

HANS BROCKMANN und HANS MUXFELDT

Actinomycine, XIX¹⁾. Antibiotica aus Actinomyceten, XL²⁾

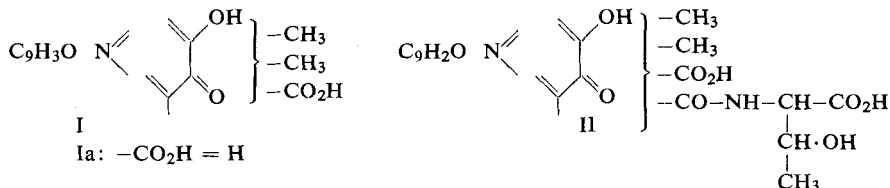
Konstitution und Synthese des Actinomycin-Chromophors

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 27. März 1958)

Aus Säurehydrolysaten von Actinomycin C ließen sich neben Actinocinin zwei neue, dem Actinomycin-Chromophor entstammende Abbauprodukte isolieren, die durch Synthese als 2.5-Dihydroxy-toluchinon-(1.4) und 3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) identifiziert wurden. — Auf Grund dieser Ergebnisse gelang es, die Konstitution des Actinocinins durch Synthese zu beweisen. — Aus der Konstitution der Chromophor-Abbauprodukte sowie aus dem Vergleich der Actinomycine mit *N,N'*-[3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarboyl-(4.5)]-bis-glycinmethylester (XXXIII) ergibt sich, daß der Chromophor der Actinomycine C₁, C₂, C₃, X_{0β} und X₂ die 3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5) ist, deren Carboxygruppen säureamidartig mit zwei Peptidlacton-Gruppen verknüpft sind.

Die in unserem Institut zuerst in reiner Form isolierten Actinomycine C₁^{3,4}, C₂^{3,4}, C₃^{3,4}, X_{0β}⁵⁾ und X₂^{4,6)} stimmen überein⁷⁾ in der Struktur des für ihre rote Farbe verantwortlichen Molekülteils — im folgenden Chromophor genannt — und unterscheiden sich in bestimmten Teilen der säureamidartig mit dem Chromophor verknüpften beiden Peptidlacton-Reste⁸⁾. Wie in der vorhergehenden Mitteilung¹⁾ am Beispiel des Actinomycins C gezeigt, kann man den Chromophor durch Säurehydrolyse, allerdings unter Austausch seiner Amino- gegen eine Hydroxygruppe, von den beiden Peptidlacton-Resten ablösen und in Form des roten kristallisierten Actinocinins⁹⁾ isolieren, dessen Bruttoformel C₁₅H₁₁NO₅ sich nach I auflösen ließ¹⁾.



1) XVIII. Mitteil.: H. BROCKMANN und H. GRÖNE, Chem. Ber. 91, 773 [1958].

2) XXXIX. Mitteil.: H. BROCKMANN und H. GRÖNE, Chem. Ber. 91, 773 [1958].

3) H. BROCKMANN und N. PFENNIG, Naturwissenschaften 39, 429 [1952]; Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 292, 77 [1953].

4) H. BROCKMANN und H. GRÖNE, Naturwissenschaften 40, 222 [1953]; Chem. Ber. 87, 1036 [1954].

5) H. BROCKMANN und G. PAMPUS, Angew. Chem. 67, 519 [1955].

6) H. BROCKMANN, H. LINGE und H. GRÖNE, Naturwissenschaften 40, 224 [1953].

7) H. BROCKMANN und K. VOHWINKEL, Chem. Ber. 89, 1337 [1956].

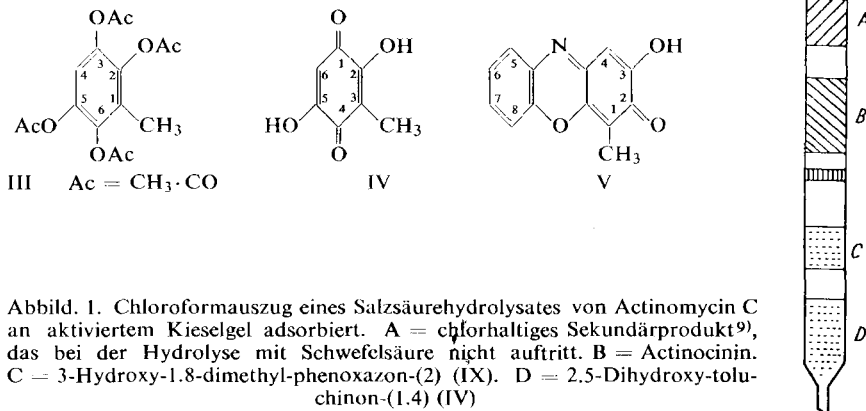
8) H. BROCKMANN, G. BOHNSACK, B. FRANCK, H. GRÖNE, H. MUXFELDT und C. SÜLING, Angew. Chem. 68, 70 [1956].

Außer Actinocinin wurde ein zweites, kristallisiertes, rotes Spaltstück⁹⁾, das Desamino-actinocinyl-threonin, gefaßt, für das Teilformel II zur Diskussion gestellt wurde¹⁾

Beim weiteren Studium des Säureabbaus ist es uns gelungen, noch zwei andere, ebenfalls dem Actinomycin C-Chromophor entstammende Abbauprodukte¹⁰⁾ zu isolieren und ihre Konstitution durch Synthese zu beweisen; ein Ergebnis, das zunächst die Aufklärung und Synthese des Actinocinins¹¹⁾ und dann die des Actinomycin-Chromophors selbst¹²⁾ ermöglicht hat. Über diese Arbeiten^{10, 11, 12)} soll im folgenden eingehender berichtet werden. Wir beginnen mit den beiden neuen Abbauprodukten, die den Schlüssel zur Konstitutionsaufklärung des Actinomycin-Chromophors geliefert haben.

ABBAU VON ACTINOMYCIN C ZU 2,5-DIHYDROXY-TOLUCHINON-(1,4) (IV)
UND 3-HYDROXY-1,8-DIMETHYL-PHENOXAZON-(2) (IX)

Actinocinin wurde zuerst in einem Salzsäurehydrolysat von Actinomycin C aufgefunden (20-proz. Salzsäure, 85°, 120 Stdn.) und aus dem Chloroformextrakt dieses Hydrolysates durch Chromatographie an saurem Kieselgel abgetrennt¹⁾. Dabei bildeten sich unterhalb der roten Actinocinin-Zone (Abbild. 1, B) eine gelbrote (C) und eine gelbe (D), die beide nur wenig Substanz enthielten. Da wir in diesen Zonen Chromophor-Abbauprodukte mit kleinerem Mol.-Gew. als demjenigen des Actinocinins vermuteten, haben wir, um zu sehen, ob sich die Ausbeute erhöhen läßt, in acht Ansätzen zu je 2.5 g Actinomycin C die Konzentration, Temperatur und Einwirkungsdauer der Säure variiert, wobei in zwei Ansätzen statt Salzsäure auch Schwefelsäure verwendet wurde. Am besten, wenn auch hier noch gering (8 mg Fraktion D und 124 mg Fraktion C aus 2.5 g Actinomycin), war die Ausbeute nach 22 stdg. Erhitzen mit 25-proz. Schwefelsäure auf 100°.



9) Vorl. Mitteil.: H. BROCKMANN und H. GRÖNE, Angew. Chem. **68**, 66 [1956].

10) Vorl. Mitteil.: H. BROCKMANN und H. MUXFELDT, Angew. Chem. **68**, 67 [1956].

11) Vorl. Mitteil.: H. BROCKMANN und H. MUXFELDT, Angew. Chem. **68**, 67 [1956].

12) Vorl. Mitteil.: H. BROCKMANN und H. MUXFELDT, Angew. Chem. **68**, 69 [1956].

Aus der Chloroformlösung der Fraktion D erhielten wir durch Extraktion mit wäbr. Alkali, Chromatographie des alkalilöslichen Anteils an saurem Kieselgel und Sublimation bei $60^{\circ}/16$ Torr eine kristallisierte, stickstofffreie, orangefarbene Verbindung, die unter Normaldruck bereits bei 100° sublimierte. Ihre violette Lösung in wäbr. Natriumhydrogencarbonat wurde durch Dithionit entfärbt. Potentiometrische Titration in 50-proz. Methanol ergab das Äquiv.-Gew. 73 ± 5 und den p_K -Wert 4,2, der dem einer Carbonsäure entspricht.

Sehr ähnliche Eigenschaften hat das 2,5-Dihydroxy-benzochinon-(1,4), von dem sich unser Abbauprodukt jedoch dadurch unterschied, daß es bei $157-163^{\circ}$ schmolz und sein Äquiv.-Gew. etwas größer war. Da seine Menge für Analysen nicht ausreichte und wir das Vorliegen von 2,5-Dihydroxy-toluchinon-(1,4) vermuteten, haben wir das Abbauprodukt reduzierend acetyliert. Dabei entstand ein farbloses, kristallisiertes, bei $194-196^{\circ}$ schmelzendes Acetat, das mit 2,3,5,6-Tetraacetoxy-toluol (III) keine Schmp.-Erniedrigung zeigte. Dieser Befund sowie die Beobachtung, daß es 1. das gleiche UV- und IR-Spektrum hat wie 2,5-Dihydroxy-toluchinon-(1,4) (IV) und 2. mit *o*-Amino-phenol ein kristallisiertes, rotbraunes Kondensationsprodukt bildet, das mit einem in gleicher Weise aus IV gewonnenen Präparat im Schmp., Misch-Schmp., UV- und IR-Spektrum übereinstimmt, beweisen, daß unser Spaltprodukt 2,5-Dihydroxy-toluchinon-(1,4) (IV) ist.

Das Kondensationsprodukt aus IV und *o*-Amino-phenol hat entweder die Konstitution V oder die des isomeren 3-Hydroxy-4-methyl-phenoxazons-(2). Da die Aminogruppe des *o*-Amino-phenols wahrscheinlich leichter mit der C-1-Chinoncarbonylgruppe von IV reagiert als mit der anderen, von zwei *o*-Substituenten flankierten, bevorzugen wir Formel V.

Aus Zone C (Abbild. 1) unserer Hydrolysate haben wir eine rote, kristallisierte Verbindung $C_{14}H_{11}NO_3$ vom Schmp. 242° isoliert, die der KUHN-ROTH-Oxydation nach zwei C-Methylgruppen enthält. Sie ist in ihrem Absorptionsspektrum dem Actinocinin ähnlich und wie dieses in wäßrigem Alkali gelbrot löslich. Mit Acetanhydrid/Natriumacetat lieferte sie ein kristallisiertes, gelbrotes, bei $164-166^{\circ}$ schmelzendes Monoacetat $C_{16}H_{13}NO_4$, mit Zinn(II)-chlorid in Chloroform ein tiefblaues Reduktionsprodukt und mit *o*-Phenylendiamin ein kristallisiertes, braunes Kondensationsprodukt, das sich nicht acetylieren ließ.

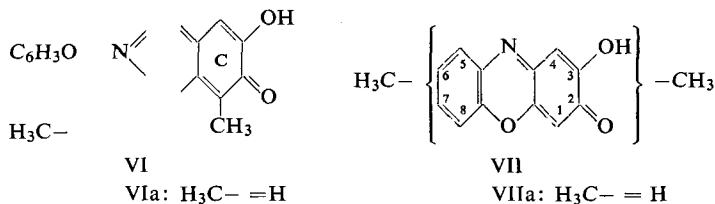
Da unser Abbauprodukt $C_{14}H_{11}NO_3$ dem Actinocinin $C_{15}H_{11}NO_5$ sehr ähnlich ist, eine um CO_2 kleinere Bruttoformel hat und von wäßrigem Natriumhydrogencarbonat nicht aufgenommen wird, lag nahe, es als decarboxyliertes Actinocinin anzusehen und (der Actinocinin-Teilformel I entsprechend) nach Ia zu formulieren.

Das von uns isolierte 2,5-Dihydroxy-toluchinon-(1,4) (IV) entstammt zweifellos dem Actinomycin-Chromophor. Nimmt man an, daß es während der Hydrolyse aus dem zunächst gebildeten Abbauprodukt $C_{14}H_{11}NO_3$ hervorgeht, so kann dessen Teilformel Ia zu VI erweitert werden. Über den mit Ring C (VI) verbundenen Rest, der die zweite C-Methylgruppe enthält, läßt sich dann sagen, daß : 1. sein Stickstoffatom wie beim Actinocinin wahrscheinlich tertiär und Bestandteil eines Heteroringes ist und 2. sein Sauerstoffatom — da das Abbauprodukt nur ein *Mono*-acetat bildet — sicher nicht einer Hydroxygruppe angehört.

Ersetzt man in VI die beiden C-Methylgruppen durch Wasserstoff, so erhält man VIa, die Teilformel der Stammverbindung unseres Abbauproduktes. Die Aufgabe, sie zur Konstitutionsformel zu erweitern, ist dadurch erleichtert worden, daß das Abbauprodukt mit Zinn(II)-chlorid ein blaues Reduktionsprodukt liefert. Denn, da Verbindungen, die das tun, selten sind, lief die Strukturauflklärung der Stammverbindung VIa auf die Frage hinaus, welche heterocyclischen Verbindungen der Formel $C_{12}H_7NO_3$ 1. mit Zinn(II)-chlorid ein blaues Reduktionsprodukt, 2. bei Säurehydrolyse 2.5-Dihydroxy-benzochinon-(1.4) und 3. mit *o*-Phenylendiamin ein braunes Kondensationsprodukt geben.

Bei einer Durchmusterung heterocyclischer Verbindungen fanden wir nur *eine*, die allen drei Forderungen genügt: das 3-Hydroxy-phenoxazon-(2) (VIIa), das demnach die Stammverbindung unseres Abbauproduktes sein muß; ein Ergebnis, das auch mit den spektroskopischen Befunden in Einklang steht. Denn VIa und das Abbauprodukt haben recht ähnliche Absorptionskurven (Abbild. 2), und das gleiche gilt für das Monoacetat der beiden Verbindungen (Abbild. 2). Damit ließ sich die Teilformel VI unseres Abbauproduktes zur Formel VII erweitern, in der die beiden Methylgruppen acht verschiedene Stellungen einnehmen können.

Da es bei unseren geringen Substanzmengen aussichtslos war, durch Abbauveruche zwischen diesen acht Formeln zu entscheiden, haben wir versucht, diese Aufgabe durch Synthese zu lösen, und daher 2.5-Dihydroxy-toluchinon-(1.4) (IV) mit allen

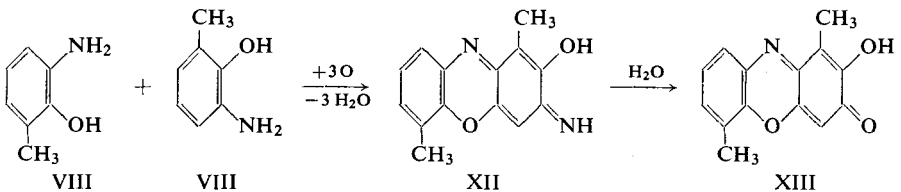
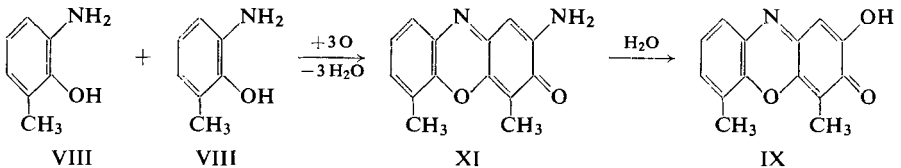
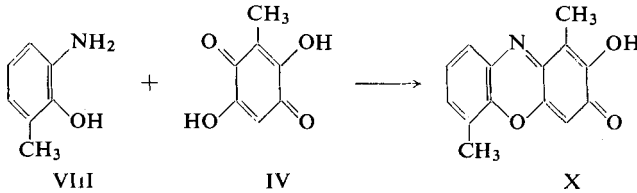
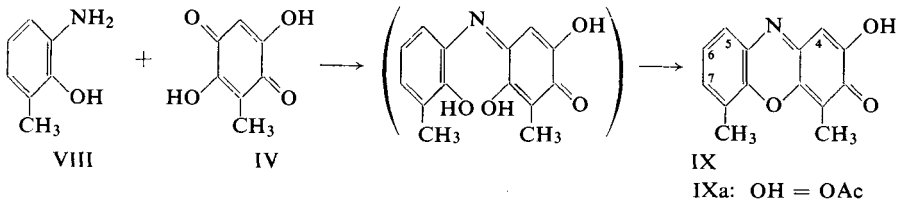


vier isomeren *o*-Amino-methylphenolen kondensiert. Dabei erhielten wir aus IV und 3-Amino-2-hydroxy-toluol (VIII) ein gelbrotes, kristallisiertes 3-Hydroxy-dimethylphenoxazon-(2) $C_{14}H_{11}NO_3$ vom Schmp. 242° , das im Spektrum des sichtbaren sowie des UV- und IR-Gebietes völlig mit unserem Abbauprodukt übereinstimmte (Abbild. 2 und 3) und dessen Schmp. nicht erniedrigte.

Ebenso wie das Abbauprodukt ließ sich das synthetische Phenoxazon in ein kristallisiertes, orangefarbenes Monoacetat $C_{16}H_{13}NO_4$ vom Schmp. $162-164^\circ$ überführen, das den Schmp. des Abbauprodukt-monoacetates nicht erniedrigte und im IR-Spektrum in allen Einzelheiten mit diesem übereinstimmte. Damit war die Identität unseres Abbauproduktes mit dem synthetischen Phenoxazon gesichert und die Richtigkeit der obigen Ableitung bewiesen. Lediglich für die Stellung der beiden Methylgruppen blieben noch zwei Möglichkeiten offen. Denn bei der Kondensation von IV mit VIII war, je nachdem, welche Chinoncarbonylgruppe mit der Aminogruppe von VIII reagiert, sowohl das 3-Hydroxy-1.8-dimethylphenoxazon-(2) (IX) wie das isomere 3-Hydroxy-4.8-dimethylphenoxazon-(2) (X) zu erwarten.

Um zu entscheiden, ob unserem synthetischen Phenoxazonderivat Formel IX oder X zukommt, haben wir nach einem lange bekannten Verfahren zur Darstellung von 3-Amino-

phenoxazonen-(2) das 3-Amino-2-hydroxy-toluol (VIII) in Benzol/Methanol unter Verwendung von Quecksilberoxyd oxydativ mit sich selbst kondensiert, wobei neben 3-Amino-1.8-



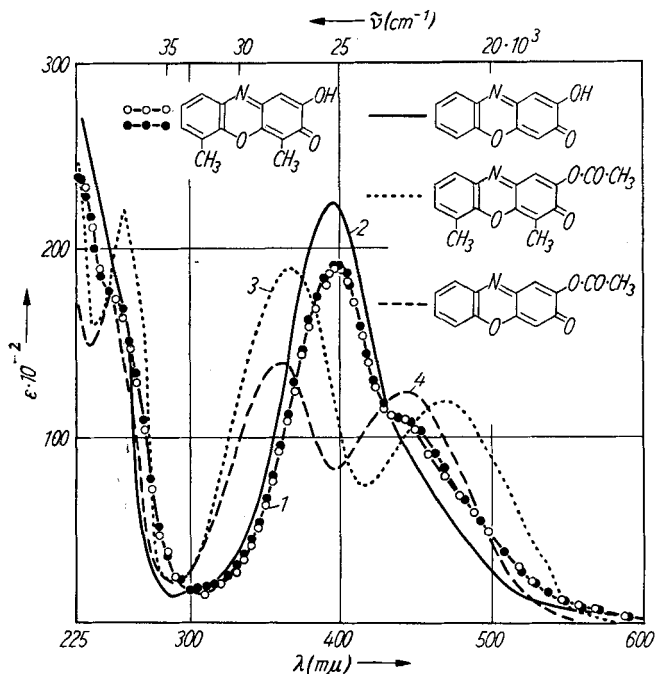
dimethyl-phenoxazon-(2) (XI) auch das isomere 3-Hydroxy-4.8-dimethyl-phenoxazin-(2) (XII) zu erwarten war. Da XII im Gegensatz zu XI in wäßrigem Alkali löslich sein sollte, wurde die Benzollösung des Reaktionsproduktes erschöpfend mit 2 *n* NaOH ausgeschüttelt, um etwa vorhandenes XII zu entfernen. Die nach dieser Vorbehandlung aus dem Benzol auskristallisierende rote, bei 242° schmelzende Verbindung C₁₄H₁₂N₂O₂, die mit Acetanhydrid/Natriumacetat ein kristallisiertes, gelbrotes Monoacetat C₁₆H₁₄N₂O₃ vom Schmp. 164–166° lieferte, mußte demnach die Verbindung XI sein¹³⁾. Daß diese Überlegung richtig ist, hat sich inzwischen durch eine Reaktionsfolge¹⁴⁾ beweisen lassen, über die wir in einer späteren Mitteilung berichten werden.

Um seine Amino- gegen eine Hydroxygruppe auszutauschen, wurde XI 10 Stdn. mit 50-proz. Essigsäure gekocht. Das gelbrote, kristallisierte Reaktionsprodukt, dem seiner Entstehungsweise nach die Formel IX zukommt, schmolz allein sowie im Gemisch

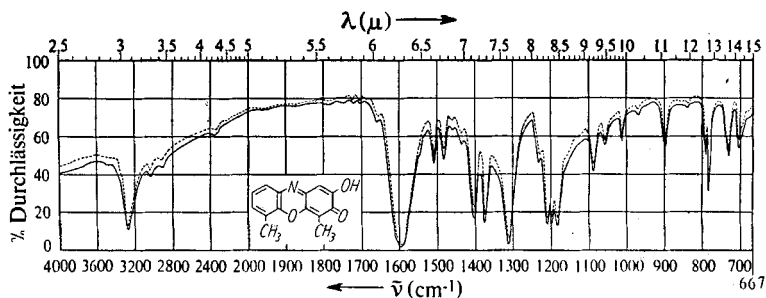
¹³⁾ Diese Verbindung ist zuerst von F. KEHRMANN, Ber. dtsh. chem. Ges. 39, 136 [1906], beschrieben worden, der VIII jedoch in wäßrig alkalischer Lösung mit Luft oxydierte.

¹⁴⁾ O. ATZROTT, Diplomarb. Univ. Göttingen 1956.

mit unserem roten Actinomycin-Abbauprodukt bei 242° und stimmte mit ihm im Spektrum des sichtbaren, UV- und IR-Gebietes überein. Damit war bewiesen, daß das Abbauprodukt Formel IX hat. Und da es, wie oben gezeigt, mit dem durch Kondensation von IV und VIII entstehenden Phenoxazonderivat identisch ist, war nunmehr auch für dieses die Formel IX sichergestellt. Bei der Kondensation von IV mit



Abbild. 2. Absorptionskurven in Methanol von 1) 3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (IX) synthetisch (—○—○—) und aus Actinomycin (—●—●—), 2) 3-Hydroxy-phenoxazon-(2) (VIIa) (———), 3) 3-Acetoxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (IXa) (·····) und 4) 3-Acetoxy-phenoxazon-(2) (----)



Abbild. 3. IR-Spektrum von 3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (IX) aus Actinomycin (·····) und von einem synthetisch gewonnenen Präparat (———) in KBr

VIII reagiert also diejenige Carbonylgruppe von IV bevorzugt, die nur von *einem* *o*-ständigen Substituenten flankiert ist

Bei der mit Quecksilberoxyd durchgeführten Oxydation von VIII zu XI haben wir nicht geprüft, ob das Phenoxazim XII entsteht, sondern durch die Alkalibehandlung des Rohproduktes nur dafür gesorgt, daß XII, falls vorhanden, entfernt wird. Bei der in schwach alkalischer Lösung vorgenommenen Luftoxydation¹⁴⁾ von VIII zu XI dagegen wurde die Entstehung von XII präparativ nachgewiesen. Als wir nämlich das Oxydationsprodukt von VIII mit 50-proz. Essigsäure kochten, um die Amino- gegen eine Hydroxygruppe auszutauschen, erhielten wir eine Substanz, bei deren chromatographischer Trennung sich unterhalb der orangefarbenen Zone von IX eine gelbe, schneller wandernde Zone ausbildete. Ihr Inhaltstoff, gelbe Nadeln vom Schmp. 237–239°, die den Schmp. von IX erniedrigten, gab Analysenzahlen, die gut auf $C_{14}H_{11}NO_3$ paßten. Da die Verbindung alle Eigenschaften eines 3-Hydroxyphenoxazons-(2) zeigt, ist sie offensichtlich das aus dem Phenoxazim XII hervorgegangene, mit IX isomere 3-Hydroxy-4.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (XIII).

Der Befund, daß bei der Säurehydrolyse von Actinomycin C das 3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (IX) entsteht, ist für alle weiteren Versuche und Überlegungen der vorliegenden Arbeit von entscheidender Bedeutung gewesen. Bevor wir darauf eingehen, soll noch kurz auf folgendes hingewiesen werden. Wenn Säure auf Actinomycin C einwirkt, entsteht als erstes Abbauprodukt Desamino-actinomycin C, eine Reaktion, bei der lediglich eine Aminogruppe des Chromophors als Ammoniak abgespalten und gegen eine Hydroxygruppe ausgetauscht wird¹⁵⁾. Das 3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (IX) und ebenso das Actinocin (I) und Desamino-actinocinyl-threonin (II) entstammen demnach dem Chromophor des Desamino-actinomycins C, und alle Schlüsse, die sich aus der Konstitution dieser Abbauprodukte ergeben, beziehen sich streng genommen zunächst auf den Chromophor des Desamino-actinomycins C. Da dieser sich jedoch vom Actinomycin-C-Chromophor nur dadurch unterscheidet, daß er an Stelle einer Amino- eine Hydroxygruppe enthält, ist seine Strukturermittlung gleichbedeutend mit der Konstitutionsaufklärung des Actinomycin C-Chromophors selber.

Zu fragen war somit zunächst, was sich an Hand des Abbauproduktes IX über die Konstitution des Desamino-actinomycin C-Chromophors aussagen läßt. Ein Vergleich von IX mit Desamino-actinomycin C hat folgendes ergeben:

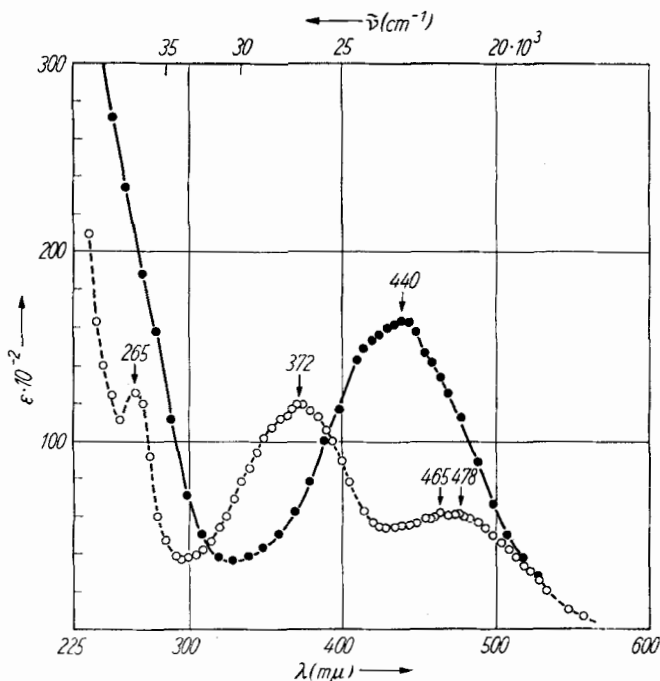
1. IX wird durch Zinn(II)-chlorid zu einer tiefblauen, semichinoiden Verbindung reduziert, Desamino-actinomycin C zu einer tiefgrünen. Die Absorptionsspektren beider Reduktionsprodukte sind einander ähnlich.

2. IX und Desamino-actinomycin C lösen sich in wäßrigem Alkali gelbbraun.

3. Das Absorptionsspektrum von IX ist dem des Desamino-actinomycins C ähnlich (Abbild. 2 und 4), und ähnlich ist bei beiden Verbindungen auch die Änderung des Spektrums beim Übergang in das Monoacetat (Abbild. 2 und 4). Da das Abbauprodukt IX somit noch alle für Desamino-actinomycin C charakteristischen Farbeigenschaften aufweist und andererseits durch Säure nicht weiter abgebaut werden

¹⁵⁾ H. BROCKMANN und B. FRANCK, Chem. Ber. 87, 1767 [1954].

kann, ohne diese Eigenschaften zu verlieren, war gesichert, daß wir in ihm das Kernstück des Desamino-actinomycin-Chromophors in Händen hatten.



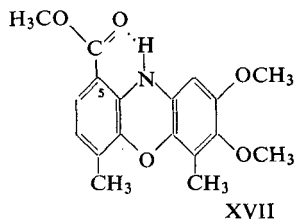
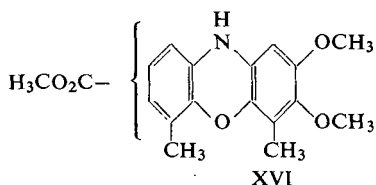
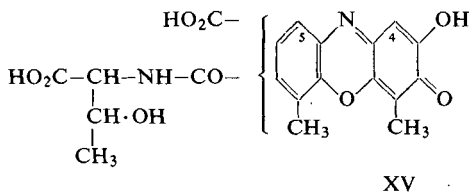
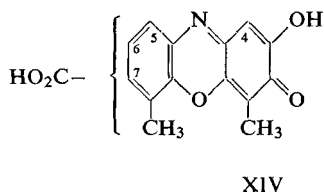
Abbild. 4. Absorptionskurven von Desamino-actinomycin C (—●—●—) und Desamino-actinomycin C-monoacetat (---o---o) in Methanol

Als nächstes war nun zu klären, wie dieses Kernstück in der Desamino-actinomycin-Molekel mit den beiden Peptidlacton-Resten verknüpft ist und ob sich bei der Säurehydrolyse außer diesen Resten noch andere Gruppen vom Kernstück ablösen. Antwort auf diese Fragen haben die Versuche und Überlegungen des nächsten Abschnitts gegeben.

KONSTITUTION UND SYNTHESE DES ACTINOCININS

Als neues Derivat des Actinocinins (I) erhielten wir beim Verestern mit Acetanhydrid/Perchlorsäure ein kristallisiertes, rotes Monoacetat vom Schmp. 214–216°. Seine Absorptionskurve (Methanol) unterscheidet sich nur wenig von der des 3-Acetoxy-1.8-dimethyl-phenoxazons-(2) (IXa); ein weiterer Ausdruck für die Ähnlichkeit unseres roten Abbauproduktes IX mit Actinocinin. Wie schon erwähnt, hatte uns diese Ähnlichkeit, die Differenz CO₂ zwischen den Bruttoformeln sowie der Löslichkeitsunterschied in wäßrigem Natriumhydrogencarbonat (I löslich; IX unlöslich) zu der Annahme geführt, daß IX ein decarboxyliertes Actinocinin sei. Somit konnte, nachdem die Konstitution des roten Abbauproduktes aufgeklärt war, die Actinocinin-Formel I zu XIV und die Desamino-actinocinyl-threonin-Formel II zu XV entwickelt werden.

In Formel XIV gibt es für die Stellung der Carboxygruppe vier Möglichkeiten (C-4, C-5, C-6 und C-7). Da wir nicht genug Actinocinin hatten, um durch systematischen Abbau zu entscheiden, wo die Carboxygruppe steht, haben wir ebenso wie bei IX versucht, auch die Konstitution des Actinocinins durch Synthese zu beweisen.

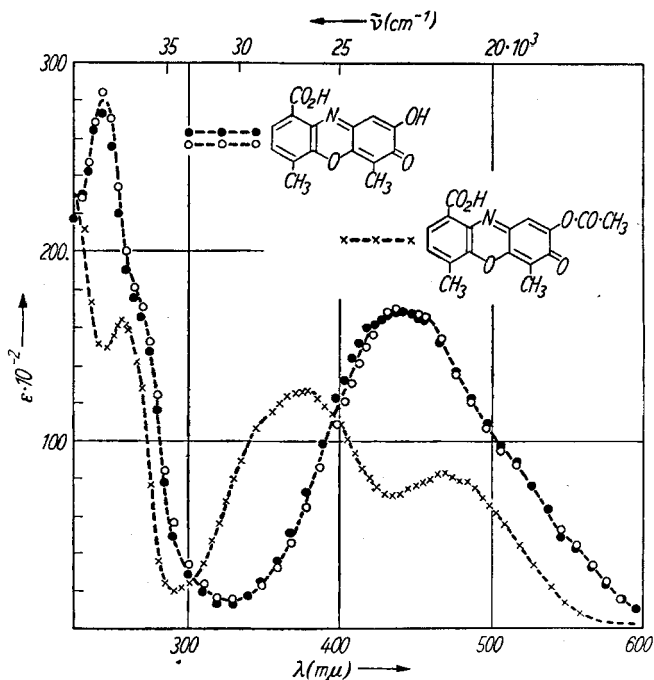
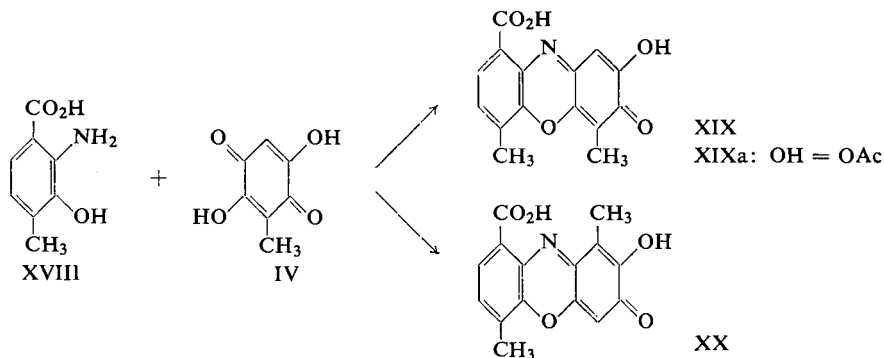


Die Aussicht, dabei auf Anheiß die „richtige“ der vier Säuren XIV zu gewinnen, ist durch folgende Überlegungen vergrößert worden.

Aus der Desamino-actinocinyl-threonin-Formel XV und dem Befund, daß Actinocin C zwei Peptidlacton-Gruppen enthält, läßt sich schließen, daß diese beiden Gruppen im Desamino-actinocin C säureamidartig mit zwei am Chromophor-Kernstück IX sitzenden Carboxygruppen verbunden sind. Beide Carboxygruppen können, wie die Isolierung von IX zeigt, bei der Hydrolyse durch Decarboxylierung entfernt werden, und zwar eine von ihnen leichter; die nämlich, die dem Actinocinin (XIV) im Gegensatz zu XV fehlt. Fragt man sich, von welchem Kohlenstoffatom des Phenoxazon-Gerüsts (XV) eine Carboxygruppe am leichtesten abzuspalten ist, so wird die Wahl auf das dem chinoiden Ring angehörende C-4 fallen, denn Chinon-carbonsäuren sind leicht decarboxylierbar. Danach schien sicher, daß die Carboxygruppe des Actinocinins *nicht* an C-4 steht.

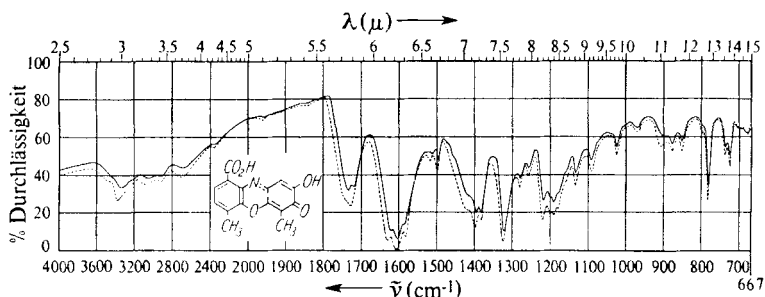
Die Auswahl zwischen den noch verbleibenden drei Möglichkeiten für die Stellung der Carboxygruppe (C-5, C-6, C-7) ist durch die Untersuchung eines neuen Actinocininderivates, des „Dihydro-actinocinin-trimethyläthers“, erleichtert worden. Diese sich in konz. Mineralsäuren blaugrün lösende Verbindung, der die Formel XVI zuzuschreiben ist, erhielten wir in gelben, bei 105–107° schmelzenden Kristallen, als Actinocinin mit Natriumdithionit reduziert und anschließend mit Dimethylsulfat methyliert wurde. Ihr IR-Spektrum hat eine von der Iminogruppe (vgl. XVI) herführende Bande bei 2.90 μ ; ferner eine Carbonylbände bei 5.89 μ , die der Estergruppe zuzuordnen ist. Bemerkenswert erschien uns nun, daß diese Bande ein wenig längerwellig ist als die bei 5.80 μ liegende Ester-carbonylbände des methylierten Actinocinins¹⁾. Der Unterschied ist nicht groß. Dennoch hielten wir es für denkbar, daß er von einer Chelierung der Ester-carbonylgruppe in XVI herrührt. Die aber ist nur möglich, wenn

die Estergruppe der Dihydroverbindung XVI wie in Formel XVII an C-5 steht. Um zu sehen, ob dementsprechend Actinocinin die 3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-carbonsäure-(5) (XIX) ist, haben wir versucht, diese Säure durch Kondensation von 2.5-Dihydroxy-toluchinon-(1.4) (IV) mit 2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (XVIII) aufzubauen. Dabei entstand in guter Ausbeute eine kristallisierte, rote Verbindung $C_{15}H_{11}NO_5$, für die, je nachdem welche Carbonylgruppe von IV sich mit der Aminogruppe von XVIII kondensiert, zunächst die Formeln XIX und XX zur Diskussion standen.



Abbild. 5. Absorptionskurven von Actinocinin aus Actinomycin C (—●—●—), synthetischem Actinocinin (—○—○—) und Actinocinin-acetat (—x—x—) in Methanol

Da sich bei der Synthese von 3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (IX) aus IV und VIII bevorzugt die nur von *einem* *o*-ständigen Substituenten flankierte Carbonylgruppe von IV kondensiert und nicht einzusehen ist, warum sich IV der Carbonsäure XVIII gegenüber anders verhalten sollte, haben wir dem Kondensationsprodukt aus IV und XVIII die Konstitution XIX zugeschrieben. Ein Vergleich des Kondensationsproduktes mit Actinocinin hat gezeigt, daß beide in den Farbreaktionen sowie im Spektrum des sichtbaren, UV- und IR-Gebietes (Abbild. 5 und 6) vollkommen übereinstimmen.



Abbild. 6. IR-Spektrum von Actinocinin aus Actinomycin C (-----) und synthetischem Actinocinin (—) in KBr

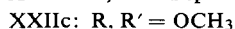
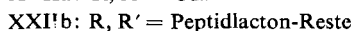
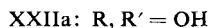
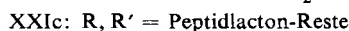
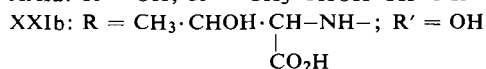
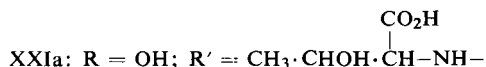
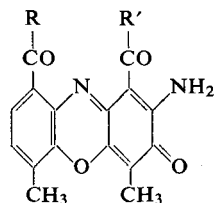
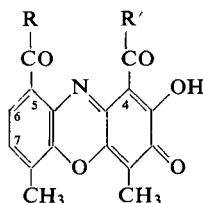
Ebenso wie Actinocinin konnten wir unsere synthetische Verbindung mit Acetanhydrid/Perchlorsäure in ein kristallisiertes, rotes Monoacetat überführen, das den gleichen Schmp. hat wie Actinocinin-acetat (XIXa), dessen Schmp. nicht erniedrigt und im sichtbaren, UV- und IR-Gebiet das gleiche Spektrum zeigt wie dieses. Danach ist Actinocinin mit unserer synthetischen Verbindung identisch und hat die Konstitution XIX.

Zu bemerken ist, daß die Alternative zwischen den Formeln XIX und XX nur für die synthetische Phenoxazon-carbonsäure zur Diskussion stand. Denn, da das Abbau-Phenoxazon IX, in dem die Stellung der beiden Methylgruppen bewiesen ist, zweifellos aus Actinocinin entstehen kann, war für dieses die Formel XX von vornherein auszuschließen.

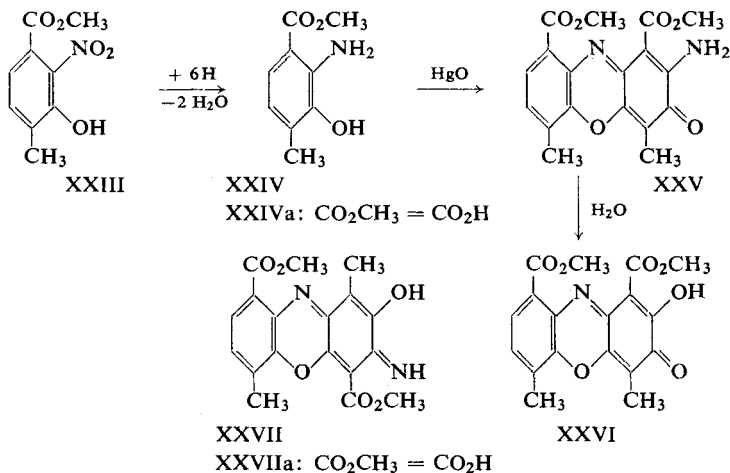
KONSTITUTION UND SYNTHESE DES ACTINOMYCIN-CHROMOPHORS

Der Beweis, daß Actinocinin die Konstitution XIX hat, und die Feststellung, daß beim Abbau von Desamino-actinocinyl-threonin (XV) zu Actinocinin (XIX) entweder die freie oder die mit dem Threoninrest verknüpfte Carboxygruppe aus XV abgespalten wird und daher an C-4 stehen muß, gestattet, die Desamino-actinocinyl-threonin-Formel XV zur Formel XXI a bzw. b zu erweitern, bei der noch offen bleibt, ob R oder R' der Threoninrest ist. Von den beiden oben aufgeworfenen Fragen: 1. wo und wie die beiden Peptidlacton-Gruppen des Desamino-actinomycins C an das Kernstück IX des Chromophors geknüpft sind und 2. ob im Desamino-actinomycin außer diesen beiden Gruppen noch andere an IX hängen, ist die erste durch Formel XXI beantwortet; die Peptidlacton-Gruppen sind säureamidartig mit zwei an C-4 und C-5 stehenden Carboxygruppen verknüpft.

Zur zweiten Frage ist folgendes zu sagen. Desamino-actinocinyl-threonin-dimethylester und die Desamino-actinomycine sind in ihren Absorptionskurven sehr ähnlich¹⁾, und das gleiche gilt für ihr grünes Zinn(II)-chlorid-Reduktionsprodukt¹⁾



sowie ihr Acetat. Ständen am Chromophor-Kernstück IX des Desamino-actinomycins C an C-6 und C-7 Gruppen, die im Desamino-actinocinyl-threonin nicht mehr vorhanden sind, so müßten sie so beschaffen sein, daß sie: 1. spektroskopisch nicht in Erscheinung treten und 2. bei Säurehydrolyse durch Wasserstoff ersetzt werden. Da es keine Substituenten gibt, die beide Bedingungen zugleich erfüllen, scheint uns sicher, daß Desamino-actinomycin C den gleichen Chromophor besitzt wie Desamino-actinocinyl-threonin und daher nach XXIc formuliert werden kann.

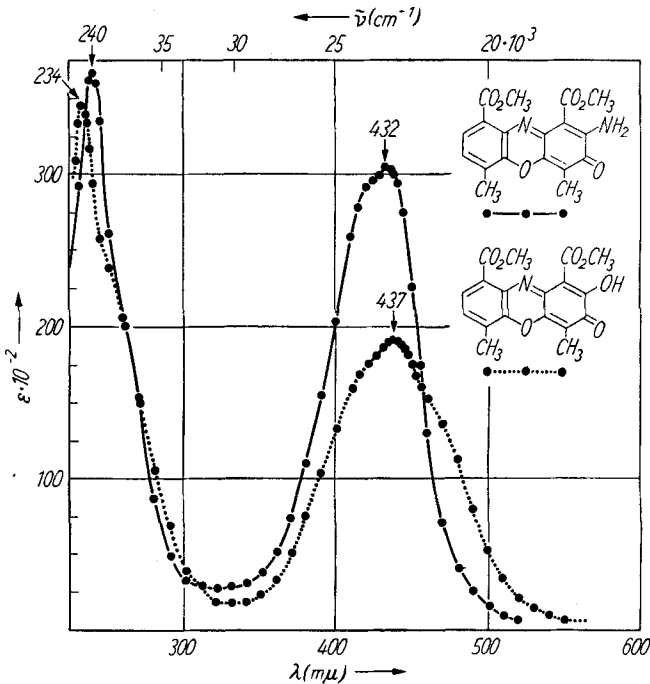


Der Desamino-actinomycin C-Chromophor wäre somit der Säurerest der 3-Hydroxy-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4,5) (XXId). Und da die Desamino-actinomycine aus den Actinomycinen dadurch entstehen, daß eine Aminogruppe des Actinomycin-Chromophors unter Abspaltung von Ammoniak gegen eine

Hydroxygruppe ausgetauscht wird, müßte der Säurerest der 3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5) (XXIIa) der Chromophor der C- und X-Actinomycine sein. Für die Actinomycine selber ergibt sich daraus die Formel XXIIb.

Um diese Folgerungen spektroskopisch zu überprüfen, haben wir zunächst den Mylester XXIIc der Säure XXIIa synthetisiert. Ausgangsmaterial war 2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure-methylester (XXIII), der mit Natriumdithionit zum 2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure-methylester (XXIV) reduziert wurde. Dieser lieferte, in Chloroform mit Quecksilberoxyd oxydiert, in guter Ausbeute eine kristallisierte, gelbrote Verbindung $C_{18}H_{16}N_2O_6$, für die zunächst die Formeln XXV und XXVII zur Diskussion standen. Da unser Kondensationsprodukt durch Salzsäure zu Actinocinin (XIX) abgebaut werden konnte, war ihm die Konstitutionsformel der gesuchten Verbindung XXV zuzuordnen. Die oxydative Verknüpfung von zwei Molekeln XXIV verläuft also analog wie die von VIII zu XI.

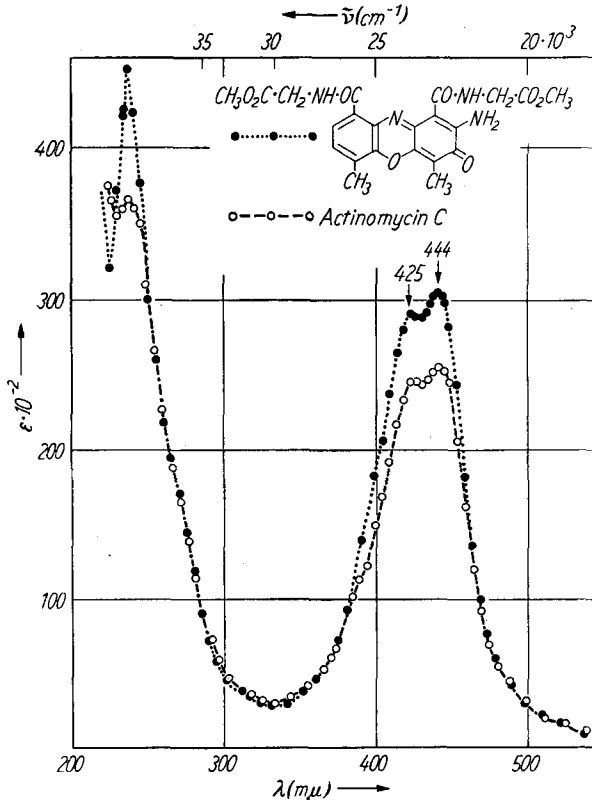
Durch Kochen mit 50-proz. Essigsäure oder kürzeres Erwärmen mit Salzsäure unter Bedingungen, wie sie bei der Darstellung von Desamino-actinomycinen angewandt wurden¹⁵⁾, ließ sich die Aminogruppe von XXV gegen eine Hydroxygruppe austauschen. Der so gewonnene 3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5)-dimethylester (XXVI) kristallisiert in roten Prismen, die sich oberhalb 200°



Abbild. 7. Absorptionskurven von 3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5)-dimethylester (XXV) (●—●—●) in Methanol und 3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5)-dimethylester (XXVI) (●.....●.....●) in Methanol, das 10 % Chloroform enthielt, um die Löslichkeit zu erhöhen

zersetzen. Sein in Methanol bei $437\text{ m}\mu$ liegendes Maximum (Abbild. 7) hat eine kleinere Extinktion als die Aminoverbindung XXV. Eine analoge Extinktionsdifferenz findet man beim langwelligeren Maximum der Actinomycine und Desamino-actinomycine.

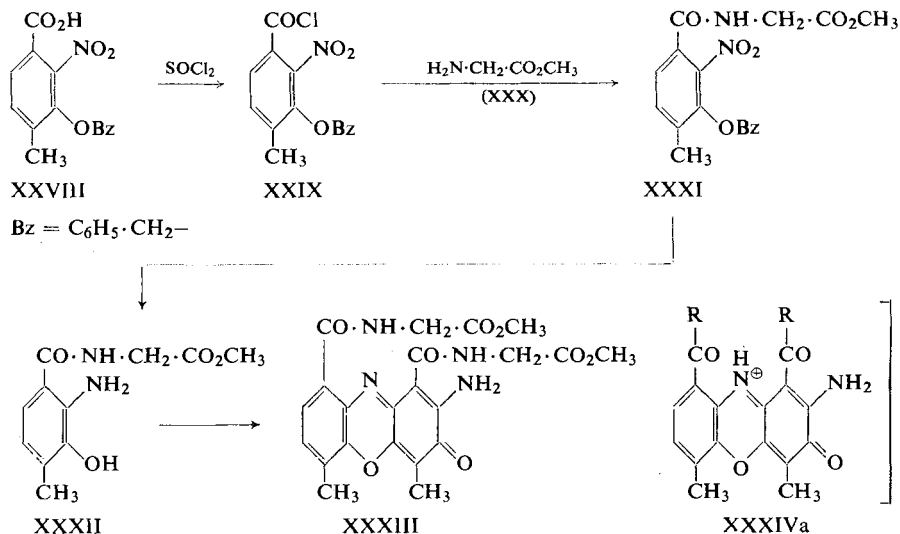
Die in Methanol gemessene Absorptionskurve (Abbild. 7) von XXV ist der Kurve der Actinomycine (Abbild. 8) recht ähnlich, doch liegt das langwellige Maximum von



Abbild. 8. Absorptionskurven von Actinomycin C (o--o--o) und Actinocinyl-bis-glycinmethylester (XXXIII) (●.....●.....) in Methanol

XXV um $12\text{ m}\mu$ kürzerwellig als bei den Actinomycinen. Um zu sehen, ob dieser Unterschied dadurch bedingt ist, daß die Carboxygruppen in XXV verestert, in den Actinomycinen dagegen säureamidartig gebunden sind, haben wir die Verbindung XXXIII aufgebaut, in der die beiden Carboxygruppen von XXIIa säureamidartig mit zwei veresterten Glycinresten verbunden sind. Dabei gingen wir von der 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure (XXVIII) aus, deren mit Thionylchlorid bereitetes Chlorid XXIX, mit Glycinmethylester (XXX) umgesetzt, den in farblosen Nadeln vom Schmp. 126° kristallisierenden *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-glycinmethylester (XXXI) lieferte. Der daraus durch Hydrierung mit Raney-Nickel ge-

wonnene *N*-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-glycinmethylester (XXXII) wurde in wäßrigem Ammoniumcarbonat bei p_{H} 9.0 mit Luft oxydiert, wobei in 90-proz. Ausbeute eine gelbrote, kristallisierte Verbindung $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_8$ entstand. Da bei der Oxydation der Säure XXIV a sowie des Esters XXIV die Phenoxazonderivate XXII a bzw. XXV und *nicht* die isomeren Phenoxazine XXVII a bzw. XXVII entstehen, war von vornherein wahrscheinlich, daß bei der Oxydation von XXXII ebenfalls ein Phenoxazonderivat gebildet wird und unser aus XXXII gewonnenes Oxydationsprodukt $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_8$ die Konstitution XXXIII hat. Daß diese Annahme richtig ist, ließ sich durch Säureabbau beweisen, denn dabei faßten wir Actinocinin.



Die Absorptionskurve von XXXIII ist in ihren Konturen der Kurve der Actinomycine gleich (Abbild. 8) und schmiegt sich dieser im Gebiet 240–380 $\text{m}\mu$ sowie 450–500 $\text{m}\mu$ völlig an. Unterschiede bestehen allein in der Extinktion der Maxima, die bei den Actinomycinen etwas kleiner ist als bei der Modellverbindung. Sie könnten dadurch bedingt sein, daß die sperrigen Peptidlacton-Gruppen die am Ringsystem sitzenden Säureamid-carbonyl-Gruppen an der coplanaren Einstellung hindern, etwa so, wie es bei der Carbonylgruppe sterisch gehinderter Alkyl-aryl-ketone der Fall ist¹⁶⁾.

Die weitgehende spektrale Übereinstimmung unserer Modellverbindung XXXIII mit den Actinomycinen, ihre Ähnlichkeit mit den Actinomycinen im chemischen Ver-

¹⁶⁾ Vgl. z. B. E. A. BRAUDE und E. S. WRIGHT, in „Progress in Stereochemistry“ S. 145, London 1954.

halten (leichter Austausch einer Amino- gegen eine Hydroxygruppe, schwache Basizität, Abbau mit Alkali, Halochromie) und schließlich unsere Befunde beim Abbau der Actinomycine lassen keinen Zweifel mehr daran, daß der Acylrest der 3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5) (XXIIa) der Chromophor der Actinomycine C₁, C₂, C₃, X_{0β} und X₂ ist und diesen Antibiotica die Formel XXIIb zugeschrieben werden kann.

An Hand dieser Formel sollen nun kurz einige Reaktionen des Actinomycin-Chromophors erläutert werden. Faßt man die α -Hydroxy-carbonyl-Gruppierung des Desamino-actinomycin-Chromophors als vinyloge Carboxygruppe auf, so ist die α -Amino-carbonyl-Gruppierung des Actinomycin-Chromophors als vinyloge Säureamidgruppe anzusehen, und damit wird verständlich, daß die Aminogruppe des Chromophors nicht basisch ist und hydrolytisch leicht gegen eine Hydroxygruppe ausgetauscht wird.

Welche Rolle die Aminogruppe bei der Salzbildung der Actinomycine spielt, zeigt die dabei auftretende Farbvertiefung. Die in organischen Solvenzien gelbrot löslichen Actinomycine werden von konzentrierten Mineralsäuren mit weinroter Farbe aufgenommen. Diese auch den 3-Amino-phenoxazonen-(2) XI, XXIIc und XXXIII eigene Halochromie wäre unerklärlich, wenn die Aminogruppe als Protonenacceptor fungierte. Sie wird dagegen verständlich, wenn man annimmt, daß sich das Proton an das Hetero-N-Atom anlagert. Denn dann entsteht ein resonanzstabilisiertes Kation, das sich durch die Grenzformeln XXXIVa und XXXIVb beschreiben läßt.

Erhitzt man Actinomycin C 36 Stdn. mit 30-proz. Schwefelsäure auf 110°, so wird 0.7 bis 0.8 Mol. Kohlendioxyd frei¹⁷⁾. Es entstammt, wie jetzt klar wird, der an C-4 des Chromophors sitzenden Säureamid-carbonyl-Gruppe, die nach Verseifung decarboxyliert wird. Die gleiche Decarboxylierung beobachteten wir beim Actinocin-dimethylester (XXV), der bei längerem Erhitzen mit 20-proz. Salzsäure in Actinocin (XIX) überging.

Vor einiger Zeit wurde gefunden¹⁸⁾, daß Actinomycine und Desamino-actinomycine unter den bei der Acetylbestimmung üblichen Bedingungen bei alkalischer Verseifung (2 stdg. Kochen mit methanol. *n* NaOH) 0.4–0.6 Mol. und bei Verseifung mit 20-proz. Schwefelsäure (3 Stdn. bei 110°) sogar 0.8–0.9 Mol. flüchtiger Säure liefern. Aus dem nach saurer Verseifung erhaltenen Destillat ließ sich Propionsäure isolieren, deren Entstehung auf einen Abbau des im Peptidteil vorhandenen Threonins zurückgeführt wurde.

Um zu sehen, ob die Gesamtmenge an flüchtiger Säure aus dem Threonin stammt, wurden Blindversuche mit dieser Aminosäure durchgeführt¹⁸⁾. Sie gaben bei „saurer Verseifung“ nicht mehr als 0.2–0.3 Mol. und bei „alkalischer Verseifung“ sogar nur 0.03 Mol. flüchtiger Säure. Diese Diskrepanz gegenüber den Actinomycinen erklärt sich, wie wir fanden, dadurch, daß aus dem 3-Hydroxy-phenoxazon-(2)-Gerüst unter den Bedingungen der Acetylbestimmung erhebliche Mengen an flüchtiger Säure entstehen. Bei den Actinomycinen ist demnach der gefundene „Acylgehalt“ bei alkalischer Verseifung praktisch ganz und bei saurer zum größeren Teil auf flüchtige saure Abbauprodukte des Chromophors zurückzuführen.

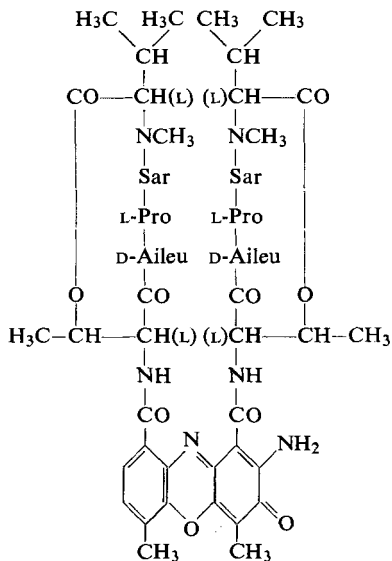
Bemerkenswert ist, daß im Gegensatz zu den Actinomycinen weder XXIIc noch XXXIII mit Bariumhydroxyd zu Despeptido-actinomycin abgebaut werden konnte.

¹⁷⁾ H. BROCKMANN, N. GRUBHOFER, W. KASS und H. KALBE, Chem. Ber. **84**, 260 [1951]

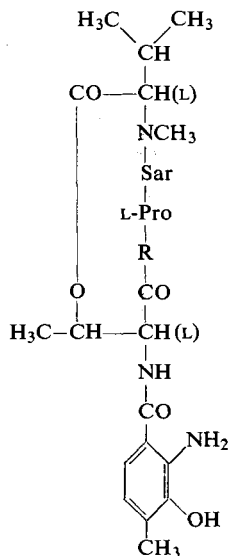
¹⁸⁾ H. BROCKMANN und B. FRANCK, Naturwissenschaften **42**, 180 [1955].

ZUR KONSTITUTION UND BIOGENESE DER ACTINOMYCINE

Durch unseren Arbeitskreis ist der Aminosäuregehalt der Actinomycine C₁, C₂, C₃, X₀₈ und X₂ ermittelt^{19, 20}) und die Struktur ihres Peptidteils soweit aufgeklärt worden, daß für Actinomycin C₃ die Konstitutionsformel XXXV vorgeschlagen werden konnte⁸). An Hand dieser Formel und unserer weiter unten erörterten Vorstellungen über die Biogenese der Actinomycine war vorauszusehen, daß Actinomycin C₁ sich von Actinomycin C₃ nur dadurch unterscheidet, daß die beiden Peptidlactonringe D-Valin an Stelle von D-*allo*-Isoleucin enthalten; oder anders gesehen, daß Actinomycin C₁ zwei C-Methylgruppen weniger enthält als Actinomycin C₃. Daß dies zutrifft, konnte kürzlich von E. BULLOCK und A. W. JOHNSON²¹) gezeigt werden, die für Actinomycin C₁ die Bezeichnung Actinomycin D²²) verwenden.



XXXV


 XXXVI: R = D-Aileu; Val
 Aileu = *allo*-Isoleucin

Inzwischen haben Untersuchungen über die Peptidgruppen²³) der Actinomycine C₁, C₂, C₃, X₀₈ und X₂ erkennen lassen, daß die strukturellen Unterschiede zwischen

¹⁹) H. BROCKMANN und G. BOHNSACK, *Naturwissenschaften* **40**, 223 [1953]; H. BROCKMANN, H. GRÖNE und J. TIMM, ebenda **42**, 125 [1955]; H. VORBRÜGGEN, *Diplomarb. Univ. Göttingen* 1955; G. GEBHARDT, *Diplomarb. Univ. Göttingen* 1955.

²⁰) H. BROCKMANN und J.-H. MANEGOLD, unveröffentlicht.

²¹) *J. chem. Soc. [London]* **1957**, 3280.

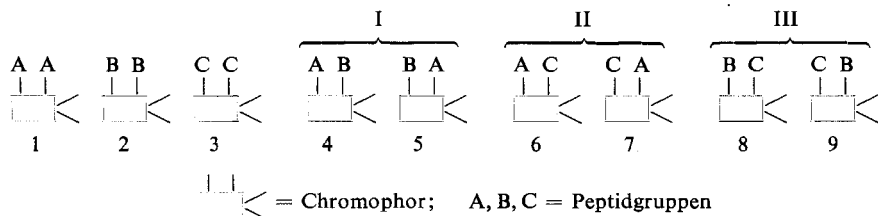
²²) Mit dem Buchstaben D haben L. C. VINING und S. A. WAKSMAN (*Science [Washington]* **120**, 389 [1954]) ein von ihnen aus *Str. parvullus*-Kulturen isoliertes Actinomycin bezeichnet, das identisch ist mit dem zuerst von H. BROCKMANN und N. PFENNIG (*Naturwissenschaften* **39**, 429 [1952]; *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **292**, 77 [1953]) isolierten Actinomycin C₁. Actinomycin D ist also kein „neues“ Actinomycin, wie die Bezeichnung vermuten lassen könnte.

²³) H. BROCKMANN und Mitarbb., unveröffentlicht.

diesen fünf Actinomycinen auf bestimmte Glieder der Peptidringe beschränkt sind. Wieweit die hier im Bauplan zutage tretende Übereinstimmung auch für die Peptidgruppen der vielen neuen Actinomycine gilt, die G. SCHMIDT-KASTNER²⁴⁾ biosynthetisch durch Zusatz verschiedener Aminosäuren zur Kulturlösung Actinomycin produzierender Streptomyceten gewonnen hat, wird z. Zt. untersucht.

Unsere Beobachtung, daß Actinocinyl-bis-glycinmethylester (XXXIII) in wäßriger Lösung bei p_H 7.8 in Ausbeuten bis zu 93% d. Th. durch Luftyoxydation aus XXXII entsteht, legt die Vermutung nahe⁸⁾, daß die Actinomycine *in vivo* in analoger Weise durch oxydative Kondensation aus *N*-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-peptiden oder entsprechenden Peptidlactonen des Strukturtyps XXXVI aufgebaut werden, wobei die Oxydation vielleicht durch Phenoxylasden besorgt wird. Damit würde die Actinomycin-Synthese, soweit sie das Phenoxazon-Gerüst betrifft, in Parallele gesetzt zur Synthese der von A. BUTENANDT und Mitarbb. untersuchten und als Phenoxazonderivate erkannten Ommochrome²⁵⁾.

Wie schon früher betont⁸⁾, ermöglicht ein Aufbau der Actinomycine aus *N*-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-peptiden (XXXVI) — auch, wenn die Zelle deren Peptidteil nur in engen Grenzen variieren kann — die Bildung einer größeren Zahl verschiedener Actinomycine. Angenommen, ein *Streptomyces*-Stamm wäre bei der Synthese der als Vorstufen fungierenden Verbindungen XXXVI auf drei Strukturvariationen des Peptidteils beschränkt, so könnten, wenn diese Vorstufen bei der Kondensation zum 3-Amino-phenoxazon-(2)-Gerüst alle denkbaren Kombinationen eingehen, der Abbild. 9 entsprechend, neun verschiedene Actinomycine entstehen; drei mit zwei gleichen Peptidketten (*iso*-Actinomycine) und sechs mit zwei verschiedenen Peptidketten (*aniso*-Actinomycine).



Abbild. 9. Schematische Darstellung der Actinomycine, die durch oxydative Kondensation entstehen können, wenn die Zelle zum Aufbau von drei in der Peptidkette verschiedenen Vorstufen des Strukturtyps XXXVI befähigt ist

Diese Überlegung führt zu der Frage, ob die in unserem Institut entwickelten verteilungschromatographischen Methoden zur Trennung von Actinomycingemischen ausreichen, um alle nach obigem Schema möglichen Actinomycine zu isolieren. Für die *iso*-Actinomycine ist diese Frage, wie die Trennung von Actinomycin C₁ und C₃ zeigt, grundsätzlich zu bejahen, und das gleiche dürfte für *aniso*-Actinomycine gelten, sofern sie nicht der gleichen Gruppe I, II oder III angehören. Von besonderem Interesse

²⁴⁾ G. SCHMIDT-KASTNER, Naturwissenschaften 43, 132 [1956]; „Medizin und Chemie“, „Bayer“ Leverkusen, Verlag Chemie, Weinheim 1956, Bd. V, S. 463.

²⁵⁾ Vgl. zusammenfassende Darst. von A. BUTENANDT, Angew. Chem. 69, 16 [1957].

ist es, ob Vertreter der gleichen Gruppe, z. B. die der Formel 4 und 5 trennbar sind. Denn wenn das gelingt, sollte sich das zur Gruppe der *aniso*-Actinomycine gehörende Actinomycin C₂ eventuell in zwei Isomere zerlegen lassen. Versuche in dieser Richtung sind im Gange.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, den FARBENFABRIKEN BAYER, Werk Elberfeld, und dem FONDS DER CHEMIE danken wir für großzügige Förderung.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE²⁶⁾

„Säures“ Kieselgel: Das für die chromatographischen Trennungen dieser Arbeit verwendete „saure“ Kieselgel wurde nach der früher angegebenen Vorschrift¹⁾ hergestellt.

Abbau von Actinomycin C mit Säure: Kristallisiertes Actinomycin C wurde in 8 Ansätzen zu je 2.5 g mit Salz- oder Schwefelsäure unter den in der Tab. angegebenen Bedingungen erhitzt. Die Hydrolysate extrahierte man erschöpfend mit Chloroform, gab den Chloroformauszug jedes Ansatzes durch eine Säule von saurem Kieselgel und wusch mit Chloroform nach. Als Beispiel für die dabei erhaltenen Chromatogramme ist in Abbild. 1 das des Ansatzes Nr. 5 angeführt. Bei manchen Ansätzen fehlte die eine oder andere der bei Nr. 5 vorhandenen Zonen ganz oder war nur schwach ausgeprägt. Die mit Chloroform extrahierten Hydrolysate wurden auf andere Abbauprodukte hin aufgearbeitet.

Säurehydrolyse von Actinomycin C

Dauer der Hydrolyse in Stdn.	Temp.	Säure	Fraktion A	Fraktion B (Actinocinin)	Fraktion C	Fraktion D
1 240	60°	10-proz. HCl	—	—	—	—
2 240	60°	20-proz. HCl	17 mg	—	—	3 mg
3 120	80°	20-proz. HCl	36 mg	65 mg	—	5 mg
4 96	85°	20-proz. HCl	34 mg	61 mg	—	5 mg
5 120	85°	20-proz. HCl	28 mg	73 mg	Spuren	6 mg
6 20	100°	20-proz. HCl	1 mg	10 mg	62 mg	8 mg
7 137	80°	25-proz. H ₂ SO ₄	—	71 mg	—	6 mg
8 22	100°	25-proz. H ₂ SO ₄	—	2 mg	124 mg	8 mg
		Summe	116 mg	292 mg	188 mg	41 mg

Fraktion D (2.5-Dihydroxy-toluchinon-(1.4) (IV)): Die Eluate aus den D-Zonen sämtlicher Chromatogramme verdampfte man gemeinsam, nahm den Rückstand in 100 ccm Chloroform auf und schüttelte dieses erschöpfend mit insgesamt 50 ccm *n* NaOH aus. Die violettrote, wäßrig-alkalische Phase säuerte man an, extrahierte den hellgelben Farbstoff mit Chloroform, engte den Chloroformauszug auf 20 ccm ein und gab ihn durch eine kleine Säule von „saurem“ Kieselgel. Beim Nachwaschen mit Chloroform wurde die schnell laufende,

²⁶⁾ Schmpp., soweit nicht anders vermerkt, auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert.

hellgelbe Zone gesondert aufgefangen und ihr Eluat unter Normaldruck eingedampft. Das hinterbleibende *2,5-Dihydroxy-toluchinon-(1.4) (IV)* sublimierte bei 60°/16 Torr in orange-farbenen, glänzenden Blättchen. 1.986 mg Substanz entwickelte bei der Verbrennung nach DUMAS keine meßbare Menge Stickstoff. UV-Absorptionsspektrum in Methanol: λ_{\max} 289 μ . ($\epsilon = 10380$); 360 μ . ($\epsilon = 2800$).

Reduzierende Acetylierung von Fraktion D: Eine Lösung von 1.6 mg des vorstehenden Sublimates in 1 ccm Acetanhydrid wurde nach Zugabe von wenig Zinkstaub und Natriumacetat 5 Min. gekocht, mit 1 ccm Eisessig verdünnt und nach Abfiltrieren des Zinkstaubs mit 6 ccm Wasser versetzt. Nach 2 Tagen hatten sich farblose Nadeln abgeschieden, die aus Methanol/Wasser umkristallisiert wurden. Ausb. 0.6 mg. Schmp. 194–196°, Misch-Schmp. mit *2,3,5,6-Tetraacetoxy-toluol (III)* 194–198°.

Kondensation mit o-Amino-phenol: Eine Lösung von 1 mg der *Fraktion D* in 1 ccm Methanol verdünnte man mit 10 ccm heißem Wasser, gab 4 mg *o-Aminophenol-hydrochlorid* hinzu und erhitzte 2 Stdn. auf siedendem Wasserbad. Dann wurde mit Chloroform extrahiert und der Chloroformauszug durch eine kleine Säule von saurem Kieselgel gegeben. Beim Nachwaschen mit Chloroform bildete sich eine schwache, schnell wandernde, hellgelbe Zone, über ihr eine breite, gelbrote und am oberen Rand der Säule eine festhaftende, blaue Zone. Aus dem auf 0.5 ccm eingeeengten Eluat der gelbroten Zone fielen auf Zugabe von 2 ccm Petroläther rotbraune, bei 222–225° (BERL-Block) schmelzende Kristallblättchen aus. Mischen mit dem in gleicher Weise aus *2,5-Dihydroxy-toluchinon-(1.4)* bereiteten *3-Hydroxy-x-methylphenoxazon-(2)* erniedrigte den Schmp. nicht. Beide Präparate stimmten in allen Einzelheiten ihres IR-Spektrums überein.

Fraktion C (3-Hydroxy-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2) (IX)): Als die vereinigten Eluate aus den C-Fractionen aller Hydrolysenansätze auf 0.5 ccm eingeeengt wurden, schied sich *IX* in orangefarbenen Prismen ab, die unter Zersetzung bei 243° schmolzen, in 2 *n* Na₂CO₃ wenig löslich waren und von 2 *n* NaOH mit gelbbrauner Farbe aufgenommen wurden. Die gelbrote Chloroformlösung färbte sich auf Zugabe von Zinn(II)-chlorid grünstichig-blau.

C₁₄H₁₁NO₃ (241.3) Ber. C 69.70 H 4.59 N 5.80 2 C-CH₃ 12.4

Gef. C 69.62 H 4.62 N 5.72 C-CH₃ 11.8 Mol.-Gew. *) 244 ± 3

*) Bestimmt durch Redox titration mit Chrom(II)-acetat in 70-proz. Methanol.

Beim Kochen einer mit etwas *o-Phenylendiamin* versetzten Lösung von *Fraktion C* in Eisessig, schied sich nach kurzer Zeit ein braunes, kristallisiertes Kondensationsprodukt aus, das beim Behandeln mit Acetanhydrid/Pyridin unverändert blieb.

Acetylierung von Fraktion C: Eine Lösung von 20 mg der *Fraktion C* in 5 ccm Acetanhydrid wurde nach Zugabe von etwas Natriumacetat 30 Min. auf siedendem Wasserbad erwärmt und dann mit 5 ccm Eisessig und 15 ccm Wasser verdünnt. Der dabei ausfallende, feinkristalline, orangefarbene Niederschlag lieferte, aus Methanol/Wasser umkristallisiert, orangefarbene, bei 164–166° schmelzende Nadeln des *Acetates IXa*. Ausb. 20 mg.

C₁₆H₁₃NO₄ (283.3) Ber. C 67.87 H 4.63 N 4.95 1 CH₃CO 15.2

Gef. *) C 67.97 H 4.63 N 4.95 CH₃CO 14.7 (**)

*) getrocknet bei 100° i. Hochvak.

***) verseift mit *n* methanol. NaOH 180 Min. bei Siedetemperatur. Blindwert abgezogen.

3-Hydroxy-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2) (IX): Eine Lösung von 100 mg *2,5-Dihydroxy-toluchinon-(1.4) (IV)* und 400 mg *3-Amino-2-hydroxy-toluol-hydrochlorid (entspr. VIII)* in 10 ccm heißem Methanol wurde mit 60 ccm heißem Wasser verdünnt, 2 Stdn. auf siedendem Wasserbad erwärmt und dann mit Chloroform extrahiert. Als der Chloroformauszug durch eine Säule aus saurem Kieselgel gegeben und mit Chloroform nachgewaschen wurde, bildeten

sich eine breite, schnell laufende orangerote und zwei langsamer laufende, schmale, blaue Zone. Beim Einengen des Eluates der orangeroten Zone auf 0.5 ccm fiel IX in orangeroten Prismen aus. Schmp. 242° (Zers.); Ausb. 148 mg. Misch-Schmp. mit Fraktion C 242°. IX in gleicher Weise acetyliert wie Fraktion D lieferte ein Acetat vom Schmp. 164—166°, das im Gemisch mit dem Acetat der Fraktion C keine Schmp.-Erniedrigung gab.

3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (XI): Eine Lösung von 1 g *3-Amino-2-hydroxy-toluol (VIII)* in einer Mischung aus 20 ccm Methanol und 100 ccm Benzol schüttelte man 8 Stdn. mit 5 g gelbem *Quecksilberoxyd*, filtrierte ab und schüttelte das Filtrat so oft mit 2 n NaOH, bis die wäßrige Phase farblos blieb. Aus der mit Wasser gewaschenen und auf 5 ccm eingengten Benzollösung schied sich XI in tiefroten Kristallen ab, die mit Äther gewaschen wurden. Ausb. 780 mg. Beim Erhitzen trat oberhalb 280° Zers. ein.

$C_{14}H_{12}N_2O_2$ (240.3) Ber. C 69.99 H 5.03 N 11.66 Gef. *) C 70.30 H 4.80 N 11.85

*) i. Hochvak. sublimiert.

3-Acetamino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2): Eine Lösung von 100 mg *3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (XI)* in 20 ccm heißem *Acetanhydrid* wurde nach Zusatz von etwas wasserfreiem Natriumacetat 1 Stde. auf siedendem Wasserbad erwärmt. Das nach Verdünnen mit 20 ccm Eisessig und Zusatz von Wasser ausgefallene Acetat kristallisierte aus heißem Eisessig in langen, orangefarbenen Nadeln vom Schmp. 283°. Ausb. 108 mg.

$C_{16}H_{14}N_2O_3$ (282.3) Ber. C 68.07 H 5.00 N 9.92 1 CH_3CO 15.25

Gef. *) C 67.96 H 4.83 N 9.98 CH_3CO 15.90 **)

*) getrocknet 5 Stdn. bei 150° i. Hochvak. **) nach Abzug von 7 % Blindwert.

3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (IX) aus 3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2) (XI): Eine Lösung von 1 g XI in 215 ccm 50-proz. Essigsäure wurde 10 Stdn. unter Rückfluß gekocht, mit Wasser verdünnt und dann erschöpfend mit Chloroform ausgezogen.

Beim Filtrieren der Chloroformlösung durch eine Säule von saurem Kieselgel bildete sich beim Nachwaschen mit Chloroform eine schnell laufende, orangerote Zone. Aus ihrem auf 1 ccm eingengten Eluat kristallisierten orangerote Prismen. Ausb. 720 mg. Schmp. 242°. Misch-Schmp. mit Fraktion C 242°.

Das analog wie bei Fraktion C dargestellte kristallisierte Acetat schmolz bei 164—166° und zeigte im Gemisch mit dem Acetat der Fraktion C keine Schmp.-Erniedrigung.

Ein nach F. KEHRMANN¹³⁾ dargestelltes Rohprodukt von *3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)* gab nach Kocchen mit 50-proz. Essigsäure bei chromatographischer Adsorption aus Chloroform an saurem Kieselgel neben der orangeroten Zone des *3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazons-(2)* noch eine gelbe, schneller laufende Zone, deren Eluat beim Einengen gelbe Nadeln vom Schmp. 237—239° lieferte. Ein Gemisch dieser Verbindung mit *3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)* schmolz bei 216 bis 230°.

$C_{14}H_{11}NO_3$ (241.3) Ber. C 69.70 H 4.58 N 5.80 Gef. *) C 69.43 H 4.93 N 5.72

*) 3 Stdn. i. Hochvak. bei 150° getrocknet.

Derivate und Synthese des Actinocinins

Actinocinin-acetat (XIXa): Eine Lösung von 20 mg *Actinocinin* in 3 ccm *Acetanhydrid* wurde mit einem Tropfen Perchlorsäure versetzt, 6 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt, dann mit 3 ccm Eisessig verdünnt und auf Eis gegossen. Das ausgefallene, rote Acetat wusch man mit Wasser, löste es nach Trocknen in Chloroform und gab die Lösung durch eine Säule von saurem Kieselgel. Beim Nachwaschen mit Chloroform trennte sich eine schnell laufende, leuchtend rote Zone von einer darüberliegenden braunen.

Der Verdampfungsrückstand des Eluates der roten Zone kristallisierte aus Methanol/Wasser in roten Nadeln. Schmp. 214–216° (Zers.); Ausb. 18 mg.

$C_{17}H_{13}NO_6$ (327.3) Ber. C 62.38 H 4.00 N 4.28 1 CH_3CO 13.2
Gef.*) C 62.22 H 4.14 N 4.45 CH_3CO 16.2**)

*) getrocknet bei 130° i. Hochvak. **) Acetyl-Blindwert 10.0 berücksichtigt.

„*Dihydro-actinocinin-trimethyläther*“ (XVII): Eine Suspension von 50 mg *Actinocinin* in 50 ccm Aceton und 10 ccm Wasser wurde nach Zugabe von 6 g Kaliumcarbonat und 2 g *Natriumdithionit* 10 Min. auf siedendem Wasserbad erhitzt, dann in Abständen von 15 Min. 3 mal mit 2 ccm *Dimethylsulfat* versetzt und anschließend 90 Min. gekocht. Die hellgelbe, erkaltete Lösung verdünnte man mit 200 ccm Wasser, extrahierte den Farbstoff mit Chloroform, dampfte den Chloroformauszug i. Vak. ein, nahm den Rückstand in 50 ccm Aceton auf und kochte diese Lösung nach Zusatz von 5 g Kaliumcarbonat und 4 ccm *Dimethylsulfat* 1 Stde. Dann wurde mit 200 ccm Wasser verdünnt, der Farbstoff wieder mit Chloroform ausgeschüttelt und der Chloroformauszug zur Verseifung von überschüss. *Dimethylsulfat* 1 Stde. mit *n* NaOH geschüttelt. Nachdem man die Chloroformlösung gut mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet hatte, dampfte man sie i. Vak. ein und nahm den hellgelben, kristallisierten Rückstand in 10 ccm Benzol auf. Als diese Lösung durch eine Säule von Aluminiumoxyd (Akt.-Stufe II) gegeben und mit Benzol/Aceton (20 : 1) nachgewaschen wurde, wanderte eine breite, hellgelbe Zone schnell durch die Säule, während eine schmale, orangefarbene fest haften blieb. Das Eluat der gelben Zone hinterließ, bei 50° i. Vak. verdampft, einen Rückstand, der aus Methanol/Wasser in gelben Nadeln vom Schmp. 105–107° kristallisierte. Ausb. 47% d. Th.

$C_{18}H_{19}NO_5$ (329.3) Ber. C 65.64 H 5.82 N 4.25 3 CH_3O 28.3
Gef.*) C 65.32 H 5.99 N 4.04 CH_3O 27.8

*) getrocknet bei 70° i. Hochvak.

2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoessäure: 1 g *2-Nitro-3-methoxy-4-methyl-benzoessäure*²⁷⁾ wurde 1 Stde. in 30 ccm 48-proz. siedender Bromwasserstoffsäure erhitzt. Aus der gelben Lösung schieden sich beim Erkalten gelbe Blättchen ab, die nach einigen Stdn. abgesaugt und mit Wasser gewaschen wurden. Schmp. 182–183°, Ausb. 77% d. Th.

$C_8H_7NO_5$ (197.1) Ber. C 48.74 H 3.58 N 7.11 Gef. C 48.64 H 3.73 N 7.00

2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoessäure (XVIII): Man löste 1 g *2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoessäure* in 15 ccm heißer 2-proz. Natriumacetatlösung und gab bei Siedehitze in kleinen Anteilen soviel *Natriumdithionit* hinzu, bis die Lösung entfärbt war. Beim Erkalten schied sich XVIII in farblosen Nadeln ab und wurde mit frisch ausgekochtem, kaltem Wasser gewaschen. Ausb. 66% d. Th., Schmp. 218–219° (Gasentwicklung).

$C_8H_9NO_3$ (167.2) Ber. C 57.48 H 5.43 N 8.38 Gef.*) C 57.32 H 5.18 N 8.26

*) Bei 150° i. Hochvak. sublimiert und vor Analyse nochmals bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

Synthese des Actinocinins (XIX): Eine Lösung von 100 mg *2,5-Dihydroxy-toluchinon-(1.4)* (IV) und 200 mg *2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoessäure* (XVIII) in 5 ccm Methanol wurde mit 30 ccm Wasser versetzt, mit 1 Tropfen 2 *n* HCl angesäuert, 2 Stdn. auf siedendem Wasserbad erwärmt und dann mit Chloroform extrahiert. Beim Chromatographieren der Chloroformlösung an saurem Kieselgel (Nachwaschen mit Chloroform) bildete sich eine schmale, schnell laufende, orangefarbene Zone, darüber eine breite, rote und oben eine festhaftende braune Zone. Aus dem auf 1 ccm eingengten Eluat der roten Zone kristallisierte die

27) J. L. SIMONSEN und M. A. RAU, J. chem. Soc. [London] 119, 1342 [1921].

3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-carbonsäure-(5) (*Actinocinin*) (*XIX*) in roten, rhombischen Nadeln. Ausb. 110 mg. Das Präparat zersetzte sich oberhalb 280°, ohne zu schmelzen.

$C_{15}H_{11}NO_5$ (285.3) Ber. C 63.16 H 3.89 N 4.91 Gef. *) C 63.28 H 4.40 N 4.98

*) getrocknet 5 Stdn. bei 150° i. Hochvak.

Acetylierung: Eine Probe des Präparates wurde, wie oben beim Actinocinin-acetat beschrieben, acetyliert und lieferte dabei rote Nadeln vom Schmp. 214–216° (Zers.), die im Gemisch mit *Actinocinin-acetat* keine Schmp.-Erniedrigung zeigten.

Synthese des Actinomycin-Chromophors und einiger Derivate

2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure-methylester (*XXIII*): Eine Lösung von 1 g *2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure* in 50 ccm 4-proz. methanol. Salzsäure kochte man 12 Stdn. unter Rückfluß, goß dann in 200 ccm Wasser und extrahierte mit Äther. Der Rückstand des mit *n* NaHCO₃ und Wasser gewaschenen und mit Natriumsulfat getrockneten Ätherextraktes kristallisierte aus Methanol/Wasser in farblosen Blättchen vom Schmp. 115–116°. Ausb. 90% d. Th.

$C_9H_9NO_5$ (211.2) Ber. C 51.49 H 4.30 N 6.63 Gef. *) C 51.45 H 4.83 N 7.18

*) i. Hochvak. sublimiert.

3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5)-dimethylester (*XXV*): Eine Lösung von 1 g *2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure-methylester* (*XXIII*) in 100 ccm heißem 0.5 *n* Na₂CO₃ wurde bis zur Entfärbung mit *Natriumdithionit* versetzt und mit Chloroform extrahiert. Den mit Natriumsulfat getrockneten Chloroformauszug schüttelte man 5 Stdn. mit 5 g gelbem *Quecksilberoxyd*, filtrierte ab, engte auf 5 ccm ein und verdünnte mit 10 ccm heißem Methanol. Beim Erkalten schied sich *XXV* in langen, orangefarbenen Nadeln ab, die sich oberhalb 195°, ohne zu schmelzen, dunkel färbten. Ausb. 67% d. Th. In Aceton und Methanol auch in der Hitze schwerlöslich. Gut löslich in Eisessig und heißem Pyridin oder Formamid, die sich beide zum Umkristallisieren eignen. Lösungsfarbe in konz. Salzsäure gelbrot.

$C_{18}H_{16}N_2O_6$ (356.3) Ber. C 60.67 H 4.53 N 7.86 Gef. *) C 60.58 H 4.49 N 7.83

*) getrocknet 5 Stdn. bei 150° i. Hochvak.

3-Hydroxy-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5)-dimethylester (*XXVI*): Eine Lösung von 200 mg *3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5)-dimethylester* (*XXV*) in 30 ccm Eisessig verdünnte man mit 30 ccm Wasser und kochte 4 Stdn. unter Rückfluß. Das mit Wasser verdünnte Reaktionsgemisch extrahierte man mit Chloroform und filtrierte den Chloroformauszug durch eine kurze Säule von saurem Kieselgel. Aus dem auf 1 ccm eingeeengten Filtrat schied sich *XXVI* in roten, prismatischen Kristallen ab, die sich oberhalb 200°, ohne zu schmelzen, zersetzten. Ausb. 91% d. Th. Schwerlöslich auch in der Hitze in Aceton und Methanol, gut löslich in heißem Pyridin und Dimethylformamid, die sich beide zum Umkristallisieren eignen. Löslich mit braunroter Farbe in konz. Salzsäure.

$C_{18}H_{15}NO_7$ (357.3) Ber. C 60.50 H 4.23 N 3.92 Gef. *) C 60.31 H 4.16 N 3.82

*) getrocknet 5 Stdn. bei 150° i. Hochvak.

3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5): Durch eine Lösung von 2 g *2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure* (*XXIVa*) in 300 ccm einer 1-proz. wäßrigen Ammoniumcarbonatlösung wurde 12 Stdn. ein kräftiger Luftstrom geleitet. Die beim Ansäuern ausgefallene Säure wurde mit wenig Wasser, Methanol und Äther gewaschen. Ausb. 1.9 g. Zur Identifizierung wurde ein kleiner Teil mit Methyljodid und Silberoxyd verestert. UV- und IR-Absorptionsspektrum des Esters stimmten in allen Einzelheiten mit denen des *3-Amino-1.8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5)-dimethylesters* überein.

2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoessäure (XXVIII): In eine aus 2.4 g Natrium und 50 ccm Methanol bereitete Natriummethylatlösung trug man 10 g *2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoessäure* ein, verdünnte die rote Lösung mit 200 ccm Benzol und engte i. Vak. bis auf 50 ccm ein, wobei sich das Natriumsalz feinkristallin abschied. Nachdem durch 2 malige Zugabe von je 200 ccm Benzol und Einengen i. Vak. die letzten Reste an Methanol und Wasser azeotrop abdestilliert waren, wurde zur Trockne verdampft. Das hinterbleibende, staubtrockne, feinpulverige, sehr hygroskopische Natriumsalz suspendierte man in 75 ccm absol. Methyl-äthylketon und kochte das Gemisch nach Zusatz von 2 g wasserfreiem Natriumjodid und 10 ccm frisch destilliertem *Benzylchlorid* 20 Stdn. unter Rückfluß. Die von ausgefallenen Salzen abfiltrierte Lösung hinterließ beim Verdampfen i. Vak. einen gelben, öligen Rückstand, den man in 100 ccm 10-proz. methanol. Kaliumhydroxyd aufnahm. Die mit 10 ccm Wasser verdünnte Lösung schüttelte man 3 Stdn., goß in 300 ccm Wasser, kochte mit etwas Tierkohle auf, filtrierte und säuerte das heiße Filtrat an. Das ausgefallene Rohprodukt kristallisierte aus Benzol in farblosen Blättchen, die sich im Licht gelb färbten. Schmp. 174—175°. Ausb. 92% d. Th.

$C_{15}H_{13}NO_5$ (287.3) Ber. C 62.71 H 4.56 N 4.88 Gef.*) C 62.47 H 4.80 N 5.06

*) Bei 150° i. Hochvak. sublimiert.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-glycinmethylester (XXXI): 5 g *2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoessäure (XXVIII)* suspendierte man in 50 ccm absol. Chloroform und erwärmte das Gemisch nach Zusatz einiger Tropfen Pyridin mit 3 ccm *Thionylchlorid* 10 Min. auf dem siedenden Wasserbad. Das Lösungsmittel destillierte man i. Vak. ab, nahm den Rückstand in absol. Benzol auf, filtrierte vom Pyridiniumchlorid ab und dampfte das Filtrat i. Vak. ejn. Den kristallisierten Rückstand nahm man in 50 ccm absol. Chloroform auf und ließ diese Lösung unter Rühren und Eiskühlung in ein Gemisch von 5 g frisch destilliertem *Glycinmethylester* und 50 ccm absol. Chloroform tropfen, um anschließend noch 2 Stdn. bei Zimmertemperatur zu rühren. Dann filtrierte man vom ausgeschiedenen Glycinesterhydrochlorid ab, extrahierte das Filtrat mehrfach mit 2 *n* HCl, wusch mit Wasser nach, trockenete mit Natriumsulfat und verdampfte das Chloroform. Der kristallisierte Rückstand lieferte, aus Benzol/Äther/Petroläther umkristallisiert, farblose Nadeln vom Schmp. 126°, die sich im Licht gelb färbten. Ausb. 93% d. Th.

$C_{18}H_{18}N_2O_6$ (358.3) Ber. C 60.33 H 5.06 N 7.82 Gef.*) C 60.25 H 5.67 N 8.03

*) getrocknet i. Hochvak. bei 100°.

Actinocinyl-bis-glycinmethylester (XXXIII): Eine Lösung von 2 g *N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-glycinmethylester (XXXI)* in einer Mischung aus 50 ccm Benzol und 10 ccm Methanol schüttelte man nach Zugabe von Raney-Nickel unter Wasserstoff bis zur Sättigung, filtrierte, destillierte das Lösungsmittel bei 40° i. Vak. ab, nahm den farblosen, kristallisierten Rückstand (*N-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-glycinmethylester (XXXII)*) in 100 ccm Methanol auf, verdünnte die Lösung mit 100 ccm einer wäßrigen Ammoniumcarbonatlösung vom p_H 9.0 und leitete 12 Stdn. Luft durch die Lösung. Schon nach wenigen Min. begann die Abscheidung des in langen, orangeroten Nadeln kristallisierenden *Actinocinyl-bis-glycinmethylesters (XXXIII)*. Nach Beendigung der Oxydation saugte man den Ester ab, wusch mit Wasser und Methanol und kristallisierte ihn aus Chloroform um. Orangerote Nadeln vom Schmp. 293—296° (Zers.). Ausb. 93% d. Th. Gut löslich in heißem Pyridin, Dimethylformamid und Eisessig, wenig löslich in heißem Aceton und Methanol. Lösungsfarbe in konz. Salzsäure weinrot.

$C_{22}H_{22}N_4O_8$ (470.4) Ber. C 56.17 H 4.71 N 11.91 Gef.*) C 55.79 H 4.63 N 12.03

*) getrocknet bei 150° i. Hochvak.