

Biosynthese von Naturstoffen mit einer P–C-Bindung, IX^[1]

Synthese und Einbau von (*S*)- und (*R*)-2-Hydroxy-[2-²H₁]ethylphosphonsäure in Fosfomycin durch *Streptomyces fradiae*

Friedrich Hammerschmidt

Institut für Organische Chemie der Universität Wien,
Währingerstraße 38, A-1090 Wien

Eingegangen am 2. Dezember 1991

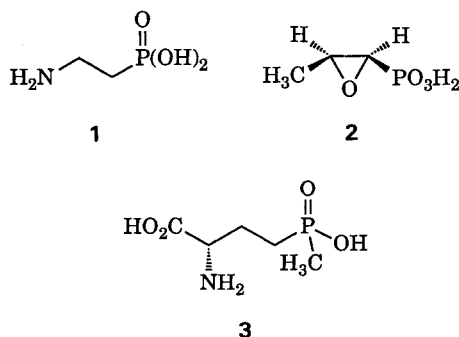
Key Words: Ethylphosphonic acids / Fosfomycin / *Streptomyces fradiae*

Biosynthesis of Natural Products with a P–C Bond, IX^[1]. – Synthesis and Incorporation of (*S*)- and (*R*)-2-Hydroxy-[2-²H₁]ethylphosphonic Acid into Fosfomycin by *Streptomyces fradiae*

(*S*)- and (*R*)-2-(benzyloxy)-[1-²H₁]ethanol (**8**) were transformed into (*S*)- and (*R*)-2-hydroxy-[2-²H₁]ethylphosphonic acid (**13**). These were fed to cultures of *Streptomyces fradiae*. The fosfomycin produced was isolated as aminopropylphosphonic acid and contained 32% Deuterium, when (*S*)-**13** was added to

the growth medium, and no deuterium, when the antipode (*R*)-**13** was added as substrate. The dehydrogenase-accepting 2-hydroxyethylphosphonic acid is stereospecifically removing its *pro-R* hydrogen from C-2.

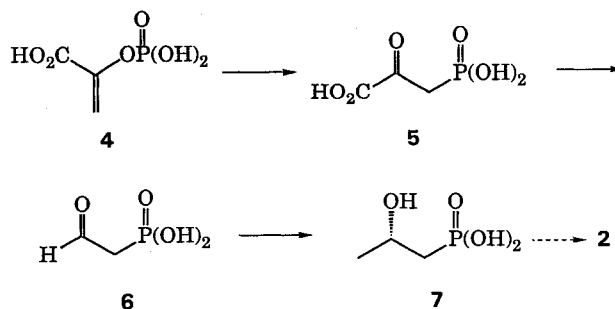
Die 2-Aminoethylphosphonsäure^[2] (**1**) wurde als erster Naturstoff mit einer P–C-Bindung aus Protozoen isoliert. Seither wurden weitere Vertreter dieser Naturstoffklasse wie Fosfomycin^[3] (**2**) und Phosphinothricin^[4] (**3**) aufgefunden. Diese werden von verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen produziert und besitzen interessante biologische Eigenschaften. Fosfomycin z. B. blockiert die Zellwandbiosynthese von Bakterien und wird klinisch als Antibiotikum eingesetzt^[5].



Die Biosynthese von Naturstoffen mit einer P–C-Bindung beginnt mit einer intramolekularen Umlagerung^[6] von Phosphoenolpyruvat (**4**), katalysiert durch die Phosphoenolpyruvatmutase, in Phosphonobrenztraubensäure (**5**), aus der alle diese Naturstoffe aufgebaut werden (Schema 1). Bei der Biogenese des Fosfomycins wird diese zu Phosphonoacetaldehyd (**6**) decarboxyliert^[7]. Addition von formal „CH₃“ liefert (*S*)-2-Hydroxypropylphosphonsäure (**7**), die in Fosfomycin übergeführt wird^[8], wobei das Oxiran-Sauerstoff-Atom der Hydroxylgruppe an C-2 entstammt^[1]. Bei der Fütterung von deuterierten 2-Hydroxyethylphosphonsäuren an *Streptomyces fradiae* wurde angenommen, daß sie in der Zelle durch eine Dehydrogenase, die diese Verbin-

dungen zufällig als Substrat umgesetzt, zum eigentlichen Zwischenprodukt, dem Phosphonoacetaldehyd, dehydriert werden^[8]. Zweck der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welches der beiden enantiotopen Wasserstoff-Atome an C-2 der 2-Hydroxyethylphosphonsäure entfernt wird. Diese Untersuchung umfaßt die Synthese der beiden chiralen 2-Hydroxy-[2-²H₁]ethylphosphonsäuren und die Fütterung dieser Verbindungen an *Streptomyces fradiae*, die Isolierung des gebildeten Fosfomycins als Derivat und die Bestimmung seines Deuterierungsgrades.

Schema 1

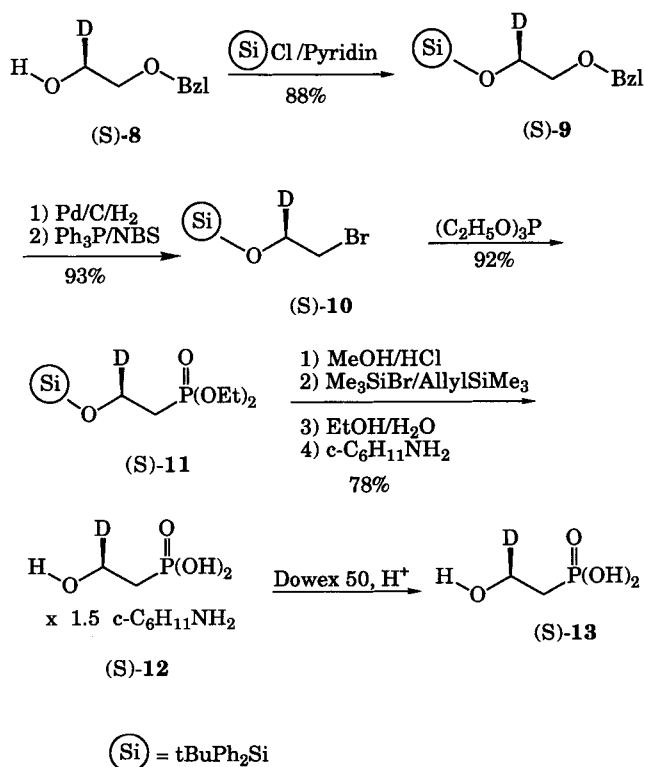


Synthese von (*S*)- und (*R*)-2-Hydroxy-[2-²H₁]ethylphosphonsäure

Als Edukt der Wahl bot sich (*S*)-2-Benzyloxy-[1-²H₁]ethanol^[9] [(*S*)-**8**] an, das durch Reduktion des entsprechenden deuterierten Aldehyds mit dem System Pferdeleberalkoholdehydrogenase/NAD⁺/Ethanol in Gramm-Mengen mit einem Enantiomerenüberschuß von über 98% zugänglich ist. Den Antipoden gewinnt man daraus durch Inversion der Konfiguration durch Veresterung mit Triphenylphos-

phan/Diethylazodicarboxylat/Benzoesäure und Verseifung des gebildeten Esters^[9]. Für die Synthese der Phosphonsäuren ist es notwendig, die Hydroxylgruppe zu schützen, die Benzylgruppe zu entfernen und die freigelegte OH-Gruppe durch Umfunktionalisierung durch die Phosphonatgruppe zu ersetzen. Zuerst wurde dafür der Tetrahydropyranylester als Schutzgruppe verwendet. Dieser erwies sich aber als labil und wurde zu Gunsten des *tert*-Butyldiphenylsilylrestes^[10], der besonders hydrolysestabil ist, aufgegeben [Schema 2, nur für (*S*)-13 gezeichnet].

Schema 2

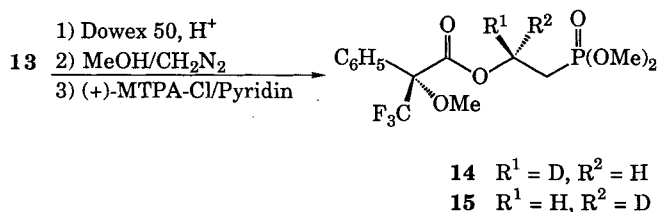


Der chirale Alkohol (*S*)-8 wurde mit *tert*-Butyldiphenylchlorosilan in Pyridin bei 60 °C in 2 Stunden mit 88proz. Ausbeute zum differenziert geschützten Glykol (*S*)-9 silyliert. Die Benzylgruppe wurde hydrogenolytisch abgespalten und das dabei entstandene (*S*)-2-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-[2-²H₁]ethanol wurde sofort ohne Charakterisierung mit Triphenylphosphan/NBS^[11] unter milden Bedingungen in das Bromid (*S*)-10 mit einer Gesamtausbeute über beide Schritte von 93% übergeführt. Die Arbusov-Reaktion mit Triethylphosphit lieferte das Phosphonat (*S*)-11 mit 92proz. Ausbeute und mit einem D₁-Gehalt von über 99% (EIMS). Die Abspaltung der Schutzgruppen mußte getrennt erfolgen. Es war nicht möglich, die *tert*-Butyldiphenylsilylgruppe nach der Freilegung der Phosphonsäure mit Trimethylbromsilan und anschließender Hydrolyse des gebildeten Bis(trimethylsilyl)phosphonats unter den sauren Bedingungen zu entfernen. Daher wurde zuerst die *tert*-Butyldiphenylsilylgruppe in trockenem Methanol mit Chlorwasserstoff abgespalten^[10]. Ein Austausch einer Ethyl- gegen eine Methylgruppe

konnte bei einem analogen Ansatz mit dideutertem Phosphonat auf Grund des ¹H-NMR-Spektrums nicht festgestellt werden. Das Diethyl-2-hydroxy-[2-²H₁]ethylphosphonat wurde nach der Flash-Chromatographie sogleich mit Trimethylbromsilan in Gegenwart von mehr als einem Äquivalent Allyltrimethylsilan als Fänger für Bromwasserstoff bei 50 °C dealkyliert^[12]. Bei der Reaktion der freien Hydroxylgruppe mit Trimethylbromsilan bildet sich Bromwasserstoff, der mit Allyltrimethylsilan reagiert, wobei sich Bromtrimethylsilan und Propen bilden. Nach dem Entfernen flüchtiger Anteile im Vakuum wurde das mit Silylgruppen geschützte Phosphonat zur freien Phosphonsäure (*S*)-13 hydrolysiert. Diese wurde über das Cyclohexylammoniumsalz (*S*)-12, das auf Grund des ¹H-NMR-Spektrums und der Elementaranalyse [von (*R*)-12] Säure und Amin im Molverhältnis 1:1.5 enthält, gereinigt. Daraus wurde die Säure mittels Dowex 50 (H⁺) für die Fütterungsexperimente freigesetzt. Die (*R*)-2-Hydroxy-[2-²H₁]ethylphosphonsäure [(*R*)-13] wurde auf analoge Weise aus (*R*)-2-Benzoyloxy-[1-²H₁]ethanol [(*R*)-8] synthetisiert.

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurden die dargestellten Phosphonsäuren an der Phosphonsäure mit Diazomethan und an der Hydroxylgruppe mit (+)- α -Methoxy- α -(trifluormethyl)phenylethylsäurechlorid [(+)-MTPA-Cl, Mosher's Reagens]/Pyridin^[13] verestert (Schema 3).

Schema 3

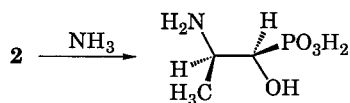


Für dieses Derivat der nichtmarkierten 2-Hydroxyethylphosphonsäure weist das in C₆D₆ aufgenommene ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) ein AB-System mit einer genügend großen Verschiebungsdifferenz für die diastereotopen Wasserstoffatome an C-2 auf^[8]. Die chemische Verschiebung von 2-H der Mosher-Derivate 14 und 15 ist $\delta = 4.24$ beziehungsweise 4.29. Ein Vergleich der Spektren zeigt, daß bei den Verbindungen 14 und 15 das jeweilige andere Diastereomer nicht nachweisbar ist und der Enantiomerenüberschuß somit über 98% beträgt.

Fütterung von (*S*)- und (*R*)-2-Hydroxy-[2-²H₁]ethylphosphonsäure an *Streptomyces fradiae*

Die freien Phosphonsäuren wurden dem Nährmedium für die Hauptkultur (6 × 220 ml Nährmedium in 1000-ml-Erlenmeyerkolben) vor dem Sterilisieren in einer Konzentration von 150 mg · l⁻¹ zugefügt^[14]. Nach dem Inokulieren wurden die Kulturen bei 28 °C im Luftbadschüttler 64 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Fosfomycin (ca. 10 mg · l⁻¹) im Überstand wurde mit Ammoniak hauptsächlich zur (1*R*,2*R*)-2-Amino-1-hydroxypro-

pylphosphonsäure (**16**) geöffnet, die mittels Ionenaustauschchromatographie isoliert und aus Wasser/Ethanol kristallisiert wurde^[14]. Der Versuch mit (*S*)-**13** lieferte 5 mg Aminopropylphosphonsäure **16** mit einem Deuteriumgehalt von 32% an C-2, indirekt bestimmt aus dem ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, D₂O). Das ¹³C-{¹H}-Spektrum (100.6 MHz) zeigt in Übereinstimmung mit Literaturdaten^[8] neben den Dubletts, infolge der Kopplung mit Phosphor, für die nichtmarkierte Aminopropylphosphonsäure zusätzlich zu höherem Feld verschobene Dubletts für C-1 (durch Deuterium induzierte β -Verschiebung +0.07 ppm) und C-3 (0.114 ppm) der an C-2 deuterierten Spezies. Der Versuch mit (*R*)-**13** lieferte 7 mg Aminopropylphosphonsäure, die auf Grund des ¹H-NMR-Spektrums kein Deuterium enthält.

**16**

Aus diesem Ergebnis folgt, daß die Dehydrogenase stereospezifisch das *pro-R*-Wasserstoffatom von C-2 der 2-Hydroxyethylphosphonsäure bei der Dehydrierung zum Phosphonoacetaldehyd, dem eigentlichen Metaboliten der Biosynthese des Fosfomycins, entfernt. Es ist wenig wahrscheinlich, daß diese Dehydrogenase substratspezifisch für die 2-Hydroxyethylphosphonsäure ist, die offensichtlich bei *Streptomyces fradiae* keine Rolle spielt. Vermutlich handelt es sich um eine der zahlreichen, in lebenden Zellen vorkommenden Dehydrogenasen, die zufällig diese β -Hydroxyethylphosphonsäure als Substrat akzeptiert, wodurch die Einschleusung markierter Vertreter in den Biosyntheseweg des Fosfomycin erst möglich wird. Auch zwei oder mehr Dehydrogenasen, die dieses Substrat unter stereospezifischer Abstraktion des *pro-R*-Wasserstoffatoms umsetzen, können nicht ausgeschlossen werden.

F. H. dankt Herrn Prof. Dr. E. Zbiral für seine Unterstützung, Herrn Doz. Dr. A. Nikiforov für die Aufnahme von Massenspektren, Herrn Mag. H. Kählig für die Aufnahme von NMR-Spektren, Herrn S. Frenczko für die Elementaranalysen und Frau J. Humpelstetter für die Herstellung der trockenen Lösungsmittel. Dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Wien) wird für die Bereitstellung von Mitteln und Geräten (WM 250 und AM-400 WB der Fa. Bruker) im Rahmen der Projekte Nr. P 8671, P 4009 und 6537 C gedankt.

Experimenteller Teil

DC: Fertigplatten (Fa. Merck), Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.25 mm. Die Markierung der Flecken erfolgte mittels UV-Licht und/oder Besprühen mit einer 2proz. Cer(IV)-sulfat-Lösung in 2 N H₂SO₄ und Erhitzen auf einer Heizplatte. – Flash-SC: Kieselgel 60 (Fa. Merck), Korngröße 0.04–0.063 mm. – IR-Spektren: Perkin-Elmer 377. – ¹H-NMR-Spektren: Bruker WM 250 und AM 400 WB, interner Standard TMS; bei Verwendung von D₂O als Lösungsmittel wurde auf HDO ($\delta = 4.80$) normiert. – Drehwerte: Polarimeter Perkin-Elmer 141. – Massenspektren: Varian-MAT 311 A mit Datensystem Varian V 72. – Schmelzpunkte (nicht korrigiert): Kofler-Apparat mit Thermometerablesung. – Reaktionen

wurden in trockenen Lösungsmitteln durchgeführt; THF wurde von Kalium destilliert, CH₂Cl₂ und CCl₄ von P₂O₅, Methanol von Magnesiummethoxid, und Pyridin von CaH₂. – Der Begriff „Einengen“ bedeutet Entfernen eines Lösungsmittel im Rotationsverdampfer. – (*S*)-(+)-MTPA-Cl (JPC-Chimie) hatte $[\alpha]_D^{20} = +135$ ($c = 5.2$ in CCl₄), $ee > 99$.

(*S*)-(–)-(2-Benzyloxy-[1-²H₁]ethyl)-(tert-butyl)diphenylsilyl)-ether [(*S*)-**9**]: 1.6 g (10.44 mmol) (*S*)-**8** ließ man mit 3.44 g (12.53 mmol, 3.2 ml) *tert*-Butylchloridiphenylsilan in 16 ml trockenem Pyridin 2 h bei 60°C unter Feuchtigkeitsausschluß reagieren. Das Pyridin wurde i. Vak. (0.05 Torr, bis 45°C) entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser und Dichlormethan versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wäßrige nochmals mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit einer wäßrigen Zitronensäure-Lösung (10 g Zitronensäure in 250 ml Wasser) und einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Flach-SC (Hexan/Dichlormethan, 3:1, $R_f = 0.17$) des nach dem Einengen erhaltenen Rückstandes lieferte 3.6 g (88%) (*S*)-**9** als farbloses Öl; $[\alpha]_D^{20} = -0.084$ ($c = 25.65$ in Dichlormethan), $[\alpha]_{365}^{20} = -0.304$.

(*R*)-**9**: 2.27 g (14.81 mmol) (*R*)-**8** wurden analog zu 5.7 g (98%) (*R*)-**9** umgesetzt; $[\alpha]_D^{20} = +0.091$ ($c = 26.5$ in Dichlormethan), $[\alpha]_{365}^{20} = +0.32$.

Die IR- und ¹H-NMR-Spektren von (*S*)- und (*R*)-**9** stimmen überein. – IR (Film): $\tilde{\nu} = 3075$ cm⁻¹, 2935, 2860, 2160, 1473, 1430, 1140, 1110. – ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): $\delta = 1.06$ (s, 9H, *tert*-Butyl), 3.61 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H, OCH₂), 3.83 (verbreitertes t, $J = 5.1$ Hz, 1H, CHD), 4.57 (s, 2H, Ar-CH₂), 7.2–7.5 (m, 15H, Aromaten-H).

C₂₅H₂₉DO₂Si (391.6) Ber. C 76.68 H 7.46 D 0.51
Gef. C 76.41 „H + D“ 7.79

(*S*)-(–)-(2-Brom-[1-²H₁]ethyl)-(tert-butyl)diphenylsilyl)ether [(*S*)-**10**]: Eine Lösung von 3.56 g (9.09 mmol) (*S*)-**9** in 120 ml trockenem Ethanol wurde mit 0.4 g Palladium (10% Pd) auf Aktivkohle in einer Parr-Apparatur 15 h bei Raumtemp. bei 3.4 atm hydrogenolysiert. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Lösung eingeeengt. Der Rückstand wurde zweimal mit Toluol versetzt und eingeeengt, i. Vak. (0.001 Torr) zuerst 1.5 h bei Raumtemp. und 10 min bei 50°C getrocknet. Das erhaltene 2-(*tert*-Butyl)diphenylsilyloxy-[2-²H₁]ethanol wurde sofort weiter umgesetzt. – Zu einer Mischung von 2.022 g (11.36 mmol) NBS in 20 ml trockenem CH₂Cl₂ wurde bei –78°C in einer Argonatmosphäre unter Rühren eine Lösung von 2.98 g (11.36 mol) Triphenylphosphan in 10 ml trockenem CH₂Cl₂ zugetropft. Als sich alles NBS gelöst hatte (30 min), wurde eine Lösung des oben beschriebenen Alkohols in 30 ml trockenem CH₂Cl₂ rasch zugetropft. Nach dem Entfernen des Kältebades wurde zuerst 10 min bei Raumtemp., dann in einem Wasserbad (40°C) gerührt, bis das Edukt umgesetzt war (ca. 1 h; DC: CH₂Cl₂). Es wurde 1 ml trockenes Methanol zugegeben und nach dem Abkühlen eingeeengt. Der Rückstand wurde mit CH₂Cl₂ durch Kieselgel filtriert, um Triphenylphosphanoxid und Succinimid zu entfernen. Flash-SC (CH₂Cl₂/Hexan, 1:10; $R_f = 0.34$) des Rohprodukts lieferte 3.08 g (93%) (*S*)-**10** als farbloses Öl; $[\alpha]_D^{20} = -0.51$ ($c = 25.7$ in CH₂Cl₂), $[\alpha]_{365}^{20} = -1.58$.

(*R*)-**10**: Aus 5.71 g (14.58 mmol) (*R*)-**9** wurden analog 3.5 g (66%) (*R*)-**10** erhalten; $[\alpha]_D^{20} = +0.49$ ($c = 28.05$ in CH₂Cl₂), $[\alpha]_{365}^{20} = +1.64$.

Die IR- und ¹H-NMR-Spektren von (*S*)- und (*R*)-**10** stimmen überein. – IR (Film): $\tilde{\nu} = 3071$ cm⁻¹, 2960, 2932, 2860, 1473, 1428, 1110. – ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): $\delta = 1.05$ (s, 9H, *tert*-Butyl),

3.41 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH₂Br), 3.90 (tt, $J = 6.4$ Hz, 1.5 Hz, 1H, CHD), 7.30–7.50 (m, 10H, Aromaten-H).

C₁₈H₂₂DBrOSi (262.3) Ber. C 59.33 H 6.09 D 0.55 Br 21.93
Gef. C 59.19 „H + D“ 6.42 Br 21.54

(*S*)-(–)-Diethyl- $\{2$ -(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)- $[2$ -²H₁]ethyl}-phosphonat [(*S*)-**11**]: In einem 25-ml-Rundkolben, versehen mit einem Luftkühler und einem gewöhnlichen Kühler, wurde eine Lösung von 1 ml Bromtrimethylsilan in 5 ml trockenem Pyridin unter Feuchtigkeitsausschluß 30 min unter Rückfluß erhitzt. Die Apparatur wurde nach dem Ausgießen der Reaktionslösung gründlich mit Wasser gespült und getrocknet. In diesem Kolben, versehen mit dem Luftkühler, wurde eine Lösung von 3.018 g (8.28 mmol) (*S*)-**10** in 6 ml destilliertem Triethylphosphit im Ölbad bei 170 °C unter Rühren erhitzt. Nach jeder Stunde wurde der Luftkühler kurz entfernt, um das Bromethan entweichen zu lassen. Nach dem Abkühlen wurde das überschüssige Phosphit i. Vak. (0.01 Torr; Luftbadtemp. bis 90 °C) entfernt. Flash-SC (CH₂Cl/Ethylacetat, 5:1; $R_f = 0.28$) des Rohprodukts lieferte 3.2 g (92%) (*S*)-**11** als farbloses Öl; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0.074$ ($c = 26.65$ in CH₂Cl₂), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0.24$.

(*R*)-**11**: Aus 3.2 g (8.78 mmol) (*R*)-**10** wurden analog 3.44 g (93%) (*R*)-**11** erhalten; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0.07$ ($c = 27.85$ in CH₂Cl₂), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0.24$.

Die IR-, ¹H-NMR- und EIMS-Spektren von (*S*)- und (*R*)-**11** stimmen überein. – IR (Film): $\tilde{\nu} = 3070$ cm⁻¹, 2960, 2933, 2860, 1443, 1430, 1269, 1250, 1114, 1055, 1030, 960. – ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): $\delta = 1.05$ (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 × POCH₃), 2.60 (dd, $J = 18.2$ Hz, 7.5 Hz, 2H, CH₂P), 3.90 (verbreitertes dt, $J = 10.5$ Hz, 7.5 Hz, 1H, CHD), 4.02 (quint, $J = 7.1$ Hz, 4H, 2 × POCH₂), 7.33–7.70 (m, 10H, Aromaten-H). – EIMS (70 eV): m/z (%) = 364 (86) [M⁺ – C₄H₉], 258 (44), 230 (100), 201 (72); D₁ > 99% für (*S*)- und (*R*)-**11**.

C₂₂H₃₂DO₄PSi (421.6) Ber. C 62.68 H 7.65 D 0.48 P 7.35
Gef. C 61.94 „H + D“ 7.89 P 7.62

(*S*)-(+) -2-Hydroxy- $[2$ -²H₁]ethylphosphonsäure × 1.5 Cyclohexylamin [(*S*)-**12**]: 3.12 g (7.4 mmol) (*S*)-**11** wurden in einer Mischung aus 7 ml trockenem Methanol und 7 ml einer Lösung von Chlorwasserstoff (11.4 g) in 100 ml trockenem Methanol gelöst und 16 h bei Raumtemp. stehengelassen (DC: Dichlormethan/Ethylacetat, 5:1; nahezu vollständiger Umsatz). Die Lösung wurde i. Vak. (0.1 Torr) bei Raumtemp. eingengt, noch zweimal mit 15 ml trockenem Methanol versetzt und wieder eingengt. Flash-SC (Ethylacetat, für Produkt: Ethanol) des Rückstandes lieferte (*S*)-Diethyl-(2-hydroxy- $[2$ -²H₁]ethyl)phosphonat, das mit Toluol versetzt wurde. Die erhaltene Lösung wurde eingengt, der Rückstand 1 h bei 0.01 Torr getrocknet und direkt weiter umgesetzt. Es wurde in 16 ml trockenem Tetrachlorkohlenstoff gelöst, mit 1.79 g (15.7 mmol, 2.5 ml) Allyltrimethylsilan und 4.79 g (31.3 mmol, 4.1 ml) Bromtrimethylsilan 2 h unter Feuchtigkeitsausschluß bei 50 °C (Badtemp.) gerührt. Die flüchtigen Anteile wurden i. Vak. (0.1 Torr, bis 40 °C) entfernt, wonach ein öliges Rückstand erhalten wurde. Dann wurde in Ethanol/Wasser gelöst, eingengt, in Ethanol gelöst, eingengt, abermals in wenig Ethanol gelöst, mit 2.5 ml Cyclohexylamin versetzt und eingengt. Das erhaltene Salz wurde 1.5 h bei Raumtemp. bei 0.1 Torr getrocknet, in wenig Ethanol in der Siedehitze gelöst und auf Raumtemp. abkühlengelassen. Durch langsame Zugabe von Ether und einem Impfkristall von (*R*)-2-Hydroxy- $[1$ -²H₁]ethylphosphonsäure × 1.5 Cyclohexylamin^[8] kristallisierte (*S*)-**12** aus, das 2 h bei 0.05 Torr/45 °C getrocknet wurde; Ausb. 1.6 g (78%), Schmelzbereich 115–130 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0.19$ ($c = 27.6$ in Wasser), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0.69$. Einmal wurden Kristalle mit einem molaren Verhältnis von Säure zu Amin von 1:2 (¹H-NMR) erhalten. Geringfügige Abwei-

chungen vom Verhältnis 1:1.5 sind möglich. Durch erneutes Kristallisieren oder Wiederholung obiger Vorschrift ab der Zugabe von Cyclohexylamin liefert ein Salz mit dem Verhältnis von 1:1.5. Die Analyse wurde unter der Annahme berechnet, daß kein Kristallwasser vorhanden ist. Die IR- und ¹H-NMR-Spektren stimmen nahezu überein.

(*R*)-**12**: Aus 3.3 g (7.83 mmol) (*R*)-**11** wurden analog 1.85 g (86%) (*R*)-**12** erhalten, das 2–3% Ethanol enthält; Schmelzbereich 124–132 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0.19$ ($c = 13.36$ in Wasser), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0.69$.

Die IR- und ¹H-NMR-Spektren von (*S*)- und (*R*)-**12** stimmen nahezu überein. – IR (Nujol): $\tilde{\nu} = 3660$ –2000 cm⁻¹, 1635, 1550, 1145, 1040. – ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz): $\delta = 1.15$ –2.10 (m, 15H, Cyclohexyl-H), 1.88 (dd, $J = 8.2$ Hz, 17.5 Hz, 2H, PCH₂), 3.21 (m, 1.5H, CHN), 3.83 (q, $J = 8.2$ Hz, 1H, CHDOH).

C₁₁H_{25.5}DN_{1.5}O₄P (275.8) Ber. C 47.90 H 9.31 D 0.73 N 7.62
Gef. C 46.47 „H + D“ 9.43 N 7.40

Darstellung der Derivate 14 und 15: Aus 0.15 g (0.54 mmol) (*S*)-**12** wurden nach Lit.^[8] 0.178 g (88%) **14** als Öl erhalten. – ¹H-NMR (C₆D₆, 400 MHz): $\delta = 1.76$ (dd, $J = 18.8$ Hz, 7.2 Hz, 1 Hz, 2H, PCH₂), 3.23 und 3.24 (zwei d, $J = 11$ Hz, je 3H, 2 × POCH₃), 3.37 (q, $J = 1.2$ Hz, 3H, OCH₃), 4.24 (dtt, $J = 14.5$ Hz, 7.2 Hz, 1 Hz, 1H, CHD), 7.02–7.62 (m, 5H, Aromaten-H).

15: Aus 0.12 g (0.44 mmol) (*R*)-**12** wurden analog 0.14 g (88%) **15** erhalten. – Das ¹H-NMR-Spektrum (C₆H₆, 400 MHz) stimmt mit Ausnahme des Signals für 2-H [$\delta = 4.29$ (dtt, $J = 13$ Hz, 7.3 Hz, 1 Hz, CHD)] nahezu mit dem von **14** überein.

Fütterungsexperimente: Diese wurden nach Lit.^[14] durchgeführt. Es wurden 6 Stück 1000-ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit je 220 ml Maisstärke-Medium mit je 150 mg · l⁻¹ (*S*)- oder (*R*)-**13** (erhalten durch Durchleiten einer wäßrigen Lösung von 0.435 g (*S*)- bzw. (*R*)-**12** durch Dowex 50, H⁺) verwendet. Die Zellen wurden nach 64 h zentrifugiert. In den Überständen wurden die Fosfomycinkonzentrationen (ca. 10 mg · l⁻¹) mikrobiologisch bestimmt. Das Fosfomycin wurde mittels Ammoniak in die Aminophosphonsäure **16** übergeführt, die durch Ionenaustauschchromatographie isoliert wurde, und zwar durch zweimalige Chromatographie an Dowex 50, H⁺, sowie durch je einmalige Chromatographie an Dowex 1, OAc⁻ und Dowex 50, H⁺ (1 N HCO₂H).

[1] VIII. Mitteilung: F. Hammerschmidt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1991**, 1993–1996.

[2] M. Horiguchi, M. Kandatsu, *Nature* **1959**, *184*, 901–902; Übersichtsartikel: M. Horiguchi in *Biochemistry of Natural C–P Compounds* (Hrsg.: T. Hori, M. Horiguchi, A. Hayashi) Maruzen Ltd., Kyoto Branch Publishing Service, Japan, **1984**, Kap. 3.

[3] B. G. Christensen, W. J. Leanza, T. R. Beattie, A. A. Patchett, B. H. Arison, R. E. Ormond, F. A. Kuehl, Jr., G. Albers-Schönberg, O. Jardetzky, *Science* **1969**, *166*, 123–125.

[4] E. Bayer, K. H. Gugel, K. Hägele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W. A. König, H. Zähler, *Helv. Chim. Acta* **1972**, *55*, 224–239; Y. Ogawa, T. Tsuruoka, S. Inoue, T. Niida, *Sci. Rep. Meiji Seika Kaisha* **1973**, *13*, 42–48.

[5] F. M. Kahan, J. S. Kahan, P. J. Cassidy, H. Kropp, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1974**, *235*, 364–386.

[6] H. M. Seidel, S. Freeman, C. H. Schwalbe, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8149–8155.

[7] T. O. Rogers, J. Birnbaum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1974**, *5*, 121–132.

[8] F. Hammerschmidt, H. Kählig, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2364–2370.

[9] F. Hammerschmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 955–960.

- ^[10] S. Hanessian, P. Lavallee, *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 2975–2977.
^[11] A. K. Bose, B. Lal, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 3937–3940.
^[12] A. H. Schmidt, *Aldrichimica Acta* **1981**, *14*, 31–38.
^[13] J. A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543–2549.
^[14] F. Hammerschmidt, G. Bovermann, K. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 1055–1061.

[271/91]

CAS-Registry-Nummern

(–)-(S)-**9**: 139244-51-2 / (+)-(R)-**9**: 139244-52-3 / (–)-(S)-**10**:
139244-53-4 / (+)-(R)-**10**: 139244-54-5 / (–)-(S)-**11**: 139244-55-6 /
(+)-(R)-**11**: 139244-56-7 / (+)-(S)-**12**: 139244-57-8 / (–)-(R)-**12**:
139244-58-9 / (S,R)-**14**: 139244-59-0 / (R,R)-**15**: 139244-60-3 /
(OH)₂P(O)O(CH₂)₂OH: 22987-21-9 / Fosfomycin: 23155-02-4