

141. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

66. Mitteilung [1]

Die Struktur des Granaticins und des Granaticins B.

1. Teil: Spektroskopische Eigenschaften und chemischer Abbau

von W. Keller-Schierlein, M. Brufani und S. Barcca

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich

(30. V. 68)

Summary. UV-, IR- and NMR.-spectra of the antibiotic granaticin and several of its derivatives and degradation products are discussed. The spectroscopic properties agree with the formula XX for the antibiotic, which was fully elucidated by an X-ray structural analysis (see following communication).

Das von zahlreichen Actinomycetenstämmen produzierte Antibioticum Granaticin wurde vor über 10 Jahren zum erstenmal in Form tiefroter Kristalle isoliert [2]. Manche Actinomycetenstämmen bilden daneben ein zweites rotes Antibioticum, das Granaticin B, das als L-Rhodosid des Granaticins erkannt worden ist [3]. Die Konstitution und Konfiguration der 2,3,6-Tridesoxy-aldohexose L-Rhodosose, die auch Baustein anderer Antibiotica aus Actinomyceten ist [4] [5], wurde von BROCKMANN und WAEHNELT [4] aufgeklärt, die enantiomere D-Rhodosose von STEVENS und Mitarb. [6] synthetisch hergestellt.

Über das Granaticin, $C_{22}H_{20}O_{10}$ ¹), das zugleich Aglykon des Granaticins B ist, wusste man bisher lediglich, dass es ein Polyhydroxychinon ist [2]. Die vorliegende und die nachfolgende Abhandlung befassen sich mit der Struktur dieser Verbindung.

1. *Chromophor und funktionelle Gruppen.* Das Absorptionsspektrum des Granaticins im UV. und im Sichtbaren (s. [2], Fig. 1) gleicht dem des Naphtazarins [7] und noch besser denjenigen von substituierten Naphtazarinderivaten wie etwa Fusarubin [8], Javanicin und Isojavanicin [9]. Das ebenfalls schon früher mitgeteilte UV.-Absorptionsspektrum des Tetra-O-acetyl-granaticins [2] ist das eines mehrfach substituierten Naphtochinons. Wie die erwähnten Naphtazarinderivate erleidet Granaticin beim Übergang ins Anion eine starke bathochrome Verschiebung der Absorptionsbande im Sichtbaren. Alkalische Lösungen sind tiefblau. Die Acidität der phenolischen Gruppen ist relativ hoch: $pK_{MCS}^* = 7,34$. Da die NMR.-Spektren des Granaticins und seiner Derivate keine Signale von Protonen an aromatischen Ringen oder Doppelbindungen aufweisen, bildete die Annahme, dass das Antibioticum ein tetra-substituiertes Naphtazarin darstelle, eine gute Ausgangshypothese für die weiteren Untersuchungen.

Das IR.-Absorptionsspektrum des Granaticins (s. [2], Fig. 2) besitzt im $\nu(CO)$ -Gebiet neben einer Bande für die stark wasserstoffbrückengebundenen Chinocarbo-nyle bei 1610 cm^{-1} eine intensive Absorptionsbande bei ca. 1775 cm^{-1} , die einer γ -Lactongruppe zugeschrieben wird. Die Aufspaltung dieser Bande in ein Maximum (1770 cm^{-1}) und eine Schulter (1780 cm^{-1}) ist möglicherweise durch eine FERMI-Re-

¹) Diese Bruttoformel wurde durch das Massenspektrum gesichert; vgl. [3].

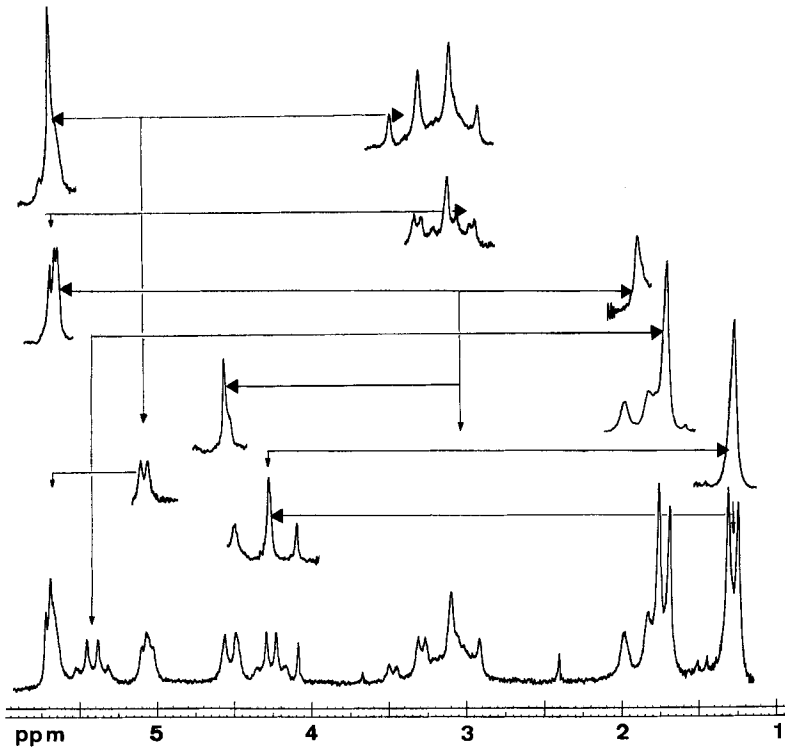


Fig. 1. NMR.-Spektrum von Granaticin in CF_3COOH (100 MC) mit Spinentkopplung

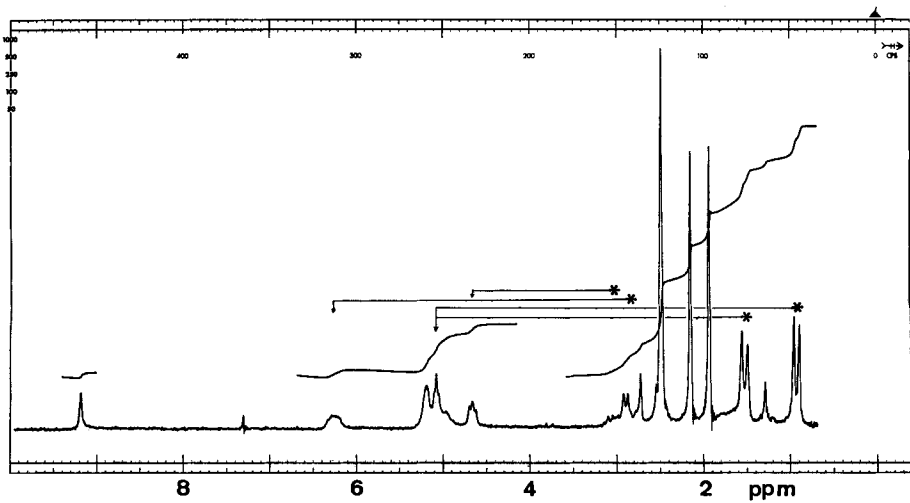


Fig. 2. NMR.-Spektrum von Tetra-O-acetyl-granaticin in $CDCl_3$ (100 MC) mit Spinentkopplung

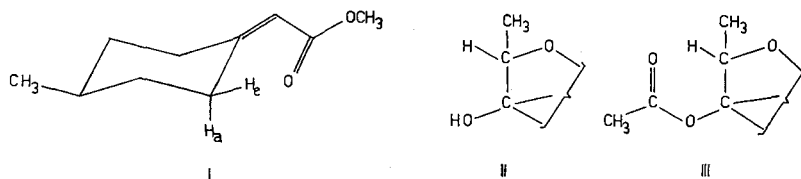
sonanz zu erklären [10] [11]. Das gelbe Tetra-O-acetylderivat zeigt zusätzlich Banden bei 1768 cm^{-1} für die Phenolacetat-Gruppen und bei 1740 cm^{-1} für zwei aliphatisch gebundene O-Acetylgruppen. Die Chinon-Carbonylbande liegt im Acetylderivat bei 1665 cm^{-1} .

Von den 10 Sauerstoffatomen des Granaticins liegen demnach zwei als Chinon-carbonyle, 2 als phenolische und 2 als alkoholische Hydroxylgruppen und 2 in einer Lactongruppe vor. Die restlichen beiden geben sich weder durch besondere spektroskopische Eigenschaften noch durch chemische Reaktionen zu erkennen und sind daher als Äthersauerstoffatome anzusehen.

Weitere charakteristische Gruppierungen lassen sich durch das NMR.-Spektrum erkennen, das wegen der geringen Löslichkeit des Granaticins in aprotischen Lösungsmitteln in deuterierter Trifluoressigsäure aufgenommen wurde (Fig. 1). Die Anwesenheit von 2 $\text{CH}_3\text{-CH}$ -Gruppierungen geht aus den beiden Dubletten bei $\delta\ 1,27\text{ ppm}$ (J ca. 6 cps) und $1,72\text{ ppm}$ (J ca. 6,5 cps) hervor. Wie sich aus Doppelresonanzspektren ergab, ist das Methylsignal bei $\delta\ 1,27\text{ ppm}$ mit einem Quartett bei $\delta\ 4,27\text{ ppm}$ gekoppelt. Im Tetra-O-acetyl-granaticin (Fig. 2) ist dieses Quartett nach $\delta\ 5,1\text{ ppm}$ verschoben. Obwohl es hier in einem Signalhaufen versteckt liegt, liess sich seine Lage durch Spinentkopplung sicher erkennen. Diese Verschiebung kann entweder bedeuten, dass die betreffende $\text{CH}_3\text{-CH}$ -Gruppe in einer acetylierbaren Methylcarbinolgruppe ($\text{CH}_3\text{-CHOH-}$) enthalten ist, oder dass einer $\text{CH}_3\text{-CH-O-R}$ -Gruppe ein acetylierbares Hydroxyl derart benachbart ist, dass das Carbonylsauerstoffatom im Acetylderivat dem Methinwasserstoff durch eine pseudocyclische Konformation nahekommt. Dass das letztere der Fall ist, ergab sich erst aus der RÖNTGEN-Strukturanalyse eines Granaticinderivates [12].

Ähnliche Verschiebungen von Protonensignalen nach tieferen Feldstärken durch Carbonylgruppen wurden bereits früher beobachtet. So liegt z. B. das Signal für das äquatoriale Wasserstoffatom an C-2 des 4-Methylcyclohexyldennessigsäure-methylesters (I) [13] bei $\delta\ 3,8\text{ ppm}$, während die Signale der übrigen 8 Methylen- und Methin-Protonen an den erwarteten Stellen zwischen $\delta\ 1,5$ und $2,8\text{ ppm}$ erscheinen²⁾. Ein ähnlicher Fall wurde von HAUTH und Mitarb. [14] beobachtet, die das Signal des Methinprotons in der *cis*-2-Methylcyclohexyldennessigsäure bei $\delta\ 4,1\text{ ppm}$, dasjenige des äquatorialen Methylenprotons an C-6 des entsprechenden *trans*-Isomeren bei $\delta\ 3,5\text{ ppm}$ fanden, während die übrigen Signale von Methin- und Methylen-Protonen durch die Carbonylgruppe kaum beeinflusst wurden³⁾.

Der bei der Acetylierung des Granaticins beobachtete Effekt wird darnach durch die in den Teilformeln II und III dargestellte Beziehung erklärt.

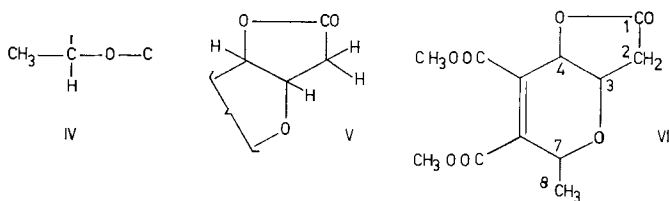


²⁾ Herrn Dr. H. GERLACH danken wir für die Überlassung dieses Spektrums, das in seiner Abhandlung [13] nicht erwähnt wird.

³⁾ *Anm. bei der Korrektur:* Ein dem Granaticin näherstehendes Analogiebeispiel wurde kürzlich veröffentlicht [14a].

Das zweite C-Methyl-Dublett (δ 1,72 ppm) zeigt eine Wechselwirkung mit einem Quartett bei δ 5,42 ppm, das als Folge der Acetylierung nicht nach tieferem Magnetfeld verschoben wird. Das Sauerstoffatom am betreffenden Methinkohlenstoff ist demnach eines der beiden Äthersauerstoffatome und gehört zu einer Gruppierung IV. Die relativ grosse chemische Verschiebung gegenüber Tetramethylsilan sowohl des Methyl- wie des Methin-Signals findet ihre Erklärung in der Nachbarschaft zum Chinonring (s. unten). In der Gegend von 2,8 bis 3,5 ppm im Spektrum des Granaticins und von 2,5 bis 3,1 ppm in demjenigen des Acetylderivates fällt noch der *AB*-Teil eines *ABX*-Spektrums mit $J_{AB} = 18$ cps, $J_{AX} < 1$ cps und $J_{BX} = 4,5$ cps auf. Das zugehörige Signal des X-Protons findet sich bei δ 5,1 ppm und steht wiederum zu einem Signal im Signalhaufen bei δ 5,7 ppm in Beziehung. Gemäss der chemischen Verschiebung steht die entsprechende CH_2 -Gruppe (*AB*) in α -Stellung zu einer Carbonylgruppe, die erste Methingruppe in α -Stellung zu einem Äthersauerstoff und die zweite Methingruppe in α -Stellung zu einem Lactonsauerstoff. Dieser Komplex von Signalen gibt demnach näheren Aufschluss über die Umgebung des γ -Lactonrings gemäss Formel V.

Weitere Signale konnten erst anhand von Abbauprodukten zugeordnet werden und sollen daher später diskutiert werden.



2. Chemischer Abbau. – Da das NMR.-Spektrum des Granaticins eine Überlagerung der Spektren von zwei Teilmolekeln darstellt, die durch das Naphtazarin-System getrennt werden, schien es ratsam, den Chinonteil abzubauen und die beiden «Seiten-teile» in getrennten Abbauprodukten zu fassen. Dies gelang durch einen Abbau mit Ozon. Aus den Produkten der oxydativen Spaltung des Ozonids konnte nach Veresterung mit Diazomethan eine kristalline farblose Verbindung $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_7$ isoliert werden. Das IR.-Absorptionsspektrum zeigt durch eine Bande bei 1773 cm^{-1} an, dass der im Granaticin nachgewiesene γ -Lactonring in diesem Abbauprodukt enthalten ist. Weitere Banden bei 1730 , 1720 und 1662 cm^{-1} weisen darauf hin, dass noch weitere Estergruppen und eine Doppelbindung vorhanden sind. OH-Banden fehlen dagegen. Das NMR.-Spektrum (Fig. 3) zeigt im $\delta(\text{OCH}_3)$ -Gebiet zwei Singulette zu drei Protonen bei δ 3,75 und 3,77 ppm; die Verbindung ist demnach ein Dimethylester. Das siebente Sauerstoffatom liegt weder in einer Hydroxyl- noch in einer Keto-Gruppe vor und wird einer Äthergruppe zugeschrieben. Das NMR.-Spektrum zeigt keine Signale zwischen δ 5 und 10 ppm, die durch das IR.-Spektrum nachgewiesene Doppelbindung ist demnach tetrasubstituiert. Aus der Bruttoformel und den nachgewiesenen Funktionen lässt sich schliessen, dass ausser dem Lactonring noch ein weiterer Ring vorhanden sein muss. Unter Berücksichtigung dieser Befunde ergibt sich die Konstitution VI aus dem NMR.-Spektrum (Fig. 3). Das Dublett bei δ 1,32 ppm ($J = 6,5$ cps) zeigt die Anwesenheit einer CH_3-CH -Gruppe an. Das zugehörige Quartett für das

Methinproton (H-7 in Formel VI) liegt bei δ 4,72 ppm. Da das Quartett nicht weiter aufgespalten ist, sind dem Wasserstoffatom 7 ausser den Methylprotonen keine anderen Protonen benachbart. Die grosse chemische Verschiebung von 4,72 ppm kann nicht durch ein benachbartes Äthersauerstoffatom allein erklärt werden, sondern wird teilweise durch die Doppelbindung hervorgerufen.

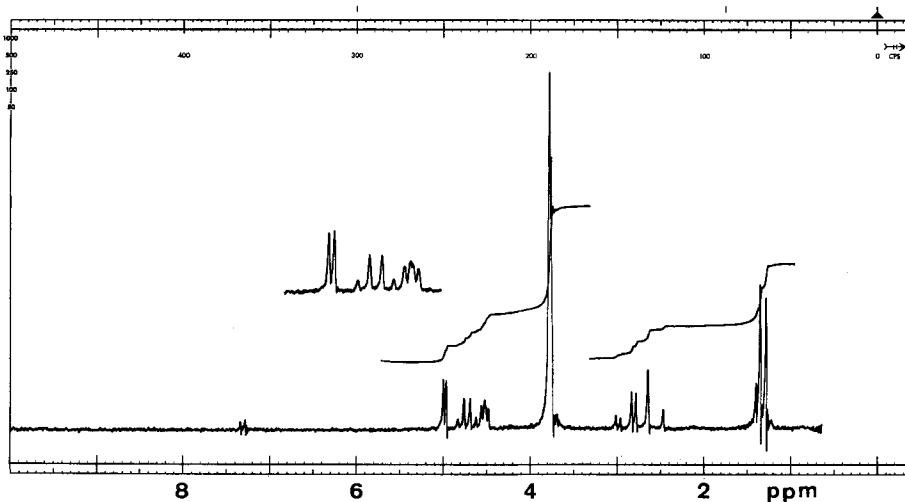


Fig. 3. NMR.-Spektrum des Abbauprodukts VI in CDCl_3 (100 MC)

Der *AB*-Teil eines *ABX*-Spektrums bei δ 2,4 bis 3,0 ppm ($J_{AB} = 18$ cps, $J_{AX} < 1$ cps, $J_{BX} = 4,5$ cps) ist einer CH_2 -Gruppe in α -Stellung zum Lactoncarbonyl zuzuordnen (C-2 in Formel VI). Die Kopplungskonstante J_{AX} von 4,5 cps findet sich wieder im Doppeldublett bei δ 4,5 ppm eines Protons neben Äthersauerstoff (H-3), das andererseits mit $J = 3,5$ cps mit einem Proton in Wechselwirkung steht, das bei δ 4,98 ppm ein Dublett hervorruft, und das dem Proton neben dem Lactonsauerstoff (H-4) zugeschrieben wird.

Alle Signale der Verbindung VI (ausser den OCH_3 -Singulett) erscheinen wieder im NMR.-Spektrum des Granaticins selber (Fig. 1), was beweist, dass der durch dieses Abbauprodukt wiedergegebene Molekelteil im Antibioticum unverändert enthalten ist, wobei es wahrscheinlich ist, dass die C-Atome 5, 6, 9 und 10 des Abbauproduktes VI aus Teilen des Naphtazarinsystems stammen.

Ein Abbauprodukt mit völlig anderen spektroskopischen Eigenschaften wurde erhalten, wenn anstelle von Granaticin dessen Acetylderivat mit Ozon abgebaut wurde. Nach der Veresterung mit Diazomethan liess sich durch Chromatographie als Hauptprodukt ein blass gelbliches Öl isolieren, das bei der Dünnschichtchromatographie einen einheitlichen Fleck gab, und dessen spektroskopische Eigenschaften ebenfalls für das Vorliegen einer einheitlichen Verbindung sprachen. Das Produkt konnte nicht unzersetzt destilliert werden. Es schien hartnäckig Lösungsmittel zurückzuhalten, so dass keine reproduzierbaren Analysenwerte erhalten wurden. Da der Ester im Massenspektrum kein Molekel-Ion erkennen liess, konnten wir keine sicheren Anhaltspunkte

über seine Bruttozusammensetzung gewinnen. Die Formel VII beruht einzig auf spektroskopischen Beobachtungen und ist daher mit einem gewissen Grad von Unsicherheit behaftet. Trotz dieser Unsicherheit, die sich vor allem auf den ungesättigten Teil bezieht, liessen sich aus den Spektren wertvolle Rückschlüsse auf die Struktur des gesättigten Teils der Molekel ziehen.

Entsprechend den für das Granaticin aus dessen Spektren abgeleiteten Gruppen und unter Berücksichtigung des durch das Abbauprodukt VI determinierten Teils der Granaticinmolekel mussten im Abbauprodukt VII folgende Atomgruppen erwartet werden: Eine Äthergruppe, eine $\text{CH}_3\text{-CH-O}$ -Gruppe, zwei alkoholische Hydroxylgruppen, hier in acetylierter Form. Das NMR.-Spektrum des Abbauproduktes VII (Fig. 4) zeigt insgesamt 3 Acetoxygruppen, von denen eine aus dem Naphthazarinteil stammen muss und demnach an einem ungesättigten C-Atom steht (δ 2,27 ppm), während die beiden andern (δ 1,92 und 2,09 ppm) an gesättigte Kohlenstoffatome gebunden sind. Die Singulette von drei Methoxygruppen (δ 3,85 ppm, 6 H, und 3,91 ppm, 3 H) müssen ebenfalls durch Abbau und Veresterung aus dem Chinonteil entstanden sein. Die Beziehungen der übrigen Signale zueinander wurde durch Spinentkopplung abgeklärt (in Fig. 4 durch Pfeile angedeutet). Die C-Methylgruppe (δ 0,86

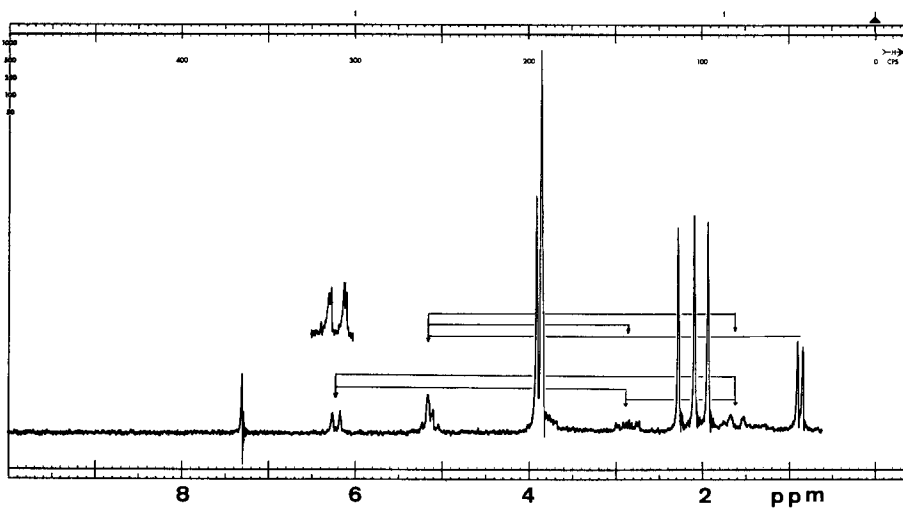
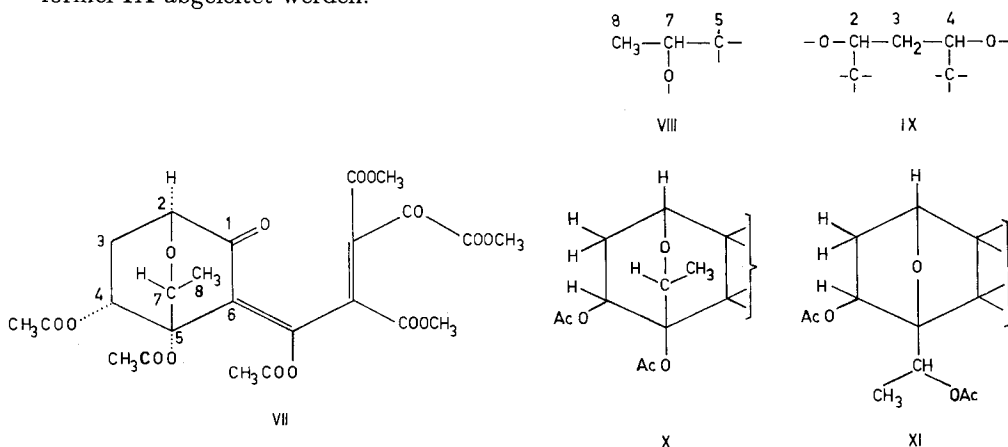


Fig. 4. NMR.-Spektrum des Abbauprodukts VII in CDCl_3 (100 MC) mit Spinentkopplung

ppm, d , $J = 6$ cps) steht in Nachbarschaft zu einer CH-Gruppe, die eines der beiden Signale bei δ 5,14 hervorruft. An der Methingruppe muss demnach ein Sauerstoffatom sitzen. Da das Quartett des Methinsauerstoffs nicht weiter aufgespalten ist, ist das nächstfolgende C-Atom quaternär, so dass wir die Teilformel VIII für die C-Atome 8, 7 und 5 in Formel VII als gesichert annehmen dürfen. Die Signale um δ 1,6 und 2,85 ppm bilden den AB -Teil eines komplexen $ABXY$ -Spektrums. Während beim Signal für H-A (δ 1,6 ppm) nur die AB -Kopplung deutlich in Erscheinung tritt ($J_{AB} = 15$ cps), sind im Signal von H-B (δ 2,85 ppm), das aus acht Linien besteht, alle drei Kopplungen deutlich zu erkennen: $J_{BA} = 15$ cps, $J_{BX} = 3$ cps, $J_{BY} = 8,5$ cps. Das

Signal von H-Y findet sich bei δ 6,2 ppm als Doppeldublett ($J_{YB} = 8,5$ cps, $J_{YA} = 1,2$ cps), dasjenige von H-X bei δ 5,14 ppm (überlagert vom oben besprochenen Methinquantett von H-7). Es kann daher für einen weiteren Teil der Molekel die Teilformel IX abgeleitet werden.



In den Teilformeln VIII und IX sind sämtliche Wasserstoffatome ausser den Methoxyl- und Acetyl-Protonen, die sich im NMR.-Spektrum zu erkennen geben, lokalisiert. Die beiden Teilformeln lassen sich zwanglos zu einer erweiterten Teilformel X zusammenfügen, wobei zu berücksichtigen ist, dass von den 5 Sauerstoffatomen dieses Molekelteils vier in Acetoxygruppen vorliegen, das fünfte als Äthersauerstoff. Die Spektren stehen aber auch im Einklang mit einer isomeren Formel XI. Während längerer Zeit haben wir dieser letzteren den Vorzug gegeben, da wir die eingangs diskutierte Verschiebung des einen Methinquantetts bei der Acetylierung von Granaticin der Acetylierung einer freien Methylcarbinolgruppe zuschrieben. Erst auf Grund der RÖNTGEN-Strukturanalyse [12] konnte zugunsten der Formel X entschieden werden.

Die Erweiterung der Teilformel X zur Formel VII für das Abbauprodukt ergab sich aus folgenden Beobachtungen:

1. Im ungesättigten Teil der Molekel, der ursprünglich Teil des Naphazarinsystems gewesen sein muss, sind noch drei durch das NMR.-Spektrum ausgewiesene Carbo-methoxygruppen und eine Acetoxygruppe unterzubringen. Weitere H-Atome sind am Aufbau dieses Molekelteils nicht beteiligt, d.h. alle Doppelbindungen müssen tetra-substituiert sein.

2. Die ungewöhnlich grosse chemische Verschiebung des Signals von H-2 im NMR.-Spektrum (Fig.4, δ 6,2 ppm) lässt sich nicht durch die Nachbarschaft eines Äthersauerstoffs allein erklären, sondern ist mitbedingt durch die Nachbarschaft des Carbonylsauerstoffs an C-1.

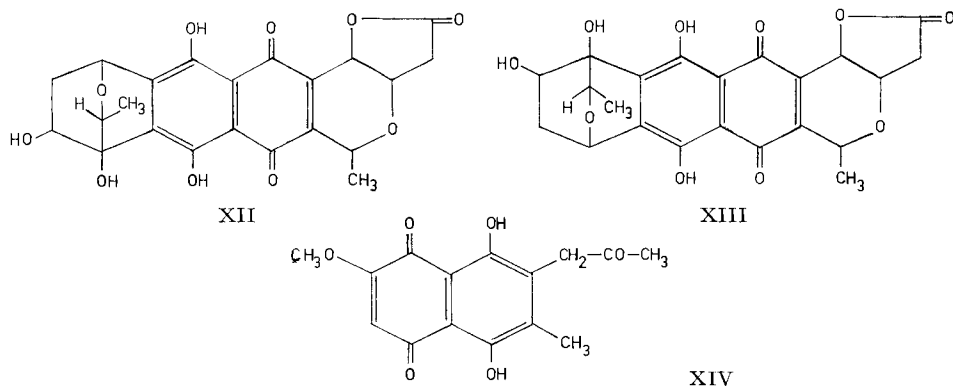
3. Im Massenspektrum findet man als grösstes Fragment eines mit m/e 494. Dieses kann als Bruchstück M-60 (Abspaltung von Essigsäure) gedeutet werden, was zu einem Molekulargewicht von 554 für das Abbauprodukt führt, in Übereinstimmung mit der Formel VII. Weitere Signale im Massenspektrum lassen sich wie folgt erklären:

m/e: 463 = 494 – 31 (Abspaltung von Methoxyl); 450 = 494 – 44 (Decarboxylierung; solche Abspaltungen werden gelegentlich bei β -Ketoestern beobachtet und verlaufen unter Umlagerung der Methylgruppe); 436 = 494 – 58 (thermische Hydrolyse und Decarboxylierung eines β -Ketoesters); 421 = 463 – 42 (Keten-Abspaltung); 408 = 450 – 42 (Keten-Abspaltung); 390 = 450 – 60 (Abspaltung von Essigsäure); 379 = 421 – 42 (Keten-Abspaltung); 366 = 408 – 42 (Keten-Abspaltung); 348 = 408 – 60 (Essigsäureabspaltung).

Versuche zur Interpretation des beobachteten Massenspektrums ausgehend von anderen Formeln, die dem NMR.-Spektrum gerecht werden (z. B. einer Formel ohne die α -Keto-Gruppe) waren ohne Erfolg.

4. Im Tetra-O-acetyl-granaticin (vgl. Formel XX) dürfte die am leichtesten zugängliche Stelle des Naphtazarinsystems die Bindung zwischen C-8 und C-9 sein, weshalb diese durch das Ozon bevorzugt angegriffen wird.

Die beiden Teile der Granaticinmolekel, die den Abbauprodukten VI und VII entsprechen, lassen sich auf zwei Arten über ein Chinonsystem zu einer Molekel $C_{22}H_{20}O_{10}$ zusammenfügen (XII und XIII). Beide Formeln stellen tetrasubstituierte Naphtazarine dar und sind in völliger Übereinstimmung mit den erwähnten spektroskopischen und chemischen Daten. Auf chemischem Wege wäre zwischen diesen beiden Möglichkeiten nur mit einem unverhältnismässig grossen Aufwand zu entscheiden gewesen. Die Schwierigkeit zur Lösung eines analogen Problems hat sich u. a. beim Antibiotikum Javanicin (XIV) und verwandten Stoffwechselprodukten von Pilzen gezeigt, bei denen erst eine eindeutige Synthese zum Ziel geführt hat (vgl. [9] und dort zitierte frühere Arbeiten von HARDEGGER und Mitarb.). Die chemische Untersuchung des Granaticins wurde daher an dieser Stelle abgebrochen, da zu erwarten war, dass eine



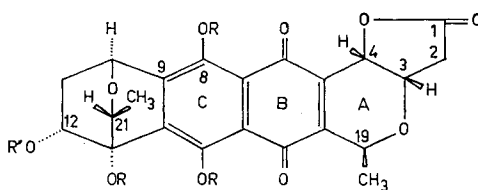
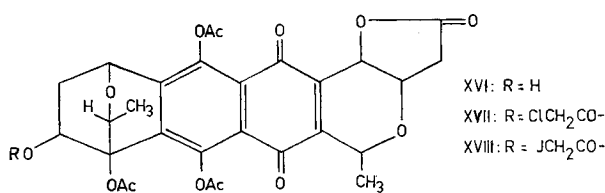
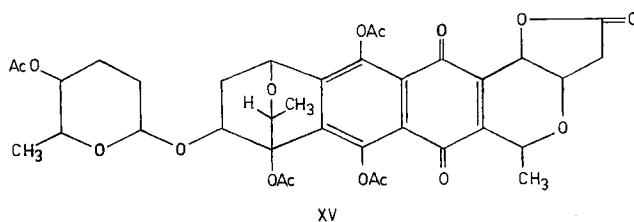
RÖNTGEN-Strukturanalyse nicht nur den Entscheid zwischen den Konstitutionsformeln XII und XIII in viel kürzerer Zeit erlauben, sondern gleichzeitig die absolute Konfiguration an den 7 asymmetrischen C-Atomen liefern würde. Dass uns die Strukturanalyse zudem zwingen würde, die damals im Vordergrund stehende Teilformel XI zugunsten der Formulierung X aufzugeben, konnte in diesem Zeitpunkt noch nicht geahnt werden.

3. *Herstellung des 8,13,15-Tri-O-acetyl-12-O-jodacetylgranaticins.* Für die RÖNTGEN-Strukturanalyse benötigten wir ein gut kristallisierbares Derivat mit einem schweren Atom. Zunächst versuchten wir, das Problem mit Hilfe des Tetra-O-chlor-

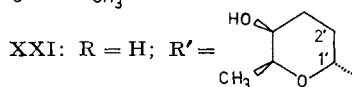
acetylderivates anzugehen, das zwar gut ausgebildete Kristalle lieferte, dessen PATTERSON-Diagramm sich aber als nicht interpretierbar erwies. Es zeigte sich später, dass die Hauptintensitäten nicht von den Cl-Cl-Abständen stammten, sondern durch eine Summierung mehrerer gleicher C-C-Abstände in gleicher Richtung zustande kamen, was zu Fehlinterpretationen führte. Es gelang uns darauf, ausgehend vom Granaticin B [3] ein Derivat mit nur einem schweren Atom zu bereiten, das den Anforderungen einer RÖNTGEN-Analyse genügte.

Das Tetra-O-acetyl-granaticin B (XV) [3] liess sich durch eine milde saure Methanolyse selektiv an der Glykosidbindung spalten zum Tri-O-acetyl-granaticin (XVI) mit einer einzigen freien Hydroxylgruppe. Die Anwesenheit von drei Acetylgruppen ergab sich aus dem NMR.-Spektrum. Durch Umsetzung mit Chloressigsäureanhydrid wurde das Monochloracetat XVII erhalten, dessen NMR.-Spektrum neben den drei Acetyl-Signalen ein Singulett zu 2 H bei δ 4,56 ppm zeigt, das der Cl-CH₂-CO-Gruppe zuzuschreiben ist. Der Austausch von Chlor durch Jod mittels Kaliumjodid erfolgte glatt und gab das 8,13,15-Tri-O-acetyl-12-O-jodacetyl-granaticin (XVIII), dessen Singulett für die J-CH₂-CO-Gruppe im NMR.-Spektrum bei δ 4,15 ppm lag. Das Derivat wurde in schönen bernsteinfarbenen Prismen erhalten, die für die RÖNTGEN-Untersuchung direkt eingesetzt wurden.

Die Einzelheiten der Kristallstrukturanalyse des Derivates XIX sind in der nachfolgenden Abhandlung [12] wiedergegeben. Es ergibt sich daraus, dass dem Granaticin die Konstitution XII und die absolute Konfiguration XX zukommt, im besten Einklang mit den oben diskutierten physikalischen und chemischen Eigenschaften des Antibioticums.



XIX: R = Ac; R' = JCH₂CO-
XX: R = R' = H



4. *Die Struktur des Granaticins B.* Über die Solvolyse des Granaticins B zu Granaticin und Methyl-L-rhodosid ist bereits früher berichtet worden [3]. Aus den oben beschriebenen Umsetzungen ergibt sich, dass der Zuckerrest an derjenigen Stelle des Aglykons sitzt, die im Derivat XVIII von der Jodacetylgruppe eingenommen wird, also am Sauerstoffatom an C-12. Unglücklicherweise ist das Signal des Protons an C-1' des Zuckerrestes im NMR.-Spektrum des Granaticins B (Fig. 5) bei δ 5,2 ppm vom Quartett des Wasserstoffatoms H-19 überlagert, so dass seine Multiplizität nicht klar hervortritt. Auch nach der Entkopplung des Quartetts wird die Übersichtlichkeit nur unwesentlich verbessert. Da das Dublett bei δ 5,33 ppm, das auch im Granaticin vorkommt und H-10 zugeschrieben wird, sehr scharf ist, ist es unwahrscheinlich, dass darunter Teile des Signals von H-1' verborgen sind. Es ergibt sich daraus, dass in dieser Gegend Kopplungskonstanten J von 8 und mehr cps, wie sie durch eine Wechselwirkung zwischen H-1'_a und H-2'_a hervorgerufen werden müssten, nicht vorkommen, und dass daher das α -Glykosid XXI mit äquatorialem H-1' vorliegt.

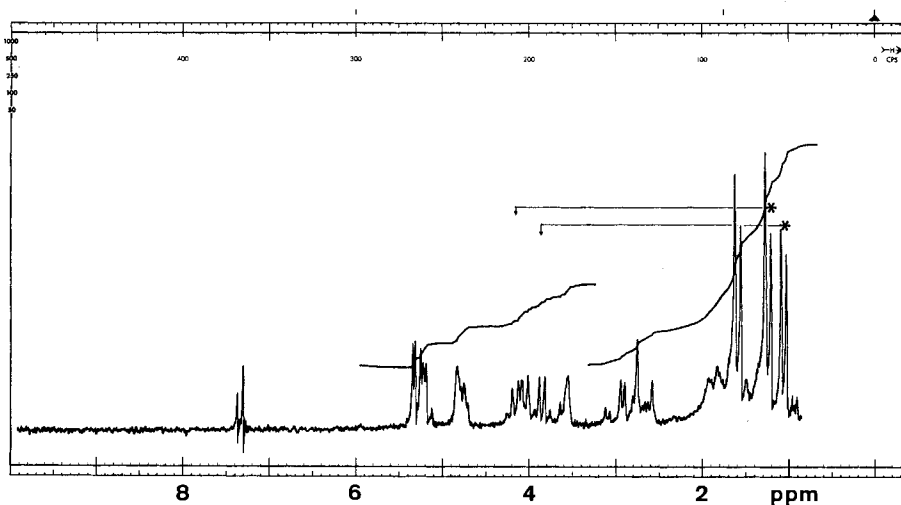


Fig. 5. NMR.-Spektrum von Granaticin B in $CDCl_3$ (100 MC)

Die vom biogenetischen Standpunkt aus nächsten Verwandten des Granaticins sind das Antibiotikum Frenolicin [15] und der rote Actinomyceten-Farbstoff Actinorhodin [16]. Es fällt auf, dass in diesen beiden Verbindungen der ätherartig überbrückte Ring D des Granaticins fehlt. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass dem Granaticin ein biogenetisches Zwischenprodukt zugrunde liegt, das nur aus den Ringen A, B und C (Formel XX) besteht, die sich aus einer unverzweigten Polyketid-Kette (8 Acetat-Einheiten) ableiten lassen. In einer zweiten Phase der Biosynthese würde dann diesem hypothetischen Zwischenprodukt ein C_6 -Baustein derart angegliedert, dass der überbrückte Ring D entsteht. Das C_6 -Zwischenprodukt lässt sich entweder aus 3 Acetat-Einheiten oder wahrscheinlicher aus einem Zucker ableiten. Dieser Zucker müsste eine 2,6-Didesoxyhexose sein, eine Gruppe von Kohlehydraten, die gerade als Bausteine von Stoffwechselprodukten von Actinomyceten besonders verbreitet ist.

Herrn Prof. H. ZÄHNER, Tübingen, danken wir für rohes Granaticin.

Experimentelles. – *Allgemeines.* Die Smp. wurden in einer offenen Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer, Modell 21, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrographen, Modell A 60 oder Modell HA-100, aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in δ -Werten gegenüber Tetramethylsilan als internem Standard, die Kopplungskonstanten in cps angegeben. Es bedeuten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, b = schlecht aufgelöster Signalhaufen.

Dünnschichtchromatogramme wurden mit Kieselgel-Fertigplatten F₂₅₄ «MERCK» ausgeführt. Für die präparative Chromatographie wurde Kieselgel «MERCK», 0,05–0,2 mm, verwendet.

Abbau von Granaticin mit Ozon. 600 mg Granaticin in 200 ml Eisessig wurden bei Zimmertemperatur während ca. 1,5 Std. mit einem ozonhaltigen Luftstrom behandelt. Der Lösung wurden 50 ml ca. 6-proz. Wasserstoffsuperoxid zugefügt und nach einiger Zeit überschüssiges Peroxid durch Zugabe von etwas Palladiumkohle zersetzt. Die Lösung wurde filtriert und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand nahm man in Methanol auf und veresterte die rohen Säuren mit Diazo-methan. Der Eindampfrückstand zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Äthylacetat-Methanol 9:1) 3 Flecke mit Rf 0,62, 0,53 und 0. Nach der Trennung an einer Säule aus 50 g Kieselgel erwies sich die Substanz mit Rf 0,53 auf Grund des NMR.-Spektrums als Gemisch mehrerer aliphatischer Carbonsäure-methylester. Das Produkt mit Rf 0,62 war einheitlich, konnte aus Benzol-Petroläther kristallisiert werden und bildete farblose Blättchen mit Smp. 139–140°. Nach der Sublimation im Hochvakuum war der Smp. unverändert.

C₁₂H₁₄O₇ Ber. C 53,33 H 5,22% Mol.-Gew. 270 Gef. C 53,45 H 4,96% Mol.-Gew. 272,8⁴⁾

Das Massenspektrum zeigt u. a. ein schwaches Signal für das Molekel-Ion bei m/e 270 und charakteristische Fragmente mit m/e 255 ($M - CH_3$), 239 ($M - OCH_3$), 227, 223 und 211 (Basis-spitze, $M - COOCH_3$). IR.-Absorptionsspektrum in Nujol: ν_{max} 1772, 1732, 1710, 1662 cm⁻¹; keine Absorption zwischen 3000 und 4000 cm⁻¹. NMR.-Spektrum in CDCl₃ s. Fig. 3.

Abbau von Tetra-O-acetyl-granaticin mit Ozon. Die Ozonisierung von 110 mg Tetra-O-acetyl-granaticin erfolgte in methanolischer Lösung bei Zimmertemperatur. Die Spaltung der Ozonide mit Wasserstoffsuperoxid und die Aufarbeitung erfolgten wie oben beschrieben. Das mit Diazo-methan veresterte Produkt enthielt gemäss Dünnschichtchromatographie (Chloroform-Äthylacetat 1:1) ein Hauptprodukt mit Rf 0,75 und mehrere polarere Nebenprodukte. Die Chromatographie an einer Säule aus 20 g Kieselgel gab mit Chloroform-Äthylacetat 1:1 als Eluierungsmittel 26 mg des Hauptproduktes als dünnschichtchromatographisch einheitliches blass gelbliches Öl, das sich im Hochvakuum nicht unzersetzt destillieren liess.

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{max} 290 nm ($\log \epsilon$ 3,21), hohe Endabsorption bei 220 nm. IR.-Absorptionsspektrum in Chf.: ν_{max} 1737 cm⁻¹, Schultern bei 1775 und 1685 cm⁻¹, keine Absorption zwischen 3100 und 4000 cm⁻¹. Massenspektrum s. theor. Teil. NMR.-Spektrum in CDCl₃ s. Fig. 4.

Tetra-O-chloroacetyl-granaticin. Zu einer Lösung von 900 mg Granaticin in 12 ml Pyridin wurden bei 0° 15 g Chloressigsäureanhydrid gegeben. Das Gemisch wurde auf Eiswasser gegossen und nach einigem Stehen mit Äthylacetat ausgezogen. Den Extrakt wusch man mit verd. Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser. Nach dem Trocknen mittels Natriumsulfat wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand an 90 g Kieselgel chromatographiert. Mit Äthylacetat wurden 900 mg eines Eluats erhalten, das sich bei der Dünnschichtchromatographie (Äthylacetat, Rf 0,72) einheitlich verhielt und aus Äthylalkohol in gelben rhombischen Prismen kristallisierte; Smp. 209–212°.

C₃₀H₂₄Cl₄O₁₄ Ber. C 47,97 H 3,22 Cl 18,90% Gef. C 48,25 H 3,20 Cl 18,66%

Tetra-O-acetyl-granaticin B. Herstellung und Eigenschaften s. [3]. Das NMR.-Spektrum in CDCl₃ zeigt u. a. folgende Signale: δ 0,90 ppm (d , $J = 6,5$ cps, 3 H: Methylgruppe C-22), 1,10 ppm (d , $J = 6,5$ cps, 3 H: Methylgruppe im Zuckerteil), 1,51 ppm (d , $J = 6,5$ cps, 3 H: Methylgruppe C-20), 2,08 ppm (s , 3 H), 2,18 ppm (s , 3 H), 2,47 ppm (s , 6 H), 2,50–3,05 ppm (AB -Teil eines ABX -Systems mit $J_{AB} = 18$ cps, $J_{AX} < 1$ cps, $J_{BX} = 4$ cps, CH₂ im γ -Lactonring), 3,9 ppm (m , 1 H an C-5' im Zuckerteil), 4,65 ppm (dd , $J_1 = 4$ cps, $J_2 = 3$ cps, H-3), 4,7–5,1 ppm (b , 5 H; gemäss Spinentkopplung sind in diesem Haufen u. a. die Signale von H-19 und H-21 enthalten). 5,18 ppm

⁴⁾ Dampfdruckosmometrie in Äthylacetat.

(δ , $J = 2,5$ cps, H-10), 5,40 ppm (m , H-4' im Zuckerteil). Im Gebiet zwischen δ 1,2 und 2,7 finden sich, z. T. überdeckt von anderen Signalen, diejenigen von mehreren CH_2 -Gruppen.

8,13,15-Tri-O-acetyl-12-O-jodacetyl-granaticin. 300 mg Tetra-O-acetyl-granaticin B in 70 ml absol. Methanol wurden mit 14 ml 1,3N HCl in Methanol gemischt und 24 Std. stehengelassen. Die Lösung wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand an 30 g Kieselgel chromatographiert. Mit Äthylacetat-Methanol 8:2 erhielt man ein einheitliches Produkt mit Rf 0,57 (Äthylacetat-Methanol 8:2 im Dünnschichtchromatogramm). Das NMR.-Spektrum in CDCl_3 zeigte u. a. 3 Singulette bei δ 1,92, 2,13 und 2,44 ppm für die 3 CH_3 -CO-Gruppen und 2 Dublette (J ca. 6,5 cps) bei δ 0,89 und 1,52 ppm für die beiden CH_2 -(CH)-Gruppen.

Das Produkt wurde mit 5 g Chloressigsäureanhydrid und 4 ml Pyridin während 15 Min. bei Zimmertemperatur umgesetzt, das Gemisch auf Eis gegossen und mit Äthylacetat ausgezogen. Die mit verd. Salzsäure, Hydrogencarbonat und Wasser gewaschene Lösung wurde getrocknet und im Vakuum eingedampft. Durch Chromatographie an 30 g Kieselgel wurden 110 mg Hauptprodukt (Rf 0,55, Dünnschichtchromatographie mit Äthylacetat) von einem Nebenprodukt (Rf 0,71) getrennt. Das NMR.-Spektrum zeigt u. a. 3 Singulette zu 3 H bei δ 1,92, 2,16 und 2,48 ppm, ein Singulett zu 2 H bei δ 4,57 ppm (Cl- CH_2 -CO-) und 2 Dublette zu 3 H (J ca. 6,5 cps) bei δ 0,91 und 1,52 ppm.

110 mg Chloracetat wurden mit 235 mg Kaliumjodid in 19 ml Aceton 2 Std. gekocht. Die abgekühlte Lösung wurde vom ausgeschiedenen Kaliumchlorid abfiltriert und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand chromatographierte man an 20 g Kieselgel. Mit Äthylacetat wurden 80 mg einheitliches Produkt (Rf 0,60, Äthylacetat) erhalten. Das NMR.-Spektrum zeigte neben den mehrfach erwähnten 3 Singuletten der CH_3 -Gruppen ein solches zu 2 H bei δ 4,13 ppm für die J-CH_2 -CO-Gruppe. Durch zweimaliges Umkristallisieren aus Äthylalkohol-Aceton wurden gelbe rhombische Kristalle erhalten, die direkt für die Strukturanalyse verwendet wurden.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 65. Mitteilung: A. MÜLLER & H. ZÄHNER, Arch. Mikrobiol. (im Druck).
- [2] R. CORBAZ, L. ETTLINGER, E. GAUMANN, J. KALVODA, W. KELLER-SCHIERLEIN, F. KRADOLFER, B. K. MANUKIAN, L. NEIPP, V. PRELOG, P. REUSSER & H. ZÄHNER, Helv. 40, 1262 (1957).
- [3] S. BARCZA, M. BRUFANI, W. KELLER-SCHIERLEIN & H. ZÄHNER, Helv. 49, 1736 (1966).
- [4] H. BROCKMANN & T. WAEHNELDT, Naturwiss. 50, 43 (1963).
- [5] K. L. RINEHART & D. B. BORDERS, J. Amer. chem. Soc. 85, 4037 (1963).
- [6] C. L. STEVENS, P. BLUMBERGS & D. L. WOOD, J. Amer. chem. Soc. 86, 3592 (1964).
- [7] A. L. UNDERWOOD, T. Y. TORIBARA & W. F. NEUMAN, J. Amer. chem. Soc. 72, 5597 (1950).
- [8] H. W. RUELIUS & A. GAUHE, Liebigs Ann. Chem. 570, 121 (1950).
- [9] E. WIDMER, J. W. MEYER, A. WALSER & E. HARDEGGER, Helv. 48, 538 (1965).
- [10] R. N. JONES, C. L. ANGELL, T. ITO & R. J. D. SMITH, Canad. J. Chemistry 37, 2007 (1959).
- [11] P. YATES & L. WILLIAMS, J. Amer. chem. Soc. 80, 5896 (1958).
- [12] M. BRUFANI & M. DOBLER, Helv. 51, 1269 (1968).
- [13] H. GERLACH, Helv. 49, 1291 (1966).
- [14] H. HAUTH, D. STAUFFACHER, P. NIKLAUS & A. MELERA, Helv. 48, 1087 (1965).
- [14a] K. YAMADA, S. TAKEDA, S. NAKAMURA & Y. HIRATA, Tetrahedron 24, 1267 (1968).
- [15] G. A. ELLESTAD, H. A. WHALEY & E. L. PATTERSON, J. Amer. chem. Soc. 88, 4109 (1966).
- [16] H. BROCKMANN, A. ZECK, K. VAN DER MERWE & W. MÜLLER, Liebigs Ann. Chem. 698, 209 (1966).