

## 67. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

75. Mitteilung [1]

### Synthese des Ferrichroms; 2. Teil

von W. Keller-Schierlein und B. Maurer

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

(22. I. 69)

*Summary.* Ferrichrome, a biologically active sideramine isolated from cultures of several strains of fungi, was synthesized starting from  $\delta$ -nitro-L-norvaline and glycine. The intermediate trinitro-cyclohexapeptide **17** could be obtained in high yield by SCHWYZER's method from the corresponding open-chain hexapeptide **16**.

Das Ferrichrom ist der einfachste Vertreter einer Gruppe von Sideraminen, die häufig als biologisch aktive Eisenkomplexe in Pilzkulturen aufgefunden werden [2]. Seine Konstitutionsformel (**1**) geht aus Arbeiten von NEILANDS und Mitarbeitern hervor [3]. Die Aminosäuresequenz gemäss Formel **1** folgt aus der Identifizierung eines Reduktionsprodukts des Ferrichroms mit einem synthetischen Cyclohexapeptid [4]. Andererseits wurden die Konstitutionsformeln einiger verwandter Sideramine, des Ferrichrysins (**2**), des Ferrirhodins (**3**) und des Ferrirubins (**4**) aus Abbauergebnissen sowie aus ihrer Verknüpfung mit dem Ferrichrom A (**5**) abgeleitet [5], von dem eine Kristallstrukturanalyse vorliegt [6] und dessen Aminosäuresequenz mit Resultaten eines biologischen Abbaus vereinbar ist [7]<sup>1)</sup>.

Während die Ferrioxamine, eine wesentlich anders gebaute Gruppe von Sideraminen, die in Kulturen von Actinomyceten [2] und Bakterien [8] aufgefunden wurden, schon seit mehreren Jahren synthetisch zugänglich sind [9], liegen für Sideramine vom Typus des Ferrichroms bisher keine Synthesen vor. In dieser Mitteilung wird über die erste Synthese des Ferrichroms (**1**) berichtet.

Dem Plan der Synthese liegt die Vermutung zugrunde, dass die Hydroxylamino- oder die säureempfindlichen Hydroxamsäuregruppen die Reaktionen einer Peptidsynthese kaum unbeschadet überstehen würden. Wir haben daher zunächst, ausgehend vom  $\delta$ -Nitro-L-norvalin (**6**) [1], das Trinitro-cyclohexapeptid **17** nach dem Schema I über die Zwischenstufen **7** bis **17** aufgebaut. Die angegebene Wahl der Aminosäure-Reihenfolge im offenen Hexapeptid **14** ermöglichte es, den Ringschluss zwischen zwei Glycinresten durchzuführen und dadurch eine teilweise Racemisierung an der aktivierten Gruppe während des Cyclisierungsschrittes zu vermeiden. Als Amino-Schutzgruppe wurde durchgehend die *t*-Butoxycarbonyl-Gruppe (BOC) gewählt, weil eine hydrogenolytische Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe wegen der leichten Reduzierbarkeit der Nitrogruppe nicht in Betracht gezogen werden konnte. Die Aktivierung der Carboxylgruppen erfolgte auf allen Stufen mit Ausnahme

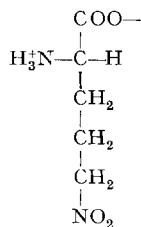
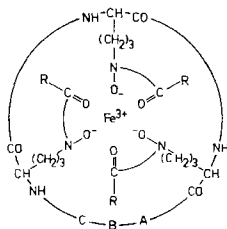
<sup>1)</sup> In älteren Abhandlungen aus unserem Laboratorium [5] wurde eine andere Aminosäuresequenz bevorzugt. Hingegen wurde in einem Übersichtsreferat [2] die Sequenzbestimmung des Ferrichroms A berücksichtigt.

der Cyclisierung über gemischte Anhydride, die mittels Chlorameisensäure-isobutylester hergestellt wurden [10]. Bei der Verwendung von Dicyclohexyl-carbodiimid zur Herstellung des Zwischenproduktes **7** wurden erheblich kleinere Ausbeuten erzielt.

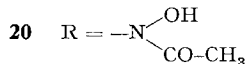
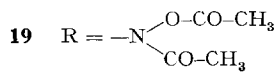
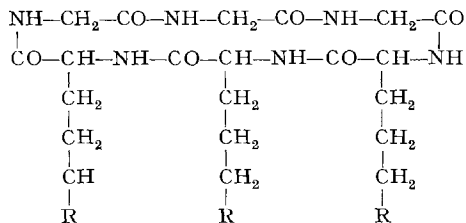
Die Hydrolyse des geschützten Hexapeptid-methylesters **13** mit wässriger Natriumcarbonatlösung bei Raumtemperatur gab nahezu quantitativ die einheitliche Säure **14**. Wenn die Verseifung dagegen mit verd. Natronlauge durchgeführt wurde, so bildeten sich mehrere Nebenprodukte, wie dünnschichtchromatographisch nachgewiesen wurde.

Mehrere Zwischenprodukte konnten durch Kristallisation gereinigt werden und gaben nach katalytischer Reduktion der Nitrogruppen bei der Hydrolyse optisch reines L-Ornithin. Die stereochemische Einheitlichkeit ist dadurch gesichert. Die Reinheit der Produkte wurde weiter durch Dünnschichtchromatogramme und NMR.-Spektren geprüft.

Für die Cyclisierung des Hexapeptids wählten wir die Methode der aktiven Ester [11], die sich u.a. bei der Synthese des Gramacidins S [12] bewährt hat. Das rohe Trinitro-cyclohexapeptid **17** wurde bei Anwendung des Prinzips der hohen Verdünnung mit der überraschend guten Ausbeute von 70–80% erhalten. Es bildet ein in den meisten Lösungsmitteln äusserst schwerlösliches graues Pulver, das sich nicht kristallisieren liess. Da es sich bei der Dünnschichtchromatographie einheitlich verhielt (in den Mutterlaugen waren dagegen mehrere Nebenprodukte nachweisbar) und die spektroskopischen Daten mit der erwarteten Struktur vereinbar waren, wurde es ohne Reinigung mit Zinkstaub in alkoholisch-wässriger Ammoniumchloridlösung

**6****17** R = –NO<sub>2</sub>**18** R = –NHOH

	R	A	B	C	
Ferrichrom:	CH <sub>3</sub>	Gly	Gly	Gly	(1)
Ferrichrysin:	CH <sub>3</sub>	Ser	Ser	Gly	(2)
Ferrirhodin:	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{C} = \text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \backslash \quad / \\ \quad \quad \quad \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	Ser	Ser	Gly	(3)
Ferrirubin:	$\begin{array}{c} \quad \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad / \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{C} = \text{C} \\ \quad \quad \quad \backslash \quad / \\ \quad \quad \quad \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	Ser	Ser	Gly	(4)
Ferrichrom A:	$\begin{array}{c} \quad \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad / \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{C} = \text{C} \\ \quad \quad \quad \backslash \quad / \\ \quad \quad \quad \text{CH}_2 - \text{COOH} \end{array}$	Ser	Ser	Gly	(5)





Schema II

Gly	NO <sub>2</sub> -Norval	NO <sub>2</sub> -Norval	NO <sub>2</sub> -Norval	Gly	Gly
BOC—OH	H—OCH <sub>3</sub>				
BOC—	—OCH <sub>3</sub>				
BOC—	—OH	H—OCH <sub>3</sub>			
BOC—		—OCH <sub>3</sub>			
BOC—		—OH	H—OCH <sub>3</sub>		
BOC—			—OCH <sub>3</sub>		
BOC—			—OH	H—	—OCH <sub>3</sub>
BOC—					—OCH <sub>3</sub> (13a)
BOC—					—OH (14a)
BOC—					—O- <i>p</i> NPh (15a)
H—					—O- <i>p</i> NPh (16a)

Abkürzungen wie im Schema I.

Da wir anfänglich Mühe hatten, das BOC-Derivat des  $\delta$ -Nitro-L-norvalins in befriedigender Ausbeute herzustellen [1], wurde zunächst versucht, den Peptidaufbau nach dem Schema II durchzuführen. Da in der Literatur Angaben zu finden sind, wonach die Methode der gemischten Anhydride bei Verwendung von Chlorameisensäure-isobutylester und N-Methylmorpholin weitgehend ohne Racemisierung verlaufen soll [14], hofften wir, auf diesem Weg einfacher zum Ziel zu gelangen. Sämtliche im Schema II aufgeführten Zwischenprodukte bildeten aber nicht kristallisierbare Harze, obwohl bei mehreren Stufen eine chromatographische Reinigung eingeschaltet wurde. Das geschützte Hexapeptid **13a** zeigte bei mehreren Versuchen schwankende optische Drehungen, die weit unter den für die reine Verbindung **13** gefundenen lagen ( $-5$  bis  $-20^\circ$  gegenüber  $-26,6^\circ$ ), und gab bei der Reduktion und Totalhydrolyse teilweise racemisches Ornithin. Die Cyclisierung des aktivierten Hexapeptids **16a** und die anschliessende Weiterverarbeitung führte in sehr schlechter Ausbeute (ca. 1%) zu einem Eisenkomplex, der zwar bei der Dünnschicht- und Papierchromatographie die Rf-Werte des Ferrichroms besass, aber nur eine etwa halb so grosse optische Drehung zeigte wie der Naturstoff. Es scheint uns interessant zu sein, dass dieses Diastereomeren-gemisch trotzdem ca. 80% der biologischen Wirkung des Ferrichroms besass.

Der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil

**Allgemeines.** Die Absorptionsspektren im Sichtbaren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer, Modell 137, die IR.-Absorptionsspektren mit einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer, Modell Infracord, aufgenommen. Die NMR.-Spektren wurden mit einem VARIAN-Spektrometer, Modell A 60, gemessen; die chemischen Verschiebungen gegenüber Tetramethylsilan als internem Standard sind in  $\delta$ -Einheiten, die Kopplungskonstanten ( $J$ ) in cps angegeben. Es bedeuten:  $s$  = Singulett,  $d$  = Dublett,  $t$  = Triplett,  $b$  = breiter nicht aufgelöster Signalhaufen,  $k$  = komplex aufgespaltene Signalgruppe. Die optischen Drehungen wurden in einem 1-dm-Rohr mit einem lichtelektrischen ZEISS-Polarimeter bestimmt.

Die Smp. wurden in einer offenen Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Zur Analyse wurden alle Präparate 3 Tage im Hochvakuum getrocknet, im Schweinchen eingewogen und über  $P_2O_5$  nachgetrocknet. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten F<sub>254</sub> (MERCK) und für die Papierchromatographie WHATMAN-Papier Nr. 1 verwendet. Die Dünnschichtchromatogramme wurden mit Joddampf entwickelt. Für Aminosäuren und Peptide mit freier Aminogruppe diente zudem eine 0,1-proz. Lösung von Ninhydrin in Chloroform unter Zusatz von 0,1% 2,6-Lutidin als Sprühreagens.

**Kopplungsreaktion** [10]. Die *t*-Butyloxycarbonyl-aminosäure wurde in der 15–20fachen Menge frisch über Lithiumaluminiumhydrid destilliertem Tetrahydrofuran gelöst und mit der  $1\frac{1}{2}$ -fachen molaren Menge N-Methylmorpholin versetzt. Durch Zugabe von einem Äquivalent Chlorameisensäure-isobutylester in wenig Tetrahydrofuran bei  $-10^\circ$  wurde das gemischte Anhydrid bereitet. Nach 10 Min. Rühren bei  $-10^\circ$  wurde eine äquimolare Menge Peptid-methylester, gelöst in Dimethylformamid, zugegeben und das Gemisch bei Zimmertemperatur 15 Std. gerührt. Falls die Aminokomponente als Hydrochlorid vorlag, wurde der Lösung in Dimethylformamid zudem die  $1\frac{1}{2}$ -fache molare Menge N-Methylmorpholin zugegeben. Die Reaktionslösung wurde vom N-Methylmorpholin-hydrochlorid abfiltriert, im Vakuum bei  $60^\circ$  eingedampft und der Rückstand in der 200–500fachen Menge Essigester (beim Penta- und Hexapeptid in Essigester-Butanol 3:1) gelöst. Dann wurde mit 10-proz. wässriger Zitronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft.

**Abspaltung der BOC-Schutzgruppe** [15]. Die BOC-Polypeptid-methylester wurden in der 15–20fachen Menge 1,2-Dimethoxyäthan (frisch über Lithiumaluminiumhydrid destilliert) gelöst oder suspendiert. Bei  $20^\circ$  wurde das gleiche Volumen einer bei  $0^\circ$  gesättigten Lösung von trockenem Chlorwasserstoff in 1,2-Dimethoxyäthan (ca. 7 N) hinzugefügt und unter Feuchtigkeitsausschluss 2 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde der Rückstand noch zweimal mit etwas 1,2-Dimethoxyäthan zur Trockene eingedampft.

**BOC- $\delta$ -Nitro-L-norvalyl-glycyl-glycin-methylester (7).** Aus 3,17 g (12,1 mMol) BOC- $\delta$ -Nitro-L-norvalin [1] und 2,5 g (17,1 mMol) frisch bereitetem Glycylglycin-methylester [16] wurden nach der allgemeinen Vorschrift (s. oben) 4,1 g (87% d. Th.) des Methylesters **7** als chromatographisch einheitliches farbloses Öl erhalten. Für die Aufnahme der Spektren wurde eine Probe an der 200-fachen Menge Kieselgel mit Äthylacetat-Aceton 3:1 chromatographiert.  $[\alpha]_D = -5,5^\circ$  ( $c = 1$  in Methanol). IR.-Absorptionsspektrum in Chlf.:  $\nu_{max}$  3370, 2280, 1740, 1700, 1670, 1550  $cm^{-1}$ . NMR.-Spektrum in  $CDCl_3$ :  $\delta$  1,44 ppm (s, 9 H), 1,67–2,35 ( $b$ , 4 H), 3,75 ( $s$ , 3 H), 4,05 (verbreitertes  $d$ ,  $J = 5,5$  cps, 4 H), 4,25–4,65 ( $k$ , 3 H), 5,78 (verbreitertes  $d$ ,  $J = 8$ , 1 H), 7,35 (verbreitertes  $t$ ,  $J = 5,5$ , 1 H), 7,62 (verbreitertes  $t$ ,  $J = 5,5$ , 1 H).

43 mg des geschützten Tripeptids **7** wurden in Gegenwart von 150 mg 10-proz. Palladiumkohle und 0,5 ml Eisessig in 5 ml Äthanol hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wurde die Lösung zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit 5 ml 6 N Salzsäure bei  $120^\circ$  im Bombenrohr über Nacht hydrolysiert. Der Eindampfrückstand zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1) nur die Anwesenheit von Glycin und Ornithin.  $[\alpha]_D = +8,9^\circ$  ( $c = 0,8$  in 6 N Salzsäure); ein authentisches Gemisch aus 1 Mol L-Ornithin-dihydrochlorid und 2 Mol Glycinhydrochlorid zeigte  $[\alpha]_D = +8,7^\circ$  im gleichen Lösungsmittel.

**Hydrochlorid des  $\delta$ -Nitro-L-norvalyl-glycyl-glycin-methylesters (8).** Aus 3,8 g BOC-Tripeptid-methylester (**7**) wurden nach der allgemeinen Vorschrift (s. oben) und nach Umkristallisieren aus Methanol-Äther 2,80 g (88%) des Hydrochlorids von **8** als farblose hygroscopische Blättchen vom Smp. 107–112° erhalten.  $[\alpha]_D = +21^\circ$  ( $c = 0,66$  in Methanol). IR.-Absorptionsspektrum in Nujol:  $\nu_{max}$  3300, 3180, 1740, 1660, 1550  $cm^{-1}$ . NMR.-Spektrum in Pyridin- $d_5$ :  $\delta$  2,40–2,80 ppm ( $b$ , 4 H),

3,55 (s, 3 H), 4,30 (verbreitertes *d*, *J* = 6, 2 H), 4,4–4,65 (*b*, 2 H), 4,65–4,95 (*b*, 2 H), 4,95–5,30 (*b*, 1 H), 9,16–9,66 (*b*, ca. 4 H, teilweise von Pyridin-Signal überdeckt), 10,3 (verbreitertes *t*, *J* = 6, 1 H).

$C_{10}H_{19}ClN_4O_6$  Ber. C 36,76 H 5,86 Cl 10,85 N 17,15%  
Gef. „ 36,75 „ 5,93 „ 10,82 „ 17,30%

*BOC- $\delta$ -Nitro-L-norvalyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl-glycyl-glycin-methylester (9).* Aus 2,28 g BOC- $\delta$ -Nitro-L-norvalin und 2,80 g des Hydrochlorids von **8** wurden nach der allgemeinen Vorschrift 4,1 g (88%) Tetrapeptid-Derivat **9** als farbloses zähes Öl erhalten, das als Rohprodukt weiterverwendet wurde. Für die Charakterisierung wurde eine Probe an der 100fachen Menge Kieselgel mit Äthylacetat-Aceton 3:1 chromatographiert.  $[\alpha]_D = -21^\circ$  (*c* = 0,81 in Methanol). IR.-Absorptionsspektrum in Chlf.:  $\nu_{max}$  3250, 1740, 1700, 1670, 1635, 1550  $cm^{-1}$ . NMR.-Spektrum in  $CDCl_3$ :  $\delta$  1,45 ppm (s, 9 H), 1,65–2,35 (*b*, 8 H), 3,77 (s, 3 H), 4,00–5,35 (*k*, 10 H), 6,05–6,35 (*b*, 1 H), 7,70–8,15 (*b*, 1 H), 8,15–8,61 (*b*, 2 H).

*Hydrochlorid des  $\delta$ -Nitro-L-norvalyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl-glycyl-glycin-methylesters (10).* 4,1 g des rohen Tetrapeptid-Derivates **9** gaben nach der üblichen Methode 3,5 g (98%) rohes Hydrochlorid von **10**, als glasige Masse, die nicht kristallisiert werden konnte.  $[\alpha]_D = +5,4^\circ$  (*c* = 0,60 in Methanol). Das dünnschichtchromatographisch nahezu einheitliche Produkt wurde ohne Reinigung weiter verwendet.

*BOC- $\delta$ -Nitro-L-norvalyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl-glycyl-glycin-methylester (11).* 1,94 g BOC- $\delta$ -Nitro-L-norvalin wurden nach der üblichen Methode mit 3,43 g des Hydrochlorids von **10** gekoppelt. Nach dem Eindampfen und Umkristallisieren aus Methanol-Äther wurden 3,97 g (80%) des Pentapeptid-Derivates **11** erhalten. Die Analysenprobe wurde noch zweimal umkristallisiert: farblose Nadeln, Smp. 181–182°.  $[\alpha]_D = -30,9^\circ$  (*c* = 0,76 in Methanol). IR.-Absorptionsspektrum in Nujol:  $\nu_{max}$  3250, 1740, 1700, 1670–1625, 1550  $cm^{-1}$ . NMR.-Spektrum in Pyridin- $d_5$ :  $\delta$  1,51 ppm (s, 9 H), 1,80–2,50 (*b*, 12 H), 3,60 (s, 3 H), 4,17–5,25 (*k*, 13 H), 7,90–8,17 (*b*, 1 H), 8,90–9,66 (*k*, 4 H).

$C_{25}H_{42}N_8O_{14}$  Ber. C 44,24 H 6,24 N 16,51% Gef. C 44,07 H 6,19 N 16,65%

40 mg des BOC-Pentapeptid-methylesters wurden wie oben beschrieben hydriert und mit Salzsäure hydrolysiert. Der nur Glycin und Ornithin enthaltende Rückstand zeigte  $[\alpha]_D = +13,6^\circ$  (*c* = 0,96 in 6*N* Salzsäure). Authentisches Gemisch aus 3 Mol L-Ornithin-dihydrochlorid und 2 Mol Glycin-hydrochlorid:  $[\alpha]_D = +13,4^\circ$  im gleichen Lösungsmittel.

*Hydrochlorid von  $\delta$ -Nitro-L-norvalyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl-glycyl-glycin-methylester (12).* Aus 3,53 g BOC-Pentapeptid-methylester (**11**) wurden nach der beschriebenen Methode und nach Umkristallisation aus Methanol-Äther 2,93 g (92%) farblose Blättchen erhalten, Smp. ca. 132° (Zers.).  $[\alpha]_D = -11,5^\circ$  (*c* = 0,65 in Methanol). IR.-Absorptionsspektrum in Nujol:  $\nu_{max}$  3230, 1740, 1680, 1625, 1550  $cm^{-1}$ .

$C_{20}H_{35}ClN_8O_{12}$  Ber. C 39,06 H 5,74 Cl 5,77 N 18,22%  
Gef. „ 39,26 „ 5,70 „ 5,59 „ 18,22%

*BOC-Glycyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl-glycyl-glycin-methylester (13).* Aus 700 mg BOC-Glycin<sup>3)</sup> und 2,31 g Hydrochlorid von **12** wurden nach der Standardmethode und einmaligem Umlösen aus Methanol-Äther 2,38 g (86%) des Hexapeptid-Derivates **13** als amorphes weisses Pulver erhalten. Zur Analyse wurde eine Probe dreimal aus Methanol-Äther umgefällt. Smp. 178–181° (Zers.).  $[\alpha]_D = -26,6^\circ$  (*c* = 0,42 in Methanol). IR.-Absorptionsspektrum in Nujol:  $\nu_{max}$  3240, 1750, 1700, 1690–1630, 1550  $cm^{-1}$ . NMR.-Spektrum in Pyridin- $d_5$ :  $\delta$  1,50 ppm (s, 9 H), 1,75–2,58 (*b*, 12 H), 3,60 (s, 3 H), 4,10–4,75 (*k*, 12 H), 4,93–5,45 (*k*, 3 H), 7,70–8,05 (*b*, 1 H), 8,92–9,67 (*k*, 5 H).

$C_{27}H_{45}N_9O_{15}$  Ber. C 44,07 H 6,17 N 17,14% Gef. C 44,03 H 6,19 N 17,08%

*BOC-Glycyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl- $\delta$ -nitro-L-norvalyl-glycyl-glycin (14).* 2,0 g Methylester **13** wurden in 15 ml Methanol suspendiert und mit 7 g Kristallsoda in 70 ml Wasser über Nacht bei 20° gerührt. Die mit 100 ml Wasser verdünnte und mit Kochsalz gesättigte Lösung wurde mit kristallisierter Zitronensäure angesäuert und mit 1 l Äthylacetat-Butanol-Gemisch (3:1) in 5 Portionen extrahiert. Die Extrakte wurden dreimal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Eindampfrückstand wurde aus Methanol-Äther

<sup>3)</sup> FLUKA AG, Buchs SG, Schweiz.

umgefällt: farbloses Pulver; langsame Zers. ab ca. 160° ohne Schmelzen,  $[\alpha]_D = -28,7^\circ$  ( $c = 0,47$  in Methanol). IR.-Absorptionsspektrum in Nujol:  $\nu_{\max}$  3240, 1720, 1700, 1680–1625, 1550  $\text{cm}^{-1}$ . NMR.-Spektrum in Dimethylsulfoxid- $d_6$ :  $\delta$  1,38 ppm (s, 9 H), 1,45–2,20 (b, 12 H), 3,40–3,95 (k, 6 H), 4,10–4,80 (k, 9 H), 4,80–5,60 (b, 3 H), 7,70–8,30 (k, 4 H).

$\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_{15}$  Ber. C 43,27 H 6,01 N 17,47% Gef. C 43,25 H 6,03 N 17,54%

**Trinitro-cyclohexapeptid 17.** Eine Suspension von 1,70 g BOC-Hexapeptid **14** in 100 ml Aceton wurde nach Zugabe von 4,25 g Di-(*p*-Nitrophenyl)-sulfit und 600 mg Pyridin über Nacht bei 20° gerührt. Die klare braune Lösung wurde abgedampft. Der Rückstand zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1) neben Di-(*p*-Nitrophenyl)-sulfit (Rf 0,1) und *p*-Nitrophenol (Rf 0,85) nur ein Reaktionsprodukt mit Rf 0,7. Die Lösung des Rückstandes in 100 ml 3,5*N* Chlorwasserstoff in trockenem 1,2-Dimethoxyäthan wurde 2 Std. bei 20° gerührt und darauf im Vakuum abgedampft. Im Dünnschichtchromatogramm war anstelle des Flecks mit Rf 0,7 ein solcher mit Rf 0,43 vorhanden, welcher sich ausserdem mit Ninhydrin anfärben liess. Das Rohprodukt wurde in 20 ml Dimethylformamid-Eisessig 4:1 aufgenommen und die Lösung innerhalb von 3 Std. unter starkem Rühren mit Hilfe eines HERSHBERG-Trichters in 1 l auf 70° erhitztes Pyridin eingetropft. Anschliessend wurde weitere 2 Std. bei 70° gerührt und die Lösung zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 200 ml heissem Methanol suspendiert, mit 200 ml Äther versetzt, abfiltriert und der Niederschlag mit Methanol und Äther gewaschen: 1,10 g (77%) graubraunes amorphes Pulver, das ausser in Dimethylsulfoxid und in heissem Dimethylformamid in allen Lösungsmitteln sehr schwer löslich war. Die Substanz gab bei der Dünnschichtchromatographie (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1, Rf 0,33) einen einzigen Fleck.  $[\alpha]_D = -22^\circ$  ( $c = 0,8$  in Dimethylformamid). IR.-Absorptionsspektrum in Nujol:  $\nu_{\max}$  3300, 3230, 1650, 1625, 1545  $\text{cm}^{-1}$ . In den Mutterlaugen waren dünnschichtchromatographisch mehrere Verunreinigungen neben etwas Cyclohexapeptid **17** nachweisbar.

**Ferrichrom (1).** Eine Suspension von 1,12 g Cyclohexapeptid **17** in 60 ml 10-proz. wässriger Ammoniumchlorid-Lösung und 80 ml Äthan wurde bei 20° unter gutem Rühren in kleinen Portionen innerhalb von 40 Min. mit 2 g Zinkstaub versetzt, wobei das Peptid in Lösung ging. Die Lösung wurde durch Celit filtriert und eingedampft. Der braune Rückstand (rohes **18**) gab auf der Tüpfelplatte mit Triphenyltetrazoliumchlorid eine intensive Rotfärbung. Er wurde während 2 Std. bei Zimmertemperatur mit je 150 ml Essigsäureanhydrid und Pyridin acetyliert. Nach dem Eindampfen zeigte der Rückstand (rohes Acetylderivat **19**) weder mit Triphenyltetrazoliumchlorid noch mit methanolischer Eisen(III)-chlorid-Lösung eine Farbreaktion. – Das rohe Acetylderivat wurde in 250 ml methanolischem Ammoniak (gesättigt bei 0°) 1 Std. bei 10° stehengelassen. Der Eindampfrückstand (rohes **20**) wurde in 200 ml Methanol mit einer Lösung von 2 g Eisen(III)-chlorid-hexahydrat und 5 g Natriumacetat in 50 ml Methanol versetzt, die tief rotbraune Lösung nach 30 Min. filtriert und im Vakuum eingedampft. Die Lösung des Rückstands in 200 ml Wasser wurde mit Kochsalz gesättigt und mit 150 ml Phenol-Chloroform 1:1 ausgeschüttelt. Der tief braune Auszug wurde zweimal mit Kochsalzlösung gewaschen, durch Celit filtriert und nach Verdünnen mit 400 ml Äther mehrmals mit insgesamt 250 ml Wasser ausgezogen. Die wässrige Lösung wurde mehrmals mit Äther gewaschen, um Reste von Phenol völlig zu entfernen, und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde durch Ausziehen mit warmem Aceton von Acetamid befreit und durch eine CRAIG-Verteilung über 45 Stufen gereinigt. Lösungsmittelsystem: *n*-Butanol-Benzylalkohol-0,001*N* wasser. Salzsäure-gesättigte Kochsalzlösung 50:50:80:28. Die Fraktionen 14–32, welche die Hauptmenge des braungelben Farbstoffs enthielten, wurden vereinigt, mit Äther verdünnt und die wässr. Phase abgetrennt. Die organische Schicht wurde noch zweimal mit Wasser ausgeschüttelt und dann verworfen. Die mit Kochsalz gesättigten wässr. Auszüge wurden wie oben mit Phenol-Chloroform extrahiert und das Ferrichrom nach Filtration durch Celit und Verdünnen mit Äther wieder in Wasser übergeführt. Der Eindampfrückstand (220 mg) wurde in 100 ml heissem Methanol gelöst und bei 0° kristallisiert: 125 mg feine, orange-braune Nadeln. Aus den Mutterlaugen wurden nach Einengen weitere 20 mg krist. Ferrichrom gewonnen. Ausbeute 10,5% bezogen auf das eingesetzte Trinitro-cyclohexapeptid **17**. Eine Analysenprobe wurde nochmals aus Methanol umkristallisiert.

$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{FeN}_9\text{O}_{12}$  Ber. C 43,79 H 5,72 Fe 7,54 N 17,02%  
Gef. „ 43,85 „ 5,77 „ 7,39 „ 16,95%

$[\alpha]_D = +291^\circ \pm 10^\circ$  ( $c = 0,04\%$  in Wasser); für den Naturstoff wurde  $[\alpha]_D = +300^\circ$  unter den gleichen Bedingungen gefunden. Das synthetische Präparat zersetzt sich bei  $240\text{--}250^\circ$  ohne zu schmelzen, in Übereinstimmung mit dem Naturstoff. Die Absorptionsspektren im IR. und im Sichtbaren stimmten mit denen des natürlichen Ferrichroms überein. Bei einer analytischen CRAIG-Verteilung über 23 Stufen im oben beschriebenen Lösungsmittelgemisch verhielten sich synthetisches und natürliches Ferrichrom gleich (Maxima in den Stufen 12), und die photometrisch bestimmten Verteilungskurven stimmten mit einer berechneten völlig überein<sup>4</sup>). Die biologische Wirkung im Antagonismus-Test mit Ferrimycin A und *Staphylococcus aureus* als Testorganismus<sup>5</sup>) betrug  $107 \pm 10\%$  derjenigen von natürlichem Ferrichrom.

Die Mikroanalysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung W. MANSER) ausgeführt. Die NMR-Spektren verdanken wir unserer Abteilung für Instrumentalanalyse (Leitung Prof. W. SIMON).

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 74. Mitteilung: B. MAURER & W. KELLER-SCHIERLEIN, *Helv.* **52**, 388 (1969).
- [2] W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG & H. ZÄHNER, *Fortschr. Chem. Naturstoffe* (Ed. L. ZECHMEISTER) **22**, 279 (1964).
- [3] J. B. NEILANDS, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 4846 (1952); T. EMERY & J. B. NEILANDS, *ibid.* **82**, 3658, 4903 (1960).
- [4] S. J. ROGERS, R. A. J. WARREN & J. B. NEILANDS, *Nature* **200**, 167 (1963).
- [5] a) W. KELLER-SCHIERLEIN & A. DEÉR, *Helv.* **46**, 1907 (1963); b) W. KELLER-SCHIERLEIN, *Helv.* **46**, 1920 (1963).
- [6] A. ZALKIN, J. D. FORRESTER & D. H. TEMPLETON, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 1810 (1966).
- [7] R. A. J. WARREN & J. B. NEILANDS, *J. biol. Chemistry* **240**, 2055 (1965).
- [8] A. MÜLLER & H. ZÄHNER, *Arch. Mikrobiol.* **62**, 257 (1968).
- [9] V. PRELOG & A. WALSER, *Helv.* **45**, 631, 1732 (1962); W. KELLER-SCHIERLEIN, P. MERTENS, V. PRELOG & A. WALSER, *Helv.* **48**, 710 (1965).
- [10] G. W. ANDERSON, J. E. ZIMMERMANN & F. M. CALLAHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 5012 (1967).
- [11] B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 373 (1957).
- [12] R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **40**, 624 (1957); vgl. auch O. ABE, H. TAKIGUCHI, M. OHNO, S. MAKISUMI & N. IZUMIYA, *Bull. chem. Soc. Japan* **40**, 1945 (1967); J. MEIENHOFER, *Experientia* **24**, 776 (1968).
- [13] H. ZÄHNER, W. KELLER-SCHIERLEIN, R. HÜTTER, K. HESS-LEISINGER & A. DEÉR, *Arch. Mikrobiol.* **45**, 119 (1963).
- [14] TH. WIELAND, *Angew. Chem.* **80**, 209 (1968).
- [15] D. A. LAUFER & E. R. BLOUT, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 1246 (1967).
- [16] H. BROCKMANN & H. MUSSO, *Chem. Ber.* **87**, 581 (1954).

<sup>4</sup>) Herrn Dr. T. CLERC danken wir für seine Mithilfe bei der elektronischen Berechnung der theoretischen Verteilungskurven.