

# Neue Terphenylchinone aus Mycelkulturen von *Punctularia atropurpurascens* (Basidiomycetes) [1]

New Terphenylquinones from Mycelial Cultures of *Punctularia atropurpurascens* (Basidiomycetes) [1]

Heidrun Anke

Lehrbereich Biotechnologie der Universität, Paul-Ehrlich-Str. 22, D-6750 Kaiserslautern

Ingrid Casser, Rupert Herrmann und Wolfgang Steglich

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, Gerhard-Domagk-Str. 1, 5300 Bonn 1

Z. Naturforsch. **39c**, 695–698 (1984); received April 6, 1984

*Punctularia atropurpurascens*, *P. strigosozonata*, Basidiomycetes, Phlebiarubrone, Phlebiarubrone Derivatives, Terphenylquinones

Three violet terphenylquinone pigments, 4'-hydroxyphlebiarubrone (**2**), 4',4''-dihydroxyphlebiarubrone (**3**), 3',4',4''-trihydroxyphlebiarubrone (**4**), and the already known pigment phlebiarubrone (**1**) were isolated from cultures of *Punctularia atropurpurascens*. The structures of the phlebiarubrone derivatives were determined by spectral evidence. The structure of **3** was confirmed by synthesis from atromentin (**6**). Two strains of the genus *Punctularia* obtained from CBS, were also found to produce these compounds, whereas with a third strain only the production of **1** was observed. **3** did not exhibit any antimicrobial or cytotoxic activity. The other pigments showed weak antibacterial and cytotoxic activity.

## Einleitung

Im Verlauf unserer Suche nach neuen Metaboliten aus Pilzen fielen die Kulturen eines von uns isolierten imperfekten Basidiomyceten durch die Produktion roter und violetter Pigmente auf. Eines der Pigmente erwies sich als Phlebiarubron (**1**), das bereits früher von McMorrison und Anchel [2] aus *Phlebia strigosozonata* isoliert worden war. Diese Art wurde 1914 von Lloyd als *Punctularia strigosozonata* in die Gattung *Punctularia* eingegliedert [3].

In einem morphologischen und physiologischen Vergleich unseres Stammes HA 193-82 mit den Stämmen *P. strigosozonata* CBS 345.34, CBS 308.78 und *P. atropurpurascens* CBS 407.70 erwies sich unser Isolat als identisch mit dem imperfekten Stadium von *P. atropurpurascens*. Wir gehen daher davon aus, daß unser Stamm ein anamorphes Stadium dieser Art ist.

Im folgenden wird die Herstellung und Charakterisierung von Phlebiarubron und dreier neuer Terphenylchinone aus *P. atropurpurascens* (HA 193-82, CBS 407.70) und *P. strigosozonata* (CBS 345.34 und CBS 308.78) beschrieben.

Sonderdruckanforderungen an Frau Dr. H. Anke.

0341-0382/84/0700-0695 \$ 01.30/0

## Produktion, Isolierung und Charakterisierung der Pigmente

*P. atropurpurascens* (HA 193-82) wurde in Penicillin-Kolben auf BAF-Agar [4] bei 22 °C drei Wochen lang inkubiert. Aus dem Essigester-Extrakt des Kulturmediums fiel beim Einengen das violette Hauptpigment **3** aus. Phlebiarubron (**1**) ließ sich aus dem Rückstand auf Grund seiner guten Löslichkeit in  $\text{CCl}_4$  abtrennen. Es erwies sich als identisch mit einem synthetischen Vergleichspräparat [5]. Der schwarzviolette Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und nach Abtrennung eines weiteren Anteils von **3** an Sephadex LH 20 aufgetrennt. Anschließende Reinigung durch präparative Schichtchromatographie lieferte die violetten Pigmente **2**, **3** und **4**.

Nach den hochaufgelösten Massenspektren unterscheiden sich diese Verbindungen von Phlebiarubron nur durch jeweils ein, zwei und drei zusätzliche Sauerstoffatome. Berücksichtigt man die Aufspaltung der Aromatensignale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, so ergeben sich für die violetten Pigmente die Strukturen von 4'-Hydroxyphlebiarubron (**2**), 4',4''-Dihydroxyphlebiarubron (**3**) und 3',4',4''-Trihydroxyphlebiarubron (**4**). **3** erwies sich in allen Eigenschaften als identisch mit einem aus Atro-



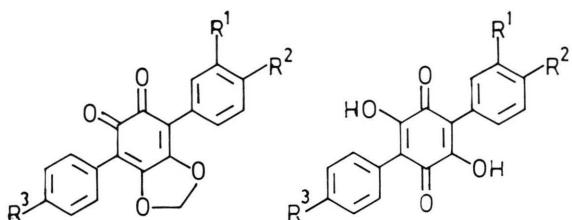
Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

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 digitized 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.

mentin (**6**) durch Umsetzung mit Methylensulfat/ Kaliumcarbonat in Aceton erhaltenem Vergleichspräparat.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>		R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	
<b>1</b>	H	H	H		<b>5</b>	H	OH	H
<b>2</b>	H	OH	H		<b>6</b>	H	OH	OH
<b>3</b>	H	OH	OH		<b>7</b>	OH	OH	OH
<b>4</b>	OH	OH	OH					

Im Massenspektrum zeigen Phlebiarubron und seine Hydroxyderivate ein intensives  $M+2$ -Ion [6]. Neben einem CO-Verlust zu  $m/e$  276, fallen bei **1** intensive Fragmentionen  $m/e$  129 ( $C_9H_5O$ , 100%) und 118 ( $C_8H_6O$ , 55) auf, über deren Bildung ohne Markierungsexperimente keine sicheren Aussagen gemacht werden können. Entsprechend werden bei **2** neben  $m/e$  129 (33,6) und 118 (5,7) die um 16 Masseneinheiten höheren Ionen  $m/e$  145 (21,2) und 134 (32,1) beobachtet. Bei den höher hydroxylierten Derivaten **3** und **4** tritt dieser Fragmentierungsweg gegenüber anderen Spaltungen zunehmend in den Hintergrund.

### *Biologische Aktivität*

Die Pigmente **1–4** wurden auf antibakterielle, antifungische, cytotoxische und Pflanzenwachstum-

regulierende Aktivitäten geprüft. **3** war in allen Testsystemen unwirksam. Für die restlichen Verbindungen wurden schwache antibakterielle und cytotoxische Aktivitäten nachgewiesen. **4** hemmt als einzige Verbindung das Wachstum von Pilzen. Das antimikrobielle Wirkungsspektrum der Pigmente ist in Tab. I wiedergegeben.

## Pigmentbildung in der Gattung *Punctularia*

Die Pigmentbildung bei verschiedenen Stämmen der Gattung *Punctularia* wurde in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen untersucht. Wie Tab. 2 zeigt, bilden beide Stämme von *P. atropurpurascens* auf festen Medien stets mehr Pigmente als in Submerskultur. Während *P. strigosozonata* CBS 345.34 auf festen Nährböden ohne Pigmentbildung mit rein weißem Mycel wächst, wurde in Submerskulturen mit BAF-Medium nach sechs Wochen die Bildung von **1** (35 mg/l) im Mycel beobachtet. Hydroxylierte Derivate wurden von diesem Stamm nicht gebildet. Der zweite Stamm dieser Art, CBS 308.78, produzierte nur **3** und **4**, aber kein Phlebiarubron (**1**). Die Zugabe von Hefeextrakt stimulierte bei keinem der vier Stämme die Pigmentbildung, obwohl Biogenesestudien einen guten Einbau von Phenylalanin in Phlebiarubron ergaben [7] und Tyrosin der Vorläufer von hydroxylierten Terphenylchinonen in Basidiomyceten ist [8]. Die Fixierung des ortho-chinoiden Systems durch die Methylengruppe, die sich von Methionin ableitet [9], scheint eine spezifische biogenetische Fähigkeit der Gattung *Punctularia* darzustellen.

Das gemeinsame Vorkommen von Terphenylchinonen mit unsubstituierten und hydroxylierten Phenylringen wurde bisher noch nicht beobachtet. In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage nach dem Zeitpunkt der Einführung der Hydroxylgruppe, d. h. ob **2** durch Kondensation von Phenylpyruvat mit 4-Hydroxyphenylpyruvat entsteht, oder ob Phlebiarubron nachträglich hydroxyliert wird. Pigment **2** ist das zweite Beispiel für ein nur in einem der beiden Phenylringe hydroxyliertes Terphenylchinon. Der entsprechende Grundkörper, Ascocorynin (**5**), wurde kürzlich aus Mycelkulturen von *Ascocoryne sarcoides* isoliert [10]. Interessant ist auch Pigment **4**, das sich vom Leucomelon (**7**) ableitet. Da **7** bisher nur in Form seines Oxidationsproduktes Cycloleucomelon in der Natur nachgewiesen werden konnte [11], ist **4** das erste natürliche

Tab. I. Wirkungsspektrum der Punctularia-Pigmente (Reihenverdünnungstest).

Organismus	1	2	3	4
(MHK $\mu$ g/ml)				
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	60	60	> 50	50
<i>Bacillus brevis</i>	10	20	> 50	40
<i>Bacillus subtilis</i>	60	50	> 50	40
<i>Mucor miehei</i>	> 60	> 70	> 50	60
<i>Nematospora coryli</i>	> 60	> 70	> 50	> 60
<i>Paecilomyces varioti</i>	> 60	> 70	> 60	60
<i>Penicillium notatum</i>	> 60	> 70	> 50	60

Tab. II. Pigmentbildung bei den untersuchten Stämmen der Gattung *Punctularia* auf verschiedenen Medien.

Medium	<i>P. strigosozonata</i>								<i>P. atropurpurascens</i>							
	CBS 345.34				CBS 308.78				CBS 407.70				HA 193-92			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
ME-fest	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+	+	+	+	+
ME-submers	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—
HMG-fest	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+	—	—	++	+
HMG-submers	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	+	—	(+)	—	+	—
BAF-fest	—	—	—	—	—	—	++	+	+	+	+++	+	++	+	+++	+
BAF-submers	+++	—	—	—	—	—	+	+	+	+	++	+	++	+	++	+

ME: 20 g Malzextrakt, HMG: 10 g Malzextrakt, 4 g Hefeextrakt, 4 g Glukose/l.

(+): weniger als 1 mg/l.

+: 2–5 mg/l.

++: 5–20 mg/l.

+++: 20 mg/l oder mehr.

Terphenylchinon mit einer 3',4',4"-Trihydroxy-substitution.

## Experimenteller Teil

UV-Spektren: Cary 17 Spektrophotometer. – IR-Spektren: Pye Unicam SP 1100 (Intensitätsangaben in Klammern: st = Stark, m = mittel, br = breit). – <sup>1</sup>H-NMR-Spektren: Bruker WM 400 (in [D<sub>6</sub>]Aceton, Lösungsmittel als innerer Standard,  $\delta_{[D_6]Aceton}$  = 2,04 ppm). – MS-Spektren: AEI MS 50 mit Datenverarbeitung (Direkteinlaß, Ionisierungsenergie 70 eV). Für die Säulenchromatographie wurde Sephadex LH 20 der Fa. Pharmacia verwendet, zur Schichtchromatographie Kieselgel 60, Fa. Merck, Darmstadt. Die DC erfolgte auf Kieselgelfolien F<sub>254</sub> (Merck); Laufmittel: A (Benzol/Ameisensäure-ethylester/Ameisensäure 10:5:3), B (Benzol/Aceton/Eisessig 70:30:1), C (Chloroform/Methanol 97:3). – Die Stämme CBS 308.78, 345.34 und 407.70 wurden von CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande, bezogen; HA 193-82 aus einer im August 1982 im Tsitsikama Forest (Cape Province, Südafrika) gesammelten Probe isoliert.

## Produktion und Isolierung

*P. atropurpurascens* (HA 193-82) wurde in Penicillin-Kolben auf BAF-Agar [4] bei 22 °C drei Wochen lang inkubiert. Danach wurde der gesamte Kolbeninhalt erschöpfend mit Essigester extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde der Extrakt auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens eingedampft, wobei das Hauptpigment 3 als schwarzvioletter Niederschlag ausfiel. Man filtrierte ab und dampfte das Filtrat zur Trockene ein. Aus dem schwarzen Rückstand ließ sich Phlebiarubron (1) durch Digerieren mit CCl<sub>4</sub> abtrennen. Es kristallisierte beim Eindampfen des Lösungsmittels in roten Nadeln und wurde durch Waschen mit wenig eiskaltem Ether in reiner Form erhalten. Der schwarze Rückstand wurde in heißem Methanol gelöst. Beim Abkühlen fiel eine zweite Fraktion von Pigment 3 aus. Sie wurde abfiltriert und das Filtrat an Sephadex LH20 chromatographiert. Dabei wurden mit Methanol die violetten Farbstoffe in der Reihenfolge 2, 3 und 4 eluiert. Die Mischfraktionen wurden mittels präparativer Schichtchromatographie an Kieselgel (Fließmittelsystem B)) aufgetrennt.

Phlebiarubron (1): rote Nadeln vom Schmelzpunkt 235–236 °C, Lit. [2] 248–250 °C. –  $R_F$ : 0,51 (A), 0,91 (B), 0,97 (C). – MS (Ionenquellen-temperatur 220 °C):  $m/e$  = 306 (M<sup>+</sup> + 2, 38,6%); 304 (M<sup>+</sup>, 2,6); 129 (C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>O, 100); 118 (C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O, 55).

Die Verbindung erwies sich nach Schmp., Mischschmp.,  $R_F$ -Wert, IR-, <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum und MS als identisch mit synthetischem 1 [5]. Der in der Lit. [2, 5] angegebene Schmp. von 248–250 °C konnte nicht bestätigt werden.

4'-Hydroxyphlebiarubron (2): violette Kristalle, Schmp. 237–238 °C. –  $R_F$ : 0,37 (A), 0,68 (B), 0,48 (C). – UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  (log ε) = 500 (3,13), 352 (2,87) 273 nm (4,22). (+ NaOH: 585 nm). – IR (KBr): 3430 (m, br), 1650 (st), 1615 (m), 1365 (st), 1070 cm<sup>-1</sup> (m). – <sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  = 6,38 (s, OCH<sub>2</sub>O);

6,90 (,,d“,  $J = 8,5$  Hz, 3’, 5’-H); 7,35 (tt,  $J = 8$  und 2 Hz, 4”-H); 7,42 (td,  $J = 8$  und 2 Hz, 3”,5”-H); 7,53 (,,d“,  $J = 8,5$  Hz, 2’,6’-H); 7,63 (dd,  $J = 8$  und 2 Hz, 2”,6”-H). — MS (270 °C):  $m/e$  322,0846 ( $M^+ + 2$ , 100%); 320,0672 ( $M^+$ , ber. für  $C_{19}H_{12}O_5$  320,0685, 14,0); 292 ( $C_{18}H_{12}O_4$ , 48,1); 145 ( $C_9H_5O_2$ , 21,2); 134 ( $C_8H_6O_2$ , 23,1); 129 ( $C_9H_5O$ , 33,6); 121 ( $C_7H_5O_2$ , 6,7); 118 ( $C_8H_6O$ , 5,7).

*4’,4”-Dihydroxyphlebiarubron* (3): dunkelviolette Kristalle, Schmp. > 300 °C. —  $R_F$ : 0,26 (A), 0,50 (B), 0,20 (C). — UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\varepsilon$ ) = 530 (3,38), 382 (3,19), 276 nm (4,33); (+ NaOH): 628 nm. — IR (KBr): 3480 (st), 1630 (m), 1610 (st), 1292 (st), 1060  $\text{cm}^{-1}$  (m). —  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta = 6,35$  (s,  $OCH_2O$ ); 6,90, 7,52 (AA’BB’-System,  $J = 8$  Hz, 4 H). — MS (220 °C):  $m/e = 338,0796$  ( $M^+ + 2$ , ber. für  $C_{19}H_{14}O_6$  338,0791, 100%); 310 ( $C_{18}H_{14}O_5$ , 13,3); 175 ( $C_{10}H_7O_3$ , 7,8); 159 ( $C_{10}H_7O_2$ , 5,7); 147 ( $C_9H_7O_2$ , 6,2); 145 (13,5); 134 (8,5); 133 (5,6); 121 (10,5).

*3’,4’,4”-Trihydroxyphlebiarubron* (4): schwarz-violette Kristalle, Schmp. 242–244 °C. —  $R_F$ : 0,16 (A), 0,31 (B), 0,06 (C). — UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\varepsilon$ ) = 543 (3,58), 277 nm (4,51); (+ NaOH): Zersetzung. — IR (KBr): 3400 (st, br), 1640 (st), 1615 (st), 1362 (st), 1065 (m). —  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta = 6,32$  (s,  $OCH_2O$ ); 6,85 (d,  $J = 8,5$  Hz, 5’-H); 6,90 (,,d“,  $J = 8,5$  Hz, 3”,5”-H); 7,05 (dd,  $J = 8,5$  und 2 Hz, 6’-H); 7,20 (d,  $J = 2$  Hz, 2’-H); 7,52 (“d”,  $J = 8,5$  Hz, 2”,6”-H). — MS (230 °C):  $m/e = 354$  ( $M^+ + 2$ , 100%), 352,0586 ( $M^+$ , ber. für  $C_{19}H_{12}O_7$  352,0583, 6,50); 326 (9,9); 325 (5,2); 324 (13,1).

#### Darstellung von 3 aus Atromentin

162 mg (0,5 mmol) Atromentin (6) wurden in 50 ml wasserfreiem Aceton mit 553 mg (4 mmol)

trockenem Kaliumcarbonat und 440 mg (4 mmol) Methylensulfat [12] drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend filtrierte man den Feststoff ab, dampfte das Filtrat i. Vak. ein und kristallisierte den Rückstand aus Dioxan um. Nach Trocknen i. Vak. bei 70 °C Ausbeute 78 mg (46%), Schmp. > 300 °C. Die Verbindung erwies sich nach Schmp., Mischschmp., UV-,  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und MS als identisch mit dem Naturstoff.

#### Biologische Tests

Anzucht der Bakterien zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) erfolgte in Nutrient Broth (Difco) bei 37 °C. Die Impfdichte betrug  $10^6$  Zellen oder Sporen pro ml. Pilze wurden in Hefeextrakt-Malzextrakt-Glucose-Medium kultiviert. Zur Durchführung der Tests siehe [13, 14]. Als MHK wurde diejenige Konzentration gewertet, bei der nach 48 h kein Wachstum (Keimung der Sporen oder Zellvermehrung) zu beobachten war.

Tests auf Pflanzenwachstum-regulierende Aktivität wurden mit *Lepidium sativum* und *Setaria italica* durchgeführt.

#### Danksagung

Wir danken dem Bundesministerium für Forschung und Technologie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit und die Gewährung eines Bruker WM 400 NMR-Spektrometers, sowie U. Laubscher für wertvolle technische Mitarbeit.

- [1] 45. Mitteilung über Pilzpigmente. 44. Mitteilung: B. Steffan u. W. Steglich, Angew. Chemie, im Druck.
- [2] T. C. McMorris u. M. Anchel, Tetrahedron Lett. **1963**, 335.
- [3] J. Erikson, K. Hjortstam u. L. Ryvarden, The Corticiaceae of North Europe, **Bd. 6**, S. 1229, Fungiflora, Oslo 1981.
- [4] M. Moser, Die Gattung Phlegmacium, S. 59, J. Klinkhardt, Bad Heilbrunn 1960.
- [5] J. Gripenberg, Tetrahedron Lett. **1966**, 697.
- [6] R. D. Grigsby, W. D. Jamieson, A. G. McInnes, W. S. G. Maass u. A. Taylor, Can. J. Chem. **52**, 4117 (1974).
- [7] A. K. Bose, K. S. Khanchandani, P. T. Funke u. M. Anchel, Chem. Comm. **1969**, 1347.
- [8] R. Herrmann, Dissertation, Universität Bonn 1980.
- [9] M. Anchel, A. K. Bose, K. S. Khanchandani u. P. T. Funke, Phytochemistry **9**, 2335 (1970).
- [10] W. Quack, H. Scholl u. H. Budzikiewicz, Phytochemistry **21**, 2921 (1982).
- [11] Das von M. Akagi, J. Pharm. Soc. Japan **62**, 129 (1942), angegebene Vorkommen von Leucomelon in Fruchtkörpern von *Boletopsis subsquamosa* (= *B. leucopelma*) beruht auf einer Verwechslung mit Cycloleucomelon: E. Jägers u. W. Steglich, Publikation in Vorbereitung.
- [12] W. Baker, J. Chem. Soc. **1931**, 1765.
- [13] H. Zähner u. W. K. Maas, Biology of Antibiotics, S. 26, Springer, New York, Heidelberg, Berlin 1972.
- [14] H. Anke, H. Zähner u. W. König, Arch. Microbiol. **116**, 253 (1978).