

Analytische Charakterisierung von synthetischem und natürlichem Enniatin A und von Enniatin B als Vergleich

	synthetisches Enniatin A	natürliches Enniatin A	Enniatin B
1. $[\alpha]_D^{25}$ in CHCl_3 ($\pm 2^\circ$)	-94,5° ($c = 0,74$)	-98,2° ($c = 0,77$)	-107° ($c = 1,1$)
2. Smp.	122-124°	118-120°	172-174°
Mischschmelzpunkt	keine Depression		
3. Dünnschichtchromatographie (Rf)	keine Depression		
Benzol/Äther/Methanol 85:10:5			
4. Molekulargewicht	0,39	0,39	0,39
5. IR.-Spektrum	678 (ber. 682) in Methanol	681 (ber. 682) in Äthylacetat	655 (ber. 639)
C=O Amid	6,04 μ	6,02 μ	6,05 μ
C=O Ester	5,77 μ	5,76 μ	5,77 μ
Ester	8,57 μ	8,57 μ	8,50 μ
Fingerprint	Fingerprint identisch	Fingerprint identisch	Fingerprint sehr ähnlich, aber nicht identisch
6. Mikroanalysen	$\text{C}_{98}\text{H}_{142}\text{O}_9\text{N}_3$ (681,9)	$\text{C}_{98}\text{H}_{142}\text{O}_9\text{N}_3$ (681,9)	$\text{C}_{98}\text{H}_{142}\text{O}_9\text{N}_3$ (639,8)
Ber.	C 63,41 H 9,31 N 6,16%	C 63,41 H 9,31 N 6,16%	
Gef.	" 63,58 " 9,46 " 6,39%	" 63,37 " 9,30 " 6,24%	
7. Mikrobiologische Aktivität bez. auf nat. Enniatin A = 100%	98%	100%	
<i>Staph. aureus</i> ATCC 6538	102%	100%	
<i>Mycobact. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv			

Erläuterungen zur Tabelle

ad 1. Die Drehungsmessungen wurden in einem photoelektrischen Polarimeter mit Thermostat, das in unserer physikchemischen Abteilung durch Dr. F. BURKHARDT entwickelt worden ist, aufgenommen. Die kleine Diskrepanz im Drehwert von natürlichem und synthetischem Enniatin A konnte nicht aufgeklärt werden. Die Werte stimmen jedoch innerhalb der Fehlergrenze überein.

ad 2. Die Substanzen zeigen eine Kristallumwandlung zwischen 60 und 80°, wenn sie unterhalb 50° getrocknet wurden (vgl. Erläuterungen zu DEBYE-SCHERRER-Diagramm, Fig. 2).

ad 3. Herstellung der Kieselgelplatten und Arbeitstechnik entsprechend den Originalangaben von STAHL⁵⁾. Entwicklung der Platten in I₂-Atmosphäre mit anschließendem Besprühen mit Stärkelösung.

ad 4. Die Molekulargewichtsbestimmungen⁴⁾ wurden von Herrn Dr. W. SIMON, Organisch-Chemisches Laboratorium der ETH., Zürich, ausgeführt, wofür wir an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen möchten.

ad 5. Die IR.-Spektren wurden von Dr. L. H. CHOPARD-DIT-JEAN in Kaliumbromid (1 mg Substanz in 300 mg KBr) mit einem Infrarotspektrophotometer PERKIN-ELMER, Mod. 21, aufgenommen.

ad 6. Alle Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung der Herren Dres. H. WALDMANN und A. DIRSCHERL ausgeführt.

ad 7. Die Bestimmungen der mikrobiologischen Aktivität wurden in unserer mikrobiologischen Abteilung unter der Leitung von Prof. B. FÜST und Dr. ERIKA BÖHNI ausgeführt.

⁵⁾ E. STAHL, Arbeitsvorschrift für Dünnschichtchromatographie, herausgegeben von der Firma C. DESAGA, GmbH, Heidelberg; vgl. auch M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. FATAKI in E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer, Berlin 1962, S. 403.

nach mehrstündigem Heizen auf 80–100° in eine einheitliche Modifikation umwandelten. Erst die so behandelten Substanzen lieferten reproduzierbare Pulverdiagramme, die innerhalb des Messfehlers von 1% für beide Präparate identisch waren.

Experimenteller Teil⁶⁾

A. *Synthese des Ausgangsmaterials.* – *N-Methyl-L-isooleucin* wurde nach der früher beschriebenen⁷⁾ Methode aus allo-freiem Isooleucin hergestellt:

N-Benzyl-L-isooleucin. Nach Methode A⁷⁾ (94%) und Methode B⁷⁾ (77%). Kann aus Wasser umkristallisiert werden. Smp. > 250° (Zers.); $[\alpha]_D^{26} = +27,6^\circ$ ($c = 1,0$, in 6N HCl).

$C_{13}H_{19}O_2N$ (221,29) Ber. C 70,55 H 8,65 N 6,33% Gef. C 70,86 H 8,45 N 6,35%

N-Benzyl-N-methyl-L-isooleucin. Der nach Methylierung erhaltene Rohrückstand wird in Aceton mit wenig Methanolzusatz aufgekocht, von wenig Rückstand filtriert und nach Zugabe eines gleichen Volumens Äther kristallisieren gelassen. Man erhält in zwei Fraktionen 89% Substanz vom Smp. 168° (nach Subl.); $[\alpha]_D^{26} = +38,5^\circ$ ($c = 1,02$, in Wasser).

$C_{14}H_{21}O_2N$ (235,32) Ber. C 71,45 H 9,00 N 5,95% Gef. C 71,58 H 8,98 N 6,08%

N-Methyl-L-isooleucin. Durch Hydrogenolyse in 90-proz. Essigsäure in 97% Rohausbeute erhalten. Das Rohprodukt ist zur Weiterverarbeitung rein genug und zeigt im Chromatogramm nur einen Fleck. Umkristallisieren aus wenig Wasser möglich. Sublimiert oberhalb 200° und schmilzt nicht bis 290°. $[\alpha]_D^{26} = +27,5^\circ$ ($c = 1,07$, in Wasser); $[\alpha]_D^{26} = +47,7^\circ$ ($c = 1,06$, in 6N HCl).

$C_7H_{15}O_2N$ (145,20) Ber. C 57,90 H 10,41 N 9,65% Gef. C 57,63 H 10,15 N 9,91%

B. *Synthetischer Aufbau gemäss Reaktionsschema.* – 1. *Benzylloxycarbonyl-N-methyl-L-isooleucin* (I). *N-Methyl-L-isooleucin* wurde gleich wie *N-Methyl-L-valin*¹⁾ carbobenzoxyliert. Der Rohrückstand wurde aus Äther/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute: 79%. Smp. 63–64°; $[\alpha]_D^{26} = -72,4^\circ$ ($c = 0,93$, in Alkohol).

$C_{15}H_{21}O_4N$ (279,33) Ber. C 64,49 H 7,58 N 5,01% Gef. C 64,79 H 7,46 N 5,03%

2. *Z-N-Methyl-L-isooleucyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-t-butylester* (III). 15,4 g (0,055 Mol) *Z-N-Methyl-L-isooleucin* (I) werden bei 0° in 80 ml Pyridin unter Rühren tropfenweise mit 7 ml (0,055 Mol) Benzolsulfochlorid versetzt. Nach 30 Min. fügt man 8,7 g (0,050 Mol) *D- α -Hydroxyisovaleriansäure-t-butylester* (II)¹⁾ zu, rührt noch 30 Min. bei 0° und 2 Std. bei Raumtemperatur, dampft dann im Vakuum ein, setzt etwas Toluol zu und dampft erneut ein. Den Rückstand nimmt man in Äther auf, wäscht diesen 5mal mit 1M Weinsäure und Eis und erschöpfend mit 10-proz. $KHCO_3$, trocknet und dampft im Vakuum ein. Die 14,6 g öligen Rückstandes werden an Kieselgel chromatographiert⁸⁾. Mit Benzol/Essigester 9:1 werden 11,1 g (51%) von III eluiert. $[\alpha]_D^{26} = -57,3^\circ$ ($c = 1,0$).

$C_{24}H_{37}O_6N$ (435,54) Ber. C 66,18 H 8,56 N 3,22% Gef. C 66,34 H 8,61 N 3,35%

3. *Z-N-Methyl-L-isooleucyl-D- α -oxy-isovaleriansäure* (IV). 7,2 g (0,0165 Mol) des Esters III werden in 250 ml Benzol mit 800 mg *p-Toluolsulfosäure-hydrat* 1 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird abwechslungsweise mit eiskalter 2N Sodalösung und Wasser erschöpfend extrahiert. Die wässrigen Anteile werden nach Vereinigung auf Kongo angesäuert und mit Äther extrahiert. Nach Waschen, Trocknen und Eindampfen des Äthers im Vakuum erhält man 5,2 g eines Öls, welches zum grössten Teil kristallisiert. Aus Hexan erhält man 4,2 g (68%) Säure IV vom Smp. 74–76°; $[\alpha]_D^{26} = -89,5^\circ$ ($c = 0,95$).

$C_{20}H_{29}O_6N$ (379,44) Ber. C 63,30 H 7,70 N 3,69% Gef. C 63,46 H 7,50 N 3,78%

⁶⁾ Die Smp. wurden auf einem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Drehungen wurden, wenn nichts anderes angegeben, in Benzol bestimmt. Fehlergrenze $\pm 2^\circ$. Die Analysenmuster wurden 16 Std. über P_2O_5 bei 0,01 Torr bei 50–80° getrocknet.

⁷⁾ P. QUITT, J. HELLERBACH & K. VOGLER, *Helv.* 46, 327 (1963). (Methode A: Reduktion der SCHIFF-Base mit Natriumborhydrid; Methode B: Hydrierende Benzylierung.)

⁸⁾ Alle öligen Zwischenprodukte wurden durch Chromatographie an Kieselgel (Korngrösse 0,2–0,5 mm) gereinigt. Es wurde jeweils eine Säule mit der 10fachen Menge Kieselgel in Hexan zubereitet und nach Adsorption der Substanz mit folgenden Lösungsmitteln eluiert: 1. Hexan; 2. Benzol/Hexan 1:4; 3. Benzol/Hexan 1:1; 4. Benzol; 5. Benzol/Essigester 98:2; 6. Benzol/Essigester 95:5; 7. Benzol/Essigester 80:20; 8. Benzol/Essigester 50:50.

4. *N-Methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-t-butylester (V)*. 7,2 g (0,0165 Mol) der Benzyl-oxy-carbonyl-Verbindung III löst man in 50 ml 98-proz. Eisessig und hydrogenolysiert mit 1,2 g 5-proz. Pd-Kohle in Anwesenheit von Natronkalk, bis die Wasserstoffaufnahme aufhört. Nach Filtrieren und Eindampfen nimmt man in Äther auf und extrahiert erschöpfend mit eiskalter 1M Weinsäurelösung. Die wässrigen Extrakte werden sofort mit festem NaHCO_3 neutralisiert und mit Äther ausgezogen. Aus dem Äther erhält man nach Waschen und Trocknen 3,9 g (79%) eines farblosen Öls, das im Kugelrohr bei 80°/0,01 Torr destilliert wird. $[\alpha]_D^{25} = +23,3^\circ$ ($c = 1,1$).

$\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}$ (301,42) Ber. C 63,75 H 10,37 N 4,65% Gef. C 63,87 H 10,31 N 4,83%

5. *Z-N-Methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-t-butylester (VI)*. 3,5 g (0,0092 Mol) der Z-Didepsipeptidsäure IV, gelöst in 40 ml abs. Äther, werden 30 Min. bei 0° mit 2,1 g (0,010 Mol) Phosphorpentachlorid gerührt. Die klare Lösung wird dann bei 30° im Vakuum eingedampft, in 30 ml abs. Äther aufgenommen und tropfenweise zu einer gerührten und auf -15° gekühlten Lösung von 2,8 g (0,0092 Mol) Didepsipeptidester V und 2,8 ml (0,020 Mol) Triäthylamin in 80 ml abs. Äther gegeben. Nach erfolgter Vereinigung (ca. 10 Min.) wird noch 30 Min. bei -15° und anschliessend noch 5 Std. bei 0° gerührt, dann wird 4mal mit eiskalter 1M Weinsäure, 3mal mit eiskalter Sodalösung und 2mal mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die resultierenden 5,9 g Öl werden auf 60 g Kieselgel⁸⁾ gegeben und mit Benzol/Essigester eluiert. Man erhält 5,7 g (94%) des geschützten Tetradepeptids VII. $[\alpha]_D^{25} = -85,0^\circ$ ($c = 1,02$).

$\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_9\text{N}_2$ (662,84) Ber. C 65,23 H 8,82 N 4,23% Gef. C 64,82 H 8,85 N 4,25%

6. *N-Methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-t-butylester (VII)*. 3,4 g (0,0051 Mol) des Z-Tetradepeptidesters VI werden in 200 ml Äthanol mit 1,1 g 5-proz. Pd-Kohle in Anwesenheit von Natronkalk hydrogenolysiert. Nach Stehenbleiben der Hydrierung wird filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Äther gelöst und erschöpfend mit eiskalter 1M Weinsäurelösung extrahiert, wobei unmittelbar anschliessend mit festem NaHCO_3 neutralisiert wird. Die wässrige Phase wird danach 2mal mit Äther ausgezogen und der Ätherextrakt gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhält 2,7 g Öl (prakt. quantitativ). $[\alpha]_D^{25} = -57,6^\circ$ ($c = 1,0$).

$\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{O}_7\text{N}_2$ (528,71) Ber. C 63,60 H 9,91 N 5,30% Gef. C 63,59 H 9,92 N 5,34%

7. *Z-N-Methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-t-butylester (VIII)*. 4,25 g (0,0112 Mol) Z-Didepsipeptidsäure IV werden in 50 ml abs. Äther mit 2,4 g (0,0115 Mol) PCl_5 bei 0° 30 Min. gerührt und dann bei 35° im Vakuum eingedampft. Der Rückstand, in 60 ml abs. Äther gelöst, wird inert 10 Min. tropfenweise zu einer gerührten und auf -15° gekühlten Lösung von 5,9 g (0,0112 Mol) Tetradepeptidester VII und 2,8 ml (0,020 Mol) Triäthylamin in 50 ml abs. Äther gegeben. Es wird noch 2 Std. bei -15° , dann 2 Std. bei 0° gerührt, danach 3mal mit eiskalter 1M Weinsäure und je 2mal abwechselungsweise mit eiskalter 2N Sodalösung und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die 8,8 g Rückstand werden an 90 g Kieselgel⁸⁾ mittels Benzol/Essigester eluiert. Man erhält 8,6 g (86%). $[\alpha]_D^{24} = -107,0^\circ$ ($c = 1,31$).

$\text{C}_{48}\text{H}_{70}\text{O}_{12}\text{N}_3$ (890,14) Ber. C 64,76 H 8,94 N 4,72% Gef. C 65,01 H 9,00 N 4,62%

8. *N-Methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-hydrobromid (IX)*. 7,6 g (0,0085 Mol) geschütztes Hexadepeptid VIII löst man in 10 ml Eisessig und versetzt mit 15 ml 33-proz. Bromwasserstoffsäure in Eisessig. Nach 6 stündigem Schütteln bei Raumtemperatur wird im Vakuum bei 35° eingedampft und anschliessend 3mal mit je 200 ml Petroläther geschüttelt und dekantiert. Der Rückstand wird mehrere Male abwechselungsweise in Äther und Essigester gelöst und in Petroläther eingerührt. Man erhält so 6,1 g (71%) eines zähen Schaumes. $[\alpha]_D^{25} = -48,5^\circ$ ($c = 1,00$, in Alkohol).

$\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{O}_{10}\text{N}_3\text{Br}$ (780,83) Ber. C 55,37 H 8,52 Br 10,24% Gef. C 55,01 H 8,52 Br 10,35%

9. *Cyclo-(N-Methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxy-isovaleryl) (X)*. 1,12 g (0,0014 Mol) Hexadepeptid-hydrobromid IX werden in 30 ml abs. Benzol unter Eiskühlung und Rühren mit 375 mg (0,0018 Mol) PCl_5 versetzt und 30 Min. bei 0° und $3\frac{1}{2}$ Std. bei Raumtemperatur weitergerührt. Danach wird die klare Lösung im Vakuum bei 30° eingedampft. Der Rückstand wird in drei Teile geteilt und jeder Teil getrennt

in 1,8 l abs. Benzol gelöst. Während 30 Min. wird jedes der gerührten Volumina mit je 1,42 ml (0,010 Mol) Triäthylamin in je 500 ml abs. Benzol versetzt. Danach wird 18 Std. stehengelassen. Die drei Ansätze werden vereinigt und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in Äther aufgenommen und 4mal mit eiskalter 1M Weinsäure und 2mal mit 10-proz. KHCO_3 gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird an 10 g Kieselgel chromatographiert⁸⁾, wobei das cyclische Depsipeptid X mit Benzol/Essigester 95:5, 80:20 und 50:50 eluiert wird. Aus Alkohol/Wasser erhält man in zwei Fraktionen 370 mg (36%) kristallines Produkt. Konstanten siehe Tabelle.

SUMMARY

A cyclic hexadepsipeptide containing alternatively N-methyl-L-isoleucine and D- α -hydroxy-isovaleric acid (Fig. 1) has been synthesized. It proved to be identical with Enniatin A, a microbiologically active metabolite isolated in 1947 from *Fusarium oxysporum* SCHLECHT.

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

186. Chinazoline und 1,4-Benzodiazepine

XIII. Mitteilung¹⁾

**Synthese von 7-Carbalkoxy-, 7-Carbamoyl- und 7-Cyan-5-phenyl-
1,4-benzodiazepin-Derivaten**

von L. H. Sternbach, G. Saucy, F. A. Smith, M. Müller und J. Lee

(5. VI. 63)

Die interessanten psycho-pharmakologischen Eigenschaften²⁾ von gewissen 5-Phenyl-1,4-benzodiazepinen (z. B. I³⁾ und II⁴⁾) gaben Anlass zu einem Arbeitsprogramm, das u. a. auch die Darstellung von Derivaten mit Carbalkoxy-, Carbamoyl- und Cyan-Gruppen in Stellung 7 enthält (siehe allgemeine Formel IV).

Im folgenden berichten wir über die Darstellung von derartigen 7-substituierten 5-Phenyl-1,4-benzodiazepinen IV, die z. T. im Phenytring in *o*-Stellung (R') zusätzlich noch ein Fluor- oder ein Chloratom tragen. Die als Schlüsselsubstanzen hergestellten, entsprechend substituierten 2-Aminobenzophenone III (R = $-\text{COOH}$, $-\text{COOCH}_3$ und $-\text{CN}$; R' = H, F oder Cl) sind neu. Die Umwandlung der Verbindungen vom Typus III in die gewünschten 1,4-Benzodiazepine IV erfolgte nach den von uns früher mitgeteilten Methoden.

¹⁾ XII. Mitteilung dieser Reihe: W. METLESICS, G. SILVERMAN & L. H. STERNBACH, J. org. Chemistry 28 (1963), im Druck.

Betr. Nomenklatur siehe VII. Mitteilung: G. SAUCY & L. H. STERNBACH, Helv. 45, 2226 (1962).

²⁾ L. O. RANDALL, Diseases nerv. System, 27 (Suppl. 3), 7 (1960); 22 (Suppl. 7), 7 (1961); L. O. RANDALL, G. A. HEISE, W. SCHALLEK, R. E. BAGDON, R. BANZIGER, A. BORIS, R. A. MOE & W. B. ABRAMS, Current therap. Res. 3, Nr. 9 (1961).

³⁾ 7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxid = Librium[®]. Siehe L. H. STERNBACH & E. REEDER, J. org. Chemistry 26, 1111 (1961).

⁴⁾ 7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on = Valium[®]. Siehe L. H. STERNBACH & E. REEDER, J. org. Chemistry 26, 4936 (1961).