

aus An-Me noch 13,4 mg analysenreinen Kohlenwasserstoff XXI in farblosen Blättchen, Smp. 154–155°. Zur Analyse wurde bei 0,02 Torr und 115–130° (Badtemperatur) sublimiert.

$C_{20}H_{18}$ (158,35) Ber. C 92,98 H 7,02% Gef. C 93,02 H 6,96%

Die Mischprobe mit 7-Isopropyl-1,2-benzofluoren vom Smp. 153–154° schmolz bei 120–140°. Hingegen gab die Mischprobe mit dem JACOBS'schen Kohlenwasserstoff keine Smp.-Erniedrigung und auch die IR.-Spektren waren gleich (vgl. Fig. 8). – UV.-Spektrum vgl. Fig. 2.

Die Mikroanalysen wurden unter der Leitung von Herrn E. THOMMEN im Mikrolabor unseres Instituts ausgeführt.

Zusammenfassung

Die Synthese von 7-Äthyl-1,2-benzofluoren (XVIII) und von 7-Äthyl-8-methyl-1,2-benzofluoren (XXI) wird beschrieben. Der letztgenannte Stoff XXI erwies sich als identisch mit dem Kohlenwasserstoff, den JACOBS und Mitarbeiter erstmals durch Dehydrierung von Jervin und Veratramin mit Selen erhalten hatten und der seither auch durch analoge Dehydrierung von zwei pflanzlichen N-freien Aglykonen aus der Familie der Asclepiadaceen (Drevo-genin A und Condurangenin) gewonnen worden war.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

178. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten

14. Mitteilung¹⁾

Actinomycin Z

von R. Bossi, R. Hütter, W. Keller-Schierlein, L. Neipp und H. Zähler

(22. VII. 58)

Von den bisher bekannt gewordenen Actinomycinen lassen sich alle, die ausreichend charakterisiert worden sind, einem der drei von BROCKMANN & GRÖNE^{2) 3)} definierten Typen, Actinomycin C, I und X, zuordnen^{4) 5)}. Über die Identität der Actinomycine A^{6) 7)} und B^{7) 8) 9)} mit Actinomycin X²⁾ und von Actinomycin D¹⁰⁾ mit Actinomycin I²⁾ haben wir bereits früher berichtet⁵⁾.

¹⁾ 13. Mitt.: Helv. **41**, 220 (1958).

²⁾ H. BROCKMANN & H. GRÖNE, Naturwissenschaften **41**, 65 (1954).

³⁾ H. BROCKMANN & H. GRÖNE, Chem. Ber. **87**, 1036 (1954).

⁴⁾ L. ETTLINGER, R. CORBAZ, W. KELLER-SCHIERLEIN & H. ZÄHNER, Giornale Microbiol. **2**, 91 (1956).

⁵⁾ R. CORBAZ, L. ETTLINGER, W. KELLER-SCHIERLEIN & H. ZÄHNER, Arch. Microbiol. **26**, 192 (1957).

⁶⁾ S. A. WAKSMAN & M. TISHLER, J. biol. Chemistry **142**, 519 (1942).

⁷⁾ G. G. ROUSSOS & L. C. VINING, J. chem. Soc. **1956**, 2469.

⁸⁾ H. LEHR & J. BERGER, Arch. Biochemistry Biophysics **23**, 503 (1949).

⁹⁾ C. E. DALGLIESH & A. R. TODD, Nature **164**, 830 (1949).

¹⁰⁾ R. A. MANAKER, F. J. GREGORY, L. C. VINING & S. A. WAKSMAN, Antibiotics Annual **1954/55**, 853.

Seither hatten wir Gelegenheit, ein japanisches Präparat, Actinomycin J¹¹⁾, zu prüfen, das sich als mit Actinomycin X identisch erwies. Das von einer belgischen Arbeitsgruppe¹²⁾ beschriebene Actinomycin S-67 andererseits konnten wir als Actinomycin C identifizieren. Das Actinomycin M der Firma MONTECATINI¹³⁾ stand uns nicht zur Verfügung. Die eingehende Beschreibung des papierchromatographischen Verhaltens erlaubt jedoch eine recht sichere Identifizierung als Actinomycin X. Damit im Einklang ist die Beschreibung des Actinomycin M produzierenden *Streptomyces*-Stammes, die mit der von *Streptomyces antibioticus* (WAKSMAN *et* WOODRUFF) WAKSMAN *et* HENRICI, dem klassischen Actinomycin-X-Bildner, gut übereinstimmt.

Kürzlich haben wir nun aus Kulturfiltraten eines Streptomyceten ein Antibioticum isoliert, das nach seinem chemischen und spektroskopischen Verhalten als ein Actinomycin bezeichnet werden muss, das sich jedoch von den bekannten Actinomycinen C, I und X durch seine papierchromatographischen Eigenschaften (vgl. Tab. 2) und in seiner Aminosäure-Zusammensetzung deutlich unterscheidet. Dieses neue Antibioticum haben wir Actinomycin Z benannt.

In der Tabelle 1 sind die von uns beobachteten Actinomycin bildenden *Streptomyces*-Arten mit ihren artbestimmenden Merkmalen zusammengestellt. Der Produzent des Actinomycins Z, Stamm ETH 20675, stimmt in allen als wesentlich anerkannten Merkmalen¹⁴⁾ mit dem von PRIDHAM, HESSELTINE & BENEDICT¹⁵⁾ vorgeschlagenen neuen Typus der Art *Streptomyces fradiae* (WAKSMAN *et* CURTIS) WAKSMAN *et* HENRICI (Stamm ATCC 10745; NRRL B-1195; WAKSMAN 3535; ETH 13472) überein. Es scheint uns bemerkenswert, dass andere Stämme der gleichen Art, *S. fradiae*, Actinomycin X bilden¹⁶⁾.

Actinomycin Z liess sich aus den Kulturen von *S. fradiae*, Stamm ETH 20675, durch Extraktion mit Äthylacetat isolieren. Nach chromatographischer Reinigung wurde es in Form von orange-roten Kristallen erhalten. Wie die bekannten Actinomycine ist auch das Actinomycin Z keine einheitliche Verbindung. Durch Papierchromatographie³⁾ lässt es sich in eine Reihe von nahe verwandten Komponenten, die Actinomycine Z₀, Z₁, Z₂, Z₃, Z₄ und Z₅ auftrennen. Das papierchromatographische Verhalten (R_{C₂}-Werte³⁾) ist in Tab. 2 dem unter identischen Bedingungen beobachteten der Actinomycine C, I und X gegenübergestellt. Die Methodik haben wir eng an die von BROCKMAN & GRÖNE³⁾

¹¹⁾ Vgl. A. NISHIBORI, J. Antibiotics (Japan) A **9**, 31 (1956). Das Präparat stammt von der Firma NIKKEN CHEMICALS CO., LTD., Tokio.

¹²⁾ M. WELSCH, Bull. Soc. chim. biol. **28**, 557 (1946); H. SARLET, Biochim. biophys. Acta **13**, 143 (1954); H. SARLET, Enzymologia **14**, 49 (1950); H. SARLET, J. TOUSSAINT & H. BRASSEUR, Nature **168**, 469 (1951); L. DELCAMBE, Industrie chimique belge **19**, 1283 (1954). – Herrn Prof. Dr. M. WELSCH danken wir bestens für die Übersendung einer Abimpfung seines Stammes S-67.

¹³⁾ R. CRAVERI, Riv. Biol. **48**, 237 (1956).

¹⁴⁾ Systematik nach L. ETLINGER, R. CORBAZ & R. HÜTTER, Arch. Mikrobiol. (1958), im Druck.

¹⁵⁾ T. G. PRIDHAM, C. W. HESSELTINE & R. G. BENEDICT, Applied Microbiol. **6**, 52 (1958).

¹⁶⁾ Es sind dies die Stämme ETH 12690, 13474, 13584, 16614, 17817, 17957, 18017, 18247, 18889, 19129.

vorgeschlagene angelehnt. Bei der Untersuchung natürlicher Actinomycin-Z-Gemische werden dabei die Komponenten Z_0 und Z_5 von ihren Nachbarkomponenten Z_1 bzw. Z_4 nicht abgetrennt. Ihre Auffindung gelang erst nach der präparativen Abtrennung aus dem Gemisch. Im natürlichen Gemisch bilden die Actinomycine Z_1 und Z_4 die Hauptkomponenten; Z_2 und Z_3 sind nur in untergeordneten Mengen vorhanden.

Tabelle 1. Actinomycin bildende Streptomyces-Arten¹⁴⁾

	Sporen	Luftmycel- farbe	Luftmycelmorphologie	Mela- noides Pigment	Bemer- kungen
Actinomycin C <i>S. griseus</i> . . .	glatt	gelblich- grünlich- grau	Sporenketten gewellt, sympodial verzweigte Büschel, ohne Spiralen	—	17) 14)
Actinomycin I <i>S. parvulus</i> . . .	glatt	aschgrau	Sporenketten mono- podial verzweigt, offene regelmässige, lange Spiralen	—	19) 20)
Actinomycin X <i>S. antibioticus</i> . .	glatt	aschgrau	monopodial verzweigte Sporenketten, ohne Spiralen	+	21) 5)
<i>S. fradiae</i> . . .	glatt	zimtbraun	monopodial verzweigte Sporenketten, Spiralen meist mehr als 5 Win- dungen	—	16)
<i>S. griseus</i> . . .	glatt	gelblich- grünlich- grau	Sporenketten gewellt, sympodial verzweigte Büschel ohne Spiralen	—	18)
<i>S. michiganensis</i>	glatt	gelblich- grünlich- grau	Sporenketten gewellt, sympodial verzweigte Büschel ohne Spiralen	+	5)
Actinomycin Z <i>S. fradiae</i> . . .	glatt	zimtbraun	monopodial verzweigte Sporenketten, Spiralen meist mehr als 5 Win- dungen	—	Stamm ETH 20675

17) W. LINDENBEIN, Arch. Mikrobiol. 17, 361 (1952).

18) Nach M. WELSCH, R. CORBAZ & L. ETTLINGER, Schweiz. Z. allgem. Pathologie und Bakteriologie 20, 454 (1957), ist der Actinomycin X bildende Stamm *S. parvulus*⁵⁾ in der Art *S. griseus* (KRAINSKY) WAKSMAN et HENRICI unterzubringen.

19) S. A. WAKSMAN & F. J. GREGORY, Antibiotics and Chemotherapy 4, 1050 (1954).

20) Die von R. CORBAZ, L. ETTLINGER, W. KELLER-SCHIERLEIN & H. ZÄHNER⁵⁾ aufgeführten Actinomycin-I-Bildner mit gelblich-grünlichgrauem Luftmycel müssen, da sie in gut ausgewachsenem Zustand aschgraues Luftmycel besitzen, zu *S. parvulus* gestellt werden (vgl.¹⁸⁾).

21) S. A. WAKSMAN & H. B. WOODRUFF, J. Bact. 42, 231 (1941).

Tabelle 2. RC_2 -Werte der Actinomycine Z, C, I und X

Actinomycin Z:	Z_0 ca. 0,35	Z_1 0,39	Z_2 0,78	Z_3 1,63	Z_4 2,36	Z_5 2,55
Actinomycin C:		C_1 0,63	C_2 1,00	C_3 1,52		
Actinomycin I:		I_1 0,65				
Actinomycin X:	X_0 0,20	X_1 0,65	X_2 1,05			

Die präparative Auftrennung gelang am besten durch eine Kombination verschiedener Trennverfahren. Bei sorgfältiger Chromatographie an der hundertfachen Menge Aluminiumoxyd wurden die Komponenten Z_0 und Z_1 voneinander und vom Gemisch der rascher wandernden Komponenten Z_2 bis Z_5 abgetrennt. Actinomycin Z_1 wurde dabei kristallin erhalten, Actinomycin Z_0 nur als amorphes Pulver. Durch eine CRAIG-Verteilung liess sich aus dem restlichen Gemisch das Actinomycin Z_5 leicht abtrennen und kristallin gewinnen. Die Komponenten Z_2 , Z_3 und Z_4 erscheinen dabei aber in einem einzigen Verteilungsmaximum. Ihre Reindarstellung in grösserem Maßstab ist noch nicht gelungen, hingegen haben wir sie durch Papierchromatographie in kleinen Mengen isoliert, um ihre Aminosäure-Zusammensetzung untersuchen zu können.

Die Komponenten des Actinomycins Z zerfallen bei der energischen sauren Hydrolyse in eine Reihe von Aminosäuren, die wir papierchromatographisch identifiziert haben. Die Hydrolysate enthalten wie die von Actinomycinen I, X und einzelner Komponenten von Actinomycin C²²⁾ die Aminosäuren Threonin, Sarkosin, Valin und N-Methylvalin. Prolin, ein Baustein aller bisher untersuchten natürlichen Actinomycine²³⁾, fehlt jedoch beim Actinomycin Z. Dagegen tritt als neuer Baustein N-Methylalanin auf. Wir haben diese Aminosäure ausser durch ihre Lage im Papierchromatogramm²⁴⁾ auch durch die rote Farbreaktion beim Besprühen mit Pyridin und einer benzolischen Lösung von p-Nitrobenzoylchlorid²⁶⁾ identifiziert. Diese auf EDLBACHER²⁷⁾ zurückgehende Farbreaktion ist für N-Methylaminosäuren (ausser Sarkosin) charakteristisch.

Entsprechend der Anwesenheit von 3 N-Methylaminosäuren pro Peptid-lacton-Ring im Actinomycin Z findet man unter Annahme eines Molekular-

²²⁾ H. BROCKMANN, G. BOHNSACK & H. GRÖNE, *Naturwissenschaften* **40**, 223 (1953); H. BROCKMANN & N. PFENNIG, *Z. physiol. Chem.* **292**, 77 (1953).

²³⁾ Die von Actinomycin C-Bildnern unter besonderen Ernährungsbedingungen produzierten Actinomycine E und F wollen wir hier ausser Betracht lassen. Vgl. G. SCHMIDT-KASTNER, *Naturwissenschaften* **43**, 131 (1956); G. SCHMIDT-KASTNER & A. BOHNE, deutsche Patent-Anmeldung F 14746 IVa/30h, 6 (1955).

²⁴⁾ Ein synthetisches Vergleichspräparat²⁵⁾ wurde uns in verdankenswerter Weise von Herrn Dr. M. L. MIHALOVIĆ zur Verfügung gestellt.

²⁵⁾ E. FISCHER & L. v. MECHL, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **49**, 1355 (1916).

²⁶⁾ PL. A. PLATTNER & U. NAGER, *Experientia* **3**, 325 (1947); *Helv.* **31**, 2203 (1948).

²⁷⁾ S. EDLBACHER & FR. LITVAN, *Z. physiol. Chem.* **265**, 241 (1940).

gewichts von ca. 1250 6 N-Methylgruppen, während die Actinomycine C, I und X nur deren 4 aufweisen. N-Methylalanin ist unseres Wissens bisher noch nie als Baustein eines Naturstoffes nachgewiesen worden.

Die charakteristischen Eigenschaften des Actinomycins Z und seiner Komponenten stimmen mit denen der bekannten Actinomycine weitgehend überein. Actinomycin Z schmilzt unscharf in der Gegend von 260° unter Zersetzung. Die UV.-Absorptionskurven stimmen mit denen der Actinomycine C, I und X^{3) 8) 10)} völlig überein. Man findet ein breites Maximum bei 240 m μ und eine Doppelbande bei 228 und 244 m μ . Es darf daraus geschlossen werden, dass der chromophore Teil der Molekel mit dem der bekannten Actinomycine übereinstimmt²⁸⁾.

Die IR.-Absorptionskurven der kristallisierten Komponenten Z₁ und Z₅ und des Actinomycin Z-Gemisches decken sich völlig. Auch gegenüber Actinomycin X⁹⁾ und C³⁾ sind keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Die IR.-Absorptionsspektren sind allerdings recht arm an scharfen Absorptionsmaxima. Die $[\alpha]_D$ liegen mit ca. -300° ebenfalls im Rahmen der bei andern Actinomycinen gemessenen Werte^{2) 8) 9) 10)}.

Actinomycin Z ist hoch aktiv gegen Gram-positive Bakterien (0,1–1 μ g/ml). Eingehendere Untersuchungen über biologische Wirkungen sind im Gang.

Den Herren Prof. Dr. V. PRELOG und Prof. Dr. E. GÄUMANN danken wir für das Interesse, das sie dieser Arbeit entgegengebracht haben.

Experimenteller Teil²⁹⁾

Beschreibung des Organismus. Der Streptomyces-Stamm ETH 20675 wurde aus einer Erdprobe von Horsham, England, isoliert. Der Stamm ist durch folgende Merkmale charakterisiert¹⁴⁾:

1. Sporen glatt. 2. Luftmycel: dunkelrot-zimtbraun-bräunlichgrau. 3. Sporenketten in offenen, regelmässigen Spiralen von meist mehr als 5 Windungen, monopodial verzweigt, mit langer gerader Hauptachse. 4. Bildet kein melanoides Pigment. Der Stamm ist darnach in der Art *Streptomyces fradiae*¹⁵⁾ einzuordnen.

Züchtung. Für die Gewinnung von Actinomycin Z wurde der Stamm ETH 20675 in Schüttel- oder Gärtankkultur bei 27° auf folgender Nährlösung gezüchtet: 2% Sojamehl, vollfett, 2% Mannit; pH der Nährlösung vor dem Sterilisieren mit KOH auf 7,5 eingestellt.

Isolierung von Actinomycin Z. Nach 2–3 Tagen Wachstum wurde die Kulturflüssigkeit unter Zusatz von Hyflo-Super-Cel filtriert und das Filtrat mit Äthylacetat ausgezogen. Der Extrakt aus 120 l Kulturfiltrat wurde zunächst im Dünnschichteneindampfer auf ca. 2,5 l eingeeengt und dann im Vakuum völlig eingedampft. Der dunkelrote, ölige Rückstand wurde mit ca. 1 l Petroläther versetzt. Das Rohactinomycin fiel als orangefarbiges Pulver aus, das auf der Nutsche abgetrennt und im Exsikkator getrocknet wurde. Ausbeute 11,5 g.

Dieses Rohpräparat wurde in möglichst wenig Benzol gelöst und an 300 g Aluminiumoxyd (Akt. III nach BROCKMANN, neutral) chromatographiert. 650 ml Benzol und 700 ml absolutes Chloroform eluierten nur farblose oder blass gelbliche Beiprodukte. Mit 900 ml Chloroform-Methanol 49:1 wurde die Hauptmenge des roten Farbstoffes herausgelöst. Geringe Mengen Actinomycin waren in den Fraktionen mit Chloroform-Methanol (19:1) enthalten. Die aktiven Eluate wurden im Vakuum eingedampft und der Rückstand in ca.

²⁸⁾ H. BROCKMANN & H. MUXFELDT, Angew. Chem. **68**, 69 (1956); E. BULLOCK & A. W. JOHNSON, J. chem. Soc. **1957**, 3280.

²⁹⁾ Die Smp. sind korrigiert.

25 ml Aceton gelöst. Nach Hinzufügen von ca. 100 ml Äther kristallisierten 3,40 g Actinomycin Z in rotorangen Kristallen von unregelmässigem Habitus.

Zur Analyse wurde ein dreimal umkristallisiertes Präparat 24 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet. Smp. 260–264° (Zers.); $[\alpha]_D = -314^\circ$ ($c = 0,246$ in Chloroform).

Gef. C 54,88; 54,65 H 6,42; 6,57 N 12,25; 12,03%

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{\max} 242; 429; 443 $m\mu$; $\log E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,34$; 2,25; 2,27. – Im IR.-Absorptionsspektrum in KBr findet man starke Banden bei 3420, 1750, 1645 und 1580 cm^{-1} sowie einige flauere Absorptionsmaxima im Fingerprint-Gebiet.

Die *Papierchromatographie* wurde im wesentlichen nach den Angaben von BROCKMANN & GRÖNE³⁾ durchgeführt. Das Filterpapier wurde in einer 10-proz. wässrigen Lösung von Natrium-metakresotinat getränkt und zwischen Filtrierpapier ausgepresst. Die Actinomyeine wurden in Aceton gelöst, auf den Startkreis des feuchten Papiers aufgetragen und nach dem Rundfilterverfahren mit einem Gemisch aus 1 Volumenteil Di-n-butyläther und 3 Volumenteilen n-Butylacetat chromatographiert. Kresotinat-Lösung und organisches Fließmittel wurden vor Gebrauch gut miteinander äquilibriert. Die R_{F_2} -Werte³⁾ sind in der Tab. 2 zusammengestellt.

Präparative Auftrennung von Actinomycin-Z-Gemisch. – a) *Chromatographie an Aluminiumoxyd.* Eine Lösung von 750 mg Actinomycin Z in ca. 20 ml Benzol wurde auf eine Kolonne von 100 g Aluminiumoxyd (Akt. III nach BROCKMANN, neutral) gegeben und mit 100 ml Benzol und 100 ml abs. Chloroform nachgewaschen, wobei die Actinomyeine nur wenig wanderten. Beim Entwickeln mit Chloroform-Methanol 99:1 bildeten sich drei gut unterscheidbare rote Zonen aus. Die unterste, breite Zone wurde leicht mit 120 ml Chloroform-Methanol 99:1 eluiert. Nach dem Eindampfen blieben 396 mg eines Gemisches der Actinomyeine Z_2 , Z_3 , Z_4 und Z_5 zurück.

Die nächstfolgenden 150 ml Eluat gaben nur 15 mg Actinomycin-Gemisch, vorwiegend aus Z_1 bestehend. Weitere 500 ml desselben Lösungsmittelgemisches lösten die zweite, etwas schmalere Zone heraus. Die Lösung hinterliess 227 mg Rückstand, nahezu einheitliches Actinomycin Z_1 .

Die dritte, diffuse Zone wurde erst mit 150 ml Chloroform-Methanol (97:3) leicht eluiert und lieferte 110 mg Actinomycin Z_0 .

Actinomycin Z_1 : Das Eluat der zweiten Zone, 227 mg, wurde erneut an 35 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Nach Abtrennung eines kleinen Vor- und Nachlaufs wurden 206 mg Actinomycin Z_1 erhalten, das aus Aceton-Äther feine orangerote Kristalle mit unregelmässigen Kristallformen lieferte. Zur Analyse wurde bei 80° im Hochvakuum getrocknet. Smp. 256–260° (Zers.). $[\alpha]_D -362^\circ$ ($c = 0,185$ in Chloroform).

Gef. C 53,97 H 6,79 N 12,30 $\text{CH}_3\text{-(N)}$ 7,48 $\text{CH}_3\text{-O}$ 0%

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{\max} 240, 427, 442 $m\mu$; $\log E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,25$; 2,00; 2,01. – Das IR.-Absorptionsspektrum stimmt mit dem von Actinomycin-Z-Gemisch völlig überein.

Actinomycin Z_0 : Das Eluat der dritten Zone wurde ebenfalls rechromatographiert. Die Hauptfraktion (87 mg) konnte durch Umfällen aus Aceton-Äther nur als amorphes, orangebraunes Pulver erhalten werden, das sich bei ca. 250° unter Schwarzfärbung zersetzte. Im Papierchromatogramm verhält es sich etwa wie Actinomycin Z_1 , die Zone ist aber weniger scharf. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{\max} 236 u. 437 $m\mu$; $\log E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,44$ bzw. 2,17.

b) *CRAIG-Verteilung.* Als stationäre Phase diente eine 2-proz. wässrige Lösung von Natrium-naphtalin- β -sulfonat, das durch Auflösen des technischen Produktes in Wasser und Klären durch Filtration mit Aktivkohle bereitet worden war³⁾. Als mobile Phase haben wir ein Gemisch von 4 l Isopropyläther und 1 l Äthylacetat verwendet. Das durch Chromatographie abgetrennte Gemisch der Actinomyeine Z_2 bis Z_5 (390 mg, siehe oben) wurde in die ersten 7 Gläser einer vollautomatischen Verteilungsapparatur³⁰⁾ eingefüllt.

³⁰⁾ F. A. VON METZSCH, Chem. Ing. Technik 25, 66 (1953).

Nach 100 Überführungen hatten sich drei klare Maxima ausgebildet in den Fraktionen 6, 55 und 88. Zusammengehörige Fraktionen wurden vereinigt, mehrmals mit Äthylacetat ausgezogen, die Extrakte mit verd. Natriumcarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingeengt. Die öligen Konzentrate wurden mit Petroläther gewaschen und anschliessend durch eine kleine Kolonne aus Aluminiumoxyd chromatographiert. Es wurden folgende Komponenten isoliert:

Fr. 0–15: ca. 10 mg, amorph. Enthält Spur Actinomycin Z_1 sowie ein rotes Zersetzungsprodukt.

Fr. 16–40: 6,5 mg, amorph. Besteht vorwiegend aus Actinomycin Z_3 .

Fr. 41–65: 103 mg, Gemisch der Actinomycine Z_2 , Z_3 und Z_4 .

Fr. 81–92: 25 mg Actinomycin Z_5 , papierchromatogr. einheitlich.

Die Fraktionen 66–80 und 93–100 waren praktisch farblos und wurden verworfen.

Actinomycin-Gemisch $Z_2 + Z_3 + Z_4$: Die Substanz aus den Fraktionen 41–65 wurde aus Aceton-Äther in feinen roten Kristallen erhalten, die sich bei ca. 260° langsam zersetzen. $[\alpha]_D = -296^\circ$ ($c = 0,257$ in Chloroform). UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{\max} 240, 428, 441 $m\mu$; $\log E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,36; 2,17; 2,18$.

Actinomycin Z_5 wurde aus Aceton-Äther in kurzen roten Stäbchen erhalten, die meist zu Bündeln vereinigt sind. Smp. 261–267° (Zers.). Zur Analyse wurde 20 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D = -284^\circ$ ($c = 0,244$ in Chloroform). UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{\max} 240, 428, 443 $m\mu$; $\log E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,40; 2,21; 2,24$.

Gef. C 55,71 H 6,44 N 12,25%

c) *Präparative Papierchromatographie*. 25 mg des Gemisches der Actinomycine Z_2 , Z_3 und Z_4 wurden auf 4 Bogen WHATMAN-Papier Nr. 1 nach dem oben beschriebenen Verfahren getrennt. Die Zonen der einzelnen Komponenten wurden ausgeschnitten und dreimal mit Alkohol eluiert. Die Eindampfrückstände der Eluate, die reichlich Natrium-metakesretinat enthielten, wurden in Äthylacetat gelöst und dreimal mit verd. Natriumcarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die getrockneten Lösungen wurden eingedampft und die Rückstände an Kolonnen aus ca. 1 g Aluminiumoxyd nochmals gereinigt. Es wurden so je ca. 5 mg der reinen Actinomycine Z_3 und Z_4 erhalten. Das Actinomycin Z_2 fiel in einer Menge von weniger als 1 mg an.

Bestimmung der Aminosäuren. Je ca. 3–5 mg der reinen Actinomycine Z_0 , Z_1 , Z_3 , Z_4 und Z_5 wurden mit je 0,5 ml Wasser und 0,5 ml konz. Salzsäure in ein kleines Rohr eingeschmolzen und über Nacht bei ca. 110° hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden im Vakuum eingedampft und in je ca. 100 μ l Wasser gelöst. Die Aminosäuren wurden durch zweidimensionale Papierchromatographie bestimmt. Fließmittel: 1) wassergesättigtes Phenol, 2) Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1. Mittels der Ninhydrin-Reaktion konnten in den Hydrolysaten von allen Actinomycin-Z-Komponenten dieselben 5 Aminosäuren nachgewiesen werden, nämlich Threonin, Sarkosin, N-Methylalanin, Valin und N-Methylvalin. Prolin wurde in keinem Falle gefunden, obwohl es in einem Vergleichschromatogramm mit einem Gemisch authentischer Aminosäuren klar von den übrigen Komponenten getrennt wurde.

In einzelnen Fällen wurden Parallelchromatogramme durch Besprühen mit Pyridin und anschliessend mit p-Nitrobenzoylchlorid in Benzol angefärbt²⁶⁾, wobei das N-Methylalanin und das N-Methylvalin als leuchtend rote unbeständige Flecke sichtbar wurden.

Die Aminosäure-Bestimmung des Actinomycins Z_2 musste mit ca. 0,3 mg Substanz durchgeführt werden. Die Flecke des Sarkosins, N-Methylalanins und Valins waren dennoch deutlich, während diejenigen des Threonins und des N-Methylvalins gerade noch erkennbar waren.

Die Analysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der ETH (Leitung W. MANSER) durchgeführt. Die IR.-Absorptionsspektren wurden in KBr auf einem PERKIN-ELMER-Double-Beam-Spektrographen 21 aufgenommen.

Zusammenfassung

Aus den Kulturen eines Stammes von *Streptomyces fradiae* wurde ein neues, zu den Actinomycinen gehörendes Antibioticum, das Actinomycin Z, isoliert. Durch Adsorptionschromatographie, CRAIG-Verteilung und Papierchromatographie konnte es in 6 Komponenten, die Actinomycine Z₀ bis Z₅, aufgetrennt werden. Bei der Hydrolyse wurden aus allen Komponenten die 5 Aminosäuren Threonin, Sarkosin, N-Methylalanin, Valin und N-Methylvalin erhalten.

Forschungslaboratorium der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT,
Pharmazeutische Abteilung, Basel,
Institut für spezielle Botanik und Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

179. Détermination pH-métrique des constantes acide-base par la fonction de formation

par D. Monnier et I. Kapétanidis

(28 VII 58)

Pour la détermination des constantes acide-base d'un composé on peut avoir recours, entre autres, à la méthode pH-métrique ordinaire, à la méthode spectrophotométrique ou à celle de la mesure de la conductibilité. La première et la troisième ne conviennent pas si les constantes sont trop rapprochées, la seconde ne peut être appliquée que si le spectre d'absorption des particules s'y prête.

Nous inspirant des travaux de BJERRUM sur la fonction de formation, et de sa méthode de détermination des constantes de complexes successifs¹⁾, nous proposons un processus permettant le calcul des constantes acide-base, partant de la courbe pH-métrique. Cette méthode peut s'appliquer à un grand nombre de cas, même si les constantes sont proches les unes des autres. Par analogie avec la méthode de BJERRUM, nous admettons que l'ion H⁺ est le *complexant*, et R - le radical acide -, la particule complexée.

Soit un composé RH_p susceptible de libérer p ions H⁺ et possédant donc p constantes acide-base. Pour simplifier l'écriture, nous ne représenterons pas les charges des particules sauf pour l'ion H⁺. Les () exprimeront les *activités*, les | | exprimeront les *concentrations*.

Nous pouvons poser :

$$\frac{|RH_p|}{|R| F_p(H^+)^p} = K_p, \text{ dans laquelle } 1/F_p = f_{RH_p}/f_R, \quad (1)$$

$$\frac{|RH_{p-1}|}{|R| F_{p-1}(H^+)^{p-1}} = K_{p-1}, \text{ dans laquelle } 1/F_{p-1} = f_{RH_{p-1}}/f_R, \quad (2)$$

¹⁾ G. CHARLOT & R. GAUGUIN, Les méthodes d'analyse des réactions en solution, Masson 1951; J. BJERRUM, Det Kgl. Danske Vidensk. Slsb. **21**, 1 (1944).