

Antibiotika aus Basidiomyceten, III¹⁾

Strobilurin A und B, antifungische Stoffwechselprodukte aus *Strobilurus tenacellus*

Georg Schramm^{*)}, Wolfgang Steglich^{*)*}, Timm Anke^{**)} und Franz Oberwinkler^{**)*)}

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn^{*)},
Max-Planck-Str. 1, D-5300 Bonn, und

Lehrbereich spezielle Botanik der Universität Tübingen^{**)*)},
Auf der Morgenstelle 1, D-7400 Tübingen

Eingegangen am 21. November 1977

Die Konstitutionsaufklärung der Strobilurine A und B (**4** bzw. **5**) wird beschrieben. Es handelt sich um 1-Arylhexatriene, die eine endständige β -Methoxyacrylat-Gruppierung enthalten.

Antibiotics from Basidiomycetes, III¹⁾

Strobilurin A and B, Antifungal Metabolites from *Strobilurus tenacellus*

The structural elucidation of the strobilurins A and B (**4**, **5**, respectively) is described. These compounds are 1-arylhexatrienes containing a terminal β -methoxyacrylate moiety.

Aus Kulturen von *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. (Agaricales) isolierten wir kürzlich die Strobilurine A und B²⁾. Sie zeigen starke Hemmwirkung gegenüber zahlreichen Pilzen, darunter phytopathogenen Arten.

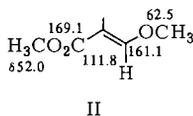
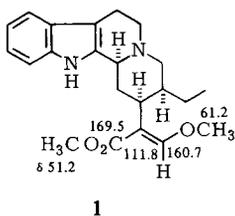
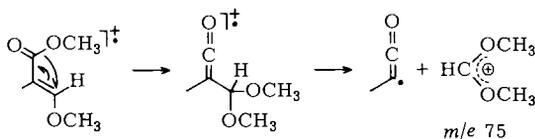
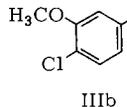
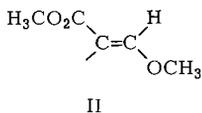
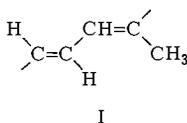
Strobilurin A und B besitzen nach den hochaufgelösten Massenspektren die Summenformeln $C_{16}H_{18}O_3$ bzw. $C_{17}H_{19}ClO_4$. Beide Verbindungen weisen im IR-Spektrum ($CHCl_3$) eine Carbonylbande bei 1700 cm^{-1} auf, die nach dem ^{13}C -NMR-Spektrum ($\delta_{CO} = 169.1$) einer α, β -ungesättigten Estergruppe zugeschrieben werden kann. Die 1H -NMR-Spektren der Strobilurine (Tab.) stimmen in Signalen für das Dien-System I, zwei Methoxygruppen ($\delta = 3.67$ und 3.90) und ein isoliertes Proton bei $\delta = 7.47$ überein.

In den Massenspektren fällt ein intensives Fragmentation $m/e = 75$ der Zusammensetzung $C_3H_7O_2$ auf. Da in den NMR-Spektren Signale für eine Acetal-Gruppierung $-CH(OCH_3)_2$ fehlen, muß das Fragment $m/e = 75$ durch eine Umlagerung entstanden sein. Postuliert man dafür eine bereits bei Zimtsäureestern beobachtete 1,3-Alkoxyverschiebung³⁾, so sollten die Strobilurine die β -Methoxyacrylat-Gruppierung II enthalten.

¹⁾ Als erste Mitteilung soll gelten: T. Anke, F. Oberwinkler, W. Steglich und G. Höfle, J. Antibiot. **30**, 221 (1977); 2. Mitteil.: Literaturstelle²⁾.

²⁾ T. Anke, F. Oberwinkler, W. Steglich und G. Schramm, J. Antibiot. **30**, 806 (1977).

³⁾ D. H. Williams, R. G. Cooks, J. H. Bowie, P. Madsen, G. Schroll und S.-O. Lawesson, Tetrahedron **23**, 3173 (1967).



Die gleiche Gruppierung kommt auch in Indolalkaloiden wie Corynantheidin (I) vor. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum mit den von Wenkert und Mitarb.⁴⁾ für 1 publizierten Werten ergibt eine sehr gute Übereinstimmung. Da für 1 die *E*-Konfiguration der Doppelbindung gesichert ist⁵⁾, sollten auch in den Strobilurinen die Ester- und Methoxy-Gruppe *trans*-ständig sein. Dies wird durch die Lage des Vinylprotons im ^1H -NMR-Spektrum (in $[\text{D}_6]$ Aceton) bei $\delta = 7.47$ (1: $\delta = 7.45$ ^{6, 7)}) und Kern-Overhauser-Experimente am Strobilurin B (s. u.) bestätigt. Im Massenspektrum des Rhynchophillins, eines Oxindolalkaloids mit der Gruppierung II, tritt wie bei den Strobilurinen ein Ion $m/e = 75$ auf (rel. Intensität ca. 50%)⁸⁾, dem bisher anscheinend wenig Beachtung geschenkt worden ist.

Zieht man die Atome der Partialformeln I und II von den Summenformeln der Strobilurine ab, so bleibt bei Strobilurin A ein Phenylrest (IIIa) und bei Strobilurin B ein Chlor-methoxyphenylrest (IIIb) übrig, der nach dem ^1H -Spektrum 1,2,4-trisubstituiert sein muß.

⁴⁾ E. Wenkert, J. S. Bindra, C.-J. Chang, D. W. Cochran und F. M. Schell, *Acc. Chem. Res.* **7**, 46 (1974).

⁵⁾ Röntgenstrukturanalyse des 9-Methoxycorynantheidins (= Mitragnin): D. E. Zacharias, R. D. Rosenstein und G. A. Jeffrey, *Acta Crystallogr.* **18**, 1039 (1965); Vergleich der ^1H -NMR-Spektren: Lit.^{6, 7)}

⁶⁾ J. A. Weisbach, J. L. Kirkpatrick, K. R. Williams, E. L. Anderson, N. C. Yim und B. Douglas, *Tetrahedron Lett.* **1965**, 3457.

⁷⁾ C. M. Lee, W. F. Trager und A. H. Beckett, *Tetrahedron* **23**, 375 (1967). Danach sollte die Resonanz des Vinylprotons bei *Z*-Konfiguration der Doppelbindung um ca. 0.5 ppm nach höherem Feld verschoben sein.

⁸⁾ B. Gilbert, J. A. Brissolese, N. Finch, W. I. Taylor, H. Budzikiewicz, J. M. Wilson und C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1523 (1963).

Tab.: NMR-Daten für 2, 3, 4 und 5 (in $[D_6]$ Aceton, TMS als innerer Standard, δ -Werte in ppm)

	2	3	4	5	4 (^{13}C) ^{a)}	5 (^{13}C) ^{a)}
1-H		d (verbr.)	6.97		C-1	d 128.0
2-H	m \approx 7.2				C-2	d 128.3
4-H		d	7.28	m \approx 7.4	C-3	d 127.3
5-H		ddt	6.78		C-4	d 128.3
7-H	m \approx 2.6	t (verbr.)	2.58	d 6.48	C-5	d 128.0
8-H				dd 6.75	C-6	s 132.5
9-H	m \approx 1.5	m } \approx 1.5		dd 6.78	C-7	d 129.7
10-H				dq 6.19	C-8	d 131.1
12-H	s 7.33	s	7.34		C-9	d 132.0
14-H	d 1.10	d	1.10	s 7.48	C-10	s 139.3
15-H	s 3.60	s	3.62	d 1.92	C-11	s 111.7
16-H	s 3.82	s	3.84	s 3.67	C-12	d 161.0
CH ₃ O		s	3.89	s 3.90	C-13	d 161.1
				s 3.90 ^{b)}	C-14	s 169.7
					C-15	q 23.9
					C-16	q 62.5
					CH ₃ O	q 52.0
						q 56.6

3: $J_{1,5} = 1.9$ Hz; $J_{4,5} = 8.0$; $J_{5,7} = 0.5$; $J_{7,8} = 6.5$; $J_{10,14} = 7.4$; **5**: $J_{1,5} = 1.8$; $J_{4,5} = 8.0$; $J_{5,7} = 0.4$; **4**, **5**: $J_{7,8} = 16$; $J_{8,9} = 10$; $J_{9,14} = 1.3$.

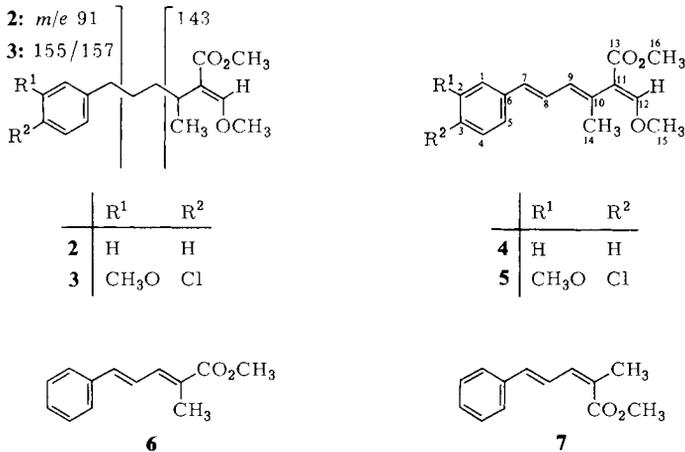
^{a)} Multiplizität aus „off resonance“-Spektrum; Zuordnung der Signale durch Inkrementrechnung; Lösungsmittel $^{12}CD_3OD$.

^{b)} Bei Zugabe von C_6D_6 zwei getrennte Singulets.

Zur Festlegung der Substituentenanordnung wurde Strobilurin B mit $\text{KMnO}_4/\text{NaIO}_4$ oxidiert⁹⁾. Die dabei isolierte substituierte Benzoesäure vom Schmp. 213 °C erwies sich als identisch mit authentischer 4-Chlor-3-methoxybenzoesäure¹⁰⁾, so daß Strobilurin B die Partialstruktur IIIb enthält.

Die Verknüpfung der Partialstrukturen I, II und III ergibt sich aus den Massenspektren der Tetrahydrostrobilurine, die durch katalytische Hydrierung über Palladium/Kohle erhältlich sind. Die Bildung von Benzyl- bzw. Chlor-methoxybenzyl-Ionen $m/e = 91$ bzw. 155/157 und eines aus dem anderen Ende des Moleküls stammenden Allylions $m/e = 143$ ($\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_3$) sind nur mit den Formeln 2 und 3 für die Tetrahydrostrobilurine A und B vereinbar. Wiederum ist in den Spektren das intensive Fragment $m/e = 75$ zu beobachten. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 3 werden die zur Seitenkette *ortho*-ständigen Protonen des Arylrestes durch Benzylkopplung mit den Methylenprotonen in Triplets aufgespalten ($J = 0.5$ Hz).

Aus diesen Befunden ergeben sich für die Strobilurine A und B die Formeln 4 und 5. Die *trans*-Anordnung der Protonen 7-H und 8-H folgt aus der Kopplungskonstante



$J = 16$ Hz, die Stereochemie der übrigen Doppelbindungen wurde durch Messung des Kern-Overhauser-Effektes¹¹⁾ bestimmt. Strahlt man beim Signal der C-Methylgruppe von 4 ein, so wird die Intensität des 8-H-Signals um 16% erhöht, während die von 12-H unbeeinflusst bleibt. Der Wert ist in guter Übereinstimmung mit Messungen am 9-*cis*- und 13-*cis*-Retinal¹²⁾ und spricht für eine *trans*-Anordnung von 9-H und Methylgruppe. Pattenden und Weedon¹³⁾ fanden bei den als Modelle geeigneten Säuren 6 und 7 nur

⁹⁾ R. U. Lemieux und E. von Rudloff, *Can. J. Chem.* **33**, 1701 (1955); R. von Rudloff, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **33**, 126 (1956).

¹⁰⁾ Dargestellt nach G. P. Gibson, *J. Chem. Soc.* **1926**, 1424. Die Konstitution aller Zwischenprodukte wurde durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Messungen gesichert (G. Schramm, unveröffentlicht).

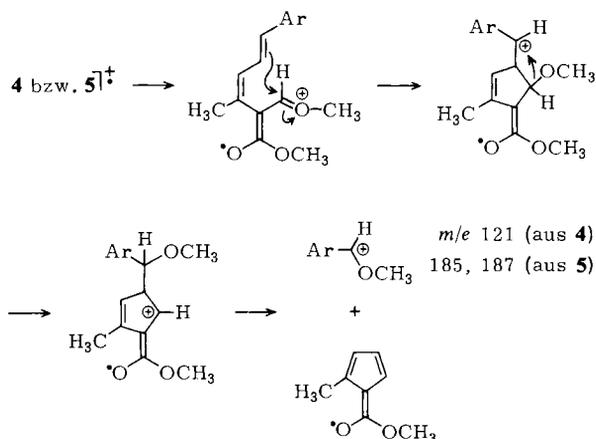
¹¹⁾ J. H. Noggle und R. E. Schirmer, *The Nuclear Overhauser Effect, Chemical Applications*, Academic Press, New York und London 1971.

¹²⁾ R. Rowan und B. D. Sykes, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1023 (1975).

¹³⁾ G. Pattenden und B. C. L. Weedon, *J. Chem. Soc. C* **1968**, 1997.

im Falle der *trans*-Stellung von 3-H und Methylgruppe eine Kopplung von $J = 1.5$ Hz, während sie bei *cis*-Stellung zu vernachlässigen ist. Die entsprechende Kopplungskonstante beträgt bei **4** und **5** $J = 1.3$ Hz, ein weiterer Hinweis auf die *E*-Konfiguration der mittleren Doppelbindung. Die mit $\delta = 23.9$ für eine olefinische Methylgruppe in sterisch beanspruchter Lage große chemische Verschiebung des ^{13}C -Signals von 14- CH_3 dürfte auf die Entschirmung durch die benachbarte Enoether-Gruppierung zurückzuführen sein¹⁴). Die *E*-Konfiguration der terminalen Doppelbindung ergibt sich außer aus dem NMR-Vergleich mit Indolalkaloiden (s. o.) auch aus dem Befund, daß sich bei Einstrahlung auf das Signal der Estermethylgruppe bei $\delta = 3.90$ die Intensität des 12-H-Signals um 31% erhöht.

Die Strobilurine zeigen im Massenspektrum neben Ionen $\text{M} - \text{CH}_3\text{OH}$, $\text{M} - \text{CO}_2\text{CH}_3$ und $m/e = 75$ bemerkenswerte Fragmentationen $m/e = 121$ ($\text{C}_8\text{H}_9\text{O}$, **4**) und $m/e = 185$, 187 ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClO}_2$, **5**), deren relative Intensität 100 bzw. 79% beträgt. Für ihre Bildung schlagen wir den folgenden Mechanismus vor:



Im Verlaufe unserer Untersuchungen wurde Strobilurin A auch aus Kulturen von *Cyphellopsis*-Arten, *Mycena zephira* und *M. fagetorum* isoliert. Nach ersten Untersuchungen ist es nicht mit Mucidin¹⁵) aus *Oudemansiella mucida* identisch.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die großzügige Förderung dieser Arbeit. Herrn Dr. G. Eckhardt, Bonn, danken wir für die Aufnahme der Massenspektren, Herrn C. Schmidt, Bonn, für die Durchführung der Kern-Overhauser-Messungen.

¹⁴) Eine paramagnetische Verschiebung des 5-Methyl-Signals um 5 ppm wird z. B. beim Übergang von 7-Methoxy-5-methylcumarin in 4,7-Dimethoxy-5-methylcumarin beobachtet: R. D. Lapper, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 4293.

¹⁵) M. Vondráček, J. Čapková, J. Šlechta, A. Benda, V. Musilek und J. Cudlin, Czech. Pat. 136495 (Cl. C 12d), (15. Mai 1970) [*Chem. Abstr.* **75**, 4029 n (1971)].

Experimenteller Teil

UV-Spektren (in Methanol): Beckman Modell 25. – IR-Spektren: Pye Unicam SP 1100 (Intensitätsangaben in Klammern: sst = sehr stark, st = stark, m = mittel, w = schwach, sh = Schulter). – Massenspektren: AEI MS-50 mit Datenverarbeitung (70 eV). – NMR-Spektren: Bruker WH 90 und WP 80. – Die Kern-Overhauser-Messungen wurden in entgasten CDCl_3 -Lösungen unter Argon ausgeführt. – Schmelzpunkte (unkorrigiert): Reichert Schmelzpunkt-mikroskop. – Dünnschichtchromatographie: Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} (Fa. Merck, Darmstadt). – Die Strobilurine **4** und **5** wurden aus Kulturen von *Strobilurus tenacellus* nach der in Lit.²⁾ angegebenen Vorschrift isoliert.

Strobilurin A (4): Farbloses Öl. – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 301 (4.33, sh), 293 (4.34), 285 (4.30, sh), 237 (4.19), 229 (4.25), 224 nm (4.20, sh). – IR (CHCl_3): 3017 (st), 2949 (st), 2860 (m), 1700 (sst), 1621 (st), 1430 (st), 1278 (st), 1261 (st), 1230 (sst), 1210 (sst, sh), 1140 (st), 1119 (sst), 1071 (st), 1000 (m), 962 (st), 924 cm^{-1} (w). – MS: M^+ m/e = 258.1247 (53%, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 258.1255), 226 (7, $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_2$), 199 (55, $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}$), 167 (35, $\text{C}_{13}\text{H}_{11}$), 121 (100, $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}$), 75 (85, $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2$).

Strobilurin B (5): Farblose, rhombische Kristalle vom Schmp. 98–99°C. – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 315 (4.43, sh), 303 (4.48), 287 (4.49), 279 (4.45), 225 nm (4.73). – IR (KBr): 3470 (m, breit), 2933 (m), 1700 (sst), 1618 (st), 1587 (m), 1408 (st), 1321 (st), 1282 (st), 1148 (sst), 1136 (st), 1121 (sst), 1070 (st), 1060 (st), 1030 (st), 970 (st), 891 (m), 865 (m), 804 (st), 768 (st), 732 cm^{-1} (m). – MS: M^+ m/e = 322.0965 (62%, ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{19}^{35}\text{ClO}_4$ 322.0971), 290 (35, $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{ClO}_3$), 275 (15, $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClO}_3$), 263 (36, $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClO}_2$), 185 (79, $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClO}_2$), 75 (100, $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2$).

$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClO}_4$ (322.1) Ber. C 63.26 H 5.93 Cl 10.98 Gef. C 63.35 H 6.04 Cl 10.58

Tetrahydrostrobilurin A (2): 6.2 mg **4** wurden in 10 ml Methanol mit einer Spatelspitze 10proz. Palladium auf Kohle 10 h bei 20°C unter Rühren hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde eingedampft und der dünnschichtchromatographisch einheitliche Rückstand (5.2 mg, R_F = 0.80, Laufmittel CCl_4 /Essigester = 3:1) direkt für die spektroskopischen Messungen verwendet. Farbloses Öl. – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 241 (3.81), 216 nm (3.78). – MS: M^+ m/e = 262.1567 (1.5%, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$ 262.1569), 230 (45, $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$), 203 (3, $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}$), 198 (29, $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}$), 170 (44, $\text{C}_{13}\text{H}_{14}$), 143 (61, $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_3$), 111 (63, $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2$), 105 (18, C_8H_9), 91 (100, C_7H_7), 75 (83, $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2$).

Tetrahydrostrobilurin B (3): 4.6 mg **5** wurden wie beim vorigen Beispiel in 20 ml Methanol 24 h bei 20°C hydriert. Nach Reinigung durch Dünnschichtchromatographie (R_F = 0.59; Laufmittel CCl_4 /Essigester = 3:1) 4.0 mg (86%) farbloses Öl. – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 288 (3.06), 276 (3.11), 230 (3.77), 210 nm (3.75). – MS: M^+ m/e = 326.1274 (5%, ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{23}^{35}\text{ClO}_4$ 326.1284), 294 (20, $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{ClO}_3$), 235 (30, $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClO}$), 169 (4, $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClO}$), 155 (43, $\text{C}_8\text{H}_8\text{ClO}$), 143 (36, $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_3$), 75 (100, $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3$).

Oxidation von Strobilurin B (5): Zu 5.0 mg **5** in 1.8 ml *tert*-Butylalkohol wurden 9 ml einer Lösung von 565 mg Natriumperiodat und 10 mg Kaliumpermanganat in 125 ml Wasser⁹⁾ gegeben. Man verdünnte mit 7.2 ml Wasser und stellte mit Kaliumcarbonat pH 9 ein. Das Gemisch wurde 15 h bei 20°C und anschließend 8 h bei 80°C gerührt, mit konz. Salzsäure angesäuert und mehrfach mit Essigester ausgeschüttelt. Die organischen Phasen ergaben nach dem Trocknen und Eindampfen einen Rückstand, der durch Dünnschichtchromatographie (Laufmittel Benzol/Ameisensäure-ethylester/Ameisensäure = 10:5:3) gereinigt wurde. Die Hauptzone (R_F = 0.68) lieferte 2.2 mg (76%) 4-Chlor-3-methoxybenzoesäure, farblose Nadeln vom Schmp. 214°C (Lit. 211°C¹⁰⁾, 215–216°C¹⁶⁾). – ¹H-NMR ($[\text{D}_6]$ Aceton): δ = 4.00 (s), [3]; 7.54 (d, J = 8.4 Hz) [1]; 7.65 (dd, J = 2.0 und 8.4 Hz) [1]; 7.7 (d, J = 2.0 Hz) [1]; 11.3 (breit) [1]. – MS: M^+ m/e = 186.0091 (22%, ber. für $\text{C}_8\text{H}_7^{35}\text{ClO}_3$ 186.0083). – Nach IR, ¹H-NMR und MS identisch mit der nach Gibson¹⁰⁾ dargestellten authentischen Vergleichsverbindung; Misch.-Schmp. zeigte keine Depression.

¹⁶⁾ H. H. Hodgson und H. G. Beard, J. Chem. Soc. 1926, 150.