

Neuartige Ceramide aus *Cystobacter fuscus* (Myxobacterales)

Novel Ceramides from *Cystobacter fuscus* (Myxobacterales)

H. Eckau, D. Dill und H. Budzikiewicz

Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln, Greinstraße 4, D-5000 Köln 41

Z. Naturforsch. **39c**, 1–9 (1984); received October 31, 1983

Cystobacter, Myxobacterales, Ceramides, Carotenoids, Myxobactone

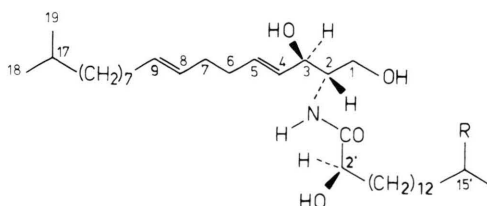
From cell material of *Cystobacter fuscus* strain Cb 685 (Myxobacterales) the ceramides 2*S*,3*R*-*N*-(2'*R*-hydroxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methylsphinga-4*E*,8*E*-dienine (**1**), 2*S*,3*R*-*N*-(2'*R*-hydroxypalmitoyl)-17-methylsphinga-4*E*,8*E*-dienine (**10**), 2*S*,3*R*-*N*-(2'*R*-hydroxy-15'-methyl)-17-methyl-4*E*-sphingenine (**11**) and 2*S*,3*R*-*N*-(2'*R*-hydroxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methylsphinganine (**12**) could be isolated, the structure elucidation of which is being reported here. The carotenoid myxobactone could be identified as the main pigment.

Die Myxobakterien sind eine phylogenetisch wahrscheinlich einheitliche Gruppe der gleitenden Bakterien [2, 3], die wegen ihrer besonderen Bewegungsform, der „sozialen“ Lebensweise und der bei Bakterien einzigartigen Fruchtkörperbildung seit langem das Interesse von Biologen und Genetikern beansprucht haben [4]. Dagegen finden sich bisher nur wenige Arbeiten über Inhaltsstoffe und sekundäre Metaboliten: Untersucht worden sind unter chemosystematischen Gesichtspunkten die Fettsäuremuster [5, 6], das Vorkommen von Menachinonen [7, 8] und Carotinoidglycosiden [8–10], des weiteren die für Myxobakterien typischen Exopolysaccharide sowie die Lipopolysaccharide aus vegetativen Zellen, Fruchtkörpern und Myxosporen [11–13]. Außerdem hat man in den letzten Jahren einige antibiotisch wirksame Substanzen aus Myxobakterien isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt [14–23]. Durch Dünnschichtchromatographie sind schließlich in drei Myxobakterienarten Phospholipide nachgewiesen worden [8, 24, 25]. Wir möchten nun über die Isolierung und Strukturaufklärung von vier Ceramiden aus *Cystobacter fuscus* Stamm Cb 685 berichten. Außerdem konnten wir das Vorkommen des schon aus anderen Myxobakterien bekannten [26, 27] Carotinoids Myxobacton nachweisen.

Ceramide als solche oder als Bestandteil von Sphingolipiden sind in der Tier- und höheren Pflanzenwelt weit verbreitet [28, 29]. Die Vielfalt der bisher aufgefundenen Ceramide ergibt sich aus

der Kombination der sogenannten „long-chain bases“ mit unterschiedlichen Fettsäuren. In einem Übersichtsartikel [28] von 1970 führt Karlsson über sechzig long-chain bases auf, die sich durch Kettenlänge, Verzweigung, Zahl der Hydroxylgruppen sowie Lage und Anzahl der Doppelbindungen unterscheiden. Ähnlich groß ist die Vielfalt der Fettsäuren. Im Gegensatz zu den höheren Lebewesen sind bei Bakterien Ceramide nur selten nachgewiesen worden [30–34], in gleitenden Bakterien noch gar nicht. Die von uns gefundene verzweigte doppelt ungesättigte longchain-base stellt überdies einen bisher noch nicht beschriebenen Strukturtyp dar, während 2-Hydroxy- und 2-Hydroxy-15-methylpalmitinsäure typische Bestandteile der Fettsäurefraktion von Myxobakterien sind [5, 6].

2*S*,3*R*-*N*-(2'*R*-Hydroxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methylsphinga-4*E*,8*E*-dienin (**1**)



- 1:** R = CH₃ **11:** R = CH₃, 8,9-gesättigt
10: R = H **12:** R = CH₃, 4,5- und 8,9-gesättigt

Im EI-Massenspektrum von **1** liegt das Ion höchster Masse bei *m/z* 561. Vergleich mit dem EI-Spektrum des Peracetylierungsproduktes, dessen

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz.
0341-0382/84/0100-0001 \$ 01.30/0



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.

M^+ bei m/z 705 gefunden wird (bestätigt durch $[M + H]^+$ bei m/z 706 im FD-Spektrum) zeigt, daß bei **1** statt M^+ nur $[M - H_2O]^+$ beobachtet werden kann und daß bei der Acetylierung ein Triacetylprodukt entstanden ist (**2**). Das Fragmentierungsmuster des letzteren entspricht dem in der Literatur für Ceramide beschriebenen Schema [35, 36]: dreimaliger Verlust von Essigsäure (m/z 645; 585; 525), sowie Spaltung im Bereich der Amidbindung (Schema 1). Im EI-Spektrum von **1** finden sich als wichtigste Fragmente das α -Spaltprodukt (entsprechend m/z 412 bei **2**) bei m/z 328, das 17u ($\cdot OH$) verliert (m/z 311), sowie m/z 60 (C_2H_6NO) [36].

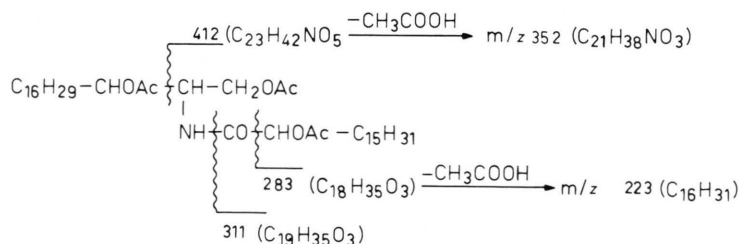
Aufgrund der eingehenden Untersuchungen der Stockholmer Gruppe [37–39] lassen sich die weitestgehenden Strukturaussagen aus dem EI-Spektrum des Tris-trimethylsilylderivates **3** (Abb. 1, Schema 2) ableiten. Das α -Spaltprodukt **d** (m/z 472) (entsprechend m/z 328 bei **1** und m/z 412 bei **2**) ist wieder eines der wichtigsten Fragmente, das weiter durch Verlust von $TMSO^+$ (m/z 383) zerfällt; z. T. verbleibt die Ladung jedoch auch bei **a** (m/z 323). Zu erwähnen ist weiter das Umlagerungsion $[M - (a - 73)]^+$ (m/z 545), das durch TMS-Wanderung entstanden sein muß [40]. Die Länge der Fettsäurekette ergibt sich aus den Fragmenten $[b + 2]^+$ (m/z 358) und **f** (m/z 313), sowie dem Komplement $[M - (b + 1)]^+$ (m/z 438) und seinem Zerfallsprodukt $[M - (b + 1) - TMSOH]^+$

Die Ionen $[M - (b + 1) - c]^+$ (m/z 217) und $[M - (b + 1) - e]^+$ (m/z 243) sowie $[M - (a - 73) - (g - 1)]^+$ (m/z 335) und $[m/z$ 335 - $TMSOH]^+$ (m/z 245) geben weitere Auskunft über die Natur der long-chain base (**4**) sowie die Stellung der Hydroxylgruppe im Fettsäuretest (C-2'), sind aber von relativ geringer Intensität.

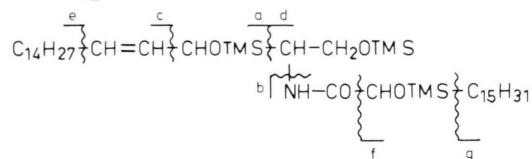
Im IR-Spektrum von **1** kann man die Amidbanden (1630 und 1540 cm^{-1}) sowie die für eine $E-CH=CH$ -Gruppierung charakteristische Bande bei 970 cm^{-1} erkennen.

Weitere Aufschlüsse lieferte das 300 MHz 1H -NMR-Spektrum von **1**, wobei die Zuordnung der einzelnen Signale durch Doppelresonanzexperimente erfolgte (Tab. I). Eindeutig ableiten läßt sich daraus die Struktur im Bereich C-1 bis C-6 der long-chain base und C-1' bis C-2' der Fettsäure, das Vorliegen der beiden terminalen Isopropylgruppen (C-17 und C-15') bei sonst unverzweigtem Bau der beiden Ketten sowie die *E*-Anordnung der beiden Doppelbindungen [41]. Daß die zweite – isolierte – Doppelbindung gleichfalls in der long-chain base enthalten sein muß, ergibt sich aus der Masse der entsprechenden Fragmente, insbesondere der α -Spaltprodukte m/z 328, 412 und 472 in den Spektren von **1**, **2** und **3**.

Das 1H -NMR-Spektrum von **2** bestätigt die Anwesenheit von drei Acetoxylgruppen (Singulets bei 2,05, 2,08 und 2,18 ppm). Die Signale der an C-1,



Schema 1. Beobachtete Fragmente im EI-Spektrum von **2**. Die angegebenen Elementarzusammensetzungen von Ionen wurden durch exakte Massmessungen bestimmt.

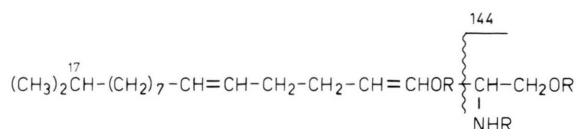


Schema 2. EI-Fragmentierungsmuster von **3** (nach [38]) (m/z 348).

C-3 und C-2' gebundenen Protonen werden erwartungsgemäß zu tieferen Feldern (4,38 und 4,41; 5,12; 5,31 ppm) verschoben. Das NH-Proton ist weiterhin als scharfes Dublett zu erkennen (6,37 ppm).

Aus den spektroskopischen Daten läßt sich somit die Struktur **1** mit Ausnahme der Lage der zweiten Doppelbindung in der long-chain base und der Konfiguration an den drei Asymmetriezentren ableiten.

Zur weiteren Charakterisierung wurde **1** sauer gespalten [42]. Das ^1H -NMR-Spektrum des Triacetylderivates **5** des so erhaltenen Sphingadienins **4** bestätigt die Anwesenheit der Isopropylgruppe: $\delta(\text{CH})$ 1,55 ppm, Septuplett, $\delta(\text{CH}_3)$ 0,85 ppm, Dublett, $J = 7,5$ Hz. Im Bereich der Olefin-Signale entspricht das Spektrum von **5** dem von **1**. Im EI-Massenspektrum (M^+ m/z 437, zweimal Verlust von CH_3COOH) erkennt man wieder das α -Spaltprodukt (m/z 144), das CH_2CO (m/z 102), CH_3CO^+ (m/z 101) und CH_3COOH (m/z 84) verliert.

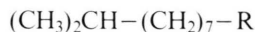


4: R = H

5: R = CH_3CO

Das zweite Verseifungsprodukt, 2-Hydroxy-15-methyl-palmitinsäuremethylester zeigt im EI-Spektrum das für 2-Hydroxyfettsäureester typische Fragmentierungsverhalten [6, 43]: M^+ bei m/z 300, kein $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (zum Unterschied von 3-Hydroxyestern), $[\text{M} - \text{COOCH}_3]^+$ bei m/z 241, das McLafferty-Umlagerungsprodukt bei m/z 90 ($[\text{HOCH}=\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$ und ein β -Spaltion ($^+\text{CH}_2 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{COOCH}_3$) m/z 103 von relativ geringer Intensität (wieder zum Unterschied von 3-Hydroxyestern). Im ^1H -NMR-Spektrum ist auch hier die Isopropylgruppe klar zu erkennen ($\text{CH} \dots$ 1,52 ppm, $\text{CH}_3 \dots$ 0,85 ppm, $J^3 = 7,5$ Hz). Das Signal der COOCH_3 -Gruppe findet sich bei 3,81, das der CHOH -Gruppe bei 4,25 ppm.

Zur Bestimmung der Lage der zweiten Doppelbindung der long-chain base wurde das durch alkalische Verseifung [44] erhaltene freie Sphingadienin nach dem Verfahren von Jaenicke und Gaag [45] der Ozonolyse unter Bildung der entsprechenden Methylacetale unterworfen und das Reaktionsgemisch durch GC/MS-Analyse untersucht. Hierbei konnten nachgewiesen werden: 1) das durch Spaltung der Δ^8 -Doppelbindung entstandene 1,1-Dimethoxy-9-methyldecan [46] (**6**): $[\text{M} - \text{H}]^+$ m/z 215, $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$ m/z 185, $^+\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$ m/z 75, und 2) das durch Spaltung der beiden Doppelbindungen gebildete 1,1,4,4-Tetramethoxybutan (**7**) [45]: $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$ m/z 147, $[m/z$ 147 - $\text{CH}_3\text{OH}]^+$ m/z 115 und $^+\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$ (m/z 75).



6: R = $\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$

8: R = CHO

9: R = COOCH_3



7

Um sicherzustellen, daß es bei der Verseifung zu keiner Doppelbindungswanderung gekommen war, wurde auch **1** unter gleichen Bedingungen der Ozonolyse unterworfen. Wegen unvollständiger Acetalisierung entstand hierbei neben **6** und **7** auch der freie Aldehyd **8** und der entsprechende Ester **9**, die durch ihre charakteristischen Massenspektren (**8**: $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$ m/z 152, $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4]^+$ m/z 142, $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3]^+$ m/z 137, McLafferty-Ion $[\text{CH}_2=\text{CHOH}]^+$ m/z 44 [47]; **9**: M^+ m/z 200; McLafferty-Ion m/z 74, β -Spaltion m/z 87 [48]) identifiziert. Damit ist die Lage der zweiten Doppelbindung in der Position [8, 9] eindeutig festgelegt. 4*E*,8*E*-Sphingadienine sind bereits in der Literatur beschrieben [28, 49], nicht aber doppelt ungesättigte verzweigte long-chain bases.

Das Ceramid **1** besitzt drei Asymmetriezentren. Die Konfiguration der 2*R*-Hydroxy-15-methylpalmitinsäure ergibt sich aus dem Vergleich von Drehwerten:

2*R*-Hydroxy-15-methylpalmitinsäuremethylester
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (6,4 mg/ml in CHCl_3) $-4,2^\circ$

2*R*-Hydroxypalmitinsäuremethylester [50]
 $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ (6,4 mg/ml in CHCl_3) $-5,8^\circ$

2*R*-Hydroxy-15-methylpalmitinsäure
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (6,0 mg/ml in CHCl_3) $-3,5^\circ$

2*S*-Hydroxydodekansäure [51]
 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (5,7 mg/ml in CHCl_3) $+1,75^\circ$

2*S*-Hydroxypalmitinsäure [52]
 $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ (2,0 mg/ml in CHCl_3) $+2,7^\circ$.

Für 4,8-Sphingadienine liegen in der Literatur keine Vergleichsdrehwerte vor, wohl aber für die gesättigten Sphinganine. Als Nebenkomponekte der Ceramidfunktion konnte das Tetrahydroderivat **12**

isoliert werden (s. u.). Da mit Sicherheit anzunehmen ist, daß die unterschiedlich ungesättigten long-chain bases im selben Organismus auch dieselbe absolute Konfiguration an den Asymmetriezentren 2 und 3 haben, kommt dem aus *Cystobacter fuscus* isolierten Ceramid somit die bisher nicht aufgefundene Struktur eines 2*S*,3*R*-*N*-(2'*R*-Hydroxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methylsphinga-4*E*,8*E*-dienins (**1**) zu.

*2*S*,3*R*-N-(2'*R*-Hydroxypalmitoyl)-17-methylsphinga-4*E*,8*E*-dienin (10)*

Die Massenspektren von **10** mit seinem Triacetyl-derivat zeigen, daß es sich bei **10** um ein niedrigeres Homologes von **1** handelt. Da die Massen der α -Spaltprodukte gegenüber den bei **1** und **3** gefundenen Werten um 14u niedriger liegen (m/z 314 und 297 für **10**, m/z 398 und 338 für das Triacetyl-**10**, vgl. die Diskussion bei **1**), muß es sich um eine Verbindung mit kleinerem Fettsäurerest handeln. Dies wird bestätigt durch das Auffinden eines langkettigen C₁₆- α -Hydroxyfettsäuremethyl-esters, wie das Massenspektrum zeigt [6, 43], im methylierten Hydrolysat von **10**. Entsprechend findet sich im ¹H-NMR-Spektrum (s. Tab. I) von **10** an Stelle des einen Isopropyldubletts ein Triplet einer -CH₂-CH₃-Gruppe (δ = 0,87 ppm), während alle übrigen Signale gegenüber denen von **1** unverändert sind.

*2*S*,3*R*-N-(2'*R*-Hydroxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methyl-4*E*-sphingenin (11)*

Dieses Nebenceramid unterscheidet sich von **1** nur durch das Fehlen der Δ^8 -Doppelbindung, wie sich aus dem ¹H-NMR-Spektrum ergibt (s. Tab. I): Es fehlen die Signale der olefinischen Protonen an C-8 und C-9 und die der allylischen Protonen an C-7 und C-10, während der CH₂-Berg bei ~ 1,3 ppm entsprechend an Intensität zugenommen hat. Ansonsten entspricht das Spektrum dem von **1**. Der Mindergehalt einer Doppelbindung in der long-chain base spiegelt sich auch in den Massenspektren von **11** ([M - H₂O]⁺ m/z 563, α -Spalt-Ionen unverändert bei m/z 328 und 311) sowie dessen Triacetylderivat (M⁺ m/z 707, α -Spalt-Ionen wie bei **2** bei m/z 412 und 352, Ionen der Fettsäurekette wie bei **2** bei m/z 311, 283 und 223) wider. Der sterische Bau an C-2, C-3 und C-2' bei **10** und **11** wird in

Analogie zu **1** bzw. zu **12** als 2*S*,3*R*,2'*R* angenommen.

*2*S*,3*R*-N-(2'*R*-Hydroxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methyl-sphingarin (12)*

Daß bei **12** eine gesättigte long-chain base vorliegt, ergibt sich aus den spektralen Daten: Im EI-Spektrum findet sich – entsprechend einem Mehrgehalt von 4H gegenüber **1** – M⁺ bei m/z 583 und [M - H₂O]⁺ bei m/z 565. Da die α -Spaltprodukte – wie bei **1** – bei m/z 328 und 311 gefunden werden, muß die Massenzunahme zwischen C-3 und C-19 stattgefunden haben. Im ¹H-NMR-Spektrum fehlen gegenüber dem von **1** die Signale der olefinischen und allylischen Protonen bei entsprechender Intensitätszunahme des Methylenberges. Durch alkalische Verseifung [44] erhält man aus **12** 17-Methylsphingarin, (CH₃)₂CH-(CH₂)₁₃-CHOH-CHNH₂-CH₂OH. Vergleich der beobachteten Drehwerte mit denen der vier diastereomeren Sphinganine [53] (Tab. II) zeigt, daß es sich bei dem isolierten Verseifungsprodukt um das 2*S*,3*R*-Isomere handelt.

Aus der Carotinoidfraktion konnte schließlich als Hauptkomponente eine Verbindung isoliert werden, bei der es sich nach dem UV-Spektrum sowie dem Massenspektrum des Peracetylierungsproduktes (s. Exp. Teil) um Myxobacton [27] handelt, das bereits aus anderen Myxobakterien isoliert worden ist [26, 27].

Dank

Herrn Prof. Dr. H. Reichenbach, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, 3300 Braunschweig, möchten wir für die Überlassung des Zellausgangsmaterials und Herrn Dr. H. J. Marner sowie Herrn N. Kraus, Institut für Biochemie der Universität zu Köln (Direktor Prof. Dr. L. Jaenicke) für die Ozonolyseversuche bestens danken. Dem Verband der Chemischen Industrie – Fonds der Chemie – danken wir für finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

Geräte

¹H-NMR: Bruker WM 300, CDCl₃, TMS.

Massenspektren: EI: Varian-MAT CH7A, direkt, 70 eV; Finnigan 3200 direkt und GC-Kopplung (OV 101), 70 eV; Finnigan 4510 mit GC-Kopplung

Tab. I. Chemische Verschiebungen (δ ppm) und Kopplungskonstanten in den 300 MHz ^1H -NMR-Spektren von **1**, **10**, **11** und **12** (CDCl_3). Die Kopplungskonstanten im Bereich der Δ^8 -Doppelbindung bei **1** wurden durch Rechnersimulation ermittelt, wobei sich zusätzlich für die beiden CH_2 -Gruppen C-7 und C-10 ein $^2J = -13,0$ Hz und für die Allyl-kopplungen C-7/C-9 + 0,6 Hz und C-8/C-10 + 0,4 Hz ergab.

Verbin- dung		H ¹	H ²	H ³	H ⁴	H ⁵	H ⁶	H ⁷	H ⁸	H ⁹	H ¹⁰	H ^{11–16}
1	δ ppm	3,73 3,87	3,87	4,10	5,48	5,78	2,07	2,07	5,38	5,42	1,95	$\sim 1,1-1,3$
	J Hz		2/3 4,0	3/4 7,5	4/5 16,0	5/6 6,5		7/8 +6,5	8/9 +16,0	9/10 +5,5		
10	δ ppm	3,75 3,89	3,93	4,15	5,47	5,78	2,11	2,11	5,42	5,38	1,96	$\sim 1,1-1,3$
	J Hz		2/3 4,0	3/4 7,5	4/5 16,0	5/6 6,5		7/8 6,5	8/9 16,0	9/10 5,5		
11	δ ppm	3,76 3,90	3,92	4,16	5,56	5,83	1,96	$\sim 1,1-1,3$				
	J Hz		2/3 4,0	3/4 7,5	4/5 16,0	5/6 6,5						
12	δ ppm	3,75 3,84	3,86	3,97	$\sim 1,1-1,3$							
	J Hz		2/3 $\sim 4,0$	3/4 7,5								

Verbin- dung		H ¹⁷	H ^{18,19}	H ^{2'}	H ^{3'–14'}	H ^{15'}	H ^{16',17'}	NH	OH	OH
1	δ ppm	1,55	0,85	4,25	$\sim 1,1-1,3$	1,52	0,85	7,23	$\sim 3,3$	$\sim 1,8$ 2 \times OH
	J Hz	17/18,19 7,5		2'/3' 4,0		15'/16'/17' 7,5			breit	breit
10	δ ppm	1,55	0,85	4,30	$\sim 1,1-1,3$	1,52	0,87	7,19	$\sim 3,3$ 2 \times OH	$\sim 1,8$
	J Hz	17,18/19 7,5		2'/3' 4,0					breit	breit
11	δ ppm	1,55	0,85	4,30	$\sim 1,1-1,3$	1,52	0,85	7,21	$\sim 2,75$ 2 \times OH	$\sim 1,8$
	J Hz	17,18/19 7,5		2'/3' 4,0		15'/16'/17' 7,5			breit	breit
12	δ ppm	1,55	0,85	4,20	$\sim 1,1-1,3$	1,52	0,85	7,28	$\sim 3,5$ 2 \times OH	$\sim 3,3$
	J Hz	17,18/19 7,5		2'/3' 4,0		15'/16'/17' 7,5			breit	breit

(OV 61) für die Ozonolyseuntersuchungen; exakte Massenmessungen Varian-MAT 731 und 212 mit Datensystem SS 200; FD: Varian-MAT 731 mit Datensystem SS 200.

IR: Nicolet 20 SX, KBr.

UV: Beckmann Spectrometer Modell 25, abs. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.

Polarimeter: Perkin-Elmer PE 141, Genauigkeit $\pm 0,002^\circ$ bei Winkeln unter 1° .

Säulenchromatographie: Kieselgel 60, Merck.

Dünnschichtchromatographie: Alu-Folien mit Kieselgel F 254, Merck.

HPLC: Polygosil 60-D-10, Macherey & Nagel bzw. RP-C₁₈, Dupont.

Tab. II. Drehwerte der diastereomeren Sphinganine [53] sowie von 17-Methylsphinginin aus **1** in $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 10:1.

λ [nm]	Sphinganine				17-Methyl- sphinginin
	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	
589	+5,69°	−5,36°	+10,13°	−12,00°	+4,0°
578	+5,82°	−5,62°	+10,55°	−12,80°	+4,8°
546	+6,68°	−6,42°	+12,08°	−14,13°	+8,5°
<i>c</i> [mg/ml]	15,1	15,1	7,2	7,5	5,0
<i>T</i> [°C]	28	28	28	28	20

Ausgangsmaterial: Tiefgefrorene Zellen von *Cystobacter fuscus* Stamm Cb 685 [20] wurden uns von Herrn Prof. Dr. H. Reichenbach, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, 3300 Braunschweig, zur Verfügung gestellt.

Myxobacton (1',2'-Dihydro-1'-glucosyl-4-ketotulonen). Mehrmalige Extraktion von 20 g der tiefgefrorenen Zellen (entspr. 2,5 g Trockengewicht) mit jeweils 50 ml Aceton bei 5 °C ergab einen Rohextrakt, der sich säulenchromatographisch durch Elution mit CCl_4 , Hexan-Ether (50:4, 10:1, 1:1) und reinem Ether in fünf Fraktionen auftrennen ließ, von denen die ersten vier wegen zu geringer Menge nicht weiter untersucht wurden. Die fünfte Fraktion enthielt Carotinoidglycoside. Zur Abspaltung der Fettsäurereste vom Zuckerrest [27] wurde 1 mg des Glycosidgemisches mit 5 ml 10-prozentiger methanolischer KOH versetzt und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Verdünnen mit 2,5 ml Wasser, Extraktion mit Ether und Einengen zur Trockene wurde das Glycosidgemisch in 30 µl abs. Pyridin aufgenommen und mit 15 µl abs. Acetanhydrid 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon im Dunkeln gerührt. Eingießen der Reaktionsmischung in Eiswasser, Extraktion mit CHCl_3 und Einengen zur Trockene ergab ein Gemisch peracetylierter Carotinoidglycoside, die mittels HPLC (Laufmittel: Hexan-Isopropanol 50:1; Detektion bei 255 nm) aufgetrennt wurden. Die Hauptfraktion erwies sich als Tetraacetylmyxobacton [27]: Ausbeute: 0,15 mg, Massenspektrum (EI): *m/z* (% rel. Int.) 896 (14): M^+ , 804 (1): $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_8]^+$, 790 (33): $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{10}]^+$, 698 (3): $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_8 - \text{C}_8\text{H}_{10}]^+$, 549 (7): $[\text{M} - \text{OGlu}(\text{Ac})_4]^+$, 548 (8): $[\text{M} - \text{H}]^+$, 443 (10): $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_8]^+$, 331 (26), 211 (13), 169 (100), 109 (46): Fragmente der Zuckerkomponente. Zur weiteren Charakterisierung wurde eine kleine Menge des freien Myxobactons

dünnschichtchromatographisch gereinigt. UV: λ_{max} 480 nm.

Ceramide: 120 g tiefgefrorene Zellen wurden mehrmals mit je 100 ml Aceton extrahiert und lieferten 130 mg Rohextrakt. Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Ether-Methanol 10:1) trennte den Hauptteil der Carotinoide und sonstigen Lipide von der Ceramidfraktion ab. Durch reversed phase-HPCL ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{Hexan}$ 8:1:0,5; Detektion bei 235 nm) ließ sich diese auftrennen, wobei nacheinander die Verbindungen **10**, **11** und **12** eluiert wurden.

2*S*,3*R*-*N*-(2'*R*-Hydroxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methylsphinga-4*E*,8*E*-dienin (**1**). Ausbeute 4 mg. Massenspektrum (EI): *m/z* (% rel. Int.) 561 (44): $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 546 (14): $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$, 351 (38), 328 (22), 311 (86), 286 (40), 280 (58), 276 (24), 239 (12). $^1\text{H-NMR}$: s. Tab. I. IR: s. Text.

2*S*,3*R*-*N*-(2'*R*-Acetoxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methylsphinga-4*E*,8*E*-dienin-1-*O*, 3-*O*-diacetat (**2**). **1** wurde wie für Myxobacton angegeben mit Pyridin/Acetanhydrid umgesetzt und das Reaktionsgemisch durch reversed phase-HPLC ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{Hexan}$ 10:1:1, Detektion bei 235 nm) aufgearbeitet. Massenspektrum (EI): *m/z* (% rel. Int.) 705 (0,2): M^+ , 645 (2), 585 (1), 525 (2), 412,3041 (4), 352,2854 (41), 311,2616 (8), 293 (4), 283,2651 (8), 276 (9), 223,0246 (8) (die aus den exakten Massenmessungen berechneten Summenformeln sind in Schema 1 angegeben). FD: 706 (100): $[\text{M} + \text{H}]^+$, 646 (12): $[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{COOH}]^+$, 412 (46). $^1\text{H-NMR}$: s. Text.

2*S*,3*R*-*N*-(2'*R*-Trimethylsilyloxy-15'-methylpalmitoyl)-1-*O*,3-*O*-bis-trimethylsilyl-17-methylsphinga-4*E*,8*E*-dienin (**3**). In einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit Durchstickkappe wurde 1 mg **1** in 50 µl abs. Pyridin gelöst

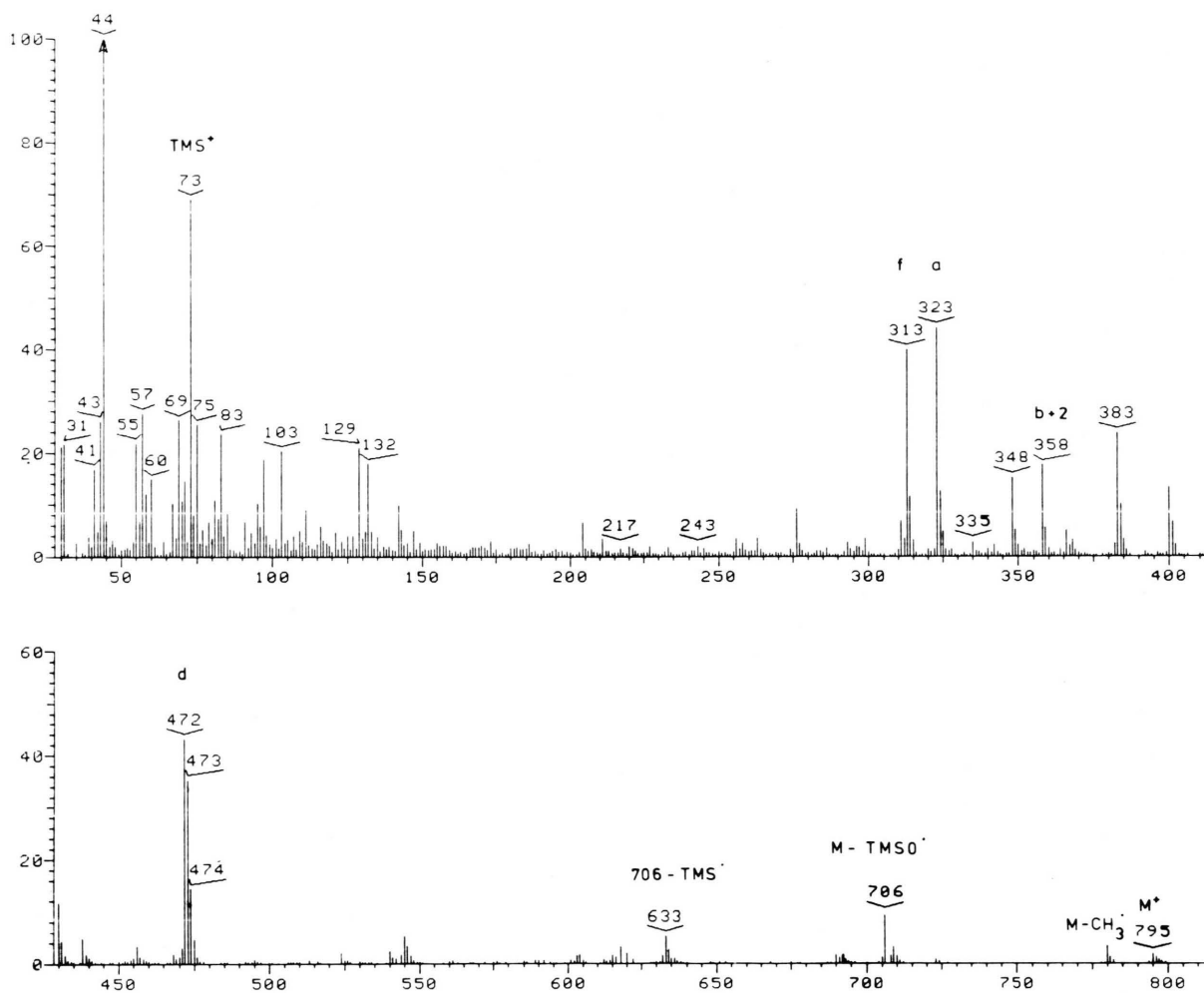


Abb. 1. EI-Massenspektrum von 2*S*,3*R*-*N*-(2'*R*-Trimethylsilyloxy-15'-methylpalmitoyl)-1-*O*,3-*O*-bistrimethylsilyl-17-sphinga-4*E*,8*E*-dienin (**3**).

und mit 50 μ l *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid sowie 10 μ l Trimethylchlorsilan versetzt [54], eine Stunde im Wasserbad auf 60 °C erwärmt und anschließend zur Trockene eingengt. Massenspektrum s. Abb. 1.

Saure Hydrolyse von 1 [42]. 25 mg **1** wurden in 20 ml CH₃OH mit 4 ml konz. HCl 1 Std. im Wasserbad auf 60 °C erwärmt. Die mit 25 ml H₂O verdünnte Lösung wurde zweimal mit 25 ml Ether extrahiert und die Etherphase zur Trockene eingengt. Gaschromatographische Aufarbeitung ergab 2-Hydroxy-15-methylpalmitinsäuremethylester. Massenspektrum (EI): *m/z* (% rel. Int.) 300 (5): M⁺, 241 (22), 103 (18), 90 (53). Aus der wäßrigen Phase

konnten durch Alkalisieren mit konz. KOH auf pH 10 und zweimalige Extraktion mit Ether 4 mg 17-Methylsphinga-4*E*,8*E*-dienin (**4**) isoliert werden, das nach dem für Myxobacton angegebenen Verfahren in das 1-*O*,2-*N*,3-*O*-Triacetylderivat **5** übergeführt und wie für **2** angegeben chromatographisch gereinigt wurde. Massenspektrum (EI): *m/z* (% rel. Int.) 437 (1): M⁺, 377 (5), 144 (50), 102 (25), 101 (33), 84 (100), 43 (59), ¹H-NMR: s. Text. Drehwerte [α]_D²⁰ (7,8 mg/ml in CHCl₃): -15,5° (589 nm), 16,0° (578 nm), -19,4° (546 nm).

Alkalische Hydrolyse von 1 [44]. 35 mg **1** wurden in 25 ml 1 *N* KOH in 90-prozentigem Methanol 18 Std. unter Rückfluß gekocht. Die Base **4** konnte an-

schließlich mit Ether extrahiert werden. Ausbeute: 17 mg. Nach Ansäuern mit 10-prozentigem HCl wurde 2-Hydroxy-15-methylpalmitinsäure mit Ether extrahiert (Ausbeute: 10 mg) und in üblicher Weise mit Diazomethan verestert (s. o.).

Ozonolyse von **1** bzw. **4** erfolgte nach der Vorschrift von Jaenicke und Gaag [45], nach der die bei reduktiver Aufarbeitung der Ozonolysemischung entstandenen Carbonylverbindungen durch Orthoameisensäuretrimethylester in die Dimethylacetale übergeführt werden. Als Katalysator hierfür dient Montmorillonit [55], an dem der Orthoester adsorbiert ist. 300 µl einer 0,5-prozentigen Lösung von **1** bzw. **4** in Pentan wurden bei -78°C mit einer Spatelspitze des mit Orthoameisentrimethylester belegten Katalysators versetzt, anschließend wurde durch eine Kapillare 5 min lang Ozon eingeleitet (30 ml/min entsprechend 0,015 mol/min), der Überschuß mit N_2 vertrieben und 5 µl Dimethylsulfid zugegeben. Nach einer Stunde Schütteln bei Raumtemperatur wurde der Katalysator abzentrifugiert und die überstehende Lösung direkt der GC/MS-Analyse zugeführt.

1,1-Dimethoxy-9-methyl-decan (**6**). Massenspektrum (EI): m/z (% rel. Int.) 215 (8): $[\text{M} - \text{H}]^+$, 185 (9): $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$, 75 (100): $^+\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$.

1,1,4,4-Tetramethoxybutan (**7**). Massenspektrum: m/z (% rel. Int.) 147 (2): $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$, 115 (35): $[m/z\ 147 - \text{CH}_2\text{OH}]^+$, 75 (100): $^+\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$. Retentionszeit und Fragmentierungsmuster stimmen mit dem von authentischem Material [45] überein.

9-Methyldecanal (**8**). Massenspektrum (EI): m/z (% rel. Int.) 155 (1): $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$, 152 (0,1), 142 (24), 137 (45), 44 (36).

9-Methyldodecansäuremethylester (**9**). Massenspektrum (EI): m/z (% rel. Int.) 200 (1): M^+ , 87 (50), 74 (100).

2S,3R-N-(2'R-Hydroxypalmitoyl)-17-methyl-sphing-4E,8E-dienin (**10**). Ausbeute 4 mg. Massenspektrum (EI): m/z (% rel. Int.) 547 (4): $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 314 (2), 311 (16), 297 (8), 280 (5). $^1\text{H-NMR}$ s. Tab. I.

2S,3R-N-(2'R-Acetoxypalmitoyl)-17-methyl-sphing-4E,8E-dienin-1-O,3-O-diacetat wurde wie für **2** angegeben dargestellt. Massenspektrum (EI): m/z (% rel. Int.) 631 (1): $[\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH}]^+$, 398 (2), 338 (7).

2-Hydroxypalmitinsäuremethylester durch saure Verseifung wie für **1** angegeben. Massenspektren (EI): m/z (% rel. Int.) 286 (2), 227 (18), 103 (12), 90 (40).

2S,3R-N-(2'R-Hydroxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methyl-4E-sphingenin (**11**). Ausbeute 6 mg. Massenspektrum (EI): m/z (% rel. Int.) 563 (3): $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 545 (4): $[\text{M} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$, 382 (11), 351 (6), 328 (7), 311 (27), 290 (11), 286 (14), 241 (4). $^1\text{H-NMR}$: s. Tab. I.

2S,3R-N-(2'R-Acetoxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methyl-4E-sphingenin-1-O,3-O-diacetat wurde wie für **2** angegeben dargestellt. Massenspektrum (EI): m/z (% rel. Int.) 707 (1): M^+ , 524 (1), 466 (9), 412 (6), 352 (40), 332 (23), 311 (10), 283 (13), 272 (14), 223 (16).

2S,3R-N-(2'R-Hydroxy-15'-methylpalmitoyl)-17-methyl-sphingarin (**12**). Ausbeute 10 mg. Massenspektrum (EI): m/z (% rel. Int.) 583 (2): M^+ , 565 (22), 410 (6), 355 (31), 328 (4), 311 (96), 294 (43). $^1\text{H-NMR}$: s. Tab. I.

17-Methylsphingarin wurde durch alkalische Verseifung wie bei **1** angegeben erhalten. Drehwerte s. Tab. II.

- [1] Teil XX der Reihe: Bakterieninhaltsstoffe. Für Teil XIX s.: G. Feistner u. H. Budzikiewicz, Can. J. Chem., im Druck.
- [2] H. Reichenbach u. M. Dworkin, in: The Prokaryotes (ed. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows u. H. G. Schlegel), Springer Verlag, New York 1981.
- [3] H. Reichenbach, Ann. Rev. Microbiol. **35**, 339 (1981).
- [4] D. Kaiser, C. Manoil u. M. Dworkin, Ann. Rev. Microbiol. **33**, 595 (1979).
- [5] E. Fautz, L. Grotjahn u. H. Reichenbach, in: The Flavobacterium-Cytophaga Group (eds. H. Reichenbach u. O. B. Weeks), Verlag Chemie, Weinheim 1981.
- [6] E. Fautz, G. Rosenfelder u. L. Grotjahn, J. Bacteriol. **140**, 852 (1979) und dort zitierte Literatur.
- [7] H. Kleinig, H. Reichenbach, N. Theobald u. H. Achenbach, Arch. Microbiol. **101**, 91 (1974).
- [8] H. Kleinig, Biochim. Biophys. Acta **274**, 489 (1972).
- [9] H. Reichenbach u. H. Kleinig, Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A **220**, 458 (1972) und dort zitierte Literatur.
- [10] H. Kleinig u. H. Reichenbach, Phytochemistry **12**, 2483 (1973).
- [11] I. W. Sutherland, J. Gen. Microbiol. **111**, 211 (1979) und dort zitierte Literatur.
- [12] G. Gnosspeilus, Arch. Microbiol. **116**, 51 (1978).
- [13] G. Rosenfelder, O. Lüderitz u. O. Westphal, Eur. J. Biochem. **44**, 411 (1974).
- [14] H. Irschik, K. Gerth, T. Kemmer, H. Steinmetz u. H. Reichenbach, J. Antibiot. **36**, 6 (1983).

- [15] E. Rosenberg, S. Fytlovitch, S. Carmeli u. Y. Kashman, *J. Antibiot.* **35**, 788 (1982).
- [16] K. Gerth, W. Trowitzsch, V. Wray, G. Höfle, H. Irschik u. H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **35**, 1101 (1982).
- [17] K. Gerth, H. Irschik, H. Reichenbach u. W. Trowitzsch, *J. Antibiot.* **35**, 1454 (1982).
- [18] W. Trowitzsch, V. Wray, K. Gerth u. G. Höfle, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1340.
- [19] W. Trowitzsch, G. Höfle u. W. S. Sheldrick, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 3829, und dort zitierte Literatur.
- [20] B. Kunze, H. Reichenbach, H. Augustiniak u. G. Höfle, *J. Antibiot.* **35**, 635 (1982).
- [21] J. M. Arias, C. Rodriguez u. E. Montoya, *J. Antibiot.* **32**, 205 (1979).
- [22] D. T. Connor, R. C. Greenough u. M. v. Strandtmann, *J. Org. Chem.* **42**, 3664 (1977).
- [23] S. M. Ringel, R. C. Greenough, S. Roemer, D. Connor, A. L. Gutt, B. Blair, G. Kanter u. M. v. Strandtmann, *J. Antibiot.* **30**, 371 (1977). M. Weigele u. W. Leimgruber, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 715.
- [24] E. Caillon, B. Lubochinsky u. D. Rigomier, *J. Bacteriol.* **153**, 1348 (1983).
- [25] P. E. Orndorff u. M. Dworkin, *J. Bacteriol.* **141**, 914 (1980).
- [26] H. Kleinig u. H. Reichenbach, *Arch. Mikrobiol.* **68**, 210 (1969).
- [27] H. Kleinig, H. Reichenbach u. H. Achenbach, *Arch. Mikrobiol.* **74**, 223 (1970).
- [28] K.-A. Karlsson, *Chem. Phys. Lipids* **5**, 6 (1970).
- [29] W. Stoffel, *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 57 (1971).
- [30] E. Miyagawa, R. Azuma u. T. Suto, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **24**, 341 (1978) und dort angegebene Literatur.
- [31] E. Miyagawa, R. Azuma, T. Suto u. I. Yano, *J. Biochem.* **86**, 311 (1979).
- [32] W. R. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta* **316**, 98 (1973).
- [33] S. Steiner, S. F. Conti u. R. L. Lester, *J. Bacteriol.* **116**, 1199 (1973).
- [34] A. Yamamoto, I. Yano, M. Masui, E. Yabuuchi, *J. Biochem.* **83**, 1213 (1978).
- [35] M. Iwamori, C. Costello u. H. W. Moser, *J. Lipid Res.* **20**, 86 (1979).
- [36] S. P. Markey u. D. A. Wenger, *Chem. Phys. Lipids* **12**, 182 (1974).
- [37] B. Samuelsson u. K. Samuelsson, *J. Lipid Res.* **10**, 41 (1969).
- [38] S. Hammarström, B. Samuelsson u. K. Samuelsson, *J. Lipid Res.* **11**, 150 (1970).
- [39] S. Hammarström, *J. Lipid Res.* **11**, 175 (1970).
- [40] W. P. Weber u. H. G. Boettger, *Intra-Sci. Chem. Rep.* **7**, 109 (1973).
- [41] J. Dabrowski, H. Egge u. P. Hanfland, *Chem. Phys. Lipids* **26**, 187 (1980).
- [42] R. C. Gaver u. C. C. Sweeley, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **39**, 63 (1965).
- [43] R. Ryhage u. E. Stenhagen, *Arkiv Kemi* **15**, 545 (1960).
- [44] V. Groom u. M. Sribney, *J. Lipid Res.* **6**, 220 (1965).
- [45] G. Gaag, Diplomarbeit, Univ. Köln, 1983.
- [46] R. A. Friedel u. A. G. Sharkey, *Anal. Chem.* **28**, 940 (1956).
- [47] R. J. Liedtke u. C. Djerassi, *J. Amer. Chem. Soc.* **91**, 6814 (1969).
- [48] R. Ryhage u. E. Stenhagen, *Arkiv Kemi* **13**, 523 (1959).
- [49] A. Hayashi u. T. Matsubara, *Biochim. Biophys. Acta* **248**, 306 (1971).
- [50] A. P. Tulloch, *Chem. Phys. Lipids* **30**, 325 (1982) und dort zitierte Literatur.
- [51] I. C. Hancock, G. P. Humphreys u. P. M. Meadow, *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 389 (1970).
- [52] H. D. S. Horn u. Y. Y. Pretorius, *J. Chem. Soc.* **1954**, 1460.
- [53] W. Stoffel u. K. Bister, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 169 (1973).
- [54] C. C. Sweeley u. G. Dawson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 6 (1969).
- [55] E. C. Taylor u. Ch.-Sh. Chiang, *Synthesis* **467** (1977).