

Die in der Spalte „Aufarbeitung“ angegebenen römischen Ziffern beziehen sich auf die folgenden 3 Beispiele.

I. 5.6-Dimethyl-1.2.4-triazin: 6.4 g Diacetyl-mono-formylhydrazon werden mit einer Lösung von 1.7 g Ammoniak in 50 ccm absol. Äthanol 7 Stdn. im Einschlußrohr auf 145–150° erhitzt. Am nächsten Tage wird der Alkohol unter vermindertem Druck abgedampft und der dunkelbraune Rückstand i. Vak. destilliert. Das Dimethyltriazin geht bei 87–88°/14 Torr als schwach gelbliche, ölige Flüssigkeit über. Ausb. 4.2 g (77% d.Th.).

II. 5.6-Dimethyl-3-phenyl-1.2.4-triazin: 5 g Diacetyl-mono-benzoylhydrazon werden mit einer Lösung von 0.9 g Ammoniak in 40 ccm absol. Äthanol 7 Stdn. im Einschlußrohr auf 130–135° erhitzt. Am nächsten Tage wird durch allmähliche Zugabe von Wasser zur Reaktionslösung das 5.6-Dimethyl-3-phenyl-1.2.4-triazin ausgefällt. Es wird abgesaugt und mit wenig 40-proz. Äthanol gewaschen. Zur Reinigung wird das hellbraun gefärbte Rohprodukt in Äthanol gelöst und durch allmähliche Zugabe von Wasser wieder gefällt. Nach zweimal wiederholtem Umfällen ist die Substanz praktisch rein. Fast farblose, verfilzte Nadelchen vom Schmp. 82°. Ausb. 3.5 g (78% d.Th.).

III. 6-Methyl-5-phenyl-1.2.4-triazin: 9.5 g Acetylbenzoyl-mono-formylhydrazon werden mit einer Lösung von 1.7 g Ammoniak in 70 ccm absol. Äthanol 8 Stdn. im Einschlußrohr auf 140–145° erhitzt. Am nächsten Tage wird der Alkohol unter vermindertem Druck abgedampft, der Rückstand mit Äther aufgenommen und die äther. Lösung dreimal mit je 30 ccm 25–30-proz. Schwefelsäure durchgeschüttelt. Die vereinigten schwefelsauren Auszüge werden unter Eiskühlung mit verd. Natronlauge alkalisch gemacht und ausgeäthert. Der Äther wird mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdampfen des Äthers wird das 6-Methyl-5-phenyl-1.2.4-triazin aus verd. Äthanol umkristallisiert. Fast farblose Nadeln vom Schmp. 96°. Ausb. 5.2 g (61% d.Th.).

117. Hans Brockmann und Volkmar Loeschke: Actinomycetenfarbstoffe, IV. Mitteil.¹⁾: Über die Konstitution des Actinorhodins und die Isolierung des Proto-actinorhodins

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]

(Eingegangen am 10. März 1955)

Aus den Analysen des Actinorhodins und drei neuer Derivate ergibt sich $C_{16}H_{14}O_7$ als kleinste Summenformel des Farbstoffes. Von ihren Kohlenstoffatomen gehören 10 einem Naphthazarin-Ringsystem und je eines einer Carboxy- bzw. C-Methylgruppe an. Verschiedene Befunde sprechen dafür, daß Actinorhodin zwei Naphthazarin-Ringsysteme enthält.

Im Mycel von *Streptomyces coelicolor* liegt Actinorhodin zum größten Teil in Form eines als Proto-actinorhodin bezeichneten Reduktionsproduktes vor, das kristallisiert isoliert wurde.

Aus dem Mycel einer zunächst nicht identifizierten Gruppe von Actinomyceten-Stämmen wurde vor einiger Zeit das rote, antibiotisch mäßig wirksame, zur Gruppe der Oxychinonfarbstoffe gehörige Actinorhodin isoliert²⁾. Durch Vergleich mit einem authentischen Stamm hat sich inzwischen herausgestellt, daß unsere actinorhodinbildenden Stämme der schon lange bekannten species

¹⁾ III. Mitteil.: H. Brockmann u. H. U. Mai, Chem. Ber. 88, 419 [1955].

²⁾ H. Brockmann, H. Pini u. O. v. Plotho, Chem. Ber. 83, 161 [1950].

Streptomyces coelicolor angehören. Die in ihrem Namen zum Ausdruck gebrachte himmelblaue Farbe, die diese Art alkalischen Nährböden verleiht, rührt von blauen Alkalisalzen des Actinorhodins her.

Die Reinigung des Actinorhodins wird durch seine sehr geringe Löslichkeit in organischen Solvenzien erschwert. Sie gelang bisher nur durch Umkristallisieren im Extraktionsapparat aus Tetrahydrofuran oder Dioxan. Die Analysenwerte so erhaltener Präparate und ihre in Phenol gefundenen Mol.-Gew.-Zahlen paßten leidlich auf die mit allem Vorbehalt angegebene Formel $C_{24}H_{22}O_{11}^2$.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war, neue Derivate des Actinorhodins zu gewinnen und durch ihre Analyse die Bruttoformel des Farbstoffes sowie Zahl und Art seiner funktionellen Gruppen sicherzustellen.

Neue Derivate des Actinorhodins

Wie unten ausführlicher erörtert, wird Actinorhodin in schwach alkalischer Lösung schnell verändert, während es gegen n Alkali recht beständig ist. Ferner fanden wir, daß bei längerem Erhitzen des Farbstoffes in Tetrahydrofuran oder Dioxan, wie es beim Umkristallisieren im Extraktor erforderlich ist, erhebliche Mengen leicht löslicher, roter Zersetzungsprodukte entstehen; offenbar bilden sich in den anfangs peroxydfreien Lösungsmitteln schnell wieder Peroxyde, die das Actinorhodin angreifen. Auf Grund dieser Befunde haben wir die Gewinnung des Actinorhodins folgendermaßen modifiziert: 1. Aufarbeitung der Kulturen, bevor sie alkalisch werden. 2. Behandeln des frisch gerenteten Mycels mit verd. Säure, um zu verhindern, daß beim Trocknen alkalische Reaktion eintritt. 3. Durchführung der Dioxan- bzw. Tetrahydrofuran-Extraktion unter Kohlendioxyd und vermindertem Druck.

Diese Maßnahmen haben nicht nur die Ausbeute erhöht, sondern auch die Qualität des kristallisierten Actinorhodins verbessert, erkenntlich daran, daß der Kohlenstoffgehalt unserer neuen Präparate etwa 1 % höher liegt als früher. Damit wird die oben erwähnte Formel hinfällig, und an ihre Stelle tritt als kleinste Summenformel $C_{16}H_{14}O_7$. Aus den Acetylwerten des gelben Actinorhodin-acetates²⁾ und der Kuhn-Roth-Oxydation des Actinorhodins ergibt sich, daß zwei Sauerstoffatome dieser Formel als acetylierbare Oxygruppen und ein Kohlenstoffatom als C-Methylgruppe vorliegen.

Da Actinorhodin sich, wenn auch schwer, in Phosphatpuffer (p_H 8.0) und wäßrigem Natriumhydrogencarbonat löst, und demnach mindestens eine saure Gruppe (Carboxy- oder phenolische Oxygruppe) enthält, haben wir versucht, es mit Methanol-Salzsäure zu methylieren. Das gelang erst, als dem Methanol zur Erhöhung der Löslichkeit das gleiche Volumen Dioxan zugesetzt und mehrere Stunden erhitzt wurde. Dabei verwandelte sich das fein zerriebene, auch in dieser Mischung zum größten Teil ungelöst gebliebene Actinorhodin in ein kristallisiertes, rotes Methylierungsprodukt, das ebenso wie Actinorhodin i. Hochvak. nicht sublimiert und keinen Schmelzpunkt hat. Auch sein Absorptionsspektrum in organischen Lösungsmitteln, Alkali, konz. Schwefelsäure und nach Umsetzung mit Pyroboracetat³⁾ gleicht dem des Ausgangsmaterials. Da-

³⁾ O. Dimroth u. Th. Faust, Liebigs Ann. Chem. 446, 97 [1925].

gegen unterscheidet es sich von Actinorhodin durch seine bessere Löslichkeit in organischen Solvenzien und seine Unlöslichkeit in wäßrigem Natriumcarbonat. Durch wäßriges Alkali wird das Methylderivat leicht zu Actinorhodin verseift, ein Beweis, daß bei der Methylierung mit methanolischer Salzsäure keine anderweitige Veränderung des Actinorhodins eintritt. Aus den Analysenzahlen des neuen Derivates ergibt sich als kleinste Formel $C_{16}H_{13}O_6$ (OCH_3).

Durch Methanol-Salzsäure werden Carboxygruppen, stark saure phenolische und bestimmte aliphatische Oxygruppen⁴⁾ methyliert. Die letztgenannte Möglichkeit entfällt beim Actinorhodin, da die methylierbare Gruppe sauer ist. Wäre sie eine stark saure phenolische Oxygruppe, so müßte sie im Chinonring des Farbstoffes stehen. Dann aber sollte sie acetylierbar sein, und ihre Methylierung müßte sich durch eine Änderung des Absorptionsspektrums zu erkennen geben. Beides ist nicht der Fall; unser neues Derivat ist demnach ein Methyl-ester und Actinorhodin, wie schon früher vermutet²⁾, eine Säure.

Während Actinorhodin von Benzol nicht aufgenommen wird, läßt sich sein Methylester daraus im Extraktor umkristallisieren. Dadurch eröffnet sich ein neuer Weg zur Isolierung des Actinorhodins. Statt wie früher das Actinorhodin durch langwierige Extraktion mit Tetrahydrofuran oder Dioxan aus dem Rohfarbstoff herauszulösen, verestert man diesen – am besten nach Vorreinigung mit Aceton – und extrahiert den Rohester im Kreisprozeß mit heißem Toluol oder Benzol. Der dabei auskristallisierende Actinorhodin-ester kann im Bedarfsfall leicht und ohne Verluste zum Actinorhodin verseift werden. Dieses Verfahren ist dem früheren dadurch überlegen, daß Dioxan oder Tetrahydrofuran entbehrlich werden und damit das Arbeiten unter Kohlendioxyd und vermindertem Druck entfällt.

Mit Acetanhydrid und konz. Schwefelsäure als Katalysator erhielten wir aus Actinorhodin-methylester ein gut kristallisiertes, gelbes Acetat $C_{16}H_{11}O_6$ (OCH_3) ($COCH_3$)₂, das sich oberhalb von 260°, ohne zu schmelzen, zersetzte.

Die Acetylbestimmung des neuen Derivates machte zunächst Schwierigkeiten. Bei Verseifung mit Schwefelsäure bildete sich Schwefeldioxyd, in Phosphorsäure war die Substanz zu wenig löslich, und Verseifung mit Alkali unter den üblichen Bedingungen gab schwankende und zu hohe Werte, weil, wie wir fanden, Actinorhodin selbst schon beim Erhitzen in Alkali flüchtige Säuren liefert. Dieser „Acetyl“-Blindwert ließ sich auf ein geringes und konstantes Maß herunterdrücken, als die Verseifung mit 4*n* NaOH unter reinstem Stickstoff durchgeführt wurde. Die so erhaltenen Acetylzahlen waren hinreichend genau. Offenbar ist der Blindwert auf eine in alkalischer Lösung stattfindende Oxydation des Actinorhodins durch Luftsauerstoff zurückzuführen.

Bemühungen, durch Zinkstaubdestillation des Actinorhodin-methylesters Anhaltspunkte über das Grundgerüst des Farbstoffes zu erhalten, waren ebenso erfolglos wie unsere früheren Versuche mit Actinorhodin selber. Es entstanden nur Spuren eines hellgelben, teilweise kristallinen Destillates, das nicht identifiziert werden konnte.

Vor kurzem wurde ein Verfahren zur Ermittlung des Stammkohlenwasserstoffes mehrkerniger Oxychinone⁵⁾ mitgeteilt, das erheblich schonender ist als

⁴⁾ Vergl. z. B. H. Brockmann, Liebigs Ann. Chem. 521, 1 [1935]; H. W. Ruelius u. A. Gauhe, ebenda 570, 38 [1950].

⁵⁾ H. Brockmann u. G. Budde, Chem. Ber. 86, 432 [1953].

die Zinkstaubdestillation und sich bereits gut bewährt hat⁶⁾. Es besteht darin, das durch reduzierende Acetylierung des Oxychinons erhaltene Leukoacetat spektroskopisch mit geeigneten aromatischen Kohlenwasserstoffen zu vergleichen. Um auf diese Weise Auskunft über den Stammkohlenwasserstoff des Actinorhodins zu erhalten, wurde Actinorhodin-methylester-acetat reduzierend acetyliert. Dabei entstand ein farbloses, kristallisiertes, in Lösung intensiv blau fluoreszierendes Reduktionsprodukt, das sich gegen 300° zersetzte. Durch Verseifung mit Lauge ließ es sich in Actinorhodin zurückverwandeln, ein Beweis, daß lediglich das Chinonsystem reduziert, sonst aber keine Veränderung des Farbstoffes eingetreten war.

Die kleinste Formel des Reduktionsproduktes ist $C_{16}H_{11}O_6(OCH_3)(COCH_3)_4$. Sie beweist, daß zwei Sauerstoffatome der Actinorhodin-Formel $C_{16}H_{14}O_7$ einem Chinonsystem angehören. Das Absorptionsspektrum des Reduktionsproduktes unterscheidet sich eindeutig von dem des Naphthalins, Anthracens und Phenanthrens. Dagegen zeigt es eine gewisse Ähnlichkeit mit dem des β,β' -Dinaphthyls. Da aber beide Spektren wenig charakteristisch sind, kann man aus dieser Ähnlichkeit nicht mit Sicherheit schließen, daß β,β' -Dinaphthyl der Stammkohlenwasserstoff des Actinorhodins ist.

Daß zwei Sauerstoffatome der C_{16} -Formel chinoid gebunden sind, läßt sich auch durch analytische Hydrierung zeigen, sofern dabei Bedingungen eingehalten werden, unter denen das Chinonsystem mit Vorrang reagiert. Wie wir fanden, ist das bei manchen Oxychinonen der Fall, wenn die Hydrierung in wäßr. Alkali mit Palladium-Katalysator durchgeführt wird. Die Wasserstoffaufnahme hört dann, sobald die Hydrochinonbildung beendet ist, entweder ganz auf, oder wird, wie z. B. beim Naphthazarin, so langsam, daß man aus dem Neigungswinkel der Hydrierkurve die zur Chinonreduktion verbrauchte Wasserstoffmenge extrapolieren kann. Bei derart reagierenden chinoiden Verbindungen läßt sich daher das Mol.-Gew. recht genau durch Hydrierung bestimmen; wobei allerdings bekannt sein muß, wieviele Chinonsysteme die Molekel enthält.

Zimtsäure wird in wäßr. Alkali sehr schnell zu Hydrozimtsäure hydriert. Da Chinone mit ungesättigten Seitenketten in analoger Weise reagieren können, ist bei ihnen die eben beschriebene Methode nur dann anwendbar, wenn man zunächst Chinon und olefinische Doppelbindungen hydriert, das Hydrochinon an der Luft reoxydiert, die Hydrierung wiederholt und aus dem Wasserstoffverbrauch der zweiten Hydrierung das Mol.-Gew. berechnet.

Beim Actinorhodin und seinem Methylester war die Wasserstoffaufnahme in n NaOH (Palladium-Bariumsulfat- oder Platinkatalysator) in einigen Minuten beendet. Die gelbe Reaktionslösung wurde an der Luft augenblicklich wieder blau und nahm bei erneuter Hydrierung praktisch die gleiche Wasserstoffmenge auf wie beim ersten Versuch. Damit ist bewiesen, daß unter den angewandten Bedingungen allein das Chinonsystem erfaßt wird. Aus dem Wasserstoffverbrauch errechnet sich für Actinorhodin, falls dieses ein Chinonsystem enthält, das Mol.-Gew. 325 ± 5 , für seinen Methylester 337 ± 5 , Werte, die mit dem für die C_{16} -Formel berechneten (318 bzw. 332) befriedigend übereinstimmen und somit eine weitere Bestätigung für die C_{16} -Formel geben.

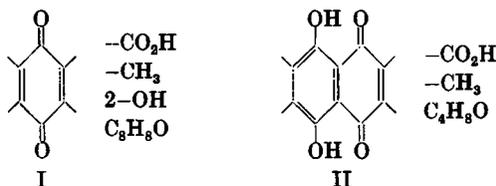
⁶⁾ H. Brockmann, E. H. v. Falkenhausen, R. Neef, A. Dorlars u. G. Budde, Chem. Ber. 84, 865 [1951]; B. R. Brown, A. W. Johnson, J. R. Quayle u. A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] 1954, 107.

Dagegen entscheiden sie nicht, ob $C_{16}H_{14}O_7$ die Bruttoformel des Actinorhodins ist, denn es ist nicht ausgeschlossen, daß der Farbstoff zwei Chinonsysteme enthält.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Analysenzahlen aller neuen Derivate im Einklang mit der kleinsten Actinorhodin-Formel $C_{16}H_{14}O_7$ stehen, die sich nach I auflösen läßt. Ihre beiden Oxygruppen sind, wie aus den Farbreaktionen des Actinorhodins hervorgeht, den Carbonylgruppen des Chinonringes benachbart.

Nimmt man an, daß $C_{16}H_{14}O_7$ die Bruttoformel des Farbstoffes ist, so lassen sich aus den bisherigen Befunden folgende Schlüsse ziehen. Actinorhodin kann weder ein Anthrachinon- noch ein Phenanthrenchinon-Derivat sein, denn dann würden 14 Kohlenstoffatome auf das Ringsystem, die beiden restlichen auf die *C*-Methyl- und Carboxygruppe entfallen, d. h. Actinorhodin müßte eine Trioxy-methyl-anthrachinon- oder eine Trioxy-methyl-phenanthren-carbonsäure $C_{16}H_{10}O_7$ sein. Abgesehen von seinem für diese Formel zu hohen Wasserstoffgehalt, sollte Actinorhodin dann ein Triacetat bilden, im Hochvak. sublimierbar sein, bei der Zinkstaubdestillation in leidlicher Ausbeute Methylanthracen bzw. Methylphenanthren geben und bei der reduzierenden Acetylierung ein Leuko-acetyl-Derivat mit einem anthracen- oder phenanthrenähnlichen Spektrum liefern. Alles dies trifft nicht zu.

Ebenso kann ausgeschlossen werden, daß Actinorhodin ein Anthrachinon- bzw. Phenanthrenchinon-Derivat mit partiell hydriertem Ring ist, denn auch in diesem Fall müßte es sich sublimieren lassen und bei der Zinkstaubdestillation in Methylanthracen bzw. Methylphenanthren übergehen.



Dann aber bleibt bei einer Bruttoformel $C_{16}H_{14}O_7$ nur noch die Möglichkeit, daß Actinorhodin ein Naphthazarin-Derivat (II) mit einem oder mehreren, insgesamt sechs Kohlenstoff- und drei Sauerstoffatome enthaltenden Substituenten ist. Damit im Einklang steht sein naphthazarinähnliches Absorptionsspektrum, seine tiefblaue Farbe in wäßrigem Alkali und konz. Schwefelsäure sowie die Farbreaktion mit Pyroboracetat²⁾. Daß die Absorptionsmaxima des Actinorhodins in allen Lösungsmitteln etwas langwelliger liegen als beim Naphthazarin, könnte durch eine bathochrome Wirkung der Substituenten bedingt sein.

Andererseits gibt es Eigenschaften und Befunde, die zwar nicht gegen eine Naphthazarin-Struktur, wohl aber gegen das relativ niedrige Mol.-Gew. der Formel II sprechen; so die bei der Mol.-Gew.-Bestimmung des Actinorhodins gefundenen Werte 450–500, die ungewöhnlich geringe Löslichkeit des Actinorhodins, die ihm und allen seinen Derivaten gemeinsame Eigenschaft, weder

zu schmelzen noch zu sublimieren, und nicht zuletzt Beobachtungen beim thermischen Abbau des Farbstoffes, die kurz erörtert werden sollen.

Erhitzt man den Methylester des Actinorhodins oder Proto-actinorhodins i. Hochvak. auf 290–310°, so bildet sich unter Zersetzung des Farbstoffes ein gelbrotes, z.Tl. kristallines Destillat. Durch chromatographische Adsorption ließ sich daraus eine kristallisierte, rote Verbindung abtrennen, die in 2 *n* Na₂CO₃ unlöslich war, von *n* Alkali dagegen mit gelber, schnell nach Blau umschlagender Farbe aufgenommen wurde. Beim Ansäuern dieser Lösung fiel eine nunmehr in wäßrigem Natriumhydrogencarbonat lösliche Verbindung aus, die nach chromatographischer Reinigung in roten Nadeln vom Schmp. 155° kristallisierte. Dieses Abbauprodukt, das spektroskopisch und in seinen Farbreaktionen dem Naphthazarin sehr ähnlich ist, unterscheidet sich von Actinorhodin in charakteristischer Weise durch seine gute Löslichkeit in organischen Solvenzien und die Fähigkeit, i. Hochvak. zu sublimieren. Seine Analysenzahlen passen auf die Summenformel C₁₇H₁₆O₇ und weniger gut auf C₁₅H₁₄O₆.

Diese Befunde lassen sich nicht mit einer Actinorhodin-Bruttoformel C₁₆H₁₄O₇ vereinbaren, denn, daß aus einer naphthazarinähnlichen, schwer löslichen, nicht sublimierbaren Verbindung C₁₆H₁₄O₇ durch thermischen Abbau eine leichtlösliche, naphthazarinähnliche, sublimierbare Verbindung C₁₅H₁₄O₆ bzw. C₁₇H₁₆O₇ entsteht, ist so gut wie ausgeschlossen. Verständlich dagegen wird das Ergebnis des thermischen Abbaus, wenn das Mol.-Gew. des Actinorhodins größer ist als das der C₁₆-Formel. Da diese ein Chinonsystem enthält, müßten in der nächst größeren Formel deren zwei vorhanden sein, und diese wäre C₃₂H_{28–28}O₁₄. Dann aber müßte der Farbstoff — da seine Absorptionsmaxima langwelliger und seine ε_{max}-Werte mehr als doppelt so groß sind wie beim Naphthazarin — zwei direkt miteinander verknüpfte Naphthazarin-Systeme enthalten, d. h. Actinorhodin wäre ein Derivat des noch unbekanntes Dinaphthazarins. Diese Annahme wird gestützt durch die oben erwähnte Ähnlichkeit zwischen den Spektren des Leuko-actinorhodinmethylester-acetates und β,β'-Dinaphthyls. Bei einer solchen Struktur wäre die Schwerlöslichkeit des Actinorhodins und seine Unfähigkeit zu sublimieren nicht überraschend. Die Bildung eines naphthazarinähnlichen, sublimierbaren Farbstoffes wäre dann dadurch zu erklären, daß beim Erhitzen die Verknüpfung zwischen den beiden Ringsystemen gelöst, und so aus dem Dinaphthazarin-Derivat ein Naphthazarin-Derivat wird. Über Versuche, die Dinaphthazarin-Struktur eindeutig zu beweisen, soll in der nächsten Mitteilung berichtet werden.

Isolierung des Proto-actinorhodins

Der dem Mycel mit wäßrigem Alkali entzogene und mit Säure wieder ausgefällte Rohfarbstoff gibt an Aceton erhebliche Mengen tiefroter, amorpher Anteile ab, die sich viel leichter lösen als Actinorhodin und im folgenden als „Acetonfraktion“ bezeichnet sind. Sie wurden eingehend auf actinorhodinähnliche Verbindungen hin untersucht, ohne daß definierte Produkte daraus abgetrennt werden konnten. Offenbar besteht die „Acetonfraktion“ aus Zersetzungs- oder Polymerisationsprodukten des Actinorhodins. In präparativer

Hinsicht war von Interesse, ob die „Acetonfraktion“ bereits im Mycel vorhanden ist, oder sich erst bei der Aufarbeitung bildet, eine Frage, die durch folgende Versuche geklärt wurde.

Bekanntlich werden viele Oxychinone in alkalischer Lösung durch Luft-sauerstoff verändert. Um zu sehen, ob sich die „Acetonfraktion“ auf diesem Wege bildet, haben wir die Sauerstoffaufnahme des Actinorhodins in wäßrigem Alkali gemessen. Sie war so träge, daß während der Extraktion des Mycels mit n Alkalilauge keine nennenswerte Oxydation des Farbstoffes eintreten kann.

Bei diesen Versuchen wurden wir auf die schon erwähnte Alkaliempfindlichkeit des Actinorhodins aufmerksam. Hält man Lösungen des Farbstoffes in 0.01 n Lauge oder in 2 n Na_2CO_3 wenige Stunden bei 20° , so ist der beim Ansäuern ausfallende Farbstoff im Gegensatz zum Ausgangsmaterial in Aceton gut löslich. Actinorhodin verwandelt sich demnach in schwach alkalischer Lösung in „Acetonfraktion“. Sauerstoff ist dafür nicht erforderlich, die Umwandlung erfolgt auch unter reinstem Stickstoff. Merkwürdigerweise läßt sich aus einer mehrere Stunden bei 20° gehaltenen Lösung in n Alkali unverändertes Actinorhodin zurückgewinnen.

Diese Befunde, die sich noch nicht befriedigend deuten lassen, warfen die Frage auf, ob die Bildung der „Acetonfraktion“ durch ein schwach alkalisches Milieu während der Kultur und Aufarbeitung des Mycels bedingt ist. Tatsächlich ist das der Fall, denn aus Mycel, das einer sauren Nährlösung entstammte, erhielten wir nur wenig „Acetonfraktion“. Im Mycel neutraler oder alkalischer Nährlösungen dagegen war sie reichlich vorhanden.

Bei der Aufarbeitung des aus saurer Lösung geernteten Mycels machten wir die überraschende Beobachtung, daß sich die zur Extraktion verwendete Natronlauge nicht wie beim Mycel aus neutraler oder alkalischer Nährlösung sofort blau färbte, sondern zunächst gelb war und dann an der Luft über Grün schnell blau wurde. Diese Farbreaktion ließ vermuten, daß das Actinorhodin im Mycel zur Hauptsache in Form einer Vorstufe vorhanden ist, die erst bei der Extraktion mit Lauge an der Luft in Actinorhodin übergeht. Um diese Vorstufe zu isolieren, wurde das Mycel ohne Anwendung von Alkali aufgearbeitet. Wir digerierten es zunächst mit verd. Säure, um die Actinorhodin-Vorstufe von Zellinhaltsstoffen abzulösen, trockneten das Material und extrahierten es nacheinander erschöpfend mit Äther, Aceton und schließlich unter Kohlendioxyd und vermindertem Druck mit Dioxan. Dabei kristallisierte aus dem karminroten, blau fluorescierenden Dioxanauszug statt Actinorhodin eine blaßrote, in organischen Solvenzien schwerlösliche Verbindung (Zers. gegen 330°) aus. Unter Luftabschluß löste sie sich in Alkali mit gelber Farbe, die bei Luftzutritt schnell in Blau übergang. Beim Ansäuern der blauen Lösung fiel Actinorhodin aus.

Damit ist gezeigt, daß im Mycel saurer Kulturlösungen die Hauptmenge des Actinorhodins in schwach gefärbter reduzierter Form vorliegt, die bei der bisherigen Aufarbeitungsweise erst während der Extraktion des Mycels mit Lauge durch Luftsauerstoff zu Actinorhodin oxydiert wird. Diese Vorstufe des Farbstoffes wird im folgenden als Proto-actinorhodin bezeichnet.

Alle bisher erhaltenen Proto-actinorhodin-Präparate enthielten wechselnde, durch Umkristallisieren nicht abtrennbare Mengen Actinorhodin und waren daher blaßrosa bis rot gefärbt. Die Analysenzahlen der besten Präparate paßten leidlich auf die kleinste Summenformel $C_{16}H_{16}O_7$.

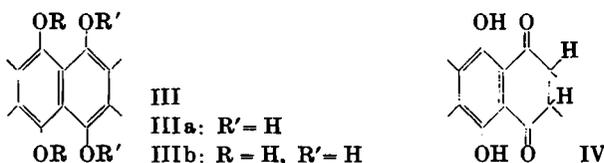
Methylierung des Proto-actinorhodins mit Methanol-Salzsäure lieferte einen in rosa Nadeln kristallisierenden Methylester, dessen Analysenzahlen innerhalb der Fehlergrenze mit denen des Actinorhodin-methylesters übereinstimmten. In wäßrigem Alkali ging er unter Sauerstoffaufnahme in Actinorhodin-methylester bzw. in daraus durch Verseifung entstandenes Actinorhodin über.

Mit Acetanhydrid und konz. Schwefelsäure als Katalysator erhielten wir aus Proto-actinorhodin ein kristallisiertes, gelbes Acetat, mit den gleichen Eigenschaften und Analysenzahlen wie Actinorhodin-acetat. Auch das aus Proto-actinorhodin-methylester mit Acetanhydrid-Pyridin oder Acetanhydrid-konz. Schwefelsäure gewonnene kristallisierte, gelbe Acetat stimmte in Eigenschaften und Analysenzahlen mit Actinorhodin-methylester-acetat überein. Offenbar tritt während der Acetylierung eine weitgehende Oxydation des Proto-actinorhodins bzw. seines Esters ein.

Proto-actinorhodin und sein Methylester enthalten kein chinoides System, denn ihre unter Wasserstoff hergestellten Lösungen in wäßrigem Alkali nehmen bei katalytischer Hydrierung nur geringe Mengen Wasserstoff auf, die zweifellos zur Reduktion des beigemengten Actinorhodins verbraucht werden.

Die durch Luftoxydation blau gewordenen alkalischen Lösungen guter Proto-actinorhodin-Präparate in wäßrigem Alkali haben nahezu die gleiche Farbintensität wie alkalische Actinorhodinlösungen gleicher Konzentration. Proto-actinorhodin muß demnach das gleiche oder zum mindesten ein sehr ähnliches Mol.-Gew. haben wie Actinorhodin; d. h. beim Übergang von Proto-actinorhodin in Actinorhodin können keine größeren Reste abgespalten werden.

Bei der Oxydation in wäßrigem Alkali nahmen die besten Präparate von Proto-actinorhodin und seinem Methylester 0,7 Mol. Sauerstoff auf. Daß der Sauerstoffverbrauch in allen Fällen unter 1 Mol. blieb, ist auf den Gehalt an Actinorhodin zurückzuführen.



Durch die vorstehenden Befunde ist Proto-actinorhodin als in alkalischem Milieu leicht oxydierbares Reduktionsprodukt des Actinorhodins charakterisiert. Da dieses ein Naphthazarin-Derivat ist, kommen für das Ringsystem des Proto-actinorhodins die Formeln III bzw. IIIa und IV in Frage. III und IIIa sind Derivate des 1.4.5.8-Tetraoxy-naphthalins; sie können erst nach Abspaltung der Reste R bzw. R' zu einem Naphthazarin-Derivat oxydiert werden. Da Proto-actinorhodin und sein Methylester fast die gleichen Analysenzahlen geben wie Actinorhodin bzw. dessen Ester, und in alkalischer Lösung zwischen Actinorhodin und seiner Vorstufe kein nennenswerter Unterschied in der Farbintensität besteht, halten wir III und IIIa für unwahrschein-

lich und nehmen an, daß Proto-actinorhodin nach IV als Derivat des 2.3-Dihydro-naphthazarins zu formulieren ist. 2.3-Dihydro-naphthazarin ist in saurer Lösung beständig; in Alkali wird es zu 1.4.5.8-Tetraoxy-naphthalin enolisiert, das an der Luft sofort in Naphthazarin übergeht. Bei der nahen Beziehung zwischen 2.3-Dihydro-naphthazarin und 1.4.5.8-Tetraoxy-naphthalin (Keto-Enol-Tautomerie) halten wir es für wahrscheinlich, daß im Mycel in kleiner Menge auch Actinorhodin-Vorstufen der Struktur III bzw. IIIa vorhanden sind.

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

Beschreibung der Versuche

Mikrobiologisches: Unser *Streptomyces-coelicolor*-Stamm wurde im Oberflächenverfahren auf einer Nährlösung (1 l je P-Kolben) kultiviert, die sich lediglich im Glykokollgehalt von der früher verwendeten²⁾ unterschied. Sie enthielt 0.1% Glykokoll und 0.05% Glykokoll-äthylester-hydrochlorid und war mit verd. Salzsäure auf p_H 7.0 eingestellt. Je 1 l der Nährlösung wurde mit 100 ccm eines 5-proz. Weizenkleieauszuges versetzt.

Zur Beimpfung der P-Kolben dienten Vorkulturen, die auf 100 ccm der obigen Nährlösung 5 mg Vitamin B₁ enthielten, um eine gute Versporung zu erreichen. Das ausgewachsene Mycel wurde geerntet, bevor die Kulturlösung infolge alkalischer Reaktion violett oder gar blau wurde.

Verbesserte Darstellung von Actinorhodin: Das aus der Kulturlösung abgetrennte Mycel wurde 15 Min. mit *n* HCl digeriert, abgesaugt, durch wiederholtes Behandeln mit Methanol weitgehend entwässert und im Exsiccator getrocknet. Das so erhaltene Präparat wurde in der Mühle zerkleinert, mit dem gleichen Vol. Sand verrieben und erschöpfend mit Äther ausgezogen. Bei anschließender Behandlung mit *n* NaOH ging das Actinorhodin mit tiefblauer Farbe in Lösung und wurde nach Abzentrifugieren des Mycels mit Säure wieder ausgefällt. Das so erhaltene Roh-Actinorhodin extrahierte man im Soxhlet-Apparat erschöpfend mit Aceton und anschließend im Kohlendioxyd-Strom unter 200 Torr mit Dioxan. Hierbei schied sich Actinorhodin in kristallisierter Form ab.

Actinorhodin aus Proto-actinorhodin: 800 mg rohes Proto-actinorhodin (Gewinnung s. unten) löste man in 50 ccm *n* NaOH, schüttelte die Lösung kurze Zeit an der Luft und goß sie in 30 ccm 2*n* HCl. Den abzentrifugierten und mehrmals mit Wasser gewaschenen Niederschlag extrahierte man viermal mit je 50 ccm Aceton, wobei ein Teil des Farbstoffes mit tieferer Farbe in Lösung ging⁷⁾ und der letzte Acetonauszug nur noch hellrot gefärbt war. Der acetonunlösliche Anteil wurde getrocknet und im Extraktionsapparat unter Kohlendioxyd mit Tetrahydrofuran (über Zinn(II)-chlorid dest.) ausgezogen. Nachdem etwa 70 mg Actinorhodin auskristallisiert waren, wurde die Extraktion mit frischem Tetrahydrofuran fortgesetzt. Nach fünfmaliger Erneuerung des Lösungsmittels erhielt man insgesamt 440 mg in mikroskopisch kleinen Prismen kristallisiertes Actinorhodin.

$C_{16}H_{14}O_7$ (318.3) Ber. C 60.38 H 4.43 O 35.19 Gef. C 60.22 H 4.54 O 35.48

*) Getr. b. 130–140° i. Hochvakuum.

Mol.-Gew.-Bestimmung durch katalytische Hydrierung: In einer Mikrohydrierapparatur wurden 19.5 mg Naphthazarin in 5 ccm *n* NaOH unter Zusatz von 200 mg Palladium-Bariumsulfat-Katalysator in 5 ccm *n* NaOH hydriert. Nach Beendigung der Wasserstoff-Aufnahme waren 2.34 ccm H₂ (0°, 760 Torr) verbraucht. Mol.-Gew. ber. 190.2, gef. 187. 24.0 mg Actinorhodin, wie vorstehend hydriert, verbrauchten innerhalb 2 Min. 1.66 ccm Wasserstoff (0°, 760 Torr), wonach die Wasserstoffaufnahme beendet war.

$C_{16}H_{14}O_7$ Mol.-Gew. Ber. 318.3 Gef. 325

⁷⁾ Ein Teil des eingesetzten Mycels war aus neutraler Lösung geerntet und enthielt daher „Acetonfraktion“.

Actinorhodin-methylester: In eine Suspension von 100 mg feingepulvertem, kristallinem Actinorhodin in 40 ccm Methanol-Dioxan (1:1) wurde trockener Chlorwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet. Nach 2 Stdn. war bereits die Bildung feiner, roter Nadelchen erkennbar. Nachdem man 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht und das Reaktionsgemisch 12 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt hatte, war das Ausgangsmaterial vollständig in die roten Nadelchen des Methylesters umgewandelt; Ausb. 86 mg. Zur Reinigung wurde im Extraktionsapparat aus Benzol umkristallisiert; dünne rote Nadeln (Zers. gegen 300°). Unlöslich in Äther und Methanol, mäßig löslich in Dioxan, Tetrahydrofuran, Chloroform, Benzol und heißem Eisessig. Von 2*n*Na₂CO₃ wird der Ester nicht aufgenommen, wohl aber von wäßr. Alkali, wobei Verseifung eintritt. Aus Benzol oder Chloroform ist er mit 10-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung nicht auszusütteln. 2*n*Na₂CO₃ dagegen entfernt ihn aus der organischen Phase, wobei er sich als blaues Alkalisalz an der Grenzschicht abscheidet. Von *n* Lauge wird er aus organischer Phase mit blauer Farbe aufgenommen.

C₁₇H₁₆O₇ (332.3) Ber. C 61.44 H 4.85 O 33.70 C-CH₃ 4.52 OCH₃ 9.35
Gef.*) C 61.41 H 4.72 O 33.62 C-CH₃ 4.46 OCH₃ 9.26

*) Getr. b. 100° i. Hochvakuum

Mol.-Gew.-Bestimmung: 30.0 mg Actinorhodin-methylester in 5 ccm *n* NaOH, mit 200 mg Palladium-Bariumsulfat-Katalysator in 5 ccm *n* NaOH vermischt, verbraucht bis zur Beendigung der Wasserstoff-Aufnahme 2.00 ccm H₂ (0°, 760 Torr).

C₁₇H₁₆O₇, Mol.-Gew. Ber. 332.3 Gef. 336.7

Die hellgelbe, alkalische Reaktionslösung wurde bei Luftzutritt sofort blau. Bei erneuter Hydrierung verbrauchte sie praktisch die gleiche Menge Wasserstoff wie bei der ersten Bestimmung.

Actinorhodin-methylester aus rohem Actinorhodin: 700 mg rohes Actinorhodin (aus mit Äther und Aceton vorextrahiertem Mycel mit 2*n*NaOH ausgezogen und mit Säure in amorpher Form wieder ausgefällt) wurden in 150 ccm Dioxan suspendiert und nach Zusatz von 50 ccm chlorwasserstoff-gesättigtem Methanol 6 Stdn. unter Rückfluß gekocht.

Aus der zur Hälfte eingengten Reaktionslösung wurde der feinkristalline Methylester abzentrifugiert und nacheinander mehrmals mit Aceton, *n*Na₂CO₃, *n* HCl, Wasser und Methanol gewaschen; Ausb. 590 mg.

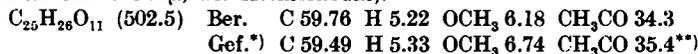
Actinorhodin-methylester-acetat: Eine Suspension von 400 mg Actinorhodin-methylester in 10 ccm Acetanhydrid (eine Spur konz. Schwefelsäure enthaltend) wurde 3 Stdn. auf 90–95° erhitzt, bis Lösung und suspendierte Substanz gelb geworden waren. Das Acetylprodukt (dünne, gelbe Nadeln), das auch in der Wärme zum größten Teil ungelöst blieb, wurde aus Acetanhydrid (oder Benzol) umkristallisiert und mit Methanol und Äther gewaschen. Ausb. 353 mg hellgelbe Nadeln (Zers. ab 255°). Das Acetat ist unlöslich in Petroläther, Äther und Methanol, mäßig löslich in Aceton und Acetanhydrid, gut löslich in Chloroform, Benzol und heißem Toluol. Während es von kalter 2*n* Lauge nicht aufgenommen wird, läßt es sich durch diese (aus organischer Phase) allmählich ausschütteln (karminrote chloroformlösliche Zwischenstufe), nicht aber durch 2*n*Na₂CO₃.

C₂₁H₂₀O₉ (416.4) Ber. C 60.57 H 4.84 OCH₃ 7.46 CH₃CO 20.7
Gef.*) C 60.45 H 4.56 OCH₃ 7.14 CH₃CO 22.0

*) Getr. b. 100° i. Hochvakuum.

Leuko-actinorhodin-methylester-acetat: Eine Suspension von 100 mg Actinorhodin-methylester in 50 ccm Acetanhydrid (zwei Tropfen konz. Schwefelsäure enthaltend) wurde 3 Stdn. auf 80° erwärmt. Die heiße, gelbe Reaktionslösung, in der ein Teil des gebildeten Actinorhodin-methylester-acetates kristallin suspendiert war, wurde nach Zugabe von frisch entwässertem Natriumacetat (auch Pyridin bewährte sich) mit insgesamt 1 g Zinkstaub in kleinen Anteilen versetzt, wobei unter Umschütteln weiter erhitzt wurde. Innerhalb weniger Minuten wurde die Reaktionslösung blaßgelb und stark blau fluoreszierend. Den abfiltrierten Zinkstaub kochte man mehrmals mit Eisessig aus, vereinigte die so erhaltenen Auszüge mit der Reaktionslösung, zersetzte das

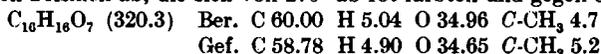
überschüssige Acetanhydrid unter Kühlung mit 50 ccm Methanol und verdünnte schließlich mit 500 ccm Wasser. Das ausgefallene, amorphe Rohprodukt wurde mit Wasser neutral gewaschen und in wenig Methanol gelöst. Nach kurzer Zeit kristallisierte das Leuko-actinorhodin-methylester-acetat in farblosen Kristallen, die aus Aceton-Methanol umkristallisiert wurden. Ausb. 70 mg farblose Prismen, die im UV-Licht blau fluorescierten und sich ab 250° zersetzten. Das Reduktionsprodukt ist löslich in Dioxan, Benzol, Chloroform, Eisessig und Aceton, schwer löslich in Äther und Methanol. Beim Behandeln mit heißem wäbr. Alkali ging es langsam mit rein blauer Farbe in Lösung (Absorptionsbande 643 m μ , wie Actinorhodin).



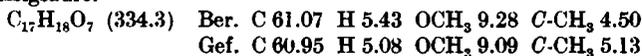
*) Getr. b. 100° i. Hochvakuum.

**) Verseift mit 4*n*NaOH unter Stickstoff, ½ Stde. bei 100°, 12 Stdn. bei 20°.

Gewinnung von Proto-actinorhodin: Das wie bei der Actinorhodin-gewinnung (s. oben) mit Säure und Äther vorbehandelte Mycel schwach saurer Kulturen wurde im Soxhlet-Apparat erschöpfend mit Aceton und anschließend unter Kohlendioxyd bei 180 bis 220 Torr mit peroxydfreiem Dioxan extrahiert. Aus der karminroten, stark blau fluoreszierenden Lösung schied sich das rosafarbene Proto-actinorhodin in mikroskopisch kleinen Prismen ab, die sich von 270° ab rot färbten und gegen 335° zersetzten.



Proto-actinorhodin-methylester: 700 mg rohes Proto-actinorhodin wurden in einer Mischung aus 30 ccm chlorwasserstoff-gesättigtem Methanol und 50 ccm Dioxan 10 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Die auf 30 ccm eingeengte Reaktionsmischung zentrifugierte man und wusch den Rückstand zunächst mit Methanol und dann mehrmals mit kaltem Aceton, bis dieses nur noch schwach rot gefärbt war. Der Rückstand, ein hellrotes, feinkörniges Pulver (625 mg), wurde im Extraktionsapparat aus Chloroform umkristallisiert. Statt Chloroform ließ sich auch das bei 63° siedende azotrope Benzol-Methanol-Gemisch oder Toluol verwenden. Das aus feinen Nadeln bestehende hellrote Kristallinat zersetzte sich gegen 300°. Proto-actinorhodin-methylester ist mäßig löslich in Chloroform, Dioxan und Benzol und schwer löslich in Methanol, Aceton, Essigester und Essigsäure.



Thermischer Abbau von Proto-actinorhodin-methylester: 400 mg Proto-actinorhodin-methylester (an seiner Stelle kann auch Actinorhodin-methylester verwendet werden) wurden in Anteilen von 50 mg in engen, einseitig zugeschmolzenen Glasröhren unter 0.05 Torr auf 290–300° erhitzt (Kupferblock, aus dem ein Teil der Röhre herausragte). Dabei bildete sich ein z.Tl. in roten Nadeln kristallisierendes Destillat, das in Äther aufgenommen wurde. Den Verdampfungsrückstand der Ätherlösung nahm man in Benzol auf, gab die Lösung durch eine Calciumsulfat-Säule und wusch die karminrote Hauptzone ins Filtrat. Das eingeengte Filtrat wurde erneut auf eine Calciumsulfat-Säule gegeben, wobei diesmal mit Äther nachgewaschen wurde, bis die Hauptzone ins Filtrat gegangen war. Beim Verdampfen des Eluates schieden sich orange-rote Kristalle (18 mg) ab. Diese Verbindung ließ sich mit 2*n*Na₂CO₃ nicht aus Äther ausschütteln. Sie löste sich in 2*n*NaOH mit gelbgrüner Farbe, die an der Luft in Blau überging. Nach Ansäuern wurde der Farbstoff in Benzol aufgenommen und die Lösung durch eine Calciumsulfat-Säule filtriert. Beim Entwickeln mit Benzol ging eine rosa Zone ins Filtrat. Die Hauptfraktion wurde mit acetonhaltigem Benzol eluiert und kristallisierte beim Einengen des Eluates in roten Nadeln vom Schmp. 155° (Berl-Block, korr.).

