

Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, XXVII [1]

Cyclopaldsäure und 3-O-Methyl-cyclopolsäure, zwei antibiotisch wirksame Substanzen aus *Aspergillus duricaulis*

Investigations on Metabolites of Microorganisms, XXVII [1]

Cyclopaldic Acid and 3-O-Methyl Cyclopolic Acid, Two Antibiotically Active Substances from *Aspergillus duricaulis*

Hans Achenbach*, Andreas Mühlenfeld, Benno Weber, Werner Kohl
und Gert-Ulf Brillinger⁺

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg, D-7800 Freiburg**
und

⁺ Lehrstuhl Mikrobiologie I, Universität Tübingen, D-7400 Tübingen
Z. Naturforsch. 37b, 1991, 1997 (1992) · 22. Dezember 1991

Z. Naturforsch. **37b**, 1091-1097 (1982); eingegangen am 28. Dezember 1981.

Aspergillus duricaulis, Cyclopadic Acid, Cyclopovic Acid Derivative
 3,5-Dihydroxy-4-formyl-7-methoxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranone [= cyclopaldic acid] (**1**) and 5-hydroxy-4-hydroxymethyl-3,7-dimethoxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranone [= 3-O-methyl cyclopovic acid] (**2**) were isolated from *Aspergillus duricaulis*; these compounds were found to be antibiotically active.

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war die Entdeckung, daß Extrakte des Schimmelpilzes *Aspergillus duricaulis* deutliche antibiotische Wirkung besitzen [2].

Das antibiotisch wirksame Prinzip befindet sich nach Abtrennen des Mycels im Kulturfiltrat. Es ist mit Essigsäureethylester extrahierbar und kann aus diesem Extrakt durch mehrfache Chromatographie an Sephadex LH 20 und Kieselgel als Reinsubstanz gewonnen werden. Dabei fällt neben dem Metaboliten A mit sehr ausgeprägter antibiotischer Aktivität [2] noch eine weitere, ebenfalls antibiotisch wirksame Substanz B an.

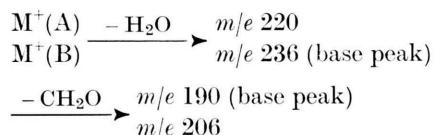
Metabolit A Schmp. 211–216 °C
C₁₁H₁₀O₆ (MW 238)

Substanz B Schmp. 155–157 °C
C₁₂H₁₄O₆ (MW 254)

Beide Verbindungen sind optisch inaktiv und besitzen ähnliche chromatographische und spektrale Eigenschaften.

Die Massenspektren zeichnen sich durch eine relativ geringe Fragmentierungstendenz aus. Die Molekülionen sind von mittlerer relativer Intensität und

zerfallen bevorzugt unter Eliminierung von H_2O und CH_2O in der Sequenz:



Nach Deuteriumaustausch erscheinen die Molekülen jeweils zwei Masseneinheiten nach höherer Masse verschoben, während die Fragmente maximal nur 1 Deuteriumatom enthalten: Die Moleküle besitzen demnach je zwei austauschbare Wasserstoffatome, von denen eines an der primären H₂O-Eliminierung beteiligt ist.

Die Intensität der Molekülionen, die geringe Fragmentierungstendenz und das große Kohlenstoff/Wasserstoff-Verhältnis der Elementarzusammensetzung verlangen in Übereinstimmung mit den Elektronenspektren eine aromatische Struktur.

Die Protonenresonanzspektren von A und B bestehen im wesentlichen aus Singulets. Die zu beobachtenden Signale und ihre Zuordnungen sind in Tab. I zusammengefaßt.

Die Bildung von Diacetyl-Derivaten als Hauptprodukte der Acetylierung beweist, daß sowohl A als auch B zwei acetylierbare OH-Gruppen enthalten, obwohl im Protonenresonanzspektrum von A nur ein entsprechendes Signal erkennbar ist.

Die dargelegten Befunde legen das Vorliegen hexasubstituierter Benzole nahe, was durch die ^{13}C -Resonanzspektren (s.u.) voll bestätigt wird.

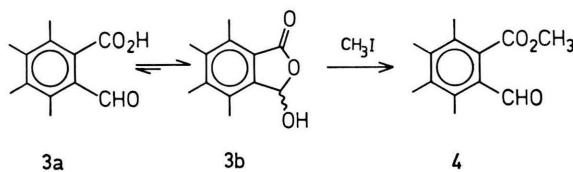
* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Achenbach.

** Neue Adresse:
Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie
Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie
Universität Erlangen-Nürnberg, Schuhstraße 19,
8520 Erlangen

Tab. I. Protonenresonanzsignale von Metabolit A, Substanz B und deren Diacetyl-Derivaten sowie die daraus abgeleiteten Strukturelemente.

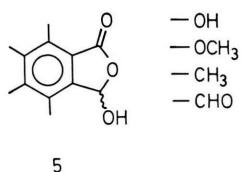
Metabolit A	Diacetyl-Derivat	Substanz B	Diacetyl-Derivat	Strukturelement in: A B
2,16 (3H, s)	2,17 (3H, s)	2,18 (3H, s)	2,03 (3H, s)	>-CH ₃ >-CH ₃
	2,21 (3H, s)		2,13 (3H, s)	
	2,51 (3H, s)		2,28 (3H, s)	
		2,8–3,8 (1H, breit)	—	-OH
		3,57 (3H, s)	3,67 (3H, s)	-OCH ₃
4,20 (3H, s)	4,35 (3H, s)	4,02 (3H, s)	4,13 (3H, s)	>-OCH ₃ >-OCH ₃
		4,86 (1H, d, J = 14 Hz)	4,93 (1H, d, J = 12 Hz) {	-CH ₂ -O-
		4,99 (1H, d, J = 14 Hz)	5,28 (1H, d, J = 12 Hz) }	
6,80 (1H, s)	7,69 (1H, s)	6,06 (1H, s)	6,40 (1H, s)	
		8,69 (1H, s)	—	
10,21 (1H, s)	10,02 (1H, s)			
12,29 (1H, s)	—			

Das Signal bei δ 6,80 ppm im Protonenresonanzspektrum von A spricht für das Strukturelement eines Acetals oder auch einer *o*-Phthalaldehydsäure **3**, die in neutralem Milieu ganz überwiegend in der 3-Hydroxy-phthalid-Form **3b** existiert.



Eine Bestätigung der Gruppierung **3b** in A liefert die Methylierung mit $\text{CH}_3\text{I}/\text{K}_2\text{CO}_3$: Dabei wird A in eine Dimethyl-Verbindung ($M^+ 266$, kein austauschbares H) überführt; das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt an, daß im Zuge der Methylierung neben einer (zweiten) Methoxy-Gruppe auch noch eine (zweite) Aldehyd-Funktion entstanden ist entsprechend der Umwandlung von **3** in einen *o*-Formylbenzoesäuremethylester **4** [3].

Für den Metaboliten A kommt man damit zum Strukturansatz **5**:



Die auffällig hohe Resonanzlage des CH_3 -Signals bei δ 8,1 ppm im $^{13}\text{C-NMR}$ (Tab. II) zeigt die *o,o*-

Substitution der Methyl-Gruppe mit den beiden verfügbaren Sauerstoffsubstituenten an [4, 5] und die ausgeprägte Tieffeldverschiebung des austauschbaren Protons bei δ 12,29 ppm im $^1\text{H-NMR}$ eine Wasserstoffbrücke zu einer benachbarten Carbonyl-Funktion.

Tab. II. $^{13}\text{C-NMR}$ -Signale von Metabolit A (**1**) und Substanz B (**2**).

C-Atom	Signal [ppm] Metabolit A	Substanz B
-CHO	194,7 (s)	—
C=O (C-1)	167,5 (s)	*
C-3	96,0 (d)	101,7 (d)
O-CH_3	63,1 (q)	62,2 (q)
OCH_3	—	56,1 (q)
CH_2OH	—	59,9 (t)
CH_3	8,1 (q)	8,7 (q)
Aromat. Ring**:		
C-3a	153,7 (s)	143,3 (s)
C-4	112,3 (s)	116,9 (s)
C-5	166,0 (s)	163,2 (s)
C-6	121,5 (s)	121,7 (s)
C-7	163,4 (s)	158,1 (s)
C-7a	111,0 (s)	109,7 (s)

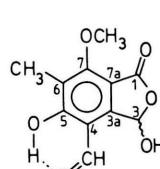
* Im Rauschen nicht eindeutig erkennbar; ** Argumente für die Zuordnung: Lit. [6].

Damit werden die Strukturalternativen für A auf die Formeln **1** und **5a** eingeschränkt. Denn bei $^1\text{H-NMR}$ -Messungen an anderen Verbindungen mit dem Strukturelement des 7-Hydroxy-phthalids,

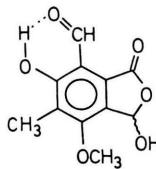
wie es in **5b** vorliegt, waren keine Wasserstoffbrücken nachweisbar [6]. Diese Befunde sind auch in Übereinstimmung mit früheren IR-spektroskopischen Untersuchungen [7].

Bei **5a** sollte – etwa durch Protonenkatalyse – eine Umwandlung zum Isomeren **5c** möglich sein; entsprechende Beobachtungen konnten aber nicht gemacht werden, was für A Struktur **1** nahelegt.

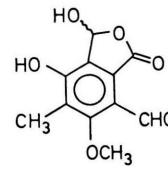
Daß keine freie 3-Hydroxy-phthalid-Gruppierung mehr in B vorliegen kann, zeigt auch das Ergebnis des Methylierungs-Versuches: Als Hauptprodukt entsteht ein Monomethyl-Derivat, in dem eine freie Aldehyd-Funktion nicht nachweisbar ist. Zu irritierenden Resultaten führen Hydrolyse-Experimente an Substanz B mit 20proz. Essigsäure: Unter formalem Verlust von CH₃OH bildet sich das



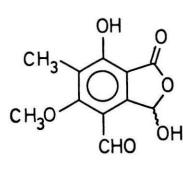
1



5a



5c



5b

1952 hat Birkinshaw über die Isolierung und Strukturaufklärung der Cyclopaldsäure (**1**) berichtet [8], für die aber ein deutlich höherer Schmelzpunkt (Schmp. 224/226 °C) angegeben wird; Kernresonanz- oder MS-Daten von **1** sind nicht verfügbar.

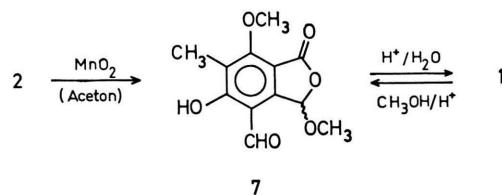
Wir haben daher ¹H{¹H}-NOE-Experimente durchgeführt. Diese beweisen die räumliche Nachbarschaft des Aldehyd-Protons mit H-(3) und legen damit Struktur **1** für den Metaboliten A fest.

Eine nach der Vorschrift von Birkinshaw durch Fermentation von *Penicillium cyclopium* Westling und anschließende Chromatographie gewonnene Substanz hat gleiche chromatographische und spektrale Eigenschaften (DC, MS, ¹H-NMR, UV, IR) wie der von uns isolierte Metabolit A. Die aus *P. cyclopium* gewonnene Substanz wurde unter acetylierenden Bedingungen in ein Gemisch aus Diacetat (Hauptprodukt) sowie Mono- und Tetraacetat (Nebenprodukte) überführt, die mit den entsprechenden Derivaten des Metaboliten A ebenfalls in jeder Beziehung übereinstimmen.

Vergleiche der ¹H-NMR- und der ¹³C-NMR-Spektren (Tab. I u. II) machen für die Substanz B Struktur **2** wahrscheinlich:

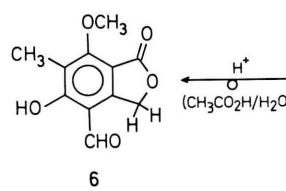
Lakton **6** mit einer freien Aldehyd-Gruppe. Dieser Befund entspricht Literaturangaben über protonenkatalysierte Umlagerungsreaktionen von 3-Hydroxy-4-hydroxymethyl-phthaliden zu 4-Formyl-phthaliden [9].

Zum Beweis der Struktur **2**, die als 3-O-Methyl-Derivat der bereits bekannten Cyclopolsäure [8, 9] aufzufassen ist, haben wir Substanz B in Cyclopaldsäure (**1**) überführt: Die Alkohol-Funktion kann – auch in Gegenwart der freien phenolischen Hydroxyl-Gruppe – mit MnO₂ zu **7** oxidiert werden. Das bei der Hydrolyse von **7** entstehende Produkt ist mit **1** identisch. Umgekehrt läßt sich **7** auch durch Erhitzen von Cyclopaldsäure in MeOH herstellen.

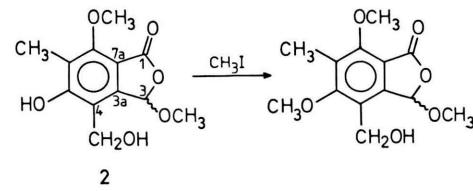


7

Während Cyclopaldsäure (**1**) u. W. bisher lediglich als Stoffwechselprodukt von *P. cyclopium* [8]



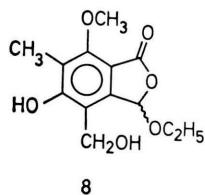
6



2

und *P. viridicatum* [10] bekannt ist, handelt es sich bei der 3-O-Methyl-cyclopolsäure (**2**) um eine bisher noch nicht beschriebene Verbindung. Unter den angewandten Fermentations- und Aufarbeitungsbedingungen fallen beide Substanzen in ungefähr gleicher Konzentration von etwa 1,2 mg/l Kulturmödium an.

Führt man die Aufarbeitung der Fermentation unter anderen Bedingungen – z. B. unter weitgehendem Ausschluß von Methanol – durch [6], so kann die Ausbeute an **2** erheblich zurückgehen; und wir haben in einem solchen Fall dann die 3-O-Ethyl-cyclopolsäure (**8**) in größerer Menge isoliert*.



Diese Beobachtung wird verständlich durch die recht empfindliche Lactolether-Gruppierung in **2** und **8**: Bereits beim Stehen von **2** in Ethanol (14 h, Raumtemp., pH 4) erfolgt weitgehende Umalkylierung zu **8**.

Da wir außerdem weder an **2** noch an **8** optische Aktivität feststellen konnten, liegt der Verdacht nahe, daß diese 3-O-Alkyl-Verbindungen erst unter den Bedingungen der Aufarbeitung aus Cyclopolsäure bzw. einem entsprechenden (aktivierten?) Cyclopolsäure-Derivat entstehen.

Wie die biologischen Tests zeigen, wird die ausgeprägte antibiotische Wirkung der Cyclopaldsäure (**1**), die Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war [2], bei der Strukturänderung zur 3-O-Methyl-cyclopolsäure (**2**) deutlich abgeschwächt: Während **1** gegen *Bacillus subtilis*, *B. brevis*, *Streptomyces antibioticus* und *Paecilomyces variotii* wirksam ist, hemmt **2** nur noch das Wachstum von *B. subtilis* und *B. brevis*. Aber auch an diesen Organismen findet man beim Diffusionsplattentest im Vergleich mit **1** nur noch etwa 50% der Aktivität.

Es sollte darauf hingewiesen werden, daß über eine deutliche fungistatische Wirkung von **1** und eine entsprechende sehr viel schwächere Aktivität von Cyclopolsäure früher einmal berichtet worden ist [11].

* Die Ethyl-Gruppe dürfte aus dem zur Extraktion benutzten Essigsäureethylester stammen.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Kofler-Heiztischmikroskop (Reichert) unkorrigiert. – IR-Spektren (in KBr – falls nicht anders vermerkt): Infrarot-Spektrophotometer 457 (Perkin-Elmer). – Elektronenspektren (MeOH p.a.): Spektralphotometer DMR 21 (Zeiss). – ¹H-NMR-Spektren: FT-Kernresonanzspektrometer WM 250 (Bruker-Physik); Lösungsmittel – falls nicht anders vermerkt: Deuteriochloroform; innerer Standard: Tetramethylsilan. – ¹³C-NMR-Spektren: FT-Kernresonanzspektrometer WP 80 (Bruker-Physik) und WM 250 (Bruker-Physik); Lösungsmittel: Hexadeuteroaceton; innerer Standard: Tetramethylsilan. – Massenspektren – falls nicht anders vermerkt: MAT 312 (Finnigan-MAT) durch Elektronenstoß mit 70 eV; Ionenquellentemperatur ca. 200 °C; Einlaßsystem: Schubstange. Die Daten sind im allgemeinen aufgeführt für *m/e* > 100 und für relative Intensitäten > 10%. – Hochauflöste MS-Daten: Mit dem gleichen Instrument durch Peak-matching bei *M*/*A*₁*M* = 10000. – Drehwerte (Aceton p.a.): Polarimeter 241 (Perkin-Elmer). – Gaschromatographie (GC): Gerät 5750 (Hewlett-Packard); Detektor: WLD; 2-m-Säulen aus Glas (1/8") mit 2,5% SE 52 auf Chromosorb W (AW-DMCS 60/80 mesh); Trägergas He (ca. 100 ml/min); Einspritzblock 235 °C; Detektor 300 °C.

Präparative Dünnsschichtchromatographie (DC): Platten mit Kieselgel P/UV₂₅₄ (Macherey–Nagel), Schichtdicke 0,5 mm. Nach Lufttrocknung erfolgt die Aktivierung bei 105 °C/30 min. Detektion: Anisaldehyd-Reagens Nr. 15 nach Stahl [12] bzw. UV-Lösung; Laufmittel – falls nicht anders vermerkt: CCl₄/MeOH/Aceton (85:2,5:12,5/v:v:v).

Analytische DC: Nanoplatten SIL-20/UV₂₅₄ (Macherey–Nagel); Laufmittel – falls nicht anders vermerkt: wie oben.

Herkunft und Fermentation von *Aspergillus duricaulinus*

Die Fermentation erfolgte, wie früher beschrieben [2].

Herstellung des Rohextraktes

Aus 100 ml Fermentationsmedium wurde das Mycel ohne Filterhilfsmittel durch Pressen abgetrennt und verworfen. Das angefallene braun-gelbe Kulturfiltrat (90 l, pH 3,8) wurde mit 1 N NaOH (ca. 2 l) neutralisiert und dann dreimal mit je 9 l Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden unter verminderter Druck einrotiert und im Exsiccator über Blaugel im Dunkeln getrocknet; Ausbeute: 9 g Rohextrakt.

Herkunft und Fermentation von *Penicillium cyclopium*

Penicillium cyclopium Westling var. *album* G. Smith (CBS Nr. 343.51) wurde von Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande (= CBS) bezogen.

Die Fermentation erfolgte wie beschrieben [8] durch Animpfen der Standkulturen mit Sporen, die von 14 Tage alten Schrägröhrchen abgeschwemmt wurden. Nach 14-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 24 °C wurde die Substanz aus dem Kulturfiltrat nach Vorschrift [8] isoliert. Aus 1,6 l Kulturfiltrat erhielten wir 16,6 mg rohe Cyclopaldsäure.

Plattendiffusionstest auf antibiotische Wirkung

Die Tests wurden in der üblichen Weise [13] durchgeführt: *Bacillus subtilis* wurde auf synthetischem Medium getestet [2]; für *B. brevis* wurde Hefemalzagar eingesetzt (Hefeextrakt (Fa. Difco) 4 g, Malzextrakt (Fa. Difco) 10 g, Glukose 4 g, Agar 20 g, demineralisiertes Wasser ad 1000 ml); für *Streptomyces antibioticus* wurde der gleiche Hefemalzagar verwendet, aber zusätzlich vor dem Sterilisieren mit NaOH neutralisiert; *Paecilomyces variotii* wurde auf Malzagar getestet (Malzagar, (Fa. Difco) 20 g, Agar 20 g, demineralisiertes Wasser ad 1000 ml).

Chromatographie des Rohextraktes aus der Fermentation von *Aspergillus duricaulis*

Der Rohextrakt wurde in zwei Anteilen (je 4,6 g) über eine Sephadex LH 20-Säule (Füllhöhe: 90 cm; \varnothing 35 mm) mit Ethylenchlorid/Ethanol (63:37/v:v) in 60 Fraktionen à 23 ml aufgetrennt. Nach DC-Kontrolle haben wir zu 3 Fraktionen vereinigt:

- Frakt. 15–29: 2,5 g Ia
- Frakt. 30–36: 2,7 g Ib
- Frakt. 37–54: 0,75 g Ic

Die eingegangene Fraktion Ib wurde in Ether gelöst, filtriert und an Kieselgel 60 (Macherey–Nagel; Füllhöhe: 90 cm; \varnothing 35 mm) chromatographiert. Elution mit 2 l CCl_4/MeOH (95:5/v:v) und dann 1 l $\text{CCl}_4/\text{MeOH}/\text{Aceton}$ (90:5:4/v:v:v) ergab 135 Fraktionen à 22 ml, die wir aufgrund von DC-Kontrolle wie folgt vereinigt haben:

- Frakt. 57–69: 2,0 g IIa
- Frakt. 73–84: 0,1 g IIb
- Frakt. 88–104: 0,4 g IIc
- Frakt. 119–135: 0,2 g IId

Isolierung des Metaboliten A (= Cyclopaldsäure) – 3,5-Dihydroxy-4-formyl-7-methoxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranon (I)

Nach Umkristallisieren von Fraktion IIId aus CHCl_3 und dann $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ fielen 56 mg Cyclopaldsäure vom Schmp. 211–216 °C an (Lit. [8]: 224 bis 226 °C). – DC: R_f 0,11; Anisaldehyd: keine Anfärbung. – MS: m/e (%) = 238(51, M^+), 221(12), 220(82), 193(11), 192(17), 191(19), 190(100), 164(14), 163(12), 162(22), 136(10), 135(14), 134(15), 106(14). – Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 238,0478 = $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_6(\text{M}^+)$; 220,0363 = $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5$; 190,0267 = $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_4$. – UV: $\lambda_{\max}(\lg \epsilon)$ = 325 sh (3,1), 275 sh (3,9), 243,5 (4,3) nm; mit KOH reversibler Shift nach 380 (3,2) nm. – IR:

$\nu_{\max} = 1740$ sh, 1730 (CO), 1645, 1620, 1580 cm^{-1} . – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz): s. Tab. I.

$^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ -NOE-Differenzspektroskopie (in CD_2Cl_2):

Durch Einstrahlung bei:	Positiver Effekt bei:
δ 2,18	δ 4,18
3,99	10,23
4,18	2,18
6,81	10,23

$^{13}\text{C-NMR}$ (62,8 MHz): s. Tab. II.

Isolierung der Verbindung B (= 3-O-Methyl-cyclopolsäure) – 3,7-Dimethoxy-5-hydroxy-4-hydroxymethyl-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranon (2)

Fraktion IIb enthielt reine 3-O-Methyl-cyclopolsäure (2), die mit Schmp. 155–157 °C anfiel. – $[\alpha]_D \pm 0^\circ$ ($c = 0,4$ in Aceton). – DC (Chloroform/Methanol = 98:2): R_f 0,22; Anisaldehyd: braun. – MS: m/e (%) = 254(63, M^+), 237(16), 236(100), 223(34), 222(68), 221(41), 220(10), 208(14), 207(24), 206(72), 205(28), 204(37), 194(14), 193(34), 192(21), 191(50), 190(10), 179(10), 178(25), 177(68), 176(41), 175(12), 165(13), 164(15), 163(29), 150(14), 149(45), 148(28), 147(12), 135(13), 121(17), 120(12), 119(10), 107(13), 106(10). – Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 254,07843 = $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_6(\text{M}^+)$. – UV: $\lambda_{\max}(\lg \epsilon)$ = 303 sh (3,3), 264 (4,0), 220 (4,4), mit KOH shift nach 309 (4,3), 241 (4,0), 218 (4,2) nm. – IR: $\nu_{\max} = 1740$ (CO), 1630 sh, 1600 cm^{-1} ; IR (CHCl_3): $\nu_{\max} = 1765$ (CO), 1600 cm^{-1} . – $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz): s. Tab. I; $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ -Differenzspektroskopie (in Aceton-D₆): Einstrahlung bei δ 4,96 ergab positiven Effekt bei δ 6,25 und Einstrahlung bei δ 3,50 positiven Effekt bei δ 4,92, δ 4,99 sowie δ 6,25. – $^{13}\text{C-NMR}$ (62,8 MHz): s. Tab. II.

Methylierung von I zu 2,3-Diformyl-4,6-dimethoxy-5-methylbenzoësäure-methylester

4 mg I wurden in 4 ml wasserfreiem Aceton mit einer Spatelspitze wasserfreiem K_2CO_3 und 1 ml Methyliodid zwei Stunden zum Sieden erhitzt. Nach Filtrieren und Einengen wurde das Produkt gas-chromatographisch isoliert. (Temperaturprogramm: 8 °C/min ab 160 °C); Ausbeute: 1,2 mg farbloses Öl; Durchbruchstemperatur (T_D): 192 °C. – MS (CH_4): m/e (%) = 266(65, M^+), 265(10), 251(75), 236(12), 235(60), 234(100), 207(14), 205(12), 178(27), 177(12), 176(14). – $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz): δ = 10,40 (1H, s), 10,28 (1H, s), 4,0 (6H, breit), 3,93 (3H, s), 2,38 (3H, s).

Acetylierung von I

5 mg I wurden mit 3 ml Acetanhydrid/Pyridin (60:40/v:v) versetzt und 8 h bei Raumtemp. stehen gelassen. Nach mehrmaligem Einengen i. Vak. unter

Chloroformzusatz wurde das Produktgemisch gas-chromatographisch aufgetrennt. (Temperaturprogramm: 8 °C/min ab 190 °C). Dabei fielen an:

a) Cyclopaldsäure-monoacetat –

3-Acetoxy-4-formyl-5-hydroxy-7-methoxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranon

Ausbeute: ca. 2 mg (ca. 35%) farbloses Öl; $T_D = 200$ °C. – MS (CH₄): m/e (%) = 280(15, M⁺), 221(38), 220(100), 192(25), 190(12). – UV: $\lambda_{\max}(\lg \epsilon)$ = 358 (3,2), 295 sh (3,8), 247 (4,4) nm; mit KOH shift nach 358 (3,7), 300 (4,1), 260 nm (4,3). – IR (CHCl₃): $\nu_{\max} = 1778$ (CO), 1648 cm⁻¹ (CO). – ¹H-NMR (90 MHz): $\delta = 12,15$ (1H, s), 9,87 (1H, s), 7,61 (1H, s), 4,27 (3H, s), 2,23 (3H, s), 2,21 (3H, s).

b) Cyclopaldsäure-diacetat –

3,5-Diacetoxy-4-formyl-7-methoxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranon

Ausbeute: ca. 1 mg (ca. 15%): $T_D = 210$ °C. – Schmp.: 153–156 °C. – MS (CH₄): m/e (%) = 262 (42, Ion höchster Masse), 221(38), 220(100), 192(34). – UV: $\lambda_{\max} = 257$ sh, 225 nm; mit KOH shift nach 309, 229 sh, 217 nm. – IR (CHCl₃): $\nu_{\max} = 1770$ (CO), 1600 cm⁻¹. – ¹H-NMR (90 MHz): s. Tab. I.

c) Cyclopaldsäure-tetraacetat –

3,5-Diacetoxy-4-diacetoxymethin-7-methoxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranon

Ausbeute: ca. 1 mg (ca. 15%) farbloses Öl; $T_D = 230$ °C. – MS (CH₄): m/e (%) = 424 (2, M⁺), 322(11), 263(23), 262(51), 221(41), 220(100), 192(21). – UV: $\lambda_{\max} = 292$, 235 sh, 215 nm; mit KOH shift nach 310, 243, 225 sh, 214 sh nm. – IR (CHCl₃): $\nu_{\max} = 1772$ cm⁻¹ (CO). – ¹H-NMR (90 MHz): $\delta = 7,92$ (1H, s), 7,66 (1H, s), 4,18 (3H, s), 2,46 (3H, s), 2,23 (3H, s), 2,19 (3H, s), 2,16 (3H, s), 2,08 (3H, s).

Methylierung von **2** zu *4-Hydroxymethyl-3,5,7-trimethoxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranon*

15 mg **2** wurden in 10 ml Aceton mit 0,5 ml Methyliodid wie **1** methyliert und aufgearbeitet; Reinigung durch präparative DC mit Standardlaufmittel; Ausbeute: 5 mg (32%). – Schmp.: 95–97 °C (aus CCl₄/Petrolether). – DC: R_f 0,45; Anisaldehyd: braun. – MS (MAT 44): m/e (%) = 268(87, M⁺), 250(28), 238(11), 237(74), 236(74), 235(100), 223(10), 221(28), 220(11), 219(25), 218(69), 209(31), 207(52), 206(29), 205(56), 193(14), 191(22), 190(35), 189(12), 179(14), 177(25), 175(22), 165(11), 164(11), 163(18), 162(23), 161(22), 160(10), 150(11), 149(20), 148(11), 147(13), 135(16), 134(11), 133(15), 121(14), 119(15), 107(13), 106(10), 105(18), 103(10). – UV: $\lambda_{\max} = 295$, 250 nm; kein shift mit KOH. – IR (CHCl₃): $\nu_{\max} = 1770$ (CO), 1610 sh, 1600 cm⁻¹. – ¹H-NMR (250 MHz): $\delta = 6,25$ (1H, s), 4,74 (1H, d, $J = 12$ Hz), 4,60 (1H, d, $J = 12$ Hz), 4,04 (3H, s), 3,84 (3H, s), 3,70 (3H, s), 2,22 (3H, s).

*Acetylierung von **2** zu 5-Acetoxy-4-acetoxymethyl-3,7-dimethoxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranon*

5 mg **2** wurden bei Raumtemp. 24 h in 1 ml Acetanhydrid/Pyridin (1:1) stehen gelassen. Nach Einengen i. Vak. haben wir durch präparative DC mittels Zweifachentwicklung gereinigt. Standardlaufmittel; Ausbeute: 4 mg (60%). – DC: R_f 0,86; Anisaldehyd: braun. – MS (MAT 44): m/e (%) = 338 (2, M⁺), 306(8), 278(10), 264(15), 237(17), 236(100), 223(15), 222(20), 221(21), 208(18), 207(15), 206(49), 204(16), 193(14), 191(13), 178(11), 177(21), 176(11), 163(11), 149(11). – UV: $\lambda_{\max}(\lg \epsilon)$ = 292 (3,4), 239 nm (3,9); mit KOH shift nach 310 (4,4), 242 nm (4,1) (nicht reversibel!). – IR (CHCl₃): $\nu_{\max} = 1770$, 1740 sh, 1615, 1600 cm⁻¹. – ¹H-NMR (250 MHz): s. Tab. I.

*Umsetzung von **2** zu 4-Formyl-5-hydroxy-7-methoxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranon (6)*

5 mg **2** wurden in 10 ml wäßriger Essigsäure (20%) 30 min zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Produkt mit Chloroform extrahiert und durch präparative DC gereinigt (Benzol/Essigsäure-ethylester = 80:20); Ausbeute: 3 mg (69%). – DC (Chloroform/Methanol = 98:2): R_f 0,68; Anisaldehyd: keine Anfärbung. – MS: m/e (%) = 222 (48, M⁺), 204(28), 194(14), 193(27), 192(48), 189(14), 177(12), 176(52), 165(12), 164(49), 150(10), 149(13), 148(41), 147(14), 136(15), 135(19), 121(14), 120(22), 119(14), 107(20), 105(14). – UV: $\lambda_{\max}(\lg \epsilon)$ = 292 sh (3,7), 260 sh (4,1), 246 nm (4,3), mit KOH reversibler shift nach 360 (3,3), 293 (3,8), 259 nm (4,0). – IR: $\nu_{\max} = 1765$, 1650, 1620, 1595 cm⁻¹. – ¹H-NMR (250 MHz): $\delta = 12,07$ (1H, s), 9,90 (1H, s), 5,51 (2H, s), 4,21 (3H, s), 2,16 (3H, s).

3-O-Ethyl-cyclopolsäure –

3-Ethoxy-5-hydroxy-4-hydroxymethyl-7-methoxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranon (8)

Isolierung s. Lit. [6]. Schwach gelbliche Kristalle vom Schmp. 117–120 °C (Diisopropylether). – $[\alpha]_D^{20} \pm 0^\circ$ ($c = 8,4$ in Aceton); CD: Kein Effekt meßbar. – DC (Chloroform/Methanol = 98:2): R_f 0,29; Anisaldehyd: braun. – MS: m/e (%) = 268 (85, M⁺), 250(55), 223(52), 222(95), 221(100), 207(10), 206(38), 205(29), 204(32), 194(17), 193(44), 192(18), 191(69), 178(32), 177(58), 176(31), 165(11), 164(18), 163(27), 150(14), 149(47), 148(19), 135(12), 121(17), 119(10), 107(14), 106(11). – Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 268,09532 = C₁₃H₁₆O₆ (M⁺), 221,04477 = C₁₁H₉O₅. – UV: $\lambda_{\max}(\lg \epsilon)$ = 292 (3,5), 284 (3,4), 242 (3,9) nm. Mit KOH reversibler shift nach 310 (4,4), 244 (4,1), 218 sh (4,3), 214 (4,5) nm. – IR (CHCl₃): $\nu_{\max} = 1765$, 1745 sh (C=O), 1610 sh, 1600 cm⁻¹. – ¹H-NMR (250 MHz): $\delta = 8,99$ (1H, s), 6,03 (1H, s), 4,94 (1H, d, breit, $J = 14$ Hz), 4,83 (1H, d, breit, $J = 14$ Hz), 3,98 (3H, s), 3,91 (1H, dq, $J_1 = 9,5$, $J_2 = 7$ Hz), 3,77 (1H, dq, $J_1 = 9,5$, $J_2 = 7$ Hz), 3,56 (1H, s, breit), 2,12 (3H, s), 1,28 (3H, t, $J = 7$ Hz).

¹H{¹H}NOE-Differenzspektroskopie (in Aceton-d₆):

Durch Einstrahlung bei: Positiver Effekt bei:

δ 2,11	δ 3,98
3,98	2,11
5,01	6,35
6,35	4,96 und 5,06

(CHCl₃): ν_{max} = 1775 (CO), 1650, 1620, 1580 cm⁻¹. – ¹H-NMR (250 MHz): δ = 12,20 (1H, s), 10,04 (1H, s), 6,41 (1H, s), 4,20 (3H, s), 3,66 (3H, s), 2,16 (3H, s).

Hydrolyse von **7** zu **1**

0,5 mg **7** wurden in wenigen Tropfen MeOH gelöst und dann mit 2 ml H₂O unter Zusatz von 1 Tropfen 2 N HCl 24 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Einengen i. Vak. erhielt man durch DC als Hauptprodukt (ca. 80%) **1** neben wenig Ausgangsmaterial. Identifizierung durch Misch-DC (Chloroform/Methanol = 98:2 und Petrolether/Essigsäureethylester = 6:4) sowie MS.

Methylierung von **1** zu 3-O-Methyl-cyclopaldsäure (**7**)

30 mg **1** wurden in 3 ml Methanol unter Zusatz von 1 Tropfen Essigsäure zum Sieden erhitzt. Nach 48 h wurde die Hauptkomponente, die sich mit etwa 70% Umsatz gebildet hatte, gaschromatographisch abgetrennt (Temperaturprogramm: 20 °C/min ab 160 °C). Sie war identisch mit dem Oxidationsprodukt **7** aus **2**.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für Sachbeihilfen.

¹³C-NMR (20,15 MHz): δ = 166,8 (s), 163,0 (s), 157,9 (s), 143,6 (s), 121,4 (s), 116,6 (s), 109,6 (s), 100,8 (d), 65,4 (t), 62,2 (q), 59,9 (t), 15,4 (q), 8,7 (q).

*Oxidation von **2** zu 3,7-Dimethoxy-4-formyl-5-hydroxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranon (= 3-O-Methyl-cyclopaldsäure) (**7**)*

3 mg **2** wurden in 10 ml Aceton mit je 10 mg MnO₂ (gefällt, aktiv) und Natriumacetat versetzt und 60 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Filtration wurde an 5 g Kieselgel (1 cm Ø) mit Chloroform/Methanol (98:2) chromatographiert; Ausbeute: 0,8 mg (27%). – Schmp.: 142–144 °C. – DC (Chloroform/Methanol = 98:2): R_f 0,82; Anisaldehyd: braun. – MS: m/e (%) = 252 (21, M⁺), 221 (39), 220 (100), 193 (16), 192 (24), 191 (16), 190 (77), 163 (11), 162 (14), 135 (11). – UV: λ_{max} (lg ε) = 325 sh (3,1), 276 sh (3,8), 244 nm (4,3); mit KOH reversibler Shift nach 365 (3,5), 300 (4,0), 257 nm (4,2). – IR

- [1] XXVI. Mitteil.: W. Kohl, H. Achenbach und H. Reichenbach, Phytochemistry im Druck.
- [2] G. U. Brillinger, W. Heberle, B. Weber und H. Achenbach, Arch. Microbiol. **116**, 245 (1978).
- [3] J. Kagan, J. Org. Chem. **32**, 4060 (1967).
- [4] E. Pretsch, T. Clere, J. Seibl und W. Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1981.
- [5] Y. Tsuda, S. Nakajima, S.-I. Udagawa und J. Uzawa, J. Nat. Prod. **43**, 467 (1980).
- [6] H. Achenbach, A. Mühlenfeld, B. Weber und G. U. Brillinger, Liebigs Ann. Chem., in Vorbereitung.
- [7] L. A. Duncanson, J. F. Grove und J. Zealley, J. Chem. Soc. **1953**, 1331.
- [8] J. H. Birkinshaw, H. Raistrick, D. J. Ross und C. E. Strickings, Biochem. J. **50**, 610 (1952).
- [9] L. A. Duncanson, J. F. Grove und J. Zealley, J. Chem. Soc. **1953**, 3637.
- [10] R. H. Sankhala, J. Sci. Ind. Res. [New Delhi], Sect. C **16**, 118 (1957).
- [11] G. Smith, Biochem. J. **50**, 629 (1952).
- [12] E. Stahl, Dünnenschichtchromatographie, 2. Aufl., S. 817, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.
- [13] H. Zähner und W. K. Maas, Biology of Antibiotics, Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin 1972.