

10. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

218. Mitteilung¹⁾

Versuche zur Strukturaufklärung von Niphimycin, 1. Teil. Reinigung und Charakterisierung der Niphimycine Ia und Ib sowie Abbau mit Salpetersäure

von Luciano Bassi, Beda Joos, Peter Gassmann, Hans-Peter Kaiser, Heinz Leuenberger und
Walter Keller-Schierlein

Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, CH-8092 Zürich

(12.XI.82)

On the Structure Elucidation of Niphimycin, Part I. Purification and Characterization of the Niphimycins Ia and Ib; Degradation by Nitric Acid

Summary

From a sample of niphimycin the pure components, niphimycin Ia and Ib, were isolated by column chromatography and droplet counter-current chromatography. They were characterized by UV., IR., ¹H-NMR. (300 MHz) and ¹³C-NMR. spectra. A vigorous degradation of niphimycin with nitric acid, followed by esterification with diazomethane, gave a complex mixture, from which many components could be isolated and identified. Several of the degradation products were synthesized, one of them (dimethyl 2,4-dimethyladipate) in a stereospecific manner, establishing the configuration of two of the centers of chirality of niphimycin.

Niphithricin was identified with copiamycin and yielded with nitric acid a degradation mixture very similar to that from niphimycin. The structures of the degradation products are in good agreement with a macrolide-type structure of niphimycin and copiamycin.

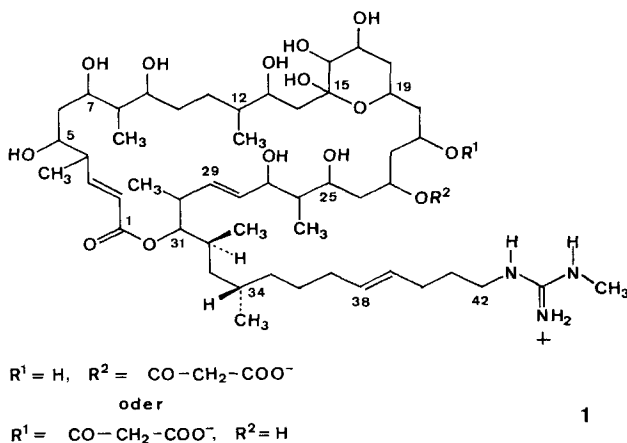
Further work for structure elucidation of niphimycin and copiamycin is in progress.

A) Einleitung. – Das gegen Pilze wie auch gegen Gram-positive Bakterien wirksame Antibiotikum Niphimycin, das von einem Actinomycetenstamm der Art *Streptomyces hygroscopicus*, Stamm B-255, produziert wird, wurde zum erstenmal von *Blinov et al.* [2] näher beschrieben. Mit Niphimycin identisch oder nahe verwandt sind die Antibiotica Melanosporin [3] und Scopafungin [4], die beide nur unvollständig charakterisiert wurden. Niphimycin wird zusammen mit zwei Polyen-Makroliden gebildet, den Endomycinen A und B [5], mit denen die Helixine A

¹⁾ 217. Mitteilung s. [1].

und B [6] übereinstimmen. In die Verwandtschaft mit Niphimycin gehören auch die Antibiotica der Azalomycin F-Gruppe, die erstmals 1960 von Arai [7] beschrieben wurden. Eine sorgfältige Charakterisierung der Hauptkomponente, Azalomycin F_{4a}, erfolgte aber erst kürzlich [8]²⁾, seine Konstitution wurde weitgehend von Iwasaki *et al.* [9] aufgeklärt. Trotz der nahen Verwandtschaft unterscheidet sich das Azalomycin F_{4a} in mehreren strukturellen Einzelheiten vom Niphimycin [10].

Kürzlich haben wir über die Isolierung eines vorwiegend antifungischen Antibiotiums, Niphithricin, berichtet [11], das zusammen mit Nigericin und Elaiophylin [12] von einem Stamm von *Streptomyces violaceoniger*, Tü 905, gebildet wird. Die ausführliche spektroskopische und analytische Charakterisierung zeigte, dass Niphithricin mit Niphimycin nahe verwandt ist, aber bei der Dünnschichtchromatographie ein unterschiedliches Verhalten zeigt. Ein weiterer charakteristischer Unterschied besteht in den UV.-Spektren: Niphimycin zeigt eine starke Bande bei 233 nm, die auf eine konjugierte Diengruppe hinweist und beim Niphithricin fehlt. Dafür tritt bei letzterem eine Bande bei 215 nm ($\log \epsilon = 4,2$) auf, die für eine α, β -ungesättigte Estergruppe spricht. Die IR.- und NMR.-Spektren zeigen dagegen nur geringfügige Unterschiede. Inzwischen hat es sich gezeigt, dass das Niphithricin in allen Eigenschaften mit Copiamycin übereinstimmt, einem Antibioticum, das 1965 von Arai *et al.* [13] kurz beschrieben wurde. Eine ausführliche Charakterisierung [14] und weitgehende Konstitutionsaufklärung [15] erfolgte dagegen erst in jüngster Zeit durch Iwasaki *et al.*²⁾. Der Identitätsbeweis ergibt sich nicht nur aus den übereinstimmenden analytischen und spektroskopischen Eigenschaften, sondern vor allem auch daraus, dass unsere Arbeiten über Niphithricin zur gleichen, fast vollständigen Konstitutionsformel 1 führten, die Iwasaki *et al.* [15] für das Copiamycin vorschlugen. Der Name Niphithricin wird daher fallengelassen. Da die in dieser und nachfolgenden Mitteilungen beschriebene Konstitutionsaufklärung von Niphimycin eng mit unseren Untersuchungen über Copiamycin verflochten ist,



²⁾ Herrn Prof. S. Iwasaki danken wir für die Zusendung der Manuskripte vor der Publikation.

müssen wir im Nachfolgenden auch auf die letzteren eingehen, obwohl sie schliesslich zur von *Iwasaki et al.* abgeleiteten Konstitutionsformel **1** führten.

B) Reinigung und Charakterisierung der Niphimycine Ia und Ib. – Das uns zur Verfügung stehende Handelspräparat³⁾ bildete ein graues Pulver, das sich in Wasser und in Lipidlösungsmitteln wie Essigester, Chloroform oder Methylenchlorid kaum auflöste. Mit bräunlicher Farbe war es dagegen in Methanol, Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid gut löslich. Gemäss Dünnschichtchromatographie (Butanol/Eisessig/Wasser 67:10:23, Anfärben mit Joddampf oder Schwefelsäure) bestand es aus vier Niphimycin-Komponenten, Ia, Ib, IIa und IIb⁴⁾ mit den Rf-Werten 0,27, 0,25, 0,23 und 0,20 sowie mehreren fettlöslichen Komponenten mit Rf-Werten von ca. 0,65 bis 0,8. Die letzteren, die zusammen ca. 5% des Gemisches ausmachten und keine antimikrobielle Wirkung zeigten, konnten durch Chromatographie an *Sephadex LH-20* leicht entfernt werden, dagegen wurden die 4 Niphimycin-Komponenten dabei kaum aufgetrennt. Lediglich eine kleine Fraktion von ca. 4% bestand ausschliesslich aus den Komponenten IIa und IIb. Durch Chromatographie an Kieselgel wurde das Niphimycingemisch aufgetrennt in ca. 50% Gemisch aus Ia und Ib und ca. 15% einer Fraktion, die alle vier Komponenten enthielt. Durch eine *Craig*-Verteilung über 1800 Stufen wurde die Komponente Ia stark angereichert, die übrigen drei Komponenten aber kaum voneinander getrennt. Einheitliche Niphimycin-Komponenten Ia und Ib wurden dagegen in guter Ausbeute erhalten, wenn ein durch Chromatographie an *Sephadex LH-20* und Kieselgel vorgereinigtes Gemisch der Komponenten Ia und Ib durch Tröpfchen-Gegenstromchromatographie [16] weiter behandelt wurde. Die beiden Komponenten wurden als farblose amorphe Pulver erhalten, die sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen. Die Bildung von Kristallen (vgl. [2]) konnten wir trotz manchen Anstrengungen nie beobachten. Die durch FAB-Massenspektrometrie für beide Komponenten übereinstimmend gefundene Molekularmasse von 1142 [Hauptpike 1142 und 1143; Fragmente mit m/z 1124 ($M - H_2O$) und 1098 ($M - CO_2$)] wird von den durch Dampfdruckosmometrie bestimmten Werten (gef. für Ia in Äthanol: 1110) und den durch Mikrotitration bestimmten Äquivalentgewichten (gef. für Ia: 1217; $pK_{MCS}^* = 5,04$) gestützt. Auf die mit den FAB-Massenspektren vereinbare Bruttoformel, $C_{59}H_{103}N_3O_{18}$, passen die Mikroanalysen beider Komponenten aber nur, wenn man annimmt, dass die amorphen Verbindungen etwa 3 mol Wasser gebunden enthalten. Endgültig bestätigt wurde die oben angegebene Bruttoformel erst durch das Ergebnis der Konstitutionsaufklärung. Die ^{13}C -NMR.-Spektren der Niphimycine Ia und Ib (*Fig. 1*) stimmen fast völlig miteinander überein. Sie weisen ca. 45 diskrete Signale auf. Zahlreiche Überlappungen und Pike mit stark erhöhter Intensität zeigen aber, dass wesentlich mehr als 45 C-Atome vorhanden sind. Beide Spektren sind nicht im Widerspruch zu der Anwesenheit von 59 C-Atomen.

In den gut aufgelösten Bereichen der ^{13}C -NMR.-Spektren fallen – bei beiden Komponenten übereinstimmend – drei Signale von Ester- bzw. Carboxyl-C-Atomen

³⁾ *Pharmachim*, Sofia. Herrn Dr. H. Bickel, Ciba-Geigy AG, Basel, danken wir für die Überlassung des Präparates.

⁴⁾ Eine eindeutige Korrelation zu den von *Blinov et al.* [2] angegebenen Komponenten A₁, A₂, A₃ und B war nicht möglich, weshalb wir für die Einzelkomponenten neue Bezeichnungen einführten.

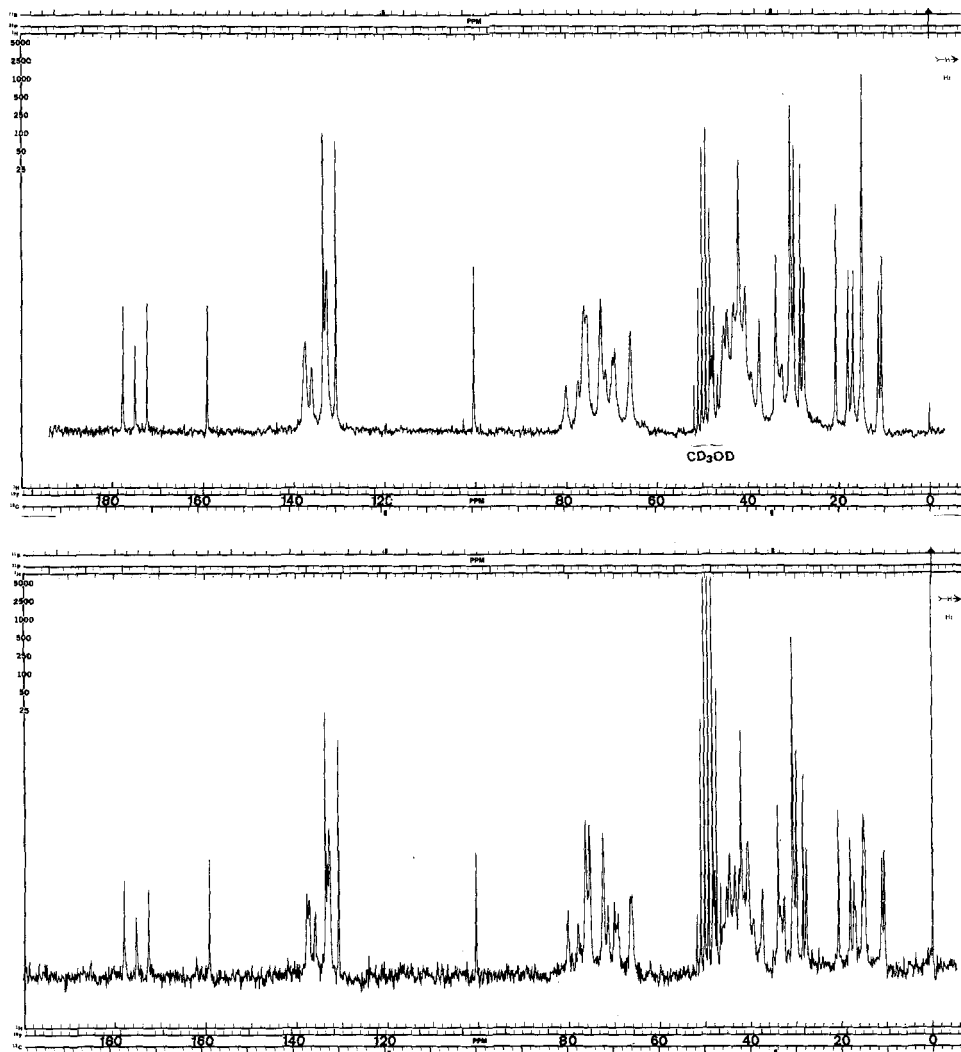


Fig. 1. ^{13}C -NMR.-Spektren von Niphimycin Ia (oben) und Niphimycin Ib (unten) in CD_3OD (25 MHz)

im Bereich von 170–176 ppm auf. Die Zuordnung eines Signals bei 158 ppm zu einem Guanidin-C-Atom wird durch spätere Abbauprodukte bestätigt [10]. Der Bereich von 120–140 ppm weist auf die Anwesenheit von vier 1,2-disubstituierten Doppelbindungen hin. Das einzelne Signal bei 99,5 ppm (Singulett im *off-resonance*-Spektrum) ist einem Acetal- oder Halbacetal-C-Atom zuzuordnen. Der Bereich von 60–80 ppm ist recht unübersichtlich und zeigt überlappende Signale einer grösseren Anzahl sekundärer Alkohol-C-Atome. Noch schwieriger interpretierbar ist das Gebiet von 20–50 ppm mit zahlreichen CH_2 - und CH -Signalen, hingegen ist der Bereich der Methylsignale, 10–20 ppm, wieder übersichtlicher. Unter Be-

rücksichtigung einzelner Überlappungen kann auf die Anwesenheit von acht Methylgruppen geschlossen werden.

Das ^1H -NMR.-Spektrum (300 MHz, Fig. 2) bestätigt im wesentlichen die obige Interpretation des ^{13}C -NMR.-Spektrums. So weist das Gebiet von 5 bis 6,2 ppm auf *ca.* acht olefinische Protonen hin. Die Anwesenheit zahlreicher CHOH -, CH_2 - und CH -Gruppen folgt aus den Bereichen von 3 bis 4,3 und von 1,2 bis 2,6 ppm, und der Bereich um 1 ppm ist, trotz teilweise überlappender Signale, am besten mit der Anwesenheit von acht Methylgruppen vereinbar. Auffällig ist ein Singulett (3 H) bei 2,83 ppm, aus dem auf eine *N*-Methylgruppe geschlossen werden kann. In $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ist dieses Signal in ein Dublett aufgespalten, entspricht also einer $\text{CH}_3\text{--NH}$ -Gruppe. Im ^{13}C -NMR.-Spektrum ist das entsprechende Signal im Gebiet um 40 ppm wegen starker Überlappungen nicht erkennbar. Die Bestätigung für das Vorliegen einer *N*-Methylgruppe ergab sich aus später zu besprechenden Abbauprodukten [10].

IR.-Spektren der Niphimycine sind bei *Blinov et al.* [2] abgebildet (vgl. Fig. 3). Eine starke und breite Bande bei *ca.* 1725 cm^{-1} kann Ester-carbonylgruppen zugeordnet werden. Von den vier Doppelbindungen der Niphimycine müssen zwei

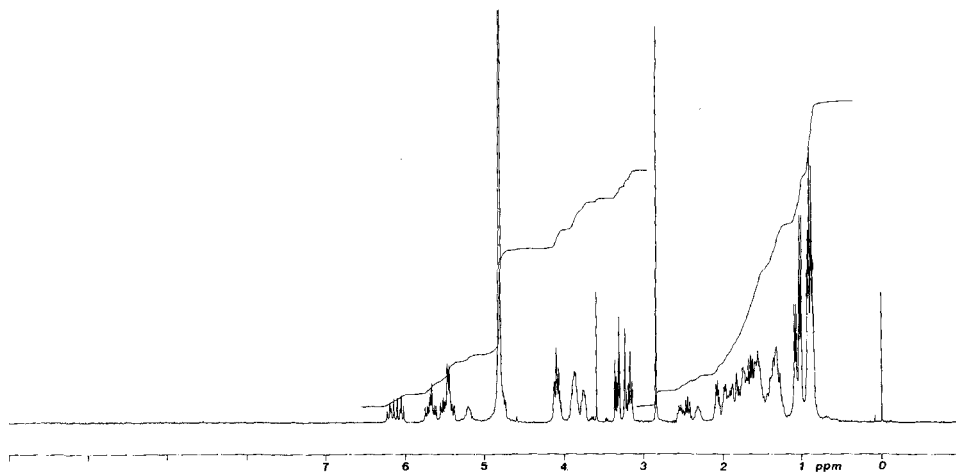


Fig. 2. ^1H -NMR.-Spektrum von Niphimycin Ia in CD_3OD (300 MHz)

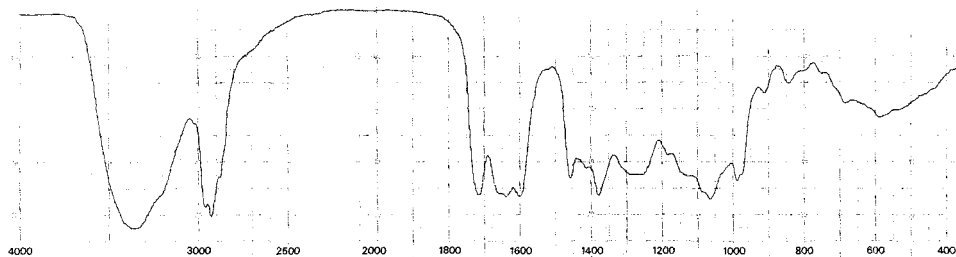


Fig. 3. IR.-Spektrum von Niphimycin Ia in KBr

konjugiert und für die intensive UV.-Bande bei 233 nm (mit Schultern bei 228 und 240 nm) verantwortlich sein. Der bei der Mikrotitration mit 0,1 N HCl in Methylcellosolve/Wasser 8:2 gemessene pK -Wert von 5,04 entspricht einer Carboxylatgruppe. Die Stufe der stark basischen Guanidinogruppe konnte dagegen mit der hier angewendeten Methode nicht erfasst werden.

Die Art der Isomerie von Niphimycin Ia und Ib ergab sich daraus, dass Lösungen der reinen Einzelkomponenten in Methanol nach ca. drei Wochen die gleichen Gemische aus Ia und Ib bildeten. Es handelt sich demnach um Diastereomerie. Der Ort der Diastereomerie ist wahrscheinlich, wie bei den Copiamycinen A und B (Niphithricine A und B [11]), ein Halbacetal-C-Atom, dessen Vorliegen durch das ^{13}C -NMR.-Spektrum erkannt wurde (s. oben).

Gegenüber Copiamycin, $\text{C}_{54}\text{H}_{95}\text{N}_3\text{O}_{17}$ [11], ist die Molekel des Niphimycins I um fünf C-Atome, acht H-Atome und ein O-Atom grösser. Davon liegen zwei C- und zwei H-Atome in einer Vinylgruppe vor; Copiamycin enthält nur drei Doppelbindungen, die alle isoliert sind. Ein weiteres zusätzliches C-Atom gehört einer Methylgruppe an, da Copiamycin nur deren sieben besitzt. Im übrigen sind die Eigenschaften von Copiamycin und Niphimycin sehr ähnlich. Insbesondere zeigen die ^{13}C -NMR.-Spektren beider Antibiotica im Carbonylbereich die gleichen drei Signale bei 170,9, 173,6 und 176,2 ppm, sowie ein Guanidinsignal bei 158 ppm sowie ein Halbacetal-C-Signal bei 99,5 ppm.

Die ^1H -NMR.-Spektren weisen bei beiden Antibiotica ein *N*-Methylsignal auf, und beide zeigen sehr ähnliches Verhalten bei der Mikrotitration ($pK_{\text{MCS}}^* = 4,9$ für Copiamycin A und B).

Niphimycin I gibt ein Polyacetylderivat, doch konnte die Anzahl der Acetylgruppen wegen starker Überlappungen ihrer Signale in den NMR.-Spektren nicht genau bestimmt werden. Die vier Doppelbindungen lassen sich leicht hydrieren. Das Octahydroniphimycin (aus einem Gemisch von Ia und Ib) zeigt im ^{13}C -NMR.-Spektrum keine Signale zwischen 100 und 155 ppm, hingegen sind die drei Carbonsignale und das Guanidinsignal unverändert vorhanden, wie auch das Halbacetalsignal bei 100 ppm, wobei das letztere, entsprechend der Anwesenheit zweier diastereomerer Halbacetale, aufgespalten ist (99,71 und 99,88 ppm).

Für die Trennung der Niphimycine IIa und IIb, die im Rohextrakt in geringerer Menge vorliegen, wurde bisher kein geeignetes Lösungsmittelsystem gefunden. Die Eigenschaften des Gemisches aus IIa und IIb zeigen, dass diese mit den Niphimycinen Ia und Ib nahe verwandt sind. Weder in der Elementarzusammensetzung noch in den UV.-, IR.- und NMR.-Spektren wurden deutliche Unterschiede gefunden, und auch bei der Mikrotitration weicht Niphimycin II ($pK_{\text{MCS}}^* = 4,74$) nur wenig von den Niphimycin-I-Komponenten ab. Ein etwas höherer N-Gehalt (3,73%) deutet auf ein etwas geringeres Molekulargewicht hin. Das Niphimycin II wurde vorläufig nicht eingehender untersucht.

C) Abbau von Niphimycin und Octahydroniphimycin mit Salpetersäure. – Die oben diskutierten spektroskopischen Eigenschaften von Niphimycin Ia und Ib stützen eine Vermutung von *Blinov et al.* [2], dass die Niphimycine einer neuartigen Gruppe von Makrolid-Antibiotica angehören. Diese Vermutung wird weiter erhärtet durch eine Reihe von Abbauprodukten, die wir bei einem energischen Abbau

mit Salpetersäure erhielten. Wegen der vermuteten Beziehung zwischen Niphimycin Ia und Ib wurden diese Versuche im präparativen Maßstab mit einem Gemisch der beiden Verbindungen durchgeführt. Im Rohprodukt der Oxydation waren zahlreiche Carbonsäuren enthalten, die nach der Veresterung mit Diazomethan durch Kapillar-Gas-Chromatographie aufgetrennt wurden. Es waren gegen 50 Pike sehr unterschiedlicher Intensität mit Retentionszeiten zwischen 1 und 300 Min. vorhanden (Kapillar-Kolonne *Ukon HB*; 90°, He-Strom 3 ml/Min.). Eine kleine Menge reines Niphimycin Ia gab beim analogen Abbau ein völlig übereinstimmendes Produkte-Gemisch, und der Abbau einer Probe Niphimycin IIa + IIb, der ebenfalls nur im analytischen Maßstab durchgeführt wurde, gab ein Ester-gemisch, das ebenfalls in den meisten Piken mit dem Abbaugemisch aus Niphimycin I übereinstimmte.

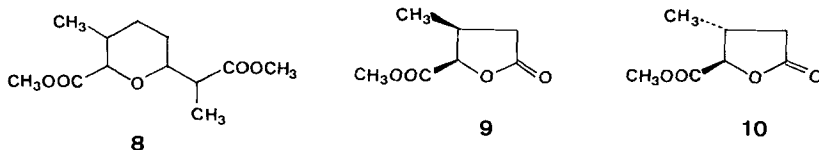
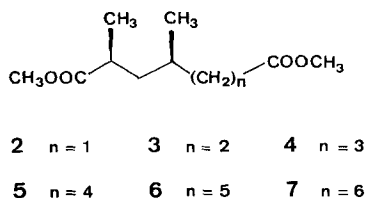
Die Abbauester aus 2 g Niphimycin I wurden zunächst durch präparative Gas-Chromatographie (*SE-30*-Kolonne) in 13 Fraktionen aufgetrennt, von denen aber die meisten noch Gemische von mehreren Komponenten waren (s. *Tab. 1* im *Exper. Teil*). Zahlreiche Einzelkomponenten wurden durch anschliessende Chromatographie an Kieselgel in Mengen zwischen *ca.* 0,5 und 10 mg rein gewonnen. Davon wurden 12 durch Vergleich der gas-chromatographischen Retentionszeiten und der Massenspektren und die meisten davon auch durch die IR.- und ¹H-NMR.-Spektren identifiziert. Als Vergleichsproben dienten teils käufliche, teils synthetisch hergestellte Präparate.

Beim Abbau von 4 g Octahydroniphimycin (aus einem Gemisch von Ia und Ib) konnten zusätzlich mehrere Produkte gefasst und identifiziert werden, die gemäss Kapillar-GC. auch im Abbaugemisch aus Niphimycin I enthalten waren. Dazu kamen eine Reihe von Verbindungen, die beim Abbau von Niphimycin nicht nachgewiesen werden konnten und erste Hinweise auf die Lage einer Doppelbindung gaben. Identifiziert wurden zunächst mehrere Verbindungen (Oxalsäure-, Bernsteinsäure-, Glutarsäure-dimethylester sowie die einfach verzweigten Methylbernsteinsäure-, 2-Methylglutarsäure-, 2-Methyladipinsäure- und 3-Methyladipinsäure-dimethylester), die im Hinblick auf die Strukturaufklärung von geringem diagnostischem Wert waren. Nützlicher war eine Reihe von mehrfach verzweigten Dicarbonsäureestern oder solchen mit zusätzlichen funktionellen Gruppen.

In genügenden Mengen für eine einwandfreie Identifizierung wurde eine homologe Reihe von 2,4-Dimethylalkandisäure-dimethylestern isoliert. Beim Abbau von Niphimycin I hörte die Reihe beim Ester der 2,4-Dimethylkorksäure (4) auf, während sie beim Abbau des Octahydroniphimycins bis zum 2,4-Dimethylundecandisäure-dimethylester (7) weiterging. Dies war ein erster Hinweis dafür, dass im Niphimycin I eine der vier Doppelbindungen von demjenigen C-Atom ausgeht, das C(8) von 4 entspricht.

Es sei noch erwähnt, dass die Reihe der in Stellung 2 einfach methylierten Dicarbonsäuren beim Abbau des Niphimycins I beim 2-Methyladipinsäure-dimethylester abbrach. Beim Abbau des Octahydroniphimycins I kamen noch der 2-Methylpimelinsäure-dimethylester und der 2-Methylkorksäure-dimethylester dazu. Diese Verbindungen entstammen demnach offensichtlich der gleichen Region der Niphimycinmolekel wie die oben erwähnten 2,4-Dimethyldicarbonsäureester 2 bis 7.

Nachdem die Massen- und die ¹H-NMR.-Spektren der Abbauprodukte 2 bis 7 klare Hinweise auf ihre Konstitution gegeben hatten, wurden für die Identifizierung



mehrere Glieder der Reihe synthetisch hergestellt (s. *Abschnitt D*). Besondere Sorgfalt wurde beim niedrigsten Glied auch der Aufklärung der Konfiguration gewidmet. Das Racemat des *erythro*-2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylesters (**2**) wurde in stereochemisch eindeutiger Weise hergestellt und stimmte nach Kapillar-GC. und in den Spektren mit dem Abbauprodukt überein. Das rechtsdrehende Abbauprodukt besitzt nach *Abrahamsson et al.* [17] die (2*S*)-Chiralität. Das Abbauprodukt ist demnach der (2*S*,4*R*)-2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylester (**2**). Ein synthetisches Diastereomerengemisch von **2** zeigte im Gas-Chromatogramm zwei stark verschiedene Pike (*erythro*-Form 6,6 Min., *threo*-Form 12,3 Min., *Ukon HB*, 90°). Die *threo*-Verbindung konnte aus dem Abbaugemisch weder rein isoliert noch als Pik im Chromatogramm des Rohgemisches nachgewiesen werden.

Die dem Ester **3** entsprechende Dicarbonsäure wurde zunächst als Diastereomerengemisch synthetisiert und anschliessend durch *Craig*-Verteilung in die beiden Racemate getrennt, so dass von der Herstellungsweise her eine Zuordnung der Konfiguration nicht möglich war. Nach der Umsetzung mit Diazomethan stimmte der eine 2,4-Dimethylpimelinsäure-dimethylester (t_R 11,8 Min., *Ukon HB*, 90°) im IR-, ^1H -NMR.- und Massenspektrum sowie in der Retentionszeit mit dem Abbauprodukt **3** überein. Da es sich später zeigte [10], dass dieser Ester aus dem gleichen Molekelbereich des Niphimycins stammt wie das Abbauprodukt **2**, muss ihm die (2*S*,4*S*)-Chiralität zugeordnet werden⁵⁾, was auch mit der Rechtsdrehung des Abbauproduktes vereinbar ist [17].

Der zu **3** diastereomere synthetische Ester, der demnach die (2*RS*,4*SR*)-Konfiguration besitzt, gab zwar ein mit dem Abbauprodukt übereinstimmendes IR.- und Massenspektrum, zeigte aber deutliche Unterschiede im ^1H -NMR.-Spektrum und in der Kapillar-Gas-Chromatographie (t_R 13,1 Min.). Dieser Ester konnte im Abbaugemisch nicht nachgewiesen werden.

Der 2,4-Dimethylnonandisäure-dimethylester (**5**) konnte nur mit einem synthetischen Diastereomerengemisch verglichen werden. Im Kapillar-GC. stimmte der Abbauester mit dem synthetischen Ester mit kleinerer Retentionszeit (42 Min.,

⁵⁾ Zu beachten ist hier die Umkehrung der CIP-Sequenz beim Übergang von der 2,4-Dimethyladipinsäure zur 2,4-Dimethylpimelinsäure.

90°) überein. Der diastereomere Ester mit t_R 46,2 Min. war im Abbaugemisch nicht nachweisbar.

Die Abbauprodukte **4**, **6** und **7** wurden nicht synthetisiert. Die α -Stellung der einen Methylgruppe ergab sich aus den Lagen ihrer Signale in den ^1H -NMR.-Spektren (1,14 bis 1,15 ppm), während jeweils die zweite Methylgruppe weiter von den Estergruppen entfernt sein musste (0,87 bis 0,88 ppm). Die genaue Lage wurde nicht bestimmt. Sie ergibt sich eindeutig aus späteren Abbauvorsuchen [10], die zeigten, dass alle diese Produkte aus demselben Bereich der Niphimycinmolekel gebildet werden. In Übereinstimmung damit sind alle Abbauprodukte dieser Reihe rechtsdrehend [17].

Von den aus dem Abbaugemisch von Niphimycin I isolierten Hydroxysäureestern oder Abkömmlingen von Hydroxysäureestern erwies sich nur das Abbauprodukt **8**, das in einer Menge von 9 mg als einheitliche Verbindung erhalten wurde, als hilfreich [10]. Das IR.-Spektrum zeigt die Abwesenheit von Hydroxygruppen und das Vorhandensein von Estergruppen (1732 cm^{-1}). Das Massenspektrum zeigt einen sehr schwachen Pik für das Ion $(M+1)^+$ bei m/z 245 sowie deutlich die für Methylester charakteristischen Fragmente $(M-32)^+$ bei m/z 212 und $(M-59)^+$ bei m/z 185. Das Massenspektrum zusammen mit der Anzahl der im ^1H -NMR.-Spektrum erkennbaren Protonen (20) weist der Verbindung eine Bruttoformel $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_5$ (244) zu. Dass ein Dimethylester vorliegt, ergibt sich aus den beiden Singulettens bei 3,70 und 3,75 ppm (je 3 H) (Fig. 4). Die Signale bei 4,15 und 3,5 ppm stammen von Protonen an C-Atomen, die mit dem fünften O-Atom verbunden sind, das demnach ein Äther-O-Atom sein muss. Das Signal bei 4,15 ppm, dessen chemische Verschiebung für die α -Stellung zu einer Estergruppe spricht, ist ein Dublett, das zugehörige Proton besitzt demnach einen einzigen Kopplungspartner, woraus sich für seine Umgebung die Teilformel **A** ergibt. Von den beiden C-Methylgruppen,

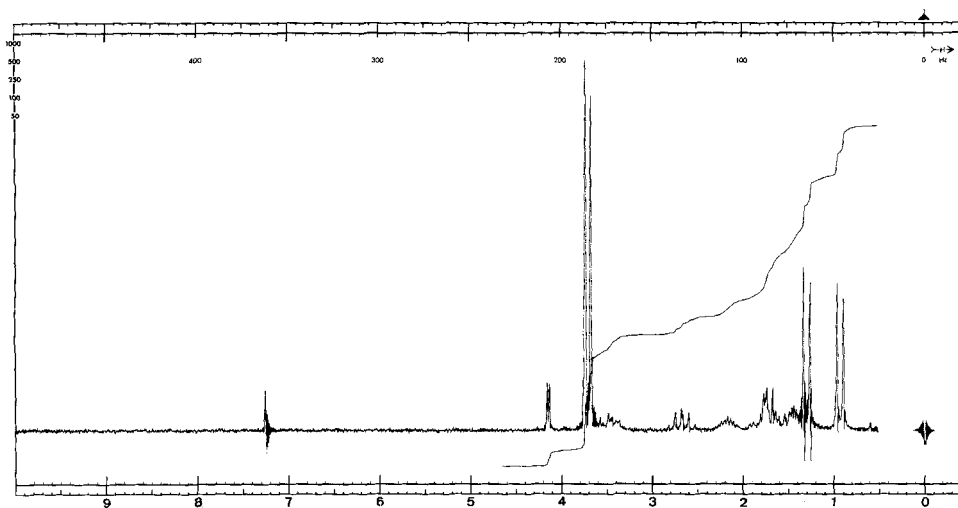
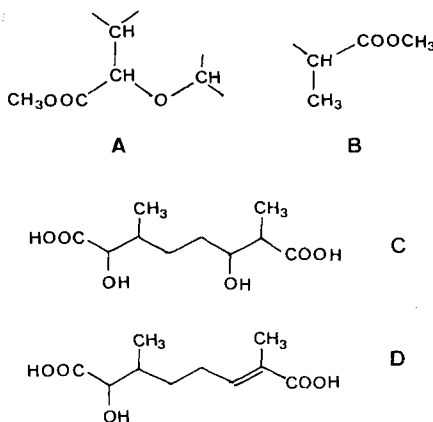


Fig. 4. ^1H -NMR.-Spektrum von 2-(6'-Methoxycarbonyl-5'-methyl-2'-tetrahydropyranyl)propionsäuremethylester (**8**) in CDCl_3 (100 MHz)

die beide im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Dublette geben, liegt die eine α -ständig zu einer Methoxycarbonylgruppe (1,14 ppm). Für die Anordnung in Teilformel **B** spricht auch das Massenspektrum, das einen starken Pik für das Produkt der *McLafferty*-Umlagerung bei m/z 88 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) zeigt. Das Signal des α -ständigen Protons in der Teilformel **B** bei 2,76 ppm zeigt eine quintettähnliche Aufspaltung. Die Teilformel **B** muss demnach mit einer der beiden Methingruppen der Teilformel **A** verbunden werden. Von den beiden Möglichkeiten würde eine zu einer Strukturformel mit einem Cyclopropanring führen, was aber mit der Lage der CH_2 -Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nicht vereinbar ist. Somit lassen sich die Teilformeln **A** und **B**, ergänzt durch zwei Methylengruppen, deren Signale zwischen 1,3 und 2,0 ppm zu erkennen sind, nur noch auf eine Art zur Konstitutionsformel **8** ergänzen. Mit dieser Formel eines 2-(6'-Methoxycarbonyl-5'-methyl-2'-tetrahydropyran)propionsäuremethylesters ist auch das Signal der zweiten Methingruppe bei 2,2 ppm, ein breites, schlecht aufgelöstes Multipllett, vereinbar, das zeigt, dass dieser CH-Gruppe (C(5')) ausser der Methylgruppe noch mehrere weitere Protonen benachbart sind.



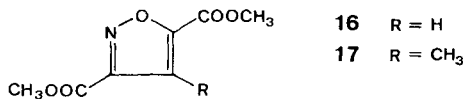
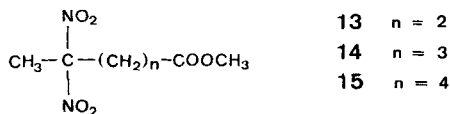
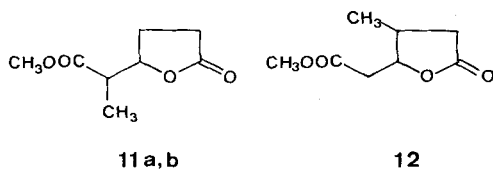
Aus dem Abbau zur Verbindung **8** lässt sich nicht erkennen, ob der Tetrahydropyranring im Niphimycin I schon vorgebildet ist, oder ob sich dieser Ring erst durch Wasserabspaltung aus einer 1,5-Dihydroxysäure **C** entsteht. Als Mechanismus für den Ringschluss kann man sich am besten zunächst eine β -Eliminierung zur ungesättigten Säure **D**, gefolgt von einer intramolekularen *Michael*-Addition der Hydroxygruppe vorstellen. Daraus würde man erwarten, dass das Tetrahydropyran **8** in stereochemisch uneinheitlicher Form gebildet wird. Das Auftreten von Diastereomeren wurde tatsächlich beim Abbau des Octahydroniphimycins I (s. unten) beobachtet. Die Bildung von Tetrahydropyranderivaten aus 1,5-Dihydroxyverbindungen unter ähnlichen Reaktionsbedingungen wurde an anderen Beispielen von *Kishi et al.* [18] sowie von *Oppolzer & Prelog* [19] beobachtet.

Aus dem analog hergestellten Abbaugemisch von *Octahydroniphimycin I* wurden ausser Äpfelsäure, 3-Methyläpfelsäure und der Verbindung **8** mehrere weitere Derivate von Hydroxycarbonsäuren isoliert und identifiziert, allen voran zwei zum Tetrahydropyran **8** diastereomere Verbindungen (**8a** und **8b**). Die Kopplungs-

konstanten $J(5',6')$ betragen bei allen drei Isomeren *ca.* 2,5 Hz, die chemischen Verschiebungen von H–C(6') 4,14 bis 4,18 ppm. Daraus schliessen wir, dass die Konfigurationen an C(6') und C(5') bei allen drei Isomeren gleich sind und eine *cis*-Anordnung der Ringsubstituenten aufweisen. Ein Unterschied der Konfiguration muss demnach an den C-Atomen 2 und 2' bestehen.

Weitere aufschlussreiche Abbauprodukte, die nur aus dem Abbaugemisch aus Octahydroniphimycin I rein erhalten wurden, deren Pike aber auch in den Ester-gemischen aus Niphimycin I erkennbar waren, sind die beiden diastereomeren *cis*- und *trans*- γ -Methoxycarbonyl- β -methylbutyrolactone **9** und **10**. Die Vergleichspräparate wurden nach *Stoll & Seidel* [20] hergestellt. Anhand der reinen synthetischen Proben konnte festgestellt werden, dass sie unter den angewandten Oxydationsbedingungen nicht ineinander umgewandelt werden. Die Verbindungen **9** und **10** stammen demnach aus verschiedenen Bereichen der Niphimycinmolekel.

Drei weitere in reiner Form isolierte Abbauprodukte besitzen aufgrund der Massenspektren die Summenformel $C_8H_{12}O_4$ und sind gemäss ihrer IR.-Spektren ebenfalls γ -Lactone. Alle drei besitzen eine sekundär gebundene C-Methylgruppe. Bei den ersten beiden (**11a** und **11b**) liegt diese entsprechend einem Fragment mit m/z 88 (Produkt der *McLafferty*-Umlagerung) in α -Stellung zur Methoxycarbonylgruppe; die beiden Verbindungen sind demnach Diastereomere der Konstitution **11**.



Das dritte Isomere (**12**) zeigt den Pik des *McLafferty*-Umlagerungsproduktes bei m/z 74, was einer Teilformel $R-CH_2-COOCH_3$ entspricht. Die Methylgruppe muss daher am Ring liegen. Die Stellung 3 folgt einerseits aus der Lage des Signals der CH_2 -Gruppe im 1H -NMR.-Spektrum (2,1–2,8 ppm, α -Stellung zur Carbonylgruppe) und der quartettähnlichen Aufspaltung des Signals von H–C(4) bei 4,48 ppm, die diesem Proton drei Kopplungspartner zuweist.

Der Vollständigkeit halber werden zum Schluss einige N-enthaltende Produkte erwähnt, die im Abbaugemisch von Octahydroniphimycin I z.T. in beträchtlicher Menge nachweisbar waren. Verbindungen dieser Typen wurden unseres Wissens bisher nie bei einer Oxydation mit Salpetersäure beobachtet. Die erste Gruppe umfasst eine homologe Reihe von drei Dinitroverbindungen, deren Entstehungsweise auch nach der fast vollständigen Konstitutionsaufklärung des Antibiotikums [10] nicht eindeutig geklärt ist. Mit einiger Sicherheit kann lediglich gesagt werden, dass sie aus dem Bereich der Seitenkette stammen, da in keiner anderen Molekelregion vier Methylengruppen in einer ununterbrochenen Reihe vorliegen.

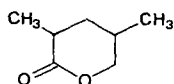
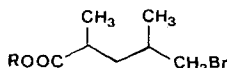
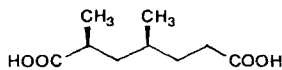
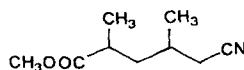
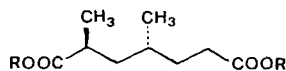
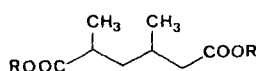
Der einfachste Vertreter der Reihe gibt im Massenspektrum einen massenhöchsten Pik bei m/z 175, der bei Hochauflösung einem Ion $(C_5H_7N_2O_5)^+$ entspricht und demnach nicht vom Molekel-Ion stammen kann. Da gemäss 1H -NMR.-Spektrum eine Methoxycarbonylgruppe vorhanden ist, vermuteten wir, dass das Ion mit höchster Masse, wie häufig bei Methylestern, dem Ion $(M-31)^+$ entspricht und der Verbindung demnach die Summenformel $C_6H_{10}NO_6$ zukommt. Da im 1H -NMR.-Spektrum ausser dem Singulett der Methoxygruppe noch Signale einer stark entschirmten C-Methylgruppe (2,14 ppm, s) und von zwei Methylengruppen zu erkennen waren, vermuteten wir, dass im Abbauprodukt **13** der 4,4-Dinitrovaleriansäuremethylester vorliege, was durch Vergleich mit einer synthetischen Probe [21] leicht bewiesen werden konnte. Die beiden zu **13** homologen Produkte **14** und **15** besitzen gemäss 1H -NMR.-Spektrum eine bzw. zwei Methylengruppen mehr. Die Signale der zusätzlichen Methylenprotonen erscheinen bei deutlich höherem Feld als die Methylensignale von **13**. Die nahe spektroskopische Verwandtschaft zu **13** (vgl. den *Exper. Teil*) lässt wohl keinen Zweifel offen, dass ihnen die im *Formelschema* zugeteilten Strukturen **14** und **15** zukommen.

Die beiden letzten Verbindungen, die aus dem Abbau von Octahydroniphimycin I rein erhalten wurden, zeichneten sich durch besonders einfache 1H -NMR.-Spektren aus. Die eine davon, deren Massenspektrum ($M^+ = 185$) auf eine Bruttoformel $C_7H_7NO_5$ passt, ist gemäss 1H -NMR.-Spektrum (s bei 4,00 und 4,01 ppm) ein Dimethylester. Ausser den beiden Methoxysignalen ist nur noch ein Singulett (1 H) bei 7,31 ppm für ein isoliertes aromatisches Proton zu erkennen. Die aus diesen Befunden und Literaturdaten für mehrere Isoxazolcarbonsäureester [22] vermutete Strukturformel (Isoxazol-3,5-dicarbonsäure-dimethylester, **16**) wurde durch eine Synthese bestätigt (s. *Abschnitt D*). Das zweite Isoxazolderivat (**17**) ist aufgrund des Massenspektrums ($M^+ = 199$) ein Homologes von **16**. Im 1H -NMR.-Spektrum findet sich anstelle des Signals bei 7,31 ein weiteres Methylsignal (2,52 ppm, s), dessen chemische Verschiebung einer Methylgruppe an einem aromatischen Ring entspricht, während die Methoxysignale (4,00 ppm, s, 6 H) mit denen von **16** übereinstimmen. Das Spektrum ist deutlich verschieden von dem des bekannten 3-Methylisoxazol-4,5-dicarbonsäure-dimethylesters [23] und des von uns hergestellten 5-Methylisoxazol-3,4-dicarbonsäure-dimethylesters (s. *Abschnitt D*), so dass für das Abbauprodukt die Strukturformel des 4-Methylisoxazol-3,5-dicarbonsäure-dimethylesters (**17**) übrigbleibt.

Der Abbau von Copiamycin A (= Niphithricin A mit Salpetersäure, [11]) konnte nur im kleinen Maßstab durchgeführt werden und gab nach der Veresterung mit Diazomethan ein Estergemisch, das bei der Kapillar-GC. demjenigen aus Niphi-

mycin I weitgehend entsprach. Insbesondere konnten durch Vergleich (Misch-GC.) mit synthetischen oder aus dem Abbau von Niphimycin I rein gewonnenen Präparaten folgende Verbindungen identifiziert werden (in Klammer Retentionszeiten, *Ukon H*, 90°): Bernsteinsäure-dimethylester (1,9 Min.), Methylbernsteinsäure-dimethylester (1,8), 2-Methylglutarsäure-dimethylester (3,0), 2-Methyladipinsäure-dimethylester (5,0), 3-Methyladipinsäure-dimethylester (5,5), Äpfelsäure-dimethylester (9,5), 3-Methyläpfelsäure-dimethylester (8,1), 2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylester (2; 4,8 Min.), 2,4-Dimethylpimelinsäure-dimethylester (3; 9,1), 2,4-Dimethylkorksäure-dimethylester (4; 16,4), 2-(6'-Methoxycarbonyl-5'-methyl-2'-tetrahydropyranil)propionsäure-methylester (8; 43,0), somit lauter Verbindungen, die auch aus Niphimycin I erhalten worden waren. Auch die nicht genau identifizierten Pike im Kapillar-GC. stimmten fast ausnahmslos mit solchen aus dem Niphimycin-Abbaugemisch überein. Von den Abbauprodukten **2**, **3** und **4** wurde auch hier jeweils nur ein Diastereomers nachgewiesen, und zwar dasselbe wie beim Abbau von Niphimycin I. Die aus Octahydroniphimycin I erhaltenen höheren 2,4-Dimethyldicarbonsäureester **5**, **6** und **7** fehlten im Abbauprodukt des Copiamycins A, ein Hinweis darauf, dass in den Seitenketten von Copiamycin und Niphimycin an der gleichen Stelle eine Doppelbindung vorhanden ist.

D) Synthesen von Vergleichssubstanzen. – Der aus 2,4-Dimethylglutarsäureanhydrid über das 2,4-Dimethylpentan-5-olid (**18**) und die 5-Brom-2,4-dimethylvaleriansäure (**19**) leicht zugängliche Methylester **20** [25] wurde mit Hilfe einer Malonestersynthese ins Gemisch der racemischen 2,4-Dimethylpimelinsäuren (**21** und **22**) übergeführt. Auch wenn als Ausgangsmaterial reines kristallines *meso*-2,4-Dimethylglutarsäureanhydrid eingesetzt wurde, konnte nur ein Diastereomeren-gemisch erhalten werden (Verhältnis *ca.* 2:1 gemäss Kapillar-GC. der Methylester), so dass eine stereoselektive Synthese der Säure **21** auf diesem einfachen Weg nicht möglich war. Dagegen liess sich das Gemisch der diastereomeren Säuren **21** und **22** durch eine vielstufige *Craig*-Verteilung trennen. Die kristalline, einheitliche Säure

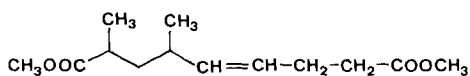
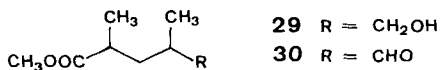
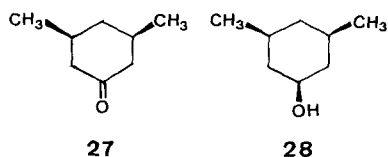
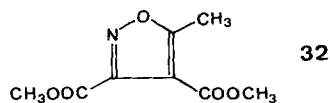
**18****19** R = H**20** R = CH₃**21****24****22** R = H**23** R = CH₃**25** R = H**26** R = CH₃

22 gab den Dimethylester **23**, der nach GC. und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Abbauprodukt **3** deutlich verschieden war. Dagegen waren das IR.- und das Massenspektrum von den Spektren von **3** nicht unterscheidbar. Ein dem Ester **23** entsprechender Pik war im Kapillar-GC. des rohen Abbaugemisches (s. oben) nicht erkennbar.

Die flüssige racemische Säure **21** gab mit Diazomethan einen Methylester, der auch bei der Kapillar-GC. und im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dem Abbauprodukt **3** völlig entsprach. Die Zuordnung der Konfiguration ergibt sich aus der unten beschriebenen Konfigurationsbestimmung des Abbauproduktes **2** und dem späteren Befund [10], dass die Abbauester **2** und **3** dem gleichen Molekelteil des Niphimycins entstammen.

Das aus dem Bromid **20** über das Nitril **24** bereitete Diastereomergemisch der 2,4-Dimethyladipinsäuren (**25**) liess sich auf dem gleichen Weg nicht in die Komponenten trennen. Es wurde in das Gemisch der diastereomeren Methylester **26** übergeführt, das im Kapillar-GC. zwei Pike mit Retentionszeiten von 6,6 und 12,3 Min. zeigte, von denen der Ester mit t_R 6,6 Min. mit dem Abbauprodukt **2** identisch war. Das IR.- und das Massenspektrum des Gemisches waren praktisch gleich wie die Spektren von **2**, doch zeigte das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in den Methylsignalen klar die Anwesenheit von zwei Diastereomeren. Ein diastereomerenfreier racemischer 2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylester (**2**) wurde dagegen auf einem anderen, die relative Konfiguration beweisenden Weg hergestellt. Die Synthese geht auf eine Untersuchung von *von Braun* zurück, der aus dem Gemisch der diastereomeren 3,5-Dimethylcyclohexanone das *cis*-Isomere (**27**) durch Kristallisation des Oxims rein erhalten und seine Konfiguration bestimmen konnte [26]. Bei unseren Versuchen erwies sich das Oxim mit Smp. 72° durch Kapillar-GC. als völlig einheitlich, dagegen wurde das isomere *trans*-3,5-Dimethylcyclohexanonoxim aus den öligen Mutterlaugen nicht rein erhalten. Auch im besten Fall enthielt es gemäss GC. noch ca. 40% des *cis*-Isomeren.

Das aus dem kristallinen Oxim regenerierte einheitliche Keton gab bei der Reduktion mit LiAlH_4 erwartungsgemäss ein Gemisch von zwei diastereomeren

**31**

Alkoholen, von denen das Hauptprodukt (ca. 85%) gemäss $^1\text{H-NMR}$ die Hydroxygruppe in *cis*-Stellung zu den beiden Methylgruppen trägt (3,60 ppm, $t \times t$, $J_1 = 10,5$; $J_2 = 4,5$ für ein axiales Proton). Das Nebenprodukt (ca. 15%) gibt dagegen für H-C(1) ein Multiplett bei 4,13 ppm mit nur kleinen Kopplungskonstanten.

Die Oxidation von **27** mit Salpetersäure gab ein flüssiges Gemisch von Dicarbonsäuren, das mit Diazomethan verestert wurde. Gemäss Kapillar-GC. enthielt das Gemisch neben ca. 75% 2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylester (**2**; t_R 7,0 Min.) noch ca. 15% *meso*-2,4-Dimethylglutarsäure-dimethylester (t_R 4,1 Min.) und 7% Methylbernsteinsäure-dimethylester (t_R 2,4 Min.). Die Isolierung des reinen Esters **2** gelang durch präp. GC. Die Eigenschaften des synthetischen Präparats stimmten in allen Einzelheiten mit denen des Abbauproduktes überein und legen damit dessen relative Konfiguration und indirekt diejenige aller homologen Abbauester **2** bis **7** fest.

Der 2,4-Dimethylnonandisäure-dimethylester (**5**) wurde synthetisch als Gemisch der beiden Diastereomeren hergestellt. Das Lacton **18** konnte über das Natriumsalz in die entsprechende Hydroxysäure übergeführt, diese mit Diazomethan in den 2,4-Dimethyl-5-hydroxyvaleriansäuremethylester (**29**) und letzterer mit Pyridinium-chlorochromat in den Aldehyd **30** übergeführt werden. Die Kettenverlängerung um vier C-Atome wurde mittels einer *Wittig*-Reaktion durchgeführt und gab einen 2,4-Dimethyl-5-nonendisäure-dimethylester (**31**), der nicht nur in bezug auf die Doppelbindung, sondern auch hinsichtlich der Konfiguration an C(2) und C(4) ein Diastereomerengemisch war, unabhängig davon, ob für die *Wittig*-Reaktion stereochemisch nahezu einheitlicher 2(*R,R*),4(*S,R*)-2,4-Dimethylglutaraldehydsäure-methylester (**30**) (aus einheitlichem *meso*-2,4-Dimethylglutarsäureanhydrid) oder ein Diastereomerengemisch von **30** eingesetzt wurde. Die Hydrierung der Doppelbindung gab den Abbauester **5** im Gemisch mit seinem Diastereomeren. Gas-Chromatographisch stimmte das Isomere mit t_R 42 Min. mit dem Abbauprodukt **5** überein. Ein dem anderen Isomeren entsprechender Pik (t_R 46,2 Min.) konnte im rohen Abbaugemisch von Niphimycin nicht gefunden werden. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Syntheseproduktes waren die Signale der C-Methylgruppen beider Isomere mit leicht verschiedener chemischer Verschiebung zu erkennen, während das reine Abbauprodukt auch spektroskopisch einheitlich war.

Der Isoxazol-3,5-dicarbonsäure-dimethylester (**16**) wurde in Analogie zu einem Verfahren von Kaplan & Shechter [21] aus Nitroessigsäure-methylester und Propiolsäuremethylester hergestellt. Er stimmte nach GC. und den spektroskopischen Eigenschaften mit dem Abbauprodukt **16** überein. Analog wurde aus Methylpropiolsäuremethylester [27] und Nitroessigsäure-methylester der 5-Methylisoxazol-3,4-dicarbonsäure-dimethylester (**32**) erhalten, der vom Abbauprodukt **17** eindeutig verschieden war.

E) Zusammenfassung. – Wenn auch diese ersten Abbauversuche nur ein sehr vages Bild der Struktur von Niphimycin I und Copiamycin A geben, beweisen sie doch die sehr nahe strukturelle Verwandtschaft dieser beiden Antibiotica und geben weitere Hinweise auf ihre Zugehörigkeit zu den Makroliden, denn alle identifizierten Abbauprodukte, insbesondere auch diejenigen mit mehrfach ver-

zweigter Kohlenstoffkette, sind im Einklang mit einem gemischten Polyketid-Aufbau aus Acetat- und Propionat-Einheiten, der für die meisten Makrolide so typisch ist [24].

Weitere Versuche zur Strukturaufklärung von Niphimycin I und Copiamycin A sind im Gange (s. [10]).

Die Mikroanalysen verdanken wir den Herren *W.* und *D. Manser* (mikroanalytisches Laboratorium der ETH Zürich), die IR.- und NMR.-Spektren unserer instrumentalanalytischen Abteilung (Leitung Herr Prof. *J. F. M. Oth*) und die Massenspektren Herrn Prof. *J. Seibl*.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. – Dünnschichtchromatographie (DC.): Fertigplatten *Merck F₂₅₄* (Kieselgel) oder Celluloseplatten *G 1440* von *Schleicher & Schüll*; Auf Kieselgel Entwicklung mit Joddampf oder Besprühen mit konz. H₂SO₄ und Erhitzen auf der Heizplatte. – Tröpfchen-Gegenstromchromatographie (DCC.): Gerät von *Rikakikai*, Modell *DCC-A*; 300 Trennsäulen, 2 mm × 40 cm. Präparative GC.: *Varian Aerograph 90 P* mit *SE-30*-Kolonnen 3,4 m × 7 mm. – Opt. Drehungen ($[\alpha]_D^{25}$): *Perkin-Elmer*-Polarimeter Modell *241*, thermostatiert bei 25°. – UV.-Spektren: *Perkin-Elmer* Modell *402*, Äthylalkohol. $\lambda_{\max}$ in nm (log ϵ). – IR.-Spektren: *Perkin-Elmer*-Spektrometer, Modell *257*; 3proz. Lösung in CHCl₃ oder KBr ($\tilde{\nu}_{\max}$ in cm⁻¹). – ¹H-NMR.: *Varian*-Gerät *HA-100* (100 MHz) oder *Bruker WM-300* (300 MHz) (δ in ppm gegenüber TMS als internem Standard); Spektren in D₂O mit 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäureester. *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *qa* = Quartett, *qi* = Quintuplett, *m* = Multipllett, *br.* = breites, schlecht aufgelöstes Signal. Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. FT.: Aufnahme mit *Fourier*-Transformation bei 100 MHz in CDCl₃. – ¹³C-NMR.: *Varian XL-100* (25,2 MHz) oder *Bruker WM-300* (75 MHz). Multiplizitäten beziehen sich auf *off-resonance*-Spektren, Angaben wie bei ¹H-NMR. (δ in ppm gegenüber TMS); in D₂O wird Dioxan (δ = 67,4) als interne Referenz verwendet. – Massenspektren (MS.): *Hitachi-Perkin-Elmer, RMU-6M* (Intensität in % des Basispiks). FAB-MS.: aufgenommen bei *M-Scan Ltd.*, Buckinghamshire, England. – Kombinierte Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS.): *Carlo-Erba*-Chromatograph, *Fractovap 2150* in Verbindung mit *Varian-Mat 112*; *Pluronic L-64*-Kapillarsäule, 20 m × 0,3 mm; Filmdicke 0,18 µm; Trägergas: He mit Eingangsdruck 0,8 atm. – Kapillar-GC.: *Carlo-Erba-Fractovap G1/450* mit Kapillarsäule *Ucon HB-5100* (20 m × 0,3 mm).

2. Reinigung und Auftrennung von Niphimycin. – Chromatographie an *Sephadex LH-20* (4 × 77 cm; Eluierungsmittel Methanol; Fraktionen à 7,5 ml). Aus 513 mg Handelspräparat wurden folgende Fraktionen erhalten:

Fraktionen	Menge	DC. mit BuOH/AcOH/H ₂ O 67:10:23
45–50	22,3 mg	Rf 0,20/0,23 (IIa und IIβ)
51–53	150,2 mg	Rf 0,20/0,23/0,25/0,27
54–56	268,5 mg	Rf 0,25/0,27 (Ia und Iβ)
57–61	87,1 mg	Rf 0,25/0,27/0,66
62–66	17,6 mg	Rf 0,66–0,8 (biol. unwirksam)

Niphimycin IIa + IIβ. Die Fraktionen 45–50 gaben nach dem Eindampfen i.V. und Trocknen bei 0,05 Torr ein blass gelbliches amorphes Pulver, löslich in Pyridin, DMSO, Methanol und Äthanol, $[\alpha]_D^{25}$ = +38,7° (c = 1,00, CH₃OH). – UV.: 228 S (4,23), 234 (4,25), 240 S (4,14). – IR. (KBr): nahezu deckungsgleich mit dem von Niphimycin Ia (s. unten und Fig. 1). – ¹H-NMR. und ¹³C-NMR.: sehr ähnlich denen von Niphimycin Ia (s. unten). – Nach Mikrotitration mit 0,1N HCl in Methylcellosolve/Wasser 8:2 Äquiv.-Gew. 1470, p*K*_{MCS} 4,74.

C₅₉H₁₀₃N₃O₁₈ · 2 H₂O (1178,48) Ber. C 60,13 H 9,15 N 3,57% Gef. C 59,95 H 8,73 N 3,73%

Tröpfchen-Gegenstromchromatographie (DCC). In $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 35:65:40 (untere Phase stationär) wurden 700 mg Niphimycin I (entsprechend etwa den Fraktionen 54–56 des obigen Chromatogramms) aufgetrennt und Fraktionen à 10 ml (60 Min.) gesammelt und durch DC. geprüft. Die Fraktionen 75–95 gaben beim Eindampfen i.V. 343 mg reine Komponente Ia und die Fraktionen 39–49 139 mg reines Niphimycin Ib. Die Fraktionen 50–74 enthielten ein Gemisch der beiden Komponenten.

Niphimycin Ia. Nach dem Umfällen aus $\text{CH}_3\text{OH}/\text{Aceton}$ farbloses Pulver, löslich etwa wie Niphimycin II (s. oben), Smp. 133–136°, $[\alpha]_D^{25} = +32,75^\circ$ ($c = 1,1$, CH_3OH). Mikrotitration: $\text{pK}_{\text{MCS}} = 5,04$; Äquiv.-Gew. 1217. – UV.: 228 S (4,48), 233 (4,50), 240 S (4,35). – IR. (KBr): s. *Figur 3*. – $^1\text{H-NMR}$. (CD_3OD): s. *Figur 2*. – $^{13}\text{C-NMR}$. (CD_3OD): s. *Figur 1*. – FAB/MS.: Signalgruppe um 1142 mit höchsten Piken bei m/z 1142 und 1143; Fragmente mit m/z 1124 und 1098. – Mol.-Gew. (Dampfdruck-Osmometrie in Äthanol): gef. 1110.

$\text{C}_{59}\text{H}_{103}\text{N}_3\text{O}_{18} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Ber. C 59,22	H 9,18	N 3,51%
(1196,48)	Gef. „ 59,48	„ 8,75	„ 3,56%
	Gef. „ 60,24	„ 8,99	„ 3,66%

Niphimycin Ib. Nach Umfällen aus $\text{CH}_3\text{OH}/\text{Aceton}$ farbloses Pulver, Smp. 132–139°, $[\alpha]_D^{25} = +32,4^\circ$ ($c = 0,9$, CH_3OH). – UV., IR. und $^1\text{H-NMR}$.: nicht unterscheidbar von Niphimycin Ia. $^{13}\text{C-NMR}$. (CD_3OD): s. *Figur 1*. – FAB/MS.: wie Niphimycin Ia.

$\text{C}_{59}\text{H}_{103}\text{N}_3\text{O}_{18} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Ber. C 59,22	H 9,18	N 3,51%
(1196,48)	Gef. „ 59,37	„ 8,86	„ 3,51%

3. Umwandlung von Niphimycin Ia in Ib und umgekehrt. – Eine einproz. Lösung von Niphimycin Ia in CH_3OH wurde 3 Wochen bei RT. aufbewahrt. DC.: Zwei nahezu gleich intensive Flecke mit den Rf-Werten von Niphimycin Ia und Ib, daneben mehrere wesentlich schwächere Flecke mit grösserem Rf-Wert (Zersetzungsprodukte). Ein völlig gleiches Gemisch wurde erhalten, wenn reines Niphimycin Ib in Methanol aufbewahrt wurde.

4. Hydrierung von Ia + Ib zum entsprechenden Octahydroniphimycin-Gemisch. – In 3 ml CH_3OH wurden 30 mg PtO_2 vorhydriert, dann 308 mg Niphimycin I (Gemisch aus Ia und Ib) in 4 ml CH_3OH zugegeben und in einer H_2 -Atmosphäre bis zum Aufhören der H_2 -Aufnahme gerührt (23 ml, ca. 3,6 mol H_2 pro mol Niphimycin). Nach dem Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen wurde mit CH_3OH an *Sephadex LH-20* chromatographiert und das gemäss DC. einheitliche Produkt (Rf 0,21 in $\text{BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ 67:10:23, Kieselgel) nach dem Eindampfen und Trocknen als farbloses amorphes Pulver gewonnen (267 mg). – UV.: kein Maximum oberhalb 210 nm. – IR. (KBr): 1718, 1665, 1640, 1595. – $^1\text{H-NMR}$. (300 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$ nach Austausch mit D_2O): 0,7–0,95 (m , 21 H, 7 CH_3); 1,05 (d , $J = 7$, 3 H, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(2)$); 1,0–1,9 (m , ca. 50 H); 2,50 (m , 2 H); 2,72 (s , 3 H, $\text{H}_3\text{C}-\text{N}$); 3,07 (t , $J = 6$, 2 H, $\text{H}_2\text{C}-\text{N}$); 3,15 (m , 1 H); 3,3–4,1 (m , ca. 12 H); 4,59 (t -ähnlich, $J \approx 4$, $\text{CH}-\text{O}-\text{CO}$); 4,99 ($br. s$, $w_{1/2}$ ca. 20 Hz, $\text{CH}-\text{O}-\text{CO}$). – $^{13}\text{C-NMR}$. (CD_3OD): 10,54 (qa), 11,25 (qa), 13,53 (qa), 14,97 (qa , 2 CH_3), 15,49 (qa), 16,51 (qa), 20,44 (qa), 27–50 (teilweise überlappende Signale von ca. 30 C); 65–82 (überlappende Signale von 12–15 C); 99,4 und 99,6 (s , $\text{O}-\text{C}-\text{O}$ von 2 Diastereomeren); 158,4 (s , Guanidin-C); 171,7 (s); 173,8 (s); 176,8 (s).

$\text{C}_{59}\text{H}_{111}\text{N}_3\text{O}_{18} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Ber. C 58,88	H 9,78	N 3,49%
(1204,55)	Gef. „ 58,89	„ 9,41	„ 3,38%

5. Oxydation von Niphimycin I mit Salpetersäure. – Eine Lösung von 557 mg Niphimycin I ($\alpha + \beta$) in 40 ml konz. Salpetersäure/Wasser 1:1 wurde unter N_2 $4\frac{1}{2}$ Std. unter Rückfluss erhitzt und dann die Salpetersäure i.V. abgetrieben. Der Rückstand (496 mg) wurde in 3 ml CH_3OH gelöst und bei 0° 30 ml ätherische Diazomethanolung zusetztropft. Nach 5 Min. wurde i.V. eingedampft und der Rückstand im Kugelrohr destilliert (1 Torr, bis 120° Badtemp.). Das Destillat (185 mg) enthielt gemäss Kapillar-GC. (*Fig. 5*) über 50 Komponenten. Eine Vortrennung liess sich durch präp. GC. (145°; 30–35 ml $\text{He}/\text{Min.}$) durchführen (s. *Tab. 1*). In vier weiteren Ansätzen wurden noch 1,47 g Niphimycin I in gleicher Weise abgebaut. Die im Kapillar-GC. erkennbaren Pike waren in jedem Fall dieselben, doch schwankten die relativen Intensitäten beträchtlich. Die Auftrennung durch präp. GC. erfolgte wie oben. Für die weitere Bearbeitung wurden einander entsprechende Fraktionen vereinigt.

Fraktion A. Die Identifizierung mit käuflichem Oxalsäure-dimethylester erfolgte durch IR., $^1\text{H-NMR}$., MS. und Kapillar-GC.

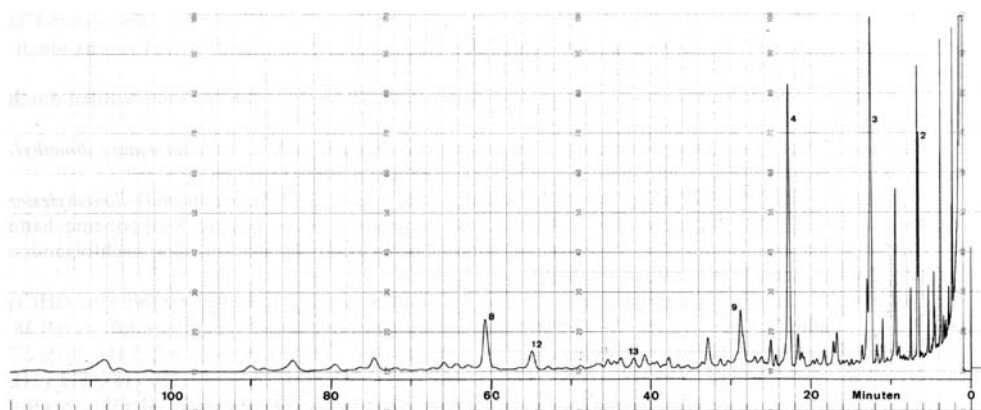


Fig. 5. Kapillar-GC. des Abbaugemisches von Niphimycin I (Ucon HB, 90°)

Fraktion B. Die Identifizierung von *Bernsteinsäure-dimethylester*, *Methylbernsteinsäure-dimethylester* und *2-Methylglutarsäure-dimethylester* erfolgte ohne präp. Auftrennung durch GC./MS. (Vergleich mit käuflichen Proben).

Fraktion C. Die einheitliche Fraktion stimmte nach IR., $^1\text{H-NMR}$. und MS. mit käuflichem *Methylbernsteinsäure-dimethylester* überein.

Fraktion D. Die vereinigten Fraktionen D (49,7 mg) wurden an 2 g Kieselgel (*Merck*, unter 0,08 mm) mit Benzol/ CHCl_3 19:1 chromatographiert und gaben neben Mischfraktionen 8 mg einheitlichen *Äpfelsäure-dimethylester* ($[\alpha]_D^{25} = -0,9^\circ$ ($c = 0,74$, CH_3OH); Identifizierung durch IR., $^1\text{H-NMR}$. und

Tabelle 1. Auftrennung des Estergemisches aus Niphimycin I durch präparative Gas-Chromatographie

Fraktion	Menge (mg)	Rel. Anteil (%)	Anzahl Pike (Kapillar-GC.)	Hauptkomponenten gemäss Kapillar-GC. (t_R in Min. bei 90° rel. Anteil in der Fraktion [%])
A	27,6	34	1	Oxalsäure-dimethylester (1,5/100)
B	2,7	3,4	8	Methylbernsteinsäure-dimethylester (2,4/13) Bernsteinsäure-dimethylester (2,5/13) 2-Methylglutarsäure-dimethylester (3,9/40)
C	0,2	0,2	1	Methylbernsteinsäure-dimethylester (2,4/100)
D	11,5	14	6	Glutarsäure-dimethylester (3,8/4,7) Äpfelsäure-dimethylester (12,6/77)
E	10,3	13	7	Glutarsäure-dimethylester (3,8/5) 3-Methyläpfelsäure-dimethylester (11,1/50) Äpfelsäure-dimethylester (12,6/30)
F	7,7	10	9	Glutarsäure-dimethylester (3,8/22)
G	3,0	4	7	2 (6,6/5); 2-Methyladipinsäure-dimethylester (6,8/50); 3-Methyladipinsäure-dimethylester (7,5/16)
H	0,4	0,5	4	2 (6,6/94)
I	4,3	5	ca. 25	2 (6,6/1,3); 3 (11,8/9)
J	1,9	2,4	1	3 (11,8/100)
K	3,4	4	ca. 15	3 (11,8/8); 4 (22,9/18)
L	2,3	3	4	4 (22,9/94)
M	4,6	6	11	8 (60,7/59)
Total	79,9	100		13 identifizierte Verbindungen

MS., Vergleich mit einer käuflichen Probe). – *Methylbernsteinsäure-* und *Glutarsäure-dimethylester* in der Fraktion D wurden durch Kapillar-GC. und GC./MS. (Vergleich mit käuflichen Proben) identifiziert.

Fraktion E. *Methylbernsteinsäure-, 3-Methyläpfelsäure- und Glutarsäure-dimethylester* wurden durch GC./MS. identifiziert.

Fraktion F. Die Hauptkomponente der Fraktion wurde durch GC./MS. als *Glutarsäure-dimethylester* erkannt. Die acht Nebenkomponten konnten nicht eindeutig erfasst werden.

Fraktion G. Die Identifizierung von *2-Methyladipinsäure-* und *3-Methyladipinsäure-dimethylester* erfolgte durch GC./MS. (Vergleich mit authentischen Präparaten). Eine weitere Komponente hatte die gleiche Retentionszeit wie *2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylester* (2), der aus der nachfolgenden Fraktion H in grösserer Menge isoliert wurde.

Fraktion H. Die Chromatographie von 7,7 mg Rohfraktion an 2 g Kieselgel 60 mit abs. CHCl_3 gab 3,4 mg einheitlichen (2R,4S)-2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylester (2). $[\alpha]_D^{25} = +4,0^\circ$ ($c = 0,38$, CH_3OH). – IR. (CHCl_3): 1730. – $^1\text{H-NMR}$. (FT.): 0,96 (d, $J = 6$, 3 H); 1,16 (d, $J = 7$, 3 H); 0,75–2,7 (m, 6 H); 3,67 (s, 3 H); 3,68 (s, 3 H). – MS.: 171 (5, $M^+ - 31$), 143 (11), 142 (14), 130 (18), 112 (21), 99 (29), 97 (14), 88 (32), 85 (25), 83 (43), 69 (75), 59 (39), 57 (57), 55 (68), 43 (100), 41 (75), 29 (36), 27 (21). – IR., $^1\text{H-NMR}$., MS. und t_R in Übereinstimmung mit synthetischem (2RS,4SR)-2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylester (s. unten).

Die Fraktionen I und K waren zu komplizierte Gemische für eine weitere Auftrennung. Die in Tabelle 1 angegebenen Identifizierungen beruhen auf übereinstimmenden t_R mit Produkten, die aus anderen Fraktionen rein erhalten wurden.

Fraktion J. Die nahezu einheitliche Fraktion (16,3 mg) wurde an 2 g Kieselgel 60 mit Benzol/ CHCl_3 4:1 chromatographiert und gab 7,6 mg einheitlichen (2S,4S)-2,4-Dimethylpimelinsäure-dimethylester (3). $[\alpha]_D^{25} = +10^\circ$ ($c = 0,05$, CH_3OH). – IR. (CHCl_3): 1732. – $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, CDCl_3): 0,91 (d, $J = 6$, 3 H); 1,17 (d, $J = 7$, 3 H); 1,1–1,9 (m, 5 H); 2,34 (t, $J = 8$, 2 H); 2,59 (m, 1 H); 3,69 (s, 6 H). – MS.: 185 (10, $M^+ - 31$), 157 (13), 156 (10), 141 (10), 129 (44), 125 (21), 101 (15), 97 (46), 88 (79), 83 (44), 81 (18), 74 (18), 73 (23), 69 (59), 59 (49), 55 (100), 41 (74), 32 (38), 29 (51), 28 (33). – IR., $^1\text{H-NMR}$., MS. und t_R in Übereinstimmung mit der synthetischen Probe (s. unten).

Fraktion L. Die Rohfraktion (23 mg) gab nach Chromatographie an 2,5 g Kieselgel 60 mit Benzol/ CHCl_3 19:1 8 mg einheitlichen (2S,4S)-2,4-Dimethylkorksäure-dimethylester (4) als farbloses Öl. $[\alpha]_D^{25} = +10^\circ$ ($c = 0,55$, CH_3OH). – IR. (CHCl_3): 1730. – $^1\text{H-NMR}$. (FT.): 0,88 (d, $J = 6$, 3 H); 1,15 (d, $J = 7$, 3 H); 1,0–1,86 (m, 7 H); 2,27 (t, $J = 8$, 2 H); 2,3–2,65 (m, 1 H); 3,64 (s, 6 H). – MS.: 199 (6, $M^+ - 31$), 182 (10), 171 (23), 166 (19), 157 (16), 151 (23), 143 (35), 139 (29), 125 (13), 111 (39), 101 (10), 97 (48), 88 (90), 83 (35), 74 (32), 73 (19), 69 (100), 59 (52), 57 (29), 55 (68), 41 (65), 32 (23), 28 (26).

Fraktion M. Die Hauptkomponente aus 29,5 mg dieser Fraktion wurde ebenfalls durch Chromatographie an 2 g Kieselgel (unter 0,08) mit Benzol/ CHCl_3 19:1 als einheitliches Öl (9,2 mg) gewonnen und erwies sich durch die Spektren als 2-(6'-Methoxycarbonyl-5'-methyl-2'-tetrahydropyranyl)propionsäure-methylester (8). $[\alpha]_D = +6^\circ$ ($c = 0,5$, CH_3OH). – IR. (CHCl_3): 1732. – $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, CDCl_3): s. Figur 4. – MS.: 245 (1, $M^+ + 1$), 212 (13), 194 (26), 185 (26), 166 (10), 157 (13), 153 (45), 144 (26), 129 (61), 125 (58), 114 (13), 112 (23), 107 (29), 101 (65), 97 (52), 88 (26), 85 (26), 82 (39), 69 (98), 59 (65), 55 (100), 43 (26), 41 (97), 29 (90).

6. Oxydation des Octahydroniphimycingemisches mit Salpetersäure. – Die Oxydation von 3,96 g Octahydroniphimycin I (aus einem Gemisch von Ia und Ib) mit 100 ml konz. Salpetersäure/Wasser 1:1 während 4,5 Std. bei 120° unter N_2 gab nach dem Verestern mit Diazomethan 2,91 g rohes Estergemisch und nach der Destillation bei 1 Torr (bis 150°) 1,04 g Destillat. Die Auftrennung durch präp. GC. gab die in der Tabelle 2 zusammengestellten Fraktionen. Ein weiterer Ansatz von 2 g Ausgangsmaterial wurde in gleicher Weise behandelt. Gleichwertige Fraktionen wurden mit denen der Tabelle 2 vereinigt. Nachfolgend werden nur die Befunde angegeben, die gegenüber dem Abbau von Niphimycin I neue Erkenntnisse lieferten.

Fraktion E'. Durch Chromatographie an Kieselgel (unter 0,08) mit Benzol/ CHCl_3 9:1 wurden aus 103 mg Fraktion E' anschliessend an eine Reihe von Mischfraktionen 7,4 mg einer einheitlichen Fraktion eluiert, die durch IR., $^1\text{H-NMR}$. und MS. als 2-Methylglutarsäure-dimethylester identifiziert wurde. Eine spätere Fraktion gab 6,6 mg einheitlichen 3-Methyläpfelsäure-dimethylester, der mit den gleichen Methoden identifiziert wurde ($[\alpha]_D = -4^\circ$ ($c = 0,6$, CH_3OH)).

Tabelle 2. Auftrennung des Estergemisches aus Octahydroniphimycin durch präp. Gas-Chromatographie

Fraktion	Menge (mg)	Rel. Anteil (%)	Anzahl Pike (Kapillar-GC.)	Hauptkomponenten gemäss Kapillar-GC. (t _R in Min./rel. Anteil in der Fraktion [%])
A'	128,4	21,6	2	Oxalsäure-dimethylester (1,5/87)
B'	13,4	2,2	2	Bernsteinsäure-dimethylester (2,5/93)
C'	14,5	2,4	5	Methylbernsteinsäure-dimethylester (2,4/44) Bernsteinsäure-dimethylester (2,5/8)
D'	32,3	5,4	10	2-Methylglutarsäure-dimethylester (3,9/29) Äpfelsäure-dimethylester (12,6/44)
E'	36,1	6,1	7	2-Methylglutarsäure-dimethylester (3,9/49) 2-Methyladipinsäure-dimethylester (6,8/1,2) 3-Methyläpfelsäure-dimethylester (11,1/19) Äpfelsäure-dimethylester (12,6/8)
F'	27,9	4,7	ca. 12	Glutarsäure-dimethylester (3,8/3) 2-Methyladipinsäure-dimethylester (6,8/12) 3-Methyläpfelsäure-dimethylester (11,1/3) 9 (28,8/2); 10 (24,2/10) 2-Methyladipinsäure-dimethylester (6,8/12)
G'	99,6	16,7	11	3-Methyladipinsäure-dimethylester (7,5/12) 9 (28,8/18); 10 (24,2/13); 3-Hydroxy-2-methylglutarsäure-dimethylester (25,0/10)
H'	32,1	5,4	10	2 (6,6/2,5); 9 (28,8/19); 10 (24,2/56); 3-Hydroxy-2-methylglutarsäure-dimethylester (25,0/10)
I'	29,3	5,0	ca. 13	2-Methylpimelinsäure-dimethylester (11,6/31) 11a (41,0/4); 12 (55,0/1); 13 (42,3/20); 16 (37,8/9)
J'	37,5	6,3	ca. 18	3 (11,8/8); 11a (41,0/9); 11b (64,2/2); 12 (55,0/2,5); 13 (42,3/8); 17 (46,4/2)
K'	28,4	4,8	ca. 19	17 (46,4/12)
L'	26,1	4,4	10	2-Methylkorksäure-dimethylester (21,7/8) 4 (22,9/8); 14 (76,8/15)
M'	25,3	4,2	6	4 (22,9/6) sowie vor allem eine nicht identifizierte Verbindung (141,9/79)
N'	43,5	7,3	9	8 sowie ein Diastereomeres von 8 (44,2/3,2 und 60,7/63) 15 (22,3 [120°]/4)
O'	8,8	1,5	7	5 (42,0/32); Isomer von 8 (82,0/25); 15 (22,3 [120°]/8)
P'	10,8	1,8	4	6 (85,3/85)
Q'	1,6	0,3	4	7 (21,6 [120°]/93)
Total	595,6	100		28 identifizierte Verbindungen

Fraktion G'. Chromatographie von 141 mg des Gemisches mit Benzol/CHCl₃ 4:1 gab 7,5 mg einer nahezu einheitlichen Fraktion, woraus durch nochmaliges Chromatographieren 2,5 mg reiner 2-Methyladipinsäure-dimethylester isoliert und durch das ¹H-NMR. (FT.) sowie das MS. identifiziert wurde. Eine spätere Fraktion von 18,4 mg gab nach nochmaligem Chromatographieren 7,4 mg trans-4-Methoxycarbonyl-3-methylbutan-4-olid (**10**) von über 90proz. Reinheit. – IR. (CHCl₃): 1790, 1747. – ¹H-NMR. (FT.): 1,29 (*d*, *J* = 6,5, 3 H); 2,0–2,95 (*m*, 3 H); 3,81 (*s*, 3 H); 4,51 (*d*, *J* = 5, 1 H). – MS.: 158 (14), 101 (12), 100 (78), 99 (100), 98 (24), 89 (30), 72 (26), 71 (49), 69 (33), 59 (39), 55 (29), 53 (21), 45 (18), 44 (20), 43 (37), 42 (36).

IR., ¹H-NMR. und MS. in Übereinstimmung mit einer synthetischen Probe (s. unten).

Fraktion H'. Die vereinigten Fraktionen H' (42,5 mg) wurden an Kieselgel 60 mit Benzol/CHCl₃ 9:1 chromatographiert und gaben zunächst 4,8 mg ca. 80% reines cis-4-Methoxycarbonyl-3-methylbutan-4-olid (**9**). – ¹H-NMR. (FT.): 1,09 (*d*, *J* = 7, 3 H); 2,1–3,1 (*m*, 3 H); 3,81 (*s*, 3 H); 4,91 (*d*, *J* = 8, 1 H) sowie schwache Signale einer Verunreinigung.

Nach t_R und 1H -NMR. Übereinstimmung mit einer synthetischen Probe (s. unten).

Nach der Eluierung von **9** wurde noch eine einheitliche Fraktion von 1,1 mg erhalten, gemäss den Spektren *3-Hydroxy-2-methylglutarsäure-dimethylester*. – 1H -NMR. (FT.): 1,21 (*d*, $J=7,5$, 3 H); 2,45–2,8 (*m*, 3 H); 3,26 (*br.*, 1 H); 3,72 (*s*, 6 H); 4,20 (*m*, 1 H). – MS.: 159 (7), 141 (86), 130 (38), 117 (71), 113 (48), 103 (81), 89 (24), 88 (52), 87 (29), 85 (86), 81 (14), 74 (36), 71 (90), 61 (50), 59 (57), 57 (48), 56 (71), 55 (29), 32 (90), 29 (100).

Fraktion J'. Chromatographie von 70,6 mg Gemisch an Kieselgel 60 mit Benzol/ $CHCl_3$ 9:1 gab in einer frühen Fraktion 2,5 mg einheitlichen *4,4-Dinitrovaleriansäure-methylester* (**13**). – IR. ($CHCl_3$): 1744. – 1H -NMR. (FT.): 2,14 (*s*, 3 H); 2,36–3,0 (*m*, 4 H); 3,72 (*s*, 3 H). – MS.: 175 (95, $M^+ - 31$), 129 (57), 127 (50), 113 (36), 99 (91), 88 (19), 85 (33), 71 (33), 59 (62), 57 (16), 55 (57), 53 (50), 44 (14), 43 (100).

Nach t_R , IR., 1H -NMR. und MS. Übereinstimmung mit der synthetischen Probe (s. unten).

Ein folgendes Eluat enthielt 0,5 mg einheitlichen *Isoxazol-3,5-dicarbonsäure-dimethylester* (**16**). – IR. ($CHCl_3$): 1748, 1603, 1589, 1471. – 1H -NMR. (FT.): 4,00 (*s*, 3 H); 4,01 (*s*, 3 H); 7,31 (*s*, 1 H). – MS.: 185 (11), 155 (4), 154 (37), 82 (25), 68 (6), 67 (9), 59 (100), 39 (10), 29 (6), 28 (6), 27 (5).

Übereinstimmung in den Spektren und t_R mit der synthetischen Probe (s. unten).

Eine weitere Fraktion von 4,2 mg erwies sich durch IR., 1H -NMR., MS. und t_R als reiner *2-Methylpimelinsäure-dimethylester*.

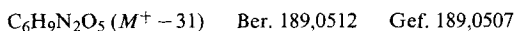
Gleich folgend wurden 0,7 mg einer einheitlichen Verbindung eluiert, die aufgrund der Spektren *5-Methoxycarbonyl-hexan-4-olid* (**11a**) ist. – IR. ($CHCl_3$): 1781, 1738. – 1H -NMR. (FT.): 1,26 (*d*, $J=6$, 3 H); 1,8–2,9 (*m*, 5 H); 3,73 (*s*, 3 H); 4,64 (*d* × *t*, $J_1=8$, $J_2=7,5$, 1 H). – MS.: 144 (4, $M^+ - 28$), 141 (10), 113 (4), 99 (5), 88 (20), 86 (5), 85 (100), 83 (14), 69 (6), 59 (5), 47 (14), 56 (10), 55 (7), 43 (6), 41 (10), 29 (28), 28 (10), 27 (10).

Das letzte einheitliche Produkt aus diesem Chromatogramm (2,4 mg) war aufgrund der Spektren *5-Methoxycarbonyl-3-methyl-pentan-4-olid* (**12**). – IR. ($CHCl_3$): 1780, 1735. – 1H -NMR. (FT.): 1,18 (*d*, $J=6$, 3 H); 2,05–2,9 (*m*, 5 H); 3,73 (*s*, 3 H); 4,48 (*qa*, $J=7$, 1 H). – MS.: 154 (23, $M^+ - 18$), 142 (15), 130 (23), 103 (30), 99 (100), 85 (14), 83 (21), 74 (18), 71 (54), 70 (14), 69 (22), 59 (14), 43 (52), 42 (64), 41 (40), 39 (20), 27 (15).

Fraktion J'. Die Chromatographie an Kieselgel 60 mit Benzol/ $CHCl_3$ 9:1 gab zunächst 4,8 mg eines Gemisches, aus dem durch nochmaliges Chromatographieren 2 mg einheitliches Produkt erhalten wurde, das mit der Verbindung **12** (s. oben) identisch war. Eine weitere einheitliche Verbindung (5,1 mg) wurde anschliessend eluiert. Sie stimmte in der Kapillar-GC. mit dem Produkt **11a** nicht überein, obwohl die Spektren sehr ähnlich waren. Es handelt sich um das Diastereomere **11b** von *5-Methoxycarbonyl-hexan-4-olid*. – IR. ($CHCl_3$): 1773, 1735. – 1H -NMR. (100 MHz, $CDCl_3$): 1,20 (*d*, $J=7$, 3 H); 1,8–3,0 (*m*, 5 H); 3,73 (*s*, 3 H); 4,72 (*qa*, $J=8$, 1 H). – MS.: 172 (1), 144 (5), 141 (11), 130 (7), 113 (5), 99 (8), 88 (31), 86 (6), 85 (100), 83 (9), 71 (6), 69 (9), 59 (7), 57 (16), 56 (12), 55 (9), 43 (9), 42 (9), 41 (13), 29 (23), 28 (11), 27 (12).

Fraktion K'. Die Chromatographie an Kieselgel 60 mit Benzol/ $CHCl_3$ 9:1 (Kolonnen $0,5 \times 30$ cm) gab neben Mischfraktionen 0,5 mg einer einheitlichen Verbindung [IR. ($CHCl_3$): 1740. – 1H -NMR. (FT.): 2,52 (*s*, 3 H); 4,00 (*s*, 6 H). – MS.: 199 (3), 168 (32), 167 (15), 140 (16), 112 (35), 96 (32), 80 (15), 59 (100), 52 (15), 42 (18), 28 (24)]. Das 1H -NMR. stimmt nicht überein mit denen von *3-Methylisoxazol-4,5-dicarbonsäure-dimethylester* [23] und *5-Methylisoxazol-3,4-dicarbonsäure-dimethylester* (**32**, s. unten). Es handelt sich um *4-Methylisoxazol-3,5-dicarbonsäure-dimethylester* (**17**).

Fraktion L'. Durch Chromatographie an Kieselgel 60 (Kolonnen $0,5 \times 34$ cm) wurden neben Mischfraktionen 1,5 mg einheitlicher *5,5-Dinitrocapronsäure-methylester* (**14**) erhalten. – IR. ($CHCl_3$): 1745, 1578, 1445, 1400, 1332. – 1H -NMR. (FT.): 1,4–1,9 (*m*, 2 H); 2,15 (*s*, 3 H); 2,35–2,7 (*m*, 4 H); 3,71 (*s*, 3 H). – MS.: 189 (82, $M^+ - 31$), 142 (91), 115 (33), 113 (15), 112 (20), 96 (16), 95 (21), 85 (100), 82 (25), 74 (20), 69 (15), 67 (48), 59 (64), 55 (50), 44 (22), 43 (93), 41 (45), 39 (32).



Spätere Eluate des gleichen Chromatogramms gaben 3,3 mg zu 75% reinen *2-Methylkorksäure-dimethylester*. Das Präparat enthielt gemäss Kapillar-GC. noch 15% *2,4-Dimethylkorksäure-dimethylester* (**3**) sowie mehrere geringfügige Verunreinigungen (unter 5%). Trotzdem stimmte das IR. praktisch vollständig mit dem der Vergleichsprobe überein. Die Signale der Hauptkomponente im 1H -NMR. und im MS. stimmten überein mit denen von authentischem *2-Methylkorksäure-dimethylester*.

Die *Fraktion M'* gab an Kieselgel keine einheitlichen identifizierbaren Verbindungen.

Fraktion N'. Chromatographie an Kieselgel 60 mit Benzol/CHCl₃ 9:1 gab aus 69 mg Fraktion N' 7,7 mg einheitliches Produkt, das in allen Eigenschaften mit der Verbindung **8** aus dem Abbau von Niphimycin übereinstimmte (s. oben). Darauf folgende Fraktionen gaben 1,7 mg einer Verbindung, deren Spektren mit denen von **8** nahe verwandt waren, die aber bei der Kapillar-GC. eine deutlich kleinere t_R besitzt (44,2 gegenüber 60,7 Min.). Es handelt sich offensichtlich um ein Diastereomer von **8**. – IR. (CHCl₃): 1735. – ¹H-NMR. (FT.): 0,93 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,14 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,26–1,95 (*m*, 4 H); 2,0–2,35 (*m*, 1 H); 2,76 (*qa*, *J* = 7, 1 H); 3,70 (*s*, 3 H); 3,72 (*s*, 3 H); 4,14 (*d*, *J* = 2,5, 1 H).

Eine dritte Verbindung aus dieser Fraktion wurde in einer Menge von 1,5 mg rein erhalten und erwies sich durch die Spektren als 6,6-Dinitro α -naphthol-säure-methylester (**15**). – IR. (CHCl₃): 1735, 1570, 1441, 1395, 1369, 1330. – ¹H-NMR. (FT.): 1,14–1,9 (*m*, 4 H); 2,12 (*s*, 3 H); 2,22–2,63 (*m*, 4 H); 3,68 (*s*, 3 H). – ¹³C-NMR. (25 MHz, CDCl₃): 21,89, 23,13, 24,15, 33,15, 36,19, 51,61, 75,59. Wegen der geringen Menge konnte kein off-resonance-Spektrum aufgenommen werden; ebenso wurde das Carbonylsignal von Rauschsignalen übertönt. – MS.: 203 (86, *M*⁺ – 31), 156 (22), 129 (20), 109 (29), 99 (18), 85 (100), 83 (53), 81 (85), 74 (43), 67 (29), 59 (45), 55 (45), 44 (37), 43 (93), 41 (61), 39 (26).

C₇H₁₁N₂O₅ (*M*⁺ – 31) Ber. 203,0668 Gef. 203,0667

Fraktion O'. Die Auftrennung an Kieselgel 60 mit Benzol/CHCl₃ 9:1 (Kolonnen 0,5 × 23 cm) gab aus 34,5 g Rohfraktion zunächst 5,1 mg (2*S*,4*S*)-2,4-Dimethylnonansäure-dimethylester (**5**), Kapillar-GC.: einheitlich, Übereinstimmung mit einer Komponente des synthetischen Gemisches (s. unten), $[\alpha]_D^{25} = +8^\circ$ (*c* = 0,5, CH₃OH). – IR. (CHCl₃): 1723. – ¹H-NMR. (FT.): 0,86 (*d*, *J* = 6, 3 H); 1,14 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,02–1,85 (*m*, 9 H); 2,31 (*t*, *J* = 7, 2 H); 2,36–2,68 (*m*, 1 H); 3,66 (*s*, 6 H). – MS.: 213 (7, *M*⁺ – 31), 185 (17), 180 (25), 157 (33), 153 (15), 129 (11), 125 (38), 112 (12), 111 (18), 101 (18), 97 (28), 88 (100), 87 (16), 85 (12), 83 (33), 74 (12), 73 (13), 69 (48), 59 (31), 57 (14), 55 (48), 43 (16), 41 (33), 29 (12). – IR. und MS. fast deckungsgleich mit denen des synthetischen Diastereomeren-gemisches.

Anschliessend wurden 2,2 mg eines weiteren Diastereomeren von **8** mit höherer t_R in reiner Form eluiert. – IR. (CHCl₃): 1739. – ¹H-NMR. (FT.): 0,93 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,14 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,3–1,95 (*m*, 4 H); 2,02–2,35 (*m*, 1 H); 2,74 (*qa*, *J* = 7, 1 H); 3,5–4,1 (*m*, 1 H); 3,70 (*s*, 3 H); 3,72 (*s*, 3 H); 4,14 (*d*, *J* = 2,5, 1 H).

Nach einer Reihe von Mischfraktionen wurden noch 0,7 mg eines einheitlichen Produktes isoliert, das aufgrund der Spektren wahrscheinlich ein 2-Hydroxy-7-methylkorksäure-dimethylester ist. – IR. (CHCl₃): 3600, 3520, 1730. – ¹H-NMR. (FT.): 1,14 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,03–1,94 (*m*, 8 H); 2,36 (*m*, 1 H); 2,70 (*br. d*, 1 OH); 3,67 (*s*, 3 H); 3,79 (*s*, 3 H); 4,18 (*m*, 1 H). – MS.: 201 (3, *M*⁺ – 31), 173 (22), 142 (10), 141 (100), 113 (33), 101 (10), 95 (95), 90 (11), 88 (36), 85 (18), 83 (15), 71 (10), 69 (38), 59 (23), 57 (27), 55 (27), 45 (13), 43 (25), 41 (31), 29 (16).

Fraktion P'. Aus 22,6 mg der nahezu einheitlichen Fraktion wurden an Kieselgel mit Benzol/CHCl₃ 9:1 9,6 mg reiner (2*S*,4*S*)-2,4-Dimethyldecandisäure-dimethylester (**6**) erhalten, $[\alpha]_D^{25} = +8^\circ$ (*c* = 0,9, CH₃OH). – IR. (CHCl₃): 1731. – ¹H-NMR. (100 MHz, CDCl₃): 0,87 (*d*, *J* = 6, 3 H); 1,14 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,0–1,9 (*m*, 11 H); 2,31 (*t*, *J* = 7, 2 H); 2,36–2,76 (*m*, 1 H); 3,64 (*s*, 6 H). – MS.: 227 (10, *M*⁺ – 31), 199 (14), 171 (43), 167 (10), 139 (33), 129 (10), 126 (18), 125 (10), 112 (10), 111 (10), 101 (17), 97 (25), 88 (100), 83 (22), 74 (11), 73 (11), 69 (44), 59 (24), 55 (53), 43 (22), 41 (42), 29 (14).

Fraktion Q'. Aus 9,8 mg der fast einheitlichen Fraktion wurden durch Chromatographie 8,2 mg reiner (2*S*,4*S*)-2,4-Dimethylundecandisäure-dimethylester (**7**) erhalten, $[\alpha]_D^{25} = +11^\circ$ (*c* = 0,8, CH₃OH). – IR. (CHCl₃): 1730. – ¹H-NMR. (100 MHz, CDCl₃): 0,87 (*d*, *J* = 6, 3 H); 1,14 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,0–1,9 (*m*, 13 H); 2,31 (*t*, *J* = 7, 2 H); 2,35–2,7 (*m*, 1 H); 3,65 (*s*, 6 H). – MS.: 241 (4, *M*⁺ – 31), 213 (13), 185 (25), 153 (19), 129 (13), 126 (27), 112 (15), 111 (13), 101 (19), 98 (13), 97 (27), 88 (100), 87 (15), 83 (21), 74 (15), 73 (13), 69 (48), 59 (25), 57 (13), 55 (44), 43 (19), 41 (35), 29 (15).

7. Abbau weiterer Antibiotica mit Salpetersäure. – Abbau von reinem Niphimycin Ia. In 2,5 ml konz. Salpetersäure/Wasser 1:1 wurden 15,6 mg Niphimycin Ia 4,5 Std. unter N₂ erhitzt und das Rohprodukt mit Diazomethan verestert. Nach der Destillation i.HV. (Kugelrohr) zeigte das Kapillar-GC. (90°) die gleichen Produkte, die auch aus dem Gemisch Ia + Ib erhalten worden waren, in leicht veränderten Mengenverhältnissen. Insbesondere traten die kleineren Abbauprodukte (t_R unter 10 Min.) deutlich zurück.

Abbau von Niphimycin IIa + IIb. In gleicher Weise wurden 17,5 mg Niphimycin-II-Gemisch oxydiert und derivatisiert. Praktisch alle Abbauprodukte von Niphimycin I waren im Kapillar-GC. wieder nachweisbar.

Abbau von Copiamycin A. In gleicher Weise wurden 15 mg Copiamycin A oxydiert und die Produkte nach der Veresterung mit Kapillar-GC. untersucht. Das GC. war praktisch identisch mit demjenigen der Abbauprodukte von Niphimycin I. Insbesondere konnten durch Misch-GC. mit authentischen Proben folgende Produkte nachgewiesen werden (in Klammer t_R): Methylbernsteinsäure-dimethylester (1,8), Bernsteinsäure-dimethylester (1,9), 2-Methylglutarsäure-dimethylester (3,0), **2** (4,8), 2-Methyladipinsäure-dimethylester (5,0), 3-Methyladipinsäure-dimethylester (5,5), 3-Methyläpfelsäure-dimethylester (8,1), **3** (9,1), Äpfelsäure-dimethylester (9,5), **4** (16,4), **8** (43,0)⁶).

8. Herstellung von Vergleichspräparaten. – 8.1. *Herstellung von (2RS,4SR)-2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylester.* – 8.1.1. *Herstellung von cis-3,5-Dimethylcyclohexanon (27).* Das aus dem 3,5-Dimethylcyclohexanon-Diastereomerengemisch bereitete Oxim [26] wurde mehrmals aus Petroläther umkristallisiert (Smp. 73°) und enthielt darnach gemäss Kapillar-GC. kein *trans*-Isomeres mehr. Die öligen Mutterlaugen bestanden gemäss GC. aus ca. 40% *cis*- und 60% *trans*-3,5-Dimethylcyclohexanonoxim. Aus 5,06 g krist. Oxim wurde mit 100 ml siedender 20proz. Salzsäure unter gleichzeitiger Wasserdampfdistillation das Keton freigesetzt und aus dem Destillat (ca. 1 l) mit Äther extrahiert. Nach dem Trocknen mit $MgSO_4$ und Eindampfen i.V. wurde das Keton im Kugelrohr bei einer Ofentemperatur von 45° (0,15 Torr) destilliert: Ausbeute 3,68 g (81%) farblose Flüssigkeit, gemäss Kapillar-GC. einheitlich. – IR. ($CHCl_3$): 1710. – 1H -NMR. (100 MHz, $CDCl_3$): 1,03 (*d*, $J=6$, 6 H); 1,6–2,6 (*m*, 8 H).

$C_8H_{14}O$ (126,19) Ber. C 76,14 H 11,18% Gef. C 75,96 H 11,19%

8.1.2. *Herstellung von cis-3,5-Dimethylcyclohexanol (Diastereomerengemisch).* Eine Probe des Ketons (317 mg) gab bei der Reduktion mit $LiAlH_4$ in abs. Äther (1 Std. Rückfluss) 241 mg Alkohol-Diastereomerengemisch (**28** + (*r*-1, *t*-3, *t*-5-Dimethylcyclohexanol)) (destilliert im Kugelrohr bei 60°/0,15 Torr), das gemäss Kapillar-GC. ein Gemisch von zwei Komponenten war, Verhältnis ca. 85:15. – 1H -NMR. (100 MHz, $CDCl_3$): 0,93 (*d*, $J=6$, 6 H); 0,5–2,3 (*m*, 9 H, davon 1 austauschbar); 3,6 (*t* × *t*, $J_1=10,5$; $J_2=4,5$; 1 H); die Nebenkompente (ca. 15%) gibt bei 4,14 ppm ein quintuplett-ähnliches Multiplett für $H-C(1)$ mit $J \approx 1,5$.

$C_8H_{16}O$ (128,21) Ber. C 74,94 H 12,58% Gef. C 74,69 H 12,62%

8.1.3. *Herstellung von (2RS,4SR)-2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylester (2).* Zu 10 ml 40proz. Salpetersäure wurden bei 100° 271 mg **27** (einheitliches *cis*-Isomeres) getropft. Nach 15 Min. wurde i.V. eingedampft und der Rückstand mehrmals in wenig Wasser gelöst und wieder eingedampft. Das in 2 ml CH_3OH gelöste Rohprodukt wurde bei RT. mit ätherischer Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach dem Eindampfen setzte sich der Rückstand (344 mg) gemäss Kapillar-GC. aus ca. 75% diastereomerenfreiem Ester **2** ($t_R=7,0$ bei 90°), 15% *meso*-2,4-Dimethylglutarsäure-dimethylester ($t_R=4,1$), 7% Methylbernsteinsäure-dimethylester ($t_R=2,4$) und Spuren weiterer Verunreinigungen zusammen. Die reine Hauptkomponente wurde durch präp. GC. in einer Menge von 143 mg als farbloses Öl isoliert. Kapillar-GC.: einheitlich, im Mischchromatogramm vom Abbauprodukt **2** nicht unterscheidbar. – IR., 1H -NMR. und MS. wie das Abbauprodukt **2**.

$C_{10}H_{18}O_4$ (202,24) Ber. C 59,38 H 8,97% Gef. C 59,28 H 8,84%

Ein aus 2,4-Dimethyl-5-bromvaleriansäure-methylester (**20**) [25] über das Nitril **24** und die Dicarbonsäure **25** in üblicher Weise bereiteter 2,4-Dimethyladipinsäure-dimethylester **26** erwies sich bei der Kapillar-GC. als Gemisch von **2** ($t_R=6,6$) und seinem Diastereomeren ($t_R=12,3$). Der erste Pik stimmte im Misch-GC. mit dem Abbauprodukt **2** überein. IR. und MS. kaum unterscheidbar von denen des Abbauproduktes **2**. – 1H -NMR. (100 MHz, $CDCl_3$): 0,91 (*d*, $J=6$, ca. 1,5 H); 0,94 (*d*, $J=6$, ca. 1,5 H); 1,15 (*d*, $J=7$, 3 H); 1,04–2,62 (*m*, 6 H); 3,62 (*s*, 6 H).

8.2. *Herstellung von (2RS,4RS)-2,4-Dimethylpimelinsäure-dimethylester.* Zu einer heissen Lösung von 1 g Natrium in 20 ml abs. CH_3OH und 7,0 g Malonsäure-dimethylester wurden langsam 3,0 g Bromid **20** [25] getropft und nach 22 Std. Erhitzen unter Rückfluss die Lösung auf Eis gegossen. Nach dem Ausziehen mit Äther, Waschen (Wasser), Trocknen ($MgSO_4$) und Eindampfen wurde der Rückstand destilliert (109°/0,5 Torr) und das Destillat mit 10 g KOH in 100 ml Äthanol/Wasser 1:1 22 Std.

⁶) Dieses GC. wurde wesentlich später als die oben beschriebenen mit einer neuen Kapillarsäule aufgenommen, woraus sich die Unterschiede in t_R erklären.

unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Neutralisieren mit Salzsäure und Eindampfen i.V. wurde der salzartige Rückstand mehrmals mit Äther ausgezogen, der Extrakt durch *Celite* filtriert und wieder eingedampft. Anschliessend wurde während 1 Std. bei 180° decarboxyliert und das rohe Dicarbonsäuregemisch einer *Craig*-Verteilung über 2000 Stufen unterzogen; Apparatur mit 200 Gläsern, 10 Umläufe; Lösungsmittelsystem: MeOH/H₂O/AcOEt/Petroläther (40–70°) 2:4:3:3. Die Prüfung einzelner Fraktionen erfolgte durch Entnahme kleiner Proben, Veresterung mit Diazomethan und Kapillar-GC. In den Gläsern 0–40 war eine Komponente angereichert, die einen Methylester mit $t_R = 11,8$ gab, der mit dem Abbauprodukt **3** identisch war.

Die durch Eindampfen dieser Fraktionen gewonnene Säure (1,3 g) wurde erneut über 3000 Stufen im gleichen Lösungsmittelsystem verteilt und gab aus den einheitlichen Fraktionen 385 mg der flüssigen (2*RS*,4*RS*)-2,4-dimethylpimelinsäure (**21**), die gemäss Analyse und ¹H-NMR. *ca.* 1 mol CH₃OH enthält. – IR. (CHCl₃): 1708. – ¹H-NMR. (100 MHz, CDCl₃): 0,94 (*d*, *J* = 6, 3 H); 1,20 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,3–2,0 (*m*, 4 H); 2,25–2,85 (*m*, 3 H); 3,49 (*s*, 3 H). – MS.: u.a. 171 (7, *M*⁺ – 17), 152 (10), 142 (14), 129 (21), 124 (7), 115 (62), 111 (14), 101 (14), 32 (34), 31 (100).

C₉H₁₆O₄ · CH₃OH (220,26) Ber. C 54,54 H 9,09% Gef. C 54,54 H 9,02%

Der mit Diazomethan in Äther bereitete (2*RS*,4*RS*)-2,4-Dimethylpimelinsäure-dimethylester war nach dem Destillieren im Kugelrohr (76°/0,02 Torr) ein farbloses Öl. – IR., ¹H-NMR., MS. und t_R wie das Abbauprodukt **3**.

Aus den Gläsern 166–200 der ersten *Craig*-Verteilung wurde 1 g Säure erhalten, in der die Dicarbonsäure **22** stark angereichert war (t_R des Methylesters = 13,1, verschieden vom Abbauprodukt **3**). Nochmaliges Verteilen im gleichen Lösungsmittelsystem über 3000 Stufen gab 372 mg einheitliche Säure **22**, nach Umkristallisieren aus Äther/Petroläther farblose Kristalle, Smp. 68°. – IR. (CHCl₃): 1710. – ¹H-NMR. (100 MHz, CDCl₃): 0,93 (*d*, *J* = 6, 3 H); 1,19 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,06–2,04 (*m*, 5 H); 2,40 (*t*, *J* = 7, 2 H); 2,4–2,9 (*m*, 1 H); 10,79 (*br.*, 2 H). – MS. ähnlich **21** ohne die Pike bei *m/z* 32 und 31.

C₉H₁₆O₄ (188,22) Ber. C 57,43 H 8,75 Gef. C 57,31 H 8,50%

Der mit Diazomethan bereitete (2*RS*,4*SR*)-2,4-dimethylpimelinsäure-dimethylester (**23**) war nach Kapillar-GC. verschieden vom Abbauprodukt **3**. Deutliche Unterschiede waren auch im ¹H-NMR. zu erkennen: 0,89 (schlecht aufgelöstes *d*, 3 H); 1,13 (*d*, *J* = 7, 3 H); 1,2–1,9 (*m*, 5 H); 2,2–2,7 (*m*, 3 H); 3,69 (*s*, 6 H). – MS. wie **3**.

8.3. Herstellung von 2,4-Dimethylnonansäure-dimethylester (**5**). – 8.3.1. Herstellung von 2,4-Dimethyl-5-hydroxyvaleriansäure-dimethylester (**29**). Eine Lösung von 5 g 2,4-Dimethyl-5-hydroxyvaleriansäure-lacton (**18**) [25] in 25 ml 2*N* NaOH wurde 1 Std. unter Rückfluss erhitzt. Unter Eiskühlung wurde langsam mit verd. Salzsäure angesäuert (pH 3–3,5), mit Äther in der Kälte ausgezogen und mit Diazomethan in Äther bei 0° verestert. Nach dem Eindampfen i.V. wurden 5,23 g Methylester **29** als farbloses Öl erhalten. Kapillar-GC.: 2 Diastereomere mit t_R 7,6 und 8,2 (90°); weniger als 1% flüchtige Verunreinigungen. – IR. (CHCl₃): 3600, 3200–3550 (*br.*), 1730. – ¹H-NMR. (100 MHz, CDCl₃): 0,90 und 0,95 (je *d*, *J* = 7, zusammen 3 H); 1,10 und 1,15 (je *d*, *J* = 7, zusammen 3 H); 1,2–2,0 (*m*, 3 H); 1,85 (*s*, 1 H, mit D₂O austauschbar); 2,5 (*m*, 1 H); 3,40 und 3,41 (je *d*, *J* = 6, zusammen 2 H); 3,60 (*s*, 3 H).

8.3.2. Herstellung von 2,4-Dimethylglutaraldehydsäure-methylester (**30**). Zu einer Suspension von 9,58 g Pyridiniumchlorochromat in 50 ml CH₂Cl₂ wurden unter Ar 4,76 g Methylester **29** in 30 ml CH₂Cl₂ gegeben. Nach 2 Std. Rühren bei RT. wurden 200 ml abs. Äther zugefügt und vom teerartigen Niederschlag abdekantiert. Der Rückstand wurde noch 3mal mit Äther ausgezogen und die vereinigten Ätherphasen durch *ca.* 40 g Kieselgel filtriert und i.V. eingedampft. Eine Probe für die Spektren wurde im Kugelrohr bei 40°/0,2 Torr destilliert. – IR. (CHCl₃): 2720, 1730. – ¹H-NMR. (100 MHz, CDCl₃): 1,10 und 1,11 (je *d*, *J* = 7, zusammen 3 H); 1,15 und 1,16 (je *d*, *J* = 7, zusammen 3 H); 0,9–1,9 (*m*, 2 H); 2,0–2,7 (*m*, 2 H); 3,65 (*s*, 3 H); 9,55 und 9,56 (je *d*, *J* = 2, zusammen 1 H).

8.3.3. Herstellung von 2,4-Dimethyl-5-nonendisäure-dimethylester (**31**). In einem Zweihalskolben wurden 2,05 g CH₃ONa unter Ar vorgelegt und rasch 21,03 g 4-Triphenyl[3-(methoxycarbonyl)propyl]-phosphoniumbromid in 96 ml abs. DMF zugegeben. Nach 1 Std. Rühren bei RT. wurde mit Eiswasser abgekühlt und aus einer Injektionsspritze 300 mg **30** in 100 ml abs. DMF zugetropft und über Nacht bei RT. gerührt. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde 5mal mit Pentan ausgezogen und nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit MgSO₄ i.V. eingedampft. Der Rückstand wurde an 25 g Aluminiumoxid (neutral, Aktivität IV) chromatographiert. Nach dem Eluieren des Triphenylphosphins mit Pentan wurde das Estergemisch erhalten und durch präp. GC. weiter gereinigt: 245 mg Öl, nach

Kapillar-GC. 2 Haupt- und mehrere NebenkompONENTEN. Gemäss $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, CDCl_3) herrschen die (Z)-Komponenten vor: bei Einstrahlung bei 2,5 ppm [m , 6 H, H–C(2), H–C(4), 2 H–C(7) und 2 H–C(8)]: 5,2 (d , $J=10$, 1 H); 5,35 (d , $J=10$, 1 H). – MS.: 242 (2), 210 (18), 182 (9). – Da nur geringfügige Mengen an (E)-Isomeren vorhanden sind, müssen sich die beiden Hauptkomponenten in der räumlichen Lage der Methylgruppen an C(2) und C(4) unterscheiden.

Wenn von reinem *meso*-2,4-Dimethylglutarsäureanhydrid (Smp. 92°) ausgegangen wurde, konnten das Lacton **18** und der Methylester **29** praktisch diastereomerenfrei erhalten werden (gemäss Kapillar-GC. über 95% Hauptkomponente). Bei vorsichtigem Arbeiten⁷⁾ herrschte auch beim Aldehyd **30** die eine Komponente stark vor (Isomerenverhältnis *ca.* 92:8). Im Produkt **31** der Wittig-Reaktion waren aber die beiden (Z)-Isomeren immer in vergleichbarer Menge vorhanden, weshalb für die grösseren Ansätze das Diastereomergemisch des 2,4-Dimethylglutarsäureanhydrids eingesetzt wurde. Wenn ein geringerer Überschuss an Wittig-Reagens verwendet wurde, waren die Ausbeuten an **31** erheblich geringer (vgl. [28]).

8.3.4. *Herstellung von 2,4-Dimethylnonandisäure-dimethylester (5+Diastereomeres)*. Die Hydrierung von 200 mg **31** in 7 ml CH_3OH erfolgte bei RT. in Gegenwart von 155 mg 10proz. Pd/C und gab 198 mg Rohprodukt, das durch präp. GC. weiter gereinigt wurde, wobei aber die beiden Hauptkomponenten nicht voneinander getrennt werden konnten. – IR. (CHCl_3): kaum unterscheidbar vom Abbauprodukt **5**. – $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, CDCl_3): 0,85 und 0,87 (je d , $J=7$, zusammen 3 H); 1,10 und 1,12 (je d , $J=7$, zusammen 3 H); 1,0–2,0 (m , 9 H); 2,3 (t , $J=8$, 2 H); 2,4–2,6 (m , 1 H); 3,65 (s , 6 H). – Kapillar-GC.: t_R 42,0 (**5**) und 46,2; 2 Pike ähnlicher Intensität.

$\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_4$ (244,32) Ber. C 63,90 H 9,90 Gef. C 64,04 H 10,01%

8.4. *Herstellung von 4-Methoxycarbonyl-3-methyl-4-butanoliden (9 und 10)*. Die beiden diastereomeren Lactone **9** und **10** wurden nach Stoll & Seidel [20] hergestellt. Auf der Stufe der Lactoncarbon-säuren konnte zunächst das *trans*-Isomere kristallin abgetrennt und durch Umkristallisieren aus AcOEt/Cyclohexan gereinigt werden; Smp. $88\text{--}89^\circ$.

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4$ (144,12) Ber. C 50,00 H 5,60 Gef. C 49,88 H 5,58%

Durch Veresterung mit Diazomethan in Äther bei 0° wurde der Methylester **10** als farblose Flüssigkeit erhalten und durch Destillation im Kugelrohr gereinigt; t_R (23,6). – IR. und $^1\text{H-NMR}$. wie Abbauprodukt **10**. – $^{13}\text{C-NMR}$. (25 MHz, CDCl_3): 18,75 (*qa*), 34,50 (*d*), 35,17 (*t*), 52,53 (*qa*), 81,85 (*d*), 169,81 (*s*), 175,32 (*s*).

Der flüssige Teil des Säuregemisches gab mit Diazomethan ein Gemisch der Ester **9** und **10**. Die Trennung gelang durch präp. Hochleistungs-Chromatographie an Lichrosorb. Nach 10 Injektionen à 10 mg wurden 30 mg **10** und 45 mg **9** erhalten, die gemäss Kapillar-GC. einheitlich waren. *cis*-4-Methoxycarbonyl-3-methyl-4-butanolid (**9**): t_R (28,8). – IR. und $^1\text{H-NMR}$. wie Abbauprodukt **9**. – $^{13}\text{C-NMR}$. (CDCl_3): 14,54 (*qa*), 33,05 (*d*), 34,49 (*t*), 52,15 (*qa*), 79,63 (*d*), 168,98 (*s*), 175,59 (*s*).

Die Zuordnung der relativen Konfiguration nach Stoll & Seidel [20] wird durch die Methyl- und Ester-carbonyl-Signale (γ -Effekt) gestützt.

8.5. *Herstellung von 4,4-Dinitrovaleriansäure-methylester (13)*. Der nach Shechter *et al.* [21] hergestellte Ester **13** war ein farbloses Öl vom Sdp. $105\text{--}110^\circ/0,1$ Torr (Kugelrohr), t_R (90°) 41,8 (wie das Abbauprodukt **13**; Mischchromatogramm). – IR. (CHCl_3): 1740, 1640, 1600, 1575, 1445, 1400, 1365, 1330. – $^1\text{H-NMR}$. und MS. wie Abbauprodukt. – $^{13}\text{C-NMR}$. (25 MHz, CDCl_3): 22,3 (*qa*), 28,4 (*t*), 31,7 (*t*), 52,3 (*qa*), 118,8 (*s*), 171,0 (*s*).

8.6. *Herstellung von Isoxazol-3,5-dicarbonsäure-dimethylester (16)*. In 5 ml Essigsäureanhydrid wurden 1 ml Nitroessigsäuremethylester, 600 mg Propiolsäuremethylester und 810 mg AcONa 6 Std. auf 60° erwärmt. Nach dem Eindampfen i.V. wurde der braune Rückstand in 100 ml CHCl_3 gelöst, mit 10proz. NaOH-Lösung und Wasser gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Das farblose Öl wurde bei $150^\circ/0,1$ Torr im Kugelrohr destilliert und anschliessend aus Äther kristallisiert. Smp. 92° . – IR., $^1\text{H-NMR}$., MS. und t_R (15,4) wie Abbauprodukt **16**. – $^{13}\text{C-NMR}$. (25 MHz, CDCl_3): 53,2 (*qa*, 2 C), 109,7 (*d*), 156,5 (*s*), 156,8 (*s*), 159,4 (*s*), 161,8 (*s*).

$\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_5$ (185,14) Ber. C 45,41 H 3,81 N 7,57% Gef. C 45,34 H 3,78 N 7,52%

⁷⁾ Aufarbeiten in der Kälte, Verzicht auf die Destillation.

8.7. *Herstellung von 5-Methylisoxazol-3,4-dicarbonsäure-dimethylester (32)*. Aus 700 mg Methylpropionsäuremethylester [27], 1 ml Nitroessigsäuremethylester und 800 mg AcONa in 5 ml Essigsäureanhydrid wurde **32** wie unter 8.6 hergestellt. Nach der Aufarbeitung und Chromatographie an 50 g Kieselgel mit CHCl_3 wurden 111 mg reines **32** als blass-gelbliches Öl erhalten. – IR. (CHCl_3): 1745, 1610, 1460. – $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, CDCl_3): 2,67 (s, 3 H); 3,84 (s, 3 H); 3,96 (s, 3 H). – MS.: 199 (41), 168 (61), 167 (40), 140 (43), 124 (11), 112 (3), 96 (5), 82 (22), 59 (100), 43 (55), 15 (22).

Spektren und t_R verschieden von denen des Abbauproduktes **17**.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. Karrer & M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **65**, 1432 (1982).
- [2] N. O. Blinov, L. M. Golovkina, Y. M. Khokhlova, E. I. Khlebarova, E. M. Kleiner, I. K. Georgieva, G. N. Sheikova & A. I. Korenyako, *Antibiotiki* 1967, 867; N. O. Blinov, V. V. Onoprienko, T. N. Rodina, S. I. Againa & E. I. Khlebarova, *Antibiotiki* 1974, 579.
- [3] F. M. Arcamone, C. Bertazzoli, M. Ghione & T. Scotti, *Giorn. Microbiol.* **7**, 207 (1959).
- [4] M. E. Bergy & H. Hoeksema, *J. Antibiot.* **25**, 39 (1972).
- [5] D. Gottlieb, P. K. Bhattachariya, H. E. Charter & H. W. Andersson, *Phytopathology* **41**, 393 (1951).
- [6] R. R. Smeby, C. Leben, G. W. Keitt & F. M. Strong, *Phytopathology* **42**, 506 (1952); L. C. Vining & W. A. Taber, *Canad. J. Chem.* **35**, 1461 (1957).
- [7] M. Arai, *J. Antibiotics Ser. A*, **13**, 46, 51 (1960).
- [8] M. Namikoshi, K. Sasaki, Y. Koiso, K. Fukushima, S. Iwasaki, S. Nozoe & S. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 1653 (1982); M. Namikoshi, S. Iwasaki, K. Sasaki, M. Yano, K. Fukushima, S. Nozoe & S. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 1658 (1982).
- [9] S. Iwasaki, M. Namikoshi, K. Sasaki, M. Yano, F. Fukushima, S. Nozoe & S. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.* (im Druck); vgl. auch S. Iwasaki, K. Sasaki, M. Namikoshi & S. Okuda, *Heterocycles* **17**, 331 (1982).
- [10] H.-P. Kaiser, B. Joos, P. Gassmann & W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **66**, 226 (1983).
- [11] H. P. Fiedler, W. Wörner, H. Zöhner, H.-P. Kaiser, W. Keller-Schierlein & A. Müller, *J. Antibiot.* **34**, 1107 (1981).
- [12] H.-P. Kaiser & W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **64**, 407 (1981); K. Neupert-Laves & M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **65**, 262 (1982).
- [13] T. Arai, S. Kuroda, H. Ohara, Y. Kato & H. Kaji, *J. Antibiot. Ser. A*, **18**, 63 (1965).
- [14] K. Fukushima, T. Arai, S. Iwasaki, M. Namikoshi & S. Okuda, *J. Antibiot.*, im Druck.
- [15] K. Fukushima, T. Arai, S. Iwasaki, M. Namikoshi & S. Okuda, *J. Antibiot.*, im Druck.
- [16] K. Hostettmann, in 'Natural Products as Medicinal Agents' (J. L. Beal & E. Reinhard, Ed.); Hippokrates-Verlag, Stuttgart 1981.
- [17] S. Abrahamsson, S. Stållberg-Stenhagen & E. Stenhagen, 'Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids' **7**, 1 (1963).
- [18] T. Kishi, M. Asai, M. Muroi, S. Harada, E. Mizuta, S. Terao, T. Miki & K. Mizuno, *Tetrahedron Lett.* 1969, 91.
- [19] W. Oppolzer & V. Prelog, *Helv. Chim. Acta* **56**, 2287 (1973).
- [20] M. Stoll & C. F. Seidel, *Deutsches Pat.* 1 128 067 (1962); *Chem. Abstr.* **57**, 11167 (1962).
- [21] R. B. Kaplan & H. Shechter, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 3535 (1961); vgl. H. Shechter & L. Zeldin, *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 1276 (1951).
- [22] R. Huisgen & M. Christl, *Chem. Ber.* **106**, 3291 (1973).
- [23] A. McKillop & R. J. Kobylecki, *Tetrahedron* **30**, 1365 (1974).
- [24] S. Omura & A. Nakagawa, in 'Antibiotics', Vol. IV, Biosynthesis (Ed. J. W. Corcoran); Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1981, S. 175; H. G. Floss & Ch.-J. Chang, *ibid.*, S. 193.
- [25] W. Keller-Schierlein, M. Brufani, R. Muntwyler & W. Richle, *Helv. chim. Acta* **54**, 44 (1971).
- [26] J. von Braun & W. Haensel, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **59**, 1999 (1926).
- [27] E. C. Taylor, R. L. Robey, D. K. Johnson & A. McKillop, *Org. Syntheses* **55**, 73 (1975).
- [28] L. D. Bergelson & M. M. Shemyakin, *Angew. Chem.* **76**, 113 (1964).