

167. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

250. Mitteilung¹⁾

Maduraferrin, ein neuartiger Siderophor aus *Actinomadura madurae*

von Walter Keller-Schierlein* und Leonhard Hagmann

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Universitätsstr. 16,
CH-8092 Zürich

und Hans Zähler und Wolfgang Huhn

Lehrstuhl für Mikrobiologie I der Universität, Auf der Morgenstelle 28, D-7400 Tübingen

(21. VI. 88)

Maduraferrin, a Novel Siderophore from *Actinomadura madurae*

From a strain of *Actinomadura madurae*, a new siderophore was isolated. Maduraferrin is the Fe complex of an oligopeptide composed of salicylic acid, β -alanine, glycine, L-serine, N^6 -hydroxy- N^2 -methyl-L-ornithine, and L-hexahydropyridazine-3-carboxylic acid. The complexing centers are a salicylamide moiety, a hydroxamic-acid group and an acid hydrazide group.

Alle bis heute eingehender untersuchten Actinomyceten, die fast ausnahmslos den beiden Gattungen *Streptomyces* und *Nocardia* angehören, produzieren als Siderophore die Ferrioxamine [2], wobei entweder das Ferrioxamin B [3] oder das Ferrioxamin E [4] die Hauptkomponenten der Gemische bilden. Über die Siderophorproduktion von sogenannten 'rare Actinomyceten' ist dagegen nichts bekannt.

Im Rahmen eines Screeningprogramms wurden 69 Stämme aus 30 verschiedenen Gattungen mittels HPLC auf die Bildung von Siderophoren geprüft (Nachweisgrenze ca. 1 mg/l Kulturflüssigkeit). Die meisten davon produzieren Siderophore, wobei mit Ausnahme der Art *Actinomadura madurae* nur Ferrioxamine nachweisbar waren. Bei einigen Stämmen von *Actinomadura madurae* wurde anstelle von Ferrioxaminen ein neuer, Maduraferrin genannter Fe-Komplex gefunden. Andere Arten der gleichen Gattung produzieren dagegen Ferrioxamine, oder die Siderophorproduktion lag unter der Nachweisbarkeitsgrenze. Die Gattung *Actinomadura* zeichnet sich durch *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure als Baustein der Zellwand aus, für Stämme der Spezies *Actinomadura madurae* ist die Anwesenheit von Madurose (3-*O*-Methyl-L-galactose) typisch. Als bester Produzent von Maduraferrin erwies sich der aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen bezogene Stamm *DSM 43067*.

Die Bildung von Maduraferrin zeigt die für die Siderophorbildung vielfach nachgewiesene Abhängigkeit vom Fe-Angebot in der Nährlösung. Bei sehr geringem Fe-Gehalt wird Desferrimaduraferrin bis zu 500 mg/l in das Medium ausgeschieden, bei guter

¹⁾ 249. Mitteilung: [1].

Fe-Versorgung lassen sich nur Spuren des Siderophors nachweisen. Da es nicht gelang, die Stämme auf einfacher, chemisch definierter Nährlösung zu einer guten Maduraferri-Bildung zu bringen, wurde eine komplexe, Sojamehl und Hefeextrakt enthaltende Nährlösung verwendet, was allerdings die Standardisierung des Fe-Gehaltes erschwerte. Durch Zugabe von AlCl_3 liess sich jedoch ein Fe-Mangel vortäuschen, der sich sehr günstig auf die Siderophorbildung auswirkte.

Die Kulturen wurden nach der Filtration mit FeCl_3 versetzt, wobei eine tief braunrote Färbung auftrat. Eine erste Anreicherung erfolgte durch Adsorption an eine Säule aus *Amberlite XAD-2* und Elution mit Aceton/ H_2O . Die eingeeengten und lyophilisierten Eluate enthielten noch einen bedeutenden Anteil an Riboflavin, der sich an einer Kieselgelsäule leicht vom Maduraferrin abtrennen liess. Die weitere Reinigung des neuen Siderophors erfolgte durch eine Serie mehrerer Chromatographien, wobei sich *Biogel*-Harze als besonders vorteilhafte Adsorbentien erwiesen. Nach Abtrennung mehrerer Verunreinigungen wurde das Maduraferrin (**1**) in Form feiner braun-roter Kristalle erhalten.

Das Maduraferrin kann von den Stämmen von *Actinomadura madurae* gut als Fe-Quelle verwendet werden. Für *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* dagegen ist keine Ausnützung von Maduraferrin-Eisen nachweisbar. Die Wirkung der Sideromycine (Albomycin bei *Escherichia coli*, Ferrimycin bei *Staphylococcus aureus*) wird durch Maduraferrin nicht antagonisiert. Daraus lässt sich schliessen, dass keine Aufnahme von Maduraferrin über die von Albomycin bzw. Ferrimycin verantwortlichen Aufnahmesysteme erfolgen kann.

Die Bruttoformel, $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{FeN}_7\text{O}_9$, ergibt sich nicht unmittelbar aus den Elementaranalysen. Diese passen nur, wenn man annimmt, dass die Kristalle 1,5 mol AcOH und 2 mol H_2O enthalten. Hingegen passt das FAB-MS mit Piken bei 667 $[M + \text{Na}]^+$ und 645 $[M + \text{H}]^+$ auf diese Formel. Sie ergibt sich ferner aus der Anzahl und den Arten der ^{13}C -NMR-Signale der Desferriverbindung und aus den nachfolgend diskutierten Abbauergebnissen. Das IR-Spektrum (*Fig. 1*) ist in der (C=O)-Region, wie bei Siderophoren üblich, komplex strukturiert. NMR-Spektren konnten entsprechend unseren früheren Erfahrungen mit Siderophoren vom Fe-Komplex nicht aufgenommen werden.

Lösungen von Desferrimaduraferrin (**2**), die sich für die Durchführung von Abbaureaktionen eignen, konnten am einfachsten durch Ausfällen von Fe mit NaOH hergestellt werden. Für die Herstellung von reinem **2** eignet sich dagegen besser die Methode mit 8-Hydroxychinolin [5]. Das durch Chromatographie an *Sephadex LH-20* gereinigte Produkt ist ein farbloses Pulver. Die Hauptpiks im FAB-MS liegen um 53 Masseneinheiten ($\text{Fe}^{3+} - 3\text{H}^+$) tiefer als beim Fe-Komplex. Die Elementaranalysen werden wieder durch die Anwesenheit von 2 mol H_2O und 0,5 mol AcOH verfälscht, wobei sich die Anwesenheit des letzteren auch im ^1H -NMR (1,93 ppm, s) zu erkennen gibt. Dass beim Ersatz von Fe^{3+} durch drei Protonen keine weitere Reaktion abgelaufen ist, zeigt sich daran, dass **2** nach Zusatz von FeCl_3 wieder das ursprüngliche Maduraferrin gibt. Das Desferrimaduraferrin (**2**) wurde weiter durch ein Acetylierungsprodukt charakterisiert, das auf Grund der Spektren (^1H -NMR, FAB-MS) vier Ac-Gruppen enthält.

Die UV-Spektren von **1** und **2** weisen auf die Anwesenheit eines aromatischen Bausteins hin, der sich auch im ^1H -NMR von **2** durch vier Signale im Bereich von 6,9 bis 7,7 ppm zu erkennen gibt, deren Aufspaltungsmuster einem 1,2-disubstituierten Benzol-Ring entsprechen. Im ^{13}C -NMR weist ein Signal bei 160 ppm auf eine phenolische OH-Gruppe

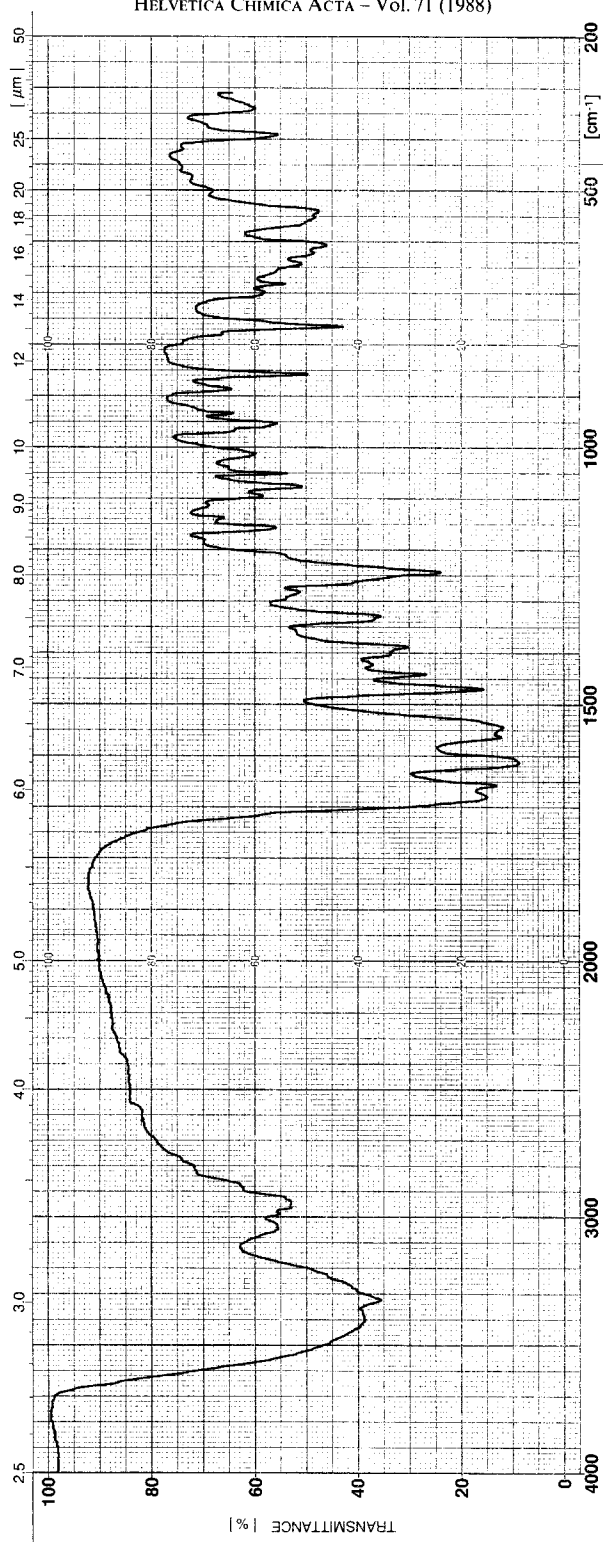


Fig. 1. IR-Spektrum (KBr) von Maduraferrin (I)

hin. Die Vermutung, dass der aromatische Baustein ein Salicylsäure-Rest ist, wurde durch einen hydrolytischen Abbau von **2** bestätigt. Die in den lipophilen Anteilen des Hydrolyse-Gemisches enthaltene Salicylsäure wurde durch DC und das ¹H-NMR identifiziert.

Die in H₂O löslichen Hydrolyseprodukte enthielten mehrere mit Ninhydrin anfärbare Substanzen, die durch Vergleich mit authentischen Präparaten (DC) als β-Alanin, Glycin und Serin erkannt wurden. Daneben enthielt das Hydrolysat zwei Produkte mit kleinem R_F-Wert, die mit Triphenyltetrazolium-chlorid eine rote Farbreaktion gaben. Wenn das Hydrolysegemisch mit H₂ und PtO₂ hydriert wurde, zeigte das DC anstelle der reduzierenden Substanzen zwei Flecken, die mit Ornithin und N^α-Methylornithin übereinstimmten.

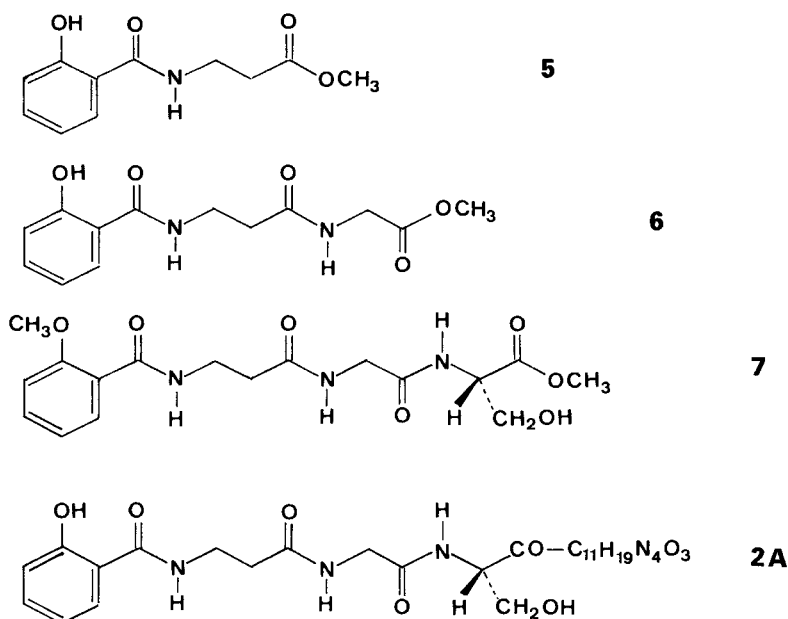
Zur Erhärtung dieser Befunde wurde ein Totalhydrolysat hydriert und mit 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol umgesetzt. Die 2,4-Dinitrophenyl(DNP)-Derivate wurden durch Chromatographie und präp. DC getrennt und gereinigt. Es konnten so die DNP-Derivate von β-Alanin und Glycin isoliert und durch Vergleich mit authentischen Präparaten (DC, ¹H-NMR) identifiziert werden. Das Serin-Derivat konnte erst nach der Umsetzung mit CH₃N₂ als Methylester völlig rein erhalten werden. Es liegt auf Grund der spezifischen Drehung in der L-Form vor. Als Nebenkomponente wurde auch etwas N,O-Bis(2,4-dinitrophenyl)-L-serin erhalten.

Das N^α,N^δ-Bis(2,4-dinitrophenyl)-N^α-methylornithin (**3**) lag nach der Reinigung als Hydrochlorid vor, wie ein Vergleich mit authentischen Präparaten zeigte. Vom entsprechenden Derivat des N^δ-Methylornithins (**4**, s. unten) liess es sich durch das DC schwierig, durch das ¹H-NMR dagegen deutlich unterscheiden. Die spezifische Drehung stimmte mit derjenigen des synthetischen Präparates der L-Reihe überein.

Das Bis(2,4-dinitrophenyl)ornithin lag bei der präp. DC ohne klare Abgrenzung zwischen den Derivaten von β-Alanin und N^α-Methylornithin und konnte bei diesem Abbau nicht rein erhalten werden. Dass auch das Ornithin in der L-Form vorliegt, ergab sich aus einem späteren Abbau (s. unten).

Die damit nachgewiesenen Bausteine – Salicylsäure, β-Alanin, Glycin, Serin, Ornithin und N^α-Methylornithin – enthalten zusammen alle 26 C-Atome und 7 N-Atome von **1**. Ihre Reihenfolge konnte aus einer Partialhydrolyse (s. *Exper. Teil, Tab. 3*) abgeleitet werden. Diese gab u. a. vier Produkte (Partialhydrolysate A, B, C und D), die sich im DC durch eine blaue Fluoreszenz zu erkennen gaben und demnach alle den Salicylsäure-Rest enthielten. Sie wurden durch präp. DC isoliert und durch Totalhydrolyse weiter untersucht. Das Partialhydrolysat A gab dabei gemäss DC nur Salicylsäure und β-Alanin, das Partialhydrolysat C zudem Glycin und das Partialhydrolysat D Salicylsäure, β-Alanin, Glycin und Serin. Das Partialhydrolysat B wird später näher diskutiert.

Die Partialhydrolysate A, C und D wurden zudem mit CH₃N₂ verestert. In allen Fällen entstanden gemäss DC mindestens zwei Produkte durch Methylierung nur an der COO-Gruppe oder zusätzlich an der phenolischen OH-Gruppe. Die jeweilige Hauptkomponente wurde durch präp. DC isoliert und durch das EI-MS charakterisiert. Die MS sind mit den Strukturformeln **5** (aus Partialhydrolysat A), **6** (aus C) und **7** (aus D) bestens vereinbar und bestätigen die Befunde der Totalhydrolysen. Für **2** kann somit eine Partialformel **2A** postuliert werden, in der der bisher unbekannte Rest C₁₁H₁₉N₄O₃ aus zwei Aminosäuren aufgebaut ist, die bei der Reduktion Ornithin und N^α-Methylornithin geben.

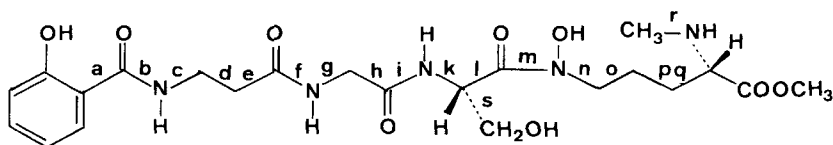
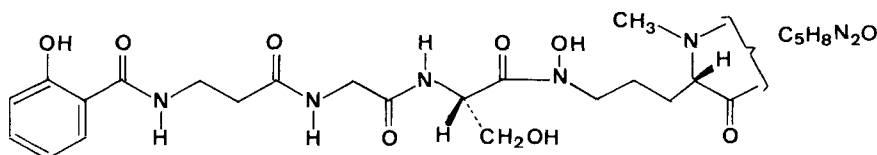
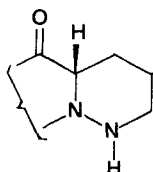


Einen wichtigen Hinweis auf den Aufbau dieses unbekannten Teils gab das vierte Partialhydrolyseprodukt B, das bei der vollständigen Hydrolyse ausser Salicylsäure, β -Alanin, Glycin und Serin noch eine reduzierende Verbindung gab (Nachweis mit Triphenyltetrazolium-chlorid). Nach der katalytischen Reduktion des Hydrolysates war anstelle dieser reduzierenden Verbindung N^{α} -Methylornithin nachweisbar. Das FAB-MS des Methylierungsproduktes **8** (CH_2N_2) zeigt, dass die Molekel um ein O-Atom grösser ist, als man für einen Tetrapeptid-methylester aus den nachgewiesenen Bausteinen errechnet. Es kann deshalb kein Zweifel bestehen, dass die bei der Reduktion zu N^{α} -Methylornithin führende Aminosäure ein N -Hydroxy-Derivat ist. Da man annehmen darf, dass diese über eine Hydroxamsäure-Bindung an den Rest der Molekel gebunden ist, kann nur das N^{δ} -Atom Träger der OH-Gruppe sein. Mit der Strukturformel **8** ist das EI-MS bestens verträglich, das zwar kein Molekül-Ion zeigt, aber bei m/z 494 einen deutlichen Pik für $[M^+ - \text{OH}]$. Dass Hydroxamsäuren sehr leicht eine OH-Gruppe verlieren, haben wir schon früher oft beobachtet [6]. Zahlreiche Fragmente (Tab. 1) sind

Tab. 1. EI-MS des Methylesters **8**; ausgewählte Fragmente

Spaltung der Bindung	m/z	Spaltung der Bindungen	m/z	Spaltung der Bindung	m/z	Spaltung der Bindung	m/z
b	390	a, d	57	m	336, 176 ^{a)}	b, e	43
c	135	a, e	71	p	116	b, l	187
d	149 ^{a)}	a, f	98 ^{a)}	q	408, 102	n, t	351 ^{a)}
g	304	a, g	113 ^{a)}	r	452, 60 ^{a)}	o, t	363 ^{a)}
l	308	a, n	257	t	494	l, q, t	83

a) Diese Fragmente bilden sich durch zusätzlichen Verlust oder Aufnahme eines Protons.

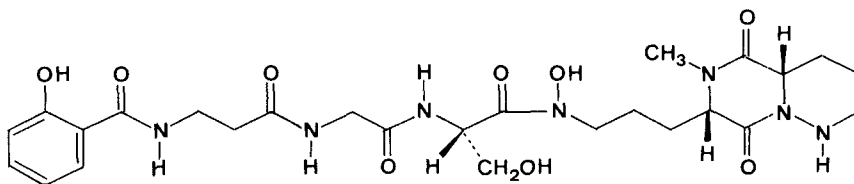
**8****2B****2C**

durch die Anordnung in Formel **8** zwangslos zu erklären. Insbesondere für die Fragmente von m/z 408, 363, 351, 116 und 83 könnte bei einer andersartigen Verknüpfung der Bausteine (Peptid-Verknüpfung mit N^{α} von N^{δ} -Methylornithin) keine plausible Interpretation gefunden werden. Die Interpretation des Ions mit m/z 83 ist durch ein metastabiles Ion (m/z 17,6 für $39 \rightarrow 83 + 308$) gut belegt. Ein wichtiges Indiz für diese Lage der Hydroxamsäure bildet die Tatsache, dass Maduraferriin (**1**) gemäss FAB-MS sicher ein (1:1)-Komplex von **2** und Fe^{3+} ist. Dies erfordert einen ausreichenden Abstand zwischen der Hydroxamsäure-Gruppe und dem dritten, noch zu bestimmenden Komplexierungszentrum (s. unten).

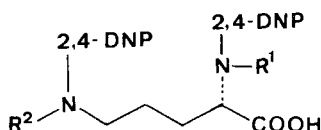
Der unbekannte Rest $\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ in der Partialformel **2b** muss, wenn das O-Atom der Säure-(C=O)-Gruppe des Ornithins entspricht, noch zwei Ringe besitzen. Einer davon dürfte durch eine zweifache Bindung des N^{δ} -Hydroxy- N^{α} -methylornithin-Restes an den unbekannten Teil (etwa in der Art eines Dioxopiperazins) zustande kommen. Der zweite Ring muss der unbekannten Aminosäure ganz angehören. Die Aminosäure, die bei der Reduktion Ornithin gibt, kann demnach nur Hexahydropyridazin-3-carbonsäure sein. Diese Säure oder Abkömmlinge davon sind kürzlich als Bausteine von Peptid-Antibiotica aufgefunden worden, so z. B. von Luzopeptinen aus *Actinomadura luzonensis* [7], von Cirratiomycin [8] und von Azinothricin [9].

Für die Aufklärung der Art der Verknüpfung der Hexahydropyridazin-3-carbonsäure mit dem Rest der Molekel war noch wichtig abzuklären, welches der beiden N-Atome ein H-Atom trägt. Zu diesem Zweck haben wir **2** vollständig methyliert, das Methylierungsprodukt hydrolysiert, das Aminosäure-Gemisch mit H_2 und PtO_2 hydriert und dann mit 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol umgesetzt. Mit Hilfe von synthetischen Vergleichssubstanzen (CD und HPLC) wurde durch präp. DC eine Fraktion isoliert, die

gemäss HPLC nur die Derivate von *N*^α-Methyl- (3) und *N*^δ-Methylornithin (4) enthielt. Durch präp. HPLC auf der analytischen Säule konnte das letztere rein isoliert werden. Es zeigte die gleiche optische Drehung wie das synthetische Vergleichspräparat der L-Reihe, wodurch nun auch das letzte Chiralitätszentrum von 2, dasjenige der Hexahydropyridazin-3-carbonsäure, bestimmt ist. Der Rest C₅H₈N₂O der Teilformel 2b kann somit gemäss Teilformel 2c aufgelöst werden, und durch Verknüpfung der Partialformeln 2b und 2c erhält man die vollständige Strukturformel 2 für Desferrimaduraferriin.



2



3 $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$

4 $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{CH}_3$

Als komplex-bindende Gruppen in 2 stehen die Salicylamid-Gruppe, die Hydroxamsäure-Gruppe und die Säurehydrazid-Gruppe zur Verfügung. Während die ersten beiden schon wiederholt als komplexierende Gruppen von Siderophoren angetroffen wurden [10], tritt eine Säurehydrazid-Gruppe hier zum erstenmal als Komplexierungszentrum auf. Dass Säurehydrazide grundsätzlich geeignet sind, mit Fe³⁺ Komplexe zu bilden, zeigt sich an einer starken Farbvertiefung nach schwarzgrün, wenn eine methanolische FeCl₃-Lösung mit Benzhydrazid in MeOH versetzt wird. Über eingehendere Untersuchungen zum Komplexierungsverhalten von Säurehydraziden ist uns nichts bekannt. Wir wollen aber darauf hinweisen, dass Säurehydrazide formal Amide von Hydroxamsäuren sind. Mit Hilfe von Modellen ('orbit molecular building system') lässt sich nahezu spannungsfrei ein (1:1)-Komplex mit Fe³⁺ aufbauen. Fig. 2 zeigt eine Computer-Zeichnung ('picture system') von Maduraferriin (1). Die Konformation wurde mittels 'molecular modelling' relaxiert²⁾.

Das für Vergleichszwecke benötigte *N*^α-Methyl-L-ornithin ist bekannt [11]. Wir haben für seine Herstellung sowie für die des isomeren *N*^δ-Methyl-L-ornithins einen einfacheren Weg, ausgehend von käuflichem *N*^δ-Benzyloxycarbonyl-L-ornithin bzw. *N*^α-Benzyloxycarbonyl-L-ornithin, gewählt. Die Methylierungen erfolgten mit Formaldehyd und NaBH₄. Die nach der katalytischen Abspaltung der Schutzgruppen erhaltenen Aminosäuren wurden direkt in die Bis(2,4-dinitrophenyl)-Derivate 3 resp. 4 übergeführt.

²⁾ Herrn M. Badertscher danken wir bestens für die Durchführung dieser Rechnungen.

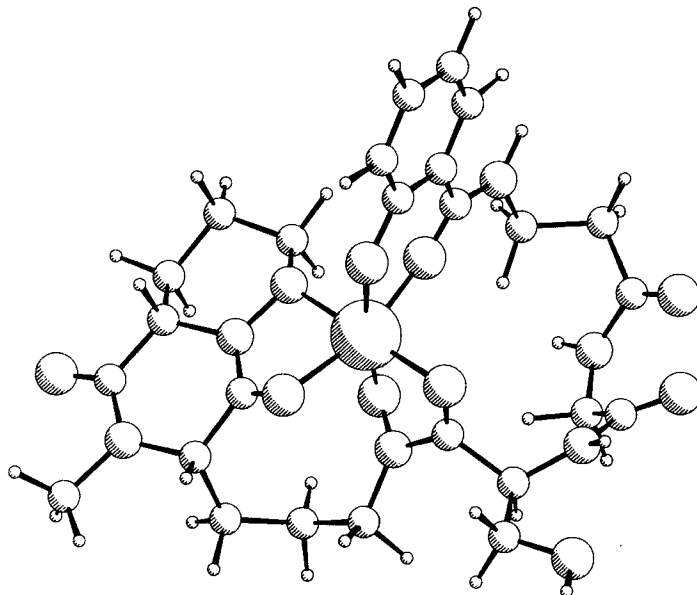


Fig. 2. Computer-Zeichnung der Struktur von Maduraferrin (1) nach einem dreidimensionalen Modell ('orbit molecular building system')

Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [12]; alle NMR bei 300 (^1H) bzw. 75 MHz (^{13}C).

Fermentierung. Der von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen bezogene Stamm DSM 43067 ist der Typus-Stamm der Spezies *Actinomadura madurae* (VINCENT) LECHEVALIER et LECHEVALIER. Die Fermentation erfolgte in Fermentern bis zu 200 l (Umwurfsystem Typ b 200, *Biologische Verfahrenstechnik Giovanola*, Monthey, Schweiz) bei 37° unter guter Belüftung. Die optimale Nährslg. enthielt 20 g/l Mannit, 10 g/l Sojamehl, 10 g/l Stärke, 10 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l Asparagin und 5 mmol AlCl_3 . Vor der Sterilisation (120°, 30 min) wurde die Lsg. auf pH 7,5 eingestellt. Die Fermenter wurden mit 10% einer auf der gleichen Nährslg. angezogenen Vorkultur angeimpft. Die Siderophorbildung wurde durch HPLC verfolgt und erreichte ein Maximum nach 110 bis 120 h.

Isolierung von Maduraferrin. Nach 110 h wurden die Kulturbrühen auf 20° abgekühlt und mit Hilfe von 2% *Celite* (*Hyflo Super Cell*) filtriert. Nach der Zugabe von ca. 1 g/l FeCl_3 bildete sich im braun-rot verfärbten Filtrat ein Niederschlag, von dem erneut abfiltriert wurde. Darauf wurde die Lsg. auf eine Säule von *Ambertlite XAD-2* (Säulenvolumen ca. 20% des Lösungsvolumens) gegeben und die Säule solange mit H_2O gewaschen bis das Eluat nahezu farblos war. Darauf wurde mit Aceton/ H_2O 3:7 eluiert, die braun-roten Fraktionen *i.v.* konzentriert, dann lyophilisiert und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert ('flash'-Methode). Das reichlich vorhandene Riboflavin wurde mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2,5\%$ AcOH 65:25:4 eluiert, das Maduraferrin erst mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2,5\%$ AcOH 5:10:4. Dieses Rohprodukt (3 g aus 20 l Kulturbrühe) wurde zunächst an *Biogel P4* (Säule 2,3 × 75 cm) mit 10 mM NH_4OAc in H_2O chromatographiert. Dabei wurden vor allem braun-schwarze, übelriechende Verunreinigungen abgetrennt. Spätere Fraktionen enthielten eine gelbe und eine weinrote Verunreinigung. Zuletzt wurde das Maduraferrin als eine orange-braune Zone eluiert. Gemäss HPLC (*RP-18*-Säule, 0,5 × 25 cm; $\text{MeOH}/10$ mM NH_4OAc in H_2O 1:1; UV-Detektor 254 nm) enthielt diese Hauptfraktion neben Maduraferrin (t_R 14 min) eine geringe orange-braune Nebenkomponente (t_R 10 min) und Reste der erwähnten weinroten Komponente (t_R 7 min).

Durch eine anschliessende Chromatographie an *Biogel P2* (1,8 × 74 cm; 15 mM NH_4OAc in H_2O) wurden die Nebenkomponenten weitgehend entfernt. Eine weitere Chromatographie an *Fractogel TSK-40* (1,8 × 65 cm; 10 mM NH_4OAc in H_2O) gab gemäss HPLC einheitliches Maduraferrin. Abschliessend wurde das Präparat an *Sephadex G-15* (2,3 × 65 cm; H_2O als Eluierungsmittel) entsalzt und nach dem Eindampfen *i.v.* aus $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ umkristallisiert. In einem typischen Versuch wurden aus 20 l Kultur 150 mg Maduraferrin erhalten, doch schwankten die Ausbeuten von Fall zu Fall beträchtlich.

Maduraferrin (Fe (III)-Komplex von **2**; **1**). Sehr feine, orange-braune, hygroskopische Kristalle ohne scharfen Schmp. DC (Kieselgel F_{254}): R_f 0,27 mit BuOH/AcOH/H₂O 1:1:1; 0,11 mit Aceton/H₂O 1:1; $[\alpha]_D^{25} = +436^\circ$ ($c = 0,025$, MeOH). UV (MeOH): 442 (3,63), 330 (sh, 3,65) 302 (sh, 3,74), 280 (3,82), 250 (sh, 4,14), 219 (4,62). IR: Fig. 1. FAB-MS (Thioglycerin als Matrix): 667 ($[M + Na]^+$), 645 ($[M + H]^+$), 629, 595, 472. Anal. ber. für C₂₆H₃₄N₇O₉Fe · 1,5 AcOH · 2 H₂O (770,55): C 45,20, H 5,76, N 12,72, Fe 7,25; gef.: C 44,89, 44,86; H 5,69, 5,58; N 12,60, 12,77; Fe 7,31, 7,16.

Desferrimaduraferrin (N-Hydroxy-N-[3-(6-methyl-5,8-dioxo-2,3,4,4a,6,7-hexahydro-(1H,5H,8H)-pyridino[3,4-b]pyridazin-7-yl)propyl](N-salicyl-β-alanyl-glycyl-L-serinamid); **2**). Zu einer Lsg. von 272 mg Maduraferrin in 10 ml H₂O/MeOH 3:1 wurden 595 mg 8-Hydroxychinolin in 5 ml MeOH zuge tropft und 90 min gerührt. Dann wurde vom schwarzen Niederschlag abfiltriert und die Lsg. i.v. eingedampft. Der Rückstand wurde an Sephadex LH-20 (2,7 × 72 cm) mit MeOH chromatographiert. Die zuerst eluierten Anteile (84 mg) waren blass gelblich gefärbtes, leicht verunreinigtes Desferrimaduraferrin. Spätere Fraktionen gaben beim Eindampfen i.v. 148 mg (65%) reines Produkt als farbloses amorphes Pulver. HPLC (RP-18, 0,5 × 25 cm; MeOH/20 mM NH₄OAc in H₂O 2:1): t_R 11 min; einheitlich. UV (MeOH): 298 (3,39), 248 (sh, 4,06), 242 (4,08). ¹H-NMR (CD₃OD): 7,69 (dd, $J = 7,9$, 1,7, 1 H); 7,41 (ddd, $J = 8,4$, 7,3, 1,7, 1 H); 6,96 (dd, $J = 8,4$, 0,9, 1 H); 6,90 (ddd, $J = 7,9$, 7,3, 1,1, 1 H); 5,04 (dd, $J = 10,5$, 8,3, 1 H); 4,79 (teilw. von Lsgm. überdeckt, 1 H); 4,68 (dd, $J = 10,5$, 8,6, 1 H); 4,61 (t, $J = 8,5$, 1 H); 4,49 (dd, $J = 10,8$, 5,3, 1 H); 3,93 (d, $J = 16,6$, 1 H); 3,85 (d, $J = 16,6$, 1 H); 3,73–3,52 (br. m, 4 H); 3,46 (m, 2 H); 2,70 (m, 2 H); 2,42 (s, 3 H); 2,13–1,63 (br. m, 8 H); 1,93 (s, 1,5 H–0,5 AcOH). ¹³C-NMR (CD₃OD): 179,16 (s, AcOH); 173,93 (s); 173,85 (s); 173,56 (s); 171,31 (s); 168,67 (s); 167,07 (s); 160,98 (s); 135,09 (d); 129,53 (d); 120,05 (d); 117,70 (d); 111,50 (s); 70,64 (t); 69,44 (d); 63,87 (d); 52,64 (t); 51,48 (d); 48,29 (t); 43,59 (t); 36,43 (t); 33,74 (q); 33,03 (t); 30,32 (t); 28,66 (t); 23,40 (t); 23,40 (q, AcOH); 21,81 (t). FAB-MS (Thioglycerin): 614 ($[M + Na]^+$), 592 ($[M + H]^+$), 576, 434. Anal. ber. für C₂₆H₃₇N₇O₉ · 0,5 AcOH · H₂O (639,66): C 50,70, H 6,46, N 15,33; gef.: C 50,75, 50,60; H 6,30, 6,30; N 15,05, 15,06.

Maduraferrin aus 2. In 4 Tropfen MeOH gelöstes **2** (0,5 mg) wurde mit 1 Tropfen NaOAc (5% in H₂O) und 1 Tropfen FeCl₃ (5% in H₂O) versetzt. Das braun-rote Produkt liess sich weder durch DC (R_f 0,27) noch durch HPLC von authentischem Maduraferrin unterscheiden.

Tetraacetyl-desferrimaduraferrin. Aus 9,2 mg **2** in 0,3 ml abs. MeOH, 1 ml Pyridin und 1,6 ml Ac₂O wurde bei RT. (8 h) das Ac-Derivat bereitet und nach dem Eindampfen i. HV. getrocknet. Die Reinigung erfolgte durch präp. DC (2 RP-18-Platten 20 × 20 cm, 0,25 mm dick) mit MeOH/H₂O 4:1. Durch Elution der im UV fluoreszierenden Zone mit MeOH und Eindampfen i.v. wurden 5,7 mg (54%) einheitliches farbloses Pulver erhalten, das mit FeCl₃ keine Farbreaktion mehr gab. R_f 0,41 (DC auf RP-18-Platte, MeOH/H₂O 4:1); $[\alpha]_D^{25} = -29,5^\circ$ ($c = 0,44$, CHCl₃). IR (CHCl₃): 3450–3200 (br.), 1798, 1758, 1670, 1642. ¹H-NMR (CDCl₃): 8,00 (dd, $J = 7,8$, 1,7, 1 H); 7,54 (td, $J = 7,9$, 1,7, 1 H); 7,32 (td, $J = 7,8$, 1,3, 1 H); 7,24 (t, $J = 5$, 1 H, austauschbar); 7,13 (dd, $J = 8,0$, 1,3, 1 H); 7,06 (br. d, $J = 6$, 1 H; austauschbar); 5,29 (m, 1 H); 4,90 (dd, $J = 10,7$, 8,6, 1 H); 4,61 (dd, $J = 10,6$, 8,7, 1 H); 4,56 (t, $J = 8,7$, 1 H); 4,51 (m, 1 H); 4,03 (br., 1 H, austauschbar); 4,01 (dd, $J = 16,9$, 6,0, 1 H); 3,86 (dd, $J = 16,8$, 5,0, 1 H); 3,74–3,39 (m, 6 H); 2,99 (s, 3 H); 2,58 (ddd, $J = 16,5$, 8,1, 3,9, 1 H); 2,39 (s, 3 H); 2,30 (ddd, $J = 16,5$, 9,0, 4,0, 1 H); 2,17 (s, 6 H); 2,14 (s, 3 H); 2,23–2,00 (m, 4 H); 1,99–1,54 (m, 4 H). FAB-MS (Thioglycerin): 783 ($[M + H + Na]^+$), 760 ($[M + H]^+$), 740, 718, 588.

Hydrolyse von 2. Die Hydrolyse von 7 mg **2** in 6 ml 6M HCl wurde unter N₂ während 15 h unter Rückfluss durchgeführt (Ölbad 120°). Die Lsg. wurde i.v. eingedampft. Mittels DC mit PhOH/H₂O auf Kieselgel (System A), mit PhOH/H₂O 3:1 auf Celluloseplatten (System B) und mit BuOH/Aceton/Me₂NH/H₂O 10:10:2:5 auf Cellulose-Platten (System C) wurden die in der Tab. 2 aufgeführten Produkte durch Vergleich mit authentischen Präparaten nachgewiesen (Salicylsäure durch hellblaue Fluoreszenz im UV-Licht, die Aminosäuren mit Ninhydrin). Durch Besprühen mit Triphenyltetrazolium-chlorid/NaOH wurden im System C zwei rote Flecke mit R_f 0,23 und 0,15 sichtbar.

Tab. 2. DC der Hydrolyseprodukte

Substanz	R_f -Werte			Farbe mit Ninhydrin im System A
	System A	System B	System C	
Salicylsäure	0,40	0,95	0,53	—
β-Alanin	0,28	0,59	0,27	blau
Glycin	0,18	0,34	0,22	ocker
Serin	0,12	0,26	0,34	violett

Reduktion der Hydrolyseprodukte. Ein wie oben aus 107 mg **2** hergestelltes Hydrolysat wurde in 10 ml MeOH nach Zugabe von 20 mg PtO₂ 16 h bei RT. hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators mit Hilfe von *Celite* wurde i.v. eingedampft und i. HV. getrocknet. Mittels DC (Kieselgel, PhOH/H₂O 5:2) wurden nach Abfärben mit Ninhydrin folgende Produkte nachgewiesen: Salicylsäure (*R_f* 0,47, Fluoreszenz im UV), β -Alanin (0,28), Glycin (0,19), Serin (0,13), Ornithin (0,07), und *N*²-Methylornithin (0,04, orange Farbe mit Ninhydrin). Mit Triphenyltetrazolium-chlorid anfärbbare Produkte waren nicht mehr vorhanden.

Salicylsäure. Eine wässr. Lsg. von 229 mg Maduraferrin (10 ml) wurde unter Rühren mit 7,5 ml 2*M* NaOH versetzt. Nach 10 min wurde das ausgefallene Fe(OH)₃ mit Hilfe von *Celite* abfiltriert und die nahezu farblose Lsg. mit 31 ml konz. HCl angesäuert (entspricht einer ca. 6*M* HCl-Lsg.). Nach 16 h Erhitzen unter Rückfluss (N₂-Atm.) wurde die Lsg. i.v. eingedampft, erneut in wenig H₂O gelöst, wieder eingedampft und i. HV. getrocknet. Der Rückstand wurde in 70 ml EtOH und 40 ml MeOH gelöst und in Gegenwart von 45 mg PtO₂ 14 h hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wurde die Lsg. eingedampft und der Rückstand (1,2 g) in 60 ml H₂O gelöst. Nun wurde 3mal mit AcOEt ausgeschüttelt, die Extrakte mit 30 ml H₂O gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde durch präp. DC (AcOEt/MeOH 2:1, Kieselgel) gereinigt. Der Rückstand nach dem Eindampfen gab 3,1 mg farblosen Festkörper. *R_f* 0,48 (DC, AcOEt/MeOH 2:1, braun-violett nach Besprühen mit FeCl₃), *R_f* ¹H-NMR in (D₆)Aceton und EI-MS entsprachen denen von authentischer Salicylsäure.

2,4-Dinitrophenyl-Derivate der Aminosäuren. Die wässr. Lsg. nach dem Ausziehen der Salicylsäure wurde i.v. eingedampft und der Rückstand in 15 ml H₂O gelöst. Unter Rühren wurden zuerst 500 mg NaHCO₃ und dann 600 mg 2,4-Dinitrofluorbenzol in 15 ml EtOH zugegeben. Die orange-gelbe Lsg. wurde kurz auf 60° erwärmt und dann 1,5 h bei RT. gerührt. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand in 100 ml H₂O gelöst und das überschüssige 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol durch Ausschütteln mit Et₂O entfernt. Die wässr. Lsg. wurde darauf mit HCl angesäuert (pH ca. 2) und 3mal mit 80 ml Et₂O/AcOEt 2:1 ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen (Na₂SO₄) wurde i.v. zu 1,05 g viscosum gelbem Öl eingedampft. Durch DC (Kieselgel, CHCl₃/BuOH/AcOH 100:10:1) liessen sich die 2,4-Dinitrophenyl-Derivate folgender Aminosäuren erkennen: β -Alanin (*R_f* 0,51), Glycin (0,16), Serin (0,03). Ein länglicher Fleck mit *R_f* 0,38 enthielt die schwer trennbaren DNP-Derivate von Ornithin und *N*²-Methylornithin. Ein weiterer Fleck mit *R_f* 0,66 wurde nach der Isolierung durch die Spektren als 2,4-Dinitrophenol identifiziert.

Eine erste grobe Auftrennung erfolgte durch 'flash'-Chromatographie (Kieselgel, 4 × 23 cm), wobei nacheinander die Eluierungsmittel CHCl₃/BuOH 5:1 (400 ml), CHCl₃/BuOH/AcOH 100:10:1 (700 ml), 20:10:1 (300 ml), CHCl₃/EtOH/AcOH 20:10:1 (600 ml) und 10:10:1 (200 ml) eingesetzt wurden. Die weitgehend einheitlichen Fraktionen gaben 143 mg 2,4-Dinitrophenol, 183 mg DNP-Glycin und 190 mg DNP-Serin. Die übrigen DNP-Derivate wurden als Gemisch erhalten, das durch präp. DC (Kieselgel, CHCl₃/BuOH/AcOH 100:5:1) weiter aufgetrennt wurde (s. unten).

***N*-(2,4-Dinitrophenyl)-L-serin-methylester.** Die Fraktion (190 mg) wurde durch mehrfache präp. DC (CHCl₃/EtOH/HCOOH 100:8:1; 100:12:1 und 100:20:2) weiter gereinigt und gab schliesslich 13 mg eines Präparates, das gemäss DC einheitlich zu sein schien, gemäss ¹H-NMR aber noch verunreinigt war. Es wurde in 4 ml MeOH mit 6 ml CH₂N₂ umgesetzt. Nach 60 min wurde eingengt und der Ester durch präp. DC (CHCl₃, *R_f* 0,33) und zuletzt an einer kleinen Säule aus *Sephadex LH-20* (Aceton) gereinigt. Das einheitliche Präparat (1,1 mg) zeigt [α]_D²⁰ = -11° (*c* = 0,10, CHCl₃) wie ein aus L-Serin bereitetes Vergleichspräparat. ¹H-NMR (CDCl₃): 9,16 (*d*, *J* = 2,7, 1 H); 9,14 (br. *s*, 1 H, austauschbar); 8,28 (*ddd*, *J* = 9,4, 2,7, 0,5, 1 H); 6,87 (*ds*, *J* = 9,4, 1 H); 4,47 (*td*, *J* = 3,8, 7,6, 1 H); 4,20 (*dd*, *J* = 11,2, 3,8, 1 H); 4,10 (*dd*, *J* = 11,2, 3,9, 1 H); 3,85 (*s*, 3 H); 2,10 (br. *s*, 1 H, austauschbar). EI-MS: 285 (*M*⁺). Nach *R_f*, ¹H-NMR und MS nicht unterscheidbar vom Vergleichspräparat.

***N*-(2,4-Dinitrophenyl)glycin.** Die entsprechende Fraktion (183 mg) wurde durch 2malige präp. DC (Kieselgel, CHCl₃/EtOH/HCOOH 100:15:1) weiter gereinigt, wobei jeweils nur die Kernzonen der gelben Bänder weiterverarbeitet wurden, und gab nach dem Eluieren und Trocknen i. HV. 12 mg gelbes Pulver. *R_f* 0,42 (DC, CHCl₃/EtOH/HCOOH 100:15:1). ¹H-NMR ((D₅)Pyridin): 9,62 (br. *s*, 1 H, austauschbar); 9,11 (*d*, *J* = 2,7, 1 H); 8,30 (*dd*, *J* = 9,5, 2,7, 1 H); 7,06 (*d*, *J* = 9,5, 1 H); 4,49 (*d*, *J* = 3,8, 2 H). Übereinstimmung nach DC, ¹H-NMR und EI-MS mit einer authentischen Probe.

***N*,O-Bis(2,4-dinitrophenyl)-L-serin.** Eine Nebenfraktion bei der Reinigung von DNP-Glycin wurde durch nochmalige präp. DC gereinigt. Nach dem Eindampfen des Eluats und Trocknen i. HV. kristallisierte die Verbindung in gelben Nadeln. *R_f* 0,33 (DC, CHCl₃/EtOH/HCOOH 100:8:1). ¹H-NMR ((D₆)DMSO): 9,74 (*d*, *J* = 6,3, 1 H, austauschbar); 8,86 (*d*, *J* = 2,7, 1 H); 8,67 (*d*, *J* = 2,8, 1 H); 8,43 (*dd*, *J* = 9,3, 2,8, 1 H); 8,11 (*dd*, *J* = 9,6, 2,7, 1 H); 7,64 (*d*, *J* = 9,4, 1 H); 7,26 (*d*, *J* = 9,4, 1 H); 4,80 (*dd*, *J* = 10,1, 2,9, 1 H); 4,64 (*dd*, *J* = 10,1, 6,4, 1 H); 4,46 (*td*, *J* = 6,3, 2,9, nach Austausch mit D₂O *dd*, *J* = 6,4, 2,9, 1 H).

***N*², *N*^d-Bis(2,4-dinitrophenyl)-*N*²-methyl-L-ornithin (3).** Die Mischfraktion wurde durch mehrfache präp. DC (CHCl₃/EtOH/AcOH 100:10:1 und 100:15:1) weiter gereinigt, wobei jeweils die vordere und die hintere Hälfte der breiten gelben Zonen separat eluiert und weiter verarbeitet wurden. Aus den hinteren Zonenhälften wurde nach

3maligem Chromatographieren, Eluieren und Trocknen i. HV. 18 mg gelbes viskoses Öl erhalten. R_f 0,52 (DC, $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{AcOH}$ 100:20:1). $[\alpha]_D^{20} = +209,3^\circ$ ($c = 0,87$, Aceton). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): 8,92 (d , $J = 2,7$, 1 H); 8,55 (d , $J = 2,8$, 1 H); 8,19 (dd , $J = 9,5$, 2,7, 2 H); 7,25 (d , $J = 9,6$, 1 H); 7,12 (d , $J = 9,6$, 1 H); 4,47 (dd , $J = 10,4$, 4,8, 1 H); 3,58 (t , $J = 6,6$, 2 H); 2,86 (s , 3 H); 2,26 (m , 1 H); 2,13 (m , 1 H); 2,02–1,76 ($br. m$, 2 H). $^1\text{H-NMR}$, R_f und $[\alpha]_D$ in Übereinstimmung mit einem ausgehend von L-Ornithin bereiteten synthetischen Präparat (s. unten). FAB-MS: 500 ($[M - H + Na]^+$), 478 (M^+), 477, 459, 433.

N-(2,4-Dinitrophenyl)- β -alanin. Wenn jeweils die vorderen Hälften der gelben Zonen weiter verarbeitet wurden, erhielt man nach zweimaliger Wiederholung der präp. DC und Trocknen des Eluats i. HV. 27 mg gelbe Kristalle. Schmp. 141–142°. R_f 0,34 (DC, $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{AcOH}$ 100:7:1). $[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$ (Aceton). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): 9,01 (d , $J = 2,7$, 1 H); 8,28 (dd , $J = 9,6/2,7$, 1 H); 7,21 (d , $J = 9,6$, 1 H); 3,76 (t , $J = 6,5$, 2 H); 2,73 (t , $J = 6,5$, 2 H). EI-MS: 256 (5), 255 (43, M^+). Übereinstimmung von Schmp., R_f und $^1\text{H-NMR}$ mit einer authentischen Probe.

Das in Zwischenfunktionen dieser Chromatogramme angereicherte Bis(2,4-Dinitrophenyl)ornithin konnte nicht rein erhalten werden. Aus einem späteren Abbau (s. unten) ergibt sich, dass die L-Form vorliegt.

Partialhydrolyse von 2. In 4 ml 1N HCl wurden 69 mg **2** 45 min auf 60° erwärmt. Nach dem Eindampfen und Trocknen i. HV. konnten im Rückstand durch DC keine freien Aminosäuren nachgewiesen werden, hingegen waren mehrere schlecht voneinander getrennte Flecken mit R_f um 0,5 (Kieselgel, $\text{BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ 5:2:2) durch Fluoreszenz im UV erkennbar. Die entsprechenden Verbindungen wurden durch präp. DC im gleichen Fließmittel als Gemisch isoliert und an *Sephadex LH-20* ($0,7 \times 13$ cm, MeOH) weiter gereinigt. Nach dem Eindampfen wurden 105 mg Gemisch erhalten, das durch präp. DC auf 4 *RP-18*-Platten ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1) in vier weitgehend einheitliche Komponenten aufgetrennt wurde. Man erhielt zunächst 15 mg Partialhydrolysat *A* (R_f 0,80, *RP-18*), 12 mg Partialhydrolysat *D* (R_f 0,35) sowie ein Gemisch von *B* und *C* (16 mg, R_f 0,74 und 0,66). Das letztere wurde auf 2 *RP-18*-Platten mit $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2:1 weiter aufgetrennt und ergab nach dem Eluieren mit MeOH und Trocknen 4,5 mg reines *B* und 6,2 mg reines *C*.

Proben von ca. 0,5 mg wurden mit je 2 ml 6N HCl 6 h im Ölbad von 130° vollständig hydrolysiert und die Produkte durch DC ($\text{PhOH}/\text{H}_2\text{O}$ 8:2) untersucht. Salicylsäure wurde durch die blaue Fluoreszenz im UV erkannt, die Aminosäuren nach Anfärben mit Ninhydrin, reduzierende Verbindungen nach Besprühen mit Triphenyltetrazolium-chlorid/NaOH. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Das Totalhydrolysat von Partialhydrolysat *B* wurde in 1,5 ml MeOH mit 0,5 mg PtO_2 hydriert (60 h, RT.). Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wurde eingedampft und i. HV. getrocknet. Das DC ($\text{PhOH}/\text{H}_2\text{O}$ 3:1) zeigte die Anwesenheit von Salicylsäure (R_f 0,47), β -Alanin (0,27), Glycin (0,16), Serin (0,12) und *N* $^\alpha$ -Methylornithin (0,05, orange mit Ninhydrin). Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit authentischen Proben im obigen und 2 weiteren Fließmitteln.

Methylester der Partialhydrolysate A, B, C und D. Die Hauptmengen der Partialhydrolysate wurden in 1,5 ml MeOH mit CH_2N_2 in Et_2O bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt und nach ca. 2 h eingedampft. DC (*RP-18*, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 oder 2:1) zeigte, dass in allen Fällen mindestens 2 Produkte entstanden waren (Methylierung teilweise auch an der phenolischen OH-Gruppe). Die jeweilige Hauptkomponente wurde durch präp. DC (*RP-18*) isoliert und durch EI-MS untersucht.

N-Salicyl- β -alanin-methylester (5). Aus Partialhydrolysat *A*. $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (223,22). EI-MS: 223 (0,4), 222 (0,3), 205 (0,1), 187 (2), 173 (4), 151 (2), 150 (1), 149 (4), 145 (3), 130 (1), 129 (2), 126 (10), 116 (1), 115 (2), 114 (2), 103 (2), 102 (3), 101 (2), 99 (5), 98 (36), 95 (5), 93 (2), 88 (4), 87 (3), 86 (3), 85 (4), 84 (4), 76 (9), 75 (17), 74 (5), 73 (8), 72 (4), 71 (3), 70 (8), 69 (41), 61 (76), 60 (26), 59 (9), 58 (13), 55 (14), 51 (21), 50 (9), 45 (100), 44 (53), 43 (75), 42 (16), 41 (10), 39 (9), 31 (44), 30 (19), 29 (28), (13), 27 (24).

N-Salicyl- β -alanyl-glycin-methylester (6). Aus Partialhydrolysat *C*. $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ (280,28). EI-MS: 280 (3), 279 (13), 208 (5), 167 (12), 154 (5), 152 (4), 151 (3), 150 (9), 149 (44), 141 (12), 137 (4), 135 (3), 129 (8), 127 (6), 126 (6), 125 (8), 123 (7), 121 (4), 119 (6), 112 (10), 111 (15), 109 (13), 105 (9), 104 (12), 99 (7), 98 (10), 97 (33), 96 (12), 95 (20), 94 (3), 93 (10), 91 (12), 85 (22), 84 (16), 83 (31), 82 (11), 81 (27), 76 (7), 73 (13), 71 (35), 70 (18), 69 (61), 68 (14), 67 (18), 57 (83), 56 (23), 55 (69), 43 (200), 43 (100), 42 (14), 41 (72), 39 (18), 29 (31), 27 (18).

Tab. 3. Bausteine der Partialhydrolysate von **2**

Partialhydrolysat	Salicylsäure	β -Ala	Gly	Ser	red. Subst.
<i>A</i>	+	+	—	—	—
<i>B</i>	+	+	+	+	+
<i>C</i>	+	+	+	—	—
<i>D</i>	+	+	+	+	—

N-(*o*-Methoxybenzoyl)- β -alaninyl-glycyl-L-serin-methylester (7). Aus Partialhydrolysat *D*. $C_{17}H_{23}N_3O_7$ (381,39). EI-MS: 382 (0,1), 363 (18), 351 (21), 331 (0,4), 322 (0,3), 260 (6), 248 (2), 232 (1), 222 (4), 205 (2), 204 (8), 194 (8), 191 (2), 187 (3), 177 (4), 176 (6), 165 (1), 161 (7), 155 (2), 152 (6), 151 (6), 136 (15), 135 (100), 134 (6), 121 (3), 120 (2), 107 (1), 105 (9), 104 (5), 98 (3), 92 (6), 77 (17), 70 (2), 64 (2), 59 (2), 55 (5), 45 (3), 43 (5), 32 (6), 31 (9), 30 (8), 29 (5).

N ^{δ} -Hydroxy-*N* ^{α} -methyl-(*N* ^{δ} -salicyl- β -alaninyl-glycyl-L-seryl)-L-ornithin-methylester (8). Aus Partialhydrolysat *B*. $C_{22}H_{33}N_5O_9$ (511,54). EI-MS: 494 (0,1 $M^+ - OH$), 482 (0,2), 452 (0,2), 408 (0,5), 390 (0,5), 386 (1), 363 (2), 351 (4), 340 (5), 336 (1), 312 (6), 308 (2), 304 (2), 285 (7), 284 (7), 279 (6), 268 (6), 258 (11), 257 (8), 239 (10), 223 (4), 213 (4), 205 (3), 199 (8), 187 (46), 176 (5), 167 (8), 155 (25), 149 (47), 141 (7), 135 (22), 126 (12), 116 (8), 113 (12), 102 (11), 101 (13), 98 (14), 97 (20), 91 (13), 98 (14), 97 (20), 91 (13), 88 (13), 87 (12), 85 (16), 83 (24), 73 (45), 71 (30), 69 (31), 62 (36), 60 (100), 57 (85), 45 (80), 43 (95), 41 (70), 15 (73). FAB-MS: 511 (M^+), 494.

Methylierung von 2. Zu einer Lsg. von 14,5 mg **2** in 0,8 ml abs. MeOH wurden 5,3 mg Na in 1,1 ml abs. MeOH rasch zugetropft. Nach 10 min wurden unter Rühren 131 mg MeI zugegeben. Nach 5 h bei RT. war die Reaktion gemäss DC weitgehend beendet. Nach 8 h wurde eingedampft und der schwach rötliche Rückstand (56 mg) mittels präp. DC (Kieselgel, BuOH/AcOH/H₂O 3:1:1, R_f 0,69) gereinigt. Nach dem Eluieren (AcOMe/AcOH/H₂O 5:1:1) und Eindampfen kristallisierte der blass gelbliche Rückstand über Nacht. Eine weitere Reinigung erfolgte an *Sephadex LH-20* (0,7 $\times$ 13 cm, Aceton/MeOH 2:1). Das Eluat, nach dem Trocknen ein farbloses Pulver, war gemäss HPLC (*RP-18*, 0,5 $\times$ 25 cm, MeOH/H₂O 2:1, 46 bar) einheitlich, t_R 10,1 min. Es wurde mit 6 ml 6N HCl unter N₂ 8 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand (45 mg) in 7 ml MeOH mit 4,5 mg PtO₂ 10 h bei RT. unter H₂ hydriert. Der Rückstand nach dem Filtrieren und Eindampfen wurde in 3 ml H₂O gelöst und 15 mg NaHCO₃ sowie 44 mg 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol in 4 ml EtOH zugegeben. Nach 2 h Rühren bei RT. wurde die Lsg. stark eingeeengt, mit 10 ml H₂O verdünnt und mit Et₂O ausgeschüttelt (Et₂O mit überschüssigem 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol verworfen). Nach dem Ansäuern der wässr. Phase (HCl, pH ca. 2) wurde 3mal mit 10 ml AcOMe ausgezogen und der Extrakt nach dem Trocknen (Na₂SO₄) eingedampft. Der Rückstand wurde durch präp. DC (Kieselgel, CHCl₃/EtOH/AcOH 100:15:1) aufgetrennt. Eine Zone mit R_f ca. 0,45 enthielt gemäss HPLC (*RP-18*-Säule, 0,5 $\times$ 25 cm MeOH/H₂O 2:1, 72 bar) sowohl **3** (t_R 11,3 min) als auch *N* ^{δ} -*Bis*(2,4-dinitrophenyl)-*N* ^{δ} -methylornithin (**4**; t_R 6,2 min). Die Identität der Verbindungen wurde durch Vergrößerung des jeweiligen Piks nach Koinjektion mit synthetischen Präparaten (s. unten) bewiesen.

Durch mehrmalige Injektion und Sammeln der entsprechenden Fraktionen konnten 1,2 mg reines **4** semipräparativ gewonnen werden. $[\alpha]_D^{25} = -81^\circ$ ($c = 0,12$, Aceton), wie das synthetische Vergleichspräparat der L-Reihe.

Vergleichspräparate. *N* ^{δ} -*Bis*(2,4-dinitrophenyl)-*N* ^{α} -methyl-L-ornithin (**3**). Zu einer Suspension von 3,01 g käuflichem *n*-Benzoyloxycarbonyl-L-ornithin in 50 ml MeOH wurden langsam 13,2 ml 35% wässr. Formaldehyd-Lsg. zugetropft. Nach 2 h Rühren bei RT. wurde noch 30 min unter Rückfluss gekocht und nach dem Abkühlen innert 1 h 2,9 g NaBH₄ in kleinen Portionen zugegeben. Nach 8 h Rühren wurde mit AcOH neutralisiert und *i.v.* eingedampft. Der Rückstand, gelöst in 40 ml MeOH, wurde an *Sephadex LH-20* (2,7 $\times$ 72 cm MeOH) chromatographiert. Die gemäss DC einheitlichen Fraktionen gaben 1,1 g (35%) *N* ^{α} -Methyl-*N* ^{δ} -benzyloxycarbonyl-L-ornithin. Davon wurden 350 mg in 35 ml MeOH in Gegenwart von 35 mg 10% Pd/C während 14 h hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators mit Hilfe von *Celite* wurde das Filtrat eingedampft zu 130 mg farblosem *N* ^{α} -Methyl-L-ornithin, R_f 0,20 (DC, Kieselgel, BuOH/AcOH/H₂O 4:1:1). Zu 95 mg davon in 7 ml H₂O wurden 300 mg NaHCO₃ zugegeben und 370 mg 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol in 8 ml EtOH zugetropft. Nach 2 h Rühren bei RT. wurde *i.v.* auf ca. 5 ml eingeeengt, 15 ml H₂O zugegeben und überschüssiges Reagens durch Ausschütteln mit Et₂O entfernt. Die wässr. Phase wurde mit HCl auf pH ca. 2 angesäuert und 4mal mit Et₂O/AcOEt 2:1 ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der Extrakte (Na₂SO₄) wurde eingedampft und der Rückstand (87 mg) durch präp. DC (CHCl₃/EtOH/AcOH 100:12:1) gereinigt. Eine anschliessende präp. HPLC (*RP-18*, 0,5 $\times$ 25 cm MeOH/H₂O 2:1, 46 bar, Injektion von je ca. 1 mg Substanz) befreite das Präparat von geringfügigen NebenkompONENTEN. Die gesammelten einheitlichen Hauptfraktionen aus 20 Injektionen gaben 14 mg **3** als gelbes Pulver. ¹H-NMR (CD₃OD): 8,93 (*d*, $J = 2,7$, 1 H); 8,55 (*d*, $J = 2,7$, 1 H); 8,54 (*br. s*, 1 H, austauschbar); 8,19 (*dd*, $J = 9,6$, 2,7, 1 H); 8,13 (*dd*, $J = 9,5$, 2,8, 1 H); 7,18 (*d*, $J = 9,6$, 1 H); 7,14 (*d*, $J = 9,6$, 1 H); 4,18 (*dd*, $J = 10,7$, 4,2, 1 H); 3,58 (*t*, $J = 6,8$, 2 H); 2,88 (*s*, 3 H); 2,26 (*br. m*, 1 H); 2,08 (*m*, 1 H); 1,99–1,74 (*br. m*, 2 H).

Aus 8 mg **3** wurde durch Auflösen in 3 ml MeOH und 0,5 ml 1N HCl und Eindampfen *i.v.* das Hydrochlorid bereitet, gelbes amorphes Pulver. $[\alpha]_D^{20} = +209,7^\circ$ ($c = 0,38$, Aceton). ¹H-NMR (CD₃OD): 8,93 (*d*, $J = 2,7$, 1 H); 8,56 (*d*, $J = 2,8$, 1 H); 8,21 (*dd*, $J = 9,5$, 2,7, 1 H); 8,20 (*dd*, $J = 9,6$, 2,7, 1 H); 7,26 (*d*, $J = 9,6$, 1 H); 7,13 (*d*, $J = 9,6$, 1 H); 4,52 (*dd*, $J = 10,5$, 4,8, 1 H); 3,58 (*t*, $J = 6,7$, 2 H); 2,85 (*s*, 3 H); 2,24 (*m*, 1 H); 2,14 (*m*, 1 H); 1,88 (*br. m*, 2 H); gute Übereinstimmung mit dem Präparat aus dem Abbau von **2** nach ¹H-NMR und DC (R_f 0,25, CHCl₃/EtOH/AcOH 100:20:1).

N^{α},N^{δ} -Bis(2,4-dinitrophenyl)- N^{δ} -methyl-L-ornithin (4). Käufliches N^2 -(Benzyloxycarbonyl)-L-ornithin wurde wie oben mit CH_2O und NaBH_4 methyliert und die Schutzgruppe durch Hydrogenolyse abgespalten. Durch präp. DC (Kieselgel, $\text{PhOH}/\text{H}_2\text{O}$ 5:2, R_f 0,22) wurde ein einheitliches Präparat erhalten, wie üblich mit 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol umgesetzt und das Derivat wieder durch präp. DC gereinigt. Nach einer weiteren Chromatographie an *Sephadex LH-20* ($\text{MeOH}/\text{Aceton}$ 4:1) wurde das Derivat als gelbes amorphes Pulver erhalten. $[\alpha]_D^{22} = -83^\circ$ ($c = 0,15$, Aceton). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): 8,96 (*d*, $J = 2,7$, 1 H); 8,50 (*d*, $J = 2,8$, 1 H); 8,18 (*dd*, $J = 9,6$, 2,7, 1 H); 8,14 (*dd*, $J = 9,6$, 2,8, 1 H); 7,24 (*d*, $J = 9,6$, 1 H); 6,99 (*d*, $J = 9,6$, 1 H); 4,21 (*t*, $J = 5,1$, 1 H); 3,54 (*m*, 1 H); 3,43 (*m*, 1 H); 2,89 (*s*, 3 H); 2,00 (*m*, 2 H); 1,83 (*m*, 2 H).

Die NMR-Spektren verdanken wir Frl. B. Brandenberg und den Herren M. Langenauer, F. Fehr und M. Welti, die IR-Spektren Herrn H. Hediger, die MS Frau L. Golgowski, Frl. J. Weber, Dr. J. Meili und Herrn U. Schefer, die Elementaranalysen Herrn D. Manser, alle vom org.-chem. Laboratorium der ETH Zürich, die Fe-Bestimmungen (Atom-Absorption) Frau K. Hametner vom anorg.-chem. Laboratorium der ETH Zürich. Ein Teil der FAB-MS wurden bei Ciba-Geigy AG, Basel, aufgenommen, wofür wir Herrn Dr. J. P. Pachlatko bestens danken. Für die finanzielle Unterstützung der Arbeiten in Tübingen danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 76 und 323).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. Rohr, S. Eick, A. Zeeck, P. Reuschenbach, H. Zähler, H. P. Fiedler, *J. Antibiot.* **1988**, 41, im Druck.
- [2] H. Bickel, E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, V. Prelog, E. Vischer, A. Wettstein, H. Zähler, *Experientia* **1960**, 16, 129; H. Zähler, E. Bachmann, R. Hütter, J. Nüesch, *Path. Microbiol.* **1962**, 25, 708; W. Keller-Schierlein, V. Prelog, H. Zähler, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1964**, 22, 279.
- [3] H. Bickel, G. E. Hall, W. Keller-Schierlein, V. Prelog, E. Vischer, A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta* **1960**, 43, 2129.
- [4] W. Keller-Schierlein, V. Prelog, *Helv. Chim. Acta* **1961**, 44, 1981.
- [5] H. Bickel, H. Keberle, E. Vischer, *Helv. Chim. Acta* **1963**, 46, 1385.
- [6] P. Huber, Dissertation ETH, Zürich, Nr. 7077, 1982.
- [7] M. Konishi, H. Ohkuma, F. Sakai, T. Tsuno, H. Koshiyama, T. Ito, H. Kawaguchi, *J. Antibiot.* **1981**, 34, 148.
- [8] T. Shiroza, N. Ebisawa, K. Furihata, T. Endo, H. Seto, N. Otake, *Agric. Biol. Chem.* **1982**, 46, 1891.
- [9] H. Maehr, C. Liu, N. J. Palleroni, J. Smallheer, L. Todaro, T. H. Williams, J. F. Blount, *J. Antibiot.* **1986**, 39, 17.
- [10] J. B. Neilands, *Structure Bonding* **1984**, 58, 1.
- [11] N. Izumiya, *J. Chem. Soc. Jpn.* **1951**, 72, 550; W. A. Skinner, J. G. Johannsson, *J. Med. Chem.* **1972**, 37, 1673.
- [12] L. Bassi, B. Joos, P. Gassmann, H. P. Kaiser, H. Leuenberger, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1963**, 66, 92.