

### 55. Biosynthese der Verrucarine und Roridine. Teil 3. Der Einbau von (3*R*)-[5-<sup>14</sup>C]-, [2-<sup>14</sup>C]- und an C(2) stereospezifisch tritiertem Mevalonat in Verrucarol

Verrucarine und Roridine, 29. Mitteilung [1]

von **Beat Müller, Roland Achini** und **Christoph Tamm**

Institut für Organische Chemie der Universität, 4056 Basel

(17. XII. 74)

*Summary.* Separate experiments, involving incorporation of either (3*R*)-[5-<sup>14</sup>C]-mevalonate or each enantiomer of [2-<sup>3</sup>H]-mevalonate into verrucarin A and roridin A, indicate that hydroxylation at C(4) of the tricothecane skeleton, to yield verrucarol (4), proceeds with an overall retention of configuration; they confirm that C(8) and not C(10) is derived specifically from C(2) or mevalonate.

**1. Einleitung.** - Der Einbau von drei Molekeln verschieden markierter Mevalonsäure in Trichothecolon [2] [3] [4], Trichodermol (Roridin C) [5] und Calonectrin [3] hat den sesquiterpenartigen Charakter des Tricothecangerüsts [6] gezeigt. Ausserdem wurden *all-trans*-Farnesylpyrophosphat [7] und Trichodien [8] als Vorläufer von Trichothecolon erkannt. *all-trans*-Farnesylpyrophosphat ist auch ein Zwischenprodukt in der Biosynthese des Verrucarols (4) [9], des sesquiterpenoiden Bausteins des Antibiotica-Komplexes der Verrucarine und Roridine [10].

Im folgenden berichten wir über den Einbau von [2-<sup>14</sup>C]- und [2-<sup>3</sup>H]-markiertem Mevalonat in Verrucarol (4)<sup>1</sup>. Vor allem galt es abzuklären, ob C(8) oder C(10) dem C(2) der Mevalonsäure entspricht, was einen Hinweis auf die Art der Faltung der Farnesolkette gibt. Um näheren Aufschluss über den Mechanismus der späteren Stufen zu erhalten, wurden auch stereospezifisch tritierte Mevalonate eingesetzt.

**2. Einbauversuche.** - Markiertes Natrium-mevalonat wurde wie früher beschrieben [1] [13] zu wachsenden Kulturen von *Myrothecium roridum*, Stamm 1135, gegeben, die radioaktiven Metabolite, hauptsächlich Verrucarin A (1) und Roridin A (2), isoliert und mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bzw. KOH in Methanol hydrolysiert. Die verabreichten Vorläufer und die Radioaktivität der isolierten Verbindungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Der Einbau von (3*R*)-[5-<sup>14</sup>C]-Mevalonat in Verrucarol (4) diente als Basis für alle weiteren Versuche, die mit racemischem 3(*R,S*)-Mevalonat durchgeführt wurden, denn er zeigt, dass in der Tat das natürliche Enantiomere der Baustein des Tricothecangerüsts ist, ein Sachverhalt, der bisher von allen Autoren als selbstverständlich vorausgesetzt worden ist, ohne experimentell bewiesen zu sein.

**3. Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in Verrucarol.** - Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass sich nach Einbau von (3*R*)-[5-<sup>14</sup>C]-Mevalonat in Verrucarin A (1) erwartungsgemäss ca. ein Viertel der Radioaktivität im Verrucarinolacton und drei Viertel im Verrucarol (4) befinden. Zur Lokalisierung der Radioaktivität

<sup>1</sup>) Einige der Resultate waren Gegenstand vorläufiger Mitteilungen; vgl. [11] [12].

## Schema 1

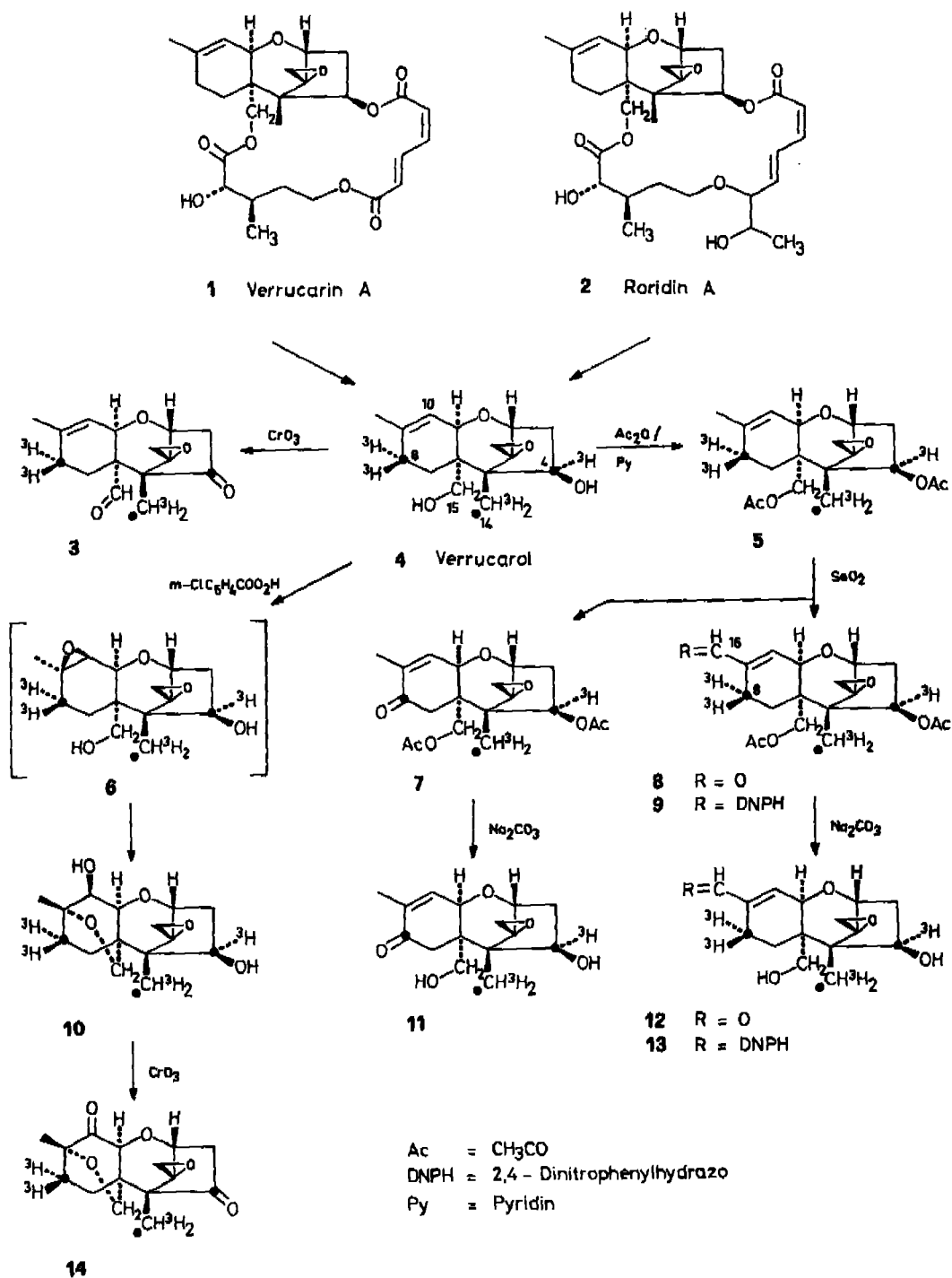


Tabelle 1. Radioaktivitäten von *Verrucarins A (1)*, *Roridin A (2)* und deren Umwandlungsprodukten

Mevalonat-Vorläufer <sup>a)</sup> (Na-Salz)	Aktivität des Vorläufers mCi	Kulturflüssigkeit (Liter)	Substanz	Spezifische Aktivität dpm/mmol <sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H: <sup>14</sup> C Aktivitätsverhältnis	Abs. Einbaurrate %	% des Totals
[3R]-[5- <sup>14</sup> C]	0,01	5	Verrucarins A (1)	30,1 · 10 <sup>3</sup>			1,6	100
			Verrucarol (4)	21,3 · 10 <sup>3</sup>				70
			Verrucarinolacton	7,9 · 10 <sup>3</sup>				26
[2- <sup>3</sup> H, 2- <sup>14</sup> C]	0,5( <sup>14</sup> C) 5,0( <sup>3</sup> H) <sup>3</sup> H : <sup>14</sup> C = 9,6	20	Roridin A (2)	63,8 · 10 <sup>3</sup>				
			Verrucarins A (1)	110,4 · 10 <sup>3</sup>	15,7 · 10 <sup>3</sup>	7,0	0,45	100
			Verrucarol (4)	87,5 · 10 <sup>3</sup>	12,8 · 10 <sup>3</sup>	7,6		81
			Ketoaldehyd 3	84,4 · 10 <sup>3</sup>	12,5 · 10 <sup>3</sup>	6,7		
			Hydrazon 9	146,6 · 10 <sup>3</sup>	12,6 · 10 <sup>3</sup>	11,6		
			Hydrazon 13	-	-	12,1		
			Diketon 14	78,1 · 10 <sup>3</sup>	12,7 · 10 <sup>3</sup>	6,1		
			Verrucarinolacton	18,6 · 10 <sup>3</sup>	4,3 · 10 <sup>3</sup>	4,3		
			Roridin A (2)	73,0 · 10 <sup>3</sup>	12,3 · 10 <sup>3</sup>	5,9	3,0	27
			Verrucarol (4)	48,2 · 10 <sup>3</sup>	6,5 · 10 <sup>3</sup>	7,4		100
			Ketoaldehyd 3	38,9 · 10 <sup>3</sup>	6,5 · 10 <sup>3</sup>	5,9		53,3
			Diketon 14	39,6 · 10 <sup>3</sup>	6,5 · 10 <sup>3</sup>	6,1		
			Dj-O-acetyl-16-oxo- verrucarol (8)	82,4 · 10 <sup>3</sup>	6,5 · 10 <sup>3</sup>	12,7		
			8-Oxo-verrucarol (11)	29,0 · 10 <sup>3</sup>	6,4 · 10 <sup>3</sup>	4,6		
16-Oxo-verrucarol (12)	-	-	12,5					
Tetrahydroimidinsäure- dimethylester	25,9 · 10 <sup>3</sup>	5,7 · 10 <sup>3</sup>	4,5		46,2			
[3R]-[(2S)-2- <sup>3</sup> H] [3S]-[(2R)-2- <sup>3</sup> H]	0,25	20	Verrucarins A (1)	34,3 · 10 <sup>4</sup>			0,07	100
			Verrucarol (4)	37,0 · 10 <sup>4</sup>				60
			Ketoaldehyd 3	22,0 · 10 <sup>4</sup>				<1
[3R]-[(2R)-2- <sup>3</sup> H] [3S]-[(2S)-2- <sup>3</sup> H]	0,25	20	Verrucarins A (1)	14,4 · 10 <sup>4</sup>			0,04	100
			Verrucarol (4)	9,7 · 10 <sup>4</sup>				67
			Ketoaldehyd 3	10,3 · 10 <sup>4</sup>				71
Verrucarinolacton	6,2 · 10 <sup>4</sup>				43			

<sup>a)</sup> Die radioaktiven Vorläufer wurden vom *Radiochemical Centre*, Amersham (Buckinghamshire, England), bezogen, mit Ausnahme von (3R)-[5-<sup>14</sup>C]-Natrium-mevalonat, das uns Prof. D. Arigoni, ETH Zürich, freundlicherweise zur Verfügung gestellt hatte.

in der Verrucarolmolekel dienten die nach Verabreichung von doppelt markiertem [ $2\text{-}^3\text{H}$ ,  $2\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Mevalonat durch Hydrolyse von Verrucarin A (1) und von Roridin A (2) erhaltenen Verrucarol-Präparate. Durch die im *Schema 1* dargestellten Reaktionen liessen sich die C-Atome C(4), C(8), C(10), C(15) und C(16) des Verrucarols (4) erfassen. Auf den Nachweis der Tritiumaktivität an C(14) wurde verzichtet, da bereits durch frühere orientierende Versuche [14] gezeigt worden war, dass dieses C-Atom aus C(2) von Mevalonat stammt. Oxydation von Verrucarol mit  $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  in Aceton ergibt den Ketoaldehyd 3 [15], womit die  $^3\text{H}$ -Aktivität an C(4) erfasst wird. Epoxydation von Verrucarol mit *m*-Chlorperbenzoesäure in Chloroform/Äther liefert das  $9\beta,10\beta$ -Epoxyd 6 als Hauptprodukt, das jedoch nicht fassbar ist, da es unter intramolekularem Angriff der 15-Hydroxygruppe an der (C(9)-O)-Bindung in den Hydroxyäther 10 [16] übergeht. Oxydation von 10 ergibt das Diketon 14. Durch diese Reaktionen lassen sich die  $^3\text{H}$ -Aktivitäten an C(4) und C(10) bestimmen. Dass C(15) nicht markiert ist, ist schon früher gezeigt worden [14]. Durch Oxydation der Allylstellung der  $\Delta^9$ -Doppelbindung sollte sich Tritium auch an C(8) nachweisen lassen. Zu diesem Zwecke wurde Di-O-acetyl-verrucarol (5) mit  $\text{ScO}_3$  in Dioxan behandelt und mit  $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  in Aceton nachoxydiert. Nach chromatographischer Trennung des Rohprodukts an einer Kieselsäule und auf Dickschichtplatten wurden die beiden einheitlichen Verbindungen 7 und 8 erhalten. (Da das Edukt mehrere allylische Stellungen aufweist, sind auch mehrere Oxydationsprodukte zu erwarten.) Die Struktur des Aldehyds 8 ergab sich zunächst aus dem IR.-Spektrum (typische Schwingungen für die  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehydgruppe bei 1690, 2720 und  $2830\text{ cm}^{-1}$ ), dem UV.-Spektrum (Maxima bei 222 nm ( $\log \epsilon = 4,12$ ) und 322 nm ( $\log \epsilon = 1,48$ )) sowie aus dem Massenspektrum ( $M^+$  bei  $m/e$  364) und dem  $^1\text{H}$ -NMR.-Spektrum. Im letzteren liessen sich alle wichtigen Signale zuordnen (vgl. Tab. 2). Beim zweiten Oxydationsprodukt handelt es sich um das  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Keton 7. Kristalle wurden erst nach Entacetylierung, die zu 11 führte, erhalten. Der Konstitutionsbeweis für 11 (und damit auch für 7) stützt sich auf das IR.-Spektrum mit der für  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Sechsringketone typischen Schwingung bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  (weitere für Verrucarol (4) charakteristische Banden bei 1080 und  $960\text{ cm}^{-1}$ ); das UV.-Spektrum (Maxima bei 224 nm ( $\log \epsilon = 3,84$ ) und 317 nm ( $\log \epsilon = 1,55$ )), das Massenspektrum ( $M^+$  bei  $m/e$  280) und das  $^1\text{H}$ -NMR.-Spektrum (vgl. Tab. 2).

Das nach Einbau von [ $2\text{-}^3\text{H}$ ,  $2\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Mevalonat ( $^3\text{H}:^{14}\text{C} = 9,6$ ) in 1 oder 2 erhaltene Verrucarol (4) wies ein ( $^3\text{H}:^{14}\text{C}$ )-Verhältnis von 7,56 (Präparat aus Verrucarin A) bzw. 7,4 (Präparat aus Roridin A) auf, was 4,6 Tritiumatomen entspricht. Die Abweichung vom erwarteten Wert von 5 Tritiumatomen könnte auf einer reversiblen Reaktion der Prenylisomerase beruhen [17]. Aus Gründen der Bilanz sind in Tabelle 1 jeweils auch die Radioaktivitäten der isolierten sauren Hydrolysenprodukte vermerkt. Der Verlust von einem Fünftel der Tritiumaktivität bei der Oxydation von Verrucarol (4) zum Ketoaldehyd 3 zeigt, dass C(4) von 4 ein Tritiumatom trägt. Im ungesättigten Keton 7, das aus dem aus Roridin A stammenden Verrucarolpräparat bereitet wurde, sind noch drei Fünftel der Tritiumaktivität des Verrucarols vorhanden, was beweist, dass zwei Tritiumatome an C(8) vorhanden sind.

Interessant ist, dass das zweite Oxydationsprodukt, der ungesättigte Aldehyd 8 (da er anfänglich nicht kristallisierte, wurde er in das 2,4-Dinitrophenylhydrazon 9 übergeführt), fast die doppelt so grosse mol-spezifische Tritiumaktivität wie Verru-

Tabelle 2. Zuordnung der H-Atome in den  $^1\text{H-NMR-Spektren}^3$  der Verbindungen 7, 8 und 11

Substanz	C(2)	C(3)	C(4)	C(7)	C(8)	C(10)	C(11)	C(13)	C(14)	C(15)	C(16)
Di-O-acetyl-8-oxo- verrucarol (7)	3,93 <i>d</i> (5,5)	1,9-2,8 <i>m</i>	5,7 <i>m</i>	2,68 <i>AB</i> (16)	-	6,52 <i>dd</i> (5/2)	4,14 <i>d</i> (5)	3,03 <i>AB</i> (4)	0,82 <i>s</i>	4,21 <i>AB</i> (12)	1,86 <i>d</i> (2)
Di-O-acetyl-16-oxo- verrucarol (8)	3,93 <i>d</i> (5,5)	1,8-2,4 <i>m</i>	5,8 <i>q</i>	-	-	6,65 <i>d</i> (5)	4,10 <i>d</i> (5)	3,04 <i>AB</i> (4)	0,90 <i>s</i>	4,1 <i>AB</i> (13)	9,55 <i>s</i>
8-Oxo-verrucarol (11)	3,91 <i>d</i> (5,5)	1,9-2,8 <i>m</i>	4,8 <i>m</i>	2,60 <i>AB</i> (16)	-	6,54 <i>dd</i> (5/2)	4,18 <i>d</i> (5)	2,98 <i>AB</i> (4)	0,90 <i>s</i>	3,70 <i>AB</i> (12)	1,86 <i>d</i> (2)

<sup>3</sup>) Aufgenommen mit einem Varian-A-60 (60 MHz) oder einem Varian-HR-100 (100 MHz)-Spektrometer in  $\text{CDCl}_3$ -Lösung im Spektrollabor des Instituts (K. Aegerter). Chemische Verschiebungen ( $\delta$ -Werte) in ppm relativ zu Tetramethylsilan. Abkürzungen: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *q* = Quartett, *m* = Multiplett; Kopplungskonstanten *J* (Zahlen in Klammern) in Hz.

carol (4) aufweist. Dieser Befund ist durch den kinetischen Isotopeneffekt zu erklären. In einer Molekel Verrucarol befindet sich höchstens ein einziges Tritiumatom an einer der möglichen Stellungen. Erst eine Vielzahl von Molekeln ergibt das beobachtete Markierungsmuster. Bei der  $\text{SeO}_2$ -Oxydation von 5 konkurrieren C(8) und C(16) miteinander. Molekeln mit auch nur einem Tritium-Atom an C(8) werden an dieser Stelle *ca.* 20mal langsamer oxydiert als solche mit nur Wasserstoff an C(8). Infolgedessen werden diejenigen mit Tritium an C(8) bevorzugt an C(16) oxydiert, da sich dort kein Tritium befindet, welches die Reaktion verlangsamt. Durch die Oxydation werden deshalb die Molekeln mit Tritium an C(8) ausgewählt und im Aldehyd 8 angereichert, wodurch sich dessen Tritiumgehalt erhöht. Die entsprechende Verminderung der Tritiumaktivität im 8-Oxo-Derivat 7 lässt sich nicht feststellen, da dort das Tritium vollständig ausgewaschen wird.

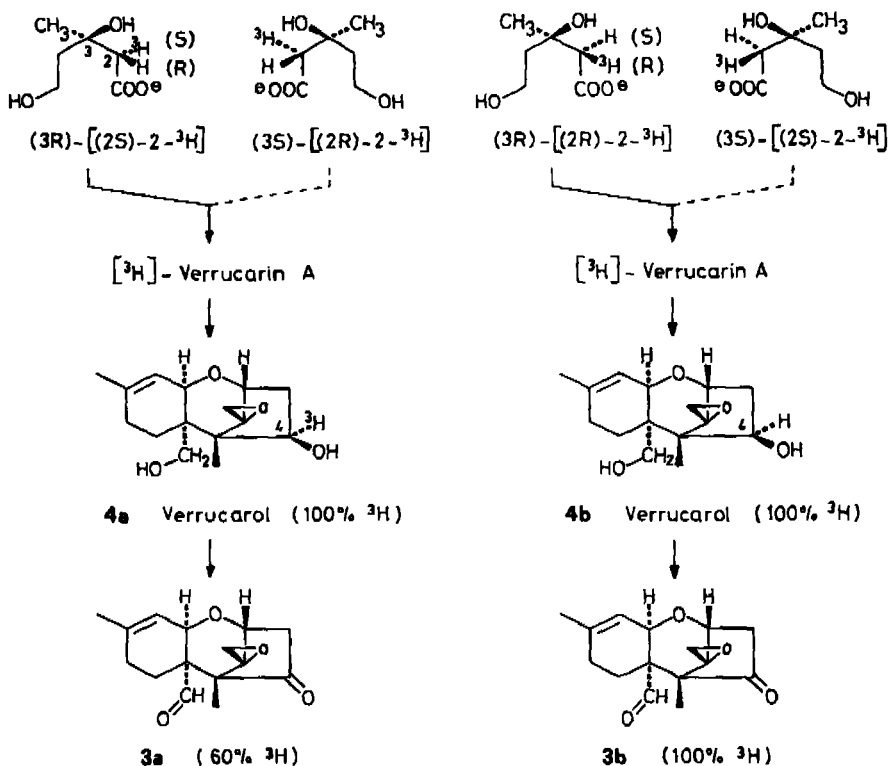
Dieser kinetische Isotopeneffekt kann als direkter Beweis für die Tritiummarkierung an C(8) in Verrucarol (4) betrachtet werden. Ein Beweis für die Abwesenheit von Tritium an C(10) liefert der Diketoäther 14, der noch vier der ursprünglichen fünf Tritiumatome enthält. Bei dieser Umwandlung ist lediglich das Tritiumatom an C(4) verloren gegangen<sup>4)</sup>.

Die Versuche mit (3*R*)-[(2*S*)-2-<sup>3</sup>H]/[(3*S*)-[(2*R*)-2-<sup>3</sup>H]- und (3*S*)-[(2*S*)-2-<sup>3</sup>H]/(3*R*)-[(2*R*)-2-<sup>3</sup>H]-Mevalonat bezweckten die Abklärung der Stereochemie der Hydroxylierung an C(4) des Trichothecan-Gerüsts (vgl. *Schema 2*). Aufgrund der oben beschriebenen Versuche mit (3*R*)-[5-<sup>14</sup>C]-Mevalonat ist gezeigt, dass aus den verabreichten Racematen jeweils nur das (3*R*)-Enantiomere in Verrucarol eingebaut wird. Nach Einbau von (3*R*)-[(2*S*)-2-<sup>3</sup>H]-Mevalonat und Oxydation des erhaltenen Verrucarolpräparats 4a zum Ketoaldehyd 3a sind noch *ca.* zwei Drittel der Radioaktivität vorhanden, d. h. ein Drittel ist bei der Oxydation der 4-Hydroxygruppe verloren gegangen. Wird hingegen das Diastereoisomere (3*R*)-[(2*R*)-2-<sup>3</sup>H]-Mevalonat in Verrucarol (4b) eingebaut, so ändert sich die Tritiumaktivität bei der Umwandlung in den Ketoaldehyd 3b nicht. Dies bedeutet, dass dieses Verrucarolpräparat an C(4) kein Tritium enthalten hat.

**4. Diskussion der Ergebnisse.** – Aus den Versuchen mit den stereospezifisch tritiierten Mevalonatpräparaten geht hervor, dass die Orientierung der Hydroxylgruppe an C(4) des Verrucarols der des «*pro-2R*»-Wasserstoffatoms des Mevalonats entspricht und dass die Hydroxylierung von C(4) insgesamt unter Retention der Konfiguration erfolgt. Diese Schlussfolgerungen sind im Einklang mit denjenigen, die für Trichothecin und Trichodermol (Roridin C) gezogen wurden, und gelten unter der Annahme, dass die Bildung der Farnesyl-Zwischenstufe in der bei der Biosynthese von Squalen beobachteten Weise erfolgt [18]. Da wir durch Einbau von (3*R*)-[5-<sup>14</sup>C]-Mevalonat in Verrucarol den Einbau des (3*R*)-Enantiomeren nachgewiesen haben, können wir aufgrund der beiden weiteren Versuche mit den stereospezifisch tritiummarkierten Mevalonaten (vgl. *Schema 2*) das (3*S*)-Isomere der

<sup>4)</sup> Bei der Berechnung der Anzahl Tritiumatome in Verrucarol (4) aus dem (<sup>3</sup>H:<sup>14</sup>C)-Verhältnis des Verrucarols und demjenigen des Vorläufers, ergeben sich nicht-ganzzahlige Werte. Dies ist auf einen Tritiumverlust im Mevalonat durch Austausch vor dem Einbau zurückzuführen. Zu ganzzahligen Werten für die Tritiumatome für Verrucarol und die Umwandlungsprodukte gelangt man, wenn man für das (<sup>3</sup>H:<sup>14</sup>C)-Verhältnis des Vorläufers den Wert von 8,8 anstelle von 9,6 einsetzt.

Schema 2



Mevalonsäure als biogenetischen Baustein des Verrucarols ausschliessen. Würde neben dem (3R)-[(2R)-2-<sup>3</sup>H]-Mevalonat auch das (3S)-[(2S)-2-<sup>3</sup>H]-Isomere eingebaut, so müsste an C(4) des Verrucarols (**4b**) Tritium zu finden sein, denn beim Verrucarol **4a** rührt das Tritium vom (2S)-Wasserstoff des Mevalonats her.

Was den weiteren Weg der Biogenese des Trichothecangerüsts betrifft, der über Geranylpyrophosphat [19] und *all-trans*-Farnesylpyrophosphat [7] [9] führt, haben wir kürzlich anhand des Verrucarols weiteren Einblick in die beteiligten Reaktionsmechanismen erhalten [9]. Diese haben durch die in der folgenden Mitteilung [20] beschriebenen Versuche weitere experimentelle Bestätigung erfahren.

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.** - Siehe die entsprechenden Angaben in [1].

**2. Kulturversuche.** - 2.1. *Allgemeines.* Nährlösung: 7 g «Casamino acids», 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20 g Glucose, 2 g Malzextrakt, 2 g Pepton, 2 g Hefextrakt ad 1 l *aqua dest.* pH 5,28 (nicht eingestellt).

In einem Fermenter wurden 10 l sterilisierte Nährlösung vorgelegt und unter sterilen Bedingungen mit 50 ml Sporensuspension von *Myrothecium roridum*, Stamm S 1135, geimpft. Das Wachstum des Pilzes erfolgte bei 27° unter Rühren (450 rpm) und Luftdurchfluss (0,4 l pro l Kulturlösung und Min.).

2.2. *Zugabe von  $[2\text{-}^3\text{H}_2, 2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Natrium-mevalonat.* 50 Std. nach Impfung der Kulturbrühe wurden zu zwei 10-Liter-Fermentern mittels einer Millipore-Sterilfilterspritze 0,5 mCi $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ - und 5,0 mCi $[2\text{-}^3\text{H}_2]$ -Natrium-mevalonatlösung zu gleichen Teilen gegeben. 41 Std. nach Zugabe des Vorläufers wurden die 20 l Kulturlösung mit Essigester extrahiert und der Rohextrakt (34 g) an 2 kg Kieselgel chromatographiert. Als Fluierungsmittel diente Methylenchlorid, dem steigende Mengen an Methanol zugesetzt wurden. Die Substanzen wurden durch DC. und IR.-Spektren identifiziert.

Aus den Fraktionen 40-55 (3,11 g, eluiert mit 0,75% Methanol-Zusatz) resultierten nach nochmaliger Reinigung an 320 g Kieselgel 2,325 g reines *Verrucarín A* (1). Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde aus Methylenchlorid/Äther 5mal umkristallisiert, 8 Std. bei 40° und 0,02 Torr getrocknet: 3. Kristallisat: 21900 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 3110 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 4. Kristallisat: 22000 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 3140 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 5. Kristallisat: 21600 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 3130 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

Die Fraktionen 68-79 (ca. 15 g), eluiert mit 2% Methanol-Zusatz, enthielten zur Hauptsache *Roridin A*. Aus Fraktion 72 (3,1 g) konnte durch Kristallisation aus Methylenchlorid/Äther reines *Roridin A* (2) erhalten werden. Fünfmal umkristallisiert, 8 Std. bei 40° und 0,02 Torr getrocknet: 3. Kristallisat: 15600 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2170 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 4. Kristallisat: 15200 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2180 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 5. Kristallisat: 15100 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2180 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

2.3. *Zugabe von  $(3R)\text{-}[(2S)\text{-}2\text{-}^3\text{H}]/(3S)\text{-}[(2R)\text{-}2\text{-}^3\text{H}]$ -Natrium-mevalonat.* In zwei 10-Literfermentern wurde total 0,25 mCi $(3R)\text{-}[(2S)\text{-}2\text{-}^3\text{H}]/(3S)\text{-}[(2R)\text{-}2\text{-}^3\text{H}]$ -Natrium-mevalonat der spezifischen Aktivität von 60 mCi/mmol gleichmässig verteilt zur Nährlösung gegeben. Nach Sterilisation und Züchtung des Mikroorganismus wurde die Kulturlösung mit Essigester extrahiert und der Rohextrakt (14 g) an 1 kg Kieselgel mit Methylenchlorid analog zu Versuch 2.2. chromatographiert. Die Fraktionen 36-42 (646 mg, eluiert mit 0,9% Methanol-Zusatz) ergaben nach Kristallisation aus Aceton/Äther 405 mg reines *Verrucarín A* (1), das noch 2mal umkristallisiert wurde. Radioaktivitätsbestimmung<sup>5)</sup> nach Trocknen bei 80° und 0,01 Torr während 14 Std.: 1. Kristallisat: 650 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 2. Kristallisat: 740 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 3. Kristallisat: 660 dpm/mg  $^3\text{H}$ .

Die Fraktionen 57-63 (1,318 g, eluiert mit 1,5% Methanol-Zusatz) ergaben nach Kristallisation aus Aceton/Äther 388 mg reines *Roridin A* (2), das noch 3mal umkristallisiert wurde. Radioaktivitätsbestimmung<sup>5)</sup> nach 15 Std. Trocknen bei 70° und 0,01 Torr: 2. Kristallisat: 490 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 3. Kristallisat: 470 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 4. Kristallisat: 480 dpm/mg  $^3\text{H}$ .

2.4. *Zugabe von  $(3R)\text{-}[(2R)\text{-}2\text{-}^3\text{H}]/(3S)\text{-}[(2S)\text{-}2\text{-}^3\text{H}]$ -Natrium-mevalonat.* Analoge Züchtung des Stammes S 1135 von *Myrothecium roridum* unter Zusatz von total 0,25 mCi $(3R)\text{-}[(2R)\text{-}2\text{-}^3\text{H}]/(3S)\text{-}[(2S)\text{-}2\text{-}^3\text{H}]$ -Natrium-mevalonat der spezifischen Aktivität von 60 mCi/mmol und Extraktion mit Essigester ergab 10,9 g Rohextrakt, der an 1 kg Kieselgel chromatographiert wurde.

Die Fraktionen 35-41 (800 mg) ergaben nach Kristallisation aus Aceton/Äther 383 mg rohes *Verrucarín A* (1), das noch 3mal umkristallisiert wurde. Nach DC. waren die letzten drei Kristallisate rein. Radioaktivitätsbestimmung<sup>5)</sup> nach Trocknen während 14 Std. bei 80° und 0,01 Torr: 1. Kristallisat: 330 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 2. Kristallisat: 260 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 3. Kristallisat: 270 dpm/mg  $^3\text{H}$ .

2.5. *Kulturversuch mit Zugabe von  $(3R)\text{-}[\text{5-}^{14}\text{C}]$ -Natrium-mevalonat.* Zu 5 l sterilisierter Kulturlösung wurde 0,01 mCi steril filtrierte  $(3R)\text{-}[\text{5-}^{14}\text{C}]$ -Natrium-mevalonatlösung gegeben und mit 0,5 l einer Vorkulturlösung angeimpft. Nach 70 Std. wurde die Kulturlösung mit Essigester extrahiert und der gewonnene Rohextrakt (3,977 g) an 500 g Kieselgel chromatographiert. Durch Zugabe von 0,5% Methanol zum Methylenchlorid nach jeder zweiten Fraktion (je 500 ml) wurde die Polarität langsam gesteigert.

Die Fraktionen 28-31 ergaben 180 mg unreines *Verrucarín A* (1), welches für die Radioaktivitätsbestimmung noch 6mal aus Methylenchlorid/Äther umkristallisiert wurde. Die Kristallisate 4, 5 und 6 waren nach DC. einheitlich; sie wurden 1 Std. bei 70° und 0,02 Torr getrocknet. 4. Kristallisat: 59 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 5. Kristallisat: 60 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 6. Kristallisat: 64 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

Die Fraktionen 54-57 (870 mg) enthielten hauptsächlich *Roridin A*. Aus 100 mg Material der Fraktion 54 (447 mg) konnten durch präp. DC. an einer 20 × 20 cm Platte 66 mg reines *Roridin A* (2) erhalten werden. Aus Methylenchlorid/Äther wurden 5 sukzessive Kristallisate hergestellt und 1 Std. bei 70° und 0,02 Torr getrocknet. 4. Kristallisat: 121 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 5. Kristallisat: 120 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 6. Kristallisat: 118 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

<sup>5)</sup> Die Radioaktivität wurde nach der Kolbenverbrennungsmethode bestimmt. Bei dieser geringen Aktivität ist ein Fehler von  $\pm 10\%$  zu erwarten.



**3. Abbaureaktionen. - 3.1. Hydrolyse von radioaktivem Verrucarín A (1) und Roridin A (2).** - Verrucarín A (1) wurde nach *Gutzwiller & Tamm* [21] hydrolysiert. Für die Radioaktivitätsbestimmung der Muconsäure wurde der Dimethylester hergestellt. Roridin A (2) wurde nach *Böhner & Tamm* [22] hydrolysiert. Die Roridinsäure wurde mit Diazomethan verestert und in Gegenwart von Pd/C zum Tetrahydrororidinsäure-dimethylester hydriert. Es resultierten:

a) *Nach Einbau von [2-<sup>3</sup>H, 2-<sup>14</sup>C]-Mevalonat:*

Verrucarín A (1) der mittleren Aktivität von 22000 dpm/mg <sup>3</sup>H und 3140 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Verrucarol (4), aus Äther 6mal umkristallisiert und 5 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet: 4. Kristallisat: Smp. 163-164°, 36300 dpm/mg <sup>3</sup>H, 4800 dpm/mg <sup>14</sup>C; 5. Kristallisat: Smp. 163-164°, 36600 dpm/mg <sup>3</sup>H, 4790 dpm/mg <sup>14</sup>C; 6. Kristallisat: Smp. 163-164°, 36800 dpm/mg <sup>3</sup>H, 4820 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Verrucarinolacton, aus Äther umkristallisiert und 5 Std. bei 22° und 0,01 Torr getrocknet: 1. Kristallisat: Smp. 103-104°, 14500 dpm/mg <sup>3</sup>H, 3310 dpm/mg <sup>14</sup>C; 2. Kristallisat: Smp. 103-104°, 14200 dpm/mg <sup>3</sup>H, 3290 dpm/mg <sup>14</sup>C; 3. Kristallisat: Smp. 103-104°, 14300 dpm/mg <sup>3</sup>H, 3300 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Muconsäure-dimethylester, aus Äther umkristallisiert und 5 Std. bei 22° und 0,05 Torr getrocknet; Smp. 75-76°; zeigte keine <sup>3</sup>H- und <sup>14</sup>C-Aktivität.

b) *Nach Einbau von (3R)-[(2S)-2-<sup>3</sup>H]/(3S)-[(2R)-2-<sup>3</sup>H]-Mevalonat:*

Verrucarín A (1) der durchschnittlichen Aktivität von 683 dpm/mg <sup>3</sup>H.

Verrucarol (4), aus Aceton/Äther umkristallisiert und 14 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet: 2. Kristallisat: 1400 dpm/mg <sup>3</sup>H; 3. Kristallisat: 1400 dpm/mg <sup>3</sup>H; 4. Kristallisat: 1370 dpm/mg <sup>3</sup>H.

Verrucarinolacton, aus Äther umkristallisiert und sublimiert, Smp. 103-104°: 1. Sublimat: 40 dpm/mg <sup>3</sup>H; 2. Sublimat: 15 dpm/mg <sup>3</sup>H.

c) *Nach Einbau von (3R)-[(2R)-2-<sup>3</sup>H]/(3S)-[(2S)-2-<sup>3</sup>H]-Mevalonat:*

Verrucarín A (1) der durchschnittlichen Aktivität von 287 dpm/mg <sup>3</sup>H.

Verrucarol (4), aus Aceton/Äther umkristallisiert und 14 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet, Smp. 157-160°: 4. Kristallisat: 370 dpm/mg <sup>3</sup>H; 5. Kristallisat: 330 dpm/mg <sup>3</sup>H; 6. Kristallisat: 360 dpm/mg <sup>3</sup>H.

Verrucarinolacton, Smp. 103-104°: 1. Sublimat: 498 dpm/mg <sup>3</sup>H; 2. Sublimat: 458 dpm/mg <sup>3</sup>H.

d) *Nach Einbau von (3R)-[5-<sup>14</sup>C]-Mevalonat:*

Verrucarín A (1) der durchschnittlichen Aktivität von 62 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Verrucarol (4), aus Aceton/Äther umkristallisiert und 1 Std. bei 70° und 0,01 Torr getrocknet, Smp. 162-163°: 2. Kristallisat: 81 dpm/mg <sup>14</sup>C; 3. Kristallisat: 80 dpm/mg <sup>14</sup>C; 4. Kristallisat: 81 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Verrucarinolacton, aus Äther umkristallisiert und 4 Std. bei 22° und 0,01 Torr getrocknet, Smp. 103-104°: 1. Kristallisat: 61 dpm/mg <sup>14</sup>C; 2. Kristallisat: 62 dpm/mg <sup>14</sup>C; 3. Kristallisat: 62 dpm/mg <sup>14</sup>C.

e) *Nach Einbau von [2-<sup>3</sup>H, 2-<sup>14</sup>C]-Mevalonat:*

Roridin A (2) der mittleren Aktivität von 13700 dpm/mg <sup>3</sup>H und 2300 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Verrucarol (4), aus Methylenchlorid/Äther umkristallisiert und 5 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet, Smp. 163-164°: 1. Kristallisat: 18490 dpm/mg <sup>3</sup>H, 2510 dpm/mg <sup>14</sup>C; 2. Kristallisat: 18130 dpm/mg <sup>3</sup>H, 2430 dpm/mg <sup>14</sup>C; 3. Kristallisat: 17690 dpm/mg <sup>3</sup>H, 2440 dpm/mg <sup>14</sup>C.

Tetrahydrororidinsäure-dimethylester, 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. Oxydation von Verrucarol (4) zum Ketoaldehyd 3.** - a) *Nach Einbau von (3R)-[(2S)-2-<sup>3</sup>H]/(3S)-[(2R)-2-<sup>3</sup>H]-Mevalonat.* 101 mg 4 der durchschnittlichen Aktivität von 1390 dpm/mg <sup>3</sup>H wurde nach *Gutzwiller et al.* [15] mit 0,23 ml CrO<sub>3</sub>-Reagens (8N)<sup>6</sup> in Aceton oxydiert. Nach üblichem Aufarbeiten mit Äther resultierten 93 mg roher Ketoaldehyd 3, der aus Äther/Petroläther kristallisierte und noch 4mal umkristallisiert wurde. Nach DC. (Fließmittel:

<sup>6</sup>) Stammlösung: 2,67 g CrO<sub>3</sub> + 2,5 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O ad 10 ml.

Methylenchlorid mit 5% Methanol) waren die letzten Kristallisate rein und identisch mit authentischem Material. 4. Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet: 3. Kristallisat: Smp. 161–171°, 832 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 4. Kristallisat: Smp. 162–172°, 851 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 5. Kristallisat: Smp. 162–172°, 834 dpm/mg  $^3\text{H}$ .

b) *Nach Einbau von (3R)-[(2R)-2- $^3\text{H}$ ]/(3S)-[(2S)-2- $^3\text{H}$ ]-Mevalonat.* Behandlung von 110 mg Verrucarol (4) der durchschnittlichen Aktivität von 367 dpm/mg  $^3\text{H}$  analog zu 3.2.a) ergab nach Kristallisation des Rohprodukts (94 mg) aus Äther/Petroläther 61 mg Ketoaldehyd 3 vom Smp. 161–172°. 3 wurde noch 3mal umkristallisiert; nach DC. waren die letzten drei Kristallisate rein und identisch mit authentischem Material. - Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde 4 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet: 2. Kristallisat: Smp. 161–170°, 396 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 3. Kristallisat: Smp. 162–171°, 392 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 4. Kristallisat: Smp. 162–173°, 392 dpm/mg  $^3\text{H}$ .

c) *Nach Einbau von [2- $^3\text{H}$ , 2- $^{14}\text{C}$ ]-Mevalonat (Verrucarol (4) aus Verrucaridin A (1)).* Behandlung von 55 mg Verrucarol der durchschnittlichen Aktivität von 36500 dpm/mg  $^3\text{H}$  und 4800 dpm/mg  $^{14}\text{C}$  analog zu Versuch 3.2.a) ergab nach Kristallisation des Rohprodukts (35 mg) aus Äther/Petroläther 19 mg Ketoaldehyd 3 vom Smp. 163–171°. - Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde noch 3mal sukzessive kristallisiert und 5 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet: 2. Kristallisat: Smp. 163–171°, 32300 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4790 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 3. Kristallisat: Smp. 163–171°, 31700 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4700 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 4. Kristallisat: Smp. 163–173°, 32200 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4700 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

d) *Nach Einbau von [2- $^3\text{H}$ , 2- $^{14}\text{C}$ ]-Mevalonat (Verrucarol (4) aus Roridin A (2)).* Behandlung von 51 mg Verrucarol der durchschnittlichen Aktivität von 18100 dpm/mg  $^3\text{H}$  und 2400 dpm/mg  $^{14}\text{C}$  analog zu Versuch 3.2.a) ergab 48 mg Rohprodukt. Nach Reinigung mittels präp. DC. resultierten 25 mg kristalliner Ketoaldehyd 3. - Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde noch 3mal aus Äther kristallisiert und während 5 Std. bei 50° und 0,01 Torr getrocknet: 1. Kristallisat: Smp. 166–169°, 14830 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2480 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 2. Kristallisat: Smp. 168–171°, 14860 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2500 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 3. Kristallisat: Smp. 168–171°, 14810 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2500 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

**3.3. Umsetzung von Verrucarol (4) (nach Einbau von [2- $^3\text{H}$ , 2- $^{14}\text{C}$ ]-Mevalonat) mit *m*-Chlorperbenzoesäure und Oxydation zum Diketon 14.** - 3.3.1. *Mit Verrucarol (4) aus Roridin A (2).* Eine Lösung von 95 mg 4 der durchschnittlichen Aktivität von 18100 dpm/mg  $^3\text{H}$  und 2450 dpm/mg  $^{14}\text{C}$  in 4 ml Chloroform wurde mit einer Lösung von 337 mg *m*-Chlorperbenzoesäure in 4 ml Äther bei 0° vereinigt und 68 Std. bei 22° stehengelassen. Nach Zugabe von ges. NaCl-Lösung, welche  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und KJ gelöst enthielt, wurde 3mal mit Methylenchlorid extrahiert, mit ges. NaCl-Lösung neutralgewaschen und mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Rohprodukt (101 mg) wurde in 20 ml Aceton bei 0° mit 0,3 ml  $\text{CrO}_3$ -Reagens (8N)<sup>6</sup> oxydiert. Nach Zugabe von 10 ml Wasser und 1 ml Methanol wurde das Aceton im Vakuum entfernt. Nach üblichem Aufarbeiten mit Methylenchlorid/Äther 82 mg Rohprodukt, welches durch Kristallisation aus Methylenchlorid/Äther 36 mg krist. Diketon 14 lieferte. - Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde noch 6mal kristallisiert und während 5 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet; Smp. 243–246°: 4. Kristallisat: 14280 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2330 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 5. Kristallisat: 14390 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2340 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 6. Kristallisat: 14480 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2380 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

3.3.2. *Mit Verrucarol (4) aus Verrucaridin A (1).* Behandlung von 95 mg 4 der mittleren Aktivität von 36500 dpm/mg  $^3\text{H}$  und 4800 dpm/mg  $^{14}\text{C}$  analog Versuch 3.3.1. ergab nach Kristallisation des Rohprodukts (84 mg) aus Methylenchlorid/Äther 42 mg Diketon 14, welches für die Radioaktivitätsbestimmung noch 3mal kristallisiert und während 15 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet wurde: 2. Kristallisat: Smp. 220–242°, 28100 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4570 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 3. Kristallisat: Smp. 241–246°, 27700 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4470 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 4. Kristallisat: Smp. 244–246°, 27200 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 4890 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

**3.4. Oxydation von Verrucarol (4) (nach Einbau von [2- $^3\text{H}$ , 2- $^{14}\text{C}$ ]-Mevalonat) mit  $\text{SeO}_2$**  - 3.4.1. *Mit Verrucarol (4) aus Roridin A (2).* 200 mg Verrucarol 4 wurden nach Gutzwiller et al. [15] mit Acetanhydrid und Pyridin acetyliert. Das resultierende *Di-O-Acetylverrucarol* (5) wurde in 25 ml abs. Dioxan bei 80° mit 110 mg  $\text{SeO}_2$  (sublimiert) versetzt. Nach 15 Min. trat intensive Gelbfärbung ein; nach 90 Min. war alles  $\text{SeO}_2$  in Lösung gegangen; 10 Std. nach Reaktionsbeginn hatte sich schwarzes Selen ausgeschieden; hierauf wurde das Dioxan ab-

gedampft, 2mal Aceton zugegeben und im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschliessend bei 0° in Aceton mit 0,3 ml CrO<sub>3</sub>-Lösung (8N)<sup>6)</sup> nachoxydiert. Nach Zugabe von 25 ml H<sub>2</sub>O und 1 ml Methanol wurde das Aceton im Vakuum entfernt. Nach üblichem Aufarbeiten mit Methylenchlorid resultierten 200 mg Rohprodukt, welches nach DC. uneinheitlich war. Durch Chromatographie an 4 g Kieselgel mit Methylenchlorid, dessen Polarität kontinuierlich durch Zusatz von Methanol gesteigert wurde, konnte aus den mit Methylenchlorid eluierten Fraktionen, die bis 2% Methanol enthielten, 129 mg Material isoliert werden, welches im DC. (Fließmittel: Äther) vier sichtbare Flecke gab. Die Substanzen waren im DC. sowohl nach Besprühen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung<sup>7)</sup> als auch im UV. (254 nm) sichtbar. 72 mg dieses Rohprodukts wurden mittels präp. DC. (20 × 20 cm Platte) in Äther/Petroläther 4:1 in fünf verschiedene Zonen aufgetrennt. Die polarste Zone war mit J<sub>2</sub> sichtbar und ergab 2 mg Substanz. Zone 2 (18 mg) reagierte stark mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung und absorbierte UV.-Licht. Zone 3 (31 mg) reagierte schwach mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung und absorbierte ebenfalls UV.-Licht. Zone 4 (10 mg) und Zone 5 (0,3 mg) absorbierten schwach im UV.-Licht. Zonen 2 und 3 waren nach DC. nicht einheitlich, sondern bestanden aus zwei sehr nahe beieinanderliegenden Flecken, wovon der eine mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung<sup>7)</sup>, der andere im UV. sichtbar war. Aus 129 mg Rohprodukt der SeO<sub>2</sub>-Oxydation konnten mittels präp. DC. 25 mg 16-Oxo-Derivat **8** und 50 mg 8-Oxo-Derivat **7** isoliert werden.

An 60 g Kieselgel, welches mit 6 g AgNO<sub>3</sub> in 6 ml H<sub>2</sub>O imprägniert war, wurde Zone 2 (35 mg) mit Äther/Petroläther 4:1 chromatographiert. Von den 8 Fraktionen lieferten die Fraktionen 6 und 7 spontan aus Methylenchlorid/Petroläther 14 mg einheitliches kristallines *Di-O-acetyl-16-oxo-verrucarol* (**8**). Schmelzintervall 170–195°.  $[\alpha]_D^{25} = -47 \pm 1^\circ$  ( $c = 0,085$ , Chloroform). – IR. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50 mg/ml): u.a. Banden bei 2830 (CHO), 2740 (CHO), 1735, 1690, 1370, 1225, 1080, 1030, 980 cm<sup>-1</sup>. – UV.- (Äthanol), Absorptionsmaxima in nm (log  $\epsilon$ ): 222 (4,120), 322 (1,48). – NMR.-Spektrum: vgl. Tab. 2. – MS.: Molekül-Ion bei  $m/e = 364$ . – Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde nochmals 3mal sukzessive kristallisiert und während 5 Std. bei 50° und 0,01 Torr getrocknet; Smp. 197–200°: 2. Kristallisat: 21 810 dpm/mg <sup>3</sup>H, 1740 dpm/mg <sup>14</sup>C; 3. Kristallisat: 22 710 dpm/mg <sup>3</sup>H, 1790 dpm/mg <sup>14</sup>C; 4. Kristallisat: 22 640 dpm/mg <sup>3</sup>H, 1780 dpm/mg <sup>14</sup>C.

50 mg Material aus Zone 3 wurden 2mal an 60 g Kieselgel, welches mit 6 g AgNO<sub>3</sub> in 6 ml H<sub>2</sub>O imprägniert war, mit Äther/Petroläther 3:1 chromatographiert. Es resultierten 38 mg *Di-O-acetyl-8-oxo-verrucarol* (**7**), welches nach DC. in vier verschiedenen Fließmittelsystemen einheitlich war, jedoch nicht kristallisierte. – IR. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): u.a. Banden bei 1740, 1680, 1370, 1230, 1080, 1040, 970 cm<sup>-1</sup>. – NMR.: vgl. Tab. 2.

**3.4.2. Mit Verrucarol (4) aus Verrucarol A (1).** 127 mg **4** der mittleren Aktivität von 36 500 dpm/mg <sup>3</sup>H und 4800 dpm/mg <sup>14</sup>C wurden mit Acetanhydrid und Pyridin wie üblich acetyliert und das resultierende *Di-O-acetyl-verrucarol* (**5**) analog zu Versuch 3.4.1. in Dioxan mit SeO<sub>2</sub> oxydiert. Nach Nachoxydation mit CrO<sub>3</sub>-Reagens (8N)<sup>6)</sup> und Chromatographie an 3 g Kieselgel resultierten 70 mg Rohprodukt. In Abänderung der Vorschrift von Versuch 3.4.1. wurde das Rohprodukt in 3 ml Äthanol gelöst und mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung<sup>7)</sup> im Überschuss versetzt. Nach üblichem Aufarbeiten mit Methylenchlorid resultierten 93 mg *Hydrason* **9**. Durch präp. DC. an zwei 20 × 20 cm Platten mit Methylenchlorid konnte die sehr polare Substanz, die praktisch am Start zurückblieb, von allen unpolaren Verunreinigungen befreit werden. Es resultierten 53 mg einheitliche krist. Substanz **9**, welche für die Radioaktivitätsbestimmung noch 4mal aus Methylenchlorid/Methanol kristallisiert wurde. 3 Std. bei 80° und 0,05 Torr getrocknet; Smp. 154–157°: 2. Kristallisat: 26 250 dpm/mg <sup>3</sup>H, 2390 dpm/mg <sup>14</sup>C; 3. Kristallisat: 26 640 dpm/mg <sup>3</sup>H, 2440 dpm/mg <sup>14</sup>C; 4. Kristallisat: 26 940 dpm/mg <sup>3</sup>H, 2320 dpm/mg <sup>14</sup>C.

**3.5. Hydrolyse von Di-O-acetyl-16-oxo-verrucarol (8).** – Eine Lösung von 4,4 mg **8** in 0,5 ml Methanol wurde mit 0,5 ml 2N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung 5 Std. bei 60° gehalten. Nach Abdampfen des Methanols im Vakuum resultierten nach üblichem Aufarbeiten mit Methylenchlorid 3,2 mg Rohprodukt, welches nach DC. (Fließmittel: Methylenchlorid mit 10% Methanol) noch verunreinigt war. Reinigung durch präp. DC. ergab 2,1 mg *16-Oxo-verrucarol* (**12**) vom Smp. 204–207°, welches nach Misch-Smp. verschieden von 8-Oxo-verrucarol (**11**) war. – IR.-Spektrum (KBr): u.a. Banden bei 3400 (–OH, breit), 2840 (CHO), 2740 (CHO), 1680 ( $\alpha, \beta$ -unges. CHO),

<sup>7)</sup> Reagens: 3 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 15 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 20 ml H<sub>2</sub>O + 17 ml Äthanol.

1080, 1050, 1020, 950  $\text{cm}^{-1}$ . - Die Radioaktivitätsbestimmung ergab ein Verhältnis von  $^3\text{H}$ : $^{14}\text{C}$  = 12,56. Einzelwerte<sup>9)</sup>: 20770 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 1650 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

**3.6. Hydrolyse des 2,4-Dinitrophenylhydrazons 9 von Di-O-acetyl-16-oxo-verrucarol (8).** - 3 mg 9 wurden in 0,5 ml Aceton/Methanol 1:1 mit 0,5 ml 2N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  12 Std. bei 22° hydrolysiert. Nach Erwärmen auf 60° während 1 Std. wurde nach üblicher Art mit Methylenchlorid aufgearbeitet. Das Rohprodukt (2,1 mg) wurde mittels präp. DC. gereinigt. Es resultierten 1,7 mg einheitliches 2,4-Dinitrophenylhydrazon 13 von 16-Oxo-verrucarol (12). - IR. (KBr): u. a. Banden bei 3450 ( $-\text{OH}$ , breit), 3290 ( $-\text{NH}$ , schwach), 2855, 1610, 1510 ( $-\text{NO}_2$ ), 1335 ( $-\text{NO}_2$ ), 1130, 1080, 960  $\text{cm}^{-1}$ . - Die Radioaktivitätsbestimmung ergab ein Verhältnis von  $^3\text{H}$ : $^{14}\text{C}$  = 12,10. Einzelwerte<sup>9)</sup>: 13929 dpm/mg  $^3\text{H}$ ; 1151 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

**3.7. Hydrolyse von Di-O-acetyl-8-oxo-verrucarol (7).** - Eine Lösung von 38 mg 7 in 2 ml Methanol wurde bei 22° mit 0,5 ml 2N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung 15 Std. stehengelassen. Nach Entfernen des Methanols im Vakuum und üblichem Aufarbeiten mit Methylenchlorid resultierten 23 mg rohes 8-Oxo-verrucarol (11), welches durch Kristallisation aus Methylenchlorid/Petroläther 11 mg Nadeln vom Smp. 202-206° ergab.  $[\alpha]_D^{25} = +7^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 0,988$ , Chloroform). - IR. ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 10 mg/ml): u. a. Banden bei 3450 ( $-\text{OH}$ ), 1680 ( $\alpha, \beta$ -unges.  $\text{C}=\text{O}$ ), 1080, 970  $\text{cm}^{-1}$ . - UV. (Äthanol) Absorptionsmaxima in nm ( $\log \epsilon$ ): 224 (3,839), 317 (1,55). - NMR.: vgl. Tab. 2. - MS.: Molekel-Ion bei  $m/e = 280$ . - Für die Radioaktivitätsbestimmung wurden vier sukzessive Kristallisate hergestellt und während 8 Std. bei 60° und 0,01 Torr getrocknet; Smp. 206-208°: 2. Kristallisat: 10390 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2270 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 3. Kristallisat: 10250 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2270 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ ; 4. Kristallisat: 10500 dpm/mg  $^3\text{H}$ , 2270 dpm/mg  $^{14}\text{C}$ .

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 28. Mitt.: B. Müller, R. Achini & Ch. Tamm, *Helv.* 58, 453 (1975).
- [2] E. R. H. Jones & G. Lowe, *J. chem. Soc.* 1960, 3959.
- [3] R. Evans, J. R. Hanson & T. Marten, *J. chem. Soc., Perkin I*, 1974, 857.
- [4] J. R. Hanson, T. Marten & M. Sivers, *J. chem. Soc., Perkin I*, 1974, 1033.
- [5] B. Achilladelis, P. M. Adams & J. R. Hanson, *Chem. Commun.* 1970, 511.
- [6] W. O. Godtfredsen, J. F. Grove & Ch. Tamm, *Helv.* 50, 1666 (1967).
- [7] R. Evans, A. M. Holtom & J. R. Hanson, *J. chem. Soc., Chem. Commun.* 1973, 465.
- [8] Y. Machida & S. Nozoe, *Tetrahedron Letters* 1972, 1969.
- [9] D. Arigoni, D. E. Cane, B. Müller & Ch. Tamm, *Helv.* 56, 2946 (1973).
- [10] Vgl. Ch. Tamm, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 31, 63 (1974).
- [11] R. Achini, B. Müller & Ch. Tamm, *Chem. Commun.* 1971, 404.
- [12] Ch. Tamm, XXIIIrd Int. Congr. pure appl. Chemistry, Special Lectures, Vol. 5, 49 (1971).
- [13] R. Achini, B. Müller & Ch. Tamm, *Helv.* 57, 1442 (1974).
- [14] M. Kořor & A. Siewinski, *Bull. Acad. polon. Sci., Ser. Sci. chim.* 14, 341 (1966).
- [15] J. Gutzwiller, R. Mauli, H. P. Sigg & Ch. Tamm, *Helv.* 47, 2234 (1964).
- [16] W. Zürcher, J. Gutzwiller & Ch. Tamm, *Helv.* 48, 840 (1965).
- [17] A. R. H. Smith, L. J. Good & T. W. Goodwin, *Chem. Commun.* 1968, 926.
- [18] P. M. Adams & J. R. Hanson, *Chem. Commun.* 1970, 1569.
- [19] P. M. Adams & J. R. Hanson, *Chem. Commun.* 1971, 1414.
- [20] B. Müller & Ch. Tamm, *Helv.* 58, 483 (1975).
- [21] J. Gutzwiller & Ch. Tamm, *Helv.* 48, 157 (1965).
- [22] B. Böhmer & Ch. Tamm, *Helv.* 49, 2527 (1966).

<sup>9)</sup> Infolge Materialmangels musste auf eine Kristallisation verzichtet werden.