

Hans Brockmann und Erich Schulze

Actinomycine, XXXIV<sup>1)</sup>; Synthesen von Actinomycinen und actinomycin-ähnlichen Chromopeptiden, VII<sup>1)</sup>

## Pseudo-actinocinyl-bis-L-threonin

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 10. März 1969)

■

Oxydation von *O*-Acetyl-*N*-[3-amino-2-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin-methylester (**20h**) mit Kaliumhexacyanoferrat(III) liefert zu 90% ein chromatographisch trennbares Gemisch aus 2,5 Teilen Pseudo-actinocinyl-bis-[*O*-acetyl-L-threonin-methylester] (**21b**) und 1 Teil *N,N'*-[2-Hydroxy-4,9-dimethyl-phenoxazon-(3)-dicarbonyl-(1,6)]-bis-[*O*-acetyl-L-threonin-methylester] (**22b**). Da nach diesem Kondensationsverlauf bei der Synthese von Pseudo-actinomycinen (z. B. **13a**) analoge Trennungen wie die von **21b/22b** erforderlich werden und diese am Schluß der Synthese am einfachsten sind, ist für die Darstellung von Pseudo-actinomycinen die oxydative Kondensation von *N*-[3-Amino-2-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-penta-peptid-lactonen wie **11a** das Verfahren der Wahl.

■

Bei den bisherigen Actinomycin-Synthesen, z. B. der von Actinomycin C<sub>1</sub> (**1a**), entsteht das Ringsystem des Chromophors **1b** (Actinocin) in letzter<sup>1)</sup> oder vorletzter<sup>2,3)</sup> Stufe durch oxydative Kondensation eines Vorproduktes, in dem 2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (**3b**) entweder wie in **3a** mit dem fertigen Peptidlacton-Rest verknüpft ist<sup>1)</sup> oder mit dessen letzter Vorstufe<sup>2,3)</sup>. Man kann diese Kondensation als „Synthese mit naszierendem Chinon“ formulieren, bei der sich **3a** mit seiner Aminogruppe an C-6 des aus **3a** hervorgegangenen Chinonimins **4a** anlagert<sup>4)</sup>, das Addukt zu **5a** dehydriert wird und aus diesem durch intramolekulare Phenol-Addition und anschließende Dehydrierung das Actinomycin (z. B. **1a**) entsteht. Die Ausbeuten liegen bei 90%, d. h. Kondensation in umgekehrter Richtung zum Phenoxazim **6a**, beginnend mit Anlagerung der **3a**-Aminogruppe an C-5 von **4a**, ist glücklicherweise keine die Actinomycinausbeute merklich schmälernde Konkurrenzreaktion. Entsprechendes gilt für die Kondensationen von **3b–d** über **4b–d** und **5b–d** zu **1b–d**.

<sup>1)</sup> XXXIII. bzw. VI. Mitteil.: H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. 101, 2231 (1968).

<sup>2)</sup> H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. 100, 353 (1967).

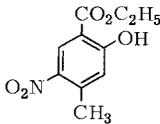
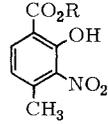
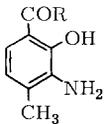
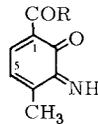
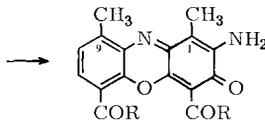
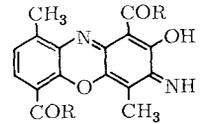
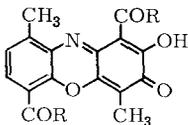
<sup>3)</sup> H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. 101, 1312 (1968).

<sup>4)</sup> H. Wanzlik, Angew. Chem. 76, 313 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 401 (1964).

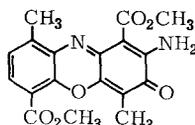
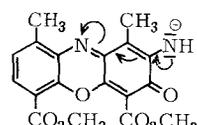


bene Äthylester **7a**, was durch Vergleich mit **7a** aus authentischem **7c** bestätigt wurde. Für die aus **7a** entstandene Dinitroverbindung gilt **8**, denn **7a** wird sicher nicht an C-6 nitriert.

Wie zu erwarten, liefert die Nitrierung von **7b** neben **7a** und **8** in geringer Ausbeute auch **10c**, das in der **7a** enthaltenden Chromatogramm-Fraktion des rohen Nitrierungsproduktes durch die NMR-Signale seiner beiden Aromatenprotonen nachgewiesen wurde.

**7a****b:** H statt NO<sub>2</sub>**c:** H statt C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>**d:** H statt NO<sub>2</sub> und C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>**8****9a****b:** SO<sub>3</sub>K statt SO<sub>3</sub>H**10a:** R = H**b:** R = CH<sub>3</sub>**c:** R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>**d:** R = H;H statt CH<sub>3</sub>**e:** R = H;CH<sub>3</sub>O statt OH**f:** R = CH<sub>3</sub>;CH<sub>3</sub>O statt OH**11a:** R = **2****b:** R = OCH<sub>3</sub>**c:** R = -L-Thr-OCH<sub>3</sub>**12a:** R = **2****b:** R = OCH<sub>3</sub>**c:** R = -L-Thr  
|  
OCH<sub>3</sub>**13a:** R = **2****b:** R = OCH<sub>3</sub>**c:** R = -L-Thr-OCH<sub>3</sub>**d:** R = OCH<sub>3</sub>;OH statt NH<sub>2</sub>**14a:** R = **2****b:** R = OCH<sub>3</sub>**15a:** R = OCH<sub>3</sub>**b:** R = OCH<sub>3</sub>;

Cl statt OH

**c:** R = OCH<sub>3</sub>;CH<sub>3</sub>O statt OH**d:** R = **2****16****17**

Eine befriedigende Darstellung von **10a** gelang durch Umsetzen von **7d** mit Oleum (65% SO<sub>3</sub>) und rauchender Salpetersäure, Isolierung des entstandenen **9a**<sup>6)</sup> als

<sup>6)</sup> A. N. Meldrum und C. N. Bamji, J. Indian chem. Soc. **13**, 641 (1936).

kristallisiertes **9b** und Erhitzen des Salzes mit 20proz. Salzsäure auf 140°. Auf **7d** bezogen erhielten wir so zu 41% ein von Isomeren freies **10a** und daraus mit Methanol bzw. Äthanol und Chlorwasserstoff **10b** bzw. **10c** (Schmp. 63–64°). Die benachbarten Aromatenprotonen geben sich durch AB-Kopplung zu erkennen (Schwerpunkte bei  $\delta = 6.95$  und  $7.85$  ppm,  $J_{AB} = 8$  Hz).

Zur Synthese von Pseudo-actinocin-dimethylester (**13b**) wurde **10b** mit Wasserstoff/Palladium zum kristallisierten **11b** reduziert, das im Gegensatz zu **3c** gegen Luft recht beständig ist. Da **11b** bei Vorversuchen träger mit Kaliumhexacyanoferrat(III) reagierte als **3c**, wurde es in verd. Äthanol bei 55° mit Eisen(III)-chlorid oxydiert, wobei man den pH-Wert der Reaktionslösung allmählich von 1.5 auf 6.0 erhöhte. Chromatographie des Reaktionsproduktes lieferte, auf **11b** bezogen, zu 13% eine kristallisierte, dunkelrote Verbindung mit der Summenformel  $C_{18}H_{16}N_2O_6$  des gesuchten **13b** und zu 53% kristallisiertes, gelbrotes  $C_{18}H_{15}NO_7$  mit kleinerem  $R_F$ -Wert.  $C_{18}H_{16}N_2O_6$ , mit ähnlichem Absorptionsspektrum wie **1c**, gab sich durch rote Halochromie mit konz. Salzsäure sowie grüne Farbe in Dimethylformamid/Natriumhydroxid (Entstehung des Anions **17**) als ein 2-Amino-phenoxazon-(3) und damit als Pseudo-actinocin-dimethylester (**13b**) zu erkennen.

Das gelbrote  $C_{18}H_{15}NO_7$ , im Gegensatz zu **13b** aus Chloroform in  $2n$  Alkalihydroxid überführbar, zeigte die für 2-Hydroxy-phenoxazon-(3) charakteristische grüne Zinn(II)-chlorid-Reaktion, gab mit Diazomethan einen kristallisierten Methyläther  $C_{19}H_{17}NO_7$  und war danach entweder das in der sauren Reaktionslösung aus Phenoxazim **14b** hervorgegangene **15a** oder durch Hydrolyse aus **13b** entstandenes **13d**. Da 2-Hydroxy-phenoxazime-(3) gegen Säure empfindlicher sind als 2-Amino-phenoxazon-(3), war **15a** plausibler.

Die Entscheidung zwischen **15a** und **13d** war vom Austausch des  $C_{18}H_{15}NO_7$ -Hydroxyls gegen  $NH_2$  zu erwarten. Denn dabei mußte aus **13d** wieder **13b** entstehen, aus **15a** dagegen das mit **13b** stellungsisomere **16**. Ausgetauscht wurde wie bei der Umwandlung von 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycinen in Actinomycine<sup>7)</sup>. Erhitzen von  $C_{18}H_{15}NO_7$  mit Thionylchlorid gab kristallisiertes  $C_{18}H_{14}ClNO_6$  und dieses mit flüssigem Ammoniak/Tetrahydrofuran eine kristallisierte Verbindung  $C_{18}H_{16}N_2O_6$  mit den Reaktionen eines 2-Amino-phenoxazons-(3). Sie war nicht mit **13b** identisch und konnte daher nur das aus **15a** über **15b** entstandene **16** sein, was beweist, daß unser  $C_{18}H_{15}NO_7$  die Konstitution **15a** hat und dessen Chlorderivat bzw. Methyläther nach **15b** bzw. **15c** zu formulieren sind. Bei der Eisen(III)-chlorid-Oxydation kondensiert **11b** demnach überwiegend in der für uns unerwünschten Richtung. Es entsteht etwa viermal soviel Phenoxazim **14b** wie 2-Amino-phenoxazon-(3) **13b**.

Für die Darstellung von **20a**, der vorletzten Vorstufe von **21a**, war von Interesse, daß die auf verschiedenen Wegen versuchte *N*-Acylierung von L-Threonin (**19a**) mit **10d** zu **20b** bisher nur über das *O*-benzylierte **10d**-Chlorid gelungen ist<sup>8,9)</sup>. Eine analoge **20a**-Synthese aus **19a** und **18b** fanden wir ungeeignet, weil die Trennung des **10a**-*O*-Benzyläthers von nicht unge-

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

8) F. S. Okumura, M. Masumura, T. Horie und F. M. Strong, J. Amer. chem. Soc. **81**, 3753 (1959).

9) F. S. Okumura, M. Masumura und T. Horie, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5215 (1959).

setztem **10a** umständlich war. Versuche, **19b** mit **10a** und Dicyclohexylcarbodiimid oder **19a** mit **10a**-Chlorid zu *N*-acylieren — beides mit **3e** glatt möglich — waren erfolglos; im ersten Fall, weil aus **10a** und Dicyclohexylcarbodiimid eine kristallisierte Verbindung  $C_{21}H_{27}N_3O_4$  vom Schmp.  $110^\circ$  entstand, im zweiten, weil die Hydrolyse von **10a**-Chlorid schneller war als die Umsetzung mit **19a**.

Zum Ziel kamen wir schließlich über das *O*-Methylderivat **10e**, dargestellt durch die Diazomethan-Methylierung von **10a** zu **10f** und dessen alkalische Verseifung. Methyl war hier als OH-Schutzgruppe brauchbar, weil es sich aus Methoxygruppen in *o*-Stellung zur Carbonylfunktion durch Bortrichlorid unter milden Bedingungen abspalten läßt<sup>10</sup>).

**19a** gab mit **18a** (aus **10e** mit Thionylchlorid) in wäbr. Alkalihydroxid zu 85% **20c** und dieses mit Diazomethan **20d**, das wir in Methylenchlorid mit Bortrichlorid zu **20a** umsetzten. Daß erwartungsgemäß das Aromaten-Methoxyl und nicht die Methoxycarbonylgruppe verseift worden war, bestätigten die rote Farbreaktion mit Eisen(III)-chlorid sowie das NMR-Spektrum (Schwerpunkte der beiden Aromatenprotonen-Dubletts bei  $\delta = 6.80, 7.70$  ppm,  $J_{AB} = 8$  Hz, statt bei  $\delta = 7.15, 8.05$  ppm wie in **20d**).

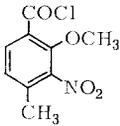
Um **20a** in **21a** zu überführen, reduzierten wir mit Palladium/Wasserstoff, oxydierten das entstandene **20e** in situ mit Eisen(III)-chlorid und erhöhten dabei den pH-Wert allmählich von 1.5 auf 7.0.

Chromatographie des Reaktionsproduktes lieferte 1. Zu 21% (bezogen auf **20a**) kristallisierten Pseudo-actinocinyl-bis-[L-threonin-methylester] (**21a**); charakterisiert durch die Bruttoformel  $C_{26}H_{30}N_4O_{10}$ , rote Halochromie mit konz. Salzsäure, Grünfärbung in Dimethylformamid/Alkalihydroxid sowie Absorptionsspektrum, und 2. zu 19% kristallisiertes **22a**,  $C_{26}H_{29}N_3O_{11}$ , mit grüner Zinn(II)-chlorid-Reaktion und im Gegensatz zu **21a** aus Chloroform mit *n* Alkalihydroxid extrahierbar.

Da die Reaktion nur 40% Ausbeute ergeben hatte und dabei zur Hälfte überdies in „falscher Richtung“ kondensiert worden war, wurde bei weiteren Versuchen statt mit Eisen(III)-chlorid wieder mit dem bei Actinomycin-Synthesen bewährten Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydiert. Und da sich ferner für die Synthese von Pseudoactinomycinen der Weg über *N*-[3-Amino-2-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptid-lactone<sup>11</sup> empfahl, in denen das Threonin-Hydroxyl verestert ist, setzten wir, um den Bedingungen einer Pseudoactinomycin-Synthese möglichst nahezukommen, statt **20e** dessen *O*-Acetylderivat **20h** ein. **20d** wurde mit Acetylchlorid zu **20f** verestert, dieses mit Bortrichlorid zu **20g** entmethyliert und das daraus durch katalytische Hydrierung entstandene **20h** in situ bei konstant gehaltenem pH 7.0 oxydiert.

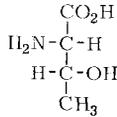
Chromatographie des Reaktionsproduktes gab, auf **20g** bezogen, zu 65% kristallisiertem Pseudo-actinocinyl-bis-[*O*-acetyl-L-threonin-methylester] (**21b**) und zu 26% kristallisiertes **22b**. Wie bei den Synthesen von **1a—d** waren demnach rund 90% des Vorproduktes zur Kondensation gelangt. Daß dabei 26% des eingesetzten **20h** zum Phenoxazim und damit zu **22b** werden, während aus **3a—d** nur sehr wenig Phenoxazim entsteht, läßt sich folgendermaßen erklären<sup>4)</sup>:

<sup>10)</sup> F. M. Dean, J. Goodchild, L. E. Houghton, J. A. Martin, R. B. Morton, B. Parton, A. W. Price und Nongyow Somvichien, Tetrahedron Letters [London] 1966, 4153.



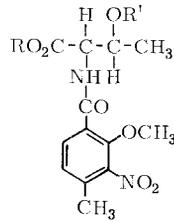
18a

**b:** OBzl statt  
OCH<sub>3</sub>



19a

**b:** CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> statt  
CO<sub>2</sub>H



**20a:** R = CH<sub>3</sub>; R' = H;

OH statt OCH<sub>3</sub>

**b:** R = R' = H; OII statt OCH<sub>3</sub>;

H statt CH<sub>3</sub> an C-4

**c:** R, R' = H

**d:** R = CH<sub>3</sub>; R' = H

**e:** R = CH<sub>3</sub>; R' = H; OH statt  
OCII<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub> statt NO<sub>2</sub>

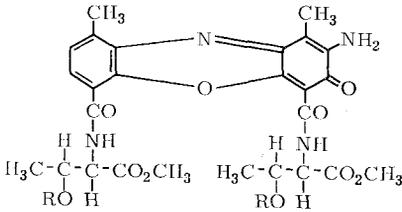
**f:** R = CH<sub>3</sub>; R' = COCH<sub>3</sub>

**g:** R = CH<sub>3</sub>; R' = COCH<sub>3</sub>;  
OH statt OCH<sub>3</sub>

**h:** R = CH<sub>3</sub>; R' = COCH<sub>3</sub>;

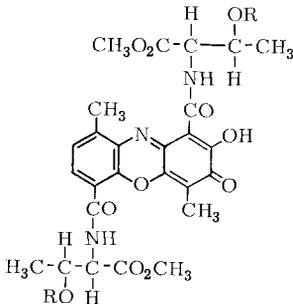
OH statt OCH<sub>3</sub>;

NH<sub>2</sub> statt NO<sub>2</sub>



**21a:** R = H (=13c)

**b:** R = COCH<sub>3</sub>



**22a:** R = H

**b:** R = COCH<sub>3</sub>

**3a–d** kondensieren praktisch nur in einer Richtung mit **4a–d**, und zwar unter Primäraddition ihrer Aminogruppe an C-6 von **4a–d**, weil 1. in **4a–d** die Additionsbereitschaft der C=C–C=N-Gruppe wie in anderen Verbindungen<sup>11)</sup> größer ist als die von C=C–C=O, 2. dieser Unterschied durch den Elektronenzug des Carbonyls an C-1 und den +I-Effekt der 4-Methylgruppe noch vergrößert wird, 3. die NH<sub>2</sub>-Gruppe in **3a–d** nucleophiler ist als die OH-Gruppe und daher Addition an C-6 von **4a–d** über das **3a–d**-Hydroxyl als Konkurrenzreaktion nicht zum Zuge kommt.

In **12a–c** sind die 1,4-Substituenten von **4a**, **4c** und **4d** gegeneinander vertauscht. Umgekehrt wie dort verringert daher ihr mesomerer und induktiver Effekt den Unterschied in der Additionsbereitschaft von C=C–C=N und C=C–C=O, so daß sich nun **11a–c** mit ihrer Aminogruppe in merklichem Ausmaß auch an C-6 von **12a–c** addieren können.

<sup>11)</sup> C. Schröder, S. Preis und K. P. Link, Tetrahedron Letters [London] 1960, Nr. 13, 23.

Ob bei der Oxydation von **11c** = **20e** mit Eisen(III)-chlorid das Produktverhältnis deshalb weiter zugunsten des Phenoxazims verschoben ist, weil die Aminogruppe von **20e** in der anfangs sauren Reaktionslösung protoniert ist, bleibt zu klären.

Da sich **20g** über **20h** zu 90% mit Produktverhältnis **21b/22b** = 2.5 kondensieren läßt, ist anzunehmen, daß *N*-acylierte Pentapeptidlactone wie **11a** mit ähnlich guter Ausbeute und ähnlichem Produktverhältnis zu **13a/14a**- und damit zu **13a/15d**-Gemischen kondensiert werden. Chromopeptide wie **13a** und **15d** sind zweifellos leichter voneinander zu trennen als ihre Vorprodukte, in denen entweder die *N*-MeVal-Carboxygruppe und das Thr-Hydroxyl<sup>3)</sup> oder das Sar-Carboxyl und das MeVal-NH-CH<sub>3</sub> frei vorliegen<sup>2)</sup>. Für die Synthese von Pseudo-actinomycinen ist daher die oxydative Kondensation eines *N*-[3-Amino-2-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptidlactons wie **11a** die Methode der Wahl.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und den Farbenfabriken Bayer AG, Werk Elberfeld, danken wir für die Förderung unserer Arbeit.

## Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte sind im Berl-Block bestimmt und korrigiert.

*Neutrales Kieselgel*: Gebr. Herrmann, Köln-Ehrenfeld, Kieselgel M, Körnung DIN 60–80.

*Saures Kieselgel*: Neutrales Kieselgel in 0.1 *n* HCl aufgeschlämmt, abgesaugt und an der Luft getrocknet.

*5-Nitro-2-hydroxy-4-methyl-benzoesäure-äthylester (7a)*: Durch eine siedende Lösung von 1.0 g *5-Nitro-2-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (7c)*<sup>12)</sup> in 30 ccm Äthanol leitete man 8 Stdn. Chlorwasserstoff, goß in 100 ccm Eiswasser, extrahierte **7a** mit Chloroform und kristallisierte es aus verd. Methanol um. Hellgelbe Prismen (700 mg, 61%) vom Schmp. 57–59°. — Die Analysenprobe wurde 18 Stdn. bei 30° i. Hochvak. getrocknet.

C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub> (225.2) Ber. C 53.33 H 4.92 N 6.22 Gef. C 53.37 H 4.80 N 6.23

*Nitrierung von 2-Hydroxy-4-methyl-benzoesäure-äthylester (7b)*: 290 mg kristallisiertes Nitrierungsprodukt (Schmp. 54°) aus **7b**<sup>5)</sup> gaben bei Chromatographie aus Chloroform/Aceton (9:1) an Kieselgel G (3% Leuchtstoff Rot N<sup>13)</sup>) zwei im UV-Licht dunkle Zonen. Der Inhaltsstoff der schnelleren Zone kristallisierte aus verd. Äthanol in farblosen Nadeln (116 mg) vom Schmp. 58° und stimmte im Schmp., Misch-Schmp. und NMR-Spektrum mit **7a** überein.

Der aus der anderen Zone mit Chloroform/Methanol unter Zusatz von konz. Salzsäure eluierte *3,5-Dinitro-2-hydroxy-4-methyl-benzoesäure-äthylester (8)* kristallisierte aus Äthylacetat/Pentan in hellgelben Prismen (159 mg) vom Schmp. 74–75°. — Zur Analyse wurde 15 Stdn. bei 45° i. Hochvak. getrocknet.

C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (270.2) Ber. C 44.45 H 3.73 N 10.37 Gef. C 44.63 H 3.78 N 10.46

*Kalium-[5-nitro-3-carboxy-4-hydroxy-6-methyl-benzolsulfonat] (9b)*: In 150 g Oleum (65% SO<sub>3</sub>) löste man unter Rühren 45 g *2-Hydroxy-4-methyl-benzoesäure (7d)* und versetzte tropfenweise mit einer Mischung aus 15 g rauchender Salpetersäure und 90 g Oleum (65% SO<sub>3</sub>), in beiden Fällen so langsam, daß die Temperatur der Lösung 30° nicht überstieg. Nach 4 Tagen gab man die auskristallisierte, auf einer G3-Glasfritte abgesaugte Sulfonsäure **9a** in 250 ccm Eiswasser, sättigte die rotbraune Lösung mit Kaliumchlorid und saugte das in farblosen

<sup>12)</sup> W. Borsche und A. D. Berkhout, Liebigs Ann. Chem. **330**, 101 (1903).

<sup>13)</sup> Riedel de Haën AG.

Kristallen ausgefallene und für die weitere Verarbeitung genügend reine **9b** (65 g, 69%) nach 15 Stdn. ab. — Zur Analyse wurde aus Wasser umkristallisiert und 18 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

$\text{C}_8\text{H}_6\text{NO}_8\text{S}$  (315.3) Ber. C 30.47 H 1.92 N 4.44 Gef. C 30.71 H 2.02 N 4.33

**3-Nitro-2-hydroxy-4-methyl-benzoessäure (10a)**: Aus einer Lösung von 20 g **9b** in 200 ccm 20proz. Salzsäure, die man im Bombenrohr 7 Stdn. auf 140° gehalten hatte, kristallisierte rohes **10a** aus und wurde nach Trocknen aus Benzol/Äthylacetat (1:1) an einer 5 × 50 cm-Säule aus saurem Kieselgel chromatographiert. Das **10a** der schnell wandernden, gelben Hauptzone kristallisierte aus Methanol/Wasser in farblosen Blättchen (7.5 g, 59%) vom Schmp. 218–219°. — Die Analysenprobe wurde 14 Stdn. i. Hochvak. bei 80° getrocknet.

$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_5$  (197.1) Ber. C 48.74 H 3.58 N 7.11 Gef. C 48.84 H 3.58 N 7.09

**3-Nitro-2-hydroxy-4-methyl-benzoessäure-äthylester (10c)**: Durch eine siedende Lösung von 2.0 g **10a** in 50 ccm Äthanol leitete man 8 Stdn. Chlorwasserstoff, goß nach Erkalten in 100 ccm Wasser und schüttelte dreimal mit Äthylacetat aus. Das nach Verdampfen des Äthylacetats hinterbliebene **10c** kristallisierte aus Methanol/Wasser in farblosen Nadeln vom Schmp. 63–64°. Ausb. 1.65 g (72%). — Zur Analyse wurde 14 Stdn. bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_5$  (225.2) Ber. C 53.33 H 4.92 N 6.22 Gef. C 53.40 H 4.96 N 6.19

**3-Nitro-2-hydroxy-4-methyl-benzoessäure-methylester (10b)**: Darstellung wie vorstehend aus **10a** und Methanol. Farblose Nadeln vom Schmp. 89–90°, Ausb. 76%. — Zur Analyse trockneten wir 15 Stdn. bei 40° i. Hochvak.

$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_5$  (211.2) Ber. C 51.19 H 4.30 N 6.63 Gef. C 51.32 H 4.43 N 6.50

**3-Amino-2-hydroxy-4-methyl-benzoessäure-methylester (11b)**: Eine mit 40 mg Pd-Kohle (10% Pd) versetzte Lösung von 2.0 g **10b** in 60 ccm Äthanol sättigte man mit Wasserstoff, verdampfte die vom Katalysator abfiltrierte Lösung i. Vak. und erhielt das hinterbliebene **11b** aus verd. Methanol in farblosen Nadeln (1.5 g, 82%) vom Schmp. 63–64°. — Die Analysenprobe wurde bei 35° i. Hochvak. sublimiert.

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$  (181.2) Ber. C 59.66 H 6.12 N 7.73 Gef. C 59.75 H 6.19 N 7.80

**Oxydative Kondensation von 11b**: Zu einer Lösung von 1.0 g **11b** in 30 ccm Äthanol gab man unter starkem, bis zur Aufarbeitung fortgesetzten Rühren 100 ccm Wasser von 90°, stellte mit konz. Salzsäure auf pH 1.5 ein (Glaselektrode), versetzte mit 20 ccm 40proz. Eisen(III)-chloridlösung (pH 0.5) und tropfte nach 30 Min. 5n NaOH so schnell ein, daß nach 45 Min. pH 6 erreicht war. Nach 20 Min. brachte man mit konz. Salzsäure wieder auf pH 1, um das ausgefallene Eisen(III)-hydroxid zu lösen, verdünnte nach 20 Min. mit 500 ccm Wasser, extrahierte erschöpfend mit Chloroform und verdampfte den dunkelroten, über Natriumsulfat getrockneten Auszug i. Vak. zur Trockne. Chromatographie des Rückstandes (Chloroform/Aceton 9:1, 5 × 50 cm-Säule aus neutralem Kieselgel) gab zwei Hauptzonen, die schneller wandernde rot, die andere gelbrot, die nach Zerschneiden der Säule mit Chloroform/Methanol (die gelbe unter Zusatz von wenig konz. Salzsäure) eluiert wurden (im folgenden „Eluat rot“, „Eluat gelbrot“).

**2-Amino-1.9-dimethyl-phenoxazon-(3)-dicarbonsäure-(4.6)-dimethylester, Pseudo-actinocindimethylester (13b)**: Der Verdampfungsrückstand von „Eluat rot“ wurde aus Chloroform/Aceton (9:1) an einer 5 × 30 cm-Säule aus Kieselgel G chromatographiert. Das Chloroform/Methanol-Eluat der ausgeschnittenen roten Hauptzone wurde zweimal mit Wasser ausgeschüttelt und i. Vak. zur Trockne gebracht. Das hinterbliebene **13b** kristallisierte aus Chloro-

form/Methanol (1:1) in tiefroten Würfeln (135 mg, 13.5%), die sich oberhalb 270° zersetzen, ohne zu schmelzen. — Zur Analyse wurde 15 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{18}H_{16}N_2O_6$  (356.3) Ber. C 60.67 H 4.53 N 7.86  
Gef. C 60.52 H 4.55 N 7.80 Mol.-Gew. 356 (Massenspektrum)

UV (Chloroform):  $\lambda_{\max}$  438 m $\mu$  ( $\epsilon = 25000$ ), 420 (25500).

*2-Hydroxy-4.9-dimethyl-phenoxazon-(3)-dicarbonsäure-(1.6)-dimethylester (15a)*: Das nach Verdampfen des zweimal mit Wasser durchgeschüttelten „Eluates gelbrot“ hinterbliebene **15a** kristallisierte aus Chloroform/Methanol in feinen, gelbroten Nadeln (530 mg, 53%) vom Schmp. 247–248°. — Zur Analyse wurde 13 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{18}H_{15}NO_7$  (357.3) Ber. C 60.50 H 4.23 N 3.92  
Gef. C 60.50 H 4.22 N 3.79 Mol.-Gew. 357 (Massenspektrum)

UV (Chloroform):  $\lambda_{\max}$  404 m $\mu$  ( $\epsilon = 9800$ ).

*2-Methoxy-4.9-dimethyl-phenoxazon-(3)-dicarbonsäure-(1.6)-dimethylester (15c)*: Aus 35 mg **15a** in 15 ccm Chloroform erhielt man bei  $-20^\circ$  mit 2 ccm äther. *Diazomethan*-Lösung **15c**, das aus Chloroform/Methanol in roten Blättchen (33 mg, 91%) vom Schmp. 174° kristallisierte. — Trocknung der Analysenprobe 8 Stdn. bei 60° i. Hochvak.

$C_{19}H_{17}NO_7$  (371.3) Ber. C 61.45 H 4.61 N 3.77 Gef. C 61.37 H 4.68 N 3.92

UV (Chloroform):  $\lambda_{\max}$  450 m $\mu$  ( $\epsilon = 4700$ ), 390 (10500).

*2-Chlor-4.9-dimethyl-phenoxazon-(3)-dicarbonsäure-(1.6)-dimethylester (15b)*: Zu einer Suspension von 170 mg feingepulvertem **15a** in 12 ccm Benzol gab man 0.5 ccm trockenes *Pyridin* und 1 ccm *Thionylchlorid*, kochte 40 Min. unter Rückfluß, verdünnte mit 100 ccm Chloroform, wusch mehrmals mit schwach angesäuertem Wasser aus und chromatographierte den Eindampfrückstand der organischen Phase aus Chloroform an einer  $3 \times 35$  cm-Säule aus neutralem Aluminiumoxid IV. Das Produkt der roten Hauptzone kristallisierte aus Chloroform/Methanol in roten Blättchen vom Schmp. 264° (Zers.), Ausb. 124 mg (69%). — Die Analysenprobe trockneten wir 10 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

$C_{18}H_{14}ClNO_6$  (375.8) Ber. C 57.53 H 3.76 N 3.73 Cl 9.44 Gef. C 57.70 H 3.74 N 3.67 Cl 9.58

UV (Chloroform):  $\lambda_{\max}$  479 m $\mu$  ( $\epsilon = 9300$ ), 372 (13400).

*2-Amino-4.9-dimethyl-phenoxazon-(3)-dicarbonsäure-(1.6)-dimethylester (16)*: 200 mg **15b** und 75 ccm über Molekularsieb (E. Merck) getrocknetes Tetrahydrofuran versetzte man im Glasautoklaven bei  $-78^\circ$  mit 15 ccm flüssigem *Ammoniak*, hielt verschlossen unter gelegentlichem Umschwenken 18 Stdn. bei Raumtemp. und brachte nach Abdampfen des *Ammoniaks* die Lösung i. Vak. zur Trockne. Chromatographie aus Chloroform an saurem Kieselgel gab eine rotgelbe Hauptzone, deren Inhaltsstoff aus Chloroform/Aceton (9:1) an einer  $3 \times 20$  cm-Kieselgel G-Säule chromatographiert wurde. Das Produkt der Hauptzone kristallisierte aus Chloroform/Methanol in gelbroten Nadeln (118 mg, 61%) vom Schmp. 257°. — Zur Analyse wurde 15 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{18}H_{16}N_2O_6$  (356.3) Ber. C 60.67 H 4.53 N 7.86  
Gef. C 60.42 H 4.65 N 7.81 Mol.-Gew. 356 (Massenspektrum)

UV (Chloroform):  $\lambda_{\max}$  435 m $\mu$  ( $\epsilon = 31600$ ).

*3-Nitro-2-methoxy-4-methyl-benzoessäure-methylester (10f)*: 8.15 g **10a** in 150 ccm Methanol gaben um überschüssiger äther. *Diazomethan*-Lösung 9.2 g (98%) **10f**, farblose Nadeln vom Schmp. 69–70°. — Zur Analyse wurde 18 Stdn. bei 35° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{10}H_{11}NO_5$  (225.2) Ber. C 53.33 H 4.92 N 6.22 Gef. C 53.39 H 4.99 N 6.26

**3-Nitro-2-methoxy-4-methyl-benzoessäure (10e):** Unter Rühren erhitzte man 9.2 g **10f** in 100 ccm Methanol mit 3.5 g *Kaliumhydroxid* in 30 ccm Wasser zum Sieden, säuerte nach 1 Stde. mit konz. *Salzsäure* an und erhielt das ausgefallene **10e** aus Methanol in Nadeln vom Schmp. 187–189°. Ausb. 8.2 g (95%). — Die Analysenprobe wurde 18 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet.

$C_9H_9NO_5$  (211.2) Ber. C 51.19 H 4.30 N 6.63 Gef. C 51.43 H 4.35 N 6.66

**N-[3-Nitro-2-methoxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin (20c):** Eine Suspension von 5.45 g **10e** in 50 ccm *Thionylchlorid* kochte man 10 Min. unter Rückfluß, verjagte überschüss. Thionylchlorid i. Vak. und nahm das 1 Stde. i. Vak. über KOH und konz. Schwefelsäure gehaltene **18a** in 100 ccm trockenem Tetrahydrofuran auf. Diese Lösung gab man bei 0° innerhalb 45 Min. in 15 Anteilen zu einer Lösung von 4.0 g *L-Threonin (19a)* in der äquiv. Menge 0.2 n *NaOH* und hielt mit 2 n *NaOH* auf pH 9.1–9.5 (Glaselektrode). Aus der nach 1 Stde. Rühren bei Raumtemp. mit konz. *Salzsäure* angesäuerten, eingeeengten Lösung kristallisierten 6.85 g (85%) **20c** aus (0°/20 Stdn.). Aus Äthylacetat/Pentan Nadelchen mit Schmp. 146–149°.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-28.3 \pm 1^\circ$  ( $c = 0.9$ , Äthanol). — Zur Analyse wurde 15 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{13}H_{16}N_2O_7$  (312.3) Ber. C 50.00 H 5.16 N 8.97 Gef. C 50.25 H 4.90 N 8.81

**N-[3-Nitro-2-methoxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin-methylester (20d):** **20d**, aus 6.85 g **20c** in Methanol mit äther. *Diazomethan* dargestellt, kristallisierte aus Äthylacetat/Pentan in farblosen Täfelchen (5.72 g, 81%) vom Schmp. 119–120°.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-45.7 \pm 1^\circ$  ( $c = 0.7$ , Äthanol). — Die Analysenprobe wurde 15 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{14}H_{18}N_2O_7$  (326.7) Ber. C 51.53 H 5.56 N 8.59 Gef. C 51.70 H 5.65 N 8.55

**N-[3-Nitro-2-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin-methylester (20a):** Zu einer auf 20° gekühlten Lösung von 4.0 g **20d** in 250 ccm Methylenchlorid gab man 25 ccm auf  $-78^\circ$  gekühltes *Bortrichlorid*, goß nach 10 Min. auf Eis, versetzte mit 300 ccm Chloroform und schüttelte die organische Phase viermal mit Wasser durch. Das nach Verdampfen des Chloroforms hintergebliebene, ölige **20a** kristallisierte aus Äthylacetat/Pentan in gelblichen Nadeln (3.55 g, 93%) vom Schmp. 106°.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+15.2 \pm 1^\circ$ , ( $c = 0.7$ , Äthanol). — Trocknung der Analysenprobe 100 Stdn. bei 60° i. Hochvak.

$C_{13}H_{16}N_2O_7$  (312.3) Ber. C 50.00 H 5.16 N 8.97 Gef. C 50.31 H 5.30 N 8.97

**Oxydative Kondensation von N-[3-Amino-2-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin-methylester (20e):** 600 mg **20a** in 40 ccm Methanol reduzierte man mit 40 mg *Pd-Kohle* (10% Pd)/ $H_2$  zu **20e**, filtrierte den Katalysator ab, verdünnte mit 1 l Äthanol und 1 l Wasser, stellte mit konz. *Salzsäure* auf pH 1.5 ein (Glaselektrode) und versetzte mit 20 ccm 40proz. wäbr. *Eisen(III)-chlorid*-Lösung (pH 0.5). Nach 30 Min. tropfte man so langsam 5 n *NaOH* ein, daß nach 30 Min. pH 7.0 erreicht war, brachte durch Zugabe von konz. *Salzsäure* das *Eisen(III)-hydroxid* in Lösung und extrahierte mit Chloroform.

Chromatographie des Abdampfrückstandes der Chloroformphase (Chloroform/Methanol 98 : 2, 8 × 50 cm-Kieselgelsäule) gab neben einigen schmalen Zonen eine rote (Zone I) und eine langsamer wandernde gelbe (Zone II).

**Pseudo-actinocinyl-bis-[L-threonin-methylester] (21a):** Zone I eluierte man mit Chloroform/Methanol und chromatographierte den Verdampfungsrückstand (178 mg) aus Chloroform/Methanol (97 : 3) an einer 5 × 20 cm-Säule aus Aluminiumoxid I. Das aus der roten Hauptzone mit Chloroform/Methanol eluierte **21a** (112 mg, 21%) kristallisierte aus Chloroform/

Methanol in violetten Blättchen vom Schmp. 285° (Zers.)<sup>14</sup>. — Zur Analyse trockneten wir 6 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

$C_{26}H_{30}N_4O_{10}$  (558.5) Ber. C 55.91 H 5.41 N 10.03 Gef. C 55.71 H 5.49 N 9.85  
UV (Chloroform):  $\lambda_{\max}$  450 m $\mu$  ( $\epsilon = 22000$ ), 433 (23300).

*N,N'*-[2-Hydroxy-4,9-dimethyl-phenoxazon-(3)-dicarbonyl-(1.6)]-bis-[L-threonin-methylester] (**22a**): Zone II eluierte man mit Chloroform/Methanol unter Zusatz von wenig 2*n* HCl und erhielt aus dem mehrfach mit Wasser gewaschenen Eluat 102 mg (19%) **22a**, das man unter Zusatz einiger Tropfen Methanol in möglichst wenig Chloroform löste. Auf Zusatz von Pentan kristallisierten rote Würfel vom Schmp. 263° (Zers.)<sup>14</sup>. — Die Analysenprobe wurde 20 Stdn. bei 75° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{26}H_{29}N_3O_{11}$  (559.5) Ber. C 55.81 H 5.22 N 7.51 Gef. C 55.98 H 5.35 N 7.46  
UV (Chloroform mit 7% Methanol):  $\lambda_{\max}$  417 m $\mu$  ( $\epsilon = 16500$ ).

*O*-Acetyl-*N*-[3-nitro-2-methoxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin-methylester (**20f**): Zu einer Lösung von 3.3 g **20d** in 10 ccm Eisessig tropfte man unter Rühren 5 ccm Acetylchlorid, verdünnte nach 1 Stde. mit 200 ccm Chloroform und entfernte Acetylchlorid sowie Säure durch Ausschütteln mit Wasser und wäbr. Natriumhydrogencarbonat. Das nach Verdampfen des Chloroforms als gelbliches Öl hinterbliebene **20f** war chromatographisch einheitlich und wurde in dieser Form weiterverarbeitet. Es kristallisierte aus Äthylacetat/Pentan in farblosen Prismen vom Schmp. 81°.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+32 \pm 1^\circ$  ( $c = 0.9$ , Äthanol). — Trocknung der Analysenprobe 18 Stdn. bei 60° i. Hochvak.

$C_{16}H_{20}N_2O_8$  (368.3) Ber. C 52.17 H 5.47 N 7.61 Gef. C 52.35 H 5.40 N 7.68

*O*-Acetyl-*N*-[3-nitro-2-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin-methylester (**20g**): Zu einer auf -20° gekühlten Lösung von 3.0 g **20f** in 70 ccm Methylenchlorid gab man 5 ccm auf -78° abgekühltes Bortrichlorid, verdünnte nach 7 Min. mit 250 ccm Chloroform und goß in 400 ccm Eiswasser. Der Rückstand der mit Wasser gewaschenen, organischen Phase gab aus Äthylacetat/Pentan gelbliche Täfelchen vom Schmp. 110°.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+56.4 \pm 1^\circ$  ( $c = 1.7$ , Äthanol). — Zur Analyse wurde 20 Stdn. bei 65° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{15}H_{18}N_2O_8$  (354.3) Ber. C 50.85 H 5.12 N 7.91 Gef. C 51.05 H 5.20 N 7.93

*Oxydative Kondensation von O*-Acetyl-*N*-[3-amino-2-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin-methylester (**20h**): 550 mg **20g** in 30 ccm Methanol reduzierte man mit 40 mg Pd-Kohle (10% Pd)/H<sub>2</sub> zu **20h**, versetzte die vom Katalysator abfiltrierte Lösung mit 70 ccm Methanol und 100 ccm Wasser, brachte mit 2*n* NaOH auf pH 7.0, verrührte mit 2 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 10 ccm Wasser und hielt mit 2*n* NaOH auf pH 7.0. Nach kurzer Zeit begann das Kondensationsprodukt auszuflocken. Als die pH-Änderung praktisch beendet war, rührte man noch 15 Stdn., extrahierte mit Chloroform und chromatographierte den Verdampfungsrückstand des Auszuges aus Chloroform/Methanol (95 : 5) an einer 5 × 60 cm-Kieselgel G-Säule, wobei sich zwei Hauptzonen bildeten, eine dunkelrote (Zone I) und eine langsamer wandernde orangefarbene (Zone II).

*Pseudo-actinocinyl-bis*-[*O*-acetyl-L-threonin-methylester] (**21b**): Aus der mit Methanol, Chloroform und Aceton eluierten Zone I erhielt man 325 mg (65%, bezogen auf **20g**) **21b**,

<sup>14</sup> Die Höhe der Extinktionskoeffizienten der Substanz bei 589, 578, 546, 436 und 313 m $\mu$  erlaubt keine zuverlässige Messung ihrer spezifischen Drehung. Hydrierende Acetylierung (wie bei **21b** und **22b**) erschien nicht sinnvoll, da 1. die Substanz in Acetanhydrid schwer löslich ist und 2. Nebenreaktionen der freien Threonin-Hydroxylgruppen zu befürchten sind.

das aus Chloroform/Pentan in braunroten Nadelchen vom Schmp. 228–230° kristallisierte. — Die Analysenprobe wurde 12 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{30}H_{34}N_4O_{12}$  (642.6) Ber. C 56.07 H 5.33 N 8.72 Gef. C 55.70 H 5.31 N 8.73

UV (Chloroform):  $\lambda_{\max}$  450 m $\mu$  ( $\epsilon = 22800$ ), 433 (24600).  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+37 \pm 2^\circ$  ( $c = 0.7$ , Acetanhydrid; nach hydrierender Acetylierung in Acetanhydrid unter Zusatz von Pd-Mohr und Natriumacetat)<sup>15</sup>).

*N,N'*-[2-Hydroxy-4,9-dimethyl-phenoxazon-(3)-dicarbonyl-(1,6)]-bis-[*O*-acetyl-L-threonin-methylester] (**22b**): Das aus Zone II mit Chloroform/Methanol/Aceton unter Zusatz von wenig 2*n* HCl eluierte **22b** (129 mg, 26%) kristallisierte aus Äthylacetat/Pentan in feinen, gelbroten Nadeln, die bei 115–125° schmolzen. — Die Analysenprobe wurde 12 Stdn. bei 70° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{30}H_{33}N_3O_{13}$  (643.6) Ber. C 55.99 H 5.17 N 6.53 Gef. C 55.99 H 5.17 N 6.39

UV (Chloroform):  $\lambda_{\max}$  416 m $\mu$  ( $\epsilon = 15600$ ).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $+57 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.4$ , Acetanhydrid; nach hydrierender Acetylierung in Acetanhydrid unter Zusatz von Pd-Mohr und Natriumacetat)<sup>15</sup>).

<sup>15</sup>) Wegen zu hoher Extinktionskoeffizienten der Substanz bei 589, 578, 546, 436 und 313 m $\mu$  (vgl. l. c.<sup>14</sup>).