

119. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten24. Mitteilung¹⁾**Über die Isolierung und Synthese des 1-Amino-5-hydroxylamino-pentans, eines wesentlichen Hydrolyseproduktes der Ferrioxamine und der Ferrimycine**von **H. Bickel, B. Fechtig, G. E. Hall, W. Keller-Schierlein, V. Prelog** und **E. Vischer**

(4. IV. 60)

In einer zusammenfassenden Darstellung²⁾ wurde vor kurzem über eisenhaltige Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die Siderochrome, berichtet. Eine Gruppe der Siderochrome, die Sideramine, stellt Wuchsstoffe für Mikroorganismen dar, während eine andere, die Sideromycine, starke antibiotische Wirksamkeit aufweist. Die antibiotische Wirksamkeit der Sideromycine beruht offenbar auf ihrem Antagonismus gegenüber den Sideraminen. Von den Sideraminen wurde von uns am eingehendsten das Ferrioxamin B und von den Sideromycinen das Ferrimycin A untersucht. Es ist nun bemerkenswert, dass diese beiden Verbindungen, wie zuerst papierchromatographisch gezeigt werden konnte, durch Kochen mit Säuren ein gleiches, wesentliches Hydrolyseprodukt liefern. Dieses gibt Farbreaktionen sowohl mit Reagentien, welche auf Amino-Gruppen ansprechen (Ninhydrin, Isatin), als auch mit solchen, welche reduzierende Gruppen anzeigen (FEHLING'sche Lösung, Kaliumferri-cyanid, Triphenyltetrazoliumchlorid).

Das Hydrolyseprodukt wurde in der Folge in reinem Zustand als kristallines Dihydrochlorid isoliert. Gemäss der Analyse handelt es sich um das Salz einer zweisäurigen Base $C_5H_{14}ON_2$, pK_{MCS}^* 5,30, 9,80, Äq.-Gew. 101. Durch katalytische Hydrierung mit Platinoxid in Methanol entsteht daraus in praktisch quantitativer Ausbeute 1,5-Diaminopentan (I), welches eindeutig als Dibenzoyl-Derivat identifiziert wurde. Das 1,5-Diaminopentan lässt sich aus Ferrioxamin B und aus Ferrimycin A auch direkt durch reduktive Hydrolyse mit Jodwasserstoffsäure erhalten.

$R' (CH_2)_5 R''$: I $R' = NH_2$, $R'' = NH_2$; II $R' = NH_2$, $R'' = NHOH$; III $R' = C_6H_4(CO)_2N$, $R'' = NO_2$; IV $R' = NH_2$, $R'' = NO_2$.

Alle diese Tatsachen sprechen dafür, dass das erwähnte Hydrolyseprodukt die Konstitution eines 1-Amino-5-hydroxylamino-pentans (II) besitzt, was durch folgende eindeutige Synthese bewiesen werden konnte: Aus dem bekannten 1-Phtalimido-5-brompentan³⁾ wurde mit Silbernitrit in Nitropropan das 1-Phtalimido-5-nitropentan (III) erhalten⁴⁾, welches mit Hydrazinhydrat das 1-Amino-5-nitropentan (IV) lieferte. Dieses gab durch Reduktion mit Zink und Wasser das gewünschte 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan (II). Die Eigenschaften der synthetischen und der durch Hydrolyse der Naturstoffe erhaltenen Verbindungen waren in jeder Hinsicht identisch.

¹⁾ 23. Mitt.: Arch. Mikrobiol. (im Druck).

²⁾ H. BICKEL, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN und H. ZÄHNER, *Experientia* 16, 129 (1960).

Mit den von uns ausgearbeiteten Methoden lässt sich das 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan auch als Hydrolyseprodukt anderer Siderochrome nachweisen. So wurde es z. B. bei der sauren Hydrolyse von *Albomycin*, einem anderen Antibioticum der Sideromycin-Gruppe⁵⁾, erhalten.

Basen vom Typus des 1-Amino-5-hydroxylamino-pentans wurden unseres Wissens bisher nicht in der Natur gefunden. Die entsprechende 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan-carbonsäure-(1) ist dagegen ein Hydrolyseprodukt des Mycobactins, eines Wuchsstoffes für *Mycobacterium johnei*⁶⁾.

Einer von uns (G. E. H.) dankt dem DEPARTMENT OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH OF GREAT BRITAIN für ein Research Fellowship, welches ihm die Beteiligung an dieser Arbeit ermöglichte.

Experimenteller Teil⁷⁾

1. *1-Amino-5-hydroxylamino-pentan* (II), durch saure Hydrolyse von *Ferrioxamin B*. 437 mg *Ferrioxamin B* wurden in 2 ml 6 N Salzsäure gelöst und während 2 Std. kontinuierlich mit Äther extrahiert. Nach Zufügen von 1 ml 6 N Salzsäure wurde nochmals $1\frac{1}{2}$ Std. extrahiert, worauf die wässrige Phase praktisch kein Eisen mehr enthielt. Die saure wässrige Lösung wurde in einem Einschmelzrohr 14 Std. bei 100° hydrolysiert. Nun wurde die Lösung mit Äther extrahiert, um lipophile Spaltstücke (vor allem Bernsteinsäure) zu entfernen. Nach dem Eindampfen der salzsauren Lösung im Vakuum blieben 385 mg braunes Öl zurück. Dieses wurde in einem Gemisch von Methyl- und Äthylalkohol gelöst und durch Aktivkohle filtriert. Aus dem gelblich grünen Filtrat schied sich auf Zugabe von Äthylacetat und Äther farblose Nadeln ab, die 5mal aus Alkohol-Äthylacetat-Äther umkristallisiert wurden. Ausbeute 70 mg, Smp. 137–138°. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 60° getrocknet.

$C_5H_{16}ON_2Cl_2$	Ber. C 31,44	H 8,44	N 14,62	Cl 37,10%
(191,11)	Gef. „ 31,20	„ 8,79	„ 14,74	„ 37,30%

pK_{MCS}^* ⁸⁾ 5,30 und 9,80; Äq.-Gew. 101. Vergleichsweise wurden für Hydroxylamin-hydrochlorid $pK_{MCS}^* = 6,03$, für Methylhydroxylamin-hydrochlorid $pK_{MCS}^* = 6,05$ und für 1,5-Diaminopentan-dihydrochlorid $pK_{MCS}^* = 9,50$ gefunden.

IR.-Absorptionsmaxima in Nujol: 3430 (m), 2920 (s), 2140 (w), 2030 (m), 1900 (m), 1612 (m), 1582 (m), 1500 (m), 1470 (s), 1417 (m), 1400 (m), 1380 (m), 1310 (m), 1290 (m), 1255 (w), 1235 (m), 1176 (w), 1160 (m), 1100 (m), 1045 (m), 1023 (s), 998 (s), 971 (w), 942 (m), 918 (m), 895 (m), 822 (m), 768 (w), 745 (s), 650 (m), (Frequenzen in cm^{-1} ; s = stark, m = mittel, w = schwach).

Die Verbindung reduziert FEHLING'sche Lösung, alkalisches Ferricyanid und Triphenyltetrazoliumchlorid (weinrote Fällung), und gibt eine blauviolette Farbreaktion mit Ninhydrin und eine orangerote Färbung mit Isatin. Die Farbreaktion nach PAULY ist negativ. Vergleichsweise gibt 1,5-Diaminopentan mit Isatin eine grauviolette, mit Triphenyltetrazoliumchlorid keine Farbreaktion.

Papierchromatographisches Verhalten. Mit n-Butanol-6 N Salzsäure, 7:3, haben II (1-Amino-5-hydroxylamino-pentan) $R_f = 0,25$ und I (1,5-Diaminopentan) $R_f = 0,14$. Mit n-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser, 10:10:2:5, haben II $R_f = 0,57$ und I $R_f = 0,79$.

Katalytische Hydrierung. 18,9 mg 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan wurden in 2 ml Methanol in Gegenwart von 14 mg Platinoxid hydriert. Nach 1 Std. waren 0,95 Mol. Wasserstoff aufgenommen. Nun wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum eingedampft, der pulverige Rückstand in 1 ml 1 N Natronlauge aufgenommen und 0,2 ml Benzoylchlorid zugefügt.

³⁾ N. L. DRAKE & J. A. GARMAN, J. Amer. chem. Soc. 71, 2425 (1949).

⁴⁾ Vgl. A. I. VOGEL, J. chem. Soc. 1948, 1847.

⁵⁾ Vgl. ²⁾. Das verwendete Präparat enthielt 500000 E/mg.

⁶⁾ J. FRANCIS, H. M. MACTURK, J. MADINAVEITIA & G. A. SNOW, Biochem. J. 55, 596 (1953); G. A. SNOW, J. chem. Soc. 1954, 2588, 4080.

⁷⁾ Die Smp. sind korrigiert. Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit PERKIN-ELMER Zweistrahl-Spektrographen Modell 21 aufgenommen.

⁸⁾ W. SIMON, E. KOVÁTS, L. H. CHOPARD-DIT-JEAN & E. HEILBRONNER, Helv. 37, 1872 (1954).

Nach 1std. Schütteln wurden weitere 1,2 ml Natronlauge zugegeben und 1½ Std. geschüttelt. Das ausgeschiedene Benzoyl-Derivat (22 mg) wurde aus wässrigem Alkohol umkristallisiert. Farblose Nadeln; Smp. (nach Trocknen im Hochvak. bei 92°) 132–133°, Misch-Smp. mit authentischem 1,5-Di-(benzoylamino)-pentan ohne Erniedrigung; IR.-Absorptionsspektrum identisch mit dem eines synthetischen Präparates.

$C_{19}H_{22}O_2N_2$ Ber. C 73,52 H 7,14 N 9,03% Gef. C 73,35 H 7,00 N 8,87%

2. 1,5-Diamino-pentan durch reduktive Hydrolyse von Ferrioxamin B mit Jodwasserstoffsäure. 200 mg Ferrioxamin B wurden mit 10 ml 57-proz. Jodwasserstoffsäure 3 Std. auf 130–140° erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum zur Trockene verdampft und in 20 ml 2 N Salzsäure aufgenommen. Zur Entfernung des ausgeschiedenen Jods wurde dreimal mit Äthylacetat ausgeschüttelt und die farblose wässrige Lösung eingedampft. Der Rückstand bildet eine gelbliche, teilweise kristalline Masse, die in 50 ml 1 N Natronlauge mit 2,4 g Benzoylchlorid unter häufigem Umschütteln 4 Std. stehengelassen wurde.

Die alkalische Lösung wurde dreimal mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit Natronlauge und Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Verdampfen im Vakuum blieb ein gelblicher kristalliner Rückstand (195 mg) zurück, der durch Umkristallisieren aus Aceton-Äther 150 mg reines 1,5-(Dibenzoylamino)-pentan vom Smp. 132–133° lieferte. Aus den Mutterlaugen liessen sich nach Einengen und weiterer Ätherzugabe nochmals 20 mg der weniger reinen Verbindung vom Smp. 126,5–129° gewinnen, Misch.-Smp. mit einem authentischen Vergleichspräparat ohne Erniedrigung. Die IR.-Absorptionsspektren der beiden Präparate waren identisch.

3. Hydrolyse von Ferrimycin A. 8 g Ferrimycin A wurden in 200 ml 6 N Salzsäure gelöst und während 20 Std. mit Äther kontinuierlich extrahiert. Der gelb gefärbte Ätherextrakt hinterliess nach dem Eindampfen 1,24 g eines braunen Rückstandes ($FeCl_3$).

Die salzsaure wässrige Lösung wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft und in 800 ml 6 N Salzsäure gelöst. Nun wurde 14 Std. unter Ausschluss von Sauerstoff zum Sieden erhitzt und hierauf im Vakuum zur Trockene verdampft. Den Eindampfrückstand nahm man in 200 ml 1 N Salzsäure auf und extrahierte während 24 Std. mit Äther. Aus dem Ätherauszug erhielt man 1,23 g eines kristallinen Rückstandes (hauptsächlich Bernsteinsäure).

Die wässrige Lösung wurde zur Trockene eingedampft, der schwarzbraune Rückstand (7,65 g) in 300 ml Alkohol aufgenommen, die Lösung von 450 mg schwarzem, schwerlöslichem Material abfiltriert, erneut eingedampft und der Rückstand in 360 ml Wasser aufgenommen. Die Lösung liess man langsam durch eine Säule (7 × 28 cm) von Dowex 1-X₈ (100–200 mesh) in der Hydroxylionen-Form durchfiltrieren und wusch mit 2 l Wasser nach. Das stark basisch reagierende Filtrat ergab nach dem Ansäuern mit Salzsäure einen kristallinen Eindampfrückstand (2,80 g), in dem papierchromatographisch drei ninhydrin-positive Verbindungen nachgewiesen werden konnten. Die Umkristallisation dieses Rückstandes aus Methanol lieferte zuerst 760 mg Ammoniumchlorid. Die eingedampften Mutterlaugen gaben beim Stehen mit Alkohol nadelförmige Kristalle, die nach Reinigung über das Pikrat (Smp. 230–233°, Zers.) und Rückverwandlung ins Hydrochlorid bei 252–254° (Zers.) schmolzen und durch Mischsmp. und IR.-Absorptionsspektrum als 1,5-Diaminopentan-dihydrochlorid identifiziert wurden. Das nach SCHOTTEN-BAUMANN hergestellte Di-(benzolsulfonyl)-Derivat (Smp. 117–119°) war ebenfalls identisch mit authentischem 1,5-Bis-(benzolsulfonylamino)-pentan.

Nach Abtrennung des 1,5-Diaminopentan-dihydrochlorids (1,73 g kristalliner Rückstand) enthielten die Mutterlaugen gemäss Papierchromatographie neben kleinen Mengen 1,5-Diaminopentan die dritte ninhydrin-positive Verbindung. Diese reduzierte FEHLING'sche Lösung, alkalisches Ferricyanid und Triphenyltetrazoliumchlorid, und wurde bei der erschöpfenden katalytischen Hydrierung mit Platinoxid in 5 N Essigsäure quantitativ in 1,5-Diaminopentan übergeführt. Auf Grund dieser Eigenschaften sowie des direkten papierchromatographischen Vergleichs in verschiedenen Lösungsmittelsystemen handelt es sich um 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan (II).

4. Synthese von 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan. – 1-Phtalimido-5-nitro-pentan⁴). Zu einer 60° warmen Lösung von 79 g 1-Phtalimido-5-brom-pentan (Smp. 58–59°)³) in 160 g Nitropropan wurden unter Rühren während 1½ Std. 45 g Silbernitrit in kleinen Portionen zugegeben. Anschliessend wurde die Temperatur im Verlauf von 3 Std. langsam auf 125° erhöht. Nach Ab-

trennung des ausgeschiedenen Silberbromids wurde das Lösungsmittel durch Vakuumdestillation entfernt und das gelbe, ölige Reaktionsprodukt (71 g) direkt weiter verarbeitet.

1-Amino-5-nitro-pentan. 70 g des obigen Produktes wurden in 250 ml abs. Alkohol mit 13,7 g Hydrazinhydrat versetzt und 4 Std. bei 25° stehengelassen. Anschliessend wurde mit 25 ml konz. Salzsäure angesäuert und noch 1/2 Std. bei 25° stehengelassen. Das ausgeschiedene Phtalsäurehydrazid wurde abfiltriert und das Filtrat nach Einengen auf ca. 70 ml mit 250 ml Wasser versetzt. Dabei fiel weiteres Phtalsäurehydrazid aus, das abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde nach weiterem Einengen und Filtrieren zur Trockene eingedampft. Durch Umlösen des festen Rückstandes aus Alkohol-Äther erhielt man 21 g 1-Amino-5-nitro-pentan-hydrochlorid, Smp. 113–115°.

$C_5H_{13}O_2N_2Cl$	Ber. C 35,61	H 77,7	N 16,61	Cl 21,03%
	Gef. „ 35,30	„ 8,09	„ 16,59	„ 21,16%

1-Amino-5-hydroxylamino-pentan. Zu einer Lösung von 8,2 g 1-Amino-5-nitro-pentan-hydrochlorid in 65 ml Wasser wurden 6,35 g Zink in kleinen Portionen bei 36° im Verlaufe von 15 Min. eingetragen, dann wurde während einer Std. bei gleicher Temperatur gerührt. Hierauf wurde vom unlöslichen Niederschlag abfiltriert, mit 25 ml 2 N Salzsäure angesäuert und im Vakuum eingedampft. Durch mehrmaliges Umkristallisieren des Rückstandes (9,2 g) aus Methanol-Äther erhielt man nach Abtrennung von kleinen Mengen 1,5-Diaminopentan-dihydrochlorid das 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan-dihydrochlorid in farblosen Nadeln vom Smp. 135–137°. Zur Analyse wurde 14 Std. bei 25° über P_2O_5 im Hochvakuum getrocknet.

$C_5H_{16}ON_2Cl_2$	Ber. C 31,44	H 8,44	N 14,62	Cl 37,10%
(191,11)	Gef. „ 31,73	„ 8,46	„ 14,41	„ 37,20%

pK_{MCS}^* 5,19 und 9,78; Äq.-Gew. 97.

Farbreaktionen, Rf-Werte in verschiedenen Lösungsmitteln und IR.-Absorptionsspektrum stimmten mit denen des Hydrolyseproduktes von Ferrioxamin B überein. Der Misch-Smp. lag bei 135–137°.

SUMMARY

A compound $C_5H_{14}ON_2$ has been isolated as its dihydrochloride from both ferrioxamine B and ferrimycin A, by acid hydrolysis. It was identified as 1-amino-5-hydroxylamino-pentane (II), and this structure confirmed by synthesis.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT,
Pharmazeutische Abteilung, Basel
und
Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

120. Strépopgénines de la caséine

I. Etude de leur libération et de leur purification

par **Pierre Baudet** et **Emile Cherbuliez**

(18 XII 59)

Les strépopgénines sont des polypeptides qui favorisent le développement des lactobacilles, du *Lactobacillus casei*¹⁾ en particulier.

On trouve ces polypeptides dans certains hydrolysats de protéines ou dans des autolysats tissulaires²⁾.

¹⁾ D. W. WOOLLEY, J. exp. Med. 73, 487 (1941).

²⁾ D. W. WOOLLEY, J. Bact. 39, 287 (1940); P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, travail non publié.