gesuchte Produkt befand sich in der oberen Zone (die untere bestand aus Reagens). Nach Elution und Umkristallisation aus Äthanol, Nadeln, Smp. 173,8-174,4° (Zers.) identisch in Smp., Mischsmp., DC., IR. und MS. mit einem authentischen Präparat.

Das Filtrat des DNP-Niederschlags wurde mit Essigester extrahiert, die Extrakte mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und aus Chloroformlösung an 10 g  $\text{SiO}_2$  chromatographiert. Es wurden zuerst 20 Fraktionen à 8 ml aufgefangen (verworfen), darauf mit Chloroform/Äther 5:1 weiterchromatographiert und 240 ml aufgefangen. Diese Eluate enthielten 10 mg Kaffeesäure, die aus Aceton/Äther kristallisiert wurde; Smp. 185-186° (Zers.); Handelsprod. unter gleichen Bedingungen Smp. 195-196° (Zers.), Misch-Smp. 190-191° (Zers.). (IR. deckungsgleich, sowie identisches DC.-Verhalten bei beiden Proben).

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. Winterstein & G. Trier, Die Alkaloide, S. 307, Borntraeger Berlin 1910.
- [2] I. D. Spenser in Chemistry of the Alkaloids, S. W. Pelletier Ed., S. 669ff, Van Nostrand Reinhold Co. N. Y. 1970.
- [3] H. Metzner, Biochemie der Pflanzen, S. 243ff, Ferdinand Enke Stuttgart 1973.
- [4] E. Leete in Biogenesis of natural Compounds, P. Bernfeld Ed., 2. Edition, Pergamon Press Oxford 1967.
- [5] K. Mothes & H. R. Schütte (Ed.), Biosynthese der Alkaloide, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1969.
- [6] S. Arihara, P. Rüedi & C. H. Eugster, Helv. 58, 343 (1975).
- [7] J. H. Fellman, Nature 182, 311 (1958).
- [8] C. Pascual, J. Meier & W. Simon, Helv. 49, 164 (1966); T. A. Wittstruck & E. N. Trachtenberg, J. Amer. chem. Soc. 89, 3803 (1967).
- [9] L. M. Jackman & S. Sternhell, Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, 2. Ed., S. 278,302, Pergamon Press Oxford 1969.
- [10] M. Gregson, K. Kurosawa, W. D. Ollis, H. T. Redman, R. J. Roberts, I. O. Sutherland & A. Braga de Oliveira, W. V. Eytton, O. R. Gottlieb & H. H. Dietrichs, Chem. Commun. 1968, 1390.

## 54. Biosynthese der Verrucarine und Roridine. Teil 2

### Der Einbau von Acetat in die *cis,trans*-Muconsäure und von Mevalonat in die Roridinsäure<sup>1)</sup>

Verrucarine und Roridine, 28. Mitteilung [2]

von Beat Müller, Roland Achini und Christoph Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität, 4056 Basel

(17. XII. 74)

**Summary.** Incorporation experiments using sodium [1-<sup>14</sup>C]-acetate and sodium [2-<sup>14</sup>C]- and [2-<sup>14</sup>C,2-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]-mevalonate and degradations of the verrucarin A (1) and roridin A (2) so produced demonstrate that *cis,trans*-muconic acid (3) is formed from 3 acetate units. The *cis,trans*-muconic acid and the C<sub>2</sub>-side-chain structural elements of roridinic acid (6) are built up from 4 acetate

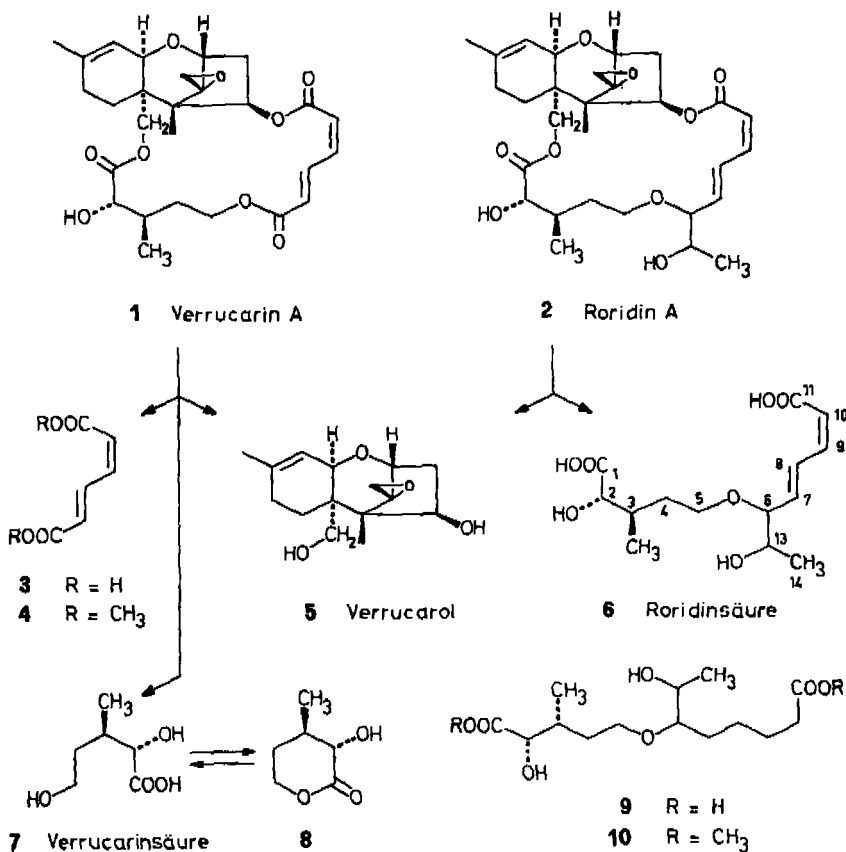
<sup>1)</sup> Ein Teil der Resultate wurde am XXIIIrd International Congress of Pure and Applied Chemistry, Boston, Mass. USA, 26-30th July 1971 [1] vorgetragen.

units; the *cis*-oriented C(11)-carboxyl group of **6** originates from C(1) of acetic acid. The structural moiety of roridinic acid (**6**) corresponding to verrucarinic acid (**7**) originates from mevalonate, as does **7**.

A new degradation scheme was devised for roridinic acid (**6**): the oxime **23** of its 13-dehydro-tetrahydro derivative **21** underwent cleavage with  $\text{SOCl}_2$  and subsequent hydrolysis to yield verrucarinolactone (**8**), acetonitrile (**26**) and methyl adipaldehyde (**27**) by a heterolytic *Beckmann* fragmentation reaction.

**1. Einleitung.** – In den Verrucarinen und Roridinen, die aus Kulturen von *Myrothecium verrucaria* (Albertini et Schweinitz) Ditmar ex Fries und *Myrothecium roridum* Tode ex Fries isoliert und während den vergangenen Jahren eingehend untersucht worden sind, liegen makrocyclische Ester des Sesquiterpenalkohols Verrucarol (**5**) vor [3]. Sie unterscheiden sich voneinander durch die Natur der sauren Hydrolysenprodukte: die Verrucarine liefern zwei Säuren, wovon die eine immer die *cis,trans*-Muconsäure (**3**) ist, die Roridine dagegen nur eine einzige Dicarbonsäure. So liefert z. B. Verrucarin A (**1**), neben der *cis,trans*-Muconsäure, die Verrucarinsäure (**7**) (isoliert als Verrucarinolacton (**8**)); Roridin A (**2**) liefert dagegen nur eine Säure, die Roridinsäure (**6**). In Verrucarin A liegt der cyclische Triester **1** des Verrucarols und in Roridin A der analoge cyclische Diester **2** vor [3]

Schema 1



Bereits frühere Untersuchungen hatten auf den sesquiterpenoiden Charakter des Trichothecangerüsts hingewiesen [4] (Einbau von drei Molekeln Mevalonsäure). Über die mit Verrucarol (5) erhaltenen Resultate wird in folgenden Mitteilungen<sup>2)</sup> eingehend berichtet [7] [8]. Einbauversuche mit <sup>14</sup>C- und stereospezifisch mit <sup>3</sup>H-markierter Mevalonsäure hatten gezeigt, dass die Verrucarinsäure (7) sich ebenfalls aus der Mevalonsäure bildet [2]. Im folgenden berichten wir über Versuche zur Abklärung der Biosynthese der Muconsäure einerseits und der Roridinsäure andererseits. Die Roridinsäure enthält die Verrucarinsäure und die *cis,trans*-Muconsäure in partiell reduzierter Form sowie eine C<sub>2</sub>-Einheit als Strukturelemente. Es ist deshalb zu erwarten, dass ihr biogenetischer Aufbau analog zu dem der Verrucarinsäure und Muconsäure erfolgt. Um dies abzuklären wurden eine Reihe von potentiellen <sup>14</sup>C- und <sup>3</sup>H-markierten Vorläufern zu wachsenden Kulturen von *Myrothecium* gegeben und die radioaktiven Antibiotica zur Lokalisierung der Radioaktivität einem gezielten Abbau unterworfen.

**2. Einbauversuche.** – Zu wachsenden Kulturen von *Myrothecium roridum*, Stamm S 1135, wurden [1-<sup>14</sup>C]-Natriumacetat, [2-<sup>14</sup>C]- und [2-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>, 2-<sup>14</sup>C]-Natriummevalonat gegeben und die Antibiotica in üblicher Weise isoliert (vgl. [2]). Die in Tabelle 1 zusammengestellten Radioaktivitäten zeigen, dass sowohl Acetat wie auch Mevalonat in die Hauptmetabolite eingebaut werden, wobei nach den Einbauarten offen ist, ob ein Metabolit Vorstufe eines andern ist. Auch über die Bildungsgeschwindigkeit kann nichts ausgesagt werden. Darüber würde die Messung der spezifischen Aktivitäten während verschiedener Perioden des Wachstums des Mikroorganismus bzw. der Bildung der Metabolite Auskunft geben.

Tabelle 1. Radioaktivität der isolierten Verrucarine und Roridine

Vorläufer <sup>3)</sup> (Na-Salz)	Aktivität des Vorläufers mCi	Kultur- flüssigkeit (Liter)	Isolierte Stoffe	Spezifische Aktivität dpm/mmol		Absolute Einbau- rate in %
				<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	
[1- <sup>14</sup> C]-Acetat	0,4	20	Verrucarin A (1)		9,00 · 10 <sup>6</sup>	1
			Roridin A (2)		1,02 · 10 <sup>6</sup>	0,2
			Roridin D		0,62 · 10 <sup>6</sup>	0,03
[2- <sup>14</sup> C]-Meva- lonat	0,4	20	Verrucarin A (1)		6,14 · 10 <sup>6</sup>	0,06
			Verrucarin J		36,00 · 10 <sup>6</sup>	0,13
			Roridin A (2)		15,80 · 10 <sup>6</sup>	0,37
[2- <sup>14</sup> C]-Meva- lonat	0,5	20	Verrucarin A (1)	110,4 · 10 <sup>6</sup>	15,7 · 10 <sup>6</sup>	0,45
			Verrucarin B	173,0 · 10 <sup>6</sup>	25,0 · 10 <sup>6</sup>	0,19
[2- <sup>3</sup> H <sub>2</sub> ]-Meva- lonat	5,0		Roridin A (2)	80,8 · 10 <sup>6</sup>	11,6 · 10 <sup>6</sup>	3,0
			Roridin D	78,4 · 10 <sup>6</sup>	10,7 · 10 <sup>6</sup>	0,2

**3. Hydrolytische Spaltung von Verrucarin A und Roridin A.** – Die basische Hydrolyse des nach Verabreichung von [1-<sup>14</sup>C]-Natriumacetat gewonnenen Verrucarins A (1) ergab für Verrucarol (5), für die *cis,trans*-Muconsäure (3), die zur

<sup>2)</sup> Einige der Ergebnisse waren Gegenstand von vorläufigen Mitteilungen, vgl. [5] [6].

<sup>3)</sup> Die radioaktiven Vorläufer wurden vom *Radiochemical Centre*, Amersham (Buckinghamshire, England) bezogen.

Messung in den Dimethylester **4** übergeführt wurde, und für die Verrucarinsäure (**7**), die als Lacton **8** isoliert und vermessen wurde, die in Tabelle 2 zusammengestellten Werte für die Radioaktivität. Falls die *cis,trans*-Muconsäure aus Acetat-Einheiten im Sinne einer Polyketid-Synthese und nicht über den Weg der Shikimisäure aufgebaut wird, sind in ihr drei markierte C-Atome zu erwarten. Da der Verrucarinsäure ebenfalls drei und Verrucarol sechs Acetat-Einheiten zugrunde liegen, ergibt sich folgende theoretische Verteilung der mol-spezifischen Radioaktivität in den Hydrolysenprodukten des Verrucarins A: Verrucarol/Verrucarinsäure/Muconsäure = 6:3:3. Die gefundenen Werte stimmen mit den berechneten gut überein, womit auch für die Muconsäure Acetat-Einheiten als Grundbausteine gesichert sind.

Roridin A (**2**) wurde wegen der Empfindlichkeit der Roridinsäure (**6**) zuerst in Tetrahydrororidin A übergeführt und dann erst hydrolysiert. Falls der Verrucarinsäureteil der Roridinsäure analog zur Verrucarinsäure und der andere Teil der Molekel analog zur Muconsäure, die um die C<sub>2</sub>-Seitenkette erweitert ist, aufgebaut wird, so sind in der Roridinsäure sechs oder sieben markierte C-Atome zu erwarten. Daraus resultiert eine theoretische Verteilung der mol-spezifischen Radioaktivität

Tabelle 2. Radioaktivität der Hydrolysenprodukte von Verrucarin A und Roridin A

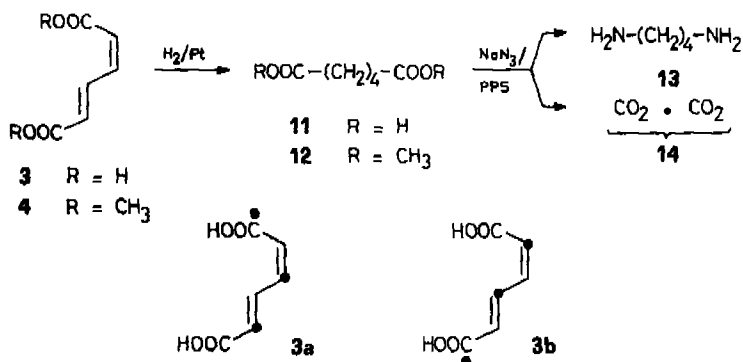
Vorläufer (Na-Salz)	Substanz	Spezifische Aktivität dpm/mmol		% des <sup>3</sup> H: <sup>14</sup> C <sup>14</sup> C-Totals	
		<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C		
[1- <sup>14</sup> C]-Acetat	Verrucarin A ( <b>1</b> )		9,00 · 10 <sup>5</sup>	100	
	Verrucarol ( <b>5</b> )		4,38 · 10 <sup>5</sup>	48,7	
	Verrucarinolacton ( <b>8</b> )		2,52 · 10 <sup>5</sup>	28	
	Muconsäure-dimethylester ( <b>4</b> )		2,22 · 10 <sup>5</sup>	24,8	
	Roridin A ( <b>2</b> )		1,02 · 10 <sup>5</sup>	100	
	Tetrahydrororidin A		1,03 · 10 <sup>5</sup>		
	Verrucarol ( <b>5</b> )		0,49 · 10 <sup>5</sup>	48	
	Tetrahydrororidinsäure ( <b>9</b> )		0,47 · 10 <sup>5</sup>	46	
	Tetrahydrororidinsäure- dimethylester ( <b>10</b> )		0,50 · 10 <sup>5</sup>	49,5	
	[2- <sup>14</sup> C]-Mevalonat	Verrucarin A ( <b>1</b> )		6,14 · 10 <sup>5</sup>	100
Verrucarol ( <b>5</b> )			3,81 · 10 <sup>5</sup>	62	
Verrucarinolacton ( <b>8</b> )			1,80 · 10 <sup>5</sup>	30,2	
Muconsäure ( <b>3</b> )			0,24 · 10 <sup>5</sup>	3,9	
Roridin A ( <b>2</b> ), verdünnt			7,61 · 10 <sup>5</sup>	100	
Tetrahydrororidin A			7,67 · 10 <sup>5</sup>		
Verrucarol ( <b>5</b> )			3,42 · 10 <sup>5</sup>	45	
Tetrahydrororidinsäure ( <b>9</b> )			4,29 · 10 <sup>5</sup>	56,4	
Tetrahydrororidinsäure- dimethylester ( <b>10</b> )			4,45 · 10 <sup>5</sup>	58,5	
[2- <sup>14</sup> C, 2- <sup>3</sup> H <sub>2</sub> ]- Mevalonat		Verrucarin A ( <b>1</b> )	110,44 · 10 <sup>5</sup>	15,71 · 10 <sup>5</sup>	100
	Verrucarol ( <b>5</b> )	87,55 · 10 <sup>5</sup>	12,76 · 10 <sup>5</sup>	81	7,5
	Verrucarinolacton ( <b>8</b> )	18,59 · 10 <sup>5</sup>	4,29 · 10 <sup>5</sup>	27	4,3
	Muconsäure-dimethylester ( <b>4</b> )	0	0	0	0
	Roridin A ( <b>2</b> )	73,00 · 10 <sup>5</sup>	12,29 · 10 <sup>5</sup>	100	5,9
	Verrucarol ( <b>5</b> )	48,20 · 10 <sup>5</sup>	6,55 · 10 <sup>5</sup>	53,3	7,4
	Tetrahydrororidinsäure- dimethylester ( <b>10</b> )	25,90 · 10 <sup>5</sup>	5,68 · 10 <sup>5</sup>	46,2	4,5

in den Hydrolysenprodukten wie folgt: Verrucarol/Roridinsäure = 6:6 oder 6:7, d.h. eine Verteilung zu ca. je 50%. Die gefundenen Werte stimmen sehr gut mit den berechneten überein. Eine Entscheidung, ob die Roridinsäure aus 6 oder 7 Acetateinheiten aufgebaut ist, ist jedoch nicht möglich, da der Einbau des Vorläufers in den verschiedenen Teilen der Molekel verschieden stark erfolgen kann. Da ausserdem die Radioaktivitäten der betr. Präparate relativ gering sind, erhöhen sich die Abweichungen der gefundenen Werte von den berechneten.

Die Hydrolyse des nach Zugabe von  $[2-^{14}\text{C}]$ -Natrium-mevalonat erhaltenen Präparats von Verrucarol (1) ergab, wie zu erwarten, radioaktives Verrucarol (5) und radioaktives Verrucarinolacton (8). Die Muconsäure (3) war praktisch radioinaktiv. Die mol-spezifischen Radioaktivitäten des Verrucarols und des Verrucarinolactons sollten ein Verhältnis von 3:1 aufweisen. Der für Verrucarinolacton gefundene Wert ist jedoch meist grösser als 25%, was auf einen bevorzugten Einbau des Mevalonats in die Verrucarinsäure deutet. - Roridin A (2) wurde nach Verdünnung mit inaktivem Material und anschliessender selektiver Hydrierung hydrolysiert. Die mol-spezifische Radioaktivität des aus beiden Versuchen erhaltenen Verrucarols (5) beträgt 42% der ursprünglichen Aktivität. Demgegenüber findet man in der Roridinsäure (6), die als Tetrahydrororidinsäure (9) bzw. als Dimethylester 10 isoliert wurde, 56,5-58,5% der ursprünglichen Radioaktivität. Das Verhältnis der Werte der beiden Hydrolysenprodukte liegt zwischen 2:3 und 1:1. Demnach scheint der Einbau der Mevalonsäure in die Roridinsäure besser zu erfolgen als in die Verrucarinsäure.

Diese Ergebnisse werden durch die mit  $[2-^{14}\text{C}, 2-^3\text{H}_2]$ -Natrium-mevalonat durchgeführten Einbauversuche bestätigt. Die gesamte  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität war auf Verrucarol und die Verrucarinsäure bzw. auf die Roridinsäure in gleicher Weise verteilt, während die Muconsäure radioinaktiv war. Der bei der Verrucarinsäure beobachtete Tritiumverlust, der mit einer 1,2-Wasserstoffwanderung zusammenhängt (vgl. [2]), tritt in gleichem Masse auch bei der Roridinsäure auf, was auf eine enge biogenetische Verwandtschaft der beiden Verbindungen deutet.

**4. Abbau der Muconsäure.** - Die nach Einbau von  $[1-^{13}\text{C}]$ -Acetat erhaltene *cis,trans*-Muconsäure (3) wurde zur Lokalisierung der Radioaktivität mittels  $\text{CH}_2\text{N}_2$  in den Dimethylester 4 und dieser durch katalytische Hydrierung in den Adipinsäuredimethylester (12) übergeführt. Der Abbau der Adipinsäure (11) nach Schmidt mittels  $\text{NaN}_3$  und Polyphosphorsäure (PPS) ergab 1,4-Diaminobutan (13) (als Pikrat isoliert) und 2 Äquivalente  $\text{CO}_2$  (14) (als  $\text{BaCO}_3$  isoliert).

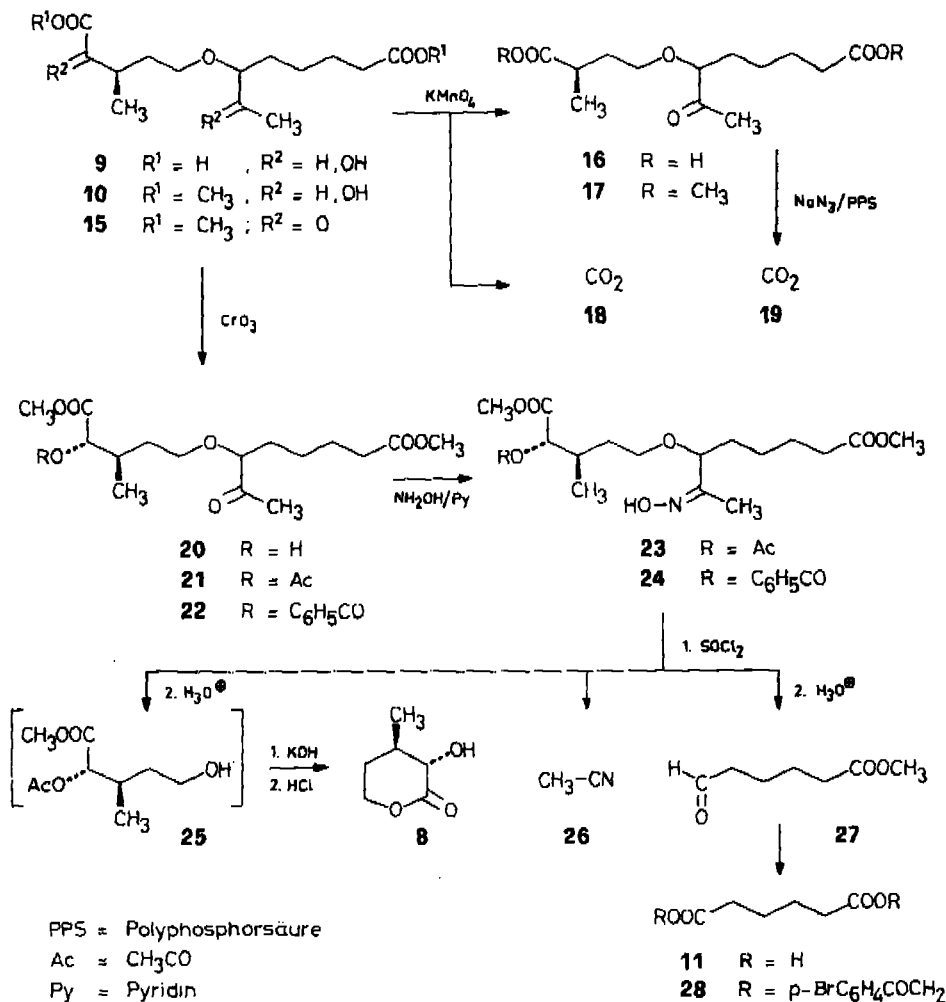


Aus den in Tabelle 3 zusammengefassten Resultaten geht hervor, dass 2/3 der Radioaktivität des Ausgangsprodukts sich im Diamin **13**, also im C<sub>4</sub>-Mittelstück der Muconsäure, befinden, und dass nur eine der beiden Carboxylgruppen der *cis,trans*-Muconsäure markiert ist. (Die Aktivität von CO<sub>2</sub> wird infolge des beidseitigen *Schmidt*-Abbaus auf die Hälfte reduziert.) Die C-Atome sind daher durch den Einbau von 3 Acetat-Einheiten alternierend markiert, wobei die zwei durch die Formeln **3a** und **3b** dargestellten Verteilungen möglich sind; welche der beiden geometrisch verschieden angeordneten Carboxylgruppen die Markierung trägt, kann aus diesem Versuch nicht entnommen werden. Es ist denkbar, dass beide Verteilungsarten zu je 50% auftreten, wenn sich z. B. die *cis,trans*-Muconsäure aus einem symmetrischen C<sub>6</sub>-Vorläufer bilden und vor der Verknüpfung mit den anderen Bausteinen des Verrucarins A entstehen würde. Die folgenden Versuche dürften jedoch diese Variante ausschliessen.

**5. Abbau der Roridinsäure.** - Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in der Roridinsäure (**6**) diente die weniger empfindliche Tetrahydrororidinsäure (**9**), die durch selektive katalytische Hydrierung von Roridin A (**2**) und anschliessende basische Hydrolyse erhalten wird [9]. Vorsichtige Oxydation von **9** durch KMnO<sub>4</sub> in einer Spezialapparatur (vgl. exper. Teil) ergab einerseits CO<sub>2</sub> (**18**) (als BaCO<sub>3</sub> isoliert) und, nach Nachoxydation der nicht-flüchtigen Anteile mit CrO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Aceton, die <sup>13</sup>Dehydro-tetrahydro-1-nor-roridin-2,11-säure (**16**), die zur Charakterisierung in den Dimethylester **17** übergeführt wurde. Ihre Struktur ist durch die spektralen Daten belegt, indem im IR. keine HO-Banden, sondern nur noch C-O-Schwingungen bei 1725-1735 cm<sup>-1</sup> (Ester) mit Schulter bei 1715 cm<sup>-1</sup> (Keton) auftraten. Im NMR.-Spektrum, das mit dem des Tetrahydrororidinsäure-dimethylesters (**10**) und des 2,13-Bisdehydro-tetrahydrororidinsäure-dimethylesters (**15**) [9] verglichen wurde, erschien anstelle des Dubletts der sekundären Methylgruppe bei 1,16 ppm ein Singulett (3H) bei 2,13 ppm, das der Methylketongruppe zuzuordnen ist. Für sie spricht auch die positive Jodoformreaktion. Die chemischen Verschiebungen der weiteren Signale (vgl. Tab. 4) sind im Einklang mit den angegebenen Strukturen. Die 13-Dehydro-tetrahydro-1-nor-roridin-2,11-säure (**16**) wurde weiter nach *Schmidt* abgebaut. Das aus C(2) und C(11) stammende CO<sub>2</sub> (**19**) wurde als BaCO<sub>3</sub> isoliert. Der Rest der Molekel konnte hingegen nicht gefasst werden. Nach den Dünnschichtchromatogrammen hatten sich mindestens 11 Folgeprodukte gebildet, was beim Abbau von Carbonsäuren mit sekundären und tertiären Carboxylgruppen und Ketocarbonsäuren schon häufig beobachtet worden ist (vgl. [10]).

Der Abbau der nach Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Acetat erhaltenen Tetrahydrororidinsäure (**9**) lieferte das C-Atom C(1) als CO<sub>2</sub> (**18**), das 13,8% oder ca. 1/7 der Gesamtaktivität enthielt. Die erwarteten Werte sind für sieben markierte C-Atome 14,3% und für nur sechs radioaktive C-Atome 16,7%. Das Resultat scheint eher anzudeuten, dass 7 Acetat-Einheiten an der Synthese beteiligt sind, doch lässt sich dies aus diesem Versuch nicht entscheiden. Das aus dem *Schmidt*-Abbau der Nor-säure **16** erhaltene CO<sub>2</sub> (**19**), weist statt des für den Fall einer Markierung an C(11) erwarteten Wertes entspr. 50% der Aktivität von CO<sub>2</sub> aus C(1) eine Aktivität auf, die 73,5% der Aktivität von C(1) entspricht, was wiederum zeigt, dass der Anteil des (nicht markierten) C(2) am Gesamt-CO<sub>2</sub> nur ca. 1/4 beträgt. Falls auch C(13) an der Bildung von CO<sub>2</sub> beteiligt ist, würde dies bedeuten, dass es ebenfalls eine Markierung

Schema 2



trägt und demnach aus Acetat stammt. Wenn C(11) nicht radioaktiv wäre, so würde keine oder höchstens eine geringe Radioaktivität im  $CO_2$  auftreten.

Nach dem Abbau des nach Verabreichung von  $[2-^{14}C]$ -Mevalonat erhaltenen Roridins A finden sich 6% der Aktivität von Tetrahydrororidinsäure (9) im  $CO_2$ , das aus der  $KMnO_4$ -Oxydation von 9 stammt. Ob der Grund dafür in einer leichten Verschmierung der Radioaktivität in der Molekel oder in einer sog. «Cross-Contamination» liegt, wie sie bei Abbaureaktionen oft auftreten kann [11], kann nicht entschieden werden. Fast die gesamte Aktivität (95%) der Tetrahydrororidinsäure findet sich wieder in der 13-Dehydro-tetrahydro-1-nor-roridin-2,11-säure (16). Hingegen enthält das  $CO_2$  aus dem Schmidt-Abbau nur 27% der Aktivität, während für den Fall, dass das  $CO_2$  aus C(2) und C(11) stammt, 50% erwartet werden. Dies lässt sich erklären, wenn man annimmt, dass der Beitrag von C(2) nur ca. 1/4 des insgesamt gebildeten  $CO_2$  beträgt. Dann sollten im Falle der  $[1-^{14}C]$ -Acetat-markierten Tetrahydrororidinsäure, die am C(11), nicht aber an dem C(2) entsprechenden C-Atom

Tabelle 3. Radioaktivität der Abbauprodukte der cis,trans-Muconsäure (3) und der Roridinsäure (6)

Vorläufer (Na-Salz)	Substanz	$^{14}\text{C}$ -Radioaktivität dpm/mmol	% des $^{14}\text{C}$ -Totals	
[1- $^{14}\text{C}$ ]-Acetat	Muconsäure-dimethylester (4)	$22,26 \cdot 10^4$	100	
	1,4-Diaminobutan (13) (Pikrat)	$14,96 \cdot 10^4$ ( $14,84 \cdot 10^4$ ) <sup>a)</sup>	67,1 (66,7) <sup>a)</sup>	
	$\text{CO}_2$ (14) ( $\text{BaCO}_3$ )	$3,18 \cdot 10^4$ ( $3,71 \cdot 10^4$ ) <sup>b)</sup>	14,3 (16,7) <sup>b)</sup>	
	Tetrahydrororidinsäure (9)	$4,68 \cdot 10^4$	100	
	Tetrahydrororidinsäure- dimethylester (10)	$5,05 \cdot 10^4$		
	13-Dehydro-tetrahydro-1-nor- roridin-2,11-säure (16)	$4,39 \cdot 10^4$ ( $4,17 \cdot 10^4$ ) <sup>c)</sup>		90 (85,7) <sup>d)</sup>
	$\text{CO}_2$ (18) ( $\text{BaCO}_3$ ) aus 9	$0,67 \cdot 10^4$ ( $0,69 \cdot 10^4$ ) <sup>e)</sup>		13,8 (14,3) <sup>d)</sup>
		$\text{CO}_2$ (19) ( $\text{BaCO}_3$ ) aus 16	$0,49 \cdot 10^4$ ( $0,35 \cdot 10^4$ ) <sup>e)</sup>	10,0 (7,1) <sup>d)</sup>
[2- $^{14}\text{C}$ ]- Mevalonat	Tetrahydrororidinsäure (9)	$42,90 \cdot 10^4$	100	
	Tetrahydrororidinsäure- dimethylester (10)	$44,50 \cdot 10^4$		
	13-Dehydro-tetrahydro-1-nor- roridin-2,11-säure (16)	$41,40 \cdot 10^4$ ( $43,70 \cdot 10^4$ ) <sup>c)</sup>	95 (100) <sup>d)</sup>	
	$\text{CO}_2$ (18) ( $\text{BaCO}_3$ ) aus 9	$2,23 \cdot 10^4$ (0) <sup>e)</sup>	6 (0) <sup>d)</sup>	
	$\text{CO}_2$ (19) ( $\text{BaCO}_3$ ) aus 16	$11,65 \cdot 10^4$ ( $21,85 \cdot 10^4$ ) <sup>e)</sup>	27 (50) <sup>d)</sup>	
[2- $^{14}\text{C}$ , 2- $^3\text{H}_2$ ]- Mevalonat	Tetrahydrororidinsäure- dimethylester (10)	$^{3}\text{H}$ $259,0 \cdot 10^4$	$^{14}\text{C}$ $56,8 \cdot 10^4$	$^3\text{H}:^{14}\text{C}$ 4,56
	Verrucarinolacton (8)	$253,0 \cdot 10^4$	$59,2 \cdot 10^4$	4,27
	Adipinsäure-di- <i>p</i> -brom- phenacylester (28)	$0,1 \cdot 10^4$	$0,1 \cdot 10^4$	0

a) Berechnet für 2 markierte C-Atome.

b) Berechnet für 1 markierte Carboxylgruppe.

c) Berechnet aus dem Mittelwert von 9 und 10 für den Fall, dass die Tetrahydrororidinsäure (9) 7 gleichmässig markierte C-Atome enthält, worunter sowohl C(1) als auch C(11).

d) Bezogen auf den Mittelwert von 9 und 10.

e) Berechnet aus dem Mittelwert von 9 und 10 für den Fall, dass die gesamte Aktivität sich an C(2) der Tetrahydrororidinsäure (9) befindet.

markiert ist, genau die umgekehrten Verhältnisse auftreten, was auch tatsächlich der Fall ist (s. unten).

Da die C(2)-Carboxylgruppe sekundär ist, können wie erwähnt Nebenreaktionen sowie kleinere Umsatzraten auftreten. Zudem könnte  $\text{CO}_2$  auch aus dem C(13) stammen (Hydrolyse der Amidgruppe durch die Polyphosphorsäure und weiterer Abbau vgl. [12]). An der Bildung von  $\text{CO}_2$  aus 16 sind jedenfalls C(2) und C(11) beteiligt. Die Radioaktivitätsverteilung in den Abbauprodukten, die aus Tetrahydrororidinsäure nach Einbau von [2- $^{14}\text{C}$ , 2- $^3\text{H}_2$ ]-Mevalonat erhalten wurden, bestätigt die obigen Resultate, indem sich die gesamte  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Verrucarinsäureteil der Roridinsäuremolekel befindet.

Da beim Abbau der 13-Dehydro-tetrahydro-1-nor-roridin-2,11-säure (16) nach Schmidt die Bildung von zahlreichen Nebenprodukten die Isolierung des Amins verunmöglicht und die Ausbeuten an  $\text{CO}_2$  vermindert hatte, haben wir eine neue Abbausequenz für die Roridinsäure ausgearbeitet, die es gestattet, ihre vermuteten bio-



Tabelle 4. Zuordnung der H-Atome in den <sup>1</sup>H-NMR.-Spektren<sup>a)</sup> von Derivaten und Reaktionsprodukten der Tetrahydrororidinsäure (9)

Substanz	C(2)	C(3)	C(4)	C(5)	C(6)	C(12)	C(13)	C(14)	OH	OCH <sub>3</sub>
Tetrahydrororidinsäure-dimethylester (10)	4,24 d(3) <sup>a)</sup>	2,6 bis	1,3 <sup>b)</sup>	3,75 t(6) <sup>c)</sup>	a)	0,86 d(6,5)	3,15	1,16 d(6,5)	-	3,82; 3,69 s s
2,13-Bisdehydro-tetrahydro-roridinsäure-dimethylester (15)	e)	2,4	1,4 <sup>b)</sup>	3,47 t(6)	3,60 t(6) <sup>c)</sup>	1,18 d(6,5)	-	2,10 s	-	3,86; 3,66 s s
13-Dehydro-tetrahydro-1-nor-roridin-2,11-säure-dimethylester (17)	f)	2,68 sex(7)	2,5-1,4	3,47f(6) 3,41f(6)	3,61 t(6) <sup>e)</sup>	1,19 d(7)	-	2,13 s	-	3,68; 3,68 s s
13-Dehydro-tetrahydrororidin-säure-dimethylester (20)	4,21 <sup>g)</sup>	2,3 bis	1,5	3,49 t(6)	a)	0,84 d(6,5)	-	2,14 s	2,85	3,79; 3,67 s s
2-O-Benzoyl-13-dehydro-tetrahydrororidinsäure-dimethylester (22)	5,36 d(3)	2,6 bis	1,5	3,50 t(6) <sup>b)</sup>	g)	1,12 d(6,5)	-	2,15 s	-	3,78; 3,66 s s
Oxim 24	5,32 d(3)	2,3 bis	1,5	3,46 t(6)	a)	1,08 d(7)	-	1,18 s	8,9	3,77; 3,65 s s

a) Aufgenommen mit einem Varian-A-60 (60 MHz)- oder einem Varian-HA-100D (100 MHz)-Spektrometer in CDCl<sub>3</sub>-Lösung im Spektrallaboratorium des Instituts (K. Aegerter). Chemische Verschiebungen (δ-Werte) in ppm relativ zu Tetramethylsilan. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, sex = Sextett, m = Multipllett; Kopplungskonstanten J (Zahlen in Klammern) in Hz.

b) Da die Rotations-Seitenbanden der CH<sub>3</sub>O-Signale mit dem Dublett zusammenfallen, wird eine höhere Aufspaltung vorgetäuscht.

c) In diesem Gebiet tritt ein Signalhaufen von 11 nicht völlig äquivalenten Methylen- und Methin-Protonen auf.

d) Das eine Signal des Triplett dürfte unter dem CH<sub>3</sub>O-Signal liegen.

e) Das Signal dieses Protons wird durch andere Signale ganz oder teilweise überdeckt.

f) Die sehr schwachen bei 4,33 und 4,23 ppm erscheinenden Signale sind die Rotations-Seitenbanden der CH<sub>3</sub>O-Gruppen.

g) Die sehr schwachen bei 4,22 und 3,14 ppm erscheinenden Signale sind die Rotations-Seitenbanden der CH<sub>3</sub>O-Gruppen.

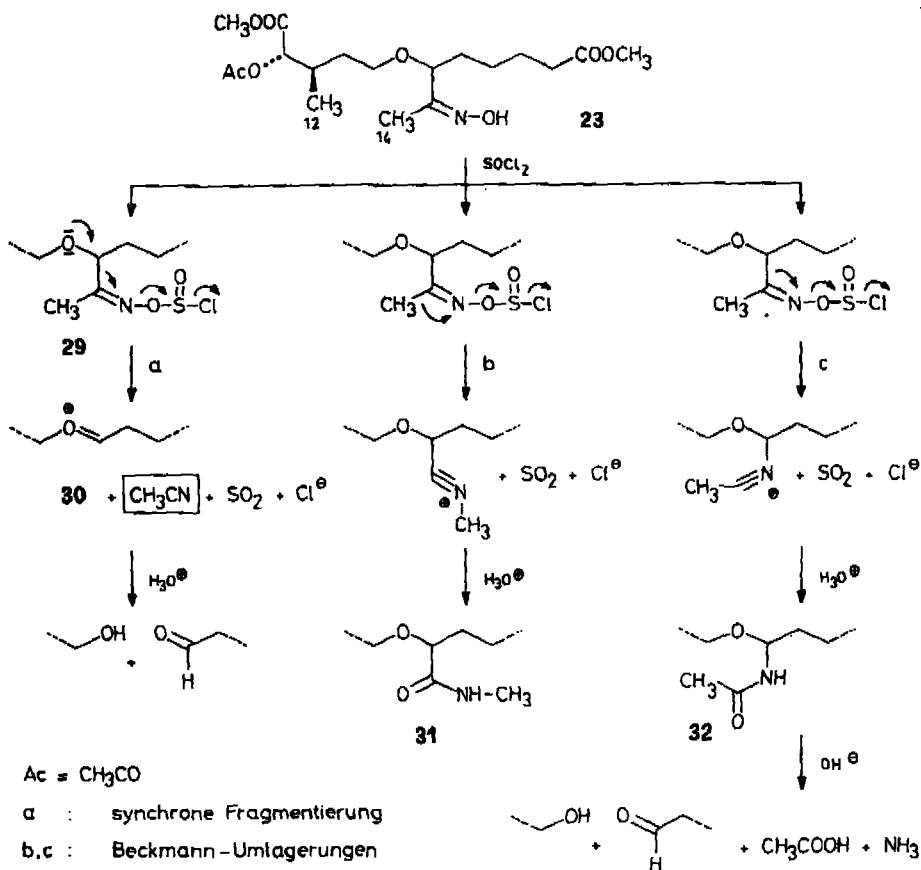
h) Das Signal erscheint erst als Dublett, wenn das Proton der 2-Hydroxygruppe durch Deuterium ausgetauscht wird.

i) Das Triplett wird nochmals aufgespalten (J = 2,5 Hz).

genetischen Grundeinheiten getrennt und eindeutig zu erfassen. Sie beruht auf einer heterolytischen Fragmentierungsreaktion eines geeigneten Roridinsäurederivats.

Selektive Oxydation der 13-Hydroxygruppe des Tetrahydrororidinsäure-dimethylesters (**10**) mit einem Äquivalent  $\text{CrO}_3$  in  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Aceton}$  ergab das 13-Dehydroderivat **20**. Acetylierung bzw. Benzoylierung der freien HO-Gruppe führte zum Acetylderivat **21** bzw. Benzoylderivat **22**. Behandlung von **21** mit Hydroxylamin in Pyridin lieferte das Oxim **23**. Die anschliessende Umsetzung mit Thionylchlorid verlief glatt und führte zu einem Chlorosulfit **29**. Diese Funktion ist eine sehr gute Abgangsgruppe für die vorgesehene Fragmentierungsreaktion. Allerdings sind auch *Beckmann*-Umlagerungen möglich. Die in Frage kommenden Reaktionswege sind im *Schema 3* dargestellt. Da in  $\alpha$ -Stellung zum Oxim ein Sauerstoffatom sitzt, das sich als Nachbargruppe an der Reaktion beteiligen kann, tritt nicht eine *Beckmann*-Umlagerung sondern eine *Beckmann*-Fragmentierung ein [13]. Der Nachweis der *Beckmann*-Fragmentierung kann nicht allein durch das Auftreten des Verrucarino-lactons und der Adipinaldehydsäure erbracht werden. Die Bildung von Acetonitril jedoch ist ein eindeutiger Hinweis für die Fragmentierungsreaktion. In *Schema 3*

Schema 3



sind die Reaktionsprodukte der beiden möglichen *Beckmann*-Umlagerungen und der *Beckmann*-Fragmentierung dargestellt. Bei ersteren entstehen, je nachdem ob sich das *syn*- oder *anti*-Oxim umlagert, die beiden Amide **31** und **32** (Wege b und c). Tritt die *Beckmann*-Fragmentierung ein (Weg a), so muss als charakteristisches Reaktionsprodukt Acetonitril entstehen. Das gleichzeitig gebildete Oxoniumsalz **30** wird beim Versetzen des Reaktionsgemisches mit Wasser in Alkohol und Aldehyd gespalten. Die Reaktion mit Thionylchlorid verläuft bei Zimmertemperatur sehr rasch. Da dieses Reagens gleichzeitig als Lösungsmittel dient, kann der Verlauf der Reaktion mit Hilfe der NMR.-Spektroskopie verfolgt werden.

Das in  $\text{CDCl}_3$ -Lösung bei 1,81 ppm erscheinende scharfe Signal der Methyl(14)-Gruppe des Oxims **23** erscheint in  $\text{SOCl}_2$ -Lösung bei 1,88 ppm. Hier befindet sich auch das Methylsignal des Acetonitrils. Dies wurde durch Zugabe einer weiteren Menge von Acetonitril zur NMR.-Probe bestätigt. Die Beobachtung, dass das scharfe Signal der Methyl(14)-Gruppe verschwindet, wenn das Lösungsmittel (Thionylchlorid) im Vakuum entfernt und dieselbe Probe in  $\text{CDCl}_3$  nochmals vermessen wird, ist ein Beweis für das Auftreten von Acetonitril und schliesst eine Verschiebung des Methylsignals durch Lösungsmittelleffekte aus. Aus dem NMR.-Spektrum ist ferner noch ersichtlich, dass die zwei Protonen an C(5), die sich am Reaktionszentrum befinden, von 3,4 ppm nach ca. 3,6 ppm (sie sind durch die Methylprotonen des Methylesters teilweise verdeckt) verschoben, was ebenfalls für das Eintreten der Fragmentierung spricht. Das Oxoniumsalz **30** scheint in Chloroform nicht beständig zu sein. Das Dublett der Protonen der Methyl(12)-Gruppe erscheint beim Oxim **23** bei 1,06 ppm. Das durch Lösen des Oxims in Thionylchlorid hergestellte Oxoniumsalz **30** zeigt das Methyl(12)-Signal bei 1,08 ppm. Wird anschliessend das Thionylchlorid entfernt und die Probe in  $\text{CDCl}_3$  gelöst, so verkleinert sich im Laufe der Zeit das Dublett bei 1,08 ppm zugunsten des sich bei 1,16 ppm bildenden Dubletts. Dasselbe Phänomen zeigt das Signal der Estermethylgruppe in 1-Stellung des Oxoniumsalzes.

Der chemische Nachweis des Acetonitrils stösst auf Schwierigkeiten, da es bei der Entfernung des Lösungsmittels aus dem Reaktionsgemisch verloren geht. Eine Hydrolyse des Nitrils zu Essigsäure würde den Beweis in Frage stellen, da auch durch den Weg c, d.h. durch Hydrolyse des Amids **32**, Essigsäure entsteht. Deshalb wurde das sehr reaktive Thionylchlorid nach Zugabe einer entsprechenden Menge des inerten Lösungsmittels Dichlormethan durch Zusatz von festem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  zerstört. Darauf liessen sich das Acetonitril und Dichlormethan vom gebildeten Kochsalz abdestillieren. Die Reaktion wurde durch vorsichtige Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und durch Kühlung unter Kontrolle gehalten. Dadurch liessen sich trotz starker Gasentwicklung 50% des eingesetzten Acetonitrils regenerieren. Die Gehaltsbestimmung an Acetonitril erfolgte gas-chromatographisch. Die Retentionszeit stimmte mit jener einer authentischen Probe vollständig überein. Das IR.-Spektrum der Dichlormethanlösung zeigte die charakteristische scharfe Bande des Nitrils bei  $2250\text{ cm}^{-1}$ .

Zur Abtrennung des Adipinaldehydsäure-methylesters (**27**) wurde das Reaktionsgemisch, nachdem das Thionylchlorid entfernt war, in Essigester gelöst und mit gesättigter wässriger  $\text{NaHSO}_3$ -Lösung 16 Std. geschüttelt. In der Essigesterlösung waren nach Dünnschichtchromatogramm zwei Substanzen nachweisbar, bei denen es sich um Umesterungsprodukte des Verrucarinsäureteils handeln dürfte.

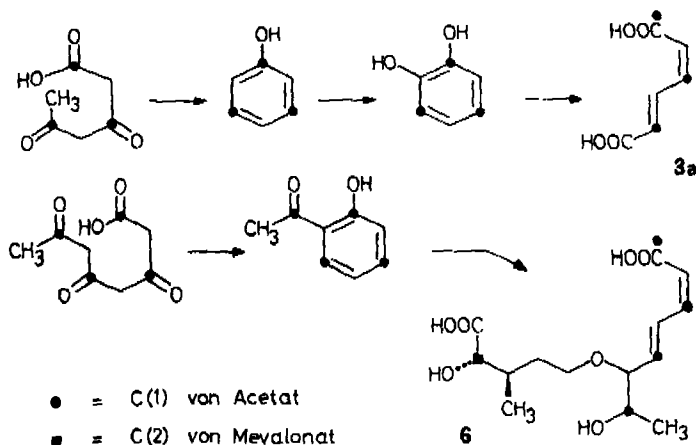
Daraufhin hatte schon das NMR.-Spektrum des Oxoniumsalzes gedeutet. Nach vollständiger Hydrolyse mit methanolischer KOH konnte aus den beiden Produkten reines Verrucarinolacton (8) isoliert werden.

Durch Ansäuern der wässrigen  $\text{NaHSO}_3$ -Lösung wurde der Aldehyd 27 freigesetzt. Die Lösung gab eine positive Reaktion mit *Tollens*-Reagens und 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Der Aldehyd wurde nicht isoliert, sondern durch  $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  in Aceton oxydiert. Nach anschliessender Hydrolyse mit wässriger KOH wurde Adipinsäure (11) erhalten, die noch durch den *p*-Bromphenacylester 28 charakterisiert wurde. Die NMR.-Daten der beim Abbau der Tetrahydrororidinsäure erhaltenen Verbindungen sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Die Resultate der Radioaktivitätsbestimmung der nach Einbau von  $[2\text{-}^{14}\text{C}, 2\text{-}^3\text{H}_2]$ -Mevalonat erhaltenen Roridinsäurederivate und ihrer nach obigem Abbauschema entstandenen Umwandlungsprodukte finden sich in Tabelle 3. Aus ihr ist ersichtlich, dass 99,9% der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität sich im Verrucarinsäureteil der Roridinsäure befinden. Das Verhältnis von  $^{14}\text{C}$  zu  $^3\text{H}$  (4,27) ist im Verrucarinolacton (8) bedeutend geringer als im zugegebenen Mevalonat ( $^{14}\text{C}:^3\text{H} = 9,6$ ), was mit der früher nachgewiesenen Eliminierung des «pro-2S»-Tritiums bzw. -H-Atoms beim Übergang der Mevalonsäure in die Verrucarinsäure im Einklang ist [2].

**6. Diskussion der Resultate.** - Die Bildung der Muconsäure und des Muconsäureanteils mit der  $\text{C}_2$ -Seitenkette der Roridinsäure dürfte nach dem Schema der aromatischen Polyketide und nicht *via* Shikimisäure erfolgen. Die gebildeten Phenole würden oxydativ und unter Isomerisierung zu den *cis,trans*-Säuren durch eine Brenzcatechin-Oxydase gespalten. Dass aus Aromaten nicht nur *cis,cis*-Säuren entstehen, zeigt die Umwandlung von Benzol im tierischen Organismus zu *trans,trans*-Muconsäure, welche kein Artefakt sondern ein echter Metabolit ist [14]. Über den Mechanismus der Isomerisierung zur *cis,trans*-Säure ist nichts bekannt. Da nach dem Einbau von  $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -Acetat in Roridinsäure C(11) radioaktiv ist, dürfte in Analogie auch in der Muconsäure die *cis*-ständige Carboxylgruppe aus der Carboxylgruppe der Essigsäure und die *trans*-ständige aus der Methylgruppe der Essigsäure stammen, dem Verteilungsmuster 3a entsprechend (vgl. Schema 4). Die Cyclisierung

Schema 4



einer C<sub>6</sub>-Polyketidkette könnte in analoger Weise den Muconsäureteil mit der C<sub>2</sub>-Seitenkette der Roridinsäure liefern. Die Biosynthese des Verrucarinsäureteils erfolgt wie diejenige der Verrucarinsäure selbst aus Mevalonat [2]. Wann und wie die einzelnen Bausteine zusammengefügt werden, ist unbekannt. Aufgrund der hohen spezifischen Einbauraten, die bei Verrucarin J beobachtet worden sind, könnte man annehmen, dass zuerst Verrucarol (5), Anhydro-mevalonsäure und die *cis,trans*-Muconsäure bzw. die um C<sub>2</sub>-Einheiten erweiterten Muconsäurebausteine zu den entsprechenden Antibiotica Verrucarin J, bzw. Roridin E und Roridin H zusammengefügt werden. Aus diesen Anhydroverbindungen würden sich die weiteren Metabolite bilden.

Wir danken dem «Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung» und der Sandoz A.G., Basel, für die grosszügige Unterstützung unserer Arbeit.

### Experimenteller Teil

**1. Allgemeines.** - Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Block bestimmt und sind nicht korrigiert. Substanzproben für die Spektralanalysen und Mikroanalysen, optische Drehung und Radioaktivitätsbestimmung wurden mindestens 2 Std. bei 30° und 0,05 Torr getrocknet. BaCO<sub>3</sub>-Proben wurden 1 Std. unter einer IR.-Lampe getrocknet.

Die Mikroanalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (E. Thommen). Die IR.-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Gitterspektrophotometer, Modell 125, oder einem Beckmann-IR-8-Spektrophotometer, die UV.-Spektren mit einem Beckmann-DK-2-Spektrophotometer im Spektrallaboratorium unseres Instituts (K. Aegeter) aufgenommen. Für die Messung der optischen Drehung diente ein Perkin-Elmer-Polarimeter, Modell 141.

Die Radioaktivitätsbestimmungen verdanken wir Herrn H. Galliher, Isotopenlaboratorium der Sandoz A.G., Basel. Die organischen Substanzproben wurden in Toluol-Scintillator gelöst und die Aktivität auf einem Tri-Carb (Packard) Liquid Scintillation Spektrometer, Modell 3375, durch Direktmessung bestimmt. Bei der Verbrennungsmethode wurde die organische Substanzprobe im Sauerstoffkolben verbrannt, das CO<sub>2</sub> in einer methanolischen Äthanolaminlösung, das H<sub>2</sub>O in Methanol absorbiert und nach Zugabe von Toluol-Scintillator vermessen. Die Genauigkeit der Messung für doppelt markierte Proben beträgt ± 5%, für Einzelmessungen von <sup>3</sup>H oder <sup>14</sup>C ± 1%, wenn nicht anders vermerkt.

Die Gas-Chromatogramme wurden mit einem Perkin-Elmer F 11 an einer 10% SE 30 auf einer Chrom.-W.-Silan-Säule ausgeführt. Für die Säulenchromatographie diente «Kieselgel 0,05-0,2 mm» der E. Merck A.G., Darmstadt, für die präparative Schichtchromatographie (präp. DC.) benutzten wir Kieselgel PF 254 (E. Merck) und für die Dünnschichtchromatographie (DC.) Kieselgel G (E. Merck) unter Zusatz von Zinksilikat als Fluoreszenzindikator. Die Substanzproben wurden durch UV.-Licht (254 nm und 366 nm), durch J<sub>2</sub>-Dämpfe oder spezifische Sprühreagentien sichtbar gemacht. Die Säulenchromatographie UV.-absorbierender Substanzen wurde mittels eines Uvicord Typ LKB 4701 A (254 nm) durchgeführt.

Übliches Aufarbeiten bedeutet: Extraktion mit dem angegebenen Lösungsmittel, 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 mit MgSO<sub>4</sub> und Eindampfen der Lösung im Vakuum.

**2. Kulturversuche.** - Die Kulturansätze mit Zugabe von [1-<sup>14</sup>C]-Natriumacetat, [2-<sup>14</sup>C]-Natrium-mevalonat und [2-<sup>14</sup>C, 2-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]-Natrium-mevalonat (vgl. Tab. 1) und die Isolierung der radioaktiven Metabolite wurden wie von Achini et al. [2] beschrieben durchgeführt.

**3. Abbaureaktionen.** - **3.1. Hydrolyse von Verrucarin A (1) und Roridin A (2).** - Radioaktives Verrucarin A (1) wurde nach Gutzwiler & Tamm [15] hydrolysiert. Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde die neben Verrucarol (5) und Verrucarinolacton (8) erhaltene *cis,trans*-Muconsäure (3) in den Dimethylester 4 übergeführt. Roridin A (2) wurde nach Böhner & Tamm [9] durch selektive Hydrierung mit Pd/C als Katalysator in Tetrahydrororidin A über-

geführt und anschliessend hydrolysiert [9]. Zur Radioaktivitätsbestimmung wurde die Tetrahydrororidinsäure (9) in den Dimethylester 10 nach Angabe der Lit. [9] übergeführt. Es resultierten:

a) Nach Einbau von [ $1-^{14}\text{C}$ ]-Acetat:

*Verrucarin A* (1): Nach Umkristallisieren aus Methylenchlorid/Äther, mittlere Radioaktivität 1790 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Verrucarol* (5) (14 Std. bei  $70^\circ$  getrocknet); 4. Kristallisat, Smp.  $158-160^\circ$ , 1630 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 5. Kristallisat, Smp.  $159-160^\circ$ , 1330 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 6. Kristallisat, Smp.  $160-161^\circ$ , 1660 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Verrucarinolacton* (8): kristallisiert und sublimiert, Smp.  $103-104^\circ$ , 1940 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; *cis, trans-Muconsäure-dimethylester* (4): sublimiert und kristallisiert, Smp.  $74-76^\circ$ , 1320 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; nochmals sublimiert, Smp.  $74-76^\circ$ , 1300 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Roridin A* (2): Mittlere Aktivität 192 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Tetrahydrororidin A* (13 Std. bei  $100^\circ$  getrocknet): 2. Kristallisat, Smp.  $181-185^\circ$ , 192 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Verrucarol* (5) (3 Std. bei  $100^\circ$  getrocknet): 2. Kristallisat, Smp.  $153-160^\circ$ , 175 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 3. Kristallisat, Smp.  $156-163^\circ$ , 183 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 4. Kristallisat, Smp.  $156-163^\circ$ , 194 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Tetrahydrororidinsäure* (9) (4 Std. bei  $50^\circ$  getrocknet): Rohprodukt: 147 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; Destillat: 159 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

*Tetrahydrororidinsäure-dimethylester* (10) (2 Std. bei  $50^\circ$  getrocknet): Rohprodukt: 155 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; Destillat: 148 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

b) Nach Einbau von [ $2-^{14}\text{C}$ ]-Mevalonat:

*Verrucarin A* (1): Nach Umkristallisieren aus Methylenchlorid/Äther, mittlere Radioaktivität 1220 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

*Verrucarol* (5) (14 Std. bei  $70^\circ$  getrocknet): 5. Kristallisat, Smp.  $160-161^\circ$ , 1490 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 6. Kristallisat, Smp.  $160-161^\circ$ , 1370 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Verrucarinolacton* (8): kristallisiert und sublimiert, Smp.  $103-104^\circ$ , 1430 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*cis, trans-Muconsäure* (3) (15 Std. bei  $80^\circ$  getrocknet): 2. Kristallisat, Smp.  $179-182^\circ$ , 170 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Roridin A* (2), verdünnt (5 Std. bei  $100^\circ$  getrocknet): 1430 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

*Tetrahydrororidin A* (13 Std. bei  $100^\circ$  getrocknet): 2. Kristallisat, Smp.  $182-186^\circ$ , 1430 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Verrucarol* (5) (3 Std. bei  $100^\circ$  getrocknet): 2. Kristallisat, Smp.  $155-163^\circ$ , 1290 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 3. Kristallisat, Smp.  $158-163^\circ$ , 1290 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 4. Kristallisat, Smp.  $158-163^\circ$ , 1270 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Tetrahydrororidinsäure* (9) (4 Std. bei  $50^\circ$  getrocknet): Rohprodukt, 1400 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Tetrahydrororidinsäure-dimethylester* (10) (2 Std. bei  $50^\circ$  getrocknet): Destillat: 1330 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

c) Nach Einbau von [ $2-^3\text{H}$ ,  $2-^{14}\text{C}$ ]-Mevalonat:

*Verrucarin A* (1): Nach Umkristallisieren aus Methylenchlorid/Äther, mittlere Aktivität 22000 dpm/mg  $^3\text{H}$  und 3140 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Verrucarol* (5), aus Äther sechsmal umkristallisiert und 5 Std. bei  $80^\circ$  und 0,01 Torr getrocknet: 4. Kristallisat, Smp.  $163-164^\circ$ , 36300 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4800 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 5. Kristallisat, Smp.  $163-164^\circ$ , 36600 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4790 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 6. Kristallisat, Smp.  $163-164^\circ$ , 36800 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4820 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Verrucarinolacton* (8), aus Äther umkristallisiert und 5 Std. bei  $22^\circ$  und 0,01 Torr getrocknet: 1. Kristallisat, Smp.  $103-104^\circ$ , 14500 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 3310 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 2. Kristallisat, Smp.  $103-104^\circ$ , 14200 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 3290 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 3. Kristallisat, Smp.  $103-104^\circ$ , 14300 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 3300 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*cis, trans-Muconsäure-dimethylester* (4), aus Äther umkristallisiert und 5 Std. bei  $22^\circ$  und 0,05 Torr getrocknet, Smp.  $75-76^\circ$ ; keine  $^3\text{H}$ - und  $^{14}\text{C}$ -Aktivität;

*Roridin A* (2): Mittlere Aktivität von 13700 dpm/mg  $^3\text{H}$  und 2300 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ;

*Verrucarol* (5), aus Methylchlorid/Äther umkristallisiert und 5 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet, Smp. 163-164°: 1. Kristallinat, 18490 dpm/mg <sup>3</sup>H, 2510 dpm/mg <sup>14</sup>C; 2. Kristallinat, 18130 dpm/mg <sup>3</sup>H, 2430 dpm/mg <sup>14</sup>C; 3. Kristallinat, 17670 dpm/mg <sup>3</sup>H, 2440 dpm/mg <sup>14</sup>C;

*Tetrahydrororidinsäure-dimethylester* (10), nach Chromatographie destilliert und bei 100° und 0,01 Torr getrocknet: 1. Destillat, 7770 dpm/mg <sup>3</sup>H, 1650 dpm/mg <sup>14</sup>C; 2. Destillat, 7570 dpm/mg <sup>3</sup>H, 1640 dpm/mg <sup>14</sup>C; 3. Destillat, 7760 dpm/mg <sup>3</sup>H, 1700 dpm/mg <sup>14</sup>C.

**3.2. Abbau der cis, trans-Muconsäure (3).** - 3.2.1. *Adipinsäure-dimethylester* (12). Eine Lösung von *cis, trans*-Muconsäure-dimethylester (4) (Radioaktivität 1310 dpm/mg), erhalten nach Einbau von [<sup>1-<sup>14</sup>C</sup>]-Acetat, wurde mit 50 mg PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O während 2 Std. im Parr-Apparat bei 3,0 atü H<sub>2</sub> hydriert. Hierauf wurde der Katalysator abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Spuren des Katalysators wurden durch Aufnehmen des Rohprodukts in wenig CHCl<sub>3</sub> und Filtrieren der Lösung entfernt. Es resultierten 28 mg farbloses Öl, das im DC. praktisch einheitlich erschien und kein Edukt mehr enthielt.

3.2.2. *Adipinsäure* (11). Eine Lösung von 28 mg Adipinsäure-dimethylester (12) in 15 ml Methanol wurde mit einer Lösung von 1,2 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 4 ml H<sub>2</sub>O versetzt und 23 Std. bei 22° gerührt. Nach Entfernen des Methanols im Vakuum wurde die wässrige Phase 3mal mit Methylchlorid ausgeschüttelt, die Auszüge mit H<sub>2</sub>O neutral gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Es resultierte 1 mg Neutralteil.

Die verbliebene wässrige Phase wurde mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kongosauer gestellt und 5mal mit Äther extrahiert. Nach Trocknen mit MgSO<sub>4</sub>, Eindampfen im Vakuum und Trocknen des Eindampfrückstands im Exsikkator resultierten 24,6 mg farblose Kristalle vom Smp. 152-154°; Misch-Smp. mit authentischem Material: 152-155°.

3.2.3. *Abbau der Adipinsäure* (11) nach Schmidt. 17 mg (11) wurden mit 65 mg NaN<sub>3</sub> und ca. 1,4 g Polyphosphorsäure in der von Britt [16] beschriebenen Apparatur während 1,5 Std. bei 80-90° behandelt. Die für die Absorption des CO<sub>2</sub> verwendete Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung wurde wie folgt zubereitet: Ausgekochtes, über Quarz destilliertes H<sub>2</sub>O wurde mit einem Überschuss an Ba(OH)<sub>2</sub> versetzt, 900 ml dieser ges. Lösung wurden mit 180 ml 10,75proz. BaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt und unter N<sub>2</sub> filtriert. Das beim Schmidt-Abbau ausgefallene Ba<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde abzentrifugiert, 3mal mit bidest. H<sub>2</sub>O und 2mal mit Methanol gewaschen und unter einer Quarzlampe bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Es resultierten 22 mg BaCO<sub>3</sub>, Aktivität: 161 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Die Polyphosphorsäure-Lösung wurde mit 10 ml H<sub>2</sub>O verdünnt, mit 5 ml 30proz. NaOH alkalisch gemacht und im Kutscher-Stendel-Apparat während 20 Std. mit Äther extrahiert. In der Vorlage befand sich eine ätherische Lösung von 60 mg Pikrinsäure. Das ausgeschiedene *Dipikrat des 1,4-Diaminobutans* (13) wurde 2mal aus wässrigem Äthanol umkristallisiert. Es resultierten 27,6 mg gelbe Kristalle, die sich bei 262-265° zersetzten. Analyse eines auf analoge Weise aus inaktivem Material gewonnenen Präparats (18 Std. bei 100° getrocknet):

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>8</sub>O<sub>14</sub> (546,4) Ber. C 35,17 H 3,32% Gef. C 35,34 H 3,51%

Zur Messung der Radioaktivität wurden das obige Präparat sowie zwei durch weiteres Umkristallisieren erhaltene Proben 18 Std. bei 100° getrocknet. Aktivitäten: 2. Kristallinat, 278 dpm/mg <sup>14</sup>C; 3. Kristallinat, 264 dpm/mg <sup>14</sup>C; 4. Kristallinat, 280 dpm/mg <sup>14</sup>C.

**3.3. Abbau der Tetrahydrororidinsäure (9).** - 3.3.1. *13-Dehydro-tetrahydro-1-nor-roridin-2,11-säure* (16) aus 9. 193 mg 9, erhalten nach Einbau von [<sup>2-<sup>14</sup>C</sup>]-Mevalonat, der Aktivität 1400 dpm/mg <sup>14</sup>C, wurden mit einer Lösung von 120 mg KMnO<sub>4</sub> in 15 ml 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in einer geschlossenen, evakuierbaren Apparatur<sup>b)</sup> innerhalb einer Std. versetzt. Am Ende der Reaktion war, nach weiterem Rühren während 1 Std., das Gemisch wieder violett gefärbt. Das gebildete CO<sub>2</sub> wurde mit der bei 3.2.3. beschriebenen Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung ausgefällt. Es resultierten 94 mg BaCO<sub>3</sub>, das wie bei 3.2.3. beschrieben behandelt wurde (Blindversuch ohne Carbonsäure 16: 0,0 mg BaCO<sub>3</sub>). Radioaktivität 113 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Das Oxydationsgemisch wurde mit festem NaHSO<sub>5</sub> bis zur Entfärbung versetzt und 5mal mit Äther extrahiert. Nach dem Waschen mit NaCl-Lösung bis zur neutralen Reaktion, Trocknen über MgSO<sub>4</sub> und Eindampfen im Vakuum resultierten 153 mg Rohprodukt als schwach gelbes Öl.

<sup>b)</sup> Es handelt sich um eine Modifikation der Methodik von Britt [16] zur Oxydation von Methylamin.

Da im DC. neben dem Hauptprodukt noch etwas Edukt sowie ein etwas langsamer laufender Fleck zu sehen waren, wurde das Rohprodukt in 20 ml Aceton gelöst und unter Rühren bei 22° mit 0,214 ml CrO<sub>3</sub>-Reagens (8N)<sup>6)</sup> versetzt.

Nach 15 Min. wurde mit H<sub>2</sub>O versetzt, das Aceton im Vakuum bei tiefer Temp. abgedampft und 5mal mit Äther extrahiert. Die Extrakte wurden einmal mit 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 4- bis 6mal mit NaCl-Lösung neutral gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO<sub>4</sub> und Eindampfen im Vakuum resultierten 154 mg Rohprodukt (gelbes Öl). Es wurde an 31 g Kieselgel mit Methylchlorid, das 3% Methanol und 1<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Ameisensäure enthielt, als Fluiermittel chromatographiert, wobei 41 mg nach DC. reine und 43 mg nach DC. beinahe reine 13-Dehydro-tetrahydro-1-nor-roridin-2,11-säure (**16**) erhalten wurden. Zur Aktivitätsbestimmung wurde eine DC.-reine Fraktion 3 Std. bei 50° getrocknet. Aktivität: 1510 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Zur Charakterisierung der Säure wurden 37 mg inaktives Material in einigen ml Äther gelöst und bei 0° mit einem Überschuss einer ätherischen Lösung von CH<sub>3</sub>N<sub>2</sub> während 10 Min. behandelt. Nach dem Eindampfen zur Trockne im Vakuum wurde diese Prozedur noch 3mal wiederholt. Das Rohprodukt wurde an 2 g Kieselgel chromatographiert; mit Methylchlorid, das 1% Methanol enthielt, als Eluiermittel resultierten 37 mg reiner 13-Dehydro-tetrahydro-1-nor-roridin-2,11-säure-dimethylester (**17**) als klares, farbloses Öl [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +26,5° ± 2° (c = 1,230, Chloroform). - IR.-Spektrum (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): u.a. Banden bei 2950, 2875, 1725-1735, 1715 (Schulter), 1355, 1195 und 1110 cm<sup>-1</sup>. - NMR.-Spektrum vgl. Tab. 4. - Jodoform-Probe positiv. Zur Analyse wurde eine Probe im Molekular Kolben bei 50-60° Badtemp. und 0,03 Torr destilliert.

C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub> (302,4) Ber. C 59,58 H 8,67% Gef. C 59,46 H 8,77%

Der analoge Abbau von 205 mg nach Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Acetat erhaltener Tetrahydrororidinsäure (**9**) der Aktivität 153 dpm/mg <sup>14</sup>C lieferte: 119,4 mg BaCO<sub>3</sub>, Aktivität: 34 dpm/mg <sup>14</sup>C; 43 mg DC.-reine 13-Dehydro-tetrahydro-1-nor-roridin-2,11-säure (**16**), Aktivität: 160 dpm/mg <sup>14</sup>C; 31 mg beinahe DC.-reine Säure **16**.

3.3.2. Abbau der 13-Dehydro-tetrahydro-1-nor-roridin-2,11-säure (**16**) nach Schmidt. 27,7 mg nach Einbau von [2-<sup>14</sup>C]-Mevalonat erhaltene Säure **16** der Aktivität 1510 dpm/mg <sup>14</sup>C (aus 3.3.1.) wurden mit 53 mg NaN<sub>3</sub> und ca. 1,4 g Polyphosphorsäure in der unter 3.2.3. erwähnten Apparatur auf analoge Weise während 1,5 Std. bei 80-90° behandelt. Es resultierten 18,5 mg BaCO<sub>3</sub>, Aktivität: 590 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Der analoge Abbau von 29,4 mg nach Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Acetat erhaltener Säure **16** der Aktivität 160 dpm/mg <sup>14</sup>C (aus 2.3.1.) lieferte 18,3 mg BaCO<sub>3</sub>. Radioaktivität 25 dpm/mg <sup>14</sup>C.

3.3.3. 13-Dehydro-tetrahydrororidinsäure-dimethylester (**20**). Eine Lösung von 1,180 g (3,55 mmol) **10** in 110 ml Aceton wurde bei 0° unter Rühren mit 1,312 ml CrO<sub>3</sub>-Reagens (8N)<sup>6)</sup> versetzt. Nach Zugabe von 40 ml H<sub>2</sub>O und 1 ml Methanol wurde das Aceton im Vakuum entfernt. Nach üblichem Aufarbeiten mit Methylchlorid resultierten 1,088 g Rohprodukt, welches im DC. (Fließmittel: Methylchlorid mit 3% Methanol) noch etwas Edukt und Diketon enthielt. Nach Chromatographie an 270 g Kieselgel mit Methylchlorid, 1,5-2% Methanol enthaltend, konnten 611 mg DC.-reiner Ester **20** als farbloses Öl erhalten werden. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +52° ± 1° (c = 1,307, Chloroform). - IR.-Spektrum (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): u.a. Banden bei 3540 (-OH), 1730 (Ester), 1720 (C=O), 1220 cm<sup>-1</sup>. NMR.-Spektrum: s. Tab. 4. - Trocknen zur Analyse 30 Min. bei 50° und 0,01 Torr.

C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub> (332,3) Ber. C 57,81 H 8,49% Gef. C 57,61 H 8,71%

3.3.4. 2-O-Benzoyl-13-dehydro-tetrahydrororidinsäure-dimethylester (**22**). Eine Lösung von 800 mg (2,41 mmol) **20** in 30 ml Pyridin wurde mit 3 ml Benzoylchlorid 24 Std. bei 22° stehen gelassen. Nach Kühlen der Reaktionslösung mit einer Eis-Kochsalz-Mischung wurde Eis zugesetzt und das Pyridin mit 13proz. HCl neutralisiert. Nach üblichem Aufarbeiten mit Methylchlorid und Behandlung mit Aktivkohle resultierten 2,316 g Rohprodukt, welches im DC. (Fließmittel: Methylchlorid mit 2% Methanol) noch viel Nebenprodukt enthielt. Nach Chromatographie an 60 g Kieselgel wurden mit Benzol 944 mg eines Nebenprodukts und mit Methylchlorid, 2% Methanol enthaltend, 835 mg 2-O-Benzoyl-13-dehydro-tetrahydrororidinsäure-dimethylester (**22**) als farbloses Öl eluiert. **22** war im DC. einheitlich und zeigte positive Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +26° ± 1° (c = 1,293, Chloroform). - IR.-Spektrum (CS<sub>2</sub>, 30 mg/ml):

<sup>6)</sup> CrO<sub>3</sub>-Reagens: 2,67 g CrO<sub>3</sub> + 2,30 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit H<sub>2</sub>O auf 10 ml aufgefüllt.



u.a. Banden bei 1735 (C=O, breit), 1360, 1260, 1210, 1110, 760, 710  $\text{cm}^{-1}$ . NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 4. - Zur Analyse 3 Std. bei 22° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_8$  (436,5) Ber. C 63,28 H 7,39% Gef. C 63,07 H 7,52%

3.3.5. *2-O-Acetyl-13-dehydro-tetrahydrovoridinsäure-dimethylester (21)*. Eine Lösung von 960 mg (2,88 mmol) **20** in 30 ml Pyridin wurde mit 30 ml Acetanhydrid über Nacht bei 22° stehengelassen. Nach Zugabe von Eis wurde mit 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert. Nach üblichem Aufarbeiten mit Methylchlorid resultierten 1,021 g Ester **21** als farbloses Öl, welches im DC. (Fließmittel: Methylchlorid mit 3% Methanol) einheitlich war. - IR.-Spektrum ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 30 mg/ml): u.a. Banden bei 1735 (C=O) und 1220  $\text{cm}^{-1}$ . Die HO-Bande bei 3540  $\text{cm}^{-1}$  ist verschwunden.

3.3.6. *Oxim 24 des 2-O-Benzoyl-13-dehydro-tetrahydrovoridinsäure-dimethylester 22*. Eine Lösung von 830 mg (1,90 mmol) **22** in 20 ml abs. Äthanol wurde mit 50 ml Pyridin und 7,2 g Hydroxylamin-hydrochlorid 11 Std. bei 22° stehengelassen, dann mit Eis versetzt und mit 13proz. HCl vorsichtig angesäuert. Nach üblichem Aufarbeiten mit Methylchlorid resultierten 900 mg gelbliches Öl, welches nach dem DC. (Fließmittel: Methylchlorid mit 3% Methanol) noch etwas Edukt und einen Startfleck enthält. Chromatographic an 60 g Kieselgel mit 1% Methanol in Methylchlorid lieferte 630 mg Oxim **24** als DC.-einheitliches farbloses Produkt.  $[\alpha]_D^{25} \sim +10^\circ \pm 1^\circ$  (= 0,538, Chloroform). - IR.-Spektrum ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 30 mg/ml): u.a. Banden bei 3580 (N-OH), 1735 (C=O), 1440, 1370, 1220, 1110  $\text{cm}^{-1}$ . NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 4. - Zur Analyse 2 Std. bei 50° und 0,01 Torr getrocknet.

$\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_8$  (451,5) Ber. C 61,18 H 7,30 N 3,10% Gef. C 61,17 H 7,50 N 3,25%

3.3.7. *Oxim 23 von 2-O-Acetyl-13-dehydro-tetrahydrovoridinsäure-dimethylester (21)*. Eine Lösung von 1,080 g **21** in Pyridin wurde analog zu Versuch 3.3.6. mit Hydroxylamin-hydrochlorid umgesetzt. Es resultierten 1,002 g farbloses Oxim **23**. Das Öl war nach DC. einheitlich. - IR.-Spektrum: u.a. Banden bei 3570 (=N-OH), 1735 (C=O), 1220  $\text{cm}^{-1}$ .

3.3.8. *Umsetzung des Oxims 23 mit  $\text{SOCl}_2$* . 770 mg (1,98 mmol) **23** wurden auf -80° gekühlt und anschliessend vorsichtig mit 10 ml  $\text{SOCl}_2$  versetzt. Nach langsamem Erwärmen auf RT. während 15 Min. wurde das  $\text{SOCl}_2$  im Vakuum entfernt. Durch 2malige Zugabe von Methylchlorid und Abdampfen im Vakuum konnte alles  $\text{SOCl}_2$  aus der Reaktionsmischung entfernt werden. Zum Rückstand wurden 40 ml ges. wässrige  $\text{NaHSO}_3$ -Lösung und 40 ml Essigester gegeben und 17 Std. bei 22° geschüttelt. Hierauf wurde die wässrige Phase abgetrennt und noch 3mal mit Essigester extrahiert, mit 45proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert und mit NaCl gesättigt. Durch Extraktion im Kutscher-Stuedel-Apparat mit Äther wurden nach total 40 Std. 121 mg *Methylester 27 der Adipinaldehydsäure* erhalten. Die Verbindung **27** reagierte positiv mit Tollens-Reagens und 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

*Oxydation von 27 zur Adipinsäure (11)*. Eine Lösung von 58 mg **27** in 20 ml Aceton wurde mit  $\text{CrO}_3$ -Lösung (8N<sup>6</sup>) bei 22° behandelt bis keine weitere Entfärbung mehr auftrat. Nach 5maligem Extrahieren mit Äther, Waschen mit NaCl-Lösung und Trocknen mit  $\text{MgSO}_4$  resultierten 53 mg Adipinsäure-monomethylester, welcher in 2 ml Methanol und 1 ml 50proz. KOH über Nacht bei 22° hydrolysiert wurde. Nach Ansäuern mit 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Extraktion mit Äther, Waschen mit NaCl-Lösung und Trocknen mit  $\text{MgSO}_4$  resultierten nach Behandlung mit Aktivkohle 50 mg Adipinsäure (**11**) vom Smp. 151-152°. **11** war nach Smp. und Misch-Smp. identisch mit authentischem Material.

*Isolierung des Verrucarinolactons (8)*. Die obigen Essigesterextrakte (s. 3.3.8. oben) wurden vereinigt, mit  $\text{NaHSO}_3$ -Lösung gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt (478 mg), welches im DC. (Fließmittel: Methylchlorid mit 4% Methanol) zwei Flecke zeigte, wurde in 20 ml Methanol mit 5 ml 50proz. KOH 5 Std. bei 22° stehengelassen. Nach Ansäuern mit 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wurde die Lösung mit NaCl gesättigt und während 18 Std. im Kutscher-Stuedel-Apparat mit Methylchlorid extrahiert. Es resultierten (220 mg) Rohprodukt, welches durch Sublimation bei 60° und 14 Torr 170 mg Verrucarinolacton (**8**) ergab. Es kristallisierte aus Äther in farblosen Nadeln vom Smp. 103-104° und war nach DC., optischer Drehung, IR.- und NMR.-Spektrum, Smp. und Misch-Smp. mit dem Verrucarinolacton, welches aus Verrucarin A gewonnen wird, identisch.

[ $\alpha$ ]-Werte von Verrucarinolacton (8):

aus Roridin A (2)

$$[\alpha]_{365}^{22} = +21,3^\circ \pm 1^\circ$$

$$[\alpha]_{436}^{22} = -7,0^\circ \pm 1^\circ$$

$$[\alpha]_{548}^{22} = -12,2^\circ \pm 1^\circ$$

$$[\alpha]_{578}^{22} = -11,8^\circ \pm 1^\circ$$

( $c = 1,135$ , Chloroform)

aus Verrucaridin A (1)

$$[\alpha]_{365}^{22} = +22,0^\circ \pm 1^\circ$$

$$[\alpha]_{436}^{22} = -6,9^\circ \pm 1^\circ$$

$$[\alpha]_{548}^{22} = -12,4^\circ \pm 1^\circ$$

$$[\alpha]_{578}^{22} = -12,1^\circ \pm 1^\circ$$

( $c = 1,175$ , Chloroform)

Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde noch 3mal aus Äther kristallisiert und 5 Std. bei 22° und 0,02 Torr getrocknet: 2. Kristallisat: 18 600 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4770 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 3. Kristallisat: 19 100 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4790 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 4. Kristallisat: 18 700 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4750 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

Isolierung von Acetonitril (26). Für die Isolierung des Acetonitrils diente ein getrennter Versuch. 540 mg Oxim **23** wurden mit 1 ml  $\text{SOCl}_2$  wie oben beschrieben behandelt. Nach einer Std. wurde das  $\text{SO}_2$  im Vakuum bei 50° abdestilliert und mittels einer Kühlfalle bei -80° aufgefangen. Nach Zugabe von 1 ml Methylenchlorid wurde in einer geschlossenen Apparatur mit Kühlfalle und Gasableitung das  $\text{SOCl}_2$  durch vorsichtige Zugabe und Kühlung mit fester  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  umgesetzt. Nach ca. 1 Std. klang die Gasentwicklung ab, worauf das Acetonitril und Methylenchlorid abdestilliert wurden. Es hinterblieb festes NaCl. Das IR.-Spektrum war identisch mit demjenigen des authentischen Materials. Im GC. (Ofen 90°, Injektor 150°) waren 10 mg (0,204 mmol = 17% d. Th.) Acetonitril nachweisbar.

3.3.9. Di-*p*-Bromphenacyl-ester **28** der Adipinsäure (11). 57 mg **11** aus Versuch 3.3.8. wurden mit 0,1N NaOH titriert und die Lösung mit einigen Tropfen 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bis zur lackmussauren Reaktion versetzt. Die wässrige Lösung wurde anschliessend im Vakuum auf 2 ml eingengt und eine Lösung von 400 mg *p*-Bromphenacylbromid in 10 ml Äthanol zugesetzt. Nach 3 Std. Erwärmen auf dem Dampfbad wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen. Es resultierten nach Waschen mit 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2N  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Trocknen über  $\text{MgSO}_4$  307 mg Rohprodukt, das aus Methylenchlorid/Methanol 35 mg Kristalle von Di-*p*-Bromphenacyl-ester **28** vom Smp. 153–154° lieferte, die nach Smp. und Misch-Smp. identisch mit authentischem Material waren.

Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde noch 3mal sukzessive kristallisiert und während 5 Std. bei 50° und 0,01 Torr getrocknet. 1. Kristallisat: Smp. 152–154°, 32 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 3 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 2. Kristallisat: Smp. 153–154°, 28 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 3 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 3. Kristallisat: Smp. 153–154°, 30 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 3 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Ch. Tamm, XXIIIrd Int. Congr. pure appl. Chemistry, Special Lectures, Vol. 5, 49 (1971).
- [2] 27. Mitt.: R. Achini, B. Müller & Ch. Tamm, Helv. 57, 1442 (1974).
- [3] Vgl. Übersichtsartikel von Ch. Tamm, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Progr. Chemistry org. nat. Prod.) 37, 64 (1974).
- [4] E. H. R. Jones & G. Lowe, J. chem. Soc. 1960, 3959.
- [5] R. Achini, B. Müller & Ch. Tamm, Chem. Commun. 1971, 404.
- [6] D. Arigoni, D. E. Cane, B. Müller & Ch. Tamm, Helv. 56, 2946 (1973).
- [7] B. Müller, R. Achini & Ch. Tamm, Helv. 58, 471 (1975).
- [8] B. Müller & Ch. Tamm, Helv. 58, 483 (1975).
- [9] B. Böhmer & Ch. Tamm, Helv. 49, 2527 (1966).
- [10] C. Schuerch & E. H. Huntress, J. Amer. chem. Soc. 77, 2233, 2238 (1949); P. A. S. Smith, ibid. 70, 320 (1948); H. Wolff, Org. Reactions 3, 307 (1946); J. W. Cook & J. S. Moffatt, J. chem. Soc. 1950, 1160.
- [11] Vgl. E. F. Phares, Arch. biochem. Biophysics 33, 173 (1951).
- [12] G. Berger & S. C. J. Oliver, Rec. trav. chim. Pays-Bas 46, 600 (1927); J. L. Rabinowitz & B. Pritsker, Analyt. Chemistry 36, 403 (1964).
- [13] R. K. Hill, J. org. Chemistry 27, 29 (1962); C. A. Grob & P. W. Schiess, Angew. Chem. 79, 1 (1967); C. A. Grob, ibid. 81, 543 (1969).
- [14] D. V. Parke & R. T. Williams, Biochem. J. 51, 339 (1952); 54, 231 (1953).
- [15] J. Gutzwiller & Ch. Tamm, Helv. 48, 157 (1965).
- [16] J. J. Brill, Dissertation ETH Zürich 1959, Nr. 2948, S. 66.