

LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER
GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

JAHRGANG 1981 · HEFT 12 · SEITE 2099–2418

Antibiotika aus Basidiomyceten, XII¹⁾

Cristatsäure, ein modifiziertes Farnesylphenol aus Fruchtkörpern von *Albatrellus cristatus*

Lothar Zechlin^a, *Maria Wolf*^a, *Wolfgang Steglich*^{*a} und *Timm Anke*^b

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn^a,
Gerhard-Domagk-Str. 1, D-5300 Bonn, und

Institut für Biologie I der Universität Tübingen^b,
Auf der Morgenstelle 1, D-7400 Tübingen

Eingegangen am 7. Januar 1981

Fruchtkörper von *Albatrellus cristatus* enthalten in hoher Konzentration Cristatsäure (3), ein Farnesylphenol, dessen Seitenkette durch Einbau eines Furanringes modifiziert ist. In einer nahe verwandten amerikanischen *Albatrellus*-Art kommt anstelle von 3 Grifolsäure (6) vor. Die biologische Aktivität von 3, 6 und verwandten Meroterpenoiden wird untersucht, wobei besonders die cytotoxische Wirkung von Dimethylcristatsäure-methylester (4) bemerkenswert ist.

Antibiotics from Basidiomycetes, XII¹⁾. – Cristatic Acid, a Modified Farnesylphenol from Fruiting Bodies of *Albatrellus cristatus*

Fruiting bodies of *Albatrellus cristatus* contain high concentrations of cristatic acid (3), a farnesylphenol modified by incorporation of a furan ring in its side chain. A closely related American *Albatrellus* species contains grifolic acid (6) instead of 3. Biological screening of 3, 6 and related meroterpenoids revealed remarkable cytotoxic activities especially for dimethylcristatic acid methyl ester (4).

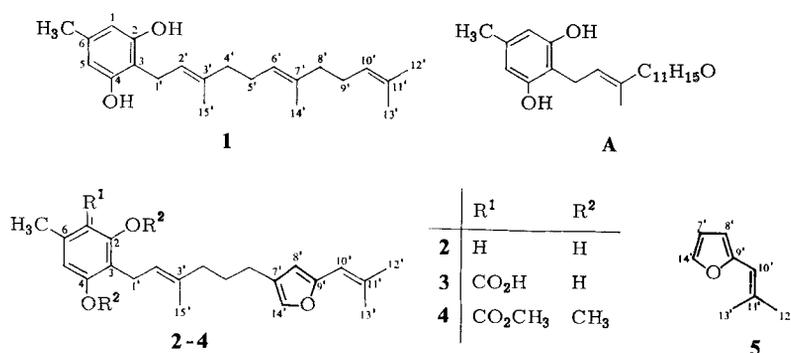
Aus Fruchtkörpern von „*Grifola confluens*“ isolierten japanische Forscher 1950 ein schwach wirksames Antibiotikum, Grifolin²⁾, dessen korrekte Konstitution 1 einige Jahre später ermittelt wurde³⁾. Kürzlich wurde gezeigt, daß 1 und verwandte Farnesylphenole in Pilzen der Gattung *Albatrellus* vorkommen^{4,5)}, so daß an der Identität des japanischen Pilzes mit dem Semmelporling, *A. confluens*, kein Zweifel besteht. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Inhaltsstoffe des Grünen Kammporlings, *A. cristatus* (Schaeff. ex Fr.) Kotl. et Pouz.

Liebigs Ann. Chem. 1981, 2099–2105

© Verlag Chemie GmbH, D-6940 Weinheim, 1981
0170–2041/81/1212–2099 \$ 02.50/0

Läßt man Dünnschichtchromatogramme von Rohextrakten des in Bayern gesammelten Pilzes einige Zeit an der Luft liegen oder setzt sie Säuredämpfen aus, so entwickelt sich ein violetter Fleck, der sich rasch nach Türkisgrün verfärbt⁶⁾. Verantwortlich für diese Farbreaktion ist Cristatsäure (3), die durch Petrolether-Extraktion der gefriergetrockneten Fruchtkörper in Ausbeuten bis zu 4.7% des Trockengewichtes erhalten werden kann. Neben 3 konnten wir aus den Pilzen noch Mannit (8.5%) sowie das bereits von *Bresinsky* und Mitarbeitern⁷⁾ nachgewiesene Atromentin (0.1%) isolieren. Daneben kommen noch einige gelbbraune Pigmente vor, deren Menge jedoch für eine nähere Charakterisierung nicht ausreichte.

Cristatsäure besitzt die Summenformel $C_{23}H_{28}O_5$ und zeigt im Massenspektrum neben dem schwachen Molekülion ein intensives Ion $M^{\oplus} - CO_2$. Durch Erhitzen mit Pyridin erfolgt Decarboxylierung zu Cristatin (2), Permethylierung mit Methyljodid/Kaliumcarbonat in Dimethylformamid liefert einen Dimethylether-methylester 4.



Tab. 1. 1H -NMR-Spektren von Grifolin (1)³⁾, Cristatin (2), Cristatsäure (3) und Grifolsäure (6) (δ -Werte; TMS als innerer Standard in $CDCl_3$)^{a)}

	1	2	3	6
1-H	s 6.24	s 6.22	—	—
5-H	s 6.24	s 6.22	s 6.26	s 6.26
8-H	s 2.19	s 2.18	s 2.52	s 2.52
1'-H	d 3.38	d 3.38	d 3.42	d 3.42
2'-H	t 5.26	t 5.26	t 5.27	t 5.29
4'-H	m { 1.92 bis 2.10	t 2.05	t 2.07	m { 1.89 bis 2.16
5'-H	m 5.08	m 1.64	m 1.64	m 5.08
6'-H	m 5.08	t 2.33	t 2.34	m 5.08
8'-H	m { 1.92 bis 2.10	s 6.02	s 6.02	m { 1.92 bis 2.10
9'-H	—	—	—	—
10'-H	m 5.08	m 6.00	m 6.00 ^{b)}	m 5.08
12'-H	s 1.67	s 1.86	s 1.87	s 1.67
13'-H	s 1.58	s 1.94	s 1.94	s 1.59
14'-H	s 1.58	s 7.06	s 7.07	s 1.59
15'-H	s 1.81	s 1.78	s 1.80	s 1.81
OH	—	s ^{c)} 4.80	s ^{c)} ≈ 11.8	—

a) Alle Signale sind durch Fernkopplungen mehr oder weniger verbreitert; $J_{8',14'} = 0.75$ Hz (2, 3).
 — b) In $[D_5]Pyridin$, $\delta = 6.13$, Halbwertsbreite 4 Hz. — c) Breites Signal.

Hilfreich für die Ableitung der Konstitution war ein Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **2** ($\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_3$) mit dem von Grifolin (**1**) ($\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$). Wie aus Tab. 1 ersichtlich, stimmen die Signale des Orcinkerns und des direkt daran gebundenen Prenylrestes der Seitenkette überein, so daß sich für **2** die Partialformel **A** ergibt.

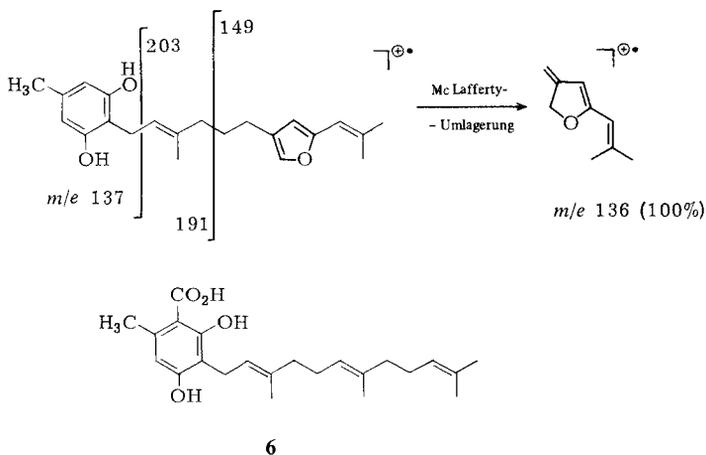
Cristatin enthält in der Seitenkette ein zusätzliches Sauerstoffatom. Berücksichtigt man, daß die Verbindung gegenüber **1** vier H-Atome weniger enthält und daß im Aromatenbereich zwei verbreiterte Singulets bei $\delta = 6.02$ und 7.06 auftreten, so muß in der Seitenkette ein Furanring enthalten sein, der zur terminalen Isobutenylgruppe konjugiert steht. Damit ergibt sich für Cristatin die Formel **2**, die durch die $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten (Tab. 2) bestätigt wird. Die chemischen Verschiebungen stimmen gut mit denen von **1** und synthetischem 2-(2-Methyl-1-propenyl)furan (**5**)⁸⁾ überein. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Cristatsäure (**3**) wird durch den Anisotropieeffekt der *ortho*-ständigen Carboxylgruppe das Singulett der aromatischen Methylgruppe um 0.34 ppm nach tieferem Feld verschoben. Da Furanderivate mit Mineralsäuren intensive Farbreaktionen zeigen⁹⁾, wird das eingangs erwähnte Verhalten der Cristatsäure durch Formel **3** zwanglos erklärt.

Tab. 2. $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrern von Grifolin (**1**), Cristatin (**2**), Cristatsäure (**3**), 2-(2-Methyl-1-propenyl)furan (**5**) und Grifolsäure (**6**) (δ -Werte, TMS als innerer Standard; in CDCl_3)

	1	2	3	6	1	2	3	5	6	
C-1	109.1	109.0	112.0	111.6	C-1'	22.2	22.2	22.0	—	22.0
C-2	154.9	155.2	160.3	160.5	C-2'	121.8	122.4	121.7	—	121.4
C-3	110.6	110.9	104.0	104.7	C-3'	137.6	137.4	138.3	—	139.1
C-4	154.9	155.2	163.8	163.7	C-4'	39.7	39.2	39.2	—	39.7
C-5	109.1	109.0	112.0	111.9	C-5'	26.4	28.2	28.2	—	26.4
C-6	138.9	138.0	142.7	142.5	C-6'	123.7	24.5	24.5	—	123.7
C-7	21.1	21.1	24.2	24.2	C-7'	135.7	126.4	126.4	111.0	135.7
C-8	—	—	176.8	175.5	C-8'	39.7	108.8	108.8	107.2	39.7
					C-9'	26.7	153.7	153.8	153.9	26.7
					C-10'	124.5	114.7	114.6	114.6	124.5
					C-11'	131.3	134.7	134.8	134.9	131.3
					C-12'	25.7	26.9	27.0	26.9	25.7
					C-13'	17.7	20.1	20.1	20.0	17.7
					C-14'	16.3	136.9	136.9	140.5	16.3
					C-15'	16.1	16.2	16.2	—	16.1

Im Massenspektrum der Verbindungen **2** und **3** tritt als Basispeak ein Ion m/e 136 ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}$) auf, das durch Spaltung der Seitenkette unter McLafferty-Umlagerung entsteht. Weitere intensive Ionen im Spektrum von **2** und **3** sind das Benzyl-Ion m/e 137 ($\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2$) und die im Schema angegebenen Fragmente m/e 203 ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}$) und m/e 149 ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$).

Überraschenderweise lieferte die Extraktion eines in den östlichen USA gesammelten Pilzes, der morphologisch von *Albatrellus cristatus* nur wenig abweicht, keine Cristatsäure, sondern geringe Mengen einer öligen Carbonsäure $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$. Nach den spektroskopischen Daten (Tab. 1 und 2) handelt es sich dabei um die bisher unbekannte Grifolsäure (**6**)¹⁰⁾, die als biosynthetische Vorstufe des Grifolins (**1**) anzusehen ist.



Biologische Wirksamkeit

Alle untersuchten Meroterpenoide, mit Ausnahme des Permethylderivates **4**, besitzen antibakterielle und hämolytische Eigenschaften. Die Hemmwirkungen gegen die Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *B. brevis* zeigt Tab. 3. Pilze (*Penicillium notatum* und *Eremothecium ashbyi*) und *Escherichia coli* K12 wurden im Plattendiffusionstest nicht gehemmt. Dies stimmt gut mit den von *Hirata* und *Nakanishi*²⁾ für Grifolin publizierten Befunden überein.

Tab. 3. Plattendiffusionstest (100 µg pro Rondelle, Hemmhofdurchmesser in mm)

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus brevis</i>
Grifolin (1)	11	12
Cristatin (2)	11	9
Cristatsäure (3)	17	16
Permethylcristatsäure (4)	–	–
Grifolsäure (6)	14	12

Die hämolytischen Eigenschaften der Verbindungen sind in Tab. 4 wiedergegeben. Wie bei den von uns untersuchten Merulinsäuren¹¹⁾ ist die Kombination eines Phenolringes mit einer lipophilen Seitenkette für die hämolytische Aktivität verantwortlich. Permethylierung führt auch im Falle der Cristatsäure zu einem Verlust der hämolytischen Eigenschaften.

Der Einfluß von **3**, **4** und **6** auf die Makromolekülsynthesen in Zellen des *Ehrlich Ascites* Carcinoms der Maus wurde wie früher beschrieben¹²⁾ getestet. Tab. 5 zeigt die Wirkung der Meroterpenoide auf den Einbau von radioaktiv markiertem Leucin, Uridin und Thymidin in säureunlösliches Material (Protein, RNS und DNS). Alle drei Verbindungen besitzen eine erhebliche cytotoxische Aktivität, die beim Permethylderivat der Cristatsäure umso bemerkenswerter ist, weil **4** weder eine Hemmwirkung gegenüber Bakterien noch hämolytische Eigenschaften aufweist.

Tab. 4. Test auf hämolytische Eigenschaften (% Hämolyse bei den angegebenen Konzentrationen an Wirkstoff)

	100 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml
1	100	100	10
2	33	27	10
3	100	56	4
4	0	0	0
6	65	10	0

Tab. 5. Einbau von ^{14}C -Leucin, ^{14}C -Uridin und ^{14}C -Thymidin in Protein, RNS und DNS in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms nach Zugabe von 20 µg/ml 3, 4 oder 6 (in % der Kontrollen ohne Antibiotikum)

	Leucin	Uridin	Thymidin
3	23	4	3
4	100	16	47
6	90	18	67

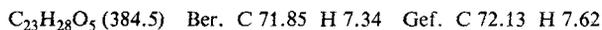
Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Förderung dieser Arbeit. Herrn Professor Dr. A. Bresinsky, Regensburg, sind wir für die Bestimmung der Pilze, Herrn Dr. G. Eckhardt, Bonn, für die Massenspektren und Herrn C. Schmidt, Bonn, für die Aufnahme der NMR-Spektren zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil

UV-Spektren: Varian Cary 219. – IR-Spektren: Pye Unicam SP 1100. – ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren: Bruker WH 90 (TMS als innerer Standard, δ -Werte). – Massenspektren: AEI MS-50 mit Datenverarbeitung, Direkteinlaß, 70 eV. – Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert. – Für die DC wurden Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. Merck verwendet; Fließmittelsystem: Benzol/Ameisensäure-ethylester/Ameisensäure (10: 5: 3).

Albatrellus cristatus wurde im September 1979 in der Nähe von Klais und Puppling (Oberbayern) gesammelt, die amerikanische Art (Varietät?) im September 1977 im Great Smoky Mountains National Park (Tennessee, USA). Belegexemplare befinden sich im Bayerischen Staatsherbarium München.

Isolierung von Cristatsäure (3) und Mannit: 16 g gefriergetrocknete Fruchtkörper von *A. cristatus* (Bayern) werden im Mörser fein gepulvert und in einer Soxhlet-Apparatur 8 h mit Petrolether (40–60°C) extrahiert. Beim langsamen Einengen der Lösung fallen farblose Kristalle von 3 aus. Ausb. 0.75 g (5%), Schmp. 100°C. Zur Analyse wird aus Petrolether umkristallisiert, Schmp. 104°C; $R_F = 0.67$ (Fleck färbt sich über HCl zunächst rotviolett, dann türkisgrün). – UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 220 (4.49), 265 (sh, 4.49), 269 (4.50), 281 (sh, 4.24), 304 nm (3.70). – IR (KBr): 3500–2400, 1640, 1620, 1506, 1467, 1457, 1318, 1290, 1270, 1215, 1195, 1170, 1100, 1083, 1018, 944, 900 cm^{-1} . – MS: $m/e = 384$ (1.4%, M^+ , $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_5$), 340 (22.4, $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_3$), 217 (11.2, $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_3$), 203 (44.0, $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}$), 191 (11.3, $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_2$); 175 (22.4, $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_2$), 149 (45.2, $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}$), 148 (9.9, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$), 137 (88.4, $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2$), 136 (100, $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}$).



Setzt man die Soxhlet-Extraktion mit Methanol fort (5 h), so fallen nach dem Erkalten farblose Kristalle aus. Nach Absaugen wird aus Methanol umkristallisiert. Ausb. 1.88 g (9%), Schmp. 166°C. Nach Misch.-Schmp., IR-Spektrum und $[\alpha]_D$ identisch mit D-Mannit.

Isolierung von Atromentin: 20 g gefriergetrocknete Fruchtkörper von *A. cristatus* (Bayern) werden mit Methanol extrahiert. Man dampft die Extrakte ein und isoliert nach mehrfacher Chromatographie des Rückstands an Sephadex LH-20 (Eluent: Methanol) 22 mg (0.1%) Atromentin, nach IR- und DC-Vergleich identisch mit der authentischen Verbindung¹³⁾.

Cristatin (2): 150 mg **3** werden in 20 ml wasserfreiem Pyridin 90 min unter Rückfluß erhitzt. Man entfernt das Pyridin i. Vak. und dampft im Rotationsverdampfer noch dreimal nach Zugabe von etwas Toluol ein. Der Rückstand wird zwischen 10proz. Citronensäurelösung und Essigester verteilt, die organische Phase mit Wasser gewaschen und getrocknet. Nach Eindampfen verbleibt ein öliges Rückstand, der aus Methylenchlorid/Petrolether (40–60°C) kristallisiert. Ausb. 47 mg (35.4%), Schmp. 46–48°C; $R_F = 0.70$ (Fleck färbt sich über HCl blaugrün). – IR (KBr): 3550–3250, 2960, 2880, 1637 (schwach), 1588, 1523, 1455, 1327, 1268, 1160, 1055, 1040, 992, 940, 850, 829, 575 cm^{-1} . – MS: 340.2034 (47.2%, M^+ , ber. für $C_{22}H_{28}O_3$: 340.2039), 203 (51.7, $C_{14}H_{19}O$), 189 (13.5, $C_{11}H_{11}O_2$), 149 (49.8, $C_{10}H_{13}O$), 148 (10.7, $C_{10}H_{12}O$), 137 (63.7, $C_8H_9O_2$), 136 (100, $C_9H_{12}O$).

$C_{22}H_{28}O_3$ (340.5) Ber. C 77.61 H 8.28 Gef. C 77.24 H 8.15

Dimethylcristatsäure-methylester (4): 100 mg **3** werden in 10 ml DMF mit 200 mg trockenem Kaliumcarbonat und 0.50 ml Methyljodid 3 d bei 25°C gerührt. Man verteilt zwischen Wasser und Methylenchlorid, wäscht die organische Phase mehrmals mit Wasser und dampft die getrocknete Lösung i. Vak. ein. Ausb. 98 mg (88.3%), hellgelbes Öl; $R_F = 0.71$. – IR (CDCl₃): 1735, 1605, 1467, 1285, 1165, 1120, 1040, 612. – MS: 426.2407 (45.9%, M^+ , ber. für $C_{26}H_{34}O_5$: 426.2406), 395 (12.4, $C_{25}H_{31}O_4$), 245 (88.5, $C_{15}H_{17}O_3$), 231 (69.2, $C_{14}H_{15}O_3$), 223 (100, $C_{12}H_{15}O_4$), 203 (87.0, $C_{14}H_{19}O$), 193 (19.8, $C_{11}H_{13}O_3$), 189 (24.9, $C_{13}H_{17}O$), 177 (85.2, $C_{10}H_9O_3$), 149 (54.4, $C_{10}H_{13}O$), 136 (90.7, $C_9H_{12}O$).

$C_{26}H_{34}O_5$ (426.5) Ber. C 73.21 H 8.04 Gef. C 72.40 H 8.39

Isolierung von Grifolsäure (6): 20 g luftgetrocknete Fruchtkörper von *Albatrellus* sp. (USA) werden mit Petrolether (60–80°C) in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Der nach dem Eindampfen erhaltene ölige Rückstand wird auf eine Säule mit acetyliertem Polyamid gebracht. Nach Abtrennen einer Lipidfraktion mit Petrolether wird mit Essigester **6** eluiert. Ausb. 90 mg (0.5%) Öl. – MS: 372.2305 (5.2%, M^+ , ber. für $C_{23}H_{32}O_4$: 372.2301), 328 (6.5, $C_{22}H_{32}O_2$), 285 (8.0, $C_{18}H_{21}O_3$), 218 (12.5, $C_{13}H_{14}O_3$), 217 (66.7, $C_{13}H_{13}O_3$), 201 (12.1, $C_{12}H_9O_3$), 191 (22.6, $C_{14}H_{23}$), 191 (14.2, $C_{12}H_{15}O_2$), 181 (10.6, $C_9H_9O_4$), 177 (12.3, $C_{11}H_{13}O_2$), 175 (36.8, $C_{11}H_{11}O_2$), 163 (12.6, $C_{10}H_{11}O_2$), 163 (49.5, $C_9H_7O_3$), 149 (11.3, $C_9H_9O_2$), 138 (14.3, $C_8H_{10}O_2$), 137 (100, $C_8H_9O_2$), 136 (12.0, $C_{10}H_{16}$).

¹⁾ XI. Mitteil.: J. Kupka, T. Anke, W. Steglich und L. Zechlin, J. Antibiot. **34**, 298 (1981).

²⁾ Y. Hirata und K. Nakanishi, J. Biol. Chem. **184**, 135 (1950).

³⁾ T. Goto, H. Kakisawa und Y. Hirata, Tetrahedron **19**, 2079 (1963).

⁴⁾ H. Besl, G. Höfle, B. Jendry, E. Jägers und W. Steglich, Chem. Ber. **110**, 3770 (1977).

⁵⁾ J. Vrkoč, M. Buděšinský und L. Dolejš, Phytochemistry **16**, 1409 (1977).

⁶⁾ Für die violette Farbreaktion der Fruchtkörper mit konz. Schwefelsäure ist eine Substanz verantwortlich, die sich mit den üblichen Lösungsmitteln nicht extrahieren läßt.

- ⁷⁾ *A. Bresinsky* und *A. Rennschmid*, Ber. Dtsch. Bot. Ges. **84**, 313 (1971); vgl. auch *H. Besl* und *A. Bresinsky*, Z. Pilzkd. **43**, 311 (1977).
- ⁸⁾ *N. I. Shuikin* und *I. F. Belskii*, Zh. Obshch. Khim. **27**, 402 (1957) [Chem. Abstr. **51**, 15489i (1957)].
- ⁹⁾ Vgl. z. B. *F. M. Dean*, Natural Occuring Oxygen Ring Compounds, S. 2, Butterworths, London 1963.
- ¹⁰⁾ Das entsprechende Geranylderivat ist bekannt: *K. T. Suzuki* und *S. Nozoe*, Bioorg. Chem. **3**, 72 (1974).
- ¹¹⁾ *B. M. Giannetti*, *W. Steglich*, *W. Quack*, *T. Anke* und *F. Oberwinkler*, Z. Naturforsch., Teil C **33**, 807 (1978).
- ¹²⁾ *J. Kupka*, *T. Anke*, *F. Oberwinkler*, *G. Schramm* und *W. Steglich*, J. Antibiot. **32**, 130 (1979).
- ¹³⁾ *F. Kögl* und *J. J. Postowsky*, Liebigs Ann. Chem. **440**, 19 (1924); **445**, 159 (1925).

[2/81]