

the terminal positions. It is not unreasonable to assume that the different forms can rearrange into one another, but in this case the number of parameters is so high that any attempt to adjust them becomes a mere gamble. However, we intend to study the fragmentation of protonated rings in order to gain some insight into their reaction paths. For the moment we must be content with the conclusion that the fragmentation of heptyl ions proceeds by one or more apparently rather specific rearrangements that are as yet unknown.

We would like to express our thanks to Mr. G. *Philippossian* for his many suggestions concerning syntheses and to the *Swiss National Foundation for Encouragement of Research* for a grant.

REFERENCES

- [1] S. *Meyerson*, J. chem. Physics **42**, 2181 (1965).
- [2] R. *Liardon* & T. *Gäumann*, Helv. **52**, 528, 1042 (1969).
- [3] C. *Corolleur*, S. *Corolleur* & F. G. *Gault*, Bull. Soc. chim. France **1970**, 158.
- [4] J. T. *Bursey*, M. M. *Bursey* & D. G. I. *Kingston*, Chem. Reviews **73**, 191 (1973).
- [5] R. *Liardon* & T. *Gäumann*, Helv. **54**, 1968 (1971).

61. Isolierung und Strukturaufklärung von Chlamydocin

von **Annemarie Closse** und **René Huguenin**

SANDOZ AG, Pharma Departement, Chemische Forschung, CH-4002 Basel

(24. I. 74)

Summary. The constitution of Chlamydocin – a metabolite of *Diheterospora chlamydosporia* with pronounced cytostatic activity – is proposed on the basis of chemical reactions and physical data. The synthesis of a derivative of a new amino acid is described. The biological activities of this compound and of derivatives of Chlamydocin are discussed.

Chlamydocin (**1**) wurde aus Kulturfiltraten von *Diheterospora chlamydosporia* (S 3440) mit Äthylenchlorid extrahiert¹⁾ und nach Chromatographie an Kieselgel als einheitlicher farbloser Schaum erhalten. Die durch Hochauflösungsmassenspektrum und Analyse ermittelte Bruttoformel von C₂₈H₃₈N₄O₆, sowie die Absorptionen im IR.-Spektrum (s. Fig. 1) bei 3400, 3300 und 1680 cm⁻¹, die für Amidbindungen charakteristisch sind, liessen das Vorliegen eines Peptids vermuten.

Nach saurer Hydrolyse konnten mittels Aminosäureanalyse Phenylalanin, Prolin und α -Aminoisobuttersäure im Verhältnis 1:1:1 nachgewiesen werden. Daneben traten noch mehrere kleinere Pike auf, die von keiner üblichen Aminosäure herrührten. Auch konnte es sich nicht um unvollständig hydrolysierte Peptidfragmente handeln, da das Verhältnis Peptid-Aminosäuren (Phe, Pro, Iabu) schon nach 90 Min. Hydrolyse konstant blieb, sondern um eine Aminosäure neuen Typs, die wir vorläufig mit «X» bezeichnen. Die absolute Konfiguration der Aminosäuren wurde durch Abbau mit D- und L-Aminosäureoxydase bestimmt [1]. Phenylalanin und die unbekannte Aminosäure X liegen in der L-Form, Prolin in der D-Form vor.

¹⁾ Herrn Dr. E. *Härvi* und Herrn H. *Hofmann* danken wir für die Bereitstellung grösserer Mengen Rohextrakt.

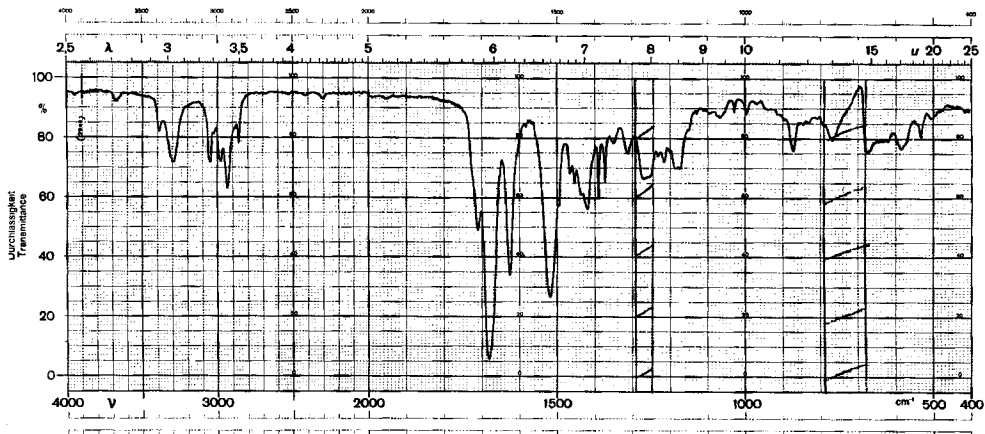
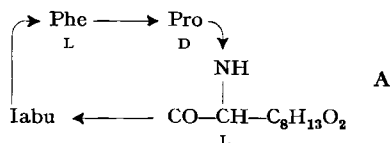


Fig. 1. IR.-Spektrum von Chlamydocin (1) in CH_2Cl_2

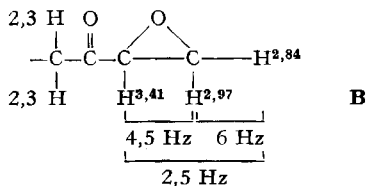
Chlamydocin ist lipophil, reagiert nicht mit Ninhydrin und verhält sich in der Elektrophorese sowohl bei pH 1,9 wie auch bei pH 5,8 wie eine ungeladene Substanz. Nach schonender Hydrolyse mit Trifluoressigsäure hingegen entstand ein Produkt **2**, das mit Ninhydrin reagierte und in der Elektrophorese bei pH 1,9 zur Kathode, bei pH 5,8 wie eine elektrisch neutrale Substanz wanderte.

Nach diesen Befunden dürfte Chlamydocin ein cyclisches Tetrapeptid sein. Die Aminosäuresequenz wurde an dem mit Trifluoressigsäure erhaltenen, offenkettigen Derivat **2** vom Aminoende her nach *Edman* [2] bestimmt und ergab die Reihenfolge: Phe-Pro-X-Iabu. Durch Carboxypeptidase-Abbau wurde zuerst Iabu freigesetzt. Dies bestätigte deren Stellung am Carboxylende [3]. Für das Cyclopeptid ergab sich als Arbeitshypothese somit die folgende Struktur **A**:



Da die noch unbekannte Aminosäure X unter den Bedingungen der Hydrolyse zersetzt wurde, konnte sie nicht als solche isoliert und charakterisiert werden. Ihre Konstitution liess sich aber aus analytischen und spektroskopischen Daten des Peptids ableiten. Ihre Bruttoformel ist $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_4$. Die Aminosäure X enthält also neben der Carboxylgruppe noch zwei weitere Sauerstofffunktionen sowie zwei Ringe oder zwei Doppelbindungen oder einen Ring und eine Doppelbindung. Eine dieser Sauerstofffunktionen ist eine Carbonylgruppe (IR.: 1710 cm^{-1}), die andere dürfte, wie aus dem NMR.-Spektrum (Fig. 2) hervorgeht, als endständiges Epoxid neben der Carbonylgruppe vorliegen.

Die für diese Gruppierung charakteristischen chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten sind im Formelbild **B** den entsprechenden Wasserstoffatomen zugeordnet.



Die restlichen 8 Wasserstoffe ($\delta = 1,1\text{--}2$ ppm) dürften an einer unverzweigten C_4 -Kette angeordnet sein. Damit lässt sich für die Aminosäure X die Struktur einer L-2-Amino-9,10-epoxy-8-oxodecansäure²⁾ und für Chlamydocin Struktur **1** postulieren, die eine eindeutige Zuordnung aller NMR.-Signale erlaubt (Fig. 2).

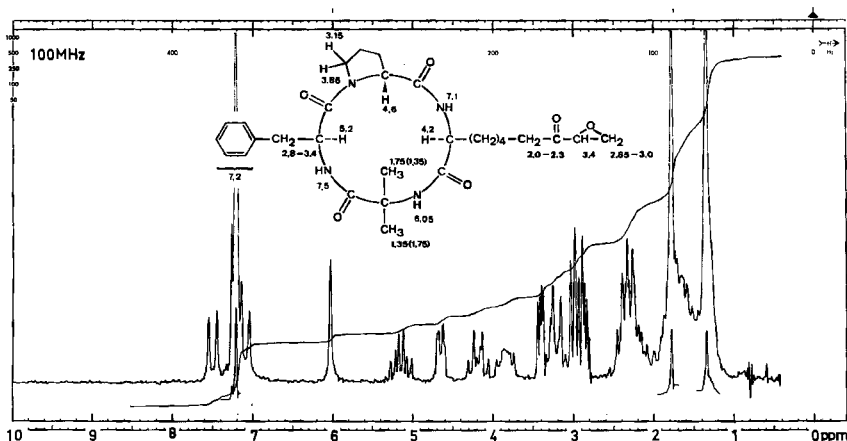
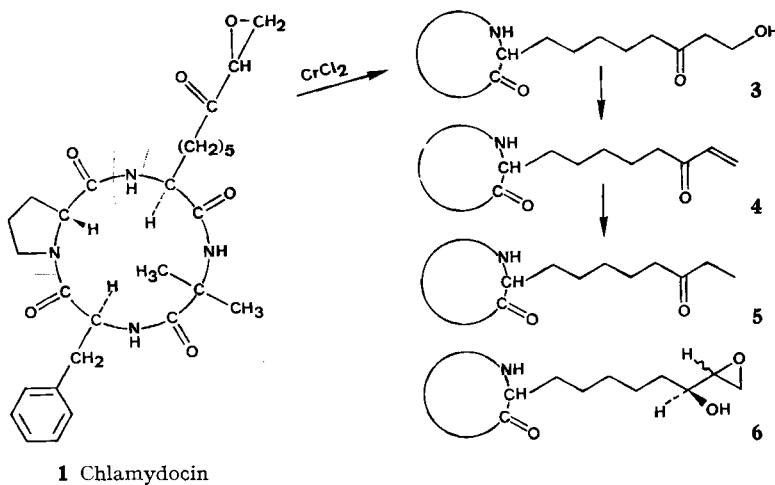


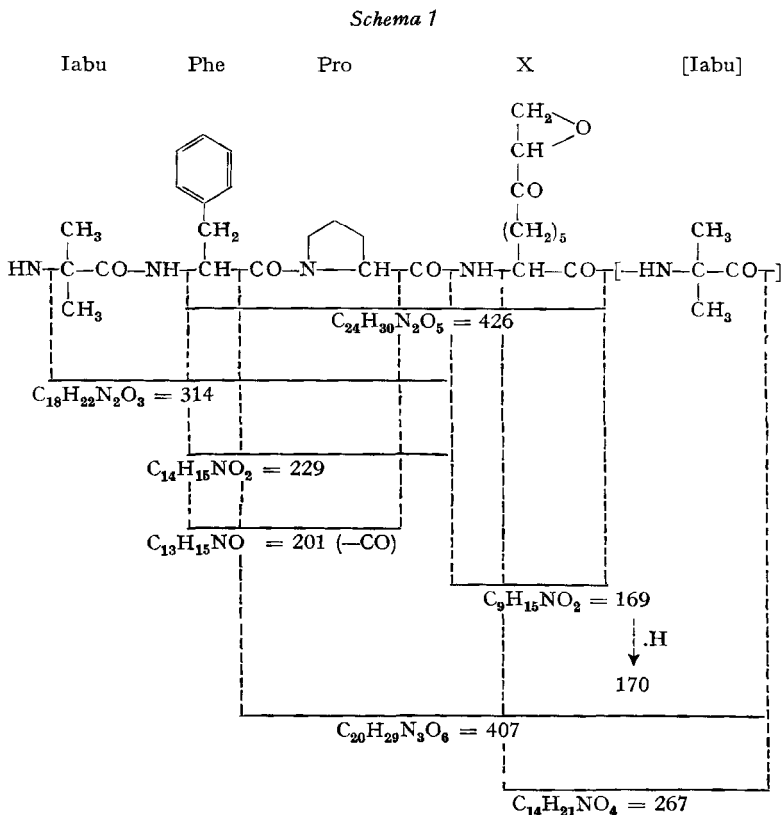
Fig. 2. NMR.-Spektrum von Chlamydocin (**1**) in CDCl_3



²⁾ Diese Aminosäure wurde vor kurzem von Hirota *et al.* [4] als Bestandteil eines Metaboliten des phytopathogenen Pilzes *Cylindrocladium scoparium* beschrieben.

Die unterschiedliche chemische Verschiebung der beiden Methylgruppen der α -Aminoisobuttersäure im Cyclopeptid ist durch Anisotropieeffekte bedingt, die bei der schonenden Ringöffnung verschwinden. Im offenen Tetrapeptid **2** geben die beiden Methylgruppen zusammen nur ein Signal bei 1,7 ppm (in CF_3COOD).

Anhand der Struktur **1** lassen sich die wichtigsten Fragmente im Massenspektrum von Chlamydocin wie folgt interpretieren (Schema 1):



Zum chemischen Beweis der endständigen Epoxycarbonylgruppierung wurde Chlamydocin mit CrCl_2 [5] zur β -Hydroxycarbonylverbindung **3** reduziert. Durch Wasserabspaltung gelangten wir zu **4**, das sich mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladium zu **5** hydrieren liess. **4** und **5** zeigten im NMR.-Spektrum die charakteristischen Signale einer Vinyl- bzw. Äthylgruppe.

Neben Chlamydocin (**1**) wurde aus den Rohextrakten von *Diheterospora chlamydocin* noch ein weisser kristalliner Metabolit der Bruttoformel $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_8$, Dihydrochlamydocin (**6**), isoliert. Bei dieser Verbindung zeigt das IR.-Spektrum im Gegensatz zu dem des Chlamydocins keine Absorption bei 1710 cm^{-1} .

Im Vergleich zu Chlamydocin sind im NMR.-Spektrum (220 MHz) von Dihydrochlamydocin zwei zusätzliche Signale bei 2,49 und 3,41 ppm zu erkennen. Während das erstere beim Zusatz von D_2O verschwindet, verschiebt sich letzteres bei der

Acetylierung nach tieferem Feld ($\delta = 4,7$ ppm). Daraus folgt, dass Dihydrochlamydocin an C(8) anstelle der Carbonylgruppe eine sekundäre Hydroxylgruppe aufweist, deren absolute Konfiguration nach der Methode von *Horeau* [6] als *S* bestimmt wurde.

Chlamydocin (**1**) und das Dihydro-Derivat **6** lassen sich wechselseitig durch CrO_3 -Oxydation bzw. NaBH_4 -Reduktion ineinander überführen. Bei letzterer dürfte allerdings ein (im NMR.-Spektrum nicht erkennbares) Diastereomeren-Gemisch entstehen. Ungeklärt bleibt die Chiralität des Epoxyds in **1** und **6**.

Synthese des «Aminosäure-X-Derivates» 2-Methoxycarbonylamino-8-oxo-9,10-epoxy-decansäureäthylester (14). – Um Einblick in die strukturellen Voraussetzungen für die im folgenden Abschnitt zu besprechende biologische Aktivität zu gewinnen, wurde ein einfaches, ebenfalls lipophiles, neutrales Derivat der neuen Aminosäure auf dem in *Schema 2* beschriebenen Wege synthetisiert.

Da das endständige Epoxid eine labile Gruppierung darstellt, war es naheliegend, diese Funktion erst am Schluss einzuführen. Zum Aufbau der Kette bot sich die Dithian-Methode nach *Corey & Seebach* [7] [8] an. Die einzige Schwierigkeit bestand in der Hydrolyse des Dithians. Von den vielen in letzter Zeit veröffentlichten Methoden war nur diejenige mit *N*-Chlorsuccinimid/ AgNO_3 [9] halbwegs erfolgreich. Die Überführung des ungesättigten Ketons **13** in die Epoxy-Verbindung **14** gelang unter milden Bedingungen mit Wasserstoffperoxid/Benzonitril [10], wobei das Aminosäurederivat **14** ein Gemisch von vier Diastereomeren sein dürfte, was allerdings aus dem NMR.-Spektrum (Fig. 3) nicht ersichtlich ist. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die beiden Asymmetriezentren (C(2) und C(9) der Aminosäure) weit voneinander entfernt und nicht fixiert sind.

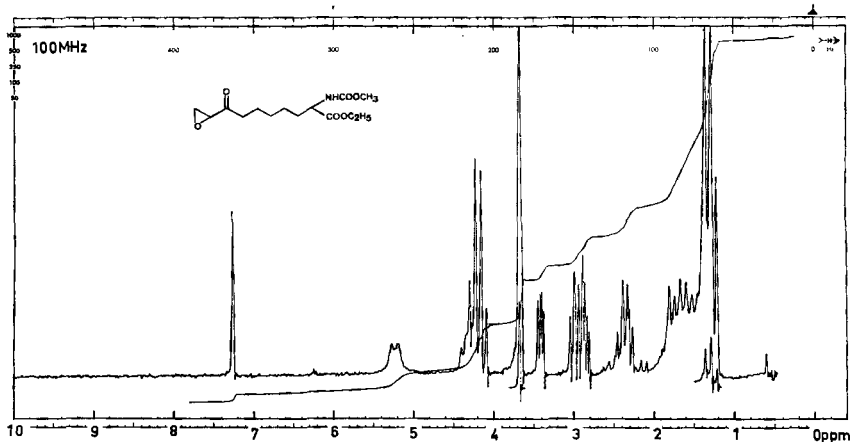
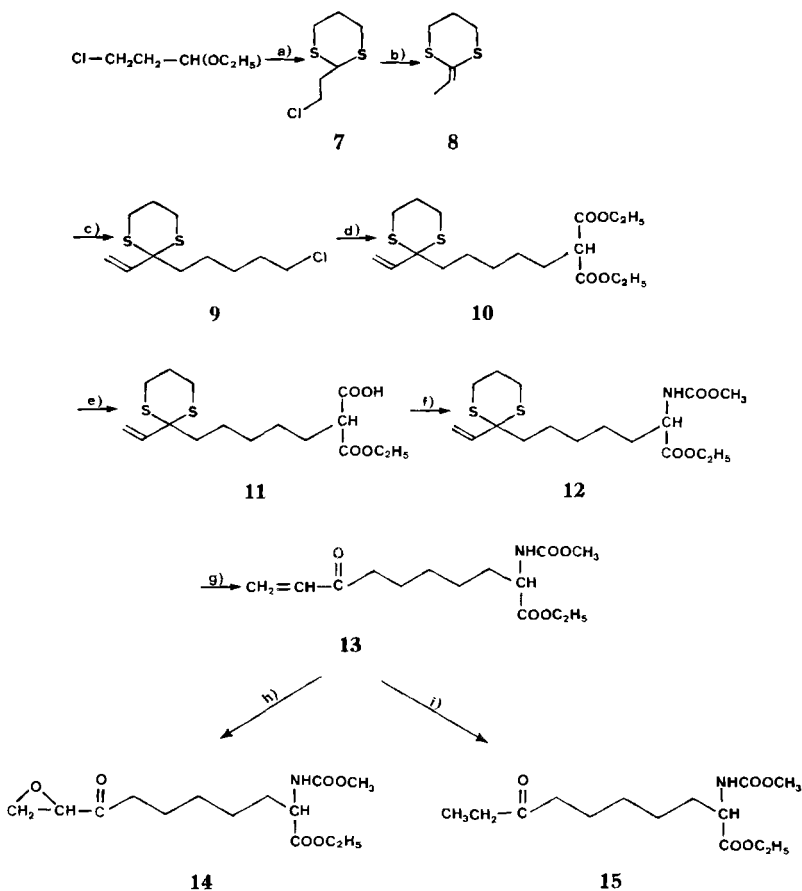


Fig. 3. NMR.-Spektrum von (**14**) in CDCl_3

Die NMR.-Signale der in Partialformel **B** dargestellten Epoxyketon-Sequenz stimmen bei **1** und **14** gut überein. Die durch katalytische Hydrierung von **13** erhaltene Verbindung **15** lieferte nach saurer Hydrolyse im Aminosäureanalysator einen Pik, der hinsichtlich Retentionszeit und Farbausbeute mit einem Pik des Hydrolysats von **5** übereinstimmte. Dieser Pik entspricht bei **5** einem mol Aminosäure pro mol Peptid.

Schema 2



a) $\text{HS}-(\text{CH}_2)_3\text{SH}/\text{HCl}$; b) $t\text{-BuONa}/\text{DMSO}$; c) $\text{BuLi}/\text{J}(\text{CH}_2)_5\text{Cl}$; d) $\text{NaCH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2$; e) OH^- ; f) 1: COCl_2 ; 2: $(\text{CH}_3)_3\text{SiN}_3$; 3: Δ ; 4: CH_3OH ; g) N-Chlorsuccinimid/ AgNO_3 ; h) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{C}_6\text{H}_5\text{CN}/\text{KHCO}_3$; j) $\text{H}_2/\text{Pd}/\text{Essigester}$.

Biologische Aktivitäten. – Chlamydocin (**1**) zeigt eine hohe cytostatische Aktivität gegenüber Mastocytomzellen (ED_{50} $10^{-9},4$ g/ml)³⁾. Bei den Verbindungen, die kein Epoxid (**3**, **4**, **5**) oder Keton (**6**) enthalten, ist die $\text{ED}_{50} > 10^{-6}$ g/ml, also mehr als tausendmal schwächer. Bei der Synthese des Aminosäurederivats **14** wurden die beiden Asymmetriezentren nicht berücksichtigt. Wir rechneten deshalb mit einer Verminderung der Aktivität gegenüber derjenigen der natürlichen Aminosäure. Tatsächlich erwies sich jedoch **14** bei einer Konzentration von 10^{-6} g/ml ebenfalls als inaktiv. Die Epoxy-carbonylgruppierung ist demnach eine notwendige, jedoch weder als solche, noch in Verbindung mit einer C_5 -Kette als «Arm» hinreichende Voraussetzung für die cytostatische Aktivität. Der Tetrapeptidring spielt als «Träger» eben-

³⁾ H. Staehelin et al., in Vorbereitung.

falls eine wichtige Rolle. Die Wirkung dürfte somit zumindest nicht ausschliesslich auf einer völlig unspezifischen chemischen Reaktion beruhen.

Herrn Dr. R. Wenger danken wir für wertvolle Ratschläge. Frau Th. Zardin und Herrn H. R. Loosli danken wir für die Aufnahme und Interpretation der NMR.-Spektren, Herrn Dr. H. Lichti für die der Massenspektren.

Experimenteller Teil

(unter Mitarbeit von *Blandine Keller, Nelli Stalder* und *Rudolf Werder*)

Allgemeines. – Die Smp. wurden im Röhrchen bestimmt und sind nicht korrigiert. Die *Hochspannungspapiererelektrophoresen* wurden bei pH 1,9 und 5,8 mit dem Apparat von *Wieland & Pfleiderer* [11] durchgeführt. Anfärbung mit Ninhydrin, Folin-Ciocalteu, Isatin, Chlor/Stärke/KI [12]. M_{TRP} 1,9 und M_{TRP} 5,8 sind die relativen Migrationen bezogen auf die des Tryptophans als Referenzsubstanz bei pH 1,9 resp. 5,8.

Die *Aminosäureanalysen* wurden mit dem Apparat BC 200 der Firma *BioCal*, München, durchgeführt: Einsäulenverfahren, Harz Aminex A 6 der Firma *Calbiochem* (55 cm × 0,9 cm), Elutionspuffer 100 ml/Std. Ninhydrin 50 ml/Std.

Tabelle 1

pH	Natrium-Konzentration	Dauer
3,17	0,2 N	0– 65 Min.
4.25	0,2 N	65–115 Min.
6,45	1,0 N ^{a)}	von 115 Min. an

a) 0,2N Natriumcitrat, mit NaCl auf 1,0N an Natrium eingestellt.

Da keine Farbkonstante für die unbekanntenen Pike vorhanden war, wurden sie mit dem Durchschnitt der Farbkonstanten aller in Protein-Hydrolysaten enthaltenen Aminosäuren (Cystin und Prolin ausgenommen) berechnet und die gefundenen Werte in eckigen Klammern angegeben.

NMR.-Spektren, wenn nicht anders vermerkt, in CDCl_3 ; Angaben in ppm, relativ zu TMS als internem Standard; Abkürzungen: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quartett, *m* = Multiplett, *b* = breites Signal. – *UV.-Spektren*: Maxima in nm (log ϵ). – *IR.-Spektren* in CH_2Cl_2 , Angaben in cm^{-1} .

Züchtung von *Diheterospora chlamydosporia* und Isolierung von 1 und 5. – 100 l einer Nährlösung, die pro l 40 g Cerelese (Glucose), 5 g Trypton, 3 g NaNO_3 , 1 g K_2HPO_4 , 500 mg KCl, 500 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und entmineralisiertes Wasser enthält, wurden mit 10 l einer Vorkultur des Stammes *Diheterospora chlamydosporia* angeimpft und in einem Stahlfermentationsgefäss unter Rühren (Blattrührer, 300 U/Min.) und Belüftung (1,0 l Luft/Min./l Nährlösung) und unter Druck (0,5 Atm.) 90 Std. bei 18° inkubiert.

Die als Ausgangskultur verwendete Vorkultur wurde wie folgt erhalten: Ein Nährboden, der pro l 20 g Cerelese, 20 g Fadenagar, 2 g Malzextrakt, 2 g Hefeextrakt, 2 g Pepton, 2 g KH_2PO_4 , 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und entmineralisiertes Wasser enthielt, wurde mit dem Stamm NRRL 3472 beimpft und 10 Tage bei 18° inkubiert. Die auf diesem Nährboden gewachsene Kultur wurde in einer physiologischen Kochsalzlösung aufgekrazt. Mit dieser Suspension wurde eine Nährlösung gleicher Zusammensetzung wie die Hauptkultur in einem 10-l-Stahlfermentationsgefäss beimpft und 72 Std. bei 18° unter Rühren (Blattrührer 350 U/Min.) und unter Belüftung (1,0 l Luft/Min./l Nährlösung) und unter Druck (0,5 Atm.) inkubiert. Diese Fermentationslösung diente als Impfmateriale für das 100-l-Fermentationsgefäss (Hauptkultur).

Nach Beendigung der Inkubation wurde zentrifugiert und der Überstand anschliessend durch Celit klar filtriert. Das Kulturfiltrat wurde 3mal mit dem gleichen Volumen Äthylenchlorid

extrahiert, die organischen Extrakte mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft: 14,4 g Rohextrakt.

Dieser Rohextrakt wurde zwischen 90proz. Methanol und Petroläther verteilt. Die wässrig methanolische Phase ergab nach Abziehen des Methanols und Extraktion mit Chloroform 7,9 g entfetteten Rohextrakt. Dieser wurde an Kieselgel (*Merck*) chromatographiert. Mit Chloroform/Methanol 99:1 wurden 4,9 g Chlamydocin (**1**) in Form eines farblosen Schaumes eluiert. $[\alpha]_D^{20} = -147,5^\circ$ ($c = 0,3$ in Benzol). Papierelektrophorese $M_{Trp}^{5,8} = 0,5$; $M_{Trp}^{1,9} = 0$; Anfärbung mit Chlor/Stärke/KI und Folin-Ciocalteu; keine Reaktion mit Ninhydrin.

MS.: 526 (M^+). – UV. (Methanol): Endabsorption, Schulter bei 235 und 283 (3,52 und 2,16). – IR.: u.a. Banden bei 3400, 3300, 1710, 1680 (s. Fig. 1). – NMR.: s. Fig. 2.

$C_{28}H_{38}N_4O_6$	Ber. C 63,9	H 7,3	N 10,6	O 18,2%
(526,63)	Gef. ,, 64,3	,, 7,7	,, 10,3	,, 18,1%

Mit Chloroform/Methanol 98:2 wurde 1 g Dihydrochlamydocin (**5**) eluiert. Smp.: 134–135° (aus Essigester/Pentan). $[\alpha]_D^{20} = -96,8^\circ$ ($c = 0,506$ in $CHCl_3$). – MS.: 528 (M^+). – UV. (Methanol): Endabsorption, Schulter bei 235 (3,5). – IR.: u.a. Banden bei 3600, 3400, 3300, 3050, 1680, 1630, 1520, 1420, 1390, 1370. – NMR. ($CDCl_3 + D_2O$): 1,0–2,6 ppm (20 H), darunter 1,35 s (3 H) und 1,81 s (3 H); 2,68 $d \times d$ ($J = 1,3$ und 2,3 Hz; 1 H); 2,81 t ($J = 2,3$ Hz; 1 H); 3,0 m (2 H); 3,2 m (2 H); 3,43 m (1 H); 3,82 b (1 H); 4,2 m (1 H); 4,65 m (1 H); 5,1 m (1 H); 6,22 s (1 H); 7,1 d (1 H); 7,22 s (5 H); 7,5 d (1 H).

$C_{28}H_{40}N_4O_6$	Ber. C 63,6	H 7,6	N 10,6	O 18,2%
(528,65)	Gef. ,, 63,4	,, 7,6	,, 10,3	,, 18,5%

Aminosäureanalyse und Bestimmung der Konfiguration der Aminosäuren. – Je ein Muster in der Grössenordnung von 0,2 mg **1** wurde in eine 2 ml Ampulle eingewogen, in 1 ml 6N HCl gelöst, die Ampulle evakuiert (1 Torr), zugeschmolzen und in ein Ölbad bei 115° gestellt. Nach 1½, bzw. 16 Std. wurde die Ampulle abgekühlt, ihr Inhalt im Vakuum bei 30–40° zur Trockene eingedampft und der Rückstand einer Aminosäureanalyse unterworfen (s. Tab. 2).

Tabelle 2

Retentions- Zeit (Min.)	Aminosäure	μmol Aminosäure pro mg Ausgangsmaterial				Konfigu- ration
		Dauer der Hydrolyse		1½ stdg. Hydrolyse		
		16 Std.	1½ Std.	+ Abbau mit DAO	LAO	
61	Prolin	1,75	1,76	0,00	1,53	D
85	α -Amino- isobuttersäure	1,58	1,58	1,23	1,52	–
107	} Zersetzungs- produkte der Aminosäure X	[0,14]	[0,02]	[0,03]	0,00	L
111		[0,08]				
113		[0,02]	[0,02]	[0,35]	0,00	
119		[0,19]	[0,79]	[0,01]	0,00	
120				[0,04]	0,00	
135	Phenylalanin	1,69	1,43	1,11	0,00	L

Abbau mit L-Aminosäure-oxydase (LAO). 0,415 mg **1** wurden in 6N HCl 1½ Std. bei 115° hydrolysiert. Nach Abdampfen der Salzsäure wurde der Rückstand 2 Std. im Hochvakuum bei 25° getrocknet und in 0,2 ml 0,2M Tris. HCl-Puffer (pH 7,8) gelöst, der pH-Wert auf 7,5 adjustiert, die Lösung mit 150 μl L-Aminosäure-oxydase (aus *Crotalus terr. terr.*, 1 mg/ml, *Boehringer*) versetzt und 16 Std. bei 37° inkubiert. Nach Ansäuern mit 25 μl 6N HCl und Filtration wurde das Filtrat im Vakuum bei 30–40° zur Trockene abgedampft, der Rückstand in 0,2 ml 0,1N HCl ge-

löst und einer Aminosäureanalyse unterworfen (Resultate in Tab. 2). Aus der Abwesenheit der Pike von Phenylalanin und der Aminosäure-X (107–119 Min.) konnte auf die L-Konfiguration dieser Aminosäuren geschlossen werden.

Abbau mit D-Aminosäure-oxydase (DAO). Ein Hydrolysat von 0,400 mg **1** wurde wie beim Abbau mit LAO vorbereitet. Nach Trocknen im Hochvakuum wurde der Rückstand in 0,2 ml 0,2M Natriumpyrophosphat gelöst, der pH-Wert mit 1N NaOH auf 7,5 eingestellt, die Lösung mit 50 μ l D-Aminosäure-oxydase (aus Schweineiere, 5 mg/ml, *Boehringer*) versetzt und 3 Std. bei 37° inkubiert. Anschliessend wurde sie wie beim Abbau mit LAO behandelt (Resultate in Tab. 2). Der Prolin-Pik war vollständig verschwunden. Also kann Prolin die D-Konfiguration zugeschrieben werden. Die Pike von Phenylalanin, α -Amino-isobuttersäure, sowie die Pike «107–119 Min.» waren noch vorhanden. Allerdings konnte eine Zunahme des Piks «113 Min.» auf Kosten des Piks «119 Min.» beobachtet werden. Unter den Inkubationsbedingungen fand anscheinend eine Umwandlung der Hauptspezies «119 Min.» des Hydrolysats in die Nebenspezies «113 Min.» statt.

Öffnung des Peptidrings (1 \rightarrow 2) und Bestimmung der Aminosäuresequenz. – 213 mg **1** wurden in 5 ml Trifluoressigsäure gelöst und 50 Min. bei 50° gehalten. Nach Abdampfen der Lösung im Vakuum bei 35° wurde der Rückstand mehrmals mit Äther verrieben. Das so erhaltene fast farblose Pulver wurde im Vakuum bei 25° getrocknet: 228 mg. Papierelektrophorese: $M_{Trp}^{1,9} = 0,70$, $M_{Trp}^{5,8} = 0,5$. Nachweis mit Ninhydrin, Folin-Ciocalteu, Chlor/Stärke/KI, keine Anfärbung mit Isatin.

Edman Abbau von 2. Alle Operationen wurden unter Stickstoff durchgeführt. 21,2 mg **2** wurden in 2 ml Puffer (0,35 g Dimethylallylamin, 6 ml Pyridin, 4 ml Wasser, mit Trifluoressigsäure auf pH 9,6 eingestellt) gelöst, 50 μ l Phenylisothiocyanat zugegeben und unter häufigem Schütteln 30 Min. bei 50° gehalten. Nach Entfernung des überschüssigen Reagens durch 2malige Extraktion mit 2 ml Petroläther wurde die wässrige Phase im Vakuum abgedampft, der Rückstand mit 0,3 ml Dioxan versetzt und diese Lösung nochmals zur Trockene abgedampft. Die Abspaltung der N-endständigen Aminosäure als Thiazolinon erfolgte durch 10 Min. Behandlung mit 1 ml Trifluoressigsäure bei 50°. Nach Abdampfen der Trifluoressigsäure unter Stickstoffstrom wurde der Rückstand einer 5stufigen Gegenstromverteilung im System Essigester/Wasser 1:1 unterworfen. Die organischen Phasen 1 und 2 enthielten den grössten Teil des Thiazolinons, das nicht näher untersucht wurde. Das Peptid befand sich hauptsächlich in den wässrigen Phasen 4 und 5, die im Vakuum bei 30° abgedampft wurden. Nach Auflösen des Rückstands in Wasser wurde mit einem aliquoten Teil nach Hydrolyse (6N HCl, 115°, 16 Std.) eine Aminosäureanalyse durchgeführt. Der Rest wurde lyophilisiert und bei der nächsten Stufe des *Edman'schen* Abbaus unter denselben Bedingungen eingesetzt. Nach dem ersten Abbau wurde eine Papierelektrophorese des Restpeptids durchgeführt: $M_{Trp}^{1,9} = 0,78$ (vor dem Abbau = 0,70). Nachweis mit Isatin, Folin-Ciocalteu, Chlor/Stärke/KI. Die Resultate der Aminosäureanalyse sind in Tab. 3 dargestellt (bezogen auf α -Amino-isobuttersäure = 1,00). Die nächsten zwei Abbaustufen wurden analog durchgeführt.

Tabelle 3

Retentionszeit (Min.)	Aminosäure	Aminosäureverhältnisse			
		vor dem Abbau	nach 1. Stufe	2. Stufe	3. Stufe
61	Prolin	1,02	1,00 \longrightarrow	0,07	Spuren
85	α -Aminoisobuttersäure	1,00	1,00	1,00	1,00
107	Zersetzungsprodukte der Aminosäure X	[0,08]	[0,08]	[0,05]	} \longrightarrow 0,00
111		[0,05]	[0,05]	[0,03]	
113		[0,01]	[0,03]	[0,03]	
119		[0,11]	[0,13]	[0,10]	
135	Phenylalanin	0,98 \longrightarrow	0,10	0,09	0,04

Abbau mit Leucinaminopeptidase [3]. 2,8 mg **2** in 100 μ l einer Lösung, die 0,1N an Ammoniak und 0,0025N an $MgCl_2$ war, wurde mit 50 μ l Leucinaminopeptidase (aus Rindsaugenlinsen, 2 mg Protein/ml, *Serva*) versetzt und bei pH 8 und Raumtemp. 16 Std. inkubiert. 25 μ l dieser Lösung wurden angesäuert und einer Aminosäureanalyse unterworfen. Keine Aminosäure war durch das Enzym freigesetzt worden. Die Aktivität des Enzyms war an der Lysin-vasopressin-Molekel kontrolliert worden.

Abbau mit Carboxypeptidase [3]. Eine Suspension von 100 μ l Carboxypeptidase A (CAO-DFB, aus Rinderpankreas, 50 mg/ml, *Mann Research*) wurde bei +4° in 4 ml Wasser suspendiert und zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 0,4 ml 0,01N $NaHCO_3$ unter Zugabe von 0,9 ml 0,1N NaOH gelöst, der pH-Wert mit 0,6 ml 0,1N HCl auf 8,5 eingestellt und diese Lösung mit 3,0 ml 0,2M N-Äthylmorpholinacetat-Puffer (pH 8,5) verdünnt.

1,0 ml dieser Carboxypeptidaselösung wurde mit einer Lösung von 1,4 mg **2** in 0,3 ml 0,2M N-Äthylmorpholinacetat-Puffer (pH 8,5) versetzt und 13 Std. bei 37° inkubiert. Nach Ansäuern mit Salzsäure auf pH 2 wurde die Lösung einer Aminosäureanalyse unterworfen. Pro mg Ausgangsmaterial wurden 0,57 μ mol α -Amino-isobuttersäure und 0,06 μ mol Phenylalanin nachgewiesen.

Aufgrund der Ergebnisse des *Edman*-Abbaus und der Inkubation mit Carboxypeptidase ist anzunehmen, dass bei ca. 90% des Cyclopeptids die Bindung Iabu-Phe, bei ca. 10% hingegen die Bindung Phe-Pro gespalten wurde.

Reduktion von 1 zu 3 (nach [5]). – 5,26 g **1** wurden in 170 ml Eisessig unter CO_2 vorgelugt und mit einer Mischung von 4,91 g $CrCl_2$ (wasserfrei, *Merck*) in 260 ml 50proz. Essigsäure versetzt. Nach 20 Min. Rühren bei Raumtemp. wurden 130 ml Wasser und 200 ml Methylenchlorid zugegeben und verteilt. Die organischen Phasen wurden mit 1N $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Ausbeute: 4,8 g weisser Schaum. Dieser wurde an der 50fachen Menge Kieselgel *Merck* (0,05–0,2 mesh) chromatographiert. Mit Chloroform/Methanol 99:1 wurden 1,32 g unverändertes **1**, mit Chloroform/Methanol 98:2 1,78 g **3** eluiert. $[\alpha]_D^{20} = -119,7$ in Benzol ($c = 0,797$). – MS.: 528 (M^+). – IR.: u.a. Banden bei 3600, 3300, 2920, 1710 (Schulter), 1680, 1625, 1530, 1430, 1395, 1380, 1220, 1180, 1060, 1000, 950, 920, 870, 850. – NMR.: 1,32 s (3 H); 1,75 s (3 H); 2,4 t ($J = 7; 2$ H); 2,65 t ($J = 5,5; 2$ H); ausserdem 1,6–3,4 noch 16 H; 3,8 m (3 H); 4,18 m (1 H); 4,62 m (1H); 5,13 m (1H); 6,18 s (1H); 7,15 d (1H); 7,2 s (5 H); 7,5 d (1H).

$C_{28}H_{40}N_4O_6$	Ber. C 63,6	H 7,8	N 10,6	O 18,2%
(528)	Gef. „ 63,9	„ 7,8	„ 10,0	„ 18,1%

Wasserabspaltung aus 3 unter Bildung von 4. – 4,3 g **3** wurden 4 Tage lang mit einigen mg Jod in 200 ml Xylol am Rückfluss gekocht. Nach Abfiltrieren und Eindampfen der Lösung erhielt man 3,6 g öligen Rückstand. Dieser wurde an 60 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform/Methanol 99:1 wurden 1,45 g **4** als weisser Schaum isoliert. Mit Chloroform/Methanol 98:2 wurde noch 1 g **3** zurückgewonnen.

Charakterisierung von 4. MS.: 510 (M^+). – UV. (CH_2Cl_2): 235 (3,67); 320,5 (1,62). – IR.: u.a. Banden bei 3400, 3300, 3050, 2950, 2850, 1680, 1625, 1520, 1470, 1455, 1390, 1370, 1310, 1180, 1070, 1030, 995, 985, 960. – NMR.: 1,35 s (3 H); 1,78 s (3 H); 2,6 t ($J = 7,5; 2$ H); 1,0–3,5 (15 H); 3,75 m (1 H); 4,2 m (1 H); 4,65 m (1 H); 5,15 m (1 H) 5,8 d \times d ($J = 3; 9; 1$ H); 6,0 s (1 H); 6,3 m (2 H); 7,1 d ($J = 10; 1$ H); 7,2 s (5 H); 7,5 d ($J = 10; 1$ H).

$C_{28}H_{38}N_4O_5$	Ber. C 65,9	H 7,5	N 11,0	O 15,7%
(510)	Gef. „ 64,8	„ 7,3	„ 10,5	„ 15,4%

Hydrierung von 4 zu 5. – 51 mg **4** wurden in 12 ml Äthanol mit 25 mg 10proz. Pd/C (*Fluka*) bis zur Beendigung der Wasserstoffaufnahme hydriert. Filtration und Einengen zur Trockene ergab 41 mg farbloses Öl, das an Dickschichtplatten (1 mm) mit Chloroform/Methanol 99:1 als Laufmittel gereinigt wurde. – MS.: 512 (M^+). – NMR.: 1,1 t ($J = 7; 3$ H); 1,39 s (3 H); 1,82 s (3 H); 2,46 q ($J = 7; 2$ H); zwischen 1 und 3,5 noch 17 H; 3,88 m (1 H); 4,2 m (1 H); 4,7 m (1 H); 5,2 m (1 H); 6,08 s (1 H); 7,0–7,4 (6 H); 7,6 d ($J = 10; 1$ H).

Bestimmung der absoluten Konfiguration der sekundären Alkoholgruppe von 6 nach Horeau [6]. – 26,4 mg **6** in 0,3 ml Pyridin wurden mit 47,2 mg D,L-Phenylbutter-

säureanhydrid versetzt und 16 Std. bei Zimmertemp. stehengelassen, dann wurden 2 ml Benzol und 2 ml Wasser zugegeben und mit 0,1 N NaOH bis zum Umschlag von Phenolphthalein titriert. (Verbrauch 2,52 ml, was einem Veresterungsgrad von 106% entspricht). Die wässrige Phase wurde abgetrennt, mit 2 N HCl angesäuert und mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wurde eingedampft, der Rückstand in 2 ml Chloroform aufgenommen und die Drehung gemessen: $[\alpha]_D^{20} = -0,086^\circ$. Dieser Versuch wurde in 4 Parallelen ausgeführt. Die vereinigten Benzolphasen wurden eingedampft, der Rückstand durch präp. Dickschichtchromatographie gereinigt. – MS.: 674 (M^+). – Das NMR.-Spektrum zeigt die Veresterung mit einer Molekel Phenylbuttersäure. Das Multiplett bei 3,43 ppm ($H-C-OH$) ist nach 4,75 ppm verschoben.

Reduktion von 1 zu 6. – Zu 106 mg 1 in 5 ml Äthanol wurden 20 mg Natriumborhydrid (*Ventron Alfa*) zugegeben und die Mischung 5 Std. bei 20° gerührt. Nach Ansäuern mit Schwefelsäure wurde 3mal mit Chloroform extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingedampft: 26 mg amorpher farbloser Rückstand, der mittels Dickschichtchromatographie gereinigt wurde. Nach Dünnschichtchromatogramm und NMR. ist das Produkt identisch mit 6, wobei es sich beim Reduktionsprodukt um ein Diastereomeren-Gemisch handeln dürfte.

Oxydation von 6 zu 1 (analog zu [13]). – 600 mg getrocknetes CrO_3 (*Merck*) wurden unter starkem Rühren zu 950 mg Pyridin in 15 ml Methylenchlorid gegeben und 15 Min. bei Raumtemp. gerührt. Dann wurden 528 mg 6 in 5 ml Methylenchlorid zugegeben und 4 Std. bei Zimmertemp. weiter gerührt. Anschliessend wurde filtriert, der Rückstand mit Äther gewaschen und die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit kalter 1 N Natronlauge, kalter 1 N HCl-, 1 N $NaHCO_3$ - und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Ausbeute 363 mg Rohprodukt, das an der 50fachen Menge Kieselgel *Merck* (0,05–0,2 mm) chromatographiert wurde. Reines 1 liess sich mit Chloroform/Methanol 99:1 eluieren. Ausbeute: 355 mg = 67,5%. Die Substanz war hinsichtlich IR., NMR., MS. und biologischer Aktivität identisch mit 1.

Synthese von 2-Methoxycarbonylamino-8-oxo-9,10-epoxy-decansäure-äthylester 14. – 2-(β -Chloräthyl)-1,3-dithian (7) (nach Seebach [15]⁴). 67,2 g 3-Chlorpropionaldehyd-diäthylacetal [14] und 40,4 ml 1,3-Propandithiol (*Fluka*) wurden in 1 l Chloroform vorgelegt, etwa 10 Min. lang ein sehr kräftiger Strom trockenes HCl eingeleitet und die Mischung 90 Min. bei Zimmertemp. stehengelassen. Anschliessend wurde sie in 400 ml Wasser gegossen und 3mal mit Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen je 3mal mit 5proz. KOH und Wasser gewaschen, über K_2CO_3 getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wurde fraktioniert destilliert und ergab 53,2 g (75% d. Theorie) einer hellen Flüssigkeit Sdp. $0,2-0,3$ Torr $91-92^\circ$, $n_D^{25} = 1,57$ (Lit. Sdp. $0,2$ Torr $84,5-86^\circ$, $n_D^{25} = 1,573$).

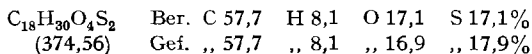
2-Äthyliden-1,3-dithian (8) [15] [16]. 2,4 g NaH (50proz. Mineralölsuspension, *Fluka*) (= 0,05 mol) wurden mit Petroläther gewaschen, unter Stickstoff in 25 ml frisch über CaH_2 destilliertem Dimethylsulfoxid suspendiert und unter Rühren auf $70-75^\circ$ erhitzt, bis die Wasserstoffentwicklung beendet war (ca. 45 Min.). Das Reaktionsgemisch wurde auf 22° abgekühlt, 4,7 ml *t*-Butylalkohol und anschliessend 3,35 g β -Chloräthylidithian 7 in 45 ml trockenem Benzol innerhalb 5 Min. zugegeben. Das Gemisch wurde weitere 10 Min. gerührt und anschliessend auf 250 ml Wasser gegossen, die Phasen getrennt, die Wasserphase mit Pentan, die organischen Phasen mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt wurde unter Zusatz einiger Kristalle Hydrochinon unter Stickstoff fraktioniert destilliert. Ausbeute: 2,7 g gelbliche Flüssigkeit (74% der Theorie). Sdp. $0,1$ Torr = 41° ; $n_D^{25} = 1,592$ (Lit. $n_D^{25} = 1,5922$). – NMR.: 1,8 d ($J = 7; 3$ H); 1,9–2,5 m (2 H); 2,6–3,2 m (4 H); 6,02 q ($J = 7; 1$ H).

2-(ω -Chlorpentyl)-2-vinyl-1,3-dithian (9) [7] [8]. 10,8 g 8 wurden in 450 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst, unter Stickstoff auf -75° gekühlt und mit 4,99 g *n*-Butyllithium in Hexan (*Merck*) versetzt. Die Lösung wurde dann auf -20° erwärmt und bei dieser Temp. belassen, bis sie sich blauschwarz verfärbt hatte und eine Probe nach Behandlung mit D_2O und einigen Tropfen Acetylchlorid im NMR. kein Ausgangsmaterial mehr zeigte. Dann wurde auf -45° abgekühlt, 10,5 ml 1-Chlor-5-jodpentan (hergestellt nach [17]) zugegeben und über Nacht bei -25° belassen. Die gelbe Reaktionslösung wurde in 2 l Wasser gegossen und mit Pentan extrahiert. Die Pentan-

⁴) Wir danken Herrn Professor D. Seebach für die Überlassung der Vorschrift zur Herstellung von 7 und 8.

phasen, mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft, ergaben 21,8 g gelbliche ölige Flüssigkeit. Diese wurde an 1 kg Kieselgel chromatographiert. Mit Petroläther/Toluol 9:1 konnten 13 g reines Produkt erhalten werden (71% d. Th.). – IR.: u.a. Banden bei 3050, 2900, 1620, 1420, 995, 930, 910, 800. – NMR.: 1,2–2,2 (10 H); 2,5–3,1 (4 H); 3,5 *t* (*J* = 6,5; 2 H); 5,2–6,1 (3 H).

2[6,6-Bis(äthoxycarbonyl)hexyl]-2-vinyl-1,3-dithian **10** (analog zu [18]). 17,6 g Malonsäure-diäthylester (Merck) wurden in 500 ml über CaH₂ destilliertem Dimethylsulfoxid gelöst, auf 10° abgekühlt und 4,8 g NaH-Ölsuspension zugesetzt. Nach Beendigung der Wasserstoffentwicklung wurden 25 g ω-Chlorpentylvinylidithian **9** zugegeben und das Reaktionsgemisch 4 Std. auf 100° erhitzt. Nach Abdestillieren des Dimethylsulfoxids wurde der Rückstand zwischen Eiswasser und Essigester verteilt. Die getrockneten Esterextrakte ergaben 41,2 g gelbes Öl. Dieses wurde an der 50fachen Menge Kieselgel chromatographiert. Mit Benzol/Essigester 9:1 konnten 33 g des gewünschten Produktes als fast farbloses Öl isoliert werden. Ausbeute = 90%. – MS.: 374 (*M*⁺). – IR.: u.a. Banden bei 2920, 1730, 1630, 1470, 1380, 1030, 935. – NMR.: 1,3 *t* (*J* = 7,3; 6 H); von 1,1 bis 2,2 noch 12 H; 2,5–3,5 (5 H); 4,22 *q* (*J* = 7; 4 H); 5,18–5,9 (3 H).



Partielle Verseifung von **10** zu 2[(6-Äthoxycarbonyl-6-carboxyl)hexyl]-2-vinyl-1,3-dithian **11**. 41,6 g **10** wurden in 280 ml Äthanol gelöst, 6,25 g KOH in Äthanol zugetropft und die Lösung über Nacht bei Raumtemp. stehen gelassen. Das Gemisch wurde eingedampft und der Rückstand zwischen Essigester und Wasser verteilt. Die Wasserphasen wurden unter Kühlung mit 2*N* Salzsäure angesäuert und mehrmals mit Essigester extrahiert. Der saure organische Extrakt lieferte nach Waschen, Trocknen und Eindampfen 33,5 g rohes **11** (89% d. Th.). Die Säure wurde, wenn nötig, durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt. Mit Chloroform/Methanol 99:1 wurden 26,3 g reines Produkt erhalten. (70% d. Th.). – MS.: 346 (*M*⁺). – IR.: u.a. Banden bei 3450, 1735, 1705, 1620, 1420, 1375, 1025, 930. – NMR.: 1,0–2,2 (15 H) darunter 1,28 *t* (*J* = 7; 3 H); 2,3–3,1 *m* (4 H); 3,37 *m* (*J* = 7; 1 H); 4,22 *q* (*J* = 7; 2 H); 5,17–6,15 (3 H); 7,9 *b* (1 H, austauschbar).

2[(6-Äthoxycarbonyl-6-chloroformyl)hexyl]-2-vinyl-1,3-dithian (analog zu [19]). 348 ml Oxalylchlorid (Fluka) wurden in 25 ml abs. Benzol gelöst und auf 10° abgekühlt. Zu dieser Mischung wurde unter Rühren und Kühlung eine Lösung von 10,4 g Säure **11** und 2,4 ml Pyridin in 20 ml abs. Benzol getropft, sodass die Temperatur 25° nicht überstieg. Dann wurde das Gemisch so lange in einem auf 60° vorgewärmten Ölbad weitergerührt, und, sobald die Gasentwicklung aufhörte (ca. 10 Min.), auf 20–25° abgekühlt, der Niederschlag von Pyridinhydrochlorid rasch abgesaugt und mit Benzol nachgewaschen. Das Filtrat wurde nach Konzentrieren nochmals filtriert, schliesslich ganz eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Ausbeute: 10,2 g Säurechlorid (IR.: u.a. Banden bei 1790 und 1735).

2[(6-Äthoxycarbonyl-6-methoxycarbonylamino)hexyl]-2-vinyl-1,3-dithian **12** (analog zu [20]). 10,2 g Säurechlorid der Säure **11** wurden in 90 ml trockenem CCl₄ gelöst und unter Stickstoff und Rühren zum Sieden erhitzt. Zu dieser Mischung wurde im Verlauf von 1 Std. 3,8 g Trimethylsilylazid (Fluka) getropft und weitere 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Tetrachlorkohlenstoff und Trimethylchlorsilan wurden weitgehend abdestilliert (ca. 84 ml). Der ölige Rückstand wurde mit 25 ml abs. Benzol verdünnt, unter Rühren mit 6 ml Methanol versetzt und über Nacht bei Zimmer-temp. belassen. Nach Abziehen der Lösungsmittel wurde der ölige Rückstand in 450 ml Ester aufgenommen, mit eiskalter 1*N* NaHCO₃-Lösung mehrmals extrahiert, mit Wasser nachgewaschen und getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhielt man 11 g hellbraunes Öl, das durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt wurde. Mit Petroläther/Essigester wurden 8,0 g (71% d. Th.) reines Urethan **12** isoliert. – IR.: u.a. Banden bei 3380, 2900, 1710 breit, 1620, 1510, 1370, 1350, 1070, 930. – NMR.: 1,29 *t* (*J* = 7; 3 H); 1–2,3 (insgesamt 15 H); 2,4–3,1 (4 H); 3,67 *s* (3 H); 4,19 *q* (*J* = 7; 3 H); 5,2–6,1 (4 H).

Abspaltung des Dithianrings aus **12** unter Bildung der Carbonylverbindung **13** (analog zu [9]). 10 g Dithianverbindung **12** wurden in 30 ml Acetonitril gelöst und diese Lösung rasch zu einer gut gerührten Lösung von 14,3 g *N*-Chlorsuccinimid (Merck) und 20,3 g AgNO₃ (Merck, p.a.) in 300 ml 80proz. wässrigem Acetonitril zugegeben. Die hellblaue trübe Lösung wurde 7 Min. bei Zimmer-temp. weitergerührt, in je 1 Min. Abstand 26,7 ml gesättigte Na₂SO₃-, Na₂CO₃- und NaCl-Lösung zugegeben, das Gemisch mit 540 ml Methylenchlorid/Hexan 1:1 verdünnt, über Talk filtriert und mit 300 ml dieser Lösungsmittelmischung nachgewaschen. Die organische Phase wurde ab-

getrennt, die wässrige Phase noch 2mal mit Hexan/Methylenchlorid 1:1 gewaschen, die vereinigten organischen Phasen getrocknet und eingedampft: 4,7 g Öl. Dieses wurde an Kieselgel chromatographiert und mit Petroläther/Essigester 8:2 1,4 g reiner Substanz (20% d. Th.) in Form eines farblosen Öls isoliert. – MS.: 287 ($M^+ + 2$). – IR.: u.a. Banden bei 3470, 1720, 1680, 1610, 1510, 1400, 1370, 1350, 1200, 1070, 1025, 985, 960. – UV. (CH_2Cl_2): 324 (1,44). – NMR.: 1,2–2,2 (11 H), darunter 1,35 t ($J = 7,5$; 3 H); 2,63 t ($J = 7$; 2 H); 3,73 s (3 H); 4,22 q + b (3 H); 5,3 b (1 H); 5,83 d \times d ($J = 3$; 8; 1 H); 6,2–6,6 (2 H).

$\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ Ber. C 58,9 H 8,1 N 4,9 O 28,0%
(285,34) Gef. „ 58,2 „ 7,8 „ 4,9 „ 28,2%

Oxydation von **13** zu 2-Methoxycarbonylamino-8-oxo-9,10-epoxy-decansäureäthylester **14** nach [10]. 400 mg **13** wurden in 3 ml Methanol und 83 mg Benzotrinitril gelöst. Dann wurden 282 mg KHCO_3 und anschliessend 0,15 ml 30proz. H_2O_2 (Merck) unter Rühren zugegeben und 75 Std. bei 4° weitergerührt. Der weisse Niederschlag wurde abfiltriert und mit Chloroform nachgewaschen. Das Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand zwischen Chloroform und Wasser verteilt. Die organische Phase, getrocknet und eingedampft, lieferte 500 mg helles Öl. Aus diesem wurden mittels präp. Dickschichtchromatographie an Kieselgel mit Benzol/Essigester 1:1 als Laufmittel 230 mg **14** isoliert (55% d. Th.). – MS.: 302 ($M^+ + 1$). – UV. (CH_2Cl_2): Nur Endabsorption. – IR.: u.a. Banden bei 3430, 1720 b, 1510, 1460, 1445, 1375, 1350, 1200, 1075, 1030, 870. – NMR.: 1,28 t ($J = 9$; 3 H); 1,1–2,1 (insgesamt 11 H); 2,36 m (2 H); 2,84 d \times d ($J = 2,5$; 5; 1 H); 3,0 t ($J = 5$; 1 H); 3,4 d \times d ($J = 2,5$; 5; 1 H); 3,68 s (3 H); 4,18 q ($J = 7,5$; 2 H) + b (1 H); 5,2 b (1 H).

$\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ Ber. C 55,8 H 7,7 N 4,6 O 31,9%
(301,339) Gef. „ 55,8 „ 7,8 „ 4,8 „ 31,8%

Hydrierung von **13** zu 2-Methoxycarbonylamino-8-oxododecansäureäthylester **15**. 250 mg **13** wurden in 5 ml Essigester gelöst und mit 60 mg 10proz. Pd/C bei Raumtemp. und Normaldruck hydriert. Nach Filtration wurde zur Trockne eingedampft. Der farblose, ölige Rückstand kristallisierte nach Stehen bei 0°. – MS.: 287 (M^+). – UV. (CH_2Cl_2): 270 (1,69), 278 (1,70). – IR.: u.a. Banden bei 3450, 1720, 1510, 1460, 1370, 1350, 1200, 1115, 1095, 1060, 1025, 860. – NMR.: 0,85–2,15 (14 H), darunter 1,05 t ($J = 7$; 3 H); 1,3 t ($J = 7$; 3 H); 2,15–2,75 (4 H); 3,87 s (3 H); 4,22 q ($J = 7$) + b (3 H); 5,25 b (1 H).

$\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ Ber. C 58,5 H 8,8 N 4,9%
(287,356) Gef. „ 58,8 „ 8,8 „ 4,8%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. A. Zeller, *Advances in Enzymology* 8, 459 (1948).
- [2] P. Edman, *Acta chem. scand.* 4, 277, 283 (1950).
- [3] C. H. W. Hirs, S. Moore, W. H. Stein, *J. biol. Chemistry* 235, 633 (1960).
- [4] S. P. Colowick, N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology* VI, 155, 426 (1963).
- [5] A. Hirota, A. Suzuki, K. Aizawa, S. Tamura, *Agric. and biol. Chemistry* 37, 955 (1973); A. Hirota, A. Suzuki, S. Tamura, *ibid.* S. 1185.
- [6] W. Cole, P. L. Julian, *J. org. Chemistry* 19, 134 (1954).
- [7] A. Horeau, *Tetrahedron Letters* 1961, 506, 654.
- [8] D. Seebach, N. R. Jones, E. J. Corey, *J. org. Chemistry* 33, 302 (1968).
- [9] D. Seebach, *Synthesis* 1969, 17; D. Seebach, *Angew. Chem.* 81, 690 (1969).
- [10] E. J. Corey, B. W. Erickson, *J. org. Chemistry* 36, 3553 (1971).
- [11] G. B. Payne, *Tetrahedron* 18, 763 (1962).
- [12] Th. Wieland, G. Pfeleiderer, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955).
- [13] St. Guttmann, R. A. Boissonnas, *Helv.* 41, 1857 (1958); 43, 205 (1960).
- [14] R. Ratcliff, R. Rodedorst, *J. org. Chemistry* 35, 4000 (1970).
- [15] Organic Synthesis Coll. Vol. II, 137.
- [16] D. Seebach, persönl. Mitteilung.
- [17] E. J. Corey, M. Chaykovsky, *J. Am. chem. Soc.* 87, 1347 (1965).
- [18] R. H. Raphael, F. Sondheimer, *J. chem. Soc.* 1950, 2100.
- [19] J. Shapira, R. Shapira, K. Dittmev, *J. Am. chem. Soc.* 75, 3655 (1953).
- [20] R. Adams, L. Ulich, *J. Am. chem. Soc.* 42, 599 (1920).
- [21] S. S. Washburne, W. R. Peterson, *Synth. Commun.* 2, 227 (1972).