

f) Bestrahlung von III mit Sonnenlicht: Eine Lösung von 5.20 g III in 80 cm Äther wird unter Luftausschluß solange dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt, bis die blaue Färbung völlig verschwunden und der Äther nur noch schwach braun gefärbt ist. Dabei scheidet sich unter Trübung der Lösung und Freiwerden von Chlorwasserstoff ein schwarzbraunes Harz ab. Dieses wird nach Abgießen des Äthers in verd. Salzsäure gelöst und neutralisiert. Die sich hierbei abscheidende ölig-harzige Masse wird in Chloroform aufgenommen und die wäßr. Phase nochmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroform-Lösungen werden mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels erhält man aus dem schwarzen, viscosen Rückstand durch Destillation 0.57 g 2-Methyl-cyclohexanon-(1)-oxim. Sdp._{0.9} 70–71°; n_D^{20} 1.4935; Schmp. 42–43°. Ausb. 14% d. Theorie. Der Oxim-Test mit Chlor ist positiv; mit einem Vergleichspräparat erfolgt keine Schmp.-Erniedrigung.

$C_7H_{13}ON$ (127.2) Ber. N 11.01 Gef. N 11.2

8.00 g „Blaue Flüssigkeit“ (3.19 g x-Chlor-x-nitroso-methyl-cyclohexan) werden in 100 cm Methyleyclohexan gelöst und unter Luftausschluß mit direktem Sonnenlicht bestrahlt. Nach Entfärbung der Lösung wird diese vom entstandenen Harz abdekantiert, das Harz in mäßig verd. Salzsäure gelöst, neutralisiert und ausgeäthert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels werden aus dem braunen Rückstand durch Destillation 0.40 g (16% d.Th.) Methyleyclohexanon-(x)-oxim erhalten. Sdp._{0.5} 74 bis 76°; n_D^{20} 1.4917.

Eine Probe der Substanz färbt sich beim Einleiten von Chlor in ihre Lösung in Cyclohexan blau.

$C_7H_{13}ON$ (127.2) Ber. N 11.01 Gef. N 10.8

232. Hans Brockmann und Günter Schmidt-Kastner: Resistomycin, II. Mitteil.*); XXIV. Mitteil. über Antibiotica aus Actinomyceten**)

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]

(Eingegangen am 26. Juli 1954)

Aus dem Mycel von *Streptomyces resistomycificus* ließ sich ein gelbes, in Wasser schwer lösliches, gegen Alkali und Säure ungewöhnlich widerstandsfähiges Antibioticum, das Resistomycin, $C_{23}H_{18}O_6$, isolieren, über dessen Untersuchung berichtet wird.

Die üblichen Testverfahren zur Auffindung antibiotischer *Actinomyces*-Stämme setzen voraus, daß die im Mycel gebildeten Antibiotica in ausreichender Menge in das Kulturmedium übergehen. Ist das nicht der Fall, weil das Antibioticum im Mycel zu fest verankert¹⁾ oder in Wasser zu wenig löslich ist, so zeigt der betreffende Stamm im Plattentest oder bei der Prüfung seiner Nährlösung geringe oder keine Wirksamkeit. Bei einer auf rein praktische Ziele ausgerichteten Suche nach medizinisch brauchbaren Antibiotica, bei denen eine gewisse Wasserlöslichkeit erwünscht ist, mag es berechtigt sein, solche Stämme unbeachtet zu lassen; nicht aber, wenn man die antibiotische Wirksamkeit lediglich als Leitfaden benutzt, um unbekannte Inhaltsstoffe

* I. vorläufige Mitteil.: H. Brockmann u. G. Schmidt-Kastner, Naturwissenschaften 38, 479 [1951].

** XXIII. Mitteil.: H. Brockmann u. H. Gröne, Chem. Ber. 87, 1036 [1954].

¹⁾ So ist z.B. ein Teil des roten Antibiotiums Rhodomycin so fest im Mycel gebunden, daß er erst nach Einwirkung von Salzsäure mit Aceton extrahierbar wird.

aus Actinomyceten zu isolieren und damit einer eingehenden pharmakologischen Untersuchung²⁾ zugänglich zu machen. Wir haben deshalb von 125 *Actinomyces*-Stämmen, die beim üblichen Test wenig oder gar nicht wirksam waren, das Mycel eingehender untersucht. In einer Reihe von Fällen gewannen wir dabei Mycelauszüge mit beachtlicher antibiotischer Wirksamkeit. Bei einem dieser Stämme, der zu den Melaninbildnern³⁾ gehört und von W. Lindenbein⁴⁾ als neue Art mit dem Namen *Streptomyces resistomycificus* belegt worden ist, fanden wir im Mycel ein gelbes, in Wasser sehr schwer lösliches Antibioticum, das wir in kristallisierter Form isoliert und wegen seiner ungewöhnlichen Resistenz gegen Alkali und Säure Resistomycin⁵⁾ genannt haben. Im Laufe unserer Untersuchung stießen wir auf drei weitere Melanin und Resistomycin bildende Stämme, deren Identität mit *Str. resistomycificus* noch nicht gesichert ist.

I. Isolierung und Bruttoformel des Resistomycins

Aus filtrierten Sporen-Suspensionen von *Str. resistomycificus* haben wir im Kochschen Plattengußverfahren vier morphologisch deutlich unterschiedene Varianten erhalten⁵⁾. Nur zwei von ihnen (A und B) bilden Resistomycin, und zwar Variante A bedeutend mehr als B. A wurde daher ausschließlich zur Resistomycingewinnung benutzt und teils im Oberflächen-, teils im Submersverfahren mit Glycerin und Glykokoll als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle kultiviert. Die nach Abernten des Mycels hinterbleibende Kulturlösung war antibiotisch nur schwach wirksam.

Zur Isolierung des Resistomycins wurde das trockene, feingepulverte, mit Petroläther von Fetten und Lipoiden befreite Mycel im Kreisprozeß erschöpfend mit Äther ausgezogen. Während dieser Extraktion, die wegen der geringen Löslichkeit des Resistomycins längere Zeit in Anspruch nahm, schied sich die Hauptmenge des Antibioticums kristallin aus dem siedenden Äther ab; den Rest erhielt man beim Einengen des Äthers. 1 kg Trockenmycel der Variante A (aus 500 l Kulturflüssigkeit) gab etwa 23 g rohes Resistomycin.

Dieses Präparat bildete bei der chromatographischen Adsorption aus Dioxan-Äther (1:10) an Gips eine gelbe Hauptzone und mehrere darüberliegende, schmale, rote und gelbe Nebenzonen, die antibiotisch wirksame, noch nicht näher untersuchte Begleitstoffe des Resistomycins enthalten. Sie können auch durch Umkristallisieren abgetrennt werden, so daß die wegen seiner geringen Löslichkeit umständliche und kostspielige chromatographische Reinigung des Resistomycins entbehrlich ist.

Obleich sich Resistomycin bei der Adsorptionschromatographie wie eine reine Substanz verhält, haben wir es auch noch einer 40stufigen⁶⁾ Gegenstromverteilung im System Äther-Pufferlösung p_H 11.3 unterworfen. Nach der dabei erhaltenen Kurve (Abbild. 1 s. S. 1462) scheint uns die Einheitlichkeit des Resistomycins vollends gesichert.

²⁾ H. Brockmann, *Angew. Chem.* 66, 1 [1954].

³⁾ H. Brockmann, H. Pini u. O. v. Plotho, *Chem. Ber.* 83, 161 [1951].

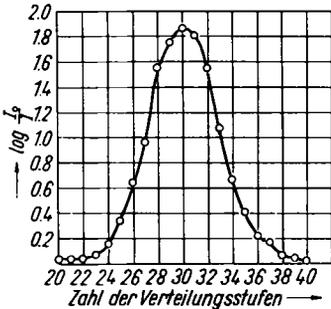
⁴⁾ *Arch. Mikrobiol.* 17, 361 [1952].

⁵⁾ G. Schmidt-Kastner, *Dissertat.* Göttingen, 1952.

⁶⁾ Wegen der geringen Löslichkeit des Resistomycins ist es schwer, die Verteilung über eine große Stufenzahl durchzuführen.

Resistomycin kristallisiert aus Aceton oder Dioxan in gelben Nadeln vom Schmp. 315° (Zers.), die gegen 300° orangerot werden. Die gleiche Farbänderung (gelb \rightarrow orangerot) beobachtet man beim Erhitzen in hochsiedenden Lösungsmitteln z. B. in Phthalsäurediäthylester.

Auf *St. aureus* wirkte das Antibioticum bis zur Verdünnung $1:20 \cdot 10^6$ wachstumshemmend. Präparate, die 1. 60 Min. auf 200° , 2. 5 Stdn. in n KOH auf 90° und 3. 2 Stdn. in konzentrierter Schwefelsäure auf 120° erhitzt worden waren, zeigten die gleiche Wirksamkeit. *Mycobacterium tuberculosis* wurde in Kirchner-Medium bis zur Verdünnung $1:500000$ bzw. $1:1000000$ gehemmt⁷⁾.



Abbild. 1. Fraktionierte Gegenstromverteilung von Resistomycin im System Äther/0.1 n Glykokoll-Puffer p_H 11.3

kleine Probe Trockenmycel – in konz. Schwefelsäure gelöst – reicht aus, um unter der UV-Lampe festzustellen, ob ein resistomycinbildender Stamm vorliegt.

Während Resistomycin in Wasser praktisch unlöslich ist, wird es von wäbr. Alkali leicht mit rotgelber Farbe aufgenommen. Zugabe von Alkali zu einer gelben, alkoholischen Resistomycin-Lösung bewirkt deutliche Farbvertiefung nach Orange. Beim Schütteln seiner Äther-Lösung mit Puffer-Lösungen vom p_H 8.2–12.0 verteilt sich Resistomycin auf beide Phasen.

Die Analysenzahlen für Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff schließen die Anwesenheit anderer Elemente aus und ergeben als kleinste Summenformel $C_{19}H_{15}O_5$ (323.3), als nächst größere $C_{23}H_{18}O_6$ (390.4). Acetyl- und Methoxy-Gruppen ließen sich nicht nachweisen.

Resistomycin ist in den zur ebullioskopischen und kryoskopischen Mol.-Gew.-Bestimmung geeigneten Lösungsmitteln zu wenig löslich, um eine einwandfreie Messung zu erlauben. Wie kürzlich gezeigt, läßt sich bei Verbindungen so geringer Löslichkeit das Mol.-Gew. auf chemischen Wege durch „Differentialtitration“ in nichtwäßrigen Lösungsmitteln bestimmen, vorausgesetzt, daß mindestens zwei saure oder zwei basische Gruppen vorhanden sind⁸⁾.

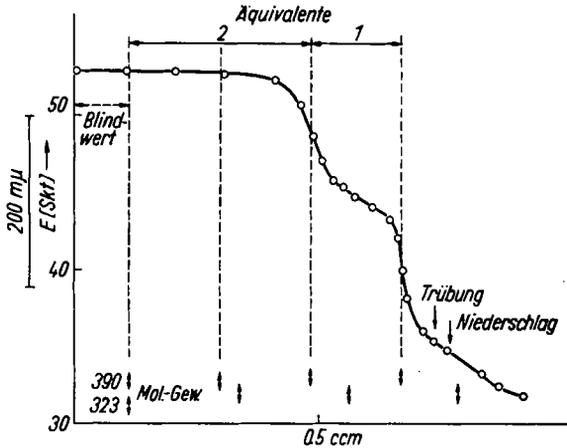
Da Resistomycin schwach sauer reagiert, wurde es potentiometrisch in Äthylendiamin mit Natrium-colaminat titriert.

Die dabei erhaltene Kurve (Abbild. 2) zeigt die für eine Differentialtitration erforderlichen zwei Wendepunkte und erlaubt demnach, aus der zwischen beiden Wendepunkten verbrauchten Menge Natrium-colaminat das Mol.-Gew.

⁷⁾ Diese Ergebnisse verdanken wir Hrn. Dr. Weitzel, Medizin. Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft Göttingen.

⁸⁾ H. Brockmann u. E. Meyer, Chem. Ber. 86, 1514 [1953].

zu berechnen⁸⁾. Gefunden wurde $386 \pm 5^8)$. Von den beiden oben genannten Summenformeln ist demnach die größere $C_{27}H_{18}O_8$ (390.4) als Bruttoformel des Resistomycins anzusehen.



Abbild. 2. Potentiometrische Titration von Resistomycin in Äthylendiamin mit 0.035 n Natrium-colaminat

II. Versuche zur Konstitutionsermittlung des Resistomycins

Resistomycin enthält vier aktive Wasserstoff-Atome. Bei der Kuhn-Roth-Oxydation fanden wir 1.2 Moll. Essigsäure, woraus auf zwei C-Methyl-Gruppen zu schließen ist.

Der Basenverbrauch bei der potentiometrischen Titration in Äthylendiamin ist bis zum ersten Wendepunkt doppelt so groß wie zwischen dem ersten und zweiten Wendepunkt (Abbild. 2), d. h. Resistomycin enthält insgesamt drei saure Gruppen. Behandelt man Resistomycin mit einem Äquiv. n NaOH, so reagiert eine der sauren Gruppen unter Bildung eines roten, kristallisierten, wasserlöslichen Mononatrium-Salzes.

Die nach diesen Befunden naheliegende Frage, ob Resistomycin eine Säure ist, kann verneint werden, denn das Antibioticum löst sich nicht in wäßrigem Natriumhydrogencarbonat und läßt sich aus wäßrigem Natriumcarbonat zu einem erheblichen Teil mit Äther ausschütteln. Ferner bleibt es bei längerer Einwirkung ätherischer Diazomethan-Lösung unverändert. Auch das UR-Spektrum gibt keinen Hinweis auf eine Carboxygruppe. Wir nehmen daher an, daß der Verbrauch an Natrium-colaminat auf drei phenolische Oxygruppen zurückzuführen ist. Damit sind von den vier aktiven Wasserstoffatomen drei in ihrer Funktion aufgeklärt. Ob das vierte einer nicht titrierbaren, phenolischen Oxygruppe zuzuordnen ist⁹⁾, bleibt zunächst un-

⁹⁾ Z.B. wird bei der potentiometrischen Titration des Chinalizarins mit Natrium-colaminat die vierte Oxygruppe nicht mehr erfaßt; vergl. H. Brockmann u. E. Meyer, Chem. Ber. 86. 1514 [1953].

gewiß. Bemerkenswert ist, daß keine der sauren Oxygruppen mit Diazomethan reagiert. Versuche, sie mit Dimethylsulfat-Kaliumcarbonat zu methylieren, lieferten Gemische verschieden weit methylierter Produkte, deren Reindarstellung noch aussteht.

Durch Acetylierung lassen sich nur zwei Oxygruppen des Resistomycins erfassen. So fanden wir bei der Titration mit Acetanhydrid-Pyridin einen Essigsäureverbrauch, der 1.6 Mcl. Hydroxyl entspricht. Präparative Acetylierung mit Acetanhydrid unter Zusatz einer geringen Menge konzentrierter Schwefelsäure gab (nach 2stdg. Erwärmen auf 90°) ein Reaktionsprodukt, das sich durch chromatographische Adsorption an Calciumsulfat in eine Haupt- und zwei Nebenfraktionen auftrennen ließ. Die in gelben Blättchen vom Schmp. 273° kristallisierende Hauptfraktion ist ihren Analysenzahlen nach ein Resistomycin-monoacetat. Es läßt sich im Gegensatz zum Resistomycin aus Äther nicht mit wäßrigem Natriumcarbonat ausschütteln, ein weiterer Beweis dafür, daß Resistomycin keine Carboxygruppe enthält.

Die eine Nebenfraktion, hellgelbe Nadeln vom Schmp. 270°, ist ihren Acetyl-Werten nach ein Diacetat. Ihre Chromatogramm-Zone liegt, wie zu erwarten, unterhalb der Hauptzone und fluoresciert im Gegensatz zu dieser blau.

Die andere Nebenfraktion vom Schmp. 218°, deren Zone über der Hauptzone liegt und ebenso wie diese gelb fluoresciert, ist anscheinend ein acetyliertes Umwandlungsprodukt des Resistomycins. Bei längerem Erhitzen des Resistomycins mit Acetanhydrid nimmt seine Menge auf Kosten der Hauptfraktion zu.

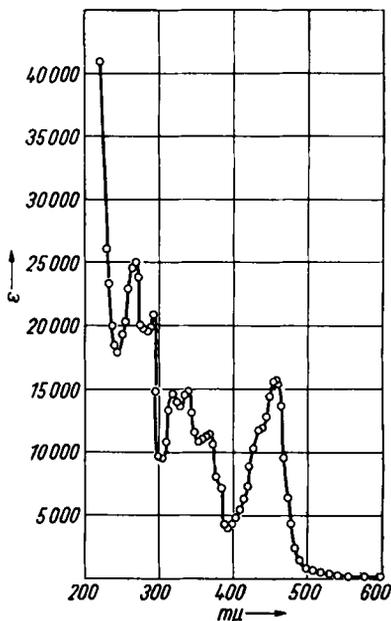
Um für Tierversuche ein fettlösliches Präparat zu gewinnen, haben wir sowohl Resistomycin als auch sein Mononatrium-Salz mit Stearinsäurechlorid umgesetzt. Bei beiden Ansätzen entstand das gleiche, unscharf bei 113° schmelzende, in gelben Rhomben kristallisierende Resistomycin-monostearat. Im Gegensatz zum Resistomycin ist es in Petroläther und fetten Ölen verhältnismäßig gut löslich und läßt sich aus Äther nicht in wäßriges Natriumcarbonat überführen. Schüttelt man die Äther-Lösung mit wäßriger Alkalilauge, so fällt das Stearat, offenbar als Salz, an der Grenzschicht beider Phasen aus.

Nimmt man an, daß Resistomycin 4 Oxygruppen enthält, von denen drei potentiometrisch titrierbar sind, so bleibt noch die Funktion von zwei Sauerstoffatomen zu klären. Da das Antibioticum verhältnismäßig wasserstoffarm ist, ein bandenreiches UV-Spektrum (Abbild. 3) hat und in Lösung fluoresciert, enthält es zweifellos kondensierte aromatische Ringe. Als nächstes war daher zu prüfen, ob die beiden restlichen Sauerstoffatome einer Chinongruppierung angehören.

Oxychinone mit kondensierten aromatischen Ringsystemen lösen sich in konzentrierter Schwefelsäure unter mehr oder weniger ausgeprägter Farbvertiefung. Resistomycin zeigt diese Halochromie nicht, seine Lösungsfarbe in Schwefelsäure ist, wie schon erwähnt, rein gelb.

Versuche, Resistomycin reduzierend zu acetylieren, haben keinen Anhaltspunkt für das Vorliegen einer Chinongruppierung ergeben. Auch bei der katalytischen Hydrierung verhielt sich das Antibioticum anders als ein Oxychinon. Mit einem großen Überschuß an Platin-Katalysator verbrauchte es in Eis-

essig innerhalb weniger Minuten zwei Moll. Wasserstoff; dann wurde die Aufnahme langsamer und kam nach Verbrauch von insgesamt etwa vier Moll. Wasserstoff praktisch zum Stillstand. Während der Reaktion färbte sich die anfangs gelbe Lösung gelbbrot. Das Hydrierungsprodukt kristallisierte nach chromatographischer Adsorption aus Aceton an Gips in gelbrotten Nadeln; seine gelbe Aceton-Lösung wurde auf Zusatz von wäßriger Alkalicarbonat-Lösung rot und bei anschließendem Ansäuern wieder gelb. Dem chemischen Verhalten nach kann Resistomycin kein Chinon sein. Dieses Ergebnis wird durch das Ultrarot-Spektrum bestätigt. Chinone, auch solche mit kondensierten aromatischen Ringsystemen wie z. B. Anthrachinon, zeigen eine Carbonylbande bei 5.95μ . Eine *peri*-ständige Oxygruppe verschiebt die Bande des benachbarten Carbonyls nach 6.08μ , die der anderen Carbonylbande bleibt bei 5.95μ . Ist jedem der beiden Chinoncarbonyle eine Oxygruppe benachbart, wie z. B. im 1.4-Dioxy-anthrachinon, so liegen beide Carbonylbanden bei 6.12μ . Resistomycin hat eine starke Bande bei 6.3μ mit einer Schulter bei 6.15μ . Diese Schulter könnte an sich von zwei chelierten Chinoncarbonyl-Gruppen herrühren. Dagegen spricht aber eindeutig das Verhalten gegen Alkali und konz. Schwefelsäure. Mit zwei chelierten Chinoncarbonylen müßte sich nämlich Resistomycin in wäßriger Alkalilauge bzw. in konzentrierter Schwefelsäure violett oder gar blau lösen.



Abbild. 3. Absorptionsspektrum des Resistomycins in Methanol

Auch für Anwesenheit einer einzelnen Carbonyl-Gruppe gibt weder die Umsetzung mit Carbonylreagenzien noch das Ultrarot-Spektrum Anhaltspunkte. Lediglich die beim Erwärmen mit Pyroboracetat eintretende sehr intensive, hellgrüne Fluoreszenz könnte als Hinweis auf das Vorliegen einer chelierten Carbonyl-Gruppe angesehen werden, gegen die auch das Ultrarot-Spektrum keinen Einwand zuläßt. Ist eine solche Gruppe vorhanden, so wären je nachdem, ob Resistomycin drei oder vier Oxygruppen enthält, noch zwei oder ein Sauerstoffatom in ihrer Funktion aufzuklären. Manches scheint uns dafür zu sprechen, daß ein Sauerstoffatom als Ätherbrücke vorliegt.

Bemühungen, durch Zinkstaubdestillation oder Zinkstaubschmelze des Resistomycins Hinweise auf die Struktur des Grundgerüsts zu erhalten, verliefen ergebnislos; die Ausbeute an Reduktionsprodukten war so gering, daß ihre Identifizierung nicht gelungen ist.

Bei Versuchen, Resistomycin oxydativ abzubauen, wurde es u. a. auch mit Stickstoffdioxid umgesetzt. Dabei faßten wir in mäßiger Ausbeute ein gut kristallisiertes, rotes Produkt, dessen Analysenzahlen als kleinste Formel $C_{17}H_{11}O_7N$ ergeben. Seine eingehendere Untersuchung steht noch aus.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, den Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld, sowie dem Fonds der Chemie danken wir für großzügige Unterstützung unserer Versuche.

Für die Durchführung der mikrobiologischen Versuche danken wir Frau Schmidt-Kastner.

Beschreibung der Versuche

Varianten von *Streptomyces resistomycificus*: Aus einer Sporensuspension von *Str. resistomycificus* wurden im Kochschen Plattengußverfahren vier Varianten gewonnen, die auf Agar folgende Merkmale zeigten. Variante A: schwach rosafarbenes, gut versportes Luftmycel; Agar stark gebräunt. Variante B: graubraunes, mäßig versportes Luftmycel; Agar hellbraun. Variante C: glattes, glänzendes, braunrotes, unversportes Luftmycel; Agar braun. Variante D: glattes, glänzendes, farbloses, unversportes Mycel; Agar fast farblos.

Im Plattenverfahren (Testorganismus: *Bac. subtilis*) zeigte Variante A eine gut ausgebildete, Variante B eine schwächere Hemmzone; C und D dagegen waren wirkungslos.

Bakterienspektrum der Variante A: Im Plattentest mit Fleischextrakt-Peptonglykokoll als Nährsubstrat zeigte A antibiotische Wirksamkeit gegen die grampositiven *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*, *Bac. petasitis*, *Bac. consolidus*. Die gramnegativen *Bact. coli*, *Bact. prodigiosum* und *Bact. ferrugineum* dagegen wurden nicht gehemmt.

Kulturbedingungen für Großansätze von *Str. resistomycificus*: Für Oberflächenkulturen in P-Kolben sowie Submers-Ansätze der Variante A wurde folgende Nährlösung verwendet: 2 Vol.-Proz. Glycerin, 0.25% Glykokoll, 0.1% Natriumchlorid, 0.1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0.01% Eisen(II)-sulfat, 0.01% Magnesiumsulfat, Spuren Calciumcarbonat, 0.5 Vol.-Proz. Hefekochsaft. Zur Gewinnung des Hefekochsaftes hielt man eine Suspension von 1 Gew.-Tl. Hefe in 10 Gew.-Tln. Wasser 1 Stde. bei 30°, erhitze dann unter Druck auf 150° und dekantierte vom Bodensatz ab.

Oberflächen-Kulturen: Nach 22-tägig. Bebrütung bei 27° wurde das Mycel von der dunkelbraunen, gegen *St. aureus* unwirksamen Nährlösung durch ein Koliertuch abgetrennt, mit Trockeneis ausgefroren und anschließend i. Vak. bei 60–70° getrocknet. Ausb. 5.5 g Trockenmycel aus 1 l Kulturlösung.

Submersverfahren: 500 l Nährlösung (p_H 6.8) wurden nach Beimpfung mit 1 l einer Vorkultur von Variante A (hergestellt in Schüttelkölbcchen) unter Belüftung 140 Stdn. bei 30° gerührt. Das schwarzbraune Mycel wurde durch ein Beutelfilter abgetrennt: Ausb. 2.6 kg lufttrockenes Mycel.

Oberflächen-Kultur der Variante A mit Nitrat als Stickstoff-Quelle: Nährlösung: 2 Vol.-Proz. Glycerin, 0.85% Natriumnitrat, 0.18% Kalium-dihydrogenphosphat, 0.12% Dikaliumhydrogenphosphat, 0.2% Natriumchlorid, 0.2 g Magnesiumsulfat, 0.005% Eisen(II)sulfat, 0.005% Calciumcarbonat, 1 Vol.-Proz. Hoaglundische Spurenlösung, 1 Vol.-Proz. Hefekochsaft. Nach 20-tägig. Bebrütung bei 27° wurde das graubraune, weißversporete Mycel von der unwirksamen, braunen Kulturlösung abfiltriert; Ausb. 2.8 g Trockenmycel aus 1 l Kulturlösung. Die Resistomycinausbeute war die gleiche wie beim Ansatz mit Glykokoll.

Kultur der *Str. resistomycificus*-Variante B: Auf Glycerin-Glykokoll-Nährlösung war auch bei längerer Kulturdauer das Wachstum nur gering. Ausb. nach 30 Tagen 1.3 g Trockenmycel aus 1 l Kulturlösung; die Resistomycinausbeute war gering.

Gewinnung von Resistomycin aus Trockenmycel: 1 kg trockenes, feingemahlene Mycel wurde im Kreisprozeß zunächst 50 Stdn. mit Petroläther vorextrahiert und anschließend in gleicher Weise 50 Stdn. mit Äther behandelt. Dabei schied sich die Hauptmenge des Resistomycins (Fraktion I) aus dem siedenden Ätherextrakt ab. Eine zweite Fraktion (II) fiel aus, als die Ätherlösung nach beendeter Extraktion auf ein Viertel ihres Vol. eingengt wurde. Im Äther verblieben Fettbestandteile des Mycels, restliche Anteile von Resistomycin sowie Begleitfarbstoffe.

Die vereinigten Fraktionen I und II erhitzte man mit 3,5 l Aceton (über Kaliumpermanganat und Kaliumcarbonat destilliert) 15 Min. unter Rückfluß und filtrierte heiß vom Ungelösten ab (R). Aus der Aceton-Lösung kristallisierte Resistomycin aus. Die Mutterlauge dieser Fraktion benutzte man zum Umkristallisieren von R; Gesamtausb. 20 g. Das Filtrat der zweiten Fraktion lieferte nach Einengen auf 1 l noch 3,3 g Resistomycin. Zur weiteren Reinigung wurde aus reinstem Dioxan¹⁰⁾ umkristallisiert, aus dem sich das Resistomycin in safrangelben, balkenförmigen Nadeln abschied.

Löslichkeit (bei 20° in g/100 g Lösungsmittel): Suspensionen von Resistomycin in den verschiedenen Solvenzien erwärmt man kurz auf 40–50°, hielt 12 Stdn. bei 20°, filtrierte und führte in einer abgewogenen Menge die Rückstandsbestimmung durch. Essigester 0.003; Chloroform 0.009; Methanol 0.015; Benzol 0.02; Äthyläther 0.02; Pyridin 0.3; Butanol 0.4; Dioxan 1.2; Tetrahydrofuran 3.0; 62-proz. wäßr. Äthylendiamin 12.3.

Auf dem Kofler-Block sublimierte Resistomycin ab 215° langsam unter das Deckglas, wurde bei 300° orangerot und schmolz bei 315° (Zers.).

C₂₂H₁₈O₆ (390.4) Ber. C 70.76 H 4.65 O 24.58 4 akt. H 1.0 C-CH₃ 3.9
Gef.**) C 70.43 H 4.75 O 24.25 4 akt. H 1.0**), 1.2***) C-CH₃ 4.4

*) Aus Äther, Aceton, zweimal aus Dioxan umkristallisiert, an Gips chromatographiert und nochmals aus Aceton umkristallisiert.

***) In Pyridin bei 20°.

**) In Pyridin bei 95°.

Beständigkeit des Resistomycins: 1. 50 mg Resistomycin wurden 60 Min. auf 200° erhitzt. 2. 100 mg Resistomycin wurden in 20 ccm n KOH 5 Stdn. unter Stickstoff auf 90° erwärmt. Den beim Ansäuern mit 2n H₂SO₄ ausfallenden Niederschlag nahm man in Äther auf, schüttelte mit wenig Wasser durch und brachte den Äther-Rückstand zur Analyse. 3. 50 mg Resistomycin wurden in 5 ccm konz. Schwefelsäure 2 Stdn. auf 120° erwärmt. Der beim Verdünnen mit Wasser ausfallende Niederschlag wurde aus wenig Dioxan umkristallisiert. 4. Resistomycin wurde bei 213–215°/1.2 × 10⁻⁴ Torr sublimiert.

C₂₃H₁₈O₆ (390.4) Ber. C 70.76 H 4.65 Gef. 1. C 70.64 H 4.62 2. C 70.67 H 4.57
3. C 70.03 H 4.61 4. C 71.27 H 4.70

Antibiotische Wirksamkeit der vorstehenden vier Proben (wirksame Grenzkonzentration gegen *St. aureus*): 1. 1:25 × 10⁶; 2. 1:18 × 10⁶; 3. 1:25 × 10⁶; 4. 1:17 × 10⁶.

Katalytische Hydrierung: Eine Lösung von 5,2 mg Resistomycin in 4 ccm Eisessig wurde mit 20 mg Platin (aus PtO₂) in einer Mikroapparatur unter Wasserstoff geschüttelt. Wasserstoff-Verbrauch bis zum Knickpunkt der Hydrierkurve 0,60 ccm, 0°/760 Torr (2,1 Moll.). Gesamtverbrauch 1,21 ccm, 0°/760 Torr (4,2 Moll.).

Hydroxyl-Titration: 94,4 mg Resistomycin wurden in 2 ccm eines Gemisches aus 1,5 ccm Acetanhydrid und 50 ccm Pyridin 45 Min. auf 100° erwärmt. Die nach Verseifung des Acetanhydrides durchgeführte konduktometrische Titration mit 0,332 n NaOH ergab einen Verbrauch von 3,21 ccm. 2 ccm Acetylierungsgemisch in gleicher Weise umgesetzt verbrauchte 4,41 ccm.

C₂₃H₁₈O₆ (390.4) Ber. 2OH 8.72 Gef. OH 7.18

Natriumsalz: 390 mg (1 mMol) Resistomycin digerierte man mit 0,95 mMol n NaOH, verdampfte die tiefrote Lösung im Exsiccator, behandelte den amorphen Rückstand zweimal mit je 20 ccm Äther, um nicht umgesetztes Resistomycin zu entfernen, löste in wenig warmem Methanol (enthaltend 2% Natriumäthanolat, um Alkoholyse zu verhindern) und kühlte auf -30°. Die ausgeschiedenen roten, nadelförmigen Kristalle wurden bei -30° mit absol. Methanol gewaschen.

C₂₃H₁₇O₆Na (412.4) Ber. Na 5.59 Gef. Na 4.90

Acetylierung des Resistomycins: Eine Lösung von 500 mg Resistomycin in 20 ccm Acetanhydrid wurde mit einem Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt (Farbumschlag nach Rot) und 2 Stdn. auf 90° erwärmt (nach kurzer Zeit Farbumschlag nach Gelb). Den beim Verseifen des Acetanhydrides mit reichlich Wasser ausfallenden gelben

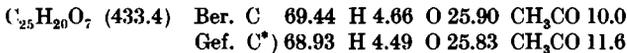
¹⁰⁾ K. Hess, Ber. dtsh. chem. Ges. 71, 2629 [1938].

Niederschlag nahm man in Aceton auf, verdünnte mit dem vierfachen Vol. Petroläther und filtrierte diese Lösung durch eine Säule von Calciumsulfat. Beim Nachwaschen mit Äther-Aceton (1:1) bildeten sich drei gut voneinander getrennte Zonen aus, die fraktioniert eluiert wurden und im folgenden nach der Reihenfolge ihres Erscheinens im Filtrat numeriert sind.

Zone 1 (blaue Fluoreszenz i. UV): Der Verdampfungsrückstand des Eluates kristallisierte aus Äther. Nochmaliges Umkristallisieren aus Dioxan lieferte lange, hellgelbe Nadeln vom Schmp. 270°.



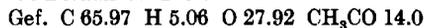
Zone 2 (gelbe Fluoreszenz i. UV): Der Inhaltstoff dieser Hauptzone kristallisierte beim Einengen des Eluates in hexagonalen Plättchen, die nach dreimaligem Umkristallisieren aus Dioxan bei 271°–272° schmolzen.



*): getrt. b. 70° i. Hochvak.

Katalytische Hydrierung: 4.1 mg des Acetates nahmen in 4 ccm Eisessig mit 20 mg Platin (aus PtO₂) insgesamt 1.00 ccm Wasserstoff (0°/760 Torr) auf. Nimmt man an, daß 4 Moll. H₂ aufgenommen werden, ergibt sich aus dem H₂-Verbrauch das Mol.-Gew. 428.

Zone 3 (gelbe Fluoreszenz i. UV): Der Verdampfungsrückstand des Eluates schmolz nach Umkristallisieren aus Dioxan bei 218°.

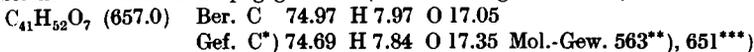


Acetylierung des Resistomycins mit Acetanhydrid-Schwefelsäure bei 120° lieferte ein Reaktionsprodukt, in dem Fraktion 3 auf Kosten der Fraktion 2 zugenommen hatte.

Resistomycin-monostearat:

a) 500 mg Natriumsalz des Resistomycins wurden unter Rühren mit dem dreifachen Überschuß von reinstem Stearinsäurechlorid 4 Stdn. auf 70° erwärmt. Das Reaktionsprodukt extrahierte man im Soxhlet-Apparat erschöpfend mit Petroläther, nahm den Verdampfungsrückstand des Petrolätherauszuges in Äther auf und filtrierte diese Lösung durch eine Calciumsulfat-Säule. Beim Entwickeln mit Äther bildeten sich folgende, deutlich voneinander getrennte Zonen (von oben nach unten beziffert) aus: 1. schmal, gelbe Fluoreszenz im UV, 2. schmal, orange-gelbe Fluoreszenz, 3. orange-gelb fluoreszierende Hauptzone, 4. schmale, hellblau fluoreszierende Zone. Das aus dem Eluat der Hauptzone erhaltene Stearat kristallisierte aus Benzol bzw. Dioxan in gelben Rhomben.

b) 500 mg Resistomycin wurden mit achtfachem Überschuß Stearinsäurechlorid 8 Stdn. auf 140° erhitzt, wobei das Resistomycin allmählich in Lösung ging. Das Reaktionsprodukt wurde durch zweimaliges Umkristallisieren aus Dioxan gereinigt. Gelbe, rhombische Kristalle. Schmp. gegen 113° (nach vorherigem Sintern; Kofler-Block).



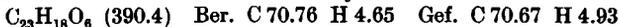
*): Chromatographisch adsorbiert und achtmal aus Butanol umkristallisiert; getrt. b. 70° i. Hochvak.

**): nach Rast in Campher.

***): Makrobestimmung nach Beckmann in Phenol.

Methylierungsversuche

a) Mit Diazomethan: Eine Lösung von 145 mg Resistomycin in 400 ccm Methanol wurde in Abständen von 6 Stdn. viermal mit je 40 ccm Diazomethan-Ätherlösung (22 mg Diazomethan/ccm) versetzt. Der beim Verdampfen des Äthers hinterbleibende, kristallisierte Rückstand war methoxyfrei.



b) Mit Dimethylsulfat: Eine Lösung von 213 mg Resistomycin in 200 ccm Aceton wurde nach Zugabe von 2 g Kaliumcarbonat und 1.2 ccm Dimethylsulfat 25 Stdn. geschüttelt, wobei man alle 5 Stdn. 0.2 ccm Dimethylsulfat nachfüllte. Der nach Ansäuern und Verdünnen mit Wasser ausgefallene gelbe Niederschlag enthielt 3.9%

CH_2O und bildete bei chromatographischer Adsorption aus Äther-Aceton (1:1) an Calciumsulfat eine Reihe verschiedenfarbig fluoreszierender Zonen, aus denen bisher kein einheitliches Produkt zu erhalten war.

Oxydativer Abbau des Resistomycins

a) Mit Stickstoffdioxid: Durch eine auf 100° erhitzte Lösung von 500 mg Resistomycin in 50 ccm Dioxan wurde 12 Min. ein lebhafter Stickstoffdioxid-Strom geleitet, wobei sich die Lösung sofort tiefrot färbte. Die erkaltete Reaktionslösung wurde nach Abblasen des überschüss. Stickstoffdioxids i. Vak. bis auf wenige ccm eingengt, das Oxydationsprodukt mit Wasser ausgefällt und in Äther aufgenommen. Aus der mit Wasser durchgeschüttelten, getrockneten und dann eingengten Ätherlösung schied sich das Oxydationsprodukt in dunkelroten Kristallen ab. Es ließ sich i. Hochvak. nicht sublimieren, war gut löslich in Dioxan und Aceton und wurde von konz. Schwefelsäure mit intensiver, roter Farbe aufgenommen. In Aceton oder Methanol gab es mit Zinn(II)-chlorid eine intensive Violettfärbung.

$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_7\text{N}$ (305.2) Ber. C 55.09 H 3.63 O 36.69 N 4.57 2 akt. H 0.66
Gef. C*) 55.31 H 3.61 O 35.91 N 4.51 2 akt. H 0.50**)

*) (Getr. b. 80° i. Hochvak.

**) in Pyridin b. 20° .

233. Otto Kruber und Armin Raeithel: Zur Kenntnis des Steinkohlenteer-Anthracenöls

[Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium der Gesellschaft für Teerverwertung m. b. H., Duisburg-Meiderich]

(Eingegangen am 27. Juli 1954)

Im Steinkohlenteer-Anthracenöl wurden als neue Bestandteile nachgewiesen: 1-Methyl-fluoren, Diphensuccindan, 2-Methyl-phenanthren, 3,6-Dimethyl-phenanthren und 1,8-Dimethyl-diphenylensulfid.

In Weiterführung unserer Arbeiten über das Steinkohlenteer-Anthracenöl haben wir aus der früher bearbeiteten Fraktion (Phenanthrenvorlauf, Siedegrenzen $315\text{--}320^\circ$)¹⁾ noch das synthetisch schon bekannte 1-Methyl-fluoren (I)²⁾ isolieren können. Es sind damit 3 Monomethyl-fluorene im Steinkohlenteer nachgewiesen.

Das 1-Methyl-fluoren (Schmp. $86\text{--}87^\circ$) ist nicht so leicht zu gewinnen wie das 2-Methyl-fluoren³⁾, das durch Feinfraktionierung und Auskristallisieren als höchstschmelzendes Isomeres (Schmp. 104°) leicht rein zu erhalten ist. 3-Methyl-fluoren³⁾ wurde nur als Fluorenon nachgewiesen.

Die Isolierung des 1-Methyl-fluorens gelang über die stufenweise Sulfurierung und die nachfolgende fraktionierte Spaltung einer kristallisierten Sulfonsäure. 1-Methyl- und 2-Methyl-fluoren verhalten sich ganz ähnlich bei der Sulfurierung: beide sind leicht sulfurierbar (mit 95-proz. Schwefelsäure bei Zimmertemperatur), beide geben kristallisierte Sulfonsäuren, beide lassen sich aber kaum durch Umkristallisieren, weder der Sulfonsäuren noch ihrer Kaliumsalze, trennen. Der deutliche Unterschied der Spaltungstemperaturen

¹⁾ O. Kruber u. A. Raeithel, Chem. Ber. **85**, 327 [1952].

²⁾ W. C. Lothrop u. P. A. Goodwin, J. Amer. chem. Soc. **65**, 363 [1943].

³⁾ O. Kruber, Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1382 [1932].