

73. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

130. Mitteilung¹⁾

Synthese des δ -N-Hydroxy-L-arginins

von **Jörg Widmer** und **Walter Keller-Schierlein**

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich

Herrn Prof. Dr. *Hans Brockmann* zum 70. Geburtstag gewidmet

(12. II. 74)

Summary. A synthesis of the antibioticly active amino acid, δ -N-hydroxy-L-arginine, starting from L-ornithine is described. In addition a new synthesis of δ -N-hydroxy-L-ornithine, an important building stone of many sideramines, is given.

Das δ -N-Hydroxy-L-arginin (**1**) ist eine antibiotisch wirksame Aminosäure, die wir kürzlich aus Kulturen des dermatophytischen Pilzes *Nannizzia gypsea* isoliert haben [2]. Dasselbe Antibioticum wurde von *Maehr et al.* [3] gleichzeitig aus einem nicht näher charakterisierten *Bacillus*-Stamm erhalten. Die Strukturformel **1** beruht einerseits auf einer eingehenden spektroskopischen Untersuchung [2], anderseits auf chemischen Umwandlungen und einer Röntgenstrukturanalyse des kristallinen Hydrobromids [3]. In dieser Arbeit berichten wir über eine Synthese von δ -N-Hydroxy-L-arginin, die die Strukturformel **1** bestätigt und zudem die Herstellung grösserer Materialmengen für eingehende biologische Studien erlaubt.

Zunächst überzeugten wir uns davon, dass Hydroxylamine (z.B. **2**) mit O-Methylisoharnstoff analog wie Amine reagieren. Die einfache Modellverbindung **3** konnte in befriedigender Ausbeute hergestellt werden. Somit konnten grundsätzlich die Methoden, die für die Überführung von Ornithin in Arginin bekannt sind, auf das neue Problem übertragen werden.

Die einfachste Synthese von Arginin, die unseres Wissens zum erstenmal von *Turba* [4] beschrieben wurde, besteht im Schutz der Carboxylgruppe und der α -Aminogruppe des Ornithins durch Bildung des Kupferkomplexes, in dem die freie δ -ständige Aminogruppe selektiv mit O-Methylisoharnstoff in die Guanidinogruppe übergeführt werden kann. Die gleiche einfache Methode lässt sich allerdings beim δ -N-Hydroxy-L-ornithin²⁾ nicht anwenden. Es ist bekannt (z.B. [6]), dass Hydroxylamine reduzierend wirken und sowohl mit Triphenyltetrazoliumchlorid wie auch mit *Fehling'scher* Lösung reagieren. Kupferkomplexe von α -Aminosäuren verhalten sich offenbar ähnlich wie *Fehling'sches* Reagens. Wenn man versucht, den Kupferkomplex des δ -N-Hydroxyornithins herzustellen, scheiden sich bald Salze des einwertigen Kupfers ab unter Zerstörung der Hydroxylaminogruppen. Wir haben daher das mit bewährten Gruppen geschützte Derivat **12** des δ -N-Hydroxy-L-ornithins auf folgendem Weg hergestellt:

¹⁾ 129. Mitt., s. [1].

²⁾ Hergestellt durch Hydrolyse von Desferrifusigen [5].

Herrn Dr. H. *Diekmann*, Tübingen, danken wir bestens für eine grössere Menge Rohfusigen.

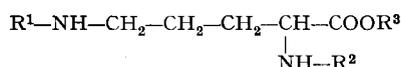
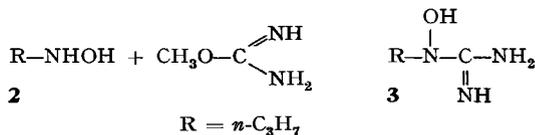
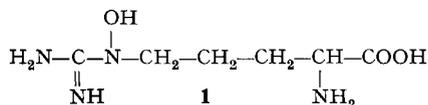
Das bekannte δ -N-Benzoyloxycarbonyl-L-ornithin (**4**) wurde durch Umesterung mit *t*-Butylacetat und Perchlorsäure in den *t*-Butylester **5** übergeführt, der mit *t*-Butoxycarbonylazid das vollständig geschützte Derivat **6** gab. Daraus liess sich durch Hydrogenolyse die Benzoyloxycarbonylgruppe selektiv abspalten. Das Produkt **7** wurde ohne Reinigung mit Anisaldehyd in die *Schiff*'sche Base **9** übergeführt. Das daraus mit *m*-Chlorperbenzoesäure bereitete Oxaziridin **11** erwies sich durch das NMR.-Spektrum als ein Gemisch von Diastereomeren, das sich nur schwer trennen liess. Da die Stereochemie im Bereich des Oxaziridinringes für das Endprodukt irrelevant ist, wurde die Synthese mit dem Gemisch weitergeführt.

Im Falle des stabileren Oxaziridins **10** liess sich dagegen ein Diastereomeres – aufgrund des NMR.-Spektrums offenbar eine der beiden *trans*-Formen [7] – kristallin abtrennen, während die beiden *cis*-Isomeren nicht kristallisiert werden konnten. Eine stabile inversionsgehemmte räumliche Anordnung an Stickstoffatomen mit elektronegativen Substituenten ist in letzter Zeit wiederholt beobachtet worden, u.a. auch an verschiedenen Oxaziridinen (vgl. z.B. [8]).

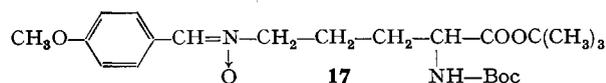
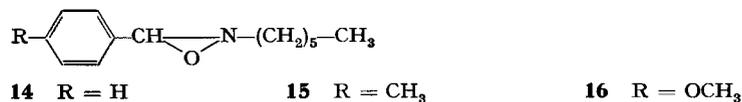
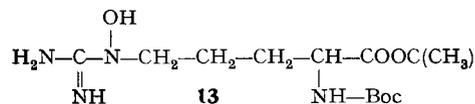
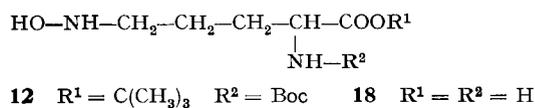
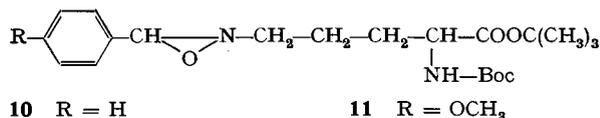
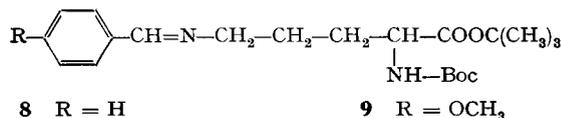
Die säurekatalysierte Spaltung des Oxaziridins **11** musste unter so milden Bedingungen erfolgen, dass die *t*-Butyl-Schutzgruppen nicht merklich angegriffen wurden. Nach diesem Postulat hatten wir die Wahl der Aldehydkomponente (Anisaldehyd) für die *Schiff*'sche Base **9** ausgerichtet. Anhand der Modellverbindungen **14**, **15** und **16** hatte sich nämlich ergeben, dass das Benzaldehyd-Derivat **14** beim Rühren mit Dowex-50 \times 2 in Methanol/Wasser bei Raumtemperatur erst nach 90 Std. zu etwa 90% gespalten wurde. Beim *p*-Tolualdehydderivat **15** wurde nach 19 Std. ein ca. 90proz. Umsatz beobachtet. Beim *p*-Methoxyderivat **16** war bereits nach 2 $\frac{1}{2}$ Std. kaum mehr Ausgangsmaterial nachweisbar. Dementsprechend konnte das Oxaziridin **10** nur unter grossen Verlusten (Angriff an den Schutzgruppen) zum Hydroxylamin **12** gespalten werden, während dasselbe ausgehend vom Oxaziridin **11** bei kurzer Reaktionsdauer mit befriedigenden Ausbeuten erhalten wurde. Dieses war allerdings von beträchtlichen Mengen des Nitrons **17** begleitet, das durch Ionenaustauscherchromatographie abgetrennt wurde. Die Umsetzung des Hydroxylamins **12** erfolgte mit S-Äthyl-isothioharnstoff, der sich in Vorversuchen dem Sauerstoffanalogen als überlegen erwiesen hatte.

Das ölige Hydroxyguanidinderivat **13** wurde ohne weitere Reinigung in kalter wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst. Nach ca. 2 Std. war die Abspaltung der Schutzgruppen beendet. Das rohe Produkt zeigte im Dünnschichtchromatogramm noch ca. 4 ninhydrinpositive Flecke, von denen der weitaus intensivste mit natürlichem δ -N-Hydroxyarginin (**1**) übereinstimmte. Die Reinigung erfolgte an einer Cellulosesäule mit Äthanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 als Eluierungsmittel. Das so erhaltene dünnschichtchromatographisch nahezu einheitliche Acetat des δ -N-Hydroxy-L-arginins [2] wurde an einer Ionenaustauschersäule in die freie Base übergeführt, die aus Wasser/Methanol kristallisiert werden konnte. Die synthetische Verbindung erwies sich nach Smp., Mischsmp., Rf-Wert und IR.-Spektrum [2] als identisch mit dem Naturstoff. Die optische Drehung ($[\alpha]_D = +7,12^\circ$ in Wasser, $+20,75^\circ$ in 6N HCl) entspricht den Angaben von *Maehr et al.* [3] für das natürliche Antibioticum, ist dagegen deutlich geringer als der von uns früher angegebene Wert [2]. Eine Nachprüfung ist mangels genügend natürlichen Materials zurzeit nicht möglich.

Die biologische Aktivität gegen zwei Stämme von *Bacillus subtilis* (Tü 203 und ATCC 6051) sowie gegen *Pseudomonas saccharophila* war innerhalb der Fehlergrenzen gleich wie beim Naturstoff. Die hemmende Wirkung konnte durch L-Arginin und L-Citrullin aufgehoben werden³⁾.



	R^1	R^2	R^3
4	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-$	H	H
5	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-$	H	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$
6	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-$	$-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$
7	H	$-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$



³⁾ Herrn Prof. Dr. W. Loeffler, Tübingen, danken wir für die Testresultate.

Im experimentellen Teil werden ferner die Hydrolysen des Oxaziridins **10** und Nitrons **17** zu δ -N-Hydroxy-L-ornithin (**18**) [9] beschrieben, die einen neuen synthetischen Zugang zu diesem wichtigen Baustein von Sideraminen [10] eröffnen.

Dem Stipendienfonds zur Unterstützung von Doktoranden auf dem Gebiet der Chemie und der Ciba-Geigy AG, Basel, danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Die Smp. wurden in offener Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Für die instrumentalanalytischen Bestimmungen wurden folgende Geräte verwendet:

IR.-Spektren: *Perkin-Elmer* Spektrophotometer, Modell 125. Lösungsmittel (sofern nichts anderes vermerkt): Chloroform. – UV.-Spektren: *Perkin-Elmer* Spektrophotometer, Modell 137 UV. Lösungsmittel: Feinsprit. – NMR.-Spektren: *Varian*-Spektrometer, Modelle A60, T60 oder HA100. Sofern nichts anderes vermerkt ist, wurden die Spektren in CDCl_3 aufgenommen. Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten (ppm gegenüber Tetramethylsilan als internem Standard), Kopplungskonstanten in Hertz angegeben: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quartett, *k* = komplex aufgespaltene Signalgruppe, *b* = breit, schlecht aufgelöst. – Massenspektren: *Hitachi-Perkin-Elmer* Spektrometer, Modell RMU 7. Optische Drehungen: Lichtelektrisches *Zeiss*-Polarimeter, Modell 141.

Für die Dünnschichtchromatographie verwendeten wir Kieselgel-Fertigplatten F_{254} bzw. Celluloseplatten der Firma *Merck AG*, für die präparative Chromatographie Kieselgel 0,063–0,2 mm bzw. Cellulosepulver mikrokristallin derselben Firma.

1-Hydroxy-1-propylguanidin (3). 1 g 1-Nitropropan in 5 ml Eisessig wurden mit 200 mg Palladium auf Bariumsulfat (10proz.) hydriert, bis ca. 2 mol Wasserstoff verbraucht waren. Nach dem Filtrieren und Eindampfen wurde der Rückstand in einer Lösung von 1,24 g O-Methylisoharnstoff-hydrochlorid in ca. 10 ml Wasser aufgenommen und mit 1 N Natronlauge auf pH 10,8 gebracht [4]. Nach 16 Std. Stehen bei 20° wurde mit verd. Salzsäure schwach angesäuert und einige Std. stehengelassen, um das überschüssige Reagens zu zersetzen. Die Guanidinverbindung **3** wurde darauf an einer Säule aus 20 ml Dowex-50 \times 2 (H^+ -Form) adsorbiert, mit 50 ml Wasser gewaschen und mit 1 N Ammoniak eluiert. Durch Umkristallisieren des Eindampfrückstandes aus Methanol wurden 430 mg farblose methanolhaltige Nadeln erhalten, die beim Trocknen (70°, Hochvakuum) zu einem amorphen hygroskopischen Pulver zerfielen. – IR. (KBr): ν (C=N) 1650 cm^{-1} . – NMR. (D_2O): 0,91 (*t*, *J* = 7, 3H); 1,72 (*m*, *J* = 7, 2H); 3,47 (*t*, *J* = 7, 2H). – Mikrotitration in Methylcellosolve/Wasser 8:2 $\text{pK}_{\text{MCS}}^{\text{H}}$ = 8,97, Äquiv.-Gew. Gef. 132.

$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$ (117,5) Ber. C 41,01 H 9,47 N 35,87% Gef. C 40,81 H 9,52 N 35,48%

2-Hexyl-3-phenyloxaziridin (14). 1 g (5,3 mmol) N-Benzylidenhexylamin [11] in 2 ml Methylchlorid liess man unter Eiskühlung langsam zu einer Lösung von 910 mg (5,3 mmol) *m*-Chlorperbenzoesäure in 10 ml Methylchlorid tropfen [12]. Nach 2 Std. bei 0° wurde von der ausgeschiedenen *m*-Chlorperbenzoesäure abfiltriert und das Filtrat je 2mal mit Natriumhydrogencarbonatlösung, verd. Schwefelsäure und Wasser gewaschen. Der nach dem Trocknen mit Magnesiumsulfat und Eindampfen erhaltene Rückstand wurde bei 0,02 Torr und 70–80° destilliert. Ausbeute 860 mg (79%) farblose Flüssigkeit.

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}$ akt. O Ber. 7,79% Gef. 7,59%⁴⁾

150 mg des Diastereomergemisches wurden an 15 g Kieselgel mit Methylchlorid als Eluierungsmittel chromatographiert. Die ersten Fraktionen enthielten 90 mg Produkt mit *Rf* 0,61 (Dünnschicht auf Kieselgel, Methylchlorid, Anfärben mit KJ-Stärke in der Wärme⁵⁾).

Zur Analyse wurde im Hochvakuum destilliert. – NMR.: 0,7–2,0 (*b*, 11H); 2,6–3,1 (*k*, 2H); 4,50 (*s*, 1H); 7,41 (*s*, 5H). Aufgrund des Signals bei 4,5 ppm [$\text{H}-\text{C}(3)$] liegt das *trans*-Isomere vor [7].

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}$ Ber. C 76,05 H 9,33 N 6,82% Mol.-Gew. 205
Gef. „ 75,86 „ 9,31 „ 6,56% M^+ 205

⁴⁾ Jodometrisch bestimmt nach *Horner & Jürgens* [13].

⁵⁾ Sprühreagens: 1 g KJ, 1 g Stärke und 20 mg Hg_2J_2 in 100 ml Wasser.

Spätere Fraktionen des Chromatogramms gaben 30 mg einer Verbindung mit Rf 0,33. Die farblose Flüssigkeit wurde im Hochvakuum destilliert. – NMR.: 0,7–1,8 (*b*, 11 H); 2,5 (*t*, *J* = 7,2 Hz); 5,30 (*s*, 1 H); 7,45 (*s*, 5 H). Aufgrund des Signals bei 5,30 ppm [H–C(3)] liegt die *cis*-Verbindung vor [7].



In gleicher Weise wurden das *p*-Methylderivat **15** und das *p*-Methoxyderivat **16** bereitet. Beide bildeten farblose Öle und sind Diastereomeregemische (Signale bei 4,5 und 5,3 ppm im NMR.-Spektrum). Beim Versuch, die Diastereomeren an Kieselgel rein zu gewinnen, trat weitgehende Zersetzung ein.

Hydrolysegeschwindigkeit von 2-Hexyl-3-aryloxaziridinen mit Dowex-50 [14]. Je 6 ml einer 0,081 M Lösung der Oxaziridine **14**, **15** und **16** in Methanol/Wasser 5:1 wurden mit 1 ml wässriger Aufschlammung von Dowex-50 $\times 2$ gerührt. Von Zeit zu Zeit entnahm man 0,3 ml der Lösung und bestimmte den Gehalt an Oxaziridin jodometrisch [13]. Ergebnisse s. Tabelle.

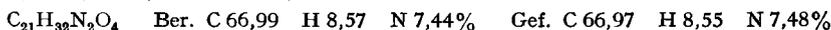
Tabelle. Verbrauch von 0,01 N Natriumthiosulfat-Lösung pro 0,3 ml Probe

Verbindung	14		15		16
Dauer (Std.)	<i>cis</i>	<i>trans</i>	Dauer		
0	4,9	5,2	0	4,9	5,0
1,5	4,4	–	0,083	4,9	1,05
15,5	1,8	4,1	2,33	3,3	0,10
25	1,1	3,5	19,0	0,44	–
41	0,5	2,5			
90	0,1	0,8			

α -N-*t*-Butoxycarbonyl- δ -N-benzyloxycarbonyl-L-ornithin-*t*-butylester (**6**). 5,25 g (20 mmol) δ -N-Benzyloxycarbonyl-L-ornithin [15] und 3,7 g 60proz. Perchlorsäure in 300 ml *t*-Butylacetat wurden 4 Tage bei Zimmertemp. stehengelassen [16]. Nach Abkühlen auf 0° wurde 4mal mit eiskalter 0,5 N Salzsäure ausgeschüttelt, die Auszüge sofort mit 1 N Natronlauge alkalisch gemacht und 3mal mit Äther ausgezogen. Die mit Natriumsulfat getrockneten Extrakte gaben beim Eindampfen 3,6 g (56%) δ -N-Benzyloxycarbonyl-L-ornithin-*t*-butylester (**5**) als farbloses viskoses Öl. Aus der wässrigen Phase fielen nach Neutralisieren (pH 6) 600 mg Ausgangsmaterial kristallin aus.

Zu 3,6 g (11,2 mmol) *t*-Butylester **5** und 1,76 g (12,3 mmol) *t*-Butoxycarbonylazid in 50 ml Dioxan und 10 ml Wasser liess man unter Rühren 1 N Natronlauge so langsam zutropfen, dass der pH-Wert nie über 10,0 stieg. Nach 5 Tagen war gemäss Dünnschichtchromatogramm alles Edukt umgesetzt. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde mit fester Zitronensäure auf pH 5 eingestellt und 3mal mit Äther ausgezogen. Nach dem Trocknen (Natriumsulfat) und Eindampfen wurden 4,7 g (99%) Produkt **6** als zähes farbloses Öl erhalten. $[\alpha]_{\text{D}} = -14,66^{\circ}$ (*c* = 1,03% in Methanol). – NMR.: 1,45 (*s*, 18H); 1,45–1,8 (*b*, 4 H $_{\beta,\gamma}$); 3,18 (*m*, *J* = 6, 2 H $_{\delta}$); 4,15 (*b*, 1 H $_{\alpha}$); 5,1 (*s*, 2H); 5,1–5,35 (*b*, 2NH); 7,30 (*s*, 5 H $_{\text{Ar}}$). – IR.: $\nu(\text{CO})$ 1720 cm $^{-1}$.

α -N-*t*-Butoxycarbonyl- δ -N-benzyliden-L-ornithin-*t*-butylester (**8**). 1 g (2,37 mmol) des Ornithinderivates **6** in 10 ml Methanol wurde mit 250 mg 10proz. Palladiumkohle bei Atmosphärendruck 14 Std. lang hydriert. Nach dem Filtrieren und Eindampfen wurde das rohe Amin **7** mit 250 mg (2,36 mmol) Benzaldehyd in 7 ml Benzol aufgenommen und mit ca. 1 g wasserfreiem Natriumcarbonat 16 Std. stehengelassen. Abfiltrieren, Eindampfen und 2maliges Umkristallisieren aus Petroläther gab 660 mg (74%) farblose Kristalle der Schiff'schen Base **8**, Smp. 102–103°. $[\alpha]_{\text{D}} = -17,8^{\circ}$ (*c* = 1,90% in Methanol). – IR.: $\nu(\text{NH})$ 3450, $\nu(\text{CO})$ 1710, $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1640 cm $^{-1}$. – NMR.: 1,47 (*s*, 18H); 1,6–1,9 (*b*, 4 H $_{\beta,\gamma}$); 3,5–3,8 (*b*, 2 H $_{\delta}$); 4,2 (*b*, 1 H $_{\alpha}$); 5,3 (*b*, 1 NH); 7,3–7,6 (*k*, 3H); 7,6–7,9 (*k*, 2H); 8,3 (*bs*, 1 H–C=N).



α -N-*t*-Butoxycarbonyl- δ -(3-phenyl-2-oxaziridyl)-L-norvalin-*t*-butylester (**10**). 300 mg Benzylidenderivat **8** wurden, wie für die Herstellung der Verbindung **14** beschrieben, mit *m*-Chlorperbenzoesäure oxidiert und das Produkt an 35 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform/Äthylacetat

5:1 wurden zunächst 200 mg des Gemisches der beiden *trans*-Oxaziridine (Rf 0,56 mit Chloroform/Äthylacetat 5:1 auf Kieselgel) eluiert. Es erstarrte nach dem Eindampfen teilweise und gab aus Petroläther 66 mg filzige Nadeln, Smp. nach einer weiteren Umkristallisation 116,5–117,5°. $[\alpha]_D = -82,9^\circ$ ($c = 0,895\%$ in Methanol). – IR.: $\nu(\text{NH})$ 3450, $\nu(\text{CO})$ 1700 cm^{-1} . – MS.: m/e 392 (0,1%, M^+), 376 (1%, $M - 16$), 336 (2%), 320 (2,8%), 291 (2,1%), 280 (12,5%), 263 (17,5%), 174 (48%), 105 (100%). – NMR.: 1,48 (s, 18H); 1,65–2,0 (b, 4H $_{\beta,\gamma}$); 2,6–3,2 (b, 2H $_{\delta}$); 4,22 (b, 1H $_{\alpha}$); 4,51 (s, 1H, H–C(3)); 5,10 (b, 1NH); 7,40 (s, 5H).

$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$ Ber. C 64,26 H 8,22 N 7,14 akt. O 4,08%
Gef. „ 64,13 „ 8,14 „ 7,02 „ 4,01%

Die öligen Mutterlaugen enthielten vorwiegend das zweite *trans*-Isomere, $[\alpha]_D = +44,2^\circ$ ($c = 0,895\%$ in Methanol). Die IR-, NMR- und Massenspektren stimmten mit denen des kristallinen Isomeren weitgehend überein.

Spätere Eluate mit dem gleichen Lösungsmittel enthielten das Gemisch der beiden *cis*-Isomeren (40 mg, Rf 0,45), das nicht kristallisiert werden konnte. – NMR.: 1,44 (s, 18H); 1,6–1,85 (b, 4H $_{\beta,\gamma}$); 2,45 (t, $J = 6$, 2H $_{\delta}$); 4,18 (b, 1H $_{\alpha}$); 5,0 (b, 1NH); 5,3 (s, 1H, H–C(3) [7]), 7,5 (s, 5H).

$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$ akt. O Ber. 4,08% Gef. 3,92% [13]

α -*N*-*t*-Butoxycarbonyl- δ -*N*-(*p*-methoxybenzyliden)-*L*-ornithin-*t*-butylester (9). Das aus 1,2 g (2,84 mmol) Benzyloxycarbonylverbindung 6 bereitete Hydrogenolyseprodukt 7 und 385 mg (2,84 mmol) Anisaldehyd wurden wie oben zu 925 mg (80,5%) Schiff'scher Base 9 umgesetzt; aus Hexan farblose Kristalle, Smp. 96–97,5°. – IR.: $\nu(\text{NH})$ 3430, $\nu(\text{CO})$ 1700, $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1650 cm^{-1} . – NMR.: u. a. 3,85 (s, 3H); 6,9 und 7,7 (je 2H, $A A' B B'$ mit $J_{AB} = 9$); 8,22 (bs, 1H–C=N); übrige Signale analog wie bei Verbindung 8.

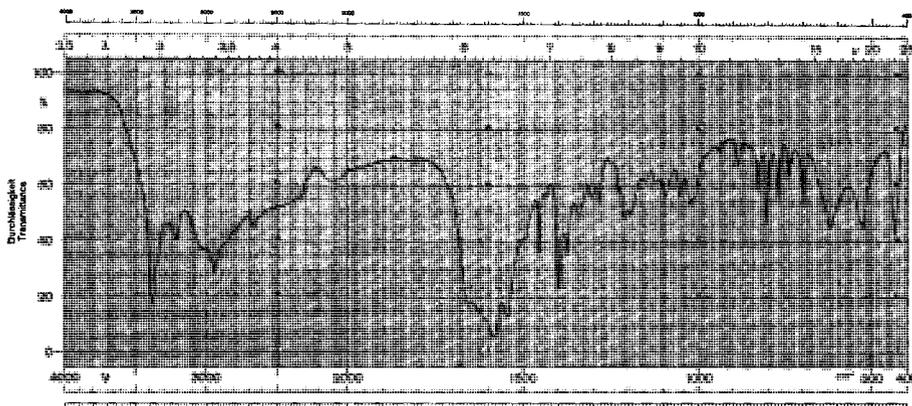
$\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5$ Ber. C 65,00 H 8,43 N 6,89% Gef. C 64,95 H 8,39 N 6,83%

δ -*N*-Hydroxy-*L*-arginin (1). 5 g (12,3 mmol) Schiff'sche Base 9 wurden wie oben zum Oxaziridin 11 oxydiert. Das Gemisch der Diastereomeren löste man in 20 ml Methanol und gab 15 ml mit Wasser aufgeschlämmtes Dowex-50 $\times 2$ zu. Nach 3stdg. Rühren bei Zimmertemp. füllte man den Ionenaustauscher in eine Säule und wusch mit Methanol so lange, bis im Eluat dünnschichtchromatographisch kein Anisaldehyd mehr nachweisbar war (ca. 40 ml). In den Methanol-Eluaten war ferner reichlich Nitron 17 nachweisbar (s. unten). Darauf wurde mit 1N Ammoniak in Methanol eluiert. Die ersten, triphenyltetrazolium-negativen Fraktionen enthielten noch 0,5 g Nitron (17), die anschließenden Fraktionen, die mit Triphenyltetrazoliumchlorid eine rote Färbung gaben, enthielten gemäß Dünnschichtchromatogramm und NMR.-Spektrum nahezu einheitliches Hydroxylamin 12. Dieses wurde zusammen mit 1,1 g (6 mmol) S-Äthyl-isothioharnstoff-hydrochlorid [17] in 10 ml Wasser/Methanol 1:1 gelöst und mit 1N Natronlauge auf pH 10,8 eingestellt. Nach 3 Tagen neutralisierte man mit 1N Salzsäure und dampfte zur Trockne ein. Der Rückstand wurde mit Eisessig ausgezogen, die Lösung von Natriumchlorid abfiltriert und erneut im Vakuum eingedampft. Das ölige Produkt (12) wurde mit 20 ml Trifluoressigsäure 3 Std. bei 0° stehengelassen und der Rückstand nach dem Eindampfen an 120 g Cellulosepulver mit Äthanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 chromatographiert. Die dünnschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen (Rf 0,38, Äthanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 auf Celluloseplatte, Anfärbung mit Ninhydrin) gaben beim Eindampfen das amorphe Acetat des δ -*N*-Hydroxyarginins (1) [2], das an einer Säule aus 30 ml Dowex-50 $\times 2$ (NH $_4$ -Form, Elution mit 0,5N Ammoniak) in die freie Base übergeführt wurde. Umkristallisation aus Wasser/Methanol gab 415 mg (18% bez. auf 9) farblose Kristalle von Smp. 217° (Zers.); $[\alpha]_D = +7,12^\circ$ ($c = 0,786\%$ in Wasser), +20,75° ($c = 0,670\%$ in 6N HCl). Das Produkt war nach Rf-Wert, Smp., IR.-Spektrum (Fig.) und biologischer Wirkung identisch mit dem Naturstoff [2].

2-Nitroindandionsalz. 23 mg der kristallinen Base in 1 ml Wasser wurde mit einer wässrigen Lösung von 2-Nitroindandion bis zu pH 5 neutralisiert und auf ca. 0,5 ml eingengt. Das ausgeschiedene Salz wurde 2mal aus heissem Wasser umkristallisiert. Nach dem Trocknen bei 60° im Hochvakuum lag ein Monohydrat in Form blassgelber Kristalle vom Smp. 187–188° (Zers.) vor.

$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Ber. C 45,11 H 5,30 N 17,54% Gef. C 45,21 H 5,18 N 17,57%

α -*N*-*t*-Butoxycarbonyl- δ -(*p*-anisylnitronyl-*N*)-*L*-norvalin-*t*-butylester (17). Die ersten, triphenyltetrazolium-negativen Ammoniak-Eluate der Spaltung des Oxaziridins 11 (s. oben) gaben beim Umkristallisieren aus Aceton/Hexan 450 mg Nitron als farblose Kristalle, Smp. 108,5–110°.

Fig. IR-Spektrum von δ -N-Hydroxy-L-arginin in KBr

Weitere 1,25 g Nitron wurden aus dem Methanol-Eluat nach chromatographischer Abtrennung des Anisaldehyds gewonnen, Gesamtausbeute 33% bez. auf **9**. $[\alpha]_D = -23,0^\circ$ ($c = 0,814\%$ in Methanol). – IR.: $\nu(\text{NH})$ 3420, $\nu(\text{C=O})$ 1700, $\nu(\text{C=N})$ 1605 cm^{-1} . – UV.: λ_{max} ($\log \epsilon$): 296 nm (Infl. 4,29), 309 (4,36), 320 (Infl. 4,27); vgl. [18]. – NMR.: 1,47 (s, 18H); 1,65–2,3 (h, 4H $_{\beta,\gamma}$); 3,86 (s, 3H); 3,97 (t, J = 6, 2H $_{\delta}$); 4,1–4,36 (b, 1H $_{\alpha}$); 5,16 (b, 1NH); 6,92 und 8,20 (je 2H, AA'BB'); 7,32 (s, 1H–C=N).

$\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6$ Ber. C 62,54 H 8,11 N 6,63% Gef. C 62,71 H 7,93 N 6,50%

δ -N-Hydroxy-L-ornithin (**18**). a) Aus dem Nitron **17**. 100 mg Nitron in 2 ml 6N Salzsäure und 0,5 ml Methanol wurden 16 Std. bei Zimmertemp. stehengelassen. Die Lösung wurde 3mal mit Äther ausgeschüttelt, um den Anisaldehyd zu entfernen. Der Eindampfrückstand der wässrigen Phase gab bei der Chromatographie an 10 ml Dowex-50 \times 2 (H-Form) mit 1N Salzsäure eine triphenyltetrazolium-positive Fraktion von 29 mg. Diese wurde in wenig heissem Wasser mit 25 mg 2-Nitroindandion versetzt und mit Natronlauge auf pH 4–5 eingestellt. Bei 0° schieden sich 30 mg gelbe Blättchen des 2-Nitroindandionsalzes ab. Smp. nach Umkristallisation aus heissem Wasser 231° (Zers.) [9].

$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$ Ber. C 49,55 H 5,05 N 12,39% Gef. C 49,45 H 5,03 N 12,25%

b) Aus dem Oxaziridin **10**. 26 mg Oxaziridin **10** wurden mit 50 mg Schwefelsäure in 2 ml Methanol/Wasser 1:1 bei Zimmertemp. während 16 Std. hydrolysiert. Das durch Ioneaustauscher-Chromatographie (s. oben) gereinigte δ -N-Hydroxy-L-ornithin gab ein 2-Nitroindandionsalz, das nach Smp. und IR.-Spektrum mit dem oben beschriebenen übereinstimmte.

c) Aus Fusigen. 100 mg Desferifusigen, durch Behandeln von Rohfusigen mit 8-Hydroxychinolin in Methanol/Wasser hergestellt [5], [10], gab nach der Hydrolyse mit 6N Salzsäure (2 Std., 100°) und Chromatographie an Dowex-50 dünnstichtchromatographisch einheitliches δ -N-Hydroxy-L-ornithin, das wie oben in das 2-Nitroindandionsalz mit Smp. 227–230° (Zers.) übergeführt wurde. Das Präparat wurde durch den Misch-Smp. und das IR.-Spektrum mit dem synthetischen Produkt identifiziert.

$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$ Ber. C 49,55 H 5,05 N 12,39% Gef. C 49,54 H 5,20 N 12,33%

Herrn W. Manser danken wir für die Mikroanalysen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. Zeeck, H. Zähler & M. Maydin, Chem. Ber., im Druck.
- [2] B. Fischer, W. Keller-Schierlein, H. Kneifel, W. A. König, W. Loeffler, A. Müller, R. Muntwiler & H. Zähler, Arch. Mikrobiol. 91, 203 (1973).
- [3] H. Maehr, J. F. Blount, D. L. Pruess, L. Yarmchuk & M. Kellett, J. Antibiotics (Tokyo) 26, 284 (1973).

- [4] *F. Turba & K. Schuster*, *Z. physiol. Chem.* **283**, 27 (1948); *A. C. Kurtz*, *J. biol. Chemistry* **180**, 1253 (1949).
- [5] *H. Diekmann*, *Arch. Mikrobiol.* **58**, 1 (1967); *H. Diekmann & H. Zähner*, *Europ. J. Biochemistry* **3**, 213 (1967).
- [6] *H. Bichel, B. Fechtig, G. E. Hall, W. Keller-Schierlein, V. Prelog & E. Vischer*, *Helv.* **43**, 901 (1960).
- [7] *D. M. Jerina, D. R. Boyd, L. Paolillo & E. D. Becker*, *Tetrahedron Letters* **1970**, 1483.
- [8] *F. Montanari, I. Moretti & G. Torre*, *Chem. Commun.* **1968**, 1694; *D. Felix & A. Eschenmoser*, *Angew. Chem.* **80**, 197 (1968); *K. Müller & A. Eschenmoser*, *Helv.* **52**, 1823 (1969); *A. Mannschreck & W. Seitz*, *Angew. Chem.* **81**, 224 (1969); *A. Mannschreck, J. Linss & W. Seitz*, *Liebigs Ann. Chem.* **727**, 224 (1969); *L. Brehm, K. G. Jensen & B. Jerslev*, *Acta chem. scand.* **20**, 915 (1966); *D. R. Boyd*, *Tetrahedron Letters* **1968**, 4561.
- [9] *S. Rogers & J. B. Neilands*, *Biochemistry* **2**, 6 (1963).
- [10] *W. Keller-Schierlein, V. Prelog & H. Zähner*, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* (Ed. L. Zechmeister) **22**, 279 (1964).
- [11] *R. Wilkendorf & M. Trénel*, *Chem. Ber.* **56**, 619 (1923); *S. K. Freeman*, *Analyt. Chemistry* **25**, 1750 (1953).
- [12] *R. G. Pews*, *J. org. Chemistry* **32**, 1628 (1967); *W. Emmons*, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 5739 (1957).
- [13] *L. Horner & E. Jürgens*, *Chem. Ber.* **90**, 2184 (1957).
- [14] *M. Ohno, H. Inuma, N. Yagisawa, S. Shibahara, Y. Suhara, S. Kondo, K. Maeda & H. Umezawa*, *J. chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 147.
- [15] *R. Ledger & F. H. C. Stewart*, *Australian J. Chemistry* **18**, 933 (1965).
- [16] *E. Taschner, A. Chimiak, B. Bator & T. Sokolowska*, *Liebigs Ann. Chem.* **646**, 134 (1961).
- [17] *E. Brand & F. C. Brand*, *Organic Synthesis* **22**, 59 (1942).
- [18] *Y. Ogata & Y. Sawaki*, *J. Amer. chem. Soc.* **95**, 4687 (1973).

74. The Crystal Structure of the NaNCS Complex of Nonactin

by **Max Dobler** and **Richard Paul Phizackerley**¹⁾

Laboratorium für organische Chemie der Eidg. Technischen Hochschule, CH-8006 Zürich

(12. II. 74)

Summary. The NaNCS complex of the macrotetrolide antibiotic nonactin, which acts as an ionophore with biological and artificial membranes crystallizes in the space group $C2/c$, $a = 15.55$, $b = 19.59$, $c = 15.31$ Å, $\beta = 90^\circ$. The X-ray crystal structure investigation shows that Na^+ is coordinated by four carbonyl oxygen atoms ($\text{Na}^+ \dots \text{O}$, 2.42 Å) and four ether oxygen atoms ($\text{Na}^+ \dots \text{O}$, 2.77 Å). The cubic coordination by eight equidistant oxygen atoms observed in the K^+ complex ($\text{K}^+ \dots \text{O}$, 2.81 Å) is thus deformed. This, however, requires only very small changes in the ligand conformation.

The macrotetrolide antibiotic nonactin (**1**) [1] and its homologues exhibit a marked cation specificity [2] in their biological action and have been shown to act as ionophores with both biological and artificial membranes. Complexing constants of alkali metals with nonactin in methanol have been measured [3]. Crystal structure determinations of the KNCS complex of nonactin [4] and of free nonactin [5] have previously been reported. In the K^+ complex [4] the four ether oxygen atoms and the four carbonyl oxygen atoms of the ligand form an approximately cubic 8-coor-

¹⁾ Present address: The Johns Hopkins University, Department of Biophysics, Baltimore, USA.