

210. Zur Biosynthese der Rubratoxine

von Sirkku Nieminen, Trevor G. Payne, Peter Senn und Christoph Tamm¹⁾

Institut für Organische Chemie der Universität Basel, St. Johannis-Ring 19, CH-4056 Basel

(20. VIII. 81)

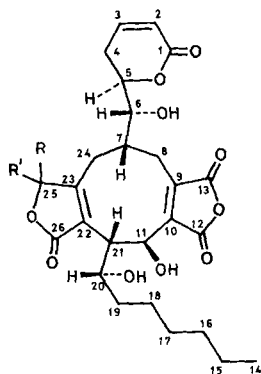
Biosynthesis of the Rubratoxins

Summary

In order to check the hypothesis that rubratoxin B (**2**), a C₂₆-metabolite, is formed biogenetically by head-to-tail coupling of two identical C₁₃-precursors derived from decanoic acid and oxaloacetic acid, two labelled forms of the postulated C₁₃-intermediate 2-((*E*)-1'-octenyl)-3-[¹⁴C]methyl- and 2-((*E*)-1'-octenyl)-3-[¹³C]-methylmaleic anhydride (**10**), were synthesized. The labelled compounds **10** as well as a number of other [¹⁴C]- and [¹³C]-labelled potential precursors were administered to growing cultures of *Penicillium rubrum* STOLL. Significant incorporation rates of acetate (as intact units) and malonate were observed. Propionate was incorporated after decarboxylation. Succinate exhibited the highest rate of incorporation. The results are in agreement with the assumption that the C₁₀-chain is formed by the fatty acid pathway and the C₃-unit *via* the tricarboxylic acid cycle. After administration of **10** randomization of the label was observed. Thus the question whether compound **10** is a biogenetic intermediate remains unanswered.

1. Einleitung. - Die Rubratoxine A (**1**) und B (**2**) sind sekundäre mikrobielle Stoffwechselprodukte, die erstmals aus Kulturen von *Penicillium rubrum* und *Penicillium purpurogenum* isoliert worden sind [1]. Schon vor *ca.* 30 Jahren wurde beobachtet, dass Futter, das diese Schimmelpilze befallen hatten, bei Haustieren Krankheitserscheinungen wie Blutungen und tödliche Störungen in der Zellentwicklung von Leber, Nieren und Milz verursachte [2]. In Anlehnung an die rot- bis gelbgefärbte Pigmente produzierenden Mikroorganismen wurden die aus dem Kulturfiltrat gewonnenen für diese Wirkungen verantwortlichen farblosen, kristallinen Verbindungen Rubratoxine genannt. Während Rubratoxin B (**2**) der Hauptmetabolit ist, kann Rubratoxin A (**1**) nur in geringen Mengen aus Kulturen gewisser Stämme isoliert werden. Ihr Wirkungsmechanismus ist bis heute noch nicht aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass Rubratoxin B (**2**) gewisse Enzyme hemmt und mutagene sowie teratogene Eigenschaften besitzt, was häufig bei Verbindungen mit α, β -ungesättigten Lactongruppierungen angetroffen wird [3].

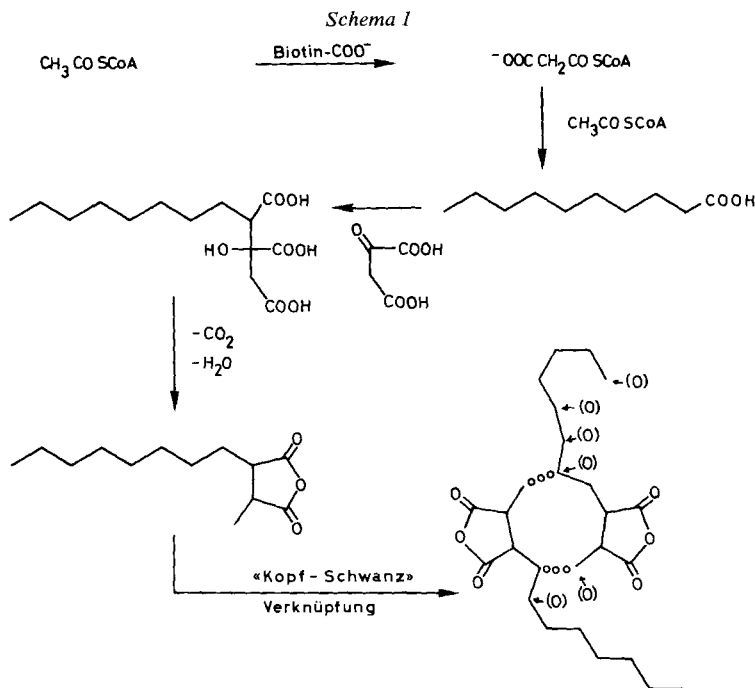
¹⁾ Korrespondenz-Autor.



- 1 (R=H; R'=OH) Rubratoxin A
- 2 (R,R'=O) Rubratoxin B

Die Konstitution von Rubratoxin B (2), einem Vertreter der kleinen Familie der Nonadride [4], ist mit Hilfe spektroanalytischer Methoden und durch eine Röntgenstruktur-Analyse aufgeklärt worden [5]. Die Nonadride sind durch einen alicyclischen neungliedrigen Ring mit zwei anellierten Fünfring-Anhydrid-Gruppen charakterisiert.

Eine Hypothese zur Biosynthese der Rubratoxine hat Moss 1971 aufgestellt, nach der sich das Grundgerüst durch «Kopf-Schwanz»-Verknüpfung von zwei identischen C₁₃-Einheiten bildet (vgl. *Schema 1*) [1]. Die zusätzlichen Sauerstoff-



Funktionen treten vermutlich in späteren Biosynthese-Stadien ein. Die Vorstufe der C_{13} -Verbindung ist ein Zitronensäure-Derivat, das durch Kondensation von Oxal-essigsäure mit einer aus Acetat- bzw. Malonat-Einheiten stammenden Decansäure gebildet wird. Diese Annahme ist berechtigt, denn sowohl der Fettsäureweg als auch der Tricarbonsäurezyklus spielen in der Biosynthese zahlreicher Naturstoffe eine wichtige Rolle [6].

Zur Überprüfung des vorgeschlagenen Biosyntheseablaufs der Rubratoxine haben wir eine Reihe potentieller biogenetischer Vorläufer in [^{14}C]- und [^{13}C]-markierter Form zu wachsenden Kulturen von *Penicillium rubrum* STOLL gegeben, das gebildete Rubratoxin B (2) isoliert und den Einbau der verabreichten Verbindungen untersucht.

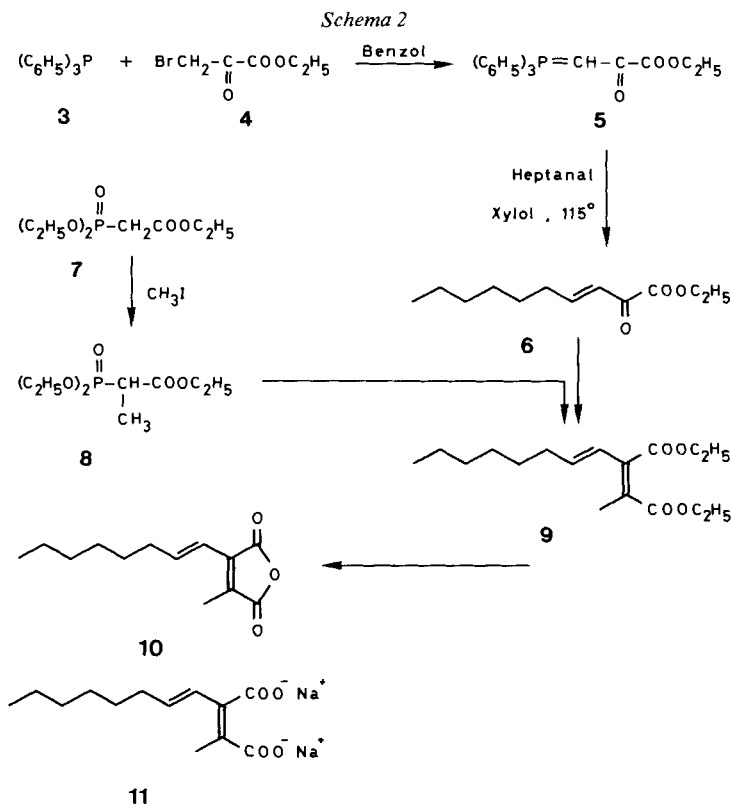
2. Synthese von 2-((E)-1'-Octenyl)-3-methyl-maleinsäureanhydrid (10). - Das postulierte biogenetische Zwischenprodukt, 2-((E)-1'-Octenyl)-3-methyl-maleinsäureanhydrid (10), wurde sowohl mit einer [^{14}C]- als auch einer [^{13}C]-Markierung der Methylgruppe in 3-Stellung hergestellt. Falls die Hypothese der «Kopf-Schwanz»-Kondensation von zwei disubstituierten Maleinsäureanhydrid-Einheiten stimmt, sollte im isolierten Rubratoxin B (2) die Markierung an C (11) und C (24) gefunden werden.

Zur Synthese von 10 (vgl. Schema 2) wurde 2-Oxo-3-decensäureäthylester (6) mit 2-Diäthoxyphosphono-propionsäureäthylester (8) nach *Wadsworth-Emmons* umgesetzt und der erhaltene disubstituierte Maleinsäurediäthylester 9 durch Baseneinwirkung in das gewünschte Anhydrid 10 übergeführt (vgl. [7]). Der Phosphonopropionsäureester 8 ist durch eine modifizierte *Michaelis-Arbuzov*-Reaktion aus 2-Diäthoxyphosphono-essigsäureäthylester (7) mit Methyljodid, welches eine [^{14}C]- oder [^{13}C]-Markierung trägt, leicht zugänglich [8].

Die zur oben erwähnten Kondensation benötigte zweite Komponente, der α -Ketoester 6, kann ausgehend von 1-Bromoctan und Oxalsäurediäthylester in sechs Reaktionsschritten nach [9] hergestellt werden. Um den Syntheseweg zu verkürzen, wurde der Ketoester 6 auch durch Kondensation von Heptanal mit dem Phosphoran 5, das sich aus Triphenylphosphin (3) und Brombrenztraubensäureäthylester (4) in guten Ausbeuten synthetisieren lässt [10], bereitet.

3. Kulturversuche. - Die Züchtung des Mikroorganismus *Penicillium rubrum* STOLL MR 043/OB6 CMI-Nr. 129 718²⁾ erfolgte in 1-l-Erlenmeyerkolben auf einem mit Malzextrakt angereicherten *Raulin-Thom*-Medium. Die Bildung von Rubratoxin B (2) beginnt kurz nach dem Animpfen und steigt stetig bis zum 20. Wachstumstag an. Es erwies sich als günstig, die Vorläufer jeweils vor dem steilen Anstieg, d.h. ca. am 5. Wachstumstag, zuzugeben. Zu diesem Zeitpunkt sind die zur Toxinbildung nötigen Nahrungsreserven noch vorhanden. Im Falle des C_{13} -Vorläufers 10 wurde zusätzlich eine Pulsfütterung durchgeführt, weil diese Verbindung sehr instabil ist und vermutlich Mühe hat, die lipidhaltige Zellwand zu passieren. Nach 20-tägiger Inkubation in totaler Dunkelheit bei Raumtemperatur wurde das von den Pilzzellen ausgeschiedene Stoffwechselprodukt aus dem Medium mit

²⁾ An dieser Stelle danken wir Herrn Dr. M. O. Moss, University of Surrey, Guildford, England, für die Überlassung einer Schräg-Agarkultur von *Penicillium rubrum* und einer Referenzprobe von Rubratoxin B. CMI bedeutet *Commonwealth Mycological Institute*, Kew, Surrey, England.



Äther extrahiert und für weitere Untersuchungen aus Aceton/Äther oder Benzol/Essigester gereinigt.

4. Einbauversuche mit ^{14}C -markierten Vorläufern. - Als biogenetische Vorläufer wurden folgende radioaktive Verbindungen eingesetzt: Natrium-[1- ^{14}C]acetat, Natrium-[2- ^{14}C]acetat, Natrium-[2- ^{14}C]malonat, Natrium-[1- ^{14}C]propionat, Natrium-[2- ^{14}C]propionat, Dinatrium-[2,3- ^{14}C]succinat, 2-((*E*)-1'-Octenyl)-3-[^{14}C]methyl-maleinsäurediäthylester (**9**), 2-((*E*)-1'-Octenyl)-3-[^{14}C]methyl-maleinsäureanhydrid (**10**), Dinatrium-2-((*E*)-1'-octenyl)-3-[^{14}C]methylmaleinat (**11**).

Die Inkorporationszeitpunkte, die Radioaktivitäten der Vorläufer, die Mengen des isolierten Rubratoxins B (**2**) und die Einbauraten der jeweiligen Ansätze sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.

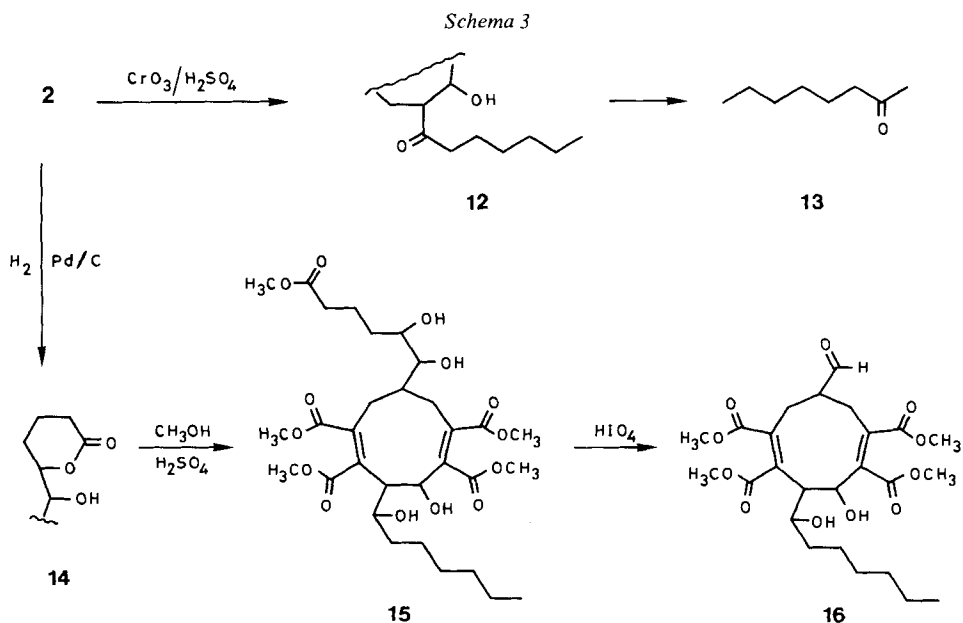
Ausser [1- ^{14}C]-Propionat wurden alle kleineren Vorläufermolekeln mit guten Einbauraten inkorporiert. Das Anhydrid **10** zeigte eine für einen relativ hochmolekularen Vorläufer gute Einbaurate. Das Dinatriumsalz von **11** wurde viel schlechter als das Anhydrid **10** und der Diäthylester **9** gar nicht eingebaut.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in den isolierten Rubratoxin B (**2**)-Präparaten wurde zunächst ein gezielter Abbau versucht. Es liess sich aber keine Reaktion finden, durch welche sich die C-Atome Nr. 11 und 24, in denen

Tabelle 1. Einbau von [^{14}C]-Vorläufern in Rubratoxin B (2)

Biogenetischer Vorläufer Bezeichnung	[^{14}C]-Aktivität		Rubratoxin B (2)		Einbaurate (%)	
	Ge- samte in mCi	Spez. in mCi/ mmol	[^{14}C]-Aktivität dpm/mg	dpm/mmol	Abs.	Spez.
Natrium-[1- ^{14}C]acetat	0,13	20,5	12800	$6,63 \cdot 10^7$	1,21	$1,46 \cdot 10^{-2}$
Natrium-[2- ^{14}C]acetat	0,17	20,5	24300	$1,26 \cdot 10^8$	2,44	$2,77 \cdot 10^{-2}$
Natrium-[2- ^{14}C]malonat	0,10	6,3	11913	$6,17 \cdot 10^6$	2,12	$4,45 \cdot 10^{-2}$
Natrium-[1- ^{14}C]propionat	0,10	50	950	$4,92 \cdot 10^5$	0,61	$0,04 \cdot 10^{-2}$
Natrium-[2- ^{14}C]propionat	0,10	15,6	15293	$7,92 \cdot 10^6$	2,90	$2,32 \cdot 10^{-2}$
Dinatrium-[2,3- ^{14}C]succinat	0,10	17,5	19300	$1,00 \cdot 10^8$	3,83	$2,57 \cdot 10^{-2}$
[3- $^{14}\text{CH}_3$]-2-((<i>E</i>)-1'-Octenyl)-3-methyl-maleinsäurediäthylester (9)	0,019		26,6	$1,38 \cdot 10^4$	0	0
[3- $^{14}\text{CH}_3$]-2-((<i>E</i>)-1'-Octenyl)-3-methyl-maleinsäureanhydrid (10)	0,024		2883	$1,49 \cdot 10^6$	3,56	1,78
Dinatrium-[3- $^{14}\text{CH}_3$]-2-((<i>E</i>)-1'-Octenyl)-3-methylmaleinat (11)	0,04		565	$2,93 \cdot 10^5$	0,48	0,37

die Radioaktivität der C_{13} -Vorläufer vermutet wurde, aus dem alicyclischen Neuring herauschälen. Es gelang jedoch, das Stück der Seitenkette zwischen C(14) und C(21) als Hexylmethylketon (13) zu isolieren (vgl. *Schema 3*), indem Rubratoxin B (2) mit $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ in Aceton in 20-Dehydrorubratoxin B (12) übergeführt [11] und dieses 1 Std. auf 130° mit 4N NaOH (im Einschlussrohr) erhitzt wurde. Das Abbauprodukt 13 wurde als 2,4-Dinitrophenylhydrazon charakterisiert.



Wir versuchten auch, das tricyclische System ohne die Seitenketten zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde Rubratoxin B (**2**) durch katalytische Hydrierung in 2,3-Dihydrorubratoxin B (**14**) übergeführt und dieses nach *Anvers* [12] durch 12-stündiges Kochen mit Methanol/Schwefelsäure in den Pentamethylester **15** übergeführt. Die anschließende Behandlung mit Perjodat, die zu Rubratoxin-B-Aldehyd (**16**) hätte führen sollen, ergab nur Polymerisate.

Die Abbaureaktion zu **13** wurde an Rubratoxin-B-Präparaten vorgenommen, die nach Verabreichung von 2-((*E*)-1'-Octenyl)-3-[¹⁴C]methyl-maleinsäureanhydrid (**10**) und Natrium-[2-¹⁴C]malonat erhalten worden waren. Die Resultate der Radioaktivitätsbestimmungen [13] sind in *Tabelle 2* zusammengefasst. Wird der C₁₃-Vorläufer **10** unverändert eingebaut, so sollte in der Seitenkette, welche die C-Atome Nr. 14-21 umfasst, keine Radioaktivität vorhanden sein. Das Ergebnis deutet auf eine Verschmierung der Radioaktivität hin. Sie beträgt *ca.* 20%, was auf einen vollständigen Abbau von **10** zu Essigsäure deutet, die ihrerseits eingebaut wird.

Die Resultate des Abbaus des nach Verabreichung von [2-¹⁴C]Malonat erhaltenen Rubratoxins B entsprechen der erwarteten Radioaktivitätsverteilung eines unspezifischen Vorläufers. So wurden in der abgebauten Seitenkette nur 75% der Aktivität gefunden, wie sie für vier C₂-Einheiten zu erwarten ist, da das Atompaar C(14)-C(15) wahrscheinlich aus der Startereinheit Acetat stammt.

5. Einbauversuche mit [¹³C]-markierten Vorläufern. - Das Fehlen geeigneter Abbaureaktionen hatte es verunmöglicht, die Radioaktivitätsverteilung der in Rubratoxin B (**2**) eingebauten Vorläufer zu lokalisieren. Deshalb mussten die Einbauversuche mit [¹³C]-markierten Verbindungen wiederholt werden. Voraussetzung zur Lokalisierung der [¹³C]-Markierung ist ein vollständig interpretiertes ¹³C-NMR.-Spektrum des Rubratoxins B. Es gelang mit Hilfe von Doppelresonanzversuchen und der Spektren von Modellverbindungen, sämtliche Signale des FT-¹³C-NMR.-Spektrums zuzuordnen [14].

Die anschließenden Einbauversuche wurden mit Natrium-[1-¹³C]acetat, Natrium-[2-¹³C]acetat, Natrium-[2-¹³C]malonat, Natrium-[1,2-¹³C]acetat, Dinatrium-[2,3-¹³C]succinat (**17**) und 2-((*E*)-1'-Octenyl)-3-[¹³C]methyl-maleinsäureanhydrid (**10**) durchgeführt. Zur Sicherheit wurden die Spektren der erhaltenen [¹³C]-Rubra-

Tabelle 2. Verteilung der Radioaktivität in den Abbauprodukten von Rubratoxin B (**2**)

Vorläufer	Erfasste C-Atome (Nr.)	Radioaktivität			
		dpm/mg	dpm/mmol	% der Gesamt-radioaktivität	
[3- ¹⁴ CH ₃]-2-((<i>E</i>)-1'-Octenyl)-3-methyl-maleinsäureanhydrid (10)	Rubratoxin B (2)	1-26	2883	1,49 · 10 ⁶	100
	2,4-Dinitrophenylhydrazon von Hexylmethylketon (13)	14-21	265	8,16 · 10 ⁴	5,5
Natrium-[2- ¹⁴ C]malonat	Rubratoxin B (2)	1-26	11913	6,17 · 10 ⁶	100
	2,4-Dinitrophenylhydrazon von Hexylmethylketon (13)	14-21	3620	1,11 · 10 ⁶	18,0

Tabelle 3. Einbauversuche mit [^{13}C]-markierten Vorläufern^{a)}

Biogenetischer Vorläufer Bezeichnung	^{13}C -Gehalt %	Rubratoxin B (2)		
		^{13}C -Anreicherung %	Spezifische Einbauraten %	Verdünnung
Natrium-[1- ^{13}C]acetat	91,7	2,50	2,72	37
Natrium-[2- ^{13}C]acetat	91,3	4,50	4,72	20
Natrium-[2- ^{13}C]malonat	90,6	1,50	1,66	60
Natrium-[1,2- ^{13}C]acetat	91,7 (C(1)); 91,86 (C(2))	2,02	2,40	42
Dinatrium-[2,3- ^{13}C]succinat (17)	90,2 ^{b)}	0,61	0,68	147
2-((E)-1'-Octenyl)-3- ^{13}C]-methylmaleinsäureanhydrid (10)	90,0 ^{c)}	0,43	0,48	212

^{a)} Zugabe jeweils am 5. Wachstumstag. Im Falle von **10** wurde zusätzlich eine Pulsfütterung durchgeführt. ^{b)} [^{13}C]-Gehalt des [2,3- ^{13}C]Dibromäthans. ^{c)} [^{13}C]-Gehalt des $^{13}\text{CH}_3\text{I}$.

toxin-B-Präparate sowohl in D_8 -Dioxan als auch in D_6 -Aceton aufgenommen. Die Resultate sind in *Tabelle 3* zusammengefasst.

Bei Verabreichung von [1- ^{13}C]Acetat ist eine Erhöhung der Signale von 12 C-Atomen, nämlich von C(2), C(4), C(6), C(8), C(13), C(15), C(17), C(19), C(21), C(26), C(12) und C(25) festzustellen. Die übrigen 14 C-Atome in Rubratoxin B (2) werden mit einer aus [2- ^{13}C]Acetat stammenden [^{13}C]-Markierung angereichert. [2- ^{13}C]Malonat verursacht eine Signalerhöhung an den folgenden 10 C-Atomen: C(1), C(3), C(5), C(7), C(9), C(14), C(16), C(18), C(20) und C(22). Die Anreicherung an C(1) und C(14) bedeutet, dass Malonat zum Teil als Acetat eingebaut wird. Das Spektrum des mit 1,2- ^{13}C]-markiertem Acetat angereicherten Rubratoxins B (2) bestätigt den direkten Aufbau der C_{26} -Molekel aus insgesamt 12 Acetat-Einheiten, wobei jeweils zwei nebeneinanderliegende C-Atome je ein Linienpaar mit identischen Kopplungskonstanten (Angabe in Hz) bilden: $J(1,2)=66,6$; $J(3,4)=40,4$; $J(5,6)=43,3$; $J(7,8)=29$; $J(9,13)=60,1$; $J(14,15)=34,6$; $J(16,17)=34,6$; $J(18,19)=35,3$; $J(20,21)=36,8$; $J(22,26)=61,0$; $J(10,11)=61$ und $J(23,25)=61$. C(11) und C(24) sind C-Atome ohne Kopplungspartner.

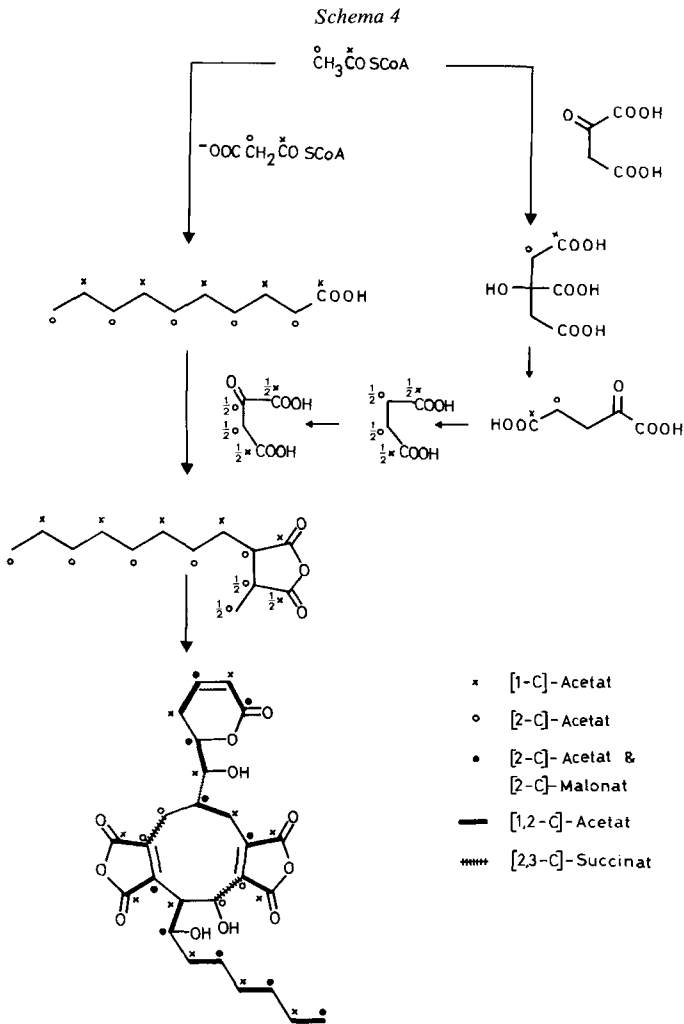
Zwei Atompaaire, nämlich C(10)/C(11) und C(23)/C(24) mit den C,C-Kopplungen von 46,3 und 53,0 tragen eine direkt aus [2,3- ^{13}C]Succinat stammende ^{13}C -Anreicherung.

Entgegen unserer Erwartung sind die Signale der C-Atome Nr. 11 und 24 nach Verabreichung von 2-((E)-1'-Octenyl)-3- ^{13}C]-methylmaleinsäureanhydrid (10) nicht signifikant erhöht. Die unregelmässige Intensitätsverteilung deutet auf eine Verschmierung der [^{13}C]-Markierung.

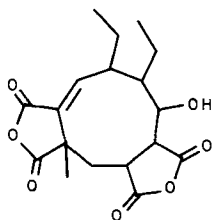
6. Diskussion der Resultate. - Die Einbauversuche mit [^{14}C]- und [^{13}C]-markiertem Acetat, Malonat, Propionat und Succinat zeigen, dass diese Verbindungen biogenetische Vorläufer von Rubratoxin B (2) sind. Die Einbauraten des [1- ^{14}C]- und [2- ^{14}C]Acetats (1,21 bzw. 2,44%) sowie die entsprechenden Werte des [^{13}C]-angereicherten Acetats (2,72 bzw. 4,72%) deuten auf einen Markierungsverlust durch Decarboxylierung hin. Dasselbe gilt für Propionat (die [^{14}C]-Einbauraten sind 0,61 und 2,90%); die Umwandlung zu Acetyl-Coenzym A erfolgt *via* Milch-

säure und Brenztraubensäure, wobei die Carboxylgruppe verloren geht. Malonat wurde nur als [2-¹³C]-markierte Form eingesetzt, da die Carboxylgruppe im Verlaufe der Fettsäuresynthese abgespalten wird.

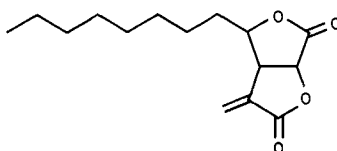
Die ¹³C-NMR.-Spektren der nach Einbau von 1-, 2- und doppelmarkiertem Acetat sowie [2-¹³C]Malonat isolierten Rubratoxin-B-Präparate stützen die aufgestellte Hypothese über die Biosynthese dieses Nonadrids. Die C₁₀-Kette wird aus Acetat- und Malonat-Einheiten (vgl. *Schema 4*) gebildet. Der Vorläufer der C₃-Kette, C(11)-C(10)-C(12) sowie C(24)-C(23)-C(25), ist eine C₄-Einheit, Oxallessigsäure, die im Zitronensäurezyklus durch Oxydation von Succinat gebildet wird. Die Einbaurrate von [2,3-¹⁴C₂]Succinat ist sehr gut (3,83%), sogar besser als diejenige der [¹⁴C]-markierten C₂- und C₃-Einheiten. Das Ergebnis des Einbau-



versuchs mit $[2,3-^{13}\text{C}_2]\text{Succinat}$ mit der Einbaurrate von 1,66% ist dagegen wenig signifikant. Trotzdem sind im ^{13}C -Spektrum des entsprechenden Rubratoxin-B-Präparats die Signale der C-Atome Nr. 10, 11, 23 und 24 erhöht. Die ^{13}C , ^{13}C -Kopplungen bestätigen den direkten Einbau dieser C_4 -Einheit. Ähnliche Verhältnisse liegen z.B. bei der Biosynthese von Glauconsäure (**18**) durch *Penicillium purpurogenum* [15] und von Avenaciolid (**19**) durch *Aspergillus avenaceus* vor [16].



18



19

Die C-Atome Nr. 10, 11, 23 und 24 können ausserdem aus der Methylgruppe des Acetats und Nr. 12 und 25 aus dessen Carboxylgruppe stammen. Da der Tricarbonsäurezyklus über das symmetrische Succinat abläuft, wird die Markierung verdünnt, so dass es verständlich ist, dass der Einbau in der C_3 -Kette jeweils geringer ist als in der C_{10} -Einheit. Die Einbaurate der $[^{13}\text{C}]$ -markierten Verbindungen **9**, **10** und **11** ist selbstverständlich dieselbe wie die der entsprechenden $[^{14}\text{C}]$ -Verbindungen.

Hier stellt sich die Frage nach der Permeabilität dieser Verbindung in der Zellmembran. Die Differenzen der Einbauraten könnten in der chemischen Zusammensetzung der Zellwände des Mikroorganismus liegen, die wegen des hohen Lipidanteils [17] für das lipophile Anhydrid **10** günstiger ist als für das Salz **11** oder den Ester **9**.

Aus der Radioaktivitätsverschmierung geht hervor, dass dennoch ein gewisser Abbau vom Anhydrid **10** zu kleineren Einheiten erfolgt ist. Wäre die C_{13} -Molekel nur als ganze Einheit eingebaut worden, so wäre keine Radioaktivität im Abbauprodukt **13**, das die C-Atome Nr. 14–21 umfasst, nachweisbar gewesen. Der Schluss, dass das postulierte biogenetische Zwischenprodukt 2-((*E*)-1'-Octenyl)-3-methyl-maleinsäureanhydrid (**10**) erst nach Abbau zu kleineren Bruchstücken inkorporiert wird, liess sich aus dem Versuch mit dem $[^{13}\text{C}]$ -markierten Präparat ziehen. Das ^{13}C -NMR.-Spektrum des isolierten Rubratoxins B (**2**) zeigt eine unregelmässige Verteilung der $[^{13}\text{C}]$ -Markierung. Wäre die C_{26} -Molekel durch «Kopfschwanz»-Verknüpfung von zwei C_{13} -Einheiten eingebaut worden, so hätte sich eine deutliche Erhöhung der Signale von C(11) und C(24) ergeben müssen.

Ob der Abbau und die Resynthese des Anhydrids **10** auf dessen Instabilität oder auf die lange Dauer des Einbauversuchs zurückzuführen ist, lässt sich aufgrund der bisher vorliegenden Resultate nicht entscheiden.

Wir danken dem «Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung» für die finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. - Die Schmelzpunkte wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt und sind korrigiert. Substanzproben für Spektren, Mikroanalysen und Radioaktivitätsbestimmungen wurden, sofern es sich um Feststoffe handelte, mindestens 2 Std. bei 0,02 Torr/25° getrocknet, während Flüssigkeiten durch Hochvakuumdestillation im Kugelrohr vom Wasser befreit wurden. - Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium des Instituts für Organische Chemie (*E. Thommen*) ausgeführt. - Die IR.- (Angaben in cm^{-1}) und 60 MHz- ^1H -NMR.-Spektren (Angaben in δ) wurden im Spektrallabor desselben Instituts (*K. Aegerter, E. Sendi, P. Jucker, K. Pfirter*) aufgenommen, und zwar die IR.-Spektren mit einem *Perkin-Elmer*-Gitterspektrophotometer, Modell 125 oder Modell 177 oder einem *Beckmann*-IR-8-Spektrophotometer, die 60-MHz- ^1H -NMR.-Spektren mit einem *Varian*-A60- oder *Varian* EM360-Spektrometer. Die 90-MHz- ^1H -NMR.- und 22,63 MHz- ^{13}C -NMR.-Spektren wurden mit einem *Bruker*-WH-90-Spektrometer mit *Fourier*-Transform (FT) im Spektrallaboratorium des Instituts (*K. Aegerter*) aufgenommen. Bei der Beschreibung der NMR.-Spektren bedeutet: *s*=Singulett, *d*=Dublett, *t*=Triplett, *qa*=Quartett, *m*=Multiplett, *br.*=breit, *J*(*a*,*b*)=Spin-Spin-Kopplungskonstante zwischen den Protonen an C(*a*) und C(*b*) bzw. den C-Atomen C(*a*) und C(*b*) in Hz, *gem*=geminal und *vic*=vicinal. Als interner Standard wurde ausnahmslos Tetramethylsilan (TMS) verwendet. Die Bestimmung der optischen Drehung wurde mit einem *Perkin-Elmer*-Polarimeter Modell 141 vorgenommen. Die Synthese von radioaktiv markierten Vorläufern wurde im Isotopenlabor der Biozentrums der Universität durchgeführt. Die Radioaktivitätsbestimmungen wurden im Isotopenlabor der *Sandoz AG.*, Basel, (*G. Marbach*) ausgeführt.

Zur Säulenchromatographie (SC.) nach der Durchlaufmethode diente «Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm)». Für die präp. Dünnschichtchromatographie (präp. DC.) wurde «Kieselgel 60 PF₂₅₄», für das Chromatotron (CT) «Kieselgel 60 GF 254 (10-40 μ . 13% Gips)» und für die Dünnschichtchromatographie (DC.) «Fertigplatten 60 F₂₅₄» verwendet. Die Adsorbentien wurden ausnahmslos von der Firma *E. Merck AG.*, Darmstadt, bezogen. Das Sichtbarmachen der Substanzen erfolgte bei der PDC und CT durch UV.-Licht und bei der DC. durch UV.-Licht, mit Jod-Dampf oder durch Besprühen mit gruppenspezifischen Reagentien.

Zur Trocknung der Substanzlösungen wurde wasserfreies Natriumsulfat, in einigen Fällen auch Magnesiumsulfat, verwendet. Eindampfen im Vakuum erfolgte, sofern nichts anderes vermerkt, im Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 35-50°.

2. Kulturversuche. - 2.1. *Nährmedien.* Mais-Medium, Fortpflanzungsmedium für Stammkulturen: 10 g Maiskörner (ganz oder geschrotet) in 8 ml dest. Wasser. Kulturmedium, *Raulin-Thom*-Medium (vereinfacht nach *Mosseray* [18]): 50 g Glucose, 400 mg Weinsäure, 250 mg MgCO_3 , 250 mg NH_4NO_3 , 400 mg K_2CO_3 , 400 mg $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 50 mg FeSO_4 , 50 mg ZnSO_4 und 25 g Malzextrakt (*Difco*) in 1 l dest. Wasser, pH 6,7.

Das Nährmedium wurde in Portionen von je 330 ml in 1-l-Erlenmeyerkolben, sofern nichts anderes vermerkt, verteilt. Alle für Kulturversuche verwendeten Medien wurden 40 Min. im Druckautoklaven sterilisiert.

2.2. *Impfung und Kultivierung.* Die Fortpflanzung von *Penicillium rubrum* STOLL erfolgte in 20 ml Reagenzgläsern oder 100-ml-Erlenmeyerkolben auf Mais-Stammkulturmedium. Die Sporen wurden unter kräftigem Schütteln mit 5-10 ml 0,01proz. wässriger Natriumlaurylsulfat-Lösung suspendiert und mit einer sterilen Spritze in Portionen von 1-2 ml zum Kulturmedium in den Erlenmeyerkolben gegeben und homogen verteilt. Die für die Einbauversuche benötigten Vorläufer wurden in Form von sterilisierten, wässrigen Lösungen mit Hilfe einer Injektionsspritze mit langer Kanüle unter den Mycelteppich in das Kulturmedium eingebracht. Die C₁₃-Vorläufer **9**, **10** und **11** wurden in Acetonlösung ohne vorherige Sterilisation zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 21 Tage bei 25° in totaler Dunkelheit.

2.3. *Isolierung von Rubratoxin B (2).* Nach der Inkubationsperiode wurde die Kulturbrühe durch Filtration vom Mycel und Schleimstoffen getrennt und mit konz. Salzsäure auf pH 1,5 angesäuert. Darauf wurde mit festem Natriumchlorid gesättigt und 3mal mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i.R.V. i.V. eingedampft. Die Reinigung des Rohtoxins erfolgte durch Umkristallisieren aus Aceton/Äther oder Benzol/Essigester. Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden jeweils drei Kristallisate gemacht. Im allgemeinen wurden pro 1 Medium 600-1200 mg Rohprodukt erhalten. Daraus liessen sich ca. 150-350 mg reines Rubratoxin B (**2**) in farblosen Kristallen gewinnen. Das so erhaltene Rubratoxin B (**2**) enthält 1 mol

Kristalläther [19], Smp. 166–168° (Zers.) ([1]: 168–170° (Zers.)), $[\alpha]_D^{20} = +68,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,01$ in Aceton) ([1]: $+67^\circ$ ($c = 2,0$ in Aceton)). - IR.-Spektrum (KBr): u.a. Banden bei 3520 (OH), 2940, 2860 (C–H), 1858, 1820, 1785, 1755 (Anhydrid, Lacton), 1705, 1690 (C=C), 925, 905, 820, 750 und 720. - $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum s. [14].

3. Herstellung von 2-((E)-1'-Octenyl)-3-methyl-maleinsäureanhydrid (10). - 3.1. *Herstellung von (Äthoxalylmethylidene)triphenylphosphoran (5).* Eine Lösung von 52,5 g (0,2 mol) Triphenylphosphin (3) in 150 ml Benzol wurde unter N_2 mit einer Lösung von 39 g (0,2 mol) Brombrenztraubensäureäthylester (4) in 60 ml Benzol versetzt. Bei der Zugabe stieg die Temperatur auf ca. 60° an. Gleichzeitig bildete sich am Boden des Gefässes ein gummiartiger gelber Niederschlag. Nach 5 Std. Weiterführen bei RT. wurde die benzolische Lösung abdekantiert. Das Salz wurde in 0,5M HCl gelöst und das Phosphoran 5 unter Zugabe von gesättigter NaHCO_3 -Lösung ausgefällt. Die dabei entstandenen gelben, grobkörnigen Kristalle wurden abfiltriert und durch mehrmaliges Nachspülen mit Wasser ausgewaschen. Nach Trocknen bei 25%/0,2 Torr über Nacht resultierten 67,7 g (0,18 mol) roher Ester 5 vom Smp. 185–186° ([10]: 187–188°), was einer Ausbeute von beinahe 90% entspricht. Zur weiteren Reinigung eignete sich Umkristallisieren des Rohprodukts aus Äthylacetat oder Dimethylformamid besonders gut. - IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): u.a. Banden bei 1725 und 1710 (Ester-C=O); 1575 und 1560 (Keton-C=O). - $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (60 MHz, CDCl_3): 7,4–7,9 (*m*, 15 H, arom. H); 4,85 (*d*, $J = 23$, 1 H, P=CH–); 4,20 (*qa*, $J(\text{vic}) = 7$, 2 H, CH_2CH_3); 1,35 (*t*, $J(\text{vic}) = 7$, 3 H, CH_2CH_3).

3.2. *Herstellung von 2-Oxo-3-decensäureäthylester (6).* Zu einer Lösung von 2,25 g (5,98 mmol) 5 in 15 ml siedendem Xylol wurde unter N_2 2,0 g (17,5 mmol) Heptanal, welches mit 15 ml Xylol verdünnt war, langsam getropft. Das Gemisch wurde sodann 6 Std. bei 115° gerührt und anschliessend bei RT. über Nacht stehengelassen. Danach wurde das Xylol i.RV. i.HV. abdestilliert. Zum Entfernen des ausgefallenen Triphenylphosphinoxids wurde Hexan zugegeben und filtriert. Der feste Anteil wurde sorgfältig mit dem gleichen Lösungsmittel nachgewaschen. Eindampfen der Hexanlösung lieferte 1,38 g rotbraunes Öl, welches im Kugelrohrföfen i.HV. destilliert wurde. Es resultierten 0,58 g (2,73 mmol) reines Produkt 6 als grüngelbes Öl vom Sdp. 86°/0,05 Torr ([9]: 86–89°/0,05 Torr). Zur Entfernung eventueller Nebenprodukte wurde an einer Kieselgelsäule gereinigt (Fließmittel: Dichlormethan). - IR.-Spektrum (CCl_4): u.a. Banden bei 1730, 1705, 1680 (*a*-Ketoester); 1630 (C=C). - $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (90 MHz, CDCl_3): 7,14 und 6,58 (*AB*-System, $J_{AB} = 16$, $J' = 6,5$, $J'' = 2$, 2 H, *trans*-Vinyl); 4,33 (*qa*, $J = 7$, 2 H, CH_2CH_3); 2,24 (*m*, $J = 7$, 2 H, allyl. H); 1,34 (*m*, $J = 7$, 8 H, 4 CH_2); 1,31 (*t*, $J(\text{vic}) = 7$, CH_2CH_3); 0,86 (*t*, $J = 5,5$, 3 H, CH_3). - $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (22,63 MHz, CDCl_3): 182,6 (*s*, C(2)); 162,7 (*s*, C(1)); 154,7 (*d*, C(3)); 125,6 (*d*, C(4)); 62,2 (*t*, CH_2CH_3); 33,2 (*t*, C(5)); 31,6 (*t*, C(8)); 29,0 (*t*, C(7)); 28,0 (*t*, C(6)); 22,6 (*t*, C(9)); 14,0 (*qa*, C(10)); 14,0 (*qa*, CH_2CH_3).

2.4. *Daten des Dinitrophenylhydrazons von 6:* Smp. 88–90°.

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6$ (392) Ber. C 55,09 H 6,17 N 14,28% Gef. C 54,86 H 6,27 N 14,50%

3.3. *Herstellung von 2-Diäthoxyphosphono-propionsäureäthylester (8).* Die Lösung von 3,58 g (16,0 mmol) 2-Diäthoxyphosphono-essigsäureäthylester (7) in 7 ml abs. Äthanol wurde zu derjenigen von 0,37 g (16,1 mg Atom) Natrium in 13 ml abs. Äthanol gegeben und 60 Min. unter Rühren stehengelassen. Danach wurde mit 3,2 g (22,6 mmol) Methyljodid, bzw. [^{13}C]Methyljodid (^{13}C -Gehalt: 90%), versetzt und 4 Std. bei RT. gerührt. Das Gemisch wurde sodann in eine 5proz. NaCl-Lösung gegossen und 3mal mit Äther extrahiert. Die Ätherphasen ergaben nach Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen i.V. 4,5 g gelb gefärbtes Öl. Fraktionierende Destillation lieferte 3,3 g (13,9 mmol) farbloses Öl vom Sdp. 91–92°/0,9 Torr ([8]: 115–118°/4 Torr; [9]: 140–141°/15 Torr).

Herstellung von radioaktivem 2-Diäthoxyphosphono-propionsäureäthylester (8). Bei der Herstellung von radioaktiv markiertem 2-Diäthoxyphosphono-propionsäureäthylester (8) wurde zur Vermeidung von radioaktiver Kontamination durch [^{14}C]Methyljodid eine Hochvakuumlinie verwendet. Zuerst wurde das inaktive Methyljodid in die Ampullen mit radioaktivem Methyljodid umgefroren und anschliessend das verdünnte radioaktive $\text{CH}_3\text{I}/^{13}\text{CH}_3\text{I}$ -Gemisch in das Reaktionsgefäss mit der Verbindung 7 zugegeben. Nach der eigentlichen Reaktion erfolgte die Aufarbeitung wie beim inaktiven Produkt 8. - IR.-Spektrum (CCl_4): u.a. Banden bei 1740 (C=O); 1260 (P=O); 1165 und 1030 (P=O–C). - $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (90 MHz, CDCl_3): 4,21 (*m*, $J(\text{vic}) = 7$, 6 H, 3 CH_2CH_3); 3,02 (*m*, $J(\text{P}(\text{O})\text{CH}) = 22$, $J(\text{vic}) = 7$, 1 H, PCH–); 1,45 (*t*, $J(\text{vic}) = 7$, 3 H, CH_3); 1,38 (*m*, 9 H, 3 CH_2CH_3).

Daten des [^{13}C]-markierten 8. Signal bei 1,45 mit den [^{13}C]-Satelliten bei 2,18 und 0,72 ppm entspricht dem $^{13}\text{CH}_3$ ($J(\text{vic}) = 7$, $J(\text{P}(\text{O})\text{CH}) = 18$, $J(^{13}\text{CH}) = 131$).

3.4. *Herstellung von 2-((E)-1'-Octenyl)-3-methyl-maleinsäurediäthylester (9)*. Zu einer unter Ar bereiteten, auf -40° gekühlten Suspension von 0,6 g (12,6 mmol) 50proz. Natriumhydrid in 20 ml abs. Tetrahydrofuran wurde eine Lösung von 3,0 g (12,6 mmol) 2-Diäthoxyphosphono-propionsäure-äthylester (**8**) in 6 ml abs. Tetrahydrofuran langsam getropft. Das gelbliche Gemisch wurde danach unter stetigem Kühlen 60 Min. gerührt, bis keine Gasbildung mehr sichtbar war. Dazu wurde dann die Lösung von 2,8 g (13,2 mmol) 2-Oxo-3-decensäureäthylester (**6**) in 10 ml abs. Tetrahydrofuran so langsam gegeben, dass die Temperatur nie über 0° anstieg. Nach 90 Min. Weiterführen bei $0-4^{\circ}$ wurde das Gemisch langsam auf RT. erwärmt. Am nächsten Tag wurde mit 6 ml Eisessig angesäuert, mit Wasser versetzt und 3mal mit Äther extrahiert. Die Ätherphasen wurden mit ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i.V. eingedampft. Es resultierten 4 g Rohgemisch, welches sich durch Destillation im Kugelrohrföfen nicht vollständig reinigen liess. Durch präp. DC. (Benzol/Essigester 95:5) wurden aus 200 mg Rohprodukt nur 120 mg blassgelbes Öl gewonnen, welches neben der gesuchten Verbindung **9** vermutlich noch die entsprechende Säure enthielt.

Bessere Resultate ergab das Chromatotron; Eluierung mit Petroläther/Essigester 90:10, 80:20, 50:50 und Essigester lieferte, ausgehend von 500 mg Rohprodukt, 109 mg (0,37 mmol) reine Verbindung **9**. - Analoges Vorgehen mit der ^{13}C -markierten Verbindung **8** lieferte den ^{13}C -markierten Ester **9**.

Daten der (nichtmarkierten) Verbindung 9. - IR.-Spektrum (CCl_4): u. a. Banden bei 1720 ($\text{C}=\text{O}$), 1628 und 1600 ($\text{C}=\text{C}$, Dien). - ^1H -NMR.-Spektrum (90 MHz, CDCl_3): 6,37 und 5,98 (*AB*-System, $J_{AB}=15$, $J'=6,5$, $J''=2$, 2 H, *trans*-Vinyl); 4,26 (*qa*, $J(\text{vic})=7$, 4 H, 2 CH_2CH_3); 2,22 (*m*, $J=6,5$, 2 H, allyl. H); 2,00 (*s*, 3 $=\text{CH}-\text{CH}_3$); 1,34 (*m*, $J(\text{vic})=7$, 14 H, 2 CH_2CH_3 und 4 CH_2); 0,92 (*t*, $J(\text{vic})=5,5$, 3 H, CH_3). - ^{13}C -NMR.-Spektrum (22,63 MHz, CDCl_3): 168,8 (*s*, C(1)); 167,2 (*s*, C(4)); 141,3 (*s*, C(2)); 140,9 (*d*, C(1')); 124,5 (*s*, C(3)); 124,0 (*d*, C(2')); 61,0 (2 *t*, 2 CH_2CH_3); 33,6 (*t*, C(3')); 31,7 (*t*, C(6')); 28,8 (2 *t*, C(4') und C(5')); 22,6 (*t*, C(7')); 14,0 und 14,1 (3 *qa*, C(8') und 2 CH_2CH_3); 13,6 (*qa*, $=\text{CH}-\text{CH}_3$).

Daten der ^{13}C -markierten Verbindung 9. - ^1H -NMR.: Signal bei 2,00 ppm klein, ^{13}C -Satelliten bei 2,75 und 1,27; $J(^{13}\text{C}, \text{H})=133$. - ^{13}C -NMR.: Signal bei 13,6 ppm ^{13}C -angereichert. Die Carbonylsignale bei 168,8 und 167,2 ppm werden durch Fernkopplungen von 3 bzw. 5 Hz aufgespalten.

3.5. *Herstellung von 2-((E)-1'-Octenyl)-3-methylmaleinsäureanhydrid (10)*. Eine Lösung von 636 mg **9** in 50 ml abs. Äthanol wurde unter N_2 mit 25 ml 2N NaOH versetzt. Das zu Beginn trübe, gelb gefärbte Gemisch wurde 20 Std. bei RT. gerührt. Danach wurde es zu einer 2proz. Na_2SO_4 -Lösung gegossen und mit 2N HCl auf pH 2 bis 3 gestellt. Das organische Material wurde in Äther aufgenommen. Nach Waschen, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen i.V. wurden aus der Ätherphase 517 mg Rohprodukt erhalten. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe des Chromatotrons und anschliessend durch präp. DC. ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOH}$ 97:3). Es resultierten 180 mg (0,81 mmol) reines Anhydrid **10** als blassgelbes Öl. - IR. (CCl_4): u. a. Banden bei 1865*w*, 1820*m* (cyclisches Anhydrid); 1770*s*, α, β -unge-sättigtes Anhydrid; 1655*s*, 1615*w*, Dien; 1280*s* und 1140*m*, C-O. - ^1H -NMR. (90 MHz, CDCl_3): 7,14 und 6,27 (*AB*-System, $J_{AB}=16$, $J'=7$, $J''=2,5$, 2 H, *trans*-Vinyl); 2,35 (*m*, $J=7$, $J'=5$, 2 H, allyl. H); 2,10 (*s*, 3 H, $=\text{CH}-\text{CH}_3$); 1,35 (*m*, $J=7$, 8 H, 4 CH_2); 0,92 (*s*, $J=5$, 3 H, CH_3). - ^{13}C -NMR.-Spektrum (22,63 MHz, CDCl_3): 166,4 (*s*, C(1)); 164,6 (*s*, C(4)); 148,0 (*d*, C(1')); 137,0 (*s*, C(2)); 135,0 (*s*, C(3)); 117,2 (*d*, C(2')); 34,4 (*t*, C(3')), 31,6 (*t*, C(6')); 28,9 (*t*, C(4')); 28,4 (*t*, C(5')); 22,5 (*t*, C(7')); 14,0 (*qa*, C(8')); 9,2 (*qa*, Vinyl- CH_3).

Daten der ^{13}C -markierten Verbindung 10. - ^1H -NMR.: Signal bei 2,10 ppm klein, ^{13}C -Satelliten bei 2,85 und 1,35 ppm, $J(^{13}\text{C}, \text{H})=133$ Hz. - ^{13}C -NMR.: Signal bei 9,2 ppm ^{13}C -angereichert. Die Carbonylsignale bei 166,4 und 164,6 ppm werden durch Fernkopplungen von 5 bzw. 3 Hz aufgespalten.

3.6. *Herstellung von 2-((E)-1'-Octenyl)-3-methylmaleinsäure-N-phenylimid (10a)*. Ein Gemisch von 57 mg (0,26 mmol) **10** und 100 mg frisch destilliertem Anilin wurde 45 Min. auf 100° erhitzt [20] und nach Zugabe von 5 ml Eisessig in Benzol noch 20 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Eindampfen i.V. resultierten 288 mg Rohprodukt, welches an 25 g Kieselgel chromatographiert wurde. Mit CH_2Cl_2 wurde ein gelbes, festes Produkt eluiert, das aus Äthanol 13 mg reines kristallines *N*-Phenylimid **10a** vom Smp. $48-49^{\circ}$ lieferte. - IR.-Spektrum (CCl_4): u. a. Banden bei 1770*w* und 1710*s* (Fünfring-Imid in Konjugation mit $\text{C}=\text{C}$); 1650 und 1600 (Dien) [21].

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ (297) Ber. C 76,73 H 7,80 N 4,71% Gef. C 76,12 H 7,91 N 4,28%

4. Herstellung von Dinatrium-[2,3-¹³C]succinat (17). – Ein Gemisch von 380 mg (5,84 mmol) Kaliumcyanid, 0,62 ml Wasser, 1,9 ml abs. Äthanol und einer katalytischen Menge Kaliumjodid wurde mit 1 g (5,27 mmol) Dibrom-[1,2-¹³C]äthan (¹³C-Gehalt: 90,2%) versetzt und 75 Min. unter Rückfluss erhitzt [22a]. Darauf wurden 65 ml Wasser zugegeben und das nicht umgesetzte Dibromid mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 13 ml 5N H₂SO₄ angesäuert, 30 Min. bei RT. stehengelassen und mit Chloroform das rohe Dinitril (110 mg) extrahiert. Dieses wurde mit 1,8 ml konz. Salzsäure versetzt und 3 Std. unter Rückfluss erhitzt [22b]. Nach Abdestillieren des Wassers wurde der Rückstand in Äther aufgenommen und die Ätherlösung über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Eindampfen resultierten 140 mg (1,19 mmol) farblose, kristalline Bernsteinsäure, Smp. 184–187° ([22a]: 186–187°, 183–185°). Die Substanz wurde mit 2N NaOH ins Natriumsalz 17 übergeführt und für die Einbauversuche verwendet.

5. Abbaureaktionen. – 5.1. *Herstellung von 20-Dehydrorubratoxin B (12).* Eine auf 0° gekühlte Lösung von 120 mg (0,23 mmol) Rubratoxin B (2) in 1,5 ml Aceton wurde tropfenweise mit 0,1 ml 8N CrO₃ in 25proz. Schwefelsäure versetzt. Nach 45 Min. bei 0° wurde das Gemisch mit 5–10 ml Eiswasser versetzt, worauf sich ein weisser Niederschlag bildete. Dieser wurde abfiltriert, gründlich mit kaltem, destilliertem Wasser ausgewaschen und 5 Std. bei 30°/0,02 Torr getrocknet. Umkristallisation aus Benzol/Essigester 1:1 ergab reines 20-Oxorubratoxin B (12) vom Smp. 166–167°. – IR.-Spektrum (KBr): u.a. Banden bei 3520, 3500 (OH), 1862, 1828, 1787, 1760 (Anhydrid, Lacton), 1730 und 2708 (C=C).

5.2. *Spaltung von 20-Dehydrorubratoxin B (12) in Hexylmethyl-Keton (13) und Herstellung des entsprechenden 2,4-Dinitrophenylhydrazons (13a).* Eine Suspension von 50 mg 20-Dehydrorubratoxin B (12) in 0,5 ml 4N NaOH (Farbe: gelbbraun) wurde 1 Std. im Bombenrohr auf 130° erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Gemisch 3mal mit Äther extrahiert und die Ätherlösungen mit MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Zum Rückstand (charakteristischer fruchtiger Geruch) wurden 1 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens und 1 ml 2N H₂SO₄ gegeben. Nach 24 Std. kristallisierten in der Kälte 3 mg des 2,4-Dinitrophenylhydrazons 13a vom Smp. 58° aus. Rf (Benzol/Essigester 1:1) 0,7. Die Probe war nach Smp., Mischsmp., IR.-Spektrum und Dünnschichtchromatogramm mit authentischem Material identisch. – IR.-Spektrum (CCl₄): u.a. Banden bei 3340, 3120 (NH), 1620, 1595 (Aromat, weiter konjugiert), 1510, 1430 (C–NO₂) und 1340.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *M. O. Moss*, in 'Microbial Toxins', Vol. 6, Academic Press, New York & London 1971, S. 381.
- [2] *W. L. Sippel, J. E. Burnside & M. B. Atwood*, Proc. 90th Ann. Meeting Amer. Vet. Med. Assoc., Toronto, S. 174, 1953.
- [3] *A. W. Hayes*, in 'Mycotoxins in Human and Animal Health', Ed. J. V. Rodricks, Pathotox Publishers, Inc., U.S.A., 1977, S. 507.
- [4] *D. H. R. Barton & J. K. Sutherland*, J. Chem. Soc. (C), 1965, 1769.
- [5] *G. Büchi, K. M. Snader, J. D. White, J. Z. Gougoutas & S. Singh*, J. Am. Chem. Soc. 92, 6638 (1970).
- [6] *W. B. Turner*, in 'Fungal Metabolites', Academic Press, London & New York 1971, S. 292.
- [7] *R. K. Huff, C. E. Moppett & J. K. Sutherland*, J. Chem. Soc., Perkin I 1972, 2584.
- [8] *G. Gallagher, jr. & R. L. Webb*, Synthesis 1974, 122.
- [9] *P. Senn*, Dissertation, Universität Basel 1976.
- [10] *M. Le Corre*, C. R. Hebd. Séances Acad. Sc. t. 270, Ser. C 1970, 1312.
- [11] *K. Bowden, I. M. Heilbron, E. R. H. Jones & B. C. L. Weedon*, J. Chem. Soc. 1946, 39.
- [12] *K. V. Anvers & E. Caner*, Liebigs Ann. Chem. 470, 307 (1929).
- [13] *F. Kalberer & J. Rutschmann*, Helv. Chim. Acta 44, 1956 (1961).
- [14] *S. Nieminen & Ch. Tamm*, Helv. Chim. Acta, im Druck.
- [15] *R. E. Cox & S. J. S. E. Holker*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1976, 583.
- [16] *M. Tanabe, T. Hamasaki & Y. Suzuki*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1973, 212.
- [17] *P. D. Unger & A. W. Hayes*, J. Gen. Microbiol. 91, 201 (1975).
- [18] *K. B. Raper & D. I. Fennell*, in 'The Genus Aspergillus', Williams & Wilkins, Baltimore 1965, S. 37.
- [19] *Th. Ragetli*, Basel, unpublizierte Versuche.
- [20] *A. Laurent & Ch. Gerhardt*, Ann. Chim. Phys. 24, 188 (1848).
- [21] *R. A. Abramovitch*, J. Chem. Soc. (C) 1957, 1413.
- [22] a) *M. Kuschner & S. Weinhouse*, in 'Organic Synthesis with Isotopes', Ed. A. Murray, III & D. L. Williams, Interscience Publishers, New York 1958, S. 129; b) *C. S. Marvel & W. F. Tuley*, Org. Synth. Coll. Vol. 1, 1932, 283.