

267. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

143. Mitteilung¹⁾

Echinocandin B, ein neuartiges Polypeptid-Antibioticum aus *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: Isolierung und Bausteine

von Fritz Benz, Fritz Knüsel, Jakob Nüesch, Hansjörg Treichler
und Walter Voser

Pharma-Forschungslaboratorien der CIBA-GEIGY A.G., Basel

Robert Nyfeler und Walter Keller-Schierlein

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

(4. X. 74)

Summary. From a strain of *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*, A 32204, echinocandin, a novel polypeptide antibiotic complex with high and specific anti-yeast activity was isolated. The main component, echinocandin B, was separated by counter-current distribution. A tentative molecular formula $C_{32}H_{81}N_7O_{18}$ is discussed. The antibiotic is characterized by its IR. and NMR. spectra and by its characteristic hydrolytic degradation products: linolic acid, L-4-hydroxyproline, L-4-oxoproline, (2S, 3S, 4S)-4-methyl-3-hydroxy-proline, L-threonine (2 mols), and 1-(*p*-hydroxyphenyl)-3-amino-propan-2-one.

Der antibiotisch aktive Komplex Echinocandin entsteht bei der Züchtung eines neuen *Aspergillus*-Stammes, der in den Pharma-Forschungslaboratorien der Ciba-Geigy AG unter der Bezeichnung A 32204 aufbewahrt wird. Der Pilz wurde von Buchenblättern (*Fagus silvatica* L.) isoliert. Nach Raper & Fennell [2] lässt sich der Stamm A 32204 der Art *Aspergillus nidulans* zuordnen. In seinen wesentlichen morphologischen Merkmalen entspricht er der von Fennell & Raper [3] beschriebenen Varietät von *Aspergillus nidulans* (EIDAM) WINT., *Aspergillus nidulans* (EIDAM) WINT. var. *echinulatus* FENNELL & RAPER.

Echinocandin wird bei der aeroben Submerszüchtung des Pilzstammes A 32204 in Schüttelkolben oder Fermentern gebildet. Echinocandin B weist *in vitro* eine hohe spezifisch antifungische Wirkung gegenüber verschiedenen Arten hefeartiger Pilze wie *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Torulopsis dattila*, *Torulopsis sphaerica*, *Endomyces bispora* und *Hansenula californica* auf. Gegenüber Bakterien, Dermatophyten und weiteren Fadenpilzen ist das Antibioticum inaktiv. Die selektive Wirksamkeit gegen *Candida albicans* bestätigte sich auch bei der Prüfung von 22 in der Klinik frisch isolierten *Candida-albicans*-Stämmen. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) im Gradientenplatten-Strichtest nach Szybalski [4] betrug 0.2–0.35 γ /ml. Im Vergleich zu Nystatin liegt die MIC etwa 5–10mal tiefer.

Die Komponente B des neuen Antibioticums wurde in Form eines amorphen, farblosen Pulvers erhalten, das frisch bereitet bei der Dünnschichtchromatographie einen einzigen Fleck gab. Bei einem mehrere Monate alten Präparat begann sich ein Zersetzungsprodukt durch einen schwächeren Fleck mit kleinerem Rf-Wert bemerk-

¹⁾ 142. Mitteilung s. [1].

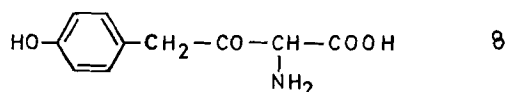
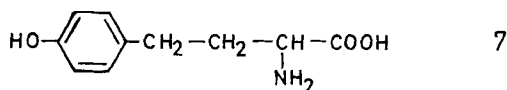
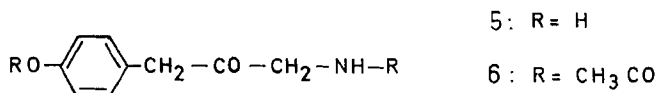
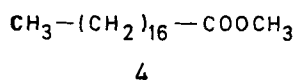
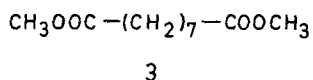
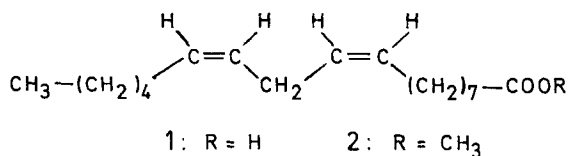
bar zu machen. Ein zwei Jahre altes Präparat enthielt vorwiegend das Zersetzungsprodukt. Da dieses bei der Hydrolyse die gleichen dünn-schichtchromatographisch nachweisbaren Abbauprodukte gab wie das reine Echinocandin B, wurde für die nachfolgend beschriebenen Abbauprobungen zum Teil ein Gemisch des Antibiotikums mit seinem Zersetzungsprodukt eingesetzt.

Aus Molekulargewichtsbestimmungen von Derivaten konnte für das Echinocandin B auf ein Molekulargewicht um 1100 geschlossen werden. Massenspektren sowohl des freien Antibiotikums als auch mehrerer Derivate zeigten nur relativ kleine Fragmente an, aus denen sich keine Schlussfolgerungen auf die Bruttoformel ziehen liessen. Mikroanalysen von Verbindungen dieses Molekulargewichtsbereiches sind in der Regel mehrdeutig. Dazu kommt eine Unsicherheit, die sich aus dem amorphen Zustand der Verbindung ergibt, der die Reproduzierbarkeit der Analysen beeinträchtigte. Die vorläufig angenommene Bruttoformel, $C_{52}H_{81}N_7O_{18}$, beruht daher ausser auf den Analysen des Antibiotikums und einiger Derivate vor allem auch auf spektroskopischen Daten und Abbauergebnissen. Sie soll daher erst am Schluss dieser Abhandlung diskutiert werden. Ebenso lassen sich die spektroskopischen Befunde anhand der Kenntnisse der Abbauprodukte besser verstehen. Es wird daher hier zunächst der hydrolytische Abbau besprochen und erst anschliessend werden die Eigenschaften des Antibiotikums näher diskutiert.

Der hydrolytische Abbau. – Bei der sauren Hydrolyse unter den Bedingungen der Peptidspaltung wurden ein ätherlösliches und mehrere wasserlösliche Abbauprodukte erhalten. Das lipophile Produkt wurde rasch als Linolsäure (1) erkannt und in Form des Methylesters (2) durch Gas-Chromatographie und durch IR.- und NMR.-Spektrum eindeutig identifiziert. Aus dem Fehlen einer IR.-Bande bei *ca.* 970 cm^{-1} darf geschlossen werden, dass wie bei der aus Fetten und Ölen bekannten Linolsäure beide Doppelbindungen *cis*-substituiert sind. Da eine andere Stellung der Gruppe $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ innerhalb der Fettsäurekette möglicherweise nur geringfügige spektroskopische Veränderungen gegenüber authentischem Linolsäure-methylester zur Folge hätte, wurde die Stellung 9 der ersten Doppelbindung durch oxydativen Abbau zu Azelainsäure (als Dimethylester (3) durch Gas-Chromatographie nachgewiesen) erhärtet.

Echinocandin B nimmt bei der katalytischen Hydrierung *ca.* 2 Mol-Äqu. Wasserstoff auf. Tetrahydro-echinocandin B gibt bei der Totalhydrolyse anstelle der Linolsäure Stearinsäure, die ebenfalls als Methylester (4) durch Gas-Chromatographie und die Spektren identifiziert wurde.

Die wasserlöslichen Hydrolyseprodukte des Echinocandins B und seines Tetrahydroderivates enthielten gemäss Dünnschicht-Chromatographie die gleichen 5 ninhydrinpositiven Bestandteile, die wegen teilweiser Überlappung nur in zweidimensionalen Chromatogrammen klar zu erkennen waren. Dabei fiel auf, dass nur eines der Produkte (später als Threonin erkannt) die für α -Aminosäuren charakteristische violette Farbreaktion mit Ninhydrin gab, während die übrigen vier Flecke eine gräuliche, gelbe oder orange Färbung zeigten. Eine gelbe Ninhydrinreaktion ist vor allem für Prolin und seine Abkömmlinge charakteristisch. Tatsächlich gaben zwei der Produkte mit Isatin einen blauen Fleck wie Prolin. Eines der Hydrolyseprodukte (4-Oxoprolin) besass zudem reduzierende Eigenschaften. Es gab mit alkalischem



Triphenyltetrazoliumchlorid eine rote und mit Anilinhydrogenphthalat eine rosa Färbung²⁾ (s. Tabelle 4 im exper. Teil).

Die präparative Auftrennung des Gemisches erfolgte durch eine Kombination von Cellulose-Chromatographie und Ionenaustauscher-Chromatographie. Es konnten folgende Produkte isoliert und in reiner Form oder als Derivate charakterisiert werden:

1. *1-(p-Hydroxyphenyl)-3-amino-propan-2-on* (5). Das freie Amin liess sich durch Chromatographie und *Craig*-Verteilung nur teilweise reinigen. Ein stark angereichertes Präparat wurde daher mit Essigsäureanhydrid und Pyridin zu einem kristallinen Derivat umgesetzt, das aufgrund der beiden Signale bei 2,0 und 2,3 ppm im NMR.-Spektrum (Fig. 1) ein Diacetylderivat ist. Die durch Elementaranalyse ermittelte Bruttoformel, C₁₃H₁₅NO₄, wurde durch ein Molekelion im Massenspektrum (*m/e* 249) bestätigt. Der aromatische Charakter der Verbindung ergibt sich zunächst aus dem UV.-Spektrum mit λ_{max} (log ϵ) 221 nm (3,92) und 273 (3,28), das dem von Tyrosin recht ähnlich ist. Die Konstitution des aromatischen Teils ergibt sich aus dem NMR.-Spektrum (Fig. 1) mit einer *AA'**BB'*-Signalgruppe zu 4 Protonen bei ca. 7,1 ppm. Es liegt demnach ein *p*-disubstituierter Benzolring vor. Das IR.-Spektrum zeigt bei 1760 cm⁻¹ eine Bande für einen Phenylester, wodurch der eine Substituent am aromatischen Ring als Acyloxyrest charakterisiert ist. Der aliphatische Teil der Molekel muss aufgrund der IR.-Banden bei 1720 und 1650 cm⁻¹ eine nicht konjugierte Keto-Gruppe und eine Amidgruppe besitzen. Die letztere ist gemäss dem breiten NMR.-Signal bei 6,25 ppm (NH) sekundär und liegt an einer CH₂-Gruppe, denn das NH-

²⁾ Alle Reagentien für die Papier- und Dünnschichtchromatographie nach [5].

Proton koppelt mit einem Zweiprotonen-Dublett ($J = 5$ Hz) bei 4,2 ppm (Spinentkopplung s. Fig. 1). Eine weitere Methylengruppe gibt ein Singulett bei 3,75 ppm, was mit einer Methylengruppe zwischen einem aromatischen Ring und einer Keto-Gruppe bestens vereinbar ist. Aus diesen Befunden ergibt sich für das Diacetylderivat zwingend die Struktur **6**. Da das angereicherte Amin vor der Acetylierung kein Acetylsignal zeigte, sind beide Acetylgruppen erst durch die nachträgliche Acetylierung des Hydrolyseproduktes **5** hinzugekommen.

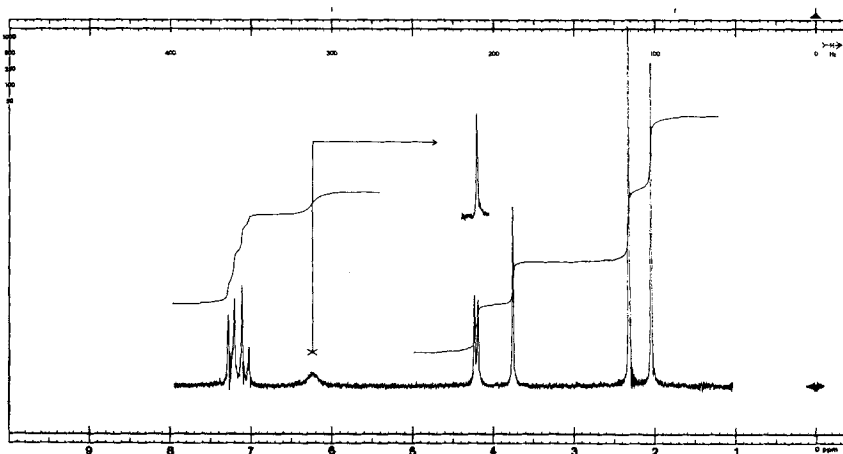


Fig. 1. NMR.-Spektrum von 1-(*p*-Acetoxyphenyl)-3-acetamido-propan-2-on (**6**) in CDCl_3 ; 100 MHz

Da am Aufbau des Echinocandins B u.a. mehrere Aminosäuren beteiligt sind (s. unten), hielten wir es für wahrscheinlich, dass das 1-(*p*-Hydroxyphenyl)-3-amino-propan-2-on ein sekundäres Zerfallsprodukt einer primär durch Hydrolyse entstandenen Aminosäure darstellt. Eine α -Amino- β -ketosäure **8** würde z.B. leicht durch Decarboxylierung zu **5** zerfallen. Wenn der Hydrolyse von Tetrahydro-echinocandin B eine Reduktion vorgeschaltet würde, sollte es möglich sein, ein an der Ketogruppe reduziertes Derivat der Aminosäure **8** zu fassen. Nun liegt allerdings die Ketogruppe von **8** im intakten Antibioticum nicht frei vor und ist einer selektiven Reduktion mit den üblichen Reduktionsmitteln (NaBH_4 , Clemmensen-Reduktion usw.) nicht zugänglich. Wenn aber die Hydrolyse direkt unter reduktiven Bedingungen, nämlich mit Jodwasserstoff durchgeführt wurde, trat der reduktive Angriff an der Ketogruppe von **8** mit der Decarboxylierung in Konkurrenz. Neben reichlich Decarboxylierungsprodukt **5** wurde in geringer Menge eine neue Aminosäure gefasst, die sich durch das NMR.-Spektrum (Fig. 2) als Homotyrosin (**7**) zu erkennen gab. Eine Bestätigung für die Formel **7** ergab sich aus dem Massenspektrum des Bis-trifluoracetylmethylesters von **7**. Neben dem schwachen Pik des Molekelions mit m/e 401 findet man die für Methylester typischen Signale $M - 31$ und $M - 59$ bei m/e 370 und 342. Ein Signal bei m/e 288 ist dem Verlust von Trifluoracetamid durch eine *McLafferty*-Umlagerung zuzuschreiben. Eine andere, durch die Formeln **9** und **10** charakterisierte *McLafferty*-Umlagerung ist für den Basispik (m/e 185) verantwortlich. Aus dem Ion **10** führt der Verlust von Methanol zu einem Fragment mit m/e 153 (39%) und eine

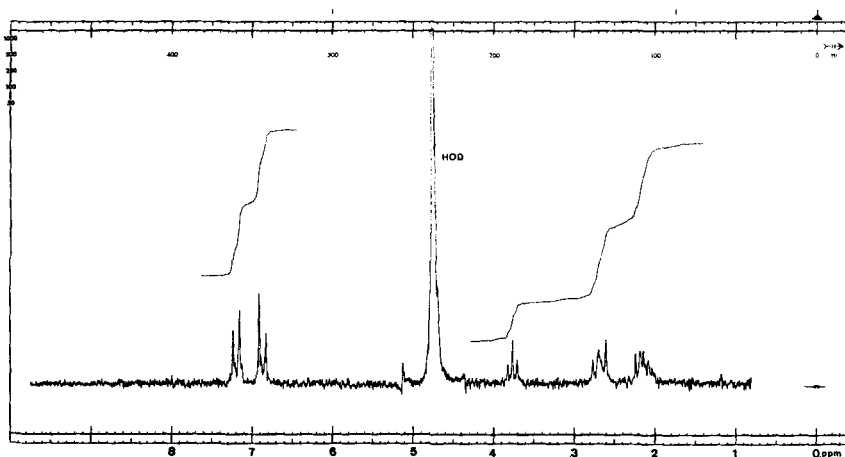
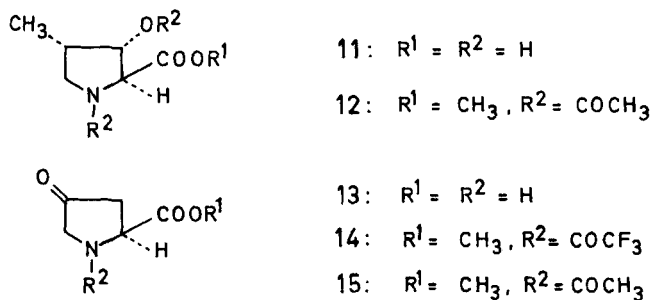
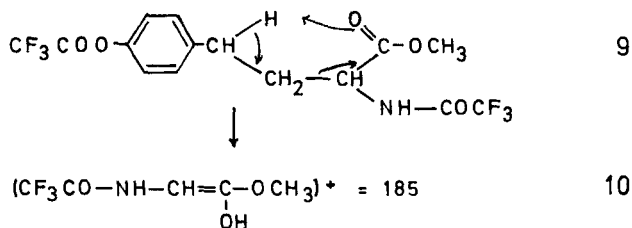


Fig. 2. NMR.-Spektrum von Homotyrosin (7) in D_2O ; 100 MHz

weitere Abspaltung von CO zu dem mit m/e 125 (15%). Ein starkes Signal bei m/e 203 (48%) ist durch das Fragment $\text{CF}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2^+$ leicht zu erklären. Damit ist die Ketosäure **8** (β -Ketohomotyrosin) als Zwischenprodukt bei der Bildung von 1-(*p*-Hydroxyphenyl)-3-amino-propan-2-on bestätigt.



2. (2S,3S,4S)-4-Methyl-3-hydroxy-prolin (**11**). Eine der Aminosäuren mit gelber Ninhydrinreaktion wurde nach der Reinigung an einer Ionenaustauschersäule kristallin erhalten. Die aus den Analysen abgeleitete Bruttoformel $C_6H_{11}NO_3$ wurde durch das Massenspektrum ($M^+ = 145$) bestätigt. Das IR.-Spektrum (Fig. 3) zeigt die für Zwitterionen der Aminosäurereihe typischen Banden bei 1625 und 1580 cm^{-1} sowie eine sehr breite Bande bei ca. 2200 bis 3200 cm^{-1} . Durch säurekatalysierte

Veresterung mit Methanol und anschliessende Acetylierung wurde ein Diacetylmonomethylester (**12**) erhalten, dessen IR.-Spektrum eine Ester- und eine Amidbande (1750 bzw. 1655 cm^{-1}) aufweist, wogegen im NMR.-Spektrum das Signal

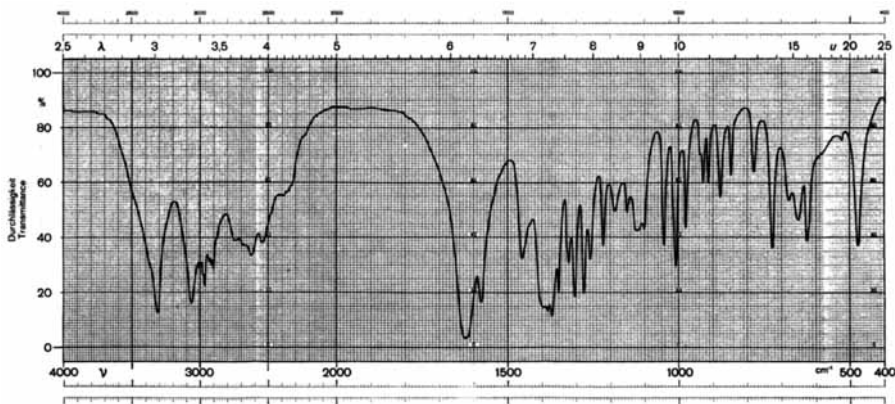


Fig. 3. IR.-Spektrum von (2S,3S,4S)-4-Methyl-3-hydroxy-prolin in KBr

eines Amidprotons fehlt. Die Aminosäure enthält demnach ausser einer acetylierbaren sekundären Aminogruppe eine acetylierbare Hydroxylgruppe. Wichtig ist ferner ein Methyl dublett im NMR.-Spektrum sowohl der freien Aminosäure (Fig. 4)

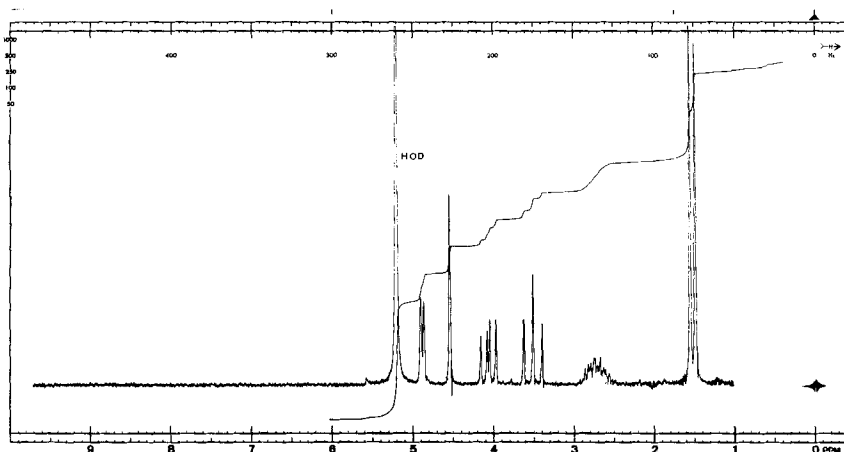


Fig. 4. NMR.-Spektrum von (2S,3S,4S)-4-Methyl-3-hydroxy-prolin in D_2O ; 100 MHz

als auch des acetylierten Methylesters bei $1,50$ bzw. $1,04$ ppm, woraus sich das Vorliegen einer CH_3-CH -Gruppierung ergibt. Diese Befunde sind bestens vereinbar mit der Struktur eines Methyl-hydroxyprolins.

Wenn man noch die Spin-Spin-Wechselwirkungen im NMR.-Spektrum berücksichtigt (Fig. 4), kann die Struktur eines 4-Methyl-3-hydroxy-prolins (**11**) eindeutig abgeleitet werden (s. Tabelle 1).

Tabelle 1. *Spin-Spin-Wechselwirkungen im NMR.-Spektrum des (2S, 3S, 4S)-4-Methyl-3-hydroxy-prolins*

Proton	(ppm)	<i>J</i> (Hz)
H—C(2)	4,50	} 0
H—C(3)	4,85	
H—C(4)	2,72	} 4
H—C(5a)	3,52	
H—C(5b)	4,05	} 11 } 8

Auffallend ist dabei, dass zwischen H—C(2) und H—C(3) keine Kopplung erkennbar ist. Aus einer *Röntgen*-Strukturanalyse [6] ergibt sich für den kristallinen Zustand ein Torsionswinkel H—C(2)—C(3)—H von 88,76°. Wenn man für den gelösten Zustand eine nicht wesentlich verschiedene Konformation annimmt, ist daraus die unauflösbar kleine Kopplung gemäss der *Karplus*-Beziehung [7] verständlich. Auch für die grosse Kopplung von 11 Hz für $J_{4,5a}$ findet sich eine Erklärung in der Kristallstrukturanalyse, die für H—C(4)—C(5)—H_a einen Torsionswinkel von 169° ergibt.

Das ¹³C-NMR.-Spektrum ist ebenfalls mit der angenommenen Struktur bestens vereinbar. Aufgrund der chemischen Verschiebungen gegenüber Tetramethylsilan [8] und der «off-resonance»-Aufspaltung können die in der Tabelle 2 angegebenen Zuordnungen getroffen werden.

Die L-Konfiguration der neuen Aminosäure ergibt sich aus einer positiven Verschiebung der optischen Drehung beim Übergang von neutralem zu saurem Medium [9]. Hingegen liessen die spektroskopischen und chiroptischen Eigenschaften keine

Tabelle 2. ¹³C-NMR.-Spektrum von (2S, 3S, 4S)-4-Methyl-3-hydroxy-prolin in D₂O + CF₃COOH (δ gegenüber Tetramethylsilan)

δ	<i>n</i>	C	δ	<i>n</i>	C
9,95	<i>q</i>	CH ₃	68,37	<i>d</i>	C(2)
37,52	<i>d</i>	C(4)	75,98	<i>d</i>	C(3)
50,57	<i>t</i>	C(5)	170,2	<i>s</i>	COOH

Schlussfolgerungen über die Konfiguration an den C-Atomen 3 und 4 zu. Diese wurde durch eine *Röntgen*-Strukturanalyse ermittelt, worüber in einer separaten Abhandlung berichtet wird [6]. Sie ergab für die neue Aminosäure die Struktur des (2S,3S,4S)-4-Methyl-3-hydroxy-prolins (**11**).

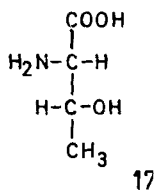
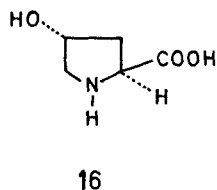
3. *L-4-Oxoprolin* (**13**). Am schwierigsten gestaltete sich die Reingewinnung dieser nur in saurer Lösung einigermaßen stabilen Aminosäure. Erst durch Ionenaustauscher-Chromatographie unter Vermeidung basischer Bedingungen wurde ihr Hydrochlorid praktisch rein erhalten. Es zeigt im IR.-Spektrum ausser der für Carboxylgruppen von Aminosäurehydrochloriden charakteristischen Bande bei 1745 cm⁻¹ eine zweite Carbonylbande bei 1770 cm⁻¹, typisch für eine Ketogruppe in einem gespannten cyclischen System. Das in Trifluoressigsäure aufgenommene NMR.-Spektrum mit zwei schlecht aufgelösten Signalhaufen bei 3,3 und 4,3 ppm ist wenig aufschlussreich; dagegen gab das ¹³C-NMR.-Spektrum wichtige Auskünfte über die Struktur der Verbindung. Ein Signal bei δ 207,3 ppm bestätigte die Anwesenheit einer Ketogruppe. Bei 170,4 ppm findet man das Signal der Carboxyl-

gruppe. Ein Signal bei 57,8 ppm ist charakteristisch für das α -C-Atom einer Aminosäure. Dazu kommen noch zwei Signale bei 51,8 und 38,6 ppm. Aus diesen Daten wurde das Vorliegen von 4-Oxoprolin vermutet. Von dieser Aminosäure, die zum erstenmal von *Kuhn & Osswald* [10] als Racemat synthetisch hergestellt wurde, und die als Baustein des Actinomycins X_2 nachgewiesen wurde [11], ist bekannt, dass sie sehr unbeständig und stark reduzierend ist. Damit im Einklang ist eine rote Farb-reaktion des Abbauproduktes mit Triphenyltetrazoliumchlorid.

Für die massenspektrometrische Untersuchung wurde das Hydrolyseprodukt in den Trifluoracetyl-methylester (**14**) übergeführt. Das Molekelion (m/e 239) bestätigt die vermutete Bruttoformel, $C_8H_8F_3NO_3$. Mit der Struktur **14** vereinbar sind die für Methylester charakteristischen Pike für $M - 32$ (m/e 207) und $M - 59$ (m/e 180). Der Basispek bei m/e 152 wird durch den Zerfall $M - 59 - 28$ erklärt. Ferner sind die für Trifluoracetate typischen Signale bei m/e 142 ($M - 97$), m/e 97 (CF_3CO) und m/e 69 (CF_3) gut zu sehen.

Für die endgültige Identifizierung wurde der N-Acetyl-4-L-oxoprolin-methylester (**15**) bereitet, der nach chromatographischer Reinigung als einheitliches blassgelbes Öl erhalten wurde. Das IR.-Spektrum mit Banden bei 1775 (Fünfring-Keton), 1745 (Methylester) und 1660 cm^{-1} (Amid) ist im Einklang mit früheren Befunden in der Prolinreihe [10] [12]. Das NMR.- und das Massenspektrum sind mit der Strukturformel **15** im Einklang. Insbesondere geben die Protonen an C(2) und C(3) eine charakteristische *ABX*-Signalgruppe, während den beiden Protonen an C(5) ein Singulett bei 4,06 ppm zuzuordnen ist (s. exp. Teil).

Ein synthetisches Vergleichspräparat wurde durch Oxydation von N-Acetyl-L-4-hydroxyprolin-methylester analog zu einer Vorschrift von *Patcheff & Witkop* [12] bereitet. Das chromatographisch gereinigte einheitliche Öl stimmte in allen Eigenschaften (IR., NMR., Rf) mit dem Derivat des Abbauproduktes überein. Da auch die spez. Drehungen des synthetischen und des durch Abbau erhaltenen Präparates nach Richtung und Betrag gleich sind, steht für das letztere die L-Konfiguration fest. Schliesslich wurde der synthetische N-Acetyl-L-4-oxoprolin-methylester mit 6N Salzsäure zu kristallinem L-4-Oxoprolinhydrochlorid hydrolysiert, das im Dünnschichtchromatogramm nach Rf-Wert und Farbreaktionen (Ninhydrin, Triphenyltetrazoliumchlorid, Anilinhydrogenphthalat) mit dem Abbauprodukt übereinstimmte.



4. L-4-Hydroxyprolin (**16**) und L-Threonin (**17**). Die Isolierung dieser beiden bekannten Aminosäuren in kristalliner Form bot keine Schwierigkeiten. Sie wurden durch IR.-Spektrum, NMR.-Spektrum, spez. Drehung und Dünnschichtchromatographie identifiziert. Vom 4-Hydroxyprolin wurden zudem zwei flüchtige Derivate bereitet und durch Gas-Chromatographie und die Spektren mit authentischen Proben als identisch befunden.

5. *Quantitative Bausteinanalyse.* Eine sorgfältige quantitative Analyse drängt sich vor allem darum auf, weil bei ersten Versuchen zur Sequenzbestimmung, über die später berichtet werden soll, zwei Abbauprodukte mit Threonin in verschiedener Umgebung erhalten wurden. In einer Versuchsreihe wurde ein von Stearinsäure befreites Totalhydrolysat von Tetrahydro-echinocandin B mit absol. methanolischer Salzsäure verestert und das Estergemisch acetyliert. Im Gas-Chromatogramm (Kapillarkolonne) waren vor allem die Pike der Derivate des Threonins, des 4-Hydroxyprolins und des 4-Methyl-3-hydroxy-prolins zu erkennen. Von zwei viel schwächeren Piken nehmen wir an, dass sie von N-Acetyl-4-oxoprolin-methylester bzw. von 1-(*p*-Acetoxyphenyl)-3-acetamido-propan-2-on stammen. 4-Oxoprolin wird unter den Bedingungen der Acetylierung weitgehend zersetzt.

Zum Vergleich wurde ein Gemisch bekannter Mengen L-Threonin, L-4-Hydroxyprolin und 4-Methyl-3-hydroxy-prolin zunächst den Bedingungen der Peptidhydrolyse (6N HCl, 24 Std., 120°) unterworfen, um allfällige Verluste während der Hydro-

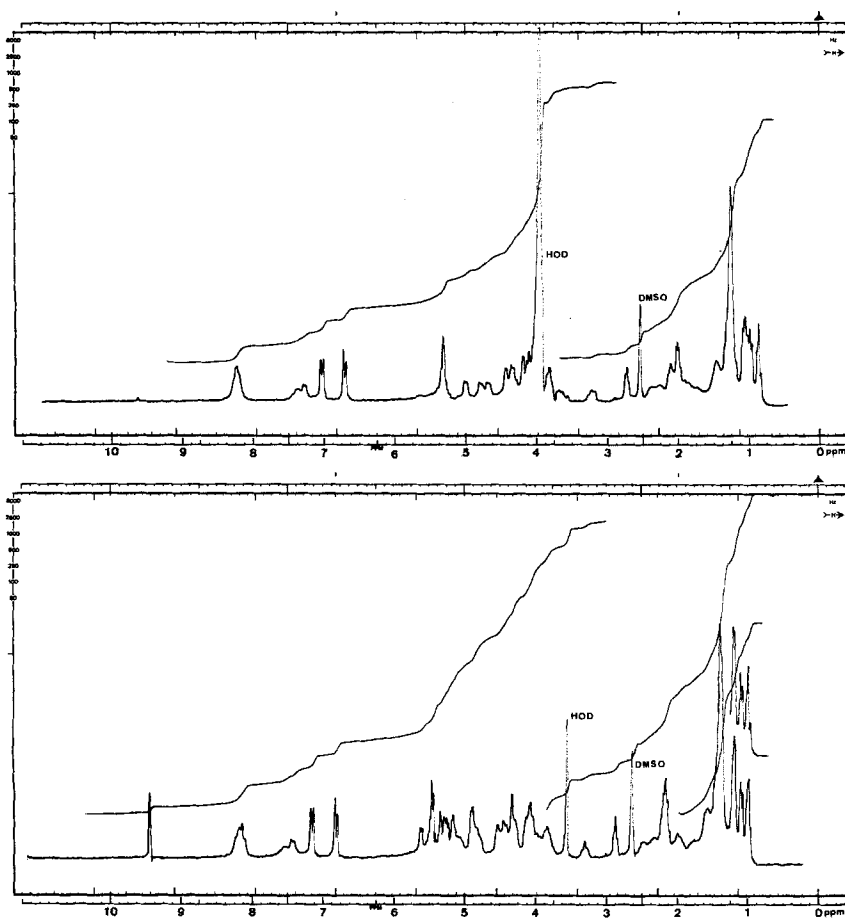


Fig. 5. NMR.-Spektrum von Echinocandin B
Untere Kurve in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$; obere Kurve nach Austausch mit D_2O

lyse auszugleichen. Darauf wurde das Gemisch methyliert und acetyliert und für die Gas-Chromatographie als Standard eingesetzt. Durch Vergleich der Pikhöhen des Hydrolysegemischs mit denen des Standardgemischs ergab sich eindeutig, dass auf je ein Mol 4-Hydroxyprolin und 4-Methyl-3-hydroxy-prolin zwei Mole Threonin vorhanden waren. Auch die Rohausbeuten bei der präparativen Hydrolyse sprechen für die Anwesenheit von 2 Mol Threonin.

Von 4-Oxoprolin, das bei der gas-chromatographischen Analyse nicht quantitativ erfasst werden konnte, ist aufgrund der Rohausbeute bei der Hydrolyse wahrscheinlich nicht mehr als ein Mol vorhanden. Für das 1-(*p*-Hydroxyphenyl)-3-amino-propan-2-on ergibt sich die Anwesenheit von nur einem Mol aus dem NMR.-Spektrum von Echinocandin B (Fig. 5), bei dem das Integral der *AA'BB'*-Signalgruppe bei 6,80 und 7,25 ppm für den *p*-substituierten Benzolring 4 Protonen entspricht. Auch für die Linolsäure folgt die Anwesenheit eines einzigen Restes aus dem NMR.-Spektrum von Echinocandin B, wobei vor allem das Methylsignal bei 0,9 ppm (3H), das Methylensignal bei 1,3 ppm und das Signal für die Gruppe C=C-CH₂-C=C bei 2,75 ppm (2H) massgebend sind.

Die Bruttoformel und die Eigenschaften von Echinocandin B. – Die Summe der damit nachgewiesenen Bausteine – 1 Linolsäure = C₁₈H₃₂O₂, 2 Threonin = 2 · C₄H₉NO₃, 1 4-Methyl-3-hydroxy-prolin = C₆H₁₁NO₃, 1 4-Hydroxyprolin = C₅H₉NO₃, 1 4-Oxoprolin = C₅H₇NO₃ und 1 β-Ketohomotyrosin (8) = C₁₀H₁₁NO₄ – gibt C₅₂H₉₈N₆O₂₁. Wenn man aus den Analysen des (amorphen) Antibioticums eine Formel mit 52 C-Atomen berechnet, kommt die Formel C₅₂H₈₃N₇O₁₉ den gefundenen Prozentzahlen und dem exp. Molekulargewicht am nächsten. Ein in den nachgewiesenen Abbauprodukten nicht enthaltenes siebentes Stickstoffatom ist auch aufgrund des ¹³C-NMR.-Spektrums wahrscheinlich, das im Bereich der Amidcarbonyl-C-atome (169–176 ppm) eher sieben als nur sechs Signale besitzt (Tabelle 3). Da das Antibioticum aufgrund der Mikrotitration weder saure noch basische Gruppen besitzt, ist es demnach wahrscheinlich, dass das Aminoende einer peptidartigen Struktur vom Linolsäurerest, das Carboxylende aber von einer primären Amidgruppe besetzt ist.

Die Analysen von Derivaten des Antibioticums sind mit der Bruttoformel C₅₂H₈₃N₇O₁₉ nicht völlig im Einklang. Mit Essigsäureanhydrid in Pyridin wird ein Poly-O-acetylderivat erhalten. Die Estergruppen geben im IR.-Spektrum eine breite Bande bei 1750 cm⁻¹, die beim freien Antibioticum fehlt. Die Anzahl der Acetylgruppen lässt sich, da die Signale im 2-ppm-Gebiet stark überlappen, nur abschätzen. Das Spektrum ist mit der Anwesenheit von 5–7 O-Acetylgruppen vereinbar. Dass daneben noch N-Acetylgruppen vorhanden sind, ist unwahrscheinlich, da Echinocandin B bei der selektiven N-Acetylierung in Methanol unverändert bleibt. Der mit den Analysen vereinbaren Bruttoformel, C₆₆H₉₅N₇O₂₅, liegt die Annahme eines Heptaacetats zugrunde. Daraus ergibt sich für das Echinocandin B eine Formel C₅₂H₈₁N₇O₁₈, die um H₂O ärmer ist als die aus den Analysen bestimmte. Es ist damit wahrscheinlich, dass das amorphe Antibioticum auch beim scharfen Trocknen (7 Tage, 90°, Hochvakuum) ein Mol Wasser hartnäckig zurückhält. Dafür sprechen auch die Analysen eines zweiten Derivates, das bei der Umsetzung mit *p*-Brombenzoylchlorid in Pyridin nach chromatographischer Reinigung kristallin

erhalten wurde³⁾. Aus dem NMR.-Spektrum mit zahlreichen überlappenden Signalen lässt sich die Zahl der eingebauten *p*-Brombenzoylreste wiederum nur grob abschätzen. Spektren und Analysen sind mit denen eines Hepta-*p*-brombenzoats

Tabelle 3. ¹³C-NMR.-Spektrum von *Echinocandin B* in *d*₄-Methanol, Chem. Verschiebungen gegenüber Tetramethylsilan

δ (ppm)	Intensität in mm/10	rel. Intensität abgeschätzt	Aufspaltg. off-resonance	Zuordnung		
175,9	156	1	<i>s</i>	CO—N<		
174,0	192	1	<i>s</i>	CO—N<		
173,2	162	1	<i>s</i>	CO—N<		
172,5	149	1	<i>s</i>	CO—N<		
172,2	343	2	<i>s</i>	2 CO—N<		
169,7	113	1	<i>s</i>	CO—N<		
158,2	123	1	<i>s</i>	C(4') Ar		
132,5	163	1	<i>s</i>	C(1') Ar		
130,7	382	2	<i>d</i>	C(9), C(13) Lin		
129,5	449	2	<i>d</i>	C(2'), C(6') Ar		
128,8	442	2	<i>d</i>	C(10), C(12) Lin		
116,1	361	2	<i>d</i>	C(3'), C(5') Ar		
76,81	125	1	}	5 C—O—		
75,51	540	3				
74,3						
70,87						
69,42						
68,3	562	3	}	6 α-C von AS-Resten		
62,3						
58,6						
56,6	482	3				
55,9						
52,75	76	1	}	3 C—N		
38,78	271	2				
36,73	175	1				
35,17	85	1			C(2) Lin	
32,41	144	1			C(16) Lin	
30,58	201	1				
30,09	998	5			C(5), C(6), C(7)	
					C(8), C(15) Lin	
28,04	393	2			C(4), C(14) Lin	
26,80	225	1			C(3), C(11) Lin	
26,43	233	1				
23,41	121	1		C(17) Lin		
20,06	211	1	<i>q</i>	CH ₃ Thr		
19,52	187	1	<i>q</i>	CH ₃ Thr		
14,34	80	1	<i>q</i>	CH ₃ Lin		
11,27	139	1	<i>q</i>	CH ₃ Me-Hydro		

³⁾ Ein kristallines *p*-Brombenzoat wurde allerdings nur aus frisch vorbereitetem Echinocandin B erhalten, während aus einem mehrere Monate aufbewahrten, teilweise zersetzten Präparat nur noch amorphe Produkte erhalten wurden.

$C_{101}H_{102}Br_7N_7O_{25}$ vereinbar, woraus sich für das freie Antibioticum wiederum die Formel $C_{52}H_{81}N_7O_{18}$ ergibt.

Zu einer Formel mit 52 C-Atomen steht auch das ^{13}C -NMR.-Spektrum von Echinocandin B (Tabelle 3) nicht im Widerspruch. Da auch hier manche Signale zusammenfallen, sind insgesamt zwar nur 37 Pike zu erkennen. Manche sind aber so intensiv, dass sie mit Sicherheit von mehr als einem C-Atom herrühren. In der Tabelle 3 sind die abgeschätzten relativen Intensitäten angegeben. Ihre Summe ergibt ca. 52 in Übereinstimmung mit der angenommenen Bruttoformel. Die Zuordnung erfolgte, soweit möglich, aufgrund von Vergleichen mit Spektren von Linolsäure [13], Tyrosin [14], Threonin [15], 4-Hydroxyprolin [15] und 4-Methyl-3-hydroxyprolin (diese Arbeit). Ferner wurden bekannte Regeln [8] sowie die Aufspaltung im «off-resonance»-Spektrum berücksichtigt. Die Zuordnung im Bereich der CH_2 -Gruppen der Linolsäure ist etwas unsicher. Im Bereich von ca. 36–76 ppm, in dem die Signale z.T. sehr eng zusammenliegen und das «off-resonance»-Spektrum unklare Ergebnisse gab, ist eine exakte Zuordnung zur Zeit nicht möglich.

Besonders auffällig ist das Fehlen jeglicher Ketonsignale im Bereich um 200 ppm, obwohl zwei der Abbauprodukte (5 und 13) Ketogruppen besitzen. Eine befriedigende Deutung dieses Befundes ist zur Zeit nicht möglich, doch ist sicher, dass diese beiden Gruppen im intakten Antibioticum nicht frei vorliegen, sondern maskiert, möglicherweise durch ketalartige Bindungen. Der gleiche Schluss ergibt sich auch aus dem IR.-Spektrum (Fig. 6), das wohl eine breite Amid-Carbonylbande bei 1630–1680 cm^{-1} aufweist, aber im Bereich von 1700 bis 1800 cm^{-1} leer ist.

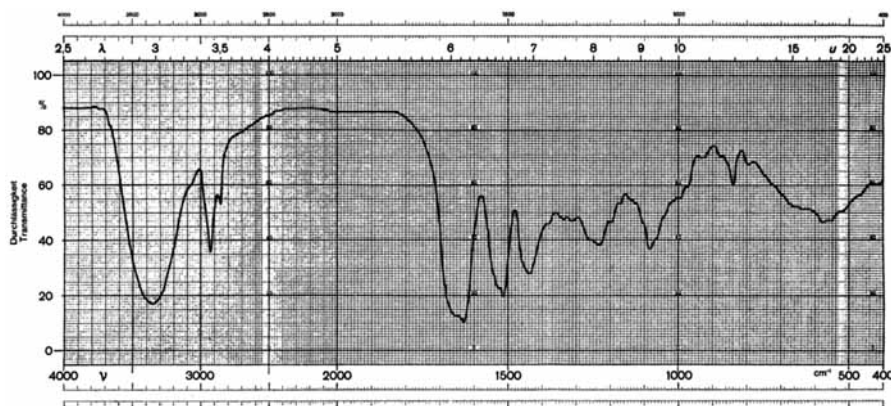


Fig. 6. IR.-Spektrum von Echinocandin B in KBr

Es sei zum Schluss nicht verschwiegen, dass mehrere schlecht reproduzierbare Mikroanalysen des amorphen Tetrahydro-echinocandins nicht auf die Bruttoformel $C_{52}H_{85}N_7O_{18}$ passen, sondern nur auf solche mit geringerem Sauerstoffgehalt (z.B. $C_{52}H_{86}N_6O_{16}$ oder $C_{52}H_{87}N_7O_{15}$). Die Formel $C_{52}H_{81}N_7O_{18}$ für das Antibioticum ist daher mit grossem Vorbehalt aufzunehmen und bedarf weiterer Stützen durch gezielte Abbaureaktionen, die zur Zeit im Gang sind. Immerhin ist eine Formel mit 52 C-Atomen und 7 N-Atomen als sehr wahrscheinlich anzunehmen.

Experimenteller Teil

Allgemeines: Für die Aufnahme der UV-, IR-, NMR- und Massenspektren sowie die opt. Drehungen wurden die in unserem Laboratorium üblichen Geräte verwendet (vgl. z.B. [16]). Dazu kam für die ^{13}C -NMR-Spektren ein *Bruker-Spektrospin*-Gerät, Modell HFY-90 mit Breitbandentkopplung oder mit 'off-resonance'-Technik. Chemische Verschiebungen sind in δ -Einheiten gegenüber Tetramethylsilan angegeben.

Für präparative Gas-Chromatogramme diente ein Gas-Chromatograph *Varian-Aerograph* 90 P, für analytische Gas-Chromatogramme ein Chromatograph *Carlo Erba*, Modell Fractovap Gl/450 mit Flammenionisations-Detektor. Dünnschichtchromatogramme wurden mit Kieselgel Fertigplatten F_{254} (*Merck*) ausgeführt. Als Farbreagentien dienten Ninhydrin, Isatin oder Joddampf. Für die Säulenchromatographie wurden Kieselgel (*Merck*), 0,05–0,2 mm, Cellulose mikrokristallin (*Merck*) oder Sephadex LH-20 (*Pharmacia*) verwendet.

Isolierung des Antibioticum-Komplexes aus der Kulturbrühe. 3200 l einer Kulturbrühe vom pH 7,7 wurden mit 32 kg Filterhilfsmittel «Dicalite» (Diatomeenerde) versetzt und unter Verwendung einer Filterpresse filtriert. 742 kg feuchter Filterkuchen wurden 30 Min. mit 1500 l Methanol verrührt, die Feststoffe mittels einer Zentrifuge abgetrennt und mit 350 l 80-proz. wässrigen Methanol extrahiert. Es resultierten insgesamt 2000 l methanolische Extrakte. Sie wurden in einem Zirkulationsverdampfer im Vakuum schonend auf 400 l eingeeengt und das trübe Konzentrat mit einem Schlammseparator geklärt. Das Zentrifugat wurde im Volumenverhältnis 1:3 mit Essigester extrahiert und der Extrakt zur Trockne eingedampft. Der mittels des Schlammseparators abgetrennte wässrige Schlamm (44 l) wurde mit 60 l Methanol und 1 kg Dicalite versetzt und die Mischung 1 Std. gerührt. Dann werden die Feststoffe abfiltriert, mit 70 l 80-proz. wässrigem Methanol extrahiert und die beiden Filtrate zur Trockne eingedampft. Man erhielt insgesamt 2,85 kg Trockenrückstände. Diese löst man in 5 l 85-proz. wässrigem Methanol und extrahiert die Lösung dreimal mit je 15 l Heptan. Die vereinigten wässrigen Methanolphasen wurden abgedampft und im Vakuum getrocknet. Es resultierten 813 g brauner Rückstand, der zweimal mit je 2 l Essigester intensiv vermischt und abgenutscht wurde. Der Nutschenrückstand wurde im Vakuum bei 50° getrocknet. Das braune Pulver (660 g) enthielt den Antibioticum-Komplex.

Echinocandin B. Für die *Craig*-Verteilung wurde eine automatische Apparatur mit je 500 ml Phasenvolumen und 80 Stufen verwendet. Lösungsmittelsystem (in Raumteilen): 6 Teile Äthylacetat, 2 Teile Cyclohexan, 3 Teile Methanol und 4 Teile dest. Wasser, bei 20° äquilibriert. 100 g des obigen braunen Pulvers wurden in je 2,5 l unterer und oberer Phase gelöst, zur Klärung durch Celite filtriert und dann über 180 Stufen verteilt. In den Fraktionen 38–70 waren 23,5 g Komponente B enthalten. Die Fraktionen 28–37 waren rel. schwach aktiv und enthielten neben Echinocandin B eine weitere aktive Komponente mit etwas kleinerem R_f im Dünnschichtchromatogramm, 4,5 g. Die Stufen 144–180, 114–143 und 84–113 gaben total 4,5 g weiterer, noch uneinheitlicher Nebenkomponenten.

Der Rückstand der eingedampften Stufen 38–70 wurde in 4,7 l Methanol-Tetrachlorkohlentstoff (3:7) gelöst und durch 240 g Magnesiumsilikat (*Woelm*, I) perkoliert. Das hellgelbe Eluat wurde im Vakuum schonend eingedampft: 18 g antibiotisch aktives, helles Pulver. Im Magnesiumsilikat blieb eine rote inaktive Zone zurück.

5 g dieses Pulvers wurden mit Methanol an einer Säule aus Sephadex LH-20 (4 cm Durchmesser, 70 cm lang) chromatographiert. Die dünnschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen (R_f 0,3 mit Chloroform-Methanol 3:1) gaben 4,2 g farbloses amorphes Pulver. $[\alpha]_D^{25} = -44,4^\circ$ ($c = 0,54$, Methanol). UV. in Feinsprit: λ_{max} in nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$): 225 (152), 277 (30), 288 (infl., 28); in 0,01N alkohol. NaOH: 225 (195), 248 (150), 301 (41). – IR. in KBr: Fig. 6. – NMR. (220 MHz) in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$: Fig. 5. ^{13}C -NMR.-Spektrum in CD_3OD s. Tabelle 3.

$\text{C}_{52}\text{H}_{83}\text{N}_7\text{O}_{19}$	Ber.	C 56,24	H 7,54	N 8,84	O 27,39%
	Gef.	„ 56,30	„ 7,50	„ 8,74	„ 26,96%
	Gef.	„ 56,17	„ 7,56	„ 8,60%	
	Gef.	„ 56,43	„ 7,53	„ 8,84%	

Echinocandin B reagiert nicht mit Essigsäureanhydrid in Methanol. Bei der Mikrotitration mit 0,1N Tetramethylammoniumhydroxid bzw. 0,1N HCl in Methylcellosolve-Wasser 8:2 wurde

keine Stufe erhalten. Das Massenspektrum zeigte keine Signale oberhalb m/e 352, dasjenige des Trimethylsilylderivates keine oberhalb m/e 500.

Polyacetylderivat. 128 mg Echinocandin B wurden mit je 1 ml Pyridin und Essigsäureanhydrid 2 Std. bei 20° stehengelassen und der Rückstand nach dem Eindampfen an 15 g Kieselgel chromatographiert. Die nach Dünnschichtchromatographie einheitlichen Fraktionen gaben 90 mg farbloses amorphes Pulver. UV. in Feinsprit: $\lambda_{\max}$ in nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) 212 (220), 284 (5,6). – IR. in KBr: $\nu_{\max}$ 1750, 1680, 1640, 1225 cm^{-1} . – NMR. in CDCl_3 sehr komplex, im 2-ppm-Gebiet überlappende Signale von 5-7 Acetylgruppen. Massenspektrum: keine Pike oberhalb m/e 380.

$\text{C}_{66}\text{H}_{85}\text{N}_7\text{O}_{25}$ Ber. C 57,17 H 6,19 N 7,07% M.-G. 1386,4
Gef. „ 57,06 „ 6,92 „ 6,99% „ 1403,4

Poly-p-Brombenzoylderivat. 150 mg Echinocandin B und 400 mg *p*-Brombenzoylchlorid in 5 ml Pyridin wurden 2 Std. bei 20° gerührt. Nach dem Verdünnen mit 40 ml Äther wurde filtriert, eingedampft und der Rückstand an 30 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Methanol 98:2 wurden 184 mg eluiert, die nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthylacetat-Methanol 60 mg feine farblose Kristalle mit Smp. 161–165° gaben. – IR. in KBr: $\nu_{\max}$ 1725, 1690, 1640, 1260 cm^{-1} . – NMR. sehr komplex; aus den Signalen im 8-ppm-Gebiet kann die Anzahl der *p*-Brombenzoylreste auf 6–7 geschätzt werden. Massenspektrum: Keine Pike oberhalb m/e 250.

$\text{C}_{101}\text{H}_{102}\text{Br}_7\text{N}_7\text{O}_{25}$ Ber. C 51,11 H 4,33 Br 23,57 N 4,13%
Gef. „ 51,53 „ 4,41 „ 22,79 „ 4,41%

Tetrahydro-echinocandin B. 2 g Echinocandin B in 45 ml Methanol wurden mit 100 mg vorhydriertem Platinoxid (*Adams*) in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach 4 Std. waren 112 ml (2,2 Mol-Äqu.) Wasserstoff aufgenommen und die Hydrierung kam zum Stillstand. Nach dem Filtrieren und Eindampfen wurden 1,95 g farbloses amorphes Pulver erhalten. Im Dünnschichtchromatogramm mit Chloroform-Methanol zeigt das Produkt den gleichen R_f -Wert (0.30) wie das Ausgangsmaterial. $[\alpha]_D = -47^\circ$ ($c = 0,52$, Methanol). UV. in Feinsprit: 215 (168), 224 (infl., 144), 277 (19,5), 282 (infl., 18,5); in alkohol. NaOH: 224 (249), 247 (158), 294 (41). – NMR. in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (100 MHz): u.a. 0,95–1,2 (*k*, 12 H), 1,25 (*br. s.*, ca. 30 H), 6,70 u. 7,03 (*AA'BB'*, $J_{AB} = 8,4$ Hz), 7,2–7,5 (*b*, 2 CONH), 7,8–8,1 (*b*, 3 CONH), 9,25 (*s*, 1 OH).

Gef. C 59,15; 59,21 H 8,22; 8,42 N 8,27; 9,21%

Hydrolytischer Abbau. – a) *Von Echinocandin B.* 1,5 g Echinocandin B und 30 ml 6*N* Salzsäure wurden unter Stickstoff im Bombenrohr 24 Std. auf 110° erhitzt. Nach dem Verdünnen mit 150 ml Wasser wurde dreimal mit Äther ausgeschüttelt, die Ätherphase mit wenig Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft zu 650 mg braunem Öl. Der wasserlösliche Anteil wurde im Vakuum eingedampft und gab 1,8 g einer zähen braunen Masse.

Linolsäure-methylester (2). 300 mg Ätherextrakt wurden an 20 g Kieselgel mit Benzol-Eisessig 9:1 chromatographiert. Das Eluat, 165 mg Öl, war gemäss Dünnschichtchromatogramm (R_f 0,1 mit Benzol) noch nicht ganz einheitliche Linolsäure. Sie wurde mit Diazomethan in Äther während 10 Min. verestert und das Produkt mit Benzol an 30 g Kieselgel chromatographiert. Das dünn-schichtchromatographisch einheitliche Eluat, 115 mg farbloses Öl, wurde im Hochvakuum bei 120–130° destilliert und durch IR.-Spektrum, NMR.-Spektrum, Massenspektrum und Gas-Chromatographie als Linolsäure-methylester identifiziert⁵⁾.

7 mg Ester wurden mit 6 ml einer wässrigen Lösung, die 0,018*M* an Natriumperjodat und 0,0025*M* an Kaliumpermanganat war, 3 ml 0,1*M* Natriumhydrogencarbonatlösung und 4,5 ml *t*-Butylalkohol 6 Std. bei Raumtemperatur oxydiert, das überschüssige Reagens mit Natriumhydrogensulfid zersetzt und die Lösung nach Zugabe von 50 mg Kaliumhydroxid im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml 1*N* Schwefelsäure aufgenommen und mit Äther extrahiert. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat und Verestern mit Diazomethan in Äther wurde eingedampft und der Rückstand, gelöst in 0,2 ml Chloroform, gas-chromatographisch untersucht (SE-30, 170°, He-Strom 50 ml pro Min.). Der Hauptpik mit Retentionszeit 18,2 Min. verhielt sich wie authentischer Azelainsäure-dimethylester (3) und wie ein analog hergestelltes Abbauprodukt aus authentischem Linolsäure-methylester.

⁴⁾ Dampfdruckosmometrie in CH_2Cl_2 .

⁵⁾ Vergleichspräparat: *Fluka A.G.*, Buchs SG.

Der wasserlösliche Anteil der Hydrolyseprodukte zeigte bei der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1 bzw. Phenol-Wasser 3:1) die gleichen fünf ninhydrinpositiven Komponenten wie das entsprechende Hydrolysegemisch von Tetrahydro-echinocandin B. Die Isolierung der reinen Verbindungen wird dort beschrieben.

Nachweis von Kohlendioxid. 65 mg Echinocandin B und 10 ml 30proz. Schwefelsäure wurden in einer mit Stickstoff gespülten Apparatur in einem langsamen Stickstoffstrom auf 110° erhitzt. Das austretende Gas wurde mit einer gesättigten Bariumhydroxid-Lösung aufgefangen. Nach 8 Std. wurde das ausgefallene Bariumcarbonat abfiltriert und bei 110° getrocknet. Ausbeute 8,7 mg (68%).

b) *Von Tetrahydro-echinocandin B.* 1,5 g Tetrahydro-echinocandin B wurden wie oben mit 30 ml 6N Salzsäure hydrolysiert und das Produktgemisch in gleicher Weise aufgearbeitet.

Stearinsäure-methylester (4). Von den 450 mg ätherlöslichen Anteilen wurde die Hälfte an 25 g Kieselgel mit Hexan-Äther-Eisessig 80:20:2 chromatographiert. Die Hauptfraktion, 150 mg, verhielt sich bei der Dünnschichtchromatographie (Hexan-Äther-Eisessig 80:20:2; Rf 0,24) wie Stearinsäure. Nach dem Verestern mit Diazomethan in Äther (10 Min., Raumtemperatur) wurde der Eindampfrückstand an 15 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Benzol eluierte einheitliche Hauptfraktion, 97 mg farbloses Wachs, war nach IR., Massenspektrum und Dünnschichtchromatographie (Benzol, Rf 0,37) identisch mit Stearinsäure-methylester⁵⁾.

1-(p-Acetoxyphenyl)-3-acetamido-propan-2-on (6). Der wasserlösliche Anteil der Hydrolyseprodukte, 1,9 g dunkelbraunes zähes Harz, zeigte im Dünnschichtchromatogramm auf Cellulose fünf ninhydrinpositive Substanzen (s. Tabelle 4).

Tabelle 4. *Ninhydrinpositive Hydrolyseprodukte von Tetrahydro-echinocandin B, Rf-Werte und Farbreaktion mit Ninhydrin*

Substanz	Rf-Werte ^{a)}			Ninhydrin-Reaktion
	A	B	C	
1-(p-Hydroxyphenyl)-3-amino-propan-2-on	0,72	0,55	–	orange
4-Methyl-3-hydroxy-prolin	0,60	0,27	0,51	gelb ^{b)}
L-Threonin	0,46	0,21	0,23	violett
L-4-Hydroxyprolin	0,45	0,18	0,37	gelb ^{b)}
L-4-Oxoprolin	0,44	0,20	–	bräunlich-grau ^{c)}

Fliessmittel: A: Äthanol-Wasser 7:3; B: *n*-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1; C: Phenol-Wasser 3:1.

a) Die wegen Überlappung am Gemisch schwer bestimmbarcn Rf-Werte wurden später mit den reinen Verbindungen verifiziert.

b) Mit Isatin blau.

c) Mit Anilin-hydrogenphthalat rosa, mit Triphenyltetrazoliumchlorid rot.

Für die präparative Trennung wurde zunächst an einer Cellulose-Säule (80 cm lang, 4 cm Durchmesser) mit *n*-Butanol-Eisessig-Wasser chromatographiert. Die ersten 300 ml ninhydrinpositiver Fraktionen gaben 520 mg Eindampfrückstand, der vorwiegend aus 1-(p-Hydroxyphenyl)-3-amino-propan-2-on bestand. Weitere 500 ml gaben 240 mg noch etwas verunreinigtes 4-Methyl-3-hydroxy-prolin. Weitere 1,4 l Eluat gaben 1 g Rückstand, der aus den restlichen drei Produkten bestand, die nicht aufgetrennt worden waren.

Das erste Eluat wurde im System *n*-Butanol-Wasser über 770 Stufen nach *Craig* verteilt. Die Fraktionen 45–70 gaben 238 mg noch stark braun gefärbtes, aber dünnschichtchromatographisch einheitliches 1-(p-Hydroxyphenyl)-3-amino-propan-2-on (5). 130 mg davon wurden mit je 1 ml Essigsäureanhydrid und Pyridin 2 Std. bei 20° acetyliert. Nach dem Eindampfen wurde mit Benzol-Methanol 7:3 an 20 g Kieselgel chromatographiert. Die Hauptfraktion gab aus Benzol-Petroläther 43 mg (6) in farblosen Kristallen, Smp. 114–115°. UV. in Feinsprit: $\lambda_{\max}$ in nm (log ϵ) 221 (3,92), 273 (3,28). – IR. in KBr: ν (CO) 1760, 1720, 1655 cm⁻¹. – NMR. (100 MHz, CDCl₃):

Fig. 1. Massenspektrum: m/e 249 (21%, M^+), 207 (23%), 165 (6%), 120 (22%), 107 (92%), 100 (100%) etc.

$C_{13}H_{15}NO_4$ Ber. C 62,64 H 6,02 N 5,62% Gef. C 62,49 H 6,04 N 5,56%

4-Methyl-3-hydroxy-prolin (11). Die zweite Fraktion der Cellulose-Chromatographie wurde im System Äthanol-Wasser 7:3 erneut an Cellulose chromatographiert. Die chromatographisch einheitlichen Fraktionen wurden zusammen eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 ml Wasser mit 500 mg Aktivkohle entfärbt und nach dem Filtrieren und erneuten Eindampfen in 0,2 ml Wasser und 2 ml Methanol gelöst. Unter einer Glocke, die ein zweites offenes Gefäß mit 50 ml Äther enthielt, setzte bald Kristallisation ein. Nach drei Tagen wurden 50 mg Kristalle mit Smp. 265° (Zers.) gewonnen. $[\alpha]_D = -21^\circ$ ($c = 0,425$, Wasser); $+10^\circ$ ($c = 0,40$, 5N HCl). – IR. in KBr: Fig. 3. – NMR. (100 MHz, D_2O): Fig. 4. ^{13}C -NMR (22,62 MHz, D_2O + etwas CF_3COOH): δ 9,95 (q), 37,52 (d), 50,57 (t), 68,37 (d), 75,98 (d), 170,2 (s). Massenspektrum: m/e 145 (5,6%, M^+), 100 (100%), 87 (40%), 82 (8,3%) etc.

$C_6H_{11}NO_3$ Ber. C 49,64 H 7,64 N 9,65% Gef. C 49,49 H 7,63 N 9,75%

O, N-Diacetyl-4-methyl-3-hydroxy-prolin-methylester (12). 37 mg 4-Methyl-3-hydroxy-prolin wurden in 4 ml 3N absol. methanolischer Salzsäure 24 Std. bei 20° verestert. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand mit je 1 ml Essigsäureanhydrid und Pyridin 2 Std. bei Raumtemperatur acetyliert und das braune ölige Produkt nach dem Eindampfen an 10 g Kieselgel chromatographiert. Mit Äthylacetat-Methanol 4:1 wurden 32 mg gelbliches Öl erhalten. Dünnschichtchromatographie mit Äthylacetat-Methanol 4:1 Rf 0,58, einheitlich. – IR. (fl.): ν (CO) 1750, 1655 cm^{-1} . – NMR. (100 MHz, $CDCl_3$): 1,04 (d , $J = 7$, 3 H); 2,13 (s , 6 H); 2,4–2,8 (b , 1 H); 3,26 (t , $J = 10$, 1 H); 3,77 (s , 3 H); 3,80 (m , 1 H); 4,52 (s , 1 H); 5,28 (d , $J = 4,5$, 1 H). Massenspektrum: M^+ 243.

L-Threonin (17). Die bei der Chromatographie an Cellulose anschliessend an 4-Methyl-3-hydroxy-prolin erhaltenen Mischfraktionen wurden an einer Säule aus Dowex 50 $\times$ 4 (H-Form, 200–400 mesh; 70 cm lang, 2 cm Durchmesser) mit 1N Salzsäure als Eluierungsmittel weiter aufgetrennt. Durch Eindampfen der dünnschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen wurden 360 mg fast reines L-Threoninhydrochlorid, 150 mg leicht verunreinigtes 4-Oxoprolinhydrochlorid und 123 mg 4-Hydroxyprolinhydrochlorid isoliert. Das Threoninhydrochlorid wurde an einer Säule (1 cm $\times$ 10 cm) von Dowex 1 $\times$ 8 (Acetatform, 200–400 mesh) mit 0,1N Essigsäure als Eluierungsmittel chromatographiert. Die aus den einheitlichen Fraktionen erhaltenen 270 mg L-Threonin ergaben aus Wasser-Äthylalkohol farblose Kristalle mit Smp. 265–268° (Zers.). $[\alpha]_D = -29^\circ$ ($c = 0,5$, Wasser); $-14,4^\circ$ ($c = 0,5$, 1N HCl). Rf-Wert, IR., NMR. und Massenspektrum stimmen mit denen von authentischem L-Threonin überein⁵).

$C_4H_9NO_3$ Ber. C 40,33 H 7,62 N 11,76% Gef. C 40,32 H 7,57 N 11,63%

L-4-Hydroxyprolin (16). Das aus Dowex 50 $\times$ 4 eluierte Hydrochlorid (123 mg, s. oben) wurde ebenfalls an Dowex 1 $\times$ 8 in die freie Aminosäure übergeführt. Die aus Wasser-Äthylalkohol erhaltenen 30 mg Kristalle mit Smp. 269–272° (Zers.) zeigten ein $[\alpha]_D = -68^\circ$ ($c = 0,55$, Wasser); -52° ($c = 0,525$, 5N HCl). Die Identifizierung erfolgte durch IR.-Spektrum, NMR.-Spektrum in Trifluoressigsäure und Dünnschichtchromatographie (s. Tabelle 4)⁵).

80 mg Abbauprodukt wurden in 2 ml Trifluoressigsäure bei -10° mit 2 ml Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und die Lösung 30 Min. bei 20° gehalten. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand in Methanol 10 Min. lang mit ätherischer Diazomethanlösung verestert. Das Produkt destillierte im Hochvakuum bei 110° als blass gelbliches Öl, 82 mg. Durch präparative Gas-Chromatographie (SE-30, 150°) wurde das Präparat in zwei Komponenten mit Retentionszeiten von 10,6 und 21,7 Min. aufgetrennt.

O, N-Bis-trifluoracetyl-L-4-hydroxyprolin-methylester. Retentionszeit 10,6 Min.; 12 mg farblose Flüssigkeit. – IR. (fl.): ν (CO) 1780, 1750, 1700 cm^{-1} . – NMR. (100 MHz, $CDCl_3$): 2,1–2,8 (m , 2 H); 3,84 (s , 3 H); 4,06 (k , 2 H); 4,72 (t , $J = 8$, 1 H); 5,6 (k , 1 H). Massenspektrum: m/e 337 (2,1%, M^+), 306 (3%), 278 (23%), 240 (0,9%), 164 (100%).

N-Trifluoracetyl-L-4-hydroxyprolin-methylester. Retentionszeit 21,7 Min.; 17 mg farblose Flüssigkeit. – IR. (fl.): ν (OH) 3480, ν (CO) 1750, 1690 cm^{-1} . – NMR. (100 MHz, $CDCl_3$): 1,9–2,5 (m , 2 H); 2,50 (s , 1 H, mit D_2O austauschbar); 3,79 (s , 3 H); 3,84 (k , 2 H); 4,61 (k , 1 H); 4,68 (t , $J = 8$, 1 H). Massenspektrum: m/e 241 (7,8%, M^+), 223 (5,5%), 210 (1,7%), 182 (100%) etc.

Authentisches L-4-Hydroxyprolin gab bei der analogen Behandlung die beiden gleichen Derivate, die gas-chromatographisch getrennt und durch IR., NMR.- und Massen-Spektrum verglichen wurden.

L-4-Oxoprolinhydrochlorid (13-Hydrochlorid). Versuche zur Herstellung der freien Aminosäure aus der oben beschriebenen Hydrochlorid-Fraktion an Dowex 1 führten zu braunen, harzigen Zersetzungsprodukten. Deshalb wurden die 150 mg rohes Hydrochlorid nochmals mit 1N Salzsäure an einer Säule aus Dowex 50 $\times$ 4 (H-Form, 200–400 mesh) chromatographiert und die Hauptfraktion, die im Dünnschichtchromatogramm nur noch eine Spur einer Nebenkomponeute zeigte, als festes Hydrochlorid spektroskopisch untersucht. – IR. in Nujol: ν (NH) und ν (OH 3400–2300 cm^{-1} (breit)); ν (CO) 1770 und 1745 cm^{-1} . – NMR. (100 MHz, Trifluoressigsäure): 3,30 (b, 2 H); 4,30 (b, 3 H). ^{13}C -NMR. (22,62 MHz, D_2O): 38,58 [C(3)], 51,8 [C(5)], 57,84 [C(2)], 170,4 (COOH), 207,3 (C=O); 6 weitere, 5 bis 10mal schwächere Signale müssen der Verunreinigung zugeschrieben werden.

N-Trifluoracetyl-L-4-oxoprolin-methylester (14). 3 mg Hydrochlorid wurden mit 1 ml 2N HCl in abs. Methanol 16 Std. bei 20° verestert, der Rückstand nach dem Eindampfen 10 Min. mit 2 ml Trifluoressigsäureanhydrid unter Rückfluss erhitzt und das Lösungsmittel in einem Stickstoffstrom abgetrieben. Der Äthylacetatextrakt des Rückstandes wurde filtriert und unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wurde direkt für die Massenspektrometrie verwendet: m/e 239 (27%, M^+), 208 (1%), 207 (11%, m^+ 179,5), 180 (62%), 152 (100%, m^+ 128,5), 142 (5%), 97 (11%), 69 (57%) etc.

N-Acetyl-L-4-oxoprolin-methylester (15). – a) *Aus Abbau*. 88 mg über Phosphorpentoxid getrocknetes 4-Oxoprolinhydrochlorid wurden mit 5 ml absolut methanolischer 3N Salzsäure 6 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde der Rückstand (100 mg) in 8 ml Methanol mit 2 ml Essigsäureanhydrid und 40 mg wasserfreiem Natriumacetat 14 Std. bei Raumtemperatur acetyliert. Die nach dem Eindampfen im Vakuum gewonnene braune, amorphe Masse (130 mg) wurde an 20 g Kieselgel mit Benzol-Methylacetat 1:3 chromatographiert. Als Hauptfraktion wurden 13 mg dünnschichtchromatographisch einheitliches gelbes Öl eluiert; Rf 0,4 mit Benzol-Methylacetat 1:3. $[\alpha]_D = +11,5^\circ$ ($c = 0,26$, Chloroform). – IR. in Chloroform: ν (CO) 1775, 1745, 1660 cm^{-1} . – NMR. (100 MHz, CDCl_3): 2,15 (s, 3 H); 2,4–3,2 (AB-Teil von ABX, $J_{AB} = 18$, $J_{AX} = 4$, $J_{BX} = 10$, 2 H); 3,76 (s, 3 H); 4,06 (s, 2 H); 5,01 (X-Teil von ABX, 1 H). Massenspektrum: m/e 185 (5%, M^+), 154 (2,3%), 153 (7%, 143 (7%), 142 (5%), 126 (60%), 84 (100%).

b) *Synthetisch*. 1,53 g L-4-Hydroxyprolin in 40 mg Methanol-Wasser 3:1 wurden mit 10 ml Essigsäureanhydrid 16 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgetrieben und der in Methanol aufgenommene Rückstand mit Diazomethan in Äther während 10 Min. bei Zimmertemperatur verestert. Das durch Eindampfen gewonnene gelbliche Öl (2,1 g) war nach Dünnschichtchromatographie einheitlich; Rf 0,17 mit Methylacetat. – IR. in Chloroform: ν (OH) 3400 cm^{-1} , ν (CO) 1745, 1640 cm^{-1} . – NMR. (60 MHz, CDCl_3): 1,9–2,6 (h, 2 H); 2,15 (s, 3 H); 3,1 (b, 1 H, austauschbar); 3,6–3,9 (h, 2 H); 3,80 (s, 3 H); 4,50 (h, 1 H); 4,60 (t, $J = 8$, 1 H).

Zu 2,1 g dieses N-Acetylderivates in 30 ml Methylenchlorid wurden im Verlauf von 45 Min. unter Eiskühlung und starkem Rühren 2,0 g Natriumdichromat in 1,5 ml Essigsäure, 2,7 ml konz. Schwefelsäure und 9 ml Wasser getropft. Nach weiteren 90 Min. Rühren bei 0° wurde mit dem gleichen Volumen gesättigter Natriumchloridlösung versetzt und viermal mit Chloroform ausgezogen. Die mit Natriumhydrogencarbonat und gesättigter Kochsalzlösung gewaschenen Auszüge wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Vom dünnschichtchromatographisch einheitlichen Rückstand (1,2 g, 58% d. Th.) wurden für die Aufnahme der Spektren 100 mg im Hochvakuum bei 110° als farbloses Öl destilliert. $[\alpha]_D = +10,4^\circ$ ($c = 0,26$, Chloroform). – IR. und NMR. stimmten mit denen des Abbauproduktes überein.

1,1 g synthetischer N-Acetyl-L-4-oxoprolin-methylester wurden im Bombenrohr unter Stickstoff mit 20 ml 6N Salzsäure bei 110° während 15 Std. hydrolysiert. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde der braune Rückstand in 15 ml 2N Salzsäure mit 150 mg Aktivkohle entfärbt (10 Min., 20°), die Lösung filtriert und abgedampft. Der Rückstand ergab nach Auflösen in 2 ml 2N Salzsäure und 8 ml Eisessig durch Zutropfen von Äthylacetat 310 mg (32%) farblose Kristalle, die sich nach kurzem Stehen gelblichgrau färbten. Smp. 180–185° (Zers.). $[\alpha]_D = -53^\circ$ ($c = 0,55$ Wasser). – IR. in KBr: ν (CO) 1765, 1745 cm^{-1} . Bei der Dünnschichtchromatographie war das

synthetische 4-Oxoprolinhydrochlorid nach Rf-Werten und Farbreaktionen vom Abbauprodukt nicht unterscheidbar.

Homotyrosin (7). 2 g Tetrahydro-echinocandin B wurden mit 30 ml konz. Jodwasserstoffsäure unter Stickstoff 18 Std. auf 120° erhitzt. Das tiefbraune Hydrolysat wurde mit 200 ml Wasser verdünnt und ausgeäthert. Aus der tiefbraunen Ätherlösung erhielt man nach Entfärben mit Natriumthiosulfatlösung 590 mg rohe Stearinsäure, die durch Gas-Chromatographie ihres Methyl-esters identifiziert wurde.

Die noch blassgelbe wässrige Phase gab beim Eindampfen im Vakuum 2 g zähe Masse. Durch Dünnschichtchromatographie in Äthanol-Wasser 7:3 bzw. Phenol-Wasser 3:1 und Anfärben mit Ninhydrin wurden folgende Aminosäuren und Amine nachgewiesen: 4-Methylprolin (Rf 0,79 in Äthanol-Wasser), Homotyrosin (0,68), Prolin (0,45 in Äthanol-Wasser bzw. 0,55 in Phenol-Wasser), 4-Hydroxyprolin (0,45 bzw. 0,37), Threonin (0,46 bzw. 0,23), 4-Oxoprolin (0,44 bzw. 0,45), α -Aminobuttersäure (0,55 bzw. 0,37), 4-Methyl-3-hydroxy-prolin (0,60 bzw. 0,51), 1-(*p*-Hydroxyphenyl)-3-amino-propan-2-on (0,72, —).

Das Hydrolysegemisch wurde zunächst an einer Cellulosesäule (3 cm $\times$ 85 cm) mit Äthanol-Wasser 7:3 chromatographiert. Die Fraktionen, die das noch stark verunreinigte Homotyrosin enthielten, wurden eingedampft und an Dowex 1 $\times$ 8 (Acetatform, 200–400 mesh; 1,8 cm $\times$ 20 cm) mit 0,5N Essigsäure als Eluierungsmittel weiter aufgetrennt. Die einheitlichen Homotyrosin-Frak-tionen gaben beim Eindampfen 10 mg farblosen Rückstand. – NMR. (100 MHz, D₂O, Natrium-trimethylsilylpropansulfonat als interner Standard): Fig. 2.

1 mg Abbauprodukt wurde mit 2N absol. methanolischer Salzsäure über Nacht bei Raum-temperatur verestert und der nach dem Eindampfen im Hochvakuum getrocknete Rückstand mit 1 ml Trifluoressigsäureanhydrid 10 Min. unter Rückfluss gekocht. Das überschüssige Anhydrid wurde mit einem Stickstoffstrom abgetrieben, der Rückstand mit Methylenchlorid extrahiert, und die filtrierte Lösung eingedampft. Massenspektrum: *m/e* 401 (0,4%, *M*⁺), 383 (0,2%), 370 (0,1%), 367 (0,2%), 362 (0,3%), 354 (0,2%), 342 (4,4%), 322 (0,9%), 305 (0,5%), 304 (0,7%), 288 (1,2%), 272 (0,7%), 262 (2,2%), 256 (1,1%), 245 (1%), 244 (1,8%), 229 (13%), 203 (48,5%), 185 (100%), 175 (14,5%), 153 (39%), 139 (7%), 131 (13%), 125 (15%) etc.

Quantitative Aminosäurebestimmung. 5,21 mg Tetrahydro-echinocandin B wurden in einer zu-geschmolzenen Ampulle unter Stickstoff 24 Std. mit 1 ml 6N Salzsäure bei 110° hydrolysiert. Nach dem Verdünnen auf 5 ml und Ausäthern der Stearinsäure wurde eingedampft. Der im Hochvakuum getrocknete Rückstand wurde mit 1 ml absol. methanolischer 6N Salzsäure 16 Std. bei 20° verestert. Das erneut im Hochvakuum getrocknete Esterhydrochlorid-Gemisch wurde mit 0,2 ml Pyridin und 0,3 ml Essigsäureanhydrid 20 Std. bei 20° acetyliert. Das überschüssige Anhydrid wurde mit absol. Methanol zersetzt und die Lösung eingedampft. Für die Gas-Chromato-graphie wurde in 1 ml Methylenchlorid gelöst und je 1 μ l Lösung eingespritzt. Kapillarkolon-nen Ucon HB-5100, 20 m lang; Temperatur 165°; Helium als Trägergas.

Für das Vergleichschromatogramm wurde in gleicher Weise ein Gemisch von 1,55 mg L-Threo-nin, 1,56 mg 4-Hydroxyprolin und 1,32 mg 4-Methyl-3-hydroxy-prolin zunächst mit 6N Salzsäure erhitzt und anschliessend wie oben aufgearbeitet und in das Gemisch der Acetyl-methylester übergeführt. Es wurden von beiden Lösungen je drei Chromatogramme ausgeführt, deren Er-gebnisse maximal 6% vom Mittelwert abwichen. Es wurden die Höhen der Pike mit denen des Vergleichschromatogrammes verglichen und auf Hydroxyprolin = 1 normiert.

Die Pike wurden mit Hilfe von Vergleichschromatogrammen der einheitlichen Verbindungen zugeordnet: Threonin 2,4 Min., 4-Methyl-3-hydroxy-prolin 8,3 Min., 4-Hydroxyprolin 9,5 Min. Aminosäure-Verhältnis: Threonin 2,07, 4-Methyl-3-hydroxy-prolin 0,94, 4-Hydroxyprolin 1.

Das 4-Oxoprolin konnte in diese Bestimmung nicht eingeschlossen werden, da es bei der Derivatisierung zum grossen Teil zersetzt wird. Ein schwacher Pik mit der Retentionszeit des 4-Oxoprolin-Derivates konnte im Chromatogramm beobachtet werden.

Die Aufarbeitung der Kulturlösungen sowie die Abtrennung der Komponente B wurde von den Herren J. Scheidegger und K. Weiss (Biol. Versuchsbetrieb Ciba-Geigy AG) durchgeführt.

Die Mikroanalysen verdanken wir dem analytischen Laboratorium der ETH (Leitung Herr W. Manser), die Massenspektren Herrn Prof. Dr. J. Seibl und die ¹³C-NMR.-Spektren Herrn Dr. E. Pretsch. Die H-NMR.-Spektren wurden von der instrumentalanalytischen Gruppe der ETH Zürich (Leitung Prof. J. F. Oth) aufgenommen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *K. Uchida & H. Zöhner*, J. Antibiotics (Tokyo); im Druck.
- [2] *K. B. Raper & D. I. Fennel*, 'The genus *Aspergillus*', Williams & Wilkins Co., Baltimore 1965.
- [3] *D. I. Fennel & K. B. Raper*, Mycologia 47 (1), 79 (1955).
- [4] *W. Szybalski*, Science 116, 46 (1952).
- [5] *I. M. Hais & K. Macek*, «Handbuch der Papierchromatographie», Band I, Gustav Fischer Verlag, Jena 1958.
- [6] *G. Koyama*, Helv. 57, 2477 (1974).
- [7] *M. Karplus*, J. chem. Physics 30, 11 (1959).
- [8] *T. Clerc, E. Pretsch & S. Sternhell*, «¹³C-Kernresonanzspektroskopie», Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurt a.M. 1973.
- [9] *O. Lutz & B. Jirgensons*, Ber. deutsch. chem. Ges. 63, 448 (1930); 64, 1221 (1931); *G. W. Clough*, J. chem. Soc. 113, 526 (1918).
- [10] *R. Kuhn & G. Osswald*, Chem. Ber. 89, 1423 (1956).
- [11] *H. Brockmann & J. H. Manegold*, Chem. Ber. 93, 2971 (1960); *R. Diegelmann, A. Mauger & E. Katz*, J. Antibiotics (Tokyo) 22, 85 (1969).
- [12] *A. A. Patchett & B. Witkop*, J. Amer. chem. Soc. 79, 185 (1957).
- [13] *J. A. Hamilton, C. Talkourshi, E. Williams, E. M. Avila, A. Allerhand, E. H. Cordes & G. Camejo*, Science 180, 193 (1973).
- [14] *W. Voelter, G. Jung, E. Breitmaier & E. Bayer*, Z. Naturforsch. 26 (b), 213 (1971); *W. Horsley, H. Sternlicht & J. S. Cohen*, J. Amer. chem. Soc. 92, 680 (1970).
- [15] *L. F. Johnson & W. C. Jankowski*, 'Carbon-13 NMR-Spectra', John Wiley & Sons, New York 1972.
- [16] *R. Muntwyler & W. Keller-Schierlein*, Helv. 55, 2071 (1972).

268. Metabolites of Microorganisms

144th communication¹⁾

The Crystal and Molecular Structure of 3-Hydroxy-4-methylproline

by **Gunji Koyama**²⁾

Laboratorium für Organische Chemie der Eidg. Technischen Hochschule, 8006 Zürich

(4. X. 74)

Summary. A new amino acid isolated from the acid hydrolysate of the antibiotic Echinocandin B is shown by X-ray analysis to be 2,3-*trans*-3,4-*cis*-3-hydroxy-4-methylproline. The crystals are orthorhombic, $a = 5.633 \text{ \AA}$, $b = 8.760 \text{ \AA}$, $c = 14.314 \text{ \AA}$, $Z = 4$, space group $P2_12_12_1$. The structure was determined by direct methods and refined by least-squares analysis to a final R value of 0.032 for 532 reflections. The molecule exists as a zwitterion forming one O—H...O and two N—H...O hydrogen bonds.

Introduction. – A new amino acid isolated by *Benz et al.* [1] from an acid hydrolysate of the antibiotic Echinocandin B was assumed to be 3-hydroxy-4-methylproline on the basis of spectral data, especially the proton magnetic resonance spectra of the compound. The purpose of the present work was to confirm this structure independently by X-ray analysis and to establish its configuration.

¹⁾ 143rd Commun. see [1].

²⁾ Present address: Institute of Microbial Chemistry, 3-14-23, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan.