

## Merulinsäuren A, B und C, neue Antibiotika aus *Merulius tremellosus* Fr. und *Phlebia radiata* Fr.

Antibiotics from Basidiomycetes, VI

Merulinic Acids A, B, and C, New Antibiotics from *Merulius tremellosus* and *Phlebia radiata*

Bruno Max Giannetti und Wolfgang Steglich

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

Wolfram Quack \*, Timm Anke und Franz Oberwinkler

Lehrbereich spezielle Botanik der Universität Tübingen

Z. Naturforsch. **33 c**, 807–816 (1978) ; eingegangen am 11. Oktober, 1978

Herrn Prof. Dr. Dr. e. h. Hans Brockmann zum 75. Geburtstag gewidmet

Merulinic Acids, Fungal Metabolites, Antibiotics, *Merulius tremellosus*, *Phlebia radiata*, Basidiomycetes, Hemolysis

Three new antibiotics, merulinic acids A, B, and C, have been isolated from fruiting bodies of *Merulius tremellosus* and *Phlebia radiata*. They are closely related derivatives of  $\beta$ -resorcylic and salicylic acid, carrying monounsaturated  $C_{17}$ -alkyl side chains in 6-position. The merulinic acids are mixtures of the  $\Delta^8$ -compounds with minor amounts of the corresponding  $\Delta^{10}$ -, dehydro-, and dihydro derivatives, separable only by means of HPLC.  $\Delta^8$ -Merulinic acid A (**1**) was synthesized via a biomimetic cyclization of a linear precursor. The merulinic acids inhibit a variety of bacteria and are not active against fungi. RNA, DNA, and protein synthesis in *Bacillus brevis* and Ehrlich carcinoma ascites cells are inhibited shortly after the addition of the antibiotics. Almost complete hemolysis of human erythrocytes is caused by 25  $\mu$ g/ml of merulinic acid B and C or by 73  $\mu$ g/ml of merulinic acid A.

### Einleitung

Bei der Suche nach neuen Metaboliten aus Basidiomyceten prüften wir einige Arten von *Merulius* s.l. und verwandte Pilze auf die Anwesenheit von Antibiotika. In Fruchtkörpern von *Phlebia radiata* Fr. und *Merulius tremellosus* Fr. fanden wir drei miteinander nahe verwandte antibiotisch wirksame Stoffe, die wir als Merulinsäuren A, B und C (**MA**, **MB** und **MC**) bezeichnen möchten. In dieser Arbeit berichten wir über die Isolierung, Strukturklärung und biologische Wirksamkeit der neuen Verbindungen.

### Isolierung der Merulinsäuren

Zur Isolierung der Merulinsäuren wurden die lyophilisierten Fruchtkörper erschöpfend mit Ace-

ton/Methanol (1 : 1 Vol.) extrahiert, die eingengten Extrakte zwischen Essigester/Wasser verteilt und der lipophile Anteil an Kieselgel chromatographiert. Bei *M. tremellosus* wurde **MA** eluiert, bei *P. radiata* nacheinander **MC** und ein Gemisch von **MA** und **MB**. Die weitere Auftrennung und Reinigung erfolgte durch Rechromatographie an Kieselgel oder Sephadex LH 20. Über die erhaltenen Ausbeuten und die Eigenschaften der Merulinsäuren informiert Tab. I.

### Konstitution von Merulinsäure A

**MA** ist wie die beiden anderen Wirkstoffe löslich in wäßrigem Kaliumhydrogencarbonat. Es besitzt nach der Elementaranalyse die Summenformel  $C_{24}H_{38}O_4$  und kristallisiert mit einem halben Molekül Kristallwasser. Im Massenspektrum tritt als massenhöchstes Ion  $m/e$  346 auf, das einem Fragment  $M^+ - CO_2$  entspricht. Mit Diazomethan werden je nach Reaktionsdauer ein Methylester **2**, ein Monoether-ester **3** und ein Diether-ester **4** erhalten, so daß neben einer Carboxylgruppe zwei phenolische OH-Gruppen vorliegen. Beim Erhitzen mit

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Steglich, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, Gerhard-Domagk-Str. 1, D-5300 Bonn, oder Prof. Dr. F. Oberwinkler, Lehrbereich spezielle Botanik der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 1, D-7400 Tübingen.

\*Neue Adresse: Batelle Institut, D-6000 Frankfurt/Main.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tab. I. Ausbeuten, Schmelzpunkte und DC-Verhalten der Merulinsäuren.

	Ausb. [%] <sup>a</sup>	Schmp. [°C]	<i>R<sub>F</sub></i> <sup>b</sup>		
			<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<b>MA</b>	0,31 ( <i>M. tremellosus</i> ) 0,16 ( <i>P. radiata</i> )	116–117	0,68	0,42	0,71
<b>MB</b>	0,26	farbloses Öl	0,51	0,11	0,60
<b>MC</b>	2,10	31–32	0,57	0,29	0,73

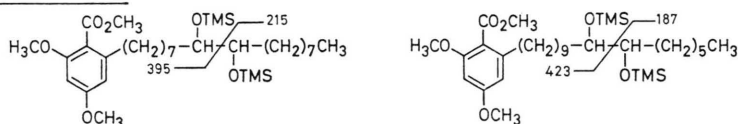
<sup>a</sup> Bezogen auf lyophilisierte Fruchtkörper. <sup>b</sup> Auf Kieselgelfolien 60 F<sub>254</sub> (Fa. Merck, Darmstadt). Laufmittelsysteme: *A* Benzol/Aceton/AcOH (70:30:1), *B* Chloroform/EtOAc/Aceton (6:3:3), *C* Cyclohexan/EtOAc/HCO<sub>2</sub>H (120:40:5). Die Merulinsäuren geben sichtbare Flecken beim Besprühen mit FeCl<sub>3</sub> (rotbraun), mit Anisaldehyd/Schwefelsäure (orangerot nach Erwärmen) und mit 50-proz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (rotgelb nach Erhitzen).

1 N HCl (1 h, Rückfluß) wird **MA** zum Diphenol **5** decarboxyliert.

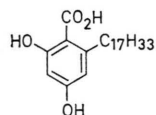
Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und der Tatsache, daß die Carboxylgruppe nach dem IR-Spektrum (CHCl<sub>3</sub>) chelatisiert vorliegt ( $\nu_{\text{CO}} = 1635 \text{ cm}^{-1}$ ) und im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ([D<sub>6</sub>]Ace-

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Tab. II) stimmen Lage und Aufspaltung der beiden Vinylprotonen bei  $\delta = 5,36$  völlig mit denen der Ölsäure überein, so daß die Seitenkette eine *cis*-Doppelbindung enthält. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum sind neben den Hauptsignalen bei  $\delta = 130,6$  und  $130,7$  im Vinylbereich schwächere Signale sichtbar, die darauf hindeuten, daß **MA** Doppelbindungsisomere enthält. Dieser Befund wird durch weitere Untersuchungen zur Lage der Doppelbindung bestätigt.

Nach der Methode von Eglinton und Hunneman [2] wurde permethyliertes **MA 4** mit Osmiumtetroxid in das Diol **6** übergeführt, das anschließend mit Bis-N,O-(trimethylsilyl)acetamid den Bis-trimethylsilylether **7** ergab. Dieser zeigte im MS neben der  $\alpha$ -Spaltung *m/e* 215 und 395 Begleiter bei *m/e* 187 und 423, die nur aus einer  $\Delta^{10'}$ -Verbindung hervorgegangen sein konnten [2]. Dieses Ergebnis wird durch die Ozonolyse von **4** bestätigt, bei der nach GC- und DC-Analysen neben Nonanal und dem Aldehyd **8** auch Heptanal entsteht.



ton) zwei *meta*-ständige Aromatenprotonen bei  $\delta = 6,23$  und  $6,31$  ppm nachweisbar sind, dürfte **MA** ein  $\beta$ -Resorcyssäure-Derivat mit einer monounsättigten Seitenkette C<sub>17</sub>H<sub>33</sub> in 6-Stellung sein:



Versuche, **MA** durch Umkristallisation oder DC in die Komponenten aufzutrennen, blieben erfolglos. Erst mit Hilfe der HPLC des permethylierten Derivates konnte gezeigt werden, daß **MA** aus vier Komponenten besteht (Abb. 1), die massenspektrometrisch als  $\Delta^{8'}$ -Merulinsäure **A** (**1**) (59%),  $\Delta^{10'}$ -Merulinsäure **A** (**9**) [16%], Dihydromerulinsäure **A** (**10**) [14%] sowie eine Dehydromerulinsäure **A**

Tab. II. <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Merulinsäuren A, B und C (**1**, **16**, **13**)<sup>a</sup> ( $\delta$ -Werte, TMS als innerer Standard).

	Merulinsäure A ( <b>1</b> ) (CDCl <sub>3</sub> )		Merulinsäure A ( <b>1</b> ) [D <sub>6</sub> ] Aceton		Merulinsäure B ( <b>16</b> ) (CDCl <sub>3</sub> )		Merulinsäure C ( <b>13</b> ) (CDCl <sub>3</sub> )	
3-H	„s“	6,30	d	6,29	d	6,75	d	6,75
4-H	—	—	—	—	ABM-t	7,35	ABM-t	7,35
5-H	„s“	6,30	d	6,23	d	6,86	d	6,86
1'-H	t (br)	2,95	t (br)	2,95	t (br)	2,95	t (br)	2,95
7', 10'-H	m	2,02 [4 H]	—	b	m	2,00 [4 H]	m	2,02 [4 H]
8', 9'-H	„t“	5,36	„t“	5,36	„t“	5,36	„t“	5,36
16'-H	—	—	—	—	m	3,86	—	—
17'-H	t (br)	0,89 [3 H]	t (br)	0,89 [3 H]	d	1,19 [3 H]	t (br)	0,89 [3 H]
CH <sub>2</sub>	„s“	1,32 [26 H]	„s“	1,32 [26 H]	„s“	1,32 [26 H]	„s“	1,32 [26 H]
	m	1,62 [2 H]	m	1,55 [2 H]	m	1,62 [2 H]	m	1,62 [2 H]
OH	m	2,02	—	—	m (br)	6–6,40	s (br)	9,71
	„s“	10–12	—	—	—	—	—	—

Kopplungskonstanten:  $J_{3,4} = J_{4,5} = 8 \text{ Hz}$ ;  $J_{3,5} = 2,5$ ;  $J_{1',2'} = 6$ ;  $J_{8',9'} = 6$ ;  $J_{16',17'} = 6$ .

<sup>a</sup> Jeweils natürliches Gemisch.

<sup>b</sup> Wird vom Aceton-Signal überlagert.

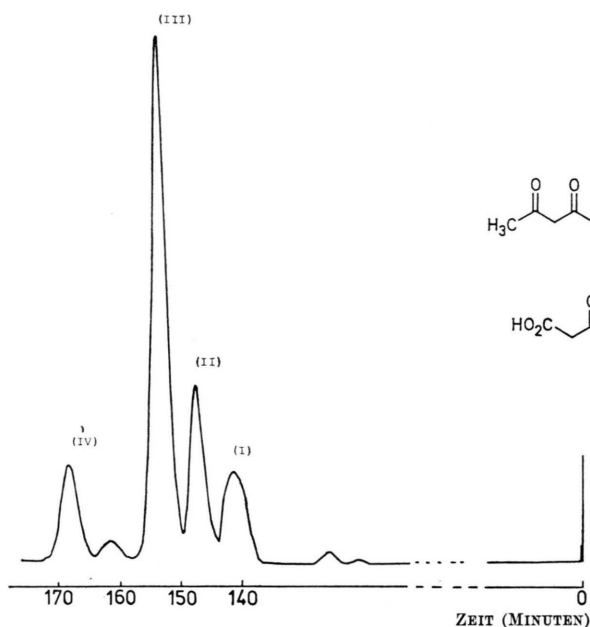
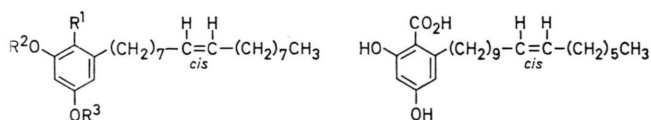


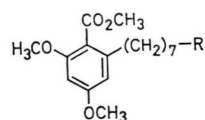
Abb. I. HPLC-Trennung des natürlichen 2,4-Di-O-methylmerulinsäure-A-methylesters. (I) 2,4-Di-O-methyl-dihydromerulinsäure-A-methylester; (II) 2,4-Di-O-methyl- $\Delta^{10'}$ -merulinsäure-A-methylester; (III) 2,4-Di-O-methyl- $\Delta^{8'}$ -merulinsäure-A-methylester; (IV) 2,4-Di-O-methyl- $\Delta^{x'}$ ,  $\Delta^{y'}$ -merulinsäure-A-methylester. (Versuchsbedingungen vgl. exp. Teil).

[11%] identifiziert wurden. Da die Auftrennung größerer Mengen des Dimethyletherester-Gemisches von **MA** zu aufwendig war, wurde für die Biotests wie bei den anderen Merulinsäuren das Gemisch der Komponenten verwendet. Selbstverständlich handelt es sich bei den Derivaten **2**–**7** ebenfalls um Gemische mit unterschiedlichen Seitenketten.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
1	CO <sub>2</sub> H	H	H
2	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H
3	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
4	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
5	H	H	H

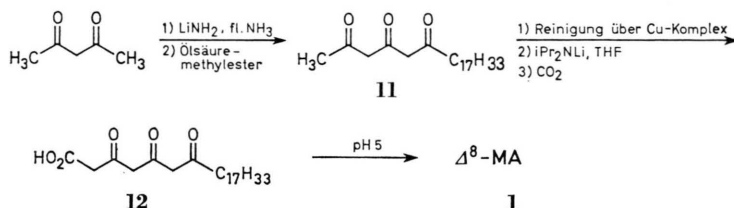
**9** Doppelbindung in  
**10** Seitenkette hydriert



	R
6	–CH(OH)CH(OH)(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>
7	–CH(OTMS)CH(OTMS)(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>
8	–CHO

## Synthese von Merulinsäure A

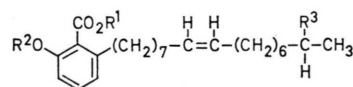
Um einheitliche  $\Delta^{8'}$ -**MA** **1** zu gewinnen, haben wir die Verbindung in Anlehnung an die mögliche Biosynthese nach Harris [3] synthetisiert. Als Aus-



gangsmaterial diente Acetylacetone, dessen Dianion mit Ölsäure-methylester zum Triketon **11** kondensiert wurde. Zur Abtrennung überschüssigen Ölsäure-methylesters wurde der Cu-Komplex von **11** benutzt. Nach Überführung in das Trianion wurde **11** mit CO<sub>2</sub> bei 0 °C [4] zur Triketosäure **12** umgesetzt, die bei pH 5 zur  $\Delta^{8'}$ -**MA** cyclisierte. Die synthetische Verbindung zeigte mit dem unaufgetrennten Naturstoff keine nennenswerte Schmelzpunktniedrigung, das gleiche <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum und ein nahezu identisches IR-Spektrum. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum treten im Vinylbereich nur zwei Signale bei  $\delta$  = 129,9 und 130,1 ppm auf. Der aus der synthetischen Verbindung hergestellte Bis-trimethylsilylether **7** zeigte im MS wie erwartet zwei intensive Fragmentationen *m/e* 215 und 395.

## Merulinsäure C

**MC** unterscheidet sich nach Elementaranalyse und MS von **MA** durch das Fehlen einer Hydroxygruppe. Entsprechend liefert **MC** mit überschüssigem Diazomethan nur einen Monomethyletherester **14**. Da nach dem IR-Spektrum (KBr) die Carboxylgruppe noch chelatisiert vorliegt ( $\nu_{\text{CO}}$  = 1640 cm<sup>-1</sup>) und im <sup>1</sup>H-



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
13	H	H	H
14	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
15	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
16	H	H	H *
17	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH

\* anstelle der Doppelbindung  
–CH(OTMS)CH(OTMS)–

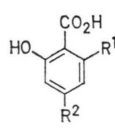
NMR-Spektrum die Aromatenprotonen ein ABM-System ergeben, muß die Verbindung Formel **13** besitzen. Sie wird durch das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum bestätigt, das übrigens wie das von **MA** zusätzliche Signale im Vinylbereich aufweist. Die Lage der Doppelbindung wurde wie bei **MA** bestimmt. Das entsprechend erhaltene Bis-trimethylsilyldiol **15** zeigte neben den für die  $\Delta^8$ -Doppelbindung erwarteten Fragmenten  $m/e$  215 und 365 ebenfalls Ionen, die auf eine Begleitverbindung mit  $\Delta^{10}$ -Doppelbindung zurückzuführen sind ( $m/e$  187 und 393). Auf eine quantitative Bestimmung der Komponenten wurde verzichtet.

### Merulinsäure B

**MB** ist nach dem Massenspektrum isomer mit **MA**. Laut  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum besitzt **MB** die gleiche Anordnung der Substituenten am Benzolring wie **MC**. Aus einem Methyldublett bei  $\delta = 1,19$  ppm ( $J = 6$  Hz), das mit einem Multiplett bei 3,86 koppelt, kann geschlossen werden, daß **MB** an C-16 der Seitenkette eine OH-Gruppe trägt, woraus sich die Formel **16** ergibt. Wegen der nahen biogenetischen Verwandtschaft mit den anderen Merulinsäuren ist anzunehmen, daß auch **MB** als schwer trennbares Gemisch verschiedener Komponenten vorliegt, in dem die  $\Delta^8$ -Verbindung **16** überwiegt. Bei der Methylierung mit Diazomethan liefert **MB** wie erwartet einen Monomethylether-ester **17**.

### Verwandtschaft der Merulinsäuren mit anderen Naturstoffen

**MA** unterscheidet sich nur in der Seitenkette von einem kürzlich von französischen Autoren [5] aus Kulturen von *Pulcherricium coeruleum* (*Corticium caeruleum*, Basidiomycetes) isolierten  $\beta$ -Resorcyssäure-Derivat **18**. Besonders interessant ist die nahe Verwandtschaft von **MC** mit 6-Alkylsalicylsäure-Derivaten aus Anacardiaceen und *Ginkgo biloba*, wie Anacardsäure-III (**19**), Pelandjausäure (**20**) und Ginkgolsäure (**21**) [6], die als solche oder in decarboxylierter Form für die hautreizende Wirkung dieser Pflanzen verantwortlich sind. Auch bei Merulinsäure A konnten wir einen schleimhautreizenden Effekt feststellen.

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
	<b>18</b> $n\text{-C}_{15}\text{H}_{31}$	OH
	<b>19</b> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$	H
	<b>20</b> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$	H
	<b>21</b> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$	H

Die Anwesenheit von Merulinsäure A in den Typusarten der Gattungen *Merulius* und *Phlebia*, *M. tremellosus* Fr. und *P. radiata* Fr., ist von chemotaxonomischem Interesse. Ihre aus morphologischen und anatomischen Befunden erkennbare nahe Verwandtschaft wird dadurch bekräftigt.

### Biologische Eigenschaften der Merulinsäuren

Tab. III zeigt die Wirkungsspektren der Merulinsäuren. Diese hemmen das Wachstum Gram-positiver und zum Teil Gram-negativer Bakterien. *Mycobacterium phlei* wird nur durch **MB** und **MC** gehemmt, während sich für **MC** kein Einfluß auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus* und *Proteus vulgaris* nachweisen läßt.

Die getesteten Pilze werden von den Merulinsäuren nicht gehemmt. Abb. 2 zeigt den Einfluß von **MA** auf die RNS-, DNS- und Proteinbiosynthese in Zellen von *Bacillus brevis*. Alle drei Makromolekülsynthesen werden innerhalb von 3–5 min nach Zugabe des Antibiotikums gehemmt. **MB** und **MC** zeigen den gleichen Effekt.

Der Einfluß der Merulinsäuren auf die Makromolekülsynthese in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms der Maus wurde nach Weitzel *et al.* [7] und Anke *et al.* [8] getestet. Die RNA-, DNA- und Proteinbiosynthese wird bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  **MA**, **MB** und **MC** vollständig gehemmt.

Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, unterscheidet sich **MA** in den hämolytischen Eigenschaften von **MB** und **MC**. Während die maximalen Hämolysewerte von **MB** und **MC** (91 bzw. 93%) bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$  erreicht werden, tritt eine 93% Hämolyse durch **MA** erst bei einer Konzentration von 73  $\mu\text{g/ml}$  ein.

Für den Wirkungsmechanismus ist ein oberflächenaktiver Effekt zu diskutieren, der sich schon auf Grund der Strukturformeln der Merulinsäuren vermuten läßt. Diese Annahme wird durch den Hämolysetest bestätigt, der eindeutig eine membranschädigende Wirkung dieser Verbindungen belegt. Auch bei Alkalisalzen der Anacardsäure (**19**) und Ginkgolsäure (**21**) wurde neben der hautreizenden eine starke hämolytische Wirkung beschrieben [9, 10].

### Experimenteller Teil

UV-Spektren: Beckman Modell 25. — IR-Spektren: Pye Unicam SP 1100 (Intensitätsangaben in Klammern: sst = sehr stark, st = stark, m = mittel,



Tab. III. Wirkungsspektrum der Merulinsäuren A, B und C.

	Testorganismus	MHK ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		MA (1)	MB (16)	MC (13)
Reihenverdünnungstest	Pseudomonadales			
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	>100	>100	>100
	Eubacteriales, Gram-negativ			
	<i>Aerobacter aerogenes</i>	>100	>100	>100
	<i>Escherichia coli</i>	>100	>100	>100
	<i>Proteus vulgaris</i>	10–100	1–10	>100
	Eubacteriales, Gram-positiv			
	<i>Arthrobacter citreus</i>	0,4–0,6	1–2	1–2
	<i>Bacillus brevis</i>	20–40	1–10	10–100
	<i>Bacillus subtilis</i>	0,8–1,0	1–10	10–100
	<i>Corynebacterium insidiosum</i>	1–10	1–10	10–100
	<i>Micrococcus roseus</i>	1–10	0,4–0,6	0,6–0,8
	<i>Sarcina lutea</i>	1–10	1–10	1–10
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10–100	1–10	>100
	<i>Mycobacterium phlei</i>	>100	2–4	2–4
	Actinomycetales			
	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	10–100	1–10	10–100
Plattendiffusionstest	<i>Clostridium pasteurianum</i>	>100	>100	>100

Bei keinem der folgenden Pilze konnte im Plattendiffusionstest eine Hemmung durch 100  $\mu\text{g}$  Merulinsäure A, B oder C festgestellt werden:

*Aspergillus panamensis*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Fusarium cubense*, *Neurospora crassa*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium notatum*, *Pythium debaryanum*, *Rhizoctonia solani*, *Rhodotorula glutinis* var. *dairenensis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

w = schwach). — Massenspektren: AEI MS-50 mit Datenverarbeitung (70 eV, Ionenquellentemp. 150 °C), AEI MS-9 und MS 30. — NMR-Spektren: Bruker WH 90 und Bruker WP 80. — Schmelzpunkte (unkorrigiert): Reichert Schmelzpunktmikroskop. — DC: Kieselgel-Fertigplatten 60 F<sub>254</sub> (Fa. Merck, Darmstadt); Laufmittelsysteme: D : CCl<sub>4</sub>/EtOAc (4 : 1 Vol.), E : Benzol/HCO<sub>2</sub>Et/HCO<sub>2</sub>H (10 : 5 : 3 Vol.). — Säulenchromatographie: Kieselgel Mallinckrodt und Sephadex LH 20

(Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden). — HPLC: Waters Modell 6000 A. Detektor: Modell 440 bei 254 nm. Injektor: U 6 K. GC: Perkin Elmer F 22.

Testorganismen und Medien: *Clostridium pasteurianum* wurde in RCM-Medium Nr. 5411 (Merck), *Corynebacterium insidiosum*, *Proteus vulgaris*, *Sarcina lutea* in Hefeextrakt-Malzextrakt-Medium (HM, Hefeextrakt 4,0 g, Malzextrakt 10,0 g, Glucose 4,0 g/l) und die übrigen Bakterien in Nutrient Broth (Difco, 8,0 g/l) angezogen. Die Inkubationstemp.

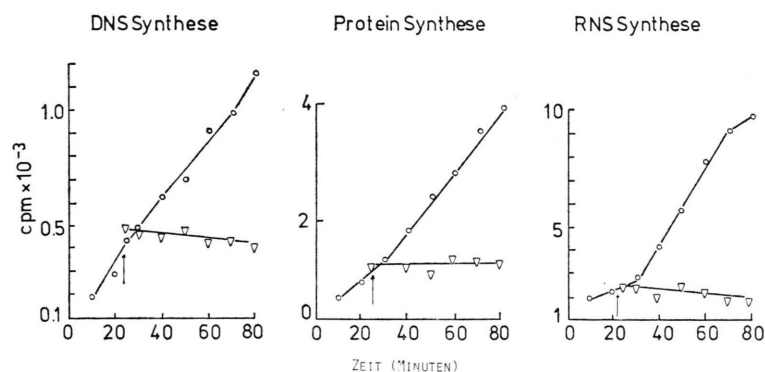


Abb. 2. Wirkung der Merulinsäuren auf die Makromolekülsynthesen von *Bacillus brevis*-Zellen *in vivo*. Zugabe des Antibiotikums: Pfeil.

Kontrolle: ○—○;  
100  $\mu\text{g/ml}$  (=MHK): ▽—▽.

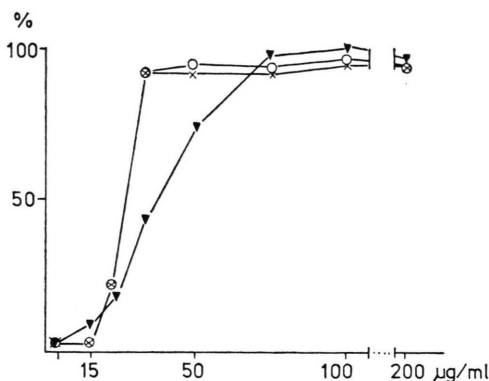


Abb. 3. Hämolytische Aktivität der Merulinsäuren.

▼ — Merulinsäure A;  
 × — Merulinsäure B;  
 ○ — Merulinsäure C.

betrug für *Arthrobacter citreus*, *C. insidiosum*, *Micrococcus roseus*, *S. lutea* und *C. pasteurianum* 27 °C und für die übrigen Bakterien 37 °C. *Saccharomyces cerevisiae* und *Rhodotorula glutinis* wurden auf Yeast Nitrogen Base (Difco, mit 4,0 g Glucose/l), *Aspergillus panamensis* und *Penicillium notatum* auf Malzextrakt (20 g/l), *Pythium debaryanum* auf Corn Meal Agar (Difco) und die restlichen Pilze auf HM-Agar bei 27 °C kultiviert. — Fruchtkörper von *Merulius tremellosus* und *Phlebia radiata* wurden in Wäldern des Schönbuchs bei Tübingen gesammelt.

#### Isolierung von Merulinsäure A aus *M. tremellosus*

80 g lyophilisierte Fruchtkörper von *M. tremellosus* wurden pulverisiert und dreimal mit je 600 ml Aceton/Methanol (1 : 1 Vol.) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden auf 20 ml eingeeengt und nach Zugabe von 200 ml Wasser dreimal mit je 200 ml Essigester extrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rohextrakt (3,8 g) in Chloroform gelöst, auf eine Kieselgelsäule (2,5 × 12 cm) aufgetragen und mit Chloroform/Ethanol (99 : 1 Vol.) eluiert. Die **MA**-enthaltenden Fraktionen wurden zusammen eingedampft und der Rückstand wie oben beschrieben rechromatographiert. Das so erhaltene hellbraune Öl wurde in 7 ml Methanol auf eine Säule mit Sephadex LH-20 (2,5 × 163 cm) aufgetragen und mit Methanol eluiert. Die Fraktionen mit **MA** ( $V_e/V_t = 0,9 - 1,0$ ) wurden im Vakuum eingeeengt und aus Cyclohexan/ $\text{CCl}_4$  (96 : 4 Vol.) kristallisiert. Ausbeute: 250 mg **MA** (0,31%).

#### Isolierung von **MA**, **MB** und **MC** aus *Phlebia radiata*

38 g lyophilisierte Fruchtkörper von *P. radiata* wurden wie oben beschrieben extrahiert und das Rohprodukt (3,2 g) an Kieselgel chromatographiert. Bei der Elution mit Chloroform/Ethanol (99 : 1 Vol.) wurde zuerst **MC** und anschließend ein Gemisch von **MA** und **MB** eluiert.

Nach Rechromatographie an Kieselgel wurde **MC** wie oben für **MA** beschrieben an Sephadex LH-20 gereinigt ( $V_e/V_t = 0,76 - 0,82$ ) und anschließend noch auf eine Kieselgelsäule (2,5 × 12 cm) gegeben und mit Chloroform/EtOH/MeOH (98 : 1 : 1 Vol.) eluiert. Die Ausbeute an reinem **MC** betrug 800 mg (2,10%).

Die eingeeengten Fraktionen von **MA/MB** wurden an einer Sephadex LH-20-Säule (2,5 × 174 cm) mit Methanol chromatographiert. **MA** ( $V_e/V_t = 0,9$  bis 1,0) wurde aus Cyclohexan/ $\text{CCl}_4$  (96 : 4 Vol.) kristallisiert. Ausbeute 60 mg (0,16%).

Die **MB** enthaltenden Fraktionen ( $V_e/V_t = 0,8$  bis 0,9) wurden nochmals an Sephadex LH-20 chromatographiert und auf eine Säule mit Kieselgel (2,5 × 12 cm) aufgetragen. Nach Waschen mit Chloroform/EtOH/MeOH (98 : 1 : 1 Vol.) wurde **MB** mit Chloroform/EtOH/MeOH (94 : 1 : 5) eluiert. Ausbeute 100 mg (0,26%).

#### Merulinsäure A (**MA**, **1**) [natürliches Gemisch]

Farblose Kristalle vom Schm. 116–117°. UV-Spektrum (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 299$  ( $\epsilon = 4187$ ), 259 (9797), 225 nm (24300). — IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 3610 (m), 3450–3100 (m), 2920 (sst), 2870 (st), 1635 (st), 1590 (m), 1470–1440 (m), 1370 (m), 1265 (st), 1185 (st), 1025 (w), 1015 (w), 830  $\text{cm}^{-1}$  (w). —  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14,2, 22,8, 27,4, 29,2, 29,5, 29,6, 30,0, 31,8, 32,0, 32,1, 36,9, 102,2, 104,4, 112,0, 128,8^*, 130,6, 130,7, 130,8^*, 131,0^*, 151,7, 162,4, 167,4, 176,8$  (\* schwächere Signale, die auf Verunreinigung mit **9** und Dehydro-**MA** zurückzuführen sind). MS:  $\text{M}^+ - \text{CO}_2$   $m/e$  346.2859 (10,5%, ber. für  $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{O}_2$  346.2872), 320 (9), 250 (7), 236 (2), 208 (3), 205 (3), 191 (4), 177 (2), 166 (10), 165 (3), 163 (7), 149 (4), 138 (4) 124 (100,  $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$ ).

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4 \times 0,5 \text{ H}_2\text{O}$  (399.6) Ber. C 72.18 H 9.77  
 Gef. C 71.81 H 9.70

**Merulinsäure C (MC, 13)** [natürliches Gemisch]

Farbloses Öl. — UV-Spektrum (MeOH):  $\lambda_{\max}$  = 309 ( $\epsilon$  = 3193), 243 (5098), 210 nm (19000). — IR (CHCl<sub>3</sub>): 3400–3100 (breit, m), 2950 (sst), 2890 (st), 1650 (st), 1610 (st), 1465–1450 (st), 1300 (m), 1250 (m), 1190 (m), 1165 (w), 900 (w), 830 cm<sup>-1</sup> (w). — <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 14.2, 22.8, 25.4, 26.6, 27.1, 27.4, 29.2, 29.6, 29.8, 30.0, 32.2, 32.6, 36.7, 116.6, 123.5, 128.9 \*, 130.7, 130.9, 131.0 \*, 136.2, 148.7, 164.7, 177.0 (\* schwächere Signale, die auf Doppelbindungsisomere und Dehydroverbindung zurückzuführen sind). — MS: M<sup>+</sup> *m/e* 374 (10%), 356 (7), 346 (11), 330 (28), 328 (8), 302 (20), 161 (11), 147 (19), 134 (15), 120 (25), 108 (100), 107 (45), 69 (18), 55 (48), 41 (56).

C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub> (374.6) Ber. C 77.00 H 10.16  
Gef. C 76.93 H 10.12

**Merulinsäure B (MB, 16)** [natürliches Gemisch]

Farblose, wachsartige Kristalle vom Schmp. 31 bis 32 °C. — UV-Spektrum (MeOH): entspricht dem von MC. — IR (CHCl<sub>3</sub>): 3500 (breit, m), 3020 (m), 2950 (sst), 2880 (st), 1660 (st), 1610 (st), 1450 (st), 1320 (m), 1250 (m), 1190 (m), 1025 (m), 830 cm<sup>-1</sup> (w). — MS: M<sup>+</sup> *m/e* 390.2771 (4%, ber. für C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> 390.2771), 372 (27), 354 (15), 346 (15), 328 (15), 325 (5), 298 (4), 201 (6), 187 (8), 175 (9), 173 (12), 162 (17), 161 (20), 152 (30), 147 (30), 134 (23), 133 (19), 120 (30), 109 (27), 108 (100), 107 (69), 95 (44), 81 (43).

**Merulinsäure-A-methylester (2)**

6 mg **MA** wurden in 2 ml Methanol tropfenweise mit etherischer Diazomethanolösung versetzt und nach dem ersten Auftreten einer bleibenden Gelbfärbung eingedampft. Der Rückstand wurde durch PTLC gereinigt ( $R_F$  = 0,44; System *D*). Öl. — <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.89 (verbr. t,  $J$  = 6 Hz) [3]; 1.32 („s“) [28]; 2.02 (m) [4]; 2.95 (verbr. t) [2]; 3.93 (s) [3]; 5.36 („t“) [2]; 6.24 und 6.32 (AB-qu,  $J$  = 2,5 Hz) [2], 11.7 (s) [OH]. — MS: M<sup>+</sup> *m/e* 404 (1%), 279 (3), 182 (20), 167 (15), 149 (100), 129 (20).

**4-O-Methylmerulinsäure-A-methylester (3)**

6 mg **MA** wurden in 2 ml Methanol tropfenweise mit etherischer Diazomethanolösung versetzt und nach bleibender Gelbfärbung noch 30 sec gerührt. Auf-

arbeitung und PTLC wie bei **2** ergab das ölige Produkt ( $R_F$  = 0,69; System *D*). — <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.89 („t“) [3]; 1.32 („s“) [28]; 2.02 (m) [4]; 2.95 („t“) [2]; 3.80, 3.93 (jeweils s) [6]; 5.36 („t“,  $J$  = 6 Hz) [2]; 6.24 und 6.32 (AB-qu,  $J$  = 2,5 Hz) [2]; 11.66 (s) [OH].

**2.4-Di-O-methylmerulinsäure-A-methylester (4)**

10 mg **MA** wurden in 2 ml Methanol mit überschüssiger etherischer Diazomethanolösung versetzt und über Nacht gerührt. Nach PTLC ( $R_F$  = 0,58; System *D*) farbloses Öl, Ausbeute 10,6 mg (96%). — IR (CHCl<sub>3</sub>): 3050 (w), 2950 (sst), 2870 (st), 1730 (st), 1605 (st), 1580 (m), 1460 (m), 1270 (m), 1185 cm<sup>-1</sup> (st). — <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.89 („t“) [3]; 1.23 („s“) [28]; 2.02 (m) [4]; 2.95 („t“) [2]; 3.79, 3.80, 3.93 (jeweils s) [9]; 5.36 („t“) [2]; 6.30 („s“) [2]. — M<sup>+</sup> *m/e* 432.3231 (37,4%, bezogen auf *m/e* 210 = 100%; ber. für C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub> 432.3239).

**Decarboxylierung von MA zu 5**

30 mg **MA** in 30 ml 1 N HCl und 3 ml Methanol wurden unter N<sub>2</sub> 2 h unter Rückfluß erhitzt. Dabei ließ sich mit Ba(OH)<sub>2</sub>-Wasser die Entwicklung von CO<sub>2</sub> feststellen. Nach Abkühlen schüttelte man 5mal mit je 10 ml Ether aus und dampfte die getrockneten Extrakte i. Vak. ein. Nach dünnschichtchromatographischer Reinigung ( $R_F$  = 0,32; Laufmittel *D*) 20,6 mg (77%) eines farblosen Öls. — IR (CCl<sub>4</sub>): 3550–3300 (m), 2950 (sst), 2870 (st), 1630 (m), 1600 (m), 1470 (m), 1185–1180 cm<sup>-1</sup> (m). — <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.89 („t“) [3]; 1.32 („s“) [28]; 2.02 (m) [4]; 2.95 („t“) [2]; 5.36 („t“) [2]; 6.30 (m) [3]. — MS: M<sup>+</sup> *m/e* 346.2872 (5%, bezogen auf *m/e* 124 = 100%; ber. für C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub> 346.2872).

**Hydroxylierung von 4 zu 6**

7 mg **4** in 3 ml Pyridin/Ether (1 : 1 Vol.) wurden unter Rühren bei 23 °C tropfenweise mit 50 mg Osmiumtetroxid in Ether versetzt und 2 h gerührt. Anschließend gab man 30 ml einer methanolischen Natriumsulfitlösung (aus 45 ml 15proz. wäßriger Natriumsulfitlösung und 10 ml Methanol) zu und rührte weitere 2 h. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand zur Trockene eingedampft und der Rückstand 6mal mit je 30 ml Ether extrahiert. Nach Eindampfen der organischen Lösungen wurde das Rohprodukt durch DC gereinigt ( $R_F$  = 0,50; System *E*).

Farbloses Öl, das beim Stehen im Kühlschrank kristallisierte; Schmp. 63 – 65 °C.

#### *Silylierung des Diols 6 zu 7 [aus Naturprodukt]*

5 mg **6** wurden in wenig absolutem THF mit überschüssigem N,O-Bis-(trimethylsilyl)acetamid 30 min bei 24 °C gerührt und anschließend noch 20 min unter Rückfluß erhitzt. Nach Abziehen der flüchtigen Bestandteile im Ölpumpenvakuum wurde **7** direkt massenspektrometrisch untersucht. — MS:  $M^+$   $m/e$  610 (0,5%), 496.3027 (3,5%, ber. für  $C_{26}H_{48}O_5Si_2$  496.3040), 468 (3,7,  $C_{24}H_{44}O_5Si_2$ ), 423 (22,  $C_{23}H_{39}O_5Si$ ), 395 (33,  $C_{21}H_{35}O_5Si$ ), 363 (23), 319 (30), 291 (36), 215 (25,  $C_{12}H_{27}OSi$ ), 210 (20), 191 (23), 187 (23,  $C_{10}H_{23}OSi$ ), 147 (22), 75 (100), 73 (80).

#### *Ozonolyse von 4 [aus Naturprodukt]*

Durch die Lösung von 30 mg **4** in 50 ml Eisessig wurde 7 h lang ein Gemisch von Ozon und Sauerstoff geleitet. Dabei verdunstete etwa  $\frac{3}{4}$  der Flüssigkeit. Man gab 100 ml Ether zu und reduzierte anschließend unter Kühlung mit Eiswasser mit 200 mg Zinkstaub und 20 ml Wasser 3 h bei 23 °C.

Nach weiteren drei Stunden wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, das Filtrat dreimal mit wäßriger Natriumcarbonatlösung sowie anschließend mit Wasser ausgeschüttelt und nach Trocknen über Calciumchlorid eingedampft. Ein Teil des öligen Rückstandes zeigte im Gaschromatogramm zwei Peaks, die in ihren Retentionszeiten mit denen von authentischem Pelargonaldehyd und Önanthaldehyd übereinstimmten.

Der andere Teil wurde dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (System *D*), wobei zwei Fraktionen vom  $R_F$  0,58 und 0,38 massenspektrometrisch vermessen wurden. Die erste Fraktion war ein etwas verunreinigtes Gemisch des  $C_7$ - und  $C_9$ -Aldehyds ( $M^+$ :  $m/e$  114.1041, ber. für  $C_7H_{14}O$  114.1045 und  $m/e$  142.1352, ber. für  $C_9H_{18}O$  142.1358). Die zweite Fraktion erwies sich als ein kompliziertes Gemisch verschiedener Substanzen, in dem **8** als Bestandteil nachgewiesen werden konnte ( $M^+$ :  $m/e$  322.2063, ber. für  $C_{18}H_{26}O_5$  322.2069).

#### *Auftrennung des natürlichen Gemisches von 4 in die Komponenten durch HPLC*

Jeweils 100  $\mu$ l einer Lösung von 10 mg **4** in 10 ml *n*-Hexan wurden auf eine  $0,4 \times 93$  cm  $\mu$ -Porasil-Kolonne gegeben (Laufmittel: *n*-Hexan mit 1%

Essigester und 0,02% *n*-Propanol, Flußrate: 1,2 ml/min). — Man sammelte die 4 getrennten Hauptkomponenten (Ausbeute  $\geq 95\%$ ) und untersuchte sie nach Eindampfen des Lösungsmittels mit Hilfe der Massenspektrometrie.

2.4-Di-O-methyl-dihydromerulinsäure-A-methylester 14,3%  $M^+$ :  $m/e$  434,

2.4-Di-O-methyl- $\Delta^{10'}$ -merulinsäure-A-methylester 16,1%  $M^+$ :  $m/e$  432,

2.4-Di-O-methyl- $\Delta^{8'}$ -merulinsäure-A-methylester 59,1%  $M^+$ :  $m/e$  432,

2.4-Di-O-methyl- $\Delta^{x'}$ ,  $\Delta^{y'}$ -merulinsäure-A-methylester 10,5%  $M^+$ :  $m/e$  430.

#### *14-Tricosen-2.4.6-trion (11)*

2,5 g Acetylaceton wurden tropfenweise unter Rühren zu einer Lösung von 0,6 g Lithiumdraht in 300 ml flüssigem Ammoniak gegeben. Nach 1 h wurde das Reaktionsgemisch mit 15 g Ölsäuremethylester versetzt und nach weiteren 5 min durch Zugabe von 200 ml Ether vom Ammoniak befreit. Die etherische Lösung wurde dann je zweimal mit verd. Essigsäure, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und nach Trocknen eingedampft. Der ölige Rückstand wurde unter Rühren in eine wäßrige ammoniakalische Kupfersulfatlösung eingetragen und der entstandene grüne Niederschlag anschließend durch mehrfaches Ausschütteln mit Chloroform herausgelöst. Man dampfte die getrocknete organische Phase ein und nahm den öligen Rückstand mit Ether auf. Innerhalb kurzer Zeit fielen grüne, glänzende Kristalle aus, die abfiltriert und mit Ether gewaschen wurden. Dieser Niederschlag wurde anschließend erneut in Chloroform gelöst und 3 h mit wäßriger Essigsäure geschüttelt, wobei sich der Cu-Komplex zersetzte und die organische Phase nahezu farblos wurde. Diese wurde abgetrennt, getrocknet und eingedampft, wobei das Triketon als farbloses Öl zurückblieb. Ausbeute: 1,88 g (16,5%),  $R_F$  = 0,64 (System *D*).

IR-Spektrum ( $CHCl_3$ ): 2950 (sst), 1730 (st), 1720 (st), 1600 (st), 1470 (m), 1410  $cm^{-1}$  (m).

#### *3.5.7-Trioxo-15-tetracosen-1-carbonsäure (12)*

Zu einer Lösung von 20 ml 15proz. Lithiumdiisopropylamid-Suspension in abs. THF wurde unter Rühren bei 0 °C 0,5 g **11** zugegeben. Nach 1 h Rühren, wobei man auf 20 °C erwärmen ließ, wurde

unter erneuter Kühlung auf 0 °C 5 min ein kräftiger CO<sub>2</sub>-Strom durch die Lösung geleitet. Man dampfte im Wasserstrahlvakuum ein und verarbeitete die rohe Carbonsäure **12** direkt weiter.

#### *Δ<sup>8</sup>-Merulinsäure A*

Das Rohprodukt der Carboxylierung wurde in einer methanolischen Natriumacetatpufferlösung (30 ml 0,5 M Natriumacetat und 5 ml Methanol; pH 5) 6–7 h bei 23 °C gerührt. Man dampfte das Lösungsmittel weitgehend ein und reinigte den Rückstand über eine Säule mit Sephadex LH 20 (1,5 × 80 cm, Eluent: Methanol).

Ausbeute: 106 mg [20%], bezogen auf **11**. – IR-Spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3610 (m), 3450–3100 (m), 2920 (sst), 2870 (st), 1635 (st), 1580 (m), 1460 (m), 1370 (m), 1265 (st), 1195 (st), 1025 (w), 830 cm<sup>-1</sup> (w). – <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,89 („t“, *J* = 6 Hz) [3]; 1,32 („s“) [26]; 1,62 (m) [2]; 2,02 (m) [4]; 2,95 („t“) [2]; 5,36 („t“) [2]; 6,30 („s“) [2].

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>): δ = 14,1, 22,7, 27,3, 29,2, 29,4, 29,6, 29,8, 31,7, 32,0, 32,1, 36,6, 101,6, 103,7, 111,4, 129,9, 130,1, 150,8, 161,5, 166,4, 175,8.

MS: *m/e* 346 (50), 320 (10), 278 (1), 264 (3), 250 (22), 236 (3), 222 (3), 208 (3), 205 (18), 194 (3), 192 (5), 191 (26), 180 (5), 177 (15), 166 (38), 163 (38), 151 (21), 149 (25), 138 (25), 137 (80), 125 (65), 124 (100), 113 (19), 95 (20), 83 (17), 81 (24), 69 (58), 55 (76), 43 (68), 41 (72).

C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (399,6) Ber. C 72,18 H 9,77  
Gef. C 72,51 H 9,81

#### *Silylierung der Δ<sup>8</sup>-Merulinsäure A*

Die Methylierung, Hydroxylierung und Silylierung des synthetischen Produktes erfolgte wie beim natürlichen Gemisch beschrieben. Sowohl das Trimethylderivat als auch das entsprechende Diol stimmten in ihren <sup>1</sup>H-NMR und IR-Spektren mit den Derivaten des Naturstoffes überein.

Das erhaltene Bistrimethylsilylderivat wurde direkt massenspektrometrisch untersucht.

MS: M<sup>+</sup> *m/e* 610 (0,5%), 468 (4), 395 (35), 363 (38), 349 (16), 319 (18), 291 (75), 215 (52), 210 (30), 187 (11), 151 (20), 147 (18), 75 (88), 73 (100).

#### *2-O-Methylmerulinsäure-C-methylester (14)* [natürliches Gemisch]

20 mg **13** wurden wie für **4** beschrieben mit etherischer Diazomethanolösung umgesetzt. Rohausbeute: 20,5 mg (95%); *R<sub>F</sub>* = 0,62 (System D). <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,89 („t“, *J* = 6 Hz) [3]; 1,32 („s“) [28]; 2,02 (m) [4]; 2,95 („t“) [2]; 3,80 und 3,93 (jeweils s) [6]; 5,36 („t“, *J* = 6 Hz) [2]; 6,75 (d, *J* = 8 Hz) [1]; 6,86 (d, *J* = 8 Hz) [1]; 7,35 (ABM, *J<sub>AB</sub>* = *J<sub>AM</sub>* = 8 Hz) [1]. MS: M<sup>+</sup> *m/e* 402,3138 (13%, ber. für C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub> 402,3134), 370 (11), 251 (7), 210 (6), 180 (27), 179 (12), 175 (19), 160 (67), 148 (11), 134 (11), 121 (11).

#### *Hydroxylierung und Silylierung von 14 zu 15* [aus Naturprodukt]

5 mg **14** wurden wie für **4** beschrieben mit OsO<sub>4</sub> hydroxyliert und das Rohprodukt weiter zum Bis(trimethylsilyl)diol **15** umgesetzt. MS: *m/e* M<sup>+</sup> 580 (0,1%), 466 (5, C<sub>25</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>), 438 (2, C<sub>23</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>), 393 (14, C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>), 365 (20, C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>), 289 (35), 261 (20), 215 (19, C<sub>12</sub>H<sub>27</sub>OSi), 187 (11, C<sub>10</sub>H<sub>23</sub>OSi), 175 (12), 161 (23), 147 (22), 117 (35), 75 (100), 73 (64).

#### *2-O-Methylmerulinsäure-B-methylester (17)* [aus Naturprodukt]

10 mg **16** wurden wie für **4** beschrieben mit etherischer Diazomethanolösung umgesetzt. Rohausbeute: 10,2 mg (96%); farbloses Öl; *R<sub>F</sub>* = 0,27 (System D). – IR-Spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3050 (m), 2950 (sst), 2870 (m), 1730 (st), 1600 (w), 1590 (m), 1470 (m), 1440 (w), 1270 (st), 1205 (w), 1125 (m) 1085 (m), 930 (w), 710 cm<sup>-1</sup> (m).

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,19 (d, *J* = 6 Hz) [3]; 1,32 („s“) [28]; 2,02 (m) [4]; 2,95 („t“) [2]; 3,80 und 3,93 (jeweils s) [6]; 3,86 (m, verdeckt) [1]; 5,36 („t“) (*J* = 6 Hz) [2]; 6,75 (d, *J* = 8 Hz) [1]; 6,86 (d, *J* = 8 Hz) [1]; 7,35 (ABM, *J<sub>AB</sub>* = *J<sub>AM</sub>* = 8 Hz) [1].

MS: M<sup>+</sup> *m/e* 418 (0,5%), 400 (4), 386 (18), 371 (10), 368 (20), 350 (18), 273 (5), 259 (4), 245 (6), 231 (9), 215 (12), 201 (8), 189 (15), 180 (35), 175 (45), 162 (30), 161 (100), 149 (30).



### Biologische Tests

#### Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]Thymin, [ $^{14}\text{C}$ ]Leucin und [ $^{14}\text{C}$ ]Uracil in vegetative Zellen von *Bacillus brevis*

Zu 18 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *Bacillus brevis* in Nutrient Broth ( $E_{650} = 0,7$ ) wurden 0,25  $\mu\text{Ci}$  der radioaktiv markierten Vorstufen [ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ]Thymin (0,99  $\mu\text{g}$ ), L-[ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]Leucin (0,56  $\mu\text{g}$ ) und [ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ]Uracil (125  $\mu\text{g}$ ) hinzugefügt. Die Antibiotika (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei Merulinsäure A und C, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei Merulinsäure B) wurden 22 bis 25 Minuten später zugesetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben von 200  $\mu\text{l}$  entnommen, die Zellen sofort mit 2 ml 5% Trichloressigsäure gefällt, das säureunlösliche Material auf Membranfiltern (Selectron, Typ 81785) gesammelt, gewaschen und die Radioaktivität mit einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gemessen.

#### Prüfung auf hämolytische Eigenschaften

Dieser Test wurde mit aus der Armvene entnommenem, heparinisiertem Blut nach der Hämoglobin-

cyanidmethode durchgeführt [11]. Reaktionslösung (a) mit Detergens (Merck Nr. 3317): 1,0 mmol/l KCN; 0,6 mmol/l Kalium-hexacyanoferrat (III); 2,5 mmol Phosphatpuffer, pH 7,2; 1,5 mmol/l NaCl; 0,05% Detergens.

Reaktionslösung (b): wie Reaktionslösung (a), jedoch ohne Detergens und mit 141 mmol/l NaCl.

Je 0,5 ml der isotonischen Reaktionslösung (b) wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Antibiotika kurz geschüttelt, 20  $\mu\text{l}$  Blut hinzugefügt, geschüttelt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden danach 5 Minuten bei  $900 \times g$  zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes bei 546 nm gegen die Reaktionslösung (b) als Leerwert gemessen. Der Kontrollwert mit der Reaktionslösung (a) wurde gleich behandelt. Die Hämolyse dieses Kontrollwertes wurde bei der Berechnung als 100% zugrunde gelegt.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

- [1] V. Mitt.: W. Quack, T. Anke, F. Oberwinkler, B. M. Giannetti u. W. Steglich, *J. Antibiotics* **31**, 737 (1978).
- [2] G. Eglinton u. D. H. Hunneman, *Phytochemistry* **7**, 313 (1968).
- [3] T. M. Harris, G. P. Murphy u. A. J. Poje, *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7733 (1976).
- [4] R. Arnold, Dissertation 1972, TU München. Die Reaktion bei  $-20^\circ\text{C}$  führt zu schlechteren Ausbeuten an dem Triketon **II**.
- [5] G. Deffieux, R. Baute, G. Bourgeois, A. Neveu u. M. J. Filleau, *Bull. Soc. Pharm. Ouest.* **16**, 259 (1974).
- [6] Vgl. R. Hegnauer, *Chematoxonomie der Pflanzen*, **Bd. I**, 327 (1962) und **Bd. III**, 90 (1964), Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart.
- [7] G. Weitzel, F. Schneider, A. M. Fretzdorff, J. Durst u. W. D. Hirschmann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 433 (1967).
- [8] T. Anke, F. Oberwinkler, G. Schramm u. W. Steglich, *J. Antibiotics* **30**, 806 (1977).
- [9] J. Kawamura, *Japan. J. Chem.* **3**, 89 (1928).
- [10] F. W. Eichbaum, *Mem. Inst. Butantan* **19**, 127 (1946).
- [11] E. Merck, Darmstadt, *Klinisches Labor*, 12. Auflage, 1974.