

Botrylacton, ein neuer Wirkstoff aus der Nährlösung des Pilzes *Botrytis cinerea*, 2¹⁾

Karin Welmar, Rudolf Tschesche* und Eberhard Breitmaier

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

Eingegangen am 8. Februar 1979

Botrylacton (**1a**), ein Antibioticum aus der Nährlösung des Pilzes *Botrytis cinerea*, wurde isoliert und vorwiegend spektroskopisch in der Konstitution aufgeklärt. Die Röntgenstrukturanalyse des Acetats ergab die Konfiguration des Tricyclus **1a**.

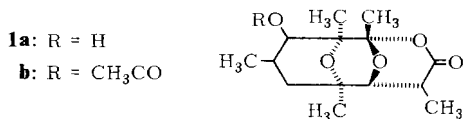
Botrylactone, a New Antibiotic from the Culture Solution of the Fungus *Botrytis Cinerea*, 2¹⁾

Botrylactone (**1a**), an antibiotic, was isolated from the culture solution of the fungus *Botrytis cinerea*. Informations about its constitution were taken from mass, ¹H, and ¹³C NMR spectrometry. The absolute configuration was elucidated by X-ray diffraction of the acetate **1b**. To conclude, botrylactone (**1a**) is a tricyclic ring system which may be named as 3,9:4,8-diepoxy-7,9-dihydroxy-2,4,6,8,9-pentamethylpelargono-1,9-lactone.

Wie früher berichtet¹⁾, konnte aus einer Biomalz-Nährlösung, die mit *Botrytis cinerea* beimpft worden war, eine antibiotisch wirksame Verbindung isoliert werden²⁾. Unter veränderten Extraktionsbedingungen haben wir jetzt eine weitere Substanz isoliert. Ihre Struktur haben wir vor allem mit physikalischen Methoden geklärt. Da es sich um ein Lacton handelt, schlagen wir die Bezeichnung Botrylacton vor (**1a**).

Botrylacton hemmt das Wachstum von *Bacillus subtilis* (Trübungstest)³⁾ mit einer kritischen Hemmgrenze von weniger als 100 µg/ml und von *B. mycoides* (62.5 µg/ml). Eine Aktivität gegen Pilze wurde dagegen nicht festgestellt.

Die NMR-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie der Verbindung wurde mit ihrem Acetyl-Derivat **1b** durchgeführt, das im Gegensatz zum Naturstoff aus Petrolether/Aceton sehr gut kristallisiert.



Aus der hochauflösenden Massenspektrometrie ergab sich C₁₄H₂₂O₃ als Summenformel für Botrylacton. Das IR-Spektrum zeigte eine OH-Bande bei 3470 cm⁻¹, die auf eine Wasserstoffbrücke hinwies; die Carbonylbande bei 1740 cm⁻¹ legte eine Lacton-Funktion nahe. Entsprechend wies das ¹³C-NMR-Spektrum ein Carboxyl-Signal bei 171.2 ppm auf (Tab. 1). Auffallend waren ferner ein Ketal-Kohlenstoff >C(-O-)₂ mit

104.2 ppm, vier Alkohol- bzw. Ether-Kohlenstoffe (81.8–71.2 ppm) sowie fünf Methyl-Gruppen (26.1–17.3 ppm, Tab. 1), wie man an Quartettaufspaltungen bei Off-Resonance-Entkopplung erkannte.

Tab. 1. ^{13}C -NMR-Verschiebungen von **1a** in CDCl_3 bei 30°C und 22.63 MHz gegen internes TMS

Gruppe	Position	δ [ppm]	Gruppe	Position	δ [ppm]
CO (Lacton)	1	171.2	CH	2	34.7
C	9	104.2	CH	6	30.5
CH	3	81.8	CH_3	14	26.1
C	8	78.8	CH_3	11	21.5
CH	7	76.0	CH_3	10	18.7
C	4	71.2	CH_3	12, 13 (aus-tauschbar)	17.4
CH_2	5	41.0	CH_3		17.3

Das besser kristallisierende und haltbarere Acetyl-Derivat **1b** des Botrylactons (**1a**) zeigte im Massenspektrum einen Molekül-Peak von $m/e = 312$, dessen Hochauflösung (312.1565) die Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_6$ ergab und so auf ein Monoacetyl-Derivat und mithin fünf Doppelbindungsäquivalente hinwies. Von diesen gehören zwei zur Lacton- und Acetyl-Gruppe. Eine ergänzende OH-Bestimmung zeigte, daß vollständige Acetylierung vorlag. Da das ^{13}C -NMR-Spektrum des Monoacetats neben den Carbonyl-Resonanzen (170.3 und 171.3 ppm) und dem Ketal-Signal (104.2 ppm) keine olefinischen Kohlenstoff-Signale aufwies (Tab. 3), gehören die drei zusätzlichen Doppelbindungsäquivalente zu einem tricyclischen (Lacton)-Ringsystem.

Zur Ermittlung der Struktur des Tricyclus wurde eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt⁴⁾, deren Ergebnis in Abb. 1a dargestellt ist und mit den ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten (Abb. 1b) verglichen wird.

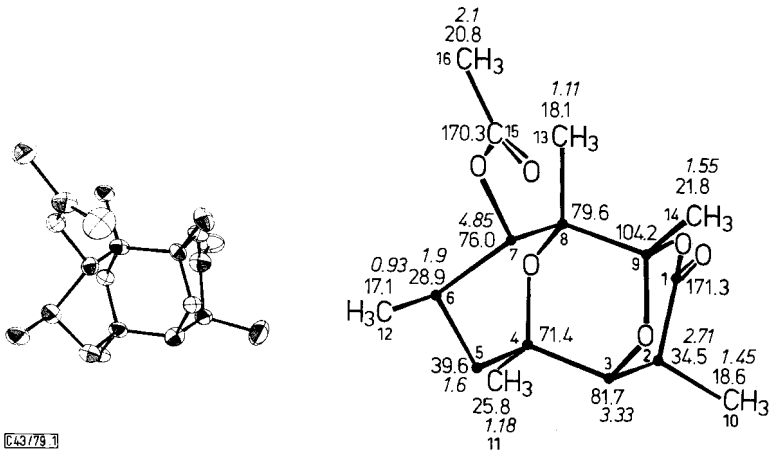


Abb. 1a. Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse des Acetats **1b**

Abb. 1b. Zuordnung der ^1H - (kursiv) und ^{13}C -NMR-Verschiebungen des Acetats **1b** nach Tab. 2 und 3

Die ^{13}C - und ^1H -NMR-Daten konnten anhand der so ermittelten Struktur vollständig zugeordnet werden, wobei miteinander verknüpfte ^{13}C - und ^1H -Kerne durch ^1H -Selektiventkopplung⁵⁾ der ^{13}C -Signale identifiziert wurden (Tab. 2).

Über die Zuordnung sämtlicher ^{13}C -Verschiebungen mit Hilfe bekannter Verschiebungsregeln⁵⁾ sowie aufgrund der Off-Resonance-Multiplizitäten und aller im gekoppelten ^{13}C -NMR-Spektrum auflösbaren C–H-Kopplungskonstanten orientiert Tab. 3.

Tab. 2. Ergebnisse der selektiven Protonen-Entkopplung für das Acetat **1b** (CDCl_3 , 30°C , 22.63/90.0 MHz)

Position	Verknüpfungsart	Kopplungspartner		$J_{\text{H-H}}$ [Hz]
		^1H [ppm]	^{13}C [ppm]	
C-2	C–H	2.71	34.5	7.35 (0.6) q
C-3	C–H	3.33	81.7	0.6 d
C-6	CH	1.9	28.9	m
C-7	CH	4.85	76.0	10.3 d
Acetyl	CH_3CO	2.10	20.8	s
C-10	CH_3	1.45	18.6	7.3 d
C-11	CH_3	1.18	25.8	s
C-12	CH_3	0.93	17.1	6.01 d
C-13	CH_3	1.11	18.1	s
C-14	CH_3	1.55	21.8	s

Tab. 3. ^{13}C -NMR-Verschiebungen, C–H-Kopplungskonstanten und Zuordnung der Signale des Acetats **1b** (Lösungsmittel CDCl_3)

$\delta^{\text{a)}$ [ppm]	C-Nr.	Off-Res.- Ergebnis	$J_{\text{CH}}^{\text{b)}$ [Hz]	$^{2,3}J_{\text{CH}}^{\text{b)}$ [Hz]	Multi- plizi- tät	Fern- kopplungs- partner
171.3	1	C	–	$7(^3J)$	} dd	3-H
				$3(^2J)$		2-H
170.3	15	C	–	$7(^2J)$	} dq	7-H
				$3(^2J)$		16-H
104.2	9	C	–	$5(^2J)$	q	14-H
81.7	3	CH	148	$<2^{\text{c)}$	$m^{\text{c)}$	$^{\text{c)}$
79.6	8	C	–	$<2^{\text{c)}$	$m^{\text{c)}$	$^{\text{c)}$
76.0	7	CH	154	$2(^2J)$	dd	5-H, 6-H
71.4	4	C	–	$<2^{\text{c)}$	$m^{\text{c)}$	$^{\text{c)}$
39.6	5	CH_2	127.5	$<2^{\text{c)}$	$m^{\text{c)}$	$^{\text{c)}$
34.5	2	CH	131	$3(^2J)$	p	3-H, 10-H
28.9	6	CH	130.5	$4.5(^2J)$	q	5-H, 7-H
25.8	11	CH_3	127	$7(^3J)$	} dd	5-H (<i>trans</i>)
				$4.5(^3J)$		3-H
21.8	14	CH_3	129	–	s	–
20.8	16	CH_3	130	–	s	–
18.6	10	CH_3	130	$4.5(^2J, ^3J)$	t	2-H, 3-H
18.1	13	CH_3	129	$2(^3J)$	d	7-H (<i>gauche</i>)
17.1	12	CH_3	124	$3^{\text{c)}$	$m^{\text{c)}$	$^{\text{c)}$

a) Genauigkeit ± 0.04 ppm, daher auf das nächste Zehntel ppm gerundet.

b) Genauigkeit ± 0.5 Hz, daher auf halbe oder ganze Hz gerundet.

c) Schlecht aufgelöst, daher keine sichere Zuordnung.

Offen blieb zum Schluß die Frage, wo die Protonen-Resonanz der CH₂-Gruppe (C-5) zu suchen ist. Diese konnte wegen zu starker Signalüberlappung weder durch Analyse der Kopplungen noch durch Integration lokalisiert werden. Aufgrund bekannter CH₂-Verschiebungen in cyclischen Systemen⁶⁾ wurde angenommen, daß dieses Signal zwischen 1.4 und 1.8 ppm liegt. Zum Beweis hierfür wurde eine neue Variante der ¹H-Selektiventkopplung erprobt. Dabei wurde zwischen 1.4 und 1.8 ppm in 0.03-ppm-Schritten (ca. 3 Hz bei 90 MHz) mit schwacher Leistung ohne Rauschmodulation entkoppelt. Wie Abb. 2 für das CH₂-Signal ($\delta = 39.6$ ppm) zeigt, fand die maximale Entkopplung bei 1.6 ppm statt, der gesuchten Methylen-Resonanz.

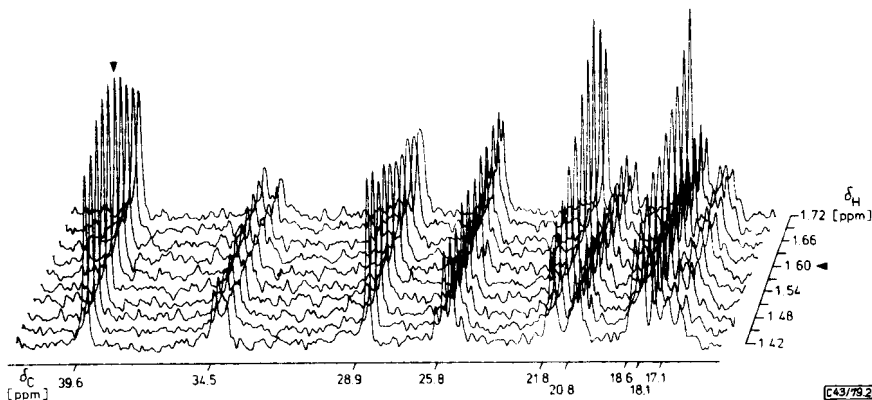


Abb. 2. ¹H-Selektiventkopplung des ¹³C-NMR-Spektrums von **1b** zwischen 1.4 und 1.7 ppm in 0.03-ppm-Schritten zur Lokalisierung der Methylen-¹H-Resonanz bei 1.6 ppm (CDCl₃, 22.63/90.00 MHz)

Acetyliertes Botrylacton ist damit als 7-Acetoxy-3,9:4,8-diepoxy-9-hydroxy-2,4,6,8,9-pentamethylpelargonsäure-1,9-lacton zu bezeichnen.

Unser Dank gilt Herrn Dr. A. Kirfel (Mineralogisches Institut der Universität Bonn) für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse, den Herren Dr. G. Eckhardt, E. Gessi und L. Bettin (Institut für Organische Chemie der Universität Bonn) für die Aufnahme der Massenspektren, Herrn C. Schmidt (Chemische Institute der Universität Bonn) für die Aufnahme einiger ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren, Fräulein G. Fietz (Institut für Organische und Biochemie der Universität Bonn) und Frau M. Fergen (Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn) für ihre Hilfe bei der Isolierung und die Ausführung der mikrobiologischen Tests sowie dem *Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen* für die finanzielle Unterstützung, die den Abschluß dieses Themas ermöglicht hat.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Kofler-Weygand (Mikroskop-Heiztisch). – IR-Spektren: Perkin-Elmer-Modell 221. – Kernresonanzspektren (¹H-NMR und ¹³C-NMR): WH-90 Gerät (90 MHz für Protonen- und 22.63 MHz für ¹³C-Messungen), Fa. Bruker Physik. – Massenspektren: Geräte MS 9, MS 30 und MS 50 der A. E. I. – Drehwerte: Polarimeter 141 von Perkin-Elmer. – CH-Analysen: Mikroanalytisches Laboratorium des Instituts, C,H,N-Analysator von Perkin-Elmer 240. – Säulenchromatographie (SC): Kieselgel der Fa. Gebr. Herrmann, Köln. – Dünnschichtchromatographie (DC) und Bestimmung der R_F-Werte: DC-Fertigfolien F 1500 LS 254

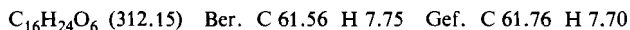
Kieselgel der Fa. Schleicher & Schüll. Die Substanzen wurden durch Besprühen mit 40proz. Schwefelsäure oder mit Chlorsulfonsäure/Eisessig (1:2) und anschließendes Erhitzen auf ca. 150°C angefärbt. Als Lösungsmittelgemische für SC und DC dienen: A: Petrolether/Aceton, B: Cyclohexan/Aceton, C: Benzol/Aceton.

Isolierung von Botrylacton (1a): Je 1 l Nährlösung von *Botrytis cinerea*²⁾ wurde dreimal mit ca. 300 ml Methylenchlorid extrahiert. Anschließend schüttelte man noch mit ca. 300 ml Benzol aus. Die organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. zur Trockne eingedampft (Rohprodukt ca. 1 g Öl). DC auf Kieselgel mit System A (10:3): $R_F = 0.25$. Durch SC an 250 g Kieselgel mit dem System A mit fallendem Gradienten für Petrolether (6 bis 1.5:1.5) erhielt man durchschnittlich Ausbeuten von ca. 30 mg **1a**.

IR (CCl₄): 1740 (C=O), 3470 cm⁻¹ (OH). – ¹³C-NMR (WH-90, CDCl₃): s. Tab. 1. – MS: $m/e = 270$ (13%, M; C₁₄H₂₂O₅); 215 (12.1); 139 (26.0); 109 (68.2); 85 (15.4); 82 (19.6); 69 (19.6); 43 (100).

Botrylacton-acetat (1b): Die Lösung von 12 mg **1a** in 2 ml Pyridin wurde mit 1 ml Acetanhydrid versetzt und 12 h bei Raumtemp. stehengelassen. Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man 25 mg Rohprodukt, das an 10 g Kieselgel im System C (100:5) chromatographiert wurde. $R_F = 0.64$ im Laufmittel C (10:1), 0.34 im Laufmittel B (5:1). Es konnten so 14 mg **1b** isoliert werden, die aus Petrolether (40–60°C)/Aceton würfelförmig kristallisierten. Schmp. 136–140°C, $[\alpha]_D^{20} = +88^\circ$ ($c = 1$ in CHCl₃).

IR (CCl₄): 1740 (C=O), 1750 cm⁻¹ (Acetat). – ¹H-NMR und ¹³C-NMR (WH-90, CDCl₃): s. Abb. 1b und Tab. 2 und 3. – MS: $m/e = 312.15$ (2.3% M); 284 (14); 270 (3.1); 242 (12.6); 225 (15.6); 165 (17.9); 149 (21.0); 139 (9.3); 123 (18.7); 109 (56.2); 85 (13.2); 69 (9.3); 43 (100). Hochauflösung des Molekülpeaks: $m/e = 312.1565$.



Antibakterielle Wirkung von 1a: Schlechte Löslichkeit der Verbindung und mangelnde Diffusion im Agar (Plattendiffusionstest) ergaben Schwierigkeiten bei der exakten Bestimmung der antibakteriellen Wirkung. Dies wurde durch die Bestimmung der Standardkurve⁷⁾ für Botrylacton nachgewiesen, bei der eine geringe Kurvenneigung (slope) auf eine wesentlich größere antibiotische Aktivität hinwies, als im Test nachgewiesen werden konnte.

Der übliche Trübungstest³⁾ wurde ebenfalls aus Löslichkeitsgründen abgeändert. Man benutzte Ethanol als Lösungsvermittler, beimpfte die Verdünnungsreihe mit *Bacillus mycoides* und ließ den Ansatz 48 h bei 30°C inkubieren. Die Auswertung erfolgte nephelometrisch. Dabei wurde die kritische Hemmgrenze unterhalb von 62.5 µg pro ml Nährlösung ermittelt. Für *Bacillus subtilis* liegt diese unterhalb 100 µg pro ml Nährlösung.

Literatur

- 1) H. W. Fehlhaber, R. Geipel, H. J. Mercker, R. Tschesche und K. Welmar, Chem. Ber. **107**, 1720 (1974).
- 2) Phytopathol. Z. **63**, 193 (1968).
- 3) H. Köhler, Einführung in die Methoden der pflanzlichen Antibiotikaforschung, Akademie-Verlag, Berlin 1956.
- 4) A. Kirfel, noch unveröffentlicht.
- 5) E. Breitmaier und M. Voelter, ¹³C NMR Spectroscopy, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1978.
- 6) Vgl. z. B. H. Günther, NMR-Spektroskopie, S. 370, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1973.
- 7) K. H. Wallhäuser und H. Schmidt, Sterilisation, Desinfektion, Konservierung und Chemotherapie, Thieme-Verlag, Stuttgart 1967.