

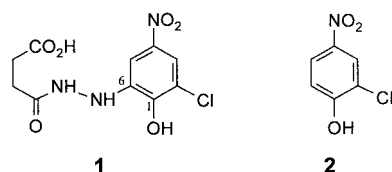
Stephanosporin, ein „spurloser“ Vorläufer von 2-Chlor-4-nitrophenol im Bauchpilz *Stephanospora caroticolor***

Martin Lang, Peter Spiteller, Veronika Hellwig und Wolfgang Steglich*

Professor Siegfried Hünig zum 80. Geburtstag gewidmet

Die Karottentrüffel, *Stephanospora caroticolor* (BERK.) PAT., ist ein seltener Gasteromycet, der in Laub- und Mischwäldern in lehmiger, kalkhaltiger Erde vorkommt. Die etwa 1 bis 3 cm großen, knollenförmigen Fruchtkörper wachsen hypogäisch und sind mit etwas Glück beim Durchbrechen der Erdoberfläche an ihrer lebhaft orangefelben Farbe zu erkennen. Auch das Innere des Pilzes (Gleba) ist intensiv karottenrot gefärbt.

Extrahiert man die Fruchtkörper von *St. caroticolor* mit Methanol, so erhält man eine gelbe Lösung, in der sich HPL-chromatographisch zwei Farbstoffe, **1** und **2**, nachweisen lassen (Schema 1).^[1] Nach den spektroskopischen Daten und



Schema 1. Chlornitroarene aus *St. caroticolor*.

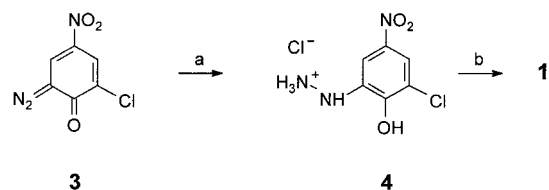
dem direkten GC/MS-Vergleich handelt es sich bei **2** um 2-Chlor-4-nitrophenol.^[2] Die Verbindung liegt nach den Atomabsorptions- und UV/Vis-Spektren im Extrakt vorwiegend als Kaliumsalz vor, was die gelbe Farbe der Lösung erklärt. **2** ist ein Fungizid,^[3a] das früher u. a. zur Saatgutbehandlung^[3b] und Lederkonservierung^[3c] verwendet wurde. Die Verbindung wurde bisher noch nicht als Naturstoff beschrieben.

2-Chlor-4-nitrophenol **2** findet man immer dann im Rohextrakt der Fruchtkörper, wenn diese im Kühlschrank aufbewahrt, getrocknet oder vor der Extraktion zerkleinert werden. Der Gehalt an **2** kann dabei mehr als 2 % des Trockengewichts betragen. Extrahiert man dagegen junge, unverletzte Fruchtkörper unmittelbar nach dem Sammeln mit Methanol, so enthält der Extrakt nur den Farbstoff **1**, der sofort mittels präparativer HPLC isoliert werden muss, um einen Zerfall in **2** zu vermeiden.

Im ¹H-NMR-Spektrum von **1** sind im Arenbereich nur zwei Dubletts (⁴J(H,H) = 3 Hz) sichtbar, sodass der Farbstoff gegenüber **2** einen weiteren Substituenten an C-6 tragen muss. Außerdem erkennt man ein Multiplett für eine

CH₂CH₂-Gruppe, die nach dem HMBC-Spektrum von zwei COX-Gruppen flankiert wird, d. h., es liegt eine Bernsteinsäure-Einheit vor. Mittels LC/(–)-ESI-MS kann für **1** *M_r* = 303 als Molekülmasse (bez. auf ³⁵Cl) ermittelt werden.^[4] Außerdem weist das Schlüsselson mit *m/z* = 116 darauf hin, dass eine der CO-Gruppen der Bernsteinsäure-Einheit eine Amid-CO-Gruppe ist. Daraus ergibt sich für den von uns Stephanosporin genannten Farbstoff die Struktur **1** (Schema 1). Wie **2** kommt auch **1** im Pilz als Kaliumsalz vor, was die Farbe der Fruchtkörper erklärt.

Die Struktur von **1** ist durch Synthese gesichert (Schema 2). Dazu wird das bereits von Griess^[5a] hergestellte 6-Chlor-4-nitro-1,2-chinon-2-diazid^[5b] **3** mit Zinn(II)-chlorid zum Hydrochlorid des 2-Chlor-6-hydrazino-4-nitrophenols **4** reduziert und dieses mit Bernsteinsäureanhydrid und Triethylamin zu Stephanosporin **1** umgesetzt.



Schema 2. Synthese von Stephanosporin **1**. a) SnCl₂, HCl, HOAc, 0 °C, 77 %; b) Bernsteinsäureanhydrid, NEt₃, MeOH, 25 °C, 70 %.

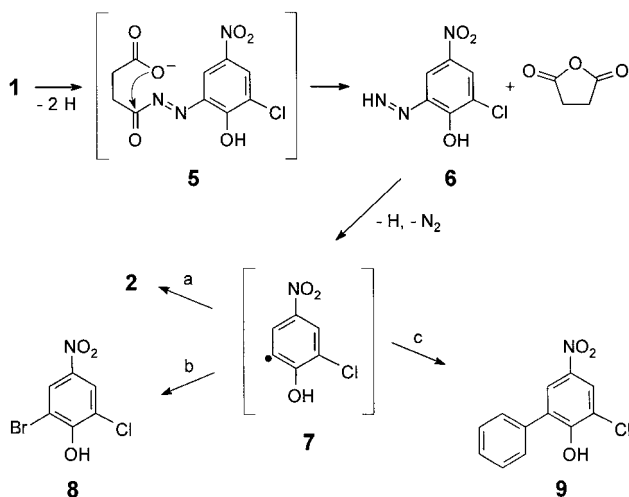
Die oxidative Umwandlung von Stephanosporin **1** in 2-Chlor-4-nitrophenol **2** läuft nach Verletzung der Fruchtkörper enzymatisch ab. Als ersten Schritt der Reaktionskaskade schlagen wir die Oxidation von **1** zum Acyldiazon **5** vor. Dieses aktivierte Säurederivat spaltet nach intramolekularem Angriff des Carboxylations Bernsteinsäureanhydrid ab,^[6, 7a] und es entsteht 2-Chlor-6-diazonyl-4-nitrophenol **6**. Von Verbindungen dieses Typs ist bekannt, dass sie nach Abstraktion eines H-Atoms in Stickstoff und ein Arylradikal zerfallen können.^[8] Das intermediär auftretende Radikal **7** stabilisiert sich durch Aufnahme eines Wasserstoffatoms unter Bildung von 2-Chlor-4-nitrophenol (Schema 3, Weg a).

Durch Oxidation von **1** mit Cer(IV)-ammoniumnitrat, Eisen(III)-nitrat oder Mangan(III)-acetat in Methanol oder Tetrahydrofuran kann dieser Abbau in vitro nachvollzogen werden.^[9] Das dabei entstehende Bernsteinsäureanhydrid ist mittels GC/MS nachweisbar. Wird die Oxidation in Anwesenheit von Bromtrichlormethan durchgeführt (Weg b), so entsteht 2-Brom-6-chlor-4-nitrophenol **8**, mit Benzol (Weg c) 3-Chlor-5-nitro-2-biphenylol **9**. Diese Resultate sind nur mit der intermediären Bildung eines Arylradikals **7** vereinbar (Schema 3). Der Verlust der Seitenkette im Stephanosporin erinnert an die Verwendung von „spurlosen“ Hydrazidankern bei Festphasensynthesen.^[10]

Da 2-Chlor-4-nitrophenol **2** antibiotisch wirkt, dürfte seine enzymatische Bildung aus der Vorstufe **1** bei Verletzung der Fruchtkörper dem Pilz zur Verteidigung dienen. Interessanterweise wurden *N*-Aryl-*N'*-succinylhydrazine vom Stephanosporin-Typ bereits als Fungizide patentiert,^[11, 12] und beim Antibiotikum Spinamycin^[7] spielt eine *N*-Succinylphenylhydrazin-Einheit die entscheidende Rolle für den Wirkmechanismus.

[*] Prof. Dr. W. Steglich, Dipl.-Chem. M. Lang, Dipl.-Chem. P. Spiteller, Dr. V. Hellwig
Department Chemie der Universität
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-7756
E-mail: wos@cup.uni-muenchen.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 369) gefördert.



Schema 3. Bildung von 2-Chlor-4-nitrophenol **2**, 2-Brom-6-chlor-4-nitrophenol **8** und 3-Chlor-5-nitro-2-biphenylol **9** aus Stephansporin (**1**): a) enzymatisch im Pilz bzw. CAN (3 Äquiv.), MeOH, 5 min, RT, 77%; b) CAN (3 Äquiv.), CBrCl₃/MeOH 2:1, 5 min, RT, 59%; c) CAN (3 Äquiv.), Benzol/MeOH 2:1, 5 min, RT, 20%. Konzentration von **1** jeweils 25 mM. CAN = Cer(IV)-ammoniumnitrat.

St. caroticolor enthält außer **1** und **2** noch 4-Hydroxyacetanilid (Paracetamol), 4-Amino-2-chlorphenol und 4-Nitrophenol, wie durch GC/MS-Analyse und Vergleich mit den authentischen Verbindungen gezeigt wurde. Inwieweit diese Metabolite für die Biosynthese von **1** von Bedeutung sind, muss noch geklärt werden.

Wie wir fanden, kommen auch in den orangefarbenen, resupinaten Fruchtkörpern von *Lindtneria trachyspora* (BOURD. & GALZ.) PIL.^[13] 2-Chlor-4-nitrophenol **2** und 4-Nitrophenol vor, letzteres als Hauptverbindung. Damit wird die von Oberwinkler^[14] vorgenommene Einordnung von *Stephanospora* und *Lindtneria* in eine eigene Familie der Stephanosporaceae chemotaxonomisch bestätigt. Ob die Nitrophenole in *Lindtneria* ebenfalls aus „spurlosen“ Vorläufern entstehen, ist noch unbekannt.

Experimentelles

Isolierung von 1-Dikaliumsalz: Zwei Fruchtkörper von *St. caroticolor* wurden am 10. September 1999 in einem Mischwald nahe der Pupplinger Au bei Wolfratshausen (Oberbayern) gefunden. Die Fruchtkörper (Frischgewicht etwa 3 g) wurden unverzüglich mit MeOH (20 mL) extrahiert. Der Extrakt wurde mittels Festphasenextraktion (RP18) vorgereinigt und daraufhin das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH (0.5 mL) gelöst und durch präparative HPLC (Säule: 25 × 2 cm, 7 µm, RP18) mit MeOH/Wasser als Laufmittel gereinigt (Gradient: von 100 % Wasser auf 100 % MeOH linear in 40 min); *R*_f = 15.9 min; Ausbeute: ca. 3 mg. LC/(–)-ESI-MS: *m/z* (%): 304 (28), 302 (100) [*M* – H][–]; LC/(–)-ESI-MSMS (Mutterion *m/z* 302, 20 eV): *m/z* (%): 302 (0.2) [*M* – H][–], 266 (9) [*M* – H – HCl][–], 202 (28) [2-Chlor-6-hydrazino-4-nitrophenol – H][–], 186 (10), 156 (9) [2-Chlor-6-hydrazinophenol – H][–], 154 (9), 116 (100) [Bernsteinsäuremonoamid – H][–], 98 (16) [Succinimid – H][–]; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD, Referenz: δ = 3.31, 25 °C): δ = 2.59 (m, 2 H, CH₂CO₂[–]), 2.60 (m, 2 H, CH₂CONH), 7.42 (d, ⁴*J*(H,H) = 3.0 Hz, 1 H, 5-H), 7.79 (d, ⁴*J*(H,H) = 3.0 Hz, 1 H, 3-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD, Referenz: δ = 49.0, 25 °C): δ = 30.8 (CH₂CO₂[–]), 32.0 (CH₂CONH), 106.0 (C-5), 119.7 (C-3), 121.2 (C-2), 135.7 (C-4), 140.8 (C-6), 158.9 (C-1), 174.8 (CONH), 178.1 (CO₂[–]). **2-Kaliumsalz:** *R*_f = 30.5 min.

4: Zu einer Lösung von **3**^[5] (2.99 g, 15.0 mmol) in Eisessig (15 mL) und konzentrierter Salzsäure (15 mL) wurde nach Abkühlen auf 0 °C tropfen-

weise eine Lösung von SnCl₂ · 2H₂O (6.77 g, 30.0 mmol) in konzentrierter Salzsäure (7 mL) gegeben. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und mehrmals mit halbkonzentrierter Salzsäure sowie anschließend mit Diethylether gewaschen. Ausbeute nach Trocknen im Vakuum: 2.77 g (11.5 mmol, 77 %), graubrauner Feststoff. Zers. beim Erhitzen; ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ = 7.88 (d, ⁴*J*(H,H) = 2.6 Hz, 1 H), 8.00 (d, ⁴*J*(H,H) = 2.6 Hz, 1 H); ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ = 109.3, 120.3, 121.5, 136.3, 141.8, 149.2.

Synthese von 1: Bernsteinsäureanhydrid (0.330 g, 3.30 mmol) wurde unter kurzem Erwärmen in MeOH (7 mL) gelöst und anschließend mit **4** (0.720 g, 3.00 mmol) versetzt. Unter Rühren gab man tropfenweise Triethylamin (0.46 mL, 3.3 mmol) zu, säuerte mit verdünnter Salzsäure an und versetzte die Lösung mit Wasser (15 mL). Der goldgelbe Niederschlag wurde nach einigen h abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0.638 g (2.10 mmol, 70 %). Schmp. 191–194 °C (Zers.); UV/Vis (MeOH) λ_{max} (ε): 226 (11925), 258 (12579), 312 (4738), 351 nm (3751, Schulter); ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ = 2.63 (m, 4 H, CH₂CH₂), 7.55 (d, ⁴*J*(H,H) = 2.5 Hz, 1 H, 5-H), 7.71 (d, ⁴*J*(H,H) = 2.5 Hz, 1 H, 3-H); ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ = 29.5 (CH₂CO₂H), 29.7 (CH₂CONH), 106.5 (C-5), 116.8 (C-3), 120.5 (C-2), 140.3 (C-6), 142.3 (C-4), 147.2 (C-1), 174.6 (CONH), 176.0 (CO₂H); Elementaranalyse (%): ber. für C₁₀H₁₀ClN₂O₆: C 39.55, H 3.32, Cl 11.68, N 13.84; gef.: C 39.55, H 3.31, Cl 11.47, N 13.70.

1-Dikaliumsalz: Zu **1** (76 mg, 0.25 mmol) in trockenem THF (1 mL) wurde tropfenweise eine 1.0 M Lösung von KO^tBu in THF (0.55 mL, 0.55 mmol) gegeben. Der dunkelrote Niederschlag wurde abfiltriert, mehrmals mit THF und einmal mit EtOH gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 86 mg (0.23 mmol, 90 %). Die spektroskopischen Daten waren identisch mit denen des Naturstoffs.

Eingegangen am 20. November 2000 [Z16132]

- [1] Einige Aufarbeitungen, vor allem von getrockneten Pilzen, enthielten nur den Farbstoff **2**.
- [2] J. Klein, Dissertation, Universität Bonn, 1989.
- [3] a) M. Polster, *Arch. Exp. Veterinaarmed.* **1967**, 21, 299–305 [*Chem. Abstr.* **1968**, 68, 19912z]; b) W. A. Sexton, F. L. Sharp (ICI), GB 568949, **1945** [*Chem. Abstr.* **1947**, 41, 4272a]; c) S. Dahl, A. M. Kaplan, *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **1958**, 53, 103–118 [*Chem. Abstr.* **1958**, 52, 19206e].
- [4] Wir danken Prof. M. Spiteller, Dortmund, für die Anfertigung der ESI-Massenspektren.
- [5] a) Erste Synthese von **3**: P. Griess, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1860**, 113, 201–217; b) 2-Amino-6-chlor-4-nitrophenol: K. Linhart, A. Friedrich (Bayer AG), DE 2614825, **1976** [*Chem. Abstr.* **1978**, 88, 22374u]; **3**: W. Ried, M. Butz, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, 716, 190–197.
- [6] Acyldiazene als aktivierte Carbonsäurederivate: R. B. Kelly, G. R. Umbreit, W. F. Liggett, *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 1273–1275; H. B. Milne, C. F. Most, Jr., *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 169–175.
- [7] a) Analoger Zerfall des Antibiotikums Spinamycin: E. M. Kosower, T. Miyadera, *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 307–312; b) Isolierung und Strukturaufklärung von Spinamycin: E. L. Wang, M. Hamada, Y. Okami, H. Umezawa, *J. Antibiot. Ser. A* **1966**, 19, 216–221; H. Naganawa, T. Takita, K. Maeda, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1968**, 21, 241–242.
- [8] Eigenschaften des Phenylidiimins und dessen Zerfall über einen Radikalmechanismus: J. Nicholson, S. G. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 2247–2252; P. C. Huang, E. M. Kosower, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 2367–2376; A. Heesing, B.-U. Kaiser, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 2845–2848; E. M. Kosower, *Acc. Chem. Res.* **1971**, 4, 193–198.
- [9] Wird Stephansporin dagegen mit Iod in Methanol oxidiert, so bildet sich fast ausschließlich 6-Chlor-4-nitro-1,2-chinon-2-diazid **3**.
- [10] C. R. Millington, R. Quarrell, G. Lowe, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7201–7204; F. Stieber, U. Grether, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1142–1145; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1073–1077; Übersicht: S. Bräse, S. Dahmen, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 1899–1905.
- [11] E. Kühle, E. Klauke, P.-E. Frohberger (Bayer AG), DE 2712434, **1977** [*Chem. Abstr.* **1979**, 90, 1684w].

- [12] **1** selbst ist gegen Bakterien und Pilze nur schwach wirksam. Wir danken Prof. T. Anke, Kaiserslautern, für diese Untersuchung.
- [13] Wir danken den Herren Dipl.-Biol. Christoph Hahn und Dr. Norbert Arnold für die freundliche Überlassung von *L. trachyspora*, die im Oktober 1998 auf Treibholz am Rißbach im Karwendel gesammelt wurde.
- [14] F. Oberwinkler, E. Horak, *Plant Syst. Evol.* **1979**, *131*, 157–164. Wir danken Prof. F. Oberwinkler, Tübingen, für die Anregung zu dieser Untersuchung.

Eine Sol-Gel-Route zur Synthese von B_4C^{**}

Edwin Kroke,* Karl W. Völger, Alexander Klonczynski und Ralf Riedel

Der klassische oxidische Sol-Gel-Prozess auf der Grundlage der Hydrolyse von Alkoxiden oder Halogeniden ist in den vergangenen Jahrzehnten detailliert untersucht worden.^[1] Eine kontinuierlich und stark steigende Zahl von Publikationen zu diesem Thema zeigt, dass die Sol-Gel-Technik als Methode zur Herstellung oxidischer Materialien immer noch an Bedeutung gewinnt.^[2] Demgegenüber sind nur sehr wenige Berichte über nichtoxidische Sol-Gel-Systeme publiziert worden.^[3] Ein Sol-Gel-Weg zu B/(C)/N-Materialien wurde in den 80er Jahren von Paine und Narula et al. gefunden. Der Prozess beruht auf „Silazanolyse“ von *B*-Trichlorborazinen mit Hexa- (HMDS) oder Heptamethyldisilazan und wurde zur Herstellung von B/C/N-Xerogelen, Aerogelen und h-BN benutzt.^[4] Das Kristallisationsverhalten und die Oxidationsbeständigkeit der Produkte wurden untersucht.^[5] Molekulare Modellverbindungen wurden synthetisiert und strukturell charakterisiert.^[6] Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in einem Übersichtsartikel zusammengefasst und mit klassischen Herstellungsverfahren für Bornitrid verglichen.^[7]

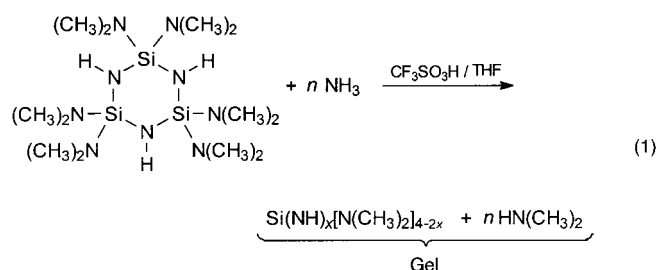
1997 wurde ein Sol-Gel-Prozess entdeckt, der auf Pyridinkatalysierten Umsetzungen von Chlorsilanen $RSiCl_3$ ($R = H, Cl, \text{Alkyl}, \text{Aryl}$) mit Bis(trimethylsilyl)carbodiimid basiert.^[8] Später wurde dieses Sol-Gel-System auf einige Dichlorsilane und funktionalisierte Chlorsilane übertragen.^[9] Daneben gelang es, monodisperse, sphärische Partikel,^[10] Si/C/N-Schichten und Membranen,^[11] Si/C/N-Formkörper und reines SiC -Pulver herzustellen.^[12] Es ist bemerkenswert, dass dieser Sol-Gel-Prozess bezüglich seiner Phänomenologie, einiger chemisch-physikalischer Charakteristika und spektroskopischer Eigenschaften den klassischen oxidischen Systemen analog ist.^[3, 13]

[*] Dr. E. Kroke, Dipl.-Ing. K. W. Völger, Dipl.-Ing. A. Klonczynski, Prof. Dr. R. Riedel
Technische Universität Darmstadt
FB 11, FG Disperse Feststoffe
Petersenstraße 23, 64287 Darmstadt (Deutschland)
Fax: (+49) 6151-166346
E-mail: kroke@hrzpub.tu-darmstadt.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Bonn), vom Fonds der Chemischen Industrie (FCI, Frankfurt) und von der der Bayer AG (Leverkusen) unterstützt. Wir danken Frau Dr. Florence Babonneau und Frau Dr. Christel Gervais (Université Paris) für die Festkörper-NMR-Untersuchungen.

Zahlreiche Versuche zur Herstellung von Gelen aus Chlorsilanen und HMDS oder anderen Silazanen waren nicht erfolgreich.^[14] Auch sind für Carbide und Nitride von anderen Elementen außer Silicium sowie weitere nichtoxidische Materialien wie Sulfide, Selenide, Boride etc. nur sehr wenige Sol-Gel-Prozesse bekannt.^[3] In der Regel entstehen bei den Versuchen zur Synthese nichtoxidischer Gele feste Niederschläge.

Das erste Beispiel für einen auf einer Ammonolyse-Reaktion basierenden Sol-Gel-Prozess wurde von Bradley et al. entdeckt. Ausgehend von einem Dialkylamin-substituierten cyclischen Trisilan wurden Si/(C)/N-Gele erhalten [Gl. (1)].^[15]



B/C/N-Materialien sind aus verschiedenen Gründen von Interesse. Neue graphitartige ternäre Phasen dieser Elemente sollten Werkstoffe sein, die die Eigenschaften von Graphit und h-BN kombinieren.^[16] In ähnlicher Weise sind für sp^3 -hybridisierte B/C/N-Materialien Eigenschaften zu erwarten, die zwischen denjenigen von Diamant und c-BN liegen.^[17]

Borcarbid (B_4C) ist ein extrem hartes Material mit diamantähnlichen mechanischen Eigenschaften.^[18] Es wird industriell durch carbothermische Reduktion von B_2O_3 in Lichtbogenöfen hergestellt. Dichte Werkstoffe werden entweder durch druckloses Sintern oder Heißpressen bei 2100–2250 °C hergestellt. B_4C wird für Schutzschilde gegen Geschosse, Düsentriebwerke, Dichtungen und für Schleif- und Schneidwerkzeuge verwendet. Der natürlich vorkommende Anteil am ^{10}B -Isotop zusammen mit der chemischen Beständigkeit und Stabilität gegen Bestrahlung macht B_4C nützlich für Anwendungen als Neutronenabsorber. Wegen der Fähigkeit, eine elektromotorische Kraft (EMK) zu liefern, die sich mit der Temperatur erhöht, wurde B_4C für Anwendungen zur Stromerzeugung sowie für Hochtemperaturthermoelemente getestet.^[18]

Bei unseren Arbeiten zur Synthese neuer ternärer B/C/N-Phasen haben wir Reaktionen von BCl_3 und *B*-Trichlorborazin mit Bis(trimethylsilyl)carbodiimid untersucht. Es stellte sich heraus, dass BCl_3 feste, unlösliche und nicht schmelzbare Produkte liefert, die je nach Reaktionsbedingungen entweder Chlorreste oder signifikante Mengen an Silicium enthalten. Dagegen gaben Umsetzungen von *B*-Trichlorborazin ($\text{B}_3\text{N}_3\text{H}_3\text{Cl}_3$) mit Bis(trimethylsilyl)carbodiimid in THF, Toluol oder auch ganz ohne Lösungsmittel nichtoxidische Gele. Die nach Alterung und Trocknung hergestellten Xerogele enthalten nur geringe Mengen an Chlor-, Silicium- oder Sauerstoffverunreinigungen.