

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

Organisch chemisches Laboratorium der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

## 216. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

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

### 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 isoliert<sup>2)</sup>. 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 erhalten<sup>2)</sup>. Diese beiden miteinander nahe verwandten Sideramine unterscheiden sich von den früher untersuchten Sideraminen aus Pilzen, dem Ferrichrom<sup>3)</sup>, dem Ferrichrysin<sup>1)</sup> und dem Ferricrocin<sup>1)</sup> 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  $\nu$ (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 ist<sup>1)</sup>.

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 Ferrichrysin<sup>1)</sup>.

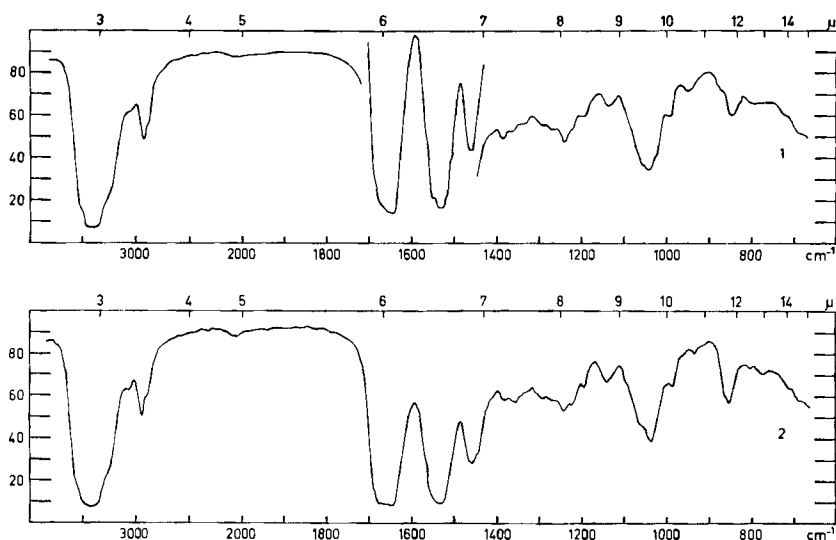
Mit den beim Ferrichrysin erprobten Methoden – Hydrolyse der Desferri-Verbindungen mit Salzsäure und anschliessende katalytische Reduktion der Hydroxylaminogruppen bzw. reduzierende Hydrolyse der Sideramine mittels Jodwasserstoffsäure<sup>4)</sup> – konnte gezeigt werden, dass sich der Peptid-Teil sowohl des Ferrirubis

<sup>1)</sup> 44. Mitteilung: W. KELLER-SCHIERLEIN & A. DEÉR, *Helv.* 46, 1907 (1963).

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

<sup>3)</sup> 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).

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



IR.-Absorptionsspektren in KBr  
 Kurve 1: Ferrirubin      Kurve 2: Ferrirhodin

wie auch des Ferrirhodins aus 3 Mol. Ornithin, 2 Mol. Serin und 1 Mol. Glycin zusammensetzt. Die Vermutung, dass das Ornithin in den neuen Sideraminen nicht als solches, sondern wie beim Ferrichrom und Ferrichrysin in Form des  $\delta$ -N-Hydroxyornithins eingebaut ist, war naheliegend und konnte später durch die Überführung von Ferrirubin in Ferrichrysin bestätigt werden (s. unten).

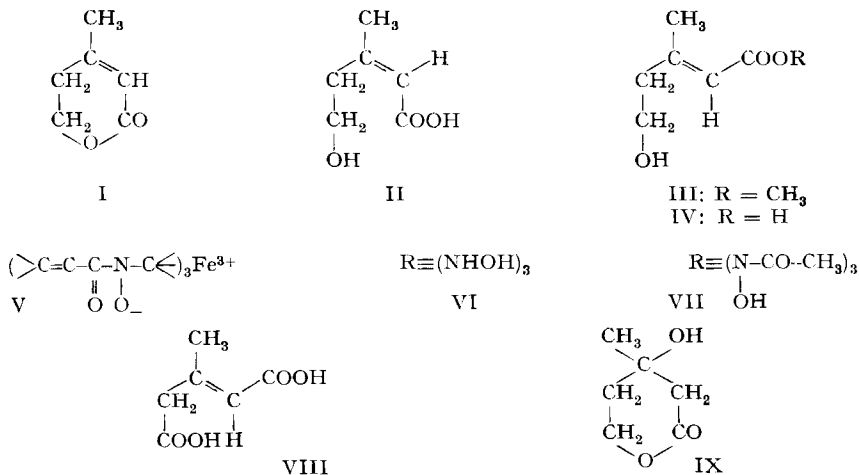
Im Gegensatz zum Ferrichrysin enthalten die beiden neuen Sideramine keine N-Acetylgruppen. Dies geht deutlich aus den NMR.-Spektren der Desferri-Verbindungen hervor, in denen das für hydroxamsäureartig gebundene Essigsäure charakteristische Singlett bei  $\delta = 2,14$  ppm (vgl. <sup>1)</sup>) fehlt. Dagegen konnten aus Ferrirubin und Ferrirhodin nach dem Perjodsäure-Abbau der Desferri-Verbindungen, wobei die Hydroxamsäurebindungen gespalten werden <sup>5)</sup>, zwei neue Carbonsäuren in Form von Derivaten isoliert werden.

Im Falle des Ferrirhodins erhielten wir durch Extraktion der Oxydationslösung mit Äther und Destillation im Vakuum ein Lacton, dessen NMR.-Spektrum vier gut voneinander getrennte Signale bzw. Signalgruppen erkennen liess (vgl. exper. Teil). Die Signale liessen sich eindeutig bestimmten Protonentypen zuordnen und erlaubten unmittelbar die Konstitutionsableitung für das Lacton. Die Verbindung enthält ein einzelnes Wasserstoffatom an einer Doppelbindung ( $\delta = 5,68$  ppm), dessen Signal durch eine «long-range»-Wechselwirkung ( $J = 1,3$  cps) mit einer Methylgruppe an der Doppelbindung ( $\delta = 2,00$  ppm) in ein Quartuplett aufgespalten ist. Neben der Doppelbindung befindet sich weiter eine Methylengruppe, deren Signal ( $\delta = 2,36$  ppm) durch ein benachbartes  $\text{CH}_2$  in ein Triplet ( $J = 6,3$  cps) aufgespalten wird. Das Triplet dieser zweiten Methylengruppe liegt bei  $\delta = 4,31$  ppm; sie ist demnach an Sauerstoff gebunden. Das UV.-Absorptionsspektrum der Ver-

<sup>5)</sup> T. EMERY & J. B. NEILANDS, J. Amer. chem. Soc. 82, 4903 (1960).

bindung mit einer hohen Absorptionsbande bei ca. 220  $\mu\mu$  zeigt ferner, dass es sich um ein  $\alpha, \beta$ -ungesättigtes Lacton handeln muss. Die einzige Struktur, die mit diesem NMR.-Spektrum im Einklang steht, ist die des 5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurelactons (I). Diese Verbindung ist vor einiger Zeit durch Wasserabspaltung aus Mevalonsäure-lacton hergestellt worden<sup>6)</sup>. Das IR.- und das NMR.-Spektrum eines nach dieser Methode bereiteten Vergleichspräparates stimmten mit den Spektren des Abbaulactons aus Ferrirhodin völlig überein. Da nur für das *cis*-Isomere eine spontane Lactonbildung erwartet werden kann, muss die *cis*-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure (II) am Aufbau der Ferrirhodin-Molekel beteiligt sein.

Das Produkt des Perjodsäure-Abbaus des Desferri-ferrirubins wurde nach der Veresterung mit Diazomethan als destillierbarer Methylester gewonnen. Das NMR.-Spektrum des Esters zeigte die genau gleichen Strukturelemente wie das des Lactons I, wozu noch die Signale für eine Methoxygruppe und für ein Hydroxylwasserstoff kamen (vgl. exper. Teil). Es handelt sich offenbar um den Methylester III einer 5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure. Da die *cis*-Säure aus Ferrirhodin spontan in das Lacton übergegangen war, während hier bei genau gleicher Arbeitsweise keine Spur einer Lactonbildung beobachtet werden konnte, handelt es sich offenbar um die *trans*-Säure IV.



Da Ferrirhodin und Ferrirubin isomer sind und die quantitative Aminosäurezusammensetzung die gleiche ist, lag die Vermutung nahe, dass sich die beiden Verbindungen ausser durch die geometrische Isomerie im Carbonsäurebaustein nicht von einander unterscheiden. Tatsächlich wurde bei der katalytischen Hydrierung mittels Palladiumkohle aus Ferrirubin und aus Ferrirhodin dasselbe Hexahydroderivat erhalten. Die beiden nicht kristallisierbaren Hydrierungsprodukte bildeten orangebraune Pulver, die identische Absorptionsspektren im IR., UV. und Sichtbaren zeigten und durch Papierchromatographie in 2 Fließmitteln sowie in der biologischen Wirkung voneinander nicht unterscheidbar waren.

Hexahydroferrirubin besitzt im UV. und im Sichtbaren ein Absorptionsspektrum, das völlig dem des Ferrichroms, Ferricrocins und Ferrichrysinis gleicht. Das sichtbare

<sup>6)</sup> J. W. CORNFORTH, R. H. CORNFORTH, S. POPJAK & I. Y. GORE, *Biochem. J.* 69, 146 (1958).

Maximum liegt bei 425–430  $m\mu$  und die Absorptionsbande bei ca. 250  $m\mu$  fehlt. Das charakteristische Spektrum des Ferrirhodins und des Ferrirubins beruht demnach auf dem Strukturelement V als Chromophor.

Aus den nachgewiesenen Bausteinen – 3 Mol. N-Hydroxyornithin ( $3 \times C_5H_{12}O_3N_2$ ), 2 Mol. Serin ( $2 \times C_3H_7O_3N$ ), 1 Mol. Glycin ( $C_2H_5O_2N$ ), 3 Mol. *trans*- bzw. *cis*-5-hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure ( $3 \times C_6H_{10}O_3$ ) und 1 Eisen(III)-Ion – lässt sich unter Abzug von 9 Mol. Wasser und 3 Protonen formell eine Molekel  $C_{41}H_{64}O_{17}N_9Fe$  ableiten. Da die Analysen von Ferrirubin und Ferrirhodin mit dieser Formel im Einklang sind und da andere Spaltprodukte nicht gefunden werden konnten, darf angenommen werden, dass durch die genannten Abbauprodukte die Molekeln der beiden Sideramine vollständig erfasst sind.

Sie unterscheiden sich in ihrer quantitativen Zusammensetzung vom Ferrichrysin nur darin, dass die drei Essigsäurereste durch drei Reste der Säuren II bzw. IV ersetzt sind. Durch eine Verknüpfung von Ferrirubin mit Ferrichrysin liess sich nun zeigen, dass

1. die 6 Aminosäuren wie beim Ferrichrysin in einem Cyclohexapeptid-Ring angeordnet sind;
2. die Aminosäure-Reihenfolge im Peptidring die gleiche ist wie beim Ferrichrysin;
3. die Hydroxylamin-Stickstoffatome, die mit den 5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säuren zu Hydroxamsäuregruppen verbunden sind, wie beim Ferrichrysin mit den  $\delta$ -Stickstoffatomen der Ornithinreste identisch sind.

Im Verlaufe der Konstitutionsaufklärung des Ferrichrysin ist es gelungen, die Desferri-Verbindung durch Partialhydrolyse zu einem acetylfreien Trihydroxylamin VI abzubauen und daraus durch Acetylierung und Umsetzung mit Eisen(III)-chlorid das ursprüngliche Ferrichrysin wieder aufzubauen. Es erwies sich nun, dass  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Hydroxamsäuren wesentlich schwerer hydrolysierbar sind als Acethydroxamsäuren. Bei der Hydrolyse von Desferri-ferrirubin mit 1 N Salzsäure wurde auch nach 2stdg. Erhitzen noch eine intensive Farbreaktion mit Eisen(III)-chlorid beobachtet. Da zu befürchten war, dass bei länger dauernder Einwirkung der Säure auch die Peptidbindungen erheblich angegriffen würden, wurde für weitere Versuche das Desferrihexahydroferrirubin eingesetzt. Die partielle Hydrolyse verlief damit wesentlich rascher. Nach ca. 30 Min. war die Eisen(III)-chlorid-Reaktion praktisch negativ, und beim Aufbau des Acethydroxamsäure-Eisenkomplexes, der in gleicher Weise durchgeführt wurde wie früher mit dem Abbauprodukt des Ferrichrysin<sup>1)</sup>, erhielt man in befriedigender Ausbeute ein kristallisiertes Sideramin, dessen Eigenschaften mit denen des authentischen Ferrichrysin übereinstimmten.

Durch diese Umwandlung ist bewiesen worden, dass Ferrirubin und Ferrirhodin die selbe Anordnung der Aminosäure-Bausteine besitzen wie das Ferrichrysin.

Ein biologisch unwirksames Siderochrom<sup>7)</sup>, das von GARIBALDI & NEILANDS<sup>8)</sup> als Nebenprodukt des Ferrichroms aus Kulturen von *Ustilago sphaerogena* erhalten wurde, ist das *Ferrichrom A*. Für diese kristalline Verbindung wurden als Bausteine dieselben Aminosäuren wie für Ferrichrysin, Ferrirubin und Ferrirhodin und als

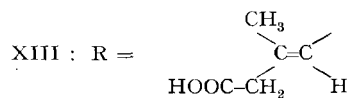
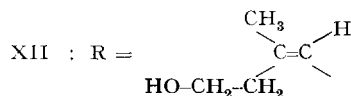
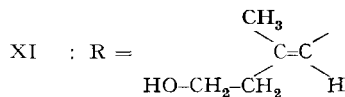
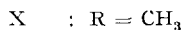
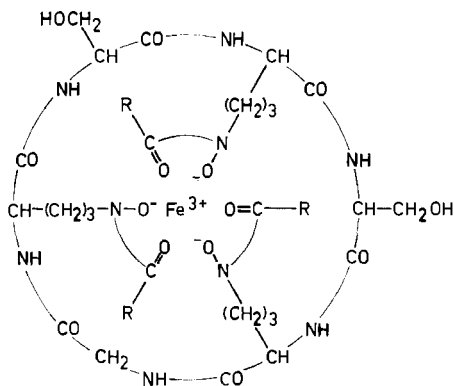
<sup>7)</sup> H. BICKEL, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN & H. ZÄHNER, *Experientia* 16, 129 (1960).

<sup>8)</sup> J. A. GARIBALDI & J. B. NEILANDS, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 2429 (1955).

Carbonsäure-Baustein die *trans*- $\beta$ -Methylglutaconsäure (VIII) nachgewiesen<sup>9)</sup>. Die Aminosäuresequenz ist noch nicht aufgeklärt worden. Es ist uns nun gelungen, in Anlehnung an die Umwandlung von Ferrirubin in Ferrichrysin auch das unwirksame Ferrichrom A in das biologisch hoch aktive Ferrichrysin überzuführen. Somit besitzt auch Ferrichrom A die gleiche Aminosäuresequenz wie Ferrichrysin.

Da Ferrichrom A das gleiche UV.-Absorptionsspektrum besitzt wie Ferrirubin und Ferrirhodin, müssen die zur Doppelbindung konjugierten Carboxylgruppen der  $\beta$ -Methylglutaconsäure-Bausteine mit den Hydroxylamin-Stickstoffatomen zu den Hydroxamsäuregruppen vereinigt sein, während die isolierten Carboxylgruppen frei sind und den sauren Charakter des Ferrichroms A bedingen.

Durch diese Verknüpfungen ist natürlich die Frage nach der Aminosäuresequenz noch nicht gelöst, da diese ja auch beim Ferrichrysin bisher noch offen gelassen wurde. Die Sequenzaufklärung einer dieser vier Verbindungen – Ferrichrysin, Ferrirhodin, Ferrirubin und Ferrichrom A – wird aber hiernach gleichzeitig auch die endgültige Konstitutionsaufklärung der andern drei bringen. In Analogie zu unserer provisorischen Formel X für das Ferrichrysin<sup>1)</sup> benützen wir vorläufig auch für Ferrirubin, Ferrirhodin und Ferrichrom A diejenigen Formeln mit der regelmässigen Reihenfolge der Bausteine (XI, XII und XIII), die wir als Beispiele für die je 10 möglichen sequenzisomeren Formeln hier wiedergeben.



Die drei miteinander nahe verwandten Carbonsäuren II, IV und VIII, die als Bausteine von Siderochromen erkannt worden sind, stehen offenbar in biogenetischem Zusammenhang mit dem Mevalonsäurelacton (IX), diesem wichtigen Zwischenprodukt der Biosynthese von Terpenen und Steroiden. Es scheint bemerkenswert, dass dieser selbe Baustein für die Biogenese so verschiedenartiger Produkte wie Steroide und Siderochrome verwendet wird.

Die biologische Wirkung des Ferrirubins und des Ferrirhodins im Antagonismustest mit Ferrimycin A beträgt etwa 10% derjenigen des Ferrichroms und des Ferrichrysin (vgl. <sup>10)</sup>). Hexahydroferrirubin ist etwa gleich stark wirksam wie Ferrirubin. Hexahydroferrichrom A ist wie Ferrichrom A selber unwirksam.

<sup>9)</sup> T. EMERY & J. B. NEILANDS, J. Amer. chem. Soc. 83, 1626 (1961).

<sup>10)</sup> H. ZÄHNER, E. BACHMANN, R. HÜTTER & J. NÜESCH, Pathologia et Microbiologia 25, 708 (1962).

Herrn Dr. H. ZÄHNER, Institut für spezielle Botanik der ETH Zürich, danke ich für die Herstellung des Rohmaterials und die Bestimmung der biologischen Wirksamkeiten. Der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, sei für die Unterstützung dieser Arbeit gedankt.

### 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  $D_2O$  Trimethylsilyl-äthansulfonat, in organischen Lösungsmitteln Tetramethylsilan. Chemische Verschiebungen sind in  $\delta$ -Werten angegeben, Spin-Spin-Wechselwirkungen in cps. Es bedeuten: *s* = Singlett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quadruplett, *b* = breite, nicht aufgelöste Signalhaufen. – Die *Smp.* wurden unter dem Mikroskop bestimmt.

**Ferrirubin.** – *Isolierung und Eigenschaften.* Die Isolierung des Ferrirubins aus Kulturen von *Penicillium variable*, Stamm ETH M 2733, *Spicaria sp.*, Stamm ETH M 4622, oder *Paecilomyces varioti*, Stamm ETH M 4646, erfolgte in üblicher Weise durch Extraktion der mit Eisen(III)-sulfat versetzten Kulturfiltrate mittels Phenol-Chloroform (1 kg:1 l). Aus diesen Extrakten wurde das Rohferrirubin durch Zugabe von Äther und Ausschütteln mit Wasser in die wässrige Phase übergeführt und durch Lyophilisieren als lockeres Pulver von dunkelrotbrauner Farbe gewonnen. Die weitere Reinigung erfolgte durch eine CRAIG-Verteilung im Lösungsmittelsystem Benzylalkohol-*n*-Butanol-0,001*N* wäss. Salzsäure – gesättigte wäss. Natriumchlorid-Lösung im Volumenverhältnis 9:9:15:5<sup>2)</sup>.

14,3 g aus 40 l Kultur gewonnener Rohextrakt wurde über 150 Stufen verteilt. Das Ferrirubin bildete ein intensives Farbstoff-Maximum in Stufe 125 ( $K = 5,1$ ). Nebenkomponenten waren nur in Spuren mit Maxima in den Stufen 30 und 63 vorhanden. Diese wurden nicht weiter untersucht. n Das Ferrirubin wurde aus den Fraktionen 113–140 isoliert. Die vereinigten Fraktionen wurden mit dem doppelten Volumen Äther versetzt, um das Sideramin in die wässrige Phase zu verdrängen, und die organische Phase noch viermal mit Wasser ausgeschüttelt. Die wässrige-Lösungen wurden mit Äther gewaschen und vereinigt. Aus der mit ca. 10% Natriumchlorid versetzten Lösung wurde das Ferrirubin mit Phenol-Chloroform ausgezogen und die trüben Auszüge an einer kurzen Celite-Säule geklärt. Nach dem Verdünnen mit Äther wurde wieder mehrmals mit Wasser ausgeschüttelt, die tiefbraunen Auszüge zweimal mit Äther gewaschen und dann im Vakuum zur Trockne verdampft. Man erhielt 6,36 g reines Ferrirubin als amorphes, tiefbraunes Pulver, das in Methanol leicht, in Äthanol und Wasser etwas schwerer löslich ist, sich dagegen in Äthylacetat, Äther und Benzol nicht auflöst. Durch langsames Verdunstenlassen einer methanolischen Lösung von reinem Ferrirubin wurden dunkelrote derbe Prismen erhalten. – Zur Analyse wurde eine Probe zweimal aus Methanol mit Äther gefällt. Der Niederschlag bestand aus rotorangen amorphen Flocken, die durch Zentrifugieren abgetrennt und im Vakuum über  $P_2O_5$  getrocknet wurden.

$C_{41}H_{64}O_{17}N_9Fe$	Ber. C 48,71	H 6,38	N 12,47	Fe 5,53%
	Gef. „ 49,01	„ 6,57	„ 12,70	„ 5,25%

Papierchromatographisches Verhalten s. Tabelle, S. 1928. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  in  $m\mu$  ( $\log \epsilon$ ): 216 (4,58), 254 (4,34), 450 (3,53). IR.-Absorptionsspektrum in KBr: s. Fig. 1, Kurve 1; in Nujol:  $\nu$  (CO) 1650 und 1515  $cm^{-1}$ . Bei der Papierelektrophorese verhielt sich Ferrirubin als neutrale Verbindung. – Die biologische Wirkung des Ferrirubins im Antagonismustest mit Ferrimycin A beträgt ca. 10% von derjenigen des Ferrichrysin und des Ferrichroms (vgl. <sup>2)</sup>).

*Desferri-ferrirubin.* 435 mg Ferrirubin in 30 ml Wasser und 1 g 8-Hydroxychinolin in 10 ml Methanol wurden vereinigt und 24 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Vom ausgeschiedenen 8-Hydroxychinolin-Eisenkomplex wurde abfiltriert und das Filtrat mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt, um das überschüssige Reagens zu entfernen. Darauf dampfte man die wässrige Lösung im Vakuum ein und löste den glasartigen Rückstand in wenig Methanol. Durch rasches Eindampfen dieser Lösung erhielt man 390 mg Desferri-Verbindung als blaugelblichen spröden Schaum, der nicht kristallisiert werden konnte. Zur Analyse wurde über  $P_2O_5$  getrocknet.

$C_{41}H_{67}O_{17}N_9$	Ber. C 51,40	H 7,05	N 13,16%	Gef. C 51,12	H 7,29	N 13,00%
-------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

28 mg Desferri-ferrirubin und 27 mg Eisen(III)-chlorid in je 1 ml Methanol wurden vereinigt und die tief violette Lösung mit krist. Natriumacetat versetzt, bis ein Farbumschlag nach Rotbraun eintrat. Nach 1stdg. Stehen wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 5 ml Wasser gelöst und in der oben beschriebenen Weise durch Extraktion mit Phenol-Chloroform aufgearbeitet. Das Produkt erwies sich bei der Papierchromatographie in zwei Fließmitteln (s. unten) als einheitlich und identisch mit Ferrirubin.

*Saure Hydrolyse.* – a) mit Chlorwasserstoffsäure. 21 mg Ferrirubin wurden in 4 ml 6N Salzsäure gelöst und während drei Std. kontinuierlich extrahiert, um das Eisenchlorid zu entfernen. Die eisenfreie wässrige Lösung wurde darauf 4 Std. unter Rückfluss gekocht und dann im Vakuum zur Trockne verdampft. Eine Probe des Rückstandes zeigte im Papierchromatogramm (Phenol-Wasser 4:1 bzw. *n*-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1, Nachweis mit Ninhydrin) das Vorliegen von Glycin, Serin, einer unbekanntenen Aminosäure und einer Spur Ornithin an.

Die Hauptmenge des Hydrolysates wurde in 5 ml Feinsprit gelöst und in Gegenwart von 20 mg vorhydriertem Platinoxid hydriert. Das Reduktionsprodukt wurde papierchromatographisch und durch ein Ionenaustauscher-Chromatogramm nach MOORE & STEIN auf Aminosäuren untersucht. Es liessen sich Serin, Glycin, Ornithin und Ammoniak im Verhältnis 1,68:1,00:2,43:0,85 nachweisen (Glycin willkürlich als 1,00 gesetzt).

b) mit Jodwasserstoffsäure. 20 mg Ferrirubin wurden mit 2 ml 57-proz. Jodwasserstoffsäure im zugeschmolzenen Rohr während 6 Std. auf 110° erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand nach Zufügen von etwas Wasser mehrmals erneut eingetrocknet, bis ein nahezu farblosler Rückstand erhalten wurde. Die Aminosäure-Analyse nach MOORE & STEIN zeigte die Anwesenheit von Serin, Glycin, Alanin, Ornithin und Ammoniak im Verhältnis 0,25:1,00:1,54:2,31:0,11.

*trans-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure-methylester.* 300 mg Ferrirubin wurden in üblicher Weise mit 500 mg 8-Hydroxychinolin in Methanol-Wasser umgesetzt und die vom Niederschlag abgetrennte und mit Chloroform ausgeschüttelte Lösung mit 330 mg Perjodsäure in 5 ml Wasser versetzt. Nach 3 Std. wurde 1 ml konz. Salzsäure zugegeben und die Lösung mit Äther kontinuierlich extrahiert. Der mit Natriumsulfat getrocknete Auszug wurde eingedampft und das zurückbleibende bräunliche Öl (120 mg) in 5 ml Äther gelöst. 5 ml ätherische Diazomethanlösung (ca. 2-proz.) wurden tropfenweise zugegeben und das Gemisch 1 Std. stehengelassen. Der Eindampfrückstand gab nach zweimaliger Vakuumdestillation (11 Torr, Badtemperatur 120–130°) 75 mg eines blass gelblichen Öls. – IR.-Absorptionsspektrum in  $\text{CCl}_4$ :  $\nu(\text{OH})$  3490  $\text{cm}^{-1}$  (breite Bande);  $\nu(\text{CO})$  1720  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu(\text{C}=\text{C})$  1652  $\text{cm}^{-1}$ . – NMR.-Spektrum in  $\text{CCl}_4$ :  $\delta = 2,13$  ppm (*d*,  $J = 1,3$ ; 3 H;  $\text{CH}_3$  an C-3);  $\delta = 2,31$  ppm (*t*,  $J = 6,5$ ; 2 H; C-4);  $\delta = 2,93$  ppm (*s*; 1 H; OH);  $\delta = 3,62$  ppm (*s*; 3 H;  $\text{OCH}_3$ );  $\delta = 3,67$  ppm (*t*,  $J = 6,5$ ; 2 H; C-5);  $\delta = 5,62$  ppm (*q*,  $J = 1,3$ ; 1 H; C-2).

*Hexahydroferrirubin.* 300 mg Ferrirubin wurden in 25 ml Methanol in Gegenwart von 150 mg 10-proz. Palladiumkohle 1 Std. lang hydriert. Die Wasserstoffaufnahme betrug 19,5 ml  $\text{H}_2$  entsprechend ca. 3 Mol. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wurde im Vakuum eingedampft und gab 292 mg eines amorphen orange braunen Pulvers, das nicht kristallisiert werden konnte. Das Produkt war papierchromatographisch einheitlich und unterschied sich deutlich vom Ausgangsmaterial (vgl. Tabelle), hingegen war die biologische Wirkung etwa die gleiche wie beim Ferrirubin. – UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{\text{max}}$  425  $\mu\text{m}$  ( $\log \epsilon = 3,50$ ); hohe Endabsorption bei 220  $\mu\text{m}$  ( $\log \epsilon$  über 4); bei 254  $\mu\text{m}$  ist keine Absorptionsbande vorhanden. IR.-Absorptionsmaxima in Nujol:  $\nu(\text{CO})$  1660, 1565 und 1512  $\text{cm}^{-1}$ .

*Desferri-hexahydroferrirubin.* 1,0 g Hexahydroferrirubin wurde in 40 ml Wasser gelöst und mit 1,5 g 8-Hydroxychinolin in 15 ml Methanol 24 Std. bei 20° gerührt. Nach dem Abfiltrieren wurde die gelbliche Lösung mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt und die wässrige Phase im Vakuum eingedampft. Man erhielt 900 mg Desferri-Verbindung als amorphes, nahezu farbloses Pulver. – NMR.-Spektrum in  $\text{D}_2\text{O}$ :  $\delta = 0,93$  ppm (*d*,  $J = 5,9$  H);  $\delta = 1,2$ – $2,2$  ppm (*b*; 21 H);  $\delta = 2,40$  ppm (*b*; 6 H);  $\delta = 3,4$ – $4,1$  ppm (*b*; 18 H);  $\delta = 4,3$  ppm (*b*; 5 H).

*Ferrichrysin aus Ferrirubin.* 900 mg Desferri-hexahydroferrirubin wurden mit 30 ml 1N Salzsäure im siedenden Wasserbad erwärmt. Nach 50 Min. gab ein Tropfen der Lösung mit methanolischer Eisen(III)-chlorid-Lösung nur noch eine sehr blasse Färbung. Die Lösung wurde im Vakuum eingedampft und der getrocknete glasartige Rückstand mit je 10 ml Essigsäureanhydrid und Pyridin während 5 Std. bei Zimmertemperatur acetyliert. Den Eindampfrückstand der Reaktions-

lösung nahm man in 60 ml kaltgesättigter methanolischer Ammoniaklösung auf und dampfte nach 4 Std. erneut ein.

Die gelbliche, halbfeine Masse löste man in 50 ml Methanol und gab eine Lösung von 1 g Eisen(III)-chlorid in Methanol zu. Es entstand eine tiefviolette Färbung, die auf Zusatz von krist. Natriumacetat nach Rotbraun umschlug. Nach 4stdg. Stehen trieb man das Lösungsmittel im Vakuum ab und löste den Rückstand in 100 ml Wasser, dem man 10 g Natriumchlorid zufügte. Das Reaktionsprodukt wurde in der üblichen Weise mit Phenol-Chloroform extrahiert und nach dem Verdünnen mit Äther wieder in Wasser aufgenommen. Die mehrmals mit Äther gewaschenen wässrigen Lösungen dampfte man im Vakuum ein und reinigte das Produkt durch eine 50stufige CRAIG-Verteilung mit dem oben für Ferrirubin angegebenen Lösungsmittelgemisch. Braune Verunreinigungen sammelten sich in den ersten 6 Gläsern an. Das Hauptprodukt war in den Gläsern 12–25 enthalten ( $\tau_{max} = 19$ ;  $K = 0,62$ ; für authentisches Ferrichrysin war früher  $K = 0,63$  gefunden worden<sup>2)</sup>). – Der Inhalt der Fraktionen 12–25 wurde wie oben beschrieben durch Extraktion mit Phenol-Chloroform aufgearbeitet und gab 202 mg papierchromatographisch einheitliches Ferrichrysin. Durch langsame Kristallisation aus Äthanol erhielt man rotbraune Nadelbüschel. Sie liessen sich papierchromatographisch in 2 Fließmitteln sowie im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1 als Fließmittel) nicht von authentischem Ferrichrysin unterscheiden. Wie die Vergleichsprobe wurde das Produkt ohne zu schmelzen bei ca. 250–260° schwarz und gab ein völlig identisches IR.-Absorptionsspektrum.

**Ferrirhodin.** – *Isolierung und Eigenschaften.* 10,6 g roher Phenol-Chloroform-Extrakt aus *Penicillium versicolor*, Stamm ETH M 3636, wurde in gleicher Weise wie beim Ferrirubin (s. oben) einer CRAIG-Verteilung über 137 Stufen unterzogen. Die Fraktionen 40–60 gaben nach der Aufarbeitung 1,29 g Ferricrocin (vgl. <sup>1)</sup>). Eine Nebenkomponente zeigte ein Verteilungsmaximum in Stufe 121 ( $K = 7,3$ ). Das entsprechende Sideramin, Ferrirhodin, wurde aus den Fraktionen 106–130 in gleicher Weise isoliert wie das Ferrirubin (s. oben). Man erhielt 341 mg Eindampfungsrückstand, der sich leicht aus Methanol-Äther umkristallisieren liess und 277 mg glänzende rotbraune Kristalle lieferte, die bei ca. 270° schwarz werden, ohne zu schmelzen. Zur Analyse wurde über  $P_2O_5$  getrocknet.

$C_{41}H_{64}O_{17}N_9Fe$	Ber. C 48,71	H 6,38	N 12,47	Fe 5,53%
	Gef. „ 49,28	„ 6,38	„ 12,30	„ 6,25%

Papierchromatographisches Verhalten s. Tabelle, S. 1928. IR.-Absorptionsspektrum in KBr: s. Fig. 1, Kurve 2; in Nujol:  $\nu$  (CO) 1653 und 1538  $cm^{-1}$ . UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  in  $m\mu$  ( $\log \epsilon$ ): 217 (4,56), 252 (4,36), 450 (3,58). Bei der Papierelektrophorese verhielt sich Ferrirhodin als neutrale Verbindung.

*Saure Hydrolyse.* Bei der wie beim Ferrirubin durchgeführten Hydrolyse mit Chlorwasserstoffsäure und der anschließenden katalytischen Hydrierung wurden Glycin, Serin, Ornithin und Ammoniak gebildet. Bei der Hydrolyse mit Jodwasserstoffsäure (s. bei Ferrirubin) erhielt man Serin, Glycin, Alanin, Ornithin und Ammoniak im Verhältnis 0,20:1,00:1,55:2,95:0,02.

*cis-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säurelacton.* 150 mg Ferrirhodin und 200 mg 8-Hydroxychinolin wurden in üblicher Weise miteinander reagieren gelassen und die Lösung der Desferriverbindung wie beim Ferrirubin mit 130 mg Perjodsäure in 5 ml Wasser versetzt. Nach 2 Std. wurde die Lösung mit 1 ml konz. Salzsäure stark angesäuert und mit Äther im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat extrahiert. Der mit Natriumsulfat getrocknete Auszug gab beim Eindampfen 50 mg Öl, das bei 11 Torr (120–130° Badetemperatur) destilliert wurde. – IR.-Absorptionsspektrum in  $CCl_4$ : Keine Hydroxyl-Absorption;  $\nu$ (CO) 1732  $cm^{-1}$ . NMR.-Spektrum in  $CCl_4$ :  $\delta = 2,00$  ppm ( $d, J = 1$ ; 3 H;  $CH_3$  an C-3);  $\delta = 2,36$  ppm ( $t, J = 6,3$ ; 2 H; C-4);  $\delta = 4,31$  ppm ( $t, J = 6,3$ ; 2 H; C-5);  $\delta = 5,68$  ppm ( $q, J = 1$ ; 1 H; C-2). Ein durch Wasserabspaltung aus D, L-Mevalonsäurelacton hergestelltes Vergleichspräparat<sup>6)</sup> zeigte identische IR.- und NMR.-Spektren.

$C_8H_8O_2$	Ber. C 64,27	H 7,19%	Gef. C 64,50	H 7,07%
-------------	--------------	---------	--------------	---------

*Katalytische Hydrierung von Ferrirhodin.* 102 mg Ferrirhodin wurden in 5 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 70 mg 10-proz. Palladiumkohle hydriert. Die Wasserstoff-Aufnahme betrug innert 100 Min. 7 ml entspr. ca. 3 Mol. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung gab beim Eindampfen ein amorphes rotbraunes Pulver, dessen IR.- und UV.-Absorptionsspektren mit denen von Hexahydroferrirubin übereinstimmten. Das papierchromatographische Verhalten in 2 Fließ-



mitteln stimmte mit dem der Vergleichsprobe ebenfalls überein (s. Tabelle), und die beiden Präparate zeigten die gleiche biologische Wirkung im Antagonismus-Test mit Ferrimycin A.

**Ferrichrom A.** – Ferrichrom A wurde als Nebenprodukt bei der Herstellung von Ferrichrom mittels eines Stammes von *Ustilago sphaerogena* (Stamm ETH 31 415) erhalten. 18,5 g eines rohen Phenol-Chloroform-Extraktes gaben bei der CRAIG-Verteilung über 114 Stufen im üblichen Lösungsmittelsystem aus den Fraktionen 51–74 ( $r_{max} = 62$ ;  $K = 1,19$ ) 2,5 g krist. Ferrichrom und aus den Fraktionen 84–108 ( $r_{max} = 99$ ;  $K = 6,4$ ) 1,50 g Ferrichrom A. Das letztere wurde aus Methanol-Wasser umkristallisiert und stimmte in seinen Eigenschaften mit den Angaben von GARIBALDI & NEILANDS<sup>7</sup>) überein. – UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  in  $m\mu$  ( $\log \epsilon$ ): 217 (4,58), 254 (4,33), 445 (3,62). – Bei der Papierelektrophorese (pH 8) wandert Ferrichrom A als Anion. Im Antagonismus-Test mit Ferrimycin A ist es unwirksam.

**Hexahydroferrichrom A.** 300 mg Ferrichrom A in 25 ml Methanol wurden in Gegenwart von 150 mg 10-proz. Palladiumkohle während 2 Std. hydriert. Der Eindampfrückstand der vom Katalysator abfiltrierten Lösung war ein orangebraunes amorphes Pulver, das nicht kristallisiert werden konnte. Im UV.-Absorptionsspektrum war das Absorptionsmaximum bei 254  $m\mu$  verschwunden, und die Absorptionsbande im Sichtbaren lag bei 425  $m\mu$ . – Hexahydroferrichrom A ist unwirksam im Antagonismus-Test. Im Papierchromatogramm unterscheidet es sich nicht wesentlich vom Ausgangsmaterial.

**Ferrichrysin aus Ferrichrom A.** Aus 600 mg Hexahydroferrichrom A wurde das Eisen mittels 8-Hydroxychinolin in üblicher Weise entfernt. Die amorphe Desferri-Verbindung wurde, wie beim Ferrirubin beschrieben, mit 1N Salzsäure partiell hydrolysiert, das Hydrolysat zuerst mit Essigsäureanhydrid und Pyridin und darauf mit methanolischem Ammoniak umgesetzt. Das Reaktionsprodukt gab mit 1 g Eisen(III)-chlorid in Methanol ein tief braunes Reaktionsgemisch, das durch eine 50stufige CRAIG-Verteilung (s. oben) gereinigt wurde.  $r_{max} = 19$ ;  $K = 0,62$ . Aus den Fraktionen 13–23 wurden bei der üblichen Aufarbeitung 70 mg Ferrichrysin erhalten, das aus Äthanol in glänzenden braunen Nadeln kristallisierte. Es wurde durch das IR.-Absorptionsspektrum und durch Papierchromatographie in 2 Fließmitteln (s. unten) identifiziert. Die biologische Wirkung des Umwandlungsproduktes entsprach derjenigen von authentischem Ferrichrysin.

**Papierchromatographisches Verhalten der Sideramine.** – Die papierchromatographischen Identifizierungen wurden parallel in 2 Fließmitteln durchgeführt.

**System I:** *n*-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1; aufsteigende Chromatographie mit WHATMAN-Filterpapier Nr. 1. Dieses Fließmittel eignet sich auch für die Dünnschichtchromatographie nach STAHL auf Kieselgel G von MERCK.

**System II:** *t*-Butanol – 0,004N Salzsäure – gesätt. wäss. Natriumchlorid-Lösung 2:1:1 (obere Phase); absteigende Chromatographie mit WHATMAN-Filterpapier Nr. 1, imprägniert mit Aceton-Wasser – gesätt. wäss. Natriumchlorid-Lösung 6:3:1 und 10 Min. an der Luft getrocknet. Die Resultate sind in der Tabelle zusammengestellt.

Papierchromatographie von Sideraminen

Sideramin	Rf (System I)	Rf (System II)
Ferrirubin	0,52	0,81
Ferrirhodin	0,61	0,88
Hexahydroferrirubin	0,57	0,80
Hydrierungsprod. von Ferrirhodin	0,57	0,80
Ferrichrysin, authentisch	0,26	0,34
Ferrichrysin aus Ferrirubin	0,26	0,34
Ferrichrysin aus Ferrichrom A	0,26	0,34
Ferrichrom	0,28	0,29
Ferrichrom A	0,38	0,38

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

#### SUMMARY

The fungal siderochromes ferrirhodine, ferrirubine and ferrichrome A possess the same cyclic hexapeptide skeleton as ferrichryesine, composed of 3 mols.  $\delta$ -N-

hydroxyornithine, 2 mols. serine, and 1 mol. glycine, with unknown, but identical amino-acid sequence. The  $\delta$ -nitrogen atoms of the ornithine residues are linked with carboxylic acid residues to hydroxamate groups which form stable complexes with 3-valent iron. The carboxylic acid residues are: *cis*-5-hydroxy-3-methyl-2-pentenoic acid in ferrirhodine, its *trans* isomer in ferrirubine, and *trans*- $\beta$ -methylglutaconic acid in ferrichrome A.

Organisch-chemisches Laboratorium der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

## 217. Über die Struktur der Guaj-azulen-sulfosäuren

von W. Meier, Doris Meuche und E. Heilbronner

(6. III. 63)

Im Anschluss an die ersten Berichte über die elektrophile Substitution der Azulene<sup>1)</sup> ist die Sulfonierung des Guaj-azulens (1) erstmals von PLATTNER, FÜRST & ZIMMERMANN<sup>2)</sup> und davon unabhängig von TREIBS & SCHROTH<sup>3)</sup> beschrieben worden.

Lässt man (1) mit Schwefelsäure in Acetanhydrid reagieren, so erhält man eine Sulfosäure, die von den erstgenannten Autoren mit I bezeichnet wurde. Sie ist mit der Verbindung identisch, die TREIBS & SCHROTH durch Sulfonierung von (1), gelöst in 1,2-Dichloräthan, mit Hilfe des Schwefeltrioxid-Dioxan-Komplexes darstellten und für die sie die Formel (2) vorschlugen. Den Beweis dafür, dass der Sulfosäure I tatsächlich die Struktur (2) zukommt, erbrachten MIYAZAKI, WATANABE, HASHI & UKITA<sup>4)</sup>, die (2) mit dem bekannten 3-Chlor-guaj-azulen verknüpften.

Abgesehen von der Sulfosäure I konnten PLATTNER, FÜRST & ZIMMERMANN<sup>2)</sup> durch Sulfonierung von (1) mit Oleum eine von I (= (2)) verschiedene Sulfosäure II erhalten, deren Struktur mittels der damals zur Verfügung stehenden Methoden nicht aufgeklärt werden konnte.

Neuere Untersuchungen über die Protonierung von Azulenen<sup>5)</sup> und über die Spektren von Azulonium-Kationen<sup>6)</sup>, sowie der Versuch, unter Verwendung substituierter Azulene eine Aciditätsskala vom HAMMETT-Typ aufzustellen<sup>7)</sup>, liessen den Wunsch nach einem Azulenderivat wach werden, das sowohl stark basisch als auch leicht wasserlöslich ist. Diese beiden Bedingungen sollten durch die, drei Alkyl-

1) PL. A. PLATTNER, Abstracts of Papers, 120th Meeting of the American Chemical Society, New York, September 4, 1951; A. G. ANDERSON JR. & J. A. NELSON, J. Amer. chem. Soc. 72, 3824 (1950); A. G. ANDERSON JR., J. A. NELSON & J. J. TAZUMA, *ibid.* 75, 4980 (1953); W. TREIBS & W. ZIEGENBEIN, Liebigs Ann. Chem. 586, 194 (1954).

2) PL. A. PLATTNER, A. FÜRST & K. ZIMMERMANN, Promotionsarbeit K. ZIMMERMANN, Eidg. Technische Hochschule, Prom. Nr. 2199, Zürich 1953.

3) W. TREIBS & W. SCHROTH, Liebigs Ann. Chem. 586, 202 (1954).

4) M. MIYAZAKI, H. WATANABE, M. HASHI & T. UKITA, Pharmaceut. Bull. (Tokyo) 5, 417 (1957).

5) a) F. A. LONG & J. SCHULZE, J. Amer. chem. Soc. 83, 3340 (1961); b) J. SCHULZE & F. A. LONG, Proc. chem. Soc. 1962, 364; c) DORIS MEUCHE & E. HEILBRONNER, Helv. 45, 1965 (1962).

6) W. MEIER, DORIS MEUCHE & E. HEILBRONNER, Helv. 45, 2628 (1962).

7) F. A. LONG & J. SCHULZE, persönliche Mitteilung.