

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *H. O. Jones & P. E. Evans*, J. chem. Soc. 99, 334 (1911); *M. G. Edwards, R. E. Garrod & H. O. Jones*, *ibid.* 101, 1376 (1912).
- [2] *S. Tamura, C. Takiguchi & K. Sakai*, J. pharmaceut. Soc., Japan, 76, 912 (1956) [Chem. Abstr. 51, 2782 (1957)]; *G. M. Badger, H. P. Crocker, B. C. Ennis, J. A. Gayler, W. E. Matthews, W. G. C. Raper, E. L. Samuel & T. M. Spotswood*, Aust. J. Chemistry 16, 814 (1963).
- [3] *J. von Braun, W. Gmelin & A. Petzold*, Ber. deutsch. chem. Ges. 57, 382 (1924).
- [4] *N. J. Leonhard & H. P. Fox*, J. Amer. chem. Soc. 68, 2112 (1946).
- [5] *K. Savard*, J. biol. Chemistry 202, 457 (1953).
- [6] *A. Eucken*, Angew. Chem. 45, 203 (1932).
- [7] *A. Albert & E. P. Serjeant*, "Ionization Constants of Acids and Bases", Methuen & Co Ltd, London 1962.

## 88. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

80. Mitteilung [1]

## Aranciamycin

von **W. Keller-Schierlein, J. Sauerbier, U. Vogler** und **H. Zähler**

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich (Schweiz), und Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, der Universität, Tübingen (Deutschland)

(4. IV. 70)

*Summary.* Aranciamycin is a new antibiotic isolated from cultures of a strain of *Streptomyces echinatus*. The orange-yellow acidic compound,  $C_{27}H_{28}O_{12}$ , is a glycoside of an aglycone, aranciamyconone, and a 6-deoxyhexose monomethyl ether.

The aglycone,  $C_{20}H_{16}O_8$ , is composed of a 1,8-dihydroxyanthraquinone nucleus, to which a fourth carbocyclic six-membered ring is condensed, bearing a tertiary C-methyl group, a tertiary and a secondary hydroxyl group, a secondary methoxyl group, and a carbonyl group. A partial formula of the aglycone is given.

Aranciamycin as well as its aglycone are strongly inhibitory against gram-positive bacteria on synthetic media. The antibiotic activity is considerably decreased by the addition of amino-acid combinations and pyruvate to the test medium.

Der Actinomycetenstamm Tü 303, der der Art *Streptomyces echinatus* Corbaz *et al.* [2] angehört, scheidet ein im alkalischen Bereich violett, im sauren Bereich orange gefärbtes Antibioticum in die Lösung aus. Wegen der orangen Farbe der Kristalle nennen wir das Antibioticum Aranciamycin.

Aus den Kulturfiltraten lässt sich das neue Antibioticum durch Extraktion mit Chloroform anreichern. Die Überführung in 0,5N Natronlauge, Ansäuerung und Reextraktion mit Chloroform bringt eine weitere Anreicherung, so dass das Aranciamycin anschliessend ohne weitere Reinigung aus Methanol auskristallisiert werden kann.

Das Antibioticum fiel in Form tief orange-gelber Plättchen an, die sich bei ca. 240° zersetzen. Obwohl es im Massenspektrum kein Molekel-Ion erkennen lässt, halten wir die aus Analysen und aus der Mikrotitration abgeleitete Bruttoformel  $C_{27}H_{28}O_{12}$  für endgültig, da sie mit Abbauergebnissen (s. unten) im Einklang ist. Das IR.-Absorptionsspektrum (Fig. 1) lässt drei Carbonylgruppen erkennen, worunter ein

wasserstoffbrückengebundenen ( $1623\text{ cm}^{-1}$ ) und ein freies ( $1673\text{ cm}^{-1}$ ) Chinoncarbonyl. Das NMR.-Spektrum (Fig. 2) zeigt die Anwesenheit einer sekundären ( $\delta\ 1,32\text{ ppm}$ , *d*) und einer tertiären Methylgruppe an ( $\delta\ 1,46\text{ ppm}$ , *s*). Ein Singulett zu 6 Protonen bei  $\delta\ 3,52\text{ ppm}$  weist auf zwei  $\text{OCH}_3$ -Gruppen hin. Von den 5 mit  $\text{D}_2\text{O}$  austauschbaren HO-Protonen liegen zwei im Gebiet oberhalb  $\delta\ 10\text{ ppm}$  und gehören wasserstoffbrückengebundenen phenolischen Gruppen an. Von den übrigen drei Hydroxylgruppen sind zwei sekundär (Dublette bei  $\delta\ 4,70$  und  $4,94\text{ ppm}$ ) und eine tertiär ( $\delta\ 5,66\text{ ppm}$ , *s*). Die Signale der vier aromatisch gebundenen Wasserstoffe sind

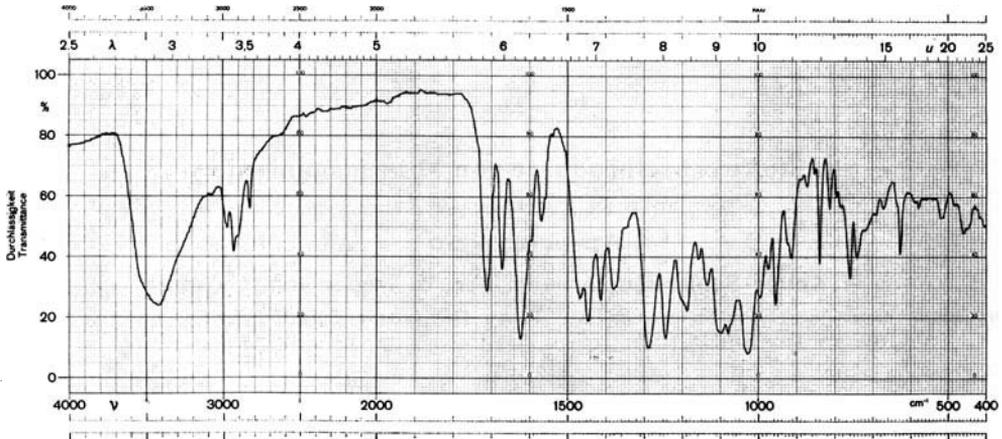


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von Aranciamycin in KBr

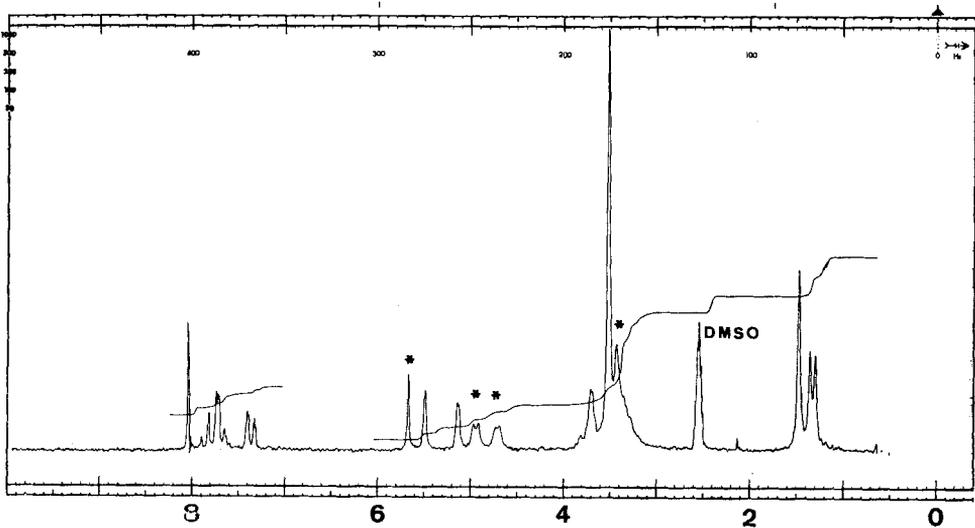


Fig. 2. NMR.-Spektrum von Aranciamycin in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ; 100 MHz.

\* mit  $\text{D}_2\text{O}$  austauschbar

bei einem Derivat des Aglykons (s. unten) übersichtlicher angeordnet und sollen dort näher besprochen werden.

Das Aranciamycin ist eine schwache Säure mit  $pK_{MCS}^*$  8,6 [3]. Es ist optisch aktiv,  $[\alpha]_D = +149,5^\circ$  in Methanol.

Bei der Acetylierung in Pyridin und Essigsäureanhydrid werden die zwei phenolischen und die zwei sekundären alkoholischen Hydroxylgruppen verestert. Demgemäss findet man im NMR.-Spektrum des Acetylderivates vier Singulette zu drei Protonen bei  $\delta$  2,13, 2,15, 2,53 und 2,65 ppm, und im IR.-Absorptionsspektrum Banden bei 1775 und 1745  $\text{cm}^{-1}$ . Nach wie vor sind die Ketonbande bei 1710 und die Chinonbande bei 1678  $\text{cm}^{-1}$  vorhanden, während das Fehlen der Bande bei 1623  $\text{cm}^{-1}$  bestätigt, dass im Aranciamycin Wasserstoffbrücken zwischen einem der beiden Chinoncarbonyle und mindestens einer der beiden phenolischen Hydroxylgruppen bestehen. Eine IR.-Absorptionsbande bei 3580  $\text{cm}^{-1}$  (in Chloroform) zeigt an, dass die tertiäre Hydroxylgruppe nicht acetyliert worden ist.

Die zahlreichen Sauerstoffatome, worunter sich mehrere von sekundären Hydroxylgruppen befinden, liess die Vermutung aufkommen, dass das Aranciamycin – wie zahlreiche bekannte Chinonantibiotika – ein Glykosid sei. Die Solvolyse mit Schwefelsäure in abs. Methanol verlief erst nach 20-stdg. Erhitzen nahezu vollständig. Durch Extraktion mit Äthylacetat und Reinigung an einer Kieselgel-Kolonnen wurde ein kristallines orangefarbenes Aglykon erhalten, dessen Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren dem des Antibioticums (Fig. 3) weitgehend entsprach. Es wird im folgenden – in Analogie zu verwandten Verbindungen – Aranciamycinon genannt.

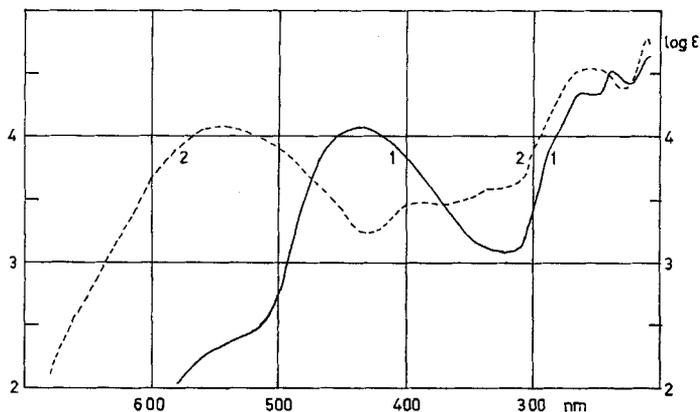


Fig. 3. UV.- und sichtbares Absorptionsspektrum von Aranciamycin  
Kurve 1: in Feinsprit; Kurve 2: in 0,01 N NaOH in Feinsprit

Von den beiden C-Methylgruppen des Glykosids ist nur noch die tertiäre ( $\delta$  1,44 ppm, s, Fig. 4) vorhanden, während die sekundäre dem Zuckerteil (s. unten) zugehört. Auch von den beiden O-Methylgruppen ist im Aglykon nur eine übriggeblieben ( $\delta$  3,50 ppm, s), die zweite wurde ebenfalls im Zuckerteil gefunden. Zwei Dublette im NMR.-Spektrum ( $J = 3$  Hz) bei 3,64 und 5,25 ppm gehören zwei sekundären Sauerstofffunktionen an. Während das Signal bei 3,64 ppm im Acetylderivat (s. unten) etwa an derselben Stelle wieder erscheint und demnach am gleichen C-Atom steht

wie die Methyläthergruppe, ist das Signal bei 5,25 ppm einem H neben einer sekundären Hydroxylgruppe zuzuordnen, denn dieses Signal erscheint im Acetylderivat bei 6,40 ppm. Dass diese beiden Funktionen an benachbarten C-Atomen stehen, wurde durch Spinentkopplung bewiesen.

Das NMR.-Spektrum des Aranciamycinons weist ferner Signale von vier aromatisch gebundenen Wasserstoffatomen auf. Signale von zwei phenolischen Hydroxylen finden sich bei  $\delta$  11,9 ppm. Beide sind demnach durch Wasserstoffbrücken gebunden. Ein breites Singulett bei  $\delta$  3,30 ppm ist im Acetylderivat nicht mehr vorhanden und wird der sekundären Hydroxylgruppe zugeschrieben, ein scharfes Singulett bei  $\delta$  5,34 ppm (in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ), das im Spektrum des Acetylderivates (in  $\text{CDCl}_3$ ) bei 3,60 ppm erscheint, der tertiären OH-Gruppe.

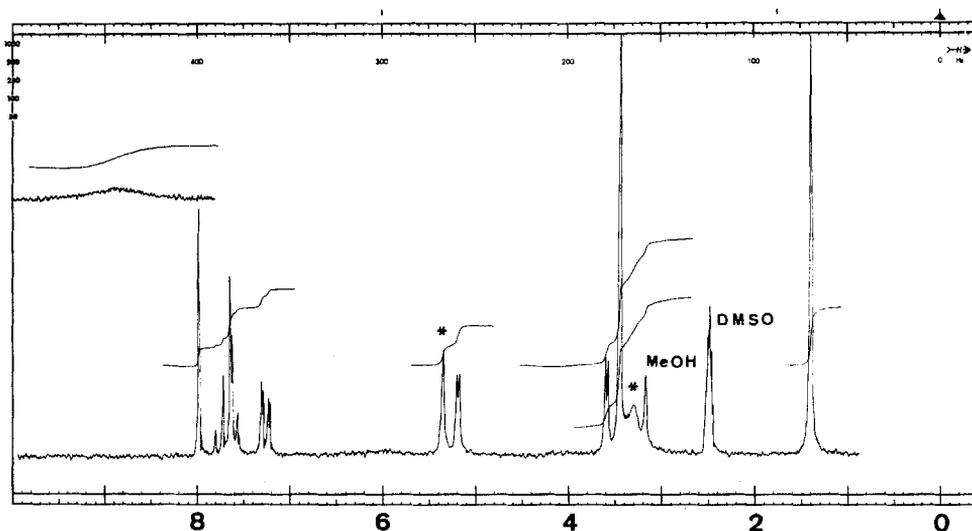


Fig. 4. NMR.-Spektrum von Aranciamycinon in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ; 100 MHz.

\* mit  $\text{D}_2\text{O}$  austauschbar

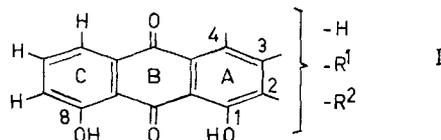
Bei der Acetylierung des Aranciamycinons bildet sich ein Triacetylderivat. Singulette im NMR.-Spektrum bei 2,12 ppm (3 H) und 2,40 ppm (6 H) zeigen, dass eine alkoholische und zwei phenolische Hydroxylgruppen verestert worden sind. Die freie tertiäre Hydroxylgruppe gibt sich durch IR.-Absorptionsbanden bei 3680 und 3560  $\text{cm}^{-1}$  (in Chloroform) zu erkennen.

Die beiden phenolischen Hydroxylgruppen des Aranciamycinons lassen sich mit Diazomethan veräthern. Das gelbe kristalline Produkt,  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_8$ , zeigt im IR.-Absorptionsspektrum noch die Chinonbande bei 1675  $\text{cm}^{-1}$ , nicht aber die bei 1620  $\text{cm}^{-1}$  für ein wasserstoffbrückengebundenes Carbonyl. Der Dimethyläther besitzt noch ein acetylierbares sekundäres sowie das nicht acetylierbare tertiäre Hydroxyl.

Die Konstitution des Chromophors ergibt sich aus folgenden Beobachtungen: Die UV.-Absorptionsspektren der Acetylivate sowohl des Aglykons wie des Antibiotiums entsprechen denen von mehrfach substituierten Anthrachinonen (vgl. z. B. [4]). Die reduzierende Acetylierung führt zu einem dünnschichtchromatographisch

nicht ganz einheitlichen Produkt, dessen UV.-Absorptionsspektrum mit Maxima bei 352, 380 und 402 nm dem eines mehrfach substituierten Anthracens entspricht [5]. Die beiden phenolischen Hydroxylgruppen liegen wegen der oben diskutierten Wasserstoffbrücken in *peri*-Stellung zu einem Chinoncarbonyl. Andererseits ist nur eine der beiden Chinoncarbonylgruppen durch Wasserstoffbrücken gebunden. Es kommt daher als Chromophor nur ein 1,8-Dihydroxyanthrachinon-System in Frage. Von den käuflichen Dihydroxyanthrachinonen zeigt das 1,8-Dihydroxyanthrachinon ein Elektronenspektrum, das demjenigen des Aranciamycinons gut entspricht, während die Isomeren stärkere Abweichungen zeigen.

Über die Substitution am 1,8-Dihydroxyanthrachinon-Gerüst (I) gibt am besten Auskunft das NMR.-Spektrum des Triacetylaranciamycinons, bei dem die Signale der einzelnen aromatisch gebundenen Wasserstoffatome schön voneinander getrennt sind. Man erkennt bei  $\delta$  7,76 ppm ein Triplett ( $J_0 = 8$  Hz.) für ein Wasserstoffatom, das beidseits in *o*-Stellung je ein weiteres Wasserstoffatom als Nachbarn besitzt (H-C6 in Formel I). Die Signale dieser *o*-ständigen Wasserstoffatome liegen bei  $\delta$  7,38 und 8,20 ppm und besitzen die Form von Doppeldoubletten mit  $J_0 = 8$  Hz. und  $J_m$  ca. 1,5 Hz. Daraus ergibt sich, dass der Ring C (Formel I) ausser der Hydroxylgruppe an C8 keine weiteren Substituenten tragen kann (das 1,8-Dihydroxyanthrachinon, das diese Gruppierung zweimal enthält, besitzt ein NMR.-Spektrum, das im Bereich von 7–8 ppm mit dem des Aranciamycinons, Fig. 4, völlig übereinstimmt).

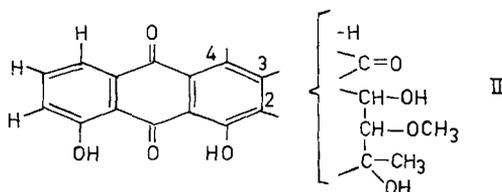


Ein viertes aromatisch gebundenes Proton gibt Anlass zu einem Singulett. Die grosse chemische Verschiebung, 8,12 beim Aranciamycinon, 8,77 beim Acetylderivat, macht es wahrscheinlich, dass dieses Wasserstoffatom in *peri*-Stellung zu einem Chinoncarbonyl, also an C4 steht.

Die Reste  $R^1$  und  $R^2$  (Formel I) bestehen nach den oben diskutierten NMR.-Spektren aus einer sekundären Carbinolgruppe, einer dazu benachbarten Methoxymethylengruppe, einer tertiären Hydroxylgruppe, einer tertiären C-Methylgruppe, und auf Grund der IR.-Absorptionsspektren des Aglykons und seiner Derivate, die alle eine zusätzliche Carbonylbande bei ca.  $1710\text{ cm}^{-1}$  aufweisen, einer Ketogruppe. Da nach Addition aller dieser Gruppen gerade noch ein C-Atom zur Bruttoformel fehlt, müssen die C-Methylgruppe und die tertiäre Hydroxylgruppe am selben C-Atom stehen.

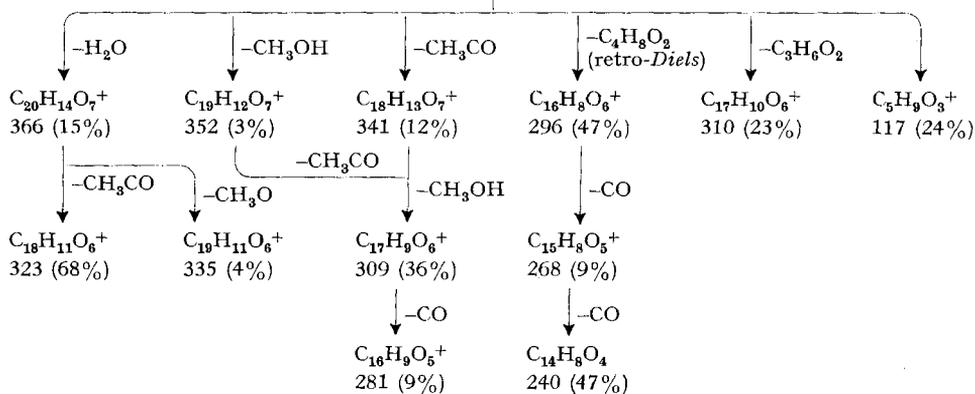
Über die relative Lage von drei dieser Gruppen geben die chemischen Verschiebungen der beiden  $-CH-O$ -Signale in den NMR.-Spektren des Aglykons und seiner Derivate Auskunft. Die Lage des Signals des Wasserstoffs neben der Methoxylgruppe, 3,64 ppm, wird durch diese Gruppe völlig erklärt. Sie kann demnach weder der Ketogruppe noch dem aromatischen Ring direkt benachbart sein. Das Doublett des  $-CH-OH$ -Protons erscheint im Aglykon bei 5,25, im Acetylderivat bei 6,40 ppm. Diese starken chemischen Verschiebungen verlangen, dass diese Gruppierung unmittelbar neben den Aromaten oder neben die Ketogruppe zu liegen kommt. Die

Methylcarbonylgruppe schiebt sich demnach zwischen die Methoxymethylengruppe und die Ketogruppe oder zwischen die Methoxymethylengruppe und den aromatischen Ring ein, so dass sich für das Aranciamycinon die Partialformel II ergibt. Darin fügen sich die Carbonylgruppe und die C<sub>3</sub>-Kette zu einem vierten sechsgliedrigen Ring an das Anthrachinongerüst an, der entweder die Stellen 3 und 4 besetzt, so dass eine Struktur vom Typus des Tetrangomycins [6] zustande kommt, oder aber wahrscheinlicher die Stellen 2 und 3, woraus sich eine anthracyclinartige [7] Struktur ergibt. Es ist bei dieser Anordnung unvermeidlich, dass die Ketogruppe in  $\alpha$ -Stellung zum aromatischen System zu stehen kommt. Die für eine solche Lage ungewöhnlich hohe IR.-Absorptionsfrequenz [ $\nu(\text{CO})$  1705–1714 in den verschiedenen Derivaten] ist wahrscheinlich durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung mit der benachbarten Hydroxylgruppe zu erklären. Die Partialformel II lässt noch 8 verschiedene Konstitutionsformeln zu.



Mit der Partialformel II ist das Massenspektrum des Aranciamycinons (Fig. 5) in bestem Einklang. Ein plausibles Fragmentierungsschema ist in der Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1. Fragmentierungsschema von Aranciamycinon C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>  
M<sup>+</sup> 384 (7%)



Zwischen  $m/e$  117 und 240 (Fig. 5) keine Pike mit Intensitäten über 5%.

Aus den wasserlöslichen Anteilen der Methanolyse konnten wir ein Methylglykosid isolieren, dem auf Grund der Analyse des kristallinen Diacetylderivates die Formel C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub> zukommt. Zwei Singulette bei  $\delta$  3,28 und 3,40 ppm im NMR.-Spektrum zeigen, dass ausser der glykosidischen O-Methylgruppe die zweite im Aranciamycin nachweisbare O-Methylgruppe in diesem Abbauprodukt enthalten ist. Da im NMR.-

Spektrum weiter ein Dublett bei  $\delta$  1,18 ppm ( $J = 5,5$  Hz., 3H) für eine  $\text{CH}_3\text{-CH}$ -Gruppe vorhanden ist, ergibt es sich, dass der Zuckerbaustein ein 6-Desoxyhexosemonomethyläther ist. Weitere Untersuchungen zur Strukturermittlung des Aranciamycins sind im Gang.

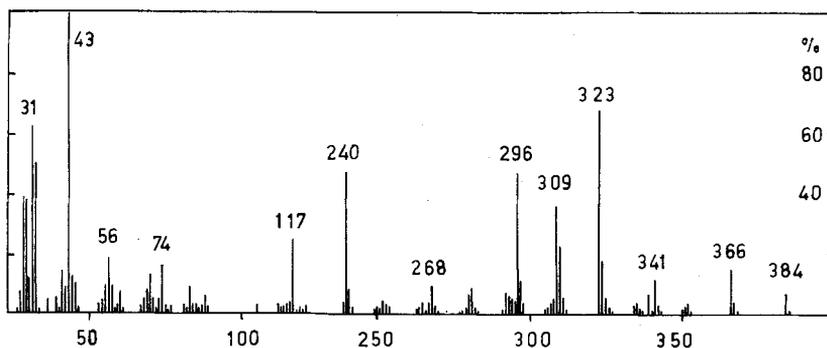


Fig. 5. Massenspektrum von Aranciamycinon

Das Aranciamycin zeigt im Test auf chemisch definiertem Medium vorwiegend gegen grampositive Bakterien eine gute Hemmwirkung, die im Test mit komplexem Medium nicht nachweisbar ist. Überraschenderweise wirkt das Aglykon mindestens ebenso gut wie das Glykosid. In der Tabelle 2 ist die Wirkung des Aranciamycins

Tabelle 2. Wirkung von Aranciamycin und Aranciamycinon auf verschiedene Mikroorganismen im Plattendiffusionstest (Filterrondellen mit 5 mm Durchmesser)

	Aranciamycin		Aranciamycinon	
	0,3 mg/ml	0,1 mg/ml	0,3 mg/ml	0,1 mg/ml
<i>Streptomyces</i>				
<i>viridochromogenes</i>	20 mm	16 mm	21 mm	12 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	14 mm	9 mm	19 mm	14 mm
<i>Pseudomonas lindneri</i>	11 mm	—	14 mm	9 mm
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	—

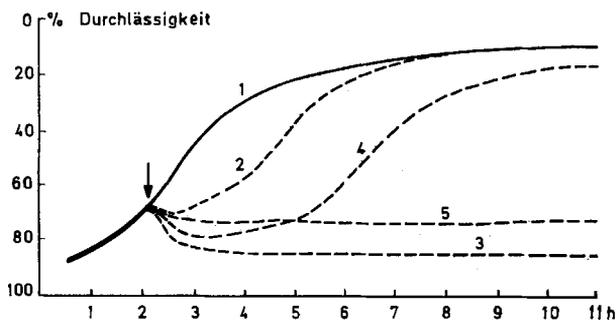


Fig. 6a. Wirkung von Aranciamycin und Aranciamycinon auf *Bacillus subtilis* bei Zugabe in der logarithmischen Wachstumsphase

1. Kontrolle    2. 2  $\mu\text{g/ml}$  Aranciamycin    3. 4  $\mu\text{g/ml}$  Aranciamycin  
4. 1  $\mu\text{g/ml}$  Aranciamycinon    5. 2  $\mu\text{g/ml}$  Aranciamycinon

und des Aranciamycinons gegen verschiedene Keime zusammengestellt. Die minimalen Hemmkonzentrationen im Test auf chemisch definiertem Medium betragen für *Bacillus subtilis* für Aranciamycin 2–4  $\mu\text{g/ml}$  und für Aranciamycinon 1–2  $\mu\text{g/ml}$ .

Biophotometerversuche zeigen, dass Aranciamycin bakteriostatisch wirkt (Fig. 6a). Werden gleichzeitig mit dem Antibioticum (3  $\mu\text{g/ml}$ ) Pyruvat und Alanin (je 125  $\mu\text{g/ml}$ ) zugegeben, so bleibt die Wachstumshemmung auf einige Stunden begrenzt, dann setzt ein normales, mit gleicher Generationszeit verlaufendes Wachstum

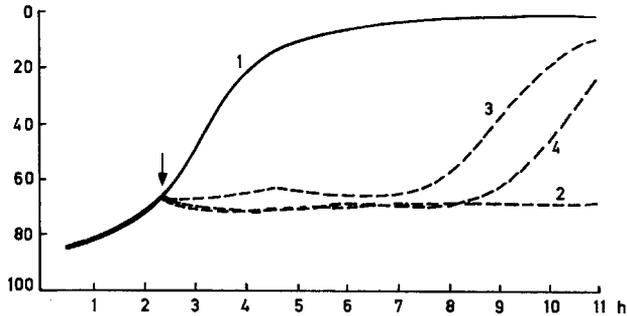


Fig. 6b. *Aufhebung der Aranciamycinwirkung durch Pyruvat und verschiedene Aminosäuren*  
 1. Kontrolle    2. 3  $\mu\text{g/ml}$  Aranciamycin  
 3. 3  $\mu\text{g/ml}$  Aranciamycin + 125  $\mu\text{g/ml}$  Pyruvat + 125  $\mu\text{g/ml}$  Alanin  
 4. 3  $\mu\text{g/ml}$  Aranciamycin + 125  $\mu\text{g/ml}$  Asparaginsäure + 125  $\mu\text{g/ml}$  Lysin  
       + 125  $\mu\text{g/ml}$  Methionin

ein (Fig. 6b). Ein ähnlicher die Hemmwirkung aufhebender Effekt kann durch Zugabe von Aminosäuregemischen, z. B. Lysin, Asparaginsäure, Methionin (je 125  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Asparaginsäure, Threonin und Isoleucin, erreicht werden.

Die nach Zusatz von Pyruvat und Alanin trotz der Antibiotica-Zugabe gewachsenen Keime zeigen keine Resistenz gegenüber Aranciamycin bei Abwesenheit von Pyruvat und Alanin.

Diese Aufhebung der Wirkung durch Pyruvat und Aminosäuren erklärt, weshalb das Aranciamycin nur im Test mit einfachen chemisch definierten Medien eine Wirkung zeigt. Da Chinone mit sehr vielen Stoffen reagieren, dürfte es sich dabei eher um eine Inaktivierung des Antibioticums handeln als um eine Interferenz dieser Stoffe mit dem Antibioticum am Wirkungsort.

### Experimenteller Teil

*Allgemeines.* Die Smp. wurden in offener Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Die IR.-Absorptionsspektren wurden auf einem *Perkin-Elmer*-Spektrophotometer, Modell 21, die UV.-Absorptionsspektren auf einem *Perkin-Elmer*-Spektrometer, Modell 137, aufgenommen. – Für die Aufnahme der NMR.-Spektren und für die NMR.-Doppelresonanz-Experimente wurde ein *Varian*-Spektrometer, Modell HA 100, verwendet. Chemische Verschiebungen sind in  $\delta$ -Einheiten gegenüber Tetramethylsilan als internem Standard, Kopplungskonstanten ( $J$ ) in Hertz angegeben.  $s$  = Singulett,  $d$  = Dublett,  $dd$  = Doppeldublett,  $t$  = Triplett,  $m$  = Multipllett,  $h$  = komplex aufgespaltene Signalgruppe. – Massenspektren wurden mit einem *Hitachi-Perkin-Elmer*-Spektrometer RMU 6 A aufgenommen.

Die Wachstumskurven wurden mit einem Biophotometer *Jouan* (Paris) aufgenommen. Nährlösung und Züchtungsbedingungen siehe [8].

*Beschreibung des Stammes:* Der Aranciamycin produzierende Actinomycetenstamm Tü 303 wurde aus einer bei Konroussa (Guinea) am Nigerufer gesammelten Erdprobe isoliert. Er ist der

Gattung *Streptomyces* zuzuordnen und durch die folgenden artcharakterisierenden Merkmale gekennzeichnet:

1. Die Sporen sind ellipsoid, 0,6–1,5  $\mu$  gross und tragen steife, schlanke Stacheln.
2. Das Luftmycel ist anfänglich weiss und wird im voll ausgereiften Zustand aschgrau.
3. Das Luftmycel, monopodial verzweigt, besitzt Seitenäste mit meist 3–4 engen Windungen.
4. Auf peptonhaltigen Nährböden bildet der Stamm ein melaninartiges Pigment.
5. Das Substratmycel zeigt, wohl zurfolge der Bildung von Aranciamycin, eine gelbliche Farbe.

Der Stamm Tü 303 stimmt in allen artcharakterisierenden Merkmalen mit dem von Corbaz u. Mitarb. [2] beschriebenen Typusstamm von *Streptomyces echinatus* Corbaz et al. überein.

*Fermentation des Stammes Tü 303 und Isolierung von Aranciamycin:* Der Stamm wurde 60 Stunden bei 27° in gut belüfteter Submerskultur auf der folgenden Nährlösung angezogen: Malzextrakt 2%; Distillers solubles 2%; Natriumchlorid 0,5%; Natriumnitrat 0,1%; Leitungswasser; pH der Nährlösung mit Kalilauge auf 7,5 gebracht.

Als Impfmateriale dienten 10% einer 48 Stunden alten Kultur, die unter gleichen Bedingungen gewonnen wurde.

Die Kulturen wurden bei unverändertem pH unter Zusatz von Filterhilfsmittel (1,5% Hyflo Super Cel) filtriert und das Filtrat dann mit Salzsäure auf pH 5 gebracht und zweimal mit einem halben Volumen Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum stark eingeeengt. Dieses Konzentrat wurde mehrfach mit 0,5 N Natronlauge ausgezogen. Die tief violetten Auszüge wurden vereinigt, mit Salzsäure bis zum Umschlag nach orange angesäuert und dreimal mit Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und dann vollständig eingeeengt. Aus einer 100-Liter-Fermentation liessen sich 3,7 g Rohextrakt, der dünnschichtchromatographisch vorwiegend Aranciamycin enthält, gewinnen. Die Rohextrakte wurden in warmem Methanol (100 ml/g Extrakt) gelöst, wonach das Aranciamycin bei längerem Stehen auskristallisierte. Aus den 3,7 g Rohextrakt wurden durch dreimaliges Umkristallisieren 2,54 g dünnschichtchromatographisch reines Aranciamycin erhalten.

Zur Analyse wurde das Aranciamycin aus Methanol umkristallisiert: tief gelborange Plättchen, die sich ab ca. 240° langsam zersetzen.  $[\alpha]_D = +149,5^\circ$  ( $c = 0,5$ , Methanol). UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  241, 265 und 440 nm (Fig. 3, Kurve 1); in 0,01 N alkohol. NaOH:  $\lambda_{max}$  212,5, 260 und 545 nm (Fig. 3, Kurve 2). IR.-Absorptionsspektrum in KBr: Fig. 1. NMR.-Spektrum in  $(CD_3)_2SO$ : Fig. 2. Mikrotitration in Methylcellosolve-Wasser 8:2:  $pK_{MCS}^*$  8,60, Äquiv.-Gew. 568. Die Kristalle sind hygroscopisch und lassen sich nur schwer trocknen.



*Tetraacetyl-aranciamycin.* 199 mg Aranciamycin wurden mit 5 ml Essigsäureanhydrid und 5 ml Pyridin 17 Std. bei 20° acetyliert und der Rückstand nach dem Eindampfen an 10 g Kieselgel chromatographiert. Das mit Chloroform-Äthylacetat eluierte Produkt war gemäss Dünnschichtchromatogramm einheitlich und bildete nach dem Umfällen aus Äther-Petroläther ein hellgelbes amorphes Pulver, Smp. 128–130°. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  in nm ( $\log \epsilon$ ) 225 (4,47), 263 (4,54), 345 (3,78). IR.-Absorptionsspektrum in KBr:  $\nu_{max}$  1775, 1745, 1710, 1678, 1590  $cm^{-1}$ ; in Chlf.: u. a. 3580  $cm^{-1}$ . NMR.-Spektrum in  $CDCl_3$ :  $\delta$  1,41 ( $d$ ,  $J = 6$ , 3H), 1,71  $s$ , 3H), 2,13 ( $s$ , 3H), 2,15 ( $s$ , 3H), 2,53 ( $s$ , 3H), 2,65 ( $s$ , 3H), 3,59 ( $s$ , 3H), 3,64 ( $s$ , 3H), 3,5–3,9 ( $b$ , 1H), 3,75 ( $d$ ,  $J = 2,5$ , 1H), 3,88 ( $d$ ,  $J = 3$ , 1H), 4,06 ( $m$ , 1H), 5,0–5,5 ( $k$ , 4H), 7,5 ( $dd$ ,  $J_0 = 8$ ,  $J_m = 1,5$ , 1H), 7,87 ( $t$ ,  $J = 8$ , 1H), 8,32 ( $dd$ ,  $J_0 = 8$ ,  $J_m = 1,5$ , 1H), 8,92 ( $s$ , 1H); NMR.-Doppelresonanz: Kopplung nachweisbar zwischen den Signalen bei 4,06 und 1,41 bzw. 4,06 und 5,2 ppm.

*Aranciamycinon.* 1,1 g Aranciamycin wurden mit 100 ml abs. Methanol und 10 ml konz. Schwefelsäure über Nacht unter Rückfluss gekocht. Das mit Eiswasser verdünnte Gemisch wurde dreimal mit Äthylacetat ausgezogen, die Extrakte mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der orangefarbene Rückstand (915 mg) gab nach dem Umkristallisieren aus Methanol 630 mg orangefarbene Kristalle, Smp. ca. 200° (Zers.). Bei drei- bis fünfständiger Methanolyse unter den gleichen Bedingungen war neben dem Aglykon noch reichlich Ausgangsmaterial vorhanden. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  in nm ( $\log \epsilon$ ) 217 (4,24), 241 (4,37), 264 (4,23), 440 (3,99); in 0,01 N alkohol. NaOH: 224 (4,27), 258 (4,36), 275 (Sch. 4,25), 524 (3,98). IR.-Absorp-

tionsspektrum in KBr:  $\nu_{\max}$  1705, 1670, 1620, 1568  $\text{cm}^{-1}$ . NMR.-Spektrum in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ : Fig. 4. Massenspektrum: Fig. 5.  $\text{p}K_{\text{MCS}}^*$  8,32, Äquiv.-Gew. gef. 384.

$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_8$  Ber. C 62,50 H 4,20 Mol-Gew. 384 Gef. C 62,10 H 4,48 Mol-Gew. 384 (MS)

*Triacetylaramciamycinon.* 17 mg Aranciamycinon wurden mit je 1 ml Essigsäureanhydrid und Pyridin über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand gab nach Chromatographie an 5 g Kieselgel mit Chloroform-Äthylacetat 1:1 14 mg Eluat, das im Dünnschichtchromatogramm einen einheitlichen gelben Fleck gab (Rf 0,60 mit Chf.-Äthylacetat 1:1). Das Acetat ist ein amorphes gelbes Pulver. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 225 (4,11), 263 (4,21), 350 (3,49), 420 (Sch. 288). IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform:  $\nu_{\max}$  u. a. 3680 (*w*), 3560 (*m*), 1777, 1742, 1714, 1680, 1593  $\text{cm}^{-1}$ . NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  1,45 (*s*, 3H), 2,12 (*s*, 3H), 2,40 (*s*, 6H), 3,53 (*s*, 3H), 3,60 (*s*, 1H), 3,65 (*d*,  $J = 3$ , 1H), 6,40 (*d*,  $J = 3$ , 1H), 7,38 (*dd*,  $J_0 = 8$ ,  $J_m = 1,5$ , 1H), 7,76 (*t*,  $J = 8$ , 1H), 8,20 (*dd*,  $J_0 = 8$ ,  $J_m = 1,5$ , 1H), 8,77 (*s*, 1H).

*Reduktive Acetylierung.* 60 mg Triacetylaramciamycinon, 1 g Zinkstaub, 1 g frisch geschmolzenes Natriumacetat und 10 ml Essigsäureanhydrid wurden 2 Std. unter Rückfluss gekocht, dann wurde das Gemisch auf Eis gegossen und nach 30 Min. mit Benzol extrahiert. Der gewaschene und getrocknete Auszug gab 75 mg gelben Eindampfrückstand, der an 6 g Kieselgel chromatographiert wurde. Die Hauptfraktionen zeigten im UV. Absorptionsmaxima bei 352, 380 und 402 nm, die für mehrfach substituierte Anthracene typisch sind.

*Aranciamycinon-dimethyläther.* 140 mg Aranciamycinon wurden unter Erwärmen in 10 ml Methanol gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 15 ml ätherische Diazomethanlösung, nach zwei Std. weitere 10 ml Diazomethanlösung zugegeben und nach 5 Std. im Vakuum eingedampft. Bei der Chromatographie an 10 g Kieselgel wurden mit Chloroform-Äthylacetat zunächst 46 mg uneinheitliche gelbe Produkte eluiert. Anschliessend wurden 52 mg einheitliches Produkt erhalten, das aus Methanol in gelben Nadeln kristallisierte, Smp. 230–231°. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{\max}$  in nm (log  $\epsilon$ ) 237 (4,43), 252 (4,41), 394 (3,77). IR.-Absorptionsspektrum in KBr:  $\nu_{\max}$  1708, 1675, 1655 (Sch.), 1583  $\text{cm}^{-1}$ . NMR.-Spektrum in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ :  $\delta$  1,40 (*s*, 3H), 3,45 (*s*, 3H), 3,60 (*d*,  $J = 2,5$ , 1H), 3,98 (*s*, 6H), 5,23 (*m*, 1H), 5,30 (*s*, 1H), 5,98 (*d*,  $J = 5$ , 1H), 7,4–7,9 (*k*, 3H), 8,28 (*s*, 1H).

$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_8$  Ber. C 64,07 H 4,89% Gef. C 64,25 H 4,98%

*Acetylaramciamycinon-dimethyläther.* 35 mg Dimethyläther wurden mit Essigsäureanhydrid und Pyridin 3 Std. bei Zimmertemperatur acetyliert und der Rückstand nach dem Eindampfen an 4 g Kieselgel chromatographiert. Die dünnschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen gaben 25 mg gelbes amorphes Produkt. IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform:  $\nu_{\max}$  3555, 1740, 1712, 1680, 1588  $\text{cm}^{-1}$ . NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  1,43 (*s*, 3H), 2,14 (*s*, 3H), 3,58 (*s*, 3H), 3,65 (*s*, 1H, mit  $\text{D}_2\text{O}$  austauschbar), 3,72 (*d*,  $J = 2$ , 1H), 3,97 (*s*, 3H), 4,00 (*s*, 3H), 6,46 (*d*,  $J = 2$ , 1H), 7,2–8,0 (*k*, 3H), 8,57 (*s*, 1H).

*Methylglykosid.* Die schwefelsäure wässrige Phase des Methanolyseproduktes nach der Extraktion des Aglykons wurde in einem Glasrichter durch ein Bett aus Dowex 1 filtriert und das neutrale Eluat im Vakuum eingedampft. Der weisse Rückstand wurde mehrmals mit Methanol ausgezogen, von unlöslichem weissem Material abfiltriert und der eingedampfte Extrakt an 20 g Kieselgel chromatographiert. Mit 80 ml Äthylacetat wurden 24 mg Methylglykosid als farblose zähe Flüssigkeit erhalten, die im Dünnschichtchromatogramm (Äthylacetat, Entwicklung mit konz. Schwefelsäure bei 130°) einen einheitlichen gelben Fleck gab. Die anschliessenden uneinheitlichen Fraktionen lieferten nach erneuter Chromatographie weitere 10 mg reines Methylglykosid. – Weiteres Methylglykosid war in den Mutterlaugen des Aglykons enthalten. Es konnte nach Acetylierung und Chromatographie in Form des Diacetylderivates (s. unten) rein isoliert werden. NMR.-Spektrum in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ :  $\delta$  1,18 (*d*,  $J = 5,5$ , 3H), 3,28 (*s*, 3H), 3,40 (*s*, 3H), 3,0–3,7 (*k*, 4H), 4,5–4,8 (*k*, 3H).

*Acetylderivat des Methylglykosids:* 73 mg rohes Methylglykosid wurden in üblicher Weise acetyliert und das Rohprodukt an 10 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Äthylacetat 9:1 wurden 69 mg chromatographisch einheitliches farbloses Eluat erhalten, das aus Äther-Petroläther Kristalle vom Smp. 70–71° ergab. Zur Analyse wurde bei 60°/0,01 Torr sublimiert. IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform:  $\nu_{\max}$  1740  $\text{cm}^{-1}$ ; keine OH-Absorption. NMR.-Spektrum

in  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  1,20 (*d*,  $J = 6$ , 3H), 2,02 (*s*, 3H), 2,06 (*s*, 3H), 3,39 (*s*, 3H), 3,47 (*s*, 3H), 3,61 (*dd*,  $J_1 = 3$ ,  $J_2 = 2$ , 1H), 3,79 (*m*, 1H), 4,70 (*d*,  $J = 2$ , 1H), 5,0–5,2 (*b*, 2H).

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_7$  Ber. C 52,16 H 7,30% Gef. C 51,90 H 7,29%

Die Mikroanalysen wurden im analytischen Laboratorium der ETH (Leitung *W. Manser*) ausgeführt. Die NMR.-Spektren verdanken wir der Abteilung für Instrumentalanalyse der ETH (Leitung Prof. *W. Simon*), die Massenspektren Herrn Dr. *J. Seibl*. Herrn *André Müller* danken wir für Mithilfe bei der Ausführung der Abbaureaktionen.

Der CIBA-Aktiengesellschaft, Basel, danken wir für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Die Fermentationen wurden in einer von der *Stiftung Volkswagenwerk* zur Verfügung gestellten Apparatur «*Ferma-Cell*», New Brunswick, durchgeführt. Wir danken der *Stiftung Volkswagenwerk* für diese Hilfe.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 79. Mitteilung: *W. Keller-Schierlein*, *R. Muntwyler* & *H. Zähler*, *Experientia* 25, 786 (1969).
- [2] *R. Corbaz*, *L. Eitlinger*, *E. Gäumann*, *W. Keller-Schierlein*, *F. Kradolfer*, *L. Neipp*, *V. Prelog*, *P. Reusser* & *H. Zähler*, *Helv.* 40, 199 (1957).
- [3] *W. Simon* & *E. Heilbronner*, *Helv.* 38, 508 (1955).
- [4] *H. Brockmann* & *W. Lenk*, *Chem. Ber.* 92, 1880 (1959).
- [5] *H. Brockmann* & *G. Budde*, *Chem. Ber.* 86, 432 (1953).
- [6] *M. P. Kunstmann* & *L. A. Mitscher*, *J. org. Chemistry* 31, 2920 (1966).
- [7] *H. Brockmann*, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* (Ed. *L. Zechmeister*) 21, 121 (1963).
- [8] *W. Keller-Schierlein*, *K. Povalla* & *H. Zähler*, *Arch. Mikrobiol.* 67, 339 (1969).

## 89. Über Pterinchemie

30. Mitteilung [1]

### Die Oxydation der hydrierten Lumazine durch Luftsauerstoff und das unerwartete Verhalten der 6,7-Diphenyl-5,6-dihydropteridine in sauren Lösungen<sup>1)</sup>

von **M. Viscontini** und **H. Leidner**

Organisch-Chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, 8001 Zürich

(5. II. 70)

Herrn Prof. Dr. *R. Tschesche* zum 65. Geburtstag gewidmet

*Zusammenfassung.* Die hydrierten 6,7-Diphenyllumazine sind gegen Luftsauerstoff beständiger als die entsprechenden 6,7-Diphenylpteridine, werden jedoch nach einem gleichen Mechanismus oxydiert. Während die tetrahydrierten Pteridine unter intermediärer Bildung eines trihydrierten Radikals und anschliessend eines dihydrierten chinoiden Pteridins zu 7,8-Dihydropteridinen oxydiert werden, verläuft die Oxydation der 5,6-Dihydropteridine anders. In neutralen sowie in alkalischen Lösungen wird ein monohydriertes Radikal gebildet, welches dem Sauerstoff ein zweites Elektron und Proton abgibt, unter Bildung der entsprechenden Pteridine. In sauren Lösungen addiert die 7,8-Doppelbindung eine Molekel Wasser. Die so entstandenen hydratisierten Pteridine werden – wie die Tetrahydropteridine – viel rascher oxydiert, so dass die Oxydation der 5,6-Dihydropteridine leichter in sauren als in neutralen Lösungen erfolgt. Das intermediäre 7-Hydroxy-6,7-diphenyl-5,6,7,8-tetrahydroalumazin wurde als Hydrochlorid rein isoliert.

<sup>1)</sup> Auszug aus der Dissertation *Leidner* [2].