

Pilzinhaltstoffe, 32¹⁾

Nachweis einer bicyclischen Zwischenstufe der Anthrachinon-Biosynthese

Burchard Franck* und Andreas Stange

Organisch-Chemisches Institut der Universität Münster,
Orleans-Ring 23, D-4400 Münster

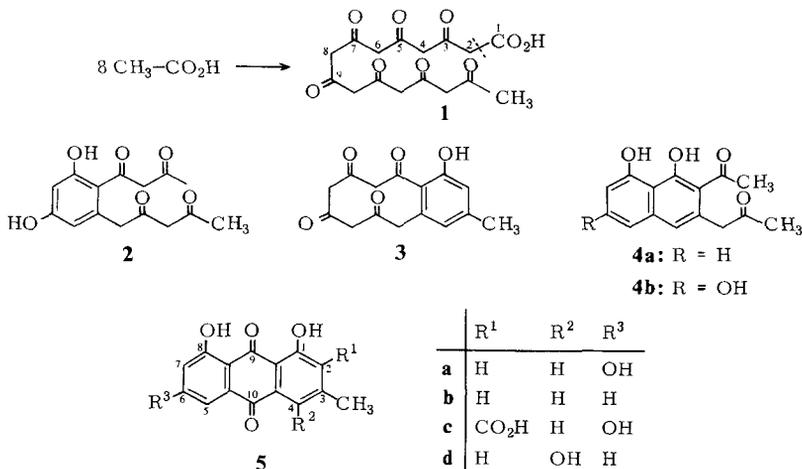
Eingegangen am 9. Oktober 1980

Verfütterung des synthetisch ¹⁴C-markierten Diketonaphthols **4a** an Oberflächenkulturen des Schimmelpilzes *Penicillium islandicum* ergab mit signifikanten Einbauraten radioaktives Islandicin (**5d**) und Skyrin (**12**). Damit wurde erstmalig die Beteiligung einer bicyclischen Zwischenstufe an der Anthrachinon-Biosynthese durch Mikroorganismen nachgewiesen.

Natural Products from Fungi, 32¹⁾. – Detection of a Bicyclic Intermediate of Anthraquinone Biosynthesis

Feeding of the synthetically ¹⁴C-labelled diketonaphthol **4a** to surface cultures of the mould fungus *Penicillium islandicum* yielded radioactive islandicin (**5d**) and skyrin (**12**) with significant incorporation rates. Thus the participation of a bicyclic intermediate in anthraquinone biosynthesis by microorganisms has been detected for the first time.

Die Anthrachinone der Mikroorganismen bilden eine große, weit verbreitete Naturstoffgruppe mit vielseitigen biologischen Aktivitäten^{2,3)}. Durch Inkorporationsversuche mit markierten Vorstufen ließ sich zeigen, daß einige dieser Anthrachinone Biosynthesestufen für zahlreiche weitere Naturstoffe wie z. B. Mycotoxine sind, die in den Organismen durch Kondensationen und Ringöffnungsreaktionen aus Anthra-



Liebigs Ann. Chem. 1981

chinonen hervorgehen²⁻⁵). Demgegenüber ist über den biologischen Aufbau der Anthrachinone selbst – durch Mikroorganismen – erst wenig bekannt. Zwar wurde bewiesen, daß das Anthrachinongrundgerüst über Acetyl- und Malonyl-Coenzym A aus acht Acetateinheiten entsteht^{6,9}), doch gelang es bisher nicht, irgendwelche kondensierten oder teilcyclisierten Zwischenstufen der Anthrachinon-Biosynthese, wie z. B. **1-4**, durch Isolierung, Abfangen oder Inkorporation nachzuweisen.

Nachstehend berichten wir über die Synthese der ¹⁴C-markierten, teilcyclisierten Zwischenstufe **4a** und deren Inkorporation in das Anthrachinon Islandicin (**5d**) sowie in das Bianthrachinon Skyrin (**12**) durch den Schimmelpilz *Penicillium islandicum*.

Auswahl der Biosynthese-Zwischenstufe

Die Biosynthese der Anthrachinone durch Mikroorganismen ähnelt in den ersten Schritten der Bildung der Fettsäuren^{2,9,24}). Es kondensiert ein Molekül Acetyl-Coenzym A als Starter mit sieben weiteren Essigsäure-Einheiten in Form von Malonyl-Coenzym A. Im Unterschied zur Fettsäure-Biosynthese unterbleibt jedoch die Reduktion der nach jedem Kondensationsschritt entstehenden Carbonylgruppe. Hierdurch soll, stabilisiert durch Bindung an einen Multienzymkomplex, eine Heptaketopalmitinsäure (**1**) (Octaketid) gebildet werden. Sie ergäbe im Zuge der Ablösung vom Enzym durch eine Folge von Aldolkondensationen und Dehydratisierungen, Decarboxylierung und Oxidation über teilcyclisierte Zwischenstufen, wie **2**, **3** oder **4**, Emodin (**5a**) und Chrysophanol (**5b**). **5a** und **5b** sind Vorstufen für zahlreiche verwandte Anthrachinone und abgeleitete Naturstoffe und damit biogenetische Schlüsselbausteine⁸). Für sie ließ sich auch in Pflanzen eine Biosynthese auf dem Acetat-Polymalonat-Weg nachweisen^{7,9}).

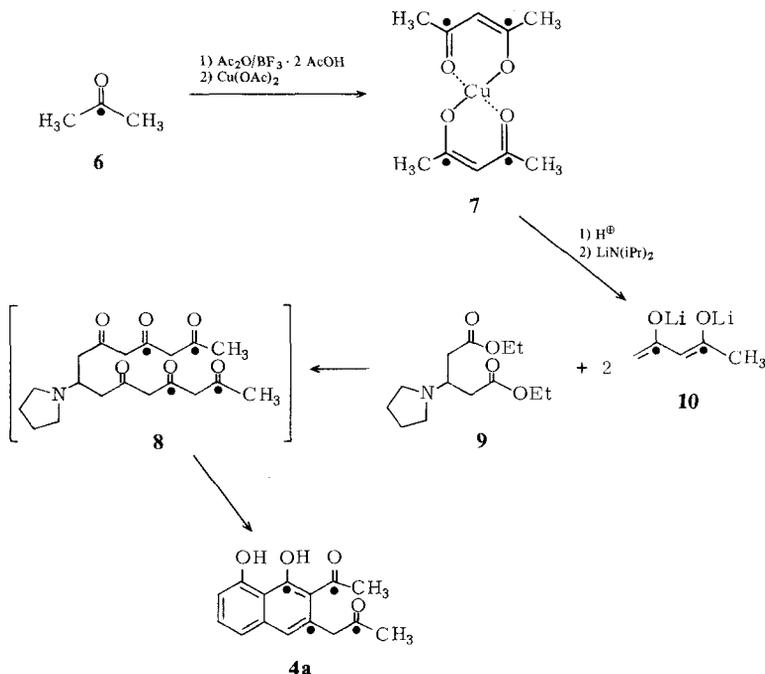
Die Decarboxylierung des Octaketids **1** erfolgt offensichtlich vor Vollendung der Anthrachinon-Biosynthese, da Endocrocin (**5c**) nicht in Emodin (**5a**) und verwandte Anthrachinone¹⁰) sowie in die aus **5a** hervorgehenden Ergochrome inkorporiert wurde⁴). Modellreaktionen von Harris und Mitarb.¹¹) mit synthetischen Polyketiden und Befunde aus der Ergochrom-Biosynthese¹²) lassen weiterhin vermuten, daß dem Chrysophanol (**5b**) gegenüber Emodin (**5a**) in der Biosynthese der Anthrachinone und daraus hervorgehender Naturstoffe eine bevorzugte Stellung zukommt.

Unter Berücksichtigung vorstehender Erkenntnisse und nachfolgender Überlegungen kam das Diketonaphthol **4a** als aussichtsreichste teilcyclisierte Anthrachinonvorstufe für Inkorporationsversuche in Betracht. So enthält es analog dem Chrysophanol (**5b**) keine Sauerstofffunktion in der Position, die dem C-6 im Anthrachinon entspricht. Mit nur zwei Carbonylgruppen sollte, anders als bei den Polyketiden **1**, **2** und **3**, die Reaktivität von **4a** gering genug sein, um eine Spontankondensation unter den Inkorporationsbedingungen weitgehend auszuschließen. Schließlich ist eine Bevorzugung von **4a** gegenüber den anderen teilcyclisierten Zwischenstufen auch dadurch begründet, daß bei Untersuchungen zur Tetracyclin-Biosynthese analog teilcyclisierte Nonaketid-Zwischenprodukte aus Kulturen von Mutanten des Tetracycline bildenden *Streptomyces aureofaciens* isoliert wurden¹³).

Synthese des [¹⁴C]Diketonaphthols **4a**

Das Diketonaphthol **4a** war in nicht markierter Form bereits bekannt¹¹). Zur ¹⁴C-Markierung wurde die von Harris und Mitarb.¹⁴) beschriebene Claisen-Kondensation

des Dilithiums Salzes **10** von Acetylaceton mit dem 3-Pyrrolidinoglutarat **9** in geeigneter Weise modifiziert. Die Pyrrolidinogruppe, die bei der abschließenden sauren Aufarbeitung eliminiert wird, bewirkt die Ausbildung einer haarnadelförmigen Konformation der Zwischenstufe **8** und Begünstigung der Bildung von **4a** gegenüber anderen Kondensationsmöglichkeiten. Ausschlaggebend für die Wahl der in **4a** angegebenen Markierungspositionen (●) war das Bestreben, die Synthese mit einer leicht zugänglichen ^{14}C -markierten Ausgangsverbindung und möglichst wenigen Reaktionsschritten mit radioaktivem Material durchzuführen.

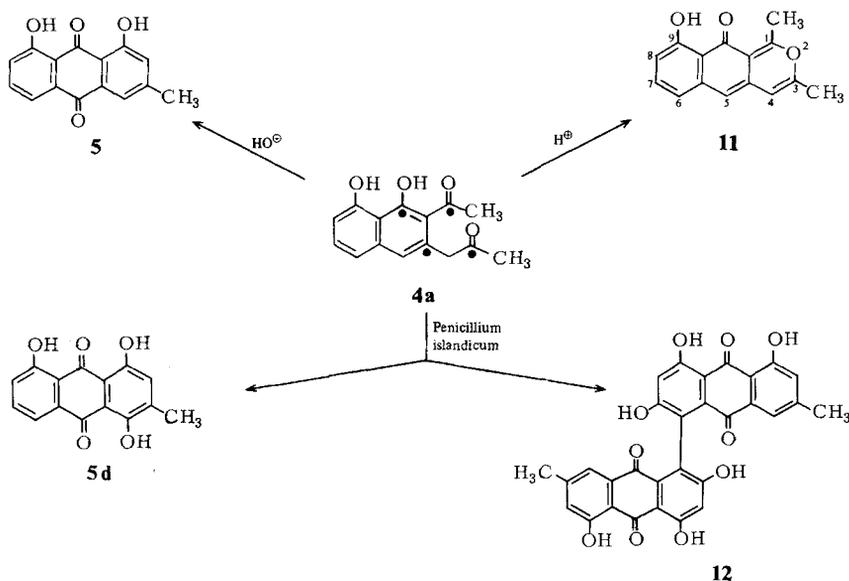


Darstellung und Umsetzung des $[2,4-^{14}\text{C}_2]$ Acetylaceton bzw. seines Dilithiums Salzes **10** wurden mit Rücksicht auf Radioaktivität und Flüchtigkeit in speziellen, geschlossenen Apparaturen (s. Experimenteller Teil) vorgenommen. Acetylierung von $[2-^{14}\text{C}]$ -Aceton mit Acetanhydrid und Bortrifluorid-diacetat als Katalysator¹⁵⁾ ergab ein Acetylaceton, dessen ^{14}C -Markierung sich auf beide Carbonyl-C-Atome verteilt. Es wurde nach Hydrolyse des Reaktionsansatzes mit Ether extrahiert, über den Kupferkomplex **7** gereinigt und zur Kondensation mit dem 3-Pyrrolidinoglutarat **9** mit Lithiumdiisopropylamid in **10** übergeführt. Das Glutarat **9** war aus Pyrrolidin und Glutaconsäure-diethylester mit 82% Ausbeute erhältlich^{11,16)}. In Anbetracht des vielstufigen Reaktionsgeschehens bei der Kondensation von **9** mit **10** zu **4a** war die auf das Bis($[2,4-^{14}\text{C}_2]$ acetylacetonato)kupfer (**7**) bezogene Radioaktivitätsausbeute von 4–7.5% zufriedenstellend. Das gelbe, kristallisierte, radioaktive Diketonaphthol **4a** stimmte mit dem von Harris und Mitarb.¹¹⁾ beschriebenen inaktiven Produkt in allen Eigenschaften überein.

Verfütterung des [^{14}C]Diketonaphthols **4a** an *Penicillium islandicum*

Vor Biosyntheseversuchen mit dem [^{14}C]Diketonaphthol **4a** war zu prüfen, ob sich für dieses unter den Inkorporationsbedingungen Kondensationsreaktionen ausschließen lassen, die eine enzymatische Umwandlung vortäuschen. **4a** kann nämlich unter sauren Bedingungen das Naphthopyran **11** und unter alkalischen Bedingungen durch Aldolkondensation Chrysophanol (**5b**) bilden¹⁷⁾. Für **5b** war von *Shibata et al.*^{17,18)} enzymatische Überführung in andere Anthrachinone, wie z. B. Islandicin (**5d**), festgestellt worden.

Zunächst wurde die Veränderung des ^1H -NMR-Spektrums von **4a** in [D_6]Dimethylsulfoxid während 30 Tagen bei Raumtemperatur untersucht. **4a** war in diesem polaren Lösungsmittel nach einem Tag zu 20% und nach 30 Tagen nahezu vollständig in das Naphthopyran **11** umgewandelt, kenntlich an einer Tieffeldverschiebung der Methylsignale nach $\delta = 2.31$ und 2.91. Für die Bildung von Chrysophanol (**5b**) fanden sich jedoch unter diesen Bedingungen keine Anzeichen.



Mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse ließ sich die Bildung von **5b** unter den Verfütterungsbedingungen völlig ausschließen. Hierzu gab man radioaktives Diketonaphthol **4a** zu dem Nährmedium *Czapek-Thom* und behandelte den Ansatz wie bei den nachfolgenden Biosyntheseversuchen (jedoch ohne Beimpfung) mit *Penicillium islandicum*. Anschließend wurde mit Ether extrahiert, der Extraktückstand nach Zuzufügen von nicht markiertem Chrysophanol (**5b**) chromatographisch aufgetrennt und das zurückgewonnene **5b** durch erneute Chromatographie und Kristallisation gründlich gereinigt. Da das so erhaltene Chrysophanol (**5b**) keine Radioaktivität oberhalb der Nachweisgrenze aufwies, muß die Bildung von **5b** aus dem Diketonaphthol **4a** unter 0.002% liegen.

Tab. 1. Inkorporation des [^{14}C]Diketonaphthols **4a** in Islandicin (**5d**) und Skyrin (**12**) durch *Penicillium islandicum*

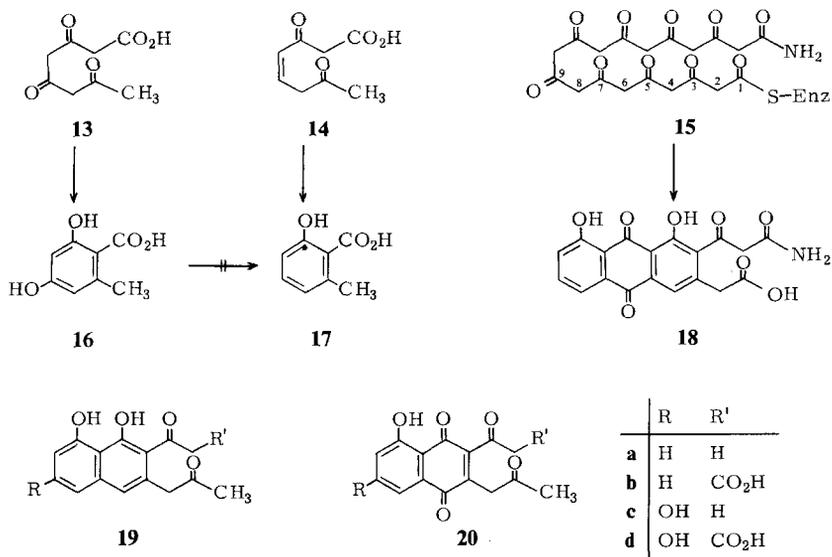
	Ansatz-Nr.			
	1	2	3	
Wachstumszeit bis zur Inkubation [d]	7	9		11
Zahl der Oberflächenkulturen	3	2		4
Substanzmenge von 4a [mg]	6.2	3.8		8.0
Gesamtradioaktivität [μCi]	0.99	0.61		1.48
Spezif. Radioaktivität [$\mu\text{Ci}/\text{mmol}$]	42	42		48
Isoliertes Anthrachinon	5d	5d	5d	12
Substanzmenge [mg]	194	286	140	154
Gesamtradioaktivität [nCi]	3.3	2.4	8.9	6.7
Spezif. Radioaktivität [nCi/mmol]	4.7	2.3	17.3	23.7
Inkorporation (%)	0.33	0.39	0.61	0.46

Als geeigneter Organismus zur Prüfung des Diketonaphthols **4a** als Zwischenstufe der Anthrachinon-Biosynthese wurde der Schimmelpilz *Penicillium islandicum* ausgewählt. Dieser japanische Reispilz, ein typischer Anthrachinonbildner¹⁹⁾, enthält als Hauptfarbstoff die Anthrachinone Islandicin (**5d**) und Skyrin (**12**). Die Inkorporationsansätze und deren Ergebnisse faßt Tabelle 1 zusammen. [^{14}C]Diketonaphthol **4a** mit der spezifischen Radioaktivität von etwa 45 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ wurde in drei Versuchsansätzen an je 2–4 gut gewachsene Kulturen des *P. islandicum* appliziert. Die Reinigung des isolierten Islandicins (**5d**) und Skyrins (**12**) bis zur konstanten Radioaktivität erfolgte durch Sublimation, Umkristallisieren und Schichtchromatographie. Die signifikanten Inkorporationen für **5d** und **12** von 0.33–0.61% liegen im Bereich der Werte, die für verwandte Biosynthesestufen von ähnlicher Molekülgröße gefunden wurden^{5,12,18)}. Der tatsächliche Einbau des Diketonaphthols **4a** dürfte noch höher liegen, da es zugunsten möglichst nativer Bedingungen den Ansätzen in sehr geringer Menge zugefügt wurde und es außerdem unter den Inkorporationsbedingungen teilweise zum stoffwechselinerten Naphthopyran **11** kondensiert.

Diskussion der Ergebnisse

Mit der Inkorporation des Diketonaphthols **4a** in Islandicin (**5d**) und Skyrin (**12**) wurde gezeigt, daß die Polyketid-Synthetase der Anthrachinon-Biosynthese für eine teilcyclisierte Zwischenstufe zugänglich ist. Dies ist deswegen bemerkenswert, weil Polyketid-Synthetasen bisher als sogenannte „Alles-oder-nichts“-Multienzymkomplexe angesehen wurden, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie nur einfache Bausteine wie Essigsäure oder Malonsäure aufnehmen und deren reaktive Folgeprodukte unaustauschbar fest gebunden halten, bis das vollständig cyclisierte, stabile Polyketid entstanden ist⁹⁾. Wegen der hohen Reaktivität in Betracht kommender Zwischenstufen sowie der Problematik ihrer Markierungssynthese blieb diese Hypothese ungeprüft und unbewiesen. Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß sie nicht generell gültig ist.

Die Inkorporation des Diketonaphthols **4a** in die Anthrachinon-Naturstoffe **5d** und **12** zeigt weiterhin an, daß bei der Anthrachinon-Biosynthese die Abspaltung der Carboxylgruppe des primär gebildeten Octaketids **1** und die Reduktion seiner mittleren Carbonylgruppe (C-9) bereits vor Abschluß der Cyclisierung erfolgen kann. Dies steht im Einklang mit den oben erwähnten Befunden, nach denen die Anthrachinoncarbonsäure Endocrocin (**5c**) nicht Biosynthese-Vorstufe des Emodins (**5a**) ist^{4,5,10}, sowie auch mit dem Nachweis, daß die Biosynthese der 6-Methylsalicylsäure (**17**) nicht über Orsellinsäure (**16**), das Kondensationsprodukt des Tetraketids **13**, verläuft. Vielmehr muß die ungesättigte Ketosäure **14** als Biosynthese-Vorstufe der 6-Methylsalicylsäure angesehen werden²⁰. Auch bei der Tetracyclin-Biosynthese über das Decaketid **15** scheint die Eliminierung der Sauerstofffunktion an C-9 vor Vollendung der Cyclisierung zu erfolgen, da sich das tricyclische Protetron (**18**) und ein ähnliches tricyclisches Anthronderivat aus blockierten Mutanten von *Streptomyces aureofaciens* isolieren ließen¹³.



Es darf nicht übersehen werden, daß das Diketonaphthol **4a** (= **19a**) eine von acht grundsätzlich möglichen bicyclischen Zwischenstufen **19a–d** und **20a–d** der Anthrachinon-Biosynthese darstellt. Verschiedene Gründe sprachen dafür, **19a**, das erwartungsgemäß auch inkorporiert wurde, den Vorzug zu geben. Solange jedoch nicht mit allen acht Verbindungen vergleichende Inkorporationsversuche durchgeführt worden sind, muß damit gerechnet werden, daß eine von ihnen **4a** als „Precursor“ übertrifft. So erwiesen sich z. B. bei Konkurrenzversuchen zur Biosynthese von Naturstoffen, die aus Anthrachinonen hervorgehen, jeweils mehrere ähnliche Verbindungen als Vorstufen, wenn auch mit recht unterschiedlichen Einbaurationen¹².

Dem Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für finanzielle Förderung, Frau M. Lütke-Twehues für mikrobiologische Mitarbeit.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Apparat nach Tottoli (Fa. Büchi). – IR: Gerät IR 177 der Fa. Perkin-Elmer. – $^1\text{H-NMR}$: Geräte T 60 und HA 100 der Fa. Varian und WH 90 der Fa. Bruker; TMS als innerer Standard. – MS: Geräte SM-1B und CH7 der Fa. Varian MAT, 70 eV, Direkteinlaß.

DC: Kieselgel-Fertigfolien Typ 60 F 254 (Merck) mit Fluoreszenzindikator, Sichtbarmachung der Zonen mit Iod dampf oder UV-Lampe. Die folgenden Lösungsmittelsysteme wurden verwendet. System 1: Benzol/Ethylformiat/Ameisensäure (20:20:1); System 2: Toluol/Cyclohexan (1:1); System 3: Chloroform/n-Hexan (2:1); System 4: Benzol/Aceton (5:1). – Für die präparative Schichtchromatographie wurde eine Aufschlammung von 160 g Kieselgel PF_{254} (Merck) in 420 ml Wasser zu einer 2-mm-Schicht auf 5 Glasplatten 20×20 cm oder auf einer Glasplatte 20×100 cm verstrichen, die luftgetrockneten Platten wurden 2 h bei 120°C aktiviert.

Die ^{14}C -markierten Syntheseprodukte und Naturstoffe wurden zunächst in inaktiver Form gewonnen und vollständig charakterisiert. Sie dienten dann zur Identifizierung der entsprechenden radioaktiven Substanzen. Für die Radioaktivitätsmessung verbrannte man Proben im sauerstoffgefüllten Meßgläschen mit Hilfe des Verbrennungsautomaten Micro-MAT BF 5010 (Berthold/Frieseke) durch optische Zündung von außen. Das Meßgläschen war mit 0.3 ml Phenylethylamin beschickt, welches das entstandene $^{14}\text{CO}_2$ während 45 min absorbierte. Anschließend löste man das gebildete Carbonat in 1 ml Methanol, gab zu der klaren Lösung 15 ml Aquasol (New England Nuclear) als Szintillationslösung und zählte die Proben im Nuclear Chicago Mark I. Die Radioaktivitäten sind in Ci angegeben ($1 \mu\text{Ci} = 2.22 \cdot 10^6$ Zerfälle/min).

Bis([2,4- ^{14}C]acetylacetonato)kupfer (7): Die Umsetzung wurde in einer speziellen Hochvakuum-Syntheseapparatur ausgeführt (Abb. 1). In die Vorlage A gab man 870 mg (15 mmol) Aceton, fror es mit flüssigem Stickstoff ein, evakuierte darin die Apparatur bei geschlossenen Hähnen H7 und H9 auf $3 \cdot 10^{-5}$ Torr, schloß die Hähne H1 – H4 sowie H6 und kondensierte die aus der Brechsigelampulle B freigesetzten 4.05 mg [2- ^{14}C]Aceton (3.0 mCi, spezif. Aktivität 43 mCi/mmol) in das Reaktionsgefäß C unter Außenkühlung mit flüssigem Stickstoff ein. Zum Spülen der Brechsigelampulle B kondensierte man das inaktive Aceton aus Vorlage A in Vorlage B und von dort in das Reaktionsgefäß C. Nachdem somit das gesamte Aceton in C eingefroren war, wurde die Apparatur über H7 bis zu einem geringen Restvakuum belüftet. Aus dem Tropftrichter D gab man nun 3.0 g (30 mmol) Acetanhydrid sowie 4.2 ml (30 mmol) Bortrifluorid-di-acetat-Komplex zu und fror das Gemisch ein. Nach Auftauen rührte man das Reaktionsgemisch 12 h bei 20°C , wobei die Hähne H1 – H9 geschlossen blieben, versetzte anschließend die rotbraune Lösung aus dem Tropftrichter D mit 45 ml wäßriger 1.3 M Natriumacetatlösung und erhitze auf 70°C . Nach 2 h überführte man die Lösung über H9 in einen Perforator und extrahierte während 2 h mit Ether in eine Vorlage, die 15 ml 30proz. wäßrige Kupferacetatlösung enthielt. Das in der Perforatorvorlage in tiefblauen Nadeln auskristallisierte 7 wurde aus Chloroform/Ethanol umkristallisiert. Ausb. 139 mg (7%); Radioaktivitätsausb. 7%; Gesamtradioaktivität 0.21 mCi; spezif. Aktivität 0.40 mCi/mmol. Durch Zugabe von 100 mg inaktivem Acetylaceton zur Mutterlauge des Acetylierungsansatzes und Wiederholung der Perforation ließen sich Reste von radioaktivem Kupferkomplex 7 isolieren. Schmp. 230°C , Zers. (Lit.²¹) 230°C , Zers.). – IR (KBr): 1580 und 1560 (C=O), 1520 cm^{-1} .

Ein analoger Ansatz mit nur 0.066 mg [2- ^{14}C]Aceton (0.05 mCi, spezif. Aktivität 43.7 mCi/mmol) und 580 mg (10 mmol) inaktivem Aceton erbrachte 204 mg (16%) Kupferkomplex 7 und 16% Radioaktivitätsausbeute. Gesamtradioaktivität 0.008 mCi, spezif. Aktivität 0.010 mCi/mmol.

Diethyl-3-pyrrolidinoglutarat (9): Die Lösung von 780 mg (11 mmol) Pyrrolidin in 30 ml Ethanol wurde langsam mit 1.86 g (10 mmol) Glutaconsäure-diethylester in 15 ml Ethanol versetzt,

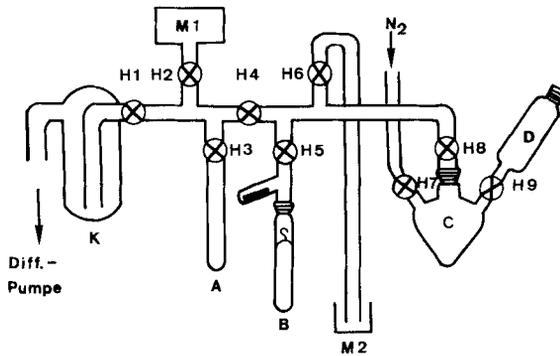


Abb. 1. Syntheseapparatur zur Darstellung des Bis([2,4- ^{14}C]acetylacetonato)kupers (7). – A: Vorlage mit inaktivem Aceton. – B: Brechsigelampulle mit [2- ^{14}C]Aceton. – C: Reaktionskolben. – D: Tropftrichter. – H1 – H9: Absperrhähne. – K: Kühlfälle. – M1, M2: Manometer

wobei die Reaktionstemperatur unter 30 °C gehalten wurde. Anschließend rührte man 24 h bei 20 °C. Nach dem Abdampfen des Ethanol verblieb ein dunkelrotes Öl, aus dem durch zweimalige Kugelrohrdestillation das Diethyl-3-pyrrolidinoglutarat (9) als farblose Flüssigkeit isoliert wurde. Ausb. 2.1 g (82%); Sdp. 141 °C/16 Torr. – IR (Film): 1730 cm^{-1} (Ester). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.16 - 1.32$ (2t; 6H, 2 CH_3 , Ethylester), 1.64 – 1.78 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, Pyrrolidin), 3.38 – 3.62 (qui, 1H, 3-H), 4.00 – 4.22 (q, 4H, 2 CH_2 , Ethylester). – MS: $m/e = 257$ (9%, M^+), 170 (100%, $\text{M} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$), 142 (17%, 170 – C_2H_4), 141 (19%, 170 – C_2H_5), 113 (15%, $\text{M} - 2 \text{CO}_2 - 2 \text{C}_2\text{H}_4$).

$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ Ber. 257.1626 Gef. 257.1631 (MS)

1-[3-([1- ^{14}C]Acetyl)-4,5-dihydroxy-[2,4- $^{14}\text{C}_2$]-2-naphthyl]-[2- ^{14}C]aceton (4a): Mit Rücksicht auf die Flüchtigkeit des umzusetzenden [2,4- $^{14}\text{C}_2$]Acetylacetons mußte auch die Synthese von 4a in einer geschlossenen Spezialapparatur durchgeführt werden (Abb. 2). In der mit Argon gespülten Apparatur füllte man den Perforator B mit 2proz. Schwefelsäure und beschickte ihn über den

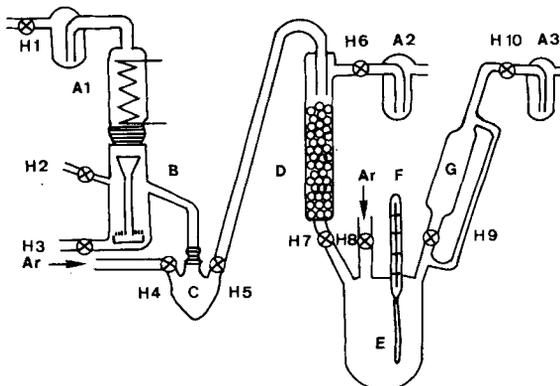


Abb. 2. Syntheseapparatur zur Darstellung des [^{14}C]Diketonaphthols 4a. – A1 – A3: Waschflaschen mit wäßriger Kupferacetat-Lösung. – B: Perforator mit Kühler. – C: Perforatorvorlage. – D: Trockensäule mit Molekularsieb und MgSO_4 . – E: Reaktionskolben. – F: Innenthermometer. – G: Tropftrichter. – H1 – H10: Absperrhähne

Hahn H2 mit einer Aufschlammung von 262 mg (1 mmol) des Kupferkomplexes von [2,4-¹⁴C₂]Acetylaceton (0.04 mCi) in Ether. Perforation mit Ether während 3 h überführte das durch die Schwefelsäure freigesetzte radioaktive Acetylaceton in die Perforatorvorlage C. Dann wurde die etherische Lösung mit Argon aus C auf die mit Molekularsieb (4 Å) und geglühtem Magnesiumsulfat gefüllte Trockensäule D gedrückt. Während der Trocknung des Perforatorextraktes in D wurde im Reaktionsgefäß E aus 444 mg (4.4 mmol) Diisopropylamin und 3.14 ml (4 mmol) einer 1.27 M n-Hexanlösung von n-Butyllithium eine Lösung von 4 mmol Lithiumdiisopropylamid in 15 ml absol. Tetrahydrofuran hergestellt.

Nach Abkühlen der in E befindlichen Lösung auf 0°C ließ man bei geöffnetem Hahn H7 unter geringem Argondruck die etherische Lösung des radioaktiven Acetylacetons langsam aus der Trockensäule D zutropfen. Danach gab man bei -25°C aus dem Tropftrichter G innerhalb von 1 h 231 mg (0.9 mmol) Diethyl-3-pyrrolidinoglutarat (**9**) in 10 ml absol. Tetrahydrofuran zu. Es bildete sich eine orangefarbene Lösung, aus der nach einiger Zeit ein gelber Niederschlag ausfiel. Nach 3 h wurden noch 77.1 mg (0.3 mmol) **9** zugesetzt, um restliches Dilithioacetylaceton zu verbrauchen, und es wurde auf 20°C erwärmt. Das Lösungsmittel dampfte man bei dieser Temperatur im Wasserstrahlvak. ab, nahm den verbleibenden gelben Kristallkuchen in wenig Wasser auf, säuerte mit kalter verd. Salzsäure an, extrahierte mit Essigester, wusch den Extrakt neutral, dampfte ein und reinigte das erhaltene gelbe Öl durch präparative Schichtchromatographie (System 1). Das gelbe [¹⁴C]Diketonaphthol **4a** wurde aus Chloroform/n-Hexan umkristallisiert. Die Ausbeuteangaben sind in Tab. 1 mit denen von zwei weiteren Syntheseansätzen zusammengefaßt.

Tab. 2. Syntheseansätze für das [¹⁴C]Diketonaphthol **4a**

	Ansatz-Nr.		
	1	2	3
Eingesetzte Menge an Komplex 7	261 mg	110 mg	113 mg
Gesamtradioaktivität	40 µCi	19.5 µCi	5.8 µCi
Ausbeute an [¹⁴ C]Diketonaphthol 4a	10 mg (3.9%)	8 mg (7.4%)	5 mg (4.5%)
Radioaktivitätsausbeute	1.6 µCi (4%)	1.5 µCi (7.7%)	0.26 µCi (4.5%)

Schmp. 209°C Zers. (Lit.¹¹) 209–210°C, Zers.). – DC (System 1): $R_F = 0.51$. – IR (CHCl₃): 1720 (C=O der Acetylseitenkette), 1631 cm⁻¹ (C=O der Acetylseitenkette). – ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.06 und 2.48 (2 s; je 3H, 2 CH₃), 3.76 (s; 2H, CH₂), 6.69–7.31 (m; 4H, arom. Protonen). – MS: $m/e = 258$ (26%, M⁺), 240 (100%, M – H₂O), 225 (13%, 240 – CH₃), 215 (8%, M – COCH₃), 212 (9%, 240 – CO), 201 (21%, M – CH₂COCH₃), 197 (21%, 240 – COCH₃), 43 (40%, CH₃CO).

C₁₅H₁₄O₄ (258.3) + 0.03 CHCl₃ Ber. C 68.95 H 5.40 Gef. C 68.98 H 5.52

Untersuchungen zur chemischen Kondensation des Diketonaphthols **4a**

a) *Zeitlicher Verlauf der intramolekularen Kondensation in neutralem Medium zum Naphthopyran **11***: Von einer Lösung aus 1.5 mg unmarkiertem Diketonaphthol **4a** in 0.5 ml [D₆]Dimethylsulfoxid im NMR-Röhrchen wurden sofort sowie nach 1 und 30 d ¹H-NMR-Spektren gemessen. Aus der Integration der CH₃-Signale von **4a** (δ = 2.06 und 2.48) und dem sich bildenden Naphthopyran **11** (δ = 2.31 und 2.91) ergab sich, daß nach 1 d 20% und nach 30 d 98% **4a** in **11** umgewandelt waren. Das Naphthopyran **11** war zu Vergleichszwecken aus nicht radioaktivem **4a** nach Literaturangaben²²) durch Kochen in Ethanol, das eine Spur Trifluoressigsäure enthält, dargestellt worden. Schmp. 219–220°C (Subl.), (Lit.²²) 221–223°C (Subl.). DC (System 1): R_F (bezogen auf **4a**) = 1.63. – ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.31 und 2.91 (2 s; je 3H, 2 CH₃), 6.4 (s,

1 H, 4-H), 6.66 (s, 1 H, 5-H), 6.68 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, 8-H), 6.98 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, 6-H), 7.53 (t, $J = 8$ Hz, 1 H, 7-H). – MS: $m/e = 240$ (100%, M^+), 225 (17%, $M - CH_3$), 212 (9%, $M - CO$), 211 (11%, $M - CHO$), 197 (31%, $M - CH_3CO$), 169 (197 – CO), 43 (48%, CH_3CO^+).

b) *Prüfung auf Bildung von Chrysophanol (5b) aus 4a unter den Inkorporationsbedingungen durch Isotopenverdünnungsanalyse:* 200 ml *Czapek-Thom*-Nährmedium wurden mit 5 mg (0.02 mmol) [^{14}C]Diketonaphthol **4a** (0.26 μCi , spezif. Aktivität 13 $\mu Ci/mm$ ol), gelöst in 3 ml 70proz. wäßrigem Ethanol, versetzt, 14 d bei 25 °C im Brutraum aufbewahrt und danach im Perforator mit Ether extrahiert. Den Extraktückstand, der im DC kein Chrysophanol (**5b**) erkennen ließ, vermischte man mit 7 mg nicht radioaktivem **5b** und trennte ihn durch präparative Schichtchromatographie (System 2). Das eluierte Chrysophanol (**5b**) zeigte nach Verbrennung im Szintillationszähler keine Radioaktivität oberhalb der Nullrate, wonach eine etwa vorhandene spezifische Radioaktivität unterhalb von 0.0003 $\mu Ci/mm$ ol, entsprechend einer Radioaktivitätsausbeute von <0.002%, liegen müßte.

Verfütterung des [^{14}C]Diketonaphthols 4a an Penicillium islandicum: In drei getrennten Inkorporationsansätzen wurden Lösungen des [^{14}C]Diketonaphthols **4a** in jeweils 10 ml 70proz. Ethanol unter die Myceldecke von insgesamt 9 350-ml-Oberflächenkulturen (*Czapek-Dox*-Nährlösung) von *Penicillium islandicum* (ATCC 10127*) gespritzt. Die unterschiedlichen Wachstumszeiten der Oberflächenkulturen bis zur Inkubation, Kolbenzahl, Substanz- und Radioaktivitätsmengen von [^{14}C] **4a** sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Nach weiteren 14 d Wachstum bei 26 °C tötete man die Kulturen der Inkubationsansätze mit je 10 ml Toluol, filtrierte das Mycel ab, wusch es dreimal mit dest. Wasser, unterwarf es einer Gefriertrocknung, vermischte mit der gleichen Volumenumenge Seesand, extrahierte im Soxhlet-Apparat mit Aceton und dampfte den Extrakt ein. Der so erhaltene Rohfarbstoff wurde mit Petrolether entfettet, zur Abtrennung höhermolekularer Begleitstoffe mit Essigester über eine kurze Säule mit Kieselgel 60 PF (Merck) filtriert und dann durch SC (System 4) in zwei Fraktionen aufgetrennt, von denen die erste Islandicin (**5d**) und die zweite Skyrin (**12**) enthielt.

[^{14}C]Islandicin 5d: Das Rohislandicin befreite man durch Sublimation bei 150 °C/0.2 Torr von begleitendem Iridoskyrin, dem Dimeren des Islandicins (**5d**), und reinigte durch präparative Schichtchromatographie (System 3) sowie Umkristallisieren aus Chloroform bis zur konstanten Radioaktivität. Um die Abtrennung etwa anhaftender Spuren von radioaktivem Diketonaphthol **4a** und Naphthopyran **11** zu unterstützen, wurden beide Substanzen in nicht radioaktiver Form vor dem Chromatographieren zugemischt. Dunkelrote Plättchen; Schmp. 218 °C (Lit.²³) 218 °C). – IR (KBr): 1600 (C=O), 1450 cm^{-1} (C=C), übereinstimmend mit dem Spektrum einer authentischen Probe. Isolierte Substanz- und Radioaktivitätsmengen sowie Einbauraten s. Tab. 1.

[^{14}C]Skyrin 12: Das Rohskyrin aus den Inkubationsansätzen wurde durch präparative Schichtchromatographie (System 4) und Umkristallisieren aus Toluol/Aceton bis zur konstanten Radioaktivität gereinigt. Orangerote Nadeln; Schmp. >300 °C (Lit.²⁾ >300 °C). – IR (KBr): 1610 (C=O), 1440 cm^{-1} (C=C); übereinstimmend mit dem Spektrum einer authentischen Probe. Substanz und Radioaktivitätsmengen sowie Einbauraten s. Tab. 1.

*) American Type Culture Collection, Rockville, Maryland/USA.

- 1) 31. Mitteil.: B. Franck und H.-P. Gehrken, *Angew. Chem.* **92**, 484 (1980); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **19**, 461 (1980).
- 2) R. H. Thomson, *Naturally Occurring Quinones*, Academic Press, New York 1971.
- 3) W. B. Turner, *Fungal Metabolites*, S. 156, Academic Press, New York 1971.
- 4) B. Franck und H. Flasch, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **30**, 151 (1973).
- 5) B. Franck in *The Biosynthesis of Mycotoxins* S. 157, (P. S. Steyn), Academic Press, New York 1980.
- 6) S. Gatenbeck, *Acta Chem. Scand.* **14**, 296 (1960); **16**, 1053 (1962).
- 7) E. Leistner, *Phytochemistry* **10**, 3015 (1971).
- 8) B. Franck, *Angew. Chem.* **91**, 453 (1979); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **18**, 429 (1979).
- 9) J. D. Bu'Lock in *Comprehensive Organic Chemistry* (Sir Derek Barton und W. D. Ollis) Vol. 5, S. 927, Pergamon, Oxford 1979.
- 10) W. Steglich, R. Arnold, W. Lösel und W. Reininger, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 102.
- 11) T. M. Harris, A. D. Webb, C. M. Harris, P. I. Wittek und T. P. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 6065 (1976).
- 12) B. Franck, G. Bringmann und G. Flohr, *Angew. Chem.* **92**, 483 (1980); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **18**, 460 (1980).
- 13) J. R. D. McCormick und E. R. Jensen, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 7126 (1968).
- 14) T. M. Harris, C. M. Harris und K. B. Hindley, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **31**, 217 (1974).
- 15) C. C. Mao, F. C. Frostrick, E. H. Man, R. M. Maniyk, R. L. Wells und C. R. Hauser, *J. Org. Chem.* **34**, 1425 (1969).
- 16) A. Stange, Dissertation, Univ. Münster 1979.
- 17) U. Sankawa, Y. Ebizuka und S. Shibata, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 2125.
- 18) U. Sankawa in *The Biosynthesis of Mycotoxins* S. 357, (P. S. Steyn), Academic Press, New York 1980.
- 19) M. Enomoto und I. Ueno in *Mycotoxins*, S. 303, (I. F. H. Purchase), Elsevier, Amsterdam 1974.
- 20) P. Dimroth, H. Walter und F. Lynen, *Eur. J. Biochem.* **13**, 98 (1970).
- 21) E. W. Berg und J. T. Truemper, *J. Phys. Chem.* **64**, 487 (1960).
- 22) A. D. Webb und T. M. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 2069.
- 23) B. H. Howard und H. Raistrick, *Biochem. J.* **44**, 227 (1949).
- 24) U. Weiss und J. M. Edwards, *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*, S. 409, J. Wiley, New York 1980.

[200/80]