

- [9] L. H. CHOPARD-DIT-JEAN & E. HEILBRONNER, *Helv.* 35, 2170 (1952).
 [10] W. MEIER, DORIS MEUCHE & E. HEILBRONNER, *Helv.* 45, 2628 (1962).
 [11] W. MEIER, DORIS MEUCHE & E. HEILBRONNER, *Helv.* 46, 1929 (1963).
 [12] W. MEIER, Promotionsarbeit ETH, Prom. Nr. 3515, Zürich 1964.
 [13] L. P. HAMMETT, «Physical Organic Chemistry», Kap. IX, New York, London 1940.
 [14] E. M. ARNETT & G. W. MACH, *J. Amer. chem. Soc.* 88, 1177 (1966); 86, 2671 (1964); M. J. JORGENSEN & D. R. HARTTER, *ibid.* 85, 878 (1963).
 [15] F. A. LONG & J. SCHULZE, *J. Amer. chem. Soc.* 83, 3340 (1961).
 [16] PL. A. PLATTNER, A. FÜRST & K. ZIMMERMANN, siehe: Promotionsarbeit K. ZIMMERMANN, Prom. Nr. 2199, ETH Zürich 1953.
 [17] B. C. CHALLIS & F. A. LONG, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 1196 (1965).
 [18] A. WELLER, *Z. Elektrochem.* 56, 662 (1952); *Z. physikal. Chem. N.F.* 75, 438 (1958); *Progr. Reaction Kinetics* 1, 200 (1961).
 [19] TH. FÖRSTER, *Z. Elektrochem.* 54, 531 (1950).
 [20] A. WELLER, persönliche Mitteilung.
 [21] Unveröffentlichte Versuche.
 [22] K. H. GRELLMANN, E. HEILBRONNER, P. SEILER & A. WELLER, in Vorbereitung.
 [23] M. A. PAUL & F. A. LONG, *Chem. Reviews* 57, 1 (1957).

159. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

57. Mitteilung^{1) 2)}

Boromycin

von R. Hütter³⁾, W. Keller-Schierlein, F. Knüsel, V. Prelog, G. C. Rodgers jr.,
 P. Suter, G. Vogel⁴⁾, W. Voser und H. Zähler⁵⁾

(12. VI. 67)

Ein neuer Streptomyceten-Stamm (ETH 28829), welcher der Art *Streptomyces antibioticus* (WAKSMAN *et* WOODRUFF) zugeordnet wurde, produziert ein Antibioticum, das besonders gut mit *Botrytis cinerea* als Testorganismus [2] nachgewiesen und bestimmt werden kann.

Unter dem Einfluss geringer, das Wachstum nur wenig hemmender Konzentrationen des Antibioticums bildet *Botrytis cinerea* an Stelle langer, nur leicht gekrümmter und in grossen Abständen sich verzweigender Hyphen abnorme, stark gewellte und sich besenartig verzweigende Hyphen. Ähnliche morphologische Veränderungen können auch von Griseofulvin, Scopamycin [2] und Cyanein (Brefeldin A) [3] hervorgerufen werden.

Aus dem Mycel des in submersen Kulturen gezüchteten Mikroorganismus lässt sich das Antibioticum mit organischen Lösungsmitteln extrahieren. Die eingengten Extrakte wurden durch Verteilung zwischen Petroläther und wässrigem Methanol vorgereinigt, worauf das reine Antibioticum durch Chromatographie an Kieselgel oder durch CRAIG-Verteilung und nachfolgende Chromatographie an Kieselgel erhalten werden konnte.

¹⁾ Herrn Professor F. WESSELY, Wien, zum 70. Geburtstag gewidmet.

²⁾ 56. Mitteilung: [1].

³⁾ Jetzt Mikrobiologisches Institut der ETH, Zürich.

⁴⁾ Jetzt Boston College, Department of Chemistry, Chestnut Hill, Mass.

⁵⁾ Jetzt Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen.

Die aus Methanol umkristallisierte reine farblose Verbindung vom Smp. 223–227° (Zers.) enthält neben C, H, O und N Asche, die zu unserer Überraschung als Borsäure identifiziert wurde. Das Bor wurde sowohl flammenphotometrisch als auch durch Herstellung des kristallinen Triäthanolamin-Borsäure-Komplexes [4] nachgewiesen; quantitativ wurde es nach ROSE [5] bestimmt.

Die Anwesenheit von ^{11}B wurde auch durch das breite Signal im ^{11}B -NMR.-Spektrum bestätigt, dessen chemische Verschiebung $-10,6$ ppm gegenüber dem Signal von $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ beträgt⁶⁾.

Unseres Wissens handelt es sich bei der isolierten Verbindung um das erste borhaltige Antibioticum und um den ersten borhaltigen Naturstoff. Wegen seines Borgehaltes haben wir dem neuen Antibioticum den Namen Boromycin gegeben.

Der Befund, dass es sich um einen borhaltigen Naturstoff handelt, war für uns überraschend, weil wir uns dessen nicht bewusst waren, dass unser Kulturmedium eine dem Antibioticum entsprechende Menge Bor enthält. Die Literaturangaben über die Verbreitung des Bors in der Natur [6] sowie eigene Bestimmungen haben jedoch gezeigt, dass darin etwa 1 mg Bor/l anwesend ist, was ein Mehrfaches der benötigten Menge darstellt. Die Ausbeute an Antibioticum liess sich durch Zugabe von Natriumborat zum Kulturmedium nicht erhöhen. Es sei aber hervorgehoben, dass, obwohl die vorhandene Menge des Bors für die Produktion des Antibioticums ausreichend ist, seine Konzentration etwa 1 ppm beträgt; der Mikroorganismus besitzt demnach eine bemerkenswerte Fähigkeit, Bor anzureichern.

Die Analysen des Boromycins und das durch Dampfdruck-Osmometrie bestimmte Molekulargewicht stehen in guter Übereinstimmung mit der Formel $\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{O}_{15}\text{NB}$, die jedoch – wie bei anderen solchen Naturstoffen – durch Abbau untermauert werden muss. Es ist optisch aktiv und zeigt ein $[\alpha]_{\text{D}} = +64^\circ$ ($c = 0,55$; CHCl_3). Im UV.-Absorptionsspektrum findet man keine wesentliche Absorption im Gebiet zwischen 210 und 400 nm. Das IR.-Absorptionsspektrum (in KBr, Fig. 1), welches sich zur

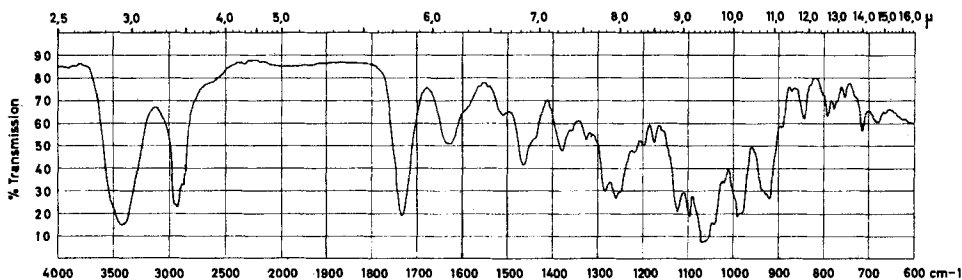


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von Boromycin in KBr

Identifikation des Antibioticums eignet, weist unter anderem starke Banden im Hydroxyl- und Carbonyl-Gebiet auf. Im NMR.-Spektrum (in CDCl_3 , Fig. 2) fallen besonders auf: a) zahlreiche hervorragende Signale im Gebiet zwischen δ 0,7 und 1,7, welche auf die Anwesenheit von mehreren Methylgruppen hinweisen; b) ein Doppelsignal bei δ 4,4; c) ein Signalhaufen zwischen δ 5,1 und 5,5, breites Singulett bei δ 6,3 und ein breites Signal bei δ 8,5.

⁶⁾ Das NMR.-Spektrum, welches in CDCl_3 mit 32,1 MHz in den Laboratorien der VARIAN ASSOCIATES, Palo Alto, gemessen wurde, verdanken wir Dr. A. MELERA.

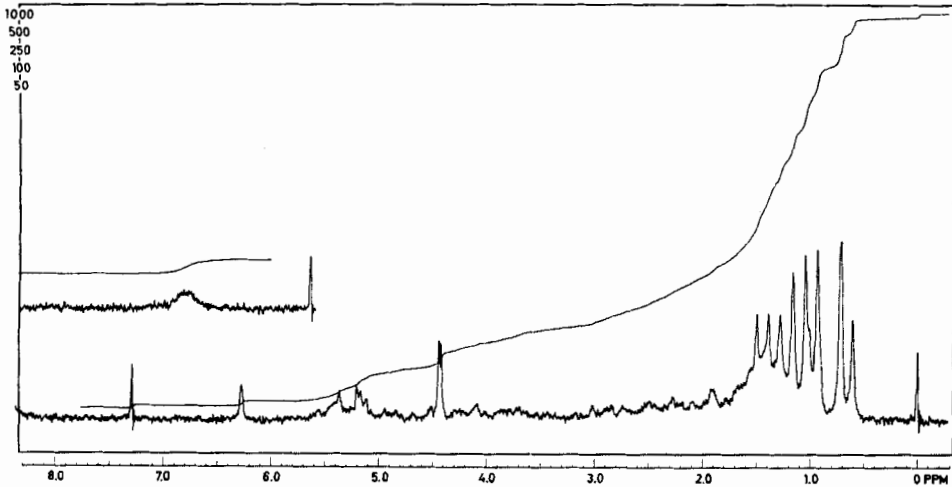


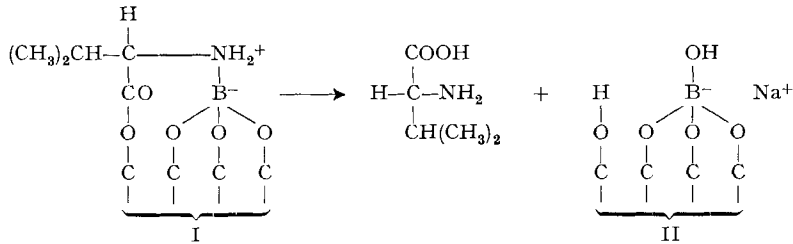
Fig. 2. NMR.-Spektrum von Boromycin in CDCl_3 (VARIAN A 60)

Das Bor ist im Boromycin fest gebunden und lässt sich nicht durch Waschen einer Lösung in Methylenchlorid mit verd. Natronlauge oder Salzsäure entfernen. Energiereiche saure Hydrolyse mit 1N und 6N Salzsäure ergab keine reduzierenden Zucker. Durch Behandlung mit wässrig-methanolischer Natronlauge unter sorgfältig gewählten Bedingungen liefert das Boromycin 1 Mol-Äqu. D-Valin, welches durch seine IR.- und NMR.-Spektren sowie auf Grund des Smp. und des optischen Drehungsvermögens seines 2,4-Dinitrophenyl-Derivates [7] identifiziert wurde. Der Rest der Molekel konnte als Natrium-Salz eines organischen Borsäure-Komplexes gefasst werden, dessen Analysen gut auf die Formel $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{O}_{15}\text{BNa}$ stimmten. Man kommt zu dieser Formel, wenn man annimmt, dass aus einer Verbindung $\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{O}_{15}\text{NB}$ eine Molekel D-Valin hydrolytisch abgespalten und eine Molekel NaOH angelagert wird.

Aus dem Natrium-Salz wurde durch Schütteln mit Benzol und 6N Salzsäure ein benzollösliches, borfreies kristallines Abbauprodukt vom Smp. 128° erhalten, dessen Analysen auf die Formel $\text{C}_{39}\text{H}_{66}\text{O}_{14}$ stimmen. Die letztere kann aus derjenigen des Natrium-Salzes formell durch Addition von 3 Mol. H_2O und Subtraktion von H_3BO_3 und NaOH abgeleitet werden. Die Eigenschaften und besonders die Spektren des borfreien Abbauproduktes weisen darauf hin, dass es sich um eine Polyhydroxyverbindung vom Makrolid-Typus handeln könnte. Es stellt den Ausgangspunkt einer eingehenden Untersuchung dar, über die später berichtet werden soll.

Die bisherigen Ergebnisse lassen sich einfach durch die Annahme deuten, dass im Boromycin ein stabiler Borsäure-Zwitterionkomplex mit einem vierzähligen Ligand vorliegt, der die Teilkonstitution I besitzt. Durch alkalische Hydrolyse wird das esterartig gebundene D-Valin abgespalten und es entsteht das Natrium-Salz eines weniger stabilen Borsäure-Komplexes, aus dem sich durch saure Hydrolyse das borfreie Abbauprodukt bildet. Der zweite Komplex besitzt wahrscheinlich die Teilkonstitution II. Im Gegensatz zu klassischen BÖESEKEN'schen Borsäure-Komplexen mit zweizähligen Liganden, die für 1,2-Diole typisch sind [8], bilden sich Komplexe vom Typus II besonders mit solchen 1,3,5-Triolen, welche eine geeignete Topographie besitzen [9].

In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, dass Verbindungen vom Makrolid-Typus aus biogenetischen Gründen oft eine Reihe von Sauerstoff-Funktionen und insbesondere auch Hydroxylgruppen in α, γ -Lage aufweisen.



Vom biologischen Standpunkt finden wir besonders die Tatsache bemerkenswert, dass ein Mikroorganismus einen spezifischen Komplexbildner für ein Spurenelement produziert.

Boromycin zeigt eine wachstumshemmende Wirkung gegen GRAM-positive Keime noch bei folgenden Konzentrationen (in $\mu\text{g/ml}$): *Staphylococcus aureus* SG 511 0,4, *Streptococcus mitis* 0,08, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 0,3, *Bacterium megatherium* 0,3. Es ist gut wirksam gegen *Candida albicans* (2), *Rhodotorula rubra* (1) und *Paecilomyces varioti* (1), weniger gegen *Mycobacterium bovis* (10). In der Konzentration 10 $\mu\text{g/ml}$ zeigt es keine Wirkung gegen folgende Mikroorganismen: *Escherichia coli* 2018, *Proteus vulgaris* ATCC 9484, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus elegans*, *Trichophyton interdigitale* und *mentagrophytes*.

Im chemotherapeutischen Versuch an der Maus zeigt Boromycin eine Wirkung gegen *Plasmodium berghei* (ED₅₀ 15 mg/kg *p.o.* oder *s.c.*). Die akute toxische Dosis für die Maus (LD₅₀) beträgt 180 mg/kg *p.o.*

G. C. RODGERS, JR. dankt der NATO und G. VOGEL den NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, Washington, für Stipendien, welche ihnen die Beteiligung an dieser Arbeit ermöglichten.

Experimenteller Teil

Beschreibung des Organismus. Der Streptomyceten-Stamm ETH 28829 wurde aus einer Bodenprobe aus der Umgebung von Bourébo (Béoumi), Elfenbeinküste, isoliert. Als Isoliermedium wurde ein sulfathaltiger Nährboden (5 g Natriumsulfat, 3 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,1 g Ammoniumchlorid, 0,1 g Magnesiumchlorid, 0,25 g Calciumchlorid, 10 g Malzextrakt, 15 g Agar (DIFCO) und 1000 ml dest. Wasser verwendet.

Merkmale des Stammes: 1. Sporen ellipsoid, 0,6 bis 1,4 \times 0,5 bis 1,2 μ gross, mit glatter oder höchstens leicht warziger Oberfläche. 2. Luftmycel sammetig, anfangs kreideweiss oder weissgrau, wenn ausgereift graubraun bis braungrau, aschgrau (*cinereus*). 3. Sporenketten monopodial verzweigt, Seitenäste gerade oder gewellt. 4. Bildung von Melanin-artigen Pigmenten auf Pepton enthaltendem Nährboden. 5. Substratmycel hellgelb, gelbbraun bis dunkelbraun, braungrau, je nach Nährboden und Entwicklungszustand.

Der Stamm ETH 28829 stimmt in allen für die Artcharakterisierung wichtigen Merkmalen mit dem Typusstamm von *Streptomyces antibioticus* (WAKSMAN *et* WOODRUFF) WAKSMAN *et* HENRICI 1948 (Stamm IMRU 3435) überein. Da die unwesentlichen Unterschiede in der Pigmentierung des Substrates keine Trennung vom Typusstamm rechtfertigen, ist der Stamm ETH 28829 als *Streptomyces antibioticus* zu bezeichnen.

Mikrobiologische Bestimmung von Boromycin in Kulturbrühen und Extrakten. Für diesen Zweck eignet sich der Test mit *Botrytis cinerea* [2], bei dem die untere Nachweisgrenze bei 30 $\mu\text{g/ml}$

liegt. Der Plattendiffusionstest mit *Bacillus subtilis* auf einem chemisch definierten Nährboden ist nur für die Prüfung reiner Präparate geeignet, da sich in den Kulturbrühen des Stammes ETH 28829 neben Boromycin noch andere gegen *Bacillus subtilis* aktive Substanzen, die nicht näher untersucht wurden, vorfinden.

Züchtung und Isolierung. Für die Herstellung von Boromycin wird der Stamm ETH 28829 in gut belüfteten Submerskulturen etwa 2 Tage bei 27° auf folgendem Nährmedium *gezüchtet*: 2% Sojamehl (vollfett, 50 ppm B enthaltend), 2% Mannit, Leitungswasser; pH vor der Sterilisation auf 7,5 eingestellt.

Zur *Isolierung* des Boromycins, das sich wegen seiner Unlöslichkeit praktisch vollständig im Mycel befindet, wird im kleineren Maßstab die Kultur abgekühlt und unter Zusatz von Filterhilfsmitteln (z. B. Celite) unter Druck filtriert. Im größeren Maßstab ist eine Gegenstromextraktion der gesamten Kulturbrühe zu empfehlen. So wurden 6300 l einer solchen Brühe mit einem Vibrationssieb (30 mesh) von gröberen Anteilen befreit und das pH wurde mit Natronlauge auf 7 eingestellt. Man versetzte mit 315 l Äthylchlorid, worauf man das gut gerührte Gemisch ohne Filtration mit einem PODBIELNIAK-Extraktor (Modell Biozon) kontinuierlich im Gegenstrom im Verhältnis 3:1 mit Äthylchlorid extrahierte. Die erhaltenen 2500 l des klaren Extraktes wurden in einem Zirkulationsverdampfer auf 25 l eingeeengt, mit 50 l Petroläther (50°–70°) versetzt und mit 25 l, 10 l und nochmals 10 l 85-proz. wässrigem Methanol extrahiert. Die wässrig-methanolischen Extrakte wurden nochmals mit 25 l Petroläther ausgezogen. Durch Eindampfen der vereinigten methanolischen Extrakte erhielt man 104 g rohes, dunkel gefärbtes Antibioticum. Diese wurden in 500 ml Äthylchlorid gelöst und an einer Säule (Durchmesser 5 cm, Höhe 1,3 m) von 1,2 kg Kieselgel (0,05–0,2 mm, MÉRCK) chromatographiert; Elutionsmittel: Äthylchlorid, Äthylchlorid-Äthylacetat-Gemische 9:1, 8:2, 7:3. Die 9:1 und 8:2 Äthylchlorid-Äthylacetat-Eluate enthielten, wie durch Dünnschichtchromatographie festgestellt wurde, das Boromycin. Der Eindampfrückstand aus diesen Eluaten wurde in 800 ml Methanol gelöst, mit 2 g Aktivkohle entfärbt und auf 300 ml eingeeengt, worauf beim Abkühlen das Boromycin auskristallisierte: 12,87 g, farblos, Smp. 223–228° (Zers.); durch Einengen der Mutterlaugen wurde noch 0,085 g des Antibiotiums gewonnen. Ausbeute 20,6 mg (= 0,26 mg B)/l Kulturbrühe.

Boromyein. Zur Analyse wurde die farblose Verbindung mehrmals aus Methanol umkristallisiert und im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$C_{44}H_{72}O_{15}NB$ Ber. C 60,91 H 8,40 N 1,65 B 1,26% M.-G. 866
Gef. „ 60,72 „ 8,56 „ 1,89 „ 1,27% „ 868 (Dampfdruck-Osmometrie)

$[\alpha]_D = +63,5^\circ$ ($c = 0,55$, $CHCl_3$). IR.-Absorptionsspektrum (in KBr): Fig. 1. NMR.-Absorptionsspektrum (in $CDCl_3$): Fig. 2. UV.-Absorptionsspektrum (in Feinsprit): leer.

Boromycin bleibt im wesentlichen unverändert durch kurzes Schütteln einer Lösung in Methylenchlorid mit 1N Salzsäure, mit 1N Natronlauge oder durch 60stündiges Rühren mit einer 10-proz. wässrigen Lösung von Mannit.

Die Asche, welche nach der Verbrennung von 20 mg Boromycin in einem kleinen Platintiegel zurückblieb, wurde mit 10-proz. wässriger Triäthanolamin-Lösung befeuchtet und mit einem mit kaltem Wasser gefüllten Reagenzglas bedeckt. Der Platintiegel wurde auf eine vorgewärmte Heizplatte (200–210°) gestellt. Nach 5 Min. hatten sich die feinen Nadeln des *Triäthanolamin-Borsäure*-Komplexes als Sublimat am Boden des Reagenzglases angesammelt. Die Verbindung $C_6H_{12}O_3NB$, Smp. 239–240°, ist in jeder Hinsicht mit einem authentischen Vergleichspräparat identisch und gibt damit keine Smp.-Erniedrigung.

Alkalische Hydrolyse des Boromycins und Identifizierung des D-Valins. Zu einer siedenden Lösung von 2,00 g Boromycin in 200 ml Methanol wurden 22 ml 20-proz. Natronlauge gegeben und das Gemisch 11 Min. (die Zeit des Aufwärmens nach der Zugabe von Natronlauge einberechnet) unter Rückfluss gekocht. Die Lösung wurde darauf rasch mit Eis abgekühlt und bei einer Badtemperatur unter 50° im Rotationsverdampfer eingedampft. Den Rückstand versetzte man mit Benzol und Wasser und extrahierte die wässrige Schicht mehrmals mit Benzol. Das Material nach dem Eindampfen der Benzol-Extrakte kristallisierte durch Befeuchten mit wenig Methanol. Es zeigt im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G, MÉRCK, Äthylacetat) einen einzigen Hauptfleck, Rf 0,7. Zur Analyse wurde an einer Kieselgel-Säule chromatographiert: Smp. 290°.

$C_{38}H_{64}O_{15}BNa$ Ber. C 58,08 H 8,00% Gef. C 57,95 H 7,88 N 0,0% Asche 9,80%

Die alkalische wässrige Schicht wurde mit verd. Salzsäure angesäuert, erschöpfend mit Methylenchlorid ausgezogen und im Vakuum abgedampft. Der Rückstand ergab durch Extraktion mit Isopropylalkohol und Eindampfen des Extraktes 0,34 g farbloses, festes Produkt, dessen IR.-Absorptionsspektrum und NMR.-Spektrum praktisch identisch mit denjenigen von Valin-hydrochlorid waren. Aus der spezifischen Drehung des mit Kochsalz verunreinigten Produktes folgte, dass es etwa 0,23 g D-Valin enthielt (ber. 0,27 g). Das daraus hergestellte 2,4-Dinitrophenyl-Derivat [10] schmolz nach zweimaligem Umkristallisieren aus Benzol-Hexan bei 133–135°, $[\text{M}]_{578} = -306^\circ$ (etwa 1-proz. in 1 N NaOH). Ein authentisches Vergleichspräparat schmolz bei 132–134° und zeigte ein $[\text{M}]_{578} = -310^\circ$. RAO & SOBER [7] geben an für das 2,4-Dinitrophenyl-L-valin: Smp. 132°, $[\text{M}]_{\text{D}} = +309^\circ$. Alkalische Hydrolyse unter milderer Bedingungen ergab viel unverändertes Ausgangsmaterial, unter energischeren Bedingungen entstanden komplizierte Gemische von Reaktionsprodukten.

Saure Hydrolyse des Natrium-Salzes $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{O}_{15}\text{BNa}$. Das durch alkalische Hydrolyse des Boromycins erhaltene Salz ist beständig gegenüber schwachen Säuren. Es lässt sich z. B. aus einer Lösung in Eisessig durch Verdünnen mit Wasser unverändert zurückgewinnen. Durch starke Säuren und Ionenaustauscherharze wie Dowex 50 W wird jedoch leicht Borsäure abgespalten.

1,627 g des durch alkalische Hydrolyse erhaltenen rohen Natrium-Salzes wurden in 20 ml Benzol 3 Std. mit 8 ml 6 N Salzsäure geschüttelt. In der abgetrennten wässrigen Schicht fand man durch Titration unter Zugabe von Mannit etwa 90% der erwarteten Menge Borsäure. Der Rückstand nach dem Eindampfen der Benzol-Schicht wurde in 20 ml siedendem Methanol gelöst und rasch abgekühlt, worauf 0,843 g des Hauptproduktes in farblosen Nadeln auskristallisierte. Die dünnschichtchromatographisch einheitliche Verbindung schmolz bei 128–130° (Zers.). Trotz energischem Trocknen im Hochvakuum, wobei der Smp. stieg, enthielten die Kristalle, wie aus dem NMR.-Spektrum folgt, Methanol. Auch andere Lösungsmittel, sogar Cyclohexan, werden hartnäckig zurückgehalten. Eine anscheinend lösungsmittelfreie Verbindung liess sich durch Umkristallisieren aus Äthylacetat erhalten, aus dem sie in Prismen vom Smp. 161–163° kristallisiert. Nach Trocknen im Hochvakuum a) 8 Tage bei Zimmertemperatur, b) weitere 3 Tage bei 80° wurden folgende analytische Daten erhalten

$\text{C}_{39}\text{H}_{66}\text{O}_{14}$ Ber. C 61,73 H 8,76% Gef. C a) 61,62; b) 61,88 H a) 9,00; b) 9,07%

Das UV.-Absorptionsspektrum (in Feinsprit) ist leer. Das IR.-Absorptionsspektrum und das NMR.-Spektrum, welche auf die Anwesenheit von mehreren Hydroxyl- und Carbonyl-Gruppen sowie von 8 Methyl-Gruppen hinweisen, sollen später im Zusammenhang mit weiteren Abbaueisuchen besprochen werden.

SUMMARY

A new strain of *Streptomyces antibioticus* (WAKSMAN *et* WOODRUFF), ETH 28829, produces a novel antibiotic, boromycin, which appears to be the first well defined boron containing organic compound to have been found in nature. Boromycin is a complex of boric acid with a tetradentate organic complexing agent, that yields by hydrolysis D-valine, boric acid, and a polyhydroxy compound of macrolide type.

Forschungslaboratorien der
pharmazeutischen Abteilung der CIBA
AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Institut für spezielle Botanik und
Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. DIEKMANN, Arch. Mikrobiol., im Druck.
- [2] R. HÜTTER, W. KELLER-SCHIERLEIN, J. NÜESCH & H. ZÄHNER, Arch. Mikrobiol. 57, 1 (1965).
- [3] V. BETINA, M. BETINOVÁ & M. KUTKOVÁ, Arch. Mikrobiol. 55, 1 (1966).
- [4] H. C. BROWN & E. A. FLETCHER, J. Amer. chem. Soc. 73, 2808 (1951).

- [5] HOUBEN-WEYL «Methoden der organischen Chemie, Bd. II, Analytische Methoden», G.Thieme Verlag, Stuttgart 1953, S.206.
- [6] H. J. M. BOWEN «Trace Elements in Biochemistry», Academic Press, London & New York 1966, S.175.
- [7] K. R. RAO & H. A. SOBER, J. Amer. chem. Soc. *76*, 1328 (1954).
- [8] J. BÖESEKEN, *Advances Carbohydrate Chemistry* *4*, 189 (1949).
- [9] S. J. ANGYAL & D. J. MCHUGH, J. chem. Soc. *1957*, 1423; TH. POSTERNAK, E. A. C. LUCKEN & A. SZENTE, *Helv. 50*, 326, 994 (1967); TH. POSTERNAK, D. JANJIC, E. A. C. LUCKEN & A. SZENTE, *Helv. 50*, 1027 (1967).
- [10] TH. WIELAND in HOUBEN-WEYL «Methoden der organischen Chemie, Bd. XI/2, Stickstoffverbindungen II und III», G.Thieme Verlag, Stuttgart 1958, S.337.

160. Welkstoffe und Antibiotika

36. Mitteilung [1]

Synthese von Verbindungen der Lycomarasmin-Reihe

von E. Hardegger, R. Andreatta, F. Szabo, W. Zankowska-Jasinska¹⁾,
Ch. Rostetter und H. Kindler

(13. VI. 67)

Das NMR.-Spektrum einer N-(β -Carboxy- β -amino-äthyl)-asparaginsäure (IX) war seinerzeit ein wertvolles Hilfsmittel zur Aufklärung der Konstitution des Lycomarasmins [2], welche inzwischen durch Synthese der Anhydrolycomarasminsäure (= Anhydro-aspergillomarasmin B) (XI) [3] und des racemischen Aspergillomarasmins B (= Lycomarasminsäure) [4] bestätigt werden konnte²⁾.

Die von uns noch nicht beschriebene Synthese der Diamino-tricarbonsäuren IX, von welchen 4 optisch aktive Formen bzw. 2 diastereomere Racemate möglich sind, erfolgte ausgehend von L-Asparaginsäure (I) bzw. L-Asparagin (Ia) über den L-Asparaginsäure-diäthylester (II), bzw. den N-Benzyl-L-asparaginsäure-diäthylester (III). Die Präparate II und III waren nach bekannten Methoden (vgl. exptl. Teil) leicht und vermutlich optisch rein zugänglich. Sie wurden sowohl als Basen, wie als Hydrochloride und Pikrolonate charakterisiert.

Der weitere Aufbau zu den Diamino-tricarbonsäuren IX erfolgte über eine MANNICH-Reaktion (vgl. [6]) des N-Benzyl-L-asparaginsäure-diäthylesters (III) mit Formamidomalonsäure-dimethylester (V) und 38-proz. wässrigem Formaldehyd in Essigsäure, die in 50-proz. Ausbeute zum krist. N-Benzyl-N-(β -di-methoxycarbonyl- β -formamido-äthyl)-asparaginsäure-diäthylester (VI) führte. Bei Verkürzung der Reaktionszeit erfolgte nur Umsetzung des Formaldehyds mit dem Formamidomalonester V zum krist. Hydroxymethyl-formamidomalonsäure-dimethylester (IV) [7], der inzwischen auch von HELLMANN [8] erhalten wurde.

Die analoge MANNICH-Reaktion von Formamidomalonsäure-diäthylester mit Formaldehyd und N-Benzyl-L-asparaginsäure-diäthylester (III) gab den ebenfalls krist. Tetraäthylester VIa in wesentlich schlechterer Ausbeute. In beiden MANNICH-

¹⁾ Z. Z. Organisch-chemisches Institut der Universität Krakau, Polen.

²⁾ Zur Nomenklatur vgl. [2], [5].