

210. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

159. Mitteilung¹⁾

Über die aromatische Aminosäure des Echinocandins B: 3,4-Dihydroxyhomotyrosin

von **Walter Keller-Schierlein** und **Jörg Widmer**

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich

(11. V. 76)

The aromatic amino acid constituent of Echinocandin B: 3,4-Dihydroxyhomotyrosine. – *Summary.* The antifungal antibiotic echinocandin B gave upon treatment of its tetrahydroderivative with anhydrous trifluoroacetic acid and subsequent methanolysis the tripeptide threonyl-(4-hydroxypropyl)-(4-oxohomotyrosine) methyl ester (**8**), which could be hydrolysed to 4-oxohomotyrosine (**11**). These facts together with the earlier described hydrolysis of the antibiotic to 1-amino-3-*p*-hydroxyphenyl-2-propanone (**6**) and the reductive hydrolysis to homotyrosine suggested the presence of 3,4-dihydroxyhomotyrosine (**14**) as a constituent amino acid of echinocandin B. This was confirmed by a degradation of the intact tetrahydro-polypeptide with periodate yielding *p*-hydroxybenzaldehyde and by the isolation of free 3,4-dihydroxyhomotyrosine upon mild acidic treatment of the tetrahydro-polypeptide.

Das gegen Pilze wirksame Polypeptid-Antibioticum Echinocandin B gab bei der Hydrolyse mit 6N Salzsäure u.a. das Aminoketon **6**, das in Form des kristallisierten Diacetylderivates **7** charakterisiert wurde [2]. Seine aus den Spektren eindeutig ableitbare Struktur wurde nun bestätigt durch eine Synthese nach dem Verfahren von *Ireland & Marshall* [3] (s. *Schema 1* und exper. Teil), das unseres Wissens hier zum erstenmal in der Aminosäurereihe angewandt wurde.

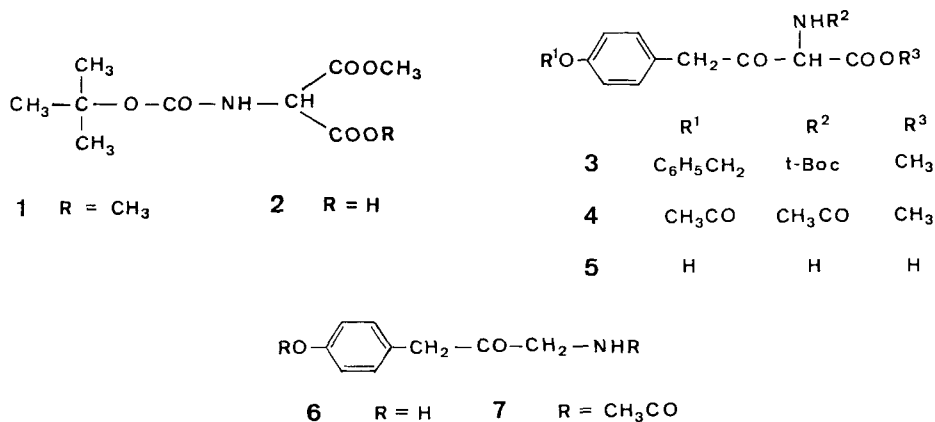
Der durch partielle Verseifung des Dimethylesters **1** leicht zugängliche Halbesther **2** wurde in Form des Magnesiumsalzes mit *p*-Benzyloxy-phenylessigsäurechlorid in den Ketoester **3** übergeführt. Daraus liess sich durch milde Abspaltung der Schutzgruppen und Acetylierung das Derivat **4** der Ketoaminosäure **5** gewinnen. Andererseits wurde das geschützte Derivat **3** nach hydrogenolytischer Abspaltung des Benzyläthers mit 6N Salzsäure unter gleichzeitiger Decarboxylierung zum Keton **6** hydrolysiert, das als Diacetylderivat **7** mit dem Abbauprodukt von Echinocandin B [2] identifiziert wurde.

Da bei der reduktiven Hydrolyse von Echinocandin B mit Jodwasserstoff in geringer Menge Homotyrosin erhalten wurde, schlossen wir seinerzeit [2], dass der aromatische Baustein des Antibioticums die β -Ketoaminosäure **5** sei, die zu **6** aufgebaut wurde. Dazu im Widerspruch stand allerdings das Fehlen von typischen Ketonsignalen im IR.- und ¹³C-NMR.-Spektrum des intakten Antibioticums.

Im Verlaufe von Untersuchungen zur partiellen Spaltung des Polypeptids machten wir nun Beobachtungen, die diesen Widerspruch aufklären. Durch Behand-

¹⁾ 158. Mitt. s. [1].

Schema 1

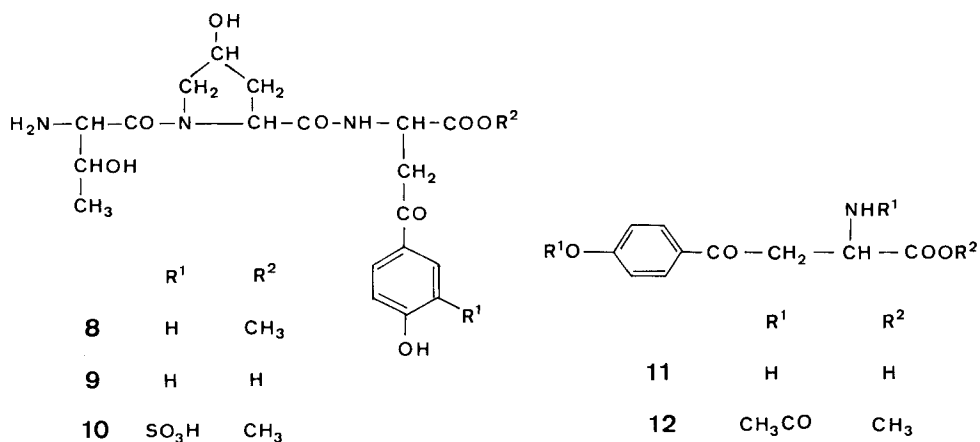


lung von Tetrahydro-echinocandin B [2] mit wasserfreier Trifluoressigsäure und anschliessend mit absoluter methanolischer Salzsäure (N,O-Acylwanderung an den Threoninresten, dann Methanolyse der Esterbindungen) wurde neben anderen Produkten der Tripeptid-methylester **8** und wegen teilweiser Hydrolyse während der Aufbereitung die entsprechende freie Säure **9** erhalten. Analog verlief der Abbau mit konz. Schwefelsäure, wobei gleichzeitig eine Sulfonierung zur Tripeptid-sulfonsäure **10** eintrat (Tyrosin und *p*-Hydroxyacetophenon lassen sich unter den gleichen Bedingungen leicht sulfonieren). Das Tripeptid **9** gab bei der vollständigen Hydrolyse mit Salzsäure Threonin und 4-Hydroxyprolin, die durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen wurden, sowie eine neue Aminosäure, die mit Ninhydrin eine Gelbfärbung zeigt. Threonin und 4-Hydroxyprolin sowie eine weitere ninhydrinpositive Substanz (gelbe Farbreaktion) wurden auch bei der Hydrolyse der Tripeptid-sulfonsäure **10** erhalten. Da in den NMR.-Spektren der Tripeptide Signale aromatischer Protonen vorkamen, war zu erwarten, dass die neuen Aminosäuren aromatisch waren und zum früher isolierten Aminoketon **6** in Beziehung standen.

Die Isolierung einer ausreichenden Menge der einen der neuen Aminosäuren gelang dadurch, dass Tetrahydro-echinocandin B zuerst mit Trifluoressigsäure behandelt und das Rohprodukt direkt mit 6*N* Salzsäure hydrolysiert wurde. Das Hydrolysegemisch enthielt Stearinsäure und alle Aminosäuren, die früher als Hydrolyseprodukte von Tetrahydro-echinocandin B identifiziert wurden [2], sowie die neue Aminosäure **11**. Das Aminoketon **6** war nur in geringer Menge vorhanden. Durch Chromatographie an Sephadex wurde das neue Produkt leicht von den übrigen Aminosäuren abgetrennt und als chromatographisch einheitliches amorphes Pulver erhalten. Daraus liess sich durch Veresterung mit methanolischer Salzsäure und Acetylierung der *N,O*-Diacetylmethylester **12** als gut chromatographierbares farbloses Öl herstellen.

Die aus dem Massenspektrum abgeleitete Elementarzusammensetzung und das IR.-Spektrum von **12** zeigen, dass es sich um ein Derivat einer Ketoaminosäure handeln muss. Die fehlende Tendenz der freien Aminosäure, sich zu decarboxylieren, schliesst die Struktur einer β -Ketosäure **5** aus, und die Carbonylfrequenz im IR.-Spektrum von **11** (1664 cm⁻¹) und vom Derivat **12** (1680 cm⁻¹ für die Keto- und die

Schema 2



Amidgruppe) weisen auf eine Ketogruppe hin, die in Konjugation zum aromatischen Ring steht. Dies wird bestätigt durch das Massenspektrum von **12**. Insbesondere lassen sich die beiden intensiven Pike bei m/e 163 und 144 als Fragmente deuten, die durch Spaltung zwischen dem β -Kohlenstoffatom und der Ketogruppe entstehen.

Gut vereinbar mit der Struktur der γ -Ketoaminosäure **11** sind auch die NMR.-Spektren des Derivates **12**, des Tripeptids **9** und der Sulfonsäure **10**: beim Vergleich der Spektren von **12** und **9** mit denjenigen von Echinocandin B [2], Homotyrosin [2] und dem Aminoketon-Derivat **7** [2] fällt auf, dass die Signale der zur Seitenkette o -ständigen Protonen des aromatischen Ringes im Fall von **12** und **9** bei ungewöhnlich tiefem Feld erscheinen; dies trifft auch für p -Hydroxyacetophenon zu, soweit die wegen der unterschiedlichen Löslichkeiten verschiedenen Aufnahmebedingungen einen Vergleich zulassen (Tabelle 1). Besser vergleichbar sind die unter ähnlichen

Tabelle 1. Chemische Verschiebungen (in δ) der aromatischen Protonen im NMR.-Spektrum des Tripeptids **9** und des N,O-Diacetyl-4-oxohomotyrosin-methylesters (**12**) und Vergleich mit Referenzsubstanzen

9 ^{a)}	12 ^{b)}	p -Hydroxyacetophenon ^{c)}	Echinocandin B ^{c)}	7 ^{b)}	Homotyrosin ^{a)}
7,0	7,18	6,83	6,83	7,10	6,85
7,95	7,95	7,80	7,30	7,33	7,25

a) In D₂O, Referenz DSS.

b) In CDCl₃, Referenz TMS.

c) In DMSO-d₆, Referenz TMS.

Bedingungen aufgenommenen Spektren der Tripeptid-sulfonsäure **10**, der 2-Hydroxy-5-acetylbenzolsulfonsäure und von m -Sulfo tyrosin (Tabelle 2). Es ergibt sich eine gute Übereinstimmung von **10** mit dem sulfonierten p -Hydroxyacetophenon, während zu m -Sulfo tyrosin eine starke Diskrepanz besteht.

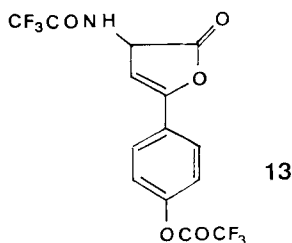
Tabelle 2. Chemische Verschiebungen der aromatischen Protonen im NMR.-Spektrum des Tripeptids **10** und Vergleich mit Referenzsubstanzen^{a)}

10	2-Hydroxy-5-acetyl- <i>m</i> -Sulfo-tyrosin benzolsulfonsäure		Multiplizität	Kopplungs- konstante <i>J</i> (Hz)
7,14	7,08	7,01	<i>d</i>	8,5
8,06	7,98	7,34	<i>d</i> × <i>d</i>	8,5; 2,3
8,35	8,31	7,61	<i>d</i>	2,3

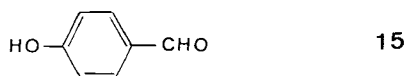
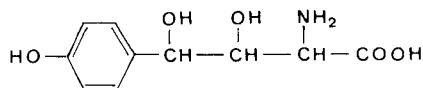
^{a)} δ -Werte in D₂O mit DSS als internem Standard.

Im NMR.-Spektrum des Diacetyl-methylesters **12** erscheint ausserdem eine *ABX*-Signalgruppe mit $\delta_A = 3,63$, $\delta_B = 3,68$ und $\delta_X = 4,98$ ppm sowie $J_{AB} = 19^2)$, $J_{AX} = 4$ und $J_{BX} = 5$ Hz. Das *x*-Signal ist zusätzlich durch Kopplung mit *H*-N aufgespalten. Aus diesen Signalen ergibt sich die Anwesenheit einer Gruppe $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}-$, die die Strukturformel **12** bestätigt.

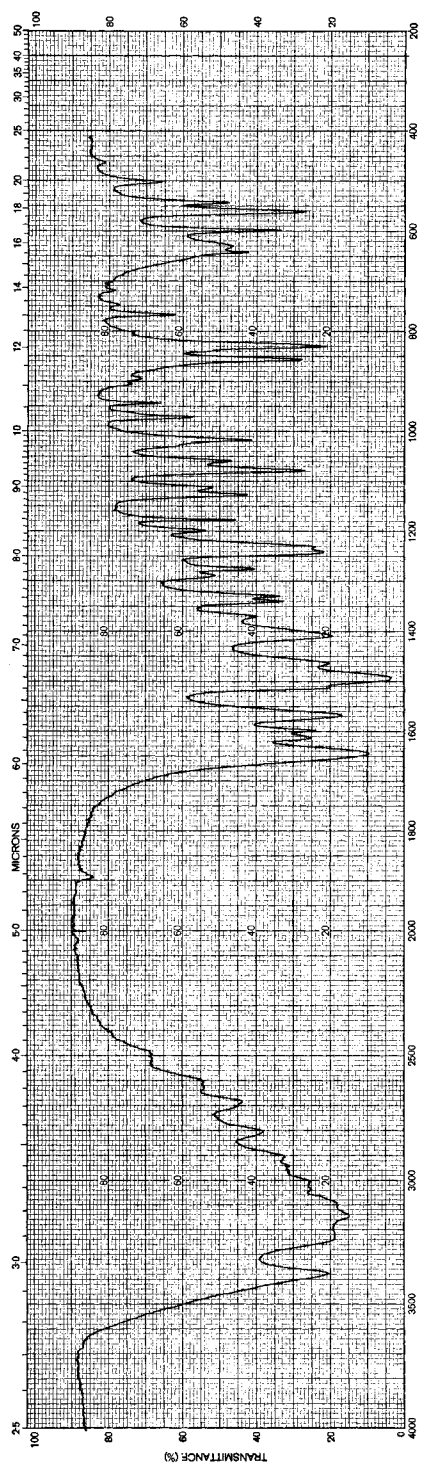
Versuche, die Keton säure **11** durch ein Trifluoracetylderivat zu charakterisieren, führten zum Bis-trifluoracetyl-enollacton **13**, wie sich aus dem Massenspektrum leicht ergibt.



Die Bildung des Abbauproduktes **6** (via β -Ketosäure **5**) bzw. der γ -Ketosäure **11** aus dem gleichen Vorläufer durch Hydrolyse unter verschiedenen Bedingungen ist wohl nur deutbar, wenn man annimmt, dass im Antibioticum als Rest ein 3,4-Dihydroxyhomotyrosin (**14**) enthalten ist. Tatsächlich verbrauchte Tetrahydroechinocandin B innert weniger Minuten ein Mol-Äquivalent Natriumperjodat. Bei einem präparativen Versuch wurde in guter Ausbeute *p*-Hydroxybenzaldehyd (**15**) gefasst und als 2,4-Dinitrophenylhydrazon identifiziert. Die wasserlöslichen Anteile des Perjodat-Abbaus gaben bei der Hydrolyse mit 6*N* Salzsäure Threonin, 4-Hydroxyprolin, 3-Hydroxy-4-methylprolin und 4-Oxoprolin (vgl. [2]), aber keine Spur des Aminoketons **6**. Damit ist die Natur der aromatischen Aminosäure des Echinocandins B als 3,4-Dihydroxyhomotyrosin (**14**) aufgeklärt.



²⁾ Wegen der sehr geringen Intensität der äusseren Pike ist dieser Wert unsicher.

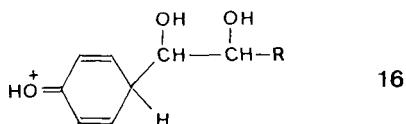


Figur. IR.-Spektrum von 3,4-Dihydroxyhomotyrosin (**14**) (in KBr)

Die freie Aminosäure **14** wurde bisher nur in sehr geringer Menge erhalten. Beim Erwärmen von Tetrahydro-echinocandin B mit 1N Salzsäure auf 105° traten nach kurzer Zeit zwei Produkte mit Rf 0,35 und 0,6 und violetter Färbung durch Ninhydrin auf, die nach *ca.* 5 Std. ein Maximum erreichten und dann langsam wieder verschwanden, bis sie nach 16 bis 20 Std. nicht mehr nachweisbar waren. In dem Mass, in dem der Gehalt an diesen beiden Verbindungen abnahm, vermehrte sich im Hydrolysat der Gehalt am Aminoketon **6**, das an seiner orangegelben Färbung durch Ninhydrin und den Rf-Wert 0,5 [2] erkennbar war. Ein präparativer Hydrolyseversuch wurde nach 5,5 Std. abgebrochen. Die chromatographische Auftrennung an Sephadex gab ein Gemisch der beiden Produkte mit Rf 0,35 und 0,6, das von allen anderen Aminosäuren und Oligopeptiden getrennt eluiert wurde. Aus wenig Wasser fiel die Aminosäure vom Rf 0,35 aus, welcher die Struktur **14** zugeordnet wurde (vgl. unten). Sie gab beim Erhitzen mit 6N Salzsäure das Aminoketon **6** als einziges Produkt. Beim Abbau von **14** mit Perjodat entstand *p*-Hydroxybenzaldehyd, der wiederum als 2,4-Dinitrophenylhydrazon identifiziert wurde. Weiter wurde das 3,4-Dihydroxyhomotyrosin (**14**) durch sein IR.-Spektrum in KBr (Fig. 1) und durch die Massenspektren einiger Derivate charakterisiert. Es ist zwar in keinem Fall ein Molekularpik zu erkennen, doch lassen sich deutlich zwei Zerfallsreihen verfolgen, die für das Trimethylsilylderivat im *Schema 3* dargestellt sind, und die gut auf die Struktur **14** passen.

Das Produkt mit Rf 0,6 wurde aus den Mutterlaugen nicht rein erhalten. Es handelt sich möglicherweise um ein Lacton der Dihydroxyaminosäure (**14**), denn beim Stehen in 1N Salzsäure geht **14** teilweise in die Verbindung vom Rf 0,6 über.

Das verschiedenartige Verhalten des 3,4-Dihydroxyhomotyrosinrestes im Antibiotikum unter verschiedenen sauren Bedingungen findet eine plausible Erklärung in der Annahme, dass in wässriger Säure erwartungsgemäss die benzyliche Hydroxylgruppe eliminiert wird, wobei sich intermediär das Enol einer β -Ketosäure bildet. In wasserfreier Säure liegt der aromatische Ring möglicherweise weitgehend protoniert vor (Formel **16**). Dadurch ist die Eliminierung der benzylichen, γ -ständigen Hydro-



xylgruppe nicht mehr begünstigt. Es kommt bevorzugt zur Abspaltung der β -ständigen Hydroxylgruppe und zur Bildung des Enols einer γ -Ketosäure.

Die Reihenfolge der Aminosäuren im Tripeptid **10** wurde durch einen zweistufigen Abbau nach *Edman* bestimmt. Durch diese Untersuchungen ist somit nicht nur die Natur der aromatischen Aminosäure des Echinocandins B bestimmt, sondern gleichzeitig auch die Sequenz von drei Aminosäureresten ermittelt worden.

Der Ciba-Geigy AG., Basel, danken wir für das Echinocandin B und die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden die IR.-Spektren (Angaben in cm^{-1}) in Chloroform, die NMR.-Spektren (chemische Verschiebungen in δ , Kopplungskonstanten J in Hz) in Deuteriochloroform mit Tetramethylsilan als interner Referenz ($\delta = 0$) und die UV.-Spektren (Angabe von λ_{max} in nm und $\log \epsilon$ in Klammern) in Äthanol aufgenommen. Bei den Massenspektren (MS.) sind die Massenzahlen m/e und in Klammern die relativen Intensitäten angegeben. Es bedeuten ferner FT. = *Fourier-Transformation*, br. = breites Signal, s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, RT. = Raumtemperatur, m^* = metastabiler Pik im MS.

Totalhydrolysen wurden mit ca. 0,5 mg Polypeptid und 0,5 ml 6N Salzsäure in unter Stickstoff zugeschmolzenen Ampullen 16 Std. bei 110° durchgeführt. Nach dem Eindampfen im Stickstoffstrom wurden die Rückstände mehrmals mit einigen Tropfen Wasser zur Trockene verdampft. Dünnschichtchromatogramme (DC.) auf Kieselgelplatten *Merck F254* wurden mit Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 ausgeführt; Nachweis mit Ninhydrin oder durch Fluoreszenzlöschung im UV.

Synthese von 1-Acetylamino-3-(*p*-acetoxyphenyl)-2-propanon (7). – N-*t*-Butyloxycarbonylaminomalonsäure-dimethylester (1). Zu 5 g Aminomalonsäure-dimethylester-hydrochlorid und 5,45 g Natriumhydroxid in je 20 ml Dioxan und Wasser tropfte man unter Rühren 4,7 g *t*-Butyloxycarbonylazid [4] und rührte 15 Std. bei RT. Nach dem Abdampfen des Dioxans i. V. wurde in Wasser aufgenommen und das überschüssige Reagens mit Äther entfernt. Nach dem Ansäuern mit konz. Salzsäure wurde die mit NaCl gesättigte Lösung 5mal mit Äthylacetat ausgezogen und die Extrakte 2mal mit wenig NaCl-Lösung gewaschen. Die mit Natriumsulfat getrocknete Lösung gab einen Eindampfrückstand, der vorwiegend die freie Dicarbonsäure enthält. Durch Verestern mit Diazomethan in Äther erhielt man 3,96 g Dimethylester 1, der bei 130° 10 Torr als farbloses Öl destillierte. – IR.: 3430, 1765, 1748, 1715. – NMR.: 1,50 (s, 9H); 3,87 (s, 6H); 5,04 (d, $J = 8, 1\text{H}$); 5,6 (br., 1H).

N-*t*-Butyloxycarbonylaminomalonsäure-monomethylester (2). Zu 3,96 g Dimethylester 1 in 50 ml abs. Methanol gab man bei –18° 641 mg (1,0 Mol-Äquiv.) Kaliumhydroxid in Methanol, liess 16 Std. bei RT. stehen und erwärmte 1 Std. unter Rückfluss. Nach dem Abdampfen des Methanols i. V. wurde in Wasser gelöst und nicht umgesetzter Dimethylester mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt, 5mal mit Äthylacetat ausgezogen, mit wenig Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Eindampfen i. V. ergab 2,95 g Halbester 2, der ohne Reinigung weiter verarbeitet wurde.

2-*t*-Butyloxycarbonylamino-3-oxo-4-(*p*-benzyloxyphenyl)-buttersäure-methylester (3). Eine aus 617 mg Magnesiumspänen und 2,77 g Äthylbromid in 15 ml abs. Tetrahydrofuran bereitete Grignard-Lösung wurde unter Kühlung zu 2,95 g Halbester 2 in 20 ml Tetrahydrofuran getropft³⁾. Nachdem die Entwicklung von Äthan beendet war und nach weiteren 10 Min. Stehenlassen bei RT., wurden 3,52 g *p*-Benzyloxyphenylessigsäurechlorid [5] in 10 ml Tetrahydrofuran zugetropft. Nach 15 Std. wurde das Magnesiumchelat mit 5 ml konz. Ammoniumchloridlösung zersetzt, das Produkt in Äther aufgenommen und 2mal mit wenig Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen und Eindampfen wurde das Rohprodukt, 5 g braunes Öl, an 200 g Kieselgel chromatographiert. Mit Petroläther/Chloroform/Äthylacetat 10:10:1 erhielt man 2,7 g Ketoester 3, als farbloses Öl, das gemäss DC. einheitlich war. – IR.: 3415, 1760, 1730–1700 br., 1610. – NMR.: 1,46 (s, 9H); 3,72 (s, 3H); 3,89 (s, 2H); 5,02 (s, 2H); 5,11 (d, $J = 7, 1\text{H}$); 5,72 (br., 1H); 6,90 und 7,10 (*AA'**BB'*, $J = 9, 4\text{H}$); 7,2–7,4 (5H). – MS.: 413 (0,65, M^+), 357 (6,2), 339 (1,2), 313 (6,8), 197 (10,7), 113 (2,55), 107 (4,8), 91 (100); m^* bei 308,5 (413 $\rightarrow$ 357) und 275 (357 $\rightarrow$ 313).

2-Acetylamino-3-oxo-4-(*p*-acetoxyphenyl)-buttersäure-methylester (4). 250 mg Ketoester 3 in 10 ml Methanol wurden in Gegenwart von 50 mg 10proz. Pd/C bei 20° erschöpfend hydriert. Nach dem Abfiltrieren und Eindampfen wurde der Rückstand in 25 ml 98proz. Ameisensäure 2 Std. stehengelassen. Darauf wurde i. V. eingedampft, der Rückstand 2mal in etwas Eisessig aufgenommen, das Lösungsmittel jeweils abgedampft und der Rückstand schliesslich mit Essigsäureanhydrid und Pyridin bei 20° acetyliert. Das Rohprodukt wurde mit Äthylacetat an Kieselgel chromatographiert. Durch 2mal Umkristallisieren aus Äthylacetat/Hexan erhielt man 143 mg

³⁾ Das Magnesiumsalz von Acetylaminalonsäure-monomethylester ist in Tetrahydrofuran schwer löslich und eignet sich daher schlecht für die Synthese.

farblose Kristalle vom Smp. 108–110°. – IR.: 3420, 1760, 1735 Schulter, 1680. – NMR.: 2,08 (s, 3H); 2,30 (s, 3H); 3,80 (s, 3H); 4,02 (s, 2H); 5,38 (d, $J = 6$, 1H); 6,7 (br., 1H); 7,05 und 7,22 ($AA'BB'$, $J = 9$, 4H). – MS.: 307 (11,1, M^+), 265 (3,6), 248 (0,5), 206 (2,6), 178 (6), 178 (6,6), 131 (35,4), 107 (100).

$C_{15}H_{17}NO_6$ Ber. C 58,63 H 5,58 N 4,56% Gef. C 58,70 H 5,60 N 4,55%

1-Acetylamino-3-(p-acetoxyphenyl)-2-propanon (7). 550 mg Benzyläther **3** wurde wie oben mittels Pd/C hydriert. Das rohe Phenol wurde mit 5 ml 5,6N Salzsäure 16 Std. auf 110° erhitzt. Der ölige Eindampfrückstand zeigte im DC. (Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1; Ninhydrin als Sprühreagens) das gleiche Verhalten wie das Aminoketon **6** aus dem Abbau von Echinocandin B. Er wurde mit je 5 ml Essigsäure-anhydrid und Pyridin über Nacht bei RT. acetyliert. Das mit Benzol/Methanol 3:1 an Kieselgel chromatographierte Produkt gab beim Umkristallisieren aus Benzol/Hexan 80 mg farblose Kristalle, Smp. 114–115°, die durch das IR., NMR. und MS. sowie den Misch-Smp. mit dem entsprechenden Abbauprodukt des Echinocandins B [2] identifiziert wurden.

$C_{13}H_{15}NO_4$ (249,29) Ber. C 62,64 H 6,07 N 5,62% Gef. C 62,51 H 6,11 N 5,61%

Abbau von Tetrahydro-echinocandin B. – **Threonyl-4-hydroxypropyl-4-oxohomotyrosin (9) und sein Methylester 8.** 350 mg Tetrahydro-echinocandin B [2] und 20 ml Trifluoressigsäure wurden unter Stickstoff in einer zugeschmolzenen Ampulle 16 Std. auf 75° erwärmt und der Rückstand nach dem Eindampfen 90 Min. mit 20 ml 3N abs. methanolischer Salzsäure zum Sieden erhitzt. Das Rohprodukt wurde nach dem Eindampfen in Wasser gelöst und 2mal mit Äther ausgeschüttelt. Der Extrakt bestand gemäss DC. zur Hauptsache aus Stearinsäure-methylester [2]. Die wässrige Phase wurde i. V. eingedampft zu 250 mg braunem, glasigem Rückstand, der in 1N Essigsäure an Sephadex G-15 (1,9 × 70 cm) chromatographiert wurde. Zunächst wurde ein Gemisch aus Dipeptid-methylestern und Aminosäure-methylestern eluiert, anschliessend 18,5 mg nahezu einheitlicher Tripeptid-methylester **8**. Dieser wurde auf eine Säule aus Dowex 50 W × 4 (0,9 × 90 cm) aufgetragen, mit 360 ml 1N Essigsäure/Pyridinpuffer vom pH 3,1 und 200 ml 0,5N Essigsäure/Pyridinpuffer vom pH 5 gewaschen und mit 0,5N Pyridin eluiert. Dabei wurde der Ester **8** weitgehend zur Säure **9** hydrolisiert. Aus den ninhydrin-positiven Fraktionen wurden 5,1 mg reines Tripeptid **9** als farbloses, amorphes Pulver erhalten: $[\alpha]_D = -55^\circ$ ($c = 0,3$, Wasser); R_f 0,28, gelbe Farbe mit Ninhydrin. – IR. (KBr): 1655 br., 1600, 1580. – NMR. (D_2O , FT.): 1,34 (d, $J = 5$, 3H); 1,7–2,8 (m, 2H); 3,5 (m, 2H); 3,80 (d, $J = 3$, 2H); 4,0–4,4 (br., 2H); 4,4–4,8 (br., 3H); 7,00 und 7,95 ($AA'BB'$, J ca. 8, 4H).

Totalhydrolyse von **9** gab Threonin, 4-Hydroxyprolin und eine unbekannte Aminosäure vom R_f 0,40 (gelb mit Ninhydrin, Fluoreszenzlöschung).

350 mg Tetrahydro-echinocandin B wurden in gleicher Weise gespalten und das Produkt an Sephadex G-15 chromatographiert. Auf die Chromatographie an Dowex 50 wurde verzichtet und dafür der Methylester **8** durch eine Chromatographie an Sephadex LH-20 (Methanol als Eluierungsmittel) weiter gereinigt. Man erhielt 18,5 mg chromatographisch einheitlichen Methylester **8** als farbloses Pulver vom R_f 0,38 (gelb mit Ninhydrin). – UV. (Wasser): 281 (4,14). – NMR. (D_2O , TMS extern): 1,79 (d, $J = 6$, 3H); 4,2 (s, 3H); 7,36 und 8,29 ($AA'BB'$, $J = 8,5$, 4H); dazu aufgelöste Signalhaufen bei 3,9–4,3 und bei 4,65.

Eine Probe des Tripeptids **9** wurde über Nacht bei RT. mit 3N abs. methanolischer Salzsäure verestert. Das Produkt war im DC. vom Methylester **8** nicht zu unterscheiden.

Tripeptid-sulfonsäure 10. 500 mg Tetrahydro-echinocandin B wurden mit 5 ml konz. Schwefelsäure 25 Tage bei 5° stehengelassen. Nach dem Abkühlen auf 0° wurde sorgfältig mit 50 ml abs. Äther verdünnt, der Niederschlag abzentrifugiert und 2mal mit Äther gewaschen. Eine 14 Tage bei RT. mit konz. Schwefelsäure behandelte und gleich aufgearbeitete Probe aus 500 mg Tetrahydro-echinocandin B zeigte im DC. die gleiche Zusammensetzung. Die beiden Proben wurden zusammen mit 50 ml 3N abs. methanolischer Salzsäure 1 Std. unter Rückfluss gekocht, i. V. eingedampft und der Rückstand 3mal mit etwas Methanol versetzt und jeweils zur Trockene eingedampft. Das Produkt wurde in wenig Wasser aufgenommen, 2mal mit Äther ausgeschüttelt, um Stearinsäure-methylester zu entfernen, und die eingeengte wässrige Phase mit 1N Essigsäure an Sephadex G-15 (1,9 × 70 cm) chromatographiert. Die Fraktionen, die im DC. eine ninhydrin-positive Verbindung mit R_f 0,21 und Fluoreszenzlöschung zeigten, wurden an einer Säule aus

Dowex 50 W $\times$ 44) mit 1 N Essigsäure/Pyridinpuffer vom pH 4,5 weiter gereinigt und schliesslich nochmals an Sephadex G-15 und dann mit destilliertem Wasser an Dowex 50 W $\times$ 4 chromatographiert. Die einheitlichen Fraktionen gaben beim Eindampfen 12 mg **10** als farbloses, amorphes Pulver. – IR. (KBr): 1740, 1660, 1600. – UV. (Wasser): 274 (3,89). – NMR. (D_2O , DSS als interner Standard; FT.): 1,32 (*d*, *J* = 6, 3H); 1,9–2,5 (*m*, 2H); 3,67 (*s*, 3H); 3,75–3,9 (*br.*, *ca.* 5H); 4,2 (*t*, 1H); 4,5–4,7 (*br.*, 2H); 5,0 (*t*, *J* = 6, 1H); 7,14 (*d*, *J* = 8,5, 1H); 8,06 (*d* $\times$ *d*, *J* = 8,5 und 2, 1H); 8,35 (*d*, *J* = 2, 1H). – ^{13}C -NMR. (D_2O , FT., Dioxan als interner Standard, umgerechnet auf TMS): 198,25 (*s*, CO, Ketogruppe), 173,57 (*s*), 173,44 (*s*), 167,87 (*s*, 3CO, Amid- und Estergruppen), 159,48 (*s*, $C_{arom.}$ -OH), 134,28 (*d*), 129,89 (*d*), 129,13 (*s*), 128,30 (*s*), 118,34 (*d*, $5C_{arom.}$), 70,55 (*d*), 66,88 (*d*), 60,07 (*d*), 57,87 (*d*), 56,77 (*t*), 53,98 (*q*), 49,76 (*d*), 40,18 (*t*), 37,91 (*t*), 19,43 (*q*).

Die Totalhydrolyse gab Threonin, 4-Hydroxyprolin und eine Verbindung mit Rf 0,4, gelber Ninhydrinreaktion und Fluoreszenzlöschung. Diese Verbindung ist wahrscheinlich identisch mit der aus dem Tripeptid **9** erhaltenen. Der Verlust von Sulfonsäuregruppen unter Hydrolysebedingungen ist bekannt.

Edman-Abbau. Der Abbau des Tripeptids **10** wurde auf Filterpapier als Träger nach *W. A. Schröder* [7] durchgeführt. Die Phenylthiohydantoine wurden jeweils mit Aceton extrahiert und mittels DC. mit Chloroform/Äthylacetat 6:3 [8] sowie durch Hochdruck-Flüssigchromatographie mit authentischen Proben [9] verglichen. Für die Hochdruckchromatographie verwendeten wir eine Kieselgelsäule (0,9 $\times$ 30 cm), Methylenchlorid/Methanol 1000:18 als Eluierungsmittel und einen UV.-Detektor; Durchfluss 82 ml/Std. Nach der ersten Abbaustufe wurde das Phenylthiohydantoin des Threonins (Retentionszeit 23,4 Min.), nach der zweiten dasjenige des 4-Hydroxyprolins (Retentionszeit 18,6 Min.) nachgewiesen.

4-Oxohomotyrosin (11) und seine Derivate 13 und 12. 200 mg Tetrahydro-echinocandin B in 10 ml Trifluoressigsäure wurden 16 Std. auf 75° erwärmt und nach dem Eindampfen der Rückstand mit 10 ml 6 N Salzsäure in einer zugeschmolzenen Ampulle 16 Std. auf 110° erhitzt. Die mit Wasser verdünnte und mit Äther von der Stearinsäure befreite Lösung wurde eingedampft. Beim Chromatographieren mit 1 N Essigsäure an Sephadex G-15 (1,9 $\times$ 70 cm) wurde zuerst ein Gemisch von Threonin, 3-Hydroxy-4-methylprolin, 4-Hydroxyprolin und 4-Oxoprolin eluiert. Spätere Fraktionen gaben 3 mg Aminoketon **6**. Zuletzt wurden 18 mg 4-Oxohomotyrosin (**11**) als chromatographisch einheitliches, farbloses Pulver erhalten: $[\alpha]_D^{25} = -4,6^\circ$ (*c* = 0,19, Wasser), $-13,4^\circ$ (*c* = 1,9, 1 N Salzsäure). – IR. (KBr): 1664, 1632, 1602, 1584.

Bei der Umsetzung von 0,5 mg **11** mit Trifluoressigsäureanhydrid (2 Std., 40°) bildete sich das zweifach acylierte Enollacton **13**. – MS.: 383 (54, M^+), 365 (10), 354 (12), 326 (27), 286 (23), 270 (10), 217 (100), 189 (9); m^* bei 348 (383 $\rightarrow$ 365), 300 (354 $\rightarrow$ 326), 214 (383 $\rightarrow$ 286) und 165 (286 $\rightarrow$ 217).

16 mg **11** wurden mit 1 ml 3 N abs. methanolischer Salzsäure 16 Std. bei 20° verestert und das Rohprodukt nach dem Eindampfen mit Essigsäureanhydrid und Pyridin bei RT. umgesetzt. Der Eindampfrückstand (20 mg) gab beim Chromatographieren an 2 g Kieselgel mit Benzol/Methanol 10:1 und anschliessend an Sephadex LH-20 mit Methanol 4,6 mg chromatographisch einheitliches Diacetat **12** als farblose, zähe Flüssigkeit: $[\alpha]_D^{25} = -7,0^\circ$ (*c* = 0,46, Methanol). – IR.: 3442, 1755, 1680, 1603. – NMR.: 2,02 (*s*, 3H); 2,33 (*s*, 3H); 3,63 und 3,68 (*AB*-Teil von *ABX*, $J_{AX} = 4$, $J_{BX} = 5$, 2H); 3,74 (*s*, 3H); 4,98 (*X*-Teil von *ABX*, zusätzlich aufgespalten durch Kopplung mit NH); 6,6 (*br. d.*, *J* = 6, 1H); 7,18 und 7,95 (*AA'BB'*, *J ca.* 8,5, 4H). – MS.: 307 (13, M^+), 275 (5,7), 264 (13), 248 (5,7), 222 (9), 206 (7), 163 (29), 144 (22), 121 (100), 93 (9); m^* bei 227 (307 $\rightarrow$ 264), 107,5 (248 $\rightarrow$ 163), 90 (163 $\rightarrow$ 121), 71,5 (121 $\rightarrow$ 93) und 67,5 (307 $\rightarrow$ 144).

3,4-Dihydroxyhomotyrosin (14). 250 mg Tetrahydro-echinocandin B in 2 ml Methanol wurden mit 40 ml 1 N Salzsäure 5,5 Std. auf 105° erwärmt. Die anfangs trübe Suspension wurde nach einigen Min. klar. Die abgekühlte Lösung wurde mit Äther von Stearinsäure befreit, eingedampft und der rötlichbraune Rückstand an Sephadex G-15 (1,9 $\times$ 70 cm) mit 1 N Essigsäure als Eluierungsmittel chromatographiert. Die ersten Fraktionen enthielten gemäss DC. Threonyl-3-hydroxy-4-methylprolin, Threonyl-4-hydroxyprolin (s. eine spätere Abhandlung), sowie Threonin, 4-Hydroxyprolin, 3-Hydroxy-4-methylprolin [10] und 4-Oxoprolin [2]. Spätere Fraktionen enthielten zwei Verbindungen mit Rf 0,35 und 0,6, rotvioletter Ninhydrinreaktion und Fluoreszenz-

4) Vorbereitet nach *P. B. Hamilton* [6]. Es wurde die Fraktion mit *ca.* 65 μ Teilchengrösse verwendet.

löschung im UV. Deren Eindampfdruckstand wurde in einigen Tropfen Wasser aufgenommen, worauf 5 mg reine Verbindung **14** (Rf 0,35) als farbloses Pulver ausfielen. Die Mutterlaugen enthielten noch beide Verbindungen. Ein Versuch, sie durch Verteilungschromatographie an Kieselgel (Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1) zu trennen, misslang, da die beiden Produkte unter den Bedingungen der Chromatographie miteinander im Gleichgewicht stehen. Eine Probe reines **14** wurde über Nacht bei 20° in 1 N Salzsäure aufbewahrt und gab dann wieder die beiden Flecke mit Rf 0,35 und 0,6. Reines 3,4-Dihydroxyhomotyrosin (**14**) schmilzt bei 250–260° (Zers.). – IR. (KBr): s. Fig. 1. – MS.: 209 (2,5, $M - H_2O$), 192 (1), 191 (1,1), 179 (1,3), 165 (1,6), 162 (3), 148 (15), 146 (11), 136 (14), 131 (5), 123 (22, $HO-C_6H_4-CHOH^+$), 122 (14), 121 (39, $HO-C_6H_4-CO^+$), 118 (6,6), 107 (53, $HO-C_6H_4-CH_2^+$), 44 (100).

MS. des Trimethylsilylderivates von **14**: s. Schema 3.

Erhitzen von **14** mit 6 N Salzsäure auf 110° gab das Aminoketon **6** als einziges ninhydrin-positives Produkt.

1 mg **14** wurde mit 12 mg Perjodsäure in 0,5 ml Wasser 30 Min. bei 20° umgesetzt. Der mit Äther extrahierte Aldehyd wurde in einem Tropfen Methanol gelöst und mit 6 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0,5 ml 30proz. Perchlorsäure versetzt. Der sofort ausfallende rotbraune Niederschlag wurde mit etwas Wasser gewaschen und aus Acetonitril umkristallisiert: Smp. 257–265° (Zers.). Das Produkt war im DC. und MS. (M^+ bei 302, (100%)) nicht von authentischem *p*-Hydroxybenzaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon unterscheidbar.

Perjodat-Abbau von Tetrahydro-echinocandin B. 40 mg Tetrahydro-echinocandin B in 3 ml Methanol und 15 mg Natrium-metaperjodat in 0,2 ml Wasser und 2 ml Natriumphthalatpuffer (pH 4,5) wurden 30 Min. bei RT. umgesetzt, die Lösung i. V. auf die Hälfte konzentriert und 3mal mit 5 ml Äther ausgezogen. Der Eindampfdruckstand gab mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin wie oben einen roten Niederschlag, der mit etwas Wasser gewaschen und aus Acetonitril umkristallisiert wurde: 6,9 mg rotbraune Kristalle, Smp. 260–270° (Zers.), die im DC., IR. und MS. nicht von *p*-Hydroxybenzaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon unterschieden werden konnten.

Das wasserlösliche Abbauprodukt wurde durch Eintrocknen, 2mal Extrahieren des Rückstandes mit Methanol und Chromatographieren an Sephadex LH-20 gewonnen und gab bei der Totalhydrolyse gemäss DC. Threonin, 4-Hydroxyprolin, 3-Hydroxy-4-methylprolin und 4-Oxoprolin, aber kein aromatisches Amin.

Die quantitative Bestimmung des Perjodat-Verbrauchs wurde nach Guthrie [11] durchgeführt, wobei die Titration innert 2 Min. nach der Zugabe von Kaliumjodid erfolgen musste, da das ausgeschiedene Jod langsam mit einem Produkt reagiert. Nach 5 Min. waren 0,85, nach 9 Min. 1,0 und nach 120 Min. 1,45 Äquivalente Perjodat verbraucht.

Die Mikroanalysen verdanken wir Herrn W. Manser, die NMR.-Spektren unserer spektroskopischen Abteilung (Leitung Prof. Dr. J. F. M. Oth) und die Massenspektren Herrn Prof. Dr. W. A. König, Hamburg.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. H. Jaschke, H. Hagenmaier, L. Santo, M. Scheer & H. Zähler, Arch. Mikrobiol. (im Druck).
- [2] F. Benz, F. Knüsel, J. Nüesch, H. Treichler, W. Voser, R. Nyfeler & W. Keller-Schierlein, Helv. 57, 2459 (1974).
- [3] R. E. Ireland & J. A. Marshall, J. Amer. chem. Soc. 81, 2907 (1959); G. Bram & M. Vilkas, Bull. Soc. chim. France 1964, 945.
- [4] L. A. Carpino, C. A. Giza & B. A. Carpino, J. Amer. chem. Soc. 81, 955 (1959).
- [5] K. Kratzl & G. Billek, Mh. Chem. 83, 1045 (1952).
- [6] P. B. Hamilton, Analyt. Chemistry 30, 914 (1958).
- [7] W. A. Schröder in «Methods in Enzymology», Vol. XI, S. 445, Ed. C. H. W. Hirs, Academic Press, New York & London 1967.
- [8] E. Cherbuliez, B. Baehler, J. Marszalek, A. R. Sussmann & J. Rabinowitz, Helv. 46, 2446 (1963).
- [9] P. Edman, Acta chem. scand. 4, 277 (1950); A. L. Levy & D. Chung, Biochem. biophys. Acta 17, 454 (1955).
- [10] G. Koyama, Helv. 57, 2477 (1974).
- [11] R. D. Guthrie in «Methods in Carbohydrate Chemistry» Vol. I, S. 432, Ed. R. L. Whistler & M. L. Wolfrom, Academic Press, London 1966.