

203. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

52. Mitteilung [1]

Granaticin B

von **S. Barcza**, **M. Brufani**, **W. Keller-Schierlein** und **H. Zähler**

(28. V. 66)

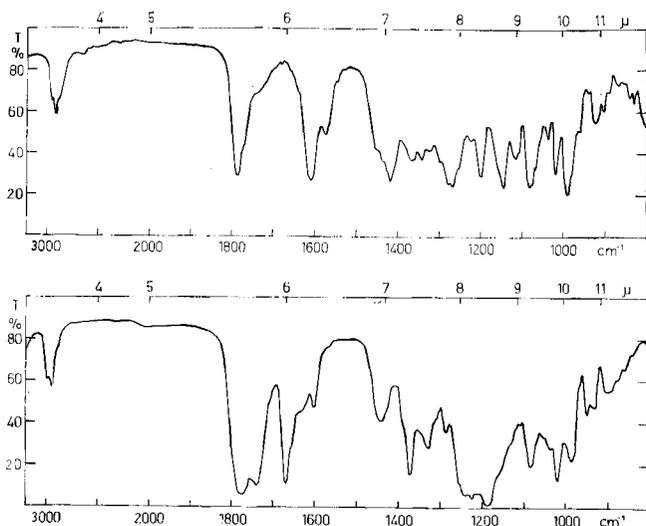
Vor einiger Zeit haben wir über die Isolierung des Antibioticums Granaticin, einer tief rot gefärbten sauren Verbindung, aus Kulturen eines Stammes von *Streptomyces olivaceus* (WAKSMAN) WAKSMAN et HENRICI, Stamm ETH 7437, berichtet [2]. Während dieser erste Stamm das Granaticin als einzigen antibiotisch aktiven roten Farbstoff produzierte, haben wir inzwischen mehrere Actinomycetenstämme erhalten, die das Granaticin im Gemisch mit einem zweiten, dem Granaticin nahe verwandten Antibioticum lieferten. Wir nennen diese neue Verbindung, die ein Glykosid des Granaticins darstellt, Granaticin B. Der von uns für die Herstellung von Granaticin B benützte Stamm, ETH 11382, gehört der Art *Streptomyces violaceoruber* (WAKSMAN et CURTIS) WAKSMAN sensu WAKSMAN et KUTZNER an [3].

Die beiden Antibiotica lassen sich gut durch Papierchromatographie (Rundfilterchromatographie mit Benzol-Formamid) oder Dünnschichtchromatographie mit Polyamidplatten voneinander unterscheiden, wobei das Granaticin B einen erheblich grösseren Rf-Wert besitzt als das Granaticin. Die präparative Trennung gelang am besten durch eine Gegenstromverteilung nach CRAIG, wofür sich das früher für die Isolierung von Granaticin verwendete Lösungsmittelsystem [2] als brauchbar erwies. Aus den Fraktionen, die gemäss Papierchromatographie reines Granaticin B enthielten, wurde dieses als leuchtend rotes amorphes Pulver erhalten.

Das in Methanol aufgenommene Elektronenspektrum des Granaticins B stimmt mit dem des Granaticins [2] im wesentlichen überein: λ_{max} ($\log \epsilon$) 223 (4,52), 285 (3,68), 498 (Schulter, 3,71), 527 (3,76) und 566 nm (3,57). Im IR.-Absorptionsspektrum findet man im 6 μ -Gebiet die gleichen Maxima wie beim Granaticin: 1785 (γ -Lacton), 1608 (Chinoncarbonyle mit starken intramolekularen Wasserstoffbrücken) und 1573 cm^{-1} (in KBr). Im «Fingerprint»-Gebiet treten dagegen erhebliche Unterschiede auf (Figur, Kurve 1).

Während Granaticin B selber nicht kristallin erhalten wurde und daher nur schlecht reproduzierbare Analysenwerte gab, konnte leicht ein gelbes kristallines Tetraacetylderivat hergestellt werden, wobei offenbar zwei alkoholische und zwei phenolische Hydroxylgruppen verestert worden sind, was sich durch das NMR.-Spektrum zu erkennen gibt: Singlette zu drei Protonen bei δ 2,08, 2,18, 2,45 und 2,47 ppm. Im IR.-Absorptionsspektrum des Tetraacetats in KBr (Figur, Kurve 2) ist im 6 μ -Gebiet die Bande bei 1780 cm^{-1} stark verbreitert, da zur unveränderten γ -Lactongruppierung Arylacetatgruppen hinzukommen. Eine neue Bande bei 1740 cm^{-1} wird durch Veresterung alkoholischer Hydroxylgruppen hervorgerufen, und die Bande der Chinoncarbonyle ist von 1608 nach 1670 cm^{-1} verschoben, da die Carbonylgruppen nicht mehr durch Wasserstoffbrücken gebunden sind.

In saurer Lösung geht Granaticin B sehr leicht durch Hydrolyse in Granaticin über. Die säurekatalysierte Solvolyse lässt sich sowohl in wasserhaltiger wie auch in absolut methanolischer Lösung durchführen, was zur Vermutung führte, dass das Granaticin B ein Glykosid des Granaticins sei.



IR.-Absorptionsspektrum von Granaticin B (oben) und Tetraacetylgranaticin B (unten) in KBr

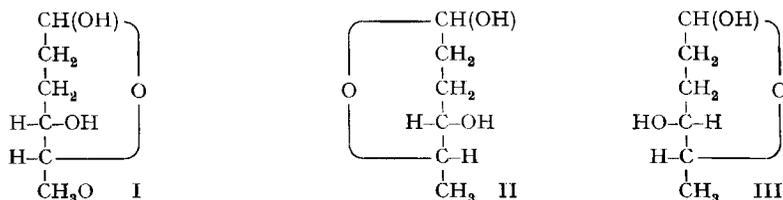
Granaticin B besitzt auf Grund der Analysen des Tetraacetylderivates und des Molekel-Massenspektrums [4]¹⁾ des Antibioticums die Zusammensetzung $C_{28}H_{30}O_{12}$ (Mol.-Gew. 558). Die früher für Granaticin gefundene Bruttoformel $C_{22}H_{20}O_{10}$ (Mol.-Gew. 444) konnte ebenfalls durch das Molekel-Massenspektrum bestätigt werden. Die beiden Verbindungen unterscheiden sich demnach durch einen Rest $C_6H_{10}O_2$ (114). Der Zucker des Granaticins B müsste die Zusammensetzung $C_6H_{12}O_3$ besitzen, was einer Tridesoxyhexose entspricht.

Durch Methanolyse von Granaticin B (für die präparative Gewinnung des Methylglykosids verwendeten wir ein an B angereichertes Gemisch der beiden Granaticine) gelangten wir zum Methylglykosid der Zusammensetzung $C_7H_{14}O_3$, dessen NMR.-Spektrum Signale zeigt, wie sie für ein Methylglykosid einer 5-Methyl-didesoxyaldopentose zu erwarten sind. Die Signale sind aber komplexer als einem Gemisch aus zwei anomeren Glykosiden entspricht. So treten vor allem beim Signal der (C-CH₃)-Gruppe neben einem starken Dublett bei δ 1,19 ppm zwei wesentlich schwächere Dublette mit gleicher Kopplungskonstante ($J = 6,5$ cps) bei δ 1,17 und 1,26 ppm auf, und das Signal der O-Methylgruppe bei δ 3,37 ppm besitzt zwei schwächere Begleiter bei δ 3,35 und 3,48 ppm. Diese Vielfalt der Signale ist nur zu verstehen, wenn man annimmt, dass im Gemisch ausser den beiden anomeren Pyranosiden noch mindestens ein Furanosid anwesend ist. Das würde aber bedeuten, dass der Zucker nur eine 2,3,6-Tridesoxyhexose sein kann. Eine Bestätigung dieser Vermutung fanden wir, als

¹⁾ Herrn Prof. K. SCHREIBER danken wir für die Massenspektren mit negativ geladenen Ionen.

wir nach der Reduktion des freien Zuckers zum Zuckeralkohol und Oxydation mit Natriumperjodat Acetaldehyd als 2,4-Dinitrophenylhydrazon isolieren konnten.

Von den 4 möglichen stereoisomeren Zuckern dieser Konstitution sind 3 bekannt. Die D-Amicetose (I) ist ein Baustein des Antibioticums Amicetin [5] und wurde auch synthetisch erhalten [6]. Die L-Rhodinose (II) kommt in den Antibiotica γ -Rhodomycin IV [7] und Streptolydigin [8] vor, und die D-Rhodinose (III) ist kürzlich synthetisch hergestellt worden [6]. Für die Identifizierung haben wir das Methylglykosid des Zuckers aus Granaticin B mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt. Der Smp. des kristallisierten 2,4-Dinitrophenylhydrazons (117–119°) stimmte mit demjenigen des Derivates aus D-Rhodinose [6] gut überein, ist aber erheblich verschieden von dem des D-Amicetose-2,4-dinitrophenylhydrazons (156–156,5° [6]).



Das 2,4-Dinitrophenylhydrazon wurde weiter mit dem der D-Rhodinose²⁾ durch Dünnschichtchromatographie und durch das Massenspektrum³⁾ verglichen und war damit identisch. Hingegen war die optische Drehung ($[\alpha]_D = -17,2^\circ$ in Pyridin) entgegengesetzt derjenigen der Vergleichsprobe [6]. Der Zucker aus Granaticin B ist demnach die L-Rhodinose (II).

Über die Konstitution des Aglykons werden wir in einer späteren Mitteilung berichten.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Die Smp. wurden in offener Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer, Modell 21, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrographen, Modell A 60, aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in δ -Werten gegenüber Tetramethylsilan als internem Standard, die Kopplungskonstanten in Hertz (cps) angegeben. Es bedeuten: *s* = Singlett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quadruplett, *m* = Multiplett und *b* = schlecht aufgelöster breiter Signalhaufen.

Für die Dünnschichtchromatographie verwendeten wir Kieselgel G von «MERCK». Die Chromatogramme wurden durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure und Erhitzen auf 140° entwickelt. Für Säulenchromatogramme verwendeten wir Kieselgel 0,05–0,20 von «MERCK».

Züchtung. Für die Herstellung von Granaticin B wurde der Stamm ETH 11382 auf folgender Nährlösung unter guter Belüftung in Submerskultur gezüchtet: 2% Sojamehl (vollfett), 2% Mannit, Leitungswasser. Für die quantitative Bestimmung des Granaticingemisches eignet sich der Plattendiffusionstest mit *Bacillus subtilis* oder *Staphylococcus aureus*. Der relative Anteil der beiden Komponenten des Gemisches liess sich durch Dünnschichtchromatographie eines Äthylacetatextraktes der Kultur auf Polyamidplatten (MN-Polyamid, MACHEREY, NAGEL & Co.) und Äthylacetat (80) – Benzin (20) als Laufmittel leicht semiquantitativ abschätzen. (Rf-Werte: Granaticin 0,34–0,38, Granaticin B 0,76–0,78). Nach 2–3tägiger Inkubation bei 27° wurden die Kulturen abgekühlt, mit 2% Filterhilfsmittel (Hyflo-Super-Cel) versetzt und filtriert. Der Filter-

²⁾ Herrn Prof. C. L. STEVENS, Wayne State University, Detroit, danken wir bestens für eine Vergleichsprobe.

³⁾ Herrn Dr. J. SEIBL vom Organ.-chem. Laboratorium der ETH danken wir für die Aufnahme der Massenspektren.

rückstand enthielt praktisch keine Granaticine. Das Filtrat wurde auf pH 4 gebracht, mit einem halben Volumen Äthylacetat ausgezogen und der Extrakt im Vakuum eingetrocknet.

Isolierung von Granaticin B. 55 g Rohextrakt wurden in einer vollautomatischen Verteilungs-Apparatur über 380 Stufen nach dem Verfahren von CRAIG verteilt. Lösungsmittelsystem: 55 Teile Chloroform, 55 Teile Tetrachlorkohlenstoff, 75 Teile Methanol und 25 Teile Wasser. Die photometrische Bestimmung bei 530 nm gab eine Verteilungskurve mit 2 etwa gleich grossen Maxima in den Stufen 88 ($k_1 = 0,30$) und 136 ($k_2 = 0,56$) und einem Minimum in Stufe 116. Die durch einen Agar-Diffusionstest mit *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* bestimmten Kurven der antibiotischen Aktivität verliefen parallel zur optischen Kurve.

Für die Isolierung des Granaticins B wurden die Fraktionen 70 bis 100 vereinigt, mit Wasser verdünnt, die unpolare Phase abgetrennt und die wässrig-methanolische Schicht bis zur Entfärbung dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschenen und mit Natriumsulfat getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen im Vakuum 8,75 g eines intensiv roten Rückstandes, der gemäss Papierchromatographie (Rundfilter-Chromatographie mit Benzol-Formamid) einheitliches *Granaticin B* war (Rf 0,67). Dieses wurde durch Umfällen aus Äthylacetat-Petroläther als leuchtend rotes amorphes Pulver erhalten. – Absorptionsspektrum im UV. und im Sichtbaren (in Feinsprit): λ_{max} in nm (log ϵ): 223 (4,42), 285 (3,68), 498 (Schulter 3,71), 527 (3,76), 566 (3,57). IR.-Absorptionsspektrum in KBr s. Figur, Kurve 1. – Massenspektrum [4]: Molekel-Ion m/e 558 (ber. für $C_{28}H_{30}O_{12}$ 558). Bei der üblichen Massenspektroskopie mit positiven Ionen wurde kein Molekel-Ion beobachtet.

Aus den Fraktionen 101–120 der CRAIG-Verteilung wurden in gleicher Weise 5,02 g eines Gemisches der beiden Granaticine erhalten. Die Fraktionen 121–150 gaben 8,76 g nahezu einheitliches *Granaticin* mit Rf 0,32, das durch Kristallisation aus Aceton weiter gereinigt wurde [2]. Die Fraktionen 151–180 gaben noch 2,1 g *Granaticin*, das durch einen dritten Farbstoff (Rf 0,09) verunreinigt war. – Massenspektrum [4] des krist. *Granaticins*: Molekel-Ion m/e 444 (ber. für $C_{22}H_{20}O_{10}$ 444). Auch *Granaticin* gab bei der Massenspektroskopie mit pos. Ionen kein Molekel-Ion.

Tetraacetylgranaticin B. 100 mg *Granaticin B* in 12 ml Essigsäureanhydrid und 3 ml Pyridin wurden 5 Min. auf dem Dampfbad erwärmt und dann 16 Std. bei 20° stehengelassen. Nach der Zugabe von Eis wurde dreimal mit Benzol ausgeschüttelt und der Benzolextrakt mit verd. Salzsäure und Wasser gewaschen. Beim Eindampfen im Vakuum erhielt man 117 mg eines gelben Rückstandes, der dreimal aus wenig absol. Äthanol umkristallisiert wurde. Smp. 257–259°.

$C_{36}H_{38}O_{16}$	Ber. C 59,50	H 5,27%	Mol.-Gew. 726
	Gef. „ 59,19	„ 5,56%	„ „ 722,84)

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{max} in nm (log ϵ): 242 (4,26), 356 (3,60). IR.-Absorptionsspektrum in KBr s. Figur, Kurve 2. Das NMR.-Spektrum in $CDCl_3$ zeigt u. a. 4 Singlette zu 3 Protonen bei δ 2,08, 2,18, 2,45 und 2,47 ppm.

Granaticin aus Granaticin B. 100 mg reines *Granaticin B* in 1 ml Äthylalkohol und 0,1 ml Wasser wurden mit 2 ml Schwefelsäure versetzt und langsam auf 60° erwärmt. Nach 20 Min. begannen aus der klaren Lösung dunkelrote Kristalle auszufallen. Nach 1 Std. Stehen bei 20° und 15 Std. bei 0° wurden die Kristalle abgetrennt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 69 mg (87%) *Granaticin*, das durch den Misch-Smp., Papierchromatographie, IR.- und Elektronenspektren identifiziert wurde.

Methyl-L-rhodinosid. 1,35 g eines Gemisches aus je ca. 50% *Granaticin* und *Granaticin B* wurden in 100 ml 1,3N absol. methanolischem Chlorwasserstoff (bereitet durch Auflösen von Acetylchlorid in Methanol) gelöst. Nach 30 Min. Stehen bei 20° schied sich ein roter krist. Niederschlag (*Granaticin*) ab, von dem abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde mit frisch gefälltem Silbercarbonat neutralisiert und nach dem Abtrennen der Silbersalze im Vakuum zu einem dunkelroten Öl eingedampft. Durch Destillation bei ca. 80°/0,01 Torr wurden 97 mg eines farblosen Öls erhalten, das durch eine zweite Destillation unter gleichen Bedingungen gereinigt wurde.

$C_7H_{14}O_3$	Ber. C 57,51	H 9,65	Gef. C 57,63	H 9,60%
----------------	--------------	--------	--------------	---------

Bei der Dünnschichtchromatographie (*n*-Butanol-Äthylacetat-Wasser 4:1:1) wurde ein einziger Fleck mit Rf 0,68 erhalten. – IR.-Absorptionsspektrum (Flüssigkeitsfilm): $\nu(OH)$ 3440 cm^{-1} ;

4) Thermoelektrische Bestimmung in Methylenchlorid.

keine Maxima im 6 μ -Gebiet. — NMR.-Spektrum in CDCl_3 : δ 1,17 (*w*), 1,19 (*st*) und 1,26 ppm (*w*) (3 *d*, *J* = 6,5 cps, zusammen 3 H: CH_3 an C-5, mind. 3 Isomere); δ 1,5–2,1 ppm (*b* 4 H: CH_2 in Stellung 2 und 3); δ 2,60 (breites *s*, 1 H: OH an C-4); δ 3,35 (*w*), 3,37 (*st*) und 3,48 (*w*) (3 *s*, zusammen 3 H: OCH_3 , mind. 3 Isomere); δ 3,4–4,1 (*b*, 2 H: H an C-4 und C-5); δ 4,7 und 5,0 (*b*, zusammen 1 H: H an C-1).

Abbau der L-Rhodinose. 67 mg Methylglykosid wurden in 5,5 ml Dioxan und 7 ml 0,1N Schwefelsäure 3 Std. auf 80° erwärmt. Darauf wurde die Lösung durch Umschütteln mit Bariumcarbonat neutralisiert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde bei 0,01 Torr und 60° destilliert und gab 48 mg farblose Flüssigkeit. Im Dünnschichtchromatogramm (Chloroform-Äthylacetat 1:1) wurde ein einziger Fleck (Rf 0,14) erhalten.

48 mg L-Rhodinose in 7 ml absol. Dioxan wurden mit 200 mg Lithiumaluminiumhydrid in 20 ml Dioxan 2 Std. gekocht. Nach Zersetzung des überschüssigen Reagens mit wenig gesättigter wässrer. Natriumsulfatlösung und Trocknen mit Natriumsulfat wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 10 ml Wasser aufgenommen und 200 mg Perjodsäure zugesetzt. Durch die Lösung wurde ein langsamer Stickstoffstrom geleitet und in einer Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 1N Schwefelsäure aufgefangen. Beim langsamen Erwärmen der Oxydationslösung auf 30–35° begann sich im Auffanggefäß ein gelber Niederschlag abzuscheiden. Nach mehreren Stunden wurde abfiltriert, getrocknet und an einer Säule aus Kieselgel mit Chloroform chromatographiert. Das aus Äthanol umkristallisierte Präparat, 25 mg, wurde durch den Misch-Smp., das IR.-Absorptionsspektrum und durch Dünnschichtchromatographie (absol. Chloroform) mit Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon identifiziert.

L-Rhodinose-2,4-dinitrophenylhydrason. Zu einer heissen Lösung von 82 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 13 ml 2N Salzsäure wurden 50 mg des Methylglykosids gegeben. Es fiel sofort ein gelber Niederschlag aus, der nach 30 Min. abfiltriert und mit Wasser gewaschen wurde. Das Rohprodukt, 70 mg, wurde an Kieselgel mit Äthylacetat als Eluierungsmittel chromatographiert und viermal aus Methanol umkristallisiert. Smp. 117–119°, $[\alpha]_D = -17^\circ$ (*c* = 0,83 in Pyridin). Im Dünnschichtchromatogramm (Äthylacetat-Methanol 8:2) liess sich die Verbindung nicht von einer Vergleichsprobe aus synthetischer D-Rhodinose [6] unterscheiden und gab ein identisches Massenspektrum.

SUMMARY

From a strain of *Streptomyces violaceoruber*, ETH 11382, a new antibiotic, granaticin B, has been isolated. Granaticin B is an L-rhodinose of the previously described antibiotic granaticin.

Organ.-chem. Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich
und Mikrobiologisches Institut der Universität, Tübingen

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 51. Mitteilung: R. HÜTTER, K. PORALLA, H. G. ZACHAU & H. ZÄHNER, *Biochem. Z.* 344, 190 (1966).
- [2] R. CORBAZ, L. ETTLINGER, E. GÄUMANN, J. KALVODA, W. KELLER-SCHIERLEIN, F. KRADOLFER, B. K. MANUKIAN, L. NEIPP, V. PRELOG, P. REUSSER & H. ZÄHNER, *Helv.* 40, 1262 (1957).
- [3] R. HÜTTER, *Systematik der Streptomyceten*, Karger-Verlag, Basel 1966.
- [4] M. VON ARDENNE, K. STEINFELDER, R. TÜMLER & K. SCHREIBER, *Experientia* 19, 178 (1963).
- [5] C. L. STEVENS, K. NAGARAJAN & T. H. HASKELL, *J. org. Chemistry* 27, 2991 (1962).
- [6] C. L. STEVENS, P. BLUMBERGS & D. L. WOOD, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 3592 (1964).
- [7] H. BROCKMANN & T. WAHNELDT, *Naturwiss.* 50, 43 (1963).
- [8] K. L. RINEHART & D. B. BORDERS, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 4037 (1963).