

Hans Brockmann und Peter Boldt

Actinomycine, XXXII¹⁾

Oxydative Abspaltung des β -Pentapeptidlactonringes aus Actinomycin C₂ und C₃; ein Beweis für die Bis-pentapeptidlacton-Struktur der Actinomycine

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 16. Dezember 1967)

■
Oxydation von 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycin C₃ und C₂ (**1c** und **1d**) liefert *N*-Oxal-cyclo-[L-Thr-D-Alle-L-Pro-Sar-L-MeVal-O_{Thr}] (**3a**); ein Beweis, daß die zehn Aminosäuren von Actinomycin C₃ und C₂ zu zwei Pentapeptidlacton-Gruppen gehören (**1**) und nicht zu einem Decapeptid-dilacton-Ring (**2**).

■
Actinomycin C₃ ist der erste Vertreter der Actinomycingruppe gewesen, dessen Struktur durch stufenweise Hydrolyse soweit aufgeklärt wurde^{2,3)}, daß Formel **1a** vorgeschlagen werden konnte⁴⁾. Obgleich auch **2a** — mit Decapeptidring und dem Chromophor als Brücke — mit den Ergebnissen der Hydrolyse in Einklang stand, wurde **1a** bevorzugt, weil einige Befunde dafür sprachen, daß bei der Actinomycin-Biogenese zwei Moleküle eines *N*-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptidlactons oxydativ miteinander kondensiert werden⁵⁾.

Demgegenüber hat Warner⁶⁾ an Kalottenmodellen gezeigt, welche Überlegungen und Beobachtungen sich zugunsten der Decapeptidformel **2a** anführen lassen.

Daß Actinomycin C₃ und C₂ (**1a** und **1b**) zwei Pentapeptidlacton-Ringe enthalten, ist bewiesen worden durch oxydativen Abbau von 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycin C₃ und C₂ (**1c** und **1d**)³⁾, über den hier ausführlicher berichtet wird⁷⁾; ferner durch Synthese⁸⁾, deren Einzelheiten Mitteilung XXXIII bringt.

¹⁾ XXXI. Mittel.: H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. 101, 1312 (1968).

²⁾ H. Brockmann, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] 18, 1 (1963).

³⁾ H. Brockmann, Angew. Chem. 72, 939 (1960).

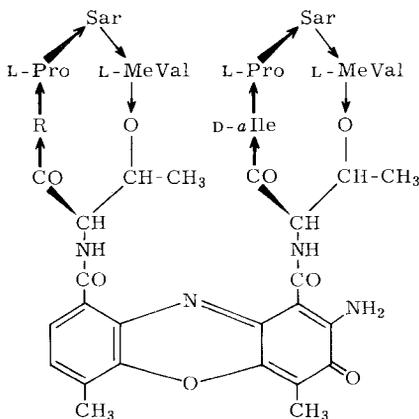
⁴⁾ H. Brockmann, G. Bohnsack, B. Franck, H. Gröne, H. Muxfeldt und C. Siling, Angew. Chem. 68, 70 (1956).

⁵⁾ J. H. Manegold, Dissertat., Univ. Göttingen 1959.

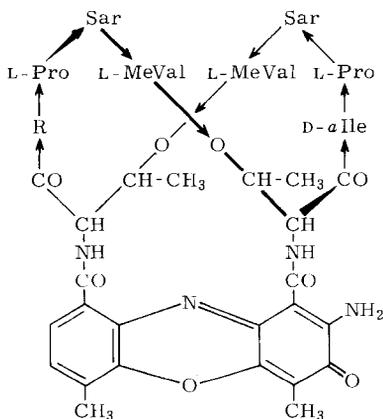
⁶⁾ D. T. Warner, Nature [London] 190, 120 (1961).

⁷⁾ Vorläuf. Mittel.: H. Brockmann und P. Boldt, Naturwissenschaften 50, 19 (1963).

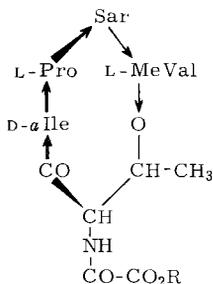
⁸⁾ Vorläuf. Mittel.: H. Brockmann und H. Lackner, Tetrahedron Letters [London] 1964, 3517.



- 1a:** R = D- α Ile
b: R = D-Val
c: R = D- α Ile; OH statt NH₂
d: R = D-Val; OH statt NH₂



- 2a:** R = D- α Ile
b: R = D-Val
c: R = D- α Ile; OH statt NH₂
d: R = D-Val; OH statt NH₂



- 3a:** R = H
b: R = CH₃

Versuche, die Bis-pentapeptidylacton-Struktur der Actinomycine durch Röntgen-Strukturanalyse zu bestätigen, waren bisher erfolglos^{9,10,11}). Für weitere Arbeiten empfehlen sich Derivate mit schwerem Atom, wie die leicht zugänglichen 7-Brom-actinomycine¹²).

Bei Oxydation der Actinomycine war zu erwarten, daß der chinoide Ring des Chromophors bevorzugt angegriffen wird und daher, wenn **1a** gilt, mindestens der β -Peptidring in Form eines einfachen *N*-Acyl-Derivates anfällt. Anstelle von Ozon¹³) verwendeten wir als Oxydationsmittel Wasserstoffperoxid in Essigsäure und statt **1a** das daraus fast quantitativ zugängliche 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycin C₃ (**1c**)¹⁴); in der Annahme, daß dessen chinoider Chromophorring noch leichter oxydierbar sein würde als der von **1a**.

⁹) H. G. Bachmann und W. Müller, Nature [London] **201**, 261 (1964).

¹⁰) H. T. Palmer, R. A. Palmer und R. E. Dickinson, Nature [London] **202**, 1052 (1964).

¹¹) M. F. Perutz, Nature [London] **201**, 814 (1964).

¹²) H. Brockmann, J. Amann und W. Müller, Tetrahedron Letters [London] **1966**, 3595.

¹³) G. Pampus, unveröffentlicht. Im Gegensatz zu Wasserstoffperoxid oxydiert Ozon die Prolylreste von **1a** zu Glutaminyl- und in geringerem Umfang zu Asparaginyresten.

¹⁴) H. Brockmann und B. Franck, Chem. Ber. **87**, 1767 (1954).

In Eisessig/30proz. Wasserstoffperoxid (10:1) gab **1c** nach 140 Std. bei 20° zu 95 Gew.-% ein blaßgelbes Oxydationsprodukt, das etwa zur Hälfte saure, mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat extrahierbare Anteile enthielt. Aus ihnen isolierten wir durch Chromatographie aus Chloroform/Butanol an Cellulose sowie am Anionen-Austauscher Dowex 1 X 8 mit steigendem Ameisensäuregradienten zu 36% eine amorphe, farblose, ninhydrinnegative Säure mit Äquiv.-Gew. 574, $[\alpha]_D^{20}$: -41.6° (in Methanol) und UV-Maximum bei 212 m μ . (Methanol). Sie zeigt noch die Lactonbande der Actinomycine bei 1745/cm (5.75 μ) und enthält laut Lactontitration je Äquiv.-Gew. eine Lactongruppe.

Totalhydrolyse des Oxydationsproduktes mit 6*n* HCl lieferte Oxalsäure und auf das Äquiv.-Gew. 568 bezogen je 1 Mol Threonin, *allo*-Isoleucin, Prolin, Sarkosin und *N*-Methyl-valin. Danach und nach den Analysenzahlen war das Abbauprodukt entweder das *N*-Oxal-pentapeptidlacton **3a** oder bei Gültigkeit von **2a** ein *N,N'*-Dioxal-decapeptid-dilacton. Die Entscheidung brachte die kryoskopische Mol.-Gew.-Bestimmung des mit Diazomethan dargestellten, kristallisierten Methylesters (Mittelwert in Dimethylsulfoxid^{15,16} 560¹⁷) und später dessen Massenspektrum¹⁸ (Molekülpeak bei *m/e* 581). Für das Abbauprodukt und dessen Methylester C₂₇H₄₃N₅O₉ (581.7) ist damit Formel **3a** bzw. **3b** bewiesen und für Actinomycin C₃ die Bis-pentapeptidlacton-Struktur **1a**.

In ähnlich guter Ausbeute wie aus **1c** erhielten wir auch aus 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycin C₂ (**1d**) **3a** und dessen kristallisierten Methylester **3b**. Die Stellung des Valin- und *allo*-Isoleucinrestes in der α - bzw. β -Aminosäuresequenz von Actinomycin C₂ (**1b**) ist bewiesen durch 1. Abbau zum Actinocinyl-L-Thr- $\frac{\text{D-Val-OH}}{\text{D-Alle-OH}}$ ^{19,20}, 2. Selektive Abspaltung der α -ständigen Aminosäuresequenz²¹) und 3. NMR-Spektrometrie²²). Aus dem Abbau von **1d** zu **3a** folgt demnach: 1. Nur der am chinoiden Ring des Chromophors stehende β -Peptidring eines 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycins wird unter unseren Versuchsbedingungen als *N*-Oxal-Derivat abgespalten. 2. Die Entstehung eines valinfreien Peptidlacton-Derivates beweist ohne Mol.-Gew.-Bestimmung, daß Actinomycin C₂ (**1b**) zwei Peptidringe enthält. 3. Bei *aniso*-Actinomycinen³), die im β -Peptidring keine oxydablen Aminosäuren wie Hydroxyprolin oder Oxoprolin enthalten, läßt sich durch oxydativen Abbau entscheiden, welche der beiden durch Partialhydrolyse ermittelten Aminosäuresequenzen dem α - und welche dem β -Peptidring zuzuordnen ist.

3b, das bei der Lactontitration zwei Äquiv. Alkalihydroxid verbraucht (Öffnung des Lactonringes und Verseifung der Methoxylgruppe), zeigt eine CO-Bande bei 1712/cm (5.84 μ), die den Actinomycinen fehlt und im **3a**-Spektrum als Schulter zu erkennen ist. Die Zuordnung

¹⁵) R. Schwyzer und P. Sieber, Helv. chim. Acta **41**, 2190 (1958).

¹⁶) Eine kryoskopische Mol.-Gew.-Bestimmung in Benzol ergab 1017.

¹⁷) Ein weiterer Beweis für die Brauchbarkeit des Dimethylsulfoxids.

¹⁸) Das Massenspektrum verdanken wir Herrn Prof. Dr. G. Spittler.

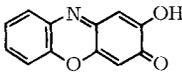
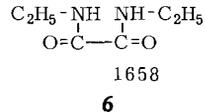
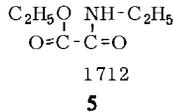
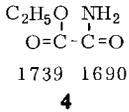
¹⁹) H. Brockmann und H.-S. Petras, Naturwissenschaften **48**, 218 (1961).

²⁰) H. Brockmann, H. Lackner, R. Mecke, S. v. Grunelius, H.-S. Petras und H. D. Berndt, Chem. Ber. **99**, 3672 (1966).

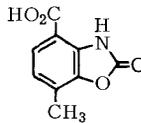
²¹) G. Döring, Dissertat., Univ. Göttingen 1960; V. Greul, Diplomarbeit, Univ. Göttingen 1967.

²²) H. Lackner, unveröffentlicht.

gelang durch Vergleich mit Oxamidsäure-äthylester (4), *N*-Äthyl-oxamidsäure-äthylester (5) und *N,N*-Diäthyl-oxamid (6). Die Amid-CO-Bande (1658/cm) von 6 liegt, wie für sekundäre Amide normal, bei kleineren Wellenzahlen als die des primären Amids 4 (1690/cm). Umgekehrt — und nicht ohne weiteres deutbar — findet man die Amid-CO-Bande (1712/cm) des sekundären 5 bei höheren Wellenzahlen. Die an gleicher Stelle liegende, den Actinomycinen fehlende 3b-Bande bei 1712/cm ist demnach dem Amidcarbonyl der Methoxalylgruppe zuzuschreiben und wird damit zum Indiz für sie.

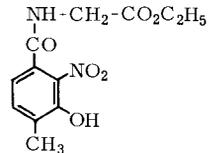


7



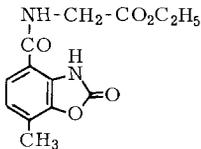
8a

8b: H statt CO₂H
und CH₃

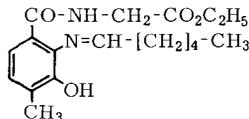


9a

9b: NH₂ statt NO₂



10



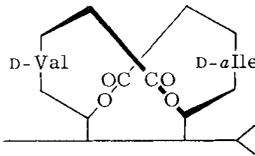
11

Welche Reste des 1c- bzw. 1d-Chromophors unter unseren Versuchsbedingungen am α -Peptidring verbleiben, ist unbekannt. *Bullock* und *Johnson*²³⁾ haben Actinomycin B, ein Gemisch der Actinomycine C₁ und X₂^{24, 25)}, mit alkalischem Wasserstoffperoxid zu einem Pentapeptidderivat abgebaut, das den benzoiden Ring des Chromophors als Rest der 7-Methylbenzoxazolone-(2)-carbonsäure-(4) (8a) enthält. In Einklang damit erhielten wir aus 2-Hydroxyphenoxazon-(3) (7) unter gleichen Bedingungen wie bei der Oxydation von 1c und 1d in 10proz. Ausbeute kristallisiertes Benzoxazolone (8b). Danach sollte der α -Peptidring von 1c und 1d als mit 8a *N*-acyliertes Pentapeptidlacton in der Neutralfraktion unserer 1c- und 1d-Oxydationsprodukte zu finden sein und sich wie 8a und die Modellverbindung 10 — dargestellt durch Reduktion von 9a zu 9b und Umsetzung von 9b mit Phosgen — durch ein Absorptionsmaximum bei 297 m μ zu erkennen geben. Tatsächlich ließen sich aus den neutralen 1c-Oxydationsprodukten chromatographisch Fraktionen mit Maximum bei 297 m μ (Methanol) abtrennen und aus den neutralen 1d-Oxydationsprodukten solche mit gleichem Maximum, die alle Aminosäuren des α -Peptidringes, aber nur sehr wenig *allo*-Isoleucin enthielten. Einheitliche Abbauprodukte konnten wir jedoch nicht isolieren; und ebensowenig aus Fraktionen, deren Absorptionsspektrum dem von 11 (aus 9b und Hexanal) ähnlich war.

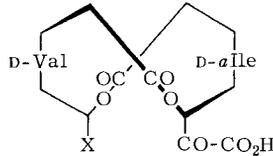
²³⁾ *E. Bullock* und *A. W. Johnson*, *J. chem. Soc. [London]* **1957**, 1620.

²⁴⁾ *H. Brockmann* und *J. H. Manegold*, *Chem. Ber.* **93**, 2971 (1960).

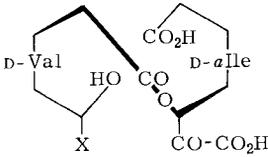
²⁵⁾ Der β -Peptidring von Actinomycin X₂ enthält γ -Oxoprolin und wird daher durch Wasserstoffperoxid angegriffen.



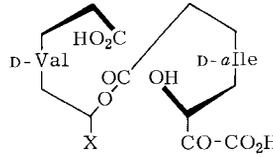
12



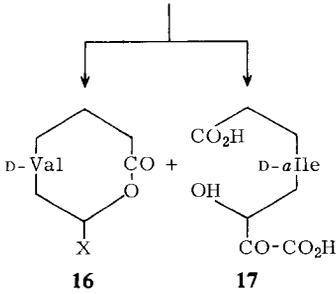
13



14

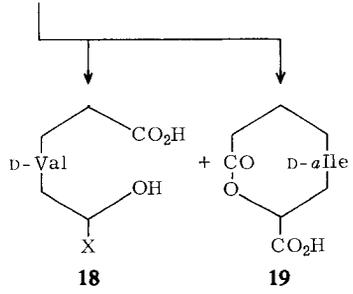


15



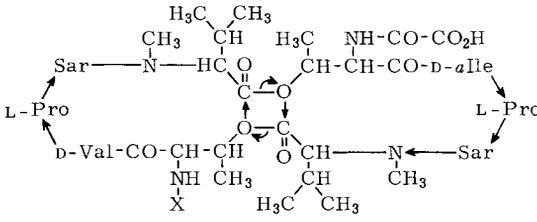
16

17



18

19



20

Der vorstehende Beweis für **1a** und **1b** setzt voraus, daß ein Decapeptidring wie in **2a** oder **2b** = **12** weder bei der Umwandlung ins 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycin **2c** bzw. **2d** noch bei der oxydativen Spaltung des **2c**- oder **2d**-Chromophors in zwei stabilere Pentapeptidlacton-Ringe übergeht. Bei der Umwandlung von Actinomycinen in 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycine, z.B. durch 140stdg. Einwirkung von 10proz. Salzsäure bei 20°¹⁴⁾ ändert sich die Peptidstruktur nicht. Denn 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycine lassen sich über 2-Desamino-2-chlor-actinomycine wieder in die Ausgangs-Actinomycine verwandeln²⁶⁾.

²⁶⁾ H. Brockmann, H. Gröne und G. Pampus, Chem. Ber. **91**, 1916 (1958).

Eine Ringverengung *nach* der Chromophorspaltung, bei der aus einem Oxydationsprodukt vom Typ **13** über **14** oder **15** die Pentapeptidlacton-Derivate **16** und **19** entstehen, würde verlangen, daß in Eisessig/Wasser (5:1) die eine Lactongruppe verseift und die andere mit dem Threoninhydroxyl umgeestert wird. Auch das läßt sich mit Sicherheit ausschließen, denn die Reaktionen $14 \rightarrow 16$ und $15 \rightarrow 19$ würden voraussetzen, daß *N*-Acyl-L-threonyl-tetrapeptidester in Eisessig/Wasser (5:1) zu *N*-Acyl-pentapeptid-lactonen cyclisieren, was nicht der Fall ist¹⁾. Ebenso wenig kann es bei der Verteilungs- und Austauscher-Chromatographie der Oxydationsprodukte von 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycinen zu einer derartigen Cyclisierung kommen.

Denkbar wäre dann nur noch, daß **13** aus der Konformation **20** in einer trans-anularen Vierzentren-Umesterung in zwei Pentapeptidlacton-Ringe übergeht. Abgesehen davon, daß es für eine derartige Umlagerung keine Parallele gibt, entfällt sie bei **20**, dem Kalottenmodell nach, aus sterischen Gründen.

Der oxydative Abbau von Actinomycin C₂ und C₃ über die Desamino-actinomycine **1d** und **1c** zum *N*-Oxal-cyclo-[L-threonyl-D-*allo*-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr}]²⁷⁾ (**3a**) ist somit ein Beweis für die Bis-cyclo-pentapeptid-Struktur von Actinomycin C₂ und C₃ (**1b** und **1a**).

Die 23 bisher kristallisiert isolierten Actinomycine sind sich chemisch und physikalisch sehr ähnlich. Die Biogenese dürfte bei allen die gleiche sein, da ein *Streptomyces*-Stamm fast immer mehrere Vertreter produziert. Beides stützt die bisherige Annahme, daß alle wie **1a** und **1b** eine Bis-cyclo-pentapeptid-Struktur haben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Förderung unserer Arbeit.

Beschreibung der Versuche²⁸⁾

N-Oxal-cyclo-[L-threonyl-D-*allo*-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr}] (**3a**) aus 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycin C₃ (**1c**): Zu einer unter Rühren mit 20 ccm 30proz. Wasserstoffperoxid versetzten Lösung von 4.0 g **1c** in 200 ccm Eisessig gab man nach 70 Stdn. nochmals 20 ccm Wasserstoffperoxid und zersetzte den Überschub nach weiteren 70 Stdn. bei maximal 25° mit Pd-Mohr. Nach Zusatz von 0.2 g Pd-Mohr hydrierte man bis zur Sättigung und erhielt nach Lyophilisieren der vom Katalysator abfiltrierten Lösung 3.8 g gelbliches, amorphes Oxydationsprodukt. Dessen Lösung in 70 ccm Chloroform extrahierte man zweimal mit je 25 ccm gesätt. wäßr. Natriumhydrogencarbonat (in der Chloroformphase verblieben 1.54 g dunkelgelbe, neutrale Oxydationsprodukte) und extrahierte die vereinigten, mit verd. Salzsäure auf pH 3 gebrachten Auszüge zehnmal mit je 100 ccm Chloroform. Die nach Verdampfen der Chloroformlösung hinterbliebenen sauren Oxydationsprodukte (1.59 g) wurden an einer 45 × 1.8 cm-Säule aus neutralem Kieselgel²⁹⁾ unter Nachwaschen mit 1. Chloroform (5% Butanol), 2. Chloroform (20–40% Butanol), 3. Methanol in drei Fraktionen getrennt.

Die Lösung von Fraktion 2 in 3 ccm tert.-Butylalkohol + 9 ccm Wasser gab man auf eine mit tert.-Butylalkohol/Wasser (1:3) eingeschlammte 23 × 1.5 cm-Säule aus Dowex 1 X 8 (200–400 mesh, Formiat-Form) und wusch nach mit 25proz. tert.-Butylalkohol,

²⁷⁾ O_{Thr} soll andeuten, daß der *N*-Methyl-L-valylrest mit dem Threoninhydroxyl verestert ist.

²⁸⁾ Alle Schmpp. wurden im Berl-Block bestimmt und korrigiert.

²⁹⁾ Kieselgel (Fa. Gebr. Herrmann, Köln-Ehrenfeld, 200–300 mesh), 30 Min. mit 6*n* HCl behandelt, mit dest. Wasser neutral gewaschen und auf 120° erhitzt, bis eben pulvertrocken.

dem kontinuierlich steigende Mengen 6*n* Ameisensäure (in 25proz. tert.-Butylalkohol) zugesetzt wurden (im Mischgefäß waren anfangs 200 ccm 25proz. tert.-Butylalkohol). Die 3-ccm-Eluatfraktionen wurden verdampft und die Rückstände ausgewogen. Das **3a** aus den Fraktionen 40–52 wurde bei 20° aus 6 ccm Benzol mit 12 ccm Petroläther (Sdp. 60–80°) gefällt, abzentrifugiert und mit Petroläther gewaschen. Ausb. 645 mg (36%), $[\alpha]_D^{20}$: -41.6 ± 0.3 ($c = 0.33$ in Methanol). Aus Chloroform mit Petroläther bei Siedehitze umgefällte Präparate halten auch bei 24stdg. Erhitzen auf 110° i. Hochvak. Lösungsmittel fest.

$C_{26}H_{41}N_5O_9$ (567.6) Ber. C 55.01 H 7.28 N 12.34 Äquiv.-Gew. 567.6
Gef. *) C 54.93 H 7.38 N 12.22 Äquiv.-Gew. 574 **)

*) 8 Stdn. bei 120° i. Hochvak. getrocknet.

**) Potentiometrische Titration in 50proz. Methanol mit 0.1*n* NaOH.

Ber. Mol Thr 1.0 Ile 1.0 Pro 1.0 Sar 1.0 MeVal 1.0

Gef.³⁰⁾ Mol Thr 0.8 Ile 1.2 Pro 1.1 Sar 1.1 MeVal 1.2

Oxalsäure aus **3a**: 330 mg **3a** erhitzte man 18 Stdn. in 6*n* HCl auf 110° und extrahierte das Hydrolysat im Kreisprozeß 12 Stdn. mit Äther. Die beim Verdampfen des Ätherauszuges hinterbliebene *Oxalsäure* wurde zweimal aus Aceton/Benzol umkristallisiert, zweimal bei 120°/12 Torr sublimiert und durch IR-Spektrum, Schmp. und Misch-Schmp. 187° identifiziert (Schmp.-Röhrchen mit frisch sublimierter Probe nach 12 Stdn. i. Vak. über Diphosphor-pentoxid so abgeschmolzen, daß es nicht aus dem Berl-Block herausragt). Ausb. 26%.

$C_2H_2O_4$ (90.0) Ber. C 26.68 H 2.24 Gef. C 26.77 H 2.28

N-Methoxylyl-cyclo-[L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr}] (**3b**): Zu 100 mg **3a** in 1 ccm Chloroform gab man 1 ccm Äther und äther. *Diazomethan*, bis die Lösung gelb blieb. Den beim Verdampfen i. Vak. hinterbliebenen Ester löste man unter Zugabe von 2 Tropfen Methanol in 2 ccm Benzol, versetzte bei Siedehitze bis zur Trübung mit Methanol und erhielt **3b** in farblosen, trigonalen Rhomben, die bei 160–175° unter Zersetzung schmolzen. Ausb. 100 mg.

$C_{27}H_{43}N_5O_9$ (581.7) Ber. C 55.75 H 7.45 N 12.04 1CH₃O 5.3
Gef. *) C 55.64 H 7.48 N 11.86 CH₃O 5.3
Mol.-Gew. 571, 549 **) , 581 ***)

*) 8 Stdn. i. Hochvak. bei 80° getrocknet.

) Kryoskop.: 0.1333, 0.0959 g **3b in 10.89, 10.89 g Dimethylsulfoxid; Δt : 0.098, 0.080°

***) Aus dem Massenspektrum.

Lactontitration: 16.0, 19.7 mg **3b**, in 2 ccm 0.1*n* methanol. NaOH 2 Stdn. auf 40° erwärmt, verbrauchten 1.98, 1.93 Äquivv. NaOH.

Abbau von 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycin C₂ (1d) zu 3a: 3.5 g **1d**, oxydiert und aufgearbeitet wie **1c**, lieferten 950 mg saure Oxydationsprodukte und diese bei Chromatographie an neutralem Kieselgel 816 mg der Fraktion 2. Aus ihr erhielt man durch Chromatographie an Dowex 1 X 8 379 mg aus 3 ccm Benzol und 12 ccm Petroläther (60–80°) umgefälltes, amorphes **3a** mit $[\alpha]_D^{25}$: -41.5 ± 0.3 ($c = 3.85$ in Methanol). Ausb. 379 mg (24%).

$C_{26}H_{41}N_5O_9$ (567.6) Ber. C 55.01 H 7.28 N 12.34 Äquiv.-Gew. 567.6
Gef. *) C 55.21 H 7.49 N 12.37 Äquiv.-Gew. 577 **)

*) 8 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

**) Potentiometrische Titration in 50proz. Methanol mit 0.1*n* NaOH.

Ber. Mol Thr 1.0 Ile 1.0 Pro 1.0 Sar 1.0 MeVal 1.0

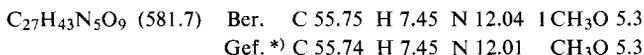
Gef. Mol Thr 1.0 Ile 1.1 Pro 1.1 Sar 1.1 MeVal 1.1

Hydrolyse: Eine kleine Probe des aus **1d** gewonnenen **3a** lieferte, in 6*n* HCl 12 Stdn. auf 110° erhitzt und erschöpfend mit Äther extrahiert, nach Verdampfen des Äthers einen Rück-

³⁰⁾ Aminosäure-Analyse nach H. Brockmann und J. H. Manegold, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **343**, 86 (1965).

stand, der im Papierchromatogramm (Xylol/Phenol/85proz. Ameisensäure (5 : 5 : 2; g : g : v)³¹⁾ nur einen Fleck mit dem R_F -Wert von *Oxalsäure* zeigte.

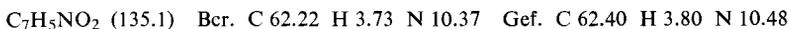
Veresterung: 100 mg **3a** aus **1d** lieferten mit *Diazomethan* 100 mg **3b**. Trigonale Rhomben aus Benzol/Petroläther, die bei 160–175° unter Zersetzung schmolzen.



*) 8 Stdn. bei 120° i. Hochvak. getrocknet.

Lactontitration: 20.2, 15.6 mg **3b**, in 2 ccm 0.1 n NaOH 4 Stdn. bei 40° gehalten, verbrauchten 1.97, 1.98 Äquivv. NaOH.

Oxydativer Abbau von 2-Hydroxy-phenoxazon-(3) (7) zu Benzoxazon (8b): Zu 2.88 g **7** in 200 ccm Eisessig und 20 ccm 30proz. *Wasserstoffperoxid* gab man nach 72stdg. Rühren die gleiche Menge Oxydationsmittel, versetzte, als nach weiterem 72stdg. Rühren alles gelöst war, mit 0.5 g Pd-Mohr und hydrierte nach Aufhören der Sauerstoffentwicklung und Zugabe von 0.2 g Pd-Mohr bis zur Sättigung. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wurde i. Vak. zur Trockne gebracht und die Butanollösung des Rückstandes (100 ccm) zweimal mit 100 ccm gesätt. wäbr. Natriumhydrogencarbonat durchgeschüttelt. Der Verdampfungsrückstand der neutral gewaschenen, über Natriumsulfat getrockneten Butanolphase wurde aus Äthylacetat/Methanol an Aluminiumoxid II chromatographiert. Nachwaschen mit 20–40% Methanol enthaltendem Äthylacetat brachte eine hellbraune Zone ins Filtrat, deren Inhaltsstoff nach Umkristallisieren aus Benzol/Cyclohexan und Hochvak.-Sublimation bei 85° durch Misch-Schmp. 141° als **8b** identifiziert wurde. Ausb. 10%.

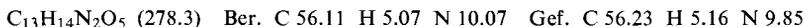


N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-glycin-äthylester (9a): Man rührte eine Suspension von 3.9 g *Glycin-äthylester-hydrochlorid* in 55 ccm Tetrahydrofuran und 3.9 g *Triäthylamin* 1 Stde. bei 20° und vereinigte das Filtrat mit einer Lösung von 5.0 g *2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure* und 5.3 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 50 ccm Tetrahydrofuran. Nach 4 Stdn. verdampfte man die von Dicyclohexylharnstoff abfiltrierte Lösung i. Vak., wusch die Chloroformlösung des Rückstandes mit 2 n HCl, gesätt. wäbr. NaHCO₃-Lösung und Wasser und trocknete sie über Natriumsulfat. Aus der eingeeengten Lösung kristallisierte **9a** in hellgelben Nadeln. Ausb. 45%. Aus Chloroform Schmp. 162°.

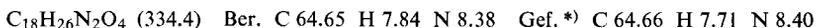


*) Getrocknet 9 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

N-[2-Oxo-7-methyl-benzoxazolin-carboyl-(4)]-glycin-äthylester (10): Eine Lösung von 200 mg (0.7 mMol) **9a** in 200 ccm Benzol hydrierte man nach Zugabe von 100 mg PtO₂ bis zur Sättigung, filtrierte den Katalysator ab und versetzte mit 5.4 mMol *Phosgen* in 3 ccm Toluol. Nach 1 Stde. wurde bei 20° i. Vak. verdampft und der Rückstand mit heißem Benzol ausgezogen. Aus der eingeeengten Lösung kristallisierte **10** in sahnfarbenen Nadeln. Aus Benzol Schmp. 190–192°. Ausb. 10%.



N-[2-Hexylidenamino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-glycin-äthylester (11): Eine Lösung von 846 mg (3 mMol) **9a** in 20 ccm Methanol hydrierte man bei 22°/760 Torr mit Pd-Kohle bis zur Sättigung, filtrierte den Katalysator ab, versetzte mit 0.37 ccm (3 mMol) *Hexanal* und erhitzte 8 Stdn. unter Stickstoff und Rückfluß. Umkristallisieren des Verdampfungsrückstandes aus Äthanol/Wasser gab **11** in hellgelben Blättchen vom Schmp. 104.5–105°. Ausb. 46%.



*) 8 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet.

³¹⁾ H. Kalbe, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **297**, 19 (1954).