

Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 195¹⁾

Konstitution von Ophiocordin, einem Antibiotikum mit antifungischen Eigenschaften

Wlfrled A. König^{*)}, Volker Sinnwell^{*)}, Sandra Witt^{*)} und Helmut Kneifel^{**)}

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg^{*)},
Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13, und

Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung MBH, Abt. Algenforschung^{**)},
Bunsen-Kirchoff-Str. 13, D-4600 Dortmund

Eingegangen am 17. Oktober 1979

Die Konstitution des antifungisch wirksamen Antibiotikums Ophiocordin (9) konnte durch chemischen Abbau, Massenspektrometrie und Kernresonanz aufgeklärt werden. Ophiocordin enthält ein neuartiges 3-Amino-hexahydro-4-hydroxyazepin-System (5), an das 4-Hydroxybenzoesäure esterartig und 3,3',5'-Trihydroxy-2,4'-carbonylbis[benzoesäure] (7) über die Carboxylgruppe in 1-Stellung säureamidartig gebunden ist.

Metabolites of Microorganisms, 195¹⁾

The Structure of Ophiocordin, an Antibiotic with Antifungal Activity

The structure of the antibiotic Ophiocordin (9), which exhibits antifungal activity, was elucidated by chemical degradation, mass spectrometry, and NMR. Ophiocordin contains a novel 3-amino-hexahydro-4-hydroxyazepin system (5), which is esterified with 4-hydroxybenzoic acid and connected to 3,3',5'-trihydroxy-2,4'-carbonylbis[benzoic acid] (7) via an amide bond between the 1-carboxy group and the amino group of the azepin system.

In einer früheren Mitteilung²⁾ haben wir über die Isolierung und die biologischen Eigenschaften des neuen, antifungisch wirksamen Antibiotikums Ophiocordin aus dem Pilz *Cordyceps ophioglossoides* berichtet. In der vorliegenden Arbeit wird nun die vollständige Konstitutionsaufklärung beschrieben.

Wegen der thermischen Labilität und der hohen Polarität von Ophiocordin war eine massenspektrometrische Molekülmassenbestimmung zunächst nicht möglich. Erst die Anwendung der Felddesorptionsmassenspektrometrie ergab ein Quasimolekül-Ion $[M + H]^+$ der Massenzahl 551. Nach Behandlung von Ophiocordin mit 3 N HCl konnten die Bruchstücke 1–4 sowie eine stark polare, ninhydrin-aktive Verbindung der Summenformel $C_6H_{14}N_2O$ mittels kombinierter Gaschromatographie und Massenspektrometrie nach Derivatbildung identifiziert werden²⁾.

Die Verbindung $C_6H_{14}N_2O$ ergab ein Trifluoracetylderivat der Molmasse 418 (3 Trifluoracetylgruppen). Nur eine der drei Trifluoracetylgruppen ließ sich leicht durch kurzzeitige Behandlung mit Wasser abspalten, wie es für Trifluoressigsäureester typisch

ist^{3,4)}. Dem Bruchstück können somit zwei Aminofunktionen und eine Hydroxylgruppe zugeordnet werden.

Unter Berücksichtigung dieser Vorkenntnisse war eine detaillierte Interpretation des ¹H-NMR-Spektrums von Ophiocordin möglich.

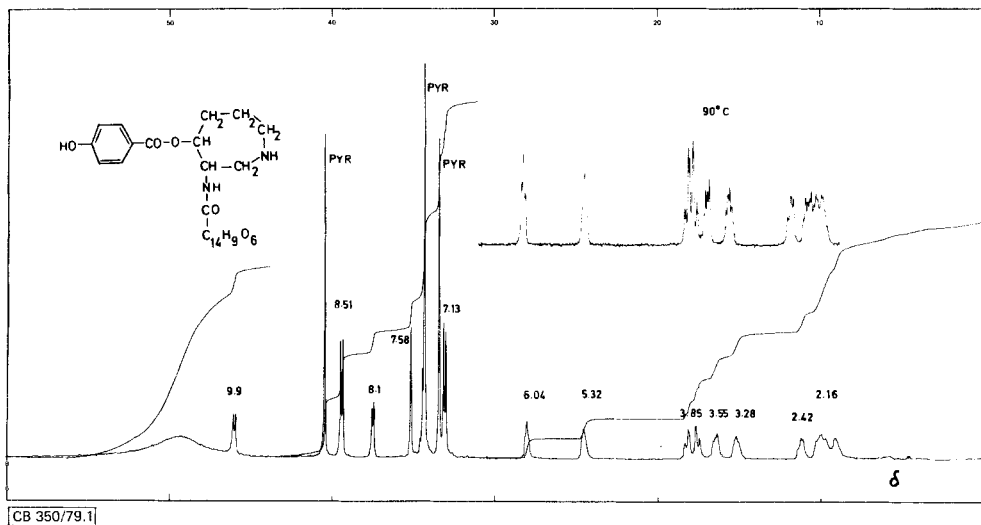


Abb. 1. ¹H-NMR-Spektrum von Ophiocordin in [D₅]Pyridin

Aus der Integration der Signale ergaben sich zehn Protonen mit nicht-aromatischem Charakter. Das – abgesehen von den aromatischen Protonensignalen – bei tiefstem Feld erscheinende Signal bei $\delta = 6.04$ entspricht einem CH mit benachbartem Sauerstoff. Durch Entkopplungsexperimente konnte gezeigt werden, daß das Proton bei $\delta = 6.04$ mit dem bei $\delta = 5.32$ und mit der 4 Protonen entsprechenden Signalgruppe zwischen $\delta = 2.16$ und 2.42 koppelt. Gleichzeitig koppelt das Proton bei $\delta = 5.32$ mit dem bei 9.9 (Dublett, $J = 8.7$ Hz). Dieses Signal verschwindet bei Zugabe von D₂O und ist einem Säureamid-NH-Signal zuzuordnen. Das CH-Proton ($\delta = 5.32$) bildet gleichzeitig den X-Teil eines ABX-Systems und koppelt mit den diastereotopen Methylenprotonen bei $\delta = 3.85$ (AB-Teil, geminale Kopplung $J = 13.2$ Hz). Eine weitere Methylen-Gruppe absorbiert bei $\delta = 3.28$ und 3.55 . Strahlt man auf dieses Signal ein, so erkennt man eine Kopplung zu der zwischen $\delta = 2.16$ und 2.42 absorbierenden vier Protonen entsprechenden Signalgruppe. Aus diesen Befunden geht eindeutig hervor, daß das aliphatische System vier Methylengruppen, eine –CH–NH–CO- und eine dieser Gruppe benachbarte –CH–O-Gruppierung enthält. Daraus folgt weiter, daß es sich um ein cyclisches System handeln muß. Die noch fehlende Aminofunktion kann somit zwangsläufig nur als NH-Gruppe in einem siebengliedrigen Ring stehen. Demnach ergibt sich für die Verbindung der Summenformel C₆H₁₄N₂O die Konstitution 3-Amino-hexahydro-4-azepinol (5).

Im Einklang damit stehen das Massen- und ¹³C-NMR-Spektrum (Tab. 1): Im Off-resonance-Spektrum werden vier CH₂- und zwei CH-Gruppen angezeigt.

Tab. 1. 67.88-MHz-¹³C-NMR-Daten des Hexahydroazepin-Teils **5** von Ophiocordin (**9**) in [D₅]Pyridin (Tetramethylsilan als interner Standard)

δ-Werte (Zuordnung)

21.37 (CH₂), 28.33 (CH₂), 47.42 (CH₂),
48.69 (CH₂), 52.29 (CH-NH), 76.48 (CH-O)

Im aromatischen Bereich des ¹H-NMR-Spektrums von Ophiocordin in CD₃OD/D₂O erkennt man die beiden 4 Protonen entsprechenden Dubletts ($J = 8.75$ Hz) eines AA'XX'-Systems bei $\delta = 6.85$ und 7.64 . Dieses System dürfte dem Molekülteil **1** zuzuordnen sein. Weiterhin erkennt man die Signale eines AMX-Systems bei $\delta = 7.03$ (d/d; $J_1 = 8, J_2 = 1$ Hz), 7.44 (d/d; $J_1 = 8, J_2 = 1$ Hz) und 7.31 (t; $J = 8$ Hz), die offensichtlich der Teilstruktur **4** zuzuordnen sind. Das verbleibende Singulett bei $\delta = 6.94$, das zwei Protonen entspricht, könnte von den zwei Protonen des 3,5-Dihydroxybenzoesäure-Teils **3** herrühren, wenn diese in 4-Stellung substituiert ist.

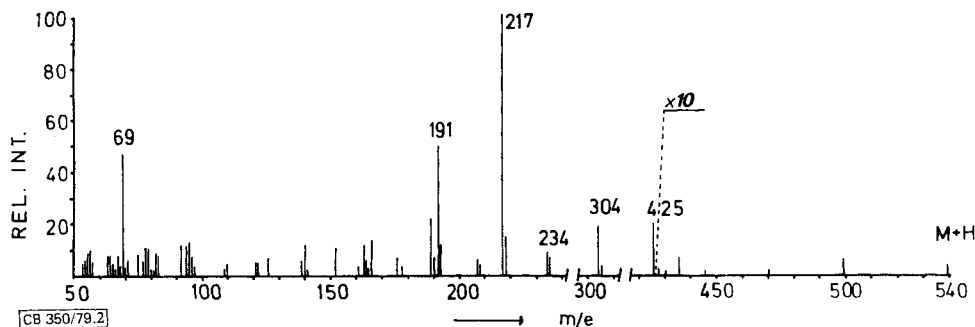
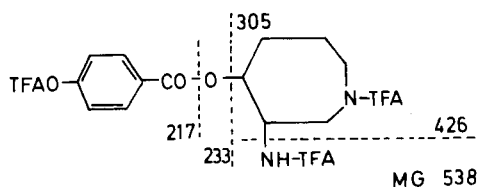
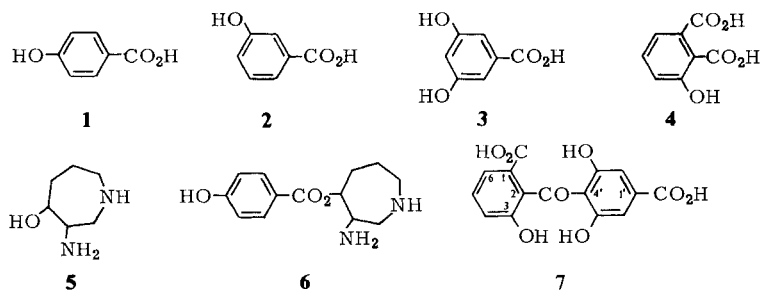


Abb. 2. 70-eV-Massenspektrum des Trifluoracetylderivates der Teilstruktur **6** von Ophiocordin (TFA = Trifluoracetyl)

Die Verknüpfung der Teilstrukturen **1**–**5** ließ sich aus der Untersuchung von zwei Bruchstücken des Ophiocordins ableiten, die man nach kurzzeitiger Hydrolyse (30 min/100°C; 3 N HCl) durch Kieselgelchromatographie isolieren konnte. Mit Hilfe von Massenspektrum und ¹H-NMR-Spektren in verschiedenen Lösungsmitteln ließ sich zeigen, daß 4-Hydroxybenzoesäure (**1**) mit dem Hexahydroazepin-System **5** zu **6** verestert ist. Das Massenspektrum des Trifluoracetylderivates von **6** ist in Abb. 2 dargestellt.

Das Molekül-Ion (*m/z* = 539) zerfällt bevorzugt unter Eliminierung von Trifluoracetamid (425), unter Eliminierung von 4-Hydroxybenzoesäure (304) und nachfolgender Eliminierung von Trifluoracetamid (191), sowie unter α-Spaltung an der Carbonylgruppe (217). Die Zuordnungen konnten durch Hochauflösungsmessungen bestätigt werden. Die ¹H-NMR-Daten von **6** sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

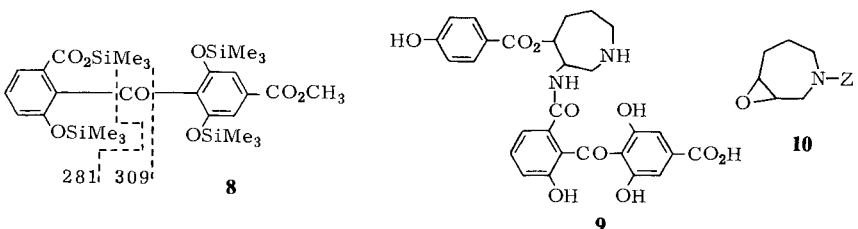
Tab. 2. 270-MHz-¹H-NMR-Daten (Tetramethylsilan als interner Standard) von **6** in [D₅]Pyridin und von **7** in CD₃OD

Verbindung	δ-Werte (Multiplizität; Zuordnung)
6	2.06 (m; CH ₂), 2.36 (m; CH ₂), 3.5 (m; CH ₂ NH), 4.6 (m; CH ₂ NH), 5.02 (m; CHNH ₂), 6.18 (q; CH–O), 7.08 (d; <i>J</i> = 8.8 Hz, 2 Aromaten-H), 7.98 (d; <i>J</i> = 8.8 Hz, 2 Aromaten-H)
7	6.90 (s; 2', 6'-H), 7.02 (d/d; <i>J</i> ₁ = 7.7, <i>J</i> ₂ = 1 Hz, 4-H), 7.27 (t; <i>J</i> = 7.7 Hz, 5-H), 7.50 (d/d; <i>J</i> ₁ = 7.7, <i>J</i> ₂ = 1 Hz, 6-H)

Als weiteres Fragment ließ sich eine gelbe Substanz der Summenformel C₁₅H₁₀O₈ isolieren. Nach Behandeln mit 1.5 N methanolischer HCl und anschließender Trifluoracetylierung erhält man ein Produkt mit der Molmasse 634. Daraus folgt, daß die Substanz zwei Carboxyl- und drei Hydroxylgruppen enthält. Unter Kenntnis der Spaltprodukte **2**–**4** und mit Hilfe des ¹H-NMR-Spektrums (Tab. 2) läßt sich nunmehr die Konstitution 3,3',5'-Trihydroxy-2,4'-carbonylbis[benzoesäure] (**7**) formulieren.

Aus **7** ist bei Einwirkung von starker Säure die Bildung der Spaltprodukte **2**–**4** zu erwarten.

Der Nachweis, daß die Carboxylgruppe in 1-Stellung von **7** mit der Aminogruppe des Azepin-Systems **5** verknüpft ist und nicht die 1'-Carboxylgruppe, gelang durch selektive Derivatbildung und Massenspektrometrie. Nach Behandlung von Ophiocordin mit 1.5 N methanolischer HCl bei Raumtemp., anschließender Behandlung mit 3 N HCl (1 h, 100°C) und Trimethylsilylierung erhielt man ein Derivat **8**.



Das Auftreten der Fragment-Ionen $m/z = 281$ und 309 ist spezifisch für die Konstitution **8**. Die Annahme, daß in **7** die OH-Gruppe in 3-Stellung und nicht in 6-Stellung steht, ist allein aus dem Auftreten des Spaltprodukts 3-Hydroxyphthalsäure (**4**) noch nicht schlüssig nachgewiesen. Die Bildung von großen Mengen an 3-Hydroxybenzoesäure bei der Behandlung von Ophiocordin mit 3 N HCl spricht jedoch für **7** und wäre kaum mit dem Isomeren mit der OH-Gruppe in Stellung 6 zu erklären. Führt man unter Annahme der Konstitution **7** eine Inkrementberechnung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums durch⁵⁾, so findet man für die chemischen Verschiebungen sehr gute Übereinstimmung mit den gefundenen Werten in Tab. 2.

Aus diesen Befunden läßt sich für Ophiocordin die Konstitution **9** angeben, deren Molmasse von 550 mit dem Ergebnis des Felddesorptionsmassenspektrums ($[\text{M} + \text{H}]^+ = 551$) übereinstimmt. Bemerkenswert in **9** ist die 3-Aminohexahydro-4-hydroxyazepin-Teilstruktur, die in natürlichen Verbindungen bisher nicht beobachtet worden ist.

Untersuchungen zur Stereochemie

Ophiocordin (**9**) ist eine optisch aktive Verbindung ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +70.0^\circ$; $c = 1$, in Methanol). Daraus ist zu schließen, daß der Aminoalkohol **5** in Form eines Enantiomeren vorliegt. Die Teilstruktur **5** ist inzwischen durch Synthese bestätigt worden⁶⁾. Das bei der Synthese anfallende Racemat von **5** wird aus dem entsprechenden benzyloxycarbonyl-geschützten Epoxid (**10**) durch Umsetzen mit wäßr. NH_3 hergestellt und sollte demnach die Amino- und Hydroxygruppe in *E*-Konfiguration enthalten. Durch Reaktion des synthetischen Racemats von **5** mit *L*- α -Chlorisovalerylchlorid⁷⁾ und anschließende Trimethylsilylierung erhält man ein diastereomeres Derivat, das an einer Hochleistungsglaskapillare gaschromatographisch getrennt wird. Das natürliche **5**, in analoger Weise derivatisiert, ist dagegen einheitlich und stimmt in seiner Retentionszeit mit dem schneller eluierten Diastereomeren überein. Bei allen bisher durchgeführten Trennungen von *N*-(*L*- α -Chlorisovaleryl)-*O*-TMS-aminoalkoholen⁷⁾ zeigte sich, daß die Diastereomeren mit *S*-Konfiguration am Asymmetriezentrum, an das die Aminogruppe gebunden ist, die längere Retentionszeit haben. In Analogie dazu könnte für **5** die Konfiguration (*3R*:*4R*) angenommen werden. Diese Annahme muß jedoch noch durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Unterstützung dieser Arbeit. Den Herren Dr. *U. Rapp* und *H. Kaufmann*, Varian MAT, danken wir für die Aufnahme des Felddesorptionsmassenspektrums.

Experimenteller Teil

Massenspektren: Varian-Gerät MAT 311 A mit Kapillar-GC-Kopplung, 70 eV, Ionenquellentemp. 200°C . Hochoptischmessungen: Gleiches Gerät (Peak-Match-Verfahren, Auflösung 10000). – $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren: Gerät Bruker WH 270 (270 bzw. 67.91 MHz); Tetramethylsilan interner Standard. – Gaschromatographie: Carlo Erba-Gerät, Typ 2101, 25-m-Glaskapillare, belegt mit Silicongummi SE 30, H_2 als Trägergas.

Isolierung und Totalhydrolyse von Ophiocordin (**9**) sowie Herstellung der Trifluoracetyl- und Trimethylsilyl-Derivate für die Massenspektrometrie sind in Lit.²⁾ beschrieben. Die *L*- α -Chlorisovaleryl-Derivate wurden, wie in Lit.⁷⁾ beschrieben, hergestellt.

Partialhydrolyse von Ophiocordin (9): 40 mg **9** wurden in 3 N HCl 30 min bei 100°C in einem Schraubdeckelglas im Trockenschrank erhitzt. Nach Eindampfen wurde der Rückstand in 0.2 ml

Ethanol/Essigsäure/Wasser (4:1:1) gelöst und an einer Kieselgel-60-Fertigsäule A der Fa. Merck im selben Laufmittelgemisch chromatographiert (Fraktionen zu je 2.5 ml). Man erhielt in den Fraktionen 15 und 16 6 mg **7**, in den Fraktionen 19 und 20 5.7 mg **6**. Daneben konnten noch geringe Mengen (ca. 1 mg) **5** aus den Fraktionen 27–30 und nicht gespaltenes **9** (3 mg) aus den Fraktionen 17 und 18 erhalten werden.

4-Hydroxybenzoesäure-(3-aminohexahydro-4-azepinyloxyester) (**6**): DC im Laufmittelgemisch Ethanol/Essigsäure/Wasser (4:1:1) an Kieselgel 60 (Fa. Merck): $R_F = 0.34$. – UV (Methanol): $\lambda_{\max}(\epsilon) = 255 (9700)$, 198 nm (10800). – MS (70 eV): m/z bei trifluoracetyliertem **6** = 425 (20%, M – CF₃CONH₂), 304 (19, M – CF₃CO₂C₆H₄CO₂H), 217 (100, CF₃CO₂C₆H₄CO), 191 (50, 304 – CF₃CONH₂). – ¹H-NMR: s. Tab. 2.

3,3',5'-Trihydroxy-2,4'-carbonylbis[benzoesäure] (**7**): DC im Laufmittelgemisch Ethanol/Essigsäure/Wasser (4:1:1) an Kieselgel 60 (Fa. Merck); $R_F = 0.86$. – UV (Methanol): $\lambda_{\max}(\epsilon) = 365 (524)$, 285 (3040), 203 nm (10482). – MS (70 eV): m/z bei trifluoracetyliertem Methylester von **7** = 634 (2%, M⁺), 603 (5, M – OCH₃), 521 (6, M – CF₃CO₂), 424 (26, M – CF₃CO – CF₃CO₂), 393 (100, M – CF₃CO – CF₃CO₂ – OCH₃), 296 (38, 393 – CF₃CO), 237 (16%, 296 – CO₂CH₃). – ¹H-NMR: s. Tab. 2.

Literatur

- 1) 194. Mittel.: H. P. Fiedler, J. High Res. Chromatogr. Chrom. Commun., zur Veröffentlichung eingereicht.
- 2) H. Kneifel, W. A. König, W. Loeffler und R. Müller, Arch. Microbiol. **113**, 121 (1977).
- 3) F. Weygand und H. Rinno, Chem. Ber. **92**, 517 (1959).
- 4) W. A. König in Adv. Mass Spectr. (N. R. Daly), 1. Aufl., Bd. 7 B, S. 1530, Heyden, London 1978.
- 5) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl und W. Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, 1. Aufl., S. H 255, Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1976.
- 6) W. A. König, H. Jünichen und S. Witt, noch unveröffentlicht.
- 7) W. A. König, K. Stöltzing und K. Kruse, Chromatographia **10**, 444 (1977).

[350/79]