

Pseudoteloidin-acetonid (VIII): 200 mg Pseudoteloidin (VII)<sup>3)</sup> wurden mit 20 ccm Aceton und 1 ccm konz. Salzsäure 1 Stde. geschüttelt. Die klare Lösung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt, anschließend wurde 15 Min. lang Ammoniak-Gas eingeleitet, vom Ammoniumchlorid abfiltriert und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Der Rückstand, ein von Kristallen durchsetztes Öl, wurde mit siedendem Benzin (70–90°) behandelt, wobei die schmierigen Anteile zurückblieben. Aus der Benzinslösung kristallisierten nach dem Erkalten 130 mg (48.5% d.Th.) Pseudoteloidin-acetonid in Form farbloser Nadeln vom konstanten Schmp. 122° aus.

C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>N (213.3) Ber. C 61.94 H 8.98 N 6.57 Gef. C 61.86 H 9.18 N 6.39

Teloidin-3-*d.l.*- $\alpha$ -methyl-buttersäureester (I, R = -CH(CH<sub>3</sub>)·CH<sub>2</sub>·CH<sub>3</sub>): Eine Lösung von 500 mg Meteloidin in 30 ccm absol. Äthanol wurde mit 50 mg Platinoxid, das in 20 ccm absol. Äthanol vorhydriert war, mit Wasserstoff bei Atmosphärendruck geschüttelt. Die Hydrierung war nach 1/2 Stde. beendet, worauf die vom Katalysator befreite Lösung i. Vak. eingedampft wurde. Der zunächst ölige Rückstand kristallisierte nach Zugabe von einigen Tropfen Benzol sofort durch; die Ausbeute war fast quantitativ. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Benzin (70–90°) wurde Teloidin-3-*d.l.*- $\alpha$ -methyl-buttersäureester in farblosen Nadeln vom Schnp. 100–102° erhalten.

C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N (257.3) Ber. C 60.67 H 9.01 N 5.44 Gef. C 60.89 H 8.57 N 5.73

### 163. Hans Brockmann und Heinz Gröne: Darstellung und Charakterisierung reiner Actinomycine, XII. Mitteil. über Actinomycine\*); Antibiotica aus Actinomyceten XXIII. Mitteil.\*\*)

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]

(Eingegangen am 12. Mai 1954)

Die präparative Trennung von Actinomycinen durch fraktionierte Gegenstromverteilung wurde verbessert und ein Verfahren zur papierchromatographischen Trennung von Actinomycinen entwickelt. Durch Anwendung beider Verfahren auf die aus einundzwanzig *Streptomyces*-Stämmen isolierten Actinomycin-Präparate ließ sich die Existenz von dreizehn verschiedenen Actinomycinen nachweisen, von denen sieben kristallisiert erhalten und näher charakterisiert wurden. Alle bisher untersuchten *Streptomyces*-Stämme bilden Actinomycin-Gemische, die ihrer Zusammensetzung nach in drei Gruppen eingeteilt werden können. In diese Gruppen lassen sich auch Actinomycin A und B einordnen.

Das in unserem Institut aus *Streptomyces chrysomallus*<sup>1)</sup> isolierte Actinomycin C<sup>2)</sup>, das sich beim Umkristallisieren und bei der Adsorptionschromatographie wie eine einheitliche Substanz verhält, hat sich durch fraktionierte Gegenstromverteilung in Actinomycin C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> zerlegen lassen<sup>3)</sup>. Dadurch war zum ersten Male nachgewiesen, daß bei den Actinomycinen die

\* XI. Mitteil.: H. Brockmann u. K. Vohwinkel, *Naturwissenschaften* **41**, 257 [1954].

\*\* XXII. Mitteil.: H. Brockmann u. K. Vohwinkel, *Naturwissenschaften* **41**, 257 [1954].  
1) W. Lindenbein, *Arch. Mikrobiol.* **17**, 361 [1952].

2) H. Brockmann u. N. Grubhofer, *Naturwissenschaften* **36**, 376 [1949]; **37**, 494 [1950]; H. Brockmann, N. Grubhofer, W. Kass u. H. Kalbe, *Chem. Ber.* **84**, 260 [1951].

3) H. Brockmann u. N. Pfennig, *Naturwissenschaften* **39**, 429 [1952]; Hoppe-Seyler's *Z. physiol. Chem.* **292**, 77 [1953]; N. Pfennig, *Arch. Mikrobiol.* **18**, 327 [1953].

klassischen Trennungsmethoden versagen, und gezeigt, daß *Streptomyces chryso-mallus* ebenso wie viele andere Mikroorganismen mehrere, einander ähnliche Antibiotica gleichen Bautyps nebeneinander aufbauen kann, und damit war vor allen Dingen fraglich geworden, ob man bisher überhaupt schon reine Actinomycine in Händen gehabt hatte. Denn ebenso wie Actinomycin C konnten auch das von S. A. Waksman und H. B. Woodruff<sup>4)</sup> aufgefundene Actinomycin A sowie das von Todd und Mitarbb.<sup>5)</sup> untersuchte Actinomycin B Gemische mehrerer Actinomycine sein.

Unter diesen Umständen schienen uns zwei Aufgaben am vordringlichsten: 1. Eine eingehende Prüfung, wieviele verschiedene Actinomycine von *Streptomyces*-Arten erzeugt werden können und 2. die Reindarstellung und Charakterisierung dieser Actinomycine. Diese Aufgaben sind auch in praktischer Hinsicht von Interesse, weil sich möglicherweise in ihrer Wirkung gegen Lymphogranulomatose<sup>6)</sup> Unterschiede zwischen den einzelnen Actinomycinen finden, die zur therapeutischen Bevorzugung eines bestimmten Actinomycins führen könnten.

Um diese Aufgaben einer Lösung zuzuführen, mußten zunächst die Methoden zur präparativen und analytischen Trennung der Actinomycine verbessert und dann auf möglichst viele Actinomycinpräparate verschiedener Herkunft angewendet werden. Unsere bisherigen Ergebnisse sind in den folgenden drei Abschnitten zusammengestellt.

### I. Präparative Trennung von Actinomycinen durch fraktionierte Gegenstromverteilung

Die ersten Gegenstromverteilungen von Actinomycin C wurden in Äther/5.6-proz. Salzsäure durchgeführt, einem System, das sich wegen der Säureempfindlichkeit der Actinomycine nur für kurzdauernde analytische Trennungen eignet. Die präparative Auftrennung von Actinomycin C in seine kristallisierten Komponenten C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> gelang zum erstenmal in Methylbutyläther + *n*-Dibutyläther (7:3)/30-proz. Harnstofflösung<sup>3)</sup>. Bei unseren Versuchen, in diesem System größere Mengen Actinomycin C zu verarbeiten, stellten sich jedoch gewisse Mängel heraus.

Einmal ist die konzentrierte, viskose Harnstofflösung unbequem zu handhaben, und zum anderen verdampft beim häufigen Umfüllen der mobilen Phase bevorzugt der niedriger siedende Methylbutyläther. Der Hauptnachteil des Systems ist jedoch seine geringe Kapazität; zur Trennung von 1 g Actinomycin C braucht man von jeder Phase etwa 70 l.

Um die Gegenstromverteilung leistungsfähiger zu machen, mußte also ein gut trennendes Lösungsmittel-System ausfindig gemacht werden, dessen Phasen viel mehr Actinomycin aufnehmen als die des Harnstoff-Systems. Für die mobile Phase war das einfach. Da die Actinomycine in Methylbutyläther erheblich löslicher sind als in *n*-Dibutyläther, genügte es, auf den seines

<sup>4)</sup> J. Bacteriol. 40, 581 [1940]; 42, 231 [1941]; S. A. Waksman u. M. Tishler, J. biol. Chemistry 142, 519 [1942].

<sup>5)</sup> C. E. Dalglish u. A. R. Todd, Nature [London] 164, 830 [1949]; C. E. Dalglish, A. W. Johnson, A. R. Todd u. L. C. Vinning, J. chem. Soc. [London] 1950, 2946.

<sup>6)</sup> Chr. Hackmann, Z. Krebsforsch. 58, 607 [1952]; Strahlentherapie 90, 296 [1953]; G. Schulte u. H. Lings, Strahlentherapie 90, 302 [1953]; G. Schulte, Z. Krebsforsch. 58, 500 [1952].

hohen Siedepunktes wegen ohnehin unbequemem Dibutyläther zu verzichten und statt des Äthergemisches Methylbutyläther allein zu verwenden.

Schwieriger war es, die Actinomycin-Konzentration in der stationären, wäßrigen Phase heraufzusetzen, denn dazu bedurfte es eines Lösungsvermittlers, der wesentlich wirksamer ist als Harnstoff. Die erste Verbindung, die dieser Anforderung entsprach, war Natrium-*p*-xylylsulfonat<sup>3)</sup>. Seine 10-proz. wäßr. Lösung nimmt etwa ebensoviel Actinomycin auf wie Methylbutyläther. Damit stand ein Lösungsmittel-Paar zur Verfügung, dessen Actinomycin-Kapazität größer ist als die des Harnstoff-Systems und dessen mobile Phase aus nur einem Lösungsmittel besteht, das überdies einen günstigen Siedepunkt hat.

Da uns Natrium-*p*-xylylsulfonat schwer zugänglich war, haben wir versucht, es durch einen leichter erhältlichen und womöglich noch wirkungsvolleren Lösungsvermittler zu ersetzen und zu dem Zweck die Natriumsalze der Sulfanilsäure,  $\beta$ -Naphthalinsulfonsäure, Naphthionsäure, Anthrachinon- $\beta$ -sulfonsäure und Naphthalin-disulfonsäure-(1.6) durchgeprüft<sup>7)</sup>. Dabei zeigte sich, daß Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonat dem Natrium-*p*-xylylsulfonat eindeutig überlegen ist. Schon 1.75% Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonat reichen aus, um Actinomycin C in der wäßrigen Phase ebenso löslich zu machen wie in Methylbutyläther. Das Salz ist außerdem billig und kann in technischem Reinheitsgrad verwendet werden.

Ebensogut wirksam sind die Natriumsalze der Naphthion- und Anthrachinon- $\beta$ -sulfonsäure. Jedoch hat die Lösung des Anthrachinon- $\beta$ -sulfonates eine schwach gelbliche Eigenfarbe und die des Naphthionates färbte sich nach kurzer Zeit violett. Wir haben daher für alle weiteren Actinomycin-Trennungen in der Verteilungsapparatur ausschließlich das Lösungsmittelpaar Methylbutyläther/1.25 · 2-proz.<sup>8)</sup> wäßr. Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonat verwendet. Seine Kapazität übertrifft die des alten Harnstoff-Systemes um ein Mehrfaches und kann im Bedarfsfalle noch dadurch vergrößert werden, daß die Salzkonzentration in der stationären Phase erhöht und als mobile Phase ein Gemisch von Methylbutyläther mit einem zweiten Lösungsmittel, z.B. Butanol, verwendet wird.

Um uns über die Lichtempfindlichkeit der Actinomyceine zu orientieren, haben wir Proben in verschiedenen Lösungsmitteln längere Zeit dem Tageslicht ausgesetzt. Die Abnahme der Farbintensität war stark von der Natur des Lösungsmittels abhängig, erfolgte jedoch so langsam, daß auch bei länger dauernden Verteilungsoperationen auf besonderen Lichtabschluß verzichtet werden kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß erst durch den Einsatz von Lösungsvermittlern aus der Gruppe der aromatischen Sulfon- und Carbonsäuren

<sup>7)</sup> H. Gröne, Diplomarb. Göttingen, 1953.

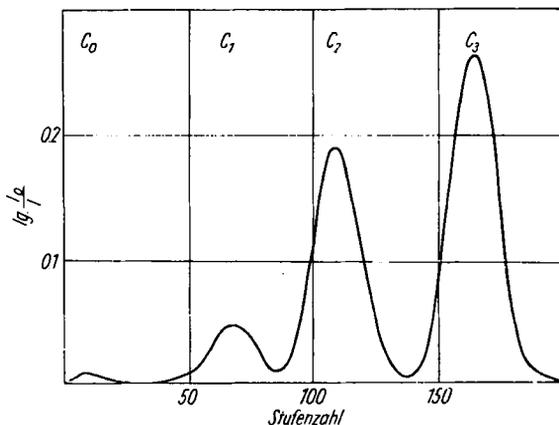
<sup>8)</sup> Schon geringe Veränderungen in der Konzentration des Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonates sind von erheblichem Einfluß auf die Löslichkeit der Actinomyceine und damit auch auf den Verteilungskoeffizienten. Das ist für die Trennung der weiter unten beschriebenen Actinomyceine von Bedeutung, die sich in ihren Löslichkeitseigenschaften von Actinomycin C unterscheiden. Durch geringe Konzentrationsänderungen der Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonat-Lösung läßt sich leicht der für die Trennung dieser Actinomyceine optimale Verteilungskoeffizient einstellen.

die fraktionierte Gegenstromverteilung zu einer präparativ brauchbaren Trennungsmethode für Actinomycine geworden ist. Darüber hinaus sind die Lösungsvermittler noch in anderer Hinsicht von Bedeutung. Wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, ist es mit ihrer Hilfe zum erstenmal gelungen, die Actinomycine papierchromatographisch zu trennen<sup>9)</sup>.

Auch apparativ hat sich die Gegenstromverteilung der Actinomycine verbessern lassen. Für die erste präparative Trennung des Actinomycins C in Methylbutyläther + *n*-Dibutyläther/30-proz. Harnstofflösung verwendeten wir eine Verteilungsapparatur nach N. Grubhofer<sup>10)</sup>, die zwanzig Gefäße mit je 800 ccm Fassungsvermögen enthielt. Dabei ergaben sich, besonders als größere Actinomycinmengen zu verarbeiten waren, folgende Mängel: Für eine saubere Trennung von Actinomycin C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> muß über mindestens 200 Stufen verteilt werden. Das erfordert bei einer 20stufigen Apparatur häufiges Umfüllen der Lösungsmittel, was zeitraubend ist und zu unvermeidlichen Verlusten führt. Ferner stellte sich wegen der großen Flüssigkeitsvolumina in den einzelnen Gefäßen das Verteilungsgleichgewicht nur langsam ein, so daß bei jeder Verteilung mindestens 100 Schüttelbewegungen von Hand erforderlich waren.

Alle diese Schwierigkeiten entfielen, als wir zur Trennung eine 200stufige vollautomatische Verteilungsapparatur einsetzten, die in unserem Institut von F. A. v. Metzsch entwickelt worden ist<sup>11)</sup>. Ihre Gefäße fassen von jeder Phase 25 ccm. Füllt man das zu trennende Actinomycingemisch in die ersten 10 Gefäße der Apparatur, so lassen sich etwa 0.5 g Actinomycin in einem Ansatz verarbeiten; bei Füllung der ersten 20 Gefäße sogar 0.9–1 g, wobei der Trennungseffekt allerdings etwas geringer wird. Die Ausbeute an reinen krist. Actinomycinen betrug bei Ansätzen mit 0.5 g Actinomycin C 72 % d.Th., bei 0.9–1 g nur noch 60 % d.Th. Läßt man die Apparatur im Kreislauf arbeiten, so kann solange verteilt werden, bis die am schnellsten wandernde Zone die langsamste einholt.

Abbild. 1 zeigt die Kurve einer in Methylbutyläther/1.75-proz. Natrium-β-naphthalinsulfonat-Lösung über 254 Stufen durchgeführten Verteilung von

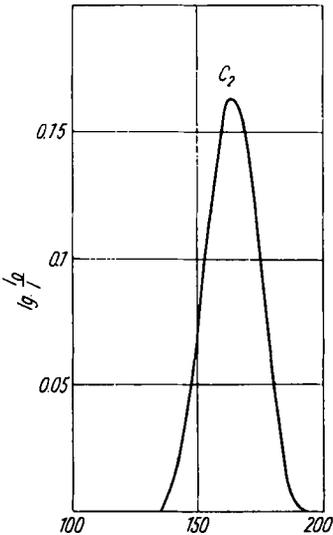


Abbild. 1. Verteilung von Actinomycin C über 254 Stufen in:  
Methylbutyläther/1.75% Natriumnaphthalin-β-sulfonat

<sup>9)</sup> H. Brockmann u. H. Gröne, *Naturwissenschaften* **40**, 222 [1953].

<sup>10)</sup> Chem.-Ing.-Technik **22**, 209 [1950]. <sup>11)</sup> Chem.-Ing.-Technik **25**, 66 [1953].

0.5 g Actinomycin C. Die für die einzelnen Actinomycine gefundenen Kurventeile (Abbild. 1) sind den für reine Substanzen berechneten sehr ähnlich, woraus zu schließen ist, daß bei einer Weiterführung der Verteilung keine Auftrennung der Komponenten mehr eintreten wird. Daß dieser Schluß berechtigt ist, zeigt eine im gleichen System über 496 Stufen durchgeführte Verteilung von Actinomycin C<sub>2</sub>. Die erhaltene Kurve (Abbild. 2) ist die einer einheitlichen Substanz.



Abbild. 2. Verteilung von Actinomycin C<sub>2</sub> über 496 Stufen in: Methylbutyläther/1.75% Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonat

kleinste Actinomycinmengen geeignete Analysenmethode zur Verfügung zu haben. Wir haben daher versucht, ob man Actinomycingemische papierchromatographisch trennen kann.

Verbindungen, die wie die Actinomycine in Wasser schwer löslich sind, lassen sich mit Hilfe der klassischen Papierchromatographie, bei der das im Papier vorhandene Wasser als stationäre Phase fungiert, nicht trennen. Sie werden aber, wie R. R. Goodall und A. A. Levy<sup>12)</sup> zuerst am Beispiel der Penicilline gezeigt haben, der Papierchromatographie zugänglich, wenn man als stationäre Phase Pufferlösungen von geeignetem  $p_H$  verwendet, in denen die zu trennenden Verbindungen löslicher sind als in Wasser. Da die Wasserlöslichkeit der Actinomycine durch Puffersubstanzen nicht genügend erhöht wird, haben wir versucht, an ihrer Stelle die oben genannten Lösungsvermittler zu benutzen und auf diese Weise den Anwendungsbereich des Verfahrens von Goodall und Levy zu erweitern. Dabei stellte sich heraus, daß die zur präparativen Gegenstromverteilung der Actinomycine brauchbaren Lösungsmittel-Systeme nicht ohne weiteres zur Papierchromatographie geeignet sind. Auf Papier, das mit einer 1.75-proz. Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonat-Lösung angefeuchtet war, bildete Actinomycin C beim Entwickeln mit Methylbutyläther

zeigt eine im gleichen System über 496 Stufen durchgeführte Verteilung von Actinomycin C<sub>2</sub>. Die erhaltene Kurve (Abbild. 2) ist die einer einheitlichen Substanz.

## II. Papierchromatographische Trennung der Actinomycine

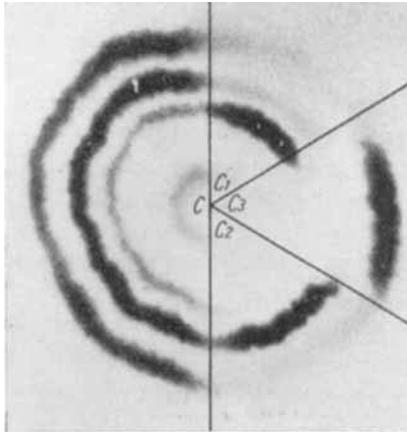
Vor kurzem ist über die Actinomycinbildung bei Einsporkulturen und Varianten von *Streptomyces chrysomallus* berichtet worden<sup>3)</sup>. Bei diesen Untersuchungen wurden die aus den Stämmen isolierten Actinomycin-Präparate im analytischen Maßstab der Gegenstromverteilung unterworfen und an Hand ihrer Verteilungskurven miteinander verglichen; ein Verfahren, das zeitraubend ist, mindestens 20 mg Substanz erfordert und den Wunsch aufgenommen ließ, für mikrobiologische Versuche eine bequemere und auch für

<sup>12)</sup> Analyst 72, 277 [1947].

nur eine einzige, mit der Front der mobilen Phase wandernde Zone. Eine Trennung trat nicht ein.

Systematische Versuche haben ergeben, daß der für eine Trennung auf Papier optimale Verteilungskoeffizient kleiner ist als beim Arbeiten in der Apparatur. Die stationäre Phase eines zur Papierchromatographie geeigneten Systemes muß demnach mehr Actinomycin aufnehmen als die mobile Phase. Das ist z.B. der Fall beim Lösungsmittelpaar *n*-Dibutyläther/10-proz. Natrium-1.6-naphthalindisulfonat-Lösung, in dem Actinomycin C im absteigenden Verfahren tatsächlich drei Zonen bildete, die allerdings verwaschen waren.

Durch Arbeiten unseres Institutes<sup>13)</sup> ist gezeigt worden, daß sich das Verfahren von Levy und Goodall erheblich verfeinern läßt, wenn man statt mit absteigender mobiler Phase auf horizontalen Bögen ringchromatographisch<sup>14)</sup> arbeitet. Diese Methode hat sich auch bei der Trennung der Actinomycine ausgezeichnet bewährt; Actinomycin C bildete in dem eben genannten Lösungsmittel-System drei weit voneinander getrennte scharfe Ringzonen



Abbild. 3. Sektoren-Chromatogramm von Actinomycin C und seinen Komponenten  $C_1$ ,  $C_2$  und  $C_3$

(Abbild. 3). Wie bei der Verteilung in der Apparatur wandert auch hier Actinomycin  $C_3$  am schnellsten (äußerer Ring) und Actinomycin  $C_1$  am langsamsten (innerer Ring). Die Aufgabe, Actinomycine papierchromatographisch zu trennen, ist damit gelöst.

Da bei unserem Verfahren die Front der mobilen Phase auf dem angefeuchteten Papier kaum zu erkennen ist und bei Substanzen geringer Wanderungsgeschwindigkeit mit durchlaufender mobiler Phase gearbeitet werden muß, ist die Angabe von  $R_F$ -Werten schwierig oder unmöglich. Um dennoch die Zonen der verschiedenen Actinomycine zahlenmäßig zu charakterisieren, kann man ihre Lage auf die eines bestimmten Actinomycins beziehen. Wir haben dafür das mit mittlerer Geschwindigkeit wandernde Actino-

<sup>13)</sup> H. Brockmann u. P. Patt, *Naturwissenschaften* **40**, 221 [1953]; H. Brockmann u. G. Pampus, *Naturwissenschaften* **41**, 87 [1954].

<sup>14)</sup> L. Rutter, *Nature* [London] **161**, 435 [1948]; *Analytic. Chem.* **23**, 396 [1951].

mycin C<sub>2</sub> gewählt und dementsprechend die Zonen der Actinomycine durch  $R_{C_2}$ -Werte ( $R_{C_2} = \text{Weglänge der betr. Zone} : \text{Weglänge der } C_2\text{-Zone}$ ) gekennzeichnet.

Für die papierchromatographische Trennung reichen 0.5 mg Substanz aus. Werden die trockenen Chromatogramme gasförmiger Salzsäure ausgesetzt oder mit konz. Salzsäure besprüht, so färben sich die gelben Actinomycinzonen infolge Salzbildung rot. Dadurch treten auch sehr schwache Zonen deutlich hervor, und die photographische Wiedergabe der Chromatogramme wird verbessert.

Abbau- und Zersetzungsprodukte der Actinomycine haben erheblich kleinere  $R_{C_2}$ -Werte als die Actinomycine und lassen sich daher im Chromatogramm leicht erkennen. Zusatz von Butanol zum *n*-Dibutyläther erhöht die  $R_{C_2}$ -Werte der Actinomycine und die ihrer Abbauprodukte. Abbauprodukte der verschiedenen Actinomycine, die wegen ihrer kleinen  $R_{C_2}$ -Werte mit *n*-Dibutyläther nicht trennbar sind, zeigen bei Zusatz von Butanol gute Zonenbildung.

Wendet man bei der Ringchromatographie das Sektorenverfahren<sup>15)</sup> an, so lassen sich mehrere Actinomycinpräparate auf einem Bogen miteinander vergleichen. Abbild. 3 zeigt ein Sektorenchromatogramm des Actinomycins C und seiner drei Komponenten. Zwei Actinomycine, die im Sektorenchromatogramm eine verschiedene Lage ihrer Zonen zeigen, sind sicher voneinander verschieden. Umgekehrt darf man aus übereinstimmenden  $R_{C_2}$ -Werten nicht ohne weiteres auf Identität schließen, sondern der Vergleich muß in einem zweiten Lösungsmittel-System wiederholt werden. Erst wenn auch hier die  $R_{C_2}$ -Werte gleich sind, kann die Identität als gesichert gelten. Für solche Vergleiche haben wir neben *n*-Dibutyläther/10-proz. Natrium-1.6-disulfonat-Lösung die beiden Systeme *n*-Dibutyläther + Butanol (3:2)/10-proz. Natrium-*m*-kresotinat-Lösung<sup>16)</sup> sowie *n*-Dibutyläther + Butylacetat (1:3)/10-proz. Natrium-*m*-kresotinat-Lösung<sup>17)</sup> verwendet.

Mit unserer papierchromatographischen Trennungsmethode ist es nunmehr ein leichtes, die durch fraktionierte Gegenstromverteilung gewonnenen Actinomycine auf Reinheit zu prüfen, die von verschiedenen *Streptomyces*-Arten produzierten Actinomycine miteinander zu vergleichen und zu untersuchen, ob durch Variationen oder Mutationen Stämme entstehen, die zur Bildung neuer Actinomycine befähigt sind.

Wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, können mit unserer Methode in Actinomycin-Präparaten noch sehr kleine Mengen von „Neben-Actinomycinen“ nachgewiesen werden. Sie unterscheiden sich von u. U. vorhandenen Abbau- oder Umwandlungsprodukten der Actinomycine dadurch, daß ihre gelben Zonen 1. sich beim Behandeln mit konz. Salzsäure rot färben, 2. beim Besprühen mit salzsaurer Zinn(II)-chloridlösung grün werden und 3. antibiologische Wirksamkeit zeigen.

Um in einem Actinomycin-Präparat das Mengenverhältnis der reinen Komponenten zu ermitteln, haben wir die Zonen des Ringchromatogramms ausgeschnitten, mit Methanol eluiert und nach Auffüllen auf ein bestimmtes Vol. die Extinktion der Lösungen im Lauge-Kolorimeter (grünblau-Filter) miteinander verglichen. Ihr Verhältnis gibt das Mengenverhältnis der Kompo-

<sup>15)</sup> K. V. Giri u. N. A. N. Rao, *Nature* [London] **169**, 923 [1952].

<sup>16)</sup> Privatmitteilung von Herrn Dr. G. Schmidt-Kastner, Elberfeld.

<sup>17)</sup> Dieses System wurde in unserem Institut von H. Martin ausfindig gemacht.

nenten hinreichend genau wieder, denn die spezif. Extinktionen der verschiedenen Actinomycine unterscheiden sich nach unseren Untersuchungen um höchstens 10 %.

Die Ringchromatographie mit Lösungsvermittlern läßt sich, wie vor kurzem gezeigt wurde<sup>13)</sup>, in präparativem Maßstab anwenden, wenn man als Träger der stationären Phase einen aus 50–100 Bogen bestehenden Papierpack verwendet. Diese Anordnung eignet sich auch zur Trennung der Actinomycine. Zweckmäßiger ist es jedoch, eine Cellulose-Säule zu benutzen.

### III. Darstellung und Eigenschaften reiner Actinomycine

Um dem oben skizzierten Programm entsprechend zu prüfen, wieviele Actinomycine es gibt, und wieweit sie sich in ihrer Konstitution und biologischen Wirkung unterscheiden, war es notwendig, die vorstehend beschriebenen analytischen und präparativen Trennungsmethoden auf möglichst viele Actinomycin-Präparate verschiedener Herkunft anzuwenden. Unsere nächste Aufgabe mußte also sein, aus unserer Actinomyceten-Sammlung sämtliche zur Actinomycinbildung befähigten Stämme herauszusuchen und ihre Actinomycine zu isolieren. Unter 2140 Stämmen unserer Sammlung fanden wir 137, die gelbe Farbstoffe bildeten, antibiotisch wirksam waren und demnach Actinomycinbildner sein konnten. Nur 21 erfüllten diese Erwartung. Die Untersuchung der aus ihnen gewonnenen Actinomycinpräparate zeigte, daß 11 von den 21 Stämmen Actinomycin C gebildet hatten.

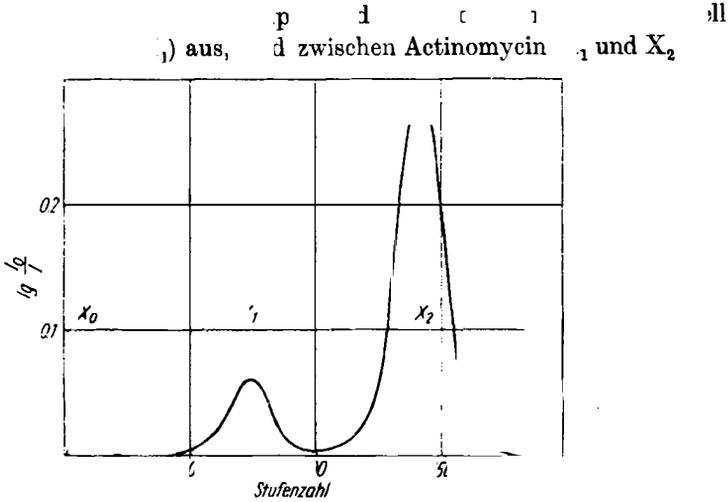
In manchen Actinomycin-C-Präparaten fanden wir neben  $C_1$ ,  $C_2$  und  $C_3$  noch ein viertes Actinomycin ( $C_0$ ), das sich in der Verteilungskurve (Abbild. 1) als erstes kleines Maximum und im Papierchromatogramm (Abbild. 3) als innerster Ring zu erkennen gibt. Es konnte bisher nur in geringer Menge kristallisiert erhalten werden. Bei der Verteilung an der Cellulosesäule trat über der Zone des Actinomycins  $C_0$  noch eine zweite auf, deren Inhaltsstoff im folgenden als  $C_{0a}$  bezeichnet ist (Abbild. 5, III).

Acht unserer Actinomycin bildenden *Streptomyces*-Stämme, die sich mikrobiologisch eindeutig von den Actinomycin C erzeugenden abgrenzen lassen, lieferten ein Actinomycin, das sich durch Kristallform, spezif. Drehung und Löslichkeit charakteristisch von Actinomycin C unterscheidet. Es wurde in unserem Institut zuerst von H. Linge<sup>18)</sup> isoliert und ist unter der provisorischen Bezeichnung Actinomycin X bereits kurz beschrieben worden<sup>19)</sup>.

Durch fraktionierte Gegenstromverteilung in Methylbutyläther/1.5-proz. Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonat-Lösung konnten wir zeigen, daß Actinomycin X ebenfalls ein Gemisch ist<sup>19)</sup>. Seine Verteilungskurve (Abbild. 4) zeigt die Hauptkomponente  $X_2$  und zwei Nebenkompontenten  $X_0$  und  $X_1$  an. Die durch Gegenstromverteilung getrennten Komponenten  $X_1$  und  $X_2$  ließen sich leicht in kristallisierter Form gewinnen. Daß die Zusammensetzung des Actinomycins X komplizierter ist, als es nach diesen ersten Versuchen den Anschein hatte, zeigte sich, als größere Mengen an der Cellulose-Säule aufgetrennt wurden.

<sup>13)</sup> Dissertat. Göttingen, 1951.

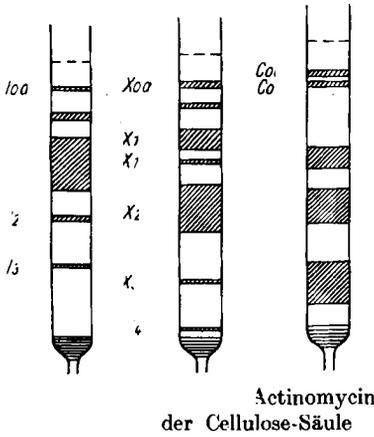
<sup>19)</sup> H. Brockmann, H. Linge u. H. Gröne, *Naturwissenschaften* 40, 224 [1953].



Ab) Verteilung Actinomycin X über Stufen Methylbutyläther/1 Natrium-β-naphthalinsulfonat

neue Zone ( Actinomycins  $X_0$  eine neue Zone

trennte so aufgefundenen Nebenkom- Substanz



Stämmen gibt wie wir fand noch d von wir t Vertreter

Ihr provisorisch mit

staben zeichnet sich dadurch aus itli ist Erst Säule pier d Hauptkomponenten N:ten komponenten l, l h kristallisiert

haben wir Actinomycin X acht nämlich Actinomycin  $I_0$ ,

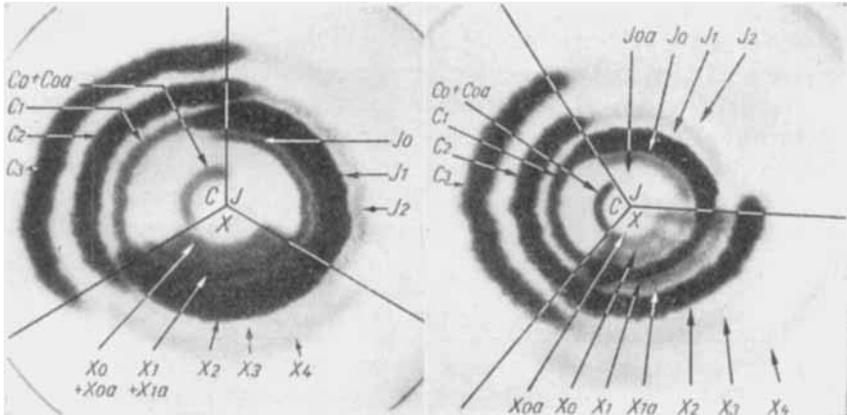
X. kristallisiert

wurden in zwei verschiedenen papierchromatographisch gliche 1 (Ab dabei ge- fundenen  $R_{C_2}$ -W geht i ti l d t t r d di ( 08: 1:  $X_2$  d verschieden

) Dieses

G.

Gröne Naturwissen-



Abbild. 6. Papierchromatographischer Vergleich von Actinomycin C, X und I, links im System: *n*-Dibutyläther + Butanol (3:2)/10-proz. Natrium-*m*-kresotinat, rechts im System: *n*-Dibutyläther + Butylacetat (1:3)/10-proz. Natrium-*m*-kresotinat

Folgende Fraktionen zeigten in beiden Systemen gleiche  $R_{C_1}$ -Werte und müssen demnach vorläufig als identisch angesehen werden: 1)  $C_{0a}$  und  $I_{0a}$ ; 2)  $C_1$  und  $I_1$ ; 3)  $C_2$  und  $I_2$ . Gegen die Identität von  $C_1$  und  $I_1$  sprachen zunächst die Ergebnisse einer vorläufigen Aminosäure-Analyse, bei der für  $C_1$  zwei Moll. Valin, für  $I_1$  nur ein Mol. gefunden wurde<sup>20)</sup>. Eine Wiederholung der Analysen hat ergeben, daß auch  $I_1$  zwei Moll. Valin enthält. Ob Actinomycin  $C_3$  mit  $I_3$  identisch ist, bleibt vorläufig unentschieden.

Nachdem die oben beschriebenen papierchromatographischen Trennungsmethoden zur Verfügung standen, war es uns möglich, Proben von Actinomycin A und B mit unseren Präparaten zu vergleichen<sup>21)</sup>. Actinomycin A verhielt sich im Papierchromatogramm auch bei Anwendung von zwei Lösungsmittel-Systemen genau so wie Actinomycin  $I_1$ . Wir zweifeln daher nicht daran, daß die beiden Actinomycinpräparate miteinander identisch sind.

Das zuerst von H. Lehr und J. Berger<sup>22)</sup> isolierte und später von Todd und Mitarbb.<sup>5)</sup> eingehend untersuchte Actinomycin B stimmt im Papierchromatogramm mit unserem Actinomycin X überein. Es ist also ebenso wie dieses ein Gemisch mehrerer Actinomycine. Aus Actinomycin B konnten wir durch Gegenstromverteilung die beiden dem Actinomycin  $X_1$  und  $X_2$  entsprechenden Komponenten  $B_1$  und  $B_2$  kristallin isolieren.  $B_1$  und  $B_2$  stimmten im Schmelzpunkt sowie in der quantitativen Zusammensetzung ihres Peptidteils<sup>23)</sup> mit Actinomycin  $X_1$  bzw.  $X_2$  überein. Diese Befunde zeigen, daß in unserem Actinomycin X der gleiche Actinomycin-Komplex vorliegt wie in Actinomycin B. Gleichzeitig beweisen sie die Verschiedenheit von Actinomycin A und B, die bisher noch nicht eindeutig feststand.

<sup>21)</sup> Wir sind Herrn Prof. Dr. Waksman und Herrn Prof. Dr. Todd für die Überlassung von Proben ihres Actinomycins A bzw. Actinomycins B zu großem Dank verpflichtet.

<sup>22)</sup> Arch. Biochemistry 23, 503 [1949].

<sup>23)</sup> Die Analysen wurden von G. Bohnsack durchgeführt.

Einige Angaben über die von uns gewonnenen einheitlichen Actinomycine und die bisher amorph erhaltenen Actinomycinfraktionen sind in Tafel 1 zusammengestellt. Die Schmelzpunkte wurden unter dem Mikroskop (Kofler-Block) bestimmt; sie sind hier besser definiert (Verlust der Kristallform) als im Röhrchen (Meniskusbildung), liegen aber etwas tiefer. Die Unterschiede im Schmp. der verschiedenen Actinomycine sind nicht erheblich, sie betragen maximal (zwischen Actinomycin C<sub>3</sub> und X<sub>2</sub>) 10°; miteinander gemischt zeigen die Actinomycine keine deutliche Erniedrigung, der Mischschmelzpunkt als Identitätsprobe entfällt demnach.

Tafel 1. Physikalische Daten der Actinomycine

	Kristallform	Schmp. *)	Spezif. Drehung <sup>†</sup> )	Spezif. Extinkt. **)	R <sub>C</sub> -Werte		Aminosäure-Bausteine
					I <sup>***</sup> )	II <sup>****</sup> )	
C <sub>0a</sub>					0.13	0.10	
C <sub>0</sub>					0.13	0.10	
C <sub>1</sub>	Hexagonale Bipyramiden, auch sechskantige Säulen und Nadeln (aus Essigester, Methanol u. Benzol)	241–243°	-349° ± 10°	20.5	0.72	0.56	Thre, Sar <sup>1)</sup> , Pro, Val, MeVal <sup>2)</sup>
C <sub>2</sub>		237–239°	-325° ± 10°	19.9	1.00	1.00	Thre, Sar, Pro, Val, MeVal, Ileu
C <sub>3</sub>		232–235°	-321° ± 10°	18.8	1.39	1.61	Thre, Sar, Pro, MeVal, Ileu
I <sub>0a</sub>					—	0.12	
I <sub>0</sub>	wie C <sub>1</sub>	242–243°	-314° ± 10°	20.5	0.49	0.27	Thre, Sar, Pro, Val, MeVal
I <sub>1</sub>	wie C <sub>1</sub>	240–242°	-353° ± 10°	20.7	0.74	0.63	Thre, Sar, Pro, Val, MeVal
I <sub>2</sub>					1.00	0.97	
I <sub>3</sub>					—	1.34	
X <sub>0a</sub>					0.14	0.17	
X <sub>0</sub>					0.14	0.39	
X <sub>1</sub>	wie C <sub>1</sub>	241–242°	-309° ± 10°	17.3	0.48	0.56	Thre, Sar, Pro, Val, MeVal
X <sub>1a</sub>					—	0.71	
X <sub>2</sub>	Rhombische Plättchen (aus Essigester)	244–246°	-341° ± 10°	18.6	0.72	0.98	Thre, Sar, Pro, Val, MeVal
X <sub>3</sub>					0.93	1.49	
X <sub>4</sub>					1.11	1.90	

\*) Bestimmt auf dem Kofler-Block. Substanz bei 210° aufgelegt, Temp.-Steigerung 4°/Min.

\*\*) Gemessen bei 446 mμ (Beckman-Spektralphotometer). Spezif. Extinktion =  $\frac{1}{cd} \lg \frac{I_0}{I}$ ; c = g/l. Lösungsmittel Cyclohexan.

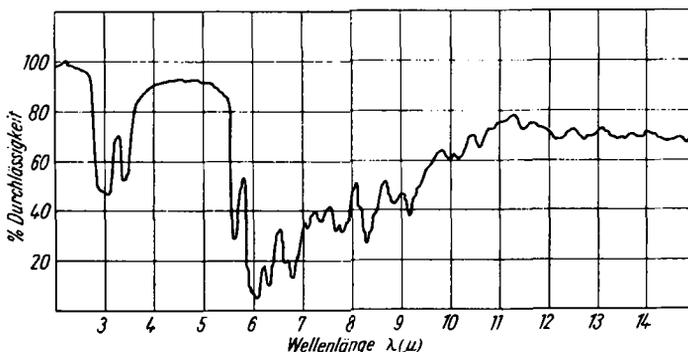
\*\*\*) Butanol + n-Dibutyläther (2:3 / 10-proz. Natrium-m-kresotinat.

\*\*\*\*) Butylacetat + n-Dibutyläther (3:1) / 10-proz. Natrium-m-kresotinat.

†) In Methanol. <sup>1)</sup> Sarkosin. <sup>2)</sup> l-N-Methyl-valin.

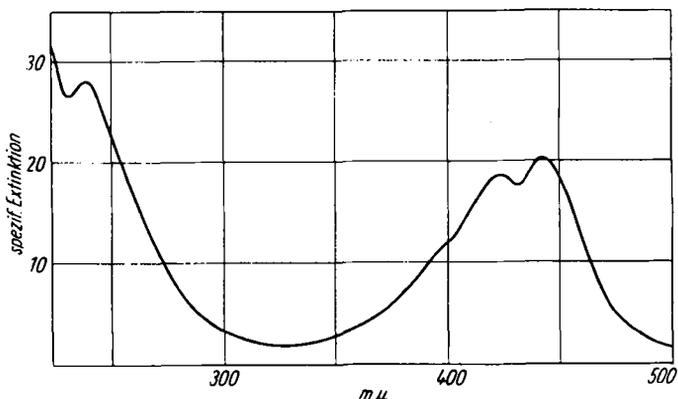
Auch die Differenzen in der spezif. Drehung sind geringfügig, liegen bei einigen Actinomycinen aber deutlich außerhalb der Fehlergrenze der Messung.

Abbild. 7 zeigt das Ultrarotspektrum des Actinomycins C<sub>3</sub>, das sich nicht merklich von dem der anderen Actinomycine unterscheidet.



Abbild. 7. Ultrarotspektrum des Actinomycins C<sub>3</sub> in Kaliumbromid<sup>24)</sup>

Arbeiten von A. R. Todd und Mitarbb.<sup>5)</sup> sowie Untersuchungen unseres Arbeitskreises haben gezeigt, daß die Actinomycine „Chromopeptide“<sup>25)</sup> sind. Der Farbstoffteil ihrer Molekel läßt sich durch Barythydrolyse vom Peptidteil als rotes, kristallisiertes Despeptido-actinomycin C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>N, abspalten<sup>25)</sup>,



Abbild. 8. Absorptionskurve von Actinomycin C<sub>3</sub> in Cyclohexan

dessen Konstitution weitgehend aufgeklärt werden konnte<sup>26)</sup>. Da die Actinomycine I<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> beim Barytabbau ein und dasselbe Despeptido-actinomycin liefern<sup>27)</sup>, darf man annehmen, daß diese von der Gattung *Streptomyces* in größerer Menge produzierten „Hauptactinomycine“ im Bau ihres

<sup>24)</sup> U. Schiedt u. H. Reinwein, Z. Naturforsch. 7b, 270 [1952].

<sup>25)</sup> H. Brockmann u. N. Grubhofer, Naturwissenschaften 37, 494 [1950]; Chem. Ber. 86, 1407 [1953]; H. Brockmann u. G. Budde, Naturwissenschaften 40, 529 [1953].

<sup>26)</sup> H. Brockmann u. H. Muxfeldt, Naturwissenschaften 41 [1954], im Druck.

<sup>27)</sup> H. Brockmann u. K. Vohwinkel, Naturwissenschaften 41, 257 [1954].

Farbstoffteils übereinstimmen. Dementsprechend verlaufen ihre Absorptionskurven (Abbild. 8) völlig analog. Lediglich in den spezif. Extinktionen (Tafel I) finden sich bei einigen Vertretern (z. B.  $X_1$  und  $I_1$ ) gewisse Unterschiede, die, da ihr Farbstoffteil gleich ist, offenbar auf geringfügige Unterschiede im Mol.-Gew. des Peptidteils zurückzuführen sind.

Der Peptidteil der Actinomycine  $I_2$ ,  $I_1$  ( $C_1$ ),  $X_1$  und  $X_2$  ist aus den Aminosäuren *l*-Threonin, Sarkosin, *l*-Prolin, *d*-Valin und *l*-*N*-Methyl-valin aufgebaut. An Stelle des *d*-Valins enthält Actinomycin  $C_3$  *d*-Allo-isoleucin<sup>28</sup>), und beim Actinomycin  $C_2$  fanden wir neben Threonin, Sarkosin, Prolin und *N*-Methyl-valin sowohl *d*-Valin als auch *d*-Allo-isoleucin<sup>28</sup>).

Mol.-Gew.-Bestimmungen der Actinomycine durch katalytische Hydrierung<sup>28</sup>) sowie durch potentiometrische Titration mit Perchlorsäure in Eisessig<sup>29</sup>) haben Werte zwischen 1200 und 1350 ergeben. Aus diesen Zahlen und dem Mol.-Gew. 285 des Despeptido-actinomycins ließ sich folgern, daß die Actinomycine mehrere der oben genannten Aminosäurebausteine doppelt enthalten. Quantitative Aminosäurebestimmungen<sup>30</sup>) haben dies bestätigt.

In Zusammenfassung der in dieser Arbeit angeführten Ergebnisse und in- zwischen weitergeführter mikrobiologischer Untersuchungen<sup>31</sup>) läßt sich sagen, daß man die zur Actinomycinbildung befähigten *Streptomyces*-Stämme nach der Natur ihrer Actinomycine in drei Gruppen einteilen kann, die sich auch mikrobiologisch deutlich unterscheiden:

1. Stämme, die wie *Streptomyces antibioticus* und unsere Stämme, I 794 u. I 797 Actinomycin I [Gemisch aus  $I_1$ <sup>32</sup>) (A),  $I_0$ ,  $I_2$ , ( $I_{0a}$ ,  $I_3$ )] erzeugen.
2. Stämme, die Actinomycin X [Gemisch aus  $X_2$ ,  $X_0$ ,  $X_1$ , ( $X_{0a}$ ,  $X_{1a}$ ,  $X_3$ ,  $X_1$ )] bilden.
3. Stämme, die wie *Streptomyces chrysomallus* Actinomycin C [Gemisch aus ( $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_1$  (=  $I_1$ ), ( $C_0$ ,  $C_{0a}$ )] hervorbringen.

Tafel 2. Prozentuale Zusammensetzung von Actinomycinen (Gemischen) verschiedener Stämme

Actinomycin I Imme 797		Actinomycin X		Actinomycin C				
		Sötenich 3	Ital 1113		Stand C	330a	Wal 679	
$I_{0a}$	0.5	$X_{0a}$	5.1	19.6	$C_0$ $C_{0a}$	8.9	(2.0)	
$I_0$	7.3	$X_0$						
$I_1$	86.5	$X_1$	5.3	21.9	$C_1$	10.3	13.0	18.1
$I_2$	5.6	$X_{1a}$	—*)	3.7	$C_2$	40.7	37.2	45.7
$I_3$	0.5	$X_2$	88.6	54.8	$C_3$	49.0	40.8	34.4
		$X_3$	0.5	—				
		$X_4$	0.5	—				

\*) — bedeutet, daß das betr. Actinomycin zwar in Spuren vorhanden, nach unserer Methode aber nicht mehr zahlenmäßig zu erfassen ist.

<sup>28</sup>) H. Brockmann, N. Grubhofer, W. Kass u. H. Kalbe, Chem. Ber. 84, 260 [1951]; A. W. Johnson, A. R. Todd u. L. C. Vining, J. chem. Soc. [London] 1952, 2672.

<sup>29</sup>) H. Brockmann u. E. Meyer, Chem. Ber. 86, 1514 [1953].

<sup>30</sup>) H. Brockmann, G. Bohnsack u. H. Gröne, Naturwissenschaften 40, 223 [1953].

<sup>31</sup>) Diese Untersuchungen wurden von H. Martin durchgeführt.

<sup>32</sup>) Hauptkomponenten fett gedruckt; in sehr kleiner Menge vorhandene Nebenkomponten durch Klammern gekennzeichnet.

Alle drei Gruppen produzieren Actinomycingemische, deren Zusammensetzung qualitativ und bis zu einem gewissen Grad auch quantitativ für jede Gruppe charakteristisch ist. Jeder der drei Actinomycinkomplexe enthält eine bzw. zwei der Menge nach überwiegende Hauptkomponenten ( $I_1$  in I;  $X_2$  in X;  $C_2$  und  $C_3$  in C) und mehrere in geringerer Menge vorhandene Nebenkomponten. Tafel 2 bringt Beispiele für das Mengenverhältnis der Komponenten. Dieses Verhältnis läßt sich – bisher besonders augenfällig beim Actinomycin X – durch Variation der Kulturbedingungen verändern, doch bleiben diese Änderungen innerhalb gewisser Grenzen. Bisher ist kein Fall beobachtet worden, in dem durch Änderung der Kulturbedingungen eine Nebenkomponten zur Hauptkomponenten wird. Ob es innerhalb jeder Gruppe Typen von Stämmen gibt, deren Actinomycingemische eine derartige Umkehrung im Mengenverhältnis der Komponenten aufweisen, muß noch untersucht werden.

Stämme, die unter gleichen Bedingungen gehalten werden, bilden nach unseren bisherigen Erfahrungen auch über längere Zeiten hin Actinomycingemische, deren Zusammensetzung nur geringe Schwankungen aufweist und auch durch Variantenbildung wenig beeinträchtigt wird<sup>3)</sup>.

Über quantitative Aminosäure-Bestimmungen bei den verschiedenen reinen Actinomyceinen, die Reihenfolge der Aminosäuren im Peptidteil, über kristallisierte Abbauprodukte des stufenweisen alkalischen und sauren Abbaus und die Konstitution des Farbstoffteils der Actinomyceine wird in den nächsten Mitteilungen berichtet werden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer sowie dem Fonds der Chemie danken wir für großzügige Förderung unserer Arbeiten.

### Beschreibung der Versuche

Lichtempfindlichkeit von Actinomycin C: Lösungen von 5 mg Actinomycin C in je 20 ccm 1) 5.6-proz. Salzsäure, 2) 50-proz. methanol. Salzsäure, 3) Methanol, 4) Essigester, 5) Benzol und 6) Methylbutyläther wurden in verschlossenen Reagenzglasern dem Tageslicht ausgesetzt, während eine analoge Lösungsreihe zur Kontrolle im Dunkeln blieb. In bestimmten Zeitabständen wurde die Extinktion der Lösungen im Lange-Kolorimeter (Filter blaugrün) gemessen. Nach 50 Tagen zeigten sich die Lösungen in Benzol und Methanol unverändert, während die Extinktion der Essigester- und Methylbutyläther-Lösungen auf die Hälfte abgesunken war. Alle unter Lichtabschluß aufbewahrten Kontrollproben blieben unverändert. Mit Abnahme der Extinktion verminderte sich auch die antibiotische Wirksamkeit. Die zunächst tief rot gefärbten Salzsäurelösungen zeigten einen sehr schnellen Abfall der Extinktion auf den halben Wert, der sich im Verlauf von 50 Tagen nicht mehr änderte.

Prüfung von Lösungsvermittlern. Lösungen von einigen Milligramm Actinomycin C in 5 ccm Methylbutyläther wurden jeweils mit 5 ccm einer 5-proz. Lösung der im folgenden angegebenen Salze geschüttelt. Die Wirksamkeit des Lösungsvermittlers gab sich durch die Farbe der wäßr. Phase zu erkennen.

Lösungsvermittler	Färbung der wäßrigen Phase
Natriumoxalat	keine
Natrium-sulfanilat	schwach
Natrium-naphthalin-1.6-disulfonat	stark
Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonat	} sehr stark
Natrium-naphthionat	
Natrium- $\beta$ -anthrachinonsulfonat	

Zusammensetzung des verwendeten technischen Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonates: 85.9% Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonat, 1.8% Natrium- $\alpha$ -naphthalinsulfonat, 2% Natrium-1.6-naphthalindisulfonat, 5.7% Natriumchlorid, 2.5% Natriumsulfat.

Präparative Gegenstromverteilung von Actinomycin C: Da jedes Gefäß der 200stufigen, vollautomatischen Verteilungsapparatur 50 ccm faßte, waren von jeder Phase 5 l erforderlich.

a) Mobile Phase: Techn. Methylbutyläther wurde über eine Kolonne fraktioniert. Verwendung fand die zwischen 70° und 73° übergehende Fraktion.

b) Stationäre Phase: 120 g techn. Natrium- $\beta$ -naphthalinsulfonat wurde unter Erwärmen in 2–3 l Wasser gelöst. Die trübe, schmutzigbraune Lösung wurde durch Kohle filtriert und auf 6 l aufgefüllt. (Farbe schwach gelb.)

Nachdem beide Phasen gründlich miteinander geschüttelt waren, wurde nochmals filtriert. Äußerste Sauberkeit der Lösungsmittel wie auch der Apparatur war erforderlich, um Emulsionsbildung zu verhindern. Zur Verteilung wurde eine Lösung von 470 mg Actinomycin C in 500 ccm eines Gemisches beider Phasen in die ersten zehn Röhrchen der Verteilungsapparatur eingefüllt. Die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes war nach 60 Schüttelbewegungen erreicht; die Trennung beider Phasen in Ruhestellung erforderte 5 bis 10 Min. Die Verteilung wurde solange fortgesetzt, bis die schnellste Komponente (C<sub>3</sub>) die am langsamsten wandernde (C<sub>1</sub>) fast erreicht hatte, was nach 254 Verteilungen der Fall war. Der Verteilungsvorgang ließ sich an der Farbe der Lösungen gut verfolgen. Die Verteilungskurve wurde kolorimetrisch ermittelt. Danach wurden abgetrennt: Stufe 57 bis 86 (C<sub>1</sub>), Stufe 92 bis 131 (C<sub>2</sub>), Stufe 146 bis 188 (C<sub>3</sub>).

In jeder dieser drei Gruppen wurde die mobile und stationäre Phase getrennt aufgearbeitet. Das Actinomycin der wäbr. Phase schüttelte man mit Benzol aus und gab den Benzolextrakt durch eine Säule von Aluminiumoxyd. Durch Waschen mit Essigester wurde das Actinomycin eluiert. Es kristallisierte beim Eindunsten des Eluates aus. Die mobile Phase trocknete man mit Natriumsulfat, filtrierte anschließend durch eine Säule von Aluminiumoxyd und eluierte die Actinomycin-Zone ebenfalls mit Essigester.

In gleicher Weise wie Actinomycin C wurden auch Actinomycin X und I in die Komponenten aufgetrennt. Entsprechend ihrer geringeren Löslichkeit war die Ausgangsmenge kleiner (200–250 mg). Außerdem mußte bei ihnen die Konzentration des Lösungsvermittlers auf 1.5% bzw. auf 1.25% verringert werden, um einen günstigen Verteilungskoeffizienten zu erreichen. Aufarbeitung wie beim Actinomycin C.

Papierchromatographische Trennung der Actinomycine. Die für die mobile Phase erforderlichen Lösungsmittel Butanol, Butylacetat und *n*-Dibutyläther hatten den richtigen Siedepunkt und waren aus technischen Produkten durch fraktionierte Destillation gewonnen. Als stationäre Phase diente eine Lösung von 50 g Natrium-*m*-kresotinat in 500 ccm Wasser. Die zunächst trübe, braune Lösung war nach Filtration durch Kohle klar und schwach gelb.

Lösungsmittelsysteme: 1. Butanol + *n*-Dibutyläther (2:3)/10-proz. Lösung von Natrium-*m*-kresotinat. 2. Butylacetat + *n*-Dibutyläther (3:1)/10-proz. Lösung von Natrium-*m*-kresotinat. Beide Lösungsmittel wurden vor der Anwendung gut gegeneinander abgesättigt.

Chromatographie mit absteigender Phase. Ein Papierstreifen (Schleicher & Schüll 2043b) wurde mit 10-proz. Lösung von Natrium-*m*-kresotinat matt-feucht besprüht. Nachdem am oberen Rand Actinomycin C aufgetragen war, wurde anschließend in der üblichen Weise mit der mobilen Phase entwickelt. Nach einigen Stdn. waren zwei stärkere und ein schwacher Fleck sichtbar, die jedoch nicht scharf voneinander getrennt waren. Bei zunehmender Laufzeit verschwammen die Umrisse immer mehr, bis die Flecken sich völlig verteilt hatten.

Ringchromatographie. Gearbeitet wurde in einem Exsiccator von 25 cm Durchmesser, dessen Deckel mit einem Tubus versehen war<sup>12</sup>).

Zuführung der mobilen Phase erfolgte aus einem zur Kapillare ausgezogenen Tropftrichter oder aus einem Tropfrohr. Dieses bestand aus einer Pipette (25 ccm), deren oberes Ende durch einen Hahn verschlossen und deren Spitze abgesprengt war. Der beim

Absprengen der Spitze entstandene Rand des Pipettenrohrs wurde etwas eingekerbt, um den Durchtritt der zum Volumenausgleich erforderlichen Luft zu erleichtern (schräges Abschleifen des Randes hat den gleichen Effekt). Dieses Tropfrohr hat den Vorteil, daß sich der Nachlauf von selbst regelt. Seine Geschwindigkeit kann durch mehr oder minder starkes Andrücken des unteren Rohrendes an die Papierfläche beeinflußt werden. Die Vorrichtung versagt bei leicht beweglichen Flüssigkeiten, z. B. Benzol.

Nachdem das Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) mit stationärer Phase mattfeucht besprüht worden war, wurde etwa 1 mg Actinomycingemisch in Aceton oder Methanol gelöst mit einer Kapillare auf der Peripherie eines kleinen Startkreises (2 cm Durchmesser) aufgetragen. Die Konzentration der Lösung soll etwa 5 mg Actinomycin in 0.5 ccm Lösungsmittel betragen. Das mit stationärer Phase angefeuchtete Papier läßt sich völlig glatt und straff auf den Exsiccatorrand auflegen. Die Entwicklung der Chromatogramme läßt sich dank der gelben Farbe der Zonen bequem verfolgen. Die Laufzeit in einem bestimmten Lösungsmittelsystem ist abhängig von der Temperatur und der benutzten Papiersorte. Bei den oben angegebenen Systemen beträgt sie bei 20° und Verwendung von Schleicher & Schüll 2043 b 6–8 Stunden.

Das Trocknen der Chromatogramme erfolgt am besten waagrecht an der Luft. Die mit Chlorwasserstoff eintretende Rotfärbung der vorher gelben Actinomycinzonen verschwindet (vor allem an feuchter Luft) nach einigen Stunden, kann jedoch durch erneute Behandlung mit HCl wieder hervorgerufen werden.

Sektorenmethode. Bei der Sektorenmethode werden auf der Peripherie des Startkreises zwei oder mehrere Substanzen nebeneinander aufgetragen. Bei der Ermittlung der  $R_{C_2}$ -Werte wurden die Laufstrecken von der Peripherie des Startkreises aus gemessen.

Bestimmung des Mengenverhältnisses der Komponenten in Actinomycinpräparaten. Die Zonen des Chromatogrammes wurden herausgeschnitten, in kleine Streifen zerteilt und mit warmem Methanol eluiert. Nach Auffüllen auf 10 ccm bestimmte man die Extinktion im Lange-Kolorimeter. Die Färbung dünner Lösungen kann durch Zusatz von 1 ccm konz. Salzsäure vertieft und damit genauer meßbar gemacht werden.

Gewinnung der Actinomycinpräparate. Die actinomycinbildenden *Streptomyces*-Stämme wurden in P-Kolben auf einer Nährlösung folgender Zusammensetzung kultiviert: Glycerin 2%, Kaliumnitrat 1%, Natriumchlorid 0.1%, Kaliumhydrogenphosphat 0.1%, Magnesiumsulfat 0.005%, Eisen(II)-sulfat 0.001%, Calciumcarbonat 0.001%. Kulturdauer bei 28°: 3–4 Wochen. Aufgearbeitet wurde lediglich die Kulturlösung. Durch mehrmaliges Ausschütteln mit Benzol entzog man ihr die Actinomyceine und isolierte sie in der üblichen Weise.

## 164. Friedrich L. Breusch: Über bi-homologe Reihen (VII. Mitteil. über isomere und homologe Reihen\*)

[Aus dem zweiten Chemischen Institut der Universität Istanbul]

(Eingegangen am 12. Mai 1954)

Neun bi-homologe Reihen, teilweise bis zu einer Alkylkettenlänge von zweimal 20 Kohlenstoff-Atomen, wurden synthetisiert. Der Verlauf der Schmelzpunktskurven dieser bihomologen Reihen wird besprochen.

Unter bi-homologen Reihen werden solche homologen Reihen verstanden, bei denen zwei an dasselbe Kohlenstoff-Atom eines Moleküls gebundene Alkylreste gleichzeitig um je eine  $-CH_2$ -Gruppe verlängert sind.

\*) VI. Mitteil.: F. Breusch u. E. Ulusoy, Chem. Ber. 86, 638 [1953].