

Hans Brockmann, Werner Lenk, Gerd Schwantje und Axel Zeeck

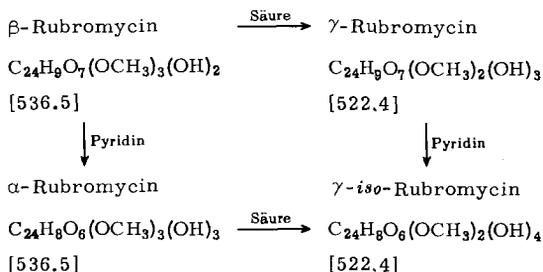
Rubromycine, II¹⁾

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 15. Juli 1968)

Die Isolierung der roten Antibiotica β -Rubromycin und γ -Rubromycin wird beschrieben. β -Rubromycin isomerisiert sich in siedendem Pyridin quantitativ zu α -Rubromycin und wird durch verd. Mineralsäuren unter Verseifung eines Methoxyls in γ -Rubromycin verwandelt. γ -*iso*-Rubromycin entsteht: 1. Aus γ -Rubromycin durch Erhitzen mit Pyridin oder konz. Schwefelsäure, 2. aus α -Rubromycin durch Chlorwasserstoff in Chloroform. — β -Rubromycin (11) enthält als Chromophor 8-Hydroxy-5.7-dimethoxy-naphthochinon-(1,2), das über Sauerstoff an C-4 und eine Methylengruppe an C-3 mit dem Rest des Moleküls verbunden ist. — Chromophor der drei anderen Rubromycine (12, 13, 14a) ist 5.8-Dihydroxy-2(bzw. 7)-methoxy-naphthochinon-(1,4) — in α -Rubromycin am 5-Hydroxyl methyliert —, an dem über Sauerstoff an C-7 (bzw. C-2) und Kohlenstoff an C-6 (bzw. C-3) der Rest des Moleküls hängt.

Wie kurz mitgeteilt¹⁾ hat die weitere Untersuchung der aus *Streptomyces collinus*²⁾ isolierten, roten Antibiotica Rubromycin³⁾ und Collinomycin⁴⁾ folgendes ergeben: 1. Rubromycin ist ein Gemisch aus der Hauptkomponente β -Rubromycin und wechselnden Anteilen von γ -Rubromycin. 2. Siedendes Pyridin isomerisiert β -Rubromycin unter Freilegung einer Hydroxygruppe zu dem mit Collinomycin⁴⁾ identischen α -Rubromycin. 3. Salzsäure verwandelt β -Rubromycin unter Verseifung einer Methoxygruppe in γ -Rubromycin. 4. Siedendes Pyridin isomerisiert γ -Rubromycin zu γ -*iso*-Rubromycin. 5. γ -*iso*-Rubromycin entsteht unter milder Säureeinwirkung aus α -Rubromycin.



¹⁾ I. Mitteil.: H. Brockmann, W. Lenk, G. Schwantje und A. Zeeck, Tetrahedron Letters [London] 1966, 3525.

²⁾ W. Lindenbein, Arch. Mikrobiol. 17, 361 (1952).

³⁾ H. Brockmann und K.-H. Renneberg, Naturwissenschaften 40, 59 (1953).

⁴⁾ H. Brockmann und K.-H. Renneberg, Naturwissenschaften 40, 166 (1953).

Die griechischen Index-Buchstaben der Rubromycine geben alphabetisch die Reihenfolge ihrer R_F -Werte an. Die im vorstehenden Schema angeführten Summenformeln der kristallisierten, optisch inaktiven, keine C -Methylgruppe enthaltenden Rubromycine sind analytisch und massenspektrometrisch gesichert.

Im folgenden berichten wir ausführlich über unsere Befunde.

Isolierung der Rubromycine

Der Hauptanteil der von unserem *Streptomyces*-Stamm⁵⁾ produzierten Rubromycine bleibt während der Kultur im Mycel. Acetonextrakte aus Mycel von Submerskulturen lieferten ein durch Verteilung zwischen Wasser und Chloroform vorgereinigtes, mit Petroläther von Fetten befreites, chloroformlösliches Rohprodukt, aus dem durch Chromatographie an Glutarsäure-Kieselgel G β -Rubromycin und γ -Rubromycin in Ausbeuten von 80 mg bzw. 7 mg je 1 l Kulturlösung rein und kristallisiert abgetrennt wurden.

α -Rubromycin, das in alkalischem Milieu leicht aus β -Rubromycin entsteht, erschien im Chromatogramm der Rohprodukte nur, wenn der pH-Wert der Kulturlösung über 7.8 lag, und war bei unseren Stämmen offenbar nicht nativ. Ob in schwach sauren Kulturlösungen ein Teil des β -Rubromycins in γ -Rubromycin übergeht und auch dieses ein Sekundärprodukt ist, bleibt offen. Umwandlung von β - in γ -Rubromycin während der Chromatographie ließ sich vermeiden, als das Kieselgel mit Glutarsäure vorbehandelt wurde, statt wie früher mit Salzsäure oder Oxalsäure.

β - und γ -Rubromycin hemmen das Wachstum mancher grampositiver Erreger bis zu hohen Verdünnungen. Gramnegative dagegen werden wenig oder gar nicht beeinflusst.

γ -Rubromycin ist antibiotisch 4–10 mal wirksamer als β -Rubromycin⁶⁾; bemerkenswert, wenn es ein Sekundärprodukt ist.

Tab. 1. Antibiotische Wirksamkeit von β - und γ -Rubromycin⁶⁾

Keimart	Zahl der Stämme	Minimale Hemmungskonzentration ⁶⁾ (Medianwert, μg pro ccm)	
		β -Rubromycin	γ -Rubromycin
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	1250	80
<i>Staphylococcus albus</i>	1	200	160
<i>Streptococcus pyogenes</i>	7	310	80
<i>Streptococcus viridans</i>	4	6000	630
<i>Enterokokken</i>	12	5000	630
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	2	310	80

⁵⁾ Da neu isoliert, taxonomisch noch nicht zugeordnet.

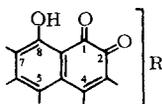
⁶⁾ Die Angaben verdanken wir Herrn Prof. Dr. H. Brandis und Dr. A. Morgenroth, Institut für Med. Mikrobiologie und Immunologie, Bonn; Testbedingungen sowie weitere Ergebnisse vgl. H. Brandis und A. Morgenroth, in Vorbereitung.

β -Rubromycin

β -Rubromycin $C_{27}H_{20}O_{12}$ mit drei Methoxylen und zwei potentiometrisch titrierbaren, phenolischen Hydroxylen verbraucht bei Hydrierung in 0.5*n* 50proz. methanol. Alkalihydroxid 1 Mol Wasserstoff, gibt reduzierend acetyliert Dihydro- β -rubromycin-tetraacetat und ist demnach ein Chinon. Die IR-Bande bei 1618/cm, die dem Dihydro- β -rubromycin-tetraacetat fehlt und daher der Chinongruppierung zukommt, zeigt durch niedrige Wellenzahl und Verschiebung auf 1658/cm (Vorbande bei 1681/cm) bei Überführung von β -Rubromycin ins gelbe, kristallisierte Diacetat, daß mindestens ein Chinoncarbonyl mit einem *peri*-Hydroxyl cheliert ist. Das gleiche ergibt sich aus der langwelligen Absorption (Tab. 2) der violetten Alkalisalze und des mit Pyroborsäureacetat^{7, 8)} entstehenden blauen Acetborsäure-esters.

Die Absorptionskurve des gelblichen, in Lösung farblosen Dihydro- β -rubromycin-tetraacetates ist der von 2.7-Dimethoxy-1.4.5.8-tetraacetoxy-naphthalin ähnlich und charakterisiert β -Rubromycin damit als Hydroxy-naphthochinon; im Einklang mit dem Redoxpotential ($E_0 = +442$ mV)⁹⁾ des β -Rubromycin-diacetates und der blaßgelben Farbe der Dithionitküpe.

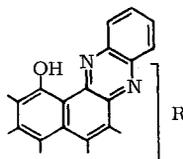
Mit *o*-Phenylendiamin liefert β -Rubromycin unter Abspaltung von 2 Mol Wasser sowie Verseifung eines Methoxyls ein rotes, in Säuren blau lösliches Kondensationsprodukt $C_{32}H_{22}N_2O_{10}$ mit zwei CH_3O - und drei OH -Gruppen, dem die Chinoncarbonyl-IR-Bande des Ausgangsproduktes fehlt. Acetanhydrid verwandelt es mit basischem Katalysator in ein Diacetat¹⁰⁾ und mit saurem in ein Triacetat. β -Rubromycin enthält demnach die 8-Hydroxy-naphthochinon-(1.2)-Gruppierung von **1a** und das *o*-Phenylendiamin-Kondensationsprodukt (im folgenden β -Rubromycin-chinoxalin) das Ringsystem von **2a**.



R = [2 CH_3O , CO_2CH_3 ,
CO \cdots HO, 3 Aromat/Olefin-H,
 CH_2 , 4 Aliphath-H, $C_{11}O_3$]

1a

b: CH_3CO_2 statt OH



R = [OH, CH_3O , CO_2CH_3 ,
CO \cdots HO, 3 Aromat/Olefin-H,
 CH_2 , 4 Aliphath-H, $C_{11}O_3$]

2a

b: CH_3CO_2 statt OH in R

c: CH_3CO_2 statt OH

Im Carbonylbereich des IR-Spektrums von β -Rubromycin findet man neben der Chinoncarbonylbande eine allen Rubromycinen gemeinsame Bande bei 1733/cm, die, wie unten gezeigt, zu einer Methoxycarbonylgruppe gehört; ferner eine bei 1686/cm, die neben der

⁷⁾ O. Dimroth und F. Ruck, Liebigs Ann. Chem. **446**, 97, 123 (1925).

⁸⁾ H. Brockmann und B. Franck, Chem. Ber. **88**, 1792 (1955).

⁹⁾ W. M. Clark, Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems, Williams & Wilkins Company, Baltimore 1960.

¹⁰⁾ Schwer acetylierbar ist die *peri*-ständige, mit N chelierte OH-Gruppe, die ein NMR-Signal ($CDCl_3$) bei $\delta = 15.25$ ppm gibt.

Methoxycarbonylbande auch im Spektrum des β -Rubromycin-chinoxalins auftritt. Sie ist einer chelierten CO-Gruppe zuzuschreiben, denn sie liegt im β -Rubromycin-diacetat (**1b**) wie im Di- und Triacetat von β -Rubromycin-chinoxalin kürzerwellig und fällt daher mit deren Methoxycarbonylbande bei 1736/cm zusammen.

Anhand des 100 MHz-Spektrums, dessen Signale in CDCl_3 wegen geringer Löslichkeit schwach sind, lassen sich von den zwanzig Wasserstoffatomen des β -Rubromycins vierzehn folgendermaßen zuordnen (Tab. 3): Cheliertes Chinon-OH ($\delta = 12.80$ ppm); cheliertes OH in R von **1a** ($\delta = 11.03$ ppm); drei Aromat/Olefin-Protonen (Singuletts, $\delta = 7.42, 6.90, 6.73$ ppm); drei CH_3O ($\delta = 3.97, 3.93$ ppm).

Über die restlichen sechs Wasserstoffatome informiert das in Trifluoressigsäure aufgenommene 100 MHz-Spektrum (Tab. 4). Neben den Singuletts der drei Aromat/Olefin-Protonen und der drei Methoxyle zeigt es ein 4-Linien-Signal vom AB-Typ ($\delta = 3.79, 3.51$ ppm; $J_{\text{AB}} = 18.5$ Hz), das man dem Kopplungsschema nach einer von protonenfreien C-Atomen flankierten Methylengruppe zuordnen kann. Daß die beiden Protonen magnetisch deutlich verschieden sind, spricht für ungleiche Umgebung sowie erschwerte Drehbarkeit der Methylengruppe.

Die vier noch übrigen Wasserstoffatome des β -Rubromycins geben zwei nicht aufgelöste Multipletts um $\delta = 3.34$ und 2.68 ppm (jedes für 2 H), die zu aliphatischen Molekülteilen gehören.

Die vorstehenden Befunde führen zur β -Rubromycin-Teilformel **1a** und für das β -Rubromycin-chinoxalin, sein Di- und Triacetat zu **2a**, **2b** und **2c**.

γ -Rubromycin

In siedendem Aceton/Chloroform (4 : 1) mit 0.4% konz. Salzsäure entsteht aus β -Rubromycin zu 75% γ -Rubromycin $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$. Wie Mineralsäuren wirken Oxalsäure, Malonsäure und Bernsteinsäure; nicht dagegen Glutarsäure oder Essigsäure, aus der sich β -Rubromycin unverändert umkristallisieren läßt.

γ -Rubromycin nimmt, in methanol. Alkalihydroxid hydriert, 1 Mol Wasserstoff auf, enthält zwei Methoxyle und, wie sein gelbes Triacetat beweist, drei Hydroxyle, von denen zwei in Dimethylsulfoxid/Wasser (20 : 1) titrierbar sind. Bei der Umwandlung von β - in γ -Rubromycin wird demnach ein Methoxyl verseift. Außerdem wird der 1.2-chinoide Chromophor von **1a** 1.4-chinoid. Denn γ -Rubromycin reagiert nicht mit *o*-Phenylendiamin, und das Redoxpotential des γ -Rubromycin-triacetates ist mit $E_0 = +348$ mV nahezu 100 mV negativer als das von β -Rubromycin-diacetat^{11,12}.

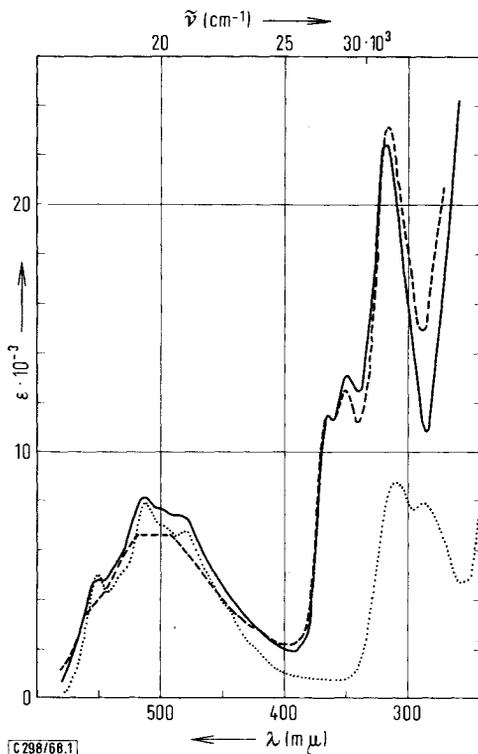
Die scharfe IR-Bande des γ -Rubromycins bei 1600/cm fehlt dem durch reduzierende Acetylierung bereiteten Dihydro- γ -rubromycin-pentaacetat und ist demnach den Chinoncarbonylen zuzuordnen. Ihre Lage und ihre Verschiebung auf 1647/cm im gelben γ -Rubromycin-triacetat zeigt ebenso wie die langwellige Absorption und violette Farbe der Alkalisalze und des Acetborsäure-esters (Tab. 2), daß beide Chinoncarbonyle des γ -Rubromycins mit *peri*-Hydroxylen cheliert sind.

Das Elektronenspektrum des γ -Rubromycins ist im langwelligen Bereich dem von 5.8-Dihydroxy-2.7-dimethoxy-naphthochinon-(1.4) (2.7-Dimethoxy-naphthazarin)

¹¹) L. F. Fieser, J. Amer. chem. Soc. **50**, 439 (1928).

¹²) K. Wallenfels und W. Möhle, Ber. dtsh. chem. Ges. **76**, 924 (1943).

(3b)¹³⁻¹⁶ ähnlich (Abbild. 1, Tab. 2) und das des blaßgelben Dihydro- γ -rubromycin-pentaacetates dem von 2.7-Dimethoxy-1.4.5.8-tetraacetoxy-naphthalin (Abbild. 2). Daß γ -Rubromycin in der Tat ein 3b-Derivat ist, hat die Hochvak.-Pyrolyse bei 280° bewiesen. Denn sie lieferte zu 4% kristallisiertes, rotes, durch Vergleich mit einem synthetisiertem Präparat^{13,17,18} identifiziertes 2.5.8-Trihydroxy-7-methoxy-naphthochinon-(1.4) (3a).



Abbild. 1. Absorptionskurven in Chloroform. β -Rubromycin (11) (---): λ_{\max} 504 m μ ($\epsilon = 6600$), 364 (11500), 350 (12500), 316 (23100); γ -Rubromycin (12) (—): λ_{\max} 551 m μ ($\epsilon = 4800$), 513 (8100), 484 (7400), 364 (11500), 349 (13100), 317 (22400); 5.8-Dihydroxy-2.7-dimethoxy-naphthochinon-(1.4) (3b) (· · · ·): λ_{\max} 551 m μ ($\epsilon = 5100$), 513 (7800), 480 (6800), 310 (8700), 288 (7800)

¹³ Zuerst synthetisiert von W. Lenk, Dissertat., Univ. Göttingen 1961.

¹⁴ C. W. J. Chang, R. E. Moore und P. J. Scheuer, J. Amer. chem. Soc. **86**, 2959 (1964).

¹⁵ S. Natori, Y. Kumada und H. Nishikawa, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] **13**, 633 (1965).

¹⁶ N. N. Gerber und B. Wiclawek, J. org. Chemistry **31**, 1496 (1966).

¹⁷ I. Singh, R. E. Moore, C. W. J. Chang und P. J. Scheuer, J. Amer. chem. Soc. **87**, 4023 (1965).

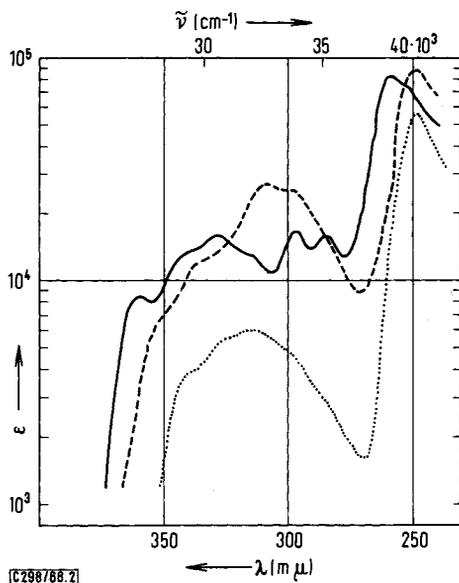
¹⁸ R. E. Moore, I. Singh, C. W. J. Chang und P. J. Scheuer, Tetrahedron [London] **23**, 3271 (1967).

Tab. 2. Absorptionsmaxima von Rubromycinen, Rubromycin-Derivaten und Modellsubstanzen in verschiedenen Lösungsmitteln (**)

	Naphthochinon- Chromophor	Chloroform Chromophor in K	Beide Chromophore	2 <i>n</i> NaOH	konz. H ₂ SO ₄	Acetanhydrid/Pyrobor- acetat (erhitzt)
β-Rubromycin (11)	504	364, 350	316		(570), 518*) karmesinrot	630, 592, (555), 480 blau
γ-Rubromycin (12)	551, 513, 484	364, 349	317	585, 550*) violett	(550), 512 rot	616, 572, (553), 519, 484 violett
2,7-Dimethoxy-naphthazarin (3b)	551, 513, 480		310, 288	578, 543 violett	560, 522, 480 rot	599, 554, (515), (499) violett
Brom-γ-rubromycin (7e)	550, 513, 484	376, 361	323			614, 567, 555, 519, 485 violett
γ-Rubromycin-monomethyläther (7c oder 7d)	454	365, 351	311			(549), 514, (489) rot
α-Rubromycin (13)	484, 415	366, 352	319	570, 535 rotviolett	520, (490) rot	595, 559, 464 violett
α-Rubromycin-monomethyl- äther (9c)	483, 412	358, 345	309			594, 556, 470 violett
α-Rubromycin-dimethyläther (9d)	483, 412	(344)	305, 292			594, 557, 470 violett
α-Rubromycin-trimethyläther (9e)	427, 376	347	304			
γ-iso-Rubromycin (14a)	532, 495, 469, 438	(362)	324	569, 531 rotviolett	512, (482) rot	554, 512, (481) karmesinrot
2,6-Dimethoxy-naphthazarin	530, 493, 464		307	570, 533 rotviolett	483 gelbrot	539, 500, 463 rot
2,3,6-Trimethoxy-naphthazarin (3c)	530, 497, 472		317	580, 543 violett	495, (470) gelbrot	529, (503) rot

*) Rasch gemessen, da Substanz im Lösungsmittel zersetztlich.

**) Angaben in mμ, gemessen im Spektralphotometer Zeiss RPQ 20 A.



Abbild. 2. Absorptionskurven in Chloroform. Dihydro- γ -rubromycin-pentaacetat (**8**) (---): λ_{\max} 309 m μ ($\epsilon = 27000$), 249 (86500) mit Schultern bei 348, 333, 300 m μ ; Dihydro- γ -isobromomycin-hexaacetat (**10b**) (—): λ_{\max} 361 m μ ($\epsilon = 8700$), 330 (16100), 298 (16800), 286 (16100), 260 (83600) mit Schulter bei 340 m μ ; 2,7-Dimethoxy-1,4,5,8-tetraacetoxy-naphthalin¹⁶⁾ (· · · ·): λ_{\max} 315 m μ ($\epsilon = 6050$), 249 (55000) mit Schulter bei 339 m μ

Wie β -Rubromycin (**1a**) zeigt auch γ -Rubromycin eine IR-Bande bei 1733/cm. Sie ist einer Methoxycarbonylgruppe zuzuordnen, denn mit verd. wäbr. Alkalihydroxid entsteht aus γ -Rubromycin bei Raumtemperatur ein um ein Methoxyl ärmeres Verseifungsprodukt, das 1. aus Chloroform mit wäbr. Natriumhydrogencarbonat extrahierbar ist, 2. im Elektronenspektrum mit γ -Rubromycin übereinstimmt, 3. mit Diazomethan wieder γ -Rubromycin liefert und demnach eine Säure (γ -Rubromycinsäure) ist.

Ebenso wie **1a** enthält auch γ -Rubromycin eine chelierte Carbonylgruppe in R, erkennbar an einer Bande bei 1686/cm, die im γ -Rubromycin-triacetat — weil das Carbonyl hier uncheliert — auf 1739/cm verschoben ist und daher mit der Methoxycarbonylbande zusammenfällt.

Das 60 MHz-NMR-Spektrum (CDCl_3) des γ -Rubromycins (Tab. 3) zeigt an: Zwei chelierte Chromophorhydroxyle ($\delta = 13.03, 12.25$ ppm; in **3b** bei $\delta = 13.18, 12.75$ ppm); ein drittes cheliertes Hydroxyl sowie zwei Methoxyle.

Von den drei Singulets im Absorptionsbereich von Aromat/Olefin-Protonen haben zwei die gleiche Lage wie im β -Rubromycin, das dritte ($\delta = 6.15$ ppm) dagegen liegt um 0.51 ppm weiter feldaufwärts als beim β -Rubromycin.

Die restlichen sechs Wasserstoffatome geben im 100 MHz-NMR-Spektrum (Trifluoressigsäure) (Tab. 4) die gleichen Signale wie β -Rubromycin. Wie dort gehören demnach zwei H-Atome zu einer von protonenfreien Kohlenstoffatomen flankierten, drehungsbehinderten Methylengruppe und vier zu einem aliphatischen Molekülteil.

Tab. 3. NMR-Signale (δ -Werte) in Deuteriochloroform

	OH, cneliert		Aromat/Olefin-H		Methoxyl
	Naphthochinon-Chromophor	CO...HO in R	Chromophor in R	Naphthochinon-Chromophor	
β -Rubromycin (11)**	12.80	11.03	7.42, 6.90	6.73	3.97, 3.93 (9 H)
γ -Rubromycin (12)**	13.03, 12.25	11.02	7.40, 6.95	6.15	3.95, 3.92 (6 H)
5.8-Dihydroxy-2,7-dimethoxynaphthochinon-(1.4) (3b)**	13.18, 12.75			6.40	3.95 (6 H)
γ -Rubromycin-monomethyläther (7c oder 7d)**	13.19	11.09	7.44, 6.95	6.00	3.98, 3.91, 3.81 (9 H)

*) 100 MHz-Spektrum.

**) 60 MHz-Spektrum.

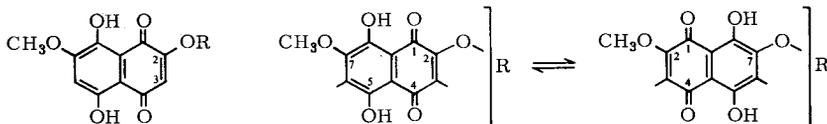
Tab. 4. NMR-Signale (δ -Werte) in Trifluoressigsäure

	Aromat/Olefin-H		Aliphat-H		
	Chromophor in R	Naphthochinon-Chromophor	H an C-1'	Methoxyl	
β -Rubromycin (11)**	7.72, 7.24	6.76	4.23, 4.19, 4.09 (9 H)	3.79, 3.51 (Multipletts) ($J = 18.5$ Hz)	3.34 (2 H), 2.68 (2 H) (Multipletts)
γ -Rubromycin (12)**	7.70, 7.21	6.49	4.09, 4.02 (6 H)	3.80, 3.53 (Multipletts) ($J = 18.3$ Hz)	3.20 (2 H), 2.59 (2 H) (Multipletts)
Brom- γ -rubromycin (7e)**	8.15	6.51	4.17 (6 H)	sehr schwach	sehr schwach
α -Rubromycin (13)**	7.72, 7.21	6.98	4.50, 4.33, 4.12 (9 H)	3.39 (4 H)	3.40 (4 H)
γ -iso-Rubromycin (14a)**	7.75, 7.25	6.88	4.13 (6 H)	3.40 (4 H)	3.40 (4 H)
α -Rubromycin-dimethyläther (9d)**	7.71, 7.53	6.97	4.51, 4.34, 4.16 (15 H)	3.40 (4 H)	3.40 (4 H)
α -Rubromycin-trimethyläther (9e)**	7.72, 7.52	7.06	4.26, 4.16 (18 H)	3.35 (4 H)	3.35 (4 H)

*) 100 MHz-Spektrum.

**) 60 MHz-Spektrum.

Aus diesen Befunden ergibt sich für γ -Rubromycin die Teilformel **4a/5a**. Der Sauerstoff an C-2 bzw. C-7 ist nicht, wie man dem γ -Rubromycin-Pyrolyseprodukt **3a** nach erwarten könnte, Teil eines Hydroxyls, denn dann müßte γ -Rubromycin als β -Hydroxy-chinon den pK -Wert einer Carbonsäure haben.



3a: R = H

b: R = CH₃

c: CH₃O statt H an C-3

R = [CO₂CH₃, CO·HO, 3 Aromat/Olefin-H,
CH₂, 4 Aliph-H, C₁₁O₂]

4a

b: CH₃CO₂ statt OH

c: CO₂H statt CO₂CH₃

d: OH statt CH₃O an C-7

5a

b: CH₃CO₂ statt OH

c: CO₂H statt CO₂CH₃

d: OH statt CH₃O an C-2

Das Elektronenspektrum des γ -Rubromycins hat ebenso wie das von β -Rubromycin zwei Banden bei 364 und 349 m μ (Abbild. 1), die **3b** fehlen und daher zu einem Chromophor im C₁₁-Rest von **1a** bzw. **4a/5a** gehören. Er ist nicht mit dem Naphthochinon-Chromophor von **1a** bzw. **4a/5a** konjugiert, denn beim Übergang von **1a** in **4a/5a** verschiebt sich nur die langwellige Absorption.

Wie zu erwarten, ist das Methoxyl an der Naphthazarin-Gruppierung des γ -Rubromycins — in **5a** Teil einer vinylogenen Estergruppe — mit Säure relativ leicht verseifbar. Denn bei der säurekatalysierten Umwandlung von β - in γ -Rubromycin erhielten wir zu 7% Desmethoxyhydroxy- γ -rubromycin, das sich im Gegensatz zu γ -Rubromycin in wäßr. Natriumhydrogencarbonat löst, potentiometrisch in Dimethylsulfoxid/Wasser (20:1) titriert, in erster Stufe einen kleineren pK_a -Wert gibt als Glutarsäure, aber nicht mit γ -Rubromycinsäure **4c/5c** identisch ist. Im langwelligen Gebiet des Elektronenspektrums unterscheidet sich Desmethoxyhydroxy- γ -rubromycin von γ -Rubromycin und ist hier **3a** ähnlicher als **3b**. Diesen Befunden nach kommt ihm Teilformel **4d/5d** zu.

4a/5a erlaubt, die β -Rubromycinformel **1a** folgendermaßen zu erweitern: 1. An C-7 von **1a** steht Methoxyl. 2. C-4 und C-5 sind mit Sauerstoff verbunden, der bei Umlagerung in γ -Rubromycin (**4a/5a**) zum Hydroxyl bzw. Carbonyl-O-Atom wird, während der Carbonyl-Sauerstoff an C-2 von **1a** in **4a/5a** die Funktion einer Äthergruppe übernimmt. 3. Da bei dieser Reaktion außer einem *O*-Methyl nichts abgespalten wird und gleiches auch bei verschärften Hydrolysebedingungen gilt, ist der C₁₁-Rest in **1a** außer über Äthersauerstoff auch noch über Kohlenstoff an den Chromophor gebunden; und zwar an C-3, denn nur dann ist die von *ortho-para*-Chinon-Umlagerung begleitete Umätherung **1a** \rightarrow **4a/5a** sterisch plausibel. **1a** \rightarrow **4a/5a** ist demnach der Dunnion¹⁹⁾- bzw. Lapachon-Umlagerung^{20,21,22)} analog, woraus sich folgern

¹⁹⁾ J. R. Price und R. Robinson, J. chem. Soc. [London] **1939**, 1522; **1940**, 1493.

²⁰⁾ S. C. Hooker, J. chem. Soc. [London] **61**, 611 (1892); **69**, 1355 (1896).

²¹⁾ M. G. Ettliger, J. Amer. chem. Soc. **72**, 3090 (1950).

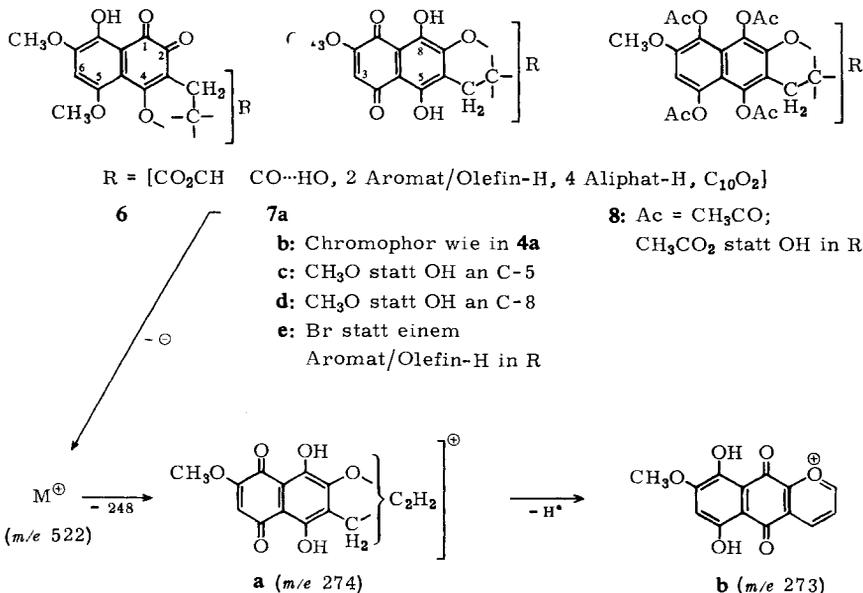
²²⁾ A. R. Burnett und R. H. Thomson, J. chem. Soc. [London] **1967**, 1261.

läßt, daß in **1a** der Äthersauerstoff an C-4 über zwei oder drei C-Atome mit C-3 verbunden und damit Glied eines dem *o*-Chinonring anellierten Dihydro-furan- oder Dihydro-pyran-Ringes ist. Bei einem größeren Ring wäre die gute Ausbeute bei der Umlagerung überraschend. 4. An C-5 von **1a** steht eine Methoxygruppe, die beim Übergang in γ -Rubromycin zum Hydroxyl von **4a** verseift wird. Da hierbei das stabile Naphthazarin-System entsteht, ist verständlich, daß sich das *p*-Chinon nicht wie beim Dunnion bzw. Lapachon ins *o*-Chinon zurückverwandeln läßt.

Damit wird, da die Methylengruppe des β -Rubromycins, wie unten gezeigt, mit C-3 verbunden ist, aus **1a** die β -Rubromycinformel **6**, aus **4a** und **5a** die γ -Rubromycinformel **7a** bzw. **7b** und für Dihydro- γ -rubromycin-pentaacetat gilt **8**.

Bei der Pyrolyse des γ -Rubromycins zu **3a** muß die Bindung zwischen Chromophor und Methylengruppe gelöst und aus der Ätherbrücke das β -Hydroxyl von **3a** werden. Das erklärt die geringe **3a**-Ausbeute und die Vielzahl farbiger Nebenprodukte.

Daß C-6 in **6** und damit auch C-3 in **7a** bzw. C-6 in **7b** mit Wasserstoff verknüpft ist, zeigen die Aromat/Olefin-Singulets von β - und γ -Rubromycin (Tab. 3, 4). Bei der sich ausschließlich am Naphthochinon-Chromophor abspielenden Umwandlung von β -Rubromycin (**6**) in γ -Rubromycin (**7a/7b**) bleiben zwei Singulets von **6** unverändert. Das dritte dagegen verschiebt sich, was nur möglich ist, wenn das zugehörige Proton am Naphthochinon-Chromophor von **6** steht. Die diamagnetische Verschiebung des Signals ins Gebiet olefinischer Protonen ($\delta = 6.15$ ppm, CDCl_3) beim Übergang in γ -Rubromycin wird verständlich, wenn dieses in Lösung ganz überwiegend als Tautomeres **7a** vorliegt.



Daß die bei der Umwandlung **6** \rightarrow **7a** unverändert bleibenden Singulets zu zwei Protonen in R von **6** bzw. **7a** gehören, beweist auch das NMR-Spektrum des kristalli-

sierten, roten, aus **7a** und Brom in Chloroform gewonnenen Brom- γ -rubromycins (**7e**). Sein IR-Spektrum ist zwischen 1050 und 1750/cm mit dem von **7a** identisch. Das gleiche gilt für den langwelligen Teil des Elektronenspektrums, während im 360 m μ -Gebiet die Maxima um 12 m μ bathochrom gegen die von **7a** verschoben sind (Tab. 2). Das Brom steht demnach in R von **7a**.

Bei der Bromierung verschwindet im NMR-Spektrum (Tab. 4) das 7.21 ppm-Signal von **7a** und das bei $\delta = 7.70$ ppm wird durch den neuen Substituenten paramagnetisch nach 8.15 ppm verschoben. Das H³-Signal ($\delta = 6.49$ ppm) dagegen bleibt erwartungsgemäß unverändert.

Das Massenspektrum des γ -Rubromycins (**7a**) zeigt neben dem Molekül-Ion (m/e 522) und wenigen schwachen Peaks nur eine Doppelspitze bei m/e 274/273. Ob die beiden zugehörigen Fragmente den Naphthochinon-Chromophor oder den Rest R von **7a** enthalten, hat das Massenspektrum eines γ -Rubromycin-monomethyläthers entschieden, der neben höher methylierten Produkten zu 38% beim Umsetzen mit Diazomethan in Chloroform anfiel. Da das langwellige Maximum seines Elektronenspektrums 59 m μ kürzerwellig liegt als das von γ -Rubromycin, die IR-Chinoncarbonylbande aufgespalten ist und das NMR-Spektrum (Tab. 3) Signale von zwei chelierten Hydroxylen sowie drei Methoxylen zeigt, ist ein *peri*-Hydroxyl des γ -Rubromycin-Chromophors methyliert worden; und zwar im Tautomeren **7a**, denn das **7a**-Proton mit $\delta = 6.15$ gibt sich im Methyläther durch ein Singulett bei $\delta = 6.00$ ppm zu erkennen. Der Monomethyläther ist demnach **7c** oder **7d**. In seinem Massenspektrum findet man neben M⁺ (m/e 536) die Doppelspitze mit m/e 288/287 um 14 Masseneinheiten höher als beim γ -Rubromycin; folglich enthält das Fragment den Naphthochinon-Chromophor.

Um zur Summenformel des Ions 274 (M-248) zu kommen, müßte man dieses nach **a** formulieren, das unter Abspaltung eines Wasserstoffatoms leicht das durcharomatisierte Ion **b** bildet. Einerlei ob **a** einen Furanring mit exocyclischer Methylengruppe enthält oder einen Sechsring, sein Auftreten bestätigt, daß dem Naphthochinon-Chromophor ein heterocyclischer Ring anelliert ist.

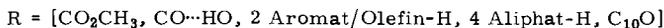
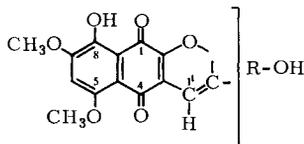
α -Rubromycin

In siedendem Pyridin entsteht aus β -Rubromycin quantitativ das isomere, gelbrote α -Rubromycin C₂₇H₂₀O₁₂ mit drei Methoxylen und, wie das kristallisierte gelbe α -Rubromycin-triacetat zeigt, drei Hydroxylen, von denen sich zwei in Dimethylsulfoxid/Wasser (20:1) potentiometrisch titrieren lassen. Bei der Umwandlung von β -Rubromycin in α -Rubromycin wird demnach eine Hydroxygruppe freigesetzt.

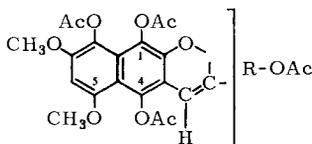
α -Rubromycin nimmt, in methanol. Pyridin hydriert, 1 Mol Wasserstoff auf, liefert reduzierend acetyliert ein kristallisiertes, blaßgelbes Dihydro- α -rubromycin-pentaacetat, reagiert nicht mit *o*-Phenylendiamin und ist demnach ein Naphthochinon-(1,4)-Derivat; in Übereinstimmung mit dem Redoxpotential $E_0 = +333$ mV seines Triacetates, das um 109 mV negativer ist als das von β -Rubromycin-diacetat^{11,12}. Die IR-Bande des α -Rubromycins bei 1634/cm, die dem Dihydro- α -rubromycin-pentaacetat fehlt und daher den beiden Chinoncarbonylen zuzuordnen ist, wird beim Übergang ins α -Rubromycin-triacetat nach 1667/cm verschoben; ein Zeichen, daß mindestens ein Chinoncarbonyl mit einem *peri*-Hydroxyl cheliert ist.

Die langwellige Absorption des α -Rubromycin-Spektrums liegt bei kürzeren Wellenlängen als die von β -Rubromycin (**6**) (Abbild. 1 und 3), während die Banden des zu R gehörenden Chromophors (360 $m\mu$ -Bereich) unverändert sind. Die Absorptionskurve von Dihydro- α -rubromycin-pentaacetat ist gegen die von Dihydro- β -rubromycin-tetraacetat bzw. Dihydro- γ -rubromycin-pentaacetat bathochrom verschoben, was nur verständlich wird, wenn das Naphthalin-Ringsystem des Dihydro- α -rubromycin-pentaacetates und damit auch der Naphthochinon-(1.4)-Chromophor von α -Rubromycin mit einer Doppelbindung konjugiert ist.

Nach diesen Befunden tritt in siedendem Pyridin die gleiche von Umätherung begleitete *ortho-para*-Chinon-Umlagerung ein wie bei der säurekatalysierten Umwandlung von β - in γ -Rubromycin. Im Gegensatz zu dieser bleibt jedoch das Methoxyl an C-5 erhalten, während zusätzlich — konjugiert zum Naphthochinon-(1.4)-Chromophor — eine Doppelbindung entsteht und außerdem ein Hydroxyl freigesetzt wird, das, wie unten gezeigt, zu R gehört. Damit kommt man von **6** zur α -Rubromycinformel **9a** und für Dihydro- α -rubromycin-pentaacetat zu **10a**.

**9a**

- b: CH_3CO_2 statt OH
- c: CH_3O statt OH an R
- d: CH_3O statt OH in und an R
- e: CH_3O statt OH

**10a:** Ac = CH_3CO ; CH_3CO_2
statt OH in R

- b: wie **10a**; CH_3CO_2 statt CH_3O an C-5

R von α -Rubromycin (**9a**) enthält das allen Rubromycinen gemeinsame Methoxycarbonyl (1727/cm) und chelierte Carbonyl, dessen Bande (1689/cm) im α -Rubromycin-triacetat (**9b**) auf 1739/cm und damit unter die Methoxycarbonylbande verschoben ist. Das bei **6** \rightarrow **9a** freigesetzte Hydroxyl (3390/cm) ist phenolisch, uncheliert und gehört wie die $\text{CO}\cdots\text{HO}$ -Gruppierung zum 360 $m\mu$ -Chromophor von R. Denn dem mit Diazomethan dargestellten α -Rubromycin-monomethyläther fehlt die OH-Bande bei 3390/cm, die IR-CO-Banden sind die gleichen wie bei **9a** und das Elektronenspektrum stimmt im langwelligen Teil mit dem von **9a** überein; nicht dagegen im 360 $m\mu$ -Bereich (Tab. 2). Für den Monomethyläther gilt demnach **9c**.

Längere Diazomethan-Einwirkung führt zum α -Rubromycin-dimethyläther mit unveränderter Chinon-CO-Bande bei 1637/cm. Ihm fehlt die 1686/cm-Bande des Monomethyläthers, während die Extinktion der Methoxycarbonylbande bei 1732/cm doppelt so groß ist wie bei diesem. Als zweites wird demnach das chelierte Hydroxyl in R methyliert. Dadurch verschiebt sich die Bande des zugehörigen Carbonyls zu höheren Wellenzahlen, so daß sie mit der Methoxycarbonylbande zusammenfällt. Der Dimethyläther ist daher nach **9d** zu formulieren. Permethylierung zum gelben α -

Rubromycin-trimethyläther (**9e**) (Chinon-CO: 1656/cm; gemeinsame Bande von Carbonyl und Methoxycarbonyl in R: 1736/cm) gelang mit *p*-Toluolsulfonsäuremethylester²³⁾.

Das NMR-Spektrum des α -Rubromycins — wegen Schwerlöslichkeit in Trifluoressigsäure gemessen — zeigt (Tab. 4): Zwei Aromat/Olefin-Protonen in R, kernständiges Aromatproton des Naphthochinon-Chromophors, kopplungsfreies Proton an C-1' von **9a**²⁴⁾, drei Methoxyle, verbreitertes Singulett für vier Aliphath-Protonen.

Bei der Umwandlung von β - in α -Rubromycin vereinfacht sich das NMR-Spektrum im Aliphath-Bereich. Die zwei nicht aufgelösten Multipletts der vier Aliphath-Protonen des β -Rubromycins rücken beim Übergang in α -Rubromycin zu einem verbreiterten Singulett zusammen. Die zugehörigen Wasserstoffatome sind also magnetisch nahezu gleichwertig geworden. Die 4-Linien-Signal der Methylengruppe von **6** fehlt dem α -Rubromycin, das statt dessen ein neues Signal für ein Aromat/Olefin-Proton zeigt. Das Methylen-C-Atom von **6** gehört demnach im α -Rubromycin zu einer C-Doppelbindung, die 1. aus den oben genannten Gründen mit dem Naphthochinon-Chromophor konjugiert und 2. Träger eines kopplungsfreien Protons ist. Die Methylengruppe muß somit entweder dem Naphthochinon-Chromophor benachbart oder über ein protonenfreies C-Atom mit ihm verknüpft sein. Für Nachbarstellung der Methylengruppe spricht die hohe Intensität der Fragmente **a** und **b** im Massenspektrum von γ -Rubromycin. Anderenfalls würden diese Fragmente erst nach Spaltung von mehr als zwei Bindungen aus γ -Rubromycin entstehen, was wir für wenig wahrscheinlich halten.

Ogleich α -Rubromycin ein cheliertes und ein uncheliertes Chinoncarbonyl enthält, hat es nur eine IR-Chinonbande. Ferner wird die langwellige Bande des Elektronenspektrums bei der Pyroboracetat-Reaktion für einen Monoacetborsäureester ungewöhnlich weit bathochrom verschoben (Tab. 2). Beide Anomalien sind kein Argument gegen **9a**, denn man findet sie auch bei analog strukturierten Modellverbindungen²⁵⁾.

Die Isomerisierung von β -Rubromycin zu α -Rubromycin ist — von der *ortho-para*-Chinon-Umlagerung abgesehen — dadurch charakterisiert, daß in R ein Hydroxyl freigesetzt wird und konjugiert zum Naphthochinon-Chromophor eine Doppelbindung entsteht. Eine plausible Deutung gibt die Erweiterung von **6** zur β -Rubromycinformel **11**, in der C-2' außer über eine Sauerstoffbrücke auch noch über eine C—C-Bindung mit R verbunden ist. Die Umlagerung von **11** in α -Rubromycin (**9a**) wäre dann eine β -Eliminierung, bei der von C-1' ein Proton abgespalten sowie von C-2' Äthersauerstoff abgelöst und zum Hydroxyl am Chromophor von R wird. Offen bleibt, ob der Äthersauerstoff an C-4 mit C-2' einen Fünfring oder über ein C-Atom einen Sechsring bildet; ferner, ob bereits vor der Umlagerung ins 1,4-Chinon β -eliminiert wird oder erst nachher. Mit **11** wird aus **7a** die γ -Rubromycinformel **12** und aus **9a** die α -Rubromycinformel **13**.

Im Massenspektrum von α -Rubromycin (**13**) findet man neben $M^{\oplus} = 536$ eine Doppelspitze bei m/e 288 ($M-248$) und m/e 287 mit nahezu gleicher Intensität der

²³⁾ D. B. Bruce und R. H. Thomson, J. chem. Soc. [London] **1955**, 1089.

²⁴⁾ Die Zuordnung der Signale $\delta = 6.98$ und 6.87 ppm in Tab. 4 ist nicht bewiesen.

²⁵⁾ A. Zeeck, unveröffentlicht.

Bruchstücke. Chromophor und unbekannter Molekülteil trennen sich wie beim γ -Rubromycin (**12**); die Massenzahl beider Fragmente ist dank der 5-Methoxygruppe um 14 höher als bei **12**.

α -Rubromycin-dimethyläther (**9d**) ($M^{\oplus} = 564$) liefert überwiegend das m/e 287-Fragment. Der m/e 288-Peak hat nach Abzug des ^{13}C -Isotopenanteils vom C_{15} -Bruchstück bei m/e 287 nur noch 3–5% der Intensität dieser Spitze; ein Hinweis, daß das m/e 288-Fragment beim α -Rubromycin (**13**) durch Umlagerung unter Einbeziehung eines Wasserstoffatoms von einem der beiden Hydroxyle in R entsteht.

Das überwiegend gebildete Schlüsselbruchstück aus α -Rubromycin-trimethyläther (**9e**) ($M^{\oplus} = 578$) liegt bei m/e 301 ($M - 277$). **9e** wird bei Aufnahme des Massenspektrums im Naphthochinon-Chromophor reduziert, denn neben dem Molekül-Ion tritt ein Peak bei m/e 580 ($M + 2$) auf, dessen Schlüsselbruchstück gegenüber m/e 301 um zwei M. E. auf m/e 303 erhöht ist.

Bei allen Umwandlungsprodukten von Rubromycinen zeigt die Lage der Doppelspitze, ob Naphthochinon-Chromophor oder Rest R verändert worden ist.

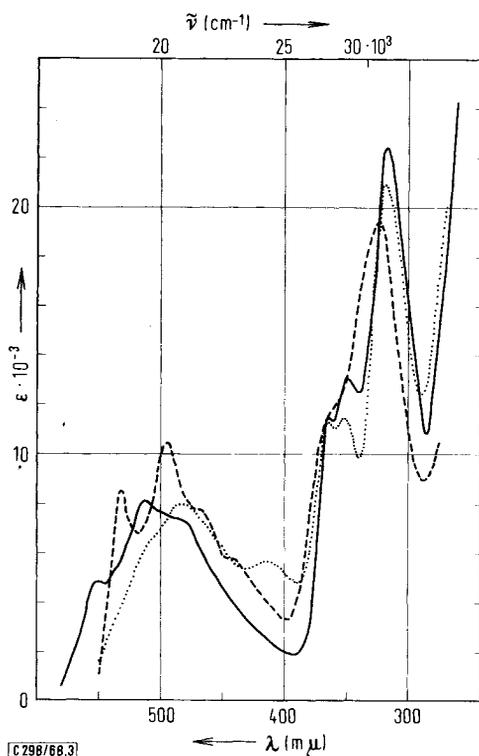
γ -iso-Rubromycin

Aus γ -Rubromycin (**12**) entsteht in siedendem Pyridin quantitativ das gelbrote, isomere, in organischen Solvenzien sehr schwer lösliche γ -iso-Rubromycin $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$ mit zwei Methoxylen, Methoxycarbonyl (1727/cm) und cheliertem, zu R gehörendem Carbonyl (1686/cm; nach Acetylierung mit der Methoxycarbonylbande zusammenfallend) wie in **12**. Es hat einen kleineren R_F -Wert als **12** und bildet ein kristallisiertes, gelbes Tetraacetat. Bei der Isomerisierung von γ -Rubromycin wird demnach ebenso wie bei der von β -Rubromycin ein uncheliertes Hydroxyl (OH-Bande bei 3438/cm) freigesetzt.

Das Redoxpotential $E_0 = +324$ mV des Tetraacetates sowie die IR-Bande des γ -iso-Rubromycins bei 1603/cm — dem farblosen Dihydro- γ -iso-rubromycin-hexaacetat fehlend und im Tetraacetat nach 1669/cm verschoben — zeigen, daß γ -iso-Rubromycin 1.4-chinoid und wie in **12** jedes Chinoncarbonyl cheliert ist.

γ -iso-Rubromycin löst sich selbst in Trifluoressigsäure so wenig, daß die Intensität der NMR-Signale (Tab. 4) nur gering ist. Im Absorptionsbereich von Aromat/Olefin-Protonen liegen — statt drei wie bei **12** — vier Singulets, von denen wie in **12** zwei zum Chromophor in R und eines zum Naphthochinon-Chromophor gehören. Das vierte und neue liegt bei $\delta = 6.71$ ppm. Neben den Methoxylsignalen zeigt ein verbreitertes Singulett ($\delta = 3.40$ ppm) vier aliphatische Protonen an.

Im Absorptionsbereich aliphatischer und aromatischer Protonen stimmt γ -iso-Rubromycin demnach mit α -Rubromycin (**13**) überein. Wie die Isomerisierung β -Rubromycin (**11**) \rightarrow α -Rubromycin (**13**) ist auch die von **12** zu γ -iso-Rubromycin gekennzeichnet durch: 1. Verschwinden eines Methylensignals und Auftreten eines neuen Aromat/Olefin-Protonensignals. 2. Äquivalentwerden von vier aliphatischen Protonen. 3. Freisetzen eines Hydroxyls an R; d. h. die Isomerisierung von **12** entspricht der β -Eliminierung bei **11** \rightarrow **13**, und γ -iso-Rubromycin hat demnach Teilformel **14a**. Daß in Lösung **14a** dominiert und nicht das **12** analoge γ -iso-Rubromycin-Tautomere, ergibt sich aus dem Chromophor-Protonensignal des γ -iso-Rubromycins (Tab. 4), das mit $\delta = 6.88$ ppm im Absorptionsbereich aromatischer Protonen liegt.



Abbild. 3. Absorptionskurven in Chloroform. γ -Rubromycin (**12**) (— — —): λ_{\max} s. Abbild. 1, α -Rubromycin (**13**) (·····): λ_{\max} 484 $m\mu$ ($\epsilon = 7950$), 415 (5650), 365 (11 300), 352 (11 400), 319 (20900); γ -*iso*-Rubromycin (**14a**) (— — —): λ_{\max} 532 $m\mu$ ($\epsilon = 8500$), 495 (10 500), 470 (7800), 438 (5900), 324 (19 500) mit Schulter bei 362 $m\mu$ ($\epsilon = 12000$)

Die langwellige Absorption des γ -*iso*-Rubromycins (**14a**) ist gegen die von γ -Rubromycin (**12**) um 19 $m\mu$ hypsochrom verschoben und zeigt ausgeprägtere Maxima mit größerer Extinktion (Abbild. 3). Andererseits absorbiert Dihydro- γ -*iso*-rubromycin-hexaacetat längerwellig als Dihydro- γ -rubromycin-pentaacetat (Abbild. 2). Beides steht — ebenso wie die Differenz (24 mV) im Redoxpotential²⁶⁾ von γ -Rubromycin-triacetat und γ -*iso*-Rubromycin-tetraacetat — in Einklang mit Formel **14a**, nach der diese Unterschiede durch die zum Naphthochinon-Chromophor konjugierte Doppelbindung des γ -*iso*-Rubromycins bedingt sind.

Auffällig ist, daß γ -*iso*-Rubromycin (**14a**) in der langwelligen Absorption seiner Chloroformlösung nicht, wie zu erwarten, mit 2.7-Dimethoxy-naphthazarin (**3b**) übereinstimmt, sondern mit 2.6-Dimethoxy-naphthazarin^{17,27)} bzw. 2.3.6-Trimethoxy-naphthazarin (**3c**)²⁸⁾ (Tab. 2). Die $C^1=C^2$ -Doppelbindung an C-3 von **14a** wirkt sich demnach spektroskopisch in gleicher Weise aus wie das 3-Methoxyl in **3c**; eine Parallele, die allerdings nur für Chloroform gilt (Tab. 2).

²⁶⁾ Vgl. α -Lapachon mit $E_0 = +304$ mV und 2-Isopropyl-naphtho[2.3-c]furanochinon-(4.9) mit $E_0 = +283$ mV, l. c. 11).

²⁷⁾ W. Waldmüller, Dissertat., Univ. Göttingen 1965.

²⁸⁾ C. Kuroda und H. Oshima, Proc. Imp. Acad. [Tokyo] **16**, 214 (1940); H. A. Anderson, J. Smith und R. H. Thomson, J. chem. Soc. [London] **1965**, 2141.

das Griseorhodin A³¹). In der Natur hat man bisher nur wenige *o*-Chinone aufgefunden, z. B. Dunnion¹⁹, Lapachon²⁰, Dioschinon³², Biflorin³³, Mycochryson³⁴, Tanshinon³⁵).

Die Massenspektren, deren Aufnahme wegen Schwerflüchtigkeit der Rubromycine nicht immer leicht war, verdanken wir Herrn Prof. Dr. G. Spitteller.

Fräulein L. Westphal, Fräulein Ch. Werther und Herrn S. Uhl danken wir für unermüdliche und geschickte Mitarbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und den Farbenfabriken Bayer AG, Werk Elberfeld, sind wir für die Förderung unserer Arbeit zu Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte sind im Berl-Block bestimmt und korrigiert. IR-Spektren (KBr-Preßlinge): Perkin-Elmer Modell 21; Elektronenspektren (mit Extinktion): Zeiss PMQ II, sonst Zeiss RPQ 20 A; NMR-Spektren: Varian 60 MHz bzw. 100 MHz, mit Tetramethylsilan als innerem Standard; Atlas CH-4 Massenspektrometer, direkter Einlaß, TO4-Ionenquelle.

Carbonsäure-Kieselgel G: 1 kg Kieselgel G nach Stahl (E. Merck) wurde mit 2l 0.5*n* Oxalsäure (Weinsäure oder Glutarsäure) verrührt, in 3–4 cm dicker Schicht 24 Stdn. bei 110° getrocknet, gepulvert und 3 Stdn. bei 110° aktiviert.

R_F-Werte wurden im Dünnschichtchromatogramm an Oxalsäure-Kieselgel G (0.5*n*, 1 Sde. bei 100° aktiviert) bestimmt (Laufmittel sowie *R_F*-Wert einer Vergleichssubstanz in Klammern).

Redoxpotentiale: 3–5 mg der Substanz wurden in 30 ccm 0.1*n* HCl (50% Essigsäure enthaltend) mit Titan(III)-chlorid (im gleichen Lösungsmittel) bei 25° titriert³⁶; bezogen auf Benzochinon-(1.4) mit $E_0 = +696$ mV, Fehler: $\pm 3\%$.

Gewinnung der Rubromycine

*Kultivierung*³⁷): Der *Streptomyces* sp. Stamm Garda 1008 wurde 4–6 Wochen auf Glycerin/Glykokoll/Agar (nach v. Plotho) bei 28° bebrütet, das Mycel von insgesamt 10 Roux-Kolben mit je 20 ccm 0.85proz. NaCl-Lösung abgeschwemmt und zur Beimpfung von 10l Vorkultur (Nährlösung: 2% Glycerin, 2% Sojamehl, 1% Glykokoll, pH 7.0) verwendet. Man ließ 24 Stdn. bei 28° submers wachsen (konstant gehaltener pH-Wert 7.0–7.2) und überführte die Vorkultur in 120l Nährlösung (3% Glycerin, 0.2% Glykokoll, 0.1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0.1% Magnesiumsulfat, 0.05% Hefe-Extrakt (Difco), pH 7.0), die 4 Tage bei 28° submers kultiviert wurde. Als Antischaum-Mittel diente nach Bedarf Siliconöl E (Farbenfabriken Bayer AG). Mycel und Kulturlösung wurden nach Zentrifugieren getrennt.

Aufarbeitung der Kulturlösung: Die mit 5*n* HCl auf pH 3–4 eingestellte Kulturlösung extrahierte man im zweistufigen Zentrifugal-Separator (Fa. Westfalia) mit 50l Butanol (fast farblose wäbr. Phase verworfen) und verdampfte das Lösungsmittel des tiefroten Extraktes i. Vak. bei 60° Badtemperatur. Der ölige Rückstand wurde mit 5l Wasser versetzt und der Farbstoffanteil mit Chloroform ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschene und über Natriumsulfat getrocknete organische Phase (8–10l) lieferte nach Verdampfen des Lösungsmittels

³¹) K. Eckardt, Chem. Ber. **98**, 24 (1965).

³²) R. Paris und L. Prista, Ann. pharmac. franç. **12**, 375 (1954).

³³) J. Comin, O. Gonçalves de Lima, H. N. Grant, L. M. Jackman, W. Keller-Schierlein und V. Prelog, Helv. chim. Acta **46**, 409 (1963).

³⁴) G. Read und L. C. Vining, Chem. and Ind. **1963**, 1239.

³⁵) A. C. Baillie und R. H. Thomson, J. chem. Soc. [London] **1968**, 49.

³⁶) P. Boldt und H. Lackner, Chemie-Ing.-Techn. **35**, 707 (1963).

³⁷) Die mikrobiologischen Arbeiten verdanken wir Herrn Dr. R. Brinkmann.

i. Vak. einen öligen Rohextrakt, der beim Übergießen mit Petroläther/Äthanol (1:1) fest wurde. Ausb. 5 g dunkelrotes Pulver, das β -Rubromycin, β -Rubromycin-Derivate und Rubromycin-Begleitstoffe enthält^{25,38)}.

Aufarbeitung des Mycels: Das feuchte Mycel rührte man viermal mit je 20 l Aceton aus (letzter Auszug blaßrot bei nahezu farblosem Mycel), vereinigte die roten Auszüge, verdampfte das Lösungsmittel i. Vak. bei 40° Badtemperatur, übergießt mit 5 l 0.2 n HCl, extrahiert erschöpfend mit Chloroform und befreite die mit Wasser gewaschenen und mit Natriumsulfat getrockneten Auszüge i. Vak. vom Lösungsmittel. Der beim Verrühren mit Petroläther fest gewordene Verdampfungsrückstand wurde mit Sand verrieben, mit Petroläther zur Entfettung 48 Stdn. und anschließend mit Chloroform erschöpfend im Kreisprozeß extrahiert. Der tiefrote Chloroformextrakt hinterließ nach Verdampfen 16.8 g dunkelrotes, amorphes Rubromycin-Rohprodukt. Aus dem Extraktionsrückstand lösten organische Solvenzien keinen Farbstoff mehr, konz. Schwefelsäure oder 2 n NaOH gaben jedoch rote bzw. violette Lösungen.

Reinigung der Rubromycine: Eine Lösung von 6 g Rubromycin-Rohprodukt in Chloroform/Aceton (97 : 3) chromatographierte man an einer 120 × 5.2-cm-Säule aus Glutarsäure-Kieselgel G. Beim Nachwaschen mit dem Lösungsmittel (mit Glutarsäure gesättigt, Acetongehalt nach 10 l Durchlauf auf 5% erhöht) bildeten sich mehrere gelbe und rote schnell wandernde Zonen (unter ihnen eine rote, im UV-Licht gelb fluoreszierende Hauptzone), die zusammen aufgefangen wurden. Dahinter lief die breite, dunkelrote Hauptzone, deren Inhaltsstoff (3.3 g) chromatographisch einheitliches β -Rubromycin war [Dünnschichtchromatogramm an Glutarsäure-Kieselgel G, Chloroform/Aceton (93 : 7)]. Am Kopf der Säule verblieben dunkle, nicht näher untersuchte Produkte. Ausb. 80 mg β -Rubromycin je 1 l Kulturlösung.

Die Inhaltsstoffe der vor β -Rubromycin wandernden Zonen wurden an Oxalsäure-Kieselgel G (Säule 50 × 2.6 cm) aus Chloroform chromatographisch gereinigt. Es bildeten sich hinter mehreren blaßroten und blaßgelben Vorzonen drei gut getrennte Hauptzonen (von unten gezählt): 1. (rot) 5 mg ϵ -Rubromycin³⁸⁾, 2. (gelb) 25 mg δ -Rubromycin²⁵⁾, 3. (rot) 282 mg γ -Rubromycin, das im Dünnschichtchromatogramm [Oxalsäure-Kieselgel G, Chloroform/Aceton (95 : 5)] einheitlich war. Ausb. 7 mg γ -Rubromycin je 1 l Kulturlösung.

β -Rubromycin und seine Derivate

β -Rubromycin (11): β -Rubromycin kristallisiert aus Eisessig, Toluol oder Benzol in rubinroten Nadeln vom Schmp. 225–227° (Dunkelfärbung, ab 218° Erweichung). Es ist in Chloroform mäßig, in Aceton oder Benzol schwer, in Cyclohexan sehr schwer löslich. Durch Säuren (Oxalsäure, Mineralsäuren) oder Basen (Pyridin, 2 n NaOH) wird es rasch verändert. $R_F = 0.16$ [Glutarsäure-Kieselgel G, Chloroform/Aceton (93 : 7), γ -Rubromycin: $R_F = 0.40$].

$C_{27}H_{20}O_{12}$ (536.5) Ber. C 60.45 H 3.76 3 CH₃O 17.36

Gef.*) C 60.17 H 3.92 CH₃O 17.1

Äquiv.-Gew. 270 ± 5 [Potentiometrische Titration in Dimethylsulfoxid/Wasser (3 : 2) mit 0.1 n methanol. NaOH-Lösung]

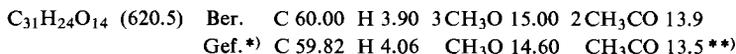
* 48 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

Mikrohydrierung: 30 mg β -Rubromycin wurden in 4 ccm Methanol/n NaOH (1:1) mit 50 mg Pd/Bariumsulfat bei 25° unter Wasserstoff geschüttelt. Die Wasserstoffaufnahme war nach 10 Min. beendet. Äquiv.-Gew. Ber. 536, Gef. 595.

β -Rubromycin-diacetat (1b): 400 mg β -Rubromycin, 40 ccm Acetanhydrid und 1 g wasserfreies Natriumacetat erwärmte man 24 Stdn. auf 75°, goß die gelbrot gewordene Lösung in

³⁸⁾ G. Schwantje, Dissertat., Univ. Göttingen 1967.

400 ccm Eiswasser und chromatographierte das ausgefallene Rohacetat an Glutarsäure-Kieselgel G (Säule 60 × 3.2 cm) aus Chloroform. Die dunkelgelbe Hauptzone lieferte 370 mg (80%) **1b**, das aus Benzol oder Äthanol/Chloroform (2 : 1) in gelben Nadeln kristallisierte. Ab 182° Zers. unter Rotfärbung. In Chloroform gut, in Benzol mäßig, in Äthanol oder Cyclohexan schwer löslich.



* 10 Stdn. bei 75° i. Hochvak. getrocknet.

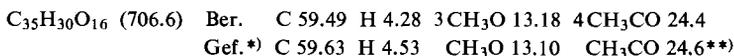
** Sauer verseift.

IR (CO): 1773, 1742, 1681 (Vorbande), 1658/cm.

NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 7.30, 7.20, 6.75$ ppm (3 Aromat/Olefin-H, Singulets); 3.92, 3.88 (3 Methoxyle); 3.46, 3.20 (CH₂-Gruppe, AB-Typ: $J = 18.0$ Hz); zwischen $\delta = 3.1$ bis 2.2 ppm undeutlich (4 Aliph-H, O-Acetyl z. Tl. überlagert); 2.33 (2 O-Acetylene).

Dihydro- β -rubromycin-tetraacetat: Eine Lösung von 183 mg β -Rubromycin-diacetat in 30 ccm Acetanhydrid rührte man 16 Stdn. bei 75° mit 2 g wasserfreiem Natriumacetat und 0.5 g Zinkstaub, goß die filtrierte, blaßgelbe Reaktionslösung in 400 ccm Eiswasser und chromatographierte den ausgefallenen Niederschlag (180 mg) an Oxalsäure-Kieselgel G (Säule 45 × 2.8 cm) aus Chloroform/Aceton (97 : 3).

Das aus der Hauptzone (im UV-Licht als Schatten sichtbar) eluierte Dihydro-tetraacetat (150 mg) wurde aus heißem Äthanol gefällt. Blaßgelbes Pulver vom Schmp. 230–232°; in Chloroform gut, in Äthanol oder Dioxan mäßig, in Cyclohexan sehr schwer löslich.



* 2 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

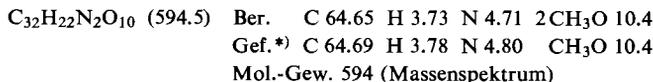
** Alkalisch verseift.

IR (CO): 1764, 1730/cm.

UV (Cyclohexan/Dioxan 9 : 1): λ_{max} (333), 309, (300), 250 m μ ³⁹).

NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 7.29, 7.18, 6.53$ ppm (3 Aromat/Olefin-H, Singulets); 3.88, 3.83 (3 Methoxyle); 3.50, 3.32 (CH₂-Gruppe, AB-Typ: $J = 17.0$ Hz); um $\delta = 2.97, 2.40$ ppm (Multipletts für 4 Aliph-H, O-Acetyl z. Tl. überlagert); 2.31, 2.26, 2.20 (4 O-Acetylene).

β -Rubromycin-chinoxalin (2a): 200 mg (0.37 mMol) β -Rubromycin in 40 ccm Eisessig versetzte man mit 80 mg (0.74 mMol) *o*-Phenylendiamin in 20 ccm Eisessig, hielt 4 Stdn. bei 60° und saugte den aus der violetten Lösung ausgefallenen, dunkelroten Niederschlag (112 mg) ab. 60 mg davon wurden an neutralem Kieselgel⁴⁰ (Säule 40 × 3.2 cm) aus Chloroform/Aceton (98 : 2) chromatographiert. Das aus der roten Hauptzone eluierte **2a** kristallisierte aus Pyridin/Dioxan (1:1) in roten Prismen (50 mg; Zers. ab 270°). Es ist in organischen Solvenzen schwer löslich. Die rote Chloroformlösung färbt sich beim Schütteln mit 1 Tropfen konz. HCl blau (λ_{max} (633), 605, 387, 361, 351, 315, 274 m μ). Die blaue Lösung in konz. Schwefelsäure wird langsam dunkelrot.



* 15 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet.

IR (CO): 1730, 1692/cm.

UV (Chloroform): λ_{max} 496, 365, 349, 319, 264 m μ .

³⁹) Wellenlängen in Klammern kennzeichnen Schultern der Absorptionskurve.

⁴⁰) H. Brockmann und W. Müller, Chem. Ber. **91**, 1920 (1958).

Der Chloroformextrakt des mit Wasser verdünnten Filtrates enthielt laut Dünnschichtchromatogramm [neutrales Kieselgel G, Chloroform/Aceton (95 : 5)] neben wenig **2a** mehrere blaue und violette nicht näher untersuchte Reaktionsprodukte.

β-Rubromycin-chinoxalin-diacetat (**2b**): 157 mg **2a**, 1 g wasserfreies Natriumacetat und 30 ccm Acetanhydrid rührte man 24 Stdn. bei 80°, goß die gelb gewordene Lösung in 300 ccm Eiswasser und chromatographierte den ausgefallenen Niederschlag aus Methylenchlorid/Aceton (97 : 3) an Weinsäure-Kieselgel G (Säule 60 × 3.0 cm). Das aus der gelbbraunen Hauptzone eluierte **2b** (143 mg) kristallisierte aus Chloroform (20 ccm) nach Zugabe von heißem Äthanol (50 ccm) in gelben Nadeln. Schmp. 281–282° (Dunkelfärbung). Es ist in Chloroform mäßig löslich, in Äthanol oder Cyclohexan unlöslich. Die gelbe Chloroformlösung färbt sich beim Schütteln mit 1 Tropfen konz. HCl karmesinrot (λ_{\max} 541 m μ).

C₃₆H₂₆N₂O₁₂ (678.6) Ber. C 63.72 H 3.86 N 4.13 2CH₃O 9.15 2CH₃CO 12.7
Gef.*) C 63.82 H 4.01 N 4.11 CH₃O 9.12 CH₃CO 12.7**)

*) 24 Stdn. bei 95° i. Hochvak. getrocknet.

***) Sauer verseift.

IR (CO): 1761, 1736/cm.

UV (Chloroform): λ_{\max} 459, 308 m μ .

NMR (CDCl₃, 60 MHz): δ = 15.25 ppm (OH, mit Phenazin-N cheliert); 8.02, 7.78 (Multipletts für 4 Aromat-H, A₂B₂-Typ); 7.32, 7.25, 6.92 (3 Aromat/Olefin-H, Singulett); 4.02, 3.92 (2 Methoxyle); zwischen δ = 3.8–2.5 ppm undeutlich (Aliph-H); 2.29, 2.24 (2 O-Acetyl).

β-Rubromycin-chinoxalin-triacetat (**2c**): 145 mg *β*-Rubromycin-chinoxalin kochte man mit 20 ccm Acetanhydrid und zwei Tropfen konz. Schwefelsäure 10 Min. unter Rückfluß, zersetzte überschüss. Acetanhydrid in 200 ccm Eiswasser und reinigte den ausgefallenen Niederschlag (170 mg) durch Chromatographie aus Methylenchlorid/Aceton (95 : 5) an Weinsäure-Kieselgel G (Säule 60 × 3.5 cm). Die gelbe Hauptzone (im UV-Licht gelbgrün fluoreszierend) enthielt 111 mg **2c**, das aus Äthanol/Chloroform (4 : 1) umgefällt wurde. Gelbes Pulver vom Schmp. 275–276° (ab 240° Dunkelfärbung). Es ist in organischen Solvenzien schwer löslich. Die blaßgelbe Chloroformlösung färbt sich beim Schütteln mit 1 Tropfen konz. HCl dunkelgelb (λ_{\max} 474, 440, 404, (387), 307 m μ).

C₃₈H₂₈N₂O₁₃ (720.6) Ber. C 63.33 H 3.92 N 3.89 2CH₃O 8.61 3CH₃CO 17.9
Gef.*) C 63.25 H 3.98 N 3.99 CH₃O 8.60 CH₃CO 17.9**)

*) 10 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

***) Sauer verseift.

IR (CO): 1761, 1733/cm.

UV (Chloroform): λ_{\max} 436, 414, (395), (329), 307 m μ .

γ -Rubromycin und seine Derivate

γ-Rubromycin (**12**): *γ*-Rubromycin kristallisiert aus Eisessig oder Benzol in roten Nadeln (Zers. ab 235°). Es ist in Chloroform mäßig, in Eisessig oder Benzol schwer löslich, in Cyclohexan oder Wasser unlöslich. Beim Erwärmen mit Basen (Pyridin, 2*n* NaOH) oder konz. Schwefelsäure wird es rasch verändert. R_F = 0.30 [Chloroform/Aceton (95 : 5)], 5,8-Dihydroxy-2,7-dimethoxy-naphthochinon-(1.4) (**3b**): R_F = 0.45].

C₂₆H₁₈O₁₂ (522.4) Ber. C 59.79 H 3.47 2CH₃O 11.88
Gef.*) C 59.65 H 3.45 CH₃O 11.70
Mol.-Gew. 522 (Massenspektrum), Äquiv.-Gew. 257 ± 5 **)

*) Aus Eisessig umkristallisiert und 10 Stdn. bei 100° getrocknet.

***) Potentiometrische Titration in Dimethylsulfoxid/Wasser (20 : 1) mit 0.1*n* methanol. NaOH-Lösung.

Mikrohydrierung: 20 mg γ -Rubromycin wurden in 4 ccm Methanol/*n* NaOH (1:1) mit 50 mg Pd/Bariumsulfat bei 25° unter Wasserstoff geschüttelt. Die Wasserstoffaufnahme war nach 10 Min. beendet. Äquiv.-Gew. Ber. 522, Gef. 602.

Umwandlung von β - in γ -Rubromycin: Eine Lösung von 200 mg β -Rubromycin in 50 ccm Chloroform verdünnte man mit 200 ccm Aceton, versetzte mit 1 ccm konz. HCl und kochte 50 Min. unter Rückfluß. Nach Zugabe von 200 ccm Chloroform wurde mehrfach mit reichlich Wasser durchgeschüttelt, die getrocknete organische Phase i. Vak. eingedampft und der Rückstand an einer 25 \times 2.5-cm-Säule aus Glutarsäure-Kieselgel G aus Methylenchlorid chromatographiert. Die rote Hauptzone enthielt 146 mg (75%) γ -Rubromycin, das in R_F -Wert, Analysenzahlen und spektroskopischen Daten mit aus Mycel gewonnenen Präparaten übereinstimmte.

Die am Kopf der Säule langsam wandernde blaue Zone wurde mit Aceton (1% 2*n* HCl enthaltend) eluiert und der rote Inhaltsstoff aus Chloroform an Oxalsäure-Kieselgel G (Säule 40 \times 2.5 cm) chromatographiert. Die beim Nachwaschen mit Chloroform wandernde rote Hauptzone lieferte 13 mg (7%) 7(2)-Desmethoxy-7(2)-hydroxy- γ -rubromycin (**4d/5d**), das aus Benzol mikrokristallin erhalten wurde. Ab 270° Zers. unter Dunkelfärbung. **4d/5d** ist in Chloroform oder Benzol schwer löslich, in Cyclohexan unlöslich und wird von wäbr. Natriumhydrogencarbonat mit rotvioletter Farbe aufgenommen. $R_F = 0.23$ [Chloroform/Aceton (93 : 7), γ -Rubromycin: $R_F = 0.38$].

$C_{25}H_{16}O_{12}$ (508.4) Ber. C 59.06 H 3.17 CH_3O 6.11 Gef.*) C 59.00 H 3.41 CH_3O 6.00

*) Aus Chloroform/Äthanol (1 : 5) umgefällt und 10 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

IR: 3369 (OH); 1733, 1686, 1600/cm (CO).

UV (Chloroform): λ_{max} 557, 518, 487, 364, 347, 317 m μ ; 2*n* NaOH (violett): 578, 552 m μ ; konz. Schwefelsäure (rot): 512, (485), (412), 392 m μ ; Acetanhydrid/Pyroboracetat (erhitzt, rotviolett): (592), 557, 526, 487, 453, 382 m μ .

Acetylierung von γ -Rubromycin: 250 mg γ -Rubromycin, 200 mg wasserfreies Natriumacetat, 12 ccm Acetanhydrid und 2 ccm Pyridin kochte man 5 Min., goß die gelb gewordene Lösung in Wasser und chromatographierte das in gelben Nadeln ausgefallene Reaktionsprodukt aus Methylenchlorid an saurem Kieselgel, wobei sich zwei Zonen bildeten.

γ -Rubromycin-diacetat: Der Inhaltsstoff der unteren Zone kristallisierte aus Methanol in gelbroten Nadelchen (15 mg) vom Schmp. 245–247° (Rotfärbung) und ist in Chloroform oder Benzol mäßig löslich.

$C_{30}H_{22}O_{14}$ (606.5) Ber. C 59.41 H 3.66 2 CH_3CO 14.18

Gef.*) C 59.64 H 3.82 CH_3CO 14.0**)

*) 8 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet.

***) Sauer verseift.

IR (CO): 1780, 1739, 1724, (1681), 1631, 1613/cm.

NMR (CDCl₃, 60 MHz): $\delta = 13.01$ ppm (cheliertes OH am Chromophor); 7.37, 7.28, 6.03 (3 Aromat/Olefin-H, Singulets); 3.94, 3.92 (2 Methoxyle); zwischen $\delta = 3.6$ –2.5 ppm sehr schwach (Aliphath-H); 2.36, 2.34 (2 O-Acetylc).

γ -Rubromycin-triacetat (4b** oder **5b**):** Das **4b** (oder **5b**) der oberen Zone, aus Eisessig hellgelbe Nadeln (200 mg) vom Schmp. 268–271° (ab 217° Rotfärbung, Zers.), ist in Chloroform, Benzol oder Eisessig schwer löslich.

$C_{32}H_{24}O_{15}$ (648.5) Ber. C 59.26 H 3.74 2 CH_3O 9.56 3 CH_3CO 19.9

Gef.*) C 59.20 H 3.84 CH_3O 9.1 CH_3CO 19.4**)

*) 12 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet.

***) Sauer verseift.

IR (CO): 1770, 1748, (1739), 1681 (Vorbande), 1647, 1618/cm.

Dihydro- γ -rubromycin-pentaacetat (8): 200 mg γ -Rubromycin, 30 ccm Acetanhydrid und 2 g wasserfreies Natriumacetat rührte man 4.5 Stdn. bei 80°, gab zur gelb gewordenen Lösungsportionsweise 0.5 g Zinkstaub und hielt noch 3 Stdn. bei 80°. Die filtrierte, farblose Reaktionslösung wurde in 400 ccm Eiswasser gegossen, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert, getrocknet und an Oxalsäure-Kieselgel G (Säule 50 \times 2.5 cm) aus Chloroform/Aceton (97 : 3) chromatographiert. Das aus der Hauptzone (im UV-Licht blau fluoreszierend) eluierte **8**, aus Äthanol/Chloroform (6 : 1) umgefällt ein blaßgelbes Pulver (133 mg) vom Schmp. 167 bis 168°, ist in Chloroform gut, in Äthanol mäßig, in Cyclohexan schwer löslich.

$C_{36}H_{30}O_{17}$ (734.6) Ber. C 58.72 H 4.12 $2CH_3O$ 8.45 $5CH_3CO$ 29.3
Gef.*) C 58.77 H 4.33 CH_3O 8.20 CH_3CO 28.8**)

*) 9 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet.

***) Alkalisch verseift.

IR (CO): 1770, 1739/cm.

NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ = 7.31, 7.21, 6.83 ppm (3 Aromat/Olefin-H, Singulets); 3.88, 3.82 (2 Methoxy); 3.45, 3.29 (CH_2 -Gruppe, AB-Typ: J = 17.5 Hz); 2.99, 2.30 (Multipletts für 4 Aliph-H, O-Acetyl z. Tl. überlagert); 2.36, 2.32, 2.29, 2.22 (5 O-Acetylene).

γ -Rubromycinsäure (4c/5c): 102 mg γ -Rubromycin und 5 g Natriumhydroxid verrieb man in 5 Min. zu einem rotvioletten Pulver, rührte dieses bei Raumtemperatur in 300 ccm Wasser, säuerte die violette Lösung mit 2 n H_2SO_4 an und extrahierte den ausgefallenen roten Niederschlag mit Äthylacetat. Der Verdampfungsrückstand der organischen Phase (75 mg) wurde an Oxalsäure-Kieselgel G (Säule 75 \times 4.5 cm) aus Chloroform/Aceton (9 : 1) chromatographiert. Das **4c/5c** der roten Hauptzone (66 mg), aus Äthylacetat oder Chloroform rote Nadeln (Zers. ab 274° unter Dunkelfärbung), ist in organischen Solvenzien schwer löslich. Die rote Chloroformlösung wird durch wäßr. Natriumhydrogencarbonat entfärbt (violettetes Salz an der Grenzschicht).

$C_{25}H_{16}O_{12}$ (508.4) Ber. C 59.06 H 3.17 CH_3O 6.11 Gef.*) C 58.90 H 3.26 CH_3O 6.11

*) 20 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet.

IR: 3400 (OH); 1724, 1674, 1591/cm (CO).

UV (Chloroform mit 2% Dioxan): λ_{max} 550 m μ (ϵ = 4500), 513 (7600), 485 (6900), 364 (10500), 348 (11800), 316 (21300); Acetanhydrid/Pyroboracetat (erhitzt, violett): λ_{max} 614, 574, 554, 519, 487, 381 m μ .

9 mg **4c/5c** in 20 ccm Chloroform versetzte man bei 0° mit überschüss. äther. Diazomethan, brachte nach 2 Min. i. Vak. zur Trockne und chromatographierte den Rückstand aus Methylchlorid an Oxalsäure-Kieselgel G (Säule 35 \times 2.0 cm). Die rote Hauptzone enthielt 4 mg γ -Rubromycin (**12**), das in R_F -Wert und IR-Spektrum mit authent. Präparat übereinstimmte.

γ -Rubromycin-monomethyläther (7c oder 7d): Eine Lösung von 145 mg γ -Rubromycin in 200 ccm Chloroform versetzte man bei 0° mit überschüss. äther. Diazomethan, engte die gelbrot gewordene Lösung nach 90 Min. i. Vak. auf 70 ccm ein und filtrierte durch eine 75 \times 3.2-cm-Säule aus Oxalsäure-Kieselgel G. Beim Nachwaschen mit Chloroform bildeten sich fünf Zonen (von unten beziffert): 1. rot, 20 mg Ausgangsprodukt; 2. dunkelgelb; 3. gelbrot; 4. gelbrot; 5. gelb.

7c (oder **7d**) aus Zone 2 kristallisierte aus Benzol in feinen, dunkelgelben Sternchen vom Schmp. 285—287° (ab 270° Dunkelfärbung). Ausb. 56 mg (38%). In Chloroform oder Benzol mäßig löslich, in Äthanol oder Cyclohexan unlöslich.

$C_{27}H_{20}O_{12}$ (536.5) Ber. C 60.45 H 3.76 $3CH_3O$ 17.36
Gef.*) C 60.90 H 3.87 CH_3O 17.10
Mol.-Gew. 536 (Massenspektrum)

*) 10 Stdn. bei 95° i. Hochvak. getrocknet.

IR (CO): 1730, 1681 (Schulter), 1669, 1626, 1600/cm.

UV (Chloroform): λ_{\max} 454 m μ ($\epsilon = 5500$), 365 (10900), 351 (11500), 311 (20500).

Die Inhaltsstoffe der anderen Zonen wurden nicht untersucht.

Brom- γ -rubromycin (7e): Eine Lösung von 261 mg (0.5 mMol) γ -Rubromycin in 120 ccm Chloroform rührte man bei Raumtemperatur mit 0.6 mMol Brom (in Chloroform gelöst) sowie 500 mg gepulvertem Silbernitrat, filtrierte nach 9 Stdn., brachte das Filtrat i. Vak. zur Trockne und chromatographierte den Verdampfungsrückstand aus Methylenchlorid an einer 50×2.7 -cm-Säule aus Oxalsäure-Kieselgel G, wo sich zwei rote Hauptzonen bildeten. Die untere enthielt 170 mg (57%) 7e, die obere 85 mg Ausgangsprodukt (identifiziert durch R_F -Wert und UV-Spektrum).

7e aus Chlorbenzol mikrokristallin, zersetzte sich ab 300° unter Dunkelfärbung und ist in Chloroform schwer, in Benzol sehr schwer löslich und in Cyclohexan unlöslich. $R_F = 0.43$ [Chloroform/Aceton (94 : 6), γ -Rubromycin: $R_F = 0.35$].

$C_{26}H_{17}BrO_{12}$ (601.3) Ber. C 51.93 H 2.85 Br 13.29 $2CH_3O$ 10.32
Gef.*) C 51.90 H 2.87 Br 13.90 CH_3O 10.13

* 24 Stdn. bei 130° i. Hochvak. getrocknet.

UV (Chloroform): λ_{\max} 550 ($\epsilon = 4550$), 513 (7700), 484 (7050), 376 (10400), 361 (11100), 323 m μ (20100).

Pyrolyse von γ -Rubromycin: 200 mg γ -Rubromycin wurden mit 2 g Seesand verrieben und bei 0.01 Torr im Sublimationsrohr rasch auf 280° erhitzt. Das Sublimat ließ sich aufgrund seiner Farbe in zwei Zonen trennen. Aus dem dunkelbraunen Pyrolyse-Rückstand war mit organischen Solvenzien kein Farbstoff mehr extrahierbar.

2.5.8-Trihydroxy-7-methoxy-naphthochinon-(1.4) (3a): Das Sublimat der vom Rückstand entfernteren Zone (rot, z. Tl. ölig, 8 mg) wurde aus Chloroform an einer 45×2.2 -cm-Säule aus Oxalsäure-Kieselgel G chromatographiert. Hinter vier gelbroten bzw. roten Zonen, deren Inhaltsstoffe wegen zu geringer Menge nicht untersucht wurden, wanderte 3a als rote Hauptzone. Aus Chloroform in roten Nadeln, nach Hochvak.-Sublimation (130°) Schmp. 224 bis 225° (Kofler-Block). Ausb. 3.6 mg (4%). 3a löst sich in wäßr. Natriumhydrogencarbonat mit roter Farbe. $R_F = 0.24$ [Chloroform/Aceton (95 : 5), 3b: $R_F = 0.45$].

$C_{11}H_8O_6$ (236.2) Gef. Mol.-Gew. 236 (Massenspektrum)

IR: 3450 (OH); 1603/cm (CO).

UV (Chloroform): λ_{\max} 557, 518, 487, 314, 278 m μ ; 2n NaOH (violett): λ_{\max} 564, 545 m μ ; konz. Schwefelsäure (rot): λ_{\max} 561, 524, 493 m μ ; Acetanhydrid/Pyroboracetat (erhitzt, karmesinrot): λ_{\max} 585, 542, 513, (480) m μ .

Das mit äther. Diazomethan erhaltene rote Methylierungsprodukt stimmte in R_F -Wert und Elektronenspektrum (Chloroform: λ_{\max} 551, 513, 480, 310, 288 m μ) mit 5.8-Dihydroxy-2.7-dimethoxy-naphthochinon-(1.4) (3b)^{13,14} überein.

γ -iso-Rubromycin (14a): Das Sublimat der zum Rückstand näheren Zone (gelbrot, 11 mg) chromatographierte man aus Chloroform/Aceton (98 : 2) an einer 55×3.2 -cm-Säule aus Oxalsäure-Kieselgel G. Dabei bildeten sich fünf gelbrote Zonen, von denen nur der Inhaltsstoff der Hauptzone (dritte von unten) untersucht wurde. Er war in R_F -Wert, IR- und Elektronenspektrum mit authent. γ -iso-Rubromycin identisch. Ausb. 7 mg.

α -Rubromycin und seine Derivate

α -Rubromycin (13): Eine Lösung von 250 mg β -Rubromycin in 15 ccm Pyridin kochte man 15 Min. unter Rückfluß. Nach Erkalten kristallisierte α -Rubromycin in roten Tafeln. Ausb. 220 mg. Zur Entfernung von Pyridinresten wurden 70 mg aus Chloroform/Aceton (92 : 8) an

einer 50×4.2 -cm-Säule aus saurem Kieselgel⁴⁰⁾ chromatographiert. Aus dem auf 30 ccm eingengten Eluat der gelbten Hauptzone kristallisierte **13** nach Zugabe von heißem Äthanol (60 ccm) in gelbten Nadeln vom Schmp. $278-281^\circ$ (Dunkelfärbung). Es ist in heißem Pyridin gut, in Chloroform oder Äthylacetat mäßig löslich und in Cyclohexan unlöslich.

$C_{27}H_{20}O_{12}$ (536.5) Ber. C 60.45 H 3.76 $3CH_3O$ 17.36

Gef.*) C 60.33 H 3.88 CH_3O 17.45

Mol.-Gew. 536 (Massenspektrum), Äquiv.-Gew. $269 \pm 5^{**}$)

*) 10 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

**) Potentiometrische Titration in Dimethylsulfoxid/Wasser (20:1) mit 0.1 *n* methanol. NaOH-Lösung.

Mikrohydrierung: 18 mg α -Rubromycin in 4 ccm Methanol/Pyridin (1:1) wurden mit 50 mg Pd/Bariumsulfat bei 25° unter Wasserstoff geschüttelt. Die Wasserstoffaufnahme war nach 10 Min. beendet. Äquiv.-Gew. Ber. 536, Gef. 564.

α -Rubromycin-triacetat (**9b**): 250 mg β -Rubromycin kochte man 15 Min. mit 25 ccm Pyridin unter Rückfluß, brachte auf 80° , versetzte mit 25 ccm Acetanhydrid, goß die nach 12 Stdn. gelbbraun gewordene Lösung in 400 ccm Eiswasser und chromatographierte den ausgefallenen Niederschlag aus Chloroform/Aceton (95:5) an Oxalsäure-Kieselgel G (Säule 60×3.2 cm). Das aus der gelben Hauptzone erhaltene **9b** (245 mg) kristallisierte (in Chloroform gelöst und mit dem 5-fachen Vol. heißem Äthanol versetzt) in gelben Säulen vom Schmp. $260-264^\circ$ (sintert ab 240° , dunkelrote Schmelze). Es ist in Chloroform gut, in Äthanol mäßig löslich und in Cyclohexan unlöslich.

$C_{33}H_{26}O_{15}$ (662.6) Ber. C 59.82 H 3.96 $3CH_3O$ 14.05 $3CH_3CO$ 19.5

Gef.*) C 59.72 H 4.04 CH_3O 14.09 CH_3CO 19.0**)

*) 10 Stdn. bei 75° i. Hochvak. getrocknet.

**) Sauer verseift.

IR (CO): 1773, 1739, 1667/cm.

NMR ($CDCl_3$, 60 MHz): $\delta = 7.40, 7.37, 6.82, 6.56$ ppm (4 Aromat/Olefin-H, Singulets); 4.02, 3.97, 3.95 (3 Methoxyle); 3.10 (Singulett, 4 Aliphat-H); 2.47, 2.41 (3 O-Acetylen).

Dihydro- α -rubromycin-pentaacetat (**10a**): Zu einer auf 80° erwärmten Lösung von 227 mg **9b** in 10 ccm Acetanhydrid/1 ccm Pyridin gab man innerhalb von 15 Min. portionsweise 0.5 g Zinkstaub, zerstörte nach 6 Stdn. überschüss. Acetanhydrid in Eiswasser und chromatographierte den ausgefallenen blaßgelben Niederschlag aus Chloroform/Aceton (97:3) an Oxalsäure-Kieselgel G (Säule 45×2.8 cm). Hinter gelben und blaßgelben Vorzonen wanderte **10a** (im UV-Licht als Schatten sichtbar), das aus Chloroform (mit Aktivkohle aufgekocht und filtriert) nach Zugabe des 4-fachen Vol. Äthanol in gelblichen Nadeln (245 mg) vom Schmp. $243-245^\circ$ (Rotfärbung) kristallisierte. **10a** ist in Chloroform gut, in Äthanol oder Dioxan mäßig, in Cyclohexan schwer löslich.

$C_{37}H_{32}O_{17}$ (748.7) Ber. C 59.36 H 4.31 $5CH_3CO$ 28.7

Gef.*) C 58.79 H 4.35 CH_3CO 28.5**)

*) 5 Stdn. bei 75° i. Hochvak. getrocknet.

**) Alkalisch verseift.

IR (CO): 1764, 1736/cm.

UV (Chloroform): λ_{max} (362), 334 m μ ($\epsilon = 18300$), 298 (17500), 286 (17000), 261 (76800).

NMR ($CDCl_3$, 60 MHz): $\delta = 7.33, 7.27, 6.64, 6.37$ ppm (4 Aromat/Olefin-H, Singulets); 3.93 (3 Methoxyle); 3.08 (Singulett, 4 Aliphat-H); 2.46, 2.38, 2.37 (5 O-Acetylen).

Methylierung mit Diazomethan: Eine Suspension von 150 mg α -Rubromycin in 200 ccm Chloroform versetzte man bei 0° mit überschüss. äther. Diazomethan, engte nach 5 Stdn.

(alles Ausgangsprodukt war gelöst) i. Vak. auf 100 ccm ein und chromatographierte das Methylierungsprodukt an einer 70 × 3.2-cm-Säule aus Oxalsäure-Kieselgel G.

Beim Nachwaschen mit Chloroform bildeten sich zwei gelbrote Hauptzonen.

α-Rubromycin-monomethyläther (9c): Das 9c der unteren Zone, aus Äthanol/Chloroform (2: 1) zweimal umgefällt ein gelbrotes Pulver (46 mg, 30%) vom Schmp. 304–305° (ab 290° Dunkelfärbung), ist in Chloroform schwer löslich und in Äthanol oder Cyclohexan unlöslich. $R_F = 0.26$ [Chloroform/Aceton (95: 5)]; *α*-Rubromycin: $R_F = 0.1$].

$C_{28}H_{22}O_{12}$ (550.5) Ber. C 61.09 H 4.03 4CH₃O 22.55 Gef.*) C 60.43 H 4.22 CH₃O 22.35
*) 24 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

IR (CO): 1724, 1686, 1637/cm.

α-Rubromycin-dimethyläther (9d): Das 9d der oberen Zone kristallisierte aus Chloroform nach Zugabe von heißem Äthanol (gleiches Vol.) in gelbten Rhomben vom Schmp. 285 bis 286°. Ausb. 108 mg (69%). Es löst sich mäßig in Chloroform und ist in Äthanol oder Cyclohexan unlöslich. $R_F = 0.18$ [Chloroform/Aceton (95: 5)]; *α*-Rubromycin: $R_F = 0.1$].

$C_{29}H_{24}O_{12}$ (564.5) Ber. C 61.70 H 4.28 5CH₃O 27.5
Gef.*) C 61.36 H 4.31 CH₃O 27.5 Mol.-Gew. 564 (Massenspektrum)

*) 24 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

IR (CO): 1732, 1637/cm.

α-Rubromycin-trimethyläther (9e): 1.0 g *α*-Rubromycin und 12 g wasserfreies Natriumcarbonat wurden in einer Mischung aus 30 ccm *o*-Dichlorbenzol und 12 g *p*-Toluolsulfonsäuremethylester 30 Min. unter Rückfluß gerührt. Das gelbbraune Reaktionsgemisch verdünnte man mit 200 ccm Ligroin, saugte den ausgeflockten Niederschlag samt Natriumcarbonat ab, wusch mit reichlich Ligroin und extrahierte den Filtrerrückstand im Kreisprozeß mit Chloroform. Den i. Vak. auf 100 ccm eingengten Extrakt filtrierte man durch eine 60 × 3.5-cm-Säule aus Kieselgel G (E. Merck, unbehandelt). Die beim Nachwaschen mit Chloroform/Aceton (88: 12) wandernde gelbe Hauptzone enthielt 775 mg 9e, das durch zweimalige Kristallisation aus Eisessig (250 ccm, dunkelgelbe Nadeln) vollends gereinigt wurde. Ausb. 617 mg (57%). Schmp. 272–273° (Rotfärbung). In Chloroform mäßig, in Benzol oder Cyclohexan sehr schwer löslich. $R_F = 0.14$ [Chloroform/Aceton (95: 5)]; *α*-Rubromycin: $R_F = 0.1$].

$C_{30}H_{26}O_{12}$ (578.5) Ber. C 62.28 H 4.53 6CH₃O 32.2
Gef.*) C 62.03 H 4.68 CH₃O 32.4 Mol.-Gew. 578 (Massenspektrum)

*) 10 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet.

IR (CO): 1736, 1656/cm.

UV (Chloroform, gelb): λ_{max} 427 m μ ($\epsilon = 4000$), 376 (7250), 347 (11000), 304 (21000).

γ -iso-Rubromycin und seine Derivate

γ-iso-Rubromycin (14a): a) Aus *γ*-Rubromycin (12) mit Pyridin: Eine Lösung von 150 mg 12 in 25 ccm Pyridin kochte man 30 Min. unter Rückfluß, verdampfte das Lösungsmittel i. Vak. und trocknete den gelbten Rückstand 2 Stdn. bei 100°/0.01 Torr. Zur Entfernung von Pyridinresten wurden 50 mg in der ausreichenden Menge Chloroform an saurem Kieselgel (Säule 60 × 4.5 cm) chromatographiert. Aus dem auf 50 ccm eingengten Chloroform-Eluat der gelbten Hauptzone kristallisierte *γ*-iso-Rubromycin. Ausb. 90%.

b) Aus *γ*-Rubromycin (12) mit konz. Schwefelsäure: 100 mg 12 löste man in 10 ccm konz. Schwefelsäure, erwärmte 10 Min. auf 100° und goß in 200 ccm Eiswasser. Das ausgefallene rote *γ*-iso-Rubromycin (88 mg) war chromatographisch einheitlich. Aus der Mutterlauge erhielt man nach Extraktion mit reichlich Chloroform weitere 12 mg *γ*-iso-Rubromycin.

c) *Aus α -Rubromycin (13)*: Durch eine Lösung von 100 mg **13** in 500 ccm Chloroform leitete man bei Raumtemperatur 6 Stdn. trockenes *HCl-Gas*, ließ über Nacht stehen, kochte 20 Min. unter Rückfluß und verdampfte das Chloroform i. Vak. Der rote Verdampfungsrückstand wurde aus Chloroform/Aceton (98 : 2) an Oxalsäure-Kieselgel G (Säule 60 \times 4.8 cm) chromatographiert. Von mehreren schmalen, gelbroten Zonen trennte sich die gelbrote Hauptzone, deren Eluat beim Eindampfen 59 mg (61 %) γ -*iso-Rubromycin* hinterließ.

γ -*iso-Rubromycin* kristallisiert aus Eisessig oder Chloroform (beim Eindunsten) in feinen, roten Nadelchen (Zers. ab 295° unter Dunkelfärbung). Es ist in Pyridin gut, in Chloroform sehr schwer löslich, in Cyclohexan unlöslich. $R_F = 0.29$ [Chloroform/Aceton (94 : 6); γ -Rubromycin: $R_F = 0.34$].

$C_{26}H_{18}O_{12}$ (522.4) Ber. C 59.79 H 3.47 2 CH_3O 11.88

Gef. *) C 59.80 H 3.42 CH_3O 11.85 Mol.-Gew. 522 (Massenspektrum)

*) 10 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet.

γ -*iso-Rubromycin-tetraacetat (14b)*: 300 mg γ -*Rubromycin* kochte man in 25 ccm *Pyridin* 15 Min. unter Rückfluß, versetzte bei 80° mit 25 ccm *Acetanhydrid* und goß die gelbbraun gewordene Lösung nach 6 Stdn. in 400 ccm Eiswasser. Der ausgefallene und getrocknete Niederschlag wurde aus Chloroform/Aceton (99 : 1) an Oxalsäure-Kieselgel G (Säule 60 \times 4.0 cm) chromatographiert. Die breite, blaßgelbe Hauptzone enthielt 266 mg (67 %) **14b**, das aus Äthanol/Chloroform (4 : 1) in gelben Prismen vom Schmp. 221–223° (Rotfärbung) kristallisierte. Es löst sich gut in Chloroform, schwer in Äthanol oder Cyclohexan.

$C_{34}H_{26}O_{16}$ (690.6) Ber. C 59.13 H 3.80 2 CH_3O 8.99 4 CH_3CO 24.9

Gef. *) C 59.12 H 3.90 CH_3O 8.94 CH_3CO 24.5 **)

*) 12 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

** Sauer verseift.

IR (CO): 1773, 1739, 1669/cm.

NMR ($CDCl_3$, 60 MHz): $\delta = 7.38, 7.35, 6.88, 6.50$ ppm (4 Aromat/Olefin-H, Singulett); 3.95 (2 Methoxy); 3.09 (Singulett, 4 Aliph-H); 2.47, 2.43, 2.40 (4 O-Acetylene).

Dihydro- γ -iso-rubromycin-hexaacetat (10b): Zu 200 mg γ -*iso-Rubromycin-tetraacetat* in 10 ccm *Acetanhydrid* gab man 1 g wasserfreies *Natriumacetat* und 0.5 g *Zinkstaub*, rührte 5 Stdn. bei 75°, filtrierte und goß das farblose Filtrat in 250 ccm Eiswasser. Die Chloroformlösung des Niederschlags (185 mg) wurde an einer 50 \times 2.5-cm-Säule aus Oxalsäure-Kieselgel G chromatographiert. Das mit Chloroform/Aceton (95 : 5) eluierte **10b** (im UV-Licht als Schatten sichtbar), aus Chloroform durch Zugabe von heißem Äthanol (vierfaches Vol.) umgefällt ein farbloses Pulver (167 mg) vom Schmp. 199–200°, ist in Chloroform gut, in Äthanol mäßig und in Cyclohexan sehr schwer löslich.

$C_{38}H_{32}O_{18}$ (776.7) Ber. C 58.76 H 4.15 2 CH_3O 7.99 6 CH_3CO 33.2

Gef. *) C 58.86 H 4.38 CH_3O 7.80 CH_3CO 33.3 **)

*) 12 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

** Alkalisch verseift.

IR (CO): 1773, 1739/cm.

NMR ($CDCl_3$, 60 MHz): $\delta = 7.35, 7.27, 7.00, 6.25$ ppm (4 Aromat/Olefin-H, Singulett); 3.92 (2 Methoxy); 3.08 (Singulett, 4 Aliph-H); 2.48, 2.40, 2.36 (6 O-Acetylene).

[298/68]