

# ANTIBIOTIKA AUS ACTINOMYCETEN. ZUR CHEMISCHEN KONSTITUTION DES ANTIBIOTIKUMS GRISEORHODIN A.

## I—ISOLIERUNG UND STRUKTUR VON ZWEI ABBAUPRODUKTEN

K. ECKARDT,\*\* D. TRESSL† und W. IHN†

Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena, Abteilungen Antibiotika-Chemie,\* Biophysikochemie† und Chemische Analyse†

(Received in Germany 3 May 1977; Received in the UK for publication 23 July 1977)

**Zusammenfassung**—Durch Einwirkung von Pyridin auf Griseorhodin A bei 100°C entstehen verschiedene Abbauprodukte. Davon wurden zwei Schlüsselsubstanzen isoliert und näher untersucht. Substanz 1a erwies sich als 2,5,8-Trihydroxy-7-methoxy-naphthochinon-(1,4), während sich das zweite Abbauprodukt (2a) vom Isocoumarin ableitet.

**Abstract**—On treating of griseorhodin A with pyridine at 100°C several degradation products of the antibiotic are formed. Two of these compounds have been isolated. Substance 1a was shown to be 2,5,8-trihydroxy-7-methoxy-naphthoquinone-(1,4). The second degradation product 2a is a derivative of isocoumarin.

Griseorhodin A wurde als Hauptkomponenten des als Griseorhodin bezeichneten roten Pigmentgemisches aus Fermentationsansätzen von *Streptomyces californicus* JA 2640 isoliert.<sup>1,2</sup> Griseorhodin A ist stark antibiotisch wirksam gegen grampositive Bakterien und Mykobakterien. Neben den Griseorhodinen wird bei der Fermentation von Stamm JA 2640 noch Viomycin gebildet.<sup>3</sup> Vor einiger Zeit wurde von anderen Autoren über die chemische Struktur der Rubromycine aus Fermentationsansätzen von *Streptomyces collinus*<sup>4</sup> und über Purpuromycin aus *Aktinoplanes Janthinogenes*, N. sp.<sup>5</sup> berichtet. Die strukturelle Verwandtschaft des Griseorhodin A mit  $\gamma$ -Rubromycin und Purpuromycin hat uns veranlasst, frühere nicht abgeschlossene Untersuchungen über die Konstitution des Griseorhodins A neu aufzugreifen. In dieser und einer nachfolgenden Publikation<sup>6</sup> soll über die Ergebnisse der Strukturaufklärung berichtet werden.

### Summenformel und Chromophor

Bei den früheren Untersuchungen<sup>7</sup> wurde aus den Ergebnissen der Elementaranalyse und der Molekulargewichtsbestimmung durch Mikrohydrierung für Griseorhodin A die Summenformel  $C_{24}H_{20}O_{12}$  (MG = 500) berechnet. Auf Grund neuerer massenspektrometrischer Untersuchungen muss diese Summenformel korrigiert werden. Aus der Präzisionsmassenbestimmung des Moleküls  $M^+$  bei  $m/e$  508 im Massenspektrum des Antibiotikums (Abb. 1) folgt für dessen elementare Zusammensetzung nunmehr  $C_{23}H_{16}O_{12}$  (gef. Masse 508.0635; ber. 508.0639). Diese Summenformel wird auch durch die Kernresonanzspektren bestätigt. So konnten im  $^1H$ -Spektrum die Signale aller 16 Protonen und im  $^{13}C$ -Spektrum die Signale aller 25 C-Atome aufgefunden werden.<sup>†</sup>

Griseorhodin A enthält als chromophores System ein Hydroxychinon. Auf Grund vergleichender Un-

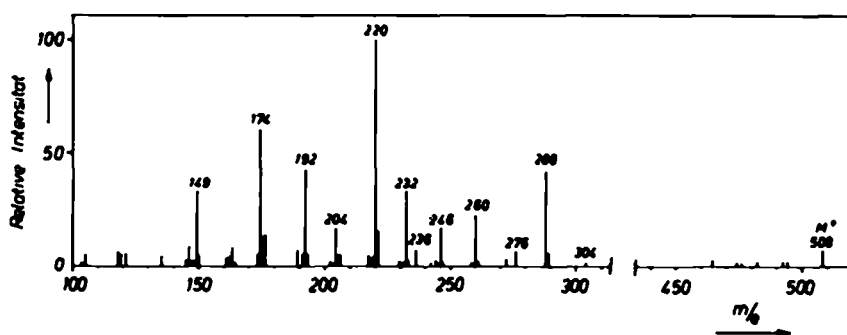


Abb. 1. Massenspektrum von Griseorhodin A.

†Wir danken Herrn Dr. Radics, Zentralinst. für Chemie der Ungarischen Akad.d.Wiss., Budapest, für die Aufnahme der  $^{13}C$ -Spektren.

‡Wir danken Frau Dr. M. R. Bardone, Research Laboratories Gruppo Lepetit S. p. A. Milano, für die Übersendung einer Probe Purpuromycin.

tersuchungen wurde zunächst gefunden, dass dem Griseorhodin A das Naphthopurpurin zugrunde liegt.<sup>7</sup> Die nahe Spektrenverwandtschaft zum Purpuromycin<sup>†</sup> im langwelligen Bereich (Abb. 2) gibt weitere Hinweise auf einen möglichen analogen Aufbau des Chromophorteils. Ein schlüssiger Beweis durch Abbau fehlte jedoch. Nun-

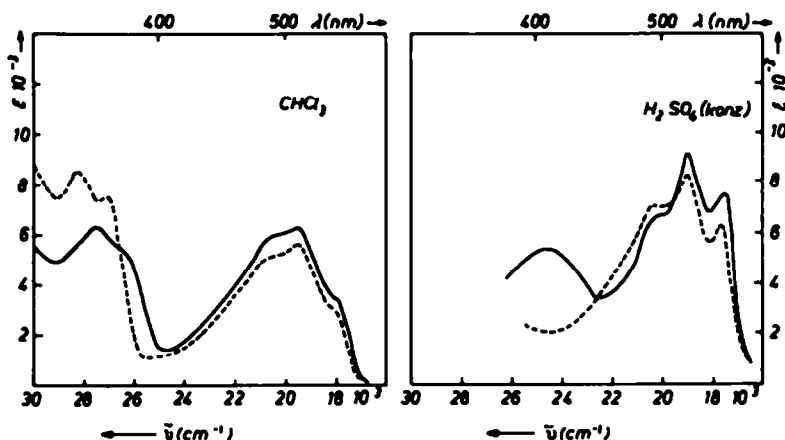


Abb. 2. Absorptionskurven in Chloroform und konzentrierter  $H_2SO_4$  — Purpuromycin:  $\lambda_{max}$   $CHCl_3$ : 315 nm ( $\epsilon = 17850$ ), 354 (8571), 370 (7500), 484 Sch. (5170), 513 (5545), 550 Sch. (3210).  $\lambda_{max}$   $H_2SO_4$ : 494 nm (7160), 526 (8350), 565 (6260). — Griseorhodin A:  $\lambda_{max}$   $CHCl_3$ : 315 nm ( $\epsilon = 8480$ ), 362 (6320), 378 Sch. (5440), 484 Sch. (5940), 513 (6260), 550 Sch. (3734).  $\lambda_{max}$   $H_2SO_4$ : 410 nm (5370), 494 Sch. (6700), 528 (9180), 570 (7500).

mehr haben wir zur Klärung dieser und anderer Fragen hinsichtlich des Restmoleküls nach spezifischen Abbauprodukten gesucht.

Erhitzt man Griseorhodin A 12 Stunden in trockenem Pyridin auf  $100^\circ C$ , so entsteht ein Gemisch von einer Vielzahl von Abbauprodukten, die dünnsschichtchromatographisch und durch Säulenchromatographie trennbar sind.

#### Konstitution des roten Abbauproduktes 1a

Das rohe Abbaugemisch enthielt einen im sauren, wässrigen Filtrat verbleibenden roten Anteil, der durch Extraktions- und Reextraktionsstufen isoliert wurde. Nach säulenchromatographischer Trennung an  $KH_2PO_4$ -behandeltem Kieselgel wurde aus der Hauptzone eine in roten Nadelchen kristallisierende Verbindung mit saurem Charakter erhalten. Die Konstitution 1a ergab sich aus folgenden Eigenschaften:

Aus dem hochaufgelösten Massenspektrum erhält man die elementare Zusammensetzung  $C_{11}H_8O_6$ . Danach muss die Verbindung 8 Doppelbindungsäquivalente besitzen. Die Substanz zeigt durch die reversible Reduzierbarkeit, IR-Chinoncarbonylbande bei  $1595\text{ cm}^{-1}$  und das Farbverhalten in konz.  $H_2SO_4$  (rot) und NaOH (rotviolett) den Hydroxychinoncharakter (zwei periständige Hydroxylgruppen zu den Chinoncarbonylen) an. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum (Tabelle 1) finden sich neben den Signalen der beiden chelierten OH-Gruppen ( $\delta = 12.07$  bzw.  $13.09\text{ ppm}$ ) noch die Signale von zwei Protonen ( $\delta = 6.48$  bzw.  $6.53\text{ ppm}$ ) sowie einer  $OCH_3$ -Gruppe ( $\delta = 3.95\text{ ppm}$ ). Als Rest der Summenformel bleiben je 1 O- und 1 H-Atom, so dass die noch verbleibende Substitutionsstelle in 1a nur eine weitere (im NMR-Spektrum nicht nachgewiesene) OH-Gruppe tragen kann. Als  $\beta$ -ständige Hydroxylgruppe im Naphthazarin-Ringsystem erklärt sie die gute Löslichkeit der Substanz in Natriumbicarbonatlösung und Wasser.

Die Methoxylgruppe und die  $\beta$ -OH-Gruppe sind nicht benachbart, da die beiden aromatisch-olefinischen Protonen nicht miteinander koppeln. Die bisherigen Daten lassen die Formulierung des roten Abbauproduktes als 1a oder 1b zu, womit auch das massenspektrometrische Fragmentierungsverhalten im Einklang steht.

1a wurde von Singh *et al.*<sup>8</sup> als Syntheseprodukt, und

Tabelle 1.  $^1H$ -NMR-Daten des roten Abbauproduktes 1a in  $CDCl_3$

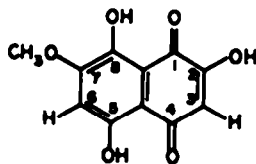
Chemische Verschiebung $\delta$ [ppm]		
3-H	6.48 S	(6.47)
6-H	6.53 S	(6.53)
$OCH_3$	3.95 S	(3.97)
2-OH	—	(—)
5-OH	13.09 S	(13.13)
8-OH	12.07 verbreitert	(12.07)

Die chemischen Verschiebungen wurden auf Tetramethylsilan (TMS) bezogen.

S = Singulett.

Werte in Klammern nach Moore und Scheuer.<sup>10</sup>

von Brockmann *et al.*<sup>9</sup> als Pyrolyseprodukt aus  $\gamma$ -Rubromycin beschrieben. Die dort angegebenen Daten (Schmp., Absorptionsspektren) stimmen mit den bei unserer Substanz gefundenen Werten gut überein, während Schmp. und Absorptionsspektrum von 1b<sup>8</sup> stark davon abweichen. Die NMR-Daten entsprechen ebenfalls den Angaben für 1a,<sup>10</sup> wobei die  $\beta$ -Hydroxylgruppe von den Autoren wie in unserem Falle nicht aufgefunden wurde.



1a

1b H und  $OCH_3$  an den Positionen 6 und 7 vertauscht.

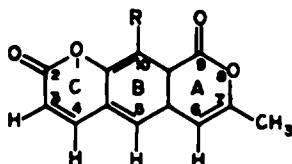
Demnach hat das rote Abbauprodukt aus Griseorhodin A die Konstitution 1a. (Zur Formulierung des Tautomeriegleichgewichtes vgl.<sup>10</sup>)

#### Konstitution des gelben Abbauproduktes 2a

Im Gegensatz zu  $\gamma$ -Rubromycin und Purpuromycin enthält Griseorhodin A eine Methylgruppe, deren Signal im NMR-Spektrum bei  $\delta = 2.30$  ( $CDCl_3$ ) bzw.  $\delta = 2.38$  ( $CF_3COOD$ ) erscheint. Da das rote Abbauprodukt keine solche Gruppe enthält, sollte sie im Restmolekül des Griseorhodins A lokalisiert sein. Aus diesem Grunde

wurde das Rohprodukt des Pyridin-Abbaus nach einem solchen Fragment untersucht.

Im Dünnschichtchromatogrammen an  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -behandeltem Kieselgel (Lösungsmittel 100% Essigester) zeigte sich neben anderen violettroten, roten bis gelben Zonen eine hellgelbe, im UV-Licht blau fluoreszierende Zone. Aus der entsprechenden Fraktion wurde bei Säulenchromatographie unter gleichen Bedingungen eine in hellgelben Nadeln kristallisierende Verbindung mit dem Schmp. 296–297°C abgetrennt, die eine solche  $\text{CH}_3$ -Gruppe enthält. Die Konstitution 2a für dieses Abbauprodukt resultiert aus den folgenden Ergebnissen:



2a: R=OH

2b: R=OCOCH<sub>3</sub>

**Summenformel und funktionelle Gruppen:** Nach der massenspektrometrischen Molmassenbestimmung kommt der Substanz die Summenformel  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_5$  zu. Im Kernresonanzspektrum (Lösungsmittel  $\text{CF}_3\text{COOD}$ ) sind 7 Protonen nachweisbar. Davon gehören 3 zu einer Methylgruppe, während die restlichen 4 aromatisch-olefinische Protonen sind (Tabelle 2). Von diesen 4 Protonen bilden 2 ein AB-Spinsystem mit einer Kopplungskonstante von  $J_{AB} = 9.8 \text{ Hz}$ , 1 Proton verursacht ein Singulett, während das vierte eine "long range"-Kopplung mit der Methylgruppe ( $J_{H,CH_3} = 1 \text{ Hz}$ ) aufweist. Das noch fehlende H-Atom gehört zu einer Hydroxylgruppe, deren Signal in  $\text{CF}_3\text{COOD}$  nicht nachweisbar ist. Sie ist phenolischer Natur, denn das gelbe Abbauprodukt bildet mit Pyridin/Essigsäureanhydrid ein Monoacetat ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ ) mit einer für phenolisches Acetat charak-

teristischen IR-C=O-Bande bei  $1772 \text{ cm}^{-1}$ . Im Massenspektrum ist die Primärfragmentierung die für Phenolacetate typische Ketenabspaltung, die zum Basispeak führt.

An funktionellen Gruppen sind weiterhin zwei Carbonylgruppen enthalten, die sich im IR-Spektrum des gelben Abbauproduktes durch intensive Banden bei  $1683 \text{ cm}^{-1}$  und  $1735/1750 \text{ cm}^{-1}$  (Doppelbande) zu erkennen geben. (Eine weitere intensive Bande bei  $1645 \text{ cm}^{-1}$  wird, wie noch gezeigt wird, durch eine C=C-Valenzschwingung verursacht.) Die beiden noch verbleibenden O-Atome müssen, da keine weiteren funktionellen Gruppen nachweisbar sind, im Ringsystem integriert sein.

**Grundkörper und Zuordnung:** Das gelbe Abbauprodukt enthält ein tricyclisches Grundgerüst. Dies geht aus der Zahl von 10 Doppel-

Tabelle 3. Lage der Isocoumarin-C=O-Bande verschiedener Substanzen

	cm <sup>-1</sup>	Methyl- derivat cm <sup>-1</sup>	Acetat cm <sup>-1</sup>	Lit.-Zitat
$\gamma$ -Rubromycin	1686		1739	9
Purpuromycin	1685			5
Griseorhodin A	1690	1725	1740	6
Griseorhodin- Abbauprodukt (2a)	1683		1740	
8-Hydroxy-3-methyl- isocoumarin (3a)	1685	1727		11
Reticulol (3b)	1680	1710	1740	12
Metabolit aus Asp. viridinutans	1691	1724		13

bindungsäquivalenten in Verbindung mit dem nachgewiesenen aromatischen Ring und den funktionellen Gruppen hervor. Die Formulierung des Molekülteils mit den Ringen A und B als Isocoumarin (Formel 2a) wurde zunächst aus der Verwandtschaft von Griseorhodin mit  $\gamma$ -Rubromycin und Purpuromycin geschlossen, die beide neben dem Chinonchromophor einen Hydroxycoumarinteil enthalten. (Das Griseorhodin A im Molekül eine Lactongruppe enthält, wurde schon früher gezeigt.<sup>7</sup>) Deshalb war das Vorliegen eines solchen Bausteins im gelben Abbauprodukt zu erwarten. Durch die folgenden Befunde wird diese Anordnung bewiesen: Das IR-Spektrum des gelben Abbauproduktes zeigt bei  $1683 \text{ cm}^{-1}$  eine für 8-Hydroxyisocoumarine an dieser Stelle charakteristische Carbonylvalenzschwingungsbande. In Tabelle 3 ist die Lage der entsprechenden Bande bei den Antibiotika  $\gamma$ -Rubromycin, Purpuromycin, und Griseorhodin A sowie einigen Isocoumarinen mit analoger Struktur aufgeführt. Nach Aufhebung der Wasserstoffbrücke durch Methylierung oder Acetylierung wird die Lage dieser Bande bei allen diesen Verbindungen um  $\sim 40 \text{ cm}^{-1}$  nach grösseren Wellenzahlen verschoben.<sup>11</sup> Die entsprechenden Werte sind ebenfalls in Tabelle 3 zu finden.

Die Lokalisierung der Methylgruppe in 2a an C-7 und des Protons an C-6 folgt aus den gefundenen chemischen Verschiebungen (Tabelle 2). Zwischen diesen beiden Signalen wird eine "long range"-Kopplung von 1 Hz beobachtet, die auch für Reticulol, einem Stoffwechselprodukt aus *Streptomyces rubrircetulae*, mit der Struktur 3b beschrieben wurde.<sup>12</sup>

Tabelle 2. <sup>1</sup>H-NMR-Daten des gelben Abbauproduktes 2a und von seinem Acetat 2b in  $\text{CF}_3\text{COOD}$

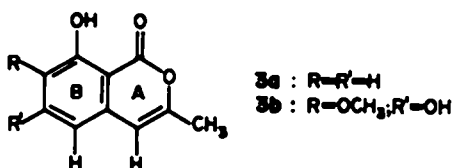
Chemische Verschiebung			
	$\delta$ [ppm] 2a		$\delta$ [ppm] 2b
3-H	6.95 D } AB-System	6.87 D	AB-System
4-H	8.03 D } $J_{AB} = 9.8 \text{ Hz}$	8.04 D	$J_{AB} = 9.8 \text{ Hz}$
5-H	7.20 S	7.63 S	
6-H	6.56 Q	6.56 Q	
CH <sub>3</sub>	(6.29 in $\text{CDCl}_3$ ) <sup>a</sup> } long range 2.39 D } $J = 1 \text{ Hz}^b$	2.38 D	$J = 1 \text{ Hz}^b$
	(2.30 in $\text{CDCl}_3$ ) <sup>a</sup>		
OAc	—	2.65 S	

Die chemischen Verschiebungen wurden auf Tetramethylsilan (TMS) bezogen.

S = Singulett, D = Dublett, Q = Quartett.

<sup>a</sup>Das gelbe Abbauprodukt konnte wegen seiner geringen Löslichkeit nur in  $\text{CF}_3\text{COOD}$  gemessen werden. Die entsprechenden chemischen Verschiebungen in  $\text{CDCl}_3$  wurden aus Vergleichsmessungen mit Griseorhodin A erhalten.

<sup>b</sup>Kopplung nur unter optimalen Messbedingungen nachweisbar.

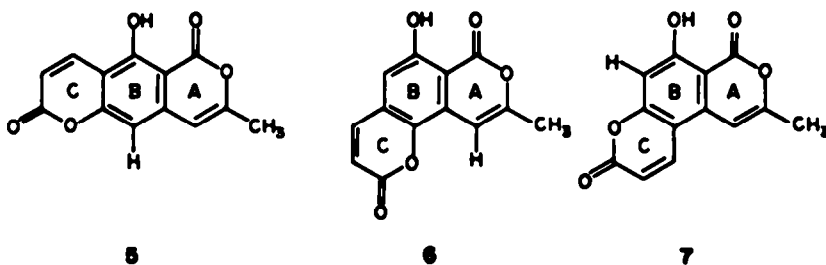


Die Lokalisierung der CH<sub>3</sub>-Gruppe umgekehrt an C-6 bzw. am restlichen Molekülteil scheidet aus. Im erstenen Falle wäre dann für das Signal des Protons an C-7 eine grössere chemische Verschiebung zu erwarten, als 6.56 ppm. (Ausserdem wird dieser Schluss durch das massenspektrometrische Fragmentierungsverhalten, wie noch gezeigt wird, erhärtet.) Im zweiten Falle würde die zu erwartende vicinale Kopplung der beiden Protonen an C-6 und C-7 am unsubstituierten Isocoumarinring nur ca. 6

9.8 Hz, die eine direkte Anbindung des Sauerstoffs an die Doppelbindung ausschließt. Damit entfallen die beiden übrigen formulierbaren Möglichkeiten 4a und 4b, für die eine erheblich niedrigere Kopplungskonstante ( $J_{AB} = 5-6.5$  Hz) zu erwarten wäre. Die Anordnung der Ringe B und C in 2a entspricht dem Cumarin, bei dem die Kopplungskonstante  $J_{AB}$  ebenfalls mit 9.8 Hz angegeben ist.<sup>14</sup>

Die Möglichkeit 4b wird zudem auch durch das IR-Spektrum ausgeschlossen, da die C=O-Valenzschwingungsbande von 1,4-Chromonen allgemein unterhalb 1680 cm<sup>-1</sup>, die entsprechende Bande des gelben Abbauproduktes jedoch bei 1735/1750 cm<sup>-1</sup> liegt. (So absorbiert 2-Methylchromon-(1,4) z.B. bei 1660 cm<sup>-1</sup>).<sup>15</sup>

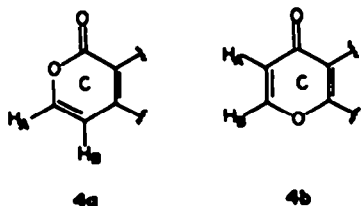
Die Kernresonanzspektren des gelben Abbauproduktes und seines Acetates schliessen auch die theoretisch noch diskutierbaren Anbindungsmöglichkeiten 5, 6 und 7 des Ringes C an das Restmolekül aus:



Hz betragen und im Widerspruch zu der gefundenen Kopplungskonstante des AB-Systems von 9.8 Hz (Tabelle 2) stehen.

Im Einklang mit der bisher abgeleiteten Struktur findet sich sowohl im IR-Spektrum des 8-Hydroxy-3-methylisocumarins (3a)<sup>11</sup> als auch in dem des gelben Abbauproduktes eine intensive C=C-Valenzschwingungsbande bei ~1645 cm<sup>-1</sup>. Sie ist auch im Spektrum des Griseorhodins A vorhanden, fehlt aber wegen der veränderten Substituenten (-COOCH<sub>3</sub> statt -CH<sub>3</sub>) in den Spektren des  $\gamma$ -Rubromycins und Purpuromycins.

Wie schon erwähnt, wird für das gelbe Abbauprodukt ein tricyclisches Ringsystem gefordert. Da ein Proton noch auf den aromatischen Ring entfällt ( $\delta = 7.20$  ppm), verbleiben für den noch zu formulierenden Ring C in 2a lediglich eine Carbonylgruppe, eine -CH=CH-Gruppierung sowie das restliche O-Atom übrig. Letzteres muß im dritten Ring integriert sein, da das gelbe Abbauprodukt nur eine Hydroxylgruppe aufweist (Monoacetat) und weitere funktionelle Gruppen nicht nachweisbar waren.



Die Strukturen 5 und 7 stehen im Widerspruch zu der gefundenen chemischen Verschiebung des aromatischen Protons. Sauerstoff in *ortho*- und *para*-Stellung bzw. *ortho*- und *ortho*-Stellung zum aromatischen Proton würde eine niedrigere chemische Verschiebung als gefunden (Tabelle 2) erwarten lassen.† Gegen die Struktur 6 spricht die gefundene chemische Verschiebung des Protons am Ring A, das bei dieser Anordnung nach tieferem Feld verschoben sein sollte. Die für das gelbe Abbauprodukt aufgestellte Konstitution 2a wird durch das massenspektrometrische Fragmentierungsverhalten dieser Substanz bestätigt.

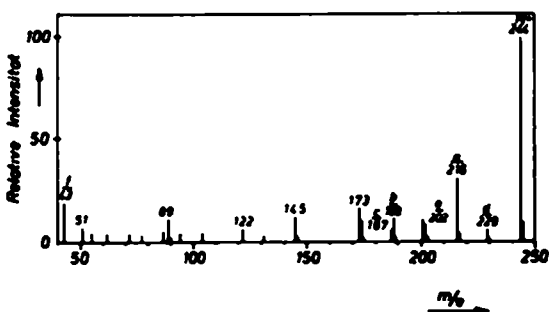
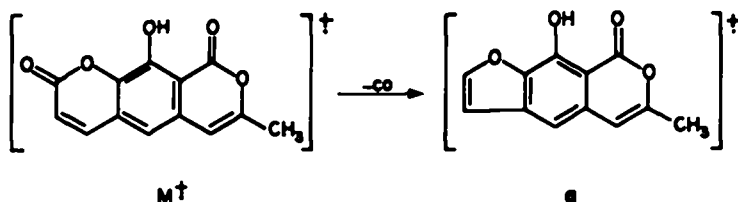


Abb. 3. Massenspektrum von 2a.

So lässt sich in Analogie zum Mechanismus der Fragmentierung des Cumarins und einiger seiner Derivate die Bildung des intensivsten Fragmentions a im Massenspektrum von 2a und dessen weiterer Abbau zu den Fragmentionen b (C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) und c (C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>) erklären.

Die Formulierung des Ringes C in 2a erfolgte auf Grund der gemessenen Kopplungskonstanten  $J_{AB} =$

† Ausserdem müssten die Anordnungen 5 und 7 eine "long-range"-Kopplung verursachen, die nicht beobachtet werden konnte.<sup>18</sup>



Von den Cumarinen ist bekannt, dass sie zu sehr stabilen Benzofuranfragmenten und dann weiter unter Eliminierung eines zweiten Moleküls CO und Abspaltung eines H-Radikals aus dem Furanring fragmentieren.<sup>16</sup>

Die zu diesen Reaktionen parallel verlaufenden Abspaltungen eines Methylradikals und von Keten aus dem Lactonring A, die primär zu den Fragmenten d ( $C_{12}H_8O_3$ ) und e ( $C_{11}H_8O_4$ ) führen, bestätigen auf Grund der guten Übereinstimmung mit den primären Fragmentierungsreaktionen des 8-Hydroxy-3-methylisocumarins<sup>17</sup> die Anordnung der Ringe A und B als Isocumarin. Zudem wird die Konstitution des A-Ringes, insbesondere die Lokalisierung der Methylgruppe an C-7 in Analogie zum Fragmentierungsverhalten des  $\alpha$ -Angelicalactons und des 8-Hydroxy-3-methylisocumarins<sup>17</sup> durch das Auftreten des für derartig substituierte ungesättigte Lactone charakteristischen stabilen Fragmentions f ( $CH_2=C=O^+$ ) angezeigt.

Über die Gesamtstruktur des Griseorhodins A wird in einer nachfolgenden Publikation berichtet.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren. Die Spektren wurden mit einem 100 MHz-Kernresonanzspektrometer des Zentralinstituts für wissenschaftlichen Gerätebau der Akademie der Wissenschaften der DDR aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden  $CDCl_3$  bzw.  $CF_3COOD$  benutzt (Tetramethylsilan als innerer Standard).

Massenspektren. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte an einem doppelfokussierendem JEOL-Gerät Typ JMS-D100 (Beschleunigungsspannung 3 kV, Direkteinlass, Proben temp. 150–250°C, Ionenquellentemp. 170–270°C) bei einer Elektronenstoßenergie von 75 eV. Die genauen Massenbestimmungen der Molekül- und Fragmentationen wurden bei einer Auflösung von ca. 10.000 nach der "peakmatching"-Methode mit PFK als Referenzverbindung durchgeführt.

$KH_2PO_4$ -behandeltes Kieselgel: KG Merck, 0,05–0,2 mm wurde 1 h mit 0,5 N  $KH_2PO_4$ -Lösung gerührt, abgesaugt und 3 h bei 120°C getrocknet.

#### Spaltung von Griseorhodin A durch Erhitzen in Pyridin.

2,5 g Griseorhodin A wurden in Analogie zu Bardone *et al.*<sup>3</sup> in 100 ml trockenem Pyridin gelöst und 10 h auf 100°C erhitzt. Nach Köhlen wurde vom ausgefallenen Niederschlag abgesaugt und zweimal mit Wasser gewaschen. Das rotviolette Filtrat wurde dann mit Schwefelsäure angesäuert und zur Gewinnung von 1a und 2a weiterbearbeitet.

#### Isolierung von 2,5,8-Trihydroxy-7-methoxy-naphthochinon-1,4 (1a).

Zur Isolierung von 1a wurde das angesäuerte Filtrat vom roten Niederschlag ( $N_1$ ) abgetrennt. Das noch tiefrot gefärbte Filtrat extrahierte man mehrfach mit Essigsäureäthylester. Nunmehr wurde mit Wasser rückextrahiert und 1a aus der roten wässrigen Phase durch mehrfaches Ausschütteln mit Chloroform entzogen. Nach Trocknen mit  $Na_2SO_4$  brachte man die vereinigten Chloroformextrakte i. Va. zur Trockne. Der Rückstand (92 mg) wurde in Essigsäureäthylester gelöst und in mehreren Anteilen durch Säulenchromatographie an  $KH_2PO_4$ -behandeltem Kieselgel (eingeschlämmt mit Essigsäureäthylester) getrennt. 1a wanderte als hellrote Hauptzone bei Elution mit 100% Essigester.

Aus den vereinigten Eluaten dieser Zonen erhielt man nach Abdampfen des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Chloroform 15 mg 1a als hellrote Nadeln. Schmp.: 229–230°C.  $C_{11}H_8O_6$  (MG: Gef. 236,0322; Ber. 236,0321, Massenspektrum). IR (KBr): 1595  $cm^{-1}$ . UV  $\lambda_{max}$  ( $CHCl_3$ ): 278, 312, 488, 520, 553 nm; 2N NaOH: 546, 565 nm;  $H_2SO_4$  konz.: 493, 524, 562 nm. m/e Gef.: 236,0322 [M]<sup>+</sup>, 218,0211 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 208,0339 [M-CO]<sup>+</sup>, 206,0191 [M-HCOH]<sup>+</sup>, 190,0255 [M-(CO+H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup>, 179,0301 [M-(CO+CHO)]<sup>+</sup>, 178,0246 [M-(CO+HCOH)]<sup>+</sup>, 165,0191 [C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 162,0327 [C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 137,0225 [C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 124,0150 [C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 123,0080 [C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 108,0191 [C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>.

#### Isolierung des gelben Abbauproduktes 2a

Der nach Ansäuern des Rohfiltrats der Pyridinspaltung erhaltene Niederschlag  $N_1$  (1,95 g) wurde dreimal mit je 100 ml Essigsäureäthylester warm extrahiert. Die vereinigten Extrakte zeigten im DC (KG HF<sub>254</sub> nach Stahl, Typ 60, in 0,5 N  $KH_2PO_4$ -Lösung aufgeschlämmt auf die Platte gegeben und luftgetrocknet) mit dem Lösungsmittel 100% Essigsäureäthylester mehrere rote und gelbe Zonen. 2a wanderte als gelbe Zone mit blauer Fluoreszenz im UV-Licht. Zur präparativen Gewinnung wurde das filtrierte Konzentrat der Extrakte (50 ml) an einer kurzen Säule mit  $KH_2PO_4$ -behandeltem Kieselgel (2,6 × 20 cm, Elution mit 100% Essigsäureäthylester) vorgetrennt. Die 2a enthaltende Fraktion (DC-Kontrolle) wurde nunmehr unter gleichen Bedingungen an einer längeren Säule noch einmal chromatographiert, wobei sich 2a als gelbe Zone in reiner Form abtrennen liess und nach Einengen auskristallisierte. Ausbeute: 12 mg blassgelbe Nadelchen aus Essigester oder Pyridin. Schmp.: 296–297°C.  $C_{11}H_8O_6$  (MG: Gef.: 244,0377; Ber.: 244,0372, Massenspektrum). IR (KBr): 1645, 1682, 1735 Sch, 1750  $cm^{-1}$ . UV  $\lambda_{max}$  ( $CH_3OH$ ): 235, 278 Sch, 296 Sch, 312, 385–400, 422 Sch. m/e Gef.: 244,0377 [M]<sup>+</sup>, 229,0118 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 216,0442 [M-CO]<sup>+</sup>, 202,0251 [M-CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup>, 201,0171 [M-(CO+CH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>, 188,0443 [M-2CO]<sup>+</sup>, 187,0384 [M-(CO+HCO)]<sup>+</sup>, 173,0225 [C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 145,0278 [C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 43,0162 [C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O]<sup>+</sup>.

#### Acetat des gelben Abbauproduktes (2b)

9 mg 2a wurden in 1,5 cm<sup>3</sup> trockenem Pyridin heiss gelöst und mit 1,5 cm<sup>3</sup> Essigsäureanhydrid 1 Min. zum Sieden erhitzt, anschließend 20 h bei Raumtemp. belassen. Zur Aufarbeitung wurde die Mischung mit Wasser versetzt. Dabei kristallisierte das Acetat langsam als hellgelber Niederschlag aus. 8 mg feine Rhomben, die direkt zur Untersuchung kamen. Schmp. 263–265°C.  $C_{11}H_{10}O_6$  MG: Gef.: 286,0486; Ber.: 286,0477, Massenspektrum IR (KBr): 1658, 1718, 1740, 1772  $cm^{-1}$ .

**Danksagung**—Herrn Dr. Sedmera, Institut für Mikrobiologie der ČSAV, Prag, danken wir für Protonenresonanzuntersuchungen am Griseorhodin A, sowie Frau Karin Mundt für ihre sorgfältige technische Mitarbeit. Herrn Dr. J. Flemming, Abteilung Biophysikochemie, danken wir für die Unterstützung durch polarographische Untersuchungen.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup>H. Thrum, unveröffentlicht.
- <sup>2</sup>W. Treibs und K. Eckardt, *Naturwissenschaften* 48, 430 (1961).
- <sup>3</sup>H. Thrum, K. Eckardt, R. Fügner und G. Bradler, *Z. Allg. Mikrobiol.* 7, 121 (1967).
- <sup>4</sup>H. Brockmann und A. Zeeck, *Chem. Ber.* 103, 1709 (1970).
- <sup>5</sup>M. R. Bardone, E. Martinelli, L. F. Zerilli und C. Coronelli, *Tetrahedron* 30, 2747 (1974).
- <sup>6</sup>D. Tresselt, K. Eckardt und W. Ihn, in Vorbereitung.

- <sup>7</sup>K. Eckardt, *Chem. Ber.* **98**, 24 (1965).
- <sup>8</sup>I. Singh, R. E. Moore, C. W. J. Chang and P. J. Scheuer, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4023 (1965).
- <sup>9</sup>H. Brockmann, W. Lenk, G. Schwantje und A. Zeeck, *Chem. Ber.* **102**, 126 (1969).
- <sup>10</sup>R. E. Moore and P. J. Scheuer, *J. Org. Chem.* **31**, 3272 (1966).
- <sup>11</sup>G. Bendz, *Arkiv. Kemi.* **14**, 511 (1959).
- <sup>12</sup>L. A. Mitscher, W. W. Andres and W. McCrae, *Experientia* **20**, 258 (1964).
- <sup>13</sup>D. C. Aldridge, J. F. Grove and W. B. Turner, *J. Chem. Soc. (C)*, 126 (1966).
- <sup>14</sup>W. Brügel, *Kernresonanz-Spektrenatlas* bzw. S. S. Dharmatti, G. Govil, C. R. Kanckar, C. L. Khetrapal and Y. P. Virmani, *Proc. Ind. Acad. Sci. A* **56** 71-85 (1962).
- <sup>15</sup>*DMS-Kartei Nr. 8987 bzw. Sammlung des Instituts für Organische Chemie, Techn. Universität Berlin* 12/62.
- <sup>16</sup>C. S. Barnes and J. L. Occolowitz, *Austral. J. Chem.* **17**, 975 (1964).
- <sup>17</sup>G. Bendz, *Arkiv. Kemi.* **15**, 131 (1959).
- <sup>18</sup>E. V. Lassak and J. T. Pinhey, *J. Chem. Soc. (C)*, 2000 (1967).