

ÜBER DIE ANTIBIOTISCH WIRKSAMEN SUBSTANZEN DER TULPE (TULIPA GESNERIANA)

R.Tschesche, F.-J.Kämmerer und G.Wulff

Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn

und F.Schönbeck

Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn

(Received in Germany 18 October 1967)

Bei Untersuchungen über die Blüteninfektion hatte F.Schönbeck gefunden, daß die Tulpe (*Tulipa gesneriana*) antibiotisch wirksame Substanzen enthält, die auch starke fungizide Wirkung ausüben. In der Narbe liegen sie besonders angereichert vor; ihre Konzentration nimmt dann über Fruchtknoten, Stengel, Blätter und Zwiebel zu den Wurzeln hin stark ab.¹⁾ Während unserer Arbeiten zur Klärung der Natur dieser Wirkstoffe erschienen zwei Mitteilungen niederländischer Arbeitsgruppen über die Isolierung von α -Methylen-butyrolacton als fungizider Komponente der Zwiebeln der Tulpe²⁾ und ferner über ein Glucosid unbekannter Struktur, das bei der Hydrolyse α -Methylen-butyrolacton und D-Glucose ergibt.³⁾ Auf dieses geht möglicherweise die allergische Wirkung der Zwiebeln zurück.³⁾ Wir sehen uns daher genötigt, unsere Ergebnisse ebenfalls mitzuteilen. Danach handelt es sich bei den antibiotisch wirksamen Substanzen der Tulpe um einen neuartigen Wirkstofftyp, der als 1-Acylglucosid von α, β -ungesättigten γ -Hydroxy-carbonsäuren angesehen werden muß und der bei der Hydrolyse ungesättigte Lactone liefert.

Wir haben uns mit den Wirkstoffen aus Stempeln sowie aus Blättern und Stengeln beschäftigt. Die Pflanzenteile wurden mit 80% Methanol extrahiert und der Extrakt durch Papierchromatographie im Lösungsmittelsystem Essigester/Pyridin/Wasser (3,6 : 1 : 1,15) untersucht. Dabei zeigten die Chromatogramme nach Auslegen auf Agarplatten mit *Bacillus subtilis* drei aktive Zonen, entsprechend drei Substanzen, die wir mit Tuliposid A, B und C bezeichnet haben (R_G -Werte auf Glucose bezogen 3,12; 1,49 und 1,00); Tuliposid C war nur in geringer Menge vorhanden.

Durch Säulenchromatographie an Cellulose mit dem obengenannten Lösungsmittelsystem ließen sich Tuliposid A und B chromatographisch rein in hoher Ausbeute

erhalten. Man erhielt dabei bezogen auf Trockensubstanz aus den Blättern und Stengeln 5,6% Tuliposid A und 2,0% Tuliposid B und aus den Stempeln 19,5% Tuliposid A und 12,8% Tuliposid B. Beide konnten nicht kristallin erhalten werden, sie zeigten eine Drehung von $[\alpha]_D^{20} = +64^\circ$ (Wasser) (A) und $[\alpha]_D^{20} = +56^\circ$ (MeOH) (B). Im Reihenverdünnungstest gegenüber *Bacillus subtilis* zeigte A vollständige Wachstumshemmung bei 100 γ /ml und B bei 40 γ /ml. Die Aktivität nahm selbst bei -20° im Laufe der Zeit stark ab, ohne daß sich die R_F -Werte oder die Spektren der Substanzen wesentlich änderten. Im UV zeigten Tuliposid A und B eine Schulter bei 207 m μ (A) bzw. 212 m μ (B) mit $\epsilon = 17000$. Das IR-Spektrum wies auf eine α, β -ungesättigte Carbonylgruppe hin (1708, 1628 cm^{-1}); beide Substanzen reagierten nicht sauer. Bei der Acetylierung lieferte A laut Protonenresonanz ein Pentaacetat und B ein Hexaacetat.

Bei der sauren und basischen Hydrolyse verhielten sich aktives und inaktives Tuliposid A bzw. B ebenfalls gleich. A lieferte bei der sauren Hydrolyse als Spaltstücke α -Methylen-butyrolacton (I) und D-Glucose. Die Struktur des α -Methylen-butyrolactons ergibt sich eindeutig aus dem IR- (1760, 1662 cm^{-1}) dem NMR- (Tabelle 1) und dem Massenspektrum mit Hochauflösung⁵⁾ ($M^+ = 98.0368$, Ber. für $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$ 98.0368). Das NMR-Spektrum zeigt die Protonen der Methylen-Gruppe bei 3,76 τ und 4,28 τ jeweils als Triplett mit einer Kopplung durch die Protonen vom β -C von 3 cps. Die beiden H am β -C werden durch die Protonen von γ -C zu einem Triplett mit $J = 7$ cps aufgespalten. Jeder Triplettpeak erscheint infolge Aufspaltung durch die Protonen der Methylen-Gruppe nochmals als Triplett mit $J = 3$ cps. Die beiden H vom γ -C bilden ein einfaches Triplett mit einer Kopplung von 7 cps.

Die saure Spaltung von Tuliposid B lieferte D-Glucose und α -Methylen- β -hydroxy-butyrolacton (II). Letzteres wurde wieder durch physikalische Methoden in der Struktur geklärt. Die Protonenresonanz zeigte ein ähnliches aber gegenüber I charakteristisch verändertes Bild. Die Methylenprotonen erscheinen in der gleichen Lage aber infolge nur eines benachbarten H als Dublett. Die γ -Protonen zeigen in der Aufspaltung ebenfalls eine Veränderung. Sie sind durch die Substitution am Nachbaratom β -C ungleichwertig geworden und erscheinen als AB-Spektrum ($J_{AB} = 9,5$ cps, $\Delta\delta_{AB} = 19$ cps), das durch das β -H zusätzlich jeweils

Tabelle 1

Protonenresonanzspektren⁴⁾ der isolierten Verbindungen [τ (J in cps)]

	=CH ₂	H am β -C	2H am γ -C
Lacton I	3,76(T;3); 4,28(T;3)	2H bei 6,98; J ₁ (T;7);J ₂ (T;3)	5,59(T;7)
Lacton II	3,50(D;2); 3,92(D;2)	1H bei 5,02(M)	$\tau_A=5,48; J_{AB}=9,5; J_{AX}=6,5;$ $\tau_B=5,78; J_{BX}=4$
Säure III*	3,77(S); 4,28(D;1,3)	2H bei 7,50(T;6,5)	6,33(T;6,5)
Säure IV*	3,50(D;0,5); 3,91(D;1,5)	1H ~ 5,27(M)	$\tau_A=6,13; J_{AB}=11,5; J_{AX}=4;$ $\tau_B=6,31; J_{BX}=6,5$
Glucosid V*	3,72(S); 4,23(D;1)	2H 7,49(T;6,5)	6,32(T;6,5)
Acetat VI	3,68(S); 4,29(D;1,3)	2H 7,34(T;6,5)	5,78(T;6,5)
Glucosid VII*	3,44(D;0,5); 3,87(D;1,3)	1H ~ 5,29(M)	$\tau_A=6,11; J_{AB}=11,5; J_{AX}=4;$ $\tau_B=6,29; J_{BX}=6,5$

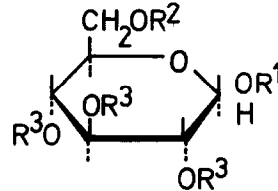
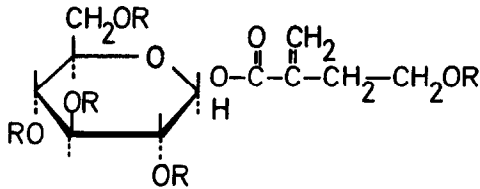
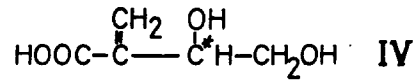
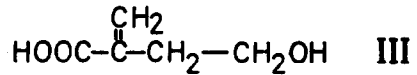
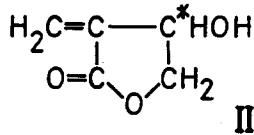
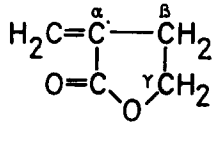
* Gemessen in D₂O mit Acetonitril als internem Standard.

zu Dubletts mit der Kopplung $J = 6,5$ cps (A-Teil) und $J = 4$ cps (B-Teil) aufgespalten wird. Am β -C tritt nur ein Proton auf, das durch die Substitution mit OH gegenüber I stark zu niedrigerem Feld verschoben ist. Es zeigt infolge vielfältiger Kopplung ($J = 3; 4$ und $6,5$ cps) ein komplexes Multiplett.

Bei der alkalischen Spaltung von Tuliposid A mit $n/2$ Ba(OH)₂ bei Raumtemperatur erhält man D-Glucose und α -Methylen- γ -hydroxy-buttersäure (III) vom Schmp. 65°. Die Struktur dieser Säure wurde wiederum durch IR-, Massen- und NMR-Spektrum ermittelt. Die Protonenresonanz zeigte bei einem infolge der freien Drehbarkeit einfacheren Kopplungsschema sehr große Ähnlichkeit mit I.

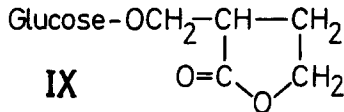
In entsprechender Weise erhielt man aus Tuliposid B durch alkalische Spaltung D-Glucose und α -Methylen- β, γ -dihydroxy-buttersäure (IV) vom Schmp. 114-115°, welche optisch aktiv ist [$\alpha_D^{20} = +14,7^\circ$ (MeOH)]. Das Massenspektrum zeigte den Peak mit der höchsten Masse bei 96 (M⁺-2H₂O) und auch das NMR-Spektrum steht mit der Struktur in guter Übereinstimmung.

Von Interesse ist, daß auch die Lactone I und II eine antibiotische und zwar vor allem eine fungizide Wirksamkeit besitzen, während die Säuren III und IV



Va R=H (1-Tuliposid A)

Via R=Ac



V b R³=R¹=H R²= $-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_2}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ (6-Tuliposid A)

VI b R³=R¹=Ac R²= $-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_2}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OAc}$

VII b R³=R¹=C₆H₉O R²= $-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_2}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_9\text{O}$

VIII a R³=R²=H R¹= $-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_2}{\text{C}}-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{OH}$ (1-Tuliposid B)

praktisch keine Aktivität aufweisen. Es erhebt sich die Frage, in welcher Form die Säuren in den Glucosiden gebunden sind. Beim Vergleich der NMR-Spektren der freien Säuren und der zugehörigen Glucoside fällt eine weitgehende Übereinstimmung auf. Wichtig ist ferner, daß die Glucoside nicht sauer reagieren, die Carboxylgruppe also die Bindung vermitteln muß. Aus der Zahl der Acetylgruppen in den acetylierten Glucosiden und dem typischen Shift von $\sim 0,6 \tau$ der $\gamma\text{-CH}_2\text{OR}$ -Protonen durch die Acetylierung geht hervor, daß die Hydroxylgruppe im Säurerest in den Glucosiden frei vorliegt, der Säurerest muß daher esterartig mit der Glucose verbunden sein, worauf auch die leichte alkalische Spaltbarkeit hinweist. Offen bleibt, in welcher Position die Säure an die Glucose gebunden ist.

Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst mit dem inaktiv gewordenen Tuliposid A gearbeitet. Dieses wurde in Dimethylsulfoxyd (DMSO) mit Dihydropyran und katalytischen Mengen Säure in die OH-freie Verbindung VIIb übergeführt. Diese wurde anschließend alkalisch verseift und darauf in DMSO/NaH mit CH_3J ⁶⁾ methyliert. Nach saurer Abspaltung der Schutzgruppen erhielt man eine Monomethyl-D-glucose,

welche die Methylgruppe an der Stelle tragen mußte, wo vorher der Säurerest gesessen hatte. Die Mono-methylglucose erwies sich als 6-Methyl-D-glucose mit dem Schmp. 143-145°, $[\alpha]_D = +59^\circ$ (H₂O), die in allen Eigenschaften mit authentischem Material identisch war. Demnach besitzt das inaktive Tuliposid A die Struktur Vb.

Diese Reaktion läßt sich leider nicht auf aktives Tuliposid A übertragen, da es sich zu leicht zersetzt, so daß ein direkter Beweis für die Stellung des Acylrestes in dieser Verbindung noch aussteht. Seine Position läßt sich jedoch aufgrund folgender Überlegungen festlegen: Im inaktiven und aktiven Tuliposid A sind die Spaltstücke bei der Hydrolyse gleich und es treten keine sichtbaren Unterschiede im NMR-Spektrum auf. Es muß sich also um Stellungsisomere handeln. Der Hauptunterschied liegt in der viel leichteren Spaltbarkeit der aktiven Substanz, die schon an Kieselgel und Aktivkohle eintritt, während die inaktive Verbindung keine Spaltung zeigt. Eine Orthoesterbindung ist unwahrscheinlich, da die Verbindung nicht sauer reagiert und ein neutraler Orthoester im NMR-Spektrum erkennbar sein sollte. Man muß daher annehmen, daß es sich um das 1-Acyl-glucosid Va handelt, unklar bleibt, ob in ihm α - oder β -glucosidische Bindung vorliegt. Von derartigen Verbindungen ist bekannt, daß sie leichter als die entsprechenden Ester gespalten werden und daß sie schnell eine Acylwanderung eingehen, die über ein 2-Acyl bis zum 6-Acyl als stabiler Endstufe führt.⁷⁾

Zur Unterscheidung soll das aktive Tuliposid A (Va) als 1-Tuliposid A und das inaktive (Vb) als 6-Tuliposid A bezeichnet werden. Weitere Zwischenstufen könnten entsprechend der Stellung des Acyls benannt werden.

Das von Cavallito und Haskell⁸⁾ aus *Erythronium americanum* isolierte α -Methylenbutyrolacton liegt in der Pflanze in einer glykosidischen Vorstufe vor, für die Struktur (IX) angenommen wurde, bei der Spaltung durch Enzyme und Säuren sollte I entstehen.⁸⁾ Nach den mitgeteilten Eigenschaften dürfte dieses Glucosid eher die Struktur (V) besitzen.

Für Tuliposid B ist aufgrund der außerordentlichen Ähnlichkeit mit A ein analoger Aufbau (VIII a und b) zu erwarten. Die Struktur weiterer bei der Hydrolyse lactonbildende Glucoside wird z.Z. bearbeitet. Der neue Verbindungstyp mit antibiotischer Aktivität ist möglicherweise im Pflanzenreich, vor allem in

Liliaceen und Ranunculaceen, weiter verbreitet.

Wir danken der IRGA GmbH, Grenzach, für Unterstützung und Frl.H.Segschneider für ihre unermüdliche und verständnisvolle Mitarbeit.

Herrn Dr.H.-W.Fehlhaber danken wir für die Anfertigung der Massenspektren.

Literatur

- 1) F.Schönbeck; Angew.Botan. 39, 173 (1966);
F.Schönbeck; Phytopathol.Zeitschrift 59, 205 (1967)
- 2) B.H.H.Bergman, J.C.M.Beijsersbergen, J.C.Overeem und A.K.Sijpesteijn;
Recueil Trav.chim.Pays-Bas 86, 709 (1967)
- 3) U.W.Brongersmä-Oosterhoff; Recueil Trav.chim.Pays-Bas 86, 705 (1967)
- 4) Die Protonenresonanzspektren wurden auf dem Varian A-60 wenn nicht anders angegeben in $CDCl_3$ mit TMS = 10 τ als internem Standard gemessen.
- 5) Messung der Massenspektren mit dem Gerät MS9 der A.E.I.
- 6) S.Hakomori, J.Biochem. (Tokyo) 55, 205 (1964);
D.M.W.Anderson und G.M.Cree, J.Carbohydrat.Res. 2, 162 (1966)
- 7) H.G.Fletcher in R.L.Whistler und M.L.Wolfram; Methods in Carbohydrate Chemistry Bd. II, S. 231;
J.Stanek, M.Cerny, J.Kocourek und J.Pacak; The Monosaccharides, Academic Press, New York 1963, S. 184 f.
- 8) C.J.Cavallito und T.H.Haskell, J.Amer.chem.Soc. 68, 2332 (1946)