

9-Phenyl-3-benzyl-5.6-benz-isoalloxazin

9-Phenyl-5.6-benz-isoalloxazin¹⁾ wurde in Wasser aufgeschwemmt und durch Zutropfen von verd. Natronlauge in Lösung gebracht. Die überschüss. Natronlauge wurde dann durch Zugabe von verd. Salpetersäure neutralisiert, bis eine geringe Trübung auftrat. Nach dem Filtrieren wurde mit Silbernitrat-Lösung im Überschuß versetzt, der entstandene Niederschlag zentrifugiert, zweimal mit Alkohol + Äther ausgewaschen und scharf getrocknet.

0.3 g dieses Silbersalzes wurden in überschüss. Benzylchlorid 6 Stdn. gekocht, dann das Benzylchlorid i. Vak. abdestilliert und der Rückstand mit Chloroform ausgezogen. Der nach dem Verdampfen des Chloroforms verbliebene Rückstand wurde wiederholt aus Benzol umkristallisiert. Orangefarbene Nadeln vom Schmp. 318–319°; Ausb. 0.14 g.

$C_{27}H_{18}O_2N_4$ (430.4) Ber. N 13.01 Gef. N 12.80

38. Hans Brockmann, Nikolaus Grubhofer, Wilhelm Kass und Hans Kalbe: Über das Actinomycin C (Antibiotica aus Actinomyceten, V. Mitteil. *)

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]
(Eingegangen am 6. November 1950)

Aus einer bisher unbekanntem *Streptomyces*-Art, die als *Str. chrysomallus* bezeichnet ist, wurde Actinomycin C, ein rotes Antibioticum, isoliert, das Unterschiede gegenüber Actinomycin A und B aufweist. Durch energische Säurehydrolyse lassen sich aus Actinomycin C sechs Aminosäuren abspalten, die als *l*-Threonin, *d*-Valin, Sarkosin, *d*-Allo-isoleucin, *l*-Prolin und *N*-Methyl-*l*-valin identifiziert wurden. Bei der Hydrolyse mit Bariumhydroxyd entsteht eine rote, kristallisierte Verbindung, die dem chromophoren Teil des Actinomycins C entstammt. Die Actinomycine sind eine neuartige Gruppe von Naturstoffen, in denen eine chromophore Komponente wahrscheinlich peptidartig mit verschiedenen Aminosäuren verbunden ist.

I.) Einleitung

Bei unseren Untersuchungen über Antibiotica aus Actinomyceten stießen wir auf einen *Streptomyces*-Stamm¹⁾, dessen gelbe Kulturlösung gegen *Staphylococcus aureus* bakteriostatisch stark wirksam war. Durch Extraktion der Nährlösung mit Butylacetat und chromatographische Adsorption von dessen Verdampfungsrückstand konnte eine gut kristallisierte, alizarinrote Verbindung mit dem Schmp. 252° und $[\alpha]_D^{17}$: $-309^0 (\pm 3^0)$ isoliert werden, die bis zur Verdünnung 1:10000000 das Wachstum von *Staphylococcus aureus* und bis

*) I.–IV. Mitteil.: Naturwiss. 36, 376 [1949], 37, 138, 492, 494 [1950].

Anm. d. Redaktion: Die in dieser Arbeit benutzten Bezeichnungen *d* und *l* bedeuten im Sinne von Wohl u. Freudenberg (B. 56, 309 [1923]) die Konfiguration bezogen auf *d*-(+)-Glycerinaldehyd.

¹⁾ Nach W. Lindenbein, der darüber an anderer Stelle berichten wird, ist dieser Stamm mit keiner der im Berges Manual of Determinative Bacteriology (6. Aufl. 1948) beschriebenen Spezies identisch. Insbesondere unterscheidet er sich erheblich von *Streptomyces antibioticus*, dem Actinomycinbildner S. A. Waksman's. Er wurde daher als neue Spezies mit dem Namen *Str. chrysomallus* belegt.

1 : 10000 das von *Escherichia coli* hemmte. Bei der Maus waren bei oraler Verabreichung einer wäßrigen Lösung 50 mg/kg Körpergewicht, bei intraperitonealer 5 mg/kg innerhalb 24 Stdn. tödlich.

Dieses rote Antibioticum, für das wir die vorläufige Bruttoformel $C_{40}H_{57}O_{11}N_7$ ermittelten²⁾, ist in seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften sowie in seinem biologischen Verhalten dem von S. A. Waksman³⁾ aus *Streptomyces antibioticus* isolierten Actinomycin A der Formel $C_{41}H_{56}O_{11}N_8$ außerordentlich ähnlich. Unterschiede zwischen beiden Verbindungen sind lediglich folgende: 1.) Der N-Gehalt des Actinomycins A liegt 1% höher als der unseres Präparates. 2.) Aus Actinomycin A erhielt Waksman ein Diacetyl-Derivat mit dem gleichen Schmelzpunkt wie das Ausgangsprodukt, während unser Antibioticum bei allen Acetylierungsversuchen unverändert zurückgewonnen wurde. 3.) Actinomycin A soll in Aceton mäßig löslich sein, während unsere Verbindung sich spielend leicht darin löst. Diese Unterschiede erlaubten zwar nicht, die Identität beider Verbindungen mit Sicherheit auszuschließen, schienen uns aber doch mehr dafür zu sprechen, daß wir ein zweites Actinomycin in Händen hatten, das sich in seiner Konstitution nur unwesentlich von Actinomycin A unterscheidet.

Rote, als identisch mit Actinomycin A angesehene Antibiotica sind in neuester Zeit von verschiedenen Autoren beschrieben worden⁴⁾. Ob die Xanthomycine⁵⁾ dem Actinomycin nahestehende Antibiotica sind, läßt sich noch nicht entscheiden.

Da über die Konstitution des Actinomycins A, abgesehen von der Vermutung, daß es eine chinoide Gruppierung enthält, nichts bekannt war, haben wir unser Antibioticum, ungeachtet seiner möglichen Identität mit Actinomycin A, eingehender untersucht. Dabei ergab sich, daß der hydrolytische Abbau ein geeigneter Weg ist, einen Einblick in die Konstitution zu gewinnen.

Bei längerem Erhitzen unseres Actinomycins mit Salzsäure oder Schwefelsäure wurden Kohlendioxyd und Ammoniak im Verhältnis 1 : 2 abgespalten und ein braunschwarzer Niederschlag fiel aus, der gelbe, offenbar dem chromophoren Teil des Moleküls entstammende Anteile enthält. Seine Menge betrug etwa 25% des Ausgangsmaterials. Das Filtrat dieses Niederschlages hinterließ beim Verdampfen einen Rückstand mit positiver Ninhydrin-Reaktion, der im ein- und zweidimensionalen Papierchromatogramm fünf Aminosäure-Flecke zeigte. Drei von ihnen hatten R_F -Werte wie Prolin, Threonin und Iso-leucin bzw. Allo-isoleucin. In Übereinstimmung damit konnten tatsächlich

²⁾ H. Brockmann u. N. Grubhofer, Naturwiss. 36, 376 [1949]; zuerst beschrieben in der Diplomarbeit von N. Grubhofer, Göttingen, März 1947.

³⁾ S. A. Waksman u. H. B. Woodruff, Journ. Bacteriol. 40, 583 [1940]; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 45, 609 [1940]; S. A. Waksman u. M. Tishler, Journ. biol. Chem. 142, 519 [1942].

⁴⁾ M. Welsch, Bull. Soc. chim. Biol. 28, 557 [1946]; H. Umezara u. Mitarb., Journ. Penicillin (Japan) 1, 129 [1947]; P. C. Trussell u. E. M. Richardson, Canadian Journ. Res. 26, 27 [1948]; W. Kochalaty u. Mitarb., Arch. Biochem. 17, 191 [1948]; H. Serlet, Enzymologia 14, 49 [1950].

⁵⁾ C. B. Thorne u. W. H. Peterson, Journ. biol. Chem. 176, 413 [1948].

l-Threonin, *l*-Prolin und *d*-Allo-isoleucin in Substanz aus dem Hydrolysat abgetrennt werden. Die vierte Aminosäure wurde nach ihrer Isolierung als *N*-Methyl-*l*-valin erkannt, während die Natur der fünften – offenbar ebenfalls einer *N*-Methyl-aminosäure – mit einem R_f -Wert wie Valin zunächst ungeklärt blieb.

Als diese Ergebnisse und einige andere über den milden Säureabbau unseres Antibioticums vorlagen, erschien eine vorläufige Mitteilung von C. A. Dalgliesh und A. R. Todd⁶⁾ über die Isolierung eines kristallisierten, roten Antibioticums vom Schmp. 252°, das dem Actinomycin A und unserem Präparat sehr ähnlich ist, sich aber von beiden, wenn auch nicht erheblich, in den Analysenzahlen unterscheidet. Diese Verbindung, von den englischen Autoren provisorisch als Actinomycin B⁷⁾ bezeichnet, lieferte bei der energischen Säurehydrolyse *l*-Prolin, *d*-Valin, *l*-Threonin, *N*-Methyl-valin und Sarkosin. Milde Säureeinwirkung setzte eine mit der Sakaguchi-Reaktion nachgewiesene Guanidino-Gruppe frei.

Ein Vergleich des Präparates von Todd und Dalgliesh mit unserem⁸⁾ hat ergeben, daß die beiden einander sehr ähnlichen Verbindungen sich, abgesehen von geringen Differenzen im Schmelzpunkt und in der spezifischen Drehung, dadurch unterscheiden, daß im Papierchromatogramm des Actinomycins B der Fleck der Isoleucingruppe fehlt. Gewisse Unterschiede fand Todd auch im Infrarot-Spektrum zwischen 1500 und 700 cm^{-1} . Wir haben daher unser Antibioticum vorläufig als Actinomycin C bezeichnet. Die Tafel 1 bringt einen Vergleich der drei Actinomycine.

Tafel 1. Vergleich der Actinomycine

| Actinomycin A | Actinomycin B | Actinomycin C |
|--|---------------------------|---|
| Schmp. 250° (Zers.) | Schmp. 255° (Zers.) korr. | Schmp. 252° (Zers.) korr. |
| $[\alpha]_D^{25}$: -320° ($\pm 5^\circ$) | $[\alpha]_D^{25}$: -367° | $[\alpha]_D^{25}$: -309° ($\pm 3^\circ$) |
| ($c=0.25\%$ in Äthanol) | ($c=0.25\%$ in Äthanol) | ($c=0.25\%$ in Äthanol) |
| C 59.1 H 6.81 N 13.35 | C 58.8 H 7.1 N 13.4 | C 59.65 H 6.87 N 12.75 |
| In Aceton mäßig löslich | | In Aceton sehr leicht löslich |
| Diacetyl-Derivat mit dem gleichen Schmp. wie Actinomycin A | | Kein Acetyl-Derivat |
| Leukoacetyl-Derivat Schmp. 241° | | Leukoacetyl-Derivat Schmp. 253° korr. |
| C 58.52 H 6.45 N 12.04 | | C 59.50 H 6.95 N 11.14 |

⁶⁾ Abstracts of Communications of the Intern. Congress of Biochemistry, Cambridge, August 1949, S. 246; *Nature* (London) **164**, 830 [1949]. Die Isolierung erfolgte aus einem nicht näher gekennzeichneten *Actinomyces*-Stamm. Anm. bei der Korrektur (3. 2. 51): Inzwischen ist eine ausführliche Veröffentlichung über dieses Actinomycin erschienen, die uns Herr Prof. Todd freundlicherweise als Manuskript zugänglich gemacht hat (C. E. Dalgliesh, A. W. Johnson, A. R. Todd u. L. C. Vining, *Journ. chem. Soc. London* **1950**, 2946).

⁷⁾ Als Actinomycin B wurde ursprünglich von Waksman eine farblose, nicht näher charakterisierte Begleitsubstanz des Actinomycins A bezeichnet.

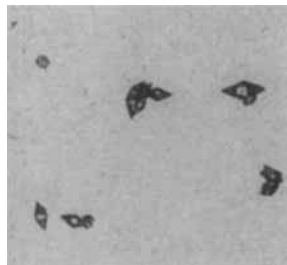
⁸⁾ Herr Prof. Todd war so freundlich, uns eine Probe seines Präparates zu überlassen und unser Präparat mit seinem Actinomycin B zu vergleichen.

Die angeführten Befunde kennzeichnen die Actinomycine als Naturstoffe, in denen ein bisher unbekanntes Bauprinzip verkörpert ist, nämlich die Verknüpfung einer farbigen Komponente mit verschiedenen Aminosäuren. Damit sind der Konstitutionsermittlung folgende Aufgaben gestellt:

- 1.) Aufklärung der farbigen Komponente, worunter der aminosäurefreie Teil des Moleküls verstanden werden soll,
- 2.) Identifizierung und quantitative Bestimmung der Aminosäuren,
- 3.) Ermittlung, in welcher Weise die Aminosäuren untereinander und mit dem chromophoren Teil verbunden sind.

II.) Eigenschaften des Actinomycins C

Actinomycin C kristallisiert aus Essigester in alizarinroten, hexagonalen Bipyramiden (Abbild. 1). Seine auffallend hohe spezifische Drehung ist stark konzentrationsabhängig. Die Löslichkeit in Aceton, Chloroform und Benzol ist groß, die in Alkohol und Essigester mäßig. Verdünnte Lösungen in Eisessig oder Methanol fluorescieren unter der Analysenlampe intensiv gelbgrün, solche in Aceton, Benzol oder Pyridin dagegen nur schwach rötlich bzw. gar nicht. Von Wasser wird das Antibioticum nur spärlich aufgenommen; es läßt sich mit Ammoniumsulfat wieder ausfällen. Die wäßrige Lösung ist kolloidal und schäumt stark. Beim Erwärmen trübt sie sich und verliert ihre Oberflächenaktivität, beim Erkalten wird sie wieder klar und schäumt beim Schütteln.



Abbild. 1. Actinomycin C aus Essigester (50 × vergr.)

Actinomycin C ist leicht zu einer hellgelben Leukoverbindung reduzierbar, die an der Luft wieder die gelbe Farbe des Ausgangsproduktes annimmt, eine Reaktion, die schon Waksman an seinem Actinomycin A beobachtet und auf das Vorliegen einer chinoiden Gruppierung zurückgeführt hat.

Wie wir fanden, kann unter gewissen Bedingungen die Reduktion und Rückoxydation eine grüne, offenbar semichinoide Zwischenstufe durchlaufen⁹⁾.

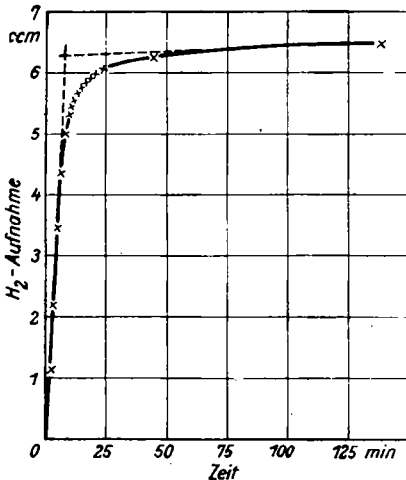
Diese tritt besonders auffällig in Erscheinung, wenn man die rote Lösung des Actinomycins C in konz. Salzsäure mit Titantrichlorid versetzt. Weniger ausgeprägt ist die Grünfärbung bei der Reduktion mit wenig Zinn(II)-chlorid in Essigester oder Chloroform. Die grüne Zwischenstufe tritt hier auch auf, wenn man die hellgelbe Leukoverbindung mit Luftsauerstoff oder Chloranil dehydriert. Die grüne Chloroformlösung hat scharfe Absorptionsbanden bei 695 und 630 m μ .

Die Entstehung eines grünen Semichinons gibt Anregung, die Frage zu prüfen, ob im Actinomycin C eines der bisher bekannten, zur Bildung grüner Semichinone befähigten chromophoren Systeme vorliegt. Man ist versucht, dabei an eine Phenazin-Gruppierung zu denken.

Die oben angegebene vorläufige Formel $C_{40}H_{57}O_{11}N_7$ für Actinomycin C basiert auf Mol.-Gew.-Bestimmungen, die wir kryoskopisch und durch isotherme Destillation nach Barger-Rast durchgeführt haben. Die hierbei erhaltenen

⁹⁾ Die Angaben unserer I. Mitteil. (Naturwiss. 36, 376 [1949]), daß bei der Reduktion des Actinomycins im Gegensatz zu den Abbauprodukten der milden Säurehydrolyse die grüne Zwischenstufe nicht auftritt, ist demnach zu korrigieren.

Zahlen weichen stark voneinander ab, so daß ihr Wert zweifelhaft ist. Wir haben daher versucht, sie auf chemischem Wege mit Hilfe der katalytischen Hydrierung zu kontrollieren. Die Wasserstoffaufnahme des Actinomycins C unter Normaldruck mit Platin-Katalysator in Eisessig erfolgt bis zum Schluß schnell und stetig (Abbild. 2), ein Zeichen, daß nur leicht und daher vollständig hydrierbare Gruppen vorliegen. Nimmt man an, daß im Actinomycin C nur eine solche Gruppe vorhanden ist, so errechnet sich aus dem Wasserstoff-



Abbild. 2. Wasserstoff-Aufnahme v. 330.9 mg Actinomycin unter Normalbedingungen

Verbrauch das Mol.-Gew. 1200 (± 25) statt 800, wie bei den oben genannten Methoden gefunden. Diese Discrepanz könnte dadurch bedingt sein, daß bei der Hydrierung z. Tl. eine reduktive Verknüpfung von 2 Mol. Actinomycin eintritt. Dann würde der Wasserstoffverbrauch geringer und das daraus berechnete Mol.-Gewicht größer werden. Diese Möglichkeit wird aber dadurch ausgeschlossen, daß sich nach Reoxydation an der Luft aus der Reaktionslösung Actinomycin C in einer Ausbeute von 92% zurückgewinnen läßt und die chromatographische Untersuchung keinerlei Anhaltspunkte für die Bildung bimolekularer Reduktionsprodukte ergeben hat. Da wir beim Actinomycin die Ergebnisse der Hydrierung für beweiskräftiger halten als die differierenden Werte der kryoskopischen und der Barger-Rast-Methode, betrachten wir

vorläufig den Wert 1200 als das Mindest-Mol.-Gewicht unseres Antibioticums. Es wäre zu verdoppeln oder zu verdreifachen, wenn zwei bzw. drei hydrierbare Gruppen im Molekül vorhanden sind. Zur Annahme eines so großen Mol.-Gewichts besteht aber bei einer Verbindung, die zu etwa 60% aus Aminosäuren aufgebaut ist, sich dennoch leicht in Benzol löst und dazu bei 252° schmilzt, vorläufig kein zwingender Grund.

Mit Zinn(II)-chlorid läßt sich Actinomycin C in salzsaurer Lösung scharf auf die hellgelbe Leukostufe titrieren. Die hierbei gefundenen Werte liefern ebenfalls ein Mol.-Gew. 1200.

Aus den Analysenzahlen unserer alten Bruttoformel $C_{40}H_{57}O_{11}N_7$ und dem durch Hydrierung ermittelten Mol.-Gew. 1200 errechnet sich die Formel $C_{62}H_{89}O_{17}N_{11}$. Da unser Antibioticum, wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, offenbar ein Gemisch verschiedener Actinomycine ist, können die Atomzahlen dieser Formel nur als Näherungswerte angesehen werden.

Actinomycin C läßt sich aus Äther unter Farbvertiefung nach Rot mit mindestens 4-proz. Salzsäure ausschütteln. Es ist also eine Base, aber eine so schwache, daß in alkoholischer Lösung eine konduktometrische Titration nicht möglich war.

Versetzt man die gelbe Lösung in Acetanhydrid mit wenig konz. Schwefelsäure, so wird sie rot und zeigt eine Absorptionsbande bei 577μ , die nach einiger Zeit unter Gelbfärbung der Lösung verschwindet.

Bei Versuchen, Salze des Actinomycins C darzustellen, erhielten wir ein kristallisiertes Perchlorat, das wegen seiner Unbeständigkeit nicht umkristallisiert werden konnte. Es enthält auf das Mol.-Gew. 1200 bezogen 3 Moll. Perchlorsäure.

Versuche, die Funktion der O- und N-Atome aufzuklären, haben bisher folgendes ergeben: Actinomycin C enthält keine Methoxy-, Acetyl- und Carboxygruppen. OH-Gruppen konnten durch Acetylierung nicht nachgewiesen werden. Bei der reduzierenden Acetylierung erhielten wir analog wie Waksman beim Actinomycin A aus unserem Präparat eine kristallisierte, blaßgelbe Verbindung, deren Analysenzahlen bei einem Mol.-Gew. 1200 annähernd auf ein Leukodiacetat passen. Man kann diesen Befund als weiteren Hinweis für das Vorliegen eines chinoiden Systems ansehen. Da das Reduktionsprodukt antibiotisch unwirksam ist, besteht die Möglichkeit, daß bei der acetylierenden Reduktion nebenher noch andere Reaktionen ablaufen. In diesem Fall würde nach Verseifung und Reoxydation aus dem Leukoprodukt kein Actinomycin C mehr zurückgebildet. Die experimentelle Prüfung dieser Frage scheidet daran, daß eine Verseifung der Acetylgruppen ohne gleichzeitige Veränderung des säure- und alkaliempfindlichen Actinomycins nicht möglich ist.

Aus den Ergebnissen der Methylimid- und Zerewitinoff-Bestimmung berechnen sich für die obige Näherungsformel 5 N-CH₃-Gruppen und 8 aktive H-Atome.

Das Verhalten des Actinomycins C gegen Salpetrige Säure gibt keine Anzeichen für das Vorliegen primärer oder sekundärer Aminogruppen. Die Ninhydrin-Reaktion ist ebenso wie die anderen üblichen Reaktionen auf Aminosäuren und Peptide negativ. Mit Nessler's-Reagens gibt Actinomycin C einen graubraunen Niederschlag, der sich auch zum Markieren des Actinomycins im Papierchromatogramm eignet. Am Licht bleicht es bei Luftzutritt innerhalb weniger Tage aus, wobei Abnahme der Wirksamkeit und der Extinktion parallel gehen.

III.) Zur Frage der Einheitlichkeit des Actinomycins C

Die Existenz verschiedener Actinomycine steht in Analogie zum Vorkommen verschiedener Penicilline, Polymyxine, Subtiline, Enniatine usw. und ist ein weiteres Beispiel für das bei Mikroorganismen ebenso wie höheren Pflanzen häufig anzutreffende Prinzip, daß ein Verbindungstyp in mehreren, einander sehr ähnlichen Varianten hervorgebracht wird. Ebenso wie bei den Polypeptid-Antibiotica bietet im Actinomycin-Molekül der vielleicht ebenfalls polypeptidartig gebaute Aminosäureteil manche Möglichkeit für chemische Abwandlungen.

Bei den Mikroorganismen gibt es für die Durchführung des genannten Variationsprinzips folgende Wege: 1.) Jede der Arten, die zur Synthese des fraglichen Verbindungstyps befähigt sind, erzeugt nur eine chemische Variante.

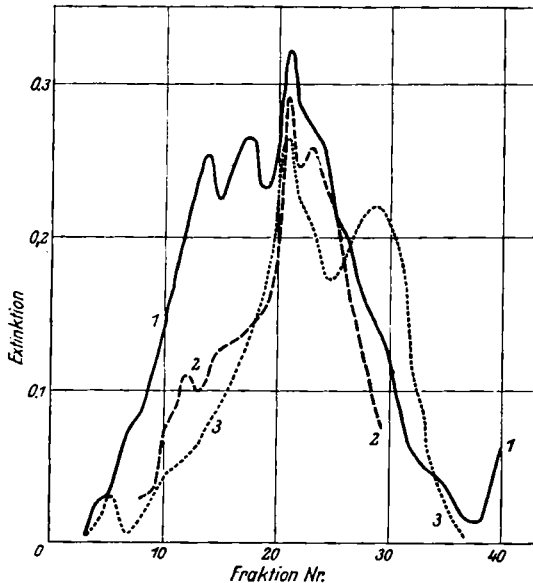
2.) Eine Spezies baut mehrere Varianten nebeneinander auf. 3.) Durch Mutationen erwirbt ein Stamm die Fähigkeit, neue chemische Abwandlungen des Verbindungstyps durchzuführen. Für den speziellen Fall der Actinomycine ergibt sich demzufolge die Frage, ob die als A, B und C bezeichneten Vertreter einheitliche, von verschiedenen *Streptomyces*-Arten gebildete Verbindungen sind, oder aber Gemische von Actinomycinen, und zweitens die andere, ob ein Stamm über längere Zeit hin das gleiche bzw. die gleichen Actinomycine produziert. Die folgenden Befunde zeigen einen Weg, um diese Fragen zu klären.

Im Laufe der Untersuchung fiel uns auf, daß unsere in letzter Zeit isolierten Actinomycin-Präparate sich von den zuerst erhaltenen durch eine größere Löslichkeit in Essigester und Alkohol unterscheiden und einen um 2° niedrigeren Schmelzpunkt zeigen. Als wir daraufhin sorgfältig gereinigte Präparate erneut analysierten, fanden wir Analysenzahlen, die von den früheren deutlich abwichen. Dagegen war die spezifische Drehung und das durch katalytische Hydrierung ermittelte Molekulargewicht innerhalb der Fehlergrenzen gleichgeblieben. Besonders bemerkenswert ist, daß das Hydrolysat unserer ersten Actinomycin-Präparate im Papierchromatogramm nicht den Fleck des *N*-Methyl-valins zeigte, der von den Flecken der anderen aus Actinomycin C abgespaltenen Aminosäuren gut abgetrennt und daher nicht zu übersehen ist. Diese Befunde lassen sich so deuten, daß bei unserem anfangs einheitlichen und möglicherweise nur ein Actinomycin produzierenden Stamm im Laufe vieler Überimpfungen Mutationen aufgetreten sind und jetzt eine Population mehrerer Mutanten vorliegt, die verschiedene Actinomycine bilden. Unsere jetzigen Präparate müßten dann Gemische verschiedener Actinomycine sein. Daß sie sich trotzdem bei der fraktionierten Kristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln und bei der Adsorptionschromatographie wie einheitliche Verbindungen verhalten, ist nicht überraschend, denn bei dem großen Molekulargewicht werden sich geringfügige Unterschiede in der Konstitution nur wenig auf die physikalischen Eigenschaften auswirken. Da am ehesten noch ein Einfluß auf die Verteilungskoeffizienten zu erwarten war, kam zur Prüfung auf Einheitlichkeit als einzige Methode die fraktionierte Gegenstromverteilung in Frage, für die es zunächst ein geeignetes Lösungsmittel-Paar zu finden galt. In Benzol-Essigsäure, Butanol-Essigsäure und Ameisensäure-Methylenchlorid gab unser Actinomycin in der von N. Grubhofer¹⁰⁾ beschriebenen Verteilungs-Apparatur die für eine reine Substanz charakteristische Verteilungskurve. Anders dagegen verhielt es sich, wie Abbild. 3 zeigt, in Äther – 6-proz. Salzsäure. Die hier erhaltene Verteilungskurve ist die eines Gemisches. Proben aus den Spitzenfraktionen in Rohr 14, 17 und 21 wurden hydrolysiert und papierchromatographisch auf Aminosäuren geprüft, wobei im Hydrolysat der letzten Fraktion kein Threonin-Fleck zu beobachten war. Die Fraktionen 19–25 wurden zur Kontrolle nochmals über 40 Stufen verteilt. Die dabei gefundene Kurve 2 zeigt, daß die Gegenstromverteilung über viele Stufen fortgesetzt werden müßte, um zu völlig einheitlichen Fraktionen zu kommen.

Da Actinomycin säureempfindlich ist, könnte der Verlauf der Verteilungskurve im System Äther–Salzsäure durch die Entstehung von Säurespaltungs-

¹⁰⁾ Chem.-Ing.-Technik 22, 209 [1950].

produkten des Antibioticums zustande kommen. Dagegen sprechen jedoch folgende Beobachtungen: Actinomycin C verändert in 6-proz. Salzsäure bei Ausschluß von hellem Licht innerhalb der für die Verteilungsoperation erforderlichen Zeit von etwa 2 Stdn. weder seine biologische Wirksamkeit noch seine Extinktion. Ferner sind die Verteilungskurven mit einem bereits einmal der Verteilung unterworfenen Präparat gut reproduzierbar. Auch die Auffindung



Abbild. 3. Verteilung von Actinomycin C im System Äther-5.6-proz. Salzsäure. Kurve 1: Präparat aus ständig überimpftem Stamm. Kurve 2: Frakt. 19-25 davon neuerlich verteilt. Kurve 3: Präparat aus nicht überimpftem Stamm. Extinktion bei 450 μ gemessen

einer threonin-freien Fraktion kann nicht auf hydrolytische Wirkung der Säure zurückgeführt werden, denn zur Abspaltung von Aminosäuren aus Actinomycin C sind nach unseren Erfahrungen weit energischere Bedingungen erforderlich, als sie bei der fraktionierten Verteilung vorliegen. Wenn man diese Befunde als Beweis dafür gelten läßt, daß bei der Verteilung keine Veränderung des Actinomycins C durch die Säure eintritt, dann bleibt zur Deutung der Verteilungskurven nur die Annahme übrig, daß unser Actinomycin-Präparat ein Gemisch verschiedener Actinomycine ist. Eine endgültige Bestätigung kann nur auf präparativem Wege erbracht werden, eine Aufgabe, die wir in Angriff genommen haben. Wir behalten vorläufig die Bezeichnung Actinomycin C bei, um zum Ausdruck zu bringen, daß sich unser Präparat von den beiden anderen bisher bekannten Actinomycinen unterscheidet, die möglicherweise ebenfalls Gemische sind.

Daß im Gegensatz zu den anderen bisher untersuchten Lösungsmittel-Paaren nur in Äther-Salzsäure eine Auftrennung erfolgt, könnte daran liegen,

daß hier die Basizität des Actinomycins mit ins Spiel kommt und die gegenseitige Mischbarkeit der beiden Phasen geringer ist als bei den anderen Lösungsmittel-Paaren.

Von großem Interesse wäre es gewesen, das zu Beginn unserer Arbeiten gewonnene Actinomycin C anhand seiner Verteilungskurve mit unseren jetzigen Präparaten zu vergleichen, um festzustellen, ob unser Stamm ursprünglich nur ein Actinomycin gebildet hat. Leider stand uns dafür keine Probe mehr zur Verfügung. Wir haben aber aus einer seit einem Jahr nicht mehr überimpften Kultur unseres Stammes ein Actinomycin isoliert, das im Gegenstrom-Verfahren zwischen Äther und 6-proz. Salzsäure verteilt eine ganz andere Kurve lieferte als das aus dem laufend überimpften Stamm gewonnene Actinomycin (Abbild. 3, Kurve 3).

Aus dem Vergleich der beiden Kurven läßt sich unter der Voraussetzung, daß keine Säureschädigung des Actinomycins eintritt, der Schluß ziehen, daß ein häufig überimpfter Stamm ein komplizierteres Actinomycin-Gemisch bildet als ein nur selten überimpfter, was in Einklang mit der oben geäußerten Annahme steht, daß im Laufe der Überimpfungen eine Population von Mutanten gebildet wird. Wir sind damit beschäftigt, zu prüfen, ob ein völlig einheitlicher, aus einer Einspor-Kultur gewonnener Stamm zunächst nur ein Actinomycin erzeugt.

Die in diesem Abschnitt geschilderten Befunde machen es wahrscheinlich, daß mindestens ein Teil der bisher verwendeten Präparate Gemische verschiedener Actinomycine gewesen sind. Zur Frage, wieweit solche Gemische zur Konstitutionsermittlung verwendet werden können, läßt sich folgendes sagen: Wenn sich die verschiedenen Actinomycine im Aminosäureteil ihres Moleküls unterscheiden, können für dessen Aufklärung selbstverständlich nur einheitliche Präparate verwendet werden. Diese Arbeit bleibt aber einem späteren Stadium der Konstitutionsermittlung vorbehalten. Zunächst kam es darauf an, zwei Aufgaben zu lösen, nämlich erstens, einen Weg zu finden, um den chromophoren Teil in Form kristallisierter Abbauprodukte aus dem Actinomycin-Molekül herauszulösen, und zweitens die methodischen Grundlagen für die Identifizierung und quantitative Bestimmung der beim Abbau entstehenden Aminosäuren zu schaffen. Beides kann auch mit Actinomycin-Gemischen durchgeführt werden. Unter diesem Gesichtspunkt sind die im folgenden geschilderten Ergebnisse zu bewerten.

Unsere bisherigen Versuche zur Abspaltung des chromophoren Teils sollen hier nur kurz erwähnt werden. Wie schon oben berichtet, fällt bei der Säurehydrolyse des Actinomycins C ein braunschwarzer Niederschlag aus, der zweifellos dem aminosäurefreien Teil des Moleküls entstammt. Er enthält neben gelbroten Fraktionen schwarze, melaninähnliche Anteile. Kristallisierte Abbauprodukte konnten wir aus diesem Niederschlag bisher nicht gewinnen. Da die melaninähnlichen Produkte wahrscheinlich bei einer tiefer greifenden Umsetzung aus der chinoiden Gruppe entstehen, wurde die Säurehydrolyse bei Gegenwart von Reduktionsmitteln wie Schwefliger Säure oder Zinn(II)-chlorid vorgenommen. Tatsächlich unterblieb dabei die Bildung der Melanine völlig und es entstanden rein gelbe Abbauprodukte, mit deren Untersuchung wir beschäf-

tigt sind. Erfolgreicher waren Versuche, den chromophoren Teil mit Bariumhydroxyd abzuspalten, denn dabei konnte ein aminosäurefreies, kristallisiertes Abbauprodukt gefaßt werden¹¹⁾, über das in einer späteren Mitteilung ausführlich berichtet wird. Dieses Verfahren ermöglicht, einen Einblick in die Konstitution des chromophoren Teils zu gewinnen und die Frage zu klären, ob die verschiedenen Actinomycine im Bau des chromophoren Teils übereinstimmen.

IV.) Trennung und Identifizierung der Aminosäuren

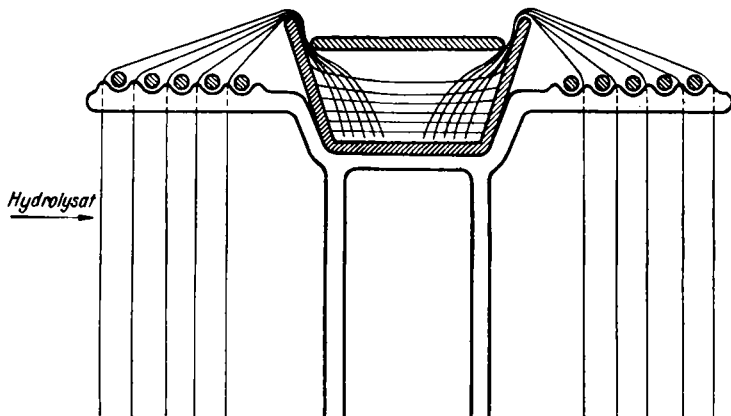
Bei der Säurehydrolyse des Actinomycins C erhält man etwa 60% des Ausgangsmaterials als kristallisiertes Aminosäure-Gemisch, über dessen Zusammensetzung die Papierchromatographie die ersten Anhaltspunkte lieferte. Zur endgültigen Identifizierung der Aminosäuren, besonders auch hinsichtlich ihrer Konfiguration, war es unerlässlich, sie in Substanz zu isolieren. Die Methode der Wahl war dafür ohne Zweifel die Verteilungschromatographie mit Stärke oder Cellulose als Träger der stationären Phase. Da aber zur Zeit unserer Hydrolyseversuche dieses Verfahren in präparativer Hinsicht für die Verarbeitung von 0.5–1 g Aminosäuregemisch noch nicht erprobt war und andererseits das Hydrolysat unserer ersten Actinomycin-Präparate im Papierchromatogramm nur vier Aminosäuren, darunter Prolin, erkennen ließ, haben wir zunächst untersucht, wieweit sich mit Hilfe der klassischen Methoden eine Trennung des Gemisches erreichen läßt. Dabei konnte *l*-Prolin ohne Schwierigkeit über das Reineckat abgetrennt und durch Analyse und spezif. Drehung identifiziert werden. Bei der fraktionierten Kristallisation aus Alkohol erhielten wir in kleiner Menge *l*-Threonin und in guter Ausbeute eine schön kristallisierte Aminosäure, bei der die Entscheidung zwischen *d*-Isoleucin und *d*-Allo-isoleucin zunächst nicht sicher zu treffen war, und schließlich als die vierte Komponente des Gemisches eine Verbindung vom Schmp. 160°, die keine primäre Amino-Gruppe enthielt, mit Hypochlorit Methylamin entwickelte und daher als *N*-Methyl-aminosäure angesprochen wurde²⁾. Ihr R_F -Wert war dem des Valins sehr ähnlich. Nach den unten angeführten Befunden liegt die Annahme nahe, daß ein Gemisch aus Sarkosin und Valin vorgelegen hat¹²⁾.

Die Versuche zeigen, daß mit den klassischen Methoden bis zu einem gewissen Grade eine Trennung des Gemisches zu erreichen ist. Da sie aber mit Verlusten verbunden ist und für ein Gemisch von sechs Aminosäuren, wie es bei der Hydrolyse später erhaltener Actinomycin-Präparate auftrat, sicher nicht in Betracht kam, haben wir uns der Frage zugewandt, in welcher Form

¹¹⁾ H. Brockmann u. N. Grubhofer, Naturwiss. 37, 494 [1950].

¹²⁾ Damit stehen allerdings folgende Befunde nicht in Einklang: Da bei der van Slyke-Bestimmung kein Amino-Stickstoff gefunden wurde, kann nur sehr wenig Valin vorhanden gewesen sein. Es ist unwahrscheinlich, daß eine so geringe Valinmenge den Schmelzpunkt des Sarkosins von 205° auf 160° herunterdrückt. Ferner ließ sich die Fraktion vom Schmp. 160° in ein gut kristallisiertes 3.5-Dinitro-benzoat vom Schmp. 186° überführen, während der des Sarkosin-dinitrobenzoates bei 153.5° liegt. Es scheint uns demnach nicht ganz ausgeschlossen, daß unser damaliges Actinomycin ein Abbauprodukt geliefert hat, das bei den später erhaltenen Präparaten nicht mehr aufgetreten ist.

die Verteilungschromatographie am zweckmäßigsten in präparativem Maßstab anzuwenden ist. Während im Papierchromatogramm bis dahin nur Mengen unterhalb 1 mg verarbeitet worden waren, lagen Versuche von W. H. Stein und St. Moore¹³⁾ vor, bei denen an Stärkesäulen etwa 25 mg Aminosäure-Gemisch pro Säule eingesetzt wurden. Da aber besondere Stärkesorten für diese Methode erforderlich sind, und für ihre Anwendung auf größere Mengen zeitraubende Vorarbeiten nötig erschienen, hielten wir es für einfacher, die Papierchromatographie zur präparativen Trennung unseres Gemisches heranzuziehen. Das ist, wie wir fanden, in verhältnismäßig einfacher Weise möglich, wenn man wie bei der zweidimensionalen Papierchromatographie ganze Bogen verwendet und auf diese das Hydrolysat als Streifen parallel zu einer Kante aufträgt. Je 10 solcher Bogen, von denen jeder etwa 10 mg Aminosäure-Gemisch trägt, werden in die für zweidimensionale Papierchromatographie gebräuchlichen Glaskästen gehängt. Die in Abbild. 4 gezeigte Anordnung gestattet, 10 Bögen aus einem Trog zu tränken, ohne daß sich diese gegenseitig berühren. Beim Entwickeln der Chromatogramme bilden



Abbild. 4. Anordnung zur präparativen Trennung von Aminosäuren an Papierbögen

sich bandförmige Zonen, die nach Maßgabe eines mit Ninhydrin behandelten Test-Streifens ausgeschnitten und eluiert werden. Da fünf Kästen gleichzeitig beschickt wurden, konnten etwa 500 mg Aminosäure-Gemisch in einem Ansatz verarbeitet werden. Bei Verwendung von *o*-Kresol als mobile Phase traten auf den Bogen fünf und bisweilen sechs Zonenbänder auf, die im folgenden nach steigenden R_F -Werten, also von oben nach unten numeriert sind. Zone I, V und VI waren stets gut abgesetzt, während II, III und IV häufig überlappten. Ihre vollständige Trennung gelang, wenn sie gemeinsam eluiert und einer erneuten Bogenchromatographie mit Butanol–20-proz. Essigsäure als mobiler Phase unterworfen wurden. Die Reihenfolge der Fraktionen blieb dabei die gleiche.

¹³⁾ Journ. biol. Chem. 178, 52 [1948].

Während unserer Untersuchung erschien eine Mitteilung von H. K. Mitchell und F. A. Haskins¹⁴⁾ über eine interessante Ausführungsform der Verteilungschromatographie, bei der als Träger der stationären Phase Cellulose in Form eines zusammengepreßten Stapels aus Rundfiltern, eines sog. „Chromatopile“ verwendet wird. Eine Anwendung auf unser Aminosäure-Gemisch ergab, daß die Trennleistung des Chromatopiles unzureichend war.

Sehr wertvoll erwies sich bei unseren Arbeiten der mikrobiologische Aminosäure-Test, der nicht nur eine Kontrolle unserer analytischen Befunde, sondern auch quantitative Angaben über den Aminosäuregehalt des Hydrolysates ermöglichte¹⁵⁾.

Aus Zone I der Chromatogramme konnte nur wenig *l*-Threonin erhalten werden, das durch Analyse, Biuret-Reaktion und Oxydation zu Acetaldehyd identifiziert wurde. Die spezif. Drehung war wesentlich geringer, als in der Literatur angegeben. Da uns nur wenige Milligramm zur Verfügung standen, messen wir dieser Abweichung keine große Bedeutung bei. Mikrobiologisch wurden im Hydrolysat 4,3% Threonin gefunden. Um festzustellen, in welchem Umfang es unter unseren Hydrolyse-Bedingungen zerstört wird, haben wir Actinomycin C unter Zusatz einer bekannten Menge *d,l*-Threonin hydrolysiert. Aus dem mikrobiologisch ermittelten Threoningehalt des Hydrolysates ergab sich ein Verlust von etwa 11% der Ausgangsmenge.

Die Identifizierung des Abbauproduktes aus Zone II als Sarkosin gelang erst, als wir durch die Befunde von Todd¹⁶⁾ auf diese Aminosäure aufmerksam wurden. Die anfallende Menge war gering; die Charakterisierung erfolgte durch Elementaranalyse und die R_F -Werte in verschiedenen Lösungsmitteln.

Die bei den ersten Versuchen in sehr geringer Menge aus Zone III gewonnene Aminosäure gab eine rein blaue Ninhydrin-Reaktion und stimmte in ihren R_F -Werten gut mit Valin überein. Da im Actinomycin-Hydrolysat mikrobiologisch kein *l*-Valin nachzuweisen war, wurde das Gemisch der Zonen II, III und IV mit Bariumhydroxyd racemisiert und erneut mikrobiologisch geprüft. Der jetzt gemessene *l*-Valingehalt betrug 2%, woraus folgt, daß das Gemisch der drei Fraktionen vor der Racemisierung 4% *d*-Valin enthalten hat. Bei einem größeren Ansatz konnte *d*-Valin in einer zur Analyse ausreichenden Menge gewonnen werden, so daß auch die Charakterisierung durch Schmelzpunkt, spezif. Drehung und Analyse möglich war.

Wesentlich besser als beim Sarkosin und Valin war die Ausbeute an der Aminosäure aus Zone IV. Dem R_F -Wert und den Analyseergebnissen nach gehört sie in die Gruppe der Leucine. Da ihre spezif. Drehung in Wasser und Salzsäure die gleiche Richtung hat, kann weder Leucin noch Norleucin vorliegen, denn bei beiden ändert sich beim Übergang von Wasser zu Salzsäure die Drehungsrichtung. Da unsere Aminosäure linksdrehend ist, war zwischen

¹⁴⁾ Science 110, 278 [1949].

¹⁵⁾ Seine Durchführung im Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer verdanken wir Hrn. Dr. E. Auhagen u. Hrn. Dr. J. Schmid. Lit.: E. E. Snell, *Advances in Protein Chemistry II*, 85 [1945].

¹⁶⁾ Herr Prof. Todd war so freundlich, uns brieflich von der Auffindung des Sarkosins als Spaltprodukt des Actinomycins B Mitteilung zu machen.

d-Isoleucin und *d*-Allo-isoleucin zu entscheiden. Ein Vergleich der spezif. Drehung und der Schmelzpunkte von drei Derivaten (Tafel 2) läßt diese Entscheidung zugunsten des *d*-Allo-isoleucins ausfallen.

Tafel 2. Vergleich der Abbau-aminosäure mit *d*-Isoleucin und *d*-Allo-isoleucin

| | <i>d</i> -Isoleucin | <i>d</i> -Allo-isoleucin | Abbau-aminosäure |
|---|---------------------|--------------------------|------------------|
| $[\alpha]_D^{25}$ (Wasser) | -10.7° | -14.2° | -15.6° |
| $[\alpha]_D^{25}$ (Salzsäure) | -41.6° | -38.0° | -31.8° |
| Schmp. d. Phenylisocyanat-Verb. | 121–127° | 151° | 157° |
| Schmp. d. Naphtylisocyanat-Verb. | 179° | 169° | 167–168° |
| Schmp. d. Formyl-Derivates | 156° | 126° | 125° |
| $[\alpha]_D^{25}$ des Methyl-äthyl-acetaldehyd-dinitrophenyl-hydrazons (Chloroform) | -21.2° | +18° | +14° |

Eine endgültige Bestätigung dafür brachte der oxydative Abbau zum Methyl-äthyl-acetaldehyd, der bei unserer Aminosäure und bei synthetischem *d*-Allo-isoleucin ein rechtsdrehendes 2.4-Dinitro-phenylhydrazon lieferte, während das 2.4-Dinitro-phenylhydrazon des aus *d*-Isoleucin erhaltenen Methyl-äthyl-acetaldehyds linksdrehend war. Die unnatürliche *d*-Konfiguration unseres Abbauproduktes gibt sich übrigens auch durch seinen süßen Geschmack und den Abbau mit *d*-Aminosäure-oxydase zu erkennen.

Allo-isoleucin ist unseres Wissens bisher nicht in der Natur aufgefunden. Das Vorkommen der *d*-Konfiguration ist nicht überraschend, denn auch in anderen Antibioticis hat man Aminosäuren mit *d*-Konfiguration gefunden, so z. B. *d*-Leucin im Gramicidin und Subtilin.

Das Vorliegen von Prolin in Zone V gab sich schon durch die gelbe Ninydrin-Reaktion zu erkennen. Nach Sublimation im Hochvakuum fanden wir den Schmp. 219° und $[\alpha]_D^{25}$: -76.0° (Wasser). Für die besten Präparate ist Schmp. 222°, $[\alpha]_D^{25,3}$: -85.0° angegeben.

Mikrobiologisch wurden im Aminosäuregemisch der Actinomycin C-Hydrolyse 20% *l*-Prolin gefunden.

N-Methyl-*l*-valin, das sich in der untersten Zone der Papierchromatogramme findet, ist erst kürzlich von A. H. Cook¹⁷⁾ sowie von Pl. A. Plattner und U. Nager¹⁸⁾ als Baustein polypeptidähnlich gebauter Antibiotica aus Fusarien entdeckt worden. Unser Präparat wurde durch Schmelzpunkt, Analyse und Farbreaktion mit Nitrobenzoylchlorid charakterisiert. Seine spezif. Drehung in Wasser und Salzsäure stimmt gut mit den von Plattner und Nager angegebenen Werten überein.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei der Säurehydrolyse des Actinomycins C die gleichen Aminosäuren entstehen wie aus Actinomycin B, außerdem aber noch *d*-Allo-isoleucin. Von großer Bedeutung für die Kennzeichnung der verschiedenen Actinomycine und ihre Konstitutionsermittlung

¹⁷⁾ A. H. Cook, S. F. Cox, T. H. Farmer u. M. S. Lacey, Nature **160**, 31 [1947].

¹⁸⁾ Helv. chim. Acta, **31**, 665 [1948].

ist die quantitative Aminosäure-Bestimmung. Sie setzt voraus, daß bei der Hydrolyse alle Aminosäuren unverändert und vollständig aus ihren Bindungen herausgelöst werden. Bei den im Actinomycin C nachgewiesenen Aminosäuren ist eine im größeren Umfange eintretende Zerstörung durch die Säure nicht zu befürchten. Zu berücksichtigen ist aber, daß die Actinomycine eine anscheinend chinoide Gruppe enthalten, die oxydierend wirken kann. Sie durchläuft dabei, wie die oben erwähnten Reduktionsversuche zeigen, eine tiefgrüne Zwischenstufe. Die bei Hydrolyse unter Luftabschluß zu beobachtende Grünfärbung der Reaktionslösung ist daher ein Zeichen, daß sich der chromophore Teil des Actinomycins oxydierend betätigt. Die Befürchtung, daß dadurch ein erheblicher Teil des Threonins zerstört wird, scheint, wie die oben erwähnte und unter Zusatz von Threonin durchgeführte Hydrolyse zeigt, nicht berechtigt zu sein¹⁹⁾.

Nimmt man an, daß der mikrobiologisch gefundene Gehalt des Aminosäuregemisches an Prolin, Valin und Threonin annähernd richtig ist, so lassen sich auf Grund folgender Überlegungen auch über die Mengen der drei anderen Aminosäuren gewisse Angaben machen. Das bei der Hydrolyse anfallende kristallisierte Aminosäure-Gemisch enthielt 9.6% Gesamt-N, 3.1% Amino-N und 4.7% Methylimid-N; daraus ergeben sich 1.8% Imino-N. In guter Übereinstimmung damit berechnen sich aus dem mikrobiologisch ermittelten Prolingehalt von 20% 1.9% Imino-N für das Gemisch.

Da im Aminosäure-Gemisch 4.3% *l*-Threonin vorhanden sind, ist dieses mit 0.4% an den 3.1% Amino-N des Gemisches beteiligt.

Demnach stammen die restlichen 2.7% Amino-N des Gemisches aus *d*-Allo-isoleucin und *d*-Valin. Um aus dieser Zahl auszurechnen, wieviel Prozent *d*-Allo-isoleucin und *d*-Valin im Gemisch vorhanden sind, muß man ihr Mengenverhältnis zueinander kennen.

Dieses Verhältnis ergibt sich aus der Analyse der vereinigten Fraktionen II, III und IV des Papierchromatogrammes. Wie oben gezeigt, enthielt dieses Gemisch 4% *d*-Valin. Für Sarkosin errechnet sich aus dem Methyl-N-Wert des Gemisches ein Gehalt von 5.5%. Danach enthält das Gemisch der drei Fraktionen 90.5% *d*-Allo-isoleucin. Das Mengenverhältnis Valin : Allo-isoleucin ist also 1 : 22. Daraus und aus den 2.7% Amino-N berechnet sich für das bei der Hydrolyse erhaltene Aminosäure-Gemisch ein Gehalt von 24% *d*-Allo-isoleucin und rund 1% *d*-Valin.

Da im Gemisch der Fraktionen II, III und IV 5.5% Sarkosin enthalten sind, muß dieses Gemisch rund 27% des Gesamthydrolysates betragen. Damit steht in guter Übereinstimmung, daß bei der chromatographischen Trennung 23% des Ausgangsmaterials als Gemisch von *d*-Allo-isoleucin, Sarkosin und *d*-Valin isoliert werden konnten. Hieraus folgt weiter, daß das Sarkosin zu 1.6% im Gesamtgemisch der Aminosäuren vorhanden sein muß.

¹⁹⁾ Jedoch kann man gegen diesen Versuch einwenden, daß Aminosäuren im Verband bekanntlich empfindlicher gegen Säure sein können und ferner, daß ein Verlust von 10% Threonin bei großem Überschuß an dieser Aminosäure nicht unbedingt besagt, daß bei der ohne Zusatz durchgeführten Hydrolyse auch nur 10% der vorhandenen Menge verlorengehen. Der gefundene Threoningehalt ist daher mit Vorbehalt zu bewerten.

Ein Sarkosingehalt von 1.6% im Gesamtgemisch der Aminosäuren würde für dieses 0.25% Methylimid-N ergeben. Zieht man diese Menge von den gefundenen 4.7% ab, so bleiben 4.45% für N-Methyl-*l*-valin. Seine Menge im Hydrolysat wäre demnach 42%. Man kommt so zu der in Tafel 3 angegebenen Zusammensetzung des Aminosäure-Gemisches.

Tafel 3. Zusammensetzung des kristallisierten Aminosäure-Gemisches

| Aminosäure | Prozentgehalt |
|-------------------------------------|---------------|
| <i>l</i> -Threonin | 4.3 |
| Sarkosin | 1.6 |
| <i>d</i> -Valin | 1 |
| <i>d</i> -Allo-isoleucin . . | 24 |
| <i>l</i> -Prolin | 20 |
| <i>N</i> -Methyl- <i>l</i> -valin . | 42 |
| | 92.9 |

In die Zahlen der Tafel 3 gehen die Fehler der Amino-N-, Methyl-N-²⁰⁾ und Gesamt-N-Bestimmungen, die des mikrobiologischen Testes und schließlich die bei der Hydrolyse entstehenden Verluste ein. Die Fehlerbreite ist daher nicht unerheblich. Trotzdem zeigt die Zusammenstellung mit aller Deutlichkeit, daß zwei Aminosäuren, nämlich *d*-Valin und Sarkosin, in wesentlich kleinerer Menge vorhanden sind als *N*-Methyl-*l*-valin, *d*-Allo-isoleucin und *l*-Prolin, die annähernd im Verhältnis 2 : 1 : 1

vorliegen. Nimmt man an, daß nur ein *d*-Valin- und ein Sarkosin-Rest im Actinomycin-Molekül vorhanden ist, dann müßte das Mol.-Gewicht ein Vielfaches von 1200 sein. Um den gleichen Faktor müßte auch die Zahl der chromophoren Gruppen größer werden. Wie schon oben gesagt, scheint uns ein so großes Mol.-Gewicht unwahrscheinlich. Angesichts der im Abschnitt III geschilderten Befunde möchten wir den geringen *d*-Valin- und Sarkosingehalt vielmehr als weiteren Hinweis dafür ansehen, daß unser Actinomycin nicht einheitlich, sondern ein Gemisch ist. *d*-Valin und Sarkosin würden dann Komponenten des Gemisches entstammen, die nur in untergeordneter Menge vorhanden sind. Der Beweis dafür wäre erbracht, wenn es gelänge, durch Gegenstromverteilung des Actinomycins C Fraktionen zu erhalten, deren Hydrolysat im Papierchromatogramm kein Sarkosin oder Valin zeigt.

V.) Milde Säurehydrolyse des Actinomycins C

Wie schon Waksman bei seinem Actinomycin A beobachtete, verliert auch Actinomycin C bei kurzem Erwärmen mit Säure seine antibiotische und toxische Wirkung. Unsere Versuche, durch kurzdauernde Einwirkung von Säure zu definierten Abbauprodukten zu kommen, sind bisher unbefriedigend verlaufen, so daß nur kurz darüber berichtet werden soll. Läßt man 6*n* HCl 20 Min. bei 100° auf Actinomycin einwirken, so hinterbleibt beim Verdampfen der Reaktionslösung ein gelbroter Rückstand, der im Gegensatz zum Actinomycin in Wasser gut löslich ist. Er besteht aus den Hydrochloriden gelbroter, basischer Abbauprodukte. Die Basen selbst lassen sich durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser aus den Hydrochloriden gewinnen und sind wasserunlöslich. Bei der milden Salzsäure-Spaltung des Actinomycins wird auf das Mol.-Gew. 1200 berechnet 0.9 Mol. NH₃ frei. Eine Abspaltung von Aminosäuren tritt dagegen nicht ein.

²⁰⁾ Manche Aminosäuren geben bei der Methylimid-Bestimmung Blindwerte, so daß die von uns gefundenen Zahlen für N-CH₃ zu hoch sein können.

Durch Adsorption an Aluminiumoxyd lassen sich die Abbaubasen in zwei Hauptfraktionen zerlegen, eine, die als orangefarbene Zone fest adsorbiert, und eine, die leicht eluiert wird. Wir haben sie diesem chromatographischen Verhalten entsprechend als Zonenbase und Eluatbase bezeichnet. Beide lassen sich in amorphe Pikrate und Pikronate überführen. Bei der Hydrolyse des Actinomycins entsteht zuerst die Eluatbase, die durch weitere Säureeinwirkung in die Zonenbase übergeht. Mit Salpetriger Säure entwickeln beide Fraktionen nur sehr wenig Stickstoff, bilden aber rote Nitrosoverbindungen. Die Zonenbase zeigt amphoterer Verhalten; sie läßt sich mit Methanol und Salzsäure verestern.

Bemerkenswert ist das Verhalten der Abbaubasen gegen Reduktionsmittel. Durch Zinn(II)-chlorid werden sie über eine tiefgrüne Zwischenstufe zu einer blaßgelben Leukoverbindung reduziert, die an der Luft unter Durchlaufen der grünen Stufe wieder ihre anfängliche gelbrote Farbe annimmt. Mit Schwefelwasserstoff bleibt die Reduktion auf der grünen Zwischenstufe stehen. Hervorzuheben ist, daß die Grünfärbung viel deutlicher und leichter eintritt als beim Actinomycin C, bei dem wir sie daher erst später aufgefunden haben. In Eisessig hat das grüne Semichinon Banden bei 684, 622 und 568 m μ .

Eine eingehendere Untersuchung der beiden Basen hat ergeben, daß sie Gemische sehr ähnlicher Verbindungen sind. In Übereinstimmung mit der oben erwähnten Beobachtung, daß bei der Salzsäureeinwirkung unter den von uns gewählten Bedingungen keine Aminosäuren abgespalten werden, erhält man bei der energischen Hydrolyse der Abbaubasen die gleichen Aminosäuren wie aus Actinomycin C. Daß nach 20 Min. langer Einwirkung von 6*n* HCl bei 100° noch keine Aminosäuren abgespalten werden, ist bemerkenswert, denn Polypeptide werden nach unseren Erfahrungen unter diesen Bedingungen schon merklich hydrolysiert. Bei einem Hydrolyse-Versuch, bei dem Actinomycin C in einer Mischung aus gleichen Teilen Eisessig und 10-proz. Salzsäure bei 37° aufbewahrt wurde, ließen sich erst nach 2 Wochen *N*-Methyl-valin und *d*-Allo-isoleucin im Papierchromatogramm nachweisen.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft und dem Werk Elberfeld der Farnefabriken Bayer, insbesondere Hrn. Dr. Auhagen, Hrn. Dr. Bohne, Hrn. Dr. Friedrich und Hrn. Dr. Schmid danken wir für weitestgehende Unterstützung, die allein die Durchführung unserer Arbeiten möglich gemacht hat.

Hrn. Prof. Todd, Cambridge, sind wir für kollegialen Erfahrungsaustausch sehr verbunden.

Beschreibung der Versuche

1.) Darstellung und Eigenschaften des Actinomycins C

Nach Untersuchungen von W. Lindenbein²¹⁾ unterscheidet sich unser *Streptomyces*-Stamm morphologisch und physiologisch eindeutig von *Streptomyces antibioticus*, aus dem Waksman das Actinomycin A isoliert hat. Auch mit *Str. flaveolus* und *Str. fulvissimus* ist er nicht identisch, so daß offenbar eine bisher unbekannte Spezies vorliegt.

Die Kultur unseres Stammes wurde bei 28° in P-Kolben, bei Großansätzen im Submersverfahren durchgeführt²²⁾. Die Nährlösung enthielt in 1 l dest. Wasser: 20 g Gly-

²¹⁾ Wird demnächst an anderer Stelle veröffentlicht.

²²⁾ Für die Durchführung dieser Ansätze sind wir dem Werk Elberfeld der Farnefabriken Bayer zu großem Dank verpflichtet.

cerin, 10 g KNO₃, 5 g K₂HPO₄, 5 g NaCl, 5 g MgSO₄·7 H₂O, 0.01 g FeSO₄·7 H₂O. In der braungelben, mit dichtem Mycel bewachsenen Nährlösung der P-Kolben war nach 26 Tagen der Actinomycingehalt auf etwa 100 mg/l angestiegen.

Das Mycel wurde auf grobem Leinen abfiltriert, bei 100° getrocknet und feinvermahlen mit Benzol extrahiert. Die Kulturlösung wurde erschöpfend mit Butylacetat ausgerührt und dieses anschließend i. Vak. verdampft. Den sirupösen Butylacetat-Rückstand vereinigte man mit dem Benzolextrakt des Mycels und filtrierte die so erhaltene Benzollösung durch eine Adsorptionssäule aus Aluminiumoxyd II. Beim Entwickeln des Chromatogramms mit reichlich Benzol erschien ein gelber Vorlauf, dessen Verdampfungsrückstand neben viel Fett ein rotes, wasserlösliches Öl enthält. Es war bakteriostatisch unwirksam und durch einen starken „Erdgeruch“ ausgezeichnet.

Die unterste orangefarbene Zone des Chromatogramms, etwa die Hälfte von dessen Länge ausmachend, enthielt das Actinomycin C. Aus den darüberliegenden braunen Zonen ließen sich schwach wirksame, wasserlösliche, braune Öle eluieren, die nicht näher untersucht wurden.

Die aus der Säule abgetrennte Actinomycin-Zone wurde auf einer Glassinternutsche mit Essigester eluiert und das nochmals filtrierte Eluat fast zur Sirupkonsistenz eingeeengt. Den Rückstand versetzte man sogleich mit dem doppelten Vol. frisch dest. Schwefelkohlenstoffes, aus dem das Actinomycin C nach kurzer Zeit auskristallisierte. Nach Waschen mit Essigester-Schwefelkohlenstoff (1 : 2) und anschließend mit Schwefelkohlenstoff wurde aus Essigester umkristallisiert. An Stelle des Essigesters kann auch Äther, Methanol oder Methylal verwendet werden.

Die bei unseren ersten Versuchen erhaltenen Präparate sind, sofern sie Unterschiede zu den später erhaltenen zeigten, durch den Zusatz (alt) bzw. (neu) gekennzeichnet.

Actinomycin C (neu) schmilzt bei 252° unter Aufschäumen und Dunkelfärbung. Da schon unterhalb des Schmelzpunktes langsam Zersetzung eintritt, wurde stets bei 240° in den Berl-Block eingesetzt und die Temperatur 4°/Min. gesteigert.

Von konz. Schwefelsäure wird das Antibioticum mit roter Farbe aufgenommen, in wäbr. Alkalilauge ist seine Löslichkeit nicht größer als in Wasser. Alkohol. Alkalilauge löst mit brauner Farbe. In Claisen-Lauge ist die Farbe anfangs purpurrot und wird dann schnell braun. Das spezif. Gewicht von Actinomycin C (alt) ist 1.0155.

Löslichkeit von Actinomycin C-Präparaten
(Die Zahlen bedeuten g/100 g Lösungsmittel)

| Actinomycin C (alt) | | Actinomycin C (neu) | |
|----------------------|------|---------------------------|---------|
| Absol. Alkohol | 7 | Absol. Alkohol | 13 |
| Benzol | 27 | Benzol | } > 100 |
| Chloroform | 65 | Chloroform | |
| Aceton | 120 | Aceton | |
| Wasser | 0.14 | Essigester | 0.78 |
| Wasser 98° | 0.05 | Schwefelkohlenstoff | 0.07 |

Abhängigkeit der spez. Drehung von der Konzentration (in Äthanol)

| | | | | | |
|---|------------|------------|-------|-------|-------|
| Konzentrat. in mg/ccm | 5.00 | 2.50 | 1.00 | 0.50 | 0.25 |
| Actinomycin C(alt): $[\alpha]_D^{25}$: | -319° (±3) | -312° | -290° | -250° | -240° |
| Actinomycin C(neu): $[\alpha]_D^{25}$: | | -309° (±3) | | | |

Actinomycin C(alt): C₈₂H₈₈O₁₇N₁₁ (1260.4)

Ber. C 59.00 H 7.12 N 12.22 5 N-CH₃ 5.95, 8 akt. H 0.64

Gef. C 59.03, 59.06 H 7.04, 7.10 N 12.27*, 12.21**) N-CH₃ 5.4 akt. H 0.63

*) Mittelwert aus 2 Bestimmungen von mehrfach umkristallisiertem Präparat, getr. bei 120°/0.01 Torr über P₂O₅.

**) Mehrfach umkristallisiertes, aus Aceton mit Petroläther amorph ausgefälltes und in gleicher Weise getrocknetes Präparat.

Mol.-Gew. nach Rast in Campher: Gef. 705, nach Beckmann in Phenol: gef. 915, nach Barger-Rast in Tetrahydrofuran: gef. 876-944.

Actinomycin C (neu): C₈₀H₈₂O₁₆N₁₁ (1214)

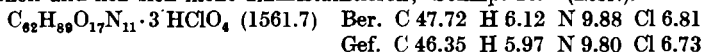
Ber. C 59.75 H 6.91 N 12.70 Gef. C 59.65 H 6.87 N 12.75

Katalytische Hydrierung: In einer Halbmikro-Apparatur verbrauchten 100 mg Actinomycin C (alt) in 7 ccm Eisessig b. Ggw. von 100 mg Pt-Katalysator (Adams-Shriner) 1.8 ccm Wasserstoff. In einem zweiten Versuch wurden von 208.9 mg Actinomycin C (alt) in 8 ccm Eisessig mit 100 mg Pt-Katalysator 4.3 ccm Wasserstoff aufgenommen. In einer Differential-Apparatur nahmen 330.9 mg Actinomycin C (neu) in 5 ccm Eisessig mit 200 mg Katalysator 6.1 ccm Wasserstoff auf (Abbild. 2). Die aus dem Wasserstoffverbrauch ber. Werte für das Mol.-Gew. sind 1280, 1110, 1218 (± 25).

Aufarbeitung des Hydrierungsproduktes: Die essigsäure KÙpe von 278 mg Actinomycin C (neu) wurde durch eine Nutsche vom Katalysator abgesaugt. Hydriergefäß und Nutsche spülte man mit Benzol gut nach. In der Saugflasche befanden sich bereits 200 ccm Benzol, die nach der Filtration mit 200 ccm Wasser unterschichtet wurden. Die hellgelbe Lösung hatte schon wenige Sek. nach der Filtration wieder einen rotgelben Farbton angenommen; weder während der Hydrierung, noch während der Rückoxydation konnten tiefergefärbte Zwischenstufen beobachtet werden. Nach Stehen über Nacht wurde das Benzol vom schwach hellgelben Wasser abgetrennt, noch zweimal mit Wasser und schließlich mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, dann mit Natriumsulfat getrocknet und durch eine Säule von Aluminiumoxyd filtriert. Abgesehen von einer äußerst schmalen braunen Zone am oberen Ende zeigte das adsorbierte Actinomycin kein Zeichen von Uneinheitlichkeit. Nach Elution mit Methanol und dessen Verjagen i. Vak. nahm man in wenig Essigester auf, engte fast zur Sirupkonsistenz ein und fügte das zehnfache Volumen Schwefelkohlenstoff hinzu. Die abgeschiedenen Kristalle wogen nach dem Trocknen 256 mg (= 92% des Ausgangsmaterials), zeigten einen Schmp. von 250.5 (korr.) und keine Schmp.-Erniedrigung mit Actinomycin C (neu). Zur Kontrolle wurden 221 mg Actinomycin C in Eisessig gelöst und ohne Hydrierung in derselben Weise aufgearbeitet, wobei 210 mg (95% des Ausgangsmaterials) wiedererhalten werden konnten.

2.) Derivate des Actinomycins C

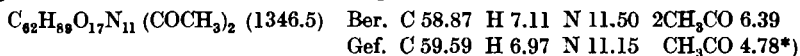
Perchlorat: Eine unter Erwärmen hergestellte Lösung von 175 mg Actinomycin (alt) in 0.5 ccm Butanol wurde nach dem Abkühlen mit 0.16 ccm 50-proz. Perchlorsäure versetzt. Das in feinen, roten Nadeln auskristallisierte Salz (180 mg) wurde mit Äther ausgewaschen und ließ sich nicht umkristallisieren; Schmp. 192° (korr.).



Ein in ähnlicher Weise gewonnenes Perchlorat von Actinomycin C (neu) enthielt 6.18% Cl. Äquiv.-Gew. durch konduktometr. Titration: Ber. 517, gef. 542.

Acetylierungsversuche: Je 50 mg Actinomycin C (alt) wurden in 2 ccm Acetanhydrid gelöst und eine Probe mit 1 ccm Pyridin, die andere mit 200 mg entwässertem Natriumacetat versetzt. Darauf wurde 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht und im Vakuumexsiccator über Kaliumhydroxyd eingedunstet. In beiden Fällen konnte unverändertes Actinomycin in fast quantitativer Ausbeute wieder erhalten werden. Die Acetylbestimmung lieferte keinen über den Blindwert hinausgehenden Betrag. Erwärmen in Acetanhydrid unter Zusatz von einer Spur konz. Schwefelsäure ergab nach Zersetzen mit Wasser und Ausäthern nur schmierige, braune Zersetzungsprodukte.

Leukoacetat: Eine Lösung von 200 mg Actinomycin C (alt) in 2 ccm Acetanhydrid wurde mit 500 mg Zinkstaub und einem Tropfen Pyridin versetzt. Nachdem, befördert durch kräftiges Schütteln, die Lösung hellgelb geworden war, filtrierte man vom Zinkstaub ab und ließ die hellgelbe Lösung im Vakuumexsiccator über viel Kaliumhydroxyd eindunsten. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen, die Lösung mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, auf 10 ccm eingeeengt und mit 20 ccm Schwefelkohlenstoff versetzt. Die ausgeschiedenen Kristalle (140 mg), hellgelbe, rechteckige Täfelchen, wurden mit Petroläther gewaschen; Schmp. 253° korr.



*) Verseifung mit 30-proz. Schwefelsäure, Apparatur nach Kög1-Postowski (A. 440, 34 [1924]).

3.) Gegenstrom-Verteilung von Actinomycin C

In den Lösungsmittelpaaren Benzol-Essigsäure, Butanol-Essigsäure und Ameisensäure-Methylenchlorid gab Actinomycin C (neu) bei der Gegenstrom-Verteilung in einer 40-stufigen Glasapparatur nach Grubhofer¹⁰⁾ die einer reinen Substanz zukommende Verteilungskurve. Das für eine Trennung geeignete Paar Äther-Salzsäure (5.56%) hat den Nachteil, daß sich das Antibioticum nur zu 0.1% in jeder Phase löst. Immerhin konnten durch Verwendung einer Glasapparatur, die 800 ccm Lösungsmittel je Stufe faßt, 80 mg Substanz einer 40stufigen Verteilung unterworfen werden, so daß die erhaltenen Spitzenfraktionen zu Hydrolyseversuchen ausreichten. Die Fraktionen 19–25 wurden vereinigt und in einer 100 ccm-Apparatur erneut über 40 Stufen verteilt, wobei sich die in Kurve I (Abbild. 3) durch eine Unsymmetrie bei Stufe 22–24 angedeutete Komponente bereits als distinktives Maximum zu erkennen gibt. Um den Actinomycingehalt der einzelnen Verteilungsstufen zu bestimmen, wurde das Lösungsmittel-Gemisch neutralisiert, wodurch sich das Antibioticum quantitativ in die Ätherschicht überführen ließ, in der es stufenphotometrisch bestimmt wurde. Die bei 2 cm Schichtdicke und 450 μ gemessene Extinktion der einzelnen Stufen ist in der Zeichnung der Verteilungskurve als Maß für die Actinomycin-Konzentration gewählt.

4.) Energetische Säurehydrolyse des Actinomycins C

Mit Salzsäure: 487 mg Actinomycin C (alt) wurden mit 3 ccm konz. Salzsäure in einem zu einer groben Capillare ausgezogenen und zugeschmolzenen Glasrohr 9 Stdn. auf 125° erhitzt. Dann wurde über die Capillare ein Gummischlauch gezogen, der mit einem mit Barytwasser gefüllten Peligot-Rohr verbunden war, und die Capillare im Schlauch abgebrochen. Durch Anlegen von Vakuum wurde der Gasinhalt des Rohres durch das Peligot-Rohr gesaugt. Nachdem kohlendioxid-freie Luft eingelassen war, wurde in der gleichen Weise wiederum evakuiert. Durch eine nochmalige Wiederholung dieser Maßnahme wurde das im Reaktionsgefäß befindliche Kohlendioxid vollständig in die Barytlösung überführt; es fällte hier 51.8 mg Bariumcarbonat aus (0.75 Mol. CO₂/1 Mol. Farbstoff). Der aus der Reaktionslösung ausgefallene schwarzbraune Niederschlag wurde abfiltriert. Er wog trocken 103 mg (24% des Ausgangsmaterials). Das mit wenig Tierkohle entfärbte Filtrat des Niederschlages hinterließ beim Eindampfen einen farblosen, kristallinen Rückstand, dessen Gewicht nach Trocknen über Phosphorpentoxid 334 mg betrug (69% des Ausgangsmaterials). Dieser Rückstand enthielt 3.3% Amino-Stickstoff und zeigte die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{25}$: -47.8°.

Um den Ammoniumchloridgehalt des Rückstandes zu bestimmen, wurden 67.5 mg (entspr. 97.2 mg Ausgangsmaterial) mit 1 ccm 50-proz. Platinchlorwasserstoffsäure übergeben und zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit absol. Alkohol in einen gewogenen Porzellanfiltertiegel übergespült und mehrmals nachgewaschen. Das zurückgebliebene gelbe Kristallinat wog getrocknet 25.82 mg, Nach Verglühen des Salzes hinterblieben 18.0 mg Platin (entspr. 2.06 mg Ammoniak-Stickstoff). Das Chloroplatinat enthielt also nur Ammoniak und keine anderen Basen. Seine Menge entspricht 1.78 Mol. NH₃ pro Mol. Farbstoff.

Mit Schwefelsäure: 6.18 g Actinomycin C (alt) wurden in 40 ccm 30-proz. Schwefelsäure unter Rückfluß 36 Stdn. auf 110° erhitzt. Das obere Ende des Kühlers war mit einem geräumigen, mit Barytwasser gefüllten Peligot-Rohr verbunden. Die Reaktionslösung wurde nach kurzem Erhitzen dunkelgrün. Wie beim vorhergehenden Versuch wurde das entwickelte Kohlendioxid quantitativ in das Barytwasser überführt. Der Menge Bariumcarbonat (607 mg) entsprechend waren aus 1 Mol. Farbstoff 0.72 Mol. Kohlendioxid entstanden.

Das Trockengewicht des aus der Reaktionslösung abfiltrierten schwarzen Niederschlages war 1.4 g (23% des Ausgangsmaterials). Die vakuumtrockene Substanz zeigte folgende Analysenzahlen: C 54.53, H 5.11, N 6.22 und N-Methyl 1.00. Das mit Bariumhydroxyd von Schwefelsäure befreite Filtrat dieses Niederschlages hinterließ beim Verdampfen einen weißen, kristallinen Rückstand (3.9 g nach Trocknen i. Hochvak., entspr. 63% des Ausgangsmaterials). Dieses Produkt, im folgenden als Aminosäure-Gemisch bezeichnet, diente als Ausgangsmaterial für die folgenden Trennungsversuche.

Fraktionierung des Aminosäure-Gemisches: 1.93 g des Gemisches wurden mit 4 ccm 99-proz. Alkohol zu einem Brei verrührt und in einem Extraktionsapparat mit 20 ccm Alkohol 10 Min. ausgezogen. Der kristalline Rückstand in der Extraktionshülse wog 0.83 g (R I). Der Verdampfungsrückstand des Extraktes (1.10 g) wurde zweimal mit je 10 ccm 99-proz. Alkohol digeriert, wobei 90 mg Rückstand vom Schmp. 235° hinterblieben (R II). Nach zweimaligem Umkristallisieren dieser Substanz wurden 15 mg einer gut kristallisierten Fraktion vom Schmp. 245–255° erhalten, die positive Biuret- und Ninhydrin-Reaktion gab und im Papierchromatogramm den gleichen R_F -Wert zeigte wie Threonin.

Das Filtrat von R II wurde mit 30 ccm gesätt. alkohol. Cadmiumchlorid-Lösung versetzt. Der ausgefallene weiße Niederschlag wurde in 40 ccm Wasser gelöst, das Cadmium durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in der Siedehitze entfernt und das Filtrat vom Cadmiumsulfid-Niederschlag auf ein kleines Volumen eingeeengt. Diese Lösung schüttelte man solange teilweise mit einer Lösung von Reinecke-Säure in Äther, bis der Äther nicht mehr entfärbt wurde. Der ausgefallene voluminöse Niederschlag vom Schmp. 189° wurde aus Aceton-Wasser umkristallisiert. Man erhielt so 257 mg Reineckat vom Schmp. 198°, das nach dem Zerlegen mit 2*n* HCl und Ausäthern der Reinecke-Säure *l*-Prolin lieferte, das sich im Papierchromatogramm als einheitlich erwies. Nach Umkristallisieren aus Isopropylalkohol Schmp. 212°, $[\alpha]_D^{17}$: -78° (Wasser); Ausb. 60 mg, Schmp. des Pikrates 146°.

Das rote Filtrat des Prolin-Reineckates wurde angesäuert, erschöpfend mit Äther ausgezogen, um die Reinecke-Säure zu entfernen, und dann bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Der Rückstand, der im Papierchromatogramm neben wenig Prolin eine Substanz mit dem R_F des Valins zeigte, wurde nach einiger Zeit kristallin. Beim Umkristallisieren aus Alkohol erhielt man in kleiner Menge farblose Nadeln vom Schmp. 160°, die eine rote Ninhydrin-Reaktion gaben, keinen Amino-Stickstoff enthielten und beim Erwärmen mit Natriumhypochlorit intensiven Geruch nach Methylamin entwickelten.

Der Rückstand R I wurde im Extraktionsapparat aus 96-proz. Alkohol umkristallisiert und bei 170°/0.01 Torr sublimiert. Dabei hinterblieb kein nennenswerter Rückstand. Das Sublimat (533 mg) zeigte im Papierchromatogramm (*o*-Kresol) zwei Flecke mit den R_F -Werten des Isoleucins und Valins. Es wurde in 10 ccm 2*n* NaOH gelöst und unter Eiskühlung teilweise mit einer äther. Lösung von 3,5-Dinitro-benzoylchlorid umgesetzt²³). Als die Reaktionslösung auf p_H 4 gebracht wurde, schieden sich Kristalle aus. Das Filtrat stellte man nun auf p_H 3 ein, woraufhin wiederum eine kristalline Fällung auftrat. Die bei p_H 4 erhaltene Fraktion hatte nach zweimaligem Umkristallisieren aus 20-proz. Essigsäure den Schmp. 186°.

Das bei p_H 3–4 ausgefallene Dinitrobenzoat bildete nach zweimaligem Umkristallisieren aus 30-proz. Essigsäure unregelmäßige Täfelchen (80 mg) vom Schmp. 178° (Schmp. von Isoleucin-3,5-dinitro-benzoat 170.4°). Nach 2stdg. Hydrolyse mit 20-proz. Salzsäure und Entfernung der Dinitrobenzoesäure wurden 15 mg einer farblosen Verbindung mit dem Schmp. 247° und $[\alpha]_D^{17}$: -14.4° (Wasser) erhalten, die sich im Papierchromatogramm wie Isoleucin verhielt.

In einem anderen Versuch wurden 300 mg Aminosäure-Gemisch kurz mit Alkohol extrahiert und darauf im Extraktionsapparat 6mal aus 99-proz. Alkohol umkristallisiert. Das so erhaltene Kristallisat (70 mg) gab eine intensive Ninhydrin-Reaktion; Schmp. 276°, $[\alpha]_D^{17}$: -15.2° (Wasser).

$C_6H_{13}O_2N$ (131.2) Ber. C 54.94 H 9.99 N 10.68 Amino-N 10.62

Gef. C 54.31 H 9.69 N 11.00 Amino-N 10.19, Mol.-Gew. 117
(ebullioskop. in Eisessig)

Präparative Trennung der Aminosäuren durch Papierchromatographie

Das verwendete Aminosäure-Gemisch enthielt 9.6% Gesamt-Stickstoff, 3.1% Amino-Stickstoff und 5.1% *N*-Methyl. Von einer 4-proz. wäßr. Lösung dieses Gemisches wurden 0.25 ccm, enthaltend 10 mg Aminosäuren, mit einer feinen Pipette auf einen Filtrierpapier-Bogen (Whatman Nr. 1) entlang einer Linie aufgetragen, die in 7 cm Abstand dem breiteren Rand des Bogens parallel lief. Anfang und Ende des Striches waren 3 cm

²³) G. B. Town, Biochem. Journ. 35, 578 [1941].

von den Schmalseiten entfernt. Nach dem Trocknen wurden je 10 solcher Bogen mit der dem Aminosäure-Streifen benachbarten Kante in den mit frisch über Zinkstaub destilliertem wassergesättigten *o*-Kresol gefüllten Trog²⁴) des Chromatogramm-Kastens gehängt. Durch Einschieben von 5 mm starken Glasstäben zwischen die Bogen (Abbild. 4, S. 270) ließ sich eine gegenseitige Berührung verhindern.

Nachdem das Kresol den unteren Rand der Bogen erreicht hatte, wurden diese zunächst bei Raumtemperatur vorgetrocknet und dann bei 105° vom restlichen Kresol befreit. Zur Erzielung guter Chromatogramme war es wichtig, während der Laufzeit des Lösungsmittels die Temperatur im Kasten auf 2° konstant zu halten.

Nach dem Entwickeln mit Ninhydrin (0.4-proz. Lösung in Butanol) zeigten solche Bogen fünf parallel zur Lösungsmittelfront verlaufende, gewellte und gezackte Bänder von 3 cm Breite. Zur Gewinnung der Aminosäuren wurden auf jedem Bogen nur zwei 5 mm breite Leitstreifen in der Laufrichtung des Lösungsmittels mit Ninhydrin-Lösung besprüht und entwickelt, nach denen die Aminosäure-Bänder ausgeschnitten wurden. Je 30–40 gleichartige wurden mit einer Klammer zu einem Bündel zusammengenommen und durch Einhängen einer Schmalseite in einen mit Wasser gefüllten Trog erschöpfend eluiert, was etwa 5 Stdn. dauerte. Die eingedampften Eluate wurden aus wenig Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert.

Die einzelnen Bänder und die daraus eluierten Fraktionen sind im folgenden nach steigendem R_F -Wert von I–VI numeriert. Band I enthält das Threonin. Die Bänder II, III und IV mit Sarkosin, Valin und Isoleucin überlappten sich häufig. Sie wurden daher zusammen als ein Streifen ausgeschnitten und eluiert. Das Eluat chromatographierte man erneut in der eben beschriebenen Weise, wobei aber Butanol–20-proz. Essigsäure als Phasenpaar gewählt wurde. Dabei entwickelten sich gut getrennte Zonenbänder. Band V enthielt Prolin, Band VI das *N*-Methyl-valin.

l-Threonin: Aus 600 mg Aminosäure-Gemisch erhielt man auf 30 Bogen nur 10 mg Fraktion I. Sublimation bei 100°/0.01 Torr lieferte ein kristallisiertes Sublimat vom Schmp. 240–242°; $[\alpha]_D^{25}$: + 7° (Wasser).

$C_4H_9O_3N$ (119.1) Ber. C 40.33 H 7.62 N 11.76 Gef. C 40.52 H 7.91 N 11.58

Oxydation mit Perjodsäure nach Nicolet²⁵) ergab Acetaldehyd, der als 2.4-Dinitro-phenylhydrazon vom Schmp. 146° identifiziert wurde. Mit synthet. Acetaldehyddinitrophenylhydrazon keine Schmp.-Erniedrigung.

Der mikrobiologische Test des Aminosäure-Gemisches ergab einen Gehalt von 4.3% *l*-Threonin. Bei einer Probehydrolyse, bei der 400 mg Actinomycin C von vornherein mit 100 mg *d,l*-Threonin versetzt worden waren, so daß im Hydrolysat 17.6% *l*-Threonin zu erwarten waren, wurden 15.6% gefunden.

Sarkosin: Wie erwähnt, konnten die Bänder II, III und IV durch Chromatographie mit *o*-Kresol nicht völlig aufgetrennt werden. Das Gemisch dieser drei Fraktionen wurde daher nochmals chromatographiert, wobei als mobile Phase Butanol diente, welches durch Schütteln mit 20-proz. Essigsäure gesättigt worden war. Die Reihenfolge der Zonen blieb dabei die gleiche.

Durch Elution von 100 Bändern der Fraktion II konnten 12 mg eines Kristallisates gewonnen werden, das mit Natriumhypochlorit-Lösung deutlichen Geruch nach Methylamin gab. Die Fraktion wurde papierchromatographisch durch Vergleich mit reinem Sarkosin als solches identifiziert.

R_F -Werte in verschiedenen Lösungsmitteln

| | Frakt. II | Sarkosin | | Frakt. II | Sarkosin |
|---------------------|-----------|-----------|------------------------|-----------|----------|
| Kresol | 0.35 | 0.34 | Phenol | 0.74 | 0.73 |
| Butanol-Essigsäure | 0.23 | 0.17–0.21 | sek. Butanol | 0.84 | 0.84 |
| Benzylalkohol . . . | 0.09 | 0.08 | Collidin | 0.08 | 0.08 |

$C_3H_7O_2N$ (89.2) Ber. C 40.44 H 7.92 N 15.72 Gef. C 40.43 H 7.89 N 15.64

²⁴) Wir verwendeten 50 cm lange, 3–5 cm breite und 5 cm hohe Tröge mit trapezförmigem Querschnitt aus glasiertem Steingut, die in einer Töpferei angefertigt waren.

²⁵) L. A. Shinn u. B. H. Nicolet, Journ. Biol. Chem. 188, 91 [1941].

Das Gemisch der Fraktionen II, III und IV enthielt 0.9% *N*-Methyl. Daraus berechnet sich ein Sarkosingehalt von 5.5%.

d-Valin: Fraktion III, die durch Hochvakuum-Sublimation gereinigt wurde, fiel ebenfalls nur in sehr geringer Menge an. R_F -Wert in *o*-Kresol 0.52, in Butanol-20-proz. Essigsäure 0.41, in Übereinstimmung mit dem zum Vergleich untersuchten *d,l*-Valin. Schmp. 296°; $[\alpha]_D^{25}$: +5.8° (Wasser), -24.9° (20-proz. Salzsäure).

$C_5H_{11}O_2N$ (117.14) Ber. C 51.26 H 9.47 N 11.96 Gef. C 51.13 H 9.61 N 12.02

Beim mikrobiologischen Test des Gemisches der Fraktionen II, III und IV war kein *l*-Valin festzustellen (Erfassungsgrenze 0.2%), wohl aber in einer Menge von 2%, nachdem durch Erhitzen mit heißgesättigter Bariumhydroxyd-Lösung (12 Std. bei 105°) racemisiert worden war. Im nunmehr optisch inaktiven Gemisch der drei Fraktionen müssen also ursprünglich 4% *d*-Valin vorhanden gewesen sein.

d-Allo-iso-leucin: Aus 800 mg Aminosäure-Gemisch wurden auf 80 Bogen Filtrierpapier mit *o*-Kresol als mobiler Phase 184 mg kristallisiertes Gemisch der Fraktionen II, III und IV erhalten. Bei der Chromatographie des Gemisches auf 12 Bogen mit Butanol-20-proz. Essigsäure erhielt man aus Fraktion IV nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser und Hochvakuum-Sublimation 32 mg gut kristallisierte Aminosäure mit süßem Geschmack. Schmp. 284°; $[\alpha]_D^{25}$: -15.6° (Wasser), -31.8° (20-proz. Salzsäure, $c=2.7$).

$C_6H_{13}O_2N$ (131.2) Ber. C 54.94 H 9.99 N 10.68 Gef. C 55.07 H 9.99 N 10.65

Phenylisocyanat-Verbindung: 6 mg der Aminosäure wurden in 0.5 ccm 0.2 *n* NaOH unter Eiskühlung mit 10 mg Phenylisocyanat geschüttelt, bis dessen Geruch verschwunden war. Nach Zusatz von etwas Tierkohle filtrierte man vom ausgefallenen Niederschlag ab und gab zum Filtrat 0.55 ccm 0.2 *n* HCl. Die nach einiger Zeit ausgeschiedenen Kristalle wurden aus Verd. Alkohol umkristallisiert; Schmp. 157°. E. Abderhalden und W. Zeisset geben den Schmp. 151° an²⁶.

Naphtylisocyanat-Verbindung: Sie wurde analog der vorstehenden Verbindung dargestellt; Schmp. 167–168°. Abderhalden und Zeisset fanden den Schmp. 168°²⁶.

Formyl-Verbindung: 20 mg der Aminosäure wurden in 1 ccm wasserfreier Ameisensäure unter Feuchtigkeitsabschluß drei Std. auf 100° erhitzt. Nachdem die Säure i. Vak. abgedampft war, wurde der Rückstand in wenig Ameisensäure aufgenommen und diese wiederum verdampft. Diese Behandlung wurde noch ein zweites Mal wiederholt. Den i. Vak. über Kaliumhydroxyd getrockneten Rückstand extrahierte man mit einigen ccm Essigester, filtrierte vom Ungelösten ab und engte auf 0.5 ccm ein. Nach Zusatz des doppelten Volumens Petroläther schieden sich Kristalle aus, die nach nochmaligem Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther unscharf gegen 125° schmolzen. Abderhalden und Zeisset fanden den Schmp. 126°²⁶.

Abbau mit Ninhydrin: 10 mg Aminosäure wurden nach K. Löhr²⁷) abgebaut und lieferten ein optisch aktives 2.4-Dinitro-phenylhydrazon vom Schmp. 130°.

l-Prolin: Fraktion V zeigte den R_F -Wert des Prolins und die für diese Aminosäure charakteristische Gelbfärbung mit Ninhydrin. Der Verdampfungsrückstand des Eluates aus 50 Bögen Filtrierpapier wurde in wenig heißem absol. Alkohol gelöst und mit Äther wieder ausgefällt. Das so erhaltene, stark hygroskopische Produkt wurde i. Hochvak. sublimiert und dann aus Wasser umkristallisiert; Ausb. 60 mg. Schmp. 218°, $[\alpha]_D^{25}$: -75.4° (Wasser). Das bei 199° schmelzende Reineckat gab mit Prolin-Reineckat keine Schmp.-Erniedrigung.

Aus dem Aminosäure-Gemisch, das nach dem mikrobiologischen Test 20% Prolin enthält, ist dieses auch ohne Anwendung der Chromatographie leicht zu isolieren, indem man das Gemisch mit Alkohol kurz extrahiert, die alkohol. Lösung eindampft, in wenig Wasser aufnimmt und mit Reinecke-Salz in schwach salzsaurer Lösung fällt. Das Reineckat wird in der üblichen Weise zerlegt.

$C_5H_9O_2N$ (115.1) Ber. C 52.16 H 7.88 N 12.17 Gef. C 50.5 H 7.85 N 12.49

N-Methyl-*l*-valin: Fraktion VI, das unterste Band des Chromatogrammes färbte sich auf dem Papier beim Besprühen mit 0.1-pröz. benzolischer Lösung von *p*-Nitro-

²⁶) Ztschr. physiol. Chem. 195, 121 [1931].

²⁷) Biochem. Ztschr. 320, 115 [1950].

benzoylchlorid und anschließend Betupfen mit Pyridin vorübergehend kirschrot (Reaktion von E. Waser²⁸⁾). R_F -Werte: Kresol 0.85, Benzylalkohol 0.40, Collidin 0.40. Mit einem synthet. *N*-Methyl-*d,l*-valin wurden die gleichen Werte erhalten. Schmp. 290°, $[\alpha]_D^{25}$: +16.5° (Wasser), +28.6° (10*n* HCl). Pl. A. Plattner und U. Nager²⁹⁾ fanden $[\alpha]_D^{25}$: +17.5 (Wasser), +30.9 (5*n* HCl).

$C_8H_{13}O_2N$ (131.2) Ber. C 54.94 H 9.99 N 10.68 *N*-CH₃ 11.93
Gef. C 54.61 H 9.69 N 10.39 *N*-CH₃ 12.05

5.) Energetische Säurehydrolyse des Actinomycins C unter reduzierenden Bedingungen

a) Hydrolyse mit Salzsäure und Zinn(II)-chlorid: 230 mg Actinomycin C in 4 ccm konz. Salzsäure wurden nach Zugabe von 160 mg Zinn(II)-chlorid 16 Stdn. im Bombenrohr unter Stickstoff auf 90° erwärmt. Die anfangs gelbe Lösung wurde bald rot und ein roter Niederschlag fiel aus. Nach beendeter Reaktion wurde das Hydrolysat erschöpfend mit Butanol extrahiert, das alle gefärbten Anteile aufnahm. Die Butanollösung schüttelte man zweimal mit 0.1*n* HCl durch. Die wäbr.-salzsaure Phase dieser Verteilung wurde mit der durch Schwefelwasserstoff vom Zinn befreiten Hydrolysenflüssigkeit vereinigt und i. Vak. über Kaliumhydroxyd eingedunstet. Der Rückstand zeigte im Papierchromatogramm die sechs im Actinomycin C enthaltenen Aminosäuren.

Die gelbrote Butanollösung schüttelte man zur Oxydation u. U. vorhandener Leukoverbindungen mit 1 ccm 0.5-proz. Wasserstoffperoxyd, wobei sich die Farbe der Lösung erheblich vertiefte. Die mit Wasser gewaschene Butanollösung wurde i. Vak. zur Trockne verdampft und die Chloroformlösung des Rückstandes durch eine Säule von Kieselgel filtriert. Durch fraktionierte Elution mit Benzol-Äthanol (1 : 1) wurde eine Fraktion erhalten, die beim Eindampfen ein rotes Pulver hinterließ. Dieses Produkt lieferte nach 24stdg. Hydrolyse mit konz. Salzsäure ein Hydrolysat, das im Papierchromatogramm keine Aminosäureflecken zeigte.

b) Hydrolyse mit Jodwasserstoff-Eisessig: Eine Lösung von 170 mg Actinomycin C (neu) in einer Mischung aus 5 ccm Eisessig und 3 ccm Jodwasserstoffsäure wurde nach Zusatz von 0.8 g Phosphoniumjodid 12 Stdn. im geschlossenen Rohr auf 100° erhitzt. Die Lösung wurde durch das Phosphoniumjodid sogleich hellgelb und behielt diese Farbe während der ganzen Reaktionsdauer.

Der beim Eindampfen i. Vak. hinterbliebene ölige Rückstand wurde zwischen 10 ccm Wasser und 10 ccm Benzol verteilt, wobei die farbigen Anteile in die Benzolphase gingen. Beim Filtrieren der mit Natriumsulfat getrockneten Benzollösung durch eine Säule von Kieselgel bildete sich eine schmale braune Zone, während die Hauptmenge die Säule als intensiv blau fluoreszierendes Filtrat verließ. Beim Verdampfen hinterließ es farblose Nadeln, die nach Umkristallisieren aus Petroläther bei 114–115° schmolzen. Nach 24stdg. Kochen mit konz. Salzsäure waren im Hydrolysat dieser Fraktion papierchromatographisch keine Aminosäuren nachzuweisen. Die vom Benzol abgetrennte wäbr. Phase versetzte man mit überschüss., heiß gesätt. Silberacetat-Lösung, filtrierte den ausgefallenen Niederschlag ab und verdampfte, nachdem zuvor das Silber mit Schwefelwasserstoff entfernt war, das Filtrat zur Trockne. Im Papierchromatogramm des farblosen kristallisierten Rückstandes fehlte der Threonin-Fleck, während die übrigen im Salzsäure- und Schwefelsäure-Hydrolysat nachgewiesenen Aminosäuren vorhanden waren.

6.) Milde Säurehydrolyse des Actinomycins C

Ammoniakbestimmung: Eine Lösung von 598 mg Actinomycin C (neu) in 12 ccm 6*n* HCl wurde 25 Min. auf 100° erhitzt, dann auf 60 ccm verdünnt und 8 Stdn. im Perforator mit Äther extrahiert. Der Äther hinterließ beim Verdampfen keinen wägbaren Rückstand. Das Hydrolysat wurde i. Vak. verdampft und der Rückstand in Borat-Puffer vom p_H 10 aufgenommen. Diese Lösung wurde im Kjeldahl-Apparat im Wasserdampf-Strom destilliert und das entweichende Ammoniak in einer Vorlage in 0.1*n* HCl aufgefangen; gef. 5.9 mg NH₃ (0.89 Mol.).

²⁸⁾ Helv. chim. Acta 7, 757 [1924].

²⁹⁾ Helv. chim. Acta 31, 3194 [1948].

Hydrolyse mit Eisessig-Salzsäure: Eine Lösung von 200 mg Actinomycin C (neu) in 20 ccm eines Gemisches aus gleichen Volumina Eisessig und 10-proz. Salzsäure wurde bei 37° aufbewahrt. In größeren Zeitabständen wurde 1 ccm abpipettiert und im Vakuumexsiccator über Kaliumhydroxyd zur Trockne verdampft. Ein Teil des roten, lackartigen Rückstandes wurde im zweidimensionalen Papierchromatogramm mit Phenol und Collidin als mobile Phasen untersucht. Nach zwei Wochen traten schwache Flecken von *N*-Methyl-valin und Allo-isoleucin auf, die im Laufe der folgenden Woche immer deutlicher wurden. Nach einer Hydrolysendauer von etwa 8 Wochen erschienen im Papierchromatogramm auch die Flecken der anderen Aminosäuren und wurden im weiteren Verlauf der Spaltung stärker. Die roten Bestandteile des Hydrolysates hatten immer den R_F-Wert 1. Nach 16 Wochen wurde die Hydrolyse abgebrochen, der Rest der tiefroten Reaktionslösung im Exsiccator verdampft und der Rückstand zunächst erschöpfend mit Chloroform, dann mit Aceton und schließlich mit Butanol ausgezogen. Geringe Mengen eines schwarzen, pulvrigen Rückstandes hinterblieben als unlöslich in Butanol.

Alle drei Fraktionen waren rotbraune, amorphe Produkte, die mit Zinn(II)-chlorid eine intensive Grünfärbung zeigten. Im Papierchromatogramm erwiesen sie sich als frei von beigemengten Aminosäuren. Wurden sie 24 Stdn. mit 20-proz. Salzsäure gekocht, so entstand wie beim Actinomycin C ein schwarzer, melaninähnlicher Niederschlag und im Chromatogramm konnten noch alle Aminosäuren des Actinomycins C nachgewiesen werden.

Die farbigen Abbauprodukte der milden Salzsäure-Hydrolyse: 1 g Actinomycin C (alt) wurde mit 10 ccm 20-proz. Salzsäure 20 Min. auf 105° erwärmt. Nachdem i. Vak. zur Trockne verdampft war, wurde die Lösung des Rückstandes in 10 ccm Wasser durch eine Säule von Aluminiumoxyd (Länge 10 cm, Durchmesser 2 cm) filtriert und ausgiebig mit 0.1 *n* HCl nachgewaschen. Es bildete sich eine gelbrote, fest haftende Zone und ein gelbes Filtrat. Das i. Vak. auf 20 ccm eingeengte Filtrat fällte man mit überschüss. Sublimatlösung und zerlegte den abzentrifugierten Niederschlag mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat des Quecksilbersulfid-Niederschlags hinterließ beim Verdampfen das Hydrochlorid der Eluatbase. Durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser entstand aus dem Hydrochlorid die Base, ein gelbbraunes Pulver, das sich in Pyridin, Eisessig, weniger gut in Butanol löste, in Wasser dagegen unlöslich war. Aus der wäbr. Lösung des Hydrochlorides fiel auf Zusatz von Goldchlorwasserstoffsäure ein orangeroter Niederschlag, der aus heißem Alkohol umgelöst wurde.

Gef. C 44.85 H 5.59 N 8.59 Au 17.5

Durch Umsetzen der wäbr. Lösung des Hydrochlorides mit Pikrolonsäure ließ sich ein gelbbraunes, amorphes Pikrolonat gewinnen.

Gef. C 53.77 H 5.98 N 13.95; Amino-N 0.45

Versetzt man die Eluatbase oder ihr Hydrochlorid in Eisessig mit dem gleichen Volumen gesätt. Natriumnitrit-Lösung und verdünnt nach einigen Minuten mit dem 20fachen Vol. Wasser, so fällt ein braunroter Niederschlag aus, der in der von Feigl³⁰⁾ angegebenen Ausführung als Tüpfelreaktion eine positive Liebermannsche Nitroso-Reaktion zeigt.

Die gelbrote Zone des Hydrolysates wurde mit Pyridin-Wasser (1 : 1) eluiert, das Eluat zur Trockne verdampft und die konz. wäbr. Lösung des Rückstandes mit Pikrolonsäure-Lösung versetzt. Das ausgefallene Pikrolonat zerlegte man mit 2 *n* HCl, schüttelte die Pikrolonsäure mit Benzol aus und verdampfte die wäbr. Phase. Der Rückstand wurde erneut in das Pikrolonat übergeführt.

Gef. C 53.55 H 6.15 N 13.78 Amino-N 0.43

Verbesserte Darstellung der Abbaubasen: Um die Eluatbase, die bei längerer Einwirkung der Säure in die Zonenbase übergeht, in besserer Ausbeute zu erhalten, wurde die mit 6 *n* HCl bei 100° angesetzte Hydrolyse des Actinomycins nach 5 Min. unterbrochen, die Salzsäure i. Vak. verjagt und der Rückstand zweimal mit Wasser ausgezogen, das die Spaltbasen aufnahm. Unverändertes Actinomycin, das ungelöst zurückblieb,

³⁰⁾ F. Feigl, V. Anger u. O. Frehden, Mikrochem. 15, 181 [1934].

wurde erneut in gleicher Weise hydrolysiert und die Behandlung wiederholt, bis alles Ausgangsmaterial umgesetzt war. Das wäbr. Hydrolysat wurde durch eine Aluminiumoxyd-Säule filtriert und die Säule so lange mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat nur noch schwach gelblich gefärbt war. Zur restlosen Entfernung der Zonenbase wurde das Filtrat nochmals durch eine Aluminiumoxydsäule gegeben. Das Filtrat dieser Adsorption machte man mit Natronlauge schwach alkalisch und schüttelte mit Essigester aus. Anschließend wurde mit verd. Salzsäure angesäuert und die Eluatbase mit Chloroform ausgeschüttelt. Die getrocknete Chloroformlösung hinterließ beim Verdampfen das Hydrochlorid der Eluatbase. Aus seiner konz. Lösung in Methanol fiel bei Zusatz von gesätt. Pikrinsäure-Lösung das orangerote Pikrat, das zur Reinigung in Chloroform gelöst und durch Zugabe von Äther als flockiger, orangeroter Niederschlag wieder ausgefällt wurde.

Die Zonenbase wurde aus Actinomycin C (neu) so dargestellt, daß die Hydrolyse mit azeotroper Salzsäure im Wasserbad nach 30 Min. durch Abdestillieren der Salzsäure i. Vak. beendet wurde. Der Rückstand wurde in Butanol aufgenommen und die Lösung an Aluminiumoxyd chromatographiert. Die Eluatbase konnte durch längeres Nachwaschen mit Butanol völlig entfernt werden. Sodann wurde das Butanol in der Säule durch Äthanol verdrängt, dieses durch Wasser und endlich durch n_{10} NaOH. Das alkal. Eluat wurde schwach angesäuert und mit Butanol-Chloroform (1 : 9) ausgeschüttelt. Nach Verjagen des Lösungsmittelgemisches i. Vak. wurde das zurückgebliebene Zonenbase-Hydrochlorid in gleicher Weise wie das der Eluatbase in das Pikrat übergeführt. Das Pikrat wurde in wenig Methanol gelöst, mit n_{10} HCl versetzt und die Pikrinsäure im Perkolator ausgeäthert. Anschließend wurde die Zonenbase in Butanol-Chloroform (1 : 9) geschüttelt und hinterblieb beim Verdampfen des Lösungsmittels als amorpher, gelbbrauner Rückstand.

39. Hans Brockmann und Willfried Henkel: Pikromycin, ein bitter schmeckendes Antibioticum aus Actinomyceten (Antibiotica aus Actinomyceten, VI. Mitteil.*)

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]

(Eingegangen am 16. November 1950)

Es wird die Isolierung eines bitter schmeckenden Antibioticums aus einem *Streptomyces*-Stamm beschrieben, für das die Bruttoformel $C_{25}H_{43}O_7N$ ermittelt wurde. Durch Alkali ließ sich daraus ein stickstoff-freies Abbauprodukt $C_{20}H_{30}O_5$ gewinnen.

Wie bereits kurz mitgeteilt, konnten wir aus der Kulturflüssigkeit eines noch nicht näher charakterisierten, in unserem Institut von W. Lindenbein und I. Olfemann isolierten *Streptomyces*-Stammes (Stamm 326) ein kristallisiertes Antibioticum abtrennen, das wir seines bitteren Geschmacks wegen Pikromycin genannt haben¹⁾. Im folgenden berichten wir ausführlicher über Darstellung und Eigenschaften der neuen Verbindung.

Zur Isolierung des Antibioticums wurde der Stamm 326 im Submers-Verfahren mit Glycerin und Glykokoll als Kohlenstoff- bzw. Stickstoff-Quelle kultiviert, wobei die gegen *Staphylococcus aureus* getestete antibiotische Wirksamkeit der Nährlösung nach 6–8 Tagen ihr Optimum erreichte. Äther oder besser Äthyl- bzw. Amylacetat nahm beim Verrühren mit der vom Mycel be-

*) V. Mitteil.: B. s. vorstehende Arbeit, B. 84, 260 [1951].

¹⁾ H. Brockmann u. W. Henkel, Naturwiss. 37, 138 [1950].