

fritte filtriert und mit kleinen Mengen Äther nachgewaschen wurde. Erhalten: 5,6 g, praktisch farblos, Smp. 91–96° (32,6%). Für die Analyse wurde noch aus Toluol umkristallisiert (unter Zusatz von etwas Äther zur Lösung): vierkantige Stengel, Smp. 99,4–100°, Sdp. 139°/0,1 Torr.

Das rohe Triacetyl-cysteinol liess sich auch durch Extraktion mit abs. Äther im Soxhlet reinigen.

$C_9H_{15}O_4NS$	Ber. C 46,35	H 6,48	N 6,01	S 13,74%
	Gef. „ 46,45	„ 6,33	„ 5,85	„ 13,58%

Aus der oben erwähnten ätherischen Lösung konnte etwas Cystein-äthylester zurückgewonnen werden, der, nach Behandlung mit Essigsäureanhydrid, Destillation im Hochvakuum und Umkristallisation aus Diisopropyläther oder Diäthyläther (unter Zusatz von Petroläther zur Lösung) als Diacetylcystein-äthylester identifiziert wurde. Dieser Körper bildete Tafeln, flächenreiche Kristalle oder haarfeine Nadeln vom Smp. 70°, wobei sich diese Formen beim Umkristallisieren ineinander verwandeln und einzeln oder nebeneinander erscheinen konnten. Beim Aufbewahren mit oder ohne Lösungsmittel gingen die anderen Formen stets in Nadeln über.

*L-Cysteinol-hydrochlorid*. 0,5 g analysenreines Triacetyl-cysteinol wurde in einem Schliffkölbchen, das mit Stickstoff ausgespült worden war, mit 2 ml konz. Salzsäure und 12 ml Wasser zusammengegeben, wodurch das Kölbchen nahezu gasfrei war. Während einer Woche wurde im Wasserbad von 80–85° erwärmt und dann im Hochvakuum, unter mässigem Erwärmen, zum Schluss unter Zusatz von abs. Äthanol, eingedampft. Der ölige, farblose Rückstand erstarrte beim Impfen sofort. Für die Analyse wurde noch in 1 ml abs. Methanol gelöst und mit reinem Essigester fraktioniert gefällt, wobei drei Fraktionen erhalten wurden, die alle rein waren. Sie wurden nach Abdekantieren der Mutterlaugen im gleichen Kölbchen mit Methanol-Essigester gewaschen. Sehr hygroskopische Stengelchen vom Smp. 77,2–77,7°. Weiteres Umkristallisieren führte durch Oxydation zu unreineren Produkten. Die spezifische Drehung wurde nicht bestimmt.

$C_3H_{10}ONClS$	Ber. C 25,08	H 7,02	N 9,75	S 22,37%
	Gef. „ 25,10	„ 7,10	„ 9,74	„ 22,37%

#### ZUSAMMENFASSUNG

Durch Reduktion von S-Äthylcystein-äthylester-hydrochlorid mit Natrium und Phenol und von L-Cystein-äthylester mit Lithiumaluminiumhydrid wurden die entsprechenden Aminoalkohole erhalten. Es wurde O,N,S-Triacetyl-cysteinol isoliert und durch Verseifung in L-Cysteinol-hydrochlorid übergeführt.

St. Gallen, Laboratorium der Kantonsschule

## 83. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten

29. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Die Konstitution des Ferrioxamins D<sub>1</sub>

von W. Keller-Schierlein und V. Prelog

(24. II. 61)

Von den bisher in reiner Form hergestellten 6 Ferrioxaminen zeichnen sich die Ferrioxamine A, B, C und F durch ihren basischen Charakter aus, während D<sub>1</sub> und E neutral sind. Die Ferrioxamine D<sub>1</sub> und E sind auch die einzigen, die bisher in kristallisierter Form erhalten werden konnten<sup>2)</sup>.

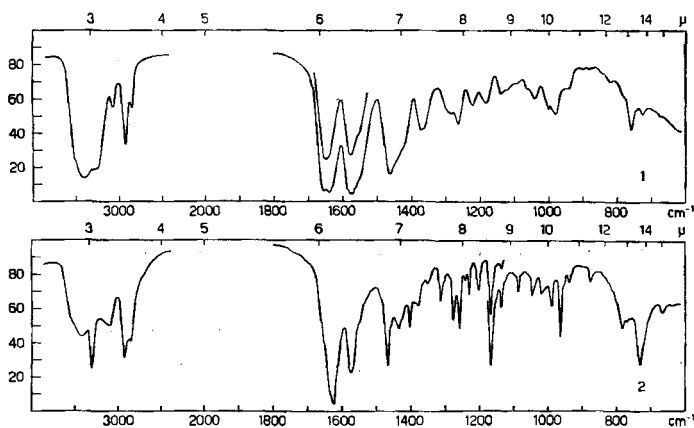
<sup>1)</sup> 28. Mitt.: Arch. Mikrobiol. 38, 326 (1961).

<sup>2)</sup> H. BICKEL, R. BOSSHARDT, E. GÄUMANN, P. REUSSER, E. VISCHER, W. VOSER, A. WETTSTEIN & H. ZÄHNER, Helv. 43, 2118 (1960).

Für die Hauptkomponente des Ferrioxamin-Gemisches aus *Streptomyces pilosus* ETLINGER *et al.* (Stamm ETH 21 748), das Ferrioxamin B, wurden kürzlich die Konstitution I und die Summenformel  $C_{25}H_{45}O_8N_6Fe$  abgeleitet<sup>3)</sup>. Das kristallisierte Ferrioxamin  $D_1$  gibt nun Analysenwerte, die mit der Formel  $C_{27}H_{47}O_9N_6Fe$  gut verträglich sind. Diese entspricht einem Acetylferrioxamin B. In Übereinstimmung damit gibt Ferrioxamin  $D_1$  bei der Hydrolyse mit 10-proz. Schwefelsäure zwei Mol. flüchtiger Säure, die als Essigsäure identifiziert wurde. Die Hydrolyseprodukte, die mit verd. Salzsäure erhalten und papierchromatographisch identifiziert wurden, sind die gleichen, welche unter den selben Bedingungen aus Ferrioxamin-B-hydrochlorid entstehen. Ausser Eisen(II)-Ionen wurden folgende Verbindungen nachgewiesen: 1,5-Diaminopentan, 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan, N-(5-Hydroxylamino-pentyl)-succinimid und Bernsteinsäure (vgl. <sup>3)</sup>).

Wir haben die Vermutung, dass dem Ferrioxamin  $D_1$  die Struktur II eines N-Acetylferrioxamins B zukomme, durch Partialsynthese bestätigt. Durch Acetylierung von Ferrioxamin-B-hydrochlorid in Methanol mit einem Mol Natriumacetat und einem grossen Überschuss Essigsäureanhydrid erhielten wir als Hauptprodukt ein einheitliches kristallines N-Acetylferrioxamin B, das auf Grund des papierchromatographischen Verhaltens, des Smp. und des IR.-Absorptionsspektrums (Fig., Kurve 1) mit Ferrioxamin  $D_1$  identisch ist.

Durch Entfernung des Eisens mittels Natronlauge wurde sowohl aus Ferrioxamin  $D_1$  wie aus Acetylferrioxamin B der selbe kristalline Grundkörper  $C_{27}H_{50}O_9N_6$  erhalten. Die beiden Verbindungen geben keine Smp.-Erniedrigung, zeigen das gleiche papierchromatographische Verhalten und besitzen identische IR.-Absorptionsspektren (Fig., Kurve 2).

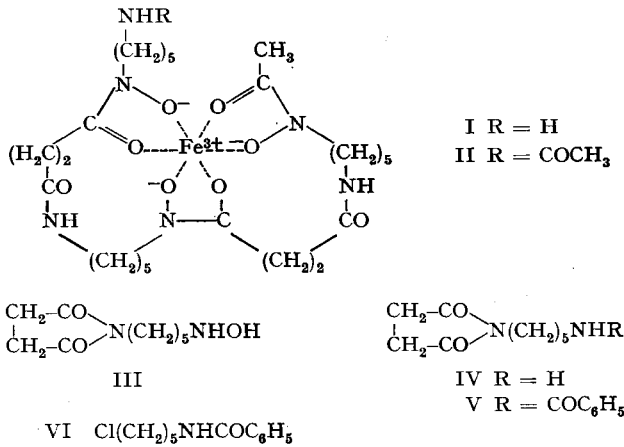


Bei einem papierchromatographischen Vergleich von Hydrolysaten der Ferrioxamine B und  $D_1$ , die unter gleichen Bedingungen (2N HCl, 100°, 2 Std.) erhalten worden waren, fiel auf, dass das N-(5-Hydroxylaminopentyl)-succinimid (III)<sup>3)</sup> beim Ferrioxamin  $D_1$  in wesentlich grösserer Menge auftritt als beim Ferrioxamin B, während

<sup>3)</sup> H. BICKEL, G. E. HALL, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* 43, 2129 (1960).

man vom 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan<sup>4)</sup> entsprechend weniger erhielt. Das gut kristallisierende N-Benzoylderivat V des Hydrierungsproduktes IV von N-(5-Hydroxylaminopentyl)-succinimid (III) konnte inzwischen synthetisch hergestellt werden. Das aus N-Benzoylpiperidin und Phosphorpentachlorid leicht zugängliche 1-Chlor-5-benzamido-pentan (VI)<sup>5)</sup> wurde in Dimethylformamid mit Succinimid und wasserfreiem Kaliumcarbonat umgesetzt<sup>6)</sup>. Das Reaktionsprodukt war nach Misch-Smp. und IR.-Absorptionsspektrum identisch mit dem aus der Verbindung IV<sup>3)</sup> in Pyridin bereiteten Benzoylderivat V. Dadurch wird die früher auf Grund des IR.-Absorptionsspektrums abgeleitete Konstitution<sup>3)</sup> der Verbindung III, die als Nebenprodukt bei der Hydrolyse von Ferrioxaminen entsteht, bestätigt.

Der CIBA-AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, danken wir für die Herstellung der verwendeten Ferrioxamine.



### Experimenteller Teil<sup>7)</sup>

*Ferrioxamin D<sub>1</sub>*. Aus Methanol-Äther rotbraune Nadeln, die bei 170–172° ihre Doppelbrechung verlieren und bei ca. 195–200° zerfließen.

$\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}_9\text{N}_6\text{Fe}$	Ber. C 49,47	H 7,23	N 12,80	Fe 8,51%
	Gef. „ 49,06	„ 7,50	„ 12,56	„ 8,45% <sup>2)</sup>

*Ferrioxamin D<sub>1</sub>* verhält sich bei der Papierelektrophorese neutral und besitzt keine titrierbaren Funktionen. IR.-Absorptionsspektrum in KBr s. Fig., Kurve 1; UV.-Absorptionsspektrum vgl. <sup>2)</sup>.

*Hydrolyse mit Salzsäure*. 3 mg *Ferrioxamin D<sub>1</sub>* in 0,5 ml 2N Salzsäure wurden 2 Std. im siedenden Wasserbad erhitzt. Das Hydrolysat wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 100  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen. Proben à 10  $\mu\text{l}$  wurden papierchromatographisch mit einem unter gleichen Bedingungen erhaltenen Hydrolysat aus *Ferrioxamin B*<sup>2)</sup> verglichen.

- <sup>4)</sup> H. BICKEL, B. FECHTIG, G. E. HALL, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG & E. VISCHER, *Helv.* **43**, 901 (1960).
- <sup>5)</sup> J. VON BRAUN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **37**, 2915 (1904).
- <sup>6)</sup> A. NEUBERGER & J. J. SCOTT, *J. chem. Soc.* **1954**, 1820; J. C. SHEEHAN & W. A. BOLHOFER, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 2786 (1950).
- <sup>7)</sup> Die Smp. wurden unter dem Mikroskop bestimmt und sind korrigiert. Die UV.-Absorptionsspektren wurden mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK 1, die IR.-Absorptionsspektren mit einem PERKIN-ELMER-Spektrographen, Modell 21, aufgenommen.

a) Fließmittel n-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser 10:10:2:5; Färbung mit Ninhydrin. Beide Hydrolyseprodukte gaben übereinstimmend folgende drei Flecke: Bernsteinsäure Rf 0,17<sup>8)</sup>; 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan Rf 0,53; 1,5-Diaminopentan Rf 0,68.

b) Fließmittel n-Butanol – 6N HCl 7:3; Färbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid. Es waren folgende drei Flecke zu erkennen: Eisen(II)-Ion Rf 0,15; 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan Rf 0,21; N-(5-Hydroxylaminopentyl)-succinimid Rf 0,52.

*Bestimmung der flüchtigen Säuren.* 153 mg Ferrioxamin D<sub>1</sub> wurden mit 15 ml 10-proz. Schwefelsäure 30 Min. unter Rückfluss gekocht und die flüchtigen Säuren mit Wasser abdestilliert, wobei das abdestillierte Wasser von Zeit zu Zeit ersetzt wurde. Das Destillat (60 ml) verbrauchte 4,37 ml 0,1N Natronlauge, entsprechend 1,88 Mol Essigsäure pro Mol Ferrioxamin D<sub>1</sub>. Die neutrale Lösung nach der Titration wurde im Vakuum zur Trockne verdampft. Ein kleiner Teil des Rückstandes wurde papierchromatographisch als reine Essigsäure identifiziert<sup>9)</sup>. Die Hauptmenge wurde in üblicher Weise (vgl. z. B.<sup>3)</sup>) mit p-Phenyl-phenacylbromid umgesetzt. Der durch Kristallisation aus Äther-Petroläther und Hochvakuumsublimation gereinigte Ester war identisch mit p-Phenyl-phenacylacetat: Smp. und Misch-Smp. 112–113°.

*Acetylierung von Ferrioxamin B.* 650 mg Ferrioxamin-B-hydrochlorid und 82 mg wasserfreies Natriumacetat wurden in 10 ml Methylalkohol mit 9,5 ml Essigsäureanhydrid 4 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die mit Natriumchlorid gesättigte Lösung schüttelte man viermal mit Chloroform aus, die Auszüge wurden zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Eindampfen im Vakuum erhielt man 550 mg rotbraunes amorphes Pulver, dessen Hauptkomponente im Papierchromatogramm<sup>2)</sup> gleich wie Ferrioxamin D<sub>1</sub> wanderte. Sie war von geringen Mengen von Nebenprodukten (das eine mit etwas grösserem, das andere mit etwas kleinerem Rf-Wert als Ferrioxamin D<sub>1</sub>) begleitet.

Zur Reinigung wurde das Acetylierungsprodukt an einer Säule aus 280 g Cellulosepulver chromatographiert. Das Cellulosepulver war mit einer 10-proz. wässrigen Natriumchlorid-Lösung befeuchtet. Als Fließmittel diente die obere Phase eines Gemisches aus 50 Teilen tert.-Butanol, 25 T. Wasser, 25 T. gesättigter Natriumchlorid-Lösung und 1 T. 0,1N Salzsäure. Es wurden Fraktionen von je 8 ml aufgefangen. In den Fraktionen 33–44 war neben Ferrioxamin D<sub>1</sub> die eine Begleitsubstanz, in den Fraktionen 55–66 die andere enthalten. Die Fraktionen 45–54 waren frei von Nebenkomponenten. Diese Fraktionen wurden im Vakuum zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, mehrmals mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Eindampfen erhielt man 226 mg Acetylierungsprodukt, das aus Methanol-Äther in feinen rotbraunen Nadelchen kristallisierte. Die Kristalle verlieren ihre Doppelbrechung bei 170–172° und schmelzen bei 197–203°. Mit Ferrioxamin D<sub>1</sub> wurde keine Smp.-Erniedrigung beobachtet. Das IR.-Absorptionsspektrum ist identisch mit dem von Ferrioxamin D<sub>1</sub>. – Zur Analyse wurde im Schweinchen eingewogen und 48 Std. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nachgetrocknet.

$C_{27}H_{47}O_9N_6Fe$	Ber. C	49,47	H	7,23	N	12,80	Fe	8,51%
	Gef. „	49,31	„	7,29	„	12,54	„	8,76%

*Eisenfreier Grundkörper aus Ferrioxamin D<sub>1</sub>.* 257 mg Ferrioxamin D<sub>1</sub> wurden in 20 ml Wasser gelöst und ca. 20 ml 1N Natronlauge zugefügt. Das feinflockige Eisenhydroxyd wurde in der Zentrifuge abgetrennt und die Lösung mit 2N HCl schwach angesäuert. Die Lösung wurde dreimal mit n-Butanol ausgeschüttelt und die Auszüge mit wenig Wasser gewaschen. Nach dem Abdampfen des Butanols im Vakuum wurde der eisenfreie Grundkörper als kristalliner Rückstand erhalten. Nach dem Umkristallisieren aus viel heissem Methanol erhielt man 170 mg (72% d. Th.) eines weissen, feinkristallinen Pulvers vom Smp. 185°. Zur Analyse wurde ein 3mal umkristalli-

<sup>8)</sup> Bei der Chromatographie mit dem genannten, Diäthylamin enthaltenden Fließmittel lassen sich die Bernsteinsäure wie auch andere organische und anorganische Säuren bei der Ninhydrin-Färbung als blassblaue Flecke erkennen. Diese scheinbar positive Ninhydrin-Reaktion von Säuren kommt offenbar dadurch zustande, dass an den betreffenden Stellen das Diäthylamin beim Trocknen des Papiers als Salz zurückbleibt und die schwache Ninhydrin-Färbung bewirkt.

<sup>9)</sup> A. R. JONES, E. J. DOWLING & W. J. SKRABA, *Analyt. Chemistry* 25, 394 (1953).

siertes Präparat 20 Std. bei 70° im Hochvakuum getrocknet. IR.-Absorptionsspektrum in KBr s. Fig., Kurve 2.

$C_{27}H_{50}O_9N_6$  Ber. C 53,80 H 8,36 N 13,94% Gef. C 53,54 H 8,42 N 13,72%

In gleicher Weise wurden aus 60 mg Acetylferrioxamin B 30 mg der eisenfreien Verbindung erhalten, die bei 188–189° schmolz, mit dem obigen Präparat keine Smp.-Erniedrigung zeigte und ein identisches IR.-Absorptionsspektrum ergab.

$C_{27}H_{50}O_9N_6$  Ber. C 53,80 H 8,36 N 13,94% Gef. C 53,66 H 8,62 N 13,79%

Für den papierchromatographischen Vergleich wurden je 50  $\mu$ g Substanz in 25  $\mu$ l Methanol aufgetragen und mit dem Fließmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1 aufsteigend chromatographiert. Das Chromatogramm wurde mit 1-proz.  $FeCl_3$  in Alkohol besprüht, wobei die Substanzen als braunviolette Flecke sichtbar wurden. Beide Proben zeigten übereinstimmendes Verhalten: Rf 0,87.

*N*-(5-Benzoylamino-pentyl)-succinimid (V). – a) *Synthetisch*. 990 mg Succinimid wurden in 10 ml Dimethylformamid (im Vakuum über BaO destilliert) gelöst und 2,25 g 1-Chlor-5-benzamido-pentan (VI)<sup>5</sup>) zugefügt. Unter Rühren wurden 1,38 g wasserfreies Kaliumcarbonat in drei Portionen im Abstand von etwa 2 Std. zugegeben und 24 Std. bei Zimmertemperatur gerührt (vgl. <sup>6</sup>). Zuletzt erwärmte man 80 Min. im siedenden Wasserbad. – Das erkaltete Gemisch wurde mit Wasser verdünnt und 5mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die gewaschenen und getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen einen grösstenteils kristallisierten Rückstand, der aus Aceton-Äther umkristallisiert wurde. Man erhielt 1,96 g (68% d. Th.) farblose Kristalle, die nach zweimaligem Umkristallisieren bei 111,5–112,5° schmolzen. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 75° getrocknet.

$C_{16}H_{20}O_3N_2$  Ber. C 66,64 H 6,99 N 9,72% Gef. C 66,69 H 7,08 N 9,74%

IR.-Absorptionsspektrum in Nujol:  $\nu(NH)$  (Benzamid): 3380  $cm^{-1}$ ;  $\nu(CO)$  (Benzamid): 1643  $cm^{-1}$ ;  $\nu(CO)$  (Succinimid): 1690 (s) und 1765 (m)  $cm^{-1}$ .

b) *Aus Ferrioxamin B*. Zu 131 mg öligem *N*-(5-Aminopentyl)-succinimid (wie früher beschrieben<sup>3</sup>) durch Hydrolyse von Ferrioxamin B und katalytische Hydrierung bereitet) in 5 ml trockenem Pyridin fügte man 0,5 ml Benzoylchlorid zu. Nach kurzem Stehen begann sich ein kristalliner Niederschlag abzuscheiden. Nach 2 Std. wurde Pyridin im Vakuum abgedampft und das überschüssige Benzoylchlorid durch kurzes Erwärmen mit ca. 5 ml Methanol zersetzt. Der Eindampfungsrückstand wurde in Chloroform gelöst, mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und wieder eingedampft. Der teilweise kristalline Rückstand wurde aus Aceton-Äther umkristallisiert. Man erhielt 95 mg Kristalle, die nach weiterem Umkristallisieren bei 110,5–112° schmolzen. Der Misch-Smp. mit dem synthetischen Präparat lag bei 111–112°. Die IR.-Absorptionsspektren der beiden Präparate waren identisch.

Die Mikroanalysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung W. MANSER) ausgeführt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Auf Grund der analytischen Daten wurde für das Ferrioxamin  $D_1$  die Konstitution des *N*-Acetylferrioxamins B vermutet. Diese konnte durch Acetylierung des Ferrioxamins B (I) zu Ferrioxamin  $D_1$  (II) bestätigt werden.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich