

215. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

44. Mitteilung¹⁾

Zur Konstitution von Ferrichrysin und Ferricrocin

von W. Keller-Schierlein und A. Deér

(13. VI. 63)

Vor einiger Zeit haben wir eine Reihe von Stämmen der Familie der *Aspergillaceae* auf die Bildung von Sideraminen untersucht²⁾. Neben den bekannten Verbindungen Ferrichrom³⁾ und Coprogen⁴⁾ wurden dabei mehrere neue Eisenkomplexe der Sideraminreihe aufgefunden. Von diesen standen das *Ferrichrysin* und das *Ferricrocin* in ihren Eigenschaften dem Ferrichrom besonders nahe. Die Absorptionsspektren im UV. und im Sichtbaren sind praktisch deckungsgleich. Die IR.-Absorptionsspektren (s. Fig. 1) weichen nur geringfügig voneinander ab, und auch die analytische Zusammensetzung zeigte nur sehr kleine Unterschiede. Auch in der biologischen Wirkung^{2) 5)} war kein signifikanter Unterschied zwischen Ferrichrom,

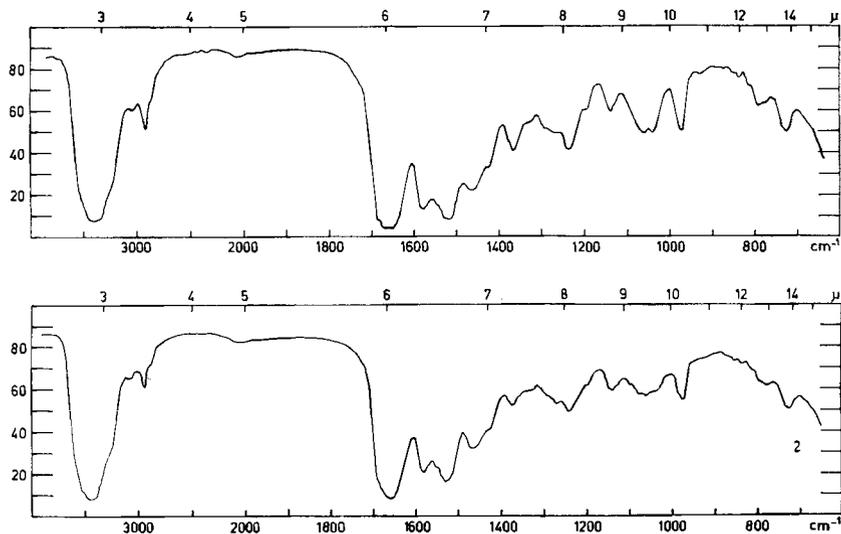
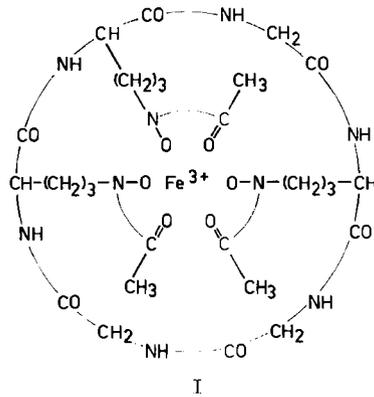


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektren in KBr
Kurve 1: Ferrichrysin; Kurve 2: Ferricrocin

- ¹⁾ 43. Mitteilung: H. BICKEL, H. KEBERLE & E. VISCHER, *Helv.* **46**, 1385 (1963).
- ²⁾ H. ZÄHNER, W. KELLER-SCHIERLEIN, R. HÜTTER, K. HESS-LEISINGER & A. DEÉR, *Arch. Mikrobiol.* **45**, 119 (1963).
- ³⁾ J. B. NEILANDS, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 4846 (1952).
- ⁴⁾ C. PIDACKS, A. R. WHITEHILL, B. L. HUTCHINGS, N. BOHONOS, L. M. PRUESS, C. W. HESSELTINE & J. H. WILLIAMS, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 6064 (1953).
- ⁵⁾ H. ZÄHNER, E. BACHMANN, R. HÜTTER & J. NÜESCH, *Pathologia et Microbiologia* **25**, 708 (1962).

Ferrichrysin und Ferricrocin festzustellen. Sogar die papierchromatographischen Rf-Werte sowie das Verhalten der drei Verbindungen bei der CRAIG-Verteilung waren recht ähnlich; immerhin liessen sie sich bei geeigneter Versuchsanordnung durch diese Kriterien mit Sicherheit voneinander unterscheiden²⁾.

Das *Ferrichrom* ist von EMERY & NEILANDS⁶⁾ eingehend chemisch untersucht worden. Als Bausteine wurden 3 Mol. Essigsäure, 3 Mol. Glycin, 3 Mol. δ -N-Hydroxy-L-ornithin und ein Eisen(III)-Ion nachgewiesen. Durch Perjodsäure-Abbau der Desferri-Verbindung wurde wahrscheinlich gemacht, dass die Essigsäurereste mit den Hydroxylaminogruppen der δ -N-Hydroxyornithin-Reste zu Hydroxamsäuregruppen verbunden sind, die mit dem Eisen(III)-Ion einen stabilen Komplex bilden. Da *Ferrichrom* weder freie Aminogruppen noch freie Carboxylgruppen besitzt, müssen sämtliche Amino- und Carboxylgruppen der Aminosäuren in Peptidbindungen vorliegen, was nur möglich ist, wenn sie in einem Cyclopeptid-Ring angeordnet sind. Über die Reihenfolge der Aminosäurereste in *Ferrichrom* besitzen wir noch keine sicheren Anhaltspunkte. Lediglich auf Grund von Modellbetrachtungen neigen EMERY & NEILANDS⁶⁾ zur Ansicht, dass die Reihenfolge unregelmässig sei. Sie schlagen für *Ferrichrom* die Konstitutionsformel (I) vor.



Die grosse Ähnlichkeit in den physikalischen und chemischen Eigenschaften von *Ferrichrom*, *Ferrichrysin* und *Ferricrocin* drängte die Vermutung auf, dass die beiden letzteren einen sehr ähnlichen chemischen Bau aufweisen wie das *Ferrichrom*. Insbesondere liessen die spektroskopischen Eigenschaften sowie die biologische Wirkung keinen Zweifel daran aufkommen, dass *Ferrichrysin* und *Ferricrocin* – wie die bekannten Sideramine *Ferrichrom* und *Ferrioxamine*⁷⁾ – Eisenkomplexe von Hydroxamsäuren sind.

Da uns im Stamm *Aspergillus melleus*, ETH M 2853, ein sehr guter Produzent von *Ferrichrysin* zur Verfügung stand, der die Herstellung einer grösseren Menge dieser Verbindung erlaubte, haben wir sie eingehend untersucht, einerseits um die Beziehungen zwischen *Ferrichrysin* und *Ferrichrom* abzuklären, andererseits um einige noch ungeklärte Probleme der Struktur dieser Verbindungen zu erhellen.

Ferricrocin, der dritte Vertreter dieser Untergruppe der Sideramine, wurde zwar als am häufigsten vorkommendes Sideramin bei *Aspergillaceen* aufgefunden²⁾. Seine Herstellung war aber schwieriger, da alle unsere *Ferricrocin* produzierenden Stämme diese Verbindung in relativ schlechter Ausbeute liefern. Die zur Verfügung

⁶⁾ T. EMERY & J. B. NEILANDS, J. Amer. chem. Soc. 82, 3658 (1960); 83, 1626 (1961).

⁷⁾ H. BICKEL, G. E. HALL, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER & A. WETTSTEIN, Helv. 43, 2129 (1960).

stehende Menge erlaubte daher nur eine unvollständige Untersuchung, die aber genügte, die Beziehungen zum Ferrichrom und Ferrichrysin im wesentlichen abzuklären.

Baustein-Analyse. Hydrolysen von Sideraminen in Form der intakten Eisenkomplexe mit Chlorwasserstoffsäure haben früher zu sehr unübersichtlichen Resultaten geführt, da offenbar der leichte Übergang zwischen 2- und 3-wertigen Eisen-Ionen katalytisch eine teilweise oxydative, teilweise reduktive Zersetzung von organisch substituierten Hydroxylaminen bewirkt⁷⁾. Für die Hydrolysen von Ferrichrysin und Ferricrocin haben wir daher, in Anlehnung an die Arbeiten über Ferrioxamine⁷⁾⁸⁾ und gestützt auf die Erfahrungen von EMERY & NEILANDS⁶⁾ mit Ferrichrom und Ferrichrom A, die Desferri-Verbindungen eingesetzt. Diese liessen sich leicht durch Umsetzung der Sideramine mit 8-Hydroxychinolin in wässrig-methanolischer Lösung herstellen. Der unlösliche Eisenkomplex des 8-Hydroxychinolins fiel dabei aus, und das überschüssige Reagens liess sich durch Ausschütteln mit Chloroform entfernen. Durch Eindampfen der wässrigen Lösung erhielt man das Desferri-sideramin in praktisch reiner Form. Obwohl die amorphen Produkte nicht durch Kristallisation gereinigt werden konnten, gaben sie recht befriedigende Analysenergebnisse. Die in D₂O aufgenommenen NMR.-Spektren (s. ³⁾, Fig. 2, sowie Fig. 2 dieser Abhandlung) zeigten ebenfalls praktisch keine Verunreinigungen an. Lediglich ein kleines Singlett bei $\delta = 3,34$ ppm weist auf eine kleine Menge Methanol hin, das offenbar beim mehrtägigen Trocknen im Vakuum hartnäckig zurückgehalten wird. Das Desferri-ferrichrysin gibt mit Eisen(III)-Ionen in guter Ausbeute das ursprüngliche Sideramin zurück.

Das Eisen(III)-Ion liess sich auch durch kontinuierliche Extraktion einer Lösung von Ferrichrysin in 6N Salzsäure mittels Äther entfernen, wonach das Eisen(III)-chlorid im ätherischen Auszug, das Desferri-ferrichrysin in der wässrigen Phase gefunden wurde. Die Entfernung des Eisens nach dieser Methode ist eher vollständiger als mittels 8-Hydroxychinolin. Doch ist die Desferri-Verbindung aus der stark sauren Lösung schwer in unzersetzter Form zu isolieren. Diese Methode ist zu bevorzugen, wenn das Produkt ohne Isolierung unmittelbar hydrolysiert werden soll.

Desferri-ferrichrysin wurde mit starker Salzsäure energisch hydrolysiert. Um die relativ instabilen und noch wenig bekannten Hydroxylamin-Verbindungen zu umgehen⁹⁾ haben wir das Hydrolysegemisch katalytisch hydriert und die Aminosäuren in Form ihrer kristallisierten 2,4-Dinitrophenylderivate isoliert. Es wurden die Derivate des L-Serins, L-Ornithins und Glycins aufgefunden und durch Misch-Smp., IR.-Absorptionsspektren, Dünnschichtchromatographie und spezifische Drehung identifiziert.

Serin, Glycin und Ornithin liessen sich in den hydrierten Hydrolysaten auch durch Ionenaustauscher-Chromatographie nach der Methode von MOORE & STEIN¹⁰⁾ nachweisen. Es zeigte sich aber, dass die Hydrolyse mit Salzsäure eine quantitative

⁸⁾ W. KELLER-SCHIERLEIN & V. PRELOG, *Helv.* 44, 709, 1981 (1961); 45, 590 (1962).

⁹⁾ *o*-N-Hydroxy-D,L-ornithin ist erst nach Abschluss dieses Teils unserer Arbeit synthetisiert worden: S. ROGERS & J. B. NEILANDS, *Biochemistry* 2, 6 (1963).

¹⁰⁾ Ausführung nach D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN & S. MOORE, *Analyt. Chemistry* 30, 1190 (1958).

Auswertung sehr unsicher macht. Sowohl die Werte für Serin wie für Ornithin schwankten stark und lagen z. T. erheblich unter den erwarteten Werten. Der Stickstoff, der durch teilweise Zersetzung dieser Aminosäuren verloren ging, trat grösstenteils als Ammoniak in Erscheinung. Gut reproduzierbare Werte wurden dagegen erhalten, wenn die reduzierende Hydrolyse mit Jodwasserstoff durchgeführt wurde. Es konnten dabei die Eisenkomplexe direkt eingesetzt werden. Man fand im Hydrolysat ausser Serin, Glycin und Ornithin erhebliche Mengen an Alanin. Da in den Salzsäurehydrolysaten nie Alanin nachgewiesen werden konnte, kann es nicht selbst ein Baustein des Ferrichrysin sein, sondern ist ausschliesslich durch Reduktion aus Serin entstanden. Die Summe aus Alanin und Serin entspricht demnach dem Serin-Gehalt des Ferrichrysin. Glycin wurde von der Jodwasserstoffsäure kaum angegriffen, und auch das Ornithin wurde nahezu quantitativ erfasst. Der Ammoniak-Pik war in den Chromatogrammen von Jodwasserstoff-Hydrolysaten klein und überschritt selten 0,1 Mol. Das gefundene Verhältnis der Aminosäuren in den Hydrolysaten von Ferrichrysin betrug in runden Zahlen: Glycin : Serin : Ornithin = 1:2:3.

Das verfügbare Ferricrocin reichte nicht aus für eine präparative Isolierung der Aminosäuren bzw. ihrer DNP.-Derivate. Durch Papierchromatographie sowie durch Aminosäureanalyse nach MOORE & STEIN wurden dieselben Aminosäuren nachgewiesen wie beim Ferrichrysin. Das Verhältnis der Hydrolyseprodukte betrug, auf ganze Zahlen aufgerundet: Glycin : Serin : Ornithin = 2:1:3. In Analogie zum Ferrichrysin nehmen wir an, dass Serin und Ornithin ebenfalls in der L-Konfiguration vorliegen. Der wesentliche Unterschied dieser neuen Sideramine zum Ferrichrom liegt demnach darin, dass im Ferricrocin einer, im Ferrichrysin zwei Glycinreste durch L-Serinreste ersetzt sind.

Als weitere Bausteine des Ferrichrysin liessen sich, wie beim Ferrichrom, drei Mol. Essigsäure nachweisen und als kristallisierter *p*-Phenylphenacylester identifizieren¹¹⁾. Im NMR.-Spektrum des Desferri-ferrichrysin lassen sich die drei Acetyl-

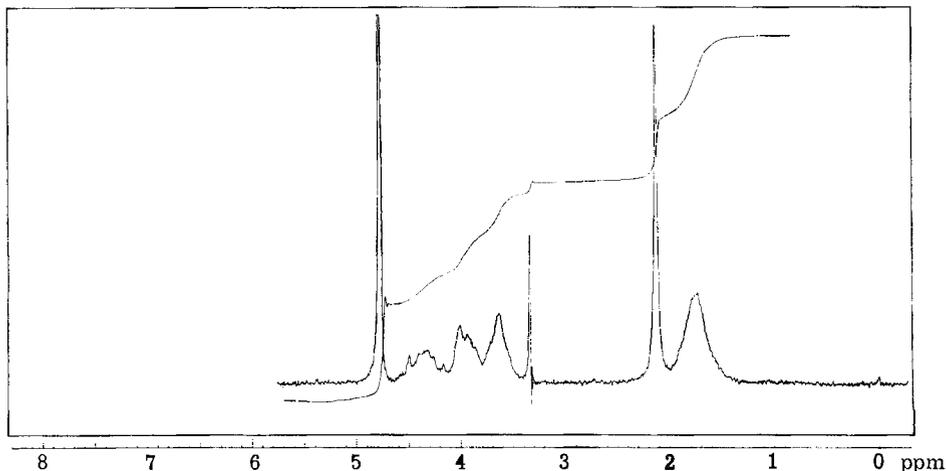


Fig. 2. NMR.-Spektrum von Desferri-ferricrocin in D_2O

¹¹⁾ A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 33, 90 (1950).

gruppen durch ein Singlett bei $\delta = 2,14$ ppm, das 9 Protonen umfasst, erkennen (vgl. ²), Fig. 2). An derselben Stelle finden wir ein ebenfalls 9 Protonen entsprechendes Singlett im Spektrum des Desferri-ferricrocins (Fig. 2). Die Essigsäure ist damit auch als Baustein des Ferricrocins bewiesen.

Weitere Bruchstücke konnten wir in den Hydrolysegemischen nicht auffinden. Da sich die erwähnten Bausteine widerspruchsfrei zu Formeln für das Ferrichrysin bzw. Ferricrocin zusammenfügen lassen (s. unten), die sowohl mit der analytischen Zusammensetzung im Einklang sind wie auch die übrigen chemischen Eigenschaften zwanglos erklären und die biochemische Beziehung zu den Ferrioxaminen erkennen lassen, darf angenommen werden, dass keine weiteren Bausteine am Aufbau dieser Sideramine beteiligt sind. Hinsichtlich der quantitativen Zusammensetzung aus einfachen Bausteinen ergibt sich somit eine klare Beziehung zwischen den drei Sideraminen der Ferrichromgruppe, die in der Tabelle 1 zusammengefasst sind.

Tabelle 1. Bausteine der Sideramine Ferrichrom, Ferrichrysin und Ferricrocin

Sideramin	L-Ornithin	L-Serin	Glycin	Essigsäure
Ferrichrom	3	0	3	3
Ferricrocin	3	1	2	3
Ferrichrysin	3	2	1	3

Verknüpfungsart der Bausteine. Die nachgewiesenen Bausteine des Desferri-ferrichrysin bzw. -ferricrocins enthalten insgesamt 9 Carboxyl- und 9-Amino-Gruppen. Von den letzteren müssen, da mit Eisen(III)-Ion ein neutraler 1:1-Komplex entsteht, drei in hydroxylierter Form vorliegen und mit drei Carboxylgruppen zu Hydroxamsäuregruppen verbunden sein. Vom Ferrichrom ist bekannt, dass die δ -ständigen Stickstoffatome der L-Ornithine und die Carboxylgruppen der Essigsäuren diese Funktionen übernehmen. Da uns δ -N-Hydroxy-L-ornithin als Vergleichspräparat nicht zur Verfügung stand⁹), haben wir den Beweis, dass dies auch beim Ferrichrysin der Fall ist, auf indirektem Weg erbracht.

Im Desferri-ferrichrysin lassen sich die Hydroxamsäurebindungen viel leichter mit Säure hydrolysieren als die Peptidbindungen. Es gelingt relativ leicht, Desferri-ferrichrysin (Partialformel II) in der Weise zu spalten, dass die Hydroxamsäurebindungen völlig hydrolysiert werden, während die Peptidbindungen im wesentlichen noch intakt sind. Das Reaktionsprodukt einer Hydrolyse mit 1 N-Salzsäure, die während ca. 20 Min. bei 95° durchgeführt wurde, war ein farbloses klebriges Harz, das nicht kristallisiert werden konnte. Dass das Produkt im wesentlichen aus dem Trihydrochlorid der Verbindung III besteht, geht aus folgendem hervor:

1) Mit Eisen(III)-chlorid entsteht keine Farbreaktion. Es können demnach keine Hydroxamsäuregruppen vorhanden sein.

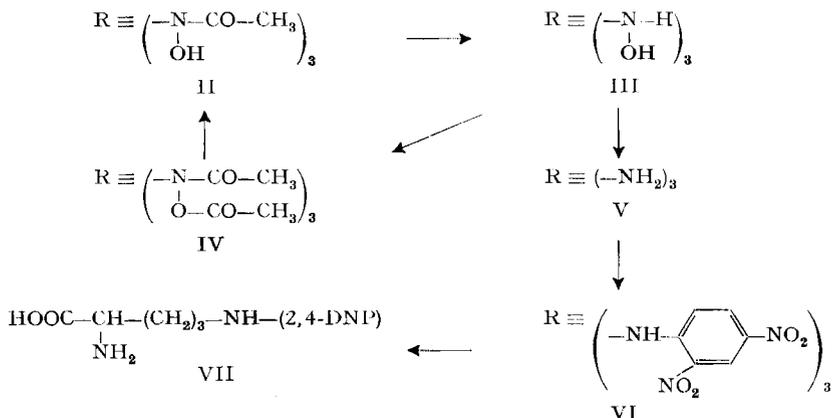
2) Papierchromatographisch liessen sich die Grundbausteine (Ornithin bzw. N-Hydroxyornithin, Serin, Glycin) nicht nachweisen. Die Peptidbindungen können demnach nicht stark angegriffen worden sein.

3) Das Hydrolyseprodukt III gibt mit Triphenyltetrazoliumchlorid eine rote Farbreaktion, was das Vorhandensein freier Hydroxylaminogruppen anzeigt.

4) In NMR.-Spektrum fehlt das charakteristische Signal für Acetylgruppen. Diese müssen daher hydrolytisch abgespalten worden sein.

5) Ein endgültiger Beweis dafür, dass die Acetylgruppen am Aufbau der Hydroxamsäuregruppen beteiligt sind, und dass das restliche Gerüst des Desferri-ferrichrysin in der Verbindung III noch intakt ist, konnte dadurch erbracht werden, dass es gelang, das Abbauprodukt wieder in das ursprüngliche Ferrichrysin zurückzuführen. Das Partialhydrolysat III liess sich mit Essigsäureanhydrid und Pyridin acetylieren. Das nicht kristallisierbare Produkt gab mit Eisen(III)-chlorid keine Farbreaktion. Es hatten sich somit offenbar die O,N-Diacetyl-hydroxylamino-gruppen (vgl. IV) gebildet, was auch den Erfahrungen auf dem Gebiet der Ferrioxamin-Synthesen¹²⁾ entspricht. Wahrscheinlich wurden auch die Hydroxylgruppen der Serinreste mindestens teilweise acetyliert.

Bei der Behandlung des Acetylierungsproduktes (IV) mit methanolischem Ammoniak wurden die O-Acetylgruppen als Acetamid abgespalten (vgl. auch ⁷⁾ und ¹²⁾). Das Produkt wurde nicht weiter gereinigt, sondern direkt in den Eisenkomplex übergeführt. Aus dem tiefbraunen Reaktionsgemisch liess sich durch CRAIG-Verteilung ein kristallisiertes Sideramin gewinnen, das nach Smp., IR.-Absorptionsspektrum, Papierchromatographie, Verteilungskoeffizient und biologischer Wirkung mit dem ursprünglichen Ferrichrysin identisch war.



Es sei nebenbei erwähnt, dass sich die gleiche Reaktionsfolge auch ausgehend von Ferrichrom durchführen liess und zum ursprünglichen Ferrichrom zurückführte¹³⁾.

Die Stickstoffatome, die an den Hydroxamsäurebindungen beteiligt sind, konnten wir in folgender Weise festlegen: Das Produkt III der partiellen Hydrolyse von Desferri-ferrichrysin wurde in Feinsprit mit Platin als Katalysator hydriert, wodurch erfahrungsgemäss⁷⁾ die Hydroxylaminogruppen zu Aminogruppen reduziert wurden. Dementsprechend gab das Reduktionsprodukt V, das als harzartiges farbloses Hydrochlorid erhalten wurde, mit Triphenyltetrazoliumchlorid keine Farbreaktion. Das rohe Reduktionsprodukt setzte man in schwach alkalischer Lösung mit 2,4-Dinitrofluorbenzol um, wobei die freien Aminogruppen markiert wurden. Entsprechend dem Verlauf der Reaktionsfolge (II → V)

¹²⁾ V. PRELOG & A. WALSER, *Helv.* 45, 631, 1732 (1962).

¹³⁾ W. KELLER-SCHIERLEIN, unveröffentlicht.

muss es sich um diejenigen Stickstoffatome handeln, die ursprünglich Bestandteile der Hydroxamsäuregruppen waren. Das rohe DNP-Derivat zeigte im Dünnschichtchromatogramm ausser einer Hauptkomponente noch mehrere schwächere gelbe Flecke. Es handelt sich wahrscheinlich um Nebenprodukte, die durch teilweise Spaltung von Peptidbindungen während der Partialhydrolyse entstanden waren. Die Isolierung der chromatographisch reinen Hauptkomponente gelang durch Chromatographie an Kieselgel. Bei der energischen Hydrolyse dieser Verbindung erhielt man an freien Aminosäuren Glycin und Serin, die papierchromatographisch identifiziert wurden. Das Ornithin wurde als δ -DNP-Derivat erhalten. Die Identifizierung erfolgte als α -N-Benzoyl- δ -N-DNP-L-ornithin durch Vergleich mit einem authentischen Präparat mittels Dünnschichtchromatographie¹⁴⁾, Misch-Smp. und IR.-Absorptionsspektrum. Damit ist der Beweis erbracht, dass die Essigsäurereste mit den δ -Stickstoffatomen der Ornithinreste, die in der Hydroxylaminstufe vorliegen, hydroxamsäureartig verbunden sind.

Die Essigsäuren müssen auch beim Ferricrocin die Hydroxamsäuregruppen bilden, da ein Partialhydrolysat aus Desferri-ferricrocin beim analogen Aufbau mittels Essigsäureanhydrid ebenfalls das ursprüngliche Ferricrocin gab.

Weitere funktionelle Gruppen der Bausteine, nämlich die Carboxylgruppen und die α -Aminogruppen der 6-Aminosäuren, müssen sämtliche peptidartig gebunden sein. Ferrichrysin ist nämlich elektrophoretisch neutral und enthält demnach keine freien Carboxyl- und Amino-Gruppen. Dies ist nur möglich, wenn die Aminosäuren in einem Cyclopeptid-Ring angeordnet sind.

Schliesslich finden wir an funktionellen Gruppen noch die beiden Hydroxyle der Serinreste. Diese liegen im Ferrichrysin in freier Form vor. Es gelingt nämlich leicht, das Ferrichrysin in Methanol durch Umsetzung mit einem grossen Überschuss Essigsäureanhydrid zu acetylieren. Das Acetylierungsprodukt ist eine rotbraune amorphe Substanz, die sich bei der Papierchromatographie durch wesentlich höhere Rf-Werte als das Ausgangsmaterial auszeichnet. Die Desferri-Verbindung des Acetylierungsproduktes zeigt im NMR.-Spektrum alle Signale des Ferrichrysin, wozu noch ein 6 Protonen entsprechendes Singlett bei $\delta = 2,08$ ppm kommt, das den beiden O-Acetylgruppen zugeordnet werden muss. Die Hydroxylgruppe des Serinrestes kann auch beim Ferricrocin nicht verestert oder veräthert vorliegen, da die Signale entsprechender Gruppen im NMR.-Spektrum der Desferri-Verbindung nicht vorhanden sind.

Nach diesen Befunden ist der chemische Bau des Ferrichrysin ganz analog demjenigen des Ferrichroms⁶⁾. Für das Ferricrocin nehmen wir aus Analogie zum Ferrichrom und Ferrichrysin ebenfalls einen gleichartigen Aufbau an. Dieser Analogieschluss scheint uns erlaubt zu sein, da das Ferricrocin nicht nur in seinem chemischen und spektroskopischen Verhalten den beiden andern Vertretern der Gruppe entspricht, sondern auch biologisch völlig übereinstimmende Eigenschaften aufweist. Ferricrocin kann gemäss seiner Bausteinanalyse als eine Zwischenform von Ferrichrom und Ferrichrysin angesehen werden (vgl. Tabelle 1).

Unaufgeklärt ist bisher – sowohl beim Ferrichrom wie auch beim Ferrichrysin und Ferricrocin – die Sequenz der Aminosäuren im Cyclopeptid-Ring. Für Ferri-

¹⁴⁾ M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. PATAKI, *Experientia* 17, 145 (1961).

chrom (allgemeine Formel A_3B_3) sind vier Anordnungen der Aminosäuren möglich (s. Fig. 3), von denen der Formelvorschlag von EMERY & NEILANDS⁶⁾ (I) eine Möglichkeit representiert. Für Ferrichrysin und Ferricrocin (allgemeine Formel A_3B_2C) sind sogar je 10 Möglichkeiten der Verknüpfung vorhanden, da sich von den allgemeinen Formeln a, b und c (Fig. 3) je drei, von der Formel d ein Sequenz-isomeres für A_3B_2C ableiten lassen.

Sequenzanalysen bei Polypeptiden sind bisher vorwiegend durch partielle saure oder enzymatische Hydrolyse und Bestimmung kleiner Bruchstücke (vor allem Di- und Tripeptide) durchgeführt worden. Überlegungen über die theoretisch möglichen Di- und Tripeptide, die aus den 10 möglichen Aminosäuresequenzen des Ferrichrysin entstehen können, zeigen, dass sich die meisten dieser Bruchstücke aus mehreren verschiedenen Sequenzen ableiten können. Es wäre notwendig, eine grössere Anzahl der theoretisch möglichen Di- und Tripeptide zu erfassen, um eine eindeutige Sequenzbestimmung vornehmen zu können. Die Erfahrungen zeigen aber, dass gewisse Peptidbindungen bevorzugt hydrolysiert werden, so dass gewöhnlich nur eine Auswahl der theoretisch möglichen Bruchstücke entsteht, was aber beim Ferrichrysin höchstens den Ausschluss einzelner Sequenzen, nicht aber eine eindeutige Sequenzzuordnung erlauben würde.

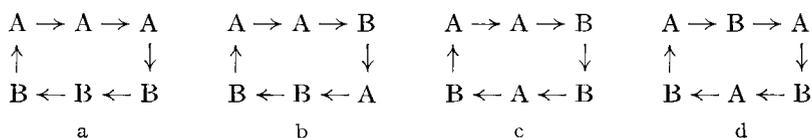
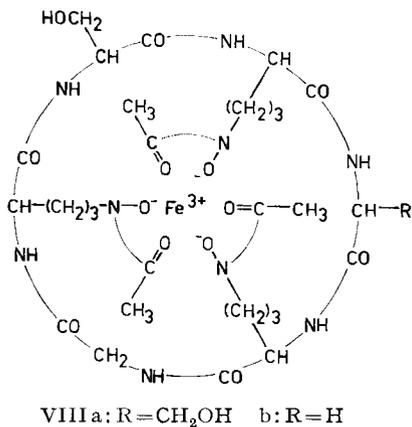


Fig. 3. Möglichkeiten der Ringverknüpfung von Cyclopeptiden der allgemeinen Formel A_3B_3

Bei orientierenden Versuchen zur partiellen sauren Hydrolyse von Desferrichrysin sowie des Cyclohexapeptids V, das durch milde Abspaltung der Acetylgruppen und katalytische Reduktion der Hydroxylaminogruppen erhalten worden war, zeigte es sich, dass überhaupt keine niedrigen Peptidbruchstücke in nachweisbarer Menge gebildet wurden. Schon die ersten ninhydrinpositiven Bruchstücke, die sich papierchromatographisch nachweisen liessen, waren die Aminosäuren. Offenbar wird ein offenkettiges Peptid, das sich durch Spaltung einer Ringbindung



bildet, rascher zu den Grundbausteinen abgebaut, als es sich aus dem Ring neu zu bilden vermag.

Wir haben daher Arbeiten in Angriff genommen, um auf synthetischem Weg die Aminosäurefolge in den Pilzsideraminen aufzuklären, worüber wir später berichten werden. Als Beispiel, das für die je 10 möglichen Aminosäuresequenzen stehen soll, schreiben wir in den Formeln VIIIa und b diejenigen Sequenzen für Ferrichrysin und Ferricrocin, die sich aus einem regelmässigen Cyclohexapeptid ableiten.

Mit Strukturen der Formeln VIIIa und b sind die NMR.-Spektren der Desferri-Verbindungen in bester Übereinstimmung. Eine Sequenzzuordnung ist allerdings auch mit diesem Hilfsmittel nicht möglich. In der Tabelle 2 ist das NMR.-Spektrum des Desferri-ferricrocins (Fig. 2) diskutiert. Analoge Zuordnungen der Signale gelten für die Spektren des Desferri-ferrichroms und des Desferri-ferrichrysin (vgl. ²⁾, Fig. 2).

Tabelle 2. NMR.-Spektrum von Desferri-ferricrocin in D₂O

δ (ppm)	Anzahl H	Zuordnung
1,75	12	β - und γ -CH ₂ in δ -N-Hydroxyornithin
2,14	9	3 CH ₃ -CO-Gruppen
(3,34	–	Methanol)
3,63	6	δ -CH ₂ in δ -N-Hydroxyornithin
3,97	6	CH ₂ in Glycin und Serin
4,35	4	α -CH in Serin und δ -N-Hydroxyornithin

Der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit. Die Rohprodukte wurden von Herrn Dr. H. ZÄHNER (Institut für spezielle Botanik der ETH, Zürich) bereitet, wofür ihm unser Dank ausgesprochen sei.

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Die *Absorptionsspektren* im UV- und im Sichtbaren wurden mit einem BECKMAN-Spektrographen, Modell DK 1, die IR.-Absorptionsspektren mit einem PERKIN-ELMER-Spektrographen, Modell 21, aufgenommen. – Die *NMR.-Spektren* wurden mit einem VARIAN-Spektrometer, Modell A-60, aufgenommen. Als interne Referenz diente in D₂O Trimethylsilyl-äthansulfonat. Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten, Spin-Spin-Wechselwirkungen in cps angegeben. Es bedeuten: *s* = Singlett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quadruplett, *b* = breite, nicht aufgelöste Signalhaufen.

Alle *Analysenproben* wurden im Schweinchen eingewogen und über P₂O₅ nachgetrocknet. Die *Smp.* wurden unter dem Mikroskop bestimmt und sind korrigiert. *Molekulargewichte* wurden thermoelektrisch in Methanol bestimmt.

Ferrichrysin. – *Isolierung.* Das Rohferrichrysin wurde aus Kulturen von *Aspergillus melleus* Stamm ETH M 2853, durch Extraktion mit Phenol-Chloroform (1 kg: 1 l) gewonnen. Die Phenol-Chloroform-Auszüge wurden mit dem doppelten Volumen Äther versetzt und mit Wasser mehrmals ausgeschüttelt. Die mit Äther gewaschenen wässrigen Auszüge gaben beim Lyophilisieren das Rohprodukt als braunes lockeres Pulver. 9,1 g eines solchen Rohproduktes, das aus ca. 20 l Kulturfiltrat erhalten worden war, wurden durch CRAIG-Verteilung über 145 Stufen weiter gereinigt. Als Lösungsmittelsystem wurde ein Gemisch aus 9 Teilen *n*-Butanol, 9 Teilen Benzylalkohol, 15 Teilen 0,001N wäss. Salzsäure und 15 Teilen gesätt. wäss. Natriumchlorid-Lösung verwendet. Die Fraktionen 65–90, die die Hauptmenge des rotbraunen Farbstoffes enthielten, wurden vereinigt, mit Äther verdünnt, und die wässrige Schicht abgetrennt. Die organische Lösung wurde noch dreimal mit Wasser ausgezogen, wobei der Farbstoff vollständig in die untere Phase ging. Die vereinigten wässrigen Auszüge wurden mit ca. 10% Natriumchlorid versetzt und drei-

mal mit Phenol-Chloroform ausgeschüttelt. Die mit 10-proz. Kochsalzlösung gewaschenen trüben Auszüge wurden an einer Säule aus 20 g Celite geklärt, mit dem doppelten Volumen Äther verdünnt und mehrmals mit dest. Wasser ausgeschüttelt. Die wässrigen Auszüge, die das gesamte Pigment enthielten, wusch man dreimal mit Äther und dampfte die Lösung im Vakuum ein. Man erhielt 4,65 g papierchromatographisch einheitliches Ferrichrysin, das aus absolutem Alkohol in feinen orangebraunen Nadeln kristallisierte. Die Kristalle werden beim Erhitzen bei ca. 260° langsam schwarz ohne zu schmelzen.

$C_{29}H_{46}O_{14}N_9Fe$	Ber. C 43,50	H 5,79	N 15,74	Fe 6,98%	Mol-G. 800,6
	Gef. „ 43,25	„ 6,01	„ 15,69	„ 6,68%	„ „ 870,5

IR.-Absorptionsspektrum in KBr: s. Fig. 1, Kurve 1. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: hohe Endabsorption bei 220 $m\mu$ ($\log \epsilon$ über 4); λ_{max} 430 $m\mu$ ($\log \epsilon = 3,48$). Papierchromatographisches Verhalten s. 2).

Desferri-ferrichrysin. 1,0 g Ferrichrysin wurde in 20 ml Wasser gelöst und zusammen mit einer Lösung von 1,5 g 8-Hydroxychinolin in 15 ml Methanol 24 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Vom schwarzen Niederschlag (Hydroxychinolin-Eisenkomplex) wurde abfiltriert und das Filtrat dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Durch Eindampfen der wässrigen Lösung im Vakuum erhielt man 900 mg Desferri-ferrichrysin als nahezu farbloses amorphes Pulver. NMR.-Spektrum in D_2O s. 2).

$C_{29}H_{49}O_{14}N_9$	Ber. C 46,57	H 6,60	N 16,84%	Gef. C 46,36	H 6,98	N 15,65; 17,90%
-------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	-----------------

Desacetyl-desferri-ferrichrysin-trihydrochlorid. 870 mg Desferri-ferrichrysin wurden mit 50 ml 1N Chlorwasserstoffsäure im siedenden Wasserbad erhitzt. In Abständen von ca. 5 Min. wurde je ein Tropfen der Lösung auf der Tüpfelplatte mit 2 Tropfen 2-proz. methanolischer Eisen(III)-chlorid-Lösung vereinigt. Anfangs entstand eine intensive violette Farbreaktion, die mit fortlaufender Hydrolyse schwächer wurde. Nach 20 Min. trat keine Farbreaktion mehr ein. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und gab 979 mg eines hygroskopischen farblosen Harzes. Die Eisen(III)-chlorid-Reaktion war negativ und im NMR.-Spektrum fehlte ein Signal für die Acetylgruppen bei ca. 2,1 ppm.

$C_{23}H_{43}O_{11}N_9 \cdot 3HCl$	Ber. C 37,80	H 5,93	N 15,87	Cl 14,55%
	Gef. „ 37,54	„ 6,70	„ 16,13	„ 14,50%

⁴ *Ferrichrysin durch Partialsynthese.* 920 mg des obigen Trihydrochlorids wurden mit je 10 ml Essigsäureanhydrid und Pyridin über Nacht stengelassen und dann im Vakuum zur Trockne eingedampft. Den Rückstand löste man in 100 ml kaltgesättigter methanolischer Ammoniaklösung und dampfte nach 5 Std. erneut ein. Den Rückstand nahm man in 100 ml Methanol auf und fügte 800 mg Eisen(III)-chlorid in 20 ml Methanol hinzu, worauf sofort eine tiefe violette Färbung entstand. Die Lösung wurde durch portionenweise Zugabe von krist. Natriumacetat gepuffert, bis die Farbe nach orangebraun umschlug. Nach 1-stdg. Stehen wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand in 150 ml Wasser gelöst. Nach dem Hinzugeben von ca. 15 g Natriumchlorid wurde durch übliche Aufarbeitung mittels Phenol-Chloroform 760 mg Rohprodukt erhalten, das durch eine CRAIG-Verteilung mit 50 Überführungen im oben angegebenen Lösungsmittelgemisch gereinigt wurde. Das Hauptprodukt gab ein Verteilungsmaximum in Stufe 19 ($K = 0,64$). Aus den Fraktionen 13–28 wurden nach der Aufarbeitung 330 mg reines Ferrichrysin erhalten, das aus Äthanol umkristallisiert und durch IR.-Absorptionsspektrum und Papierchromatographie identifiziert wurde.

Saure Hydrolyse. – a) *Mit Chlorwasserstoffsäure.* 10 mg Ferrichrysin wurden in 1 ml 6N Salzsäure gelöst und das Eisen(III)-chlorid durch kontinuierliche Extraktion mit Äther entfernt. Zum wässrigen Rückstand fügte man noch 0,3 mg konz. Salzsäure und hydrolysierte im zugeschmolzenen Rohr über Nacht bei 110°. Das Hydrolyseprodukt wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 2 Tropfen Wasser gelöst und mit 3 ml Feinsprit verdünnt. Die Lösung wurde darauf zu einer Suspension von 20 mg vorhydriertem Platinoxid in 3 ml Feinsprit gegeben und während 15 Std. hydriert. Der Eindampfrückstand der vom Katalysator abfiltrierten Lösung enthielt nach papierchromatographischer Analyse Serin, Glycin und Ornithin, aber kein Alanin. Bei der Ionenaustauscher-Chromatographie nach MOORE & STEIN¹⁰⁾ liess sich ausserdem noch eine beträchtliche Menge Ammoniak nachweisen.

b) *Mit Jodwasserstoffsäure.* 10 mg Ferrichrysin wurden mit 1 ml 57-proz. Jodwasserstoffsäure bei 110° über Nacht hydrolysiert. Das Produkt wurde mehrmals nach Zugabe von etwas Wasser zur Trockne verdampft und der fast farblose Rückstand in 10 ml Wasser gelöst. Proben à 1 ml wurden im Aminosäureanalysator nach MOORE & STEIN untersucht. Es wurden Serin, Glycin, Alanin, Ornithin und Ammoniak im molaren Verhältnis 0,24 : 1,00 : 1,50 : 2,91 : 0,09 gefunden.

c) *Präparative Isolierung der Aminosäure.* 500 mg Desferri-ferrichrysin wurden mit 6N Salzsäure hydrolysiert und das Hydrolyseprodukt wie oben mit Platinoxid in Feinsprit hydriert. Der Eindampfungsrückstand der Hydrierungslösung wurde in 15 ml Wasser gelöst und mit 500 mg Natriumhydrogencarbonat versetzt. Zu dieser Lösung wurden 500 mg 2,4-Dinitrofluorbenzol in 20 ml Alkohol gegeben. Nach 2-stdg. Schütteln wurde der Alkohol im Vakuum abgetrieben und die wässrige Lösung zur Entfernung des überschüssigen 2,4-Dinitrofluorbenzols mit Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wurde darauf mit Salzsäure angesäuert und mit Äther-Essigester (2:1) ausgeschüttelt. Nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Natriumsulfat wurde der Extrakt eingedampft, wobei 1,01 g eines gelben Harzes zurückblieben. Ein Dünnschichtchromatogramm dieses Rohproduktes mit Chloroform-Benzylalkohol-Eisessig (70:30:3)¹⁵⁾ zeigte drei Flecke, die den DNP-Derivaten von Serin (Rf 0,24), Glycin (0,51) und Ornithin (0,58) entsprachen. Für die präparative Trennung wurden 50 g Kieselgel und 20 g Wasser gut verrieben und als Aufschlammung in Butanol-Chloroform (5:95)¹⁶⁾ in eine Chromatographiersäule eingefüllt. Das DNP-Aminosäuregemisch wurde in wenig Chloroform-Butanol (95:5) gelöst auf die Säule aufgetragen und mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch eluiert. 600 ml des Eluierungsmittels gaben 140 mg DNP-Serin. Mit weiteren Lösungsmittelmengen wurde ein Gemisch aus Bis-DNP-ornithin und DNP-Glycin erhalten. Das letztere wurde an einer zweiten Kieselgelsäule mit Eisessig-Aceton-Ligroin (12:6:82)¹⁷⁾ aufgetrennt und gab 230 mg einheitliches Bis-DNP-ornithin und 60 mg DNF-Glycin.

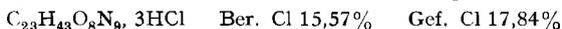
N-(2,4-Dinitrophenyl)-serin. Das Serin-Derivat wurde aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Gelbe Kristalle vom Smp. 199–200°. $[\alpha]_D = -20,4^\circ$ in Aceton. Ein authentisches Vergleichspräparat aus L-Serin schmolz bei 200–201° und zeigte ein $[\alpha]_D$ von $-20,4^\circ$. Es war mit dem Abbauprodukt identisch nach Misch-Smp., IR.-Absorptionsspektrum und Rf im Dünnschichtchromatogramm.

N,N'-Bis-(2,4-dinitrophenyl)-ornithin. Smp. nach Umkristallisation aus Aceton-Petroläther 156–157°. $[\alpha]_D = -91,8^\circ$ in Aceton. Das Derivat stimmte in allen Eigenschaften mit einer Vergleichsprobe aus authentischem L-Ornithin überein.

N-(2,4-Dinitrophenyl)-glycin. Gelbe Kristalle aus Methanol-Wasser, Smp. 202–203°. Nach Misch-Smp., IR.-Absorptionsspektrum und Rf identisch mit einer Vergleichsprobe.

d) *Bestimmung der flüchtigen Säure*¹¹⁾. 161 mg Desferri-ferrichrysin wurden mit 15 ml 10-proz. Schwefelsäure 30 Min. unter Rückfluss gekocht und die flüchtige Säure mit Wasser abdestilliert. Das Destillat verbrauchte zur Neutralisation (Phenolphthalein) 8,1 ml 0,1N Natronlauge. Die neutralisierte Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Alkohol mit *p*-Phenylphenacylbromid 30 Min. gekocht. Der Eindampfrückstand der Reaktionslösung wurde zwischen Wasser und Benzol verteilt, die Benzollösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Ester wurde durch Kristallisation aus Äther-Petroläther und Sublimation im Hochvakuum gereinigt und schmolz bei 112,5°. Nach Misch-Smp. und IR.-Absorptionsspektrum handelte es sich um *p*-Phenylphenacyl-acetat.

Cyclohexapeptid-trihydrochlorid (Orn₃, Ser₂, Gly). 200 mg Desacetyl-desferri-ferrichrysin-trihydrochlorid wurden in 10 ml Feinsprit gelöst und in Gegenwart von 50 ml Platinoxid hydriert. Die Wasserstoffaufnahme betrug 27 ml (ber. 25,3 ml). Durch Abfiltrieren vom Katalysator und Eindampfen im Vakuum erhielt man 180 mg eines farblosen klebrigen Harzes. Im Gegensatz zum Ausgangsmaterial zeigte das Produkt keine Farbreaktion mit Triphenyltetrazoliumchlorid.



NMR.-Spektrum in D₂O: $\delta = 1,84$ ppm (*b*, 12 H; β - und γ -CH₂ in Orn); $\delta = 3,00$ ppm (*b*, *t* angedeutet, 6 H; δ -CH₂ in Orn); $\delta = 3,92$ ppm (*b*, 6 H; CH₂ in Gly sowie β -CH₂ in Ser); $\delta = 4,35$ ppm (*b*, 5 H; α -CH in Orn und Ser).

¹⁵⁾ F. SANGER, Biochem. J. 40, 261 (1946).

¹⁶⁾ F. SANGER, Biochem. J. 45, 563 (1949).

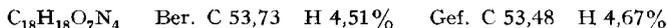
¹⁷⁾ F. CH. GREEN & L. M. KAY, Analyt. Chemistry 24, 726 (1952).

2,4-Dinitrophenylderivat des Cyclohexapeptids. 500 mg Cyclohexapeptid-trihydrochlorid wurden in 10 ml Wasser gelöst und mit 500 mg Natriumhydrogencarbonat versetzt. Nach der Zugabe von 400 mg 2,4-Dinitrofluorbenzol in 10 ml Alkohol wurde 2 Std. geschüttelt, wobei das unlösliche Umsetzungsprodukt als gelbes Pulver ausfiel. Nach dem Ansäuern wurde der Niederschlag abzentrifugiert und gründlich mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Ausbeute 750 mg. – Das Dünnschichtchromatogramm (Aceton–Eisessig 9:1) zeigte, dass neben einem Hauptprodukt ca. 6 Nebenprodukte vorhanden waren. Für die präparative Trennung wurden 100 mg des Rohproduktes an Kieselgel mit Eisessig–Aceton–Benzol (3:15:82)¹⁸⁾ chromatographiert; nach Abtrennung der Nebenprodukte erhielt man 20 mg Hauptprodukt als chromatographisch einheitliches gelbes Pulver.

δ-N-(2,4-Dinitrophenyl)-ornithin. 20 mg des chromatographisch gereinigten DNP-Peptids wurden in 5 ml konz. Salzsäure und 5 ml Eisessig gelöst und im zugeschmolzenen Rohr bei 110° hydrolysiert. Nach dem Eindampfen der Lösung wurde der Rückstand in 3 ml 1N Salzsäure gelöst und an einer Kolonne aus 40 g Talk mit 1N Salzsäure als Eluierungsmittel chromatographiert. Das farblose Eluat (400 ml) wurde eingedampft. Der Rückstand enthielt nach dem Papierchromatogramm Serin und Glycin, aber kein Ornithin.

Das gelbe DNP-Ornithin liess sich aus der Kolonne mit 1N-Salzsäure-Äthylalkohol (1:1) eluieren. Durch Eindampfen und Kristallisation aus 1N Salzsäure erhielt man 6 mg krist. *δ-N-(2,4-Dinitrophenyl)-ornithin-hydrochlorid* vom Smp. 218°, das sich bei der Dünnschichtchromatographie¹⁴⁾ wie eine authentische Vergleichsprobe verhielt.

30 mg in gleicher Weise hergestelltes Hydrochlorid wurden in 5 ml Wasser gelöst, in mehreren Portionen mit total 5 ml Natronlauge und 20 mg Benzoylchlorid versetzt und 2 Std. geschüttelt. Die mit Salzsäure angesäuerte Lösung wurde zunächst mit Äther, dann mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die Ätherlösung enthielt die Benzoesäure, das Äthylacetat das gelbe Benzoylierungsprodukt, das aus Aceton-Petroläther umkristallisiert wurde. Man erhielt 25 mg (70% d. Th.) gelbe Kristalle vom Smp. 208–209°. Eine Vergleichsprobe wurde durch Benzoylierung von authentischem *δ-2,4-Dinitrophenyl-L-ornithin* bereitet und schmolz, wie auch die Mischprobe, bei 209–210°.



Im Dünnschichtchromatogramm mit *n*-Propanol – 34-proz. Ammoniak (7:3)¹⁴⁾ besaßen beide Präparate den gleichen Rf-Wert von 0,75 und gaben übereinstimmende IR.-Absorptionsspektren.

α-N-(2,4-Dinitrophenyl)-δ-N-benzoyl-L-ornithin. Zum Vergleich wurde auch dieses Isomere hergestellt. 300 mg *L*-Ornithin-monohydrochlorid wurden in 15 ml heissem Wasser gelöst. Nach kurzem Aufkochen mit einem Überschuss an Kupfer(II)-carbonat wurde filtriert. Nach dem Erkalten machte man mit 6 ml 1N Natronlauge alkalisch. Darauf wurde die Lösung mit 390 mg Benzoylchlorid 2 Std. geschüttelt. Der unlösliche Kupferkomplex des *δ-N-Benzoyl-L-ornithins* wurde abfiltriert, in 10 ml Wasser suspendiert und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in das heisse Gemisch der Kupferkomplex zersetzt. Die vom Kupfersulfid abfiltrierte Lösung wurde auf ca. 5 ml eingengt, worauf 140 mg *δ-N-Benzoyl-L-ornithin* ausfielen. Der Niederschlag wurde zusammen mit 300 mg Natriumhydrogencarbonat in ca. 5 ml Wasser gelöst. Nach der Zugabe von 0,2 ml (300 mg) 2,4-Dinitrofluorbenzol in 4 ml Äthanol wurde 2 Std. geschüttelt und darauf der Alkohol im Vakuum abgedampft. Das überschüssige Reagens wurde durch Ausschütteln mit Äther entfernt. Nach dem Ansäuern der wässrigen Lösung fiel das *α-N-(2,4-Dinitrophenyl)-δ-N-benzoyl-L-ornithin* als amorphes Pulver aus¹⁵⁾. Nach dem Umkristallisieren aus Aceton-Petroläther bildete es gelbe Nadeln vom Smp. 177–178°. Ausbeute 200 mg (28% d. Th.).

Mit demselben Fließmittel wie oben besass das Produkt im Dünnschichtchromatogramm Rf = 0,59. Das IR.-Absorptionsspektrum ist von dem des oben beschriebenen Isomeren deutlich verschieden.

Bei der Hydrolyse mit je 2 ml Eisessig und konz. Salzsäure bei 105° (100 Std.) wurde das bekannte *α-(2,4-Dinitrophenyl)-L-ornithin*¹⁵⁾ vom Smp. 225° erhalten.

Di-O-Acetyl-ferrichrysin. 500 mg Ferrichrysin wurden in 5 ml Methanol gelöst und 10 ml Essigsäureanhydrid zugefügt. Die Lösung wurde kurz auf 60° erwärmt und dann 5 Tage stehengelassen. Nachher wurde im Vakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand aus absol. Alkohol und Äther umkristallisiert. Man erhielt 480 mg braunes Pulver vom Smp. 223° (Zers.). IR.-Absorptionsspektrum in KBr: ν (CO) 1735 cm⁻¹ (Estercarbonyl), 1665, 1582 und 1520 cm⁻¹. – Papierchromato-

¹⁸⁾ W. A. SCHROEDER & L. R. HONNEN, J. Amer. chem. Soc. 75, 4615 (1953).

graphie im System II²): Rf 0,55 (Ferrichrysin im direkten Vergleich 0,34). – Die biologische Wirkung im Antagonismus-Test ist ca. 10mal geringer als die des Ferrichrysin.

Di-O-acetyl-desferri-ferrichrysin. 100 mg des obigen Acetylierungsproduktes wurden in 5 ml Wasser gelöst und mit 3 ml einer 10-proz. Lösung von 8-Hydroxychinolin in Methanol 24 Std. gerührt. Das vom schwarzen Niederschlag abgetrennte Filtrat wurde mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung hinterliess beim Eindampfen im Vakuum 85 mg farbloses amorphes Pulver. – IR.-Absorptionsspektrum in KBr. ν (CO) 1739, 1650, 1530 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in D₂O: $\delta = 1,77$ ppm (β , 12 H; β - und γ -CH₂ in Orn.); $\delta = 2,08$ ppm (s, 6 H; 2 O-Acetylgruppen); $\delta = 2,14$ ppm (s, 9 H; 3 N-Acetylgruppen). Die Signale von 17 Protonen liegen in 3 breiten Haufen zwischen $\delta = 3,5$ und 4,6 ppm wie beim Desferri-ferrichrysin.

Ferricrocin. – *Isolierung*. 10,6 g roher Chloroform-Phenol-Extrakt aus 20 l Kulturfiltrat von *Aspergillus versicolor*, Stamm ETH M 3636, wurden einer CRAIG-Verteilung mit 137 Überführungen unterzogen. Man verwendete das gleiche Lösungsmittelsystem wie beim Ferrichrysin. Es bildeten sich zwei rotbraune Verteilungsmaxima mit $r_{max} = 52$ ($K = 0,61$) und $r_{max} = 121$ ($K = 7,3$). Das zweite Maximum kommt dem Ferrirhodin zu, worüber in einer späteren Abhandlung berichtet werden wird. Die Fraktionen 40–60 wurden wie beim Ferrichrysin (s. oben) aufgearbeitet und lieferten 1,29 g reines Ferricrocin, das aus 15 ml absolutem Alkohol in feinen orangebraunen Kriställchen erhalten wurde, die bei ca. 250° ohne zu schmelzen schwarz wurden. Zur Analyse wurde zweimal umkristallisiert und über P₂O₅ getrocknet.

C ₂₈ H ₄₄ O ₁₃ N ₉ Fe	Ber. C 43,65	H 5,76	N 16,36	Fe 7,25%
	Gef. „ 43,99	„ 5,58	„ 15,98	„ 7,37%

IR.-Absorptionsspektrum in KBr: s. Fig. 1, Kurve 2. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: hohe Endabsorption bei 220 μ ($\log \epsilon$ über 4); λ_{max} 430 μ , $\log \epsilon = 3,42$. Papierchromatographisches Verhalten s. ²). – Die biologische Wirkung im Antagonismus-Test ist qualitativ und quantitativ gleich wie die des Ferrichroms und Ferrichrysin.

Desferri-ferricrocin. 740 mg Ferricrocin in 30 ml Wasser wurden mit 1,0 g 8-Hydroxychinolin in 10 ml Methanol 24 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Die vom schwarzen Niederschlag abfiltrierte Lösung wurde viermal mit Chloroform ausgeschüttelt. Durch Eindampfen der wässrigen Lösung im Vakuum erhielt man 675 mg eines farblosen amorphen Pulvers. NMR.-Spektrum in D₂O s. Fig. 2.

C ₂₈ H ₄₇ O ₁₃ N ₉	Ber. C 46,85	H 6,60	N 17,65%	Gef. C 46,97	H 6,74	N 17,48%
--	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

Saure Hydrolysen. 12 mg Ferricrocin und 1 ml 57-proz. Jodwasserstoffsäure wurden 8 Std. im zugeschmolzenen Rohr bei 110° hydrolysiert. Nach mehrmaligem Eindampfen mit etwas Wasser wurde ein farbloser Rückstand erhalten, dessen Aminosäureanalyse nach MOORE & STEIN¹⁰) die Anwesenheit von Serin, Glycin, Alanin, Ornithin und Ammoniak im molekularen Verhältnis 0,25:2,00:0,68:3,05:0,04 ergab (Glycin willkürlich als 2,00 gesetzt).

Wenn die Hydrolyse von Desferri-ferricrocin mit 6N Salzsäure durchgeführt wurde, erhielt man nach der katalytischen Reduktion ein Gemisch, in dem sich Serin, Glycin, Ornithin und Ammoniak, nicht aber Alanin nachweisen liessen.

Partial-Abbau und Partialsynthese von Ferricrocin. 30 mg Desferri-ferricrocin wurden mit 5 ml 1N Salzsäure im siedenden Wasserbad erwärmt. Die anfangs starke Farbreaktion mit methanolischer Eisen(III)-chlorid-Lösung fiel schon nach 15 Min. negativ aus. Das Hydrolysat wurde eingedampft, mit je 3 ml Essigsäureanhydrid und Pyridin versetzt und mehrere Stunden stehen gelassen. Das im Vakuum eingedampfte Acetylierungsprodukt liess man 15 Std. mit methanolischer Ammoniaklösung stehen und dampfte erneut ein. Der Rückstand wurde in Methanol mit 50 mg Eisen(III)-chlorid umgesetzt. Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man 27 mg rohen Eisenkomplex, der nach papierchromatographischer Analyse in 2 Flussmitteln Ferricrocin als Hauptprodukt enthielt. Braune Verunreinigungen besaßen Rf-Werte von weniger als 0,2.

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

SUMMARY

The structures of the fungal sideramines ferrichrysin and ferricrocin have been determined with the exception of their amino-acid sequence. They are iron complexes

of cyclic hexapeptides composed of 3 mols. δ -N-acetyl- δ -N-hydroxy-ornithine, 2 mols serine and 1 mol. glycine (ferrichrysin), resp. 3 mols. δ -N-acetyl- δ -N-hydroxy-ornithine, 1 mol. serine and 2 mols. glycine (ferricrocine).

Organisch chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

216. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

45. Mitteilung¹⁾

Über die Konstitution von Ferrirubin, Ferrirhodin und Ferrichrom A

von W. Keller-Schierlein

(13. VI. 63)

Ferrirubin wurde als Hauptkomponente von Sideramin-Gemischen aus mehreren Aspergillaceen-Stämmen isoliert²⁾. Es bildet ein rotbraunes Pulver der Formel $C_{41}H_{64}O_{17}N_9Fe$, das papierchromatographisch einheitlich ist und sich bei der Papier-electrophorese als neutrale Verbindung verhält. Ein mit Ferrirubin isomeres und ebenfalls neutrales Sideramin, das *Ferrirhodin*, wurde als Nebenkomponente bei der Isolierung von Ferricrocin aus zwei Stämmen der Gattung *Aspergillus* in Form von rotbraunen Kristallen erhalten²⁾. Diese beiden miteinander nahe verwandten Sideramine unterscheiden sich von den früher untersuchten Sideraminen aus Pilzen, dem Ferrichrom³⁾, dem Ferrichrysin¹⁾ und dem Ferricrocin¹⁾ deutlich in ihren spektroskopischen Eigenschaften. Die Absorptionsbande im Sichtbaren liegt um etwa 20 $m\mu$ langwelliger als bei den genannten Verbindungen. Im UV. besitzen sie eine hohe Absorptionsbande bei ca. 250 $m\mu$, die bei Ferrichrom, Ferrichrysin und Ferricrocin fehlt, und im ν (CO)-Gebiet des IR.-Absorptionsspektrums fehlt bei Ferrirubin und Ferrirhodin ein Maximum bei ca. 1580 cm^{-1} (vgl. Figur), das bei den oben erwähnten Vertretern der Ferrichrom-Untergruppe vorhanden ist¹⁾.

Schon die ersten Abbauprobversuche zeigten aber, dass trotz dieser Unterschiede eine nahe Beziehung zu den Sideraminen der Ferrichrom-Untergruppe bestehen muss. In den Produkten der reduzierenden Hydrolyse fanden sich nämlich die gleichen Aminosäuren im gleichen molekularen Verhältnis wie beim Ferrichrysin¹⁾.

Mit den beim Ferrichrysin erprobten Methoden – Hydrolyse der Desferri-Verbindungen mit Salzsäure und anschliessende katalytische Reduktion der Hydroxylaminogruppen bzw. reduzierende Hydrolyse der Sideramine mittels Jodwasserstoffsäure⁴⁾ – konnte gezeigt werden, dass sich der Peptid-Teil sowohl des Ferrirubis

¹⁾ 44. Mitteilung: W. KELLER-SCHIERLEIN & A. DEÉR, Helv. 46, 1907 (1963).

²⁾ H. ZÄHNER, W. KELLER-SCHIERLEIN, R. HÜTTER, K. HESS-LEISINGER & A. DEÉR, Arch. Mikrobiol. 45, 119 (1963).

³⁾ J. B. NEILANDS, J. Amer. chem. Soc. 74, 4846 (1952); T. EMERY & J. B. NEILANDS, Nature 184, 1632 (1959); J. Amer. chem. Soc. 82, 3658 (1960); 83, 1626 (1961).

⁴⁾ H. BICKEL, G. E. HALL, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER & A. WETTSTEIN, Helv. 43, 2129 (1960).