

Abb. 1. Ausschnitte der EI-Massenspektren der Hydrolysate des Streptoviridinkomplexes sowie der Streptoviridinkomponenten A1 und A2.

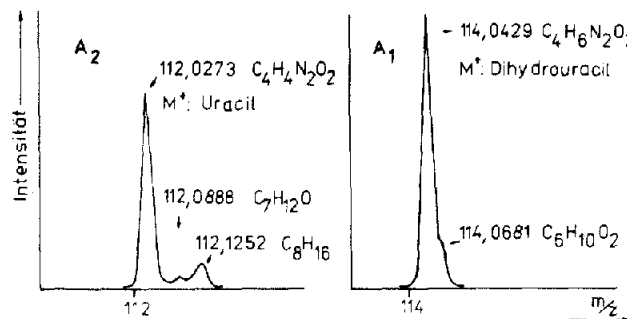


Abb. 2. Ausschnitte der EI-Hochauflösungsmassenspektren der Hydrolysate der Streptoviridinkomponenten A1 und A2, Auflösung: $m/\Delta m = 5000$ (20% Tal).

Dihydrouracil wurde bisher in keinem der aufgefundenen Tunicamycine nachgewiesen.

GC-MS-Analyse und Konstitution der Fettsäuren

Sämtliche Streptoviridinkomponenten enthalten wie die Tunicamycinantibiotika einen langkettigen aliphatischen Fettsäurerest im Molekül. Nach säurehydrolytischem Abbau liegen die entsprechenden Fettsäuren frei im Hydrolysat vor.

Über die GC-MS-Analyse und die Konstitution dieser Fettsäuren soll im folgenden berichtet werden. Dazu wurden die Fettsäuren in den Hydrolysaten des Gesamtkomplexes wie auch der reinen Einzelkomponenten mit Ether extrahiert und zur GC-bzw. GC-MS-Analyse mit methanolscher Salzsäure oder Diazomethan in die Methylester überführt. Beide Veresterungsmethoden sind gleich gut geeignet und zeigten bei den folgenden Untersuchungen keine Unterschiede.

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Vergleiche, die massenspektrometrisch ermittelten Molmassen und die daraus berechneten elementaren Zusammensetzungen sowie die massenspektrometrischen Fragmentierungsreaktionen der Fettsäuremethylester (FME) der einzelnen Streptoviridinkomponenten sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Aus dem Vergleich der Ergebnisse ergibt sich eindeutig, dass die FME der Streptoviridinpaare A1 und A2, B1 und B2, C1 und C2 sowie D1 und D2 jeweils identisch sind.

Die Abb 3 zeigt das Gaschromatogramm der FME des Gesamtkomplexhydrolysates. Die Zuordnung der entsprechenden Peaks war durch die Untersuchung der Einzelkomponenten unter den gleichen Bedingungen möglich. Das Intensitätsverhältnis der FME-Peaks in Abb. 3 zeigt gleichzeitig eine gute Übereinstimmung mit

den Ergebnissen der Gelchromatographie sowie der hplc-Trennung des Streptoviridins und gibt die quantitative Zusammensetzung des Antibiotikakomplexes wieder.—Die im FME-Spektrum neben den vier Hauptpeaks FME-A 1/2, -B 1/2, -C 1/2, -D 1/2 auftretenden Minorkomponenten sind zum Teil Artefakte und wurden nicht eingehender analysiert.

Aus den elementaren Zusammensetzungen der FME der Streptoviridine und der daraus berechneten Zahl von zwei Doppelbindungsäquivalenten sowie dem weiter unten beschriebenen gaschromatographischen Verhalten nach katalytischer Hydrierung folgt, dass sämtliche Ester einfach ungesättigt sind. Die Lage der Doppelbindungen ergibt sich eindeutig aus den massenspektrometrischen Fragmentierungen. Die Massenspektren sämtlicher Ester (s. Tabelle 1) zeigen das für eine Doppelbindung in Position C-2 charakteristische intensive Fragmention bei m/z 113, entsprechend $\text{CH}_3\text{OCO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2^+$. Zur weiteren Konstitutionsaufklärung der ungesättigten Fettsäuren wurde der Streptoviridinkomplex katalytisch mit Platinoxid (Adams-Katalysator) hydriert. Nach der Säurehydrolyse des Hydrierungsproduktes zeigte sich, dass unter den angewandten Bedingungen sowohl die ungesättigten Fettsäurereste als auch das Uracil in den entsprechenden Streptoviridinkomponenten hydriert worden waren.—Das gebildete gesättigte Fettsäuregemisch im Hydrolysat wurde nach Extraktion mit Ether in die Methylester (g-FME) überführt und durch direkten gaschromatographischen Vergleich mit authentischen Estern sowie durch die Bestimmung der äquivalenten Kettenlängen¹³ identifiziert.

In Abb 4 sind die auf Palmitinsäuremethylester bezogenen relativen Retentionszeiten der authentischen Ester (n-C 12:0, i-C 14:0, n-C 14:0, a-C 15:0, i-C 16:0, n-C

Tabelle 1. Fettsäuremethylester (FME) aus den Hydrolysaten der reinen Streptoviridinkomponenten, gaschromatographisches Verhalten und massenspektrometrische Fragmentierung (Intensität)

FME aus Hydrolysaten der Streptoviridinkomp.	A 1	A 2	B 1	B 2	C 1	C 2	D 1	D 2
relative Retentionszeit n-C16:0 = 1	0,175	0,171	0,265	0,269	0,414	0,417	0,688	0,685
element. Zusammensetzung	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
m/z : M ⁺	212,180(2)	212,179(2)	226,193(1)	226,190(1,5)	240,207(1)	240,208(1,5)	254,223(3)	254,226(3)
M - 15	197(0,3)	197(0,3)	—	—	225(0,2)	225(0,3)	—	—
M - 29	—	—	197(6)	197(8)	—	—	225(8)	225(9)
M - 31	181(24)	181(21)	195(18)	195(22)	209(6)	209(11)	223(15)	223(21)
M - 32	180(15)	180(13)	194(7)	194(8)	208(7)	208(9)	222(10)	222(11)
M - 43	169(5)	169(4)	183(1)	183(1)	197(3)	197(2)	211(3)	211(4)
M - 57	—	—	169(2)	169(2)	—	—	197(3)	197(2)
Fragmentation	113(37)	113(40)	113(40)	113(44)	113(50)	113(48)	113(51)	113(55)
"	87(100)	87(100)	87(100)	87(100)	87(100)	87(100)	87(100)	87(100)
"	74(30)	74(35)	74(28)	74(35)	74(40)	74(48)	74(51)	74(45)

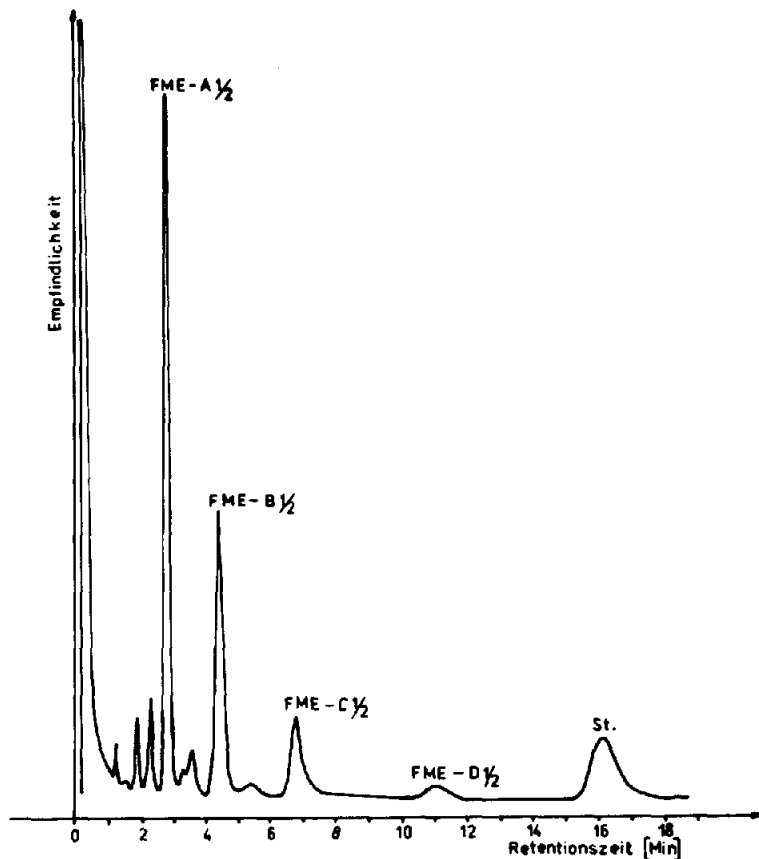


Abb. 3. Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus dem Streptoviridinkomplex, St: Palmitinsäure, als interner Standard zugesetzt.

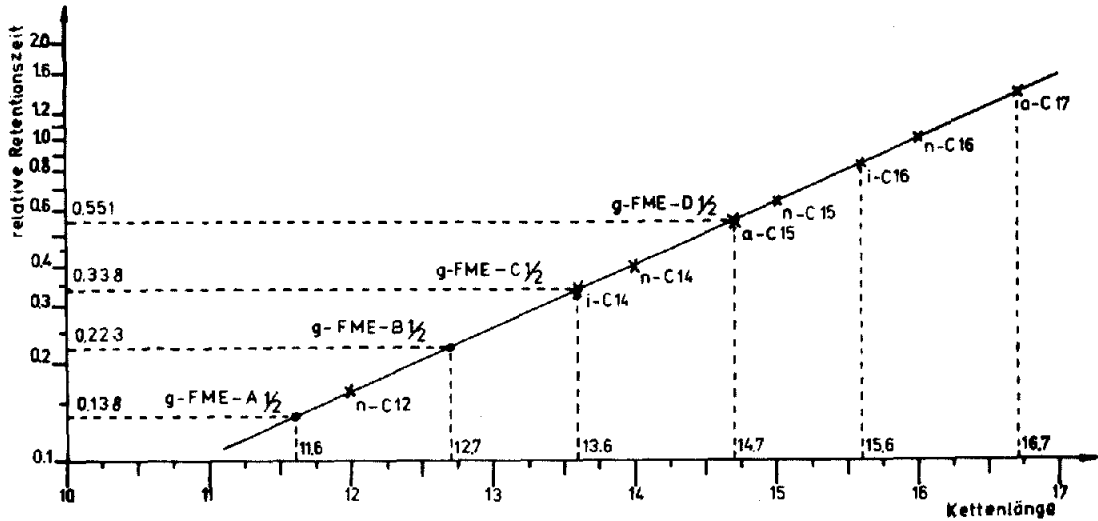


Abb. 4. Äquivalente Kettenlängen der gesättigten Fettsäuremethylester.

16:0, a-C 17:0) und der vier gesättigten Methylester (g-FME-A 1/2, g-FME-B 1/2, g-FME-C 1/2, g-FME-D 1/2) aus dem hydrierten Streptovirudinkomplex logarithmisch über die Kettenlängen aufgetragen.

Nach den direkten gaschromatographischen Vergleichen und den ermittelten äquivalenten Kettenlängen handelt es sich bei den gesättigten Methylestern g-FME-A 1/2 und g-FME-C 1/2 um die Methylester der Isododecan- bzw. der Isotetradecansäure und bei den Estern g-FME-B 1/2 und g-FME-D 1/2 mit den relativ längeren Retentionszeiten um die Methylester der Anteiotridecan- bzw. Anteio-pentadecansäure.

Die hier gaschromatographisch auf einer "OV-101-Säule" mit einer Trennleistung von ca. 1800 theoretischen Böden für die gesättigten methylverzweigten Fettsäuremethylester gefundenen charakteristischen Werte der äquivalenten Kettenlängen (Isoester—0.6 und Anteioester—0.7, unabhängig von der Kettenlänge) stimmen sehr gut mit den entsprechenden Werten (Isoester—0.62 und Anteioester—0.72) überein, die Apon und Nicolaides¹⁴ bei der gaschromatographischen Trennung zahlreicher authentischer Iso- und Anteiofettsäuremethylester auf einer "Pentasil-Kapillarsäule" erhielten.

Die Konstitution der FME aus den Hydrolysaten der

einzelnen Streptovirudinkomponenten wurden zusätzlich durch die Massenspektren bewiesen (s. Tabelle 1). Auf Grund der bevorzugten Fragmentierung von C-C-Bindungen an Verzweigungsstellen, zeigen die Isoester gegenüber den isomeren Anteioestern intensivere (M-15)⁺- bzw. (M-43)⁺-Ionen während bei den Anteioestern die Bildung der (M-29)⁺- bzw. der (M-57)⁺-Fragmentationen überwiegt.¹⁵

Zusammenfassend lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchungen für die Fettsäuren aus den einzelnen Streptovirudinkomponenten die folgenden Konstitutionsformeln ableiten: (s. Tabelle 2)

Damit enthalten die Streptoviridine im Gegensatz zu den Tunicamycinen nur ungesättigte Iso- und Anteiofettsäurereste im Molekül.

Dass die hier identifizierten Anteiosäuren eine ungerade C-Zahl aufweisen, steht im Einklang mit der Biosynthese dieser Säuren, die vom 2-Methylbutyrat ausgehend nur zu Säuren mit ungerader C-Zahl führen kann.¹⁶

Über die Gesamtstrukturen der Streptovirudinkomponenten wird in einer nachfolgenden Publikation berichtet.¹⁰

Tabelle 2. Konstitution der Fettsäuren aus den Streptovirudinkomponenten

Streptovirudin-komponente	Fettsäure	
A 1	$\text{CH}_3\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}(\text{CH}_2)_6\text{-CH}=\text{CH}-\text{COOH}$	10-Methyl-2-undecensäure
A 2	$\text{CH}_3\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}(\text{CH}_2)_6\text{-CH}=\text{CH}-\text{COOH}$	
B 1	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}(\text{CH}_2)_6\text{-CH}=\text{CH}-\text{COOH}$	10-Methyl-2-dodecensäure
B 2	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}(\text{CH}_2)_6\text{-CH}=\text{CH}-\text{COOH}$	
C 1	$\text{CH}_3\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}(\text{CH}_2)_8\text{-CH}=\text{CH}-\text{COOH}$	12-Methyl-2-tridecensäure
C 2	$\text{CH}_3\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}(\text{CH}_2)_8\text{-CH}=\text{CH}-\text{COOH}$	
D 1	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}(\text{CH}_2)_8\text{-CH}=\text{CH}-\text{COOH}$	12-Methyl-2-tetradecensäure
D 2	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}(\text{CH}_2)_8\text{-CH}=\text{CH}-\text{COOH}$	

EXPERIMENTELLER TEIL

Gaschromatographische Trennung. Benutzt wurde ein Gaschromatograph Modell GCHF-18.3 der Firma VEB Chromatron, Berlin, mit Flammenionisationsdetektor. Zur Trennung der Fettsäuremethylester wurde eine Glassäule (2 m × 3 mm) gefüllt mit 2% OV 101 auf Gas-Chrom Q (80–100 mesh) bei Temperaturen (Thermostat 160°, Injektor 220°, Detektor 220°) und einem Trägergasfluss (55 ml/Min N₂) mit einer Trennleistung von ca. 1800 theoretischen Böden verwendet.—Als Vergleichssubstanzen standen die Methylester der gesättigten Fettsäuren n-C 12, i-C 14, n-C 14, a-C 15, i-C 16, n-C 16, a-C 17 von der Firma Applied Science Labs. (State College, PA, USA) zur Verfügung.—Gaschromatographie-Massenspektrometrie: Die Massenspektren wurden mit einem doppelfokussierenden Gerät Modell JMS-D 100 der Firma JEOL, Tokio, (Beschleunigungsspannung 3 kV, Direkt- bzw. GC-Einlass, IQ-Temperatur 200°, Elektronenenergie 75 eV) gekoppelt mit Gaschromatograph Modell JGC-20 KP (experimentelle Bedingungen wie oben bei der GC-Trennung beschrieben, Trägergasfluss 25 ml/Min. He) und Data-System JMA-0231 aufgenommen. Massenfeinbestimmungen wurden nach der Methode des Massenvergleichs mit PFK als Referenzverbindung durchgeführt.

Säurehydrolytischer Abbau und massenspektrometrischer Nachweis von Uracil und Dihydrouracil in den Streptoviridinen. Ca. 0.5 mg des Streptoviridinkomplexes bzw. einer reinen Streptoviridinkomponente wurden mit 20 µl 6 N HCl in einer zugeschmolzenen Glaskapillare (2 cm × 1.5 mm) 20 h auf 105° erhitzt. Nach Abkühlung und Öffnung der Kapillare wurde das Reaktionsgemisch *i. Vak.* zur Trockene gebracht und im gleichen Gefäß über den Direkteinlass (Probentemperatur 140°, Aufheizgeschwindigkeit 25°/Min.) massenspektrometrisch analysiert.

Säurehydrolytischer Abbau der Streptoviridine und Isolierung der gebildeten Fettsäuren. 10 mg des Streptoviridinkomplexes bzw. einer reinen Streptoviridinkomponente wurden mit 1 ml 6 N HCl 3.5 h auf 100° erhitzt. Nach Abkühlung wurde das Hydrolysat mehrfach mit Ether extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und nach Filtration *i. Vak.* eingedampft. Der verbleibende ölige Rückstand der Fettsäuren kam zur Gewinnung der Methylester direkt zum Einsatz.

Veresterung der Fettsäuren

(a) **Mit methanolischer Salzsäure.** Die durch Hydrolyse gewonnenen Fettsäuren wurden mit 10 ml 0.7 N methanol. HCl versetzt und 20 h bei Zimmertemp. belassen; danach wurde das Lösungsmittel *i. Vak.* abdestilliert.

(b) **Mit Diazomethan.** Die Fettsäuren wurden in 10 ml CH₃OH gelöst und bis zur schwachen Gelbfärbung mit etherischer

Diazomethanlösung versetzt. Nach 30 Min. Stehen bei Zimmertemp. wurde das Lösungsmittel *i. Vak.* abdestilliert. Die öligen Rückstände der Fettsäuremethylester wurden zur GC- bzw. GC-MS-Analyse in wenig CHCl₃ aufgenommen.

Katalytische Hydrierung von Streptovirudin. 100 mg Streptoviridinkomplex wurden in 10 ml Eisessig gelöst und bei Zimmertemp. mit 100 mg Platinoxid (Adams-Katalysator) unter Rühren hydriert. Anschließend wurde die Lösung vom Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel *i. Vak.* abdestilliert. Der Rückstand wurde mit Aceton aufgeschlämmt, abfiltriert und mehrfach mit Aceton gewaschen. Die weiße kristalline Substanz wurde direkt zur analytischen Untersuchung verwendet.

LITERATUR

- ¹K. Eckardt, H. Thrum, G. Bradler, E. Tonew und M. Tonew, *J. Antibiotics* **28**, 274 (1975).
- ²A. D. Elbein, J. Gafford und M. S. Kang, *Arch. Biochem. Biophys.* **196**, 311 (1979).
- ³A. D. Elbein, J. Occolowitz, R. Hamill und K. Eckardt, *Biochemistry* **20**, 4210 (1981).
- ⁴A. Takatsuki, K. Arima und G. Tamura, *J. Antibiotics* **24**, 215 (1971).
- ⁵A. Takatsuki, K. Kawamura, M. Okina, Y. Kodama, T. Ito und G. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* **41**, 2307 (1977).
- ⁶A. Takatsuki, K. Kawamura, Y. Kodama, T. Ito und G. Tamura, *Ibid.* **43**, 761 (1979).
- ⁷T. Ito, Y. Kodama, K. Kawamura, K. Suzuki, A. Takatsuki und G. Tamura, *Ibid.* **41**, 2303 (1977).
- ⁸T. Ito, A. Takatsuki, K. Kawamura, K. Sato und G. Tamura, *Ibid.* **44**, 695 (1980).
- ⁹K. Eckardt, H. Wetzstein, H. Thrum und W. Ihn, *J. Antibiotics* **33**, 908 (1980).
- ¹⁰D. Tresselt, K. Eckardt, W. Ihn und D. Krebs, *Tetrahedron*, in Vorbereitung.
- ¹¹K. Eckardt, W. Ihn, D. Tresselt und D. Krebs, Proc. 1st Int. Conf. Chem. Biotechn. of Biol. Act. Nat. Products. Varna (1981).
- ¹²H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, Vol. II, S. 170. Holden-Day, San Francisco (1964).
- ¹³T. K. Miwa, K. L. Mikolajczak, F. R. Earle und I. A. Wolff, *Anal. Chem.* **32**, 1739 (1960).
- ¹⁴J. M. B. Apon und N. Nicolaides, *J. Chromatogr. Sci.* **13**, 467 (1975).
- ¹⁵R. Ryhage und E. Stenhagen, *Ark. Kemi* **15**, 291 (1960).
- ¹⁶T. Kaneda, *J. Biol. Chem.* **238**, 1222 (1963).