

## HANS BROCKMANN und JOST HENRICH MANEGOLD

Actinomycine, XXIV<sup>1)</sup>; Antibiotica aus Actinomyceten, XLVIII<sup>2)</sup>Actinomycin X<sub>1a</sub> und X<sub>0α</sub>

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 17. Oktober 1961)

Aus Actinomycingemischen vom Typ X wurden Actinomycin X<sub>1a</sub>, X<sub>0γ</sub> und X<sub>0δ</sub> abgetrennt. — Actinomycin X<sub>1a</sub> ist das zweite Actinomycin, das γ-Oxoprolin enthält. — Durch Reduktion mit Aluminiumisopropylat wurde aus Actinomycin X<sub>1a</sub> das bisher unbekannte Actinomycin X<sub>0α</sub> gewonnen. — Vergleichende Tests zeigten, wieweit die antibiotisch wirksame Grenzkonzentration der X-Actinomycine von der Struktur ihres Peptidteils abhängt.

Die zur Actinomycin-Synthese befähigten *Streptomyces*-Arten können die Peptidstruktur ihrer Actinomycine innerhalb gewisser Grenzen variieren. Da jede Art dabei eine oder zwei der möglichen Strukturen bevorzugt, besteht das von ihr produzierte Actinomycingemisch aus einem oder zwei „Hauptactinomycinen“ und mehreren in geringerer oder sehr kleiner Menge vorhandenen „Nebenactinomycinen“<sup>3)</sup>.

Die bisher aus *Streptomyces*-Kulturen isolierten Actinomycingemische kann man nach ihren Hauptactinomycinen in vier Gruppen einteilen<sup>4)</sup>: 1. Gemische vom Typ I, die hauptsächlich aus Actinomycin C<sub>1</sub> bestehen. 2. Gemische vom Typ C, die als Hauptkomponenten Actinomycin C<sub>2</sub> und Actinomycin C<sub>3</sub> enthalten. 3. Actinomycingemische X mit der Hauptkomponente Actinomycin X<sub>2</sub>. 4. Eine erst kürzlich aufgefundene, bisher wenig untersuchte, „Actinomycin Z“ genannte Gruppe von fünf Actinomycinen<sup>5)</sup>.

Die Hauptactinomycine C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> und X<sub>2</sub> der Gemische I, C und X sind zuerst von unserer Arbeitsgruppe isoliert<sup>3)</sup> und dann in ihrer Konstitution aufgeklärt worden<sup>6)</sup>. Nachdem damit der Bauplan der Actinomycine sowie Verfahren für ihre Konstitutionsaufklärung bekannt waren, lag es nahe, nunmehr die Nebenactinomycine der Gemische I, C und X näher zu untersuchen; einmal, um zu sehen, wieweit eine *Streptomyces*-Art den Peptidteil ihrer Actinomycine variieren kann und zum anderen, um an Hand weiterer Vertreter Aufschluß darüber zu erhalten, wie die antibiotische, cytotatische und toxische Wirksamkeit der Actinomycine von der Struktur ihres Peptidteils abhängt.

1) XXIII. Mittel.: H. BROCKMANN und J. H. MANEGOLD, Chem. Ber. 93, 2971 [1960].

2) XLVII. Mittel.: H. BROCKMANN und H. BROCKMANN JR., Chem. Ber. 94, 2681 [1961].

3) H. BROCKMANN und H. GRÖNE, Chem. Ber. 87, 1036 [1954].

4) H. BROCKMANN, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Bd. XVIII, S. 1, Springer-Verlag, Wien 1960.

5) R. BOSSI, R. HÜTTER, W. KELLER-SCHIERLEIN, L. NEIPP und H. ZÄHNER, Helv. chim. Acta 41, 1645 [1958].

6) H. BROCKMANN, Angew. Chem. 72, 939 [1960]; Ber. IUPAC-Symposium „The Chemistry of Natural Products“, Melbourne 1960.

Bei solchen Untersuchungen wurde aus Actinomycingemisch C das Actinomycin C<sub>2a</sub> isoliert und als Isomeres des Actinomycins C<sub>2</sub> erkannt<sup>7)</sup>. Ferner stellte sich heraus, daß die im Actinomycingemisch I gefundenen, zunächst als I<sub>2</sub> und I<sub>3</sub> bezeichneten Nebenactinomycine<sup>3)</sup> mit Actinomycin C<sub>2</sub> bzw. C<sub>3</sub> identisch sind<sup>8)</sup>. Und schließlich haben wir aus Actinomycingemischen X als erste der in kleinerer Menge vorhandenen Komponenten das Actinomycin X<sub>0β</sub><sup>9)</sup> isoliert und soweit in seiner Struktur aufgeklärt, daß nur noch zwischen den Formeln IIa und IIb zu entscheiden ist<sup>1)</sup>.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeiten gelang es uns, aus Actinomycingemischen vom Typ X drei weitere Nebenactinomycine abzutrennen, die wir — der Reihenfolge ihrer Chromatogrammmzonen entsprechend — Actinomycin X<sub>0γ</sub>, Actinomycin X<sub>0δ</sub> und Actinomycin X<sub>1a</sub> genannt haben. Wie sie aufgefunden und isoliert wurden, soll an Hand von Tab. 1 und Abbild. 1 erläutert werden.

Tab. 1. Komponenten eines Actinomycingemisches vom Typ X

Zonen bzw. Abschnitte a b c*)	Inhaltsstoff	Sequenzformel**)	Ausbeute in g/100 l Kulturlösung	
X <sub>0a</sub> I	Gemisch antibiotisch unwirksamer, gelber Produkte			
	Act. X <sub>0α</sub> ***)	Act-Thr-Val- $\left(\frac{\text{Sar}}{\text{Hypro}}\right)$ -Sar-Meval	—	
X <sub>0</sub>	X <sub>0β</sub>	Act. X <sub>0β</sub>	Act-Thr-Val- $\left(\frac{\text{Pro}}{\text{Hypro}}\right)$ -Sar-Meval	0.16
II	X <sub>0γ</sub>	Act. X <sub>0γ</sub>	Act-Thr-Val- $\left(\frac{\text{Sar}}{\text{Pro}}\right)$ -Sar-Meval	0.037
X <sub>1</sub>	X <sub>0δ</sub>	Act. X <sub>0δ</sub>	Act-Thr-Val- $\left(\frac{\text{Pro}}{a\text{-Hypro}}\right)$ -Sar-Meval	0.007
C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	Act. C <sub>1</sub>	Act-Thr-Val—Pro—Sar-Meval	0.73
X <sub>1a</sub> III	X <sub>1a</sub>	Act. X <sub>1a</sub>	Act-Thr-Val- $\left(\frac{\text{Sar}}{\text{Oxopro}}\right)$ -Sar-Meval	0.056
X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	Act. X <sub>2</sub>	Act-Thr-Val- $\left(\frac{\text{Pro}}{\text{Oxopro}}\right)$ -Sar-Meval	4.5
X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	Act. X <sub>3</sub>	unbekannt	0.022
X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	Act. X <sub>4</sub>	unbekannt	0.024

\*) a) Lösungsmittelsystem: Butylacetat-Dibutyläther (3:1)/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat; b) Lösungsmittelsystem: Butylacetat/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat; c) Lösungsmittelsystem: Butanol-Dibutyläther-Dipropyläther (2:1:7)/7-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat.

\*\*) Hypro = L-Hydroxy-prolin; *a*-Hypro = L-*allo*-Hydroxy-prolin; Oxopro = L-γ-Oxo-prolin; Erläuterung der Sequenzformeln vgl. H. BROCKMANN, Angew. Chem. 72, 946 [1960].

\*\*\*) Actinomycin X<sub>0α</sub> wurde noch nicht aus Actinomycingemischen X isoliert.

7) H. BROCKMANN und B. FRANCK, Naturwissenschaften 47, 15 [1960].

8) G. DÖRING, Diplomarbeit Univ. Göttingen 1957.

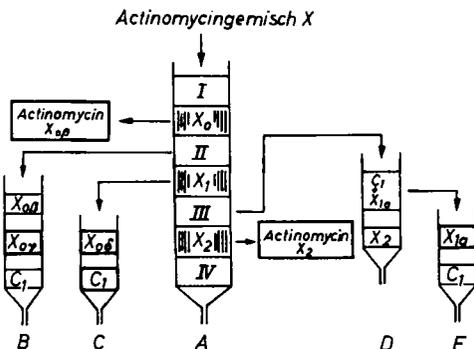
9) H. BROCKMANN, G. PAMPUS und J. H. MANEGOLD, Chem. Ber. 92, 1294 [1959]; H. BROCKMANN und G. PAMPUS, Angew. Chem. 67, 519 [1955].

Chromatographiert man ein Actinomycingemisch X im System Butylacetat-Dibutyläther (3:1)/10-proz. wäbr., mit *m*-Kresotinsäure gesättigtes Natrium-*m*-kresotinat an der Cellulose-säule, so entwickeln sich Zonen<sup>10)</sup>, die in Spalte a der Tab. 1 in der Reihenfolge ihrer  $R_F$ -Werte angeführt und so bezeichnet sind wie in früheren Mitteilungen<sup>3)</sup>.

Von den drei genannten Nebenactinomycinen bildet in solchen Chromatogrammen nur das Actinomycin  $X_{1a}$  eine eigene Zone, während Actinomycin  $X_{0\gamma}$  in der  $X_0$ -Zone und Actinomycin  $X_{0\beta}$  in der  $X_1$ -Zone verborgen bleibt.

Actinomycin  $X_{0\gamma}$  fanden wir, als der Inhaltsstoff der  $X_0$ -Zone im System Butylacetat/10-proz. wäbr., mit *m*-Kresotinsäure gesättigtes Natrium-*m*-kresotinat mit längerer Laufzeit der mobilen Phase an Cellulose chromatographiert wurde. Dabei entstanden drei Zonen. Nur zwei ( $X_{0\beta}$  und  $X_{0\gamma}$ ) enthielten antibiotisch wirksame Inhaltsstoffe mit den Farbreaktionen der Actinomycine. Der mit dem kleineren  $R_F$ -Wert ist das bereits vor einiger Zeit kristallisiert isolierte Actinomycin  $X_{0\beta}$ , der andere das Actinomycin  $X_{0\gamma}$ .

Das nur in sehr geringer Menge vorhandene Actinomycin  $X_{0\beta}$  findet sich, wie schon erwähnt, in der  $X_1$ -Zone (Abbild. 1). Ihr Inhaltsstoff wurde bereits vor längerer Zeit kristallisiert isoliert<sup>11)</sup>, zunächst für ein Isomeres des Actinomycins  $C_1$  gehalten und als „Actinomycin  $X_1$ “ bezeichnet. Eine eingehende Untersuchung bewies jedoch später seine Identität mit Actinomycin  $C_1$ . Bei dieser Gelegenheit wurde auch die  $I_1$ -Fraktion von Actinomycingemischen I in allen Einzelheiten mit Actinomycin  $C_1$  verglichen und bestätigt<sup>12)</sup>, daß sie ebenfalls mit Actinomycin  $C_1$  identisch ist<sup>13)</sup>. Der Versuchsteil bringt die Belege dieser vergleichenden Versuche.



Abbild. 1. Präparative Trennung eines Actinomycingemisches vom Typ X  
Säule A, B: Cellulosepulver, Butylacetat/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat  
Säule D: Cellulosepulver, Butylacetat-Dibutyläther (3:1)/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat  
Säule C, E: Aluminiumoxyd II, Äthylacetat  
Die stark eingerahmten Felder bezeichnen die Stelle, an der die Hauptmenge des betreffenden Actinomycins abgetrennt wird.

<sup>10)</sup> Die  $X_3$ - und  $X_4$ -Zonen sind sehr schwach und fehlen bei manchen Actinomycingemischen X. Erst unter besonderen Kulturbedingungen konnten aus bestimmten Stämmen Actinomycingemische X mit etwas stärkeren  $X_3$ - und  $X_4$ -Zonen gewonnen werden. Aus ihnen hat W. FROMMER, Arch. Mikrobiol. 34, 1 [1959], in geringer Menge Actinomycin  $X_3$  und Actinomycin  $X_4$  abgetrennt und durch qualitative Aminosäureanalyse charakterisiert.

<sup>11)</sup> H. BROCKMANN und H. LINGE, Naturwissenschaften 40, 224 [1953].

<sup>12)</sup> Teilweise mitbearbeitet von G. DÖRING, Diplomarb. Univ. Göttingen 1957.

<sup>13)</sup> Diese Identität wurde bereits in der ersten Mitteilung über Actinomycingemische I (vgl. Zitat 3) auf Grund übereinstimmender  $R_F$ -Werte angenommen.

Actinomycin  $X_{08}$  haben wir zuerst rein und kristallisiert durch katalytische Hydrierung aus Actinomycin  $X_2$  (VIIa oder VIIb) gewonnen<sup>1)</sup>. Dabei zeigte sich, daß es in den bis dahin zur Chromatographie von Actinomycingemischen X verwendeten Lösungsmittelsystemen nicht von Actinomycin  $C_1$  zu trennen ist; wohl aber 1) im System Butanol-Dibutyläther-Dipropyläther (2:1:7)/7-proz. wäbr., mit *m*-Kresotinsäure gesättigtes Natrium-*m*-kresotinat (in dem es einen kleineren  $R_F$ -Wert hat als Actinomycin  $C_1$ ) oder 2) durch Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxyd (an dem es fester adsorbiert wird als Actinomycin  $C_1$ ). Als wir auf Grund dieser Befunde den Inhaltsstoff der  $X_1$ -Zone chromatographierten, zeigte sich, daß er tatsächlich in sehr kleiner Menge eine antibiotisch wirksame Verbindung mit dem  $R_F$ -Wert und den Farbreaktionen des Actinomycins  $X_{08}$  enthielt.

Für die präparative Isolierung der drei Nebenactinomycine  $X_{07}$ ,  $X_{1a}$  und  $X_{08}$  gab es zwei Möglichkeiten: 1) Chromatographie des Actinomycingemisches X in einem Lösungsmittelsystem, in dem sich alle Komponenten in einem Arbeitsgang in einheitliche Zonen auftrennen oder 2) Chromatographie des Gemisches in mehreren, aufeinanderfolgenden Arbeitsgängen.

Für den ersten Weg würde sich das System Butanol-Dibutyläther-Dipropyläther (2:1:7)/7-proz. wäbr., mit *m*-Kresotinsäure gesättigtes Natrium-*m*-kresotinat eignen. Denn, wenn man in ihm Actinomycingemische X papierchromatographisch trennt, bilden sich bei genügend langer Laufzeit der mobilen Phase die in Spalte c (Tab. 1) angegebenen Zonen der in der nächsten Spalte angeführten Actinomycine, und das gleiche war an der Cellulosesäule zu erwarten. Nachteilig ist jedoch die geringe Kapazität des Systems, die sich in unserem Fall besonders ungünstig auswirken mußte, weil wegen des geringen Gehaltes an Nebenactinomycinen größere Mengen Actinomycingemisch X zu verarbeiten waren.

Deshalb haben wir den zweiten Weg gewählt und zunächst in einem System größerer Kapazität, aber geringerer Trennleistungen eine Vorfraktionierung durchgeführt. Bewährt hat sich dafür Butylacetat/10-proz. wäbr., mit *m*-Kresotinsäure gesättigtes Natrium-*m*-kresotinat. An  $4.5 \times 70$  cm-Cellulosesäulen entwickelten sich — bei Einsatz von 5 g Actinomycingemisch je Säule — Chromatogramme mit drei gelbten Zonen ( $X_0$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ ) und den hellgelben Abschnitten I, II, III und IV (Abbild. 1). Wie aus solchen Chromatogrammen die Actinomycine  $X_{07}$ ,  $X_{08}$  und  $X_{1a}$  isoliert wurden, ergibt sich aus der Abbildung und dem Versuchsteil.

Aus den  $X_1$ -Zonen von 91 g rohem Actinomycingemisch X erhielten wir 16 mg kristallisiertes Actinomycin  $X_{08}$ , das durch Aminosäuregehalt, antibiotische Wirksamkeit und  $R_F$ -Werte in verschiedenen Lösungsmittelsystemen identifiziert wurde. Der Reinheitsgrad des Präparates ergab sich aus dem  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ -Wert:  $23400 \pm 400$  (Methanol);  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$  von Actinomycin  $C_3$ :  $25000 \pm 400$  (Methanol).

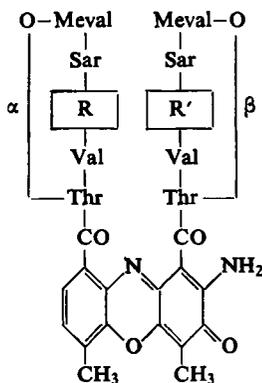
Aus dem Inhaltsstoff des Abschnittes III isolierten wir das in roten Prismen vom Schmp.  $246-247^\circ$  (Zers.) kristallisierende Actinomycin  $X_{1a}$ . Seine spezif. Drehung  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-418 \pm 15^\circ$  ( $c = 0.10$ , in Aceton) ist höher als die der anderen Actinomycine und stark konzentrations- und temperaturabhängig, sein  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ -Wert:  $24900 \pm 400$  stimmte innerhalb der Fehlergrenze mit dem des Actinomycins  $C_3$  überein, ein Beweis für die Reinheit des Präparates.

Bei der quantitativen Aminosäureanalyse eines Salzsäure-Hydrolysates von Dihydroactinomycin  $X_{1a}$ <sup>14)</sup> fanden wir 1.4 Mol Threonin, 1.9 Mol Valin, 3.1 Mol Sarkosin und 1.9 Mol *N*-Methyl-valin.

Der bei dieser Analyse nicht erfaßte zehnte<sup>15)</sup> Aminosäurebaustein ist  $\gamma$ -Oxoprolin, das wir papierchromatographisch und pherographisch im Jodwasserstoffsäure-Hydrolysat des Actinomycins  $X_{1a}$  nachwiesen und quantitativ als Hydroxyprolin bestimmten. Ob es die *L*- oder *D*-Konfiguration hat, bleibt noch offen. Für wahrscheinlicher halten wir das Vorliegen der *L*-Form. Im IR-Spektrum gibt sich das  $\gamma$ -Oxo-prolin wie beim Actinomycin  $X_2$ <sup>1)</sup> durch eine bei 5.65  $\mu$  liegende Schulter der starken Lactoncarbonylbande zu erkennen.

Läßt man die aus Analogiegründen vertretbare Annahme gelten, daß Actinomycin  $X_{1a}$  den gleichen Chromophor und eine analoge Aminosäuresequenz hat wie die anderen Actinomycine, so wäre nur noch zu entscheiden, ob ihm Formel VIa oder VIb zukommt, oder ob es ein Gemisch der beiden Stellungsisomeren VIa und VIb ist.

Mit Actinomycin  $X_{1a}$  ist das zweite Actinomycin aufgefunden, das im Peptidteil  $\gamma$ -Oxo-prolin enthält. Das erste war Actinomycin  $X_2$  (VIIa bzw. VIIb)<sup>1)</sup>. Reduziert man Actinomycin  $X_2$  mit Aluminiumisopropylat, so wird aus seinem  $\gamma$ -Oxo-prolin-Rest ein Hydroxy-prolin-Rest, und es entsteht das Actinomycin  $X_{0\beta}$  (IIa bzw. IIb). Analog reagiert, wie zu erwarten, Actinomycin  $X_{1a}$ . Denn als wir es mit Aluminiumisopropylat reduzierten, entstand in guter Ausbeute eine gelbrote, kristallisierte Verbindung vom Schmp. 251–252° (Zers.), die den gleichen Gehalt an Threonin, Valin, Sarkosin und *N*-Methyl-valin aufwies wie Actinomycin  $X_{1a}$  und außerdem 1 Mol Hydroxyprolin enthält<sup>16)</sup>.



- Ia: R = Sar; R' = Hypro (X<sub>0α</sub>)  
 Ib: R = Hypro; R' = Sar (X<sub>0α</sub>)  
 IIa: R = Pro; R' = Hypro (X<sub>0β</sub>)  
 IIb: R = Hypro; R' = Pro (X<sub>0β</sub>)  
 IIIa: R = Sar; R' = Pro (X<sub>0γ</sub>)  
 IIIb: R = Pro; R' = Sar (X<sub>0γ</sub>)  
 IVa: R = Pro; R' = *a*-Hypro (X<sub>0δ</sub>)  
 IVb: R = *a*-Hypro; R' = Pro (X<sub>0δ</sub>)  
 V: R = R' = Pro (C<sub>1</sub>)  
 VIa: R = Sar; R' = Oxopro (X<sub>1a</sub>)  
 VIb: R = Oxopro; R' = Sar (X<sub>1a</sub>)  
 VIIa: R = Pro; R' = Oxopro (X<sub>2</sub>)  
 VIIb: R = Oxopro; R' = Pro (X<sub>2</sub>)

Thr = *L*-Threonin; Val = *D*-Valin; Pro = *L*-Prolin; Hypro = *L*-Hydroxy-prolin; *a*-Hypro = *L*-*allo*-Hydroxy-prolin; Oxopro = *L*- $\gamma$ -Oxo-prolin; Sar = Sarkosin; Meval = *L*-*N*-Methyl-valin

<sup>14)</sup> Um bei quantitativen Aminosäurebestimmungen von Actinomycinen eine Oxydation des Threonins durch den Chromophor zu verhindern, verwenden wir zur Totalhydrolyse das durch katalytische Hydrierung gewonnene Dihydroderivat des betr. Actinomycins (vgl. J. H. MANEGOLD, Dissertat. Univ. Göttingen 1959).

<sup>15)</sup> Alle bisher untersuchten Actinomycine enthalten zehn Aminosäurebausteine.

<sup>16)</sup> Womit bewiesen war, daß Actinomycin  $X_{1a}$  1 Mol  $\gamma$ -Oxo-prolin enthält.

Aminosäuregehalt, Absorptionsspektrum ( $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ :  $25300 \pm 400$ , in Methanol), hohe spezif. Drehung ( $[\alpha]_D^{25}$ :  $-468 \pm 10^\circ$ ,  $c = 0.2$ , in Aceton), Farbreaktionen, chromatographisches Verhalten und antibiotische Wirksamkeit charakterisieren unser Reduktionsprodukt als neues Actinomycin.

Actinomycin  $X_{1a}$  hat im System Dibutyläther/10-proz. wäbr., mit *m*-Kresotinsäure gesättigtes Natrium-*m*-kresotinat einen etwas kleineren  $R_F$ -Wert als Actinomycin  $X_2$  (VIIa oder VIIb). Danach konnte man erwarten, daß das Aluminiumisopropylat-Reduktionsprodukt des Actinomycins  $X_{1a}$  einen kleineren  $R_F$ -Wert haben würde als Actinomycin  $X_{0\beta}$  (IIa oder IIb), das durch Aluminiumisopropylat-Reduktion aus Actinomycin  $X_2$  entsteht. Tatsächlich fanden wir diese Annahme bestätigt; im Papierchromatogramm wanderte die Zone des Actinomycin  $X_{1a}$ -Reduktionsproduktes etwas langsamer als die des Actinomycins  $X_{0\beta}$ . Wir bezeichnen das Reduktionsprodukt des Actinomycins  $X_{1a}$  daher als Actinomycin  $X_{0\alpha}$ .

Das aus Abschnitt II (Abbild. 1) isolierte Actinomycin  $X_{0\gamma}$ <sup>17)</sup> kristallisierte in roten Bipyramiden vom Schmp.  $237-238^\circ$  (Zers.), hatte die spezif. Drehung  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-388 \pm 10^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Methanol) und stimmte in seinem  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ -Wert mit dem des Actinomycins  $C_3$  überein. Der Aminosäureanalyse nach (Gef. 1.3 Mol Threonin, 1.9 Mol Valin, 1.0 Mol Prolin, 3.0 Mol Sarkosin und 1.8 Mol *N*-Methyl-valin) enthält es je zwei Threonin-, Valin- und *N*-Methyl-valin-Reste, einen Prolin-Rest und drei Sarkosin-Reste. Nimmt man wie beim Actinomycin  $X_{1a}$  an, daß Actinomycin  $X_{0\gamma}$  den gleichen Chromophor und eine analoge Aminosäuresequenz hat wie die anderen Actinomycine, so käme ihm entweder Formel IIIa oder IIIb zu, sofern nicht ein Gemisch dieser beiden Isomeren vorliegt. Ob das eine oder andere zutrifft, muß noch geklärt werden.

Ein durch die Ziffer III gekennzeichnetes Actinomycin mit der gleichen Aminosäure-Zusammensetzung wie Actinomycin  $X_{0\gamma}$ , für das gleichfalls die beiden Formeln IIIa und IIIb in Betracht gezogen wurden, hat man aus Sarkosin enthaltenden Kulturlösungen<sup>18)</sup> von *Streptomyces antibioticus* isoliert<sup>19)</sup>. Oxydationsversuchen nach könnte dieses Actinomycin ein Gemisch der beiden Isomeren IIIa und IIIb sein<sup>19)</sup>. Es unterscheidet sich von unserem Actinomycin  $X_{0\gamma}$  durch seine geringere spezif. Drehung;  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-205^\circ$  ( $c = 0.22$ , in Chloroform); Actinomycin  $X_{0\gamma}$ ,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-232^\circ \pm 10^\circ$  ( $c = 0.22$ , in Chloroform), stimmt im  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ -Wert aber mit ihm überein.

Aus den bisherigen Befunden ergibt sich, daß die Actinomycingemische X produzierenden *Streptomyces*-Stämme die Struktur ihrer Actinomycine nur innerhalb enger Grenzen abwandeln können. Diese Abwandlungen kann man als Variationen einer „Grundstruktur“ V auffassen, die durch das Actinomycin  $C_1$  repräsentiert wird. Bei den Actinomycinen  $X_{0\beta}$ ,  $X_{0\delta}$  und  $X_2$  bestehen sie lediglich darin, daß in ein und derselben Peptidlactongruppe der Grundstruktur V, formal gesehen, L-Prolin durch L-Hydroxy-prolin bzw. L-*allo*-Hydroxy-prolin bzw. L- $\gamma$ -Oxo-prolin ersetzt wird<sup>20)</sup>.

17) Actinomycin  $X_{0\gamma}$  wurde zuerst beschrieben in der Diplomarbeit J. H. MANEGOLD, Univ. Göttingen 1956.

18) E. KATZ und W. A. GOSS, *Biochem. J.* **73**, 458 [1959].

19) A. W. JOHNSON und A. B. MAUGER, *Biochem. J.* **73**, 535 [1959].

20) Ob diese drei Aminosäuren als solche in die Peptidkette eingebaut werden oder durch Oxydation eines bereits in die Kette eingebauten L-Prolin-Restes entstehen, bleibt noch offen.

Dabei ist die Abwandlung Prolin  $\rightarrow$  Oxo-prolin stark bevorzugt gegenüber der Abwandlung Prolin  $\rightarrow$  Hydroxy-prolin und diese wiederum gegenüber Prolin  $\rightarrow$  *allo*-Hydroxy-prolin. Denn Actinomycin X<sub>2</sub> ist die Hauptkomponente von Actinomycingemischen X, während der Gehalt an Actinomycin X<sub>0 $\beta$</sub>  unter dem der „Stammverbindung“ Actinomycin C<sub>1</sub> liegt und Actinomycin X<sub>0 $\alpha$</sub>  nur in sehr geringer Menge vorhanden ist (vgl. Ausb. in Tab. 1).

Den für Actinomycin X<sub>0 $\gamma$</sub>  und Actinomycin X<sub>1 $\alpha$</sub>  angenommenen Aminosäuresequenzen nach (Tab. 1) bestehen zwei weitere Variationen der Grundstruktur V darin, daß 1) ein Prolin-Rest durch Sarkosin ersetzt wird (Actinomycin X <sub>$\gamma$ 0</sub>, IIIa oder IIIb) und 2) neben diesem Ersatz in der anderen Peptidlactongruppe Prolin zu  $\gamma$ -Oxo-prolin abgewandelt ist (Actinomycin X<sub>1 $\alpha$</sub> , VIa oder VIb); beides nur in geringem Umfang, aber so, daß auch hier  $\gamma$ -Oxo-prolin gegenüber Prolin bevorzugt ist. Denn unsere Actinomycingemische enthielten mehr Actinomycin X<sub>1 $\alpha$</sub>  als Actinomycin X<sub>0 $\gamma$</sub> . Nimmt man an, daß bei der Struktur IIIa bzw. IIIb die Abwandlung eines Prolin-Restes zu dem des Hydroxy-prolins bzw. *allo*-Hydroxy-prolins in ähnlich geringem Umfang stattfindet wie bei der Struktur V, so dürften Actinomycin X<sub>0 $\alpha$</sub>  und sein noch nicht bekanntes Stereoisomeres mit einem *allo*-Hydroxy-prolin-Rest in unseren Actinomycingemischen vom Typ X, wenn überhaupt, nur in sehr kleiner Menge zu finden sein.

Um die im Verdünnungstest gegen *B. subtilis* ermittelten, antibiotisch wirksamen Grenzkonzentrationen unserer X-Actinomyceine einwandfrei miteinander vergleichen zu können, haben wir sie auf die gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen bestimmte Grenzkonzentration des Actinomycins C<sub>3</sub> bezogen und in Tab. 2 in % der Actinomycin C<sub>3</sub>-Wirksamkeit (100  $\times$  Grenzkonzentration des Actinomycins C<sub>3</sub> : Grenzkonzentration des betreffenden X-Actinomycins) angegeben<sup>21)</sup>. Da sich die Verdünnungsstufen des Testes um den Faktor 0.87 unterschieden<sup>22)</sup>, ließ sich die Grenzkonzentration auf  $\pm 10\%$  genau bestimmen. Als Lösungsmittel für die in Wasser schwer löslichen Actinomyceine diente D-Sorbit.

Tab. 2. Abhängigkeit der antibiotisch wirksamen Grenzkonzentration (*B. subtilis*) von der Struktur des Peptidteils

a) Bezeichnung der Actinomyceine; b) Aminosäuren R und R' in den Formeln I—VII; c) Wirksamkeit = 100  $\times$  Grenzkonzentration des Actinomycins C<sub>3</sub> : Grenzkonzentration des in Spalte a angeführten Actinomycins

a	b	c	a	b	c
X <sub>2</sub>	Pro, Oxopro	150 $\pm$ 10	X <sub>1<math>\alpha</math></sub>	Sar, Oxopro	70 $\pm$ 10
C <sub>1</sub>	Pro, Pro	70 $\pm$ 10	X <sub>0<math>\gamma</math></sub>	Sar, Pro	30 $\pm$ 5
X <sub>0<math>\alpha</math></sub>	Pro, <i>a</i> -Hypro	40 $\pm$ 5			
X <sub>0<math>\beta</math></sub>	Pro, Hypro	2.5 $\pm$ 0.5	X <sub>0<math>\alpha</math></sub>	Sar, Hypro	1.5 $\pm$ 0.3

Tab. 2 zeigt die Abhängigkeit der antibiotischen Wirksamkeit von der in Formeln I—VII angegebenen Variation des Peptidteils. Ersatz eines Prolin-Restes der Grundstruktur V (Actinomycin C<sub>1</sub>) durch  $\gamma$ -Oxo-prolin (Actinomycin X<sub>2</sub>) erhöht die Wirk-

<sup>21)</sup> Damit werden Fehler ausgeschaltet, die dadurch bedingt sind, daß der zum Test verwendete *B. subtilis*-Stamm zu verschiedenen Zeiten verschieden empfindlich gegenüber Actinomyceinen ist.

<sup>22)</sup> Bei orientierenden Versuchen wird meistens mit dem Verdünnungsfaktor 0.5 gearbeitet.

samkeit auf das Doppelte, Ersatz eines Prolin-Restes durch Sarkosin bzw. *allo*-Hydroxyprolin (Actinomycin  $X_{0\gamma}$  bzw. Actinomycin  $X_{0\delta}$ ) erniedrigt sie auf die Hälfte. Ebenso wie beim Actinomycin  $C_1$  erhöht auch beim Actinomycin  $X_{0\gamma}$  der Austausch von Prolin gegen  $\gamma$ -Oxo-prolin (Actinomycin  $X_{1a}$ ) die Wirksamkeit auf etwa das Doppelte. Erheblich sind die Unterschiede demnach nicht, sie liegen in den gleichen Grenzen wie die der Actinomycine  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $F_0$ ,  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$  und  $F_5$ <sup>23)</sup>. Umso bemerkenswerter ist die viel geringere Wirksamkeit der Actinomycine  $X_{0\beta}$  und  $X_{0\alpha}$ . Sie zeigt, daß von allen bisher bekannten Strukturvariationen des Peptidteils die Abwandlung Prolin  $\rightarrow$  Hydroxyprolin die antibiotische Wirksamkeit am stärksten verringert, und sie läßt ferner erkennen, daß ein Unterschied in der Konfiguration eines C-Atoms (Actinomycin  $X_{0\delta}$ —Actinomycin  $X_{0\beta}$ ) einen größeren Einfluß auf die antibiotisch wirksame Grenzkonzentration hat als irgend eine andere strukturelle Abwandlung des Peptidteils.

Den FARBENFABRIKEN BAYER, Werk Elberfeld, und der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die Unterstützung unserer Arbeit.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Actinomycin C<sub>1</sub> aus Actinomycingemisch C*: 15 g Actinomycingemisch C aus einer Submerskultur des Stammes Bop 476 wurde im System Butanol-Dibutyläther (2:3)/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (mit *m*-Kresotinsäure gesättigt) an einer Cellulosepulver-Säule (5×120 cm) in drei Zonen aufgetrennt. Das Methanoleluat der obersten Zone verdampfte man i. Vak., nahm den Rückstand in Benzol auf, schüttelte die Benzollösung mit wäbr. Natriumhydrogencarbonat, um *m*-Kresotinsäure und ihr Natriumsalz zu entfernen, und verdampfte zur Trockene. 200 mg des Rückstandes adsorbierte man aus Benzol an einer Säule (1.5×12 cm) aus Aluminiumoxyd II und wusch die Hauptzone mit Äthylacetat ins Filtrat. Das nach Verdampfen des Äthylacetates hinterbleibende *Actinomycin C<sub>1</sub>* kristallisierte aus Chloroform/Ligroin in gelbroten Nadeln.

*Actinomycin C<sub>1</sub> aus Actinomycingemisch I*: Eine Lösung von 1 g Actinomycingemisch I (aus einer Submerskultur des Stammes Bop 509, Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld) in 100 ccm Benzol gab man auf eine Säule (2×21 cm) aus Aluminiumoxyd II und wusch die rote Hauptzone mit Äthylacetat ins Filtrat. Das beim Verdampfen des Äthylacetates hinterbleibende *Actinomycin C<sub>1</sub>* (830 mg) kristallisierte in gelbroten Nadeln.

*Actinomycin C<sub>1</sub> aus Actinomycingemisch X*: Ein aus Oberflächenkulturen der Stämme Wind 731 und Arg 2028 (je 250 l) gewonnenes rohes Actinomycingemisch X<sup>24)</sup> wurde an acht Cellulosepulver-Säulen (4.5×70 cm, Butylacetat/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat, mit *m*-Kresotinsäure gesättigt) chromatographiert. Die über der Hauptzone liegende, Actinomycin  $C_1$  und Actinomycin  $X_{0\delta}$  enthaltende Zone<sup>25)</sup> wurde herausgeschnitten und mit Aceton eluiert. Der Verdampfungsrückstand des Eluates wurde, wie oben beschrieben, von *m*-Kresotinsäure und ihrem Natriumsalz befreit und aus 200 ccm Benzol an einer Säule (2.5×74 cm) aus Aluminiumoxyd II adsorbiert. Beim Nachwaschen mit Äthylacetat wanderte das *Actinomycin C<sub>1</sub>* ins Filtrat und wurde nach Verdampfen des Lösungsmittels aus Chloroform/Ligroin umkristallisiert.

<sup>23)</sup> G. SCHMIDT-KASTNER, Medizin u. Chemie (Abhandlungen aus den medizinisch-chemischen Forschungsstätten der Farbenfabriken Bayer AG) V, 463 [1956].

<sup>24)</sup> Verdampfungsrückstand des Butylacetatextraktes aus Kulturlösung; vgl. H. BROCKMANN und J. H. MANEGOLD, Chem. Ber. 93, 2978 [1960].

<sup>25)</sup> Fraktion  $X_1$  der Abbild. 1.

Die Säule blieb hellgelb, ohne eine weitere Zone erkennen zu lassen, und wurde erst beim Nachwaschen mit Methanol entfärbt. Das Eluat enthielt laut Papierchromatogramm neben Actinomycin C<sub>1</sub> das Actinomycin X<sub>08</sub> und diente (unter der Bezeichnung ME) als Ausgangsmaterial für die unten beschriebene Isolierung von Actinomycin X<sub>08</sub>.

Vergleich verschiedener Actinomycin C<sub>1</sub>-Präparate \*)

Herkunft	Actinomycin-gemisch C	Actinomycin-gemisch I	Actinomycin-gemisch X
Schmp. (Zers., Berl-Block)	244–245°	245–246°	245–246°
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> in Methanol c = 0.2	–331 ± 5°	–329 ± 5°	–333 ± 5°
in Aceton c = 0.2	–288 ● 5°	–293 ± 5°	–298 ± 5°
ε <sub>443 mμ</sub> : in Methanol	25 100 ± 400	24 800 ± 400	25 100 ± 400
Hemmung von <i>B. subtilis</i> Act. C <sub>3</sub> = 100%	61 % 75 %	66 % 75 %	66 %
C <sub>62</sub> H <sub>86</sub> N <sub>12</sub> O <sub>16</sub> (1255.4)			
Ber. C 59.31	Gef. 59.37	59.06	59.16
H 6.91	7.20	7.14	6.90
N 13.39	13.40	13.25	13.25
Ber. Mol	Gef. **) Mol	Mol	Mol
Thr 2.0	1.3	1.3	1.3
Val 2.0	1.8	1.9	2.0
Pro 2.0	2.0	2.0	2.1
Sar 2.0	2.1	2.1	2.1
Meval 2.0	1.8	1.9	1.9

\*) Die kristallisierten Actinomycine wurden i. Hochvak. 14 Stdn. bei 115° getrocknet.

\*\*) Nach katalyt. Hydrierung 48 Stdn. mit 6*n* HCl bei 110° hydrolysiert.

*Actinomycin X<sub>08</sub>*: Der Verdampfungsrückstand von Eluat ME (vgl. Actinomycin C<sub>1</sub> aus Actinomycingemisch X) wurde aus Benzol an einer Säule (1.5 × 75 cm) aus Aluminiumoxyd II adsorbiert. Beim Nachwaschen mit Äthylacetat bildeten sich zwei gelbe Zonen, von denen die schneller wandernde Actinomycin C<sub>1</sub> enthielt und ins Filtrat gewaschen wurde. Das Methanol-eluat der an der Säule verbleibenden, herausgeschnittenen Zone verdampfte man und trennte den Rückstand ringchromatographisch auf 7 Bogen (Butanol-Dibutyläther-Dipropyläther (2:1:7)/7-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat, mit *m*-Kresotinsäure gesättigt). Die Hauptzone wurde herausgeschnitten, mit 50-proz. Methanol eluiert und *m*-Kresotinsäure sowie ihr Natriumsalz entfernt. Das beim Verdampfen hinterbliebene *Actinomycin X<sub>08</sub>* wurde zweimal aus Chloroform/Ligroin kristallisiert und 14 Stdn. i. Hochvak. bei 115° getrocknet. Ausb. 16 mg. Schmp. 245–246° (Zers., Berl-Block). ε<sub>443 mμ</sub>: 23 400 ± 400 (Methanol).

Wachstumshemmung von *B. subtilis* bis zur Verdünnung 1:2 × 10<sup>6</sup>. Der gleiche Stamm wurde durch Actinomycin C<sub>3</sub> bis zur Verdünnung 1:5 × 10<sup>6</sup> gehemmt.

C<sub>62</sub>H<sub>86</sub>N<sub>12</sub>O<sub>17</sub> (1271.5)

Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 1.0 *allo*-Hypro 1.0 Sar 2.0 Meval 2.0

Gef. \*) Mol Thr 1.2 Val 1.8 Pro 1.0 *allo*-Hypro 0.9 Sar 1.8 Meval 1.8

\*) Nach katalyt. Hydrierung 48 Stdn. mit 6*n* HCl bei 110° hydrolysiert.

*Actinomycin X<sub>1a</sub>*: 91 g rohes Actinomycingemisch X<sup>24</sup>) wurde in Anteilen von 5 g im System Butylacetat/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat (mit *m*-Kresotinsäure gesättigt) an Cellulosepulver-Säulen (4.5×70 cm) chromatographiert. Die Zonen X<sub>0</sub>, X<sub>1</sub> und X<sub>2</sub> (vgl. Abbild. 1) wurden herausgeschnitten und ihre Inhaltsstoffe wie oben beschrieben (Actinomycin C<sub>1</sub> aus Actinomycingemisch C) isoliert. Ausb. 0.9 g Actinomycin X<sub>0β</sub>, 4.0 g Actinomycin C<sub>1</sub> und 24.9 g Actinomycin X<sub>2</sub>.

Den zwischen den Zonen X<sub>0</sub> und X<sub>1</sub> liegenden Teil der Säule (im folgenden „Abschnitt II“ genannt) sowie den zwischen den Zonen X<sub>1</sub> und X<sub>2</sub> liegenden „Abschnitt III“ eluierte man mit Aceton und befreite die Verdampfungsrückstände, wie oben beschrieben, von *m*-Kresotinsäure und ihrem Natriumsalz.

Der Inhaltsstoff aus „Abschnitt III“ (1.2 g) wurde an einer Cellulosepulver-Säule (4×67 cm; Butylacetat-Dibutyläther (3:1)/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat, mit *m*-Kresotinsäure gesättigt) chromatographiert. Dabei trennte sich das nur in geringer Menge vorhandene Actinomycin X<sub>2</sub> als am schnellsten laufende Zone gut ab, während die darüberliegenden Zonen von Actinomycin X<sub>1a</sub> und C<sub>1</sub> nicht deutlich voneinander zu trennen waren. Man schnitt daher die Actinomycin X<sub>1a</sub>-Zone zusammen mit dem unteren Teil der Actinomycin C<sub>1</sub>-Zone heraus, eluierte mit Aceton, entfernte *m*-Kresotinsäure sowie ihr Natriumsalz und adsorbierte aus Benzol an einer Säule (1.5×73 cm) aus Aluminiumoxyd II. Beim Nachwaschen mit Äthylacetat bildeten sich zwei Zonen, von denen die eine (Actinomycin C<sub>1</sub> enthaltend) schnell ins Filtrat wanderte. Die andere, im oberen Drittel der Säule verbliebene Zone wurde herausgeschnitten, mit Aceton eluiert und ihr Inhaltsstoff nochmals aus Benzol an Aluminiumoxyd II adsorbiert. Als mit Äthylacetat nachgewaschen wurde, gingen letzte Anteile von Actinomycin C<sub>1</sub> ins Filtrat, während *Actinomycin X<sub>1a</sub>* als breite Zone im oberen Teil der Säule hängen blieb. Es wurde mit Aceton eluiert und kristallisierte aus Benzol in roten Prismen. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus Benzol wurde 14 Stdn. i. Hochvak. bei 115° getrocknet. Ausb. 310 mg. Schmp. 246–247° (Zers., Berl-Block).  $\epsilon_{443\text{ m}\mu}$ : 24900 ± 400 (Methanol). Gegen *B. subtilis* bis zur Verdünnung 1:4.2×10<sup>6</sup> wachstumshemmend. Gegen den gleichen Stamm war Actinomycin C<sub>3</sub> bis zur Verdünnung 1:5.6×10<sup>6</sup> wirksam.

#### Abhängigkeit der spezif. Drehung (NaD-Licht) von Temperatur und Konzentration

c	22.0°		18.0°		14.0°	
	Methanol	Aceton	Methanol	Aceton	Methanol	Aceton
0.10		−418 ± 15°		−452 ± 15°		−486 ± 15°
0.05	−403 ± 15°	−340 ± 15°	−450 ± 15°		−483 ± 15°	
0.025	−309 ± 25°	−200 ± 25°				

C<sub>60</sub>H<sub>82</sub>N<sub>12</sub>O<sub>17</sub> (1243.4) Ber. C 57.96 H 6.65 N 13.52 Gef. C 57.85 H 7.10 N 13.45  
 Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Oxopro 1.0 Sar 3.0 Meval 2.0  
 Gef. \*) Mol Thr 1.4 Val 1.9 Oxopro 1.0 \*\*) Sar 3.1 Meval 1.9

\*) Nach katalyt. Hydrierung 48 Stdn. mit 6*n* HCl bei 110° hydrolysiert.

\*\*) Ermittelt aus dem Hydroxy-prolin-Gehalt des Actinomycins X<sub>0α</sub>.

*Nachweis von γ-Oxo-prolin im Actinomycin X<sub>1a</sub>*. a) im Ringchromatogramm: 40 mg Actinomycin X<sub>1a</sub> und 500 mg Quecksilber wurden in 3 ccm 57-proz. Jodwasserstoffsäure 4 Stdn. auf dem Dampfbad unter Stickstoff erhitzt. Die Jodwasserstoffsäure verdampfte man i. Vak., nahm den Rückstand in 1.8 ccm Wasser auf, filtrierte, wusch mit 0.2 ccm Wasser nach und schüttelte das Filtrat 14 Stdn. mit 1 g frisch gefälltem Silberchlorid. Der abfiltrierte Niederschlag wurde mit 1 ccm Wasser gewaschen. 30 cmm des mit dem Waschwasser vereinigten Filtrats wurden zusammen mit 30 cmm Vergleichslösung (enthaltend 2.7 mg γ-Oxo-

prolin-hydrochlorid<sup>26)</sup> in 2 ccm Wasser) auf den Startkreis eines Ringchromatogramms aufgetragen. Nach 8stdg. Laufzeit im System Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:7) besprühte man das an der Luft getrocknete Papier mit einem frisch bereitetem Gemisch aus 2-proz. wäbr. Triphenyl-tetrazoliumchlorid und *n* NaOH (1:1) und erwärmte 5 Min. in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre auf 40°. Die dabei entstehende intensiv rote Zone des Hydrolysates hatte den gleichen  $R_F$ -Wert wie die rote Zone des  $\gamma$ -Oxo-prolins der Vergleichslösung.

b) im Hochspannungs-Pherogramm: 20 cmm des Actinomycin  $X_{1a}$ -Hydrolysates und 20 cmm Vergleichslösung wurden auf zwei nebeneinander liegende, 3 cm lange Abschnitte der Startlinie eines Papierbogens (MACHERY & NAGEL, Nr. 214, befeuchtet mit 2*m* Essigsäure-Ameisensäure-Puffer pH 1.9) aufgetragen. Nach 3stdg. Elektrophorese bei 2000 Volt/40 cm und 45–55 mAmp. trocknete man das Papier 5 Min. im Trockenschrank bei 120°, besprühte es zweimal mit 1.5*n* Natriummethylat und trocknete anschließend bei Raumtemperatur im Luftstrom. Das so vorbehandelte Papier entwickelte man mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid in gleicher Weise wie das Ringchromatogramm. Die in 14 cm Abstand von der Startlinie gefundene rote Zone des Hydrolysates hatte die gleiche Lage wie die rote Zone des  $\gamma$ -Oxo-prolins der Vergleichslösung.

*Actinomycin X<sub>0α</sub>*: Eine Mischung von 90 mg krist. Actinomycin  $X_{1a}$ , 1.5 g Aluminiumisopropylat, 10 ccm Benzol und 15 ccm wasserfreiem Isopropylalkohol hielt man 24 Stdn. unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit am Sieden und gab zu der erkalteten, tiefgrünen Lösung nacheinander 100 ccm Chloroform und 12 ccm 2*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Farbumschlag nach Rot). Nach Abtrennung der Chloroform-Schicht schüttelte man die wäbr. Phase mit Chloroform und verdampfte die vereinigten Chloroformauszüge zur Trockene. Der Rückstand gab im Ringchromatogramm (Butylacetat-Dibutyläther (3:1)/7.5-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat, mit *m*-Kresotinsäure gesättigt) eine sehr schwache Zone mit dem  $R_F$ -Wert des Actinomycins  $X_{0\gamma}$  und eine Hauptzone mit kleinerem  $R_F$ -Wert als Actinomycin  $X_{0\beta}$ . Eine Zone vom  $R_F$ -Wert des Actinomycins  $X_{1a}$  war nicht zu erkennen.

Die Benzollösung des Rückstandes wurde durch eine Säule (1.5 × 8 cm) aus Aluminiumoxyd IV filtriert. Beim Nachwaschen mit Aceton wanderte eine breite, rote Zone in die Vorlage, während eine schmale, gelbe Zone am oberen Rand der Säule zurückblieb. Das nach dem Verdampfen des Acetoneluates hinterbliebene *Actinomycin X<sub>0α</sub>* kristallisierte aus Methanol in dünnen, gelbroten Blättchen, die aus dem gleichen Lösungsmittel umkristallisiert und 14 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet wurden. Ausb. 73 mg. Schmp. 251–252° (Zers., Berl-Block).  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-468 \pm 10^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Aceton).  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ :  $25300 \pm 400$  (Methanol). Wachstumshemmend gegen *B. subtilis* bis zur Verdünnung 1:10<sup>5</sup>. Gegen den gleichen Stamm war Actinomycin C<sub>3</sub> bis zur Verdünnung 1:6.4 × 10<sup>6</sup> wirksam.

C<sub>60</sub>H<sub>84</sub>N<sub>12</sub>O<sub>17</sub> (1245.4) Ber. C 57.86 H 6.80 N 13.50 Gef. C 57.90 H 7.14 N 13.43

Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Hypro 1.0 Sar 3.0 Meval 2.0

Gef. \*) Mol Thr 1.3 Val 1.9 Hypro 1.0 Sar 2.7 Meval 2.1

\*) Nach katalyt. Hydrierung 48 Stdn. mit 6*n* HCl bei 110° hydrolysiert.

*Acetat des Actinomycins X<sub>0α</sub>*: 40 mg *Actinomycin X<sub>0α</sub>* löste man in 3 ccm *Acetanhydrid*/Pyridin (2:1) und hielt das Gemisch 20 Stdn. bei Raumtemperatur. *Acetanhydrid* und Pyridin wurden i. Vak. bei 40° Badtemperatur abgedampft, der Rückstand in Benzol aufgenommen und an einer Säule (1 × 7 cm) aus Aluminiumoxyd IV adsorbiert. Beim Nachwaschen mit Äthylacetat wanderte eine breite, rote Zone in die Vorlage. Das beim Verdampfen des Äthylacetat-Eluates hinterbliebene *Acetat des Actinomycins X<sub>0α</sub>* kristallisierte aus Methanol in dünnen, gelbroten Blättchen, die aus dem gleichen Lösungsmittel umkristallisiert und 15 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet wurden. Ausb. 25 mg. Schmp. 244–245° (Zers., Berl-Block).

<sup>26)</sup> R. KUHN und G. OSSWALD, Chem. Ber. 89, 1423 [1956].

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-430 \pm 10^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Aceton).  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ :  $25300 \pm 400$  (Methanol). Wachstumshemmend gegen *B. subtilis* bis zur Verdünnung  $1:8 \times 10^4$ . Gegen den gleichen Stamm war Actinomycin C<sub>3</sub> bis zur Verdünnung  $1:5.9 \times 10^6$  wirksam.

$\text{C}_{62}\text{H}_{86}\text{N}_{12}\text{O}_{18}$  (1287.4) Ber. C 57.84 H 6.73 N 13.06 1  $\text{CH}_3\text{CO}$  3.3  
Gef. C 57.59 H 7.10 N 13.22  $\text{CH}_3\text{CO}$  3.1 \*)

\*) 2 Stdn. mit siedender  $n$  NaOH (50% Methanol enthaltend) unter Stickstoff verseift. 2% Blindwert des nicht acetylierten Actinomycins  $X_{0\alpha}$  abgezogen.

*Actinomycin X<sub>0\gamma</sub>*: Der Inhaltsstoff von „Abschnitt II“ (vgl. Actinomycin  $X_{1\alpha}$ ) wurde an einer Cellulosepulver-Säule ( $3 \times 10$  cm; Butylacetat/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat, mit *m*-Kresotinsäure gesättigt) chromatographiert, wobei zwei Zonen entstanden. Die obere enthielt Actinomycin  $X_{0\beta}$ ; aus der unteren wurden 245 mg *Actinomycin X<sub>0\gamma</sub>* isoliert, das sich aus Chloroform/Ligroin in roten, rhombischen Bipyramiden abschied und aus dem gleichen Lösungsmittel umkristallisiert wurde. Nach 14stdg. Trocknen i. Hochvak. bei  $115^\circ$  Ausb. 205 mg. Schmp.  $237-239^\circ$  (Zers., Berl-Block).  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-388 \pm 10^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Methanol);  $-313 \pm 10^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Aceton).  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ :  $25000 \pm 400$  (Methanol). Wachstumshemmung von *B. subtilis* bis zur Verdünnung  $1:2.1 \times 10^6$ ; gegen den gleichen Stamm war Actinomycin C<sub>3</sub> bis zur Verdünnung  $1:6.4 \times 10^6$  wirksam.

$\text{C}_{60}\text{H}_{84}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$  (1229.4) Ber. C 58.62 H 6.89 N 13.67 Gef. C 58.66 H 7.10 N 13.42  
Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 1.0 Sar 3.0 Meval 2.0  
Gef. \*) Mol Thr 1.3 Val 1.9 Pro 1.0 Sar 3.0 Meval 1.8

\*) Nach katalyt. Hydrierung 48 Stdn. mit  $6n$  HCl bei  $110^\circ$  hydrolysiert.

#### Bestimmung der antibiotisch wirksamen Grenzkonzentration<sup>27)</sup>

a) *Testlösung*: Eine zwischen 2.0 und 3.0 mg liegende, auf  $\pm 0.1$  mg eingewogene Menge Actinomycin nimmt man in 0.1 ccm Aceton auf und verrührt die Lösung mit 2 g *D*-Sorbit (reinst, MERCK), bis der Farbumschlag von Gelb nach Orange das vollständige Verdampfen des Acetons anzeigt. Den gleichmäßig mit Actinomycin überzogenen, nochmals gründlich verriebenen Sorbit löst man in 250 ccm Wasser und filtriert unter sterilen Bedingungen durch ein Membranfilter Nr. 3.

b) *Kolmer-Bouillon*: Man kocht 10 g Liebig-Fleischextrakt 30 Min. mit 1 l Wasser, gibt 10 g Pepton S „Brunnengräber“ hinzu, kocht weitere 30 Min. und filtriert heiß durch ein Faltenfilter. Das auf 1 l aufgefüllte Filtrat wird mit etwa 10 ccm  $2n$  NaOH auf pH 7.2 (Mercks Indikatorpapier) eingestellt, aufgekocht, wiederum heiß filtriert und nach Erkalten mit 2.5 g Glucose und 5 g NaCl versetzt.

c) *Verdünnungsreihe mit Faktor 0.5*: 15 Reagenzgläser (Kapsenberg-Kappe) mit je 2 ccm Kolmer-Bouillon werden im Autoklaven kurz auf  $120^\circ$  erhitzt. Nach Erkalten gibt man 2 ccm Testlösung in das erste Reagenzglas, vermischt gut, saugt die Mischung in die Pipette, läßt wieder auslaufen und überträgt mit der so durchgespülten Pipette 2 ccm der Mischung aus dem ersten in das zweite Röhrchen. In gleicher Weise verdünnt man 2 ccm aus Röhrchen 2 mit dem Inhalt des Röhrchens 3, 2 ccm aus Röhrchen 3 mit dem Inhalt von Röhrchen 4 u. s. f. Nachdem schließlich 2 ccm aus Röhrchen 14 mit dem Inhalt von Röhrchen 15 vermischt worden sind, werden dieser Mischung 2 ccm entnommen und verworfen. Die Röhrchen 1—15 erhalten dann je 2 Tropfen einer *B. subtilis*-Vorkultur und werden 18 Stdn. bei  $37^\circ$  gehalten. Als antibiotisch wirksame Grenzkonzentration gilt die Actinomycinkonzentration der letzten nicht bewachsenen Lösung.

d) *Verdünnungsreihe mit Faktor  $0.87 \pm 0.02$* : Eine zwischen 1.0 und 2.5 mg liegende, auf  $\pm 0.01$  mg eingewogene Menge Actinomycin wird, wie oben beschrieben, auf 1.0—2.0 g

<sup>27)</sup> Bearbeitet von E. VON TROTHA.

