

Antibiotika aus Gleitenden Bakterien, XVII¹⁾

Myxopyronin A und B – zwei neue Antibiotika aus *Myxococcus fulvus* Stamm Mx f50

Werner Kohl^{*a}, Herbert Irschik^b, Hans Reichenbach^b und Gerhard Höfle^a

GBF, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH,
Abteilung Naturstoffchemie^a und Abteilung Mikrobiologie^b,
Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig

Eingegangen am 25. März 1983

Aus dem Kulturüberstand des Gleitenden Bakteriums *Myxococcus fulvus* Stamm Mx f50 (Myxobacterales) wurden zwei Myxopyronin A und B genannte Antibiotika isoliert und konstitutionell aufgeklärt. Es handelt sich um die Verbindungen **9a**, **b** mit einer 3-Acyl-4-hydroxy- α -pyron-Struktur und einer für Naturstoffe ungewöhnlichen *N*-Alkenyl-Carbamat-Funktion.

Antibiotics from Gliding Bacteria, XVII. – Myxopyronin A and B – Two Novel Antibiotics from *Myxococcus fulvus* Strain Mx f50

From the gliding bacterium *Myxococcus fulvus* strain Mx f50 two antibiotics, named myxopyronin A and B, have been isolated and shown to possess the structures **9a** and **9b**. The two new compounds are 3-acyl-4-hydroxy- α -pyrones with an *N*-alkenylcarbamate function uncommon to natural products.

Wie bisherige Untersuchungen gezeigt haben, sind die zu den Gleitenden Bakterien gehörenden Myxobakterien eine interessante Quelle für neue antibiotisch wirksame Naturstoffe der unterschiedlichsten Substanzgruppen¹⁾. So wurden bisher Myxothiazol aus *Myxococcus fulvus* Stamm Mx f16²⁾, Myxovalargin aus *Myxococcus fulvus* Stamm Mx f65³⁾, Myxovirescin aus *Myxococcus virescens* Stamm Mx v48⁴⁾ und Myxalamid aus *Myxococcus xanthus* Stamm Mx x12⁵⁾ isoliert und in ihrer Konstitution aufgeklärt.

Der von uns untersuchte *Myxococcus-fulvus*-Stamm Mx f50 enthält in seinem Kulturfiltrat zwei gegen Gram-positive Bakterien wirksame Substanzen⁶⁾, deren Isolierung und Konstitutionsaufklärung im folgenden berichtet wird.

Die beiden Wirkstoffe wurden mit Essigester aus dem Kulturfiltrat, in dem sie in einer Konzentration von rund 5 mg/l enthalten sind, extrahiert. Nach Verteilen zwischen Methanol und Hexan und aufeinanderfolgender Chromatographie an Sephadex LH-20 und Kieselgel RP-8 wurde das Gemisch der beiden Komponenten weitgehend rein erhalten. Durch präparative HPLC an Kieselgel RP-18 konnten die beiden chemisch sehr ähnlichen Verbindungen getrennt werden. Die Konstitutionen der von uns Myxopyronin A (**9a**) und B (**9b**) genannten Verbindungen wurde aus den folgenden spektroskopischen Befunden abgeleitet und durch chemische Derivatisierung und Abbau erhärtet.

Myxopyronin A

Die Hauptkomponente A besitzt eine massenspektrometrisch bestimmte Molmasse von 417 amu und die Elementarzusammensetzung $C_{23}H_{31}NO_6$. In ihrem ^{13}C -NMR-Spektrum (Tab. 1) erkennt man im Alkylbereich 4 CH_3 -, 4 CH_2 -, 1 CH - und 1 Methoxygruppe sowie 8 quartäre und 5 tertiäre C-Atome im Carbonyl/Olefinbereich. Aus dem 1H -NMR-Spektrum (Abb. 1, Tab. 1) konnten durch Entkopplungsversuche (Tab. 2) zwei zusammenhängende Kohlenstoffsequenzen (1a und 2) abgeleitet werden.

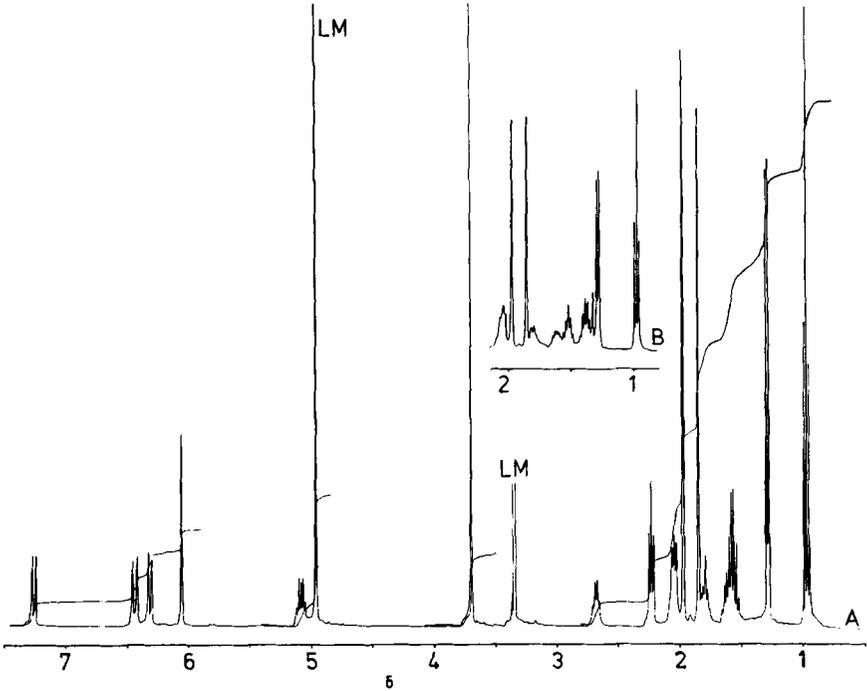


Abb. 1. 1H -NMR-Spektren von **9a** (A) und **9b** (B) in $[D_4]$ Methanol

Von den beiden Methylsingulets bei $\delta = 1.86$ und 1.97 abgesehen, ist in **1a** und **2** der gesamte aliphatische Bereich des Moleküls enthalten. Um diese Partialstrukturen abzusichern, wurde Myxopyronin A ozonolysiert. Nach oxidativer Aufarbeitung und Veresterung mit Diazomethan konnten durch GC/MS-Analyse als Hauptprodukte 2-Methylglutarsäure-dimethylester und Methylpropylketon nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigte nicht nur die Partialstrukturen **1a** und **2**, sondern die Isolierung des Methylpropylketons erfordert auch eine methylsubstituierte Doppelbindung, womit es möglich ist, **1a** zu **1b** zu erweitern. Der große Unterschied in der chemischen Verschiebung der beiden koppelnden vicinalen olefinischen Protonen bei $\delta = 6.30$ und 7.20 , denen im ^{13}C -Spektrum durch selektive $^{13}C\{^1H\}$ -Entkopplung die C-Atome bei $\delta = 122.3$ und 137.8 zugeordnet wurden, läßt sich gut mit einem carbonylsubstituierten Bu-

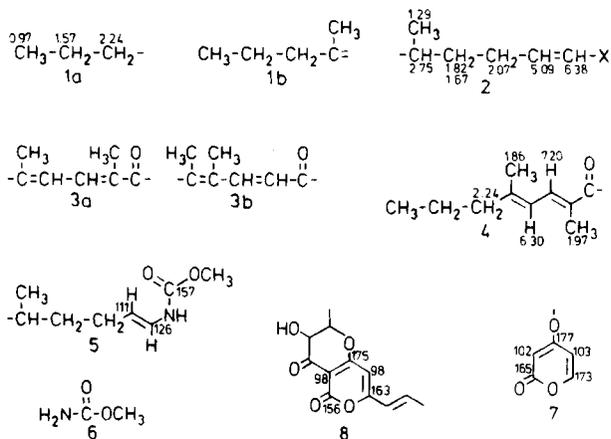
tadiensystem **3a** oder **3b** erklären. Außerdem erfordert auch das ^{13}C -Signal bei $\delta = 199.6$ ein α,β -ungesättigtes Keton.

Tab. 1. ^1H - und ^{13}C -Daten (δ -Werte, J [Hz]) von Myxopyronin A und B

Myxopyronin A (9a)				Myxopyronin B (9b)		
^{13}C	^1H	J_{HH}	Zuordnung	^{13}C	^1H	J_{HH}
11.8	1.97 ^{a)}	s	CH_3-	12.4	2.00	s
14.0	0.97 ^{a)}	t, 7	CH_3-	14.3	0.99	t, 7
17.2	1.86 ^{a)}	s,	CH_3-	17.3	1.87	s
18.4	1.29 ^{a)}	d, 7	CH_3-	18.2	1.29	d, 7
22.0	1.57	tq, 8, 8	$-\text{CH}_2-$	23.3	1.39	tq, 8, 8
28.5	2.07	dt, 7, 8	$-\text{CH}_2-$	28.4	2.07	dt, 7, 8
—	—	—	$-\text{CH}_2-$	31.0	1.53	tt, 7, 7
35.8	1.82	m	$-\text{CH}_2-$	35.6	1.81	m
—	1.64	m	—	—	1.61	m
39.0	2.75	tq, 7, 7	$>\text{CH}-$	39.0	2.71	tq, 7, 7
43.8	2.24	t, 7	$-\text{CH}_2-$	41.5	2.26	t, 7
52.6	3.75	s	$-\text{OCH}_3$	52.6	3.75	s
102.7	6.14 ^{a)}	s	$>\text{CH}-$	100.8	6.12	s
102.4	—	—	$>\text{C}=\text{—}$	101.7	—	—
110.8	5.09 ^{a)}	dt, 7, 14	$=\text{CH}-$	110.4	5.07	dt, 7, 14
122.3	6.30 ^{a)}	d, 12	$=\text{CH}-$	121.8	6.32	d, 12
125.9	6.38 ^{a)}	d, 14	$=\text{CH}-$	125.9	6.42	d, 14
135.4	—	—	$>\text{C}=\text{—}$	134.7	—	—
137.8	7.20	d, 12	$=\text{CH}-$	136.8	7.22	d, 12
150.5	—	—	$>\text{C}=\text{—}$	150.7	—	—
156.8	—	—	$>\text{C}=\text{—}$	156.4	—	—
165.3	—	—	$>\text{C}=\text{—}$	163.6	—	—
172.5	—	—	$>\text{C}=\text{—}$	174.4	—	—
176.5	—	—	$>\text{C}=\text{—}$	175.9	—	—
199.6	—	—	$>\text{C}=\text{O}$	199.3	—	—

a) Zuordnung zu den ^{13}C -Signalen durch selektive $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Entkopplung.

Von den Alternativen **3a** und **3b** konnte **3b** ausgeschlossen werden, da beide CH_3 -Signale und die beiden olefinischen Dubletts durch Allylkopplung verbreitert sind.



Durch Differenz-NOE-Versuche (Tab. 3) wurde dies bestätigt: Wenn bei der Frequenz des hohen olefinischen Dubletts ($\delta = 6.30$) eingestrahlt wurde, waren als positive Signale nur das CH_2 -Triplet bei $\delta = 2.24$ und das Methylsingulett bei 1.97 sichtbar. Umgekehrt ergab das Einstrahlen bei $\delta = 7.20$ nur einen Effekt bei dem zweiten Methylsingulett bei $\delta = 1.86$. Da die NOE-Versuche auch eine räumliche Nachbarschaft zwischen der Methylen- und der Methylgruppe anzeigen, ist es außerdem möglich, die Teilstrukturen **1b** und **3a** zu **4** zu verknüpfen. Zusätzlich folgt aus obigen Experimenten eine *E*-Konfiguration des Diensystems.

Tab. 2. $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ -Entkopplungsversuche mit Myxopyronin A (**9a**) (V = Vereinfachung)

Eingestrahlt bei δ	Vereinfachung bei δ
0.97	1.57 tq \rightarrow t
	0.97 t \rightarrow s
	2.24 t \rightarrow s
1.57	1.82 m \rightarrow V
	2.07 m \rightarrow V
	2.75 tq \rightarrow q
2.24	1.57 tq \rightarrow q
1.29	2.75 tq \rightarrow t
1.82	1.64 m \rightarrow V
	2.07 dt \rightarrow V
	2.75 tq \rightarrow V
2.07	1.64 m \rightarrow V
	1.82 m \rightarrow V
	5.09 dt \rightarrow d
2.75	1.29 d \rightarrow s
	1.64 m \rightarrow V
	1.82 m \rightarrow V
5.09	2.07 dt \rightarrow t
6.45	6.45 d \rightarrow s
6.45	5.09 d \rightarrow s
6.30	7.20 d \rightarrow s
7.20	6.30 d \rightarrow s

Tab. 3. ^1H -Differenz-NOE-Messungen an Myxopyronin A (**9a**)

Eingestrahlt bei δ	Positives Signal bei δ
7.20	1.86
6.30	2.24, 1.97
6.14	2.75
1.97	6.30
1.86	7.20
2.24	1.64, 6.30

Über die Natur des Substituenten X in Partialstruktur **2**, bei dem es sich nach der chemischen Verschiebung der benachbarten olefinischen Protonen nur um einen Amin- oder Amid-Stickstoff handeln konnte, gab ein Thermolyse-Versuch Aufschluß: Destil-

lation von Myxopyronin A im Kugelrohr bei 0.1 mbar ergab ein gelbes Öl und eine leichtflüchtige, kristalline, farblose Verbindung mit der Molmasse 75 amu, die in allen spektroskopischen Eigenschaften mit Methylcarbammat identisch war. Das bei der Thermolyse entstandene gelbe Öl bestand aus zahlreichen, nur durch Kapillar-GC trennbaren Produkten. Die beiden Hauptkomponenten hatten die Molmasse 298 amu und die Elementarzusammensetzung $C_{20}H_{26}O_2$, d. h. das Myxopyronin-Molekül hat bei der Thermolyse neben Methylcarbammat noch CO_2 verloren.

Mit Partialstruktur **5** kann die Entstehung des Methylcarbamats im Zuge einer thermischen *cis*-Eliminierung erklärt werden (s. auch Fußnote⁹). In Übereinstimmung mit **5** ist die chemische Verschiebung der beiden olefinischen Protonen und C-Atome sowie ein Carbonyl-C-Signal bei $\delta = 156.8$. Die Kopplungskonstante von 14 Hz für die olefinischen Protonen spricht für eine *E*-Konfiguration dieser Doppelbindung.

Zwischen den Elementen der Teilstrukturen **4** und **5** und der Elementarzusammensetzung von Myxopyronin A besteht noch eine Differenz von $C_5H_2O_3$, der im ^{13}C -Spektrum ein Methin-Signal bei $\delta = 102.7$ und vier Signale quartärer C-Atome bei $\delta = 102.4, 165.3, 172.5$ und 176.5 entsprechen. Ein Sauerstoffatom gehört zu einer mit Acetanhydrid/Pyridin acetylierbaren und mit Methyljodid/ K_2CO_3 methylierbaren OH-Gruppe. Bei Aufnahme des 1H -NMR-Spektrums in $CDCl_3$ findet man das zugehörige OH-Signal bei $\delta = 16.5$, was auf eine starke Wasserstoffbrücke hindeutet. Die ^{13}C -Verschiebungen lassen sich sehr gut mit einem in 4-Position mit Sauerstoff substituierten α -Pyrongerüst **7**, wie man es z. B. auch im Radicinin (**8**) findet⁷), erklären. Das einzige Ringproton, das im Protonenspektrum bei $\delta = 6.14$ liegt, ist, wie die NOE-Experimente ergaben (Tab. 3), zu dem aliphatischen Methinproton in Partialstruktur **5** räumlich benachbart. Da das Pyronproton nach den Ergebnissen der $^{13}C\{^1H\}$ -Entkoppelungsversuche an das bei $\delta = 102.7$ absorbierende C-Atom gebunden ist, muß **5** an C-5 des Pyronrings gebunden sein. Rest **4** muß damit über Position 3 verknüpft sein, womit auch die Ausbildung einer H-Brücke erklärt wird. Damit erhält man die Konstitution **9a** für Myxopyronin A.

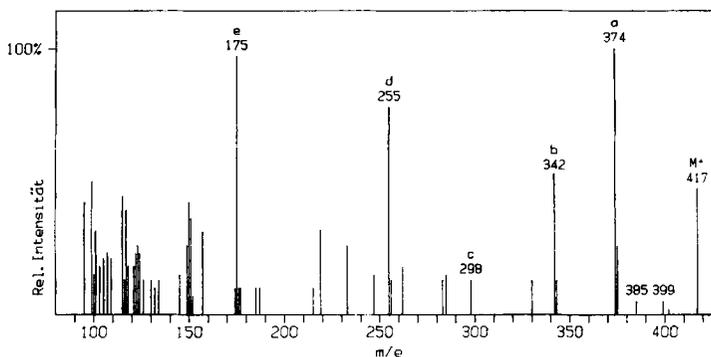
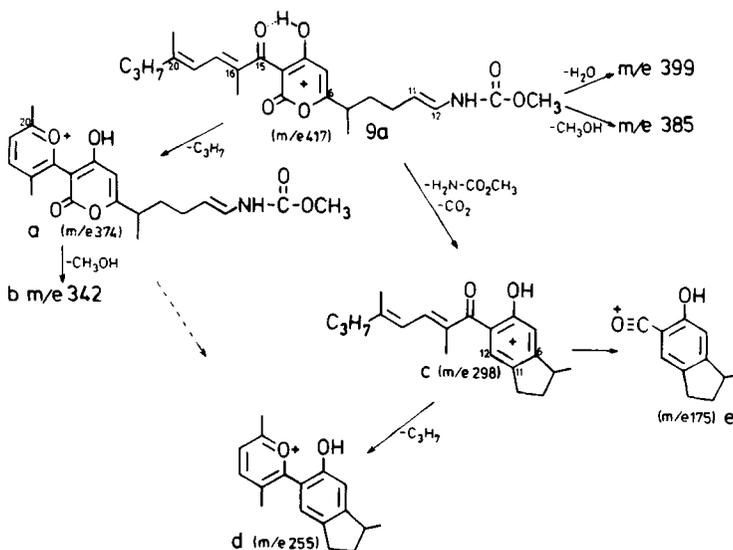


Abb. 2. Massenspektrum (70 eV) von **9a**

Ebenfalls mit **9a** im Einklang ist das Massenspektrum von Myxopyronin A (Abb. 2). Zerfallswege, mit denen die wesentlichen Fragmente erklärt werden können, sind in

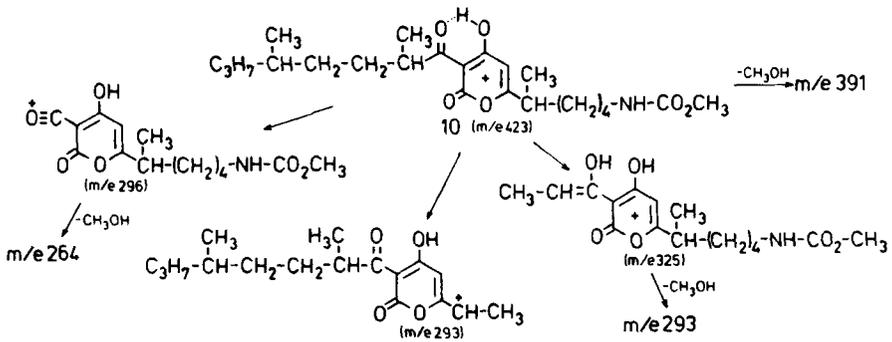
Schema 1 zusammengefaßt. Die Elementarzusammensetzungen der Schlüsselfragmente wurden durch Hochauflösung abgesichert. Hervorzuheben sind besonders das Fragment **a** mit $m/e = 374$, das einer Eliminierung von C_3H_7 aus dem Molekül-Ion entspricht und durch eine Pyrylium-Struktur stabilisiert wird, und das Ion **c** bei $m/e = 298$, das durch Methylcarbamat-Eliminierung aus dem Molekül-Ion und anschließende intramolekulare Diels-Alder-Reaktion und CO_2 -Abspaltung entstehen kann. Da Methylcarbamat auch thermisch eliminiert werden kann und intermolekulare Diels-Alder-Reaktionen zwischen Pyronen und Olefinen bzw. Acetylen bekannt sind⁸⁾, kann man nicht ausschließen, daß auch **c** zumindest teilweise thermisch entsteht⁹⁾.

Schema 1. Wesentliche MS-Fragmentierungswege von **9a**



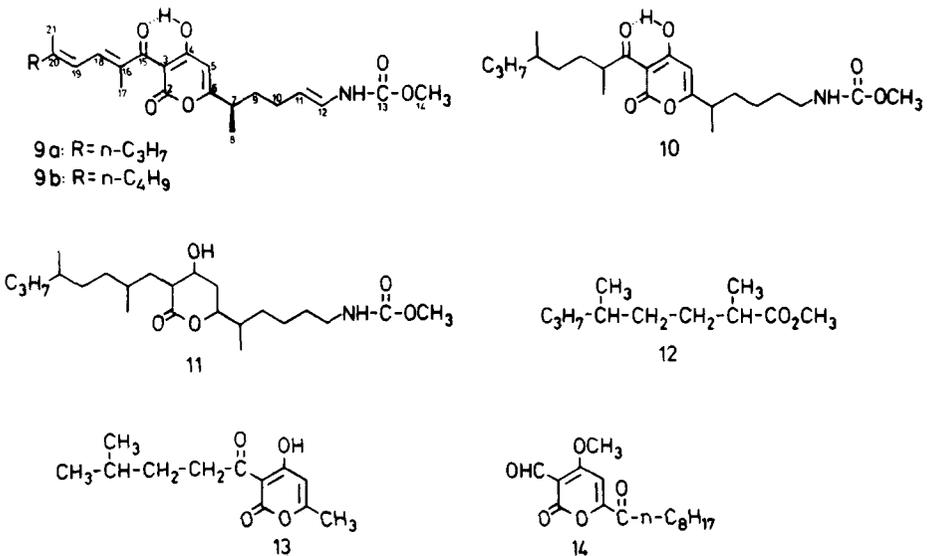
Zur Absicherung der Konstitution von **9a** wurden folgende Umsetzungen durchgeführt:

1) *Katalytische Hydrierung*: Mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator entstand bei normalem Druck und Raumtemperatur das Hexahydroprodukt **10** (als Diastereomergemisch) mit intaktem Pyronring. Die MS-Fragmentierung von **10** (Schema 2) ist in voller Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen Konstitution. Im 1H -NMR-Spektrum von **10** sind die ehemals allylischen CH_3 -Gruppen nach $\delta = 1.1$ bzw. 1.3 verschoben. Neben fünf zusätzlichen Protonensignalen im aliphatischen Bereich zwischen $\delta = 1.0$ und 1.6 findet man ein verbreitertes Methylen-Triplett bei $\delta = 3.16$ für die $-CH_2NH$ -Gruppierung und ein Sextett bei $\delta = 3.84$ für das 16-Methin-Proton. Die ausgesprochen tiefe Lage dieses Signals kann damit erklärt werden, daß das Proton durch die H-brückengebundene Carbonylgruppe und die beiden Alkylreste sterisch so fixiert ist, daß es durch die magnetische Anisotropie der Lacton-Carbonylfunktion beeinflusst wird¹⁰⁾.

Schema 2. Wesentliche MS-Fragmentierungswege von **10**

Mit Ruthenium auf Aktivkohle wurden bei 75 °C und 50 bar auch die Pyron-Doppelbindungen hydriert, und darüber hinaus wurde auch die Ketogruppe hydrogenolysiert, und man erhielt **11** als nicht weiter aufgetrenntes Diastereomerengemisch, dessen Konstitution ebenfalls durch das Massenspektrum gesichert wurde.

2) *Säurespaltung des Hexahydromyxopyronins A (10)*: 3-Acylpyrone können wie offenkettige β -Dicarbonylverbindungen einer Säurespaltung unterworfen werden¹¹⁾. Aus Myxopyronin A entstanden unter diesen Bedingungen allerdings nur undefinierte, polare Zersetzungsprodukte, die vermutlich auf Nebenreaktionen des Enamid- und Diensystems zurückzuführen sind. Wir unterwarfen deshalb auch das Hexahydroprodukt **10** einer Säurespaltung und erhielten dabei eine Carbonsäure, die sich nach Veresterung mit Diazomethan – wie erwartet – als 2,5-Dimethyloctansäure (**12**) erwies (identifiziert mit GC/MS).



Absolute Konfiguration des Myxopyronins A

Myxopyronin A (**9a**) besitzt einen Drehwert von $[\alpha]_D = -73.5^\circ$, der auf das einzige chirale Zentrum an C-7 zurückzuführen ist. Um die absolute Konfiguration zu bestimmen, wurde **9a** zu 2-Methylglutarsäure ozonolysiert. Nach Veresterung mit Diazomethan und präparativer GC-Reinigung stimmte der Drehwert im Absolutbetrag mit dem von S-(+)-2-Methylglutarsäure überein¹², besaß aber das entgegengesetzte Vorzeichen. Damit hat Myxopyronin A in Position 7 die R-Konfiguration.

Myxopyronin B

Die Nebenkomponente Myxopyronin B (**9b**) besitzt im Massenspektrum ein gegenüber **9a** um 14 amu erhöhtes Molekül-Ion bei $m/e = 431$. Alle Fragmente, die die C-Atome 22, 23 und 24 nicht mehr enthalten (**a**, **b**, **d**, **e**) sind gegenüber **9a** nicht verschoben. Im ¹³C-Spektrum von Myxopyronin B findet man bei weitgehend unveränderter Lage der von der Komponente A bekannten Signale zusätzlich die Absorption einer aliphatischen CH₂-Gruppe bei $\delta = 31.0$. Im ¹H-NMR-Spektrum besitzt Myxopyronin B ein zusätzliches CH₂-Multipllett bei $\delta = 1.45$, das mit der CH₃-Gruppe bei $\delta = 0.95$ und einem CH₂-Pentett bei $\delta = 1.55$ koppelt. Myxopyronin B ist damit das in der Seitenkette um ein C-Atom höhere Homologe von **9a**.

Myxopyronin A (**9a**) und B (**9b**) sind zwei neue Antibiotika aus Myxobakterien mit einer 3-Acyl- α -pyron-Struktur, die sich von den bisher bekannten antibakteriell wirksamen Naturstoffen dieses Typs, z. B. Dhelwagin (**13**) und verwandten Verbindungen^{11,13}) und in weiterem Sinne auch von Phacidin¹⁴) (**14**) und Radicinin⁷) (**8**) durch eine bei Naturstoffen ungewöhnliche N-Alkenyl-Carbamat-Funktion unterscheidet. Die Doppelbindungen in den Seitenketten und die freie OH-Gruppe scheinen für die biologische Aktivität essentiell zu sein, da die Hydrierungsprodukte **10** und **11** ebenso wie der Methylether und das Acetat inaktiv sind.

Wir danken den *Mitarbeitern der Abteilung Physikalische Meßtechnik* für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren sowie der *Service-Einheit* für die Massenzucht der Bakterien.

Experimenteller Teil

UV-Spektren: Spektralphotometer DMR 21 (Fa. Zeiss); Lösungsmittel Methanol: Uvasol. – *IR-Spektren:* IR-Spektrophotometer 297 (Fa. Perkin-Elmer); Lösungsmittel: Chloroform – *¹H-NMR-Spektren:* FT-Kernresonanzspektrometer WM 400 (Fa. Bruker); Protonenresonanz: 400 MHz, Kohlenstoffresonanz: 100.6 MHz; Lösungsmittel: CDCl₃ oder CD₃OD, innerer Standard: TMS. – *Massenspektren:* Massenspektrometer Typ MS 902S (Fa. AEI); Ionisierungsenergie: 70 eV; Auflösung: $M/\Delta M = 1000$; angegeben sind Daten i. a. für $m/e > 100$ und Intensitäten $> 5\%$; hochaufgelöste Daten im Peak-Matching-Verfahren mit $M/\Delta M = 15000$. – *Gaschromatographie:* Packard Modell 428 mit Quarzkapillare (12 m \times 0.2 mm, SP 2100), Trägergas: Wasserstoff (0.7 ml/min); Splitinjektion (1:40), Injektionstemperatur: 250°C; Detektor: Flammenionisationsdetektor, Temperatur: 300°C. GC-MS: Quarzkapillare (15 m \times 0.25 mm) mit DB 1-15N (SE 30), Trägergas: Helium (0.8 ml/min); offene Kopplung über eine Quarzkapillare an ein Massenspektrometer MS 30 (Fa. Kratos), Ionisierungsenergie: 24 eV, Auflösung: $M/\Delta M = 1000$ (10% Tal), Scanintervall: 6 sec. – *Präparative GC:* Glassäulen (2 m \times 4 mm) gepackt mit 3% OV-17 auf Chromosorb W HP (80–100 mesh), Trägergas: Helium (60 ml/min),

Detektor: Wärmeleitfähigkeitsdetektor. – *Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)*: LiChrosorb RP-18, 7 μm , 25 cm \times 4 mm (Fa. Merck) und RP-18, 10 μm , 25 cm \times 16 mm (Fa. Knauer); Detektion mit Spektralphotometer bei 280 nm. – *Präparative Säulenchromatographie*: Prep LC 500 (Fa. Waters) mit 2 hintereinandergeschalteten RP-8-Kartuschen; Kieselgel-Lobar-Fertigsäulen, Gr. B (Fa. Merck) und Sephadex LH-20 (Fa. Pharmacia). – *Dünnschichtchromatographie*: DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Fa. Merck); Standardlaufmittel: CH₂Cl₂/CH₃OH (95:5); Detektion: UV-Lösung bei 254 nm. – *Schmelzpunkte*: Kofler-Heiztischmikroskop, die Werte sind unkorrigiert.

Myxopyronin A und B: *Mycococcus fulvus* Stamm Mx f50 wurde wie in Lit.⁶⁾ beschrieben im 300-l-Fermenter gezüchtet, das Kulturfiltrat mit 30 l Essigester im Gegenstrom extrahiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Rohextrakte von zwei Ansätzen wurden vereinigt, mit Methanol/Wasser (95:5) aufgenommen und zweimal mit Heptan ausgeschüttelt. Die eingedampfte Methanolphase (8.7 g) wurde in 100 ml Methanol gelöst und über eine Sephadex-LH-20-Säule (6 \times 80 cm, Laufmittel: Methanol) chromatographiert. Die im Blättchen-Test gegen *Staphylococcus aureus* aktiven Fraktionen wurden vereinigt, i. Vak. eingedampft (4.25 g), in 20 ml Methanol gelöst und über Kieselgel RP-8 chromatographiert (Laufmittel: Methanol/Wasser/Eisessig, 80:20:4, 200 ml/min, t_R = 6 min). Das resultierende Gemisch (2.9 g) aus Myxopyronin A und B war zu etwa 98 % rein (NMR). Das relative Mengenverhältnis der beiden Komponenten hängt stark von den Fermentationsbedingungen ab. Im vorliegenden Fall bestand das Gemisch zu 90 % aus Myxopyronin A. Retentions-Zeit (t_R) in der analytischen HPLC (Laufmittel: Methanol/Wasser, 70:30 + PIC A, 2 ml/min): Myxopyronin A 3.86 min, Myxopyronin B 5.72 min. Zur spektroskopischen Charakterisierung wurden 500 mg des Gemisches durch präparative HPLC (Laufmittel: Methanol/Wasser/Eisessig, 70:30:4, 6.4 ml/min, t_R = 11.0 min für A und 15.0 min für B) getrennt: 350 mg Myxopyronin A und 45 mg Myxopyronin B.

N- \langle 5- $\{$ 3- $\{$ (2*E*,4*E*)-2,5-Dimethyl-2,4-octadienoyl $\}$ -4-hydroxy-2-oxo-2*H*-pyran-6-yl $\}$ -5-methyl-(1*E*)-1-pentenyl $\}$ carbamidsäure-methylester (= Myxopyronin A, **9a**): R_F = 0.5 (Standardlaufmittel). – ¹H-NMR (CD₃OD): siehe Abb. 1 (A) und Tab. 1. – ¹³C-NMR (CD₃OD): siehe Tab. 1. – UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 213 (4.50), 298 nm (4.31). – IR (Chloroform): 1720 (C=O), 1635 (C=O) cm⁻¹. – $[\alpha]_D^{20}$ = -73.5 (c = 0.3 in Methanol). – MS: siehe Abb. 2.

Hochauflösung:		Ber.	Gef.	
	417.2151	417.2152		C ₂₃ H ₃₁ NO ₆ (M ⁺)
	374.1603	374.1595		C ₂₀ H ₂₄ NO ₆
	342.1341	342.1342		C ₁₉ H ₂₀ NO ₅
	255.1384	255.1379		C ₁₇ H ₁₉ O ₂
	175.0759	175.0754		C ₁₁ H ₁₁ O ₂

C₂₃H₃₁NO₆ (417.5) Ber. C 66.16 H 7.48 N 3.35 Gef. C 65.89 H 7.47 N 3.27

N- \langle 5- $\{$ 3- $\{$ (2*E*,4*E*)-2,5-Dimethyl-2,4-nonadienoyl $\}$ -4-hydroxy-2-oxo-2*H*-pyran-6-yl $\}$ -5-methyl-(1*E*)-1-pentenyl $\}$ carbamidsäure-methylester (= Myxopyronin B, **9b**): R_F = 0.5 (Standardlaufmittel). – ¹H-NMR (CD₃OD): siehe Abb. 1 (B) und Tab. 1. – UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 213 (4.48), 297 nm (4.31). – IR (Chloroform): 1720 (C=O), 1635 (C=O) cm⁻¹. $[\alpha]_D^{20}$ = -74.9 (c = 0.2 in Methanol). – MS (70 eV): m/e (%) = 431 (51, M⁺), 416 (8), 415 (8), 375 (21), 374 (100), 342 (17), 299 (24), 295 (10), 262 (11), 256 (7), 255 (35), 248 (7), 247 (7), 233 (7), 219 (10), 191 (15), 184 (10), 175 (14), 165 (10), 164 (20), 152 (8), 151 (12), 150 (11), 149 (65), 137 (10), 127 (7), 123 (7), 122 (10), 121 (7).

Hochauflösung: Ber. 431.2308 Gef. 431.2306 C₂₄H₃₃NO₆ (M⁺)

N- \langle 5- $\{$ 4-Acetoxy-3- $\{$ (2*E*,4*E*)-2,5-dimethyl-2,4-octadienoyl $\}$ -2-oxo-2*H*-pyran-6-yl $\}$ -5-methyl-(1*E*)-1-pentenyl $\}$ carbamidsäure-methylester (= Myxopyronin-A-acetat, **9a**-Acetat): 10 mg **9a**

wurden in je 0.5 ml Pyridin und Acetanhydrid gelöst und nach 12stdg. Stehenlassen bei Raumtemp. in Vak. zur Trockne eingedampft. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 80 cm, Laufmittel: Methanol) gereinigt; Ausb. 8 mg (73 %). – ¹H-NMR (CD₃OD): δ = 7.26 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 14 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.38 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 7.14 (dt, *J*₁ = 7 Hz, *J*₂ = 14 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.80 (sext, *J* = 8 Hz), 2.26 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.08 (dt, *J*₁ = 7 Hz, *J*₂ = 8 Hz, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.83 (m, 1H), 1.6 (mc, 3H), 1.33 (d, *J* = 8 Hz, 3H), 0.98 (t, *J* = 8 Hz, 3H). – MS (70 eV): *m/e* (%) = 459 (2, M[⊕]), 417 (11), 416 (16), 385 (5), 375 (10), 374 (39), 370 (5), 343 (8), 342 (38), 340 (10), 330 (8), 299 (11), 298 (13), 297 (41), 283 (14), 281 (14), 271 (9), 262 (9), 256 (18), 255 (100), 219 (11), 215 (16), 177 (11), 175 (41), 174 (10), 165 (8), 151 (16), 149 (32), 123 (23), 121 (13).

N-[5-[3-[(2*E*,4*E*)-2,5-Dimethyl-2,4-octadienoyl]-4-methoxy-2-oxo-2*H*-pyran-6-yl]-5-methyl-(1*E*)-1-pentenyl]carbamidsäure-methylester (= Myxopyronin-A-methylether, **9a**-Methylether): 25 mg **9a** wurden in 5 ml Aceton mit 1 ml Methyljodid und 50 mg K₂CO₃ verethert. Das Produkt wurde durch präparative HPLC (Methanol/Wasser, 70:30, 10 ml/min, *t*_R = 5.5 min) gereinigt; Ausb. 19.5 mg (76 %). – ¹H-NMR (CD₃OD): δ = 7.29 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.44 (d, *J* = 14 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 5.08 (dt, *J*₁ = 7 Hz, *J*₂ = 14 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.83 (sext, *J* = 7 Hz, 1H), 2.24 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.05 (dt, *J*₁ = 7 Hz, *J*₂ = 8 Hz, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.85 (m, 1H), 1.84 (s, 3H), 1.68 (m, 1H), 1.59 (sext, *J* = 7 Hz, 2H), 1.35 (d, *J* = 7 Hz, 3H), 0.97 (t, *J* = 7 Hz). – MS (70 eV): *m/e* (%) = 431 (2, M[⊕]), 416 (2), 388 (3), 312 (7), 298 (3), 297 (14), 270 (21), 269 (100), 255 (3), 190 (3), 189 (32), 151 (10).

N-[5-[3-(2,5-Dimethyloctanoyl)-4-hydroxy-2-oxo-2*H*-pyran-6-yl]-5-methylpentyl]carbamidsäure-methylester (= Hexahydromyxopyronin A, **10**): 50 mg **9a** wurden in 25 ml Methanol mit ca. 5 mg Pd/C (10 %) 3 h bei Raumtemp. hydriert. Das Produkt wurde durch präparative HPLC (Methanol/Wasser/Eisessig, 80:20:4, 8 ml/min, *t*_R = 14.4 min) gereinigt; Ausb. 28 mg (55 %) (Diastereomerenmischung). – ¹H-NMR des Diastereomerenmischungs (CDCl₃): δ = 17.3 (s, OH), 5.95 (s, 5-H), 4.8 (s, breit, NH), 3.86 (tq, *J*₁ = *J*₂ = 7 Hz, 16-H), 3.65 (s, OCH₃), 3.16 (t, *J* = 7 Hz, 12-H₂), 2.55 (tq, *J*₁ = *J*₂ = 7 Hz, 7-H), 0.7–2.2 [27 Alkylprotonen, darin enthalten: 1.25 (d, 7 Hz, 17-H₃), 1.23 (d, 7 Hz, 8-H₃), 0.85 (m, 29-H₃) und 21-H₃]. Das Vorliegen von Diastereomeren macht sich durch Verbreiterung oder Verdoppelung der Signale bei 3.86, 3.65, 3.16, 1.25, 1.23 und 0.85 bemerkbar. – MS (70 eV): *m/e* (%) = 423 (84, M[⊕]), 392 (23), 391 (60), 325 (29), 308 (5), 307 (33), 306 (49), 296 (27), 294 (29), 293 (98), 265 (23), 264 (100), 238 (29), 237 (29), 223 (11), 209 (11), 197 (9), 196 (11), 179 (9), 175 (15), 167 (19), 166 (9), 165 (13), 158 (9), 155 (9), 154 (33), 153 (25), 152 (15), 151 (11), 149 (9), 127 (13), 126 (35), 125 (23), 123 (15), 119 (43), 111 (13), 110 (25), 109 (15), 97 (21), 96 (27).

Hochauflösung: Ber. 423.2619 Gef. 423.2623 C₂₃H₃₇NO₆ (M[⊕])

N-[5-[3-(2,5-Dimethyloctyl)-3,4,5,6-tetrahydro-4-hydroxy-2-oxo-2*H*-pyran-6-yl]-5-methylpentyl]carbamidsäure-methylester (= Decahydro-15-desoxomyxopyronin A, **11**): 50 mg **9a** wurden in 25 ml Methanol mit ca. 10 mg Ru/C (5 %) 14 h bei 50 bar und 75 °C hydriert. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie (Lobar-Kieselgel-Fertigsäule, Laufmittel: Hexan/2-Propanol, 90:10, Detektion bei 215 nm) gereinigt; Ausb. 25 mg (41 %) (Diastereomerenmischung). – MS (70 eV): *m/e* (%) = 413 (14, M[⊕]), 396 (4), 395 (15), 382 (4), 377 (8), 364 (6), 363 (13), 354 (3), 346 (3), 345 (8), 287 (10), 286 (53), 274 (10), 273 (52), 269 (4), 268 (13), 256 (7), 255 (10), 254 (28), 250 (9), 241 (10), 240 (6), 238 (8), 237 (33), 236 (16), 232 (4), 226 (4), 225 (7), 224 (4), 223 (8), 219 (5), 218 (14), 215 (4), 214 (25), 211 (8), 210 (8), 209 (4), 208 (5), 205 (4), 201 (4), 198 (4), 196 (10), 195 (7), 193 (7), 192 (6), 188 (6), 187 (6), 186 (16), 185 (34), 184 (7), 183 (7), 182 (35), 181 (7), 180 (7), 175 (7), 172 (15), 170 (18), 169 (12), 167 (6), 166 (6), 165 (7), 164 (10), 163 (6), 159 (40), 158 (12), 156 (14), 155 (7), 154 (14), 153 (9), 151 (8), 149 (7), 144 (13), 142 (10), 140 (8), 139 (18), 138 (18), 137 (10), 136 (9), 135 (9), 130 (14), 129 (14), 128 (100), 127 (10), 126 (10), 125 (10), 124 (9),

123 (13), 122 (6), 121 (19), 114 (28), 113 (6), 112 (12), 111 (20), 110 (96), 109 (26), 108 (8), 107 (13), 105 (6), 102 (13), 101 (12).

Hochauflösung:	Ber.	Gef.	
	413.3141	413.3141	$C_{23}H_{43}NO_5$ (M^{\oplus})
	286.1654	286.1660	$C_{14}H_{24}NO_5$
	273.1576	273.1584	$C_{13}H_{23}NO_5$
	254.1392	254.1396	$C_{13}H_{20}NO_4$

Thermolyse von Myxopyronin A: 200 mg **9a** wurden in einer mit fünf Kugeln bestückten Kugelrohr-Destillationsapparatur bei 250 °C und 0.1 mbar destilliert. In der dritten Kugel kondensierte eine gelbe Flüssigkeit und in der mit Trockeneis gekühlten fünften Kugel eine kristalline, weiße Substanz, die in allen Eigenschaften (Schmp., IR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR) mit käuflichem Methylcarbammat identisch war. Das gelbe Kondensat enthielt laut Kapillar-GC als Hauptkomponenten zwei isomere Verbindungen (220 °C isotherm, $t_R = 5.6$ und 5.8 min), denen nach dem Massenspektrum die Elementarzusammensetzung $C_{20}H_{26}O_2$ zukommt. Die Isomeren hatten identische Massenspektren (25 eV): m/e (%) = 298 (10, M^{\oplus}), 283 (15), 256 (100), 215 (25), 199 (10), 177 (35), 176 (9), 129 (8), 124 (7), 120 (10).

Dynamische Hochauflösung bei $M/\Delta M = 10000$:

Peak 1:	Ber. 298.1931	Gef. 298.1943	$C_{20}H_{26}O_2$ (M^{\oplus})
Peak 2:	Ber. 298.1931	Gef. 298.1923	$C_{20}H_{26}O_2$ (M^{\oplus})

Ozonolyse von Myxopyronin A. – a) *Aufarbeitung mit H_2O_2 :* In eine Lösung von 5 mg **9a** in 2 ml Methanol wurde bei Raumtemp. 10 min lang Ozon eingeleitet (Durchfluß ca. 1 g O_3/h). Nach 5 min. Stehenlassen bei Raumtemp. wurde i. Vak. auf ca. 100 μ l eingengt, dann wurden 0.5 ml Wasser und 2 Tropfen 30proz. H_2O_2 -Lösung zugegeben, und es wurde 30 min bei Raumtemp. und 30 min bei 80 °C gerührt. Überschüssiges H_2O_2 wurde mit Pt/C zerstört, die Produkte wurden mit Ether extrahiert und die enthaltenen Säuren für die GC- bzw. GC-MS-Analyse mit Diazomethan verestert. Die GC-Analyse (Temperaturprogramm: 3 min 30 °C isotherm, dann 5 °C/min) ergab als Hauptprodukte 2-Pentanon ($t_R = 1.9$ min) und 2-Methylglutarsäuredimethylester ($t_R = 16.8$ min). Die Massenspektren (GC-MS) waren mit denen der authentischen Verbindungen identisch.

b) *Aufarbeitung mit $KMnO_4$* (Präparative Gewinnung von 2-Methylglutarsäuredimethylester): 100 mg **9a** wurden nach Lit.¹⁵⁾ ozonolysiert und aufgearbeitet. Nach Extraktion mit Ether wurde mit Diazomethan verestert und der 2-Methylglutarsäuredimethylester durch präparative GC ($t_R = 1.6$ min) gereinigt; Ausb. 0.7 mg, $[\alpha]_D^{20} = -25.7$ ($c = 0.035$ in Methanol); Lit.¹²⁾ für S-(+)-2-Methylglutarsäuredimethylester: $[\alpha]_D^{20} = +24.5$.

Säurespaltung von Hexahydromyxopyronin A (10) in 2,5-Dimethyloctansäure-methylester (12): 5 mg **10** wurden in 0.5 ml 90proz. H_2SO_4 5 min lang auf 120 °C erhitzt, mit 20 ml Wasser verdünnt, mit Dichlormethan extrahiert, und das Produkt wurde mit Diazomethan verestert. Nach GC-Analyse war nur ein Produkt entstanden (100 °C isotherm, $t_R = 3.6$ min). – MS (24 eV): m/e (%) = 186 (2, M^{\oplus}), 155 (3), 143 (2), 127 (3), 115 (7), 112 (2), 111 (2), 101 (18), 89 (5), 88 (100), 87 (5), 83 (10), 71 (9), 69 (9), 59 (10), 57 (11), 56 (5), 55 (14), 44 (56), 43 (23).

- 1) XVI. Mitteilung: s. Lit.⁶⁾
- 2) *K. Gerth, H. Irschik, H. Reichenbach* und *W. Trowitzsch*, *J. Antibiot.* **33**, 1474 (1980); *W. Trowitzsch, G. Reifensahl, V. Wray* und *K. Gerth*, ebenda **33**, 1480 (1980).
- 3) *T. Kemmer, S. Santoso, H. Steinmetz, H. Irschik, L. Witte* und *G. Höfle*, 1st Internat. Confer. Chem. Biotechnol., Biological Active Natural Products, Short Commun., Bd. 3.1, S. 285, Sofia 1981; *H. Irschik, K. Gerth, T. Kemmer, H. Steinmetz* und *H. Reichenbach*, *J. Antibiot.* **36**, 6 (1983).
- 4) *W. Trowitzsch, V. Wray, K. Gerth* und *G. Höfle*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1340; *K. Gerth, H. Irschik, H. Reichenbach* und *W. Trowitzsch*, *J. Antibiot.* **35**, 1454 (1982).
- 5) *K. Gerth, R. Jansen, G. Reifensahl, G. Höfle, H. Irschik, B. Kunze, H. Reichenbach* und *G. Thierbach*, *J. Antibiot.*, im Druck; *R. Jansen, G. Reifensahl, K. Gerth, H. Reichenbach* und *G. Höfle*, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1081.
- 6) *H. Irschik, W. Kohl, G. Höfle, K. Gerth* und *H. Reichenbach*, *J. Antibiot.*, im Druck.
- 7) *H. Seto* und *S. Urano*, *Agric. Biol. Chem.* **39**, 915 (1975).
- 8) *N. P. Shusherina*, *Russ. Chem. Rev.* **43**, 851 (1974).
- 9) Sowohl bei dem thermischen wie bei dem massenspektroskopischen Prozeß ist es auch denkbar, daß in umgekehrter Reihenfolge zuerst eine Diels-Alder-Reaktion abläuft, gefolgt von sukzessiver Carbamat- und CO₂-Eliminierung.
- 10) *H. Günther*, *NMR-Spektroskopie*, S. 78, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1973.
- 11) *E. Klein* und *W. Rojahn*, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2279.
- 12) *E. Berner* und *R. Leonardsen*, *Liebigs. Ann. Chem.* **538**, 37 (1939).
- 13) *S. Nakahara, K. Kumatani* und *H. Kameoka*, *Phytochemistry* **14**, 2712 (1975). *D. de Rijke, P. C. Traas, R. ter Heide, H. Boelens* und *H. J. Takken*, *Phytochemistry* **17**, 1664 (1978).
- 14) *T. D. Cyr* und *G. A. Poulton*, *Can. J. Chem.* **60**, 133 (1982).
- 15) *W. Herz, S. V. Bhat* und *A. L. Hall*, *J. Org. Chem.* **35**, 1110 (1970).

[79/83]