

Zusammenfassung.

1. Es werden analytische Methoden zur Bestimmung des Sulfathiazol- und Formaldehydgehaltes im Kondensationsprodukt aus diesen Verbindungen beschrieben. Die Bruttozusammensetzung entspricht der einfachen Azomethinverbindung. Die Eigenschaften schliessen jedoch eine solche Konstitution aus.

2. Die Herstellung und analytische Bearbeitung von Formaldehydderivaten, ausgehend von verschiedenen heterocyclisch substituierten Sulfanilamiden, wird beschrieben.

3. Während bei der Reaktion von aromatischen Aldehyden mit Sulfathiazol und 6-Sulfanilamido-2,4-dimethylpyrimidin („Elkosin“) erwartungsgemäss die entsprechenden Benzalverbindungen erhalten werden, bilden sich mit den niederen aliphatischen Aldehyden in den meisten Fällen Reaktionsprodukte, deren Alkali-unlöslichkeit gegen die Annahme von einfachen *Schiff'schen* Basen spricht.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische und Analytische Abteilung.

288. Welkstoffe und Antibiotika.

10. Mitteilung¹⁾.

Über die Konstitution von Enniatin A

von Pl. A. Plattner und U. Nager.

(20. X. 48.)

In einer früheren Mitteilung dieser Reihe²⁾ wurde ausführlich über die Isolierung eines als Enniatin A bezeichneten Antibiotikums der Zusammensetzung $C_{24}H_{42}O_6N_2$ aus zwei Fusarienstämmen (ETH 1523 und 1536) berichtet. Die ersten Versuche zum Abbau von Enniatin A, die wir bereits kurz mitgeteilt haben³⁾, führten zum Ergebnis, dass bei der salzauren Hydrolyse 2 Mol D- α -Oxy-isovaleriansäure und reichliche Mengen einer N-Methyl-aminosäure $C_7H_{15}O_2N$ entstanden, in der wir N-Methyl-leucin vermuteten. Eine quantitative Isolierung und einwandfreie Identifizierung der gesamten stickstoffhaltigen Abbauprodukte erwies sich jedoch als äusserst schwierig, da der N-Methyl-leucin-Komponente gewisse Mengen isomerer und homologer Stoffe beigemischt waren.

¹⁾ 9. Mitt. Helv. **31**, 860 (1948).

²⁾ Pl. A. Plattner, U. Nager und A. Boller, Helv. **31**, 594 (1948); vgl. auch E. Gümmer, St. Roth, L. Ettlinger, Pl. A. Plattner und U. Nager, Exper. **3**, 202 (1947).

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

Inzwischen war es uns gelungen, aus anderen Fusarienstämmen (ETH 1574 und 4363) eine homologe Verbindung $C_{22}H_{38}O_6N_2$, Enniatin B, zu isolieren, die infolge ihrer geringeren Löslichkeit in Petroläther sehr viel leichter gereinigt werden konnte. Wir hatten deshalb die vollständige Konstitutionsaufklärung vorerst mit diesem Enniatin B durchgeführt¹⁾. Enniatin B lieferte bei der sauren Hydrolyse ebenfalls 2 Mol D- α -Oxy-isovaleriansäure und daneben 2 Mol N-Methyl-L-valin²⁾. Unter Mitberücksichtigung der Resultate, die bei der alkalischen Hydrolyse erzielt wurden, schrieben wir dem Enniatin B die Struktur einer cyclischen Verbindung (I) mit 12 Ringgliedern zu.

Auf Grund dieser Erfahrungen nahmen wir die Untersuchung des hydrolytischen Abbaus von Enniatin A wieder auf, wobei streng auf die Verwendung möglichst reiner Präparate geachtet wurde.

Saure Hydrolyse: Wie erwähnt, liefert Enniatin A beim Kochen mit 20-proz. Salzsäure fast 2 Mol D- α -Oxy-isovaleriansäure (III), auf deren sichere Identifizierung im experimentellen Teil näher eingegangen wird. Die daneben in einer gleichfalls fast 2 Mol erreichen den Ausbeute anfallenden N-Methyl-aminoäuren wurden nun sorgfältig aus 50-proz. wässrigem Alkohol fraktioniert umkristallisiert und anschliessend noch sublimiert. Die analysierten Präparate wurden zusätzlich noch einer Reinheits- und Identitätsprüfung im Papierchromatogramm nach Consden unterworfen³⁾. Es zeigte sich dabei, dass die am leichtesten löslichen Anteile neben der schon früher beobachteten N-Methyl-aminoäure $C_7H_{15}O_2N$ noch erhebliche Mengen von N-Methyl-L-valin enthielten, das wir bereits als Baustein von Enniatin B gefunden hatten. Je nach Reinheit des zur Hydrolyse verwendeten Enniatins A betrug der Anteil des N-Methyl-L-valins bis etwa 20 % der gesamten Aminoäuren. Enniatin A ist demnach äusserst schwierig von seinem niedrigen Homologen zu trennen, und selbst unsere reinsten Präparate enthalten offenbar noch wesentliche Mengen von Enniatin B.

Der Hauptteil der N-Methyl-aminoäuren aus Enniatin A, der auf die Zusammensetzung $C_7H_{15}O_2N$ stimmende Analysenwerte zeigt, erwies sich auch im Papierchromatogramm als zur Gruppe der N-Methyl-leucine gehörig. Bei Behandlung dieser N-Methyl-aminoäuren mit Hypochlorit⁴⁾ wurden Methylamin als 2,4-Dinitro-N-

¹⁾ Pl. A. Plattner und U. Nager, Helv. **31**, 665 (1948).

²⁾ Für das von uns als N-Methyl-(+)-valin bezeichnete Produkt ist inzwischen von A. H. Cook, S. F. Cox und T. H. Farmer die Konfiguration eines N-Methyl-L-valins bewiesen worden [Nature **162**, 61 (1948)].

³⁾ Wir haben die hier nur kurz erwähnte, rasche und sichere Analysenmethode auf die Hydrolysenprodukte verschiedener Präparate von Enniatin A und B, ausgedehnt. Über die Resultate dieser Untersuchung wird in einer späteren Mitteilung berichtet werden.

⁴⁾ Vgl. dazu K. Langheld, B. **42**, 2360 (1909); E. Aubel und J. Asselineau, Bl. **1947**, 114.

methyl-anilin und Methyl-äthyl-acetaldehyd erhalten, der sich als rechtsdrehendes 2,4-Dinitrophenylhydrazon identifizieren liess.

Das zweite Spaltstück der sauren Hydrolyse von Enniatin A gehört demnach zur Gruppe der Isoleucine. Die Konfiguration dieser N-Methyl-aminoäure kann auf Grund der Änderung ihrer spez. Drehung beim Übergang von wässriger zu salzsaurer Lösung festgelegt werden. Nach der Regel von *Lutz* und *Jirgensons*¹⁾ wächst bei allen α -Aminoäuren der L-Reihe der Drehwert in positivem Sinne mit steigender Säurekonzentration. Ganz ähnlich verhalten sich die beiden N-Methyl-aminoäuren sicherer L-Konfiguration, die wir prüfen konnten, nämlich N-Methyl-L-leucin und N-Methyl-L-valin²⁾. Auch die N-Methyl-aminoäure C₇H₁₅O₂N aus Enniatin A zeigt in Salzsäure die positivere Drehung als in Wasser und muss demnach in bezug auf die Konfiguration des α -Kohlenstoffatoms der natürlichen L-Reihe angehören³⁾.

Tabelle 1.

Vergleich der spezifischen Drehung einiger N-Methyl-aminoäuren in Wasser bzw. Salzsäure.

	Spezifische Drehung in	
	Wasser	5-n. Salzsäure
N-Methyl-L-valin	+ 17,5°	+ 30,9°
N-Methyl-L-leucin	+ 21,4°	+ 31,3°
N-Methyl-L-isoleucin (aus Enniatin A)	+ 28,6°	+ 44,8°
N-Methyl-D-asparaginsäure ³⁾	- 16°	- 30°

Weitere Anhaltspunkte über die Konfiguration ergeben sich aus der Betrachtung der spez. Drehungen der Dinitrophenyl-Verbindungen von N-Methyl-L-valin, N-Methyl-L-leucin und der N-Methyl-aminoäure aus Enniatin A. In allen Fällen erfolgt relativ zu den freien N-Methyl-aminoäuren bei der Einführung des 2,4-Dinitrophenyl-Restes eine ausserordentlich starke Rechtsverschiebung der Drehung. Die Aminoäure aus Enniatin A fügt sich also auch hier in die „natürliche“ L-Reihe ein. Analoge Verhältnisse zeigen sich beim Übergang Aminoäure → N-Methyl-aminoäure.

Nach Versuchen von *Ehrlich*⁴⁾ entsteht bei der *Strecker*'schen Synthese, ausgehend von (+)-Methyl-äthyl-acetaldehyd, L-Isoleucin

¹⁾ *O. Lutz* und *B. Jirgensons*, B. **63**, 448 (1930); B. **64**, 1221 (1931).

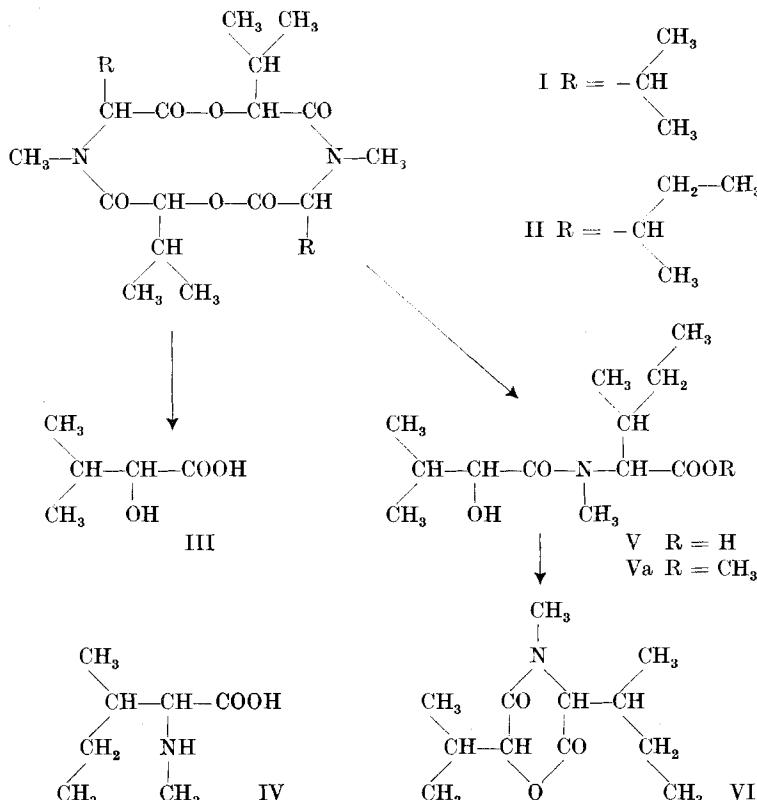
²⁾ Die erstere Verbindung wurde von uns zur Drehungsbestimmung nach *E. Fischer* und *W. Lipschitz*, B. **48**, 365 (1915) aus L-Leucin hergestellt. N-Methyl-L-valin stand uns aus dem Abbau von Enniatin B zur Verfügung. Die L-Konfiguration dieser N-Methyl-aminoäure ergibt sich aus den Versuchen von *Cook* (l. c.).

³⁾ Die N-Methyl-D-asparaginsäure, die entgegengesetztes Verhalten zeigt, wurde bereits von *Lutz* und *Jirgensons* (l. c.) untersucht.

⁴⁾ *F. Ehrlich*, B. **41**, 1453 (1908).

neben D-Allo-isoleucin. Da wir umgekehrt beim Abbau der N-Methyl-aminosäure aus Enniatin A mit Hypochlorit (+)-Methyl-äthyl-acet-aldehyd erhielten, so muss diese, nachdem deren L-Konfiguration vorne bewiesen wurde, mit N-Methyl-L-isoleucin (IV) identisch sein.

Alkalische Hydrolyse: Auch die milde alkalische Hydrolyse von Enniatin A verläuft durchaus analog mit derjenigen von Enniatin B¹⁾. Unter raschem Verbrauch von 2 Mol Alkali wird dabei ein saures Produkt V gebildet, das sich als krystallisierter Methylester Va $C_{13}H_{25}O_4N$ analysieren liess. Bei der weiteren Hydrolyse mit Salzsäure bildet dieser Methylester 1 Mol D- α -Oxy-isovaleriansäure (III) und 1 Mol N-Methyl-L-isoleucin (IV), also die gleichen Produkte, die auch bei der direkten sauren Hydrolyse von Enniatin A erhalten werden. Auch hier bildet die Säure, welche als D- α -Oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucin (V) zu formulieren ist, leicht ein Lacton, das 4-Methyl-6-isopropyl-3-sec.-butyl-2,5-dioxo-morpholin (VI).



Die Drehungsverschiebungen, welche bei den geschilderten Umsetzungen eintreten, bestätigen, wenn man sie in Parallel zu den

¹⁾ Pl. A. Plattner und U. Nager, Helv. 31, 665 (1948).

beim Abbau von Enniatin B beobachteten setzt, dass nicht nur die Konstitution der beiden Enniatine die grösste Analogie zeigt, sondern dass auch die Konfigurationen der beobachteten Verbindungen offenbar weitgehend übereinstimmen.

Tabelle 2.

Vergleich der spezifischen Drehungen von Abbauprodukten aus Enniatin A und B.

Name bzw. Formel	aus A	aus B ¹⁾
Enniatin (II) bzw. (I) . .	- 91°	- 107°
Methylester (vgl. Va) . .	- 115°	- 130°
Lacton (vgl. VI)	+ 177°	+ 160°

Auf Grund dieser Resultate ergibt sich mithin auch für Enniatin A die Struktur einer cyclischen Verbindung mit 12 Ringgliedern gemäss Formel II, wobei der Oxysäure-Komponente die „unnatürliche“ D-Konfiguration, der Aminosäure-Komponente aber die „natürliche“ L-Konfiguration zukommt.

Die Gruppe dieser Antibiotika aus Fusarien zeigt zwei auffallende Merkmale: erstens das Auftreten von N-Methyl-aminoäuren, die bis jetzt in der Natur nur selten aufgefunden wurden²⁾, und zweitens die cyclotetrapeptid-artige Struktur, wobei Aminoäuren teilweise durch Oxysäuren ersetzt sind. Besonders der letztere Befund verdient Interesse, da heute für verschiedene Antibiotika Cyclopoly-peptid-Strukturen diskutiert werden.

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

Experimenteller Teil³⁾.

A. Saure Hydrolyse.

3,18 g (7,0 Millimol) Enniatin A⁴⁾ wurden in 65 cm³ konzentrierter Salzsäure suspendiert und während $\frac{3}{4}$ Stunden auf 40° erwärmt, wobei das Enniatin teilweise in Lösung ging. Dann setzte man 65 cm³ Wasser zu und kochte 24 Stunden unter Stickstoff am Rückfluss⁵⁾. Im Verlaufe von 8 Stunden war das Enniatin vollständig gelöst. Nach beendeter Hydrolyse wurde die überschüssige Salzsäure durch Destillation im Vakuum bei 60° Badtemperatur entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und im *Kutscher-Steudel*-Apparat mit Äther extrahiert.

D- α -Oxy-isovaleriansäure (III).

Aus der getrockneten, ätherischen Lösung erhielt man nach dem Verdampfen des Lösungsmittels einen krystallinen Rückstand (1,44 g), der zur Reinigung bei 40—45°

¹⁾ *Pl. A. Plattner* und *U. Nager*, *Helv.* **31**, 665 (1948).

²⁾ Vgl. *M. Guggenheim*, Die biogenen Amine, S. 175, Basel, New York (1940).

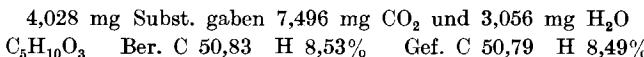
³⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert und die spez. Drehungen in einem Rohr von 1 dm Länge bestimmt.

⁴⁾ Präparat I vgl. *Helv.* **31**, 598 (1948).

⁵⁾ Vgl. *G. R. Tristram*, *Biochem. J.* **40**, 721 (1946).

(Badtemperatur) und 0,002 mm sublimiert wurde. Das farblose, krystalline Sublimat wog 1,31 g und schmolz bei 69,5—70°. Zur Analyse verwendete man ein dreimal sublimiertes Präparat vom Smp. 69—70°.

$$[\alpha]_D^{20} = -1,81^\circ \text{ (c} = 11,80 \text{ in Wasser)}$$

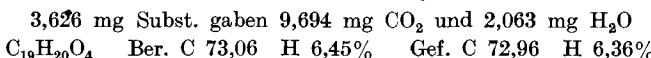


Ausbeute berechnet auf 2 Mol C₅H₁₀O₃ pro Mol Enniatin A: 79,5%; andere Hydrolysen ergaben Ausbeuten von 78 und 75%.

p-Phenyl-phenacyl-ester. 58,05 mg Säure wurden in 0,5 cm³ Wasser gelöst und mit 0,1-n. Natriumhydroxyd-Lösung auf Phenolphthalein titriert. Verbrauch: 5,025 cm³ Lauge.

$$\text{Neutralisations-Äquiv.-Gew. Ber. } 118,1 \quad \text{Gef. } 115,5$$

Aus dieser neutralen Lösung stellte man in üblicher Weise den p-Phenyl-phenacyl-ester her, der nach dreimaligem Umkristallisieren aus Äther-Hexan bei 110° schmolz. Zur Analyse wurde 14 Stunden bei 65° und 0,01 mm getrocknet.

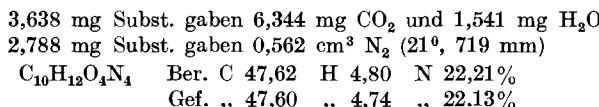


Abbau mit Blei(IV)-acetat. Zur quantitativen Bestimmung wurde die Säure in Eisessig gelöst, mit einem Überschuss an Blei(IV)-acetat in Eisessig versetzt und im Versuch 1 62 Stunden bei 39,5°, im Versuch 2 74 Stunden bei 37° stehen gelassen. Nach Zugabe von Kaliumjodid-Natriumacetat-Lösung¹⁾ wurde das freigesetzte Jod mit Natriumthiosulfat zurücktitriert und aus der Differenz mit einer Blindprobe der Verbrauch an Blei(IV)-acetat bestimmt.

1. 33,1 mg Subst. verbrauchten 0,557 Milliäquiv. Blei(IV)-acetat. Gef. 1,98 Milliäquiv.
2. 50,0 mg Subst. verbrauchten 0,846 Milliäquiv. Blei(IV)-acetat. Gef. 1,99 Milliäquiv.

Versuchsanordnung zur präparativen Erfassung des Aldehydes. Die in Eisessig gelöste Säure wurde in einem Widmer-Kolben von 300 cm³ Inhalt mit einem Überschuss (5—10%) an Blei(IV)-acetat in Eisessig versetzt und diese Mischung auf 75—80° erwärmt. Die bei der Reaktion gebildeten aldehydischen Anteile wurden mit Stickstoff ausgetrieben und in einer ersten Vorlage von Dinitrophenylhydrazin-sulfat in Äthanol absorbiert. Die Entstehung reichlicher Mengen CO₂ konnte in einer zweiten Vorlage von Bariumhydroxyd-Lösung beobachtet werden.

Isobutyraldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon. 155 mg (1,31 Millimol) Säure in 5 cm³ Eisessig gelöst wurden mit 30 cm³ Blei(IV)-acetat-Lösung (2,92 Milliäquivalente) oxydativ abgebaut. Das dabei erhaltene Dinitrophenylhydrazon (310 mg) schmolz nach dem Umkristallisieren aus Äthanol bei 182,5—183,5° und wog 230 mg. Ausbeute 70% (der Theorie). Ein viermal aus Äthanol umkristallisiertes Präparat wurde zur Analyse 13 Stunden bei 65° und 0,01 mm getrocknet. Smp. 186,5—187°. Die Mischprobe mit synthetischem Isobutyraldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon (Smp. 186—186,5°) schmolz bei 187°.



Damit ist die vorliegende Säure als α -Oxy-isovaleriansäure identifiziert.

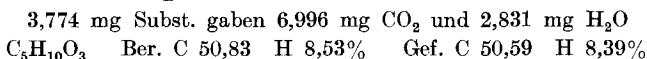
Vergleichspräparat. Die aus D-Valin durch Desaminierung mit salpetriger Säure nach Fischer und Scheibler²⁾ hergestellte D- α -Oxy-isovaleriansäure wurde aus

¹⁾ F. Knoop, F. Ditt, W. Hecksteden, J. Maier, W. Merz und R. Härtle, Z. physiol. Ch. **239**, 30 (1936).

²⁾ E. Fischer und H. Scheibler, B. **41**, 2894, 2897 (1908).

Äther-Petroläther umkristallisiert und dreimal bei 50° und 0,005 mm sublimiert. Smp. 69—69,5°.

$$[\alpha]_D^{24} = -1,92^\circ \text{ (c} = 12,05 \text{ in Wasser)}$$



Diese Säure, sowie ihr Phenyl-phenacylester erwiesen sich als identisch mit den aus Enniatin A nach Hydrolyse erhaltenen Präparaten.

N-Methyl-L-isoleucin (IV).

Überführung der Hydrochloride in die freie Aminosäure IV.

Nach der Extraktion mit Äther wurde die verbleibende wässrige Lösung im Vakuum bei 60° Badtemperatur zur Trockene verdampft und die überschüssige Salzsäure durch wiederholtes Aufnehmen des Rückstandes in Wasser und Einengen in üblicher Weise entfernt. Die grösstenteils kristallinen Hydrochloride¹⁾ wogen 2,96 g (ber. für 2 Mol C₇H₁₆O₂NCl pro Mol Enniatin 2,54 g). Sie wurden in Wasser aufgenommen und auf 25 cm³ verdünnt.

Eine Probe dieser Lösung verwendete man für ein Chromatogramm auf Filterpapier. Die Chromatogramme wurden nach der von *Consden* und Mitarbeitern²⁾ beschriebenen Methode mit *Whatman* Nr. 1 Filterpapier ausgeführt. Als mobile Phase wurde mit Wasser gesättigtes Collidin (technisches Collidin aus Basen des Steinkohlenteers, Sdp. ₁₇ 63—66°) verwendet. Ein Zwei-Phasengemisch Wasser-Collidin im unteren Trog des Gefäßes, dem 0,1% Diäthylamin und etwas Natriumcyanid zugesetzt war, sorgte für die Aufrechterhaltung einer konstanten Atmosphäre im abgeschlossenen System. Es ergab sich, dass neben der Aminosäure IV, C₇H₁₆O₂N (R_F = 0,51), geringe Mengen N-Methyl-L-valin, C₆H₁₃O₂N (R_F = 0,39) vorliegen (vgl. Tabelle 3, Nr. 1 und 6).

Aus 21 cm³ der wässrigen Lösung der Hydrochloride (s. oben) wurden durch Umsetzung mit Silbercarbonat die freien Aminosäuren hergestellt.

Fraktionierte Krystallisation der Aminosäuren IV. Die rohen Aminosäuren (1,61 g) löste man in 22 cm³ siedendem Wasser und versetzte mit der gleichen Menge Äthanol. Nach längerem Stehen in der Kälte entstand ein krystalliner Niederschlag. Von diesem wurde abfiltriert (Fraktion I), das Filtrat bis zur erneuten Krystallisation konzentriert und mit Äthanol versetzt (Fraktion II). Nach Entfernung der Fraktion II wurde schliesslich durch Eindampfen der Mutterlauge die Fraktion III erhalten. Die Fraktionen I bis III wurden dann bei 150° (Badtemperatur) und 0,001 mm sublimiert.

Sublimat I 545 mg, $[\alpha]_D^{23,5} = +45,2^\circ$ (c = 1,041 in 5-n. HCl)

Sublimat II 390 mg, $[\alpha]_D^{20,5} = +24,7^\circ$ (c = 1,074 in 5-n. HCl)

Sublimat III 525 mg, $[\alpha]_D^{22} = +24,3^\circ$ (c = 1,135 in 5-n. HCl)

Gesamtausbeute an sublimierten Aminosäuren: 85,5% (ber. für 2 Mol C₇H₁₆O₂N pro Mol Enniatin A).

Die R_F-Werte der in feinen Nadelchen krystallisierten Sublimate sind in der Tabelle 3 (Nr. 2 bis 4) zusammengestellt.

Es geht daraus eindeutig hervor, dass sich die Verunreinigung, N-Methyl-L-valin, beim Umkristallisieren der Aminosäuren aus Enniatin A in der Mutterlauge — also im Sublimat III — angereichert hat. Das Sublimat I wurde zur Analyse noch zweimal bei 140—150° und 0,002 mm sublimiert.

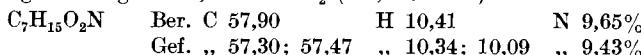
¹⁾ Physikalische und chemische Eigenschaften gereinigter Hydrochloride aus Enniatin A haben wir schon an anderer Stelle mitgeteilt; vgl. *Pl. A. Plattner und U. Nager, Exper. 3, 325 (1947)*.

²⁾ *R. Consden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, Biochem. J. 38, 244 (1944).*

$$[\alpha]_D^{22} = +44,8^\circ \text{ (c = 1,162 in 5-n. Salzsäure)}$$

$$[\alpha]_D^{22} = +28,6^\circ \text{ (c = 1,034 in Wasser)}$$

3,548; 3,642 mg Subst. gaben 7,450; 7,670 mg CO₂ und 3,280; 3,285 mg H₂O
4,454 mg Subst. gaben 0,380 cm³ N₂ (21°, 723 mm)



N-2,4-Dinitrophenyl-Derivat. Aus 145 mg Sublimat I wurde nach Sanger³⁾ das Dinitrophenyl-Derivat hergestellt, das beim Umlösen aus Äther-Hexan lange, gelbe Nadeln (180 mg) bildete. Zur Analyse wurde ein dreimal umkristallisiertes Präparat vom Smp. 150° 15 Stunden bei 64° und 0,005 mm getrocknet.

$$[\alpha]_D^{22,5} = +499,0^\circ \text{ (c = 0,791 in Chloroform)}$$

3,702 mg Subst. gaben 6,778 mg CO₂ und 1,813 mg H₂O

2,862 mg Subst. gaben 0,343 cm³ N₂ (19°, 723 mm)

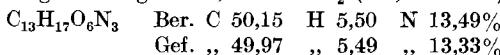


Tabelle 3.

Chromatographie auf Filtrierpapier mit Collidin. R_F-Werte.

N-Methyl-L-isoleucin (Enniatin A)		
1. rohes Hydrochlorid	0,39 schwach	0,51
2. Sublimat I	—	0,50
3. Sublimat II	—	0,49
4. Sublimat III	0,39 schwach	0,50
5. Sublimat IV ¹⁾	—	0,49
6. N-Methyl-L-valin (Enniatin B)	0,40	—
7. N-Methyl-L-leucin (synthetisch) ²⁾ . .	—	0,50

Abbau mit Hypochlorit⁴⁾.

Apparatur. Ein Destillierkolben (A) von 200 cm³ Inhalt wird mittelst eines doppelt durchlochten Gummistopfens mit einem Einleitungsrohr für Stickstoff sowie einem Reagensglas mit Hahn (B) versehen. Der seitliche Ansatz des Destillierkolbens (A), der im rechten Winkel abgebogen ist, wird am Ende zu einer Kapillare von etwa 2 mm Lumen ausgezogen und reicht in einen mit Gummistopfen verschlossenen Langhalsrundkolben (C) von 100 cm³ Inhalt. Der Kolben C seinerseits ist durch ein U-Rohr mit einem weiteren Gefäß D (Erlenmeyer-Kolben oder grosses Reagensglas) verbunden.

Ausführung der Versuche. Die zu untersuchende Aminosäure wird je nach Löslichkeit in Wasser oder verdünnter Natronlauge aufgenommen und in das Reagensglas B, das aussen mit Eis gekühlt ist, eingefüllt. Man versetzt nun die auf 0° gebrachte Lösung mit einem Äquivalent Natriumhydroxyd und der berechneten Menge Natriumhypochlorit und lässt 10 Minuten reagieren. Wurde zum Lösen der Aminosäure Natronlauge verwendet, so wird diese jetzt durch Zusatz einer äquivalenten Menge Essigsäure

¹⁾ Erhalten aus salzsaurer Hydrolyse des Methylesters (Va).

²⁾ Synthese vgl. S. 2200.

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

⁴⁾ Vgl. dazu K. Langheld, B. **42**, 2360 (1909); E. Aubel und J. Asselineau, Bl. **1947**,

neutralisiert. Unterdessen ist im Kolben A befindliches Wasser durch ein auf 110—120° geheiztes Ölbad zum Sieden gebracht worden. Im Kolben C ist eine bestimmte Menge 0,1-n. Schwefelsäure vorgelegt, die ebenfalls auf 80—90° erwärmt wird. Die zweite Vorlage (Gefäß D) besteht aus 2,4-Dinitrophenylhydrazin, gelöst in 2-n. Salzsäure. Durch Öffnen des Hahns am Reagensglas B wird die N-Chlor-aminosäure langsam in den Kolben A eingetropft (1 Tropfen pro Sekunde), wo sie durch den Wasserdampf momentan zerstellt wird. Zum Transport der flüchtigen Zersetzungprodukte, woraus in der ersten Vorlage die basischen, in der zweiten die aldehydischen Anteile absorbiert werden, leitet man einen Stickstoff-Strom durch die Apparatur. Nach beendeter Zersetzung (Dauer etwa 10 Minuten) spült man noch weitere 10 bis 15 Minuten mit Stickstoff nach.

Die in der ersten Vorlage aufgefangenen Amine bestimmt man acidimetrisch und führt sie mit 2,4-Dinitrofluorbenzol in krystallisierte Derivate über.

Behandlung der Aminosäure IV mit Hypochlorit. 130 mg (0,9 Millimol) Sublimat I wurden mit 0,93 Milliäquivalenten Natriumhypochlorit abgebaut.

a) Methyl-amin. Die Rücktitration der vorgelegten Säure ergab einen 0,4 Milliäquivalent Amin entsprechenden Verbrauch. Die neutrale Lösung behandelte man nach dem Einengen im Vakuum mit Dinitrofluorbenzol und Natriumhydrogencarbonat¹⁾. Das ausgefallene, krystalline 2,4-Dinitro-N-methyl-anilin wurde abfiltriert und mit kaltem Äthanol gewaschen. Aus Äthanol umkrystallisiert erhielt man dicke, gelbe Nadeln (70 mg) vom Smp. 183°.

Mischproben mit analysierten Vergleichspräparaten, die aus Methyl-amin-hydrochlorid und durch Hypochlorit-Abbau aus Sarkosin hergestellt waren, ergaben keine Schmelzpunktserniedrigungen, während der Mischschmelzpunkt mit 2,4-Dinitranilin (Smp. 185°) bei 160—166° lag. Zur Analyse wurde zweimal bei 115° und 0,002 mm sublimiert.

3,738 mg Subst. gaben 5,823 mg CO₂ und 1,165 mg H₂O

2,760 mg Subst. gaben 0,534 cm³ N₂ (21°, 723 mm)

C₁₁H₁₄O₄N₃ Ber. C 42,64 H 3,58 N 21,32%

Gef. „ 42,52 „ 3,49 „ 21,38%

b) Methyl-äthyl-acetaldehyd. Das in der zweiten Vorlage ausgefallene, rohe 2,4-Dinitrophenylhydrazone (185 mg) wurde vor der Analyse dreimal aus Äthanol umkrystallisiert (Ausbeute nach der ersten Krystallisation: 69%) und 15 Stunden bei 65° und 0,002 mm getrocknet. Das in orangen Blättchen erhaltene Derivat schmolz bei 133,5°. Der Mischschmelzpunkt mit einem analysierten Vergleichspräparat (Smp. 133°), das durch Hypochlorit-Abbau aus L-Isoleucin erhalten worden war, lag bei 133°. Bei Zusammensetzung von analog hergestelltem Isovaleraldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazone (Smp. 127,5°) wurde eine Schmelzpunktserniedrigung von 11° beobachtet.

$[\alpha]_D^{22} = +19,9^\circ$ (c = 0,730 in Chloroform)

3,764 mg Subst. gaben 6,847 mg CO₂ und 1,767 mg H₂O

2,650 mg Subst. gaben 0,502 cm³ N₂ (22°, 726 mm)

C₁₁H₁₄O₄N₄ Ber. C 49,62 H 5,30 N 21,04%

Gef. „ 49,65 „ 5,25 „ 20,93%

Synthese von N-Methyl-L-leucin.

Zum Vergleich mit der aus Enniatin A isolierten Aminosäure (IV) wurde nach Fischer und Lipschitz²⁾ N-Methyl-L-leucin hergestellt und zur Analyse zweimal bei 135—140° und 0,005 mm sublimiert.

$[\alpha]_D^{15} = +31,3^\circ$ (c = 0,858 in 5-n. Salzsäure)

$[\alpha]_D^{15} = +21,4^\circ$ (c = 0,770 in Wasser)

¹⁾ Vgl. F. Sanger, *i. c.*

²⁾ E. Fischer und W. Lipschitz, B. **48**, 365 (1915); vgl. auch M. Blanchard, D. E. Green, V. Nocito und S. Ratner, J. Biol. Chem. **155**, 421 (1944).

3,784 mg Subst. gaben 8,023 mg CO₂ und 3,490 mg H₂O

2,904 mg Subst. gaben 0,251 cm³ N₂ (19°, 730 mm)

C₇H₁₅O₂N Ber. C 57,90 H 10,41 N 9,65%

Gef. „ 57,86 „ 10,32 „ 9,71%

N-Methyl-L-leucin gibt mit p-Nitrobenzoylchlorid in Pyridin (Farbreaktion nach Waser) die gleiche intensive Rotfärbung, wie sie bei den N-Methyl-aminosäuren aus Enniatin A und B beobachtet wird.

2,4-Dinitrophenyl-N-methyl-L-leucin. Das in üblicher Weise hergestellte Derivat schmolz nach dreimaligem Umkristallisieren aus Äther-Hexan bei 152°. Zur Analyse wurde 20 Stunden bei 55° und 0,002 mm getrocknet.

[α]_D¹⁹ = +563,5° (c = 0,754 in Chloroform)

3,755 mg Subst. gaben 6,931 mg CO₂ und 1,821 mg H₂O

2,868 mg Subst. gaben 0,337 cm³ N₂ (18°, 729 mm)

C₁₃H₁₇O₆N₃ Ber. C 50,15 H 5,50 N 13,49%

Gef. „ 50,37 „ 5,43 „ 13,22%

Der Mischschmelzpunkt mit dem Dinitrophenyl-Derivat der Aminosäure IV aus Enniatin A (Smp. 150°) lag bei 133—134,5°.

B. Alkalische Hydrolyse.

Vorversuche zur Ermittlung der Hydrolysenbedingungen ergaben, dass Enniatin A schon bei Zimmertemperatur rasch zwei Äquivalente Lauge pro Mol verbraucht und gleichzeitig seine antibakterielle Wirkung verliert. Aus dem alkalischen Hydrolysat liessen sich weder leichtflüchtige Säuren noch Basen isolieren.

909 mg (2,0 Millimol) Enniatin A (Präparat I aus Fusarium Stamm ETH. 1523¹⁾) wurden in 25 cm³ Methanol gelöst und nach Zusatz von 25 cm³ 0,191-n. Bariumhydroxyd-Lösung 4 Stunden bei Zimmertemperatur unter Stickstoff hydrolysiert. Verbrauch an Lauge 4,014 Milliäquivalente.

(C₁₂H₂₁O₃N)₂ Äquiv.-Gew. Ber. 227,29 Gef. 226,5

Nach Beendigung der Hydrolyse wurde das Methanol im Vakuum abdestilliert und die verbleibende wässrige Lösung nach Zugabe von 4,4 Milliäquivalenten Schwefelsäure im Kutscher-Stedel-Apparat mit Äther extrahiert. Nach dem Verdampfen des Äthers erhielt man als Rückstand 975 mg eines farblosen, viskosen Öls, das eine deutlich saure Reaktion zeigte. Es war in Äther sehr gut, in Wasser nur mässig löslich.

Lacton des D-α-Oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucins; 4-Methyl-6-isopropyl-3-sec. butyl-2,5-dioxo-morpholin (VI).

100 mg dieses rohen, sauren Hydrolysenproduktes wurden dreimal bei 75—78° (Blocktemperatur) und 0,005 mm destilliert.

[α]_D¹⁷ = +176,6° (c = 1,212 in Chloroform)²⁾

3,383 mg Subst. gaben 7,868 mg CO₂ und 2,813 mg H₂O

5,020 mg Subst. gaben 0,285 cm³ N₂ (19°, 714 mm)

C₁₂H₂₁O₃N Ber. C 63,41 H 9,31 N 6,16%

Gef. „ 63,47 „ 9,30 „ 6,23%

Das Lacton zeigte keine antibakteriellen Eigenschaften.

¹⁾ Pl. A. Plattner und U. Nager, Helv. 31, 598 (1948).

²⁾ Das entsprechende Lacton aus Enniatin B hatte die spezifische Drehung [α]_D²² = +160,4° (c = 0,973 in Chloroform).

D- α -Oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucin-methylester (Va).

860 mg der Produkte der alkalischen Hydrolyse von Enniatin A wurden in trockenem Äther mit Diazomethan methyliert. Der erhaltene Methylester (845 mg) krystallisierte in langen, farblosen Nadeln und schmolz nach dreimaliger Sublimation (70° und 0,005 mm) bei 98—98,5°.

$$[\alpha]_D^{18,5} = -114,9^\circ \text{ (c} = 1,376 \text{ in Chloroform)}$$

3,944 mg Subst. gaben 8,724 mg CO₂ und 3,464 mg H₂O

2,804 mg Subst. gaben 0,137 cm³ N₂ (19°, 714 mm)

C₁₃H₂₅O₄N Ber. C 60,20 H 9,72 N 5,40%

Gef. „, 60,36 „, 9,83 „, 5,36%

Behandlung des Methylesters mit Hydrazinhydrat in Methanol lieferte nur ölige Reaktionsprodukte. Ein krystallisiertes Hydrazid konnte in diesem Falle nicht gefasst werden.

Salzsäure Hydrolyse des D- α -Oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucin-methylesters (Va).

462 mg (1,78 Millimol) Methylester Va wurden in 15 cm³ konstant siedender Salzsäure 24 Stunden am Rückfluss gekocht. Anschliessend wurde die Salzsäure im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und im *Kutscher-Steudel*-Apparat mit Äther extrahiert. Die daraus durch Sublimation isolierte D- α -Oxy-isovaleriansäure schmolz bei 69—69,3° und wog 180 mg (Ausbeute 86%). Nach Schmelzpunkt und Mischprobe erwies sie sich als identisch mit der durch direkte saure Hydrolyse von Enniatin A erhaltenen Oxsäure. Analysiert wurde ein dreimal bei 40—50° (Blocktemperatur) und 0,005 mm sublimiertes Präparat vom Smp. 69,5°.

3,720 mg Subst. gaben 6,920 mg CO₂ und 2,823 mg H₂O

C₅H₁₀O₃ Ber. C 50,83 H 8,53% Gef. C 50,76 H 8,49%

Die nach der Extraktion mit Äther verbleibende wässrige Lösung wurde im Vakuum konzentriert und der Rückstand in üblicher Weise zur Gewichtskonstanz gebracht. Die krystallinen Hydrochloride wogen 378 mg (ber. 324 mg) und wurden durch Umsetzung mit Silbercarbonat in die freie Aminosäure, N-Methyl-L-isoleucin, übergeführt. Ausbeute: 225 mg (87% der Theorie). Zur Analyse wurde dreimal bei 135—140° (Ölbadtemperatur) und 0,005 mm sublimiert (vgl. Tab. 3, Sublimat IV).

$$[\alpha]_D^{18,5} = +40,4^\circ \text{ (c} = 1,176 \text{ in 5-n. Salzsäure)}$$

3,704 mg Subst. gaben 7,811 mg CO₂ und 3,414 mg H₂O

2,490 mg Subst. gaben 0,215 cm³ N₂ (19°, 714 mm)

C₇H₁₅O₂N Ber. C 57,90 H 10,41 N 9,65%

Gef. „, 57,54 „, 10,31 „, 9,48%

Das 2,4-Dinitrophenyl-Derivat schmolz bei 150,5—151,5° und war nach Mischprobe mit dem durch direkte saure Hydrolyse von Enniatin A erhaltenen Vergleichspräparat identisch. Das dreimal umkrystallisierte Derivat wurde vor der Analyse 14 Stunden bei 60° und 0,005 mm getrocknet. Smp. 152° (Zersetzung).

$$[\alpha]_D^{19,5} = +495,7^\circ \text{ (c} = 0,741 \text{ in Chloroform)}$$

3,622 mg Subst. gaben 6,664 mg CO₂ und 1,723 mg H₂O

2,286 mg Subst. gaben 0,278 cm³ N₂ (20°, 717 mm)

C₁₃H₁₇O₆N₃ Ber. C 50,15 H 5,50 N 13,49%

Gef. „, 50,21 „, 5,32 „, 13,36%

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

Zusammenfassung.

Die Konstitution von Enniatin A ($C_{24}H_{42}O_6N_2$), eines aus *Fusarium* Stamm ETH 1523 und Stamm ETH 1536 isolierten Antibiotikums, wurde aufgeklärt. Die saure Hydrolyse liefert 2 Mol N-Methyl-L-isoleucin (IV) und 2 Mol D- α -Oxy-isovaleriansäure (III), während bei der alkalischen Hydrolyse das D- α -Oxy-isovaleryl-N-methyl-L-isoleucin (V) neben dem entsprechenden Lacton, 4-Methyl-6-isopropyl-3-sec. butyl-2,5-dioxo-morpholin (VI) entsteht. Enniatin A besitzt demnach die Konstitution II einer cyclischen Verbindung mit 12 Ringgliedern und gehört zur gleichen Gruppe neuartiger Stoffe, wie das früher aufgeklärte homologe Enniatin B (I).

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

289. Welkstoffe und Antibiotika.

11. Mitteilung¹⁾.

Analyse und Charakterisierung der Enniatine. Über das Verhalten von N-Methyl-aminosäuren im Papierchromatogramm

von Pl. A. Plattner und U. Nager.

(20. X. 48.)

Beim Abbau der von uns als Enniatin A und B bezeichneten Antibiotika aus Fusarien haben wir N-Methyl-L-isoleucin bzw. N-Methyl-L-valin als Spaltstücke erhalten²⁾. Diese N-Methyl-aminosäuren sind bis jetzt in der Natur nicht beobachtet worden, und ihr Verhalten im Papierchromatogramm nach Consden³⁾, der heute erfolgreichsten Trennungs- und Analysenmethode für α -Aminosäuren und niedere Peptide, war nicht bekannt.

Dies veranlasste uns, einige systematische Versuche in dieser Richtung mit Sarkosin und den N-Monomethyl-Verbindungen von DL-Valin, L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin durchzuführen.

In dem für α -Aminosäuren sonst gebräuchlichsten Lösungsmittel, Phenol, liegen die R_F -Werte⁴⁾ von Sarkosin (0,80) und N-Methyl-L-leucin (0,95) sehr nahe beisammen, so dass in dieser Weise keine glatte Trennung zu erzielen war. In Collidin gelingt es dagegen,

¹⁾ 10. Mitt. Helv. **31**, 2192 (1948).

²⁾ Pl. A. Plattner und U. Nager, Helv. **31**, 665 (1948); Helv. **31**, 2192 (1948).

³⁾ R. Consden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, Biochem. J. **38**, 224 (1944). R. Consden, Nature, **162**, 359 (1948).

⁴⁾ Wanderungsgeschwindigkeit relativ zur Lösungsmittelfront.