

ANTIBIOTIKA AUS ACTINOMYCETEN. ZUR CHEMISCHEN KONSTITUTION DES ANTIBIOTIKUMS GRISEORHODIN A

II. ABLEITUNG DER STRUKTUR†

D. TRESSELT^a, K. ECKARDT^b und W. IHN^c

Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena, Abteilung Biophysikochemie,^a Antibiotika-Chemie^b und Chemische Analyse^c

(Received in Germany 7 October 1977; Received in the UK for publication 9 March 1978)

Zusammenfassung—Für das Antibiotikum Griseorhodin A wird auf Grund verschiedener chemischer Umsetzungen sowie auf Grund von IR-, NMR- und massenspektrometrischen Untersuchungen die Strukturformel 2a vorgeschlagen.

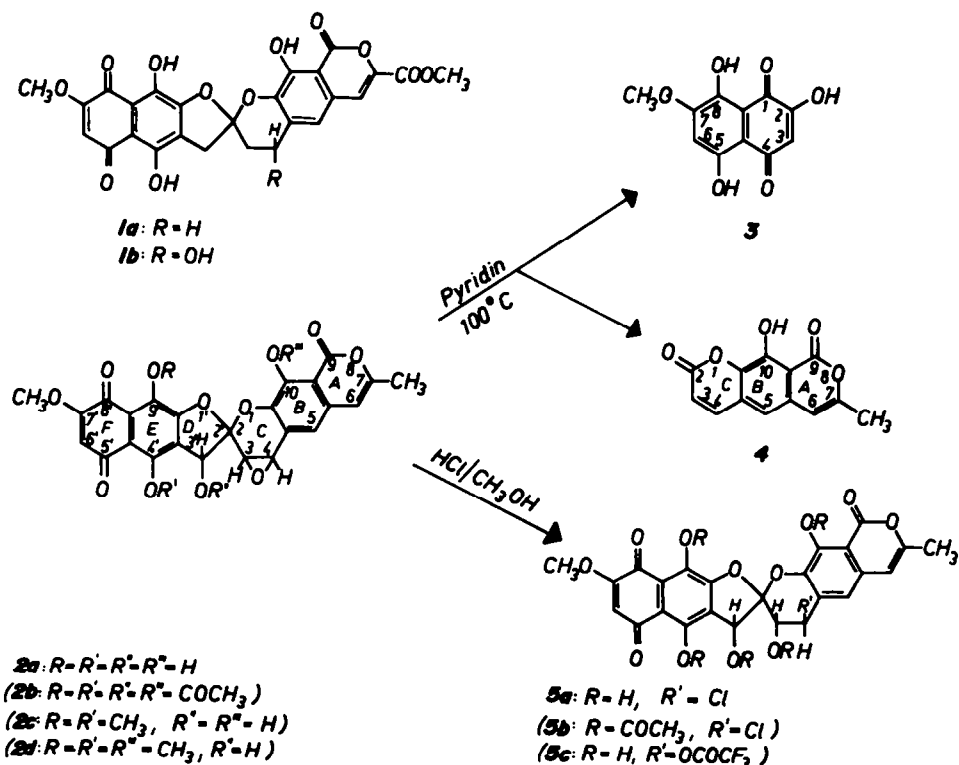
Abstract—On the basis of chemical reactions and studies of IR, NMR and mass spectra the structure 2a for the antibiotic griseorhodin A has been proposed.

Griseorhodin A ist ein Antibiotikum der Hydroxynaphthochinonreihe. In einer vorangegangenen Mitteilung¹ wurde über zwei chemische Spaltprodukte, (3) und (4), des Griseorhodin A berichtet. Auf Grund weiterer Derivate sowie deren NMR- und massenspektrometrischer Untersuchung wird für Griseorhodin A nunmehr die Konstitutionsformel 2a vorgeschlagen.

Griseorhodin A hat die Summenformel $C_{25}H_{16}O_{12}$.¹ Alle 16 Protonen sind im ¹H-NMR-Spektrum (Lösungsmittel: DMSO- D_6) nachweisbar und in der

Tabelle 1 angegeben. Von den 16 H-Atomen sind 3 in einer Methyl- und 3 in einer OCH_3 -Gruppe enthalten. Diese Substituenten wurden schon früher auf analytischem Wege nachgewiesen.^{2,3} 3 der verbleibenden 10 Protonen sind aromatisch/olefinischer Natur, weitere 3 entfallen auf chelierte phenolische Hydroxyle und 2 auf eine

H-C-OH-Gruppierung. Alle 4 Hydroxyle sind leicht acetylierbar; ihre NMR-Signale verschwinden nach H-D-Austausch. Die noch fehlenden beiden Protonen verursachen zwischen 4 und 4.5 ppm ein AB-System. Sie



Schema 1.

Tabelle 1. ¹H-NMR-Daten (δ-Werte in ppm)

	Griseorhodin A (2a)			Griseorhodin A in CF ₃ COOD ^a (5c)	Griseorhodin A tetraacetat (2b)	Griseorhodin A- chlorhydrin (5a)	Griseorhodin A- chlorhydrin- pentaacetat (5b)
	CDCl ₃ ^b	DMSO-D ₆	Pyridin-D ₅				
4'-OH	13,11 S	13,22 S				13,25 S	2,02 S
9'-OH	12,16 S, v	11,76 S, v			2,20 S	11,81 S, v	2,06 S
10-OH	11,06 S	10,80 S			2,21 S	10,89 S	2,28 S
OAc	-	-	-	-	2,34 S ^c	-	2,28 S
3'-OH		6,90 (A) ^c			2,42 S	ca. 6,57 (A)	2,40 S
3'-H	5,81 S	5,32 (X) ^c	6,10 S	6,02 S	6,74 S	5,26 (X)	6,65 S
		J _{AX} = 8 Hz ^c				J _{AX} = 8 Hz	
6'-H	6,22 S	6,37 S	6,38 S	6,57 S	6,00 S	6,41 S	5,96 S
5-H	6,98 S	7,10 S	7,01 S	7,22 S	7,28 S	7,17 S	7,28 S
6-H	6,29 (A)	6,44 (A)	6,24 (A)	6,55 (A)	6,13 (A)	6,57 (A)	6,15 (A)
7-CH ₃	2,30 (X)	2,23 (X)	2,09 (X)	2,38 (X)	2,21 (B)	2,25 (X)	2,21 (X)
	J _{AX} ~ 1 Hz	J _{AX} = 1 Hz	J _{AX} ~ 1 Hz	J _{AX} = 1 Hz	J _{AX} = 1 Hz	J _{AX} ~ 1 Hz	J _{AX} ~ 1 Hz
7'-OCH ₃	3,96 S	3,92 S	3,76 S	4,05 S	3,85 S	3,91 S	3,82 S
3-H	4,19 (A)	4,30 (A)	4,81 (A)	5,12 (A)	4,12 (A)	4,65 (A)	5,81 (A)
4-H	4,31 (B)	4,40 (B)	4,47 (B)	6,37 (X)	4,24 (B)	5,25 (X)	5,02 (X)
	J _{AB} = 4 Hz	J _{AB} = 4 Hz	J _{AB} = 4 Hz	J _{AX} = 2 Hz	J _{AB} = 4 Hz	J _{AX} = 2 Hz	J _{AX} = 1,6 Hz

S = Singulett.

v = Signal verbreitert.

^aIn Trifluoressigsäure sind die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstante der Protonen an 3-C und 4-C stark verändert, da der Epoxidring sofort unter Anlagerung von CF₃COOD (in Analoge zur Chlorhydrinbildung) geöffnet wird (siehe Formel 5c).

^bNach Spektralanakkumulation (36 × CAT).

^cDas 3'-OH-Signal und die Kopplung mit dem geminalen 3'-H zeigten sich im Spektrum erst nach chromatographischer Reinigung von Griseorhodin A an KH₂PO₄-behandeltem Kieselgel.

gehören, wie noch gezeigt wird, zu einem Epoxidring.

Die Sauerstoffatome verteilen sich auf die 4 Hydroxylgruppen, die Methoxygruppe, eine Chinon-gruppierung,¹ eine Lactongruppierung (verseifbar zur Carboxylgruppe), einen Epoxidring sowie zwei weitere O-Atome, für die keine direkte Zugehörigkeit zu einer funktionellen Gruppe gefunden wurde. Vergleichende Untersuchungen liessen erwarten, dass sie in Analogie zu dem von Brockmann und Zeeck aufgeklärten γ -Rubromycin (1a)³ und den Ergebnissen von Bardone *et al.*⁴ über die Struktur von Purpuromycin (1b) zu einem Spiroketalssystem gehören, das die beiden aromatischen Molekülteile des Griseorhodin A miteinander verbindet. Die für Griseorhodin A aufgestellte Konstitutionsformel 2a lässt sich aus den folgenden weiteren Ergebnissen ableiten.

Zum Naphthochinonteil des Moleküls

Die Elektronenspektren von Griseorhodin A und Purpuromycin in CHCl_3 , NaOH und konz. H_2SO_4 haben im sichtbaren Bereich einen nahezu identischen Verlauf.¹ Das liess erwarten, dass beiden Substanzen der gleiche Hydroxychinonchromophor zugrunde liegt. Der Beweis wurde durch die Isolierung von 2-Hydroxy-7-methoxynaphthazarin (3) als Spaltprodukt nach Behandlung von Griseorhodin A mit Pyridin bei 100°C erhalten.¹

Die Chinoncarbonylbanden im IR-Spektrum von 3 liegen infolge der beiden periständigen Hydroxylgruppen bei 1592 cm^{-1} . Die entsprechenden Banden des Griseorhodin A und des Purpuromycins¹ finden sich bei 1600 cm^{-1} , d.h. beide Hydroxylgruppen sind auch im Griseorhodin A unsubstituiert. Übereinstimmend damit enthält das NMR-Spektrum des Griseorhodin A (Tabelle 1) 2 den Chromophorhydroxylen zuzuordnende Signale, die auch im Purpuromycin⁴ und γ -Rubromycin³ bei fast gleicher chemischer Verschiebung zu finden sind.

Das Abbauprodukt 3 weist eine freie β -Hydroxylgruppe auf. Dies bewirkt einen stark sauren Charakter der Verbindung und damit ihre gute Löslichkeit in NaHCO_3 -Lösung und Wasser. Bei Griseorhodin A fehlt dagegen der saure Charakter, d. h. die β -Hydroxylgruppe ist im Griseorhodin A nicht frei, sondern substituiert. (Sie bildet eine Anknüpfungsstelle für den zweiten Molekülteil.) Dieser Unterschied zwischen Griseorhodin A und dem Abbauprodukt 3 führt auch zu Differenzen im langwelligen Teil der Absorptionsspektren in 2 N NaOH (Griseorhodin A: $\lambda_{\text{max.}} = 560, 592\text{ nm}$, Abbauprodukt 3: $\lambda_{\text{max.}} = 546, 565\text{ nm}$); die Spektren in CHCl_3 und H_2SO_4 konz. zeigen dagegen nur geringere Abweichungen.

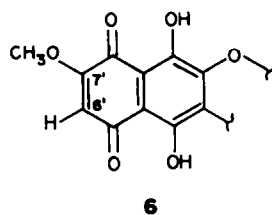
Durch die Isolierung des Spaltproduktes 3 steht die Position der Methoxygruppe an C-7' in Formel 2a fest. Die chemische Verschiebung der OCH_3 -Gruppe ist gegenüber dem Abbauprodukt 3 unverändert und entspricht den für Purpuromycin und γ -Rubromycin angegebenen δ -Werten.

Im Abbauprodukt 3 sind die noch verbleibenden Positionen 3 und 6 mit Protonen besetzt. Im Griseorhodin A steht dagegen nur 1 Proton für die beiden entsprechenden Positionen zur Verfügung, denn von den 3 insgesamt nachgewiesenen Aromat-Olefin-Protonen können die beiden anderen auf Grund ihrer NMR-Signale eindeutig dem Molekülrest zugeordnet werden. Wie später noch

gezeigt wird, entfallen auch alle noch vorhandenen Substituenten auf den restlichen Molekülteil, so dass eine der beiden freien Positionen des Naphthochinonteils noch eine weitere Anknüpfungsstelle für das Restmolekül bilden muss. Die andere ist mit dem noch zur Verfügung stehenden Proton besetzt (NMR-Signal in CDCl_3 bei $\delta = 6.22\text{ ppm}$, scharfes Singulett), das aus folgenden Überlegungen der Position 6' (Formel 2a) zuzuordnen ist: Auf Grund der geforderten Anzahl von Doppelbindungsäquivalenten und der nachfolgenden Befunde über das Restmolekül müssen die beiden Anknüpfungsstellen am Naphthochinon zu einem weiteren Ringsystem gehören. Wie aus Untersuchungen am Dreidringmodell hervorgeht, ist aber ein Ringschluss mit allen noch zur Verfügung stehenden Molekülfragmenten nur möglich, wenn die 2. Anknüpfungsstelle wie die erste am Ring E und nicht an dem weit entfernten C-6' sitzt.

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass der Naphthochinonchromophor des Griseorhodin A dem Chinonteil der Antibiotika γ -Rubromycin und Purpuromycin völlig analog ist. Entsprechend sind auch die chemischen Verschiebungen des Protons an C-6' (Griseorhodin A: 6.22 ppm ; γ -Rubromycin: 6.15 ppm ; Purpuromycin: 6.16 ppm) nahezu gleich. Dagegen liegt der δ -Wert des H-6 in 3 bei $\delta = 6.53\text{ ppm}$. Dies wird durch ein unterschiedliches Tautomeriegleichgewicht verursacht.^{3,6}

Zusammenfassend lassen sich die Befunde in der Teilformel 6 für den chromophoren Molekülteil des Griseorhodin A wiedergeben:



6

Zum Isocumarinteil des Moleküls

Die Isocumarinstruktur des zweiten aromatischen Molekülteils in Griseorhodin A geht aus dem Nachweis der Lactongruppe,² der analogen Lage der entsprechenden C=O-Bande in den IR-Spektren (vor und nach Acetylierung) der Antibiotika γ -Rubromycin, Purpuromycin und Griseorhodin A¹ sowie aus der Verwandtschaft des UV-Spektrums von reduzierend acetyliertem Griseorhodin A² mit dem des reduzierend acetylierten γ -Rubromycins⁵ hervor. Weitere Aussagen wurden durch die Isolierung des Isocumarinderivates 4 als Abbauprodukt des Griseorhodin A möglich¹. So finden sich die NMR-Signale aller Protonen der Ringe A und B von 4 (CH_3 : 2.39 ppm , 6-H: 6.56 ppm , 5-H: 7.20 ppm in CF_3COOD) im Griseorhodin A praktisch an gleicher Stelle unverändert wieder (Tabelle 1, Spektrum in CF_3COOD). Die Methylgruppe steht im Abbauprodukt 4 in Position 7. Sie hat, wie auch für das strukturanaloge Reticulol beschrieben,¹¹ eine charakteristische long-range Kopplung von 1 Hz zum Proton an C-6. Die entsprechenden Werte finden sich auch im Spektrum des Griseorhodin A. Dies bedeutet, dass Griseorhodin A im Gegensatz zu den bisher bekannten Antibiotika dieses Typs (Rubromycine und Purpuromycin) in Position 7 eine Methylgruppe anstelle der Carbomethoxygruppe enthält. Entsprechend fehlt im IR-Spektrum des Griseorhodin A die C=O-Bande der Carbomethoxy-

†Frau Dr. Maria Rosa Bardone (Research Laboratories, Gruppo Lepetit S. p. A., Milano) danken wir für eine Vergleichsprobe Purpuromycin.

gruppe, die bei γ -Rubromycin und Purpuromycin mit 1727 bzw. 1730 cm^{-1} angegeben wird.^{5,4}

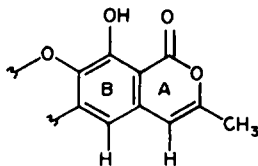
Die Lactoncarbonylbande findet sich im IR-Spektrum des Abbauproduktes 4 bei 1683 cm^{-1} , im Falle des Griseorhodin A bei 1690 cm^{-1} . Sie ist in beiden Verbindungen brückegebunden und wird durch Blockierung der H-Brücke in charakteristischer Weise verschoben.¹

Im Spektrum des Griseorhodin A-tetraacetates wird die Lactoncarbonylbande bei 1740 cm^{-1} von der Bande des alkoholischen Acetates überlagert. Die Bandenverschiebung durch Acetylierung ist daher in diesem Falle nicht beweiskräftig. Als besser geeignet erweist sich das Trimethylderivat (2d), wobei die Lactoncarbonylbande von 1690 cm^{-1} auf 1725 cm^{-1} verschoben wird. Neben 2d entsteht bei der Einwirkung von Diazomethan auf Griseorhodin A noch das Dimethylderivat 2c. Nach dem Massenspektrum ist in 2c nur der Hydroxychinonanteil um 28 Masseinheiten vergrößert, d. h. die OH-Gruppe an C-10 ist nicht methyliert. Entsprechend zeigt das IR-Spektrum von 2c oberhalb von 1690 cm^{-1} keine Bande.

Die intensive C=C-Valenzschwingungsbande des gelben Abbauproduktes bei 1645 cm^{-1} (sie findet sich auch im 8-Hydroxy-3-methyl-isocumarin⁷) ist im IR-Spektrum des Griseorhodin A ebenfalls vorhanden. Sie fehlt wegen der veränderten Substituenten (COOCH_3 statt CH_3) in den Spektren von γ -Rubromycin und Purpuromycin. Diese Bande wurde früher irrtümlich auf eine weitere Carbonylgruppe des Griseorhodin A zurückgeführt,² die sich aber nicht bestätigen liess.

Schliesslich zeigte sich, dass durch Vollacetylierung des Griseorhodin A (OCOCH_3 an C-10 anstelle von OH) das Signal des Protons an C-5 in CF_3COOD von 7.22 auf 7.63 ppm verschoben wird ($\Delta\delta = 0.41$ ppm). Für das Abbauprodukt 4 findet sich nach Acetylierung eine entsprechende Verschiebung für dieses Proton von $\Delta\delta = 0.43$ ppm.¹

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Ringe A und B von 4 auch im Molekül des Griseorhodin A unverändert vorhanden sind. Dagegen sind im Griseorhodin A weder die beiden olefinischen Protonen des Ringes C, noch die Carbonylgruppe dieses Ringes vorhanden. Das geht einerseits aus dem NMR-Spektrum des Griseorhodin A hervor, in dem das typische AB-System der beiden cis-ständigen Protonen (im Spektrum des gelben Abbauproduktes $J_{AB} = 9.8 \text{ Hz}^1$) fehlt. Andererseits weist das IR-Spektrum des Griseorhodin A keine Bande oberhalb 1690 cm^{-1} auf. (Im Spektrum des gelben Abbauproduktes gibt sich die Carbonylgruppe des Ringes C durch eine starke Doppelbande bei 1735/1750 cm^{-1} zu erkennen.¹) Wie noch bei den Untersuchungen über den mittleren Molekülteil abgehandelt wird, liegt Ring C jedoch ebenfalls als 6-Ring (in veränderter Form) vor. Zunächst jedoch kann der zweite aromatische Molekülteil nur wie in 7 formuliert werden, übereinstimmend damit, dass Griseorhodin A ausser den bisher nachgewiesenen keine weiteren aromatischen Protonen oder phenolische Hydroxylgruppen besitzt, die anstelle der beiden Anbindungen am aromatischen Ring B stehen könnten.



7

Nachweis der alkoholischen Hydroxylgruppe

Die bisherigen Teilformeln (6 und 7) zeigen, dass Griseorhodin A 3 phenolische Hydroxylgruppen enthält. Die alkoholische Natur der verbleibenden OH-Gruppe geht eindeutig aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Antibiotikums in DMSO-D_6 hervor (Tabelle 1, siehe dort auch Anmerkung c). Von den beiden Signalen bei 6.88 ppm und 5.30 ppm (gegenseitige Kopplung: $J_{AX} = 8 \text{ Hz}$) verschwindet das erstere nach H-D-Austausch. Dabei wird gleichzeitig die Aufspaltung des zweiten Signals

aufgehoben. Griseorhodin A muss deshalb eine H-C-

OH-Gruppierung enthalten, die von protonenfreien C-Atomen flankiert ist. (Das entsprechende $^{13}\text{C-NMR}$ -Signal findet sich im "off-resonance"-Spektrum bei $\delta = 75.47$ ppm als Dublett.) Wegen der chemischen Verschiebung des zur OH-Gruppe geminalen Protons in

CDCl_3 ($\delta = 5.81$ ppm) muss die H-C-OH-Gruppierung

neben einem aromatischen Ring angeordnet sein. In der acetylierten Verbindung ist dieses Signal nach niedrigerem Feld verschoben (Tabelle 1). Die Tieffeldverschiebung von 0.93 ppm deutet darauf hin, dass die H-

C-OH-Gruppierung einem gesättigten bzw. teilgesättig-

ten 5-Ring angehört.⁸

Das IR-Spektrum des Griseorhodin A-tetraacetates zeigt neben der phenolischen Acetatbande bei 1778 cm^{-1} noch eine Bande bei 1740 cm^{-1} , die einer alkoholischen Acetatbande zugeordnet werden kann. Wie schon erwähnt, ist aber in der vollacetylierten Verbindung bei gleicher Frequenz auch die Carbonylvalenzschwingungsbande des Isocumarinteils zu erwarten. Sie liegt beim γ -Rubromycinacetat⁷ bei 1739 cm^{-1} . Wegen der Überlagerung beider Banden ist das IR-Spektrum des Griseorhodin A-tetraacetates zum Nachweis der alkoholischen Hydroxylgruppe nicht geeignet.

Nachweis des Epoxidringes

Das verbleibende O-Atom entfällt auf einen Epoxidring. Zwei zugehörige cis-ständige Protonen verursachen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein AB-System mit einer Kopplungskonstante von $J_{AB} = 4 \text{ Hz}$ (Tabelle 1). (Die ^{13}C -Signale der beiden Kohlenstoffatome finden sich im "off-resonance"-Spektrum als Dublett bei 48.61 und 54.80 ppm.) Auf Grund der gefundenen chemischen Verschiebungen muss der Epoxidring in Nachbarstellung zu einem Aromaten angeordnet sein. Er ist von protonenfreien C-Atomen flankiert, da das AB-System keine weitere Aufspaltungen zeigt.

Der chemische Nachweis der Epoxidgruppe wurde durch Spaltung zum Chlorhydrin erbracht. Epoxide lagern allgemein leicht Halogenwasserstoff an.⁹ Durch Einwirkung von methanolischer Salzsäure auf Griseorhodin A in Dioxan entstand ein Gemisch mehrerer Reaktionsprodukte. Nach chromatographischer Trennung kristallisierte das Chlorhydrin (5a) ($\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{O}_{12}\text{Cl}$) in Form von roten Nadelchen. Das Molekül enthält nach dem Massenspektrum und der Elementaranalyse 1 Cl-Atom und bildet im Gegensatz zu Griseorhodin A mit Essigsäureanhydrid/Pyridin ein Pentaacetat (5b).

Dass Chlorwasserstoff, wie erwartet, durch Spaltung einer 1,2-Epoxidgruppe angelagert wurde, zeigt der

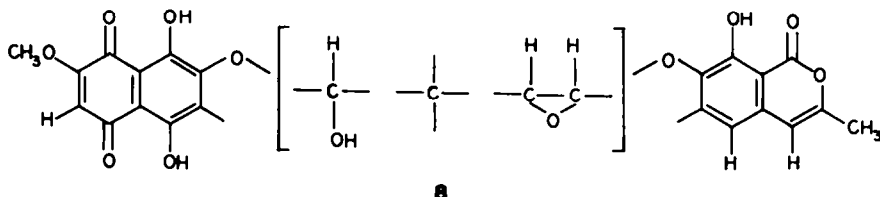
Vergleich der NMR-Spektren (Tabelle 1). Im Griseorhodin A-chlorhydrin beträgt die Kopplungskonstante zwischen den beiden vicinalen Protonen (die ehemaligen Epoxidprotonen sind jetzt geminal zum Chlor bzw. zur OH-Gruppe angeordnet) $J_{AX} = 2$ Hz. Das schließt aus, dass der Epoxidring im Griseorhodin A an einer aliphatischen Kohlenwasserstoffkette angeordnet ist, da in diesem Falle nach der Epoxidspaltung wegen der zu erwartenden freien Drehbarkeit eine Vicinalkopplung von ca. 7 Hz auftreten sollte. Die gefundene Kopplung von 2 Hz im Griseorhodin A-chlorhydrin spricht in Verbindung mit der beobachteten 4 Hz-Kopplung der Epoxidprotonen¹⁰ vielmehr dafür, dass die Epoxidgruppe in einem gesättigten bzw. teilgesättigten 6-Ring liegt. Nach der Epoxidspaltung sind dann die beiden Substituenten (Cl und OH) in der Regel transdiaxial angeordnet. Damit steht auch der gefundene Wert von 2 Hz für die Vicinalkopplung der beiden äquatorialen Protonen gut im Einklang.

Der Gesamtaufbau des Moleküls

Der Chinonchromophor und die Ringe A und B des Isocumarinrestes enthalten insgesamt 21 C-Atome. Beide Molekülteile sind daher über maximal 4 C-Atome miteinander verbunden. Wie bereits gezeigt, entfallen 3

der 4 C-Atome auf eine $\text{H}-\text{C}-\text{OH}$ - und eine

Epoxidgruppierung. Da keine weiteren Protonen vorhanden sind, lassen sich alle Befunde zur Teilformel 8 zusammenfassen:



Die Struktur des mittleren Teils ergibt sich zwangsläufig aus den Befunden, dass (a) die Epoxidgruppe an einen aromatischen Ring anschliesst,

(b) die Protonen der Epoxidgruppe und der $\text{H}-\text{C}-\text{OH}$ -Gruppe nicht miteinander koppeln und daher nicht

benachbart sind und (c) diese beiden Gruppen auf Grund der chemischen Verschiebungen ihrer Kohlenstoffatome im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht mit weiterem Sauerstoff verknüpft sein können. Diese Bedingungen sind nur in den Anordnungsmöglichkeiten 9 und 10 erfüllt. Damit ist die Epoxidgruppe, wie schon vorher aus den Kopplungskonstanten geschlussfolgert wurde, Teil eines 6-Ringes.

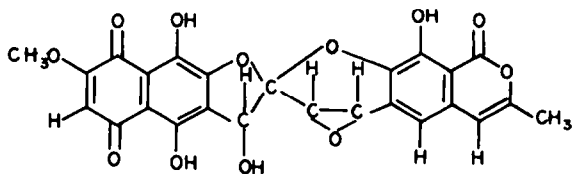
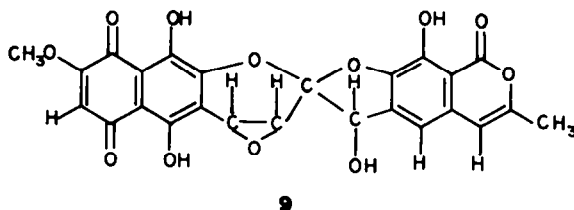
Formel 10 entspricht dem Aufbau der Antibiotika γ -Rubromycin und Puromycin, für die Brockmann *et al.* bzw. Bardone *et al.* das gleiche Spiroketalssystem gefunden haben. Aus biogenetischen Gründen ist 10 als Struktur für Griseorhodin A der Formel 9 unbedingt vorzuziehen, wofür auch die Entstehung des Abbauproduktes 4 und die nachfolgende Interpretation des massenspektrometrischen Fragmentierungsverhaltens sprechen.

Im Massenspektrum des Griseorhodin A¹ treten neben dem Peak des Moleküls M^+ bei $m/e = 508,0635$ und einigen schwachen, weniger charakteristischen Peaks im oberen Massebereich besonders im mittleren Bereich mehrere, zum Teil sehr intensive Peaks signifikanter Bruchstückionen auf.

Der primäre massenspektrometrische Zerfall des Griseorhodin A nahezu in der Molekülmitte in ein Isocumarin- und Naphthazarinfragment zeigt hierbei gewisse Parallelen zur elektronenstossinduzierten Bruchstückbildung der strukturell verwandten Antibiotika γ -Rubromycin^{5,3} und Purpuromycin.^{4,12}

Im Unterschied zum γ -Rubromycin, in dessen Spektrum die intensivsten Fragmentionen sich ausschliesslich vom Naphthazarinringsystem ableiten und der Isocumarinmolekülteil durch kein signifikantes Fragmention

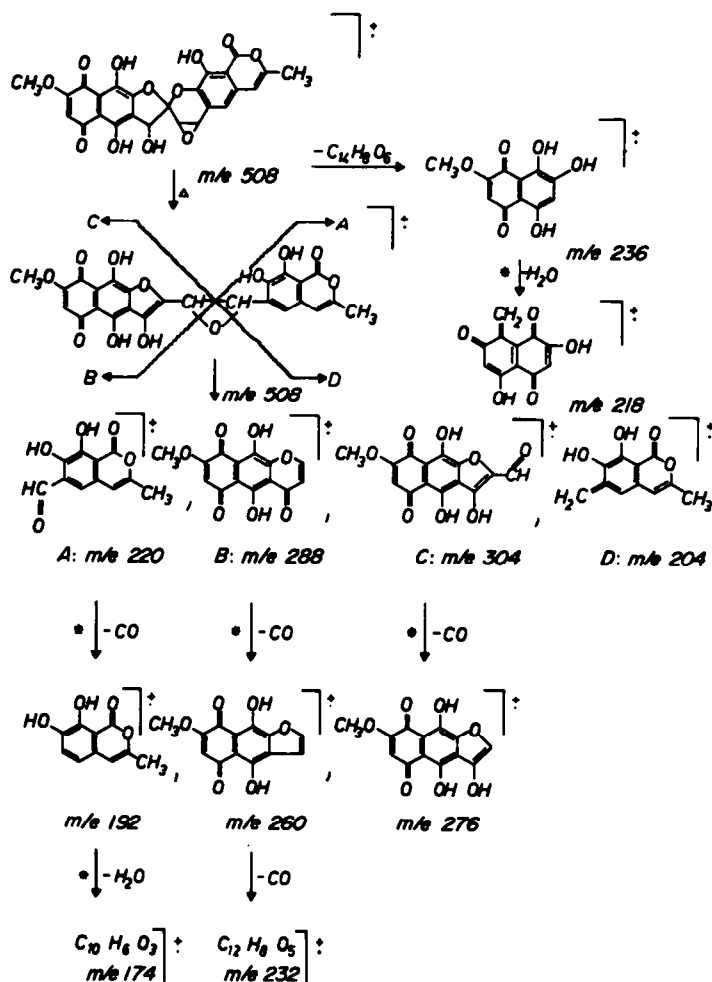
angezeigt wird, werden sowohl bei der Fragmentierung des Griseorhodin A als auch bei der des Purpuromycins (offenbar durch die Anwesenheit einer zusätzlichen Sauerstofffunktion am C-4-Atom und der dadurch verstärkten Ladungsalokalisierung am Isocumarinringsystem) auch diesem Molekülteil entsprechende, eindeutige Bruchstückionen gebildet.



Bei dem im folgenden skizzierten Fragmentierungsprozess des Griseorhodin A, der durch die Bestimmung der elementaren Zusammensetzung und der Aufnahme der DADI-Spektren einzelner Fragmentationen belegt wird, nehmen wir an, dass sich das ungeladene Molekül bzw. das Molekülion in Analogie zur u. a. auch thermisch induzierten Isomerisierung des γ -Rubromycins und Purpuromycins zu den entsprechenden Iso-Verbindungen vor der Fragmentierung unter Öffnung des Pyranrings umlagert.

Retro-Diels-Alder-Reaktion gebildeten Isocumarinfragmentation der Masse m/e 264. Durch den unterschiedlichen Substituenten am C-7-Atom (Methyl- gegenüber Carbomethoxygruppe) ist jedoch die Massenzahl des Fragmentations A um 44 Masseneinheiten auf m/e 220 erniedrigt.

Während die Fragmentationen A und D und die hieraus durch Eliminierung von CO bzw. H_2O gebildeten intensiven Fragmentationen der Massen m/e 192 und 174 für den Isocumarinmolekülteil diagnostisch interessant sind,



Schema 2.

Fragmentierungsschema des Griseorhodin A (Die durch DADI-Spektren belegten Fragmentierungszüge sind durch* gekennzeichnet.)

Das Umlagerungsprodukt zeigt die für nicht endständige Epoxide typische Fragmentierung, wobei u. a. durch transannuläre Spaltung¹³ die Fragmentationen A, B, C und D gebildet werden. Für das Methoxynaphthazarinfragment der Masse m/e 236, das auch in den Massenspektren von γ -Rubromycin und Purpuromycin auftritt, nehmen wir die von Zerilli¹² postulierte Bildung direkt aus dem Molekülion an. Dieses Fragmentation zeigt auch im DADI-Spektrum die für Methoxynaphthazarine charakteristische Eliminierung von H_2O ,¹⁴ die zum Fragment der Masse m/e 218 führt. Das Isocumarinfragmentation A, das im Griseorhodinspektrum Basispeak ist, entspricht dem aus Purpuromycin im Zuge einer

charakterisieren die Fragmentationen B und C sowie die hieraus durch Eliminierung von CO gebildeten intensiven Fragmentationen der Massen m/e 276, 260 und 232 den Naphthazarinmolekülteil. Aus der Lage dieser Schlüsselbruchstücke können bei Umwandlungsprodukten des Griseorhodin A leicht Aussagen über Veränderungen im Molekül gemacht werden. So sind u. a. die Massenzahlen der charakteristischen Fragmente A, B und C im Massenspektrum von 2d (Trimethylderivat) gegenüber dem von 2a um 14 bzw. 28 Masseneinheiten erhöht. Das bei der Umsetzung von Griseorhodin A mit Diazomethan neben dem Trimethylderivat isolierte Dimethylderivat (2c) zeigt im Massenspektrum, dass u. a. nur die Massenzahlen der Naphthazarinfragmente B und C um 28 Masseneinheiten erhöht sind. Die unveränderte Lage des Fragmentations A bei der Masse m/e 220 lässt, wie

schon das IR-Spektrum, den Schluss zu, dass bei dem Dimethylderivat die OH-Gruppe an C-10 nicht methyliert ist.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit einem 100-MHz-Kernresonanzspektrometer des Zentralinstitutes für wissenschaftlichen Gerätebau der Akademie der Wissenschaften der DDR aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden CDCl_3 , DMSO- d_6 , Pyridin- d_5 und CF_3COOD benutzt (Tetramethylsilan als innerer Standard). Die Aufnahme der Messenspektren erfolgte an einem doppelfocussierenden JEOL-Gerät Typ JMS-D 100 (Beschleunigungsspannung 3 kV, Direkteinlass, Proben temperatur 200–250°C, Ionenquellentemperatur 220–270°C) bei einer Elektronenstossenergie von 75 eV. Die genauen Massebestimmungen der Molekül- und Fragmentionen wurden bei einer Auflösung von ca. 10000 nach der "peakmatching"-Methode mit PFK als Referenzverbindung durchgeführt.

Reinigung von Griseorhodin A

Zur analytischen Untersuchung wurde Griseorhodin A chromatographisch gereinigt. Dazu gab man eine gesättigte Lösung von vorgereinigtem Griseorhodin A in $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5) auf eine Säule mit KH_2PO_4 -behandeltem Kieselgel¹ (Säulenmasse 3×40 cm, KG eingeschlämmt mit dem gleichen Lösungsmittel) und eluierte mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5). Die roten Hauptzonen mehrerer Säulen wurden vereinigt und eingeeengt. Griseorhodin A fiel aus dem Konzentrat nach Kühlen als roter, mikrokristalliner Niederschlag aus. Rotes Pulver, Schmp.: 288–290°C (Zers.). $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{O}_{12}$, (508). Ber. C, 59.06; H, 3.15; Gef. C, 58.85; H, 3.33. δ m/e Gef. 508.0635 $[\text{M}]^+$, 304.0096 $[\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_6]^+$, 288.0253 $[\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_7]^+$, 276.0303 $[\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_7]^+$, 260.0285 $[\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_6]^+$, 236.0327 $[\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_6]^+$, 232.0371 $[\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_5]^+$, 220.0368 $[\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_5]^+$, 218.0200 $[\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_5]^+$, 204.0392 $[\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_4]^+$, 192.0405 $[\text{C}_{10}\text{H}_5\text{O}_4]^+$, 174.0331 $[\text{C}_{10}\text{H}_5\text{O}_3]^+$.

Tetraacetat des Griseorhodin A (2b)

400 mg Griseorhodin A wurden in 12 ml Pyridin bei Zimmertemp. gelöst und die gleiche Menge Essigsäureanhydrid zugefügt. Nach 20 min. wurde der gleiche Anteil Chloroform zugefügt und das Acetat mit einem Überschuss Petroläther ausgefällt, wobei es sich als braunes Öl abschied. Nach Abgießen wurde das verbleibende Öl mit Petroläther gewaschen und mit wenig Chloroform aufgenommen. Zur Reinigung wurde an HCl-behandeltem Kieselgel chromatographiert (Säulenmasse 3×35 cm, Elutionsmittel Chloroform/Aceton (90:10)). Nach einer schwächeren Vorzone folgte die gelbe Hauptzone, aus der das Acetat durch Abdampfen und Umkristallisation des Rückstandes aus Äthylalkohol als gelbe Mikrokristalle gewonnen wurde. Schmp.: 210–212°C (Zers.). $\text{C}_{33}\text{H}_{24}\text{O}_{16}$ (676) (Massenspektrum) Ber. C, 58.58; H, 3.55. Gef. C, 58.74; H, 3.67. δ m/e Gef. 634.0991 $[\text{M}-\text{COCH}_3]^+$.

Methylierung mit Diazomethan

700 mg Griseorhodin A wurden in 200 ml Chloroform aufgeschlämmt und bei 0°C mit einem Überschuss an ätherischer Lösung von Diazomethan versetzt. Unter Umschütteln ging nach und nach alle Substanz in Lösung. Nach 5 h Stehen bei 0–5°C wurde die filtrierte Lösung i. Vak. zur Trockne abdestilliert. Zur Reinigung wurde der Rückstand in wenig Essigsäureäthylester gelöst und an KH_2PO_4 -behandeltem Kieselgel chromatographiert (Säulenmasse 3.8×45 cm KG eingeschlämmt mit Essigester). Bei Elution mit dem gleichen Lösungsmittel wanderte zunächst eine rote Zone (Zone 1), dann folgten zwei gelbe Zonen (2 und 3). Die Eluate der Zone 3 wurden eingeeengt und gekühlt, wobei Dimethylgriseorhodin A (2c) ausfiel: Orangerote Mikrokristalle, Schmp. > 300°C. $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ (aus dem Massenspektrum. Ber. 536.0954, Gef. 536.0960). IR (C=O): 1630 cm^{-1} , 1681 cm^{-1} . (Keine

C=O-Bande oberhalb 1681 cm^{-1}). m/e Gef. 536.0960 $[\text{M}]^+$, 522.0750 $[\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{O}_{12}]^+$. Trimethylgriseorhodin A (2d) wurde aus der Mutterlauge der eingeeengten Zone 3 durch Fällung mit n-Hexan und Umkristallisation aus Äthylalkohol erhalten. Orange mikrokristalline Substanz. Zers. unterhalb des Schmp. $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ (550) (Massenspektrum) Ber. C, 61.09; H, 4.00; Gef. C, 60.86; H, 4.02. IR (C=O): 1630, 1690, 1725 cm^{-1} . m/e Gef. 536.0680 $[\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7]^+$, 302.0441 $[\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7]^+$, 234.0536 $[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3]^+$.

Chlorhydrin (5a)

500 mg Griseorhodin A wurden, wie zur Gewinnung des HCl-Produktes beschrieben,² mit methanolischer Salzsäure behandelt. Das entstandene Produkt bestand aus mehreren Komponenten. Zur Abtrennung von 5a wurde das Umsetzungsprodukt in Essigsäureäthylester gelöst und an KH_2PO_4 -behandeltem Kieselgel (Säulenmasse 2.5×35 cm, KG eingeschlämmt mit Essigsäureäthylester) chromatographiert. Bei Elution mit dem gleichen Lösungsmittel wanderten mehrere Zonen. Die Eluate der am schnellsten wandernden hellroten Zone aus mehreren Säulen wurden vereinigt und eingeeengt. 5a kristallisierte in Form von hellroten Nadelchen aus. Umkristallisation aus Essigester. Schmp. 249–251°C (Zers.). $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{O}_{12}\text{Cl}$, (544) (Massenspektrum) Ber. C, 55.15; H, 3.13; Cl, 6.44. Gef. C, 54.83; H, 2.95; Cl, 6.87.

Pentaacetat von 5a

20 mg der Substanz 5a wurden in 0.6 ml Pyridin gelöst und die gleiche Menge Essigsäureanhydrid zugefügt. Nach 6 h Stehen bei Zimmertemp. wurde in Wasser eingegossen, wobei das Acetat nach kurzer Zeit ausfiel. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Zur Reinigung wurde das Acetat in CHCl_3 gelöst und an KH_2PO_4 -behandeltem Kieselgel chromatographiert. Die Substanz wanderte bei Elution mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5) als gelbe Zone, die aufgefangen und i. Vak. zur Trockne eingeeengt wurde. Der Rückstand kam direkt zur Messung. Gelbes Pulver, $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{O}_{17}\text{Cl}$ (754) (Massenspektrum) m/e Gef. 712.1942 $[\text{M}-\text{COCH}_3]^+$.

Danksagungen—Wir danken Herrn Dr. P. Sedmera, Institut für Mikrobiologie der ČSAV, Prag, für die Aufnahme der DADI-Spektren und Herrn Dr. L. Radics, Zentralinstitut für Chemie der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest, für ^{13}C -NMR-Messungen. Herrn Dr. Fritzsche, Jena, sind wir für IR-Messungen, Herrn Prof. Dr. Berg sowie Herrn Dr. Flemming, Jena, für polarographische Messungen verbunden.

LITERATUR

- ¹K. Eckardt, D. Tresselt und W. Ihn, *Tetrahedron* **34**, 399 (1978).
- ²K. Eckardt, *Chem. Ber.* **98**, 24 (1965).
- ³H. Brockmann und A. Zeeck, *Ibid.* **103**, 1709 (1970).
- ⁴M. R. Bardone, E. Martinelli, L. F. Zerilli und C. Coronelli, *Tetrahedron* **30**, 2747 (1974).
- ⁵H. Brockmann, W. Lenk, G. Schwantje und A. Zeeck, *Chem. Ber.* **102**, 126 (1969).
- ⁶R. E. Moore und P. J. Scheuer, *J. Org. Chem.* **31**, 3272 (1966).
- ⁷G. Bendz, *Arkiv Kemi.* **14**, 511 (1959).
- ⁸N. S. Bhacca und D. H. Williams, *Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry*, S. 83. Holden-Day, San Francisco (1966).
- ⁹G. Dittus, In Houben-Weyl, *Methoden der Organischen Chemie* Band VI/3, S. 448. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1965).
- ¹⁰N. S. Bhacca und D. H. Williams, *Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry*, S. 99. Holden-Day, San Francisco, (1966).
- ¹¹L. A. Mitscher, W. W. Andres und W. McCrae, *Experientia* **20**, 258 (1964).
- ¹²L. F. Zerilli, M. Landi, G. G. Gallo und M. R. Bardone in A. Frigario und N. Castagnoli, *Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*, S. 235. Raven Press, New York (1974).
- ¹³P. Brown, J. Kossanyi und C. Djerassi, *Tetrahedron Suppl.* **8**, Part. I, 241 (1966).
- ¹⁴D. Becher, C. Djerassi, R. E. Moore, H. Singh und P. J. Scheuer, *J. Org. Chem.* **31**, 3650 (1966).

§Die Substanzen halten sehr stark Lösungsmittel fest, woraus frühere abweichende Analysenergebnisse erklärbar sind.