

the authors were able to propose the following four possible structures:

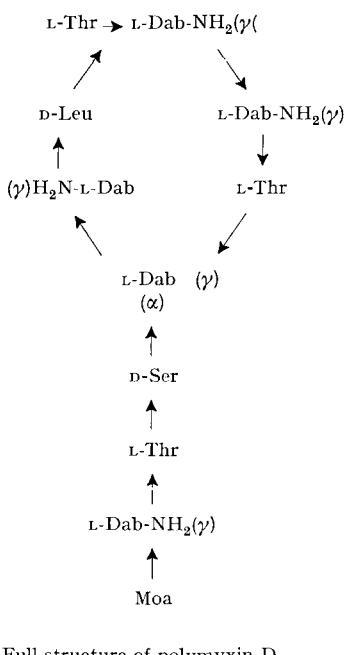
- I 7 α -type: Moa \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr \rightarrow Ser \rightarrow cyclo-[(α)Dab \rightarrow (α)-Dab \rightarrow Leu \rightarrow Thr \rightarrow (α)Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr(γ) \rightarrow]

II 8 γ -type: Moa \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr \rightarrow cyclo-[(γ)Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Leu \rightarrow Thr \rightarrow (α)Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr \rightarrow Ser(α) \rightarrow]

III 5 γ -type: Moa \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr \rightarrow (α)Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr \rightarrow cyclo-[(γ)Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Leu \rightarrow Thr \rightarrow Ser(α) \rightarrow]

IV 4 α -type: Moa \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr \rightarrow (α)Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr \rightarrow Ser \rightarrow cyclo-[(α)Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Leu \rightarrow Thr(γ) \rightarrow]

By applying our technique with NAGARSE⁵ (Subtilopeptidase A [EC 3.4.4.16]) to polymyxin D₁ we obtained two key peptides, Moa \rightarrow (α) Dab \rightarrow Thr, and D-Ser \rightarrow cyclo-[(α) Dab \rightarrow (α) Dab \rightarrow D-Leu \rightarrow Thr \rightarrow (α) Dab \rightarrow (α) Dab \rightarrow Thr(γ) \rightarrow], which were helpful in deducing the



Full structure of polymyxin D₁.

full amino acid sequence of polymyxin D₁. The chemical structure of polymyxin D₁ was thus considered to be of the 7α-type like those of colistin⁶, circulin⁷, and polymyxin B⁸.

We also attempted to confirm the proposed 7α -type structure of polymyxin D₁ by an application of N \rightarrow O rearrangement in concentrated sulphuric acid for 16 h at 21°C. The following five peptides, (I) Moa \rightarrow (α)Dab, (II) Moa \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr, (III) intact polymyxin D₁, (IV) Ser \rightarrow cyclo-[(α)Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Leu \rightarrow Thr \rightarrow (α)-Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr(γ)], (V) Thr \rightarrow Ser \rightarrow cyclo-[(α)Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Leu \rightarrow Thr \rightarrow (α)Dab \rightarrow (α)Dab \rightarrow Thr(γ)], obtained from the rearranged products also supported the 7α -type structure for polymyxin D₁.

Thus, polymyxin D₁ must have the structure shown in the Figure.

The enzymatic hydrolysis of polymyxin D₂ gave almost the same spots in paper chromatography and thin layer chromatography as those obtained from polymyxin D₁. The fatty acid which was isolated from the acid hydrolysate of polymyxin D₂ was identified as isooctanoic acid by gas chromatography. It was therefore considered that the structure of polymyxin D₂ might be the same as that of polymyxin D₁, except for having isooctanoic acid instead of (+)-6-methyloctanoic acid.

Zusammenfassung. Es wird über die Strukturaufklärung von Polymyxin D₁, einem Antibioticum aus *Bacillus polymyxa* ATCC 10401, berichtet, dem die Formel der Figur zukommt.

K. HAYASHI, Y. SUKETA,
K. TSUKAMOTO, and T. SUZUKI

*Institute for Protein Research, Osaka University,
Osaka (Japan), January 13, 1966.*

- ⁵ T. SUZUKI, K. HAYASHI, and K. FUJIKAWA, *J. Biochem.* **54**, 412 (1963).
 - ⁶ T. SUZUKI, H. INOUYE, K. FUJIKAWA, and S. NAGASAWA, *J. Biochem.* **54**, 173 (1963).
 - ⁷ K. FUJIKAWA, Y. SUKETA, K. HAYASHI, and T. SUZUKI, *Experientia* **21**, 307 (1965).
 - ⁸ T. SUZUKI, K. HAYASHI, K. FUJIKAWA, and K. TSUKAMOTO, *J. Biochem.* **56**, 335 (1964).

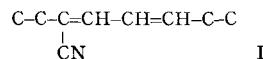
Die Konstitution des Borrelidins

Das Antibioticum Borreloidin wurde im Jahre 1949 von BERGER, JAMPOLSKY und GOLDBERG aus einem Actinomyceten-Stamm als eine farblose lipophile Carbonsäure isoliert¹. Die damals abgeleitete Bruttoformel, $C_{28}H_{43}NO_6$ wurde 1965 durch eine massenspektroskopische Molekulargewichtsbestimmung bestätigt, und auf Grund von spektroskopischen Untersuchungen konnten ANDERTON und RICKARDS² als Chromophor die Gruppierung I ableiten.

Ferner wurden 2 acetylierbare sekundäre Hydroxylgruppen nachgewiesen. Die restlichen 2 Sauerstoffatome liegen gemäss dem IR-Absorptionsspektrum in einer Ester- oder Lactongruppierung vor, wobei auf Grund der massenspektroskopischen Fragmentierung der letzteren der Vorzug gegeben wurde².

¹ J. BERGER, L. M. JAMPOLSKY und M. W. GOLDBERG, Arch. Biochem. Biophys. 22, 476 (1949).

2 K. ANDERTON und R. W. RICKARDS, *Nature* **206**, 269 (1965). — M. LUMB, P. E. MACEY, J. SPYVEE, J. M. WHITMARSH und R. D. WRIGHT, *Nature* **206**, 263 (1965).



Das NMR-Spektrum des Borrelidin-methylesters (III) zeigt unter anderem im Gebiete von δ 0,8–1,4 ppm einen stark strukturierten Signalhaufen, dessen Integral ca. 18 Protonen entspricht. Trotzdem sind nicht 6, sondern nur 4 C-Methylgruppen anwesend. Das Tetrahydroborrelidin (VII) und zahlreiche weitere Umwandlungsprodukte zeigen in diesem Gebiet nur noch Signale von 4 Methylgruppen, während die Signale von 6 weiteren Protonen durch die Hydrierung nach tieferem Feld verschoben werden. Die Anwesenheit von nur 4 Methylgruppen ergibt sich auch aus dem weiteren Abbau. Im Borrelidin-methylester müssen demnach die Signale von 6 Methylenprotonen durch ihre besondere Lage zum Dienssystem in das Gebiet der Methylsignale verschoben sein.

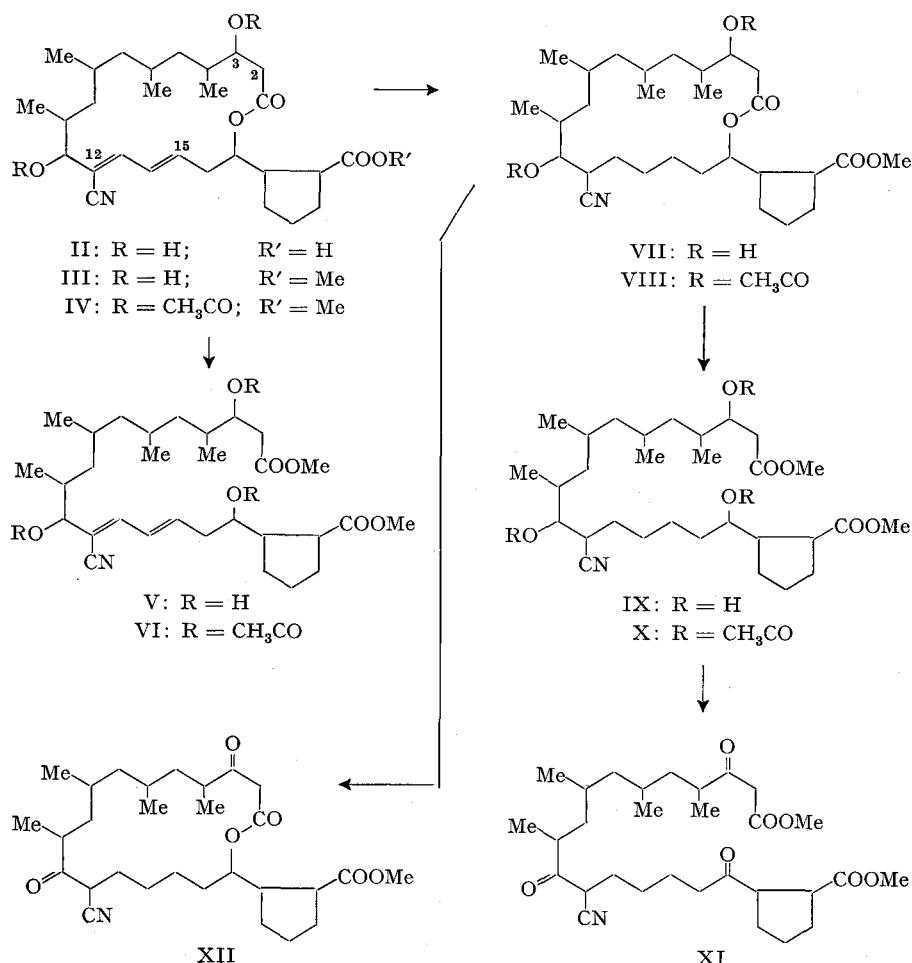
Die Anwesenheit einer Lactongruppe im Borrelidin-methylester konnte bestätigt werden durch Überführung des Esters III in den Dimethylester V und dessen Triacetyl derivat VI mittels Methanolysen oder Hydrolyse und Veresterung mit Diazomethan und anschliessende Acetylierung. Die Beziehung der Produkte V und VI zum Ausgangsmaterial ging aus den NMR-Spektren (2OCH_3 , 3COCH_3) hervor. Die Signale der Protonen am Kohlenstoffgerüst von III sind in den Spektren der Umwandlungsprodukte V und VI alle wieder erkennbar.

Die analoge Reaktionsfolge liess sich auch mit dem chromatographisch reinen, aber nicht kristallisierbaren Tetrahydroborrelidin-methylester (VII) (NMR: $4\text{C}-\text{CH}_3$, 1OCH_3 ; keine Signale von δ 5,1–10 ppm-IR: ν (OH) 3500 und 3600 cm^{-1} , ν (CO) 1723 cm^{-1} , ν (CN) 2230 cm^{-1} -UV: keine Maxima oberhalb 216 nm³) durchführen. Der Di-

methylester IX (NMR: $4\text{C}-\text{CH}_3$, 2OCH_3) gibt ein Triacetyl derivat (X) (NMR: $3\text{CH}_3\text{CO}$). Auch in den Spektren der Verbindungen IX und X lassen sich alle Wasserstoffe am C-Gerüst des Tetrahydro-borrelidin-methylesters (VII) wieder nachweisen.

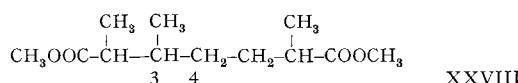
Die Verbindungen VII und IX werden durch Chrom(VI)-oxid in schwefelsaurem Aceton leicht oxydiert zu einem kristallinen Diketon, $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{NO}_6$ (XII) bzw. einem flüssigen Triketon (XI), die gemäss den IR-Absorptionspektren beide hydroxylfrei sind. In den IR-Absorptionspektren beider Ketone sind noch die ν (CN)-Banden bei ca. 2230 cm^{-1} zu erkennen. Weder das Diketon XII noch das Triketon XI zeigen im NMR-Spektrum Singlette bei 2 bis 2,5 ppm; sie sind demnach keine Methylketone. Die UV-Absorptionsspektren der beiden Ketone (in Feinsprit) besitzen Maxima bei 235 nm (log ϵ ca. 3,7) und geben eine blaugraue Eisen (III)-chlorid-Reaktion, was für eine β -Diketon- oder β -Ketoester-Gruppierung spricht. Damit in Übereinstimmung sind die NMR-Spektren: XI besitzt ein Singlett zu 2 Protonen bei δ 3,48 ppm, XII

³ Alle NMR-Spektren wurden in CDCl_3 aufgenommen. Es bedeuten: s = Singlett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, m = Multiplett, b = nicht aufgelöster, breiter Signalhaufen. Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten gegenüber Tetramethylsilan als internem Standard, Spin-Spin-Wechselwirkungen (J) in Hertz angegeben. UV-Absorptionsspektren wurden in Feinsprit, IR-Absorptionsspektren, wenn nichts anderes angegeben, in Chloroform aufgenommen.



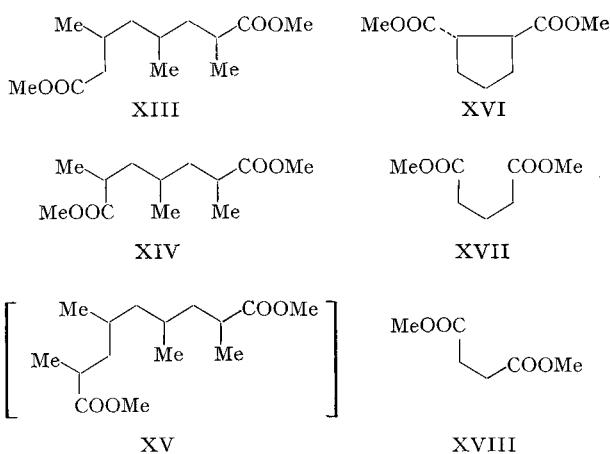
eine AB-Signalgruppe bei δ 3,46 ppm ($\delta_{A,B} = 0,284$ ppm, $J_{A,B} = 15$ c/sec) für die CO-CH₂-CO-Gruppierung.

Erste Einblicke in den Aufbau des Kohlenstoffgerüstes gewährte die drastische Oxydation von Borrelidin-methylester (III) mit Salpetersäure, die zu einer Reihe von Dicarbonsäuren führte, deren Methylester durch Gaschromatographie getrennt wurden. Bernsteinsäure-dimethylester (XVIII), Glutarsäure-dimethylester (XVII) und *trans*-Cyclopentan-1,2-dicarbonsäure-dimethylester (XVI) wurden durch Vergleich mit authentischen Präparaten identifiziert (IR-, NMR- und Massenspektren, Gaschromatographie). Der Ester XIV (höchste Spitze im Massenspektrum: $M-31 = m/e 199$; IR: ν (CO) 1725 cm⁻¹, keine OH-Banden) zeigt im NMR-Spektrum: δ 3,72 ppm, s, 6H (2OCH₃); δ 2,3-2,9 ppm, b, 3H (3CH); δ 1,2-2,0 ppm, b, 4H (2CH₂); δ 1,15 ppm, d ($J = 7$ c/sec), 6H (2CH₃-CH in α -Stellung zu C=O); δ 0,92 ppm, degeneriertes Dublett, 3H. Die Verbindung besitzt demnach die Konstitution eines 2,3,6-Trimethylheptan-disäure-dimethylesters (XIV oder XXVIII).



Zugunsten der Formel XIV sprechen folgende 3 Argumente: (1) Die Signale der beiden α -ständigen Methylgruppen bilden ein einziges scharfes Dublett im NMR-Spektrum, was für einen symmetrischen Bau der Moleköl spricht. (2) Das Massenspektrum zeigt unter anderem starke Spitzen mit m/e 101 und 129, nicht dagegen bei m/e 115, in Übereinstimmung mit der Formel XIV. Eine Verbindung der Formel XXVIII müsste dagegen eine Spur bei m/e 115 (Spaltung zwischen C-3 und C-4) zeigen. (3) ANDERTON und RICKARDS² haben festgestellt, dass radioaktive Propionsäure bei der Biosynthese mit guter Aktivitätsausbeute ins Borrelidin eingebaut wird. Es ist daher eine Biogenese ähnlich der des Erythromycins⁴ und verwandter Makrolide anzunehmen, die zu einer regelmässigen 1,3-Verteilung der Methylgruppen führt.

Der Ester XIII ist das höhere Homologe von XIV: Massenspektrum $m/e = 213$ ($M-31$), M-G. ber. für C₁₃H₂₄O₄ 244. Ferner findet man unter anderem Spitzen bei m/e 73, 87, 101, 115, 129, 143, 157 und 171, die beim Zerfall der Verbindung XIII durch Fragmentierung zwischen den einzelnen Kettengliedern zu erwarten sind. Das NMR-Spektrum zeigt unter anderem: 2OCH₃, δ 1,15 ppm, d ($J = 7$ c/sec), 3H (CH₃ in α -Stellung zu CO) und δ 0,90 ppm, b, 6H (2 weitere C-Methylgruppen). Die Signale von weiteren ca. 9 Protonen sind in flachen Signalhaufen zwischen δ 1,1 und 3,3 ppm zu finden.



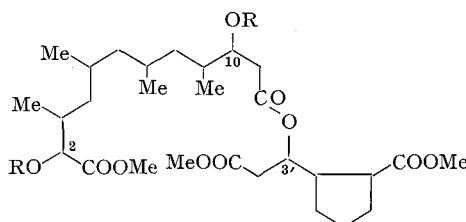
Ein sechster Methylester mit langer Retentionszeit konnte gaschromatographisch nachgewiesen werden, liess sich aber nicht präparativ gewinnen. Auf Grund der späteren Abbauergebnisse dürfte es sich um die Verbindung XV handeln. Von den nachgewiesenen Abbauprodukten dürften die Ester XIII, XIV und XV eine, die Ester XVI, XVII (und XVIII) eine andere Atomgruppierung des Borrelidins repräsentieren.

Den Zusammenhang der nachgewiesenen Atomgruppen in der Moleköl des Borrelidins ergab ein Abbau des Borrelidin-methylesters (III) mit Ozon. Die rohen Ozonide wurden mit H₂O₂ gespalten und die rohen Carbonsäuren mit Diazomethan verestert. Durch Chromatographie wurden zur Hauptsache zwei chromatographisch einheitliche, nicht kristallisierbare Produkte erhalten. Die Verbindung XIX, C₂₈H₄₈O₁₀ (M-G. des Diacetyl-derivates XX, C₃₂H₅₂O₁₂, ber. 628, gef. 628 durch Massenspektrum) besitzt 2 acetylierbare Hydroxyle (NMR des Diacetats), 3 Methylestergruppierungen (NMR: δ 3,67 ppm, s, 6H; δ 3,79 ppm, s, 3H) und eine weitere Estergruppe, die der ursprünglichen Lactongruppe entspricht (NMR: δ 5,21 ppm, m, 1H). Die 4 C-Methylgruppen stehen nicht in α -Stellung zu Carboxylen (NMR: Signalgruppe δ 0,75-1,0 ppm, 12H). Im Acetyl-derivat XX ist das eine Wasserstoff neben einer Acetylgruppe einer Methingruppe benachbart (NMR: δ 4,91, d, $J = 3,5$ c/sec, 1H an C-2), während die chemisch analogen Wasserstoffe an C-10 und C-3' mit mehreren Nachbarprotonen gekoppelt sind (δ 5,20 ppm, m, 2H).

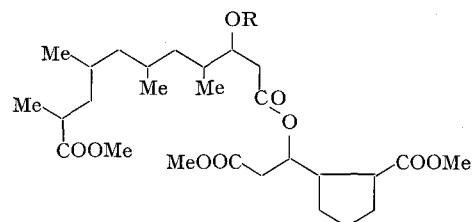
Die dem Ester XIX zugrundeliegende Säure enthält 3 C-Atome weniger als das Borrelidin. Die verlorengegangenen Kohlenstoffe müssen die beiden inneren C-Atome des Diensystems und die CN-Gruppe sein, entsprechend der Formulierung III \rightarrow XIX. Die α -Stellung der einen OH-Gruppe in XIX zu einem Ester-carbonyl folgt aus dem zweiten Ozonisierungsprodukt (XXI), da die ihm zugrundeliegende Säure ein C-Atom weniger besitzt als die dem Ester XIX entsprechende Säure und nur noch eine acetylierbare OH-Gruppe enthält (NMR des Acetyl-derivates XXII: unter anderem δ 5,18 ppm, m, 2H neben Acetyl- bzw. Estergruppe; ferner 3OCH₃; 1CH₃CO; Massenspektrum: C₂₉H₄₈O₁₀ M-G. ber. 556, gef. 556 - IR-Spektrum von XXI: ν (OH) 3500 cm⁻¹, ν (CO) 1725 cm⁻¹ - IR-Spektrum von XXII: keine OH-Bande, ν (CO) 1730 cm⁻¹). Von den 4 C-Methylgruppen steht eine in α -Stellung zu einem Ester-Carbonyl (NMR von XXII: δ 1,12 ppm, d, $J = 6,5$ c/sec, 3H; δ 0,75-1,00 ppm, b, 9H). Durch diese Beziehungen ist die Gruppierung XXIX für das Borrelidin bewiesen.

Die beiden Ester XIX und XXI geben bei der alkalischen Hydrolyse und anschliessenden Veresterung mit Diazomethan je zwei kleinere Spaltprodukte. Eines davon (XXIII) ist den beiden Abbaureihen gemeinsam. Es besitzt die Bruttoformel C₁₁H₁₆O₄ (M-G. ber. 212, gef. 212 durch Massenspektrum). Es handelt sich um einen α , β -ungesättigten Dicarbonsäureester (UV in Alkohol: λ_{max} 220 nm, log ϵ 3,84; NMR: 2OCH₃; IR: ν (CO) 1725, 1710 cm⁻¹; ν (C=C) 1660 cm⁻¹; keine OH-Bande). In diesem Spaltprodukt muss der durch das Abbauprodukt XVI bewiesene Cyclopentanring enthalten sein. Die Konstitution XXIII mit *trans*-substituierter Doppelbindung ergibt sich aus dem NMR-Spektrum: δ 6,92 ppm, dd, $J_{\beta,\alpha} = 15,5$ c/sec, $J_{\beta,\gamma} = 7$ c/sec (H an C- β); δ 5,82 ppm, dd, $J_{\alpha,\beta} = 15,5$ c/sec, $J_{\alpha,\gamma} = 1$ c/sec (H an C- α); δ 3,68

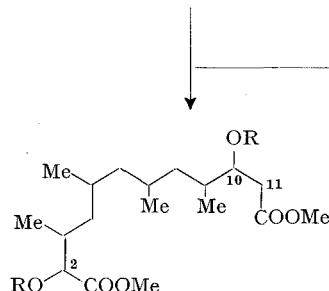
⁴ H. GRISEBACH, H. ACHENBACH und W. HOFHEINZ, Z. Naturf. 15b, 560 (1960). - H. GRISEBACH, W. HOFHEINZ und H. ACHENBACH, Z. Naturf. 17b, 64 (1962).



XIX: R = H

XX: R = CH_3CO 

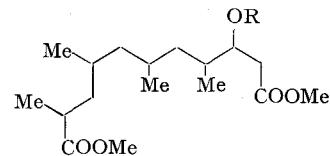
XXI: R = H

XXII: R = CH_3CO 

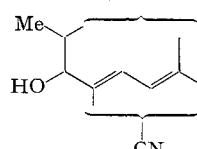
XXIV: R = H

XXV: R = CH_3CO

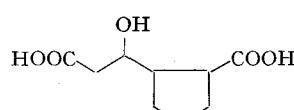
XXIII



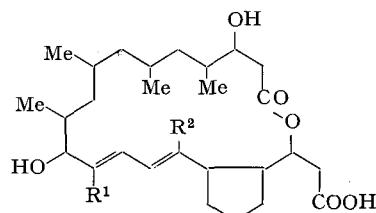
XXVI: R = H

XXVII: R = CH_3CO 

XXIX



XXX



XXXIa: R1 = CN; R2 = H

XXXIb: R1 = H; R2 = CN

und 3,73 ppm, s, je 3H (2OCH_3); δ 2,3–3,2 ppm, m (2-CH_2); δ 1,4–2,2 ppm, m (6H an 3 Ring- CH_2), kein $\text{C}-\text{CH}_3$. Da die Ausgangsester XIX und XXI keine Doppelbindung enthalten, muss die Doppelbindung in XXIII durch β -Elimination entstanden sein. Die Säure XXX ist demnach ein Baustein der beiden Ester XIX und XXI.

Die beiden andern Methylester der Hydrolyseprodukte, XXIV und XXVI, stehen zueinander in derselben Beziehung wie ihre respektiven Vorstufen, XIX und XXI, und besitzen die Bruttoformeln $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_6$ (Diacetyl-derivat XXV: $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_8$ M-G. ber. 430, gef. M-31 = 399 durch Massenspektrum) bzw. $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (Acetyl-derivat XXVII: $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_6$ M-G. ber. 358 gef. 358, sehr geringe Intensität, M-31 = 327). In diesen beiden Abbauprodukten muss auf Grund des NMR-Spektrums ($4\text{C}-\text{CH}_3$) die durch den Ester XIII bewiesene Atomgruppierung enthalten sein. Wenn man dies und die Partialformel XXIX berücksichtigt, ergeben sich die Konstitutionsformeln XXIV und XXVI zwangsläufig aus den NMR-Spektren der beiden Verbindungen und ihrer Acetyl-derivate: XXVII: δ 5,23 ppm, dt, $J_{\text{d}} = 3,5$ c/sec, $J_{\text{t}} = 6,5$ c/sec (H an C-9); δ 3,67 ppm, s, 6H (2OCH_3); δ 2,55 ppm, d, $J = 7$ c/sec (1H an C-10); δ 2,54 ppm, d, $J = 6$ c/sec (zweites H an C-10^b); δ ca. 2,50 ppm, m (weitgehend überlagert von den Signalen der Wasserstoffe an C-10; H an C-2); δ , 2,02 ppm, s, 3H (O-Acetyl); δ 1,15–2,0 ppm, b, 9H (H an C-3 bis C-8); δ 1,12 ppm, d, $J = 6,8$ c/sec, 3H (CH_3 an C-2, in α -Stellung zu CO); δ 0,7–1,0 ppm, b, 9H (3 CH_3 an C-4, C-6 und C-8). – XXV: δ 5,23 ppm, dt, $J_{\text{d}} = 3,5$ c/sec, $J_{\text{t}} = 6,5$ c/sec (H an C-10); δ 4,92 ppm, d,

$J = 3,8$ c/sec (H an C-2); δ 3,75 ppm, s, 3H (OCH_3); δ 3,67 ppm, s, 3H (OCH_3); δ 2,56 ppm, d, $J = 7$ c/sec (1H an C-11); δ 2,55 ppm, d, $J = 6,3$ c/sec (zweites H an C-11^b); δ 2,13 ppm, s, 3H (O-Acetyl an C-2); δ 2,02 ppm, s, 3H (O-Acetyl an C-10); δ 1,0–2,2 ppm, b, 10H (H an C-3 bis C-9); δ 0,75–1,0, b, 12H ($4\text{C}-\text{CH}_3$). Diese Zuordnung wurde erhärtet durch Spin-Entkopplungs-Experimente, die Wechselwirkungen der Signale bei δ 2,55 und 2,56 ppm mit δ 5,23 ppm sowie des Signals bei 4,92 ppm mit einer Partie des Signalhaufens bei δ ca. 2,2 ppm ergaben.

Für den Abbauester XIX (und daraus zwangsläufig für XXI) ergibt sich die im Formelschema angegebene Konstitution aus folgenden Überlegungen: Im Diketon XII liegen 2 C-Methylgruppen in α -Stellung zu CO-Gruppen (NMR: δ 1,17 ppm, d, $J = 7$ c/sec, 3H; δ 1,12 ppm, d, $J = 7$ c/sec, 3H; δ 0,75–0,98 ppm, b, 6H). Die beiden freien Hydroxyle im Tetrahydro-borrelidin, Borellidin (und folglich auch im Abbauester XIX) sind demnach diejenigen neben den Methylgruppen (Stellungen 2 und 10 in XIX). Für die Esterbindung in XIX kommt daher nur noch das Hydroxyl an C-3' in Frage. Von den beiden Carbomethoxygruppen in XXIV stammt diejenige neben der Hydroxylgruppe aus dem Diensystem (Partialformel XXIX!). Es bleibt nur noch die Carbomethoxygruppe

^b Die ABX-Signalgruppe der beiden H an C-10 (XXVII) bzw. C-11 (XXV) besitzt wegen der fast identischen chemischen Verschiebungen δA und δB und annähernd gleicher Kopplungskonstanten J_{AX} und J_{BX} nahezu die Form eines einzigen Dubletts.

C-12 (in XXIV), die als Partner für die Esterbindung in XIX in Frage kommt.

Durch Einfügen des Diennitril-Systems (I) in die Formel XIX ergeben sich noch 4 mögliche Formeln für Borrelidin: II, ein Isomeres IIa von II mit der Cyano-gruppe an C-15 und 2 analoge Isomere mit dem Cyclopentanring als Bestandteil des grossen Lactonringes (XXXI a und b).

Verbindungen der Formeln XXXI (a und b) müssten zu einem Triketon (analog XI) führen, in dem die Gruppierung $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{COOCH}_3$ zweimal vorhanden ist. Gemäss dem NMR-Spektrum dieser Verbindung (XI, siehe oben) liegt diese Gruppe aber sicher nur einmal vor. Formeln mit dem Ringgerüst von II muss gegenüber den Formeln XXXI a und b auch auf Grund des Massenspektrums des Methylesters III der Vorzug gegeben werden, da im Bereich höherer Massen mehrmals die Differenz 127 für den Verlust eines Carbomethoxycyclopentyl-Restes vorkommt, während die Differenz 73 ($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), die bei Methylestern von XXXI zu erwarten wäre, nicht auftritt.

Zwischen den Formeln II und dem Isomeren mit CN an C-15 lässt sich mit Hilfe von Spin-Entkopplungs-

experimenten mit dem Borrelidin-methylester (III) entscheiden: Durch Einstrahlen bei δ 6,2 ppm (Alken-Proton) tritt Entkopplung eines Signals bei δ 2,5 ppm (CH_2) ein, während die Signale von Protonen neben Sauerstoff (δ 3,85 ppm, 4,10 ppm und 4,92 ppm) nicht verändert werden.

Die Mikroanalysen der kristallinen Verbindungen III, IV und XII unterstützen die angegebenen Formeln. Die übrigen, nicht kristallisierbaren und meist nicht unzersetzt destillierbaren Verbindungen wurden nicht analysiert, sondern ihre Bruttoformeln aus den Massenspektren von Acetyl-derivaten unter Berücksichtigung der spektroskopisch bestimmten funktionellen Gruppen berechnet.

Summary. Structure II has been determined for the antibiotic Borrelidin by chemical degradation, mass spectroscopy and NMR-spectroscopy of the degradation products.

W. KELLER-SCHIERLEIN

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich (Schweiz), 18. März 1966.

7-Hydroxy-4'-methoxy-isoflavan (Formononetin) aus Süssholzwurzel. Über Inhaltsstoffe der Süssholzwurzel. II¹

Bei Untersuchungen über phenolische Inhaltsstoffe der Süssholzwurzel konnte aus dem methanolischen Wurzel-extrakt durch Fällung mit Bleiacetat neben Liquiritin eine Fraktion erhalten werden, die mit $\text{FeCl}_3/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ positive Reaktion auf Phenole gab, mit Mg/HCl aber nicht reduziert wurde. Die Reinsubstanz (50 mg aus 4 kg Wurzel) schmilzt bei 258 °C und entspricht der Zusammensetzung $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (gef.: C 71,12%, H 4,63%; ber.: C 71,6%, H 4,47%). Nach Säurebehandlung wird sie unverändert zurückhalten. Mit Essigsäureanhydrid-Pyridin bildet sie ein Monoacetat vom Schmelzpunkt 162 bis 165 °C.

Zum Unterschied von Liquiritigenin zeigt das IR-Spektrum der Verbindung bei 1610 und 954 cm^{-1} Banden, die einer konjugierten C=C-Bindung zuzuordnen sind. Die CO-Bande liegt bei 1620 cm^{-1} .

Das UV-Spektrum besitzt ein starkes Maximum und ein schwaches Nebenmaximum bei 250 bzw. 300 nm, sowie eine Schulter bei 242 nm. Lage und Intensitäten dieser Maxima deuten auf ein Isoflavon hin². Zum Beweis wurde das Absorptionsspektrum des Acetates herangezogen, da die Acetylierung die Beeinflussung des Spektrums durch freie Hydroxylgruppen aufhebt und so das Spektrum des flavonoiden Grundkörpers hervortreten lässt². Das Spektrum zeigt ein Maximum bei 252 nm und Inflektionen bei 300 und 235 nm. Bei Gegenwart von Natriumacetat wird das Spektrum der acetylierten Substanz nicht verändert. Die nicht acetylierte Verbindung erleidet dagegen eine bathochrome Verschiebung um 10 nm, die ein freies Hydroxyl in 7-Stellung vermuten lässt.

Beim Abbau mit wässriger KOH und Wasserstoff-peroxyd³ kann Anissäure papierchromatographisch als Abbauprodukt nachgewiesen werden. Das Seitenphenyl

trägt demnach in 4'-Stellung eine Methoxylgruppe. Nach Schmelzpunkt, Spektren und Reaktionen handelt es sich um 7-Hydroxy-4'-methoxy-isoflavan (Formononetin).

Aus der formononetinhaltigen Fraktion des methanolischen Extraktes liessen sich weiterhin etwa 2 mg Ferulinsäure isolieren und durch Papierchromatographie und IR-Spektrum charakterisieren.

Den Isoflavonen kommt nach den Untersuchungen von MICHELI et al.⁴ eine geringe Östrogenwirksamkeit zu. Die für Süssholz-Extrakte diskutierte östrogene Wirkung⁵ konnte aber von HÖLLER, HÜCKEL und SCHNEIDER⁶ nicht nachgewiesen werden. Die Aktivität des Formononetins reicht aber nicht aus, um einen solchen Effekt bei Süssholzextrakten manifest werden zu lassen.

Summary. Small amounts of 7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavanone (formononetin) and ferulic acid were isolated from liquorice root and identified by spectral properties and degradation.

W. REINERS

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität, Würzburg (Deutschland), 23. Dezember 1965.

¹ Als Mitteilung I gilt Naturwiss. 51, 193 (1964).

² L. JURD, in *Spectral Properties of Flavonoidal Compounds* (Ed., T. A. GEISSMAN; Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1962), p. 107.

³ O. H. STAMM, H. SCHMID und J. BÜCHI, Helv. chim. Acta 41, 2006 (1958).

⁴ R. A. MICHELI, A. N. BOOTH, A. L. LIVINGSTON und E. M. BICKOFF, J. med. pharm. Chem. 5, 321 (1962).

⁵ C. H. COSTELLO und E. V. LYNN, J. Am. pharm. Ass., Sci. Edition 39, 177 (1950).

⁶ H. HÖLLER, H. HÜCKEL und W. SCHNEIDER, Scientia pharm. 28, 33 (1960).