

217. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

251. Mitteilung¹⁾

Die Esmeraldine A und B, tief grüne Farbstoffe aus *Streptomyces antibioticus*, Stamm Tü 2706

von Walter Keller-Schierlein* und Adrian Geiger

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, CH-8092 Zürich

und Hans Zähler und Matthias Brandl

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

(31. VIII. 88)

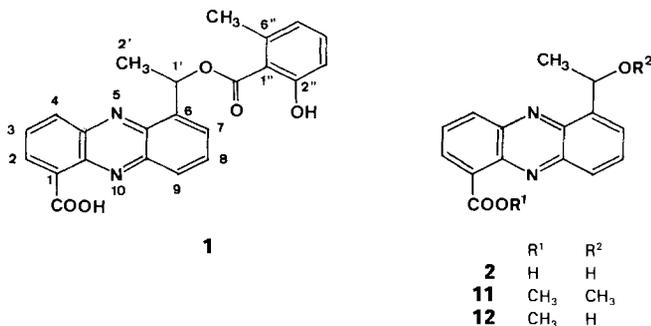
The Esmeraldines A and B, Green Pigments from *Streptomyces antibioticus*, Strain Tü 2706

From a strain of *Streptomyces antibioticus*, Tü 2706, two dark green substances, the esmeraldines A and B, **4** and **3**, respectively, were isolated. The structural elucidation was carried out by spectroscopic comparison with some simpler phenazines obtained from the same organism, saphenamycin (**1**) and related compounds, and by a series of chemical transformations. Esmeraldin B (**3**) is the 6-methylsalicylic acid ester, and esmeraldin A (**4**) a mixture of higher saturated and unsaturated fatty acid esters of esmeraldic acid. The latter is a heterocyclic compound with seven rings and four N-atoms, formally derived by condensation of two phenazine residues of the saphenic acid family. The esmeraldins are mixtures of diastereoisomers.

Einleitung. – Kürzlich haben wir über die Isolierung einer Reihe von Phenazinen aus Kulturen von *Streptomyces antibioticus*, Stamm Tü 2706, berichtet [2]. Die einzige antibakteriell hochwirksame Verbindung der Reihe war das Saphenamycin (**1**), ein Antibiotikum, das schon früher von Umezawa und Mitarbeitern [3] beschrieben worden war. Eine zweite Verbindung, Saphensäure (**2**), war identisch mit einem Abbauprodukt des Enzymhemmers DC-86-M [4]. Die auffälligste Eigenschaft des Stammes war die tief grüne Farbe seiner Kulturen und der daraus bereiteten Extrakte. Aus den Rohextrakten konnten die gelben Phenazine durch Chromatographie abgetrennt werden, während die grünen Pigmente aus der Säule erst nach dem Zufügen von HCOOH zum Lösungsmittel eluiert wurden. Die grünen Fraktionen liessen sich durch Craig-Verteilung in zwei Hauptkomponenten, die Esmeraldine B (**3**) und A (**4**) auftrennen. Für kleinere Mengen eignete sich auch die Tröpfchen-Gegenstrom-Chromatographie. Chromatographisch einheitliche Produkte (DC) wurden durch eine Kombination der beiden Methoden erhalten.

Esmeraldin B (3). – Reines Esmeraldin B bildet ein bisher nicht kristallisierbares dunkelgrünes Pulver, teilweise mit metallischem Glanz. Seine Lösungen in organischen Lösungsmitteln sind grasgrün ($\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 689 nm). Auf Zusatz von NaOH tritt eine hypso-

¹⁾ 250. Mitteilung: [1].



chrome Verschiebung ein ($\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH/NaOH}}$ 588 nm) unter Farbänderung nach Blau; die Verschiebung ist reversibel.

Die Elementaranalysen waren schlecht reproduzierbar und gaben kaum Aufschluss über die Elementarzusammensetzung. In den NMR-Spektren (¹H, ¹³C) sind zahlreiche Signale in Paare sehr ähnlicher chemischer Verschiebung und gleicher Multiplizität aufgepalten. Insgesamt waren wesentlich mehr Signale zu erkennen, als auf Grund des Molekulargewichts (653, FAB-MS) C- bzw. H-Atome vorhanden sein konnten²). Offenbar liegt ein Gemisch von zwei Diastereoisomeren vor. Wegen dieser Kompliziertheit der Spektren eignen sie sich schlecht für eine Diskussion der Konstitution. Wir beginnen daher die Strukturauflklärung mit einem Derivat von **3**, das die genannten Nachteile nicht mehr besitzt, der Esmeraldsäure (**5**) bzw. deren Dimethylester **6**.

Die Herstellung von **6** beruht auf frühen Beobachtungen an den Spektren von **3** und von Esmeraldin-B-dimethylester (**7**)³), die eine nahe Beziehung zu Saphenamycin (**1**) wahrscheinlich machten. Insbesondere war eine Gruppe von ¹H-NMR-Signalen von **7** fast identisch mit solchen, die wir bei **1** den Protonen des 6-Methylsalicylsäure-Restes zugeordnet hatten [2]. 6-Methylsalicylsäure entstand bei der alkalischen Hydrolyse von **3** neben Esmeraldsäure (**8**) und konnte als Methylester identifiziert werden. Ferner zeigt **7** im ¹H-NMR Signale für eine (CH₃–CH–O)-Gruppierung bei den extremen Werten von 2,02/1,99 (*d*) und 7,58 (*q*) ppm, fast gleich wie **1** (Tab. 1). Es war daher zu vermuten, dass der 6-Methylsalicylsäure-Rest ganz ähnlich gebunden ist wie bei **1**, und zu erwarten, dass er in gleicher Weise wie bei **1** durch katalytische Hydrogenolyse abspaltbar wäre. Tatsächlich lieferte die Hydrierung ein Produkt, die Esmeraldsäure (**5**), die als Dimethylester **6** gereinigt und charakterisiert wurde. Er trägt anstelle der (CH₃–CH–O)-Gruppe gemäss ¹H- und ¹³C-NMR (Tab. 2) eine Et-Gruppe, und die Signale des 6-methylsalicylsäure-Restes sind nicht mehr vorhanden. Der Ester **6** konnte leicht durch Kristallisation gereinigt werden und gab Elementaranalysen, die auf die Formel C₃₂H₂₆N₄O₄ passten, die durch das MS (*M*⁺ = 530) bestätigt wurde.

Die ¹H-NMR-Signale der Et-Gruppe liegen bei 1,50 ppm (CH₃) sowie 3,52 und 3,41 ppm für die offenbar diastereotopen CH₂-Protonen, ganz ähnlich wie beim 6-Ethylphenazin-1-carbonsäure-methylester, dem entsprechenden Hydrogenolyseprodukt des

²) In den Tabellen und im *Exper. Teil* wurden zu Paaren zusammengehörnde Signale durch einen Querstrich (/) getrennt.

³) Für Vergleiche eignen sich die Spektren des Esters **7** (in CDCl₃) besser als diejenigen der freien Säure **3**, da die letzteren in (D₅)Pyridin aufgenommen werden mussten.

Tab. 1. ¹H-NMR-Spektren von Phenazinen und Esmeraldinen (CDCl₃, 300 MHz)

Zuordnung	Saphenamycin 1	Saphensäure 2	Saphensäure- methylester 12	Esmeraldin-B- dimethylester ^{a)} 7	Esmeraldsäure- dimethylester 9	Esmeraldansäure- dimethylester ^{a)} 6
H-C(2)	8,99 (dd) ^{b)}	8,97 (dd)	8,35 (dd)	8,46/8,45 (s)	8,45/8,44 (s)	8,44 (s)
H-C(3)	8,06 (dd)	8,04 (dd)	7,86	-	-	-
H-C(4)	8,59 (dd)	8,51 (dd)	8,24 (dd)	-	-	-
H-C(7)	} 7,99 (m, 2 H)	} 7,97 (m, 2 H)	} 7,78 (m, 2 H)	7,91/7,88 (dd)	} 7,72 (m, 2 H)	7,64 (dd)
H-C(8)				7,75 (dd)		7,68 (dd)
H-C(9)	8,24 (m)	8,17 (dd)	8,23 (dd)	8,23 (dd)	8,16 (m)	8,09 (dd)
H-C(12)	-	-	-	7,58 (dd)	7,60 (br. d)	7,58 (dd)
H-C(13)	-	-	-	6,76/6,75 (t) ^{c)}	6,78 ^{c)}	6,76 (dd)
H-C(14)	-	-	-	7,17 (br. d)	7,18 (br. d)	7,18 (dd)
H-C(17)	-	-	-	6,53/6,50 (dd)	6,53 (br. d)	6,51 (dd)
H-C(18)	-	-	-	6,96/6,91 (t) ^{c)}	6,97 (t) ^{c)}	6,99 (dd)
H-C(19)	-	-	-	6,87/6,72 (dd)	6,86/6,85 (dd)	6,85 (dd)
H-N(20)	-	-	-	9,50/9,48 (s)	9,52 (s)	9,48 (s)
H-C(1')	7,47 (q)	5,86 (q)	5,71 (q)	7,58 (m)	5,74 (q)	3,52, 3,41 (m)
CH ₂ (2')	1,97 (d)	1,80 (d)	1,80 (d)	2,02/1,99 (d)	1,86/1,84 (d)	1,50 (t)
H-C(3')	-	-	-	5,32/5,22 (q)	5,17/5,14 (q)	5,36 (q)
H ₃ C(4')	-	-	-	1,45/1,32 (d)	1,44 (d)	1,45 (d)
H-C(3'')	6,76 (br. d)	-	-	6,69 (m)	-	-
H-C(4'')	7,29 (t) ^{c)}	-	-	7,26 (m)	-	-

H-C(5')	6,83 (br. d)	-	-	6,81 (br. d)	-	-
CH ₃ -C(6'')	2,73 (s)	-	-	2,53 (s)	-	-
HO-C(2')	11,11 (s)*	-	-	11,44/11,40 (s)	-	-
COOH	15,40 (s)*	15,37 (s)*	-	-	-	-
HO-C(1')	-	4,03 (br. d)*	4,78 (br. d)*	-	5,31 (br. d)*	-
CH ₃ O	-	-	4,11 (s)	4,04 (s)	4,05 (s)	4,04 (s)
J(2,3)	7,1	7,1	7,0	3,94 (s)	3,94 (s)	3,94 (s)
J(2,4)	1,4	1,4	1,4	-	-	-
J(3,4)	8,7	8,7	8,7	-	-	-
J(7,8)	-	-	-	7,0	-	6,9
J(7,9)	-	2,8	1,9	1,0	-	1,9
J(8,9)	-	7,4	8,2	8,7	-	8,0
J(12,13)	-	-	-	8,2	8,2	8,2
J(12,14)	-	-	-	ca. 1	ca. 1	1,3
J(13,14)	-	-	-	1,2	7,7	ca. 8
J(17,18)	-	-	-	7,4	7,7	7,6
J(18,19)	-	-	-	7,6	7,7	7,7
J(1',2')	6,6	6,6	6,4	7,8	7,7	7,4
J(3',4')	-	-	-	6,6	6,4	7,0
	-	-	-	7,0	7,0	6,9

a) Zuordnung durch 2D-Korrelationsspektrum erhatet. *: Austauschbar mit D₂O. -: keine Kopplung oder J wegen Überlappung nicht bestimmbar.
 b) Bei Saphenamycin-methylester: 8,43 ppm.
 c) t-ähnliche Aufspaltung.

Tab. 2. ^{13}C -NMR von *Esmeraldin-Derivaten* (CDCl_3 , 75 MHz)

Zuordnung	Saphenamycin 1	Esmeraldin-B- dimethylester ^{a)} 7	Esmeraldsäure- dimethylester ^{b)} 6
C(2)	137,7 (<i>d</i>) ^{c)}	125,21/125,34 (<i>d</i>)	124,74 (<i>d</i>)
C(3)	135,5 (<i>d</i>) ^{c)}	–	–
C(4)	132,9 ^{c)}	–	–
C(7)	127,5 (<i>d</i>)	126,70/127,48 (<i>d</i>)	128,09 (<i>d</i>)
C(8)	127,7 (<i>d</i>)	128,74 (<i>d</i>)	128,47 (<i>d</i>)
C(9)	130,4 (<i>d</i>)	130,26/130,46 (<i>d</i>)	129,48 (<i>d</i>)
C(12)	–	126,28 (<i>d</i>)	126,02 (<i>d</i>)
C(13)	–	119,10/119,29 (<i>d</i>)	119,32 (<i>d</i>)
C(14)	–	120,39/120,52 (<i>d</i>)	120,39 (<i>d</i>)
C(17)	–	111,42 (<i>d</i>)	111,42 (<i>d</i>)
C(18)	–	125,76 (<i>d</i>)	125,60 (<i>d</i>)
C(19)	–	120,88/121,00 (<i>d</i>)	120,97 (<i>d</i>)
C(1')	70,1 (<i>d</i>)	69,70/69,83 (<i>d</i>)	24,53 (<i>t</i>)
C(2')	22,3 (<i>q</i>)	20,82/21,01 (<i>q</i>)	14,95 (<i>q</i>)
C(3')	–	31,18 (<i>d</i>)	31,20 (<i>d</i>)
C(4')	–	23,18/23,57 (<i>q</i>)	23,60 (<i>q</i>)
C(2'')	163,0 (<i>s</i>)	162,99/163,19 (<i>s</i>)	–
C(3'')	123,1 (<i>d</i>)	122,88/123,01 (<i>d</i>)	–
C(4'')	115,9 (<i>d</i>)	115,70 (<i>d</i>)	–
C(5'')	134,5 (<i>d</i>)	134,15/134,28 (<i>d</i>)	–
CH ₃ –C(6'')	24,5 (<i>q</i>)	24,31 (<i>q</i>)	–
CO (Ester)	170,7 (<i>s</i>)	170,89/171,18 (<i>s</i>)	–
	–	168,20 (<i>s</i>)	168,31 (<i>s</i>)
	165,8 (<i>s</i>)	166,68 (<i>s</i>)	166,98 (<i>s</i>)
CH ₃ O	–	52,02 (<i>q</i>)	52,09 (<i>q</i>)
	–	52,70 (<i>q</i>)	52,73 (<i>q</i>)
keine exakte Zuordnung ^{d)}	142,6 (<i>s</i>)	142,34 (<i>s</i>)	143,21 (<i>s</i>)
	141,2 (<i>s</i> , 2 C)	141,59 (<i>s</i>)	142,46 (<i>s</i>)
	141,0 (<i>s</i>)	141,27/141,34 (<i>s</i>)	142,11 (<i>s</i>)
	140,0 (<i>s</i>)	140,70 (<i>s</i>)	141,81 (<i>s</i>)
	139,7 (<i>s</i>)	140,36 (<i>s</i>)	140,62 (<i>s</i>)
	–	139,26 (<i>s</i>)	–
	–	138,65/138,81 (<i>s</i>)	138,77 (<i>s</i>)
	–	136,87 (<i>s</i>)	136,25 (<i>s</i>)
	–	133,44 (<i>br. s</i>)	133,63 (<i>s</i>)
	–	133,31 (<i>s</i>)	130,04 (<i>s</i> , 2 C)
	–	129,65 (<i>s</i>)	–
	–	129,36/129,45 (<i>s</i>)	129,25 (<i>s</i>)
	–	129,07 (<i>s</i>)	129,10 (<i>s</i>)
	–	127,29 (<i>s</i>)	127,93 (<i>s</i>)
	124,8 (<i>s</i>)	126,80/126,96 (<i>s</i>)	127,51 (<i>s</i>)
	112,3 (<i>s</i>)	112,43/112,56 (<i>s</i>)	–

^{a)} Zuordnung durch heteronucleares 2D-Korrelationsspektrum erhärtet.

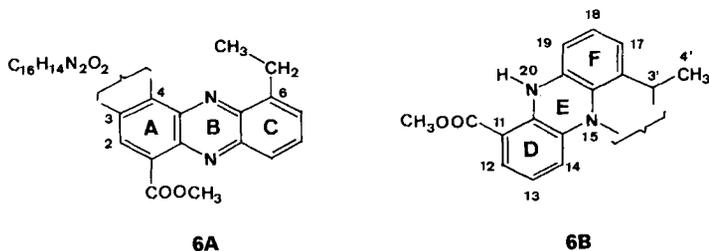
^{b)} Zuordnung in Analogie zu 7.

^{c)} Zuordnung unsicher.

^{d)} Keine exakte Zuordnung möglich wegen fehlender CH-Kopplung.

Saphenamycin-methylester [2]. Eine weitere Parallele zum Saphenamycin liegt in der Bildung von 1'-*O*-Methylesmeraldsäure-methylester **10** als Nebenprodukt der Hydrogenolyse, die in MeOH durchgeführt wurde. Bei der analogen Reaktion von Saphenamycin-methylester hatten wir früher als Nebenprodukt *O*-Methylsaphensäure-methylester **11** erhalten [2].

Die nahe Verwandtschaft von Esmeraldsäure-dimethylester (**6**) mit den Verbindungen der Saphensäure-Reihe ergibt sich weiter aus einer Gruppe von Signalen zwischen 7,64 und 8,09 ppm, die auf Grund eines 2D-Korrelationsspektrums den drei H-Atomen eines 1,2,3-trisubstituierten Benzol-Rings zugeordnet werden. Sie sind in guter Übereinstimmung mit den Signalen der Protonen an C(7), C(8) und C(9) des Saphensäure-methylesters (**12**) und weiterer Verbindungen der Saphensäure-Familie (*Tab. 1*; s.a. [2]). Die Saphensäure und ihre Derivate besitzen für die Protonen am Ring A charakteristische Signale (*Tab. 1*), von denen dasjenige bei tiefstem Feld (8.35 ppm bei **12**) dem Proton an C(2) zugeordnet wurde. Auch **6** zeigt ein Signal in dieser Gegend (8,44 ppm), das aber ein *Singulett* ist. Bei der freien Saphensäure (**2**) wie auch beim Saphenamycin (**1**) sind die entsprechenden Signale von H–C(2) nach *ca.* 9 ppm verschoben (*Tab. 1*). Esmeraldin B selber eignet sich schlecht für einen Vergleich, da es in CDCl₃ ungenügend löslich ist. Dagegen liess sich von einem Esmeraldin-monomethylester **13**, der bei der sauren Hydrolyse des Dimethylesters als Hauptprodukt entsteht, ein Spektrum aufnehmen. Das *Singulett* von H–C(2) ist hier nach 9,17 ppm verschoben. Auf Grund dieser Tatsachen können wir dem Esmeraldsäure-dimethylester eine Partialformel **6A** zuweisen, wobei C(3) und C(4) die Bindungsstellen mit dem noch unbekanntem Molekül-Teil bilden.

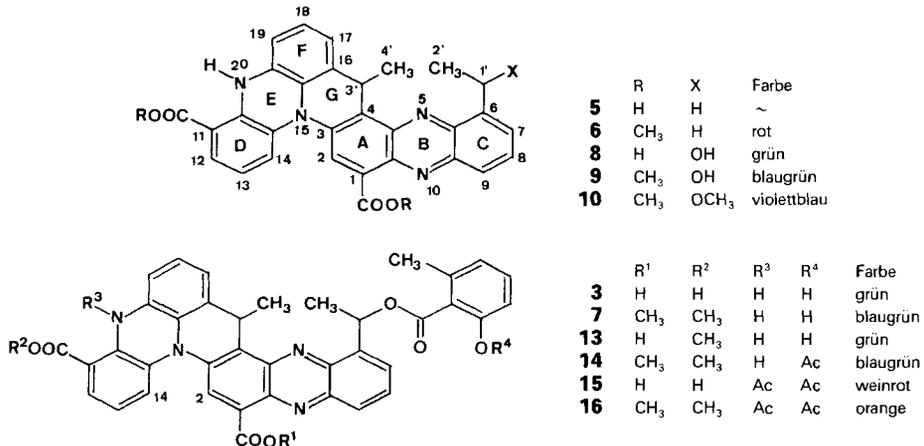


Bei diesem Teil fällt auf, dass er die Elementarzusammensetzung eines Dihydrodesoxy-saphensäure-methylesters besitzt. Dass ein konstitutioneller Zusammenhang dieses unbekanntem Teils mit der Saphensäure besteht, lässt sich aus einer Reihe von spektroskopischen Einzelheiten ableiten. Dass auch dieser Teil des Esmeraldins B eine COOH-Gruppe besitzt, ergibt sich aus der bereits erwähnten Bildung des Dimethylesters **7** mit CH₂N₂. Das Vorhandensein einer (CH₃CH)-Gruppe ergibt sich aus Signalen bei 5,36 (*q*) und 1,45 ppm (*d*, 3 H) im ¹H-NMR von **6**. Da als Substituent der CH-Gruppe kein O-Atom mehr zur Verfügung steht, ist die chemische Verschiebung ihres Protons am ehesten dadurch zu erklären, dass es zwischen zwei aromatischen Systemen liegt, also an C(3) oder C(4) von **6A**.

Wie bei der Saphensäure und ihren Derivaten sind die 6 aromatisch gebundenen Protonen des unbekanntem Teils in zwei Gruppen je in 1,2,3-Stellung eines Benzol-Ringes aufgeteilt. Die chemischen Verschiebungen im ¹H-NMR sind aber erheblich geringer als

bei Saphensäure-Derivaten (*Tab. 1*, H–C(12) bis H–C(19)), was mit der 9,10-Dihydrophenazin-Struktur dieses Teiles gut verträglich ist. Eine Dihydrophenazin-Struktur folgt auch aus der Anwesenheit eines an N-gebundenen Protons von **6**. Auf Grund eines heteronuclearen 2D-Korrelationsspektrums gehört das *Singulett* bei 9,48 ppm zu einem Proton, das nicht an C gebunden ist. Da dieses Proton andererseits mit D₂O relativ schwer ausgetauscht wird, muss es einer NH-Gruppe zugeordnet werden. Da das zweite N-Atom des Dihydrophenazin-Teiles kein Proton trägt, muss es die zweite Verbindungsstelle des unbekanntes Teils sein, dem wir somit die Partialformel **6B** zuweisen können.

Die Teilstrukturen **6A** und **6B** können auf zwei Arten miteinander verbunden werden. Dass diejenige gemäss Formel **6** die richtige ist, ergibt sich aus einem NOE-Experiment, das mit Esmeraldsäure-dimethylester (**9**) durchgeführt wurde. Einstrahlung bei 8,45 ppm (H–C(2)) gibt einzig bei 7,18 ppm einen starken NOE. Dieses Signal kann auf Grund seiner chemischen Verschiebung und der durch ein 2D-Korrelationsspektrum erhärteten Nachbarschaftsbeziehungen nur dem H in *p*-Stellung zur CH₃OCO-Gruppe, H–C(14), zugeordnet werden.



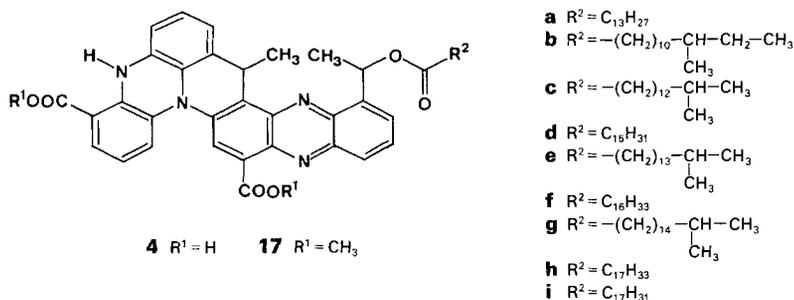
Aus der Strukturformel **6** für Esmeraldsäure-dimethylester ergibt sich eindeutig für die Esmeraldsäure die Konstitutionsformel **8** und für Esmeraldin B die Formel **3**, je mit zwei Chiralitätszentren, die das Vorliegen von Diastereoisomerenmischungen möglich machen. Mit diesen Strukturformeln sind alle Spektren, insbesondere auch die FAB-MS, gut vereinbar.

Acetylierungsversuche von **3** und Derivaten sind ebenfalls mit den angegebenen Strukturformeln im Einklang. Esmeraldin-B-dimethylester (**7**) gab mit Ac₂O und Pyridin unter üblichen Bedingungen ein Monoacetyl-Derivat **14**, bei dem offensichtlich nur die OH-Gruppe des 6-Methylsalicylsäure-Restes acetyliert ist. Die NH-Gruppe (Signal bei 9,51 ppm) wird durch die CH₃OCO-Gruppe gegen den Angriff durch das Acetylierungsmittel abgeschirmt. Aus der freien Säure **3** dagegen wurde ein Diacetyl-Derivat **15** erhalten, dessen Dimethylester **16** kein NH-Signal mehr zeigt.

Esmeraldin A (4). – Das Esmeraldin A (**4**), ebenfalls ein grünes, amorphes Pulver, zeigt ein Absorptionsmaximum im Sichtbaren, das mit 608 nm wesentlich kurzwelliger

liegt als das von **3** (689 nm). Trotzdem unterscheiden sich die beiden Esmeraldine in der Farbnuance nur geringfügig voneinander. Tatsächlich ist der Kurvenverlauf beider Farbstoffe sehr ähnlich mit einer sehr breiten Absorptionsbande im Sichtbaren, die sich von *ca.* 530 bis gegen 850 nm erstreckt. Diese ist bei **3** etwa symmetrisch, bei **4** dagegen deutlich asymmetrisch. Die NMR-Spektren von **4** und seinem Dimethylester **17** sind im Bereich der aromatischen Protonen bzw. C-Atome sehr ähnlich denen von **3** bzw. **7** mit dem Unterschied, dass die Signale des 6-Methylsalicylsäure-Restes fehlen. Im aliphatischen Bereich sind die Unterschiede dagegen gross. Im ^{13}C -NMR zeigen **4** und **17** eine grössere Anzahl von Signalen (vorwiegend *t*, einige *d* und *q*) recht unterschiedlicher Intensität (im *Exper. Teil* nicht aufgeführt). Auch im ^1H -NMR sind im Bereich von *ca.* 1–3 ppm zahlreiche Signale zu erkennen, wobei ein hohes breites *Singulett* (*ca.* 24 H) bei 0,93 bis 1,44 ppm (**4**, (D_3) Pyridin) bzw. 1,27 ppm (**17**, CDCl_3) stark an Fettsäure-Derivate erinnert. Die Spektren sind am besten zu deuten, wenn man annimmt, dass ein Gemisch von Fettsäureestern der Esmeraldsäure vorliegt, ähnlich wie wir es auch in der Saphensäure-Reihe (S-7-Fraktion) vorgefunden haben [2].

Die alkalische Hydrolyse von **4** gab ein Produktgemisch, das nach der Veresterung mit CH_2N_2 durch Chromatographie in eine grüne und eine farblose Fraktion aufgetrennt wurde. Die grüne Verbindung erwies sich als identisch mit Esmeraldsäure-dimethylester (**9**). Die farblose Fraktion zeigte im GC *ca.* 18 Spitzen recht unterschiedlicher Intensität (*Tab. 3*). Einige der Verbindungen wurden durch GC-MS identifiziert⁴⁾ als Methylester von Tetradecansäure, 12-Methyltetradecansäure, 14-Methylpentadecansäure, Hexadecansäure, 15-Methylhexadecansäure, Heptadecansäure und 16-Methylheptadecansäure. Bei zwei ungesättigten Methylestern $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$ und $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$ konnten die Positionen der Doppelbindungen durch die GC-MS-Analyse nicht eindeutig bestimmt werden. Die Anwesenheit von olefinischen Bindungen gibt sich im ^1H -NMR von **17** durch das Signal bei 5,34 ppm zu erkennen. Diese beiden ungesättigten Verbindungen mit je über 20% Anteil bilden die Hauptkomponenten des Gemisches.



Die Ester mit höchster Retentionszeit (*M* bis *S*, *Tab. 3*) wurden nicht vollständig erfasst, da das verfügbare Gerät Massen über 300 nicht registriert. Auf Grund von t_R und von MS-Fragmenten kann vermutet werden, dass es sich um Methylester der Zusammensetzungen $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$ bis $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$ handelt. Diese Befunde ermöglichen es uns, dem Esmeraldin A die Konstitutionsformeln **4** (**a** bis **i**) zuzuteilen, wobei das Gemisch noch weitere nicht eindeutig identifizierte Komponenten enthält.

⁴⁾ Library Search mit dem *Finigan-Incos Data-System* (NBS-Library mit 25 400 registrierten Substanzen).

Tab. 3. *Methylester der Fettsäuren aus Esmeraldin A: GC-MS und Identifizierung*

<i>Pik</i>	<i>t_R</i> [min]	Anteil [%]	<i>M</i> ⁺	Brutto- formel	identifiziert als Methylester von	FIT ^{a)}
<i>A</i>	7,15	1,2	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	Tetradecansäure	927
<i>B</i>	7,57	0,3	–	–	–	–
<i>C</i>	9,15	0,8	–	–	–	–
<i>D</i>	9,26	2,2	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	12-Methyltetradecansäure	955
<i>E</i>	11,33	8,4	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	14-Methylpentadecansäure	966
<i>F</i>	12,26	10,8	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Hexadecansäure	973
<i>G</i>	13,55	6,5	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	15-Methylhexadecansäure	906
<i>H</i>	14,08	2,8	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Heptadecansäure	967
<i>I</i>	16,35	22,4	294	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	doppelt ungesättigte C ₁₈ -Säure	–
<i>K</i>	16,48	24,9	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	ungesättigte C ₁₈ -Säure	–
<i>L</i>	17,22	8,9	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	16-Methylheptadecansäure	974
<i>M</i>	19,15	0,5	–	–	–	–
<i>N</i>	21,26	0,8	–	–	–	–
<i>O</i>	22,06	4,0	–	–	–	–
<i>P</i>	24,24	0,3	–	–	–	–
<i>Q</i>	26,43	8,5	–	–	–	–
<i>R</i>	28,53	0,8	–	–	–	–
<i>S</i>	31,04	1,9	–	–	–	–

^{a)} Computer-Vergleich der MS mit Spektren der Literatur. Für perfekte Übereinstimmung: FIT = 1000.

Im Gegensatz zu Saphenamycin (**1**) das eine gute antibakterielle Wirkung aufweist, besitzen die Esmeraldine **B** (**3**) und **A** (**4a-i**) keine Wirkung auf Bakterien. Dagegen konnte für Esmeraldin **B** eine dem Saphenamycin vergleichbare Wirkung auf Tumorzellen beobachtet werden. Über die Wirkung von Esmeraldin **B** auf Tumorzellen wird an anderer Stelle berichtet [5].

Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [6]. Alle NMR-Spektren bei 300 MHz (¹H) bzw. 75 MHz (¹³C).

Fermentierung und Herstellung von Rohextrakten. S. [2].

Trennung der Esmeraldine A und B durch Craig-Verteilung. Der aus 200 l Fermentationsbrühe erhaltene Mycel-Extrakt (65 g) wurde mit 750 ml Hexan ausgezogen und der Hexan-Extrakt, der vorwiegend Fette und Öle enthielt, verworfen. Der unlösliche grünbraune teerige Rückstand (28,5 g) wurde darauf an 800 g Kieselgel chromatographiert. Nach Elution der gelben Phenazine [2] mit CHCl₃ und CHCl₃/AcOEt-Gemischen (bis 1:1) konnten die grünen Komponenten erst nach Zugabe von 0,05% HCOOH zum Eluierungsmittel herausgelöst werden. Die grünen Fraktionen wurden durch Waschen mit H₂O von HCOOH befreit und dann zu 9,1 g tief grünbraunem Öl eingedampft. Dieses wurde durch eine *Craig*-Verteilung (CCl₄/MeOH/H₂O 400:300:33, Gläser zu 25 ml pro Phase, 200 Überführungen) weiter aufgetrennt. Aus den Fraktionen 76–115 wurde das rohe Esmeraldin **B** (4,3 g) durch Einengen *i.v.* gewonnen. Das Esmeraldin **A** war in den Fraktionen 20–40 enthalten, die 2,96 g noch stark verunreinigtes Produkt gaben.

Esmeraldin B (= 16-[2-(2-Hydroxy-6-methylbenzoyloxy)ethyl]-18-methyl-4,18-dihydropyrido[2,3-a:1,5-m'n']diphenazin-5,11-dicarbonsäure; **3**). Die weitere Reinigung erfolgte durch Tröpfchen-Gegenstrom-Chromatographie im gleichen Lsgm. wie für die *Craig*-Verteilung in Portionen von maximal 750 mg. Die den grünen Farbstoff enthaltenden Fraktionen wurden mit dem halben Volumen H₂O verdünnt und mit CHCl₃ ausgeschüttelt. Der Extrakt wurde getrocknet (Na₂SO₄) und zu 232 mg nach DC einheitlichem Esmeraldin **B**, einem dunkelgrünen amorphen Pulver, eingedampft. Für die Spektren wurde eine Probe noch 2mal an *Sephadex LH-20* (CHCl₃/MeOH 1:1) chromatographiert. Nach dem Trocknen *i.HV.*: metallisch glänzendes dunkelgrünes Pulver.

Schmp. über 300°. UV/VIS (EtOH): 689 (4320), 400 (10000, sh), 352 (14240), 301 (9320), 256 (65350), 206 (61280); nach Zugabe von 2 Tropfen 2*N* NaOH (Farb-Verschiebung nach Blau): 588 (9400), 400 (sh), 350 (17120), 306 (13820), 258 (59080), 216 (sh); nach Zugabe von HCl: 658 (7120), 400 (sh), 342 (13560), 293 (9410), 258 (59080), 206 (61280). IR (KBr): 3380 (br.), 3300 (br.), 2700–2200 (br.), 1780, 1720, 1690, 1655, 1620, 1605. ¹H-NMR ((D₅)Pyridin): 11,60–9,15 (br. s, 2 H*); 10,50/10,49 (s, 1 H*); 9,30/9,29 (s, 1 H); 8,26/8,25 (d, *J* = 7,1, 1 H); 8,17 (br. d, *J* = 8,6, 1 H); 8,03 (br. d, *J* = 7,6, 1 H); 7,86 (dd, *J* = 8,6/7,1, 1 H); 7,84 (m, 1 H); 7,45 (br. d, *J* = 7,7, 1 H); 7,30 (br. *t*-ähnlich, *J* ≈ 8,2, 1 H); 7,08/7,03 (*t*-ähnlich, *J* ≈ 7,7, 1 H); 7,06 (br. d, *J* = 7,3, 1 H); 6,97 (br. d, *J* = 7,2, 1 H); 6,84 (m, 2 H); 6,73 (*t*-ähnlich, *J* ≈ 7,9, 1 H); 5,50 (q, *J* = 6,9, 1 H); 2,55/2,54 (s, 3 H); 2,13/2,10 (d, *J* = 6,8, 3 H); 1,63/1,62 (d, *J* = 6,9, 3 H). ¹³C-NMR ((D₅)Pyridin): 171,35 (s); 169,73/169,57 (s); 166,56 (s); 159,50/159,05 (s); 142,31 (s); 141,44 (s); 141,08 (s); 140,50/140,34 (s); 139,17/138,98 (s); 138,79 (s); 138,46 (s); 138,14 (s); 136,42/136,23 (s); 134,61/134,58 (s); 134,51 (s); 132,21/132,08 (d); 130,53 (d); 130,50 (s); 129,82 (s); 129,20 (d); 128,10/127,97 (d); 127,96/127,58 (d); 127,36/127,00 (s); 126,38 (d); 125,48 (s); 123,61 (d); 121,95/121,79 (d); 120,91/120,75 (d); 120,59/120,49 (d); 119,49 (d); 115,06 (s); 114,79/114,66 (d); 111,88 (d); 69,51/69,41 (d); 31,70/31,57 (d); 23,80/23,48 (q); 22,35/21,83 (q); 21,63/21,41 (q). FAB-MS: 654 (65), 653 (100, *M* + H), 652 (38), 519 (18), 503 (25), 502 (40), 501 (23), 456 (8), 429 (6), 395 (8), 282 (7), 215 (50), 214 (38), 197 (29), 179 (10). Mol-Gew. ber. für C₃₈H₂₈N₄O₇: 652,64.

Esmeraldin A (= 16-[1-(Alkylcarbonyloxy)ethyl]-18-methyl-4,18-dihydropyrido[2,3-a:1,5-m'n']diphenazin-5,11-dicarbonsäure; **4**). Die *Esmeraldin-A*-Fraktionen der *Craig*-Verteilung (2,96 g) wurden an 200 g Kieselgel chromatographiert ('Flash'-Methode). Nach der Abtrennung von relativ unpolaren Fraktionen mit Hexan/Aceton 1:1 wurde auf Zusatz von 0,05% HCOOH zum Lsgm. **4** eluiert. Die grünen Fraktionen wurden mit CHCl₃ verdünnt und das HCOOH durch Ausschütteln mit H₂O entfernt. Nach dem Trocknen und Eindampfen *i.v.* wurden Proben von ca. 100 mg des Rückstandes an je 10 g Kieselgel, das mit Oxalsäure imprägniert war, mit CHCl₃/AcOEt 15:1 chromatographiert. Die nach DC einheitlichen grünen Fraktionen wurden mehrmals mit H₂O gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄) und eingedampft zu 31,7 mg dunkelgrünes Pulver, das sich zwischen 121° und 155° langsam zersetzt. UV/VIS (EtOH): 608 (E_{1%}^{1cm} 50), 400 (sh), 355 (175), 256 (790), 200 (635); mit NaOH: 591 (100), 400 (sh), 360 (195), 257 (810); mit HCl: 642 (65), 400 (sh), 345 (155), 257 (705), 201 (600). IR (KBr): 3400 (br.), 3260, 2700–2200 (br.), 1740, 1680, 1620, 1605, 1590. ¹H-NMR ((D₅)Pyridin): 16,00–13,40 (br. 1 H*); 11,0–9,0 (br. 1 H*); 10,49 (s, 1 H*); 9,32/9,31 (s, 1 H); 8,16 (br. d, *J* = 8,4, 1 H); 8,09 (br. d, *J* = 6,5, 1 H); 8,03 (br. d, *J* = 7,9, 1 H); 7,87 (*t*-ähnlich, *J* ≈ 7,8, 1 H); 7,57 (m, 1 H); 7,45 (br. d, *J* = 7,4, 1 H); 7,07 (*t*-ähnlich, *J* ≈ 7,4, 1 H); 6,92 (*t*-ähnlich, *J* ≈ 8,3, 1 H); 6,84 (br. *t*-ähnlich, *J* ≈ 7,9, 1 H); 6,73 (br. d, *J* = 7,3, 1 H); 5,4–5,15 (br. m, 3 H); 2,91 (m, 0,75 H); 2,60 (m, 2,25 H); 2,09 (m, 3 H); 1,99/1,96 (d, *J* = 6,6, 3 H); 1,79 (m, ca. 3 H); 1,65/1,61 (d, *J* = 6,9, 3 H); 1,44–0,93 (br. s, ca. 24 H); 0,88–0,83 (m, 3,75 H).

Esmeraldin-B-dimethylester (**7**). In 25 ml CHCl₃ gelöstes **3** (64,7 mg) wurde solange mit CH₂N₂ in Et₂O versetzt, bis die Farbe von grasgrün nach blaugrün umschlug. Nach dem Eindampfen *i.v.* wurde der Rückstand (67,3 mg) an 35 g Kieselgel mit Hexan/Aceton 3:1 chromatographiert. Die blauen, nach DC einheitlichen Fraktionen gaben nach dem Eindampfen 61 mg blaugrünes Pulver. Nach einer weiteren Chromatographie an *Sephadex LH-20* (CHCl₃/MeOH 1:1) konnte das Präparat aus Aceton/Hexan in sehr feinen blaugrünen Kriställchen erhalten werden. Schmp. 176–180°. UV/VIS (EtOH): 581 (9950), 404 (10400), 332 (15190), 305 (14050), 258 (69900), 205 (66410); mit NaOH sichtbar Max. 563, mit HCl 606. IR (CHCl₃): 3320, 1730, 1690, 1660, 1625, 1610. ¹H-NMR (CDCl₃): *Tab. 1*; NOE: Einstrahlung bei 8,46/8,45 ppm; NOE bei 7,18 ppm. ¹³C-NMR (CDCl₃): *Tab. 2*. FAB-MS: 682 (25), 681 (68), 680 (100, *M*⁺), 546 (13), 531 (21), 530 (20), 529 (36), 154 (34), 138 (10), 137 (18), 136 (31), 135 (21), 107 (12), 90 (11), 89 (16), 77 (20), 39 (11). Anal. ber. für C₄₀H₃₂N₄O₇ (680,72): C 70,58, H 4,74, N 8,23; gef.: C 70,44, H 4,89, N 7,96.

O-Acetylesmeraldin-B-dimethylester (**14**). Die Acetylierung von **31 mg 7** in 16 ml Pyridin/Ac₂O 1:1 erfolgte bei RT. während 1,5 h. Die Farbe der Lsg. blieb unverändert blaugrün. Die Lsg. wurde *i.v.* eingedampft und das Rohprodukt (34 mg) an 35 g Kieselgel mit Hexan/Aceton 2:1 chromatographiert und darauf das blaugüne Pulver an *Sephadex LH-20* (2 × 71 cm, CHCl₃/MeOH 1:1) weiter gereinigt. Das gereinigte Pulver (31 mg) konnte nicht umkristallisiert werden. Schmp. 146–150°. UV/VIS (EtOH): 583 (8490), 405 (8740), 340 (12770), 303 (10090), 259 (67320); mit NaOH: 570 (9660), 405 (9580), 334 (14450), 303 (13900), 259 (63630); mit HCl: 590 (7070), 405 (9400), 333 (12960), 305 (11780), 257 (61900). IR (CHCl₃): 3320 (br.), 1765, 1725, 1685, 1625, 1605. ¹H-NMR (CDCl₃): 9,51 (s, 1 H); 8,47 (s, 1 H); 8,21 (dd, *J* = 8,6/1,3, 1 H); 7,93 (br. d, *J* = 7,1, 1 H); 7,75 (dd, *J* = 8,6/7,1, 1 H); 7,59 (dd, *J* = 8,2/1,3, 1 H); 7,55/7,53 (q, *J* = 6,5, 1 H); 7,35/7,34 (*t*-ähnlich, *J* ≈ 7,8, 1 H); 7,20/7,18 (br. d, *J* = 7,4, 1 H); 7,13 (br. d, *J* = 7,8, 1 H); 6,99/6,97 (br. d, *J* = 7,7, 1 H); 6,97/6,96 (*t*-ähnlich, *J* ≈ 7,6, 1 H); 6,90/6,87 (dd, *J* = 7,7/1,3, 1 H); 6,77/6,76 (*t*-ähnlich, *J* ≈ 8,0, 1 H); 6,52/6,51 (dd, *J* = 7,6/1,3, 1 H); 5,38/5,35 (q, *J* = 7,0, 1 H); 4,04 (s, 3 H); 3,94 (s, 3 H); 2,42/2,40 (s, 3 H); 2,01/1,98 (s, 3 H); 1,93/1,92 (d, *J* = 6,5, 3 H); 1,48/1,44 (d, *J* = 7,0, 3 H). Spinentkopplungsexperimente zeigten folgende Nachbarschaftsbeziehungen an: 1,93/1,92 (d) –

7,55/7,53 (*q*); 1,48/1,44 (*d*) – 5,38/5,35 (*q*); 6,52/6,51 (*dd*) – 6,97/6,96 (*t*) – 6,90/6,87 (*dd*); 6,77/6,76 (*t*) – 7,59 (*dd*) – 7,20/7,18 (*d*); 7,75 (*dd*) – 8,21 (*dd*) – 7,93 (*d*). ¹³C-NMR (CDCl₃): 169,25 (*s*); 168,28 (*s*); 166,79 (*s*); 165,85/165,72 (*s*); 148,27 (*s*); 142,38 (*s*); 141,46 (*br. s*); 140,75/140,68 (*s*); 140,10 (*s*); 139,55 (*s*); 139,42 (*s*); 139,16 (*s*); 138,12/137,96 (*s*); 136,83 (*br. s*); 133,49/133,40 (*s*); 130,58 (*d*); 129,93 (*d*); 129,55 (*s*); 129,38 (*br. s*); 129,25 (*s*); 129,00 (*d*); 128,22 (*d*); 127,54/127,44 (*s*); 127,15 (*d*); 127,02/126,92 (*s*); 126,79 (*d*); 126,31 (*d*); 125,89/125,76 (*d*); 125,37/125,24 (*d*); 121,16/120,97 (*d*); 120,55/120,45 (*d*); 119,28/119,15 (*d*); 111,51 (*d*); 69,51/69,35 (*d*); 52,74 (*q*); 52,06 (*q*); 31,28/31,09 (*d*); 23,48 (*br. q*); 22,12 (*q*); 20,79 (*br. q*); 20,18/19,98 (*q*). FAB-MS: 723 (79, M⁺ + H), 722 (100), 707 (17), 694 (13), 530 (15), 529 (28), 453 (10), 155 (14), 154 (70), 138 (18), 137 (35), 136 (62), 135 (41), 107 (22), 91 (15), 90 (18), 89 (30), 79 (10), 78 (15), 77 (33), 65 (12), 63 (16), 55 (10), 51 (19), 50 (10), 43 (15), 41 (10), 39 (23), 31 (10). Mol-Gew. ber. für C₄₂H₃₄N₄O₈: 722,76.

N,O-Diacetylesmeraldin B (15). Unter N₂ wurden 30 mg **3** in 10 ml Pyridin/Ac₂O 1:1 24 h bei RT. acetyliert. Nach ca. 4 h begann die Farbe von blaugrün nach dunkelrot umzuschlagen. Nach 6 h wurde die Lsg. mit 20 ml CHCl₃ verdünnt und 3mal mit ges. wässr. CuSO₄, einmal mit verd. HCl und 4mal mit H₂O gewaschen. Nach dem Eindampfen *i.v.* wurde der Rückstand mit Hexan/Aceton 1:1 an 8,5 g Oxalsäure-Kieselgel im Dunkeln chromatographiert. Die roten Fraktionen wurden vereinigt, 3mal mit H₂O gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄) und *i.v.* zu 23,3 mg rotem Pulver eingedampft. Nach einer weiteren Reinigung an *Sephadex LH-20* (CHCl₃/MeOH 1:1, Ausschluss von Licht) wurden 19,5 mg **15** als weinrotes Pulver erhalten. Schmp. über 300°. UV/VIS (EtOH): 495 (8290), 305 (29220), 254 (46550); mit NaOH vis. Max. bei 490, mit HCl bei 531. IR (KBr): 3430 (*br.*), 2800–2000 (*br.*), 1775, 1730, 1690, 1625, 1610, 1590. ¹H-NMR (CDCl₃): 16,00–14,00 (*br. 1 H**); 9,20/9,19 (*s, 1 H*); 8,21 (*dd, J = 8,6/1,2, 1 H*); 8,06 (*br. d, J = 6,9, 1 H*); 7,96/7,93 (*dd, J = 7,4/1,1, 1 H*); 7,88 (*br. d, J = 6,8, 1 H*); 7,60 (*dd, J = 8,2/2,1, 1 H*); 7,55/7,52 (*q, J = 6,5, 1 H*); 7,55 (*br., 1 H*); 7,35 (*br. m, 4 H*); 7,15 (*br. d, J = 7,6, 1 H*); 7,00 (*dd, J = 7,8/5,9, 1 H*); 5,56/5,52 (*q, J = 7,0, 1 H*); 2,43 (*s, 3 H*); 2,34/2,33 (*s, 3 H*); 2,09/2,06 (*s, 3 H*); 1,97/1,96 (*d, J = 6,5, 3 H*); 1,59/1,53 (*d, J = 7,0, 3 H*). FAB-MS: 738 (25), 737 (49, M⁺ + H), 736 (11), 695 (20), 694 (26), 543 (10), 501 (12), 397 (12), 396 (15), 395 (16), 394 (11), 308 (11), 307 (41), 289 (29), 177 (17), 176 (12), 155 (68), 154 (98), 139 (51), 138 (72), 137 (87), 136 (100), 135 (94). Mol-Gew. ber. für C₄₂H₃₂N₄O₉: 736,74.

N,O-Diacetylesmeraldin-B-dimethylester (16). Das in 6 ml CHCl₃ gelöste **15** (27 mg) wurde solange mit CH₂N₂ in Et₂O versetzt, bis die Farbe nach Orange umschlug. Das nach dem Eindampfen *i.v.* gewonnene Produkt wurde an 15 g Kieselgel mit Hexan/Aceton 2:1 chromatographiert ('Flash'-Methode) und die vereinigten orangen Fraktionen nach dem Eindampfen an *Sephadex LH-20* (2 × 71 cm, CHCl₃/MeOH 1:1 im Dunkeln) weiter gereinigt. Nach dem Eindampfen der nach DC einheitlichen Fraktionen wurden 18 mg oranges Pulver erhalten, das sich ab ca. 180° langsam zersetzte. UV/VIS (EtOH): 491 (9390), 306 (32560), 253 (44960); mit NaOH vis. Max. bei 481, mit HCl bei 500. IR (CHCl₃): kein OH oder NH, 1765, 1730, 1680, 1620, 1610, 1595. ¹H-NMR (CDCl₃): 8,44 (*s, 1 H*); 8,27 (*dd, J = 8,7/1,3, 1 H*); 7,99 (*br. d, J = 6,6, 1 H*); 7,84/7,81 (*dd, J = 7,1/1,5, 1 H*); 7,71 (*br. d, J = 6,6, 1 H*); 7,56 (*m, 2 H*); 7,34 (*br. m, 5 H*); 7,13 (*br. d, J = 7,7, 1 H*); 6,99 (*t*-ähnlich, *J* ≈ 7,8, 1 H); 5,55/5,52 (*q, J = 7,0, 1 H*); 4,07 (*s, 3 H*); 3,98 (*s, 3 H*); 2,42/2,41 (*s, 3 H*); 2,26/2,25 (*s, 3 H*); 2,02/1,97 (*s, 3 H*); 1,94/1,93 (*d, J = 6,5, 1 H*); 1,55/1,49 (*d, J = 7,0, 3 H*). FAB-MS: 766 (23), 765 (44), 764 (17), 724 (10), 723 (29), 722 (44), 707 (11), 693 (10), 572 (12), 571 (22), 530 (15), 529 (33), 155 (20), 154 (100), 138 (27), 137 (52), 136 (93), 135 (76), 120 (13), 107 (33), 106 (10), 105 (11), 91 (20), 90 (26), 89 (41), 79 (13), 78 (19), 77 (43), 65 (17), 63 (21), 51 (25), 43 (28), 31 (12). Mol-Gew. ber. für C₄₄H₃₆N₄O₉: 764,80.

Hydrogenolyse von 7. In 15 ml MeOH/AcOEt 1:1 gelöstes **7** (36,4 mg) wurde nach Zugabe von 15 mg 10% Pd/C unter H₂ 50 min bei RT. gerührt. Die Lsg. wurde vom Katalysator abfiltriert und durch eine kleine Säule aus Kieselgel filtriert. Das Filtrat gab nach dem Eindampfen *i.v.* 22,8 mg Rohprodukt, das gemäss DC (Kieselgel, Hexan/Aceton 3:1) aus einem roten Hauptprodukt (*R_f* 0,32) und einem blau-violetten Nebenprodukt (*R_f* 0,30) bestand. Durch mehrfache Chromatographie an Kieselgel konnten die Produkte in früheren bzw. späteren Fraktionen angereichert werden. Völlig reine Verbindungen erhielten wir erst nach einer Chromatographie an *Sephadex LH-20* (2 × 71 cm, CHCl₃/MeOH 1:1), 11,5 mg **6** und 4,2 mg **10**.

Esmeraldsäure-dimethylester (6). Die Hauptkomponente kristallisierte aus Aceton/Hexan in dunkelroten sehr feinen Nadelchen. Schmp. 254,5–255°. UV/VIS (EtOH): 561 (9990), 409 (10330), 334 (12870), 301 (13380), 261 (67280); mit NaOH vis. Max. bei 556, mit HCl bei 581. IR (CHCl₃): 3310 (*br.*), 1720, 1685 (*sh*), 1620, 1605, 1590. ¹H-NMR (CDCl₃): *Tab. 1*. ¹³C-NMR (CDCl₃): *Tab. 2*. EI-MS: 530 (37, M⁺), 529 (100), 515 (20), 514 (57), 501 (5), 500 (4), 483 (7), 470 (4), 456 (8), 455 (18), 440 (4), 382 (3), 381 (4), 265 (9), 249 (4), 248 (8), 241 (5). Anal. ber. für C₃₂H₂₆N₄O₄ (530,57): C 72,44, H 4,94, N 10,56; gef.: C 72,44, H 4,99, N 10,36.

O-Methylesmeraldsäure-methylester (10). Das zweite Hydrogenolyse-Produkt wurde nach der Chromatographie an *Sephadex LH-20* als blau-violettes Pulver erhalten, das nicht kristallisiert werden konnte. Schmp. 237,5–240° (*Zers.*). UV/VIS (EtOH): 574 (9940), 406 (10010), 340 (12880), 302 (11810), 259 (68800); mit NaOH: vis. Max. bei 566, mit HCl bei 605. IR (CHCl₃): 3320 (*br.*), 1725, 1685, 1620, 1605, 1590. ¹H-NMR (CDCl₃): 9,50 (*s*,

1 H); 8,44 (s, 1 H); 8,17 (dd, $J = 8,6/1,4$, 1 H); 7,92 (dd, $J = 7,0/1,4$, 1 H); 7,79 (dd, $J = 8,6/7,0$, 1 H); 7,58 (dd, $J = 8,2/1,3$, 1 H); 7,18 (dd, $J = 7,8/1,3$, 1 H); 6,96 (t-ähnlich, $J \approx 7,7$, 1 H); 6,86 (dd, $J = 7,7/1,2$, 1 H); 6,77 (t-ähnlich, $J \approx 8,0$, 1 H); 6,52 (dd, $J = 7,7/1,2$, 1 H); 5,87 (q, $J = 6,4$, 1 H); 5,31 (q, $J = 6,9$, 1 H); 4,05 (s, 3 H); 3,94 (s, 3 H); 3,42 (s, 3 H); 1,69 (d, $J = 6,4$, 3 H); 1,46 (d, $J = 6,9$, 3 H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 169,24 (s); 166,83 (s); 142,39 (s); 141,89 (s); 141,71 (s); 140,98 (s); 140,59 (s); 138,94 (s); 136,53 (s); 133,62 (s); 129,86 (s); 129,44/129,21 (d); 129,12 (s, 2 C); 128,97 (s); 128,36 (d); 127,50 (s); 127,16 (s); 126,64 (d); 126,29/126,16 (d); 125,72 (d); 124,93 (d); 120,94 (d); 120,44 (d); 119,33 (d); 111,48 (d); 74,53/74,01 (d); 57,13/57,03 (q); 56,76 (q); 52,08 (q); 31,25/31,15 (d); 23,58/23,53 (q); 23,45/23,11 (q). EI-MS: 561 (38), 560 (100, M^+), 546 (37), 545 (99), 530 (8), 529 (7), 528 (11), 514 (10), 513 (26), 501 (3), 500 (6), 486 (6), 485 (16), 470 (6), 455 (5), 454 (5).

Alkalische Hydrolyse von 3. Eine Suspension von 32 mg **3** in 20 ml 2N NaOH in MeOH wurde 4 h unter Rückfluss erhitzt, wobei nach ca. 10 min die grüne Suspension in eine blaue Lsg. überging. Das abgekühlte Gemisch wurde mit 6N HCl angesäuert, bis die Lsg. wieder grün wurde (pH ca. 3). Nach dem Extrahieren mit CHCl_3 (3mal, je 10 ml) zeigte ein DC ($\text{CHCl}_3/\text{Aceton}/\text{MeOH}/\text{AcOEt}$ 10:10:5:2) ein grünes Hauptprodukt (Esmeraldsäure **8**, R_f 0,28) und ein farbloses Produkt (R_f 0,49), das im UV stark fluoreszierte und sich mit I_2 -Dampf braun färbte. Die CHCl_3 -Lsg. wurde darauf mit CH_2N_2 in Et_2O bis zum Farbumschlag nach Blaugrün versetzt und nach dem Eindampfen i.v. an 30 g Kieselgel chromatographiert ('Flash'-Methode, Hexan/Aceton 3:1).

Esmeraldsäure-dimethylester (9). Die blaugrünen Fraktionen gaben 9,5 mg blaues Pulver, das an *Sephadex LH-20* ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1) weiter gereinigt wurde. Schmp. 259–262°. UV/VIS (EtOH): 570 (9280), 407 (9610), 336 (12 170), 300 (12 000), 260 (59 550); mit NaOH: vis. Max. bei 563, mit HCl bei 595 nm. IR (CHCl_3): 3560–3200 (br.), 1730, 1685, 1620, 1605, 1590. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Tab. I. EI-MS: 547 (35), 546 (100, M^+), 532 (23), 531 (65), 530 (20), 529 (10), 528 (20), 516 (7), 515 (18), 513 (22), 499 (15), 487 (18), 486 (48), 472 (15), 471 (39), 456 (12), 455 (14), 454 (12), 453 (23), 439 (10), 426 (12), 411 (19), 395 (15), 273 (17), 266 (9), 265 (6), 44 (6), 31 (6), 18 (22).

6-Methylsalicylsäure-methylester. Die unmittelbar vor den grünen Fraktionen eluierten farblosen Anteile gaben beim Eindampfen 4 mg blasse gelbliches Öl, das bei 60°/0,1 Torr destilliert wurde. Die Spektren (IR, $^1\text{H-NMR}$, MS) und das DC stimmen mit denen von synthetischem 6-Methylsalicylsäure-methylester überein [7].

Saure Hydrolyse von 7. In 25 ml 3N HCl/MeOH 1:1 gelöstes **7** (36 mg) wurde 2,5 h bei 100° gerührt. Das Gemisch wurde mit 20 ml H_2O verdünnt und 3mal mit je 15 ml CHCl_3 ausgeschüttelt. Der mit H_2O gewaschene und getrocknete (Na_2SO_4) Extrakt gab beim Eindampfen einen Rückstand, der an 14 g Kieselgel mit Hexan/Aceton 3:1 in 6,4 mg Edukt, 19,9 ml Monomethylester **13** und 3,9 mg Nebenprodukt aufgetrennt wurde. Das letztere stimmte nach DC und $^1\text{H-NMR}$ mit dem Nebenprodukt **10** aus der Hydrogenolyse überein.

Esmeraldin-monomethylester (13). Nach einer weiteren Chromatographie an *Sephadex LH-20* ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1) wurden 14,5 mg **13** als grünes Pulver erhalten, das bis 300° nicht schmolz. UV/VIS (EtOH): 561 (5980), 407 (6240), 333 (8890), 303 (8290), 262 (43 250). IR (CHCl_3): 3310 (br.), 2800–2400 (br.), 1720, 1690, 1660, 1620, 1605, 1595. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 15,70 (br. s, 1 H, austauschbar); 11,39/11,36 (s, 1 H, austauschbar); 9,59/9,58 (s, 1 H), 9,17 (s, 1 H); 8,15 (d, $J = 8,6/1,2$, 1 H); 7,98/7,82 (dd, $J = 7,2/1,2$, 1 H); 7,85 (br. dd, $J = 8,6/7,2$, 1 H); 7,64 (br. d, $J = 8,1$, 1 H); 7,57/7,56 (q, $J = 6,6$, 1 H); 7,28/7,25 (t-ähnlich, $J \approx 8,2$, 1 H); 7,18 (br. d, $J = 7,6$, 1 H); 7,01/6,97 (t-ähnlich, $J \approx 7,7$, 1 H); 6,82 (m, 3 H); 6,71 (br. t-ähnlich, $J \approx 7,9$, 1 H); 6,56/6,53 (dd, $J = 7,3/1,1$, 1 H); 5,32/5,24 (q, $J = 7,0$, 1 H); 3,95 (s, 3 H); 2,60 (s, 3 H); 2,04/2,00 (d, $J = 6,6$, 3 H); 1,46/1,36 (d, $J = 7,0$, 3 H). FAB-MS: 667 (16,7), 666 (18,6, M^+), 395 (8,4), 307 (12,8), 155 (21,7), 154 (100).

Esmeraldin-A-dimethylester (17). Aus 71,5 mg **4** in 30 ml CHCl_3 wurde wie üblich mit CH_2N_2 der Methylester hergestellt (Farbumschlag von gras-grün nach blau-grün). Nach dem Chromatographieren an 35 g Kieselgel (Hexan/Aceton 5:1) wurden die blau-grünen Fraktionen eingedampft und an *Sephadex LH-20* (2 × 71 cm, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1) eine letzte Verunreinigung abgetrennt. Der reine Ester wurde aus CHCl_3 mit eiskaltem Hexan ausgefällt zu 38 mg (nach Trocknen i.HV.) blau-grünem, gemäss DC einheitlichem Pulver. Schmp. 65–73°. UV/VIS (EtOH): 578 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 122), 405 (123), 335 (176), 259 (845); mit NaOH vis. Max. bei 573, mit HCl bei 594. IR (KBr): 3340, 3320, 1790, 1690, 1620, 1605, 1590. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 9,50 (s, 1 H); 8,45 (s, 1 H); 8,19 (dd, $J = 8,6/1,2$, 1 H); 7,85 (br. d, $J = 7$, 1 H); 7,75 (dd, $J = 8,6/7,0$, 1 H); 7,58 (br. dd, $J = 8,0/1,1$, 1 H); 7,29/7,26 (q, $J = 6,5$, 1 H); 7,18/7,17 (br. d, $J = 7,5$, 1 H); 6,96/6,94 (t-ähnlich, $J \approx 7,6$, 1 H); 6,89/6,86 (br. dd, $J = 7,3/1,2$, 1 H); 6,77/6,76 (t-ähnlich, $J \approx 8,0$, 1 H); 6,52 (br. dd, $J = 7,6/1,2$, 1 H); 5,34 (m, ca. 2,3 H); 4,04 (s, 3 H); 3,94 (s, 3 H); 2,78 (m, 0,4 H); 2,43 (m, ca. 2 H); 2,02 (m, 2,4 H); 1,81/1,80 (d, $J = 6,5$, 3 H); 1,67 (m, ca. 3,5 H); 1,46/1,43 (d, $J = 7,0$, 3 H); 1,31–1,24 (br. s, ca. 22 H); 0,89–0,82 (m, ca. 3,6 H).

Hydrolyse von 4. Eine Lsg. von 28 mg **4** in 20 ml 2N NaOH in MeOH wurde 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Ansäuern mit 6N HCl (Farbumschlag von blau-grün nach grün) wurde mit 10 ml H_2O verdünnt und 3mal mit CHCl_3 ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen (Na_2SO_4) und Eindampfen i.v. wurde das Gemisch in 10 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ mit CH_2N_2 in Et_2O verestert und durch Chromatographie an Kieselgel (Hexan/Aceton 3:1, 'Flash'-Me-

thode) getrennt. Die blau-grünen Fraktionen gaben bei Eindampfen 9,7 mg grünes Pulver, das nach einer weiteren Reinigung an *Sephadex LH-20* in allen Eigenschaften (DC, UV/VIS, IR, $^1\text{H-NMR}$) dem **8** aus Esmeraldin **B** entsprach.

Gemisch von Fettsäure-Methylestern. Die vor **8** eluierten farblosen Fraktionen gaben 14 mg Öl, das nochmals an 3 g Kieselgel (Hexan/Aceton 3:1) chromatographiert wurde. Das Ester-Gemisch wurde durch GC-MS untersucht, Säule *SE 542*, 17 m, He (2 ml/min), Temp. 150–260°, Temp.-Programm 5°/min. Die MS wurden mittels eines Computerprogramms mit Spektren der Literatur verglichen. Die Ergebnisse sind in der *Tab. 3* zusammengestellt.

Die $^1\text{H-}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ verdanken wir Frl. *B. Brandenburg*, das NOE-Experiment Herrn Dr. *B. Jaun*, die MS Frau *L. Golgowski* und Herrn Dr. *J. Meili*, die GC-MS-Analyse Herrn *U. Schäfer* und die Elementaranalysen Herrn *D. Manser*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. Keller-Schierlein, L. Hagmann, H. Zähler, W. Huhn, *Helv. Chim. Acta* **1978**, *71*, 1528.
- [2] A. Geiger, W. Keller-Schierlein, M. Brandl, H. Zähler, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, im Druck; U. Bahnmüller, W. Keller-Schierlein, M. Brandl, H. Zähler, *ibid.* **1988**, *41*, im Druck.
- [3] M. Kitahara, H. Nakamura, Y. Matsuda, M. Hamada, H. Nagawa, K. Maeda, H. Umezawa, Y. Iitake, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1412.
- [4] K. Asano, T. Takahashi, F. Tomita, I. Kawamoto, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 619; I. Takahashi, M. Morimoto, F. Tomita, *ibid.* **1986**, *39*, 624.
- [5] H. Diddens, M. Brandl, H. Zähler, in Vorbereitung.
- [6] L. Bassi, B. Joos, P. Gassmann, H. P. Kaiser, H. Leuenberger, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 92.
- [7] F. M. Hauser, S. A. Pognay, *Synthesis* **1980**, *12*, 814.