

1,2-Naphthochinon-Derivate aus Kulturen des Mycosymbionten der Flechte *Trypethelium eluteriae* (Trypetheliaceae)

Annick Mathey

Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem,
Königin-Luise-Straße 6–8, D-1000 Berlin

Bert Steffan und Wolfgang Steglich*)

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-5300 Bonn

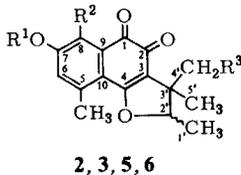
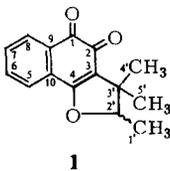
Eingegangen am 23. August 1979

Aus Kulturen des Mycosymbionten der tropischen Rindenflechte *Trypethelium eluteriae* Sprengel wurden die antibiotisch aktiven 1,2-Naphthochinone Trypethelon (2), Trypethelon-methylether (3), 8-Methoxytrypethelon-methylether (5) und 4'-Hydroxy-8-methoxytrypethelon-methylether (6) isoliert. Es handelt sich um Derivate des (+)-Dunnions (1), deren Substituentenanordnung mit einer Polyketidbiogenese des Chinonsystems im Einklang ist.

1,2-Naphthoquinone Derivatives from Cultures of the Mycosymbiont from the Lichen *Trypethelium eluteriae* (Trypetheliaceae)

From cultures of the mycosymbiont of the tropical cortical lichen *Trypethelium eluteriae* Sprengel the antibioticly active 1,2-naphthoquinones trypethelone (2), trypethelone methyl ether (3), 8-methoxytrypethelone methyl ether (5), and 4'-hydroxy-8-methoxytrypethelone methyl ether (6) have been isolated. The substitution pattern of these new derivatives of (+)-dunnione (1) is in accord with a polyketide biogenesis of the quinone system.

Trypethelium eluteriae Sprengel ist eine rindenbewohnende Flechte aus der Familie der Trypetheliaceae, die in den Tropen und Subtropen weitverbreitet ist. Ihre Sporen lassen sich leicht zur Keimung bringen, und nach Übertragung auf geeignete Nährmedien entwickelt sich innerhalb einiger Wochen eine dichte, rote Hyphenmasse, die den Farbstoff auch in das Nährmedium ausscheidet¹⁾. Die Beobachtung, daß das Wachstum von Pilzinfektionen auf den Kulturen stark gehemmt wird, veranlaßte uns, die Farbstoffe näher zu untersuchen.



	R ¹	R ²	R ³
2	H	H	H
3	CH ₃	H	H
5	CH ₃	OCH ₃	H
6	CH ₃	OCH ₃	OH

*) Korrespondenz bitte an diesen Autor richten.

Extraktion des Hyphenmaterials und des Nährmediums mit Essigester-Aceton ergab eine tiefrote Lösung, die nach dem Dünnschichtchromatogramm hauptsächlich zwei violette und zwei rote Farbstoffe enthält (Tabelle 1). Die Trennung der Komponenten gelang an einer Kieselgelsäule.

Tabelle 1. Dünnschichtchromatographisches Verhalten der Farbstoffe 2, 3, 5 und 6 [Kieselgel-Fertigplatten 60 F₂₅₄ der Fa. Merck; Laufmittel: C₆H₆/HCO₂Et/HCO₂H (10:5:3, Vol.)]

Farbstoff	R _F ^{a)}	Farbe	Farbumschlag über NH ₃	Isolierte Menge (mg)
Trypethelon-methylether (3)	0.42	violett	orange-gelb	4
Trypethelon (2)	0.33	violett	violett	12
8-Methoxytrypethelon-methylether (5)	0.31	karminrot	gelb	14
4'-Hydroxy-8-methoxytrypethelon-methylether (6)	0.32	karminrot	gelb	2

^{a)} Zum Vergleich Dunnion (1): R_F = 0.45, orangerot; über NH₃ nach einiger Zeit gelb.

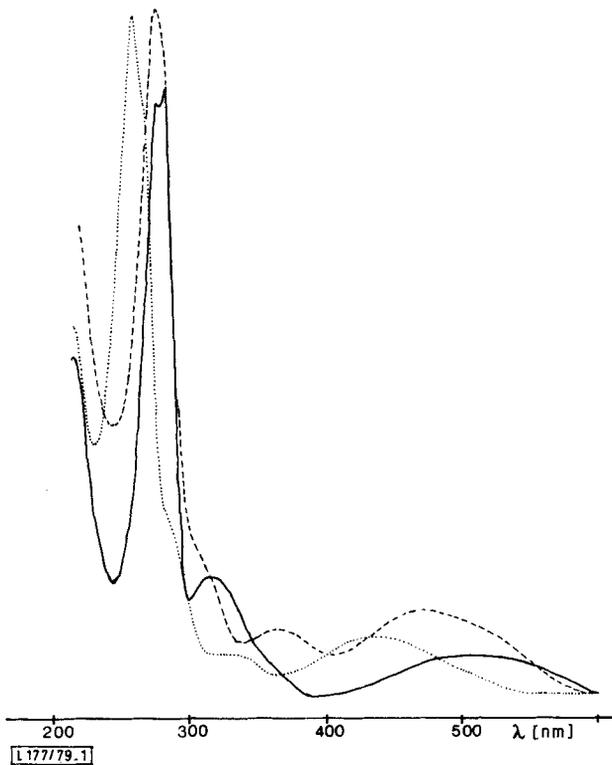


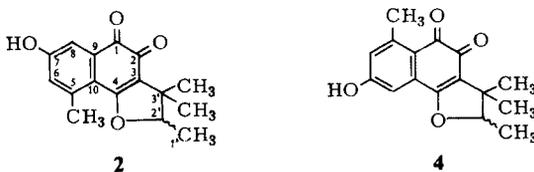
Abbildung 1. UV-Spektren von 1 (·····), 2 (—) und 5 (---)

Tabelle 2. $^1\text{H-NMR}$ -Daten der Farbstoffe **1**–**3**, **5** und **6** (**1** in $[\text{D}_4]$ Methanol, die anderen in $[\text{D}_6]$ Aceton, TMS als innerer Standard, δ -Werte)

	1	2	3	5	6
6-H	8.07 (m)	6.96 (dd)	7.08 (dd)	7.15 (s, breit)	7.13 (s, breit)
8-H	7.65 (m)	7.35 (d)	7.39 (d)	–	–
1'-H	1.48 (d)	1.47 (d)	1.47 (d)	1.46 (d)	1.61 (d)
2'-H	4.76 (q)	4.70 (q)	4.72 (q)	4.69 (q)	4.71 (q)
4'-H	1.26 (s)	1.22 (s)	1.22 (s)	1.21 (s)	3.74 (m)
5'-H	1.43 (s)	1.40 (s)	1.39 (s)	1.38 (s)	1.31 (s)
5-CH ₃	–	2.56 (d)	2.61 (d)	2.60 (d)	2.59 (d)
7-OCH ₃	–	–	3.92 (s)	3.94 (s)	3.94 (s)
8-OCH ₃	–	–	–	3.80 (s)	3.79 (s)
OH	–	9.14 (s)	–	–	–

$J_{6,8} = 2.6$, $J_{5-\text{CH}_3,6} = 0.5$, $J_{1',2'} = 6.8$ Hz

Das in schwarzvioletten Nadelchen kristallisierende Trypethelon (**2**) erwies sich für die Konstitutionsermittlung als besonders geeignet. Es besitzt nach dem hochaufgelösten Massenspektrum die Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$, wobei das für Chinone charakteristische $(M + 2)$ -Ion mit nahezu gleicher Intensität auftritt. Absorptionsspektrum (Abbildung 1) und die Reaktion mit *o*-Phenylendiamin zu einem Chinoxalinderivat zeigen, daß ein 1,2-Naphthochinon vorliegt. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Tabelle 2) sind zwei Dubletts für *meta*-ständige Aromatenprotonen bei $\delta = 6.96$ und 7.35 vorhanden, von denen das erstere durch Kopplung mit einer *ortho*-ständigen Methylgruppe ($J = 0.6$ Hz) weiter aufgespalten ist. Ein mit D_2O austauschbares Signal bei $\delta = 9.14$ spricht für eine nichtchelatisierte phenolische Hydroxygruppe, die restlichen Signale im Aliphatenbereich sind deckungsgleich mit denen des modifizierten Isoprenrestes im Dunnion (**1**)^{2,3}. Damit ergeben sich für Trypethelon zwei alternative Formeln **2** oder **4**:



Eine eindeutige Zuordnung ist durch das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Tabelle 3) möglich, da nach Untersuchungen von Höfle⁴) nur im Falle von **2** eine Dublettaufspaltung des Signals der 1-CO-Gruppe durch $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplung mit dem *peri*-ständigen 8-H zu erwarten ist. In der Tat beobachtet man, daß von den drei Signalen im CO-Bereich bei $\delta = 183.7$ (C-1), 176.8 (C-2) und 175.0 (C-4) im gekoppelten Spektrum nur das erste zu einem klaren 3.8-Hz-Dublett aufgespalten ist, während die beiden anderen Signale jeweils ein scharfes und ein verbreitertes Singulett ergeben. Auch im Spektrum des Dunnions (**1**)³ ist C-1 an der Aufspaltung in ein scharfes 3.8-Hz-Dublett zu erkennen, während C-2 als scharfes Singulett und C-4 als verbreitertes Dublett erscheinen. Interessant ist die im Vergleich zu **1** ($\delta = 170.8$) starke paramagnetische Verschiebung von C-4

nach $\delta = 175.0$, die wohl auf die sterische Wechselwirkung zwischen der 5-Methylgruppe und der Etherfunktion zurückzuführen ist⁵⁾.

Tabelle 3. ¹³C-NMR-Daten von **1**, **2** und **5** (in [D₄]Methanol, TMS als innerer Standard, δ -Werte)

	1 ^{a)}	2	5
C-1	182.8	183.7 (d, 3.8 Hz)	184.0
C-2	177.2	176.8 (s)	177.2 (s)
C-3	124.5	122.7 (breit)	123.0
C-4	170.8	175.0 (breit)	174.2
C-5	130.0	142.7 (m)	138.0
C-6	136.0	124.9 (dq, 160/5 Hz)	121.6 (dq, 160/5 Hz)
C-7	133.2	162.4 (dd, 2 Hz)	158.4 (s, breit)
C-8	125.8	116.6 (dd, 165/5 Hz)	153.0 (d, 3.5 Hz)
C-9	132.2	135.6 (breit)	126.1 (s)
C-10	129.2	118.1 (d, 3.4 Hz)	118.9 (d, 3.5 Hz)
C-1'	26.1	26.0 (q)	25.9 (q)
C-2'	94.7	94.3 (m)	94.1 (m)
C-3'	45.3	43.9 (s)	44.0 (s)
C-4'	14.8	14.9 (q)	14.9 (q)
C-5'	20.2	20.5 (q)	20.5 (q)
5-CH ₃	—	22.3 (q)	22.8 (q)
CH ₃ O	—	—	56.8, 61.5 (q)

a) Zuordnung der Aromatensignale durch Vergleich mit den aus den Spektren von **2** und **5** und den üblichen Inkrementen berechneten δ -Werten (vgl. auch Lit. 6)).

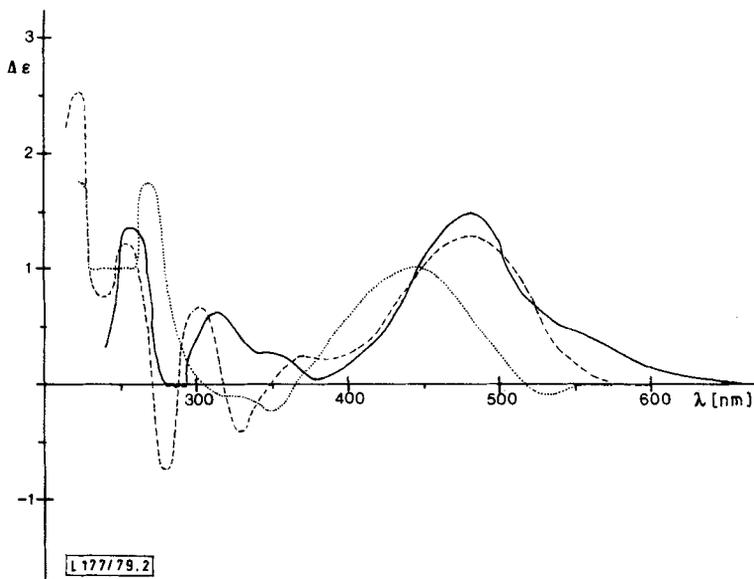


Abbildung 2. CD-Spektren von **1** (·····), **2** (—) und **5** (---)

Bei dem in rotlila Plättchen kristallisierenden Nebenpigment handelt es sich nach den spektroskopischen Daten um Trypethelon-methylether (3), was durch die Methylierung von 2 mit Diazomethan bestätigt wird.

Das rote Hauptpigment 5 besitzt die Summenformel $C_{18}H_{20}O_5$ und zeigt im 1H -NMR-Spektrum neben unveränderten Aliphatsignalen zwei Methoxysignale bei $\delta = 3.80$ und 3.94 . Da das verbleibende Aromatensignalett bei $\delta = 7.15$ noch durch Kopplung mit der 5- CH_3 -Gruppe verbreitert ist, sollte die zusätzliche Methoxygruppe an C-8 sitzen. Dies wird durch das ^{13}C -NMR-Spektrum bestätigt, in dem das Signal bei $\delta = 121.6$ zu einem Doppelquartett aufgespalten ist ($J = 160$ und 5 Hz), was nur mit einer Nachbarstellung zur 5- CH_3 -Gruppe vereinbar ist.

Ein nur in geringer Menge vorhandenes Nebenpigment 6 zeigt das gleiche Absorptionsspektrum wie 5, enthält aber nach dem Massenspektrum ein zusätzliches Sauerstoffatom, das für die intensive Abspaltung von $M - 31$ verantwortlich ist. Aus dem 1H -NMR-Spektrum ergibt sich, daß sich eine zusätzliche Hydroxygruppe an C-4' befindet. Die deutliche Verschiebung des 1'-Methyldoublets nach tieferem Feld spricht für eine *cis*-Stellung dieser Gruppe zur CH_2OH -Funktion. 6 zeigt wie alle anderen 7-Methoxyverbindungen einen reversiblen Farbumschlag nach Gelb, wenn die Verbindung auf Kieselgelplatten NH_3 -Dämpfen ausgesetzt wird.

Trypethelon (2) und seine Derivate zeigen im CD-Spektrum einen ähnlichen Kurvenverlauf wie (+)-Dunnion (1) (Abbildung 2), so daß die gleiche absolute Konfiguration vorliegt³⁾.

Unseres Wissens wurden 1,2-Naphthochinone bisher noch nicht aus Flechten oder Ascomyceten isoliert. Die Biosynthese der neuen Verbindungen dürfte nach der Substituentenanordnung am Chinonring auf dem Acetat-Malonat-Weg erfolgen, während Dunnion (1) aus *Streptocarpus* (Gesneriaceae) nach Untersuchungen von Zenk⁷⁾ über den Shikimisäure-Weg aufgebaut wird. In der intakten Flechte *T. eluteriae* können massenspektrometrisch Physcion und Secalonsäure nachgewiesen werden⁸⁾.

Trypethelon (2) und seine Derivate zeigen eine mittlere Hemmwirkung gegenüber *Bacillus subtilis*, die allerdings noch von der des Dunnions übertroffen wird⁹⁾. Die antibiotische Aktivität von 1,2-Naphthochinonen ist bereits vom Biflorin aus *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) bekannt¹⁰⁾.

Wir danken Herrn Prof. Dr. M. Zenk, Bochum, herzlich für die Überlassung von (+)-Dunnion. Herrn Dr. G. Eckhardt sei für die Aufnahme der Massenspektren, Herrn C. Schmidt für die NMR-Spektren gedankt.

Experimenteller Teil

UV-Spektren (Methanol): Beckman Model 25 und Varian Cary 219. – IR-Spektren (KBr): Pye Unicam SP 100. – 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren: Bruker WH 90 und WP 80 (TMS als innerer Standard, δ -Werte). – Massenspektren: AEI MS-9 und MS-30 mit Datenverarbeitung, Direkt-einlaß, 70 eV. – CD (Methanol): Dichrographie Jouan-Roussel III. – Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert. – Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel Mallinkrodt der Fa. Serva verwendet; DC: Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. Merck; Fließmittelsystem: Benzol/Ameisensäure-ethylester/Ameisensäure (10:5:3, Vol.).

Trypethelium eluteriae wurde auf *Persea borbonia* in den Everglades in Florida gefunden (Parking Place Mahogany Trail). Belegexemplar: Herbar A. Mathey, Berlin.

Isolierung: Wie bereits beschrieben¹⁾, konnte der Mycosymbiont von *Trypethelium eluteriae* auf Malt-Yeast-Extract-Medium¹¹⁾ herangezogen werden. Der Inhalt von 20 Petrischalen ($\varnothing = 10$ cm) wurde in Essigester/Aceton zerkleinert. Man wiederholte die Extraktion mehrfach, filtrierte und dampfte den dunkelroten Rückstand weitgehend ein. Verteilung zwischen Essigester/Wasser, Trocknen und Eindampfen der organischen Phase ergab 120 mg Rohprodukt. – Die Trennung der Komponenten gelang an einer Kieselgelsäule (30 × 20 cm). Als Eluent dienten Toluol/Essigester-Gemische (90:10 bis 65:35, Vol.). Als erste Fraktion wurden 4 mg *Trypethelion-methylether* (3) eluiert, gefolgt von 12 mg *Trypethelon* (2), 14 mg *8-Methoxytrypethelon-methylether* (5) und 2 mg *4'-Hydroxy-8-methoxytrypethelon-methylether* (6).

Trypethelon (2): Schwarz-violette Prismen aus Chloroform/Petrolether, Schmp. 264–266 °C. – $[\alpha]_{578}^{25} = +364^\circ$, $[\alpha]_{546}^{25} = +324^\circ$ ($c = 0.0024$ in Methanol). – IR (KBr): 3200, 3000, 2950, 1695, 1620, 1535, 1455, 1380, 1315, 1295, 1230, 1215, 1185, 1145, 1120, 1035, 875, 800 und 685 cm^{-1} . – UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 274 (4.54), 283 (4.55), 316 (3.89), 516 nm (3.51). – CD (Methanol): λ ($\Delta\epsilon$) = 480 (1.50), 340 (0.29), 315 (0.65), 255 nm (1.38). – MS (Ionenquellentemp. 220 °C): $m/e = 272.1045$ (38%, M^+ , ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$: 272.1049), 274 (5.2%), 257 (34.5%), 244 (20.7%), 229 (100%).

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (272.1) Ber. C 70.58 H 5.88 Gef. C 70.39 H 5.92

8-Methoxytrypethelon-methylether (5): Hellrote Plättchen aus Toluol/Petrolether, Schmp. 165–166 °C. – $[\alpha]_{578}^{25} = +62^\circ$, $[\alpha]_{546}^{25} = +102^\circ$ ($c = 0.010$ in Methanol). – IR (KBr): 3005, 2960, 2890, 1700, 1645, 1610, 1575, 1490, 1450, 1420, 1355, 1265, 1110, 1070, 1040, 1010, 990, 935, 880 und 785 cm^{-1} . – UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 278 (4.56), 363 (3.47), 478 nm (3.61). – CD (Methanol): λ ($\Delta\epsilon$) = 480 (1.34), 370 (0.23), 330 (–0.46), 302 (0.65), 280 (–0.72), 255 nm (1.23). – MS (Ionenquellentemp. 220 °C): $m/e = 316.1308$ (4.9%, M^+ , ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_5$: 316.1311), 318 (17.1%), 303 (19.5%), 301 (2.4%), 273 (9.8%), 28 (100%).

Trypethelon-methylether (3): Rotviolette Nadelchen aus Toluol/Petrolether, Schmp. 140–142 °C. – $[\alpha]_{578}^{25} = +110^\circ$, $[\alpha]_{546}^{25} = +137^\circ$ ($c = 0.0036$ in Methanol). – IR (KBr): 3000, 2960, 1650, 1640, 1610, 1590, 1555, 1455, 1395, 1380, 1340, 1255, 1180, 1145, 1120, 1070, 1030, 980, 890 und 790 cm^{-1} . – UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 273 (3.63), 281 (3.64), 314 (3.05), 499 nm (2.45). – MS (Ionenquellentemp. 180 °C): $m/e = 286.1209$ (100%, M^+ , ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_4$: 286.1213), 287 (26.0%), 288 (13.4%), 271 (94.6%), 258 (41.2%).

4'-Hydroxy-8-methoxytrypethelon-methylether (6): Rote Nadelchen aus Toluol/Petrolether, Schmp. 182–183 °C. – $[\alpha]_{578}^{25} = +218^\circ$, $[\alpha]_{546}^{25} = +305^\circ$ ($c = 0.0045$ in Methanol). – IR (KBr): 3560, 2965, 1690, 1650, 1610, 1570, 1485, 1455, 1420, 1385, 1355, 1290, 1265, 1105, 1070, 1020, 985, 945 und 890 cm^{-1} . – UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 277 (4.34), 368 (3.31), 472 nm (3.46). – MS (Ionenquellentemp. 180 °C): $m/e = 332.1252$ (11%, M^+ , ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_6$: 332.1244), 334 (37.0%), 302 (29.1%), 301 (100%), 287 (20.7%), 274 (11.0%).

Chinoxalinderivat von 2: 2 mg *Trypethelon* (2) wurden mit 1.5 mg *o*-Phenylendiamin in Eisessig 5 min auf 80 °C erhitzt. Reinigung durch präparative DC ergab das blauviolette Chinoxalinderivat. – MS: $m/e = 344$ (100%, M^+).

Methylierung von 2: 2 mg **2** wurden mit etherischer Diazomethan-Lösung verethert. Das Produkt erwies sich nach DC, Farbreaktion und MS als identisch mit **3**.

- ¹⁾ A. Mathey und D. Hoder, *Nova Hedwigia Z. Kryptogamenkd.* **30**, 79 (1978).
- ²⁾ R. H. Thomson, *Naturally Occuring Quinones*, 1. Aufl., S. 214, Academic Press, London – New York 1971.
- ³⁾ P. Rüdi und C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta*, **60**, 945 (1977).
- ⁴⁾ G. Höfle, *Tetrahedron*, **33**, 1963 (1977).
- ⁵⁾ E. Breitmaier und G. Bauer, ¹³C-NMR-Spektroskopie, 1. Aufl., S. 68, Thieme, Stuttgart 1977.
- ⁶⁾ E. B. Whipple, *Org. Magn. Reson.* **10**, 23 (1977); Y. Berger und A. Castonguay, *Org. Magn. Reson.* **11**, 375 (1978); P. W. Westermann, S. P. Gunasekera, M. Uvais, S. Sultanbawa und R. Kazlauskas, *Org. Magn. Reson.* **9**, 631 (1977).
- ⁷⁾ M. H. Zenk und E. Leistner, *Lloydia*, **31**, 275 (1968).
- ⁸⁾ A. Mathey, *Nova Hedwigia Z. Kryptogamenkd.* **31**, 1 (1979).
- ⁹⁾ T. Anke, Universität Tübingen, unveröffentlichte Ergebnisse. Wir danken Herrn Dr. T. Anke und Frau J. Kupka für die biologischen Tests.
- ¹⁰⁾ O. Gonçalves de Lima, W. Keller-Schierlein und V. Prelog, *Helv. Chim. Acta*, **41**, 1386 (1958).
- ¹¹⁾ V. Ahmadjian, *The Lichen Symbiosis*, Blaisdell Publ. Comp., Waltham (Mass.) – Toronto – London 1967.

[177/79]