

211. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten.

5. Mitteilung¹⁾.

Über das Lacton der β -Hydroxy- α , α' , γ -trimethyl-pimelinsäure, ein Abbauprodukt von Narbomycin, Pikromycin und Methymycin

von R. Anliker, D. Dvornik, K. Gubler, H. Heusser und V. Prelog.

(27. VIII. 56.)

Die Oxydation des vor kurzem beschriebenen Antibioticums Narbomycin²⁾, $C_{28}H_{49}O_7N$, mit Kaliumpermanganat in Aceton lieferte ein Reaktionsgemisch, aus dem in Form seines kristallinen Methylesters ein Carboxy-lacton, $C_{10}H_{16}O_4$, isoliert werden konnte. Das freie kristalline Carboxy-lacton, dessen Methylester mit demjenigen des Oxydationsproduktes aus Narbomycin identisch war, wurde durch Oxydation des Antibioticums Pikromycin³⁾, $C_{25}H_{43}O_7N$, mit Kaliumpermanganat erhalten. Als wir unsere Ergebnisse Professor C. Djerassi, Wayne University, mitteilten, konnte in seinem Laboratorium das gleiche Carboxy-lacton und sein Methylester auch durch Kaliumpermanganat-Oxydation des mit Pikromycin isomeren Antibioticums Methymycin⁴⁾, $C_{25}H_{43}O_7N$, gewonnen werden.

Folgende Ergebnisse zeigen, dass das Carboxy-lacton $C_{10}H_{16}O_4$ die Konstitution I eines Lactons der β -Hydroxy- α , α' , γ -trimethyl-pimelinsäure besitzt. Die Oxydation nach *Kuhn-Roth* weist auf die Anwesenheit von 3 C-Methyl-Gruppen hin. Das IR.-Absorptionsspektrum des freien Carboxy-lactons und seines Methylesters (Fig. 1, Kurve 1 und 2) schliessen die Möglichkeit aus, dass es sich um ein γ -Lacton handelt.

Durch Pyrolyse geht das Carboxy-lacton in ein Gemisch von zwei Säuren über, von welchen die erste eine ungesättigte Dicarbonsäure, $C_{10}H_{16}O_4$, und die zweite, welche nicht isoliert wurde, wahrscheinlich die daraus durch Decarboxylierung entstandene unge-

¹⁾ 4. Mitt.: Helv. **39**, 304 (1956).

²⁾ R. Corbaz, L. Ettlinger, E. Gäumann, W. Keller, F. Kradolfer, E. Kyburz, L. Neipp, V. Prelog, P. Reusser & H. Zähler, Helv. **38**, 935 (1955).

³⁾ a) H. Brockmann & W. Henkel, Chem. Ber. **84**, 284 (1951). – b) H. Brockmann & R. Strube, Chem. Ber. **86**, 876 (1953). – c) H. Brockmann, H.-B. König & R. Oster, Chem. Ber. **87**, 856 (1954). – d) H. Brockmann & R. Oster, Naturwissenschaften **42**, 155 (1955).

⁴⁾ a) M. M. Donin, J. Pagano, J. D. Dutcher & C. M. McKee, Antibiotics Annual 1953–1954, Medical Encyclopaedia, Inc., New York, S. 179. – b) C. Djerassi, A. Bowers & H. N. Khastgir, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1729 (1956). – c) C. Djerassi, A. Bowers, R. Hodges & B. Riniker, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1733 (1956). – d) C. Djerassi & J. A. Zderic, J. Amer. chem. Soc. **78**, 2907 (1956). – e) C. Djerassi & J. A. Zderic, J. Amer. chem. Soc. im Druck. Wir danken Herrn Professor C. Djerassi für die Bekanntgabe seiner Ergebnisse vor der Veröffentlichung.

sättigte Monocarbonsäure darstellt. Das Mengenverhältnis der beiden Pyrolysenprodukte hängt von den Reaktionsbedingungen ab.

Die ungesättigte Dicarbonsäure $C_{10}H_{16}O_4$ weist im UV. ein Absorptionsmaximum bei $216 m\mu$ ($\log \epsilon = 3,96$) auf und besitzt offenbar die Konstitution II, da sie bei der Ozonisierung Brenztraubensäure und meso- α, α' -Dimethyl-glutarsäure (III) liefert. Dem Carboxy-lacton kommt demnach die Konstitution I zu.

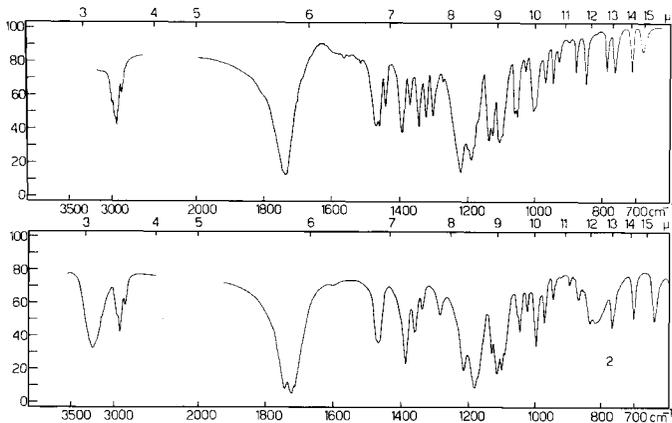
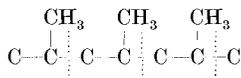


Fig. 1.

Die Isolierung des gleichen Carboxy-lactons I aus den Oxydationsprodukten der drei erwähnten Antibiotica – Narbomycin, Pikromycin und Methymycin – zeigt, dass diese die Teilstruktur



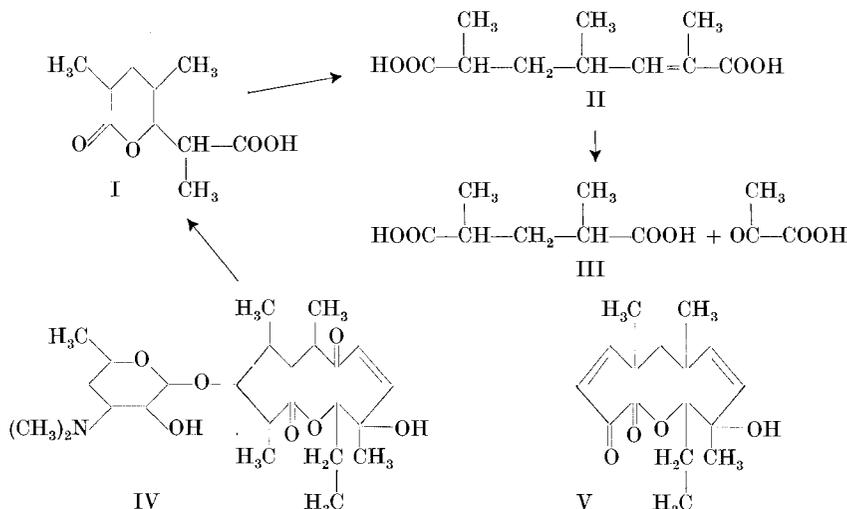
besitzen und somit zu den Verbindungen gehören, welche in diesem Teil der Molekel aus Propionsäure-Einheiten aufgebaut sind⁵⁾ ebenso wie das Aglykon des Antibioticums Erythromycins, das Erythronolid⁶⁾.

Die Konstitution des Methymycins konnte inzwischen von *C. Djerassi & J. A. Zderic*^{4d, e)} aufgeklärt werden. Die von ihnen aufgestellte Konstitutionsformel IV beruht zum grossen Teil auf der Konstitution des Carboxy-lactons I. Die Veröffentlichung der Untersuchungen der amerikanischen Autoren hat uns dazu bewogen unsere Ergebnisse zu publizieren, obwohl die Konstitutionsermittlung des Narbomycins und des Pikromycins noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Wir werden darüber in einer späteren Mitteilung berichten. Vorläufig sei nur erwähnt, dass die Bildung des Carboxy-

⁵⁾ Vgl. *R. B. Woodward*, *Angew. Chem.* **68**, 13 (1956).

⁶⁾ Vgl. *P. F. Wiley, K. Gerzon, E. H. Flynn, M. V. Sigal, jr., U. C. Quarck & O. Weaver*, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 3677 (1955), und frühere Mitt.

lactons I bei der Oxydation von Pikromycin im Widerspruch mit der vor kurzem^{3,4)} für das Abbauprodukt des Pikromycins, das Kromycin, vorgeschlagenen arbeitshypothetischen Formel V steht.



Wir danken den Hrn. Dr. L. Ettlinger und Dr. H. Zähler vom Institut für spezielle Botanik der ETH, Zürich, für die mikrobiologische Bereitung der verwendeten Antibiotica und der CIBA Aktiengesellschaft in Basel für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil⁷⁾.

Oxydation von Narbomycin mit Kaliumpermanganat. Zu 1,02 g Narbomycin in 25 cm³ Aceton wurden im Verlaufe 1 Std. 106 cm³ einer 5-proz. Kaliumpermanganat-Lösung zusetropft. Das Oxydationsgemisch liess man über Nacht stehen, versetzte es dann mit 35 g Natriumsulfit und 120 cm³ verd. Schwefelsäure und schüttelte mit Äther aus. Die mit 5-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschenen und mit Natriumsulfat getrockneten ätherischen Auszüge hinterliessen beim Eindampfen nur 32 mg neutrale Anteile. Durch Ansäuern der wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Auszüge mit 25-proz. Salzsäure und Ausziehen mit Äther wurden 0,45 g saure Oxydationsprodukte erhalten. Die papierchromatographische Untersuchung mit Alkohol-Ammoniak-Wasser-(8:1:1)-Gemisch⁸⁾ auf Whatman-Filterpapier Nr. 1 zeigte, dass diese mindestens 4 verschiedene Säuren enthalten.

Die sauren Oxydationsprodukte aus 4 Ansätzen mit je 1,02 g Narbomycin wurden vereinigt und in Äther gelöst, wobei 0,18 g in Äther unlösliche Anteile abgetrennt werden konnten. Die in Äther löslichen Säuren wurden mit überschüssiger ätherischer Diazomethan-Lösung in ihre Methylester übergeführt. Der Rückstand nach dem Abdestillieren des Äthers wurde zuerst bei gewöhnlichem Druck bis 145° erhitzt, es konnten jedoch dabei keine flüchtigen Methylester erhalten werden. Die rohen Methylester, 1,69 g, wurden darauf zuerst im gewöhnlichen Vakuum und dann im Hochvakuum in einem Kragenkölbehen destilliert und das Destillat, 0,92 g, in einer Mikrokolonne nach Craig sorgfältig fraktioniert.

⁷⁾ Alle Smp. sind korrigiert.

⁸⁾ Vgl. A. R. Jones, E. J. Dowling & W. J. Skraba, Anal. Chemistry **25**, 394 (1953). Zum Sprühen wurde die von H. Kalbe, Z. Physiol. Chemistry **297**, 19 (1954), vorgeschlagene gepufferte Methylrot-Lösung verwendet.

Fraktion	Badtemperatur	Druck mm	Menge mg
1	92—95°	10	70
2	95—145°	10	151
3	100—102°	0,1	51
4	104—106°	0,03	234
5	118°	0,03	87

Die flüssige Fraktion 1 zeigte ein $[\alpha]_D = +8,5^{\circ}$ ($c = 2,36$, Methanol).

$C_{10}H_{20}O_5$ Ber. C 54,53 H 9,15 CH_3O 14,08%
 Gef. „ 54,85 „ 9,03 „ 14,22%

Die kristalline Fraktion 4 wurde zuerst mit kaltem Pentan gewaschen, worauf der unlösliche Teil zweimal aus Methanol umkristallisiert wurde. Zur Analyse wurde im Hochvakuum sublimiert; Smp. 75,5—76,5°, $[\alpha]_D = +42^{\circ}$ ($c = 3,29$, Methanol).

$C_{11}H_{18}O_4$ Ber. C 61,66 H 8,47 CH_3O 14,11 $CH_3(C)$ 7,35%
 Gef. „ 61,12 „ 8,62 „ 14,24 „ 16,97%

IR.-Absorptionsspektrum in $KBr^9)$ s. Fig. 1, Kurve 1.

Oxydation von Pikromycin mit Kaliumpermanganat. Zu 2,13 g Pikromycin in 30 cm³ 5-proz. Natriumcarbonat-Lösung und 120 cm³ Aceton wurden bei Zimmertemperatur innerhalb 1 Std. 350 cm³ einer 5-proz. Kaliumpermanganat-Lösung portionenweise zugefügt. Nach 2 Std. Stehen wurde das Aceton im Vakuum bei 40° abdestilliert und der wässrige Destillationsrückstand mit Äther ausgezogen. Die mit Wasser gewaschenen und mit Natriumsulfat getrockneten ätherischen Auszüge hinterliessen beim Eindampfen 0,15 g neutrale Anteile. Die alkalische wässrige Lösung wurde mit verd. Schwefelsäure angesäuert und im *Kutscher-Stuedel*-Apparat extrahiert. Durch Eindampfen des mit Natriumsulfat getrockneten ätherischen Extraktes erhielt man 1,015 g ölige, saure Oxydationsprodukte, die stark nach Essigsäure rochen. Nach der Entfernung der leicht flüchtigen Säuren durch Destillation im Hochvakuum bei 35° blieben 0,813 g schwer flüchtige saure Oxydationsprodukte zurück. Durch papierchromatographische Untersuchung mit Alkohol-Ammoniak-Wasser (8:1:1) auf *Whatman*-Filterpapier Nr. 1 liessen sich in diesem Reaktionsgemisch 3 Säuren nachweisen. Zur Isolierung des Carboxylactons I wurden die nichtflüchtigen sauren Oxydationsprodukte an einer Papiersäule aus 220 g Cellulosepulver (*Whatman* Standard Grade) chromatographiert. Die Papiersäule, die sich in einem Rohr von 3,2 cm Durchmesser befand, wurde vor der Verwendung 20 Std. mit Alkohol-Ammoniak-Wasser (8:1:1) gewaschen, wonach die Eluate nach dem Eindampfen keinen Rückstand mehr hinterliessen. Die Substanz wurde in 3 cm³ Alkohol-Ammoniak-Wasser (8:1:1) aufgetragen und mit demselben Lösungsmittel-Gemisch eluiert, wobei man mit einem automatischen Fraktionensammler Fraktionen von je 12 cm³ getrennt auffing. Um den Fraktionierungsvorgang zu verfolgen, wurden von jeder Fraktion 0,2 cm³ mit dem erwähnten Lösungsmittel-Gemisch auf *Whatman*-Filterpapier Nr. 1 chromatographiert.

Die Fraktionen 34—37, welche nach der papierchromatographischen Untersuchung eine Säure mit $R_f = 0,52$ enthielten, wurden bei 40° im Vakuum eingedampft. Den Rückstand versetzte man mit 2-n. Salzsäure und extrahierte im *Kutscher-Stuedel*-Apparat mit Äther. Das durch Eindampfen der ätherischen Auszüge erhaltene rohe Carboxylacton I (95 mg) wurde zur Analyse viermal aus Aceton-Hexan umkristallisiert; Smp. 124—125°, $[\alpha]_D = +33^{\circ}$ ($c = 0,797$, Chloroform).

$C_{10}H_{16}O_4$ Ber. C 59,98 H 8,05% Gef. C 59,75 H 8,34%
 pK_{MCS}^{*10} 6,72 Äqu.-Gew. Ber. 200,23 Gef. 209

⁹⁾ Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem *Perkin-Elmer*-double-beam-Spectrograph von Frl. *E. Aeberli* aufgenommen.

¹⁰⁾ *W. Simon, E. Kováts, L. H. Chopard-dit-Jean & E. Heilbronner, Helv. 37, 1872 (1954).*

Die Verbindung zeigt im UV. keine Absorption. IR.-Absorptionsspektrum in KBr⁹⁾ s. Fig. 1, Kurve 2.

31 mg Carboxy-lacton wurden in 10 cm³ Methylenchlorid gelöst und bei 0° mit 15 cm³ einer ätherischen Diazomethan-Lösung versetzt. Der nach dem Eindampfen der Lösung erhaltene *Methylester* schmolz nach Sublimation im Hochvakuum bei 74–76° und gab mit dem Präparat aus Narbomycin keine Smp.-Erniedrigung.

C₁₁H₁₈O₄ Ber. C 61,66 H 8,47% Gef. C 61,59 H 8,47%

Das IR.-Absorptionsspektrum war mit demjenigen des Präparates aus Narbomycin identisch.

Pyrolyse des Carboxy-lactons I. 20 mg des Carboxy-lactons wurden in einem Glasrohr von 5 mm Durchmesser und 10 cm Länge im Hochvakuum eingeschmolzen und vollständig eingetaucht in einem Ölbad auf 200–205° erhitzt. Darauf destillierte man das entstandene Öl in einem Sublimierblock in eine Spitze des Röhrchens. Das Röhrchen wurde nach dem Erkalten in ein beiderseits offenes Glasrohr gebracht, welches von einer Seite mit einer Zuleitung von trockenem, kohlendioxidfreiem Stickstoff und von der anderen Seite über einen Polyäthylenschlauch, einen Ritzhahn sowie zwei Kühlschlangen mit einer Hochvakuumpumpe verbunden war. Die erste von den Kühlfallen war mit Trockeneis-Aceton, die zweite mit flüssiger Luft gekühlt. Nachdem die Apparatur mit Stickstoff gespült und auf 2 Torr evakuiert worden war, wurde die substanzfreie Spitze des Röhrchens durch Biegen des Polyäthylenschlauches abgebrochen und das gebildete Kohlendioxid mit Stickstoff in die mit flüssiger Luft gekühlte Kühlfalle übergeführt. Durch Messen im geeichten Vakuumsystem der Apparatur nach *R. C. Anderson, Y. Delabarre & A. A. Bothner-By*¹¹⁾ konnte festgestellt werden, dass 0,6 mg Kohlendioxid (14% d. Th.) abgespalten wurden.

Das ölige Produkt der Pyrolyse des Carboxy-lactons I erwies sich als ein Gemisch von zwei Säuren, die bei der papierchromatographischen Untersuchung mit Alkohol-Ammoniak-Wasser (8:1:1) die Rf-Werte 0,57 bzw. 0,81 zeigten. Durch präparative Papierchromatographie mit demselben Lösungsmittelgemisch an *Whatman*-Filterpapier Nr. 1, das vor der Benützung 3 Tage im Extraktionsapparat mit Methanol und Chloroform extrahiert wurde, erhielten wir 7,2 mg der ungesättigten Dicarbonsäure II mit Rf = 0,57. Zur Analyse wurde das Produkt im Hochvakuum destilliert.

C₁₀H₁₆O₄ Ber. C 59,98 H 8,05% Gef. C 59,95 H 8,86%
pK_{MCS}^{*} 7,69 Äqu.-Gew. Ber. 100,12 Gef. 107

Die Verbindung zeigte in Feinsprit das für α , β -ungesättigte Säuren charakteristische Maximum bei 216 μ ($\log \epsilon = 3,96$).

Abbau der ungesättigten Dicarbonsäure II mit Ozon. Durch eine Lösung von 7 mg der ungesättigten Dicarbonsäure II aus einem zweiten Ansatz in 2 cm³ Äthylchlorid leitete man bei –80° ein 2-proz. Ozon-Sauerstoff-Gemisch bis zur Blaufärbung der Lösung. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Ozonid durch 1stündiges Kochen mit 2,5 cm³ Wasser zersetzt.

0,25 cm³ der wässrigen Lösung wurden zum Nachweis der Brenztraubensäure nach *A. I. Virtanen, J. K. Miettinen & H. Kunttu*¹²⁾ verwendet. Durch Versetzen mit 5 cm³ 0,2-proz. Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2-n. Salzsäure wurde daraus das 2,4-Dinitrophenylhydrazon bereitet, das mit Äthylacetat extrahiert wurde. Das durch Ausschütteln mit 10-proz. Natriumcarbonat-Lösung, Ansäuern mit 2-n. Salzsäure und Aufnehmen in Äthylacetat vorgereinigte Derivat wurde schliesslich papierchromatographisch mit einem authentischen Brenztraubensäure-2,4-dinitrophenylhydrazon verglichen. Als stationäre Phase diente mit einer Spur von Cyanwasserstoff versetztes Phenol, während die bewegliche Phase der *Sørensen*-Puffer bildete, der durch Mischen von gleichen Volumina von 0,1-n. Glykokoll und 0,1-n. Natriumchlorid mit 0,1-n. Natronlauge auf pH 8,4 eingestellt worden war. Die gelben Flecken lassen sich besonders gut durch Kopieren im UV.-Licht sichtbar machen.

¹¹⁾ Anal. Chemistry **24**, 1298 (1952).

¹²⁾ Acta chem. scand. **7**, 38 (1953).

2,25 cm³ der wässrigen Lösung nach der Zersetzung des Ozonids, die nicht zum Brenztraubensäure-Nachweis verbraucht worden waren, liess man zusammen mit 2 cm³ Perameisensäure 14 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Das Reaktionsprodukt wurde dann in Äther aufgenommen und die ätherischen Auszüge mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Den Rückstand sublimierte man fraktioniert im Hochvakuum. Bei 38° liessen sich geringe Mengen öligere Anteile abtrennen, worauf bei 60—70° 1,2 mg einer kristallinen Säure vom Smp. 126—128° sublimierten. Auf Grund des IR.-Absorptionsspektrums und des Misch-Smp. sowie des papierchromatographischen Vergleichs mit einem authentischen Vergleichspräparat erwies sich diese als identisch mit der meso- α , α' -Dimethyl-glutarsäure (III).

Die Mikroanalysen wurden in unserem Mikroanalytischen Laboratorium (Leitung *W. Manser*) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Dem Carboxy-lacton, C₁₀H₁₆O₄, das durch Oxydation der Antibiotica Narbomycin, Pikromycin und Methymycin mit Kaliumpermanganat entsteht, wurde auf Grund seiner Eigenschaften und Abbauergebnisse die Konstitution I zugewiesen.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

212. Reinigung von Coenzym A und Isolierung von reinem Dephospho-Coenzym A¹⁾

von Olga Brenner-Holzach, R. Adler und F. Leuthardt.

(25. VIII. 56.)

Während unserer Arbeiten über die biologische Synthese und über die Spezifität von CoA²⁾ stellte sich das Problem, CoA von seinen Abbauprodukten (im Speziellen von Dephospho-CoA) zu trennen.

Als erste Methode wählten wir die Papierchromatographie. Mit Filterpapier *Whatman* Nr. 1 und 1-proz. Natriumacetat/Propanol 1:1 als mobile Phase konnte im aufsteigenden Chromatogramm eine gute Trennung der reduzierten und oxydierten Form des CoA und Dephospho-CoA erhalten werden. Die Betrachtung des Chromatogramms im UV. lässt die adeninhaltigen Produkte erkennen; die Entwicklung mit Ammonmolybdat zeigte die phosphathaltigen Verbindungen, diejenige mit Nitroprussidnatrium das Vorhandensein von SH-Verbindungen an.

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Hilfe der *Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* durchgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

Es werden folgende Abkürzungen verwendet: CoA = Coenzym A, Dephospho-CoA = Dephospho-Coenzym A, ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat.

²⁾ Siehe nachfolgende Arbeit: *Olga Brenner-Holzach & F. Leuthardt*, *Helv.* **39**, 1796 (1956).