

Wenn eine solche intra-nicht-permutierende Membran die Trennungswand zwischen 2 Lösungen bildet, welche wenigstens 2 verschiedene Ionensorten, die von den Poren der Membran aufgenommen werden können (z. B. Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen), in verschiedener Konzentration enthalten, so besitzt die erste Lösung durch die Membran hindurch gemessen gegen die zweite Lösung nicht *ein* Gleichgewichtspotential; es gibt vielmehr *zwei voneinander in der Grösse und in sehr vielen Fällen sogar im Vorzeichen verschiedene Gleichgewichtspotentiale*. Das eine der Potentiale wird festgestellt, wenn ein stationärer Strom (dessen Stromstärke in der Grenze auf Null absinken darf) von links nach rechts und das andere, wenn ein stationärer Strom von rechts nach links durch die Membran hindurch aufrecht erhalten wird.

Beispiele zeigen, dass das eine dieser Potentiale mit dem Ruhepotential an der Nerven- oder Muskelfaser, das andere mit dem Aktionspotential identisch ist. Die Erregung z. B. des Nerven dürfte daher nichts anderes sein als die Umstellung der Membran aus dem einen auf das andere der beiden möglichen Gleichgewichtspotentiale. Die Umstellung kann durch einen Stromstoss in geeigneter Richtung oder durch andere Mittel erreicht werden, durch welche die Poren der Membran entweder aus der ersten oder aber aus der zweiten Lösung mit Ionen versorgt werden.

Es ist wahrscheinlich, dass von den beiden möglichen Potentialen dasjenige, welches den grösseren Absolutbetrag besitzt, normalerweise verwirklicht wird. Mit dieser Annahme wird die im Nerv und im Muskel beobachtete Fortschreitung eines lokal erzeugten Reizes als Reizwelle mit Aktionsstrom verständlich.

Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Basel

## 26. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten

15. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Über die Konstitution von Echinomycin

von W. Keller-Schierlein, M. Lj. Mihailović und V. Prelog

(15. XII. 58)

Die früheren Untersuchungen über Echinomycin<sup>2)3)</sup> führten zum Schluss, dass es sich um ein neutrales, makrocyclisches Polypeptid, C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>N<sub>7</sub>S, handelt. Durch saure Hydrolyse wurden daraus D-Serin, L-Alanin und L-N-Methylvalin erhalten, aus den Produkten der alkalischen Hydrolyse liessen sich die Chinoxalincarbonsäure-(2) und Ammoniak isolieren.

Auf Grund neuer Analysen, Molekulargewichtsbestimmungen und von anderem inzwischen gesammeltem Tatsachenmaterial musste die Formel des Echinomyocins in C<sub>50</sub>H<sub>60</sub>O<sub>12</sub>N<sub>12</sub>S<sub>2</sub> geändert werden. Die neue Formel steht in gutem Einklang mit den

<sup>1)</sup> 14. Mitt., Helv. **41**, 1645 (1958).

<sup>2)</sup> R. CORBAZ, L. ETTLINGER, E. GAUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, F. KRADOLFER, L. NEIPP, V. PRELOG, P. REUSSER & H. ZÄHNER, Helv. **40**, 199 (1957).

<sup>3)</sup> W. KELLER-SCHIERLEIN & V. PRELOG, Helv. **40**, 205 (1957).

analytischen Ergebnissen, die von uns für das Echinomycin und von GOLDBERG und Mitarbeitern<sup>4)</sup> für das Antibioticum X-948 veröffentlicht wurden, welches allem Anschein nach mit dem Echinomycin identisch ist. Einzige die Schwefelwerte lagen früher für die neue Formel zu niedrig, doch konnten neuerdings mit sorgfältig gereinigten Analysenpräparaten Schwefelwerte erhalten werden, die mit der neuen Formel gut übereinstimmen. Von entscheidender Bedeutung für die Annahme der neuen Formel waren die Molekulargewichtsbestimmungen, die wir in Chloroform-Lösung nach der von E. P. CLARK<sup>5)</sup> modifizierten Methode von R. SIGNER<sup>6)</sup> ausführten.

Es muss hier erwähnt werden, dass man auf Grund von analytischen Daten Formeln für Echinomycin, die bis zwei Kohlenstoffatome und bis vier Wasserstoffatome mehr oder weniger als die Formel  $C_{50}H_{60}O_{12}N_{12}S_2$  aufweisen, nicht vollständig ausschliessen kann. Die von uns angenommene Formel beruht deshalb zum grossen Teil auf den Abbauergebnissen, über die im Folgenden berichtet werden soll.

Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren, die bei der sauren Hydrolyse des Echinomycins erhalten werden, zeigte, dass in einer Molekel je zwei D-Serin-, L-Alanin- und L-N-Methylvalin-Reste vorliegen.

Neben den Aminosäuren wurden in den Produkten der sauren Hydrolyse von Echinomycin ungefähr 2 Mol. Methylamin nachgewiesen, welches papierchromatographisch und als N-Methyl-N'-phenyl-thioharnstoff identifiziert wurde. Ammoniak konnte nur in Spuren papierchromatographisch nachgewiesen werden.

Auf Grund des UV.-Absorptionsspektrums kann man schliessen, dass im Echinomycin zwei Chinoxalincarbonsäure-(2)-Reste vorliegen. Die Chinoxalincarbonsäure-(2), welche unter den Bedingungen, die zur totalen Hydrolyse des Peptid-Anteiles notwendig sind, zerstört wird, lässt sich bei der kalten sauren Hydrolyse als solche erhalten<sup>7)</sup>. Durch Hydrazinolyse des Echinomycins entsteht unter relativ milden Bedingungen das Chinoxalincarbonsäure-(2)-hydrazid.

Nach der neuen Formel bleibt nach dem Abziehen der nachgewiesenen Reste noch ein Anteil  $C_6H_4O_2S_2$  übrig, welcher nicht erfasst wurde. In diesem Anteil gibt es keine amidartig gebundene  $NH_2$ -Gruppe mehr, die wir früher angenommen haben, weil bei der alkalischen Hydrolyse des Echinomycins Ammoniak abgespalten wird. Wir sind neuerdings zur Ansicht gekommen, dass dieses Ammoniak aus dem Serin-Rest stammen muss<sup>8)</sup>.

4) J. BERGER, E. R. LA SALA, W. E. SCOTT, B. R. MELTSNER, L. H. STERNBACH, S. KAISER, S. TEITEL, E. MACH & M. W. GOLDBERG, *Experientia* **13**, 434 (1957).

5) *Ind. Eng. Chemistry, Anal. Ed.* **13**, 820 (1941).

6) *Liebigs Ann. Chem.* **478**, 246 (1930).

7) Dies ist besonders deshalb von Interesse, weil von M. W. GOLDBERG und Mitarb.<sup>4)</sup> hervorgerufen wurde, dass die Chinoxalincarbonsäure-(2) bei der sauren Hydrolyse nicht gefunden wird und dass sie somit wahrscheinlich im Echinomycin nicht amid- oder esterartig gebunden ist.

8) Aus verschiedenen Literaturangaben geht hervor, dass das freie Serin relativ beständig gegenüber verdünnten Alkalien ist, peptidartig gebunden wird es dagegen leichter zerstört. Dies ist leicht verständlich, wenn man bedenkt, dass es sich um eine Eliminierungsreaktion handelt, die durch die Abspaltung des Protons in  $\alpha$ -Stellung des Serins ausgelöst wird. Das Anion des Serins ist wegen seiner negativen Ladung für eine solche Protonabspaltung sehr ungünstig, die Peptide des Serins und besonders ihre N- und O-Acyl-Derivate sind deshalb viel günstiger. Vgl. darüber die zusammenfassenden Darstellungen von A. J. P. MARTIN & R. L. M. SYNGE, *Advances in Protein Chemistry* **2**, 10 (1945), F. SANGER, *ibid.* **7**, 23 (1952), sowie B. FRANCK & J. KNOKE, *Chem. Ber.* **90**, 2450 (1957).

Das Echinomycin lässt sich unter ausserordentlich milden Bedingungen, durch Behandlung mit 0,04-n. Natronlauge bei Zimmertemperatur in eine damit isomere Säure  $C_{50}H_{60}O_{12}N_{12}S_2$  überführen, die wir *Echinomycinsäure* nennen. Die elektrometrische Titration dieser Verbindung in 80-proz. Methylcellosolve zeigt, dass es sich um eine Dicarbonsäure handelt. Das UV.-Absorptionsspektrum der Echinomycinsäure gleicht demjenigen des Echinomycins, und auch die IR.-Absorptionsspektren der beiden Verbindungen unterscheiden sich nur sehr wenig (vgl. Fig. 1

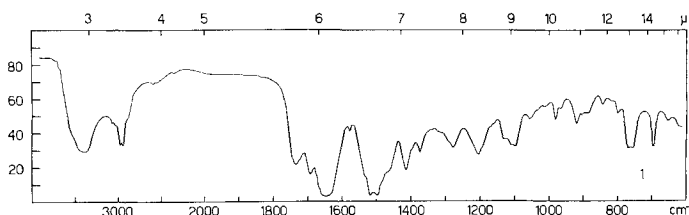
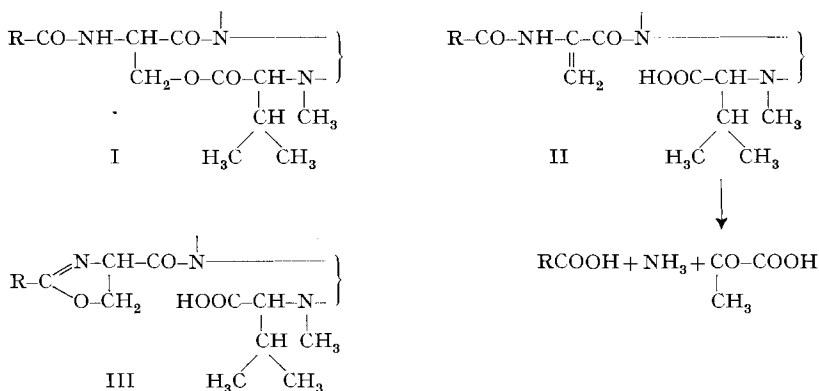


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum in KBr: Echinomycinsäure

sowie Fig. in 3)). Die saure Hydrolyse der sorgfältig durch eine CRAIG-Verteilung zwischen Chloroform und der McILVAINE-Pufferlösung  $pH = 7$  gereinigten Echinomycinsäure lieferte Alanin und N-Methylvalin; Serin fehlte dagegen vollständig. Nach dem Verfahren von DAKIN-WEST<sup>9)</sup> konnte festgestellt werden, dass die freien Carboxyl-Gruppen den N-Methylvalin-Resten angehören, indem diese Aminosäure nach 12stündigem Erhitzen mit Acetanhydrid und Pyridin auf  $155^\circ$  und nachfolgender saurer Hydrolyse papierchromatographisch nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Alle diese Tatsachen weisen darauf hin, dass durch die verdünnte Natronlauge *zweimal ein Lacton-Ring zwischen Serin und N-Methylvalin gespalten wird*.

Es handelt sich hier wahrscheinlich um eine Eliminationsreaktion und nicht um eine Hydrolyse. Eine solche Eliminationsreaktion kann entweder zu einem  $\beta$ -Acylamino-acrylsäure-Derivat II oder zu einem Oxazolin-Derivat III führen, woraus man schliessen kann, dass im Echinomycin selbst die Teilstruktur I zweimal vorkommt. Obwohl wir zwischen den Teilstrukturen II und III für die Echinomycinsäure nicht



<sup>9)</sup> Ausgeführt nach R. A. TURNER & G. SCHMERZLER, J. Amer. chem. Soc. **76**, 949 (1954).

eindeutig unterscheiden können, ziehen wir II vor<sup>10</sup>). Im Einklang mit dieser Teilstruktur liefert die Echinomycinsäure bei der sauren Hydrolyse neben Alanin und N-Methylvalin die *Brenztraubensäure* und überhaupt *kein Serin*. Daneben wurden bei der sauren Hydrolyse der Echinomycinsäure ebenso wie bei der alkalischen Hydrolyse des Echinomycins mehr als 3 Mol. flüchtige Basen erhalten, die ein Gemisch von ungefähr gleichen Mengen *Ammoniak* und *Methylamin* darstellen. Im Gegensatz dazu gibt das Echinomycin selbst bei der sauren Hydrolyse weder Brenztraubensäure noch Ammoniak.

Ein direkter Beweis, dass das N-Methylvalin im Echinomycin verestert vorkommt, wurde durch Reduktion mit Lithiumborhydrid und anschliessende saure Hydrolyse erbracht. Im Hydrolyseprodukt wurden papierchromatographisch Serin, Alanin und N-Methylcystein (als N-Methylcysteinsäure vgl. S. 309), aber kein N-Methylvalin gefunden. Statt des letzteren konnte das *N-Methylvalinol* als solches und als 2,4-Dinitrophenyl-Derivat nachgewiesen werden.

Ein ähnliches Verhalten gegenüber verdünnten Alkalien wie das Echinomycin zeigen gewisse andere Lacton-peptide, mit  $\beta$ -Hydroxysäuren als Lactonring-Komponenten wie z. B. die Actinomycine<sup>11</sup>) und das Etamycin<sup>12</sup>). Diese Antibiotica enthalten als  $\beta$ -Hydroxysäure das Threonin, und es scheint aus den Literaturangaben hervorzugehen, dass dieses letztere bei der Öffnung des Lactonringes durch Alkali erhalten bleibt. Da jedoch keine quantitativen Angaben vorliegen und die entsprechenden Säuren, die Actinomycinsäuren und die Etamycinsäure, anscheinend nicht analysenrein erhalten wurden, wäre es möglich, dass auch hier der primäre Vorgang der Lactonring-Öffnung eine Elimination und nicht eine Hydrolyse ist.

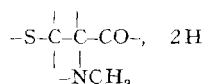
Zur Aufklärung der Konstitution des durch saure Hydrolyse nicht erfassten schwefelhaltigen Restes  $C_6H_4O_2S_2$  wurde das Echinomycin zuerst mit RANEY-Nickel entschwefelt. Die Entschwefelung verläuft sehr träge und es war nicht möglich, auch nach mehrmaliger verlustreicher Behandlung mit einem grossen Überschuss an RANEY-Nickel, vollständig schwefelfreie Produkte zu erhalten. Dazu greift RANEY-Nickel unter den angewandten Bedingungen den Chinoxalincarbonsäure-Rest reduktiv an, wie besonders aus dem UV.-Absorptionsspektrum des Entschwefelungsproduktes hervorgeht. Eine CRAIG-Verteilung mit einem Tetrachlorkohlenstoff-Chloroform-Methanol-Wasser-System zeigte, dass es sich um ein Gemisch von wenigstens vier Verbindungen handelt. Trotzdem lieferte dieses Entschwefelungsprodukt, das wir weiterhin kurz *Desthio-echinomycin* nennen wollen, sehr wichtige Auskünfte über die Konstitution des Echinomycins. Bei der sauren Hydrolyse entstehen daraus neben den schon früher bei der Hydrolyse des Echinomycins erhaltenen Aminosäuren – D-Serin, L-Alanin und L-Methylvalin – mehr als 1 Mol einer weiteren Aminosäure, welche eindeutig als *L-N-Methylalanin* identifiziert werden konnte. Der bisher unaufgeklärte Rest der Echinomycin-Molekel,  $C_6H_4O_2S_2$ , und das durch saure Hydrolyse erhaltene Methylamin müssen somit in einer Teilstruktur vorliegen, die bei der Entschwefelung 2 Mol. L-N-Methylalanin (IX) liefert. In den Produkten der

<sup>10</sup>) Im UV.-Absorptionsspektrum des  $\alpha$ -Benzoylamino- $\beta$ -isopropyl-acrylsäureamids findet man ein  $\lambda_{\max}$  bei 225 m $\mu$  (log 4,19), [A. KJÆR, Acta chem. scand. **7**, 900 (1953)], das praktisch identisch mit demjenigen des Benzamids ist [nach K. MIESCHER, A. MARXER & E. URECH, Helv. **34**, 1 (1951);  $\lambda_{\max}$  225 m $\mu$  (log  $\epsilon$  = 4,09)].

<sup>11</sup>) H. BROCKMANN & B. FRANCK, Angew. Chemie **68**, 68 (1956); E. BULLOCK & A.W. JOHNSON, J. chem. Soc. **1957**, 3280.

<sup>12</sup>) J. C. SHEEHAN, H. G. ZACHAU & W. B. LAWSON, J. Amer. chem. Soc. **79**, 3933 (1957); **80**, 3349 (1958).

sauren Hydrolyse des Echinomycins selbst liessen sich keine schwefelhaltigen Aminosäuren papierchromatographisch finden. Wenn man dagegen Echinomycin mit Natrium und Ammoniak oder mit Lithiumborhydrid reduziert und dann mit Perameisensäure oxydiert, kann man nach der sauren Hydrolyse die *N*-Methylcysteinsäure (XI) nachweisen, was auf die Anwesenheit von *N*-Methylcystein-Resten in den Reduktionsprodukten hinweist. Im Gerüst des Echinomycins liegt somit zweimal die Teilstruktur



vor. Da man sowohl aus dem allgemeinen Verhalten, als auch auf Grund von Farbenreaktionen die Anwesenheit von Thiol-, Thion- und Disulfid-Gruppen ausschliessen kann, so kommen für den schwefelhaltigen Anteil der Echinomycin-Molekel zur Diskussion die Teilstrukturen IV, V, VI und VII in Betracht.

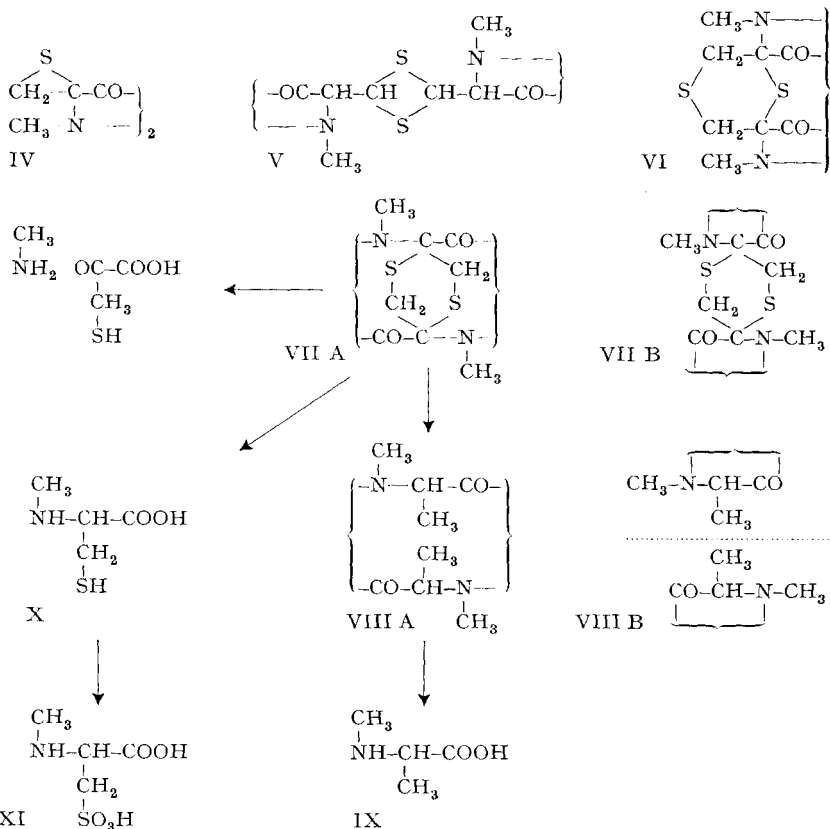
Wenn man die Erfahrungen mit einfachen Verbindungen auf Molekeln vom Typus und der Molekulargrösse des Echinomycins übertragen darf, so würde man erwarten, dass eine Verbindung mit der Teilstruktur IV unbeständiger wäre, als dies beim Echinomycin der Fall ist. Die Teilstruktur V wurde früher mehrmals für verschiedene Thioaldehyd- und Thioketon-Derivate postuliert, aber nicht einwandfrei bewiesen. Obwohl das chemische Verhalten einer Verbindung mit der Teilstruktur V deshalb nicht leicht zu beurteilen ist, nehmen wir doch an, dass sie die Farbenreaktionen der Thion-Verbindungen geben würde, was jedoch für Echinomycin nicht zutrifft. Eine Verbindung mit der Teilstruktur VI würde voraussichtlich bei der Reduktion mit Natrium und Ammoniak bzw. mit Lithiumborhydrid das *N,N'*-Dimethylanthionin liefern, welches leicht papierchromatographisch nachzuweisen wäre, jedoch nie gefunden wurde. Die bekannten Verbindungen mit der Teilstruktur VII verhalten sich dagegen in jeder Hinsicht ähnlich dem Echinomycin<sup>13</sup>). Sie gehen schon bei der milden sauren Hydrolyse in das Amin und die entsprechende  $\alpha$ -Thiolcarbonyl-Verbindung über, welche sich rasch zu dunklen harzartigen Produkten polymerisiert. Gegen eine  $\alpha$ -Stellung der Sulfid-Gruppe zum Carbonyl, wie sie in den Teilstrukturen IV, VI und VII vorkommt, sprechen scheinbar die Erfahrungen über den sterischen Verlauf der Entschwefelung mit RANEY-Nickel. Bei wenigen analogen einfachen Verbindungen, bei welchen man diesen genauer untersuchte<sup>14</sup>), wurde eine Racemisierung am asymmetrischen Kohlenstoffatom, das mit Schwefel substituiert war, beobachtet; das Echinomycin lieferte dagegen bei der Entschwefelung optisch reines *L*-*N*-Methylalanin. Man muss jedoch bedenken, dass sowohl die sterischen als auch die elektronischen Faktoren den sterischen Verlauf der Entschwefelung ändern können.

Man kann die Teilstruktur VII mit dem Polypeptid-Rest der Echinomycin-Molekel auf zwei Arten verknüpfen, die durch die Formeln VIII A und VII B schematisch dargestellt sind. Die Verbindungen mit den Teilstrukturen VII A und

<sup>13</sup>) Über 2,5-Diamino-1,4-dithiane und ihr Verhalten vgl. O. HROMATKA & R. HABERL, *Monatsh.* **85**, 1088 (1954), R. HABERL & O. HROMATKA, *ibid.* **88**, 996 (1957), T. BACCHETTI & U. FERRATI, *Gazz. chim. ital.* **86**, 722 (1956), T. BACCHETTI & O. PINAROLI, *ibid.* **86**, 1168 (1956).

<sup>14</sup>) Über den sterischen Verlauf der Entschwefelungen mit RANEY-Nickel vgl. W. A. BONNER, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 1034, 5089 (1952); W. A. BONNER, J. A. ZDERIC & G. A. CASALLETTO, *ibid.* **74**, 5086 (1952); R. L. BURWELL, jr., *Chem. Rev.* **57**, 929 (1957).

VII B unterscheiden sich dadurch voneinander, dass bei der ersteren die Entschwefelung zu einem einzigen Cyclopolypeptid-dilacton VIII A führt, während bei der zweiten zwei kleinere Cyclopeptid-lactone VIII B entstehen sollten. Drei von den vier Hauptfraktionen, die wir bei der CRAIG-Verteilung des rohen Desthio-echinomycins erhielten, gaben bei einer Molekulargewichtsbestimmung in Chloroform-Lösung nach SIGNER<sup>5)6)</sup> Werte, die grössenordnungsgemäss mit demjenigen des Echinomycins gleich waren. Wir ziehen daraus mit Vorbehalt die Schlussfolgerung, dass das letztere die Teilstruktur VII A aufweist.



Durch die partielle saure Hydrolyse des Desthio-echinomycins liess sich die wichtige Frage betreffend die Reihenfolge der Aminosäuren in der Polypeptid-Kette zwischen D-Serin und L-N-Methylvalin beantworten. Die Produkte der milden sauren Hydrolyse unter zwei verschiedenen Reaktionsbedingungen sind in Tab. 1 zusammengestellt. Durch totale Hydrolyse der erhaltenen Polypeptide wurde die Zusammensetzung bestimmt, in einem zweiten Anteil wurde nach F. SANGER & E. O. P. THOMPSON<sup>15)</sup> mit 2,4-Dinitrofluorbenzol die endständige Amino-Gruppe festgestellt. Die Ergebnisse lassen keinen Zweifel darüber, dass im Desthioechinomycin die Aminosäure-Sequenz: D-Serin-L-Alanin-L-N-Methylalanin-L-N-Methylvalin vorliegt. Auf

<sup>15)</sup> Biochem. J. 53, 353 (1953).

Grund der schon erwähnten Molekulargewichtsbestimmungen nehmen wir an, dass diese Sequenz zweimal vorkommt, wobei das Hydroxyl des D-Serins der einen Polypeptid-Kette mit dem Carboxyl des L-N-Methylvalins der anderen verestert ist. Das schwefelfreie Desthio-echinomycin hätte demnach die Konstitution XII, in der R partiell hydrierte Chinoxalin-Reste darstellt. Für das Echinomycin ergibt sich daraus die Formel XIII, welche mit allen bisher bekannten Tatsachen in gutem Einklang steht.

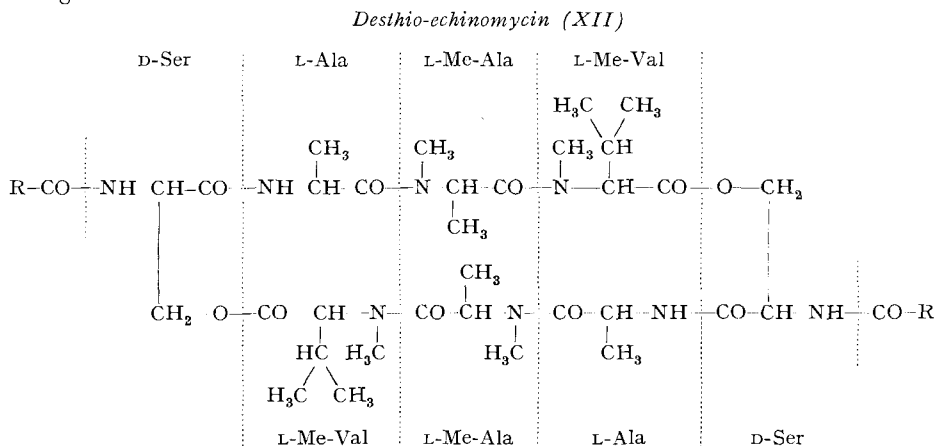
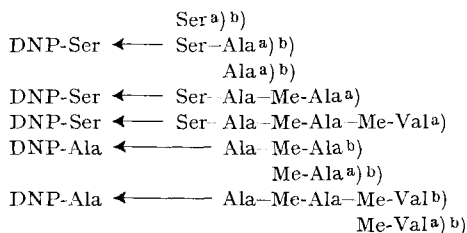


Tabelle 1. *Partielle saure Hydrolyse*: a) 20°, 40 Std. b) 37°, 72 Std.



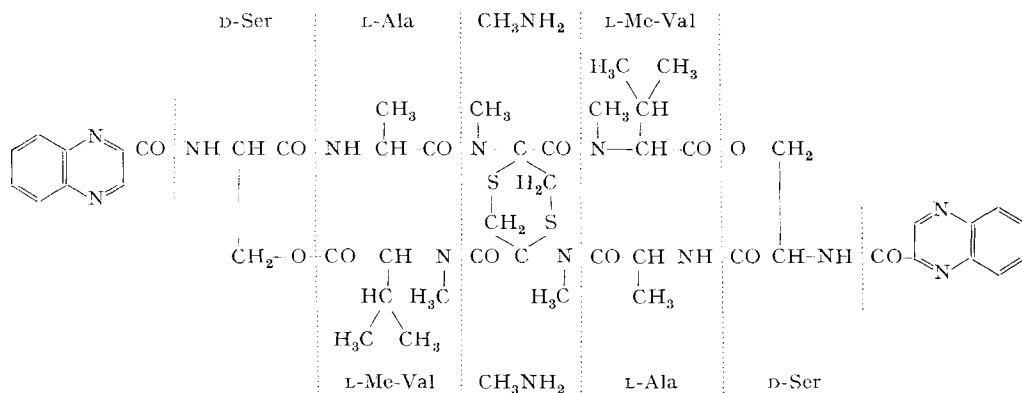
Ein Polypeptid mit dem Chinoxalincarbonsäure-(2)-Rest wurde weder bei der Hydrolyse des Echinomycins noch bei der partiellen Hydrolyse des Desthio-echinomycins gefunden, was im Einklang mit der bekannten Tatsache steht, dass die Acyl-Reste, welche am Stickstoff der  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren hängen, bei der sauren Hydrolyse am leichtesten abgespalten werden<sup>16)</sup>.

Da die Formel XIII des Echinomycins auf Abbauergebnissen beruht, mussten wir besonders sorgfältig die Möglichkeit ausschliessen, dass uns beim Abbau kleine Spaltstücke, deren Anwesenheit auf Grund der Elementaranalyse nicht ganz ausgeschlossen werden konnte, entgangen sind. Als solche Spaltstücke kamen besonders die niedrigen Aldehyde und Fettsäuren in Betracht. Durch eine sorgfältige Untersuchung der mit Wasserdampf flüchtigen Produkte der sauren Hydrolyse von Echinomycin wurde festgestellt, dass solche Spaltstücke wie z. B. Formaldehyd und

<sup>16)</sup> F. SANGER, *Advances in Protein Chemistry* 7, 21, 22 (1952); A. H. COOK & G. HARRIS in J. W. COOK, *Progress in Organic Chemistry* Vol. 4., Butterworths, London 1958, S. 171.

Ameisensäure im Destillat nicht anwesend sind. Ebenso wenig ist es gelungen, darin mit Quecksilber(II)-cyanid niedrige Mercaptane nachzuweisen, obwohl bei der Hydrolyse selbst ein starker mercaptanartiger Geruch feststellbar war.

*Echinomycin (XIII)*



Als eine wichtige Stütze der Formel XIII kann man die Tatsache ansehen, dass ihr ein räumliches Modell mit einer sehr günstigen Packung der Atome entspricht. Die gleiche L-Konfiguration des Alanin- und des N-Methylvalin-Restes und die entgegengesetzte D-Konfiguration des Serins bedingen eine günstige, syntaktische Verteilung der Seitenketten am Cyclopolypeptid-dilacton-Ring.

Die Symmetrie der Echinomycin-Molekel, die aus zwei gleichen Hälften besteht, erinnert in mancher Hinsicht an eine andere Gruppe von Antibiotica aus Actinomyceten, die Actinomycine. Man nimmt an, dass diese durch oxydative Verknüpfung zweier 2-Hydroxy-3-amino-benzoyl-cyclopolypeptid-lactone entstehen. Es lässt sich aber *a priori* nicht ausschliessen, dass es sich um Verbindungen handelt, die analog gebaut sind, wie wir es für das Echinomycin annehmen, d. h. dass sie nur einen aus zwei analogen Hälften bestehenden Cyclopolypeptid-dilacton-Ring aufweisen, der in der Mitte durch das Phenoxazin-Ringsystem überbrückt ist. Andererseits ist es nicht vollständig ausgeschlossen, dass das Echinomycin eine Formel mit der Teilstruktur VII B besitzt. Eine Assoziation der bei der Entschwefelung erhaltenen Cyclopeptid-lactone VIII B in Chloroform-Lösung könnte unter Umständen ein höheres Molekulargewicht für diese vortäuschen, als sie tatsächlich besitzen.

Die Teilstruktur VII, die im Echinomycin vorkommt, kann sowohl aus einem Vorläufer des N-Methylcysteins, als auch durch eine Oxydation aus N-Methylcystein entstehen; beide Vorgänge sind biogenetisch plausibel. Es sei noch bemerkt, dass der Molekelteil VII Eigenschaften besitzt, die dazu führen, dass man ihn in einer grösseren Molekel leicht übersehen könnte. Man wird die Möglichkeit, dass analoge Teilstrukturen in gewissen Proteinen vorliegen, bei der Bestimmung der Feinstruktur im Auge behalten müssen<sup>17)</sup>.

<sup>17)</sup> Vgl. C. H. W. HIRS, W. H. STEIN & S. MOORE in A. NEUBERGER, Symposium on Protein Structure, Methuen & Co., London; J. Wiley & Sons, New York, 1958, S. 221, sowie E. P. ABRAHAM & G. G. F. NEWTON, Ciba Foundation Symposium on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity, J. & A. Churchill, London 1958, S. 205.



Die Herstellung der Vergleichspräparate von Aminosäuren und ihren Derivaten, die wir in dieser Untersuchung zur Identifikation benötigten, ist im experimentellen Teil beschrieben und bedarf keines weiteren Kommentars.

Zur Identifizierung der seltener vorkommenden Aminosäuren: L-N-Methylalanin, L-N-Methylvalin und L-N-Methylcysteinsäure, lassen sich u. A. mit Vorteil ihre IR.-Absorptionsspektren verwenden, die wir deshalb in Fig. 2 dargestellt haben.

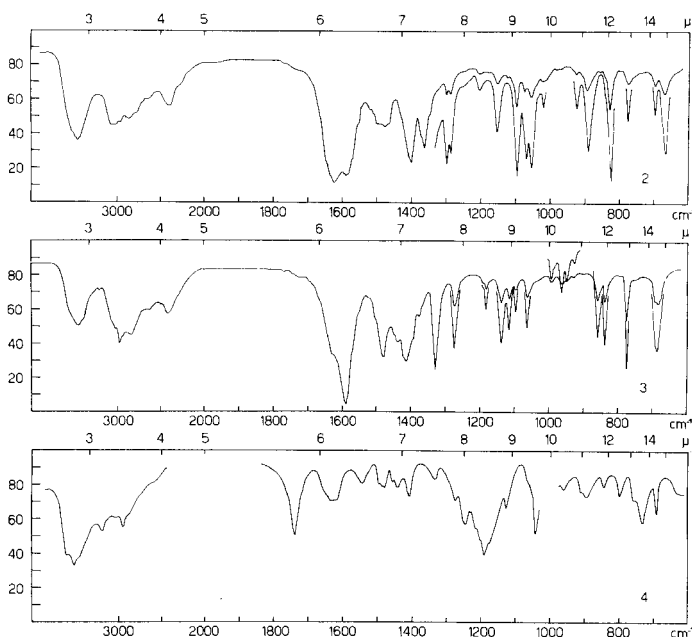


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektren in KBr: Kurve 2, L-N-Methylalanin; Kurve 3, L-N-Methylvalin; Kurve 4, L-N-Methylcysteinsäure

Wir danken der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT in Basel für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil<sup>18)</sup>

*Echinomycin*. Die sorgfältig umkristallisierten Präparate wurden zur Analyse 5 Tage bei Zimmertemperatur im Hochvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Gef. S. 6,02% Mol.-Gew.  $1050 \pm 50$ ,  $1064 \pm 30$  (Chloroform)

Mittelwerte früherer Analysen: C 55,45 H 5,88 N 15,33 S 5,27 (N)CH<sub>3</sub> 5,20 (C)CH<sub>3</sub> 2,75%

Analysen von X-948<sup>4)</sup> C 55,19 H 5,94 O 17,51 N 15,22 S 5,54%

C<sub>50</sub>H<sub>60</sub>O<sub>12</sub>N<sub>12</sub>S<sub>2</sub> Ber. C 55,34 H 5,57 O 17,69 N 15,49 S 5,91 4(N)CH<sub>3</sub> 5,54 (C)CH<sub>3</sub> 5,54% Mol.-Gew. 1085,21

C<sub>51</sub>H<sub>62</sub>O<sub>12</sub>N<sub>12</sub>S<sub>2</sub> Ber. C 55,72 H 5,69 O 17,47 N 15,29 S 5,83% Mol.-Gew. 1099,23

C<sub>50</sub>H<sub>64</sub>O<sub>12</sub>N<sub>12</sub>S<sub>2</sub> Ber. C 55,13 H 5,92 O 17,62 N 15,43 S 5,89% Mol.-Gew. 1089,24

<sup>18)</sup> Alle Smp. sind korrigiert. Die UV.-Absorptionsspektren sind mit dem BECKMAN-Spektrographen, Modell DK 1, die IR.-Absorptionsspektren sind mit dem PERKIN-ELMER-Zweistrahl-Spektrographen, Modell 21, aufgenommen.

**Farbenreaktionen.** Die Reaktionen mit Isoamylnitrit-Reagens<sup>19)</sup>, Natriumnitrit und Schwefelsäure<sup>20)</sup>, Jod und Natriumazid<sup>21)</sup> und Nitroprussidnatrium<sup>22)</sup> auf Thiol-Gruppen verliefen negativ. Ebenso negativ verlief auch die Farbenreaktion auf Disulfid-Gruppen mit Nitroprussidnatrium und Kaliumcyanid<sup>22)</sup>. Nach kurzem Kochen mit n. Natronlauge oder mit 6-n. Salzsäure und nachfolgendem Neutralisieren war die Reaktion mit Nitroprussidnatrium auf Thiol-Gruppen positiv.

**Quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Echinomycin.** Die auf übliche Weise mit 6-n. Salzsäure hydrolysierten Proben des Echinomycins wurden im zweidimensionalen Papierchromatogramm nach der Methode von B. PERNIS & C. WUNDERLY<sup>23)</sup> aufgetrennt. Die Aminosäure-Flecken wurden mit 0,05-proz. Lösung von Ninhydrin in Aceton leicht angefärbt<sup>24)</sup>, ausgeschnitten und mit Ninhydrin-Reagens nach R. A. BOISSONNAS<sup>25)</sup> behandelt. Die optische Dichte wurde mit einem BECKMAN-Spektrophotometer Modell DU bestimmt. Gef. 2,0 Mol Serin, 2,0 Mol Alanin und 1,9 Mol N-Methylvalin pro Mol Echinomycin.

**Chinoxalincarbonsäure-(2) durch milde saure Hydrolyse des Echinomycins.** 54 mg Echinomycin wurden mit 0,2 ml konz. Salzsäure 4 Tage im zugeschmolzenen Rohr bei 37° stehengelassen und das Reaktionsgemisch im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Wasser aufgenommen und viermal mit Äthylacetat extrahiert. Durch Eindampfen der Auszüge erhielt man 13,5 mg rohe Chinoxalincarbonsäure-(2), welche zuerst papierchromatographisch mit dem Alkohol-Ammoniak-Wasser (8:1:1)-System<sup>26)</sup> identifiziert wurde. Der Rest wurde in Methanol mit Diazomethan in den Methylester übergeführt, der nach zweimaligem Sublimieren im Hochvakuum bei 113° schmolz und durch Misch-Smp. und IR.-Absorptionsspektrum in KBr als Chinoxalincarbonsäure-(2)-methylester<sup>3)</sup> identifiziert wurde.

**Chinoxalincarbonsäure-(2)-hydrazid durch Hydrazinolyse des Echinomycins.** 360 mg Echinomycin wurden in 10 ml absol. Alkohol mit 1 ml Hydrazinhydrat 5 Std. unter Rückfluss gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert, eingedampft, 48 Std. im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und in 6 ml kochendem Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen fielen 42 mg gelbe Nadeln aus, die dreimal aus Methanol umkristallisiert wurden; Smp. 213,5°. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 125° sublimiert.

$C_9H_8ON_4$  Ber. C 57,44 H 4,29 N 29,77% Gef. C 57,74 H 4,36 N 29,54%

Die Verbindung war in jeder Hinsicht mit einem authentischen Vergleichspräparat<sup>27)</sup> identisch.

**Methylamin durch saure Hydrolyse des Echinomycins.** 627 mg Echinomycin wurden mit 10 ml 6-n. Salzsäure im zugeschmolzenen Rohr 14 Std. auf 105° erwärmt. Nach Verdünnen mit 20 ml Wasser schüttelte man erschöpfend mit Äther aus. Die wässrige Schicht wurde im Vakuum vom Äther befreit und nach Zugabe von 5 ml 40-proz. Natronlauge destilliert. Während der Destillation gab man zweimal je 20 ml Wasser zum Destillationsgut zu. Das Destillat (insgesamt 65 ml) wurde in einer Vorlage mit 50 ml 0,1-n. Salzsäure aufgefangen und die nicht verbrauchte Säure mit 0,1-n. Natronlauge auf Methylorange zurücktitriert: gef. 1,54 Mol flüchtige Base pro Mol Echinomycin. Die angesäuerte Lösung wurde zur Trockene verdampft, in 20 ml Wasser gelöst und die flüchtige Base nach Versetzen mit Natronlauge nochmals in 0,1-n. Salzsäure überdestilliert. Nach dem Eindampfen der sauren Lösung blieb das farblose kristalline Hydrochlorid der

<sup>19)</sup> G. HESSE & I. JÖRDER, Chem. Ber. **85**, 924 (1952), H. LECHER & W. SIEFKEN, Ber. deutsch. chem. Ges. **59**, 2594 (1926).

<sup>20)</sup> H. RHEINOLDT, Ber. deutsch. chem. Ges. **59**, 1311 (1926); **60**, 184 (1927).

<sup>21)</sup> F. FEIGL, Spot Tests in Organic Analysis, 5th Ed., Elsevier, Amsterdam 1956, S. 228ff.

<sup>22)</sup> G. TOENNIES & J. J. KOLB, Anal. Chemistry **23**, 823 (1951).

<sup>23)</sup> Biochem. biophys. Acta **11**, 209 (1953).

<sup>24)</sup> J. C. SHEEHAN, H. G. ZACHAU & W. B. LAWSON, J. Amer. chem. Soc. **80**, 3352 (1958).

<sup>25)</sup> Helv. **33**, 1975 (1950).

<sup>26)</sup> A. R. JONES, E. J. DOWLING & W. J. SKRABA, Anal. Chemistry **25**, 394 (1953).

<sup>27)</sup> Ein Vergleichspräparat von Chinoxalincarbonsäure-(2)-hydrazid wurde von Herrn P. BAUMANN (Diplomarbeit ETH 1957) hergestellt durch Umsetzung von synthetischem Chinoxalincarbonsäure-(2)-methylester mit einer methanolischen Lösung von Hydrazinhydrat. Die Verbindung schmolz nach Umkristallisieren aus Methanol und Sublimation im Hochvakuum bei 213–214°.

Base zurück, welche papierchromatographisch mit Phenol-Wasser als Lösungsmittel und 0,2-proz. Ninhydrin-Lösung in Alkohol als Entwicklungsreagens als fast reines Methylamin identifiziert werden konnte. Nachher wurde das Papierchromatogramm mit einer Lösung von 0,1% Ninhydrin und 0,05% Ascorbinsäure in Feinsprit besprüht und bei 40–50° im Luftstrom getrocknet<sup>28)</sup>. Es erschien dabei ein zweiter, sehr schwacher Fleck, der auf eine Spur von Ammoniak hinweist. Das rohe Methylamin-hydrochlorid wurde dreimal im Hochvakuum sublimiert:  $pK_{MCS}^*$  9,93, Äqu.-Gew. 69<sup>29)</sup>, in Übereinstimmung mit einem authentischen Vergleichspräparat. 20 mg des sublimierten Hydrochlorids wurden mit Phenylisothiocyanat in den N-Methyl-N'-phenyl-thioharnstoff übergeführt, der nach dreimaligem Umkristallisieren aus verd. Alkohol bei 113° schmolz<sup>30)</sup>. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

|                 |              |        |         |          |
|-----------------|--------------|--------|---------|----------|
| $C_8H_{10}N_2S$ | Ber. C 57,82 | H 6,07 | N 16,86 | S 19,26% |
|                 | Gef. „ 57,83 | „ 5,94 | „ 16,88 | „ 19,20% |

Die Verbindung war nach Misch-Smp. und IR.-Absorptionsspektrum mit einem authentischen Vergleichspräparat identisch.

*Ammoniak und Methylamin durch alkalische Hydrolyse des Echinomycins.* 315 mg Echinomycin in 45 ml Wasser wurden mit 5 g Natriumhydroxyd 8 Std. unter Rückfluss gekocht, wobei man die entweichenden Gase in einer Vorlage mit 50 ml 0,1-n. Salzsäure einleitete. Nachher wurden insgesamt 95 ml des Reaktionsgemisches, dem man zweimal je 30 ml Wasser zufügte, in die gleiche Vorlage destilliert. Durch Rücktitration mit 0,1-n. Natronlauge wurden 3,13 Mol flüchtige Basen pro Mol Echinomycin festgestellt. Die weitere Aufarbeitung, die auf gleiche Weise wie bei der sauren Hydrolyse beschrieben erfolgte, lieferte 38 mg eines Hydrochlorid-Gemisches, in welchem papierchromatographisch vergleichbare Mengen von Ammoniak und Methylamin nachgewiesen wurden. Durch wiederholte fraktionierte Sublimation von 30 mg des Hydrochlorid-Gemisches bei 90–100° im Hochvakuum konnten 10 mg des weniger flüchtigen Methylamin-hydrochlorides und 13,3 mg des leichter flüchtigen Ammoniumchlorids gewonnen werden. Das Ammoniumchlorid zeigte ein  $pK_{MCS}^*$  8,83 und Äqu.-Gew. 51, ebenso wie authentisches Ammoniumchlorid. Aus 9 mg wurde mit Phenylisothiocyanat der Phenylthioharnstoff hergestellt, der nach dreimaligem Umlösen aus wässrigem Alkohol bei 154°<sup>31)</sup> schmolz. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

|              |              |        |         |          |
|--------------|--------------|--------|---------|----------|
| $C_7H_8N_2S$ | Ber. C 55,25 | H 5,30 | N 16,86 | S 21,03% |
|              | Gef. „ 55,56 | „ 5,15 | „ 16,88 | „ 21,04% |

Die Identifikation erfolgte auch durch Misch-Smp. und IR.-Absorptionsspektrum.

Das Methylamin-hydrochlorid wurde papierchromatographisch und durch das Überführen in den N-Methyl-N'-phenyl-thioharnstoff identifiziert.

In den nichtflüchtigen Produkten der alkalischen Hydrolyse konnte nach Entsalzen mit einer Ionenaustauscher-Kolonie und Hydrolyse mit 6-n. Salzsäure bei 110° papierchromatographisch Alanin und N-Methylvalin, aber kein Serin nachgewiesen werden.

*Negative Versuche zum Nachweis kleiner Spaltstücke bei der Hydrolyse von Echinomycin.* Saure und alkalische Hydrolyse von Echinomycin gaben keine flüchtigen Produkte wie Formaldehyd (geprüft mit Dimedon), Acetaldehyd oder Aceton (geprüft mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin), Mercaptane (geprüft mit Quecksilber(II)-cyanid) und Sulfide (geprüft mit Quecksilber(II)-chlorid). Bei der sauren Hydrolyse konnten keine flüchtigen Säuren nachgewiesen werden.

*Echinomycinsäure.* 2,17 g Echinomycin wurden mit 200 ml einer 0,04-n. Lösung von Natriumhydroxyd in 90proz. wässrigem Methanol 2 Std. bei 38° gerührt und weitere 2 Std. bei 30° stehengelassen. Nach 30 Min. hatte sich alles Echinomycin klar gelöst. Die intensiv gelbe alkalische Lösung wurde mit 0,1-n. Salzsäure auf pH 6,5 gebracht und mit 50 ml Wasser verdünnt. Das Methanol wurde nun im Vakuum vertrieben und die wässrige Lösung mit verd. Salzsäure angesäuert. Die Echinomycinsäure schied sich flockig aus und wurde in Äthylacetat aufgenom-

<sup>28)</sup> A. T. H. BURNES & H. K. KING, Biochem. J. **68**, 32 P (1958).

<sup>29)</sup> W. SIMON, E. KOVÁTS, L. H. CHOPARD-DIT-JEAN & E. HEILBRONNER, Helv. **37**, 1872 (1954).

<sup>30)</sup> R. L. SHRINER, R. C. FUSON & D. Y. CURTIN, The Systematic Identification of Organic Compounds, 4th Ed., J. Wiley & Sons, New York 1957, S. 278.

<sup>31)</sup> P. DE CLERMONT, Bull. Soc. chim. France [2] **25**, 242 (1876).

men. Die mit Wasser gewaschenen Äthylacetat-Auszüge wurden zweimal mit 5proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die wässrige Schicht befreite man vom organischen Lösungsmittel, indem man 1 Std. Stickstoff durchleitete, worauf man die Echinomycinsäure mit 2-n. Salzsäure fällte und nach zweistündigem Stehen bei 0° filtrierte. Der mit Wasser gewaschene Niederschlag wurde über Nacht im Vakuum getrocknet: Ausbeute 1,87 g (83% d. Th.) rohe Echinomycinsäure, welche ein amorphes, gelbliches Pulver darstellte. Im Papierchromatogramm (Alkohol-Ammoniak-Wasser 8:1:1, UV.-Photokopie)<sup>26)</sup> konnte neben dem Hauptprodukt eine geringe Menge einer rascher wandernden Säure nachgewiesen werden.

Die CRAIG-Verteilung der rohen Echinomycinsäure wurde mit Chloroform als stationäre Phase und mit McILVAINE-Pufferlösung pH = 7 als bewegliche Phase durchgeführt. 1,538 g rohe Echinomycinsäure wurden über 122 Stufen verteilt und der Echinomycinsäure-Gehalt colorimetrisch bei 328 m $\mu$  bestimmt. Das Verteilungsmaximum befand sich in der Stufe 55 und dasjenige einer kleinen Nebenkomponente in der Stufe 115. Zur Gewinnung der reinen Echinomycinsäure wurden die Stufen 34–65 angesäuert und mit Chloroform erschöpfend ausgezogen. Die mit Wasser gewaschenen und getrockneten Chloroform-Auszüge hinterliessen beim Eindampfen 1,40 g papierchromatographisch einheitliche Echinomycinsäure, die zur Analyse dreimal aus Aceton-Äther umgelöst wurde. Die so gereinigte Echinomycinsäure bildete ein farbloses, amorphes Pulver, das bei 158–160° weich wurde, um sich beim weiteren Erhitzen langsam zu zersetzen. Zur Analyse wurde zuerst 3 Tage im Hochvakuum bei Zimmertemperatur über Phosphorpentoxyd getrocknet, wodurch man ein Dihydrat der Säure erhielt,  $[\alpha]_D^{20} = -178^\circ$  ( $c = 1,062$ , Chloroform)  $pK_{MCS}^* 6,92$ , Äqu.-Gew. 550<sup>29)</sup>.

|   |              |        |         |         |
|---|--------------|--------|---------|---------|
| $C_{50}H_{60}O_{12}N_{12}S_2 \cdot 2H_2O$ | Ber. C 53,55 | H 5,77 | N 14,99 | S 5,72% |
|   | Gef. „ 53,36 | „ 6,11 | „ 14,60 | „ 5,60% |

Das in Feinsprit aufgenommene UV.-Absorptionsspektrum der Echinomycinsäure weist folgende Maxima auf: 244,5 m $\mu$  ( $\log \epsilon = 4,88$ ), 320 m $\mu$  ( $\log \epsilon = 4,25$ ), 330 m $\mu$  ( $\log \epsilon = 4,26$ ). IR.-Absorptionsspektrum in KBr vgl. Fig. 1, Kurve 1.

Die wasserfreie Echinomycinsäure wurde nach 48 Std. Trocknen bei 100° über Phosphorpentoxyd im Hochvakuum erhalten.

|                               |              |        |         |         |
|-------------------------------|--------------|--------|---------|---------|
| $C_{50}H_{60}O_{12}N_{12}S_2$ | Ber. C 55,34 | H 5,57 | N 15,49 | S 5,91% |
|                               | Gef. „ 55,53 | „ 5,76 | „ 15,29 | „ 5,70% |

Echinomycinsäure ist im Agar-Diffusionsplattentest in einer Konzentration 1 mg/ml und wirksam gegen *Bacillus subtilis* und *Micrococcus pyogenes var. aureus*.

*Quantitative Bestimmung der Aminosäuren und die Endcarboxyl-Bestimmung in der Echinomycinsäure.* Die Bestimmung wurde wie beim Echinomycin durchgeführt und ergab 2,0 Mol Alanin und 1,9 Mol N-Methylvalin pro Mol Echinomycinsäure. Vor der CRAIG-Verteilung fand man in der Echinomycinsäure noch etwas Serin; die reine Verbindung war dagegen frei von Serin.

10 mg Echinomycinsäure wurden mit einem Gemisch von 0,75 ml Acetanhydrid und 5,0 ml Pyridin 12 Std. im zugeschmolzenen Rohr auf 155° erhitzt<sup>9)</sup>. Das Reaktionsgemisch wurde mehrmals in Wasser aufgenommen und zur Trockne verdampft. Den Rückstand hydrolysierte man 15 Std. mit 6-n. Salzsäure bei 110° und untersuchte das Hydrolysat papierchromatographisch auf Aminosäuren. Es liess sich nur Alanin nachweisen. Bei 3std. Erhitzen mit Acetanhydrid-Pyridin konnten noch Spuren von N-Methylvalin gefunden werden. Es ist bekannt, dass bei N-Alkylaminosäuren für die DAKIN-WEST-Reaktion drastischere Bedingungen notwendig sind<sup>32)</sup> als für ihre nichtsubstituierten Analoga.

*Brenztraubensäure durch saure Hydrolyse der Echinomycinsäure.* 85 mg Echinomycinsäure wurden im zugeschmolzenen Rohr mit 2 ml 6-n. Salzsäure 12 Std. auf 110° erhitzt. Das mit 5 ml Wasser verdünnte Hydrolysat wurde sechsmal mit 10 ml Äther ausgezogen. Die ätherischen Auszüge wurden getrocknet und durch eine VIGREUX-Kolonnen eingedampft. Der Rückstand wurde mit 1 ml Wasser gelöst, filtriert, das Filter mit 1 ml Wasser nachgespült und das Filtrat mit 50 ml einer heissen 0,1proz. Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 3-n. Salzsäure versetzt. Nach dreistd. Stehen wurde dreimal mit Äthylacetat ausgezogen und die Auszüge mit 5proz.

<sup>32)</sup> Vgl. R. H. WILEY & O. H. BORUM, J. Amer. chem. Soc. **72**, 1626 (1950); R. HINDERLING, B. PRIJS & H. ERLIENMEYER, Helv. **38**, 1415 (1955); G. L. BUCHANAN, S. T. REID, R. E. S. THOMSON & E. G. WOOD, J. chem. Soc. **1957**, 4427.

Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Nach Ansäuern der wässrigen Schicht mit Salzsäure wurde wieder mit Äthylacetat extrahiert. Der Rückstand nach dem Eindampfen des Äthylacetats (8 mg) wurde in 0,4 ml Methanol gelöst und papierchromatographisch mit authentischem Brenztraubensäure-2,4-dinitrophenylhydrazon verglichen<sup>33</sup>). Papier: SCHLEICHER & SCHÜLL 2043b, mit Säure gewaschen und mit Borat-Pufferlösung pH 9,2 imprägniert, luft-trocken. Fließmittel: tert. Amylalkohol-Alkohol-Wasser (5:1:4), obere Phase. Von den zwei Flecken mit Rf 0,44 und 0,66 stimmte der erste, stärkere, mit demjenigen des kristallisierten authentischen Vergleichspräparates überein. Vom zweiten wird angenommen, dass er der diastereomeren Verbindung entspricht.

Echinomycin gibt unter gleichen Bedingungen keine Brenztraubensäure.

*Ammoniak und Methylamin durch saure Hydrolyse der Echinomycinsäure.* 130 mg Echinomycinsäure wurden unter den gleichen Bedingungen, wie bei Echinomycin beschrieben, mit 6-n. Salzsäure hydrolysiert und die dabei entstandenen flüchtigen Basen isoliert. Es wurden 3,19 Mol pro Mol Echinomycin eines Basen-Gemisches erhalten, das – wie eine papierchromatographische Untersuchung zeigte – aus etwa gleichen Mengen Ammoniak und Methylamin besteht.

*Reduktive Entschwefelung des Echinomycins mit RANEY-Nickel: Desthio-echinomycin.* 1,5 g Echinomycin wurden in 220 ml warmem Alkohol gelöst, mit 80 ml Wasser verdünnt und 5 Std. mit 16 g modifiziertem RANEY-Nickel W-2<sup>34</sup>) unter Rühren zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde durch Celite filtriert und der Niederschlag gründlich mit viermal je 30 ml 70proz. Alkohol und dreimal mit 95proz. Alkohol gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Chloroform gelöst, die Lösung mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Das erhaltene Produkt (1,24 g) wurde nochmals auf gleiche Weise mit RANEY-Nickel behandelt. Nach der Aufarbeitung erhielt man 1,0 g eines bräunlichen, amorphen Pulvers, das nach dem Trocknen im Hochvakuum noch 0,56% S enthielt. Das Produkt, welches nach einer papierchromatischen Untersuchung mit dem Lösungsmittelsystem BUSH C<sup>34a</sup>) kein Echinomycin mehr enthielt, war kaum antibakteriell wirksam. Das UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit zeigt, dass der Chinoxalin-Kern bei der Entschwefelung angegriffen wird. Es wurden folgende Maxima beobachtet: 246 m $\mu$  (log E<sub>1 cm</sub><sup>1%</sup> 1,78), 312 m $\mu$  (log E<sub>1 cm</sub><sup>1%</sup> 1,74).

1,44 g des Desthio-echinomycins, welches durch dreimalige Behandlung von 2,80 g Echinomycin mit RANEY-Nickel bereitet worden waren, wurden einer CRAIG-Verteilung über 198 Stufen mit folgendem Lösungsmittelsystem unterworfen: 3 l Tetrachlorkohlenstoff, 2 l Chloroform, 4 l Methanol und 1 l Wasser. Von jeder fünften Fraktion wurde das UV.-Absorptionsspektrum in der Gegend von 270–330 m $\mu$  bestimmt, worauf die zusammengehörenden Fraktionen vereinigt, mit Wasser versetzt und mit Chloroform ausgeschüttelt wurden. Die getrockneten Chloroform-Auszüge wurden im Vakuum eingedampft.

Aus den Fraktionen 27–37 wurden 138 mg eines Produktes erhalten, welches nach zweimaligem Umlösen aus Chloroform-Äther 66 mg eines blassgelben Pulvers lieferte, das sich bei 186,5–190,5° unter Braunfärbung zersetzte. Gef. S 0,27%, Mol.-Gew. 998  $\pm$  40 (Chloroform)<sup>5)6)</sup>. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{\max}$  291 m $\mu$  (log E<sub>1 cm</sub><sup>1%</sup> = 1,85).

Die Fraktionen 91–115 (287 mg) wurden in wenig warmem Aceton gelöst, filtriert und mit Äther gefällt. Durch das Umfällen des erhaltenen Niederschlages aus Chloroform-Äther erhielt man 103 mg eines gelblichen Pulvers, das sich bei 193–204° zersetzte. Gef. S 0,90%, Mol.-Gew. 1081  $\pm$  35 (Chloroform)<sup>5)6)</sup>. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{\max}$  294 m $\mu$  (log E<sub>1 cm</sub><sup>1%</sup> 1,80), 308 m $\mu$  (log E<sub>1 cm</sub><sup>1%</sup> 1,82).

Die Fraktionen 131–157 (264 mg) lieferten nach Umfällen aus Chloroform mit Äther 108 mg gelbliches Pulver mit dem Zersetzungspunkt 195–209°, das für eine Molekulargewichtsbestimmung in Chloroform zu schwer löslich war. Gef. S 2,10%; UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{\max}$  217 m $\mu$  (log E<sub>1 cm</sub><sup>1%</sup> = 2,72), 307 m $\mu$  (log E<sub>1 cm</sub><sup>1%</sup> = 1,83).

<sup>33</sup>) A. I. VIRTANEN, J. K. MIETTINEN & H. KUNTTU, Acta chem. scand. **7**, 38 (1953); B. FRANCK & J. KNOKE, Chem. Ber. **90**, 2450 (1957); S. M. ALTMANN, E. M. CROOK & S. P. DATTA, Biochem. J. **49**, LXIII (1951).

<sup>34</sup>) R. MOZINGO, D. E. WOLF, S. A. HARRIS & K. FOLKERS, J. Amer. chem. Soc. **65**, 1013 (1943).

<sup>34a</sup>) I. E. BUSH, Biochem. J. **50**, 370 (1952).

In gleicher Weise liessen sich aus Fraktionen 171–190 (128 mg) 30 mg eines blaugelben Pulvers mit dem Zersetzungspunkt 167–173° erhalten. Gef. S. 1,55%, Mol.-Gew.  $1093 \pm 77$  (Chloroform)<sup>5)6)</sup>. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{\max}$  243  $\mu$  ( $\log E_{1\text{cm}}^{1\%}$  2,32), 291  $\mu$  ( $\log E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1,90$ ).

Alle vier Präparate gaben bei der sauren Hydrolyse nach papierchromatographischer Untersuchung die vier Aminosäuren: Serin, Alanin, N-Methylalanin und N-Methylvalin<sup>35)</sup>.

*Totale saure Hydrolyse des Desthio-echinomycins.* 2,30 g rohes Desthio-echinomycin wurden im eingeschmolzenen Rohr mit 35 ml 6-n. Salzsäure 20 Std. auf 110° erhitzt. Das dunkelgefärbte Hydrolysat verdünnte man mit 35 ml Wasser und liess es 2 Std. mit Aktivkohle stehen. Nach dem Filtrieren über Celite entfernte man die Salzsäure durch mehrmaliges Eindampfen im Vakuum unter Zugabe von etwas Wasser. Der Rückstand wurde mit Ammoniak neutralisiert und in zwei Hälften geteilt, von welchen man jede in 13 ml 50proz. Isopropylalkohol gelöst an einer Cellulosepulver-Säule chromatographierte. Die Säule wurde aus 400 g Cellulosepulver bereitet (d = 5 cm, l = 52 cm) und vor dem Gebrauch mit 3 l 90proz. Isopropylalkohol gewaschen. Als Eluierungsmittel diente 90proz. Isopropylalkohol. Mit einem automatischen Fraktionssammler wurden Fraktionen à 15 ml aufgefangen und dann papierchromatographisch auf Aminosäuren geprüft. Die Fraktionen 35–105 enthielten N-Methylvalin, die Fraktionen 144–230 N-Methylalanin und die Fraktionen von 259 aufwärts, die mit 50proz. Isopropylalkohol eluiert wurden, ein Gemisch von Alanin und Serin.

*Isolierung von L-N-Methylvalin.* Der Rückstand, welcher nach dem Eindampfen der Fraktionen 35–105 zurückblieb, wurde in wenig heissem Wasser aufgenommen, filtriert und mit Aceton gefällt. Das erhaltene farblose Pulver (481 mg, 87% d. Th.) wurde aus Wasser-Alkohol-Aceton umkristallisiert und im Hochvakuum bei 140° sublimiert: Smp. 285,5°,  $[\alpha]_D = +35^\circ$  (c = 1,441, 6-n. Salzsäure),  $pK_{\text{MCS}}^*$  10,01, Äqu.-Gew. 132 (ber. 131,2)<sup>29)</sup>.

|                 |              |         |         |                           |
|-----------------|--------------|---------|---------|---------------------------|
| $C_6H_{13}O_2N$ | Ber. C 54,94 | H 9,99  | N 10,68 | (N)CH <sub>3</sub> 11,46% |
|                 | Gef. „ 55,00 | „ 10,05 | „ 10,84 | „ 11,76%                  |

Das papierchromatographische Verhalten und das IR.-Absorptionsspektrum in KBr, Fig. 2, Kurve 3, waren mit denjenigen eines authentischen Vergleichspräparates<sup>36)</sup> identisch.

*Isolierung von L-N-Methylalanin.* Der Rückstand aus den Fraktionen 144–230 wurde zweimal mit je 14 ml heissem Wasser ausgezogen, filtriert und wieder eingedampft. Durch Auflösen in heissem Alkohol und Fällen mit Aceton-Äther (1:1) erhielt man 666 mg eines farblosen Pulvers, welches durch Entsalzen an einer Mischkolonne aus Amberlite IR-4 B und IRC-50 vom beigemischten Ammoniumchlorid befreit wurde. Die durch Eindampfen im Vakuum erhaltene rohe Aminosäure (260 mg, 59% d. Th.) kristallisierte man aus Alkohol-Aceton-Äther um. Durch Sublimation im Hochvakuum bei 130–135° wurde die reine Verbindung vom Smp. 282°<sup>37)</sup> erhalten;  $[\alpha]_D = +10^\circ$  (c = 2,248, 6-n. Salzsäure)<sup>37)</sup>,  $pK_{\text{MCS}}^*$  10,17, Äqu.-Gew. 99 (ber. 103,1)<sup>29)</sup>.

|              |              |        |         |                           |
|--------------|--------------|--------|---------|---------------------------|
| $C_4H_9O_2N$ | Ber. C 46,59 | H 8,80 | N 13,58 | (N)CH <sub>3</sub> 14,58% |
|              | Gef. „ 46,55 | „ 8,67 | „ 13,49 | „ 14,61%                  |

IR.-Absorptionsspektrum in KBr: Fig. 2, Kurve 2. Das erhaltene L-N-Methylalanin liess sich papierchromatographisch nicht vom synthetischen DL-N-Methylalanin unterscheiden.

*2,4-Dinitrophenyl-Derivat<sup>37)38)</sup>.* Die aus 65 mg L-N-Methylalanin hergestellte Verbindung kristallisierte aus Äther-Hexan unter Zusatz von einigen Tropfen Methanol in seidigen gelben

<sup>35)</sup> Zur papierchromatographischen Trennung von Aminosäuren wurden, sofern nichts anderes vermerkt, zweidimensionale Papierchromatogramme auf WHATMAN-Papier Nr. 1 ausgeführt. Als Fließmittel dienten a) Phenol-Wasser (8:2) und b) n-Butylalkohol-Eisessig-Wasser (4:1:1). Die Aminosäuren wurden mit Ninhydrin-Reagens entwickelt, die N-Methylamino-säuren durch Besprühen mit Pyridin und 0,2proz. Lösung von p-Nitrobenzoylchlorid in Benzol: S. EDLBACHER & F. LITVAN, Z. physiol. Chem. **265**, 241 (1940), PL. A. PLATTNER & U. NAGER, Helv. **31**, 2203 (1948).

<sup>36)</sup> Hergestellt von K. ZEHNDER, Diss. ETH, Zürich 1951. Vgl. auch PL. A. PLATTNER & U. NAGER, Helv. **31**, 665 (1948); A. H. COOK, S. F. FOX & T. H. FARMER, J. chem. Soc. **1949**, 1022; C. E. DALGLIESH, A. W. JOHNSON, A. R. TODD & L. C. VINING, J. chem. Soc. **1950**, 2946.

<sup>37)</sup> K. ZEHNDER, Diss. ETH, Zürich 1951.

<sup>38)</sup> A. L. LEVY & D. CHUNG, J. Amer. chem. Soc. **77**, 2899 (1955).

Nadeln vom Smp. 106,5–108,5° (Zers.),  $[\alpha]_D = +66^\circ$  ( $c = 2,134$ , Chloroform). Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 50° getrocknet.

$C_{10}H_{11}O_6N_3$  Ber. C 44,61 H 4,12 N 15,71% Gef. C 44,70 H 4,09 N 15,49%

Die Verbindung wurde mit einem synthetischen DL-2,4-Dinitrophenyl-N-methylalanin als papierchromatographisch identisch gefunden. Zur Papierchromatographie wurde WHATMAN-Papier No. 1, getränkt mit 1,5-m. Phosphat-Pufferlösung pH = 6,0 und an der Luft getrocknet, verwendet. Fließmittel: tert. Amylalkohol mit der gleichen Pufferlösung gesättigt<sup>39)</sup>.

*Isolierung von D-Sevin und L-Alanin.* Die eingedampften Fraktionen, welche ein Gemisch dieser Aminosäuren enthielten, wurden in 65 ml Wasser gelöst und mit einer Mischkolonne aus Amberlite IR-4B und IRC-50 von Ammoniumchlorid befreit. Der Rückstand nach dem Eindampfen der entsalzten Eluate wurde erneut an einer Cellulosepulver-Säule mit einem Gemisch aus n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:1) chromatographiert. Es wurden wieder Fraktionen à 15 ml getrennt aufgefangen und auf Aminosäuren papierchromatographisch geprüft. Aus den Fraktionen 50–78 wurden 350 mg (93% d. Th.) rohes L-Alanin und aus den Fraktionen 86–116 376 mg (84% d. Th.) rohes D-Serin isoliert. Beide Aminosäuren wurden durch Kristallisation gereinigt und durch Smp., IR.-Absorptionsspektrum, optisches Drehungsvermögen und papierchromatographisches Verhalten identifiziert.

*Partielle saure Hydrolyse des Desthio-echinomycins.* – a) 40 Std. bei 20°. 27 mg rohes Desthio-echinomycin wurden im eingeschmolzenen Rohr 40 Std. mit 0,15 ml konz. Salzsäure stehen gelassen und das Hydrolyseprodukt dann im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die überschüssige Salzsäure wurde durch wiederholtes Eindampfen unter Zugabe von etwas Wasser entfernt, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Äthylacetat ausgeschüttelt und die wässrige Schicht wieder eingedampft und im Vakuum über Kaliumhydroxyd getrocknet.

b) 72 Std. bei 37°. Auf gleiche Weise wurde ein Hydrolyseprodukt aufgearbeitet, welches durch 72std. Stehenlassen von 47 mg rohem Desthio-echinomycin mit 0,2 ml konz. Salzsäure bei 37° entstand.

Zur chromatographischen Trennung der Hydrolyseprodukte verwendete<sup>40)</sup> man WHATMAN-Papier No. 3 und als Fließmittel Phenol mit Wasser gesättigt. Das aufsteigende Papierchromatogramm liess man 50 Std. laufen. Darauf wurden zwei Randstreifen mit Ninhydrin-Lösung entwickelt und die dadurch lokalisierten Zonen mit Aminosäuren und Polypeptiden ausgeschnitten, einzeln mit Wasser eluiert und mit n-Butylalkohol-Essigsäure-Wasser (4:1:1) 15 Std. absteigend papierchromatographiert. Die durch Anfärben der Randstreifen lokalisierten Verbindungen wurden wieder ausgeschnitten und eluiert. Die Hälfte des Eluates wurde jeweils in zugeschmolzener Kapillare mit 6-n. Salzsäure bei 110° vollständig hydrolysiert, die andere Hälfte mit 2,4-Dinitrofluorbenzol und Trimethylamin umgesetzt. Die erhaltenen 2,4-Dinitrophenyl-Derivate wurden mit 6-n. Salzsäure bei 110° vollständig hydrolysiert und die Hydrolyseprodukte in die ätherlöslichen 2,4-Dinitrophenyl-Derivate und die wasserlöslichen freien Aminosäuren aufgetrennt, welche nach den früher erwähnten Methoden<sup>35) 39)</sup> papierchromatographisch untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 1 (S. 311) zusammengefasst.

*Reduktion von Echinomycin mit Lithiumborhydrid.* Zu einer eisgekühlten Lösung von 27 mg Echinomycin in 30 ml trockenem Tetrahydro-furan wurden 54 mg Lithiumborhydrid in mehreren Portionen zugeben. Das Reaktionsgemisch wurde 12 Std. in einer Stickstoffatmosphäre bei Zimmertemperatur gerührt und dann mit 10 ml n-Butylalkohol versetzt. Nachdem das Tetrahydro-furan im Vakuum entfernt worden war, fügte man weitere 3 ml wassergesättigten n-Butylalkohol zu. Nun wurde 10 Min. auf 60° erwärmt und filtriert. Der Niederschlag wurde viermal mit je 5 ml warmem n-Butylalkohol gewaschen, die Filtrate im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit absol. Alkohol ausgezogen. Die Auszüge wurden eingedampft, mit 10 ml Per-

<sup>39)</sup> S. BLACKBURN & A. G. LOWTHER, *Biochem. J.* **48**, 126 (1951); A. L. LEVY, *Nature* **174**, 126 (1954).

<sup>40)</sup> Zur Methodik der Papierchromatographie von Aminosäuren und Polypeptiden vgl. F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 4. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1958, S. 108–113; E. LEDERER & M. LEDERER, *Chromatography*, 2. Aufl., Elsevier, Amsterdam 1957, S. 338–348; I. M. HAIS & K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, Bd. I., G. Fischer, Jena 1958, S. 412–510.

ameisensäure oxydiert<sup>41)</sup> und mit 6-n. Salzsäure auf übliche Weise hydrolysiert und aufgearbeitet. Ein kleiner Teil des Hydrolyseproduktes, welches in 0,5 ml Wasser aufgenommen wurde, diente für die papierchromatographische Untersuchung. Während Serin und Alanin unverändert blieben, fehlte N-Methylvalin vollständig. An seiner Stelle wurde ein neuer Fleck gefunden, der durch Mischchromatogramme eindeutig als N-Methylvalinol identifiziert werden konnte. In der Nähe des Serin-Fleckes wurde ein weiterer Fleck erhalten, der nach seiner Lage im Papierchromatogramm und nach seinen Farbreaktionen mit Ninhydrin (blassviolett) und mit Pyridin und p-Nitrobenzoylchlorid (gelb) mit demjenigen der N-Methylcysteinsäure übereinstimmte. Drei ganz schwache Flecken, welche auch auftreten, wenn man synthetisches N,N'-Dimethylcystin der Behandlung mit Perameisensäure und 6-n. Salzsäure unterworfen hat, sind wohl sekundäre Umwandlungsprodukte des N-Methyl-cysteins<sup>42)</sup>.

Die Hauptmenge des Hydrolysenproduktes wurde mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung von 30 mg 2,4-Dinitrofluorbenzol in 5 ml Alkohol 3 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Der Alkohol wurde darauf im Vakuum abgetrieben, worauf man die wässrige alkalische Lösung dreimal mit Äther extrahierte. In den Äther-Auszügen wurde papierchromatographisch 2,4-Dinitrophenyl-N-methylvalinol identifiziert. Die wässrige Schicht wurde mit verd. Salzsäure vorsichtig angesäuert und wieder mit Äther ausgezogen. Diese Äther-Auszüge enthielten, wie papierchromatographisch gezeigt werden konnte, die 2,4-Dinitrophenyl-Derivate des Alanins und des Serins. Schliesslich wurde die saure wässrige Lösung auf etwa 0,5 ml eingedampft und papierchromatographisch untersucht. Es konnte darin direkt und durch Mischchromatogramme die 2,4-Dinitrophenyl-N-methylcysteinsäure nachgewiesen werden. Diese letztere lässt sich eindeutig papierchromatographisch von der 2,4-Dinitrophenyl-cysteinsäure unterscheiden<sup>43)</sup>.

*Reduktion von Echinomycin mit Natrium und Ammoniak.* Zu 108 mg Echinomycin in 150 ml flüssigem Ammoniak wurden in mehreren Portionen 30 mg Natrium zugefügt. Die anfangs gelbe Lösung färbte sich zunächst rot und schliesslich blau. Zum Reaktionsgemisch wurden nun 70 mg trock. Ammoniumchlorid zugegeben und das Ammoniak wurde abdunsten gelassen. Die Lösung des Rückstandes in 20 ml Wasser wurde mit 0,1-n. Salzsäure auf pH 5 eingestellt und dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Durch Eindampfen der getrockneten Chloroform-Auszüge erhielt man 93 mg eines gelben, amorphen Produktes, das auf übliche Weise mit Perameisensäure oxydiert und mit 6-n. Salzsäure vollständig hydrolysiert wurde. Neben Serin, Alanin und N-Methylvalin konnte im Hydrolyseprodukt leicht die N-Methylcysteinsäure papierchromatographisch nachgewiesen werden. Nach Umsetzung mit 2,4-Dinitrofluorbenzol konnte papierchromatographisch neben den 2,4-Dinitrophenyl-Derivaten von Serin, Alanin und N-Methylvalin ein schwacher Fleck beobachtet werden, der mit demjenigen des 2,4-Dinitrophenyl-N-methylalanin übereinstimmte. Die wasserlöslichen Anteile enthielten reichliche Mengen 2,4-Dinitrophenyl-N-methylcysteinsäure, die ebenfalls papierchromatographisch identifiziert wurde<sup>43)</sup>.

#### Synthetische Vergleichspräparate

*DL-N-Methyl-alanin* wurde nach den Angaben von E. FISCHER & L. v. MECHEL<sup>44)</sup> aus  $\alpha$ -Brompropionsäure und 40proz. wässrigem Methylamin bereitet. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 120–130° sublimiert.  $pK_{MCS}^*$  10,18, Äqu.-Gew. 99 (ber. 103,1)<sup>29)</sup>

$C_4H_9O_2N$  Ber. C 46,59 H 8,80 N 13,58% Gef. C 46,62 H 8,78 N 13,51%

*2,4-Dinitrophenyl-N-methylalanin* wurde nach LEVY & CHUNG<sup>38)</sup> erhalten. Es bildete aus Äthylacetat-Äther-Hexan oder aus Methanol-Wasser goldgelbe Nadeln vom Smp. 156,5–158°. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 75° getrocknet.

$C_{10}H_{11}O_6N_3$  Ber. C 44,61 H 4,12 N 15,61% Gef. C 44,60 H 4,19 N 15,58%

<sup>41)</sup> E. SCHRAM, S. MOORE & E. J. BIGWOOD, *Biochem. J.* **57**, 33 (1954).

<sup>42)</sup> Vgl. M. B. VAN HALTEREN, *Nature* **168**, 1090 (1951).

<sup>43)</sup> Zur papierchromatographischen Trennung von 2,4-Dinitrophenyl-Derivaten der N-Methylcysteinsäure und Cysteinsäure eignet sich besonders Phosphat-Pufferlösung pH 6,0 mit tert.-Amylalkohol gesättigt als Fließmittel.

<sup>44)</sup> Ber. deutsch. chem. Ges. **49**, 1355 (1916).



*DL-N-Methyl-valinol* wurde nach O. VOGL & M. PÖHM<sup>45)</sup> durch Reduktion von feinpulverisiertem *DL-N-Methylvalin*<sup>37)</sup> mit Lithiumaluminiumhydrid in trockenem Tetrahydro-furan hergestellt. Aus 1,31 g *N-Methylvalin* konnten 0,85 g (73% d. Th.) farbloses, hygroskopisches Öl, Sdp. 90–92°/12,5 Torr, erhalten werden. Zur Analyse und Charakterisierung wurde die Base in alkoholischer Lösung in ihr saures Oxalat übergeführt, welches mit Äther gefällt wurde. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol-Äther schmolz das Salz bei 117,5–118,5°. Zur Analyse wurde 2 Tage bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet.

$C_8H_{17}O_5N$  Ber. C 46,37 H 8,27 N 6,76% Gef. C 46,46 H 8,24 N 6,70%

*DL-2,4-Dinitrophenyl-N-methylvalinol* wurde aus *N-methylvalinol* und 2,4-Dinitrofluorbenzol in Gegenwart von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung bereitet<sup>46)</sup>. Das Rohprodukt, ein orangegelbes Öl, erstarrte in der Kälte nach Anrühren mit Petroläther. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol schmolz die sehr lichtempfindliche Verbindung bei 94–95°. Zur Analyse wurde 2 Tage bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet.

$C_{12}H_{17}O_5N_3$  Ber. C 50,88 H 6,05 N 14,83% Gef. C 50,96 H 6,03 N 14,71%

*L-N-Methylcysteinsäure*. Aus *L-Cystein-hydrochlorid* und Formaldehyd wurde nach den Angaben von S. RATNER & H. T. CLARKE<sup>47)</sup> die *L-Thiazolidincarbonsäure-(4)* hergestellt. Ausbeute 80% d. Th., Smp. 196–198°. 6,66 g *Thiazolidincarbonsäure-(4)* wurden in 250 ml flüssigem Ammoniak gelöst und 0,9 ml Wasser zugefügt. In diese Lösung wurden in kleinen Portionen 3,5 g Natrium bis zur bleibenden Blaufärbung eingetragen<sup>48)</sup>. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit 8 g trockenem Ammoniumchlorid versetzt und nach dem Verdunsten des Ammoniaks in 100 ml Wasser gelöst. Die auf die Hälfte eingeeengte und mit 6-n. Salzsäure stark angesäuerte Lösung hinterliess beim Eindampfen im Vakuum einen Rückstand, der fünfmal mit je 30–40 ml absol. Alkohol bei Zimmertemperatur ausgezogen wurde. Die alkoholischen Auszüge wurden im Vakuum zur Trockne eingedampft, in 250 ml Wasser gelöst, mit Ammoniak alkalisiert und nach Zugabe eines Kristalles von Eisen(II)-sulfat 7 Std. mit Luft oxydiert bis die Farbreaktion mit Nitroprussidnatrium auf die Thiol-Gruppe nicht verschwand. Die Lösung wurde darauf mit 25proz. Essigsäure angesäuert und mit 200 ml Alkohol versetzt. Nach 5std. Stehen bei 0° fiel das *L-N,N'-Dimethylcystin* in feinen Flocken aus, welche abzentrifugiert und aus 50proz. Alkohol umkristallisiert wurden; Ausbeute 4,50 g (67% d. Th.). Zur Analyse wurde noch dreimal umkristallisiert und 2 Tage bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet: feine Nadelchen vom Smp. 217–219° (Zers., Kapillare eingeführt bei 210°),  $[\alpha]_D = +78^\circ$  ( $c = 0,778$ ; n. Salzsäure)<sup>49)</sup>.

$C_8H_{16}O_4N_2S_2$  Ber. C 35,82 H 6,01 N 10,45 S 23,86%  
Gef. „ 35,79 „ 6,04 „ 10,33 „ 23,86%

Zu einer Lösung von 1,34 g *N,N'-Dimethylcystin* in 8 ml Wasser und 2,5 ml konz. Salzsäure wurden langsam 4 g Brom zugetropft. Die Lösung wurde mehrmals im Vakuum unter Zusatz von etwas Wasser eingedampft, dann in 6 ml Wasser gelöst und mit 20 ml Alkohol versetzt. Nach 2std. Stehen bei 0° wurden die farblosen Nadeln abfiltriert und mit absol. Alkohol und Äther gewaschen: Ausbeute 1,66 g (82% d. Th.) *L-N-Methylcysteinsäure-monohydrat*. Zur Analyse wurde dreimal aus 60proz. Alkohol umkristallisiert, Smp. 228–229° (Zers., Kapillare bei 222° eingeführt). Gewichtsverlust nach 20 Std. im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd:

$C_4H_9O_5NS, H_2O$  Ber.  $H_2O$  8,95% Gef.  $H_2O$  9,13%

$[\alpha]_D = +4,26^\circ$  ( $c = 5,216$ ; Wasser),  $pK_{H_2O}^* 3,01$ , Äqu.-Gew. gef. 202 (ber. 201,2)<sup>20)</sup>.

$C_4H_9O_5NS$  Ber. C 26,22 H 4,95 N 7,65 S 17,50%  
Gef. „ 26,16 „ 5,05 „ 7,55 „ 17,48%

<sup>45)</sup> Monatsh. **83**, 541 (1952), **84**, 1097 (1953).

<sup>46)</sup> W. GRASSMANN, H. HÖRMANN & H. ENDRES, Chem. Ber. **86**, 1477 (1953); **88**, 102 (1955), M. JUTISZ, M. PRIVAT DE GARILHE, M. SUQUET & C. FROMAGEOT, Bull. Soc. Chim. biol. **36**, 117 (1954).

<sup>47)</sup> J. Amer. chem. Soc. **59**, 200 (1937).

<sup>48)</sup> Zur Methodik vgl. H. T. CLARKE, J. R. JOHNSON & R. ROBINSON, The Chemistry of Penicillin, Princeton University Press, Princeton N. J. 1949, S. 945.

<sup>49)</sup> Vgl. K. BLOCH & H. T. CLARKE, J. biol. Chemistry **125**, 275 (1938),

Als weiteres Vergleichspräparat wurde für papierchromatographische Untersuchungen auf übliche Weise die wasserlösliche 2,4-Dinitrophenyl-N-methylcysteinsäure hergestellt, aber nicht isoliert.

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung W. MANSER) ausgeführt.

### Zusammenfassung

Für das früher<sup>2)3)</sup> isolierte Antibioticum *Echinomycin* wird auf Grund der bereits bekannten und neuen analytischen Daten und Abbauergebnisse eine neue Formel,  $C_{50}H_{60}O_{12}N_{12}S_2$ , abgeleitet. Dieser Formel entspricht die ungewöhnliche Konstitution XIII, eines durch einen Dithian-Ring überbrückten Cyclooctapeptid-dilactons mit 26 Ringgliedern.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

## 27. Das scheinbare Redoxpotential von Viskose und dessen Beeinflussung durch m-nitrobenzolsulfosaures Natrium

von Ernst Geiger und Horst Nobs

(27. XI. 58)

Da in der Viskoseindustrie vielfach Küpenfarbstoffe verwendet werden, haben wir uns die Aufgabe gestellt, den Einfluss des Viskose-Redoxpotentials auf diese Farbstoffe kurz zu diskutieren. Dabei war es interessant festzustellen, wie das Oxydationsmittel m-nitrobenzolsulfosaures Natrium, bekannt als Ludigol, Revatol S, Albatex BD oder Resistsalt L<sup>1)</sup>, mit der Viskose reagiert.

Nach den Ausführungen von J. EISELE & S. HAFENRICHTER<sup>2)</sup> lassen sich die Leukopotentiale der Küpenfarbstoffe in alkalischem Medium mit Kaliumferricyanidlösungen bestimmen. Die Normalpotentialen können nicht gemessen werden, weil die Küpenfarbstoffe nur in der reduzierten Form wasserlöslich sind.

Die Bestimmung des Leukopotentials der Farbstoffe erfolgt nach der bewährten Methode von EISELE & HAFENRICHTER<sup>2)</sup> bei 60° unter Stickstoffstrom. Messungen bei 20° – Viskosetemperatur – geben weniger ausgeprägte Kurvenbilder und erschweren so die exakte Bestimmung des Leukopotentials ausserordentlich. Die bei 60° ausgeführten Messungen werden deshalb auf 20° reduziert. Für Redoxpotentiale von –300 mV bis –900 mV kann eine generelle Reduktion des absoluten Wertes um 50 mV als genau genug angesehen werden. HAFENRICHTER<sup>1)</sup> gibt als Faustregel an, dass sich bei einer Temperaturänderung die mV-Werte gleichsinnig um eine Einheit pro °C ändern.

Alle Messungen werden mit der Kette Platin-Kalomel unter Stickstoffstrom und intensivem Rühren durchgeführt. Für die Bestimmung des Potentials verwendeten wir das pH-Meter Type E 150 A der METROHM AG, Herisau, mit eingebauter mV-Skala. Gerührt wurde mit einem Magnetrührwerk mit eingebauter Heizplatte. Um Fehlmessungen zu vermeiden, ist es vorteilhaft, die bei Zimmertemperatur gesättigte Kaliumchloridlösung öfters zu erneuern.

<sup>1)</sup> S. HAFENRICHTER, Textil-Rundschau 11, 257 (1956).

<sup>2)</sup> Melliand Textilber. 35, 756 (1954).