

196. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

238. Mitteilung¹⁾

Isolierung und Strukturaufklärung von Differolid

von Walter Keller-Schierlein*, Urs Bahnmüller und Max Dobler

Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule,
Universitätstr. 16, CH-8092 Zürich

und Jacek Bielecki²⁾, Joachim Stümpfel und Hans Zähler

Lehrstuhl für Mikrobiologie I der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, D-7400 Tübingen

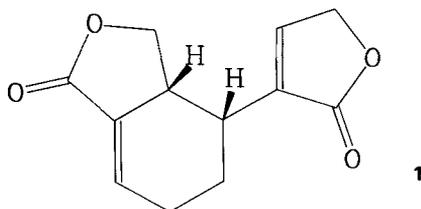
(12.IX.86)

Isolation and Structure Elucidation of Differolide

From cultures of a new actinomycete, *Streptomyces aurantiogriseus* (PREOBRAZHENSKAYA 1957), strain *Tü 3149*, a compound $C_{12}H_{12}O_4$ was isolated, which enhances the formation of aerial mycelium and spores of *Streptomyces glaucescens*. The structure determined by X-ray diffraction studies was that of racemic dilactone **1** ((±)-differolide).

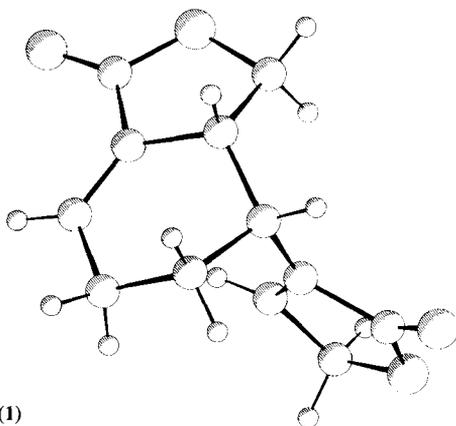
In den Extrakten von Kulturen des Actinomyceten-Stammes *Tü 3149*, *Streptomyces aurantiogriseus* (PREOBRAZHENSKAYA 1957), fiel ein Metabolit durch seine ungewöhnliche gelb-orange Farbreaktion beim Besprühen mit Tetrazoliumblau-Reagens auf. Die Verbindung konnte durch Chromatographie gereinigt und aus Et_2O kristallisiert werden. Die Bruttoformel $C_{12}H_{12}O_4$ ergab sich aus der Elementaranalyse und dem EI-MS ($M^{+} = 220$). Das IR-Spektrum zeigte eine starke (C=O)-Bande bei 1755 cm^{-1} , aber keine OH-Absorption. Ein UV-Maximum bei 214 nm ($\epsilon = 15500$) wies auf ein α, β -ungesättigtes Lacton hin.

Das ^{13}C -NMR zeigte das Vorhandensein von 2 (C=O)- und 2 (C=C)-Bindungen an. Die Verbindung musste demnach 3 Ringe besitzen, von denen zwei offensichtlich Lacton-Ringe waren. Zwei ^{13}C -NMR-Signale bei 68,5 und 70,4 ppm, beide *t* bei 'off-resonance'-Einstrahlung, zeigen, dass beide Ring-O-Atome an CH_2 -Gruppen liegen. Das 1H -NMR



¹⁾ 237. Mitt.: [1].

²⁾ Gegenwärtige Adresse: Institute of Microbiology, University of Warsaw, Warsaw, Polen.



Figur. Eine Ansicht von Differolid (1)

(Exper. Teil) war wegen zahlreicher Fern-Wechselwirkungen unübersichtlich. Die Strukturaufklärung vom racemischen Differolid erfolgte mittels einer Röntgenstrukturanalyse, die die in Formel 1 angegebene Konstitution ergab (vgl. Figur). Bindungslängen (vgl. Tab. 1) und Bindungswinkel (vgl. Tab. 2) weisen kaum Besonderheiten auf. Differolid hat zwei Chiralitätszentren, kristallisiert aber in der zentrosymmetrischen Raumgruppe $P\bar{1}$ als Racemat. Differolid zeigte im Rundfilter-Agar-Diffusionstest keine wachstumshemmende Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie Hefen und Pilze. Hingegen wurde bei *Streptomyces glaucescens* ssp. *glaucescens* die Luftmycel- und Sporenbildung erheblich gesteigert.

Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [2].

Isolierung und Eigenschaften von Differolid (1). Erntereife Kulturen wurden mit Hilfe von *Celite* filtriert. Das Filtrat wurde auf eine Säule von *Amberlite XAD-16* gegeben, die Säule mit H_2O gewaschen und mit MeOH eluiert. Der Filterkuchen wurde 2mal mit MeOH extrahiert und die Extrakte zusammen mit dem obigen Eluat bis zu einem wässr. Rückstand i.V. konzentriert. Nach dem Ansäuern auf pH 5–6 wurde 2mal mit AcOEt ausgezogen und der Extrakt nach dem Eindampfen i.V. unter geringem Überdruck mit $CHCl_3$ an Kieselgel chromatographiert. Die differolid-enthaltenden Fraktionen wurden i.V. zur Trockne eingengt. Nach einer weiteren Chromatographie an *Sephadex LH-20* (MeOH) wurden 360 mg eines bräunlichen Öls erhalten. Eine weitere Chromatographie an Kieselgel (2 cm \times 50 cm) mit $CHCl_3$ /AcOEt 4:1 gab 94 mg farbloses Öl, aus dem nach der Zugabe von etwas Et_2O 25 mg krist. I ausfiel, das aus Aceton/Hexan umkristallisiert wurde. Farblose Prismen. DC (AcOEt): R_f 0,57 einheitlich, gelboranger Fleck mit Tetrazolblau-Sprühreagens²⁾. Schmp. 171–175° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = \pm 0^\circ$ (MeOH, $c = 1,71$). UV (EtOH): 214 (15 500). IR ($CHCl_3$): 3020w, 3000w, 1755s, 1645w, 1485w, 1455m, 1425w, 1400w, 1380w, 1350m, 1330m, 1310w, 1290w, 1270w, 1255w, 1185s, 1105m, 1085m, 1075m, 1065s, 1040 (sh), 1025s, 1005m, 985m, 955w, 940m, 895w, 870w, 835m. ¹H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 1,85–2,05 (m, 2 H); 2,25 (dm, $J_d = 17,2$, 1 H); 2,50 (dm, $J_d = 17,2$, 1 H); 3,32–3,50 (m, 2 H); 3,86 (t, $J = 9,2$, 1 H); 4,52 (t, $J = 9,1$, 1 H); 4,80 (br., 2 H); 6,95 (q, $J = 3,4$, 1 H); 7,09 (br., 1 H). ¹³C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 22,1 (t); 25,0 (t); 28,3 (d); 38,6 (d); 68,5 (t); 70,4 (t); 127,3 (s); 131,5 (s); 136,3 (d); 145,9 (d); 169,3 (s); 174,1 (s). EI-MS: 220 (16,1, M^+), 202 (15,8), 192 (6,0), 191 (9,3), 187 (13,2), 174 (47,1), 164 (18,2), 162 (5,2), 157 (7,9), 145 (9,2), 144 (7,7), 133 (5,1), 131 (9,8), 130 (11,4), 129 (33,4), 123 (20,7), 119 (13,3), 117 (30,6), 115 (24,8), 111 (100), 110 (48,4), 105 (12,2), 103 (8,3), 91 (27,8), 83 (24,2),

²⁾ 0,5% Tetrazoliumblau-chlorid in MeOH und 6N wässr. NaOH, kurz vor dem Sprühen im Verhältnis 1:1 gemischt. DC-Platten nach dem Sprühen leicht erwärmt.

82 (37,1), 81 (61,6), 79 (15,5), 77 (25,6), 67 (23,1), 65 (20,6), 63 (9,5), 53 (60,7), 51 (20,2), 43 (5,3), 41 (14,6), 39 (30,0), 29 (7,9), 27 (17,2). Anal. ber. für $C_{12}H_{12}O_4$ (220,216): C 65,44, H 5,49; gef.: C 65,25, H 5,54.

Kristalldaten. Differolid, $C_{12}H_{12}O_4$, Mol.-Gew. 220, triklin, $a = 6,342(2)$, $b = 7,430(3)$, $c = 12,545(6)$ Å, $\alpha = 71,65(4)$, $\beta = 78,33(3)$, $\gamma = 67,94(3)^\circ$, $V = 518,5$ Å³, $Z = 2$, Raumgruppe $P\bar{1}$, $D_x = 1,41$, $D_m = 1,38$ g/cm³.

Strukturanalyse und Verfeinerung. Die Raumgruppe wurde aus Präzessionsaufnahmen, die Zellkonstanten aus Diffraktometermessungen mit $MoK\alpha$ -Strahlung bestimmt. Die Messung der Reflexintensitäten erfolgte auf einem automatischen Diffraktometer (*Enraf-Nonius CAD4*, graphitmonochromatisierte $MoK\alpha$ -Strahlung). Bis zu $\theta = 25^\circ$ wurden 2349 Reflexe beobachtet, von denen 2207 mit $F_o > 3\sigma(F_o)$ für die Strukturanalyse verwendet wurden.

Die Struktur wurde mit direkten Methoden (MULTAN 80 [31]) bestimmt. Die Verfeinerung erfolgte durch das Verfahren der kleinsten Fehlerquadrate (SHELX 84 [4]), sie wurde durch Differenzsynthesen überprüft. Für alle H-Atome wurden experimentelle Lagen gefunden und in die Verfeinerung eingeschlossen. Mit anisotropen Temp.-Faktoren für die Nicht-H-Atome ergab sich ein abschliessender R -Faktor von 0,036. Die Atomkoordinaten sind in Tab. 3 zusammengestellt³⁾.

Tab. 1. Bindungslängen [Å]. Geschätzte Standardabweichungen ($\times 10^3$) in Klammern.

O(1)–C(1)	1,202(2)	C(3)–C(4)	1,510(3)
O(2)–C(1)	1,345(3)	C(3)–C(8)	1,527(3)
O(2)–C(4)	1,465(3)	C(5)–C(6)	1,495(3)
O(3)–C(12)	1,203(2)	C(6)–C(7)	1,513(3)
O(4)–C(11)	1,446(5)	C(7)–C(8)	1,535(3)
O(4)–C(12)	1,354(5)	C(8)–C(9)	1,497(3)
C(1)–C(2)	1,465(3)	C(9)–C(10)	1,322(3)
C(2)–C(3)	1,491(3)	C(9)–C(12)	1,471(3)
C(2)–C(5)	1,309(3)	C(10)–C(11)	1,477(3)

Tab. 2. Bindungswinkel [°]. Geschätzte Standardabweichungen 0,2–0,3°.

C(1)–O(2)–C(4)	110,6	C(5)–C(6)–C(7)	113,7
C(11)–O(4)–C(12)	108,6	C(6)–C(7)–C(8)	113,5
O(1)–C(1)–O(2)	120,9	C(3)–C(8)–C(7)	107,4
O(1)–C(1)–C(2)	130,4	C(3)–C(8)–C(9)	115,3
O(2)–C(1)–C(2)	108,7	C(7)–C(8)–C(9)	110,8
C(1)–C(2)–C(3)	107,6	C(8)–C(9)–C(10)	133,5
C(1)–C(2)–C(5)	126,5	C(8)–C(9)–C(12)	119,9
C(3)–C(2)–C(5)	125,6	C(10)–C(9)–C(12)	106,6
C(2)–C(3)–C(4)	102,0	C(9)–C(10)–C(11)	111,1
C(2)–C(3)–C(8)	111,4	O(4)–C(11)–C(10)	104,1
C(4)–C(3)–C(8)	119,8	O(3)–C(12)–O(4)	121,2
O(2)–C(4)–C(3)	105,4	O(3)–C(12)–C(9)	129,1
C(2)–C(5)–C(6)	121,2	O(4)–C(12)–C(9)	109,6

³⁾ Listen mit Strukturparametern und anisotropen Vibrationsparametern stehen auf Verlangen zur Verfügung.

Tab. 3. Atomkoordinaten. Standardabweichungen ($\times 10^4$), für H-Atome ($\times 10^3$) in Klammern. $U_{\text{äq}}$ [\AA^2], bzw. U_{iso} für H-Atome^{a)}.

	x	y	z	$U_{\text{äq}}$ (U_{iso})
O(1)	-0,4281(4)	-0,2386(4)	0,6440(2)	0,070
O(2)	-0,1823(4)	-0,3523(3)	0,7724(2)	0,066
O(3)	0,1495(3)	0,2073(3)	0,9087(2)	0,058
O(4)	-0,2156(3)	0,2810(3)	0,9791(2)	0,052
C(1)	-0,2864(5)	-0,2140(4)	0,6833(3)	0,048
C(2)	-0,1969(5)	-0,0468(4)	0,6503(2)	0,043
C(3)	0,0077(5)	-0,1123(5)	0,7123(3)	0,050
C(4)	-0,0315(7)	-0,2807(5)	0,8101(3)	0,063
C(5)	-0,2917(7)	0,1345(5)	0,5874(3)	0,059
C(6)	-0,2001(8)	0,3000(6)	0,5730(3)	0,079
C(7)	0,0246(8)	0,2298(7)	0,6226(3)	0,081
C(8)	0,0398(5)	0,0660(7)	0,7345(3)	0,053
C(9)	-0,1229(5)	0,1489(4)	0,8255(2)	0,041
C(10)	-0,3445(5)	0,1855(5)	0,8538(3)	0,053
C(11)	-0,4209(5)	0,2696(6)	0,9525(3)	0,059
C(12)	-0,0404(5)	0,2123(4)	0,9043(2)	0,041
H(3)	0,138(6)	-0,173(5)	0,665(3)	0,058
H(4A)	-0,108(6)	-0,230(5)	0,879(3)	0,074
H(4B)	0,097(6)	-0,395(5)	0,831(3)	0,074
H(5)	-0,426(6)	0,168(5)	0,552(3)	0,067
H(6A)	-0,185(6)	0,369(6)	0,492(3)	0,088
H(6B)	-0,315(7)	0,403(6)	0,605(3)	0,088
H(7A)	0,043(7)	0,347(6)	0,637(3)	0,094
H(7B)	0,145(7)	0,179(6)	0,566(3)	0,094
H(8)	0,189(6)	0,020(5)	0,760(3)	0,063
H(10)	-0,449(5)	0,160(4)	0,821(2)	0,043
H(11A)	-0,528(6)	0,405(5)	0,935(3)	0,071
H(11B)	-0,473(6)	0,172(5)	1,021(3)	0,071

$$^a) U_{\text{äq}} = 1/3 \sum_{ij} a_i^* \cdot a_j^* \cdot a_i \cdot a_j \cdot U_{ij}$$

Die NMR-Spektren verdanken wir Frl. *B. Brandenburg*, die MS Frau *L. Golgowski* und die Elementaranalyse Herrn *D. Manser*. Herrn *A. Müller* danken wir für seine Mithilfe bei der Isolierung und Reinigung.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. Müller, W. Keller-Schierlein, J. Bielecki, G. Rak, J. Stümpfel, H. Zähler, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 1829.
- [2] L. Bassi, B. Joos, P. Gassmann, H.-P. Kaiser, H. Leuenberger, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 92.
- [3] P. Main, M. M. Woolfson, G. Germain, MULTAN 80, University of York, England, 1980.
- [4] G. Sheldrick, SHELX 84, unpublizierte Version.