

Wirkstofflösung gemischt. Die Mischung enthielt 0,1% Desoxyribonucleinsäure, 10% Kochsalz; sie war 0,0005 M hinsichtlich Wirkstoff und 1/30 M hinsichtlich Phosphatpuffer. Während der Versuche sank der pH-Wert der Lösungen niemals unter etwa 6,3. Die Mischungen wurden in 5 ml Rundkolben mit Schliffzapfen unter Luftatmosphäre aufbewahrt; die Viskosität wurde in bestimmten Zeitintervallen gemessen.

Die Viskositätsmessungen erfolgten in einem OSTWALD-Viskosimeter mit einer Kapillare von 6,5 cm Länge und 0,023 cm Durchmesser. Die obere Kugel fasste 0,080 ml; für die Messungen wurde jeweils 1 ml der Lösungen verwendet. Auslaufzeiten: 70 bis 150 Sek. Eichflüssigkeit: Wasser. Der mittlere Strömungsgradient errechnet sich gemäss der Formel von KROEPELIN¹³⁾ ungefähr zu 300 bis 600 s⁻¹. Die Viskositäten wurden in einem thermostatisierten Wasserbad von 37° ± 0,1° bestimmt.

SUMMARY

Ascorbic acid in aqueous solution in the presence of molecular oxygen causes a degradation of deoxyribonucleic acid (DNA). This degradation can be completely suppressed by the addition of catalase or of peroxidase. It is concluded that the degradation of the DNA is due to the formation of hydrogen peroxide during the autoxidation of the ascorbic acid. Hydrogen peroxide itself is not very efficient in degrading DNA, but it is reduced by ascorbic acid to OH radicals which degrade the DNA.

Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

¹³⁾ H. KROEPELIN, Kolloid-Z. 47, 294 (1929).

8. Welkstoffe und Antibiotika

24. Mitteilung¹⁾

Die Konstitution des Lycomarasmins²⁾

von E. HARDEGGER, P. LIECHTI³⁾, L. M. JACKMAN⁴⁾, A. BOLLER⁵⁾ und PL. A. PLATTNER

(14. XI. 62)

Aus Kulturfiltraten von *Fusarium lycopersici* SACC., dem Erreger der infektiösen Tomatenwelke, isolierten vor längerer Zeit PLATTNER & CLAUSON-KAAS⁶⁾ eine welkaktive Verbindung, die Lycomarasmin genannt wurde⁷⁾. Die Kulturfiltrate enthielten auch stets eine dem Lycomarasmin sehr nahe stehende, biologisch inaktive

¹⁾ 23. Mitt.: Helv. 43, 2096 (1960).

²⁾ Vorgetragen von E. HARDEGGER im Mai 1962 im Institut für Chemie der Naturstoffe, Akademie der Wissenschaften der UdSSR, in Moskau.

³⁾ Vgl. P. LIECHTI, Dissertation ETH, Zürich 1958, Prom.-Nr. 2789.

⁴⁾ Z. Z. University of Melbourne, Victoria, Australia.

⁵⁾ Vgl. A. BOLLER, Dissertation ETH, Zürich 1951, Prom.-Nr. 2047.

⁶⁾ N. CLAUSON-KAAS, PL. A. PLATTNER & E. GÄUMANN, Ber. Schweiz. Bot. Ges. 54, 523 (1944); PL. A. PLATTNER & N. CLAUSON-KAAS, Helv. 28, 188 (1945); Experientia 1, 195 (1945).

⁷⁾ Die Wirkungsweise des Lycomarasmins in der Tomatenpflanze ist eingehend untersucht worden; vgl. dazu E. GÄUMANN, ST. NAEF-ROTH & G. MIESCHER, Phytopath. Z. 16, 257 (1950), E. GÄUMANN, ST. NAEF-ROTH & H. KERN, Phytopath. Z. 24, 373 (1955), E. GÄUMANN & ST. NAEF-ROTH, Phytopath. Z. 25, 418 (1956), dort auch weitere Literatur.

Verbindung, die sog. Substanz J. In der Substanz J, die in allen pH-Bereichen⁸⁾ leicht aus Lycomarasmin unter Abspaltung von 1 Mol. Ammoniak entsteht⁹⁾, scheint ein Kunstprodukt vorzuliegen.

Die Bruttoformel des Lycomarasmins stimmt auf $C_9H_{15}O_7N_3$, jene von Substanz J demzufolge auf $C_9H_{12}O_7N_2$. Das röntgenographisch¹⁰⁾ ermittelte Molekulargewicht des Lycomarasmins steht in Übereinstimmung mit Diffusionsmessungen¹¹⁾. Beide Verbindungen sind optisch aktiv.

Weder Lycomarasmin noch Substanz J zeigen im UV. eine charakteristische Absorption, und auch aus dem IR.-Spektrum der beiden Substanzen und ihrer Salze wurden wegen Überlagerung aufschlussreicher Banden keine positiven Erkenntnisse gewonnen, dagegen konnten für beide Verbindungen Lacton-, Säureanhydrid- und Diacylamid-Gruppen ausgeschlossen werden⁵⁾.

Lycomarasmin gibt mit Ninhydrin eine violette Färbung und mit Hypojodit die Jodoformreaktion¹²⁾. Substanz J wird mit Ninhydrin gelb bis braunviolett und gibt mit alkalischer Jodlösung kein Jodoform. Lycomarasmin und Substanz J gaben keine kristallisierten Reaktionsprodukte mit 3,5-Dinitro-fluor-benzol, 3,5-Dinitro-benzoylchlorid, Acetylchlorid, Tosylchlorid, 2,4-Dinitro-phenylhydrazin, Phosphoroxylchlorid. Beide Verbindungen entfärben Brom bei pH 7 und Permanganat⁵⁾.

Keine der beiden Verbindungen ist unter Normalbedingungen mit Palladium, Platin oder Nickel hydrierbar⁵⁾, keine enthält C-Methyl nach KUHN-ROTH, keine gibt VAN SLYKE-Stickstoff¹³⁾, keine wird von proteolytischen Fermenten abgebaut.

Nach den etwas schwierig und nicht ganz sicher interpretierbaren Titrationsversuchen scheinen beide Verbindungen je 3 Carboxylgruppen zu enthalten⁵⁾.

Lycomarasmin wird von 1 N bis konz. Salzsäure erst im Verlauf einiger Stunden bei 145–150° annähernd quantitativ hydrolytisch gespalten. Als Spaltstücke wurden DL-Asparaginsäure, Glycin, Brenztraubensäure und Ammoniak gefunden. Die Racemisierung der Asparaginsäure wurde den energischen Hydrolysebedingungen zugeschrieben. Modellversuche machten es wahrscheinlich, dass Lycomarasmin aus den vier Spaltstücken im molaren Verhältnis 1:1:1:1 aufgebaut sei¹³⁾.

In Versuchen zur partiellen Hydrolyse des Lycomarasmins mit 1 N Salzsäure bei 100° liessen sich nur Substanz J, DL-Asparaginsäure und Glycin, bzw. nach längerer Reaktionszeit nur DL-Asparaginsäure und Glycin papierchromatographisch nachweisen¹³⁾. Man muss daraus schliessen, dass zunächst das Lycomarasmin mindestens teilweise in Substanz J umgewandelt und dass anschliessend Substanz J hydrolysiert wird.

⁸⁾ Die Umwandlung erfolgt sehr leicht in alkalischer Lösung, weniger rasch in saurer und neutraler Lösung.

⁹⁾ Möglicherweise neben etwas Vb.

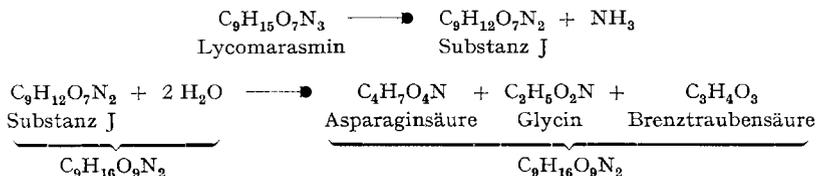
¹⁰⁾ PL. A. PLATTNER, HS. H. GÜNTARD & A. BOLLER, *Helv.* 35, 999 (1952), und Berichtigung von PL. A. PLATTNER, A. BOLLER & HS. H. GÜNTARD, *Helv.* 43, 887 (1960). – Y. OKAJA & R. PEPIŃSKY, *Acta crystall.* 10, 138 (1957).

¹¹⁾ Zur Methodik vgl. K. O. PEDERSEN & R. L. M. SYNGE, *Acta chim. scand.* 2, 408 (1948). Wir danken Herrn Dr. KAI O. PEDERSEN für die Durchführung der Versuche, deren Ergebnisse in der Dissertation von A. BOLLER⁵⁾ beschrieben sind.

¹²⁾ Vgl. D. W. WOOLEY, *J. biol. Chemistry* 176, 1291 (1948).

¹³⁾ PL. A. PLATTNER, N. CLAUSON-KAAS, A. BOLLER & U. NAGER, *Helv.* 37, 860 (1948).

Anhand der Hydrolysenversuche sind für Lycomarasmin und Substanz J, z. T. mit allen Vorbehalten, verschiedene Konstitutionsformeln in Erwägung gezogen worden^{5) 12) 13) 14)}. Keine der vorgeschlagenen Formeln erklärt die Eigenschaften der beiden Verbindungen befriedigend und keine ist je bewiesen worden. Nach den heutigen Erkenntnissen sind alle falsch.



Eine vorübergehende neue Schwierigkeit im Hinblick auf die Hydrolysgleichung ergab sich, als nach Hydrolyse von Lycomarasmin mit Wasser bei 200° als neues Spaltstück DL- α -Alanin in beträchtlichen Mengen isoliert wurde. Der analytische Wert dieses Befundes erwies sich aber bald als gering, da festgestellt wurde, dass unter denselben Hydrolysebedingungen auch aus reiner Asparaginsäure, allerdings nur in Spuren, Alanin entsteht. Es erscheint auch möglich, dass Alanin durch «Umaminierung» aus Asparaginsäure bzw. Glycin und Brenztraubensäure, oder aus Brenztraubensäure, Ammoniak und reduzierenden Stoffen des Hydrolysegemisches sekundär entstanden ist.

Von den 3 N-Atomen des Lycomarasmins erscheinen in den Hydrolyseprodukten – natürlich mit Ausnahme von Alanin! – 2 in organischer Bindung. Orientierenden Aufschluss über die Bindungsart des dritten N-Atoms sowie über die Konfiguration des Asparaginsäure-Teils gab die Oxydation von Lycomarasmin mit Kaliumpermanganat. In den Oxydationsprodukten konnten auf Grund der Rf-Werte und der Ninhydrin-Reaktion mit Sicherheit Glycinamid identifiziert und L-Asparaginsäure und Glycin als kristallisierte Dinitrophenyl-Derivate isoliert werden.

Um näheren Einblick in die Art der Verknüpfung des gemäss Bruttoformel noch fehlenden C₃-Bruchstücks, des L-Asparaginsäure-Teils und des Glycinamid-Teils im Lycomarasmin, bzw. des Glycin-Teils in Substanz J zu erhalten, versuchten wir

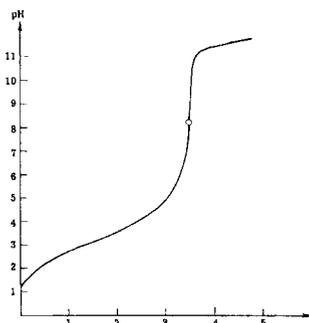


Fig. 1. Titration des Veresterungsproduktes von 78,5 mg Subst. J mit Methanol-Salzsäure in 10 ml Methanol mit 0,1N NaOH

Zur Umrechnung der Zahlenwerte vgl. Tabelle S. 64

¹⁴⁾ M. BRENNER, R. TAMM & P. QUITT, *Helv.* 41, 763 (1958).

alle funktionellen Gruppen in beiden Verbindungen eindeutig festzulegen. Dies gelang durch Behandlung mit methanolischer Salzsäure.

Substanz J gab ein öliges Trimethylester-hydrochlorid, welches über die unbeständige Trimethylester-base als kristallisiertes Pikrolonat (Smp. 160-161°) der erwarteten Zusammensetzung $C_{12}H_{18}O_7N_2, C_{10}H_8O_5N_4$ charakterisiert wurde. In analoger Weise konnte auch das Triäthylester-pikrolonat $C_{15}H_{24}O_7N_2, C_{10}H_8O_5N_4$ in 2 wahrscheinlich dimorphen Formen gewonnen werden.



Das Trimethylester-hydrochlorid zeigte in der Titration mit NaOH nur 1 basische Gruppe (s. Fig. 1). Das zweite N-Atom muss also in Substanz-J-ester bzw. in Substanz J amidartig gebunden sein.

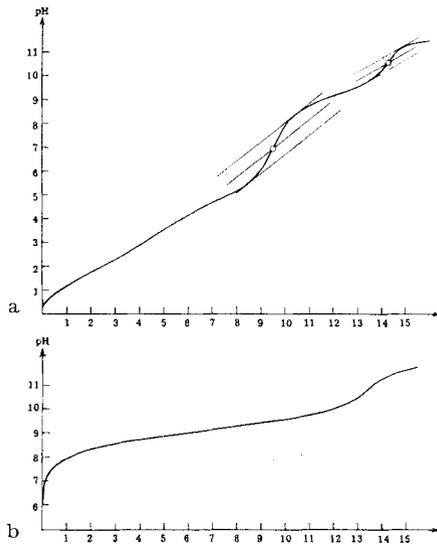


Fig. 2. Titration des Veresterungsproduktes von Lycomarasmin

Zur Umrechnung der Zahlenwerte vgl. Tabelle S. 64

a = Titration des Veresterungsproduktes von 134 mg Lycomarasmin mit Methanol-Salzsäure in 10 ml Methanol mit 0,1N NaOH

b = Titration von 69 mg Ammoniumchlorid in 10 ml Methanol mit 0,1N NaOH

Unter der Annahme, dass bei der Umwandlung von Lycomarasmin in Substanz J der Amid-Stickstoff des Glycins abgespalten wird, folgt durch Kombination mit dem Ergebnis der Titration, dass in Substanz J das Carboxyl des Glycin-Teils säureamidartig mit dem Stickstoff des Asparagin-Teils verbunden ist. Der basische Stickstoff des Substanz-J-esters gehört folglich dem Glycin-Teil an. Damit ist die Natur aller funktionellen Gruppen in Substanz J festgelegt, und es kann dafür die Partialformel A aufgestellt werden.

Da es unmöglich ist, in C_2H_4-COOH 3 freie Valenzen unterzubringen, ist die Teilstruktur logischerweise als sekundäres Amin nach B zu formulieren.

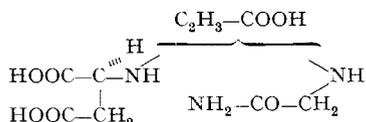
Die für Substanz J postulierte Teilformel steht in bester Übereinstimmung mit der Hydrolyse des öligen Substanz-J-tosylats, welche zu krist. N-Tosylglycin und L-Asparaginsäure führte¹²⁾. Ferner wird aus der Teilformel verständlich, weshalb die – im experimentellen Teil nicht beschriebene – Oxydation von Substanz J mit Permanganat weder zu Glycinamid noch zu freien Aminosäuren führte, sondern erst nach saurer Hydrolyse DL-Asparaginsäure und Glycin gab.

Lycomarasmin gab mit methanolischer Salzsäure unter Abspaltung der für 1 N berechneten Menge Ammoniumchlorid auch ein öliges Methylester-hydrochlorid, welches titrimetrisch 2 basische N-Atome und demzufolge 4 veresterte Carboxylgruppen enthielt, also als Tetramethylester-dihydrochlorid neben dem ebenfalls titrimetrisch sauber erfassten Ammoniumchlorid vorliegen muss (s. Fig. 2).

Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse der Veresterung von Substanz J und Lycomarasmin und der Titration der Ester im Vergleich mit den berechneten Werten.

Substanz	Ein- waage mg	Veresterungs- produkt		Titration NaOH-Verbrauch		Aminogruppen pro Mol	
		ber. mg	gef. mg	ber. ml	gef. ml	ber.	gef.
Substanz J	17	22	22	0,65	0,68	1	1,05
	78,5	102	99	3,02	3,50	1	1,16
Lycomarasmin	134	205	201	9,66	9,50	2	1,97
	79	121	119	5,71	5,60	2	1,96
	76	117	116	5,50	5,10	2	1,86

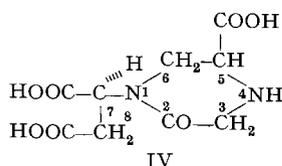
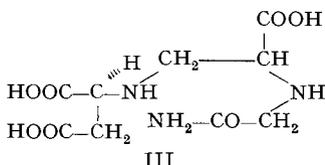
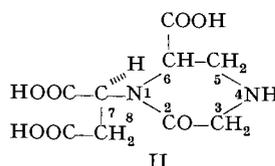
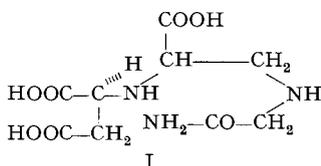
Bei der Veresterung des Lycomarasmins ist die Amidgruppe des Glycinteils in eine Methylester-gruppe umgewandelt worden. Für Lycomarasmin ergibt sich daraus folgende Teilformel.



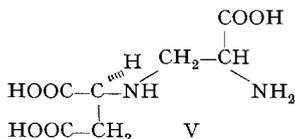
Sowohl Substanz-J-trimethylester-hydrochlorid wie das Tetramethylester-dihydrochlorid aus Lycomarasmin gaben bei alkalischer Verseifung Substanz J. Es steht daher fest, dass bei der Veresterung in keiner der beiden Verbindungen eine Umlagerung erfolgte und dass beide im C_2H_5-COOH -Teil gleiche Struktur besitzen. In beiden Verbindungen ist die C_3 -Säure, unter Erhaltung der freien Carboxylgruppe und demzufolge nicht säureamidartig, mit dem N-Atom der Asparaginsäure wie mit dem α -N des Glycin-Teils verbunden.

Die in ihrer Konstitution bisher noch nicht erkannte C_3 -Säure kann nicht zweifach in α -Stellung zur Carboxylgruppe substituiert sein, da weder Substanz J, noch Lycomarasmin C-Methyl nach KUHN-ROTH enthalten. Disubstitution in β -Stellung zum Carboxyl ist mit dem Auftreten von Brenztraubensäure als Spaltstück nach der Hydrolyse unvereinbar. Daraus folgt, dass sich die C_3 -Säure von der α, β -Diaminopropionsäure ableiten muss.

Für Lycomarasmin und Substanz J bleibt deshalb nur noch die Wahl zwischen den 2 Formelpaaren I, II und III, IV.



Eine definitive Entscheidung zwischen den Strukturen II und IV für Substanz J konnte mit Hilfe der NMR. getroffen werden¹⁵⁾. Als Vergleichssubstanzen dienten L-Asparaginsäure, N-Acetyl-L-asparaginsäure und optisch aktive N-(β-Carboxy-β-amino-äthyl)-asparaginsäure (V),



über deren Herstellung wir demnächst berichten werden.

Nur die in alkalischer Lösung aufgenommenen Spektren waren interpretierbar. Die Lage der Banden erwies sich abhängig von Lauge- und Substanz-Konzentration. Die im folgenden diskutierten Spektren wurden in 1,47N NaOD bei 0,308M Substanz-Konzentration aufgenommen.

Das Spektrum der L-Asparaginsäure (Fig. 3, oben) zeigt ein *ABX*-System. *A* und *B* sind die Methylenprotonen, die eine ähnliche, aber nicht identische chemische Verschiebung aufweisen, weil die Methylengruppe mit einem asymmetrischen C-Atom verknüpft ist. Das Spektrum stimmt mit den allgemeinen Gegebenheiten eines *ABX*-Systems überein, da es ein 8-Linien Multipllett von *AB* und ein 4-Linien Multipllett von *X* aufweist, wobei die beiden Splittungen ebenfalls in der *AB*-Region erscheinen. *A* und *B* liegen 2,4–2,6 ppm und *X* 3,5 ppm vom äusseren Bezugssignal (Tetramethylsilan).

Das Spektrum der N-(β-Carboxy-β-amino-äthyl)-asparaginsäure (Fig. 3, unten) ist wegen Überlappung einiger Banden komplexer. Neben den oben besprochenen Protonen des Asparaginsäure-Teils erscheint hier eine Absorption bei 3,2–3,5 ppm, die der dem Asparaginsäure-N benachbarten CH₂-Gruppe zugeschrieben werden muss.

Das Spektrum der Substanz J (Fig. 4, oben) enthält das 8-Linien *AB* Multipllett bei ca. 2,6 ppm, welches für die Methylengruppe der Asparaginsäure charakte-

¹⁵⁾ Wir danken Frä. Dr. D. MEUCHE und den Herren A. WALSER & R. ANDREATTA für die Aufnahme und die Mithilfe bei der Interpretation der NMR.-Spektren.

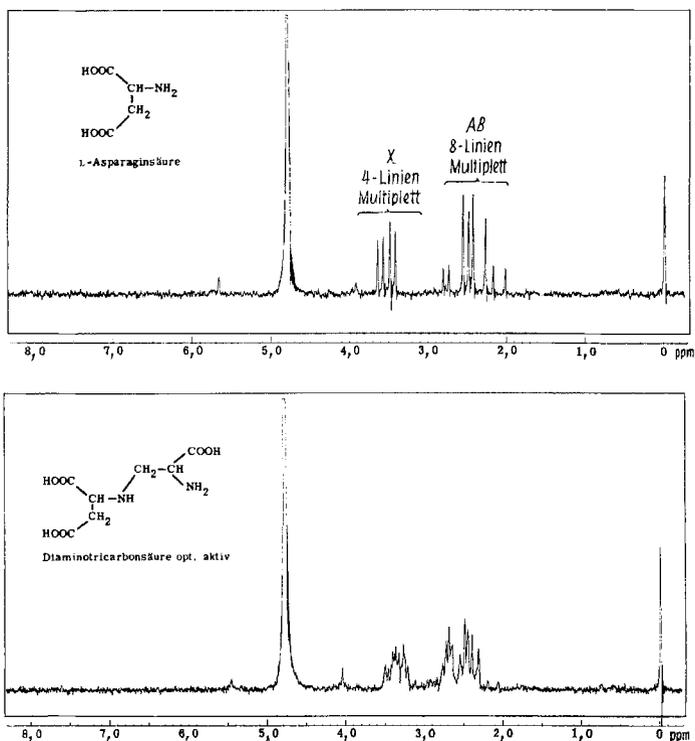


Fig. 3. NMR.-Spektren von L-Asparaginsäure und Diaminotricarbonsäure

ristisch ist und mit Sicherheit nicht aus dem Ring von Substanz J stammt. Die bei N-Acylierung allgemein beobachtete Verschiebung – vgl. dazu das Spektrum der N-Acetyl-asparaginsäure (Fig. 4, unten) – nach niederen Feldstärken ist dem Asparaginsäure-Stickstoff zuzuschreiben, der hier als Amid-Stickstoff vorliegt. Das X-Signal ist jetzt bei 5,0 ppm, d. h. ungefähr gleich weit vom AB-Signal wie in N-Acetyl-asparaginsäure, während die übrige Absorption in der Gegend von 3,5 ppm liegt.

Bezüglich die möglichen Strukturen für Substanz J lässt sich daraus folgendes ableiten:

In beiden Strukturen II und IV muss die Absorption der Protonen in Stellung 7 und 8 bei 5,0 ppm bzw. 2,6 ppm liegen. In Struktur IV ist das Proton 5 von gleichem Typ wie in Asparaginsäure mit einer Absorption bei 3,5 ppm zu erwarten. Die übrigen 4 Protonen aus Stellung 3 und 6 fallen ebenfalls in diese Region. Das Spektrum der Substanz J stimmt demnach mit Struktur IV überein.

In der Struktur II sind die Protonen in Stellung 6 und 7 vom gleichen Typ, und das Spektrum sollte in der Gegend von 5,0 ppm eine zwei X-Protonen entsprechende Absorption aufweisen. Zudem sollten, vergleichsweise zur N-(β -Carboxy- β -amino-äthyl)-asparaginsäure, die beiden Protonen in Stellung 5 um 3,4 ppm absorbieren. Die Struktur II ist im Hinblick auf beide Argumente unvereinbar mit dem Spektrum von Substanz J.

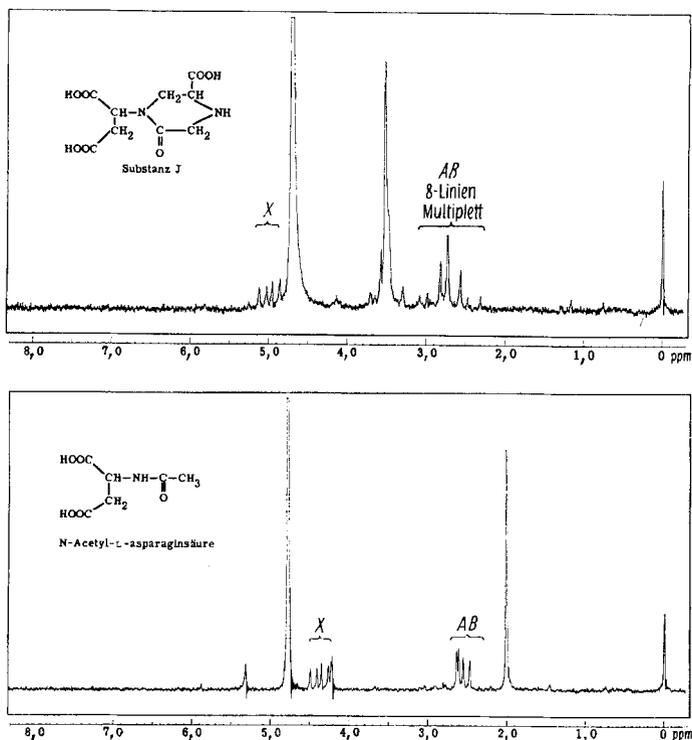
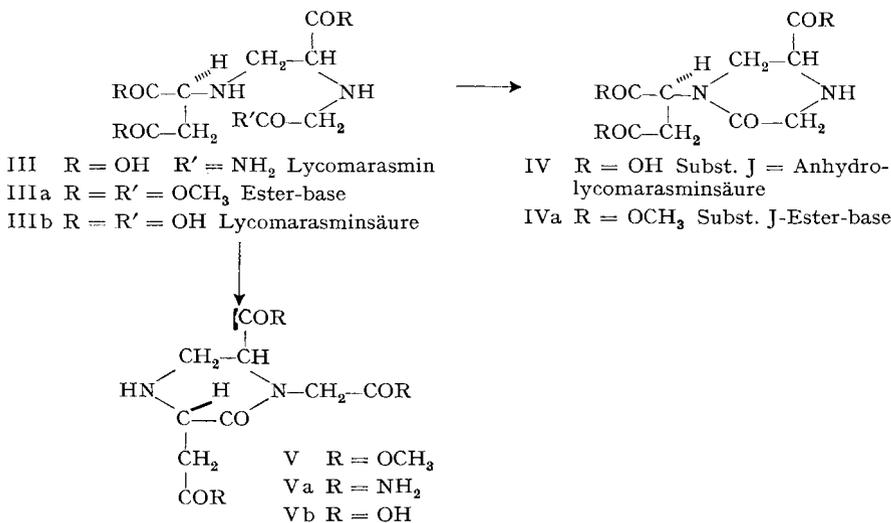


Fig. 4. NMR.-Spektren von Substanz J und N-Acetyl-L-asparaginsäure

Für Substanz J ist damit die Struktur IV und für Lycomarasmin die Konstitutionsformel III festgelegt. Die einzige Unbestimmtheit in den beiden Strukturformeln ist noch die absolute Konfiguration des asymmetrischen C-Atoms 5.

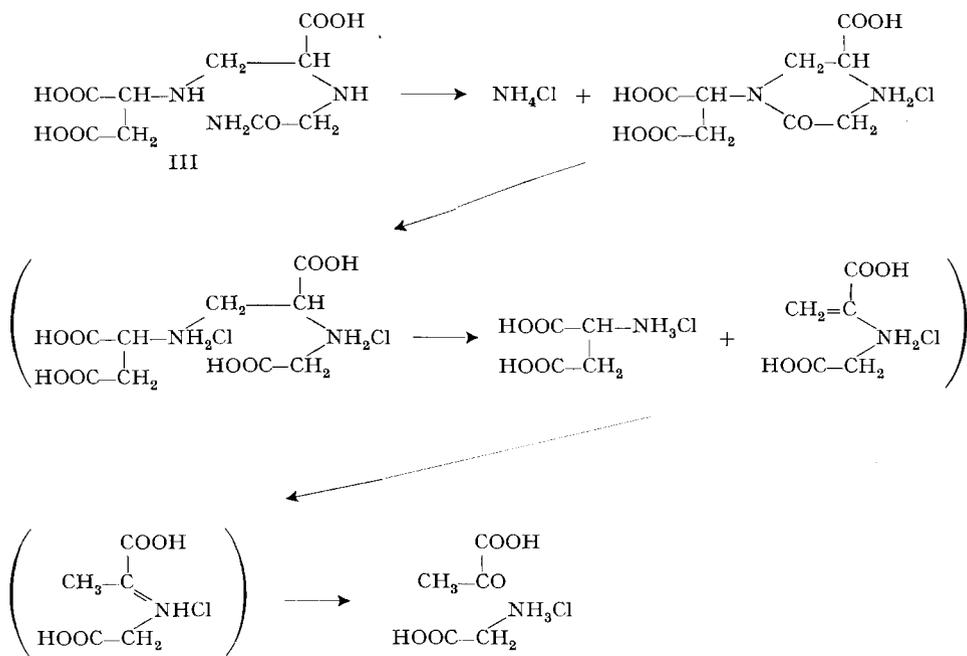


Nach Aufklärung der Struktur des Lycomarasmins und der Substanz J können nun auch die Lycomarasminester-base IIIa und die Substanz-J-ester-base IVa formuliert werden.

Die Umsetzung der Lycomarasminester-base mit Pikrolonsäure führte überraschenderweise unter Abspaltung von Methanol zu einem krist. Pikrolonat $C_{22}H_{26}O_{12}N_6$ (Smp. 169–171°), das nach UV.- und IR.-Spektren und Mischprobe mit dem Substanz-J-ester-pikrolonat $C_{22}H_{26}O_{12}N_6$ (Smp. 160–161°) nicht identisch war und dem als einzig mögliche Struktur mit einem 6 gliedrigen Lactamring die Formel V zukommen sollte¹⁶⁾.

Eine analoge Struktur schreiben wir vorläufig auch dem aus der Lycomarasminester-base mit Ammoniak erhältlichen Triamid-lactam Va zu¹⁶⁾, da die Einwirkung von Ammoniak auf Substanz-J-ester-base nicht zu einem krist. Produkt führte.

Die aus Lycomarasmin gewonnene Ester-base IIIa leitet sich von einer Diaminotetracarbonsäure IIIb ab, die, wie wir fanden, unter speziellen Versuchsbedingungen durch alkalische Verseifung aus Lycomarasmin hergestellt werden konnte, ohne dass dabei wesentliche Mengen an Substanz J entstanden. Wir bezeichnen die Diaminotetracarbonsäure IIIb als Lycomarasminsäure. Die Lycomarasminsäure ist im Welketest etwa doppelt so aktiv wie Lycomarasmin. In alkalischer wie in neutraler Lösung wird sie beim Erwärmen leicht unter Wasserabspaltung in guter Ausbeute zu Substanz J cyclisiert. Möglicherweise entsteht gleichzeitig als Nebenprodukt etwas isomere Tricarbonsäure Vb¹⁸⁾. Auch 5 jährige krist. Präparate von reiner Lycomarasminsäure enthielten auf Grund einer neuerlichen Stickstoffanalyse



¹⁶⁾ Sofern nicht ein 7gliedriger Lactamring oder ein dimolekulares Diketopiperazin vorliegen. Die Verbindungen wurden nicht näher untersucht.

bereits ca. 50% Lactam. Lycomarasminsäure ist neben Substanz J und einer diesen Produkten nahestehenden Verbindung (Aspergillomarasmin A) kürzlich von LEDERER und Mitarbeitern¹⁷⁾ aus Kulturflüssigkeit von *Aspergillus flavus oryzae* isoliert und orientierend untersucht worden. Nachdem die Struktur dieser Verbindungen nun feststeht, wollen wir in Übereinkunft mit E. LEDERER Substanz J künftig als Anhydro-lycomarasminsäure bezeichnen.

Der hydrolytische Abbau des Lycomarasmins könnte auf Grund der ermittelten Strukturen beispielsweise wie folgt formuliert werden (siehe Seite 68).

Das Jodoform, welches aus Lycomarasmin, nicht aber aus Anhydro-lycomarasminsäure mit Hypojodit entsteht, scheint entsprechend einem STRECKER'schen Abbau durch Angriff am Asparaginsäurestickstoff über eine SCHIFF'sche Base der Oxal-essigsäure aus der Methylengruppe des Asparaginsäureteils zu stammen.

Lycomarasmin und Lycomarasminsäure gehören einer ziemlich neuartigen Gruppe von Naturstoffen an, die aus Aminosäuren aufgebaut sind und in denen diese Säuren nicht peptidartig, sondern über ihre α -N-Atome durch Bildung sekundärer Aminogruppen miteinander verknüpft sind. In die gleiche Gruppe von Naturstoffen gehören das Octopin¹⁸⁾ aus *Octopus*-Muskeln, das Lysopin¹⁹⁾ aus crown gall-Gewebe verschiedener erkrankter Pflanzen und das Aspergillomarasmin A¹⁷⁾ aus Kulturen von *Aspergillus flavus oryzae*.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS (Projekte 1297, 1718, 2290) und der Fa. F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG in Basel für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil²⁰⁾

1) *Isolierung von Lycomarasmin und Substanz J*²¹⁾. Zur Aufarbeitung der wie früher hergestellten Kulturen²²⁾ von *Fusarium lycopersici* SACC. bewährte sich folgende gegenüber den Angaben von PLATTNER & CLAUSON-KAAS⁶⁾ etwas abgeänderte Vorschrift.

Das Kulturfiltrat wurde mit einer konz. Lösung von 10 g Bariumacetat pro l versetzt. Nach Abfiltrieren der ausgefallenen Bariumsalze über Celite wurde das Filtrat im Rotationsverdampfer bei 10–16° Badtemperatur auf 1/10 des Volumens eingengt und mit der 10fachen Menge Methanol versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Hochvakuum getrocknet, 2–3mal mit je der 10fachen Menge Wasser verrieben und abfiltriert. Die Filtrate wurden mit 1N HCl auf pH 2,6 eingestellt. Bei 4° schieden sich im Verlauf von 2–6 Tagen Lycomarasmin und im Verlauf von weiteren 2–4 Wochen Substanz J aus. Die nach der angegebenen Zeit jeweils abfiltrierten Präparate wurden getrennt, bei 4° in 1N NaOH gelöst und mit 1N HCl wieder auf pH 2,6 eingestellt. Je nach der Kristallisationsgeschwindigkeit wurden die Präparate analysenrein in bis zu 5 mm langen derben Prismen erhalten.

¹⁷⁾ M. ROBERT, M. BARBIER, E. LEDERER, L. ROUX, K. BIEMANN & W. VETTER, Bull. Soc. chim. France 1962, 187. Zur Konstitutionsaufklärung von Aspergillomarasmin A vgl. A, L, HAENNI, M. BARBIER & E. LEDERER, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 255, 1476 (1962).

¹⁸⁾ K. MORIZAWA, Acta Schol. Med. Univ. Imp. Kioto 9, 285 (1927); S. AKASI, J. Biochemistry (Tokyo) 25, 261, 281, 291 (1937); E. MOORE & D. W. WILSON, J. biol. Chemistry 119, 573, 585 (1937), und weitere Literatur in J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, Chemistry of the Amino Acids, Vol. 3, p. 2548, J. Wiley & Sons 1961.

¹⁹⁾ K. BIEMANN, C. LIORÉ, J. ASSELINEAU, E. LEDERER & J. POLONSKY, Biochimica biophysica Acta 40, 369 (1960).

²⁰⁾ Alle Smp. sind korrigiert.

²¹⁾ Wir danken Frau Dr. ST. NAEF-ROTH vom Institut für spezielle Botanik (ETH) für die Bereitstellung und Frau Dr. W. ZANKOWSKA-JASINSKA (z. Z. Institut für org. Chemie der Universität Krakau, Polen) für die Aufarbeitung der Kulturen.

²²⁾ Helv. 28, 188 (1945).

Die Ausbeuten waren stark schwankend. Einzelne Ansätze enthielten nur Lycomarasmin, andere nur Substanz J, meist aber beide Substanzen in etwa gleichen Mengen. Höchste Ausbeute 370 mg Lycomarasmin und 295 mg Substanz J pro Liter Kulturfiltrat, durchschnittliche Ausbeute je etwa 100 mg.

Die Analysenpräparate wurden 2 Tage bei 60° im Hochvakuum getrocknet.

Lycomarasmin $C_9H_{15}O_7N_3$ Ber. C 38,99 H 5,45 N 15,16% Gef. C 39,11 H 5,42 N 14,60%
 Substanz J $C_9H_{12}O_7N_2$ Ber. C 41,54 H 4,65% Gef. C 41,60 H 4,77%

2) *Versuche zum enzymatischen Abbau von Lycomarasmin*²³⁾. In Vorversuchen mit Gelatine erwiesen sich alle fünf verwendeten Enzympräparate als aktiv. 20 mg Lycomarasmin wurden in möglichst wenig verd. Ammoniak gelöst, die Lösung im Vakuum rasch zur Trockne eingedampft und das Ammoniumsalz für die Versuche eingesetzt.

Mit *Papain* (BRITISH DRUG HOUSES). Das Ammoniumsalz wurde in 1 ml 0,1M Citratpuffer vom pH 5,0 gelöst und nach Zugabe von 4,5 mg Papain in 0,5 ml 0,05M Citratpuffer vom pH 5,0 bei 37° gehalten²⁴⁾.

Mit *Trypsin* (Handelspräparat unbekannter Herkunft). Das Ammoniumsalz wurde in 1 ml 0,05M Boraxpuffer vom pH 8,3, der 40/100 Trypsin enthielt, gelöst und auf 37° erwärmt²⁵⁾.

Mit *Proteasengemischen* (ein Bakterienproteasengemisch und ein Pilzproteasengemisch der SCHWEIZERISCHEN FERMENT AG, Basel, und ein Pilzproteasengemisch der Firma BOEHRINGER, Mannheim²⁶⁾). Das Ammoniumsalz wurde in 2 ml 0,07M Phosphatpuffer vom pH 7 gelöst, mit 0,5 ml einer 0,4-proz. Lösung der Fermentgemische in gleichem Phosphatpuffer versetzt und bei 30° gehalten²⁷⁾.

Proben der verschiedenen Ansätze wurden ohne vorherige Entsalzung papierchromatographisch untersucht. Ausser Lycomarasmin und Anhydro-lycomarasmin-säure konnten in keinem der Ansätze mit Ninhydrin Spaltstücke nachgewiesen werden.

3) *Hydrolyse von Lycomarasmin mit 1N Salzsäure*. 20 mg Lycomarasmin wurden in 20 ml 1N Salzsäure unter Rückfluss gekocht. Proben zu 1 ml wurden im Vakuum über KOH eingedampft und im Papierchromatogramm untersucht. Nach einstündiger Hydrolyse konnten mit Ninhydrin 3 Verbindungen nachgewiesen werden mit Rf 0,04 braun, 0,17 violett und 0,46 violett. Kontrollen mit Substanz J: Rf 0,04 braun, DL-Asparaginsäure: Rf 0,15 violett, Glycin: Rf 0,45 violett. Chromatogramm nach 54 Std. Kochen: Rf 0,03 Spur, Rf 0,16 und Rf 0,43 deutlich²⁸⁾.

4) *Hydrolyse von Lycomarasmin, Lycomarasminsäure und Substanz J mit Wasser im Einschlussrohr bei 200°*. 50 mg Lycomarasminsäure wurden in 1 ml Wasser 75 Min. im geschlossenen Rohr auf 200° erhitzt. Die bräunliche, schwach nach Brenztraubensäure riechende Lösung zeigte im Papierchromatogramm einen schwachen Fleck für Substanz J. Daneben konnten noch Asparaginsäure, Glycin und eine neue Aminosäure festgestellt werden, welche letztere sich später als Alanin identifizieren liess.

Analoge Versuche mit Lycomarasmin und Substanz J zeigten, dass diese unter gleichen Bedingungen zu denselben Produkten abgebaut wurden. Verlängerte man die Reaktionszeit auf 2½ Std., so wurde der Fleck für Substanz J im Papierchromatogramm nicht mehr gefunden. Die Hydrolyse war also nach dieser Zeit vollständig.

Isolierung von Alanin. Um die neue Aminosäure in Substanz zu fassen, chromatographierte man den Eindampfrückstand des Hydrolysats von 700 mg Substanz J an Cellulosepulver mit dem

²³⁾ Vgl. dazu TH. BERSIN, Kurzes Lehrbuch der Enzymologie, S. 106 (1951), Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig KG, Leipzig.

²⁴⁾ E. WALDSCHMIDT-LEITZ & K. KÜHN, Z. physiol. Chem. 285, 28 (1950).

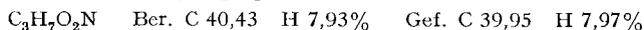
²⁵⁾ H. STETTER, Enzymatische Analyse, S. 108 (1951), Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstrasse.

²⁶⁾ Wir danken den erwähnten Firmen für die kostenlose Überlassung der Präparate.

²⁷⁾ Vgl. H. MATTENHEIMER & H. NITSCHMANN, Helv. 38, 688 (1955).

²⁸⁾ System Phenol-Wasser 5:1, + 1% konz. Ammoniak + wenig NaCN, Papier WHATMAN Nr. 1, Versuchstemperatur 12–16°, Farbreaktion mit einer 0,2-proz. Lösung von Ninhydrin in wassergesättigtem Butanol. Die geringen Schwankungen der Rf-Werte lagen innerhalb der Fehlergrenzen unserer damaligen (1949) Methodik. Identifizierungen erfolgten stets mit Vergleichssubstanzen. Zur Methodik vgl. R. CONSDEN, A. H. GORDON & A. J. P. MARTIN, Biochem. J. 38, 224 (1944), 39, 251 (1945), 40, 580 (1946), 41, 590 (1947).

Fliessmittel Ameisensäure, Aceton, Wasser 1:3:1. 135 mg papierchromatographisch reine neue Aminosäure wurden als braunes Öl erhalten, dessen Gewicht sich nach dem Entfärben mit Aktivkohle in wässriger Lösung auf 90 mg reduzierte und das in Nadel-Rosetten kristallisierte. Das aus Wasser-Alkohol umkristallisierte Produkt begann bei 200° schwach zu sublimieren und zer setzte sich bei 225–240°. Das Analysenpräparat wurde 16 Std. im Hochvakuum bei 50° getrocknet.



Das Präparat wurde in 6 Fliessmitteln zusammen mit DL-Alanin papierchromatographiert, wobei beide Verbindungen immer den gleichen Rf-Wert aufwiesen²⁹⁾. Auch aus reiner Asparaginsäure wurden unter den beschriebenen Hydrolysenbedingungen Spuren Alanin erhalten.

5) *Oxydation von Lycoramasmin mit Kaliumpermanganat. Identifizierung von Glycinamid.* 40 mg Lycoramasmin wurden in wenig 1N NaOH gelöst und bei pH 7 mit 25 mg KMnO_4 in 8 ml Wasser versetzt. Nach 2 Std. wurde vom Braunstein abfiltriert und die Lösung auf 2 ml eingengt. Im Papierchromatogramm zeigten sich mit Ninhydrin 3 Flecke, ein intensiv violetter mit Rf 0,15, ein schwach rötlichvioletter mit Rf 0,46 und ein braunvioletter mit Rf 0,87.

Bei saurer Hydrolyse der papierchromatographisch getrennten Substanzen wurden die Verbindungen mit Rf 0,16 (Asparaginsäure) und 0,46 (Glycin) nicht verändert. Anstelle von Rf 0,87 erschien Rf 0,45 (Glycin). Identifizierung des Glycinamids erfolgte papierchromatographisch in 3 Systemen im Vergleich mit synthetischem Material bei Rf 0,88 mit Phenol-Wasser, 0,33 mit S-Collidin, 0,06 mit Amylenhydrat als Laufmittel²⁸⁾.

Isolierung von Glycin und L-Asparaginsäure als Dinitrophenyl-Derivate³⁰⁾. Analoge Oxydation von 500 mg Lycoramasmin mit 675 mg KMnO_4 in 20 ml Wasser. Die filtrierte Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, in 10 ml Wasser aufgenommen und mit 1N NaOH auf pH 6–7 gebracht. Nach Entfernen der Oxalsäure als Calciumoxalat wurde die Lösung abgedampft und dem Rückstand durch Auskochen mit 90-proz. Alkohol das Glycin entzogen. Identifizierung als 2,4-Dinitrophenyl-Derivat, Smp. 195° (Zers.) aus Methanol-Wasser. Misch-Smp. mit authentischem Material 196° (Zers.) ohne Depression.

Der mit Alkohol extrahierte Rückstand gab nach Umsetzung mit 2,4-Dinitro-fluor-benzol 40 mg rohe Dinitrophenylasparaginsäure. Das Präparat wurde aus Alkohol-Äther umkristallisiert. Smp. 193–194° (Zers.). $[\alpha]_D = +18^\circ$ ($c = 0,66$ in Feinsprit). Vergleichspräparat aus L-Asparaginsäure: Smp. 194–195°, Misch-Smp. ohne Depression. $[\alpha]_D = +18^\circ$ ($c = 0,77$ in Feinsprit).

6) *Veresterung von Lycoramasmin und von Substanz J mit methanolischer Salzsäure, Titration der Veresterungsprodukte.* 0,1 g Lycoramasmin oder Substanz J wurden in 10 ml Methanol suspendiert und die Suspension bei 10° mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt. Die klare Lösung wurde 16 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen, dann im Vakuum auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Die im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Eindampfrückstände, die aus den öligen Ester-hydrochloriden bestanden – im Falle von Lycoramasmin mit kristallisiertem Ammoniumchlorid verunreinigt – wurden gewogen. Das Ester-hydrochlorid bzw. das Ester-hydrochlorid-Ammoniumchlorid-Gemisch wurde in 10 ml Methanol aufgenommen und mit 0,1N NaOH mit einer Glaselektrode titriert.

Vgl. Titrationskurven und tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse im theoretischen Teil.

Umwandlung der Ester-hydrochloride aus Lycoramasmin und aus Substanz J in die freien Esterbasen. Die Ester-hydrochloride wurden nach HILLMANN³¹⁾ mit 2-proz. ammoniakalischem Chloroform umgesetzt. Das Ammoniumchlorid wurde abfiltriert, die Filtrate wurden eingedampft. Die Ester-basen wurden nach dem Abdampfen des Chloroforms im Vakuum in fast quantitativer Ausbeute als leicht gelbliche Öle erhalten, die im Verlauf einiger Tage verharzten. Die Ester-basen wurden für jede Umsetzung frisch hergestellt.

Herstellung von Substanz-J-methylester-picrolonat. Die frisch bereitete Ester-base wurde mit der äquivalenten Menge einer 2,5-proz. methanolischen Lösung von Picrolonsäure versetzt. Beim Ein-

²⁹⁾ Versuchstemperatur 18–20°, Papier WHATMAN Nr. 1, Identifizierungen stets mit Vergleichs-substanzen. Vgl. Zusammenstellung am Schluss des experimentellen Teils. Die Abweichungen der Rf-Werte gegenüber ²⁸⁾ sind wohl auf geringe Verschiedenheit in der Zusammensetzung des Fliessmittels und auf Temperaturunterschiede zurückzuführen.

³⁰⁾ Nach F. SANGER, Biochem. J. 39, 507 (1945).

³¹⁾ Vgl. G. HILLMANN, Z. Naturforschung 1, 682 (1946).

dampfen im Vakuum schied sich das Picrolonat in feinen gelben Nadeln aus. Das Analysenpräparat wurde aus Alkohol umkristallisiert und 2 Tage im Hochvakuum bei 55° getrocknet. Smp. 161–162°, Ausbeute 80%.

$C_{22}H_{26}O_{12}N_6$	Ber. C 46,64	H 4,63	N 14,84	3 OCH ₃ 16,44%
	Gef. „ 46,49	„ 4,67	„ 14,57	„ 16,30%

7) *Herstellung von Substanz-J-äthylester-picrolonat*. Die Herstellung erfolgte analog der des Substanz-J-methylester-picrolonats. Das Analysenpräparat wurde mehrmals aus Alkohol umkristallisiert und 14 Std. bei 55° im Hochvakuum getrocknet. Smp. 145–146°.

$C_{25}H_{32}O_{12}N_6$	Ber. C 49,34	H 5,30%	Gef. C 49,77	H 5,15%
-------------------------	--------------	---------	--------------	---------

In einem andern Ansatz wurde ein Picrolonat vom Smp. 206–207° (Zers.) erhalten.

$C_{25}H_{32}O_{12}N_6$	Ber. C 49,34	H 5,30	N 13,81%	Gef. C 49,01	H 5,18	N 13,40%
-------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

Die IR.-Spektren (in Nujol!) beider Präparate waren praktisch identisch⁵⁾.

8) *Tosylierung von Substanz J und Hydrolyse des N-Tosyl-Derivats*¹²⁾. – *Isolierung von N-Tosylglycin*. 300 mg Substanz J wurden in 18 ml 1N NaOH bei 70° mit 1,5 g pulverisiertem Tosylchlorid geschüttelt, bis das Säurechlorid nahezu verschwunden war. Die Lösung wurde mehrmals, zuerst mit Äther, dann mit Essigester ausgeschüttelt. Eindampfen des Essigesters gab als Rückstand 300 mg farbloses, öliges N-Tosyl-Derivat von Substanz J, welches mit 18 ml 100-proz. Ameisensäure und 18 ml 0,5N Salzsäure 48 Std. unter Rückfluss gekocht wurde.

Der Ansatz wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, in 8 ml Wasser aufgenommen und mit Essigester ausgeschüttelt. Der Essigesterextrakt gab 50 mg krist. Rückstand. Smp. 141°, aus Wasser. Misch-Smp. mit N-Tosylglycin 143° ohne Depression.

9) *Isolierung von L-Asparaginsäure als 2,4-Dinitrophenyl-Derivat*. Die wässrige Lösung enthielt als einzige Aminosäure im Papierchromatogramm Asparaginsäure; 2,4-Dinitrophenyl-Derivat⁸⁰⁾ aus Äther-Petroläther Smp. 194° (Zers.), $[\alpha]_D = +18^\circ$ ($c = 0,72$ in Feinsprit). Vergleichspräparat aus L-Asparaginsäure: Misch-Smp. ohne Depression; $[\alpha]_D = +18^\circ$ ($c = 0,77$ in Feinsprit).

10) *Verseifung der Ester-hydrochloride von Lycomarasmin und Substanz J*. Das aus 79 mg Lycomarasmin hergestellte Ester-hydrochlorid wurde in 10 ml 1N NaOH gelöst und 3 Std. auf 95° erwärmt. Die Lösung wurde mit konz. Salzsäure auf pH 2,6 eingestellt. Die nach 2 Tagen bei 4° ausgefallenen weissen Kristalle (ca. 10 mg) wurden aus 1N NaOH mit 1N HCl umgefällt, mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum 4 Tage bei Zimmertemperatur getrocknet. Smp. 270° (Zers.). Das Präparat gab ein mit demjenigen von Substanz J völlig deckbares Infrarotspektrum und unterschied sich auch im Papierchromatogramm in keiner Weise von Substanz J.

$C_9H_{12}O_7N_2$	Ber. C 41,54	H 4,69%	Gef. C 40,96	H 4,81%
-------------------	--------------	---------	--------------	---------

Analog liess sich aus dem Ester-hydrochlorid der Substanz J durch Verseifung Substanz J zurückgewinnen. Sie wurde durch ihren Zersetzungspunkt und papierchromatographisch identifiziert.

11) *Picrolonat aus dem Methylester von Lycomarasmin*. 109 mg Methylester-base aus Lycomarasmin wurden in 10 ml Methanol gelöst und mit 170 mg Picrolonsäure, in 10 ml heissem Methanol gelöst, versetzt. Nach dem Eindampfen auf 12 ml fielen 60 mg reine Picrolonsäure aus. Nach dem Weiterengen auf 5 ml fiel immer noch reine Picrolonsäure an, und erst bei einem Volumen von 3 ml erhielt man ein Gemisch von hellgelben Picrolonsäure-Nadeln und dunkelgelben würfelförmigen Kristallen vom Smp. 155°. Beim Einengen der Mutterlauge auf 2 ml erhielt man dasselbe Gemisch. Da die Picrolonsäure feiner kristallin war als die würfelförmigen Kristalle, gelang es, sie durch rasches Lösen und sofortiges Absaugen der Lösung zu entfernen, bevor die letzteren auch aufgelöst wurden. Das Picrolonat schmolz nach Umkristallisieren aus wenig Methanol bei 169–171°. Zur Analyse wurde das Präparat 20 Std. im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

$C_{22}H_{26}O_{12}N_6$	Ber. C 46,64	H 4,63%	Gef. C 46,68	H 4,78%
-------------------------	--------------	---------	--------------	---------

Obwohl die Ester-picrolonate von Lycomarasmin und Substanz J die gleiche Bruttoformel aufweisen, sind sie nach Smp., Kristallform und Infrarotspektrum nicht identisch. Der Misch-Smp. der beiden Präparate wies eine Depression von 15° auf, bezogen auf das tieferschmelzende Derivat.

12) «*Lycomarasmin-amid*». Aus 1,0 g Lycomarasmin wurde die freie Ester-base hergestellt. Man löste das leicht gelbliche Öl in 80 ml bei 10° mit Ammoniak gesättigtem Methanol. Die Lösung wurde in einer verschlossenen Schliffflasche bei Zimmertemperatur 4 Tage stehengelassen. Nach dieser Zeit hatten sich aus der Lösung 270 mg farblose, gut ausgebildete Kristalle ausgeschieden. Zur Analyse wurden 100 mg Substanz in 1 ml heissem Wasser gelöst und die beim Abkühlen ausfallenden Kristalle 2 Tage im Hochvakuum bei 55° getrocknet. Die in organischen Lösungsmitteln unlösliche Substanz zersetzte sich unter Braunfärbung bei 225–230°.

$C_9H_{15}O_4N_5$ Ber. C 42,02 H 5,88 N 27,23% Gef. C 41,89 H 5,88 N 27,11%

Beim Versuch, aus der ammoniakalisch-methanolischen Mutterlage durch Einengen weitere Kristalle zu erhalten, fielen nur ölige Produkte an, die auch beim Animpfen nicht zum Kristallisieren zu bringen waren. Es liessen sich daraus auch keine kristallisierten Derivate herstellen.

Durch Auflösen von 100 mg Amid in 1 ml 1N Salzsäure und vorsichtiges Eindampfen der Lösung im Vakuum wurden 130 mg rohes Amid-hydrochlorid erhalten. Smp. 150° (Zers.) nach Umkristallisieren aus abs. Alkohol. Das äusserst hygroskopische, farblose Pulver wurde zur Analyse 12 Std. über Phosphorpentoxyd getrocknet und im Schweinchen eingewogen.

$C_9H_{16}O_4N_5Cl$ Ber. C 36,80 H 5,49% Gef. C 37,06 H 5,83%

13) *Lycomarasminsäure*. 1,0 g Lycomarasmin wurde in 50 ml 0,306N Barytlauge gelöst und 2 Std. auf 90° erwärmt. Das Barium wurde in der noch heissen Lösung mit 8,00 ml 1,92N Schwefelsäure gefällt, das Bariumsulfat nach dem Erkalten über Celite abfiltriert und das Filtrat, mit dem doppelten Volumen Alkohol versetzt, 2 Std. in den Kühlschrank gestellt. Die gallertige, z. T. kristalline Fällung wog nach dem Abfiltrieren und Trocknen 751 mg. Aus der Mutterlage konnten durch Zugabe eines weiteren Volumens Alkohol und Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank weitere 125 mg des gleichen Produkts erhalten werden. Gesamtausbeute an Lycomarasminsäure 87%. Smp. 190–200° (Zers.) nach Umkristallisieren aus Wasser-Aceton. Zur Analyse wurde das Präparat 20 Std. im Hochvakuum bei 80° getrocknet. $[\alpha]_D^{20} = -20,9^\circ$ ($c = 2,3$ in 0,67M Phosphatpuffer vom pH 7).

$C_9H_{14}O_8N_2$ Ber. C 38,82 H 5,07 N 10,07% Gef. C 38,55 H 5,20 N 10,00%

14) *Herstellung von Substanz J aus Lycomarasminsäure*. – a) 100 mg Lycomarasminsäure wurden in 2 ml 1N NaOH gelöst und $2\frac{1}{2}$ Std. auf 95° erwärmt. Die abgekühlte Lösung versetzte man mit 2 ml 1N HCl und 4 ml Alkohol. Über Nacht fiel im Kühlschrank 67 mg farbloses amorphes Material aus, das sich bei der papierchromatographischen Untersuchung als ein Gemisch von Lycomarasminsäure und Substanz J erwies und daneben kleine Mengen Glycin, Asparaginsäure und wahrscheinlich Alanin enthielt.

b) 32 mg Lycomarasminsäure wurden in 1,5 ml dest. Wasser gelöst und $3\frac{1}{2}$ Std. auf 95° erwärmt. Nach Zugabe von 2 Vol. Alkohol und Stehen im Kühlschrank über Nacht erhielt man 13 mg Substanz J vom Smp. 260–270° (Zers.). Aus der Mutterlage konnten durch Zugabe von mehr Alkohol 15 mg Lycomarasminsäure vom Zersetzungspunkt 190° zurückgewonnen werden. Ausbeute 80% Subst. J, ber. auf zurückgewonnene Lycomarasminsäure.

Da Lycomarasminsäure aus Lycomarasmin in einer Ausbeute von 87% hergestellt werden kann, beträgt die Ausbeute an Substanz J, bezogen auf Lycomarasmin, 70%.

15) *Papierchromatographische Untersuchungen*. Die Lösungsmittelsysteme tragen in der Tabelle der Rf-Werte die folgenden Nummern:

- 1 Phenol-Wasser (zweiphasig)
- 2 Methanol-22-proz. wässriges Ammoniak 3:1 (einphasig)
- 3 Aceton-85-proz. Ameisensäure-Wasser 3:1:1 (einphasig)
- 4 Pyridin-Eisessig-Wasser 50:35:15 (einphasig)
- 5 Pyridin-Wasser 65:35 (einphasig)
- 6 Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 (zweiphasig)
- 7 Dioxan-Wasser 1:1 (einphasig)
- 8 Dioxan-Wasser 1:2 (einphasig)
- 9 Dioxan-Wasser 3:1 (einphasig)
- 10 Methylacetat-Wasser (zweiphasig)
- 11 Dimethylformamid-Wasser 1:2 (einphasig)
- 12 Dimethylformamid-Wasser 1:1 (einphasig)

Die Systeme 2 und 3 wurden für die Säulenchromatographie entwickelt. Mit den Systemen 7–12 wurde erfolglos versucht, Lycomarasmin und Lycomarasminsäure auf Grund ihrer stark verschiedenen Wasserlöslichkeit zu trennen.

Tabelle der Rf-Werte

Substanz	System-Nr.		3	4	5	6
	1 ²⁹⁾	2				
Glycin	0,40	0,58	0,56	0,32	0,40	
Asparaginsäure . . .	0,14	0,42	0,50	0,31	0,36	
Alanin	0,55	0,63	0,71	0,48	0,53	0,11
Lycomarasmin . . .	0,25	0,33	ungeeignet	0,19	0,48	
Lycomarasminsäure .	0,11	ungeeignet	„	0,16	0,49	
Substanz J	0,10	0,35	0,53	0,29	0,49	

Versuche zur Trennung von Lycomarasmin und Lycomarasminsäure
Rf-Werte

Substanz	System-Nr.		9	10	11	12
	7	8				
Lycomarasmin . . .	0,65	0,82	0,10	0,11	0,87	0,73
Lycomarasminsäure .	0,66	0,83	0,12	0,09	0,87	0,74

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung W. MANSER) ausgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Über Derivate und Abbauprodukte gelang die eindeutige Festlegung der funktionellen Gruppen in Lycomarasmin, Lycomarasminsäure und Anhydro-lycomarasminsäure (Substanz J), sowie die Ermittlung der *L*-Konfiguration im Asparaginsäure-Teil dieser Verbindungen. Durch Kombination der neuen Erkenntnisse mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen konnten für die erwähnten Verbindungen je 2 Strukturformeln abgeleitet werden. NMR.-Spektren erlaubten die überzähligen Varianten auszuschliessen und jeder der 3 Verbindungen die richtige Konstitutionsformel, bis auf die absolute Konfiguration eines einzigen C-Atoms, zuzuschreiben.

Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich