

Die Kondensation von 5-Methylthiazol mit Benzaldehyd in Gegenwart von Zinkchlorid führt analog zum 2-Benzyl-5-methylthiazol, das gleichfalls durch eine Thiazolkondensation zum Vergleich hergestellt wurde. Die früher von *H. Erlenmeyer* und *P. Schmidt* gegebene Deutung dieses Reaktionsproduktes als 5-Styrylthiazol und die daraus abgeleitete Aktivität der Methylgruppe im 5-Methylthiazol ist damit als unrichtig erwiesen.

Universität Basel, Anstalt für anorganische Chemie.

97. Welkstoffe und Antibiotika.

8. Mitteilung¹⁾.

Über die Konstitution von Enniatin B

von *Pl. A. Plattner* und *U. Nager*.

(7. II. 48.)

In einer kurzen vorläufigen Mitteilung²⁾, sowie in der vorhergehenden Abhandlung dieser Reihe¹⁾ wurde die Isolierung eines als Enniatin B bezeichneten Antibiotikums ($C_{22}H_{38}O_6N_2$) beschrieben.

Die Verbindung ist sehr wenig löslich in Wasser, leicht löslich dagegen in den meisten organischen Lösungsmitteln mit Ausnahme von tiefsiedendem Petroläther. Aus diesem Lösungsmittel umkrystallisiert, wird sie in Krystallen vom Smp. 173—175° erhalten. Chemisch ist sie charakterisiert durch die Abwesenheit von Hydroxyl-, Alkoxy-, Carbonyl-, sowie basischer oder saurer funktioneller Gruppen.

Nach seiner Zusammensetzung und seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften gehört dieses in vitro spezifisch gegen Mycobakterien wirksame Antibiotikum demnach zur gleichen Stoffgruppe wie das von uns aus *F. orthoceras* var. *enniatinum* isolierte Enniatin A²⁾³⁾ und gleicht auch einer Gruppe von Stoffen, welche neuerdings von *Cook*, *Cox*, *Farmer* und *Lacey*⁴⁾ aus einer Reihe von Fusarien isoliert wurden.

Nach den Erfahrungen, die wir beim Abbau von Enniatin A gesammelt hatten⁵⁾, lag es nahe, für die Aufklärung der Konstitution dieses neuen Antibiotikums ähnliche Wege einzuschlagen. Enniatin B

¹⁾ 7. Mitt. Helv. **31**, 594 (1948).

²⁾ *Pl. A. Plattner* und *U. Nager*, Exper. **3**, 325 (1947).

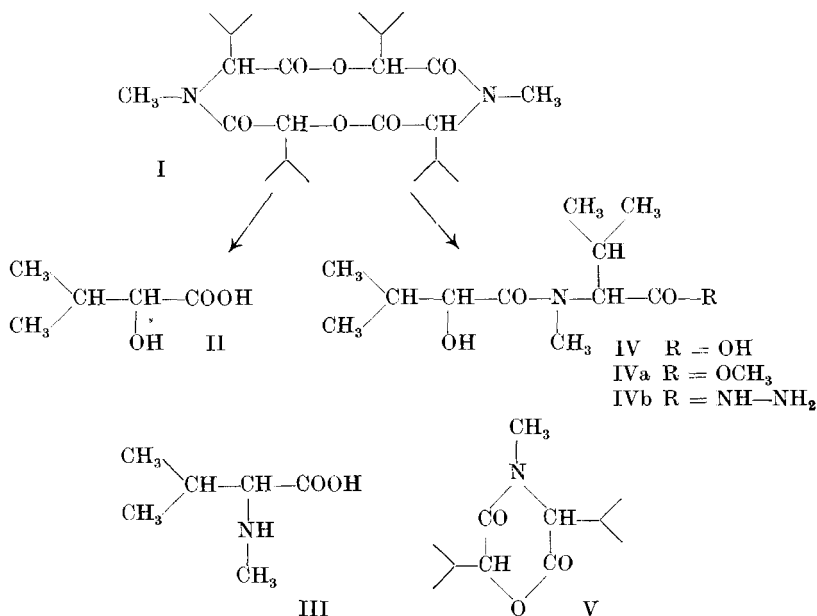
³⁾ *E. Gäumann*, *St. Roth*, *L. Ettlinger*, *Pl. A. Plattner* und *U. Nager*, Exper. **3**, 202 (1947).

⁴⁾ *A. H. Cook*, *S. F. Cox*, *T. H. Farmer* und *M. S. Lacey*, Nature **160**, 31 (1947).

⁵⁾ *Pl. A. Plattner* und *U. Nager*, Exper. **3**, 325 (1947).

wurde deshalb zuerst einer Hydrolyse mit 20-proz. wässriger Salzsäure unterworfen. In Analogie mit dem Enniatin A konnten dabei weder neutrale noch saure oder basische, leicht flüchtige Hydrolysenprodukte erhalten werden, dagegen gelang es auch hier, die D- α -Oxy-isovaleriansäure (II)¹⁾ in einer annähernd 2 Mol erreichenden Ausbeute zu isolieren. Die Identität der Säuren konnte durch einen Vergleich mit dem aus Enniatin A erhaltenen Präparat leicht festgestellt werden. Demnach ist diese Oxysäure auch am Aufbau von Enniatin B mit 2 Molekülen beteiligt.

Auf Grund der Bruttoformel ($C_{22}H_{38}O_6N_2$) des Enniatins B, das sich vom Enniatin A ($C_{24}H_{42}O_6N_2$) nur durch zwei CH_2 -Gruppen unterscheidet, war demnach als zweites Spaltstück eine Aminosäure der Formel $C_6H_{13}O_2N$ zu erwarten. Tatsächlich konnten wir eine Verbindung dieser Zusammensetzung in einer etwa 2 Mol entsprechenden Ausbeute aus der salzsauren Hydrolysenlösung isolieren. Auf Grund ihrer Eigenschaften handelt es sich auch hier um eine N-Methyl-aminosäure. Beim Abbau mit Natriumhypochlorit liefert dieselbe einerseits Methyl-amin, andererseits Isovaleraldehyd, der als 2,4-Dinitrophenylhydrazon identifiziert wurde. Das zweite Spaltstück ist demnach N-Methyl-valin (III). Im Gegensatz zur erhaltenen D- α -Oxy-isovaleriansäure, welche die unnatürliche D-Konfiguration aufweist, dürfte das isolierte N-Methyl-(+)-valin die natürliche L-Konfiguration besitzen. Andere Hydrolysenprodukte konnten nicht gefunden werden.



¹⁾ Zur Bezeichnung „D“ vgl. H. B. Vickery, J. Biol. Chem. **169**, 237 (1947).

Einen weiteren Einblick in die Konstitution von Enniatin B gewährt das Ergebnis der milden alkalischen Hydrolyse. Unter Verbrauch von 2 Mol Alkali wird dabei ein saures Produkt gebildet, das als krystallisierter Methylester IVa ($C_{12}H_{23}O_4N$) und als Hydrazid IVb ($C_{11}H_{23}O_3N_3$) analysiert werden konnte. Bei der sauren Hydrolyse bildet dieser Methylester (IVa) D- α -Oxy-isovaleriansäure (II) und N-Methyl-(+)-valin (III), also die gleichen Spaltprodukte, die auch bei der direkten sauren Hydrolyse von Enniatin B erhalten werden. Da die Säure ferner leicht lactonisiert, so liegt offenbar das D- α -Oxy-isovaleryl-N-methyl-(+)-valin (IV) vor, und das entstehende Lacton ist als 4-Methyl-3,6-diisopropyl-2,5-dioxo-morpholin (V) zu formulieren.

Auf Grund dieser Abbauresultate schreiben wir dem Enniatin B die Struktur einer cyclischen Verbindung mit 12 Ringgliedern gemäss Formel (I) zu, mit welcher sich alle bisher gemachten Beobachtungen zwangslos erklären lassen. Derartige Verbindungstypen sind u. W. bis jetzt weder in der Natur aufgefunden noch synthetisch hergestellt worden. Mit Hilfe von Kalotten-Modellen kann man jedoch zeigen, dass sie sich vollkommen spannungsfrei aufbauen lassen.

In einem Vortrag am XI. Internationalen Kongress für reine und angewandte Chemie, London, Juli 1947, hat A. H. Cook über die Resultate der vorne erwähnten englischen Forschergruppe beim Abbau von Lateritiin-I berichtet. Diese scheinen sich weitgehend mit den von uns am Enniatin B erzielten und hier dargelegten Ergebnissen zu decken. Da andererseits inzwischen gezeigt wurde, dass Lateritiin-I mit Enniatin A identisch ist, bei dessen Abbau wir neben der D- α -Oxy-isovaleriansäure ein N-Methyl-leucin¹⁾ erhielten, sind wir geneigt, anzunehmen, dass der Abbau mit Lateritiin-I-Präparaten ausgeführt wurde, die stark mit Enniatin B verunreinigt waren. Dass die vollständige Trennung der homologen Enniatine unter Umständen äusserst schwierig ist, wurde in der vorstehenden Arbeit dieser Reihe an einem Beispiel kurz dargelegt.

Für die Durchführung dieser Arbeit konnten Mittel aus den *Eidg. Arbeitsbeschäftigungskrediten* verwendet werden. Wir danken ferner der CIBA Aktiengesellschaft in Basel für ihre Unterstützung.

Experimenteller Teil²⁾.

A. Saure Hydrolyse.

2 g (4,8 Millimol) Enniatin B wurden mit 80 cm³ konstant siedender Salzsäure während 20 Stunden unter Stickstoff am Rückfluss gekocht. Die Salzsäure wurde im

¹⁾ Vgl. Pl. A. Plattner und U. Nager, Exper. **3**, 325 (1947). Nach unseren letzten Ergebnissen muss es sich um N-Methyl-(+)-isoleucin oder N-Methyl-(+)-alloisoleucin handeln.

²⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert und die spezifischen Drehungen in einem Rohr von 1 dm Länge bestimmt.

Vakuum unter 60° Badtemperatur abdestilliert, der Rückstand in Wasser aufgenommen und im *Kutscher-Steudel*-Apparat mit Äther extrahiert.

D- α -Oxy-isovaleriansäure (II).

Der aus der getrockneten ätherischen Lösung erhaltene krystalline Rückstand wog 1,18 g und schmolz bei 65–66°. Nach einmaliger Sublimation im Hochvakuum wurden 960 mg reine Oxsäure vom Smp. 67,5–69° erhalten, was einer Ausbeute von 85% entspricht. Die Mischprobe mit D- α -Oxy-isovaleriansäure aus D-Valin¹⁾ (Smp. 69–70°) schmolz bei 68–69°. Zur Analyse wurde eine dreimal sublimierte Probe vom Smp. 68 bis 68,5° verwendet.

$$[\alpha]_D^{23} = -1,92^0 \quad (c = 12,30 \text{ in Wasser})$$

3,933 mg Subst. gaben 7,319 mg CO₂ und 3,023 mg H₂O

C₅H₁₀O₃ Ber. C 50,83 H 8,53%

Gef. „ 50,78 „ 8,60%

Der p-Phenyl-phenacylester schmolz nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Äther-Petroläther bei 108–109° und gab mit einem Vergleichspräparat keine Schmelzpunktserniedrigung. Zur Analyse wurde 30 Stunden bei 50° und 0,01 mm getrocknet.

3,688 mg Subst. gaben 9,863 mg CO₂ und 2,160 mg H₂O

C₁₉H₂₀O₄ Ber. C 73,06 H 6,45%

Gef. „ 72,98 „ 6,55%

N-Methyl-(+)-valin (III).

Die nach der Extraktion mit Äther verbleibende, wässrige salzsaure Lösung wurde im Vakuum bei 60° Badtemperatur zur Trockene eingedampft. Der grösstenteils krystalline Rückstand wog 1,68 g (ber. für 2 Mol C₆H₁₄O₂NCl 1,61 g). Das Hydrochlorid liess sich durch Umsatz mit frisch gefälltem Silbercarbonat in die freie Aminosäure überführen. Man erhielt 1,25 g rohe Aminosäure, deren Ninhydrinreaktion schwach war. Mit p-Nitrobenzoylchlorid in Pyridin (Reaktion nach *Waser-Edlbacher*²⁾) liess sich eine Rotfärbung beobachten. Im evakuierten Schmelzpunktsröhrchen sublimierte die Aminosäure oberhalb 170° ohne zu schmelzen und bildete feine, farblose Nadeln. Zur Reinigung wurde sie bei 140° und 0,005 mm sublimiert. Ausbeute: 1,11 g (88% der Theorie).

$$[\alpha]_D^{17,5} = +30,0^0 \quad (c = 1,392 \text{ in 5-n. Salzsäure})$$

Zur Analyse wurde ein zweimal sublimiertes Präparat verwendet.

3,768 mg Subst. gaben 7,608 mg CO₂ und 3,293 mg H₂O

2,928 mg Subst. gaben 0,274 cm³ N₂ (22°, 733 mm)

C₆H₁₃O₂N Ber. C 54,94 H 9,99 N 10,68%

Gef. „ 55,10 „ 9,78 „ 10,44%

Das N-2,4-Dinitrophenyl-N-methyl-(+)-valin³⁾ schmolz nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Äther-Hexan bei 181,5–182° (Zers.). Zur Analyse wurde 20 Stunden bei 50° und 0,005 mm getrocknet.

$$[\alpha]_D^{19} = +482,5^0 \quad (c = 0,716 \text{ in Chloroform})$$

3,716 mg Subst. gaben 6,602 mg CO₂ und 1,666 mg H₂O

2,720 mg Subst. gaben 0,346 cm³ N₂ (20°, 728 mm)

C₁₂H₁₅O₆N₃ Ber. C 48,48 H 5,09 N 14,14%

Gef. „ 48,49 „ 5,02 „ 14,19%

¹⁾ E. Fischer und H. Scheibler, B. **41**, 2894, 2897 (1908).

²⁾ S. Edlbacher und Fr. Litvan, Z. physiol. Ch. **265**, 241 (1940); **268**, 285 (1941).

³⁾ Hergestellt nach F. Sanger, Biochem. J. **39**, 507 (1945); **40**, 261 (1946).

Abbau mit Hypochlorit¹⁾).

118 mg (0,9 Millimol) Aminosäure wurden mit 0,91 Milliäquivalenten Natriumhypochlorit abgebaut.

Methyl-amin. Das beim Abbau freigewordene Amin wurde in heisser 0,1-n. H_2SO_4 aufgefangen und dann mit Dinitrofluorbenzol in 2,4-Dinitro-N-methyl-anilin übergeführt. Aus Äthanol umkrystallisiert schmolz das Derivat bei 182°. Der Mischschmelzpunkt mit einem analysierten Vergleichspräparat (Smp. 182,2°), das durch Hypochlorit-Abbau aus Sarkosin hergestellt war, lag bei 181,8—182°. Zur Analyse wurde zweimal bei 105° und 0,002 mm sublimiert.

3,688 mg Subst. gaben 5,761 mg CO_2 und 1,151 mg H_2O

2,460 mg Subst. gaben 0,472 cm^3 N_2 (19°, 721 mm)

$\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_4\text{N}_3$ Ber. C 42,64 H 3,58 N 21,32%

Gef. „ 42,63 „ 3,49 „ 21,28%

Isobutyraldehyd. Die aldehydischen Anteile des Hypochlorit-Abbaus wurden nach Abtrennen des Methyl-amins in eine schwefelsaure Dinitrophenylhydrazin-Lösung geleitet. Das aus Äthanol umkrystallisierte 2,4-Dinitrophenylhydrazon schmolz bei 186° und wog 170 mg (Ausbeute: 75%). Der Mischschmelzpunkt mit synthetischem Isobutyraldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon vom Smp. 187—187,5° lag bei 186,5°. Zur Analyse wurde ein dreimal aus Äthanol umkrystallisiertes Präparat 14 Stunden bei 51° und 0,01 mm getrocknet.

3,728 mg Subst. gaben 6,501 mg CO_2 und 1,568 mg H_2O

2,605 mg Subst. gaben 0,526 cm^3 N_2 (19°, 713 mm)

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_4$ Ber. C 47,62 H 4,80 N 22,21%

Gef. „ 47,59 „ 4,71 „ 22,15%

B. Alkalische Hydrolyse.

853 mg (2,0 Millimol) Enniatin B (Präparat II aus *Fusarium* Stamm ETH 1574)³⁾ wurden in 25 cm^3 Methanol gelöst und nach Zugabe von 25 cm^3 0,191-n. Bariumhydroxyd-Lösung 4 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Verbrauch an Lauge 4,015 Milliäquivalente.

$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{N}$ Äquiv.-Gew. Ber. 213,27

Gef. 212,5

Nach beendeter Hydrolyse wurde das Methanol im Vakuum abdestilliert und die verbleibende wässrige Lösung nach Zusatz von 4,4-Milliäquivalenten Schwefelsäure im *Kutscher-Steudel*-Apparat mit Äther extrahiert. Nach dem Verdampfen des Äthers erhielt man als Rückstand 950 mg eines viskosen Öls, das in Äther sehr gut, in Wasser nur mässig löslich war. Es zeigte in wässriger Lösung deutlich saure Eigenschaften.

Lacton des D- α -Oxy-isovaleryl-N-methyl-(+)-valins;

4-Methyl-3,6-diisopropyl-2,5-dioxo-morpholin (V).

75 mg eines rohen Hydrolysenproduktes wurden zweimal bei 69° (Blocktemperatur) und 0,005 mm destilliert.

4,150 mg Subst. gaben 9,406 mg CO_2 und 3,291 mg H_2O

7,136 mg Subst. gaben 0,419 cm^3 N_2 (18°, 732 mm)

$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{N}$ Ber. C 61,94 H 8,98 N 6,57%

Gef. „ 61,85 „ 8,87 „ 6,63%

¹⁾ Vgl. dazu *K. Langheld*, B. **42**, 2360 (1909); *E. Aubel* und *J. Asselineau*, Bl. **1947**, 114.

²⁾ Die genaue Methode und die verwendete Apparatur werden später beschrieben werden.

³⁾ Vgl. *Pl. A. Plattner*, *U. Nager* und *A. Boller*, Helv. **31**, 594 (1948).

D- α -Oxy-isovaleryl-N-methyl-(+)-valin-methylester (IVa).

Methylierung der Produkte der alkalischen Hydrolyse von Enniatin B (950 mg) mit Diazomethan in Äther lieferte 935 mg eines zum grössten Teil krystallisierten Reaktionsproduktes, aus dem sich durch Destillation (bzw. Sublimation) der krystallisierte Methylester IVa neben kleineren Mengen flüssiger Anteile in reiner Form gewinnen liess.

Fraktion 1, Sdp._{0,001} 27–29°, 190 mg, flüssig

Fraktion 2, Sdp._{0,001} 40–50°, 685 mg, Smp. 70,5–71°.

Zur Analyse wurde die Fraktion 1 noch zweimal im Kugelrohr bei 50° (Blocktemperatur) und 0,005 mm destilliert.

3,369 mg Subst. gaben 7,413 mg CO₂ und 2,576 mg H₂O

6,841 mg Subst. gaben 0,367 cm³ N₂ (20°, 725 mm)

Lacton C₁₁H₁₉O₃N Ber. C 61,94 H 8,98 N 6,57%

Methylester C₁₂H₂₃O₄N Ber. „ 58,75 „ 9,45 „ 5,71%

Gef. „ 60,05 „ 8,56 „ 5,96%

Es scheint somit ein Gemisch von Methylester IVa und Lacton V vorzuliegen.

Die Fraktion 2, der krystalline Methylester IVa, wurde zweimal bei 60° und 0,003 mm sublimiert. Smp. 71,5°.

$[\alpha]_D^{20} = -130,4^\circ$ ($c = 1,338$ in Chloroform)

3,707 mg Subst. gaben 7,988 mg CO₂ und 3,131 mg H₂O

3,790 mg Subst. gaben 0,198 cm³ N₂ (20°, 713 mm)

3,619 mg Subst. verbr. 4,444 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃ (Methoxyl)

C₁₂H₂₃O₄N Ber. C 58,75 H 9,45 N 5,71 OCH₃ 12,65%

Gef. „ 58,81 „ 9,45 „ 5,71 „ 12,70%

Nach der Analyse liegt D- α -Oxy-isovaleryl-N-methyl-(+)-valin-methylester vor. Dieser Ester war in vitro gegen Mycobakterien antibiotisch inaktiv.

D- α -Oxy-isovaleryl-N-methyl-(+)-valin-hydrazid (IVb).

100 mg des Methylesters wurden mit 1,5 Äquivalenten Hydrazinhydrat eine Stunde in Methanol am Rückfluss gekocht und in üblicher Weise aufgearbeitet. Die Ausbeute an aus Benzol-Petroläther krystallisiertem Präparat betrug 35 mg. Nach zweimaliger Sublimation bei 105° und 0,005 mm schmolz das Hydrazid bei 144,5–147,5°.

3,736 mg Subst. gaben 7,374 mg CO₂ und 3,139 mg H₂O

3,022 mg Subst. gaben 0,470 cm³ N₂ (20°, 717 mm)

C₁₁H₂₃O₃N₃ Ber. C 53,85 H 9,45 N 17,14%

Gef. „ 53,86 „ 9,40 „ 17,09%

Salzsaure Hydrolyse des D- α -Oxy-isovaleryl-N-methyl-(+)-valin-methylesters (IVa).

368 mg (1,5 Millimol) Methylester IVa wurden in 15 cm³ Salzsäure (1:1) 24 Stunden am Rückfluss gekocht. Nach Destillation der Salzsäure im Vakuum extrahierte man den in Wasser aufgenommenen Rückstand im *Kutscher-Steudel*-Apparat mit Äther. Die Ausbeute an sublimierter D- α -Oxy-isovaleriansäure (II) vom Smp. 68,7° betrug 135 mg (76% der Theorie). Der Mischschmelzpunkt mit der durch direkte saure Hydrolyse erhaltenen Oxyssäure (Smp. 69,5°) lag bei 69°. Ein zweimal bei 50° (Blocktemperatur) und 0,003 mm sublimiertes Präparat gab folgende Analyse.

3,550 mg Subst. gaben 6,590 mg CO₂ und 2,718 mg H₂O

C₅H₁₀O₃ Ber. C 50,83 H 8,53%

Gef. „ 50,65 „ 8,57%

Das aus dem Hydrochlorid durch Umsatz mit Silbercarbonat freigesetzte N-Methyl-(+)-valin (III) wog nach Sublimation bei 154—156° (Ölbadtemperatur) und 0,005 mm 187 mg (Ausbeute 95%). Zur Analyse wurde nochmals sublimiert.

$$[\alpha]_D^{19} = +30,9^0 \quad (c = 1,396 \text{ in 5-n. Salzsäure})$$

3,650 mg Subst. gaben 7,338 mg CO₂ und 3,232 mg H₂O

2,100 mg Subst. gaben 0,201 cm³ N₂ (20°, 717 mm)

4,380 mg Subst. verbr. 9,972 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃ (Methylimid)

C₆H₁₃O₂N Ber. C 54,94 H 9,99 N 10,69 CH₃ 11,46%

Gef. „ 54,86 „ 9,91 „ 10,52 „ 11,41%

2,4-Dinitrophenyl-Derivat. Aus 80 mg der obigen Aminosäure wurde das Dinitrophenyl-Derivat hergestellt, das nach einmaligem Umkrystallisieren aus Äther-Hexan 160 mg wog, bei 184° (Zersetzung) schmolz und mit dem durch direkte saure Hydrolyse von Enniatin B erhaltenen Vergleichspräparat identisch war. Das dreimal umkrystallisierte Derivat wurde 14 Stunden bei 60° und 0,005 mm getrocknet. Smp. 186,5°.

$$[\alpha]_D^{19,5} = +489,1^0 \quad (c = 0,703 \text{ in Chloroform})$$

3,642 mg Subst. gaben 6,481 mg CO₂ und 1,654 mg H₂O

2,628 mg Subst. gaben 0,335 cm³ N₂ (19°, 719 mm)

C₁₂H₁₅O₆N₃ Ber. C 48,48 H 5,09 N 14,14%

Gef. „ 48,56 „ 5,08 „ 14,10%

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. W. Manser ausgeführt.

Zusammenfassung.

Die Konstitution von Enniatin B (C₂₂H₃₈O₆N₂), eines aus *Fusarium* Stamm ETH 4363 und Stamm ETH 1574 isolierten Antibiotikums, wurde aufgeklärt. Die saure Hydrolyse liefert 2 Mol N-Methyl-(+)-valin (III) und 2 Mol D-α-Oxy-isovaleriansäure (II), während bei der alkalischen Hydrolyse das D-α-Oxy-isovaleryl-N-methyl-(+)-valin (IV) neben dem entsprechenden Lacton, 4-Methyl-3,6-diisopropyl-2,5-dioxo-morpholin (V), entsteht. Auf Grund dieser Befunde wird dem Enniatin B die Konstitution I einer cyclischen Verbindung mit 12 Ringgliedern erteilt.

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