

sulfat getrocknete Extrakt gab nach dem Eindampfen 129 mg fast farblosen Rückstand, der im Dünnschichtchromatogramm vorwiegend ein Hauptprodukt (Rf 0,33 mit Chloroform/Äthylacetat 7:3) neben mehreren Nebenkomponten zeigte.

72 mg des Produktes wurden mit Pyridin/Essigsäureanhydrid 18 Std. bei Raumtemperatur acetyliert, das Reaktionsgemisch in 30 ml Wasser gegossen und nach 15 Min. mit Äthylacetat ausgezogen. Der mit verd. Salzsäure, Natriumbicarbonat und Wasser gewaschene Extrakt wurde getrocknet und eingedampft und der Rückstand an 10 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform/Äthylacetat 19:1 wurden zunächst Fraktionen erhalten, die im NMR.-Spektrum ein starkes Singulett bei 2,51 ppm (Pyruvat) zeigten. Mit dem gleichen Elutionsmittel folgten 45 mg farbloses Öl, das gemäss Dünnschichtchromatogramm einheitlich schien (Rf 0,53 mit Chloroform/Äthylacetat 9:1). Das Eluat wurde im Hochvakuum bei 120° destilliert. Das NMR.-Spektrum zeigte, dass ein Gemisch der beiden anomeren Diacetate VIII zu etwa gleichen Anteilen vorlag, das mit wenig Pyruvat verunreinigt war: δ 0,75–1,0 (*h*, 6 H); 1,23 (*d*, *J* = 6,5; CH₃–C(5) des einen Anomeren); 1,30 (*d*, *J* = 6,5; CH₃–C(5) des anderen Anomeren); 1,3–2,1 (*m*, H–C(2) und H–C(4)); 2,16 (*s*, 3 H); 2,26 (*s*, 3 H); 2,51 (*s*, ca. 0,3 H, Verunreinigung durch Pyruvat); 3,40 (*m*, nach Einstrahlung bei δ 1,30: *d*, *J* = 8,5; H–C(5) des einen Anomeren); 3,70 (*m*, nach Einstrahlung bei δ 1,23: *d*, *J* = 10; H–C(5) des anderen Anomeren); 4,69 (*t*, *J* = 10; H–C(3) des einen Anomeren); 4,98 (*t*, *J* = 10; H–C(3) des anderen Anomeren); 5,5 und 6,05 (H–C(1) der beiden Anomeren).

Die Mikroanalysen verdanken wir unserer analytischen Abteilung (Leitung *W. Manser*), die NMR.-Spektren unserem NMR.-Laboratorium (Leitung Prof. *J.-F. Oth*) und die Massenspektren Herrn Dr. *J. Seibl*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 102. Mitt.: *M. Brufani, L. Cellai, C. Musu & W. Keller-Schierlein*, Gazz. chim. ital. (im Druck).
- [2] *W. Keller-Schierlein & G. Roncari*, Helv. 45, 138 (1962); Helv. 47, 78 (1964); *G. Roncari & W. Keller-Schierlein*, Helv. 49, 705 (1966).
- [3] *R. S. Egan & J. R. Martin*, J. Amer. chem. Soc. 92, 4129 (1970).
- [4] *T. J. Perun, R. S. Egan, P. H. Jones, J. R. Martin, L. A. Mitscher & B. J. Slater*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1969, 116.
- [5] *D. R. Harris, S. G. McGeachin & H. H. Mills*, Tetrahedron Letters 1965, 679.
- [6] *H. Wolf*, Tetrahedron Letters 1966, 5151.
- [7] *A. McL. Mathieson*, Tetrahedron Letters 1963, 81; *K. K. Cheung, K. H. Overton & G. A. Sim*, Chem. Commun. 1965, 634.

49. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

104. Mitteilung [1]

Die Struktur des Cinerubins B.

von **W. Richle, E. K. Winkler, D. M. Hawley, M. Dobler**
und **W. Keller-Schierlein**

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

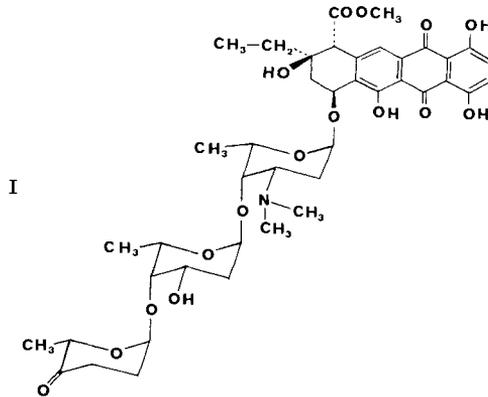
Herrn Prof. Dr. *A. Wettstein* zum 65. Geburtstag gewidmet

(10. I. 72)

Summary. The structural determination of the anthracycline antibiotic Cinerubine B by degradation, spectroscopic studies and an X-ray crystallographic analysis of a degradation product is described.

1. Einleitung. – Kürzlich konnten wir über die Struktur des Cinerubins A [2], eines antimittotischen Anthracyclin-Antibioticums, das von einem Actinomyceten

der Art *Streptomyces antibioticus* (Waksman & Woodruff) Waksman & Henrici gebildet wird [3] [4], berichten. Es baut sich gemäss Formel I auf aus dem Aglykon ϵ -Pyrromycinon, dem Aminozucker L-Rhodosamin und den neutralen Zuckern 2-Desoxy-L-fucose und L-Cinerulose A.



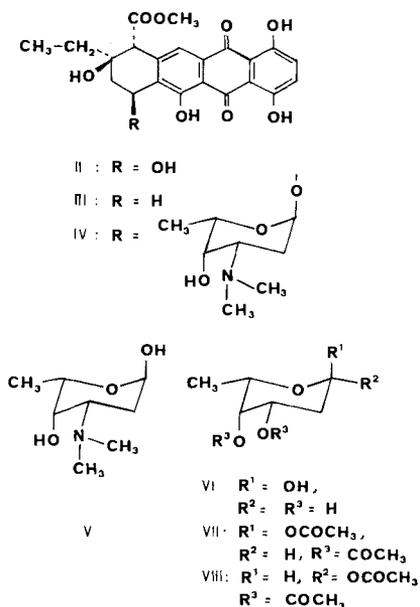
Als Nebenkomponente von Cinerubin A (die unter besonderen Fermentationsbedingungen auch zur Hauptkomponente werden kann) haben wir seinerzeit das Cinerubin B, eine in roten Stäbchen kristallisierende lipophile Base, isoliert [3]. Es wurde bereits früher festgestellt, dass dem Cinerubin B das gleiche Aglykon, ϵ -Pyrromycinon, zu Grunde liegt, das seither Gegenstand zahlreicher Untersuchungen besonders im Laboratorium von H. Brockmann geworden ist [5]. Gemäss diesen Studien sowie synthetischen Arbeiten von Horii und Mitarb. [6] ist die Strukturformel II für das Aglykon gesichert.

2. Die Zuckerbausteine des Cinerubins B. – Unsere Untersuchungen über die Zuckerbausteine des Cinerubins B führten rasch zur Isolierung des kristallinen Hydrochlorids von L-Rhodosamin (V), das durch Vergleich mit einem authentischen Präparat identifiziert wurde (vgl. [2]). Die neutralen wasserlöslichen Anteile einer Säurehydrolyse von Cinerubin B gaben bei der Acetylierung zwei durch Chromatographie trennbare Acetylderivate, die sich beim Vergleich mit den aus Cinerubin A gewonnenen anomeren 2-Desoxy-L-fucose-triacetaten (VII und VIII) als identisch erwiesen [2].

Aus je einem Mol der somit nachgewiesenen drei Bausteine, ϵ -Pyrromycinon ($C_{22}H_{20}O_9$) (II), L-Rhodosamin ($C_8H_{17}NO_3$) (V) und 2-Desoxy-L-fucose ($C_6H_{12}O_4$) (VI) ergibt sich, nach Abzug von 2 Mol Wasser für die Glykosidbindungen, eine Bruttoformel $C_{36}H_{45}NO_{14}$ mit einem Molekulargewicht von 715. Da dies mit den früheren Analysen, insbesondere mit dem gefundenen Äquivalentgewicht von 878 [3] nicht vereinbar ist, war es naheliegend, anzunehmen, dass wie seinerzeit beim Cinerubin A [2] ein unter den Hydrolysebedingungen unbeständiger Baustein nicht erfasst worden war.

Bei der Hydrolyse unter besonders milden Bedingungen liess sich, analog wie beim Cinerubin A, selektiv eine Glykosidbindung spalten. Das basische, tief rot ge-

färbte Spaltprodukt erwies sich als identisch mit dem Pyrrromycin (IV), das unter den gleichen Bedingungen schon aus Cinerubin A erhalten worden war [2]. Durch eine *Craig*-Verteilung liess sich davon eine farblose kristalline Verbindung, $C_{12}H_{18}O_6$, abtrennen, die bei der energischen Hydrolyse 2-Desoxy-L-fucose (VI) gab. Bei der milden Methanolyse von Cinerubin B wurde das entsprechende Methylglykosid, $C_{13}H_{20}O_6$, Smp. 129–130°, erhalten. Während das Methylglykosid gemäss IR.-Spektrum keine freie Hydroxylgruppe enthält und sich dementsprechend nicht acetylieren liess, besitzt die Verbindung $C_{12}H_{18}O_6$ eine Hydroxylgruppe, die sich an einem Ano-

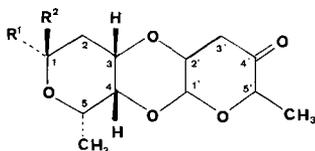


meriezentrum befindet, da bei der Acetylierung zwei isomere Monoacetate erhalten wurden. Das betreffende Anomeriezentrum entspricht demjenigen einer Aldose, da die beiden Acetylderivate im NMR.-Spektrum Signale für H-C(1) bei δ 5,7 bzw. 6,3 ppm besitzen, während beim Methylglykosid die feldtiefsten Signale bei 5,2 ppm liegen.

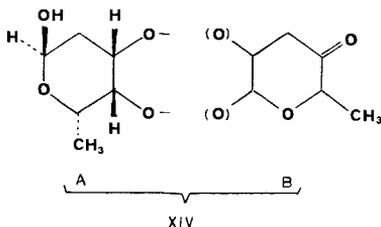
Ein weiteres Sauerstoffatom liegt in einer Carbonylgruppe vor, denn sowohl die Verbindung $C_{12}H_{18}O_6$ wie auch das Methylderivat $C_{13}H_{20}O_6$ weisen im IR.-Spektrum eine intensive Bande bei 1730 cm^{-1} auf. Diese stimmt genau überein mit derjenigen der Derivate von Cinerulose A [2] und entspricht einer Ketogruppe in einem Pyranosidring [7] [8]. Durch die Reduktion des Methylglykosids mit Lithiumaluminiumhydrid zu einer kristallinen Dihydroverbindung $C_{13}H_{22}O_6$, die im IR.-Spektrum keine Carbonylaborption aufweist, dagegen eine acetylierbare Hydroxylgruppe besitzt, konnte weiter gezeigt werden, dass nur *ein* Sauerstoffatom in einer Ketogruppe vorhanden ist.

Die übrigen vier Sauerstoffatome müssen in Äthergruppen vorliegen. Da sich in den Spektren ausser der Ketogruppe keine weiteren ungesättigten Gruppen zu erkennen geben, enthält die Verbindung drei Ringe. Die Formel $C_{12}H_{18}O_6$ und die bisher

beschriebenen Eigenschaften entsprechen denen eines tricyclischen Anhydrodisaccharids, das sich aus der 2-Desoxy-L-fucose und einer unbekanntem Hexulose, $C_6H_{10}O_4$, aufbaut. Es ist offensichtlich, dass das Disaccharid demjenigen nahesteht, das wir früher aus dem Cinerubin A erhalten haben [2].



- IX : $R^1 = OH, R^2 = H$
 X : $R^1 = CH_3COO, R^2 = H$
 XI : $R^1 = H, R^2 = OH$
 XII : $R^1 = H, R^2 = CH_3COO$
 XIII : $R^1 = H, R^2 = OCH_3$



Für die Konstitutionsaufklärung des Disaccharids waren zunächst die NMR.-Spektren seiner Derivate von Bedeutung. Eine eingehende Diskussion, die zur Ableitung der Konstitutionsformeln IX bis XIII (unter Einbezug der Stereochemie im 2-Desoxy-L-fucoseteil) geführt hat, soll hier am Beispiel des β -O-Acetylderivates (X) erfolgen (Fig. 1). Das bei tiefstem Feld erscheinende Signal ($\delta 5,68$ ppm) muss auf Grund der chemischen Verschiebung einem Wasserstoffatom zukommen, das einem Äther- und einem Estersauerstoffatom anliegt. Es handelt sich um ein Doppeldublett mit Kopplungskonstanten von 10,5 und 2,5 Hz. Daraus geht zunächst hervor, dass es sich hier um das Anomere mit axialem Wasserstoffatom an C(1) handelt (das andere Anomere, das ebenfalls rein isoliert wurde, zeigt für H-C(1) ein Doppeldublett mit Kopplungskonstanten von 3,5 und 1,5 Hz). Die doppelte Aufspaltung zeigt, dass dem C-Atom 1 eine Methylengruppe benachbart ist. Da es sich zeigen wird (s. unten), dass der unbekanntem Zuckerteil an C(2) ein Sauerstoffatom trägt, kann dieses Signal nur dem Proton an C(1) des 2-Desoxy-L-fucoseteils zukommen. Dieser bildet daher das «Kopfende» des Disaccharids mit freier Cyclohalbactalgruppierung.

Für das Wasserstoffatom an C(1') des zweiten Zuckers kommt auf Grund der chemischen Verschiebung nur das Signal bei 5,23 ppm in Frage, das beim Methylglykosid XIII (Fig. 2) und beim freien Disaccharid IX nahezu an derselben Stelle erscheint. Der unbekanntem Zucker ist demnach ebenfalls eine Aldose und über eine Glykosidbindung an die 2-Desoxy-L-fucose gebunden. Die Dublettaufspaltung des Signals bei 5,23 ppm deutet an, dass am C-Atom 2' ein einziges Proton liegt. Dessen Signal liegt bei $\delta 4,37$ ppm und zeigt damit ein Sauerstoffatom an C(2') an. Es bildet ein Quartett mit $J = 3,5$ Hz und wird bei der Entkopplung mit der Frequenz von

H-C(1') zu einem Triplett. Demnach gehört das nächstfolgende C-Atom, C(3'), einer Methylengruppe an. Die beiden Wasserstoffatome an C(3') zeigen im NMR.-Spektrum die gleiche chemische Verschiebung und die gleiche Kopplungskonstante mit H-C(2') und geben demnach ein Dublett ($J = 3,5$ Hz), dessen Lage bei 2,59 ppm derjenigen einer Methylengruppe in α -Stellung zu einer Carbonylgruppe entspricht. Damit steht auch die Ketogruppe an C(4') fest.

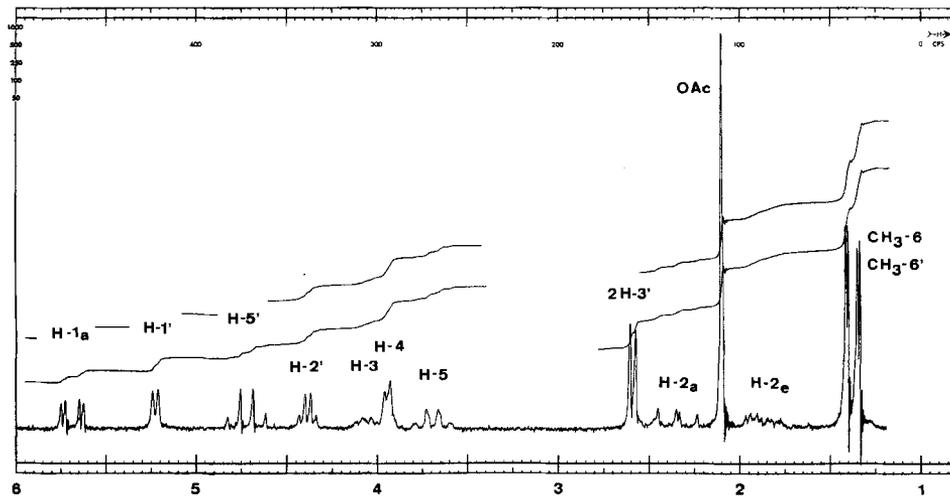


Fig. 1. NMR.-Spektrum des Disaccharid-acetats X in $CDCl_3$ (100 MHz)

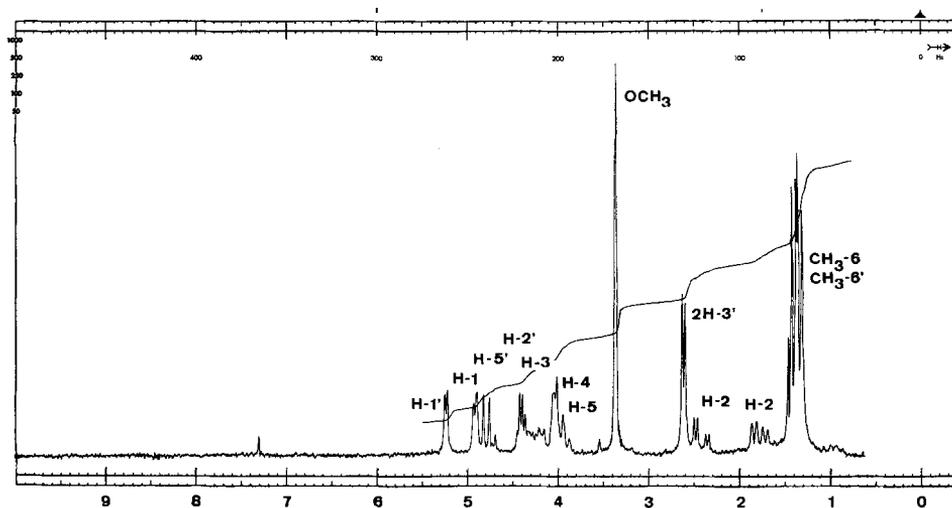


Fig. 2. NMR.-Spektrum des Methylglykosids XIII in $CDCl_3$ (100 MHz)

Lage und Substitution der übrigen beiden C-Atome des unbekanntes Zuckers ergeben sich ebenfalls aus dem NMR.-Spektrum (Fig. 1). Es besitzt im 1-ppm-Bereich zwei Dublette von zwei C-Methylgruppen. Eine davon gehört dem 2-Desoxy-L-fucose-

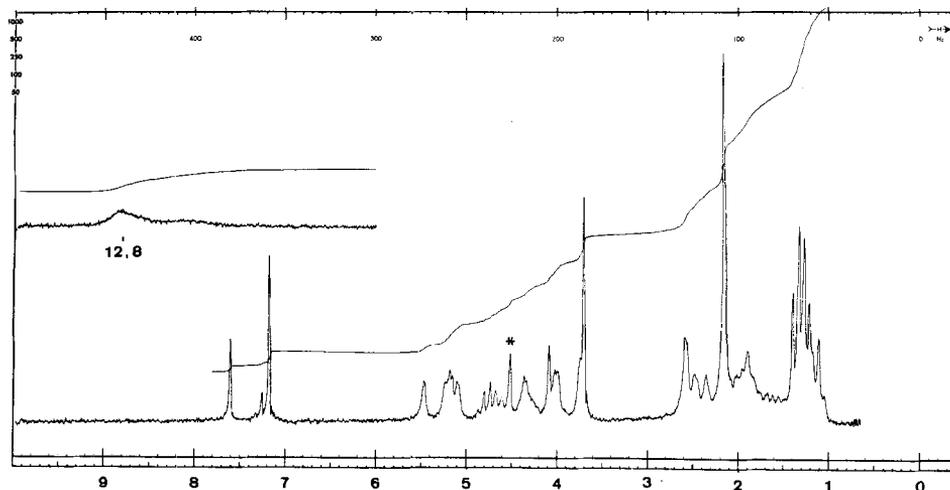


Fig. 3. NMR.-Spektrum von Cinerubin B in CDCl₃ (100 MHz). * = mit D₂O austauschbar

teil an, der neue Zucker ist also ebenfalls eine 6-Desoxyhexose mit einer CH₃-CH-Gruppe am Kettenende. Die benachbarten CH-Gruppen zeigen die entsprechenden Signale bei 3,70 bzw. 4,73 ppm. Das Quartett bei 3,70 ppm ($J = 6,5$ Hz) besitzt Signale, die durch eine zusätzliche Kopplung mit H-C(4) (J ca. 1 Hz) stark verbreitert sind, in Übereinstimmung mit den NMR.-Spektrern der 2-Desoxy-L-fucose und ihrer Derivate. Die starke chemische Verschiebung des Signals von H-C(5') (4,73 ppm) und vor allem die Schärfe des Quartetts bestätigen die Nachbarschaft zur Carbonylgruppe an C(4').

Die bisher nicht diskutierten Signale zwischen 3,85 und 4,15 ppm (Fig. 1) sind den H-Atomen an C(3) und C(4) des 2-Desoxy-L-fucoseteils, die beiden Multiplette bei ca. 1,9 und 2,4 ppm den Methylenprotonen an C(2) zuzuordnen und entsprechen weitgehend den Signalen der betreffenden Wasserstoffatome in einfachen Derivaten der 2-Desoxy-L-fucose. Damit resultiert für das C₁₂-Abbauprodukt die Partialformel XIV. Ihre beiden Teile A und B lassen sich auf 2 Arten zu einer vollständigen Konstitutionsformel zusammenschliessen. Über die beiden Möglichkeiten, die spektroskopisch im wesentlichen gleichwertig sind, kann auf Grund der diskutierten Eigenschaften nicht entschieden werden. Allerdings steht die Strukturformel IX derjenigen des Disaccharids aus Cinerubin A besonders nahe; sie leitet sich formell von ihr ab durch einen Ringschluss zwischen O-C(3) und C(2') und verdiente daher aus Analogiegründen den Vorzug. Sie wurde später bestätigt durch die unten beschriebene Röntgen-Strukturanalyse.

Die NMR.-Spektrern der Derivate X bis XIII des Disaccharids sowie des Reduktionsproduktes XV und dessen Acetylderivat XVI, die hier nicht im einzelnen diskutiert werden, stehen mit den angegebenen Strukturformeln im besten Einklang (vgl. den exp. Teil und Fig. 2).

3. Kristallstrukturanalyse des α -Methyl-3,2'-anhydro-4-(3'-desoxy- α -L-rhamnosyl)-2-desoxy-L-fucosids. – Mit den uns zur Verfügung stehenden geringen Mengen an Cinerubin B schien es kaum möglich, die letzten Einzelheiten der Struk-

tur – Verknüpfungsart der beiden Teile der Partialformel XIV und Stereochemie im Uloseteil – mit chemischen und spektroskopischen Mitteln abzuklären. Wir entschlossen uns deshalb zu einer Kristallstrukturanalyse. Die am besten ausgebildeten Kristalle gab von allen bisher beschriebenen Derivaten des Disaccharids das Reduktionsprodukt XV.

Kristalldaten: $C_{13}O_6H_{22}$, Molekulargewicht 274. Monoklin, $a = 10,67$, $b = 11,45$, $c = 12,29$ Å, $\beta = 108,7$, $U = 1421$ Å³, $D_m = 1,30$, $D_x = 1,28$ gcm⁻³, $Z = 4$, Raumgruppe $P2_1(C_2^2)$ mit zwei Molekeln in der asymmetrischen Einheit.

Intensitätsmessungen: Die Intensitäten von rund 2100 unabhängigen Reflexen bis $\sin \theta/\lambda = 0,55$ wurden auf einem computergesteuerten Vierkreisdiffraktometer (Y 290 der Firma *Hilger & Watts*) unter Verwendung von Mo K_α -Strahlung bestimmt. Es wurde die Differenzfiltertechnik mit Sr/Zr-Filtern und Integration über einen bestimmten ω -Bereich verwendet. Nach Korrektur für *Lorentz*-Polarisationseffekte blieben nur 804 Reflexe mit $F_o > 4 \cdot \sigma(F_o)$.

Strukturanalyse: Die mittels einer *Wilson*-Statistik berechneten *E*-Werte zeigten eine Verteilung, wie sie von einer zentrosymmetrischen Anordnung der Atome erwartet würde. Da die geordnete Struktur einer chiralen Verbindung nicht zentrosymmetrisch sein kann, wurde vermutet, dass das Ringgerüst des Disaccharids näherungsweise zentrosymmetrisch sei, was durch die Strukturbestimmung später bestätigt wurde. Die Aufklärung der Kristallstruktur erfolgte im wesentlichen mit Hilfe der sogenannten symbolischen Additionsmethode [9]. Dieses Verfahren führte zunächst nicht zum Erfolg. Die Phasenkombinationen mit der höchsten inneren Konsistenz führten zu unzuweckmässigen *Fourier*-Synthesen, in denen Teilstrukturen der beiden unabhängigen Molekeln der asymmetrischen Einheit ineinandergeschoben schienen. Die Interpretation der stärksten Maxima einer geschärften dreidimensionalen *Patterson*-Funktion als intra- und intermolekulare Translationsvektoren von Sechsringen in Sesselform deutete an, dass zwei Struktur-Semiinvarianten mit hohen *E*-Werten in diesen Kombinationen falsch bestimmt worden waren. Die Berücksichtigung dieser Tatsache führte zu neuen Phasenkombinationen, von denen diejenige mit der besten inneren Konsistenz eine *Fourier*-Synthese ergab, in der beide Ringgerüste, d.h. 28 der 38 Nichtwasserstoffatome, identifiziert werden konnten. Diese Partialstruktur wurde zur Bestimmung der Startphasen für eine weitere Verfeinerung mittels der Tangensformel [9] verwendet, worauf die restlichen 12 Nichtwasserstoffatomlagen bestimmt werden konnten.

Verfeinerung: Die Verfeinerung der Strukturparameter und der isotropen Temperaturfaktoren nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate senkte den *R*-Faktor innerhalb von 3 Zyklen von 0,28 auf 0,11. Da die Daten auf Grund gewisser Unzulänglichkeiten des Diffraktometers zur Zeit der Messung nicht die übliche Genauigkeit aufweisen, wurde auf die Verfeinerung mit anisotropen Temperaturfaktoren und auf die Einbeziehung von Wasserstoffatomen in das Strukturmodell verzichtet. Eine zur Kontrolle gerechnete abschliessende Differenzsynthese zeigte jedoch mehr als die Hälfte der Wasserstoffatome in erwarteten Lagen mit Elektronendichten zwischen 0,4–0,6 e/Å³.

Resultate: Koordinaten und isotrope Temperaturfaktoren aller Kohlenstoff- und Sauerstoff-Atome sind in Tab.1 zusammengestellt. Die geschätzten Standardab-

weichungen der Lageparameter, die durch Inversion der Normalgleichungsmatrix erhalten wurden, liegen zwischen 0,02 und 0,05 Å, was in einer relativ grossen Streuung der Bindungslängen, Bindungswinkel und Torsionswinkel zum Ausdruck kommt. Ihre Mittelwerte, die aus Fig. 4 ersichtlich sind, stehen aber in guter Übereinstimmung mit den in vergleichbaren Verbindungen beobachteten Grössen.

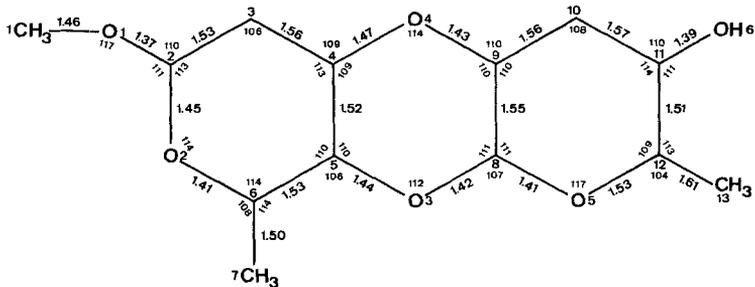
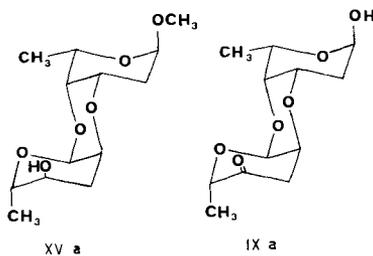


Fig. 4. Molekulare Geometrie. Die angegebenen Bindungslängen und Bindungswinkel sind gemittelte Werte der beiden unabhängigen Molekeln der asymmetrischen Einheit

Fig. 5 zeigt die ermittelte Konformation des Disaccharids, dessen Ringgerüst aus drei *cis*-verknüpften Sechseringen besteht, die alle in der Sesselform vorliegen, wobei die beiden äusseren Ringe in *trans*-Stellung zueinander sind, so dass eine zentrosymmetrische Anordnung der Ringatome entsteht.

Die an sich ungünstige Anordnung von O(4) und O(6) als 1,3-diaxiale Substituenten wird durch die Bildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke stabilisiert (O(4) ... O(6), 2,76 Å). Das Vorhandensein dieser intramolekularen Wasserstoffbrücke hat andererseits zur Folge, dass für die Packung der Molekeln im Kristall keine Wasserstoffbrücken mehr zur Verfügung stehen.

4. Die Struktur des Cinerubins B. – Entsprechend dem räumlichen Bau XV a des Reduktionsproduktes ergibt sich für das Anhydrosaccharid IX a die Stereoformel IX a. Für den bisher nicht in freier Form bekannten Zucker XVII, der dem Disaccharid zu Grunde liegt, schlagen wir in Analogie zur *Cinerulose A* den Namen *Cinerulose B* vor. Besonders interessant ist an der Struktur IX a, dass ihr – durch den tricyclischen Bau aufgezwungen – die in der Zuckerreihe ungewöhnliche Konformation mit axialer Methylgruppe C(6') zukommt, was andererseits die ungewöhnliche α -glykosidische Verknüpfung mit axialem Wasserstoffatom an C(1') zur Folge hat.



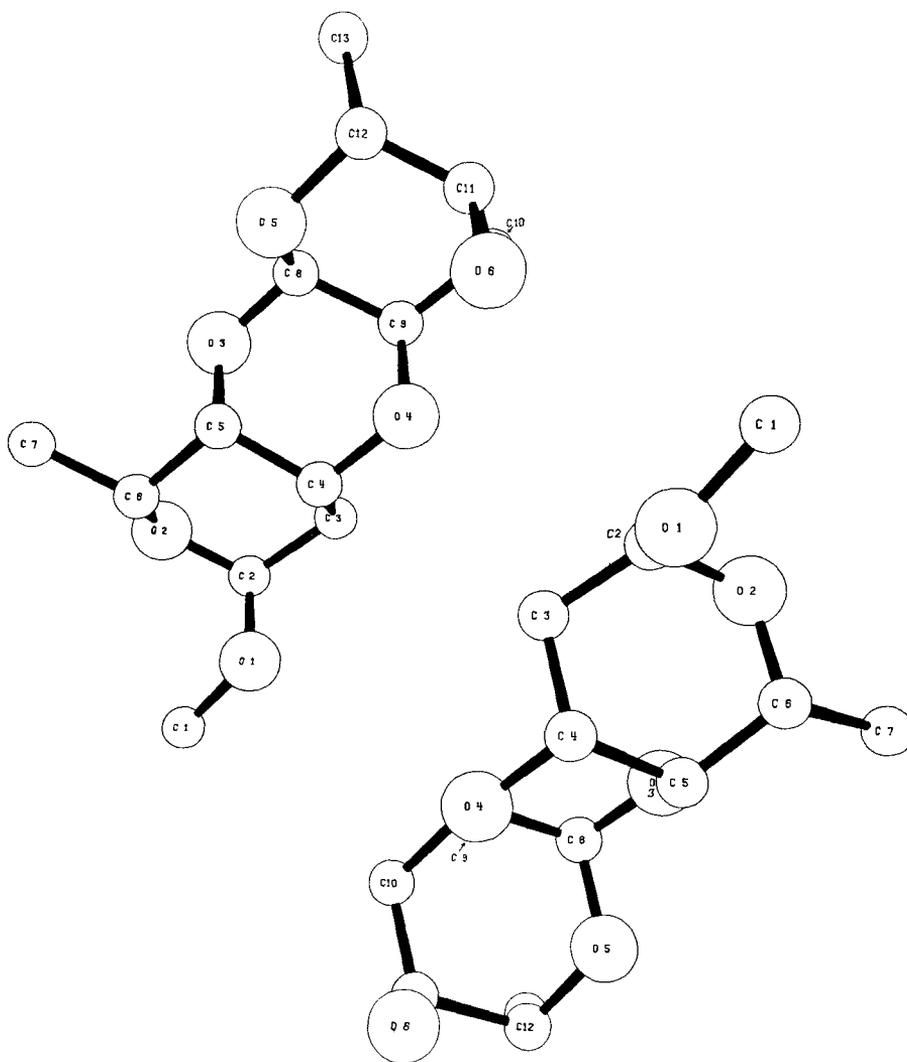
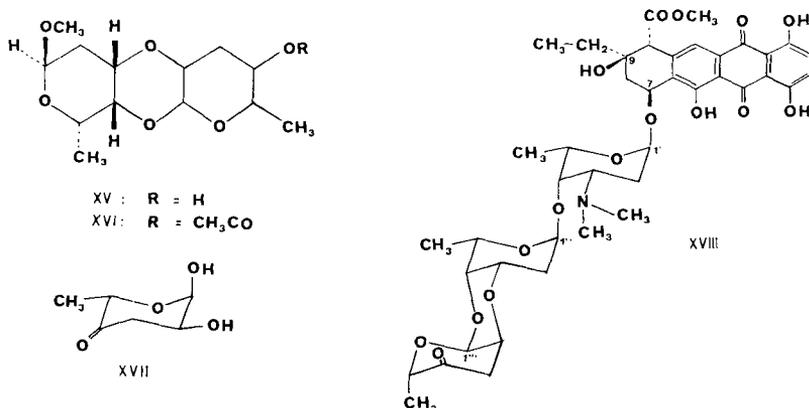


Fig. 5. *Perspektivische Ansicht der beiden Molekeln der asymmetrischen Einheit* [10]. Die Lage der Molekeln entspricht der Anordnung im Kristall. Kristallographische *b*-Achse horizontal, *c*-Achse vertikal, 20° um *b*-Achse im Uhrzeigersinn gedreht

In Analogie zum Cinerubin A ergibt sich aus der hydrolytischen Spaltung des Cinerubins B zum Pyromycin IV und zum Anhydrodisaccharid IX zwanglos die vollständige Strukturformel XVIII. Eine Bestätigung dafür, dass die drei Zuckerbausteine in einer Trisaccharidkette an die Stellung 7 des Aglykons gebunden sind, ergab sich aus der hydrogenolytischen Spaltung von Cinerubin B zu ζ -Pyromycinon (III) und einem Trisaccharid mittels Palladium [vgl. 2]. Das Trisaccharid wurde allerdings nicht in kristalliner Form erhalten, sondern als Gemisch der beiden anomeren Acetylderivate XIX und XX charakterisiert.

Tabelle 1. Koordinaten und isotrope Temperaturfaktoren. In Klammern sind die geschätzten Standardabweichungen ($\times 10^4$) angegeben.

	Molekel 1			Molekel 2			B[Å ²]	x	y	z	B[Å ²]	x	y	z	B[Å ²]
	x	y	z	x	y	z									
O(1)	0,0307 (23)	-0,1650 (30)	-0,0948 (18)	5,3	0,5305 (22)	0,2658 (28)	5,0	0,5305 (22)	0,2658 (28)	0,0532 (17)	5,0	0,5305 (22)	0,2658 (28)	0,0532 (17)	5,0
O(2)	0,0640 (21)	-0,2810 (28)	0,0637 (17)	3,7	0,3339 (22)	0,3777 (29)	5,3	0,3339 (22)	0,3777 (29)	0,0008 (18)	5,3	0,3339 (22)	0,3777 (29)	0,0008 (18)	5,3
O(3)	0,2535 (21)	-0,2038 (28)	0,2799 (18)	4,0	0,1359 (19)	0,3118 (28)	3,9	0,1359 (19)	0,3118 (28)	-0,2146 (16)	3,9	0,1359 (19)	0,3118 (28)	-0,2146 (16)	3,9
O(4)	0,2946 (21)	0,0160 (30)	0,1893 (18)	5,0	0,2520 (21)	0,0989 (30)	4,2	0,2520 (21)	0,0989 (30)	-0,2317 (17)	4,2	0,2520 (21)	0,0989 (30)	-0,2317 (17)	4,2
O(5)	0,4574 (23)	-0,1330 (32)	0,3798 (19)	5,8	0,0705 (22)	0,2517 (32)	5,2	0,0705 (22)	0,2517 (32)	-0,4002 (18)	5,2	0,0705 (22)	0,2517 (32)	-0,4002 (18)	5,2
O(6)	0,5477 (22)	0,0913 (31)	0,3066 (19)	8,9	0,1804 (21)	0,0283 (29)	6,1	0,1804 (21)	0,0283 (29)	-0,4575 (18)	6,1	0,1804 (21)	0,0283 (29)	-0,4575 (18)	6,1
C(1)	-0,0413 (38)	-0,2487 (42)	-0,1810 (31)	7,5	0,6177 (31)	0,3381 (37)	5,5	0,6177 (31)	0,3381 (37)	0,1446 (26)	5,5	0,6177 (31)	0,3381 (37)	0,1446 (26)	5,5
C(2)	0,0123 (28)	-0,1735 (37)	0,0109 (24)	3,2	0,4002 (30)	0,2649 (35)	3,7	0,4002 (30)	0,2649 (35)	0,0435 (25)	3,7	0,4002 (30)	0,2649 (35)	0,0435 (25)	3,7
C(3)	0,0738 (30)	-0,0659 (36)	0,0851 (24)	4,4	0,3324 (31)	0,1625 (34)	3,4	0,3324 (31)	0,1625 (34)	-0,0309 (26)	3,4	0,3324 (31)	0,1625 (34)	-0,0309 (26)	3,4
C(4)	0,2308 (30)	-0,0806 (37)	0,1132 (24)	2,5	0,3296 (34)	0,1883 (39)	3,6	0,3296 (34)	0,1883 (39)	-0,1522 (28)	3,6	0,3296 (34)	0,1883 (39)	-0,1522 (28)	3,6
C(5)	0,2767 (32)	-0,1954 (39)	0,1740 (27)	3,9	0,2781 (29)	0,3082 (36)	3,5	0,2781 (29)	0,3082 (36)	-0,1996 (25)	3,5	0,2781 (29)	0,3082 (36)	-0,1996 (25)	3,5
C(6)	0,1985 (26)	-0,2929 (32)	0,0958 (22)	2,4	0,3357 (31)	0,4057 (37)	3,4	0,3357 (31)	0,4057 (37)	-0,1137 (25)	3,4	0,3357 (31)	0,4057 (37)	-0,1137 (25)	3,4
C(7)	0,2375 (32)	-0,4114 (37)	0,1516 (26)	3,9	0,2804 (31)	0,5246 (39)	4,7	0,2804 (31)	0,5246 (39)	-0,1421 (26)	4,7	0,2804 (31)	0,5246 (39)	-0,1421 (26)	4,7
C(8)	0,3245 (29)	-0,1133 (36)	0,3547 (24)	3,2	0,0595 (29)	0,2278 (33)	3,9	0,0595 (29)	0,2278 (33)	-0,2877 (24)	3,9	0,0595 (29)	0,2278 (33)	-0,2877 (24)	3,9
C(9)	0,2831 (32)	0,0075 (37)	0,3044 (26)	3,7	0,1165 (35)	0,1029 (40)	3,7	0,1165 (35)	0,1029 (40)	-0,2459 (28)	3,7	0,1165 (35)	0,1029 (40)	-0,2459 (28)	3,7
C(10)	0,3580 (33)	0,1081 (37)	0,3779 (26)	3,8	0,0365 (34)	0,0137 (41)	4,4	0,0365 (34)	0,0137 (41)	-0,3430 (28)	4,4	0,0365 (34)	0,0137 (41)	-0,3430 (28)	4,4
C(11)	0,5131 (33)	0,0739 (37)	0,4091 (27)	5,3	0,0551 (32)	0,0424 (37)	4,7	0,0551 (32)	0,0424 (37)	-0,4573 (27)	4,7	0,0551 (32)	0,0424 (37)	-0,4573 (27)	4,7
C(12)	0,5506 (40)	-0,0383 (44)	0,4567 (33)	7,4	0,0051 (42)	0,1719 (42)	5,5	0,0051 (42)	0,1719 (42)	-0,4972 (35)	5,5	0,0051 (42)	0,1719 (42)	-0,4972 (35)	5,5
C(13)	0,5305 (39)	-0,0618 (43)	0,5806 (32)	7,6	-0,1496 (39)	0,1842 (42)	5,9	-0,1496 (39)	0,1842 (42)	-0,5208 (32)	5,9	-0,1496 (39)	0,1842 (42)	-0,5208 (32)	5,9



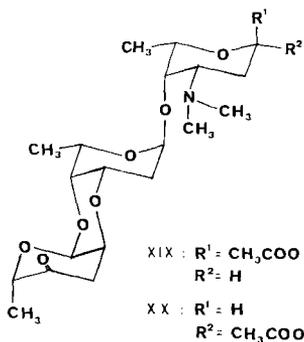
Gemäss dem Abbau muss für das Cinerubin B eine abweichende Strukturformel mit geöffnetem Dioxanring und freien Hydroxylgruppen an C(3'') und C(2'') ebenfalls in Betracht gezogen werden, denn die Möglichkeit eines Ringschlusses während der Solvolyse-Reaktionen über einen *Michael*-ähnlichen Mechanismus lässt sich nicht a priori ausschliessen. Je nachdem ergibt sich für das Cinerubin B eine Bruttoformel C₄₂H₅₁NO₁₆ (Ber. C61,08, H6,23, N1,70%) oder C₄₂H₅₃NO₁₇ (Ber. C59,77, H6,33, N1,66%). Die meisten der früher durchgeführten [2] und mehrerer neuer Analysen lagen näher bei den zweiten Werten, doch konnten nach besonders scharfem Trocknen auch einzelne Analysenergebnisse erhalten werden, die der Formel C₄₂H₅₁NO₁₆ nahe-kamen. Bei der Beurteilung dieser Befunde ist zu berücksichtigen, dass die Mikro-analysen bei beiden Cinerubinen schlecht reproduzierbar waren. Die Kristalle halten hartnäckig Lösungsmittel zurück, was das Bild verfälschen kann. Die Elementar-analysen sind daher ein ungeeignetes Mittel für die Ableitung einer exakten Bruttoformel. Ein Entscheid zwischen den beiden Möglichkeiten musste daher auf indirektem Wege gesucht werden:

1. Sowohl bei der *Craig*-Verteilung wie auch bei der Papier- und Dünnschicht-chromatographie [3] erwies sich das Cinerubin B als weniger polar als das Cinerubin A. Da Letzteres neben den drei phenolischen zwei alkoholische Hydroxylgruppen besitzt, ist demnach für das Cinerubin B der Struktur XVIII mit einer einzigen alkoholischen Hydroxylgruppe an C(9) des Aglykons der Vorzug zu geben.

2. Das Trisaccharid, das bei der Hydrogenolyse des Cinerubins B entsteht, gibt mit Essigsäureanhydrid ein Gemisch von zwei Monoacetaten (XIX und XX), während für ein Produkt mit geöffnetem Dioxanring ein Triacetat zu erwarten wäre. Die Acetylierung des Cinerubins B selber verlief dagegen uneinheitlich. Ein reines Produkt konnte nicht isoliert werden.

3. Den überzeugendsten Beweis für die Struktur XVIII lieferte das NMR.-Spektrum des Cinerubins B mit Deuteriumaustausch (Fig. 3). Nach dem Behandeln der Probelösung mit Deuteriumoxid verschwand ausser dem Signal der phenolischen Hydroxylgruppen (δ 12,8 ppm) einzig das Singulett bei δ 4,5 ppm (*), dessen Integral *einem* Proton entspricht, und das der tertiären Hydroxylgruppe an C(9) des Aglykons zugeordnet werden muss. Die übrigen Gebiete des Spektrums werden nicht verändert,

so dass im Zuckerteil der Molekel keine freien alkoholischen Gruppen vorliegen können.



Das NMR.-Spektrum (Fig. 3) bringt auch den Beweis für die α -glykosidische Verknüpfung des 2-Desoxy-L-fucoseteils mit dem Rhodosamin. Durch Vergleich mit einfachen Abbauprodukten kann das Signal bei δ 5,50 ppm dem Proton an C(1') des Rhodosaminrestes zugeordnet werden. Für das Wasserstoffatom H-C(7) des Aglykons und die Protonen an C(1'') und C(1''') der beiden neutralen Zucker steht die Signalgruppe bei 5,1 bis 5,35 ppm mit drei Schwerpunkten bei 5,28, 5,20 und 5,15 ppm, die bei starker Dehnung des Spektrums gut zu erkennen sind. In dieser Signalgruppe kommen nur Kopplungskonstanten mit weniger als ca. 3 Hz vor. Ein β -2-Desoxy-L-fucosid mit einer diaxialen Anordnung von H-C(1'') und H_a-C(2'') müsste dagegen in diesem Bereich eine Kopplungskonstante von mindestens 7 Hz zeigen.

Nachdem die Cinerulose A kürzlich auch als Baustein eines Makrolid-Antibiotiums nachgewiesen worden ist [11], ist das Cinerubin B das dritte Antibioticum, das eine 4-Ulose enthält. Auf die Bedeutung der Entdeckung dieser Ketone der Zuckerreihe für das Verständnis biosynthetischer Zusammenhänge in der Gruppe der Zucker aus Actinomyceten-Antibiotica ist bereits früher hingewiesen worden [2].

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Die IR.-Spektrn wurden auf einem *Perkin-Elmer*-Spektrometer, Modell 125, die Massenspektren auf einem *Hitachi-Perkin-Elmer*-Spektrometer, Modell RMU-6 D, und die NMR.-Spektrn mit *Varian*-Spektrometern, Modell A60 bzw. HA-100 aufgenommen. Chemische Verschiebungen sind in δ -Einheiten gegenüber Tetramethylsilan als interner Referenz angegeben. Es bedeuten: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quadrupelett, *k* = komplex aufgespaltene Signalgruppe, *b* = breites, nicht aufgelöstes Signal. Die Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Optische Drehungen wurden im 1-dm-Rohr mit einem lichtelektrischen *Zeiss*-Polarimeter bestimmt. Für die Dünnschichtchromatographie verwendeten wir Kieselgel-Fertigplatten F₂₅₄ der Firma *Merck*, Darmstadt. Die Flecke wurden im allgemeinen durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure und Erhitzen auf 100° sichtbar gemacht. Für freie Zucker verwendeten wir Anilin-hydrogenphthalat als Sprühreagens. Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel *Merck*, 0,05–0,2 mm, verwendet.

Hydrolyse von Cinerubin B. – 1,5 g Cinerubin B wurden mit 150 ml 0,1N wässriger Salzsäure 1 Std. auf 95° erwärmt. Das ausgefallene Aglykon, 730 mg rotes Pulver, wurde über Calciumchlorid getrocknet, eine Probe davon an Kieselgel chromatographiert und aus Benzol umkristallisiert. Die roten Nadelchen, Smp. 212–214°, wurden durch den Misch-Smp., das IR.-Spektrum und durch Dünnschichtchromatographie als ϵ -Pyrrromycinon [3] [5] identifiziert.

2-Desoxy-L-fucose. Das Filtrat des Hydrolyseproduktes wurde mit Aktivkohle entfärbt, mit Silbercarbonat neutralisiert und durch eine Säule aus Dowex W 50 X 2 (H-Form) filtriert. Das Filtrat wurde erneut mit Silbercarbonat neutralisiert und im Vakuum eingedampft. Der bräunliche Rückstand wurde mit Essigsäureanhydrid und Pyridin über Nacht bei 20° acetyliert. Der Eindampfrückstand gab bei der Chromatographie an Kieselgel neben 120 mg Mischfraktion 80 mg reines *2-Desoxy- α -L-fucose-triacetat* (VII) und 50 mg reines *2-Desoxy- β -L-fucose-triacetat*. Die beiden Produkte wurden durch die Rf-Werte und die NMR.-Spektren mit den aus Cinerubin A erhaltenen Präparaten identifiziert [2]: α -Anomeres Smp. 109–110°, $[\alpha]_D = -137^\circ$ ($c = 1,0\%$ in Chloroform). β -Anomeres Smp. 67–70°, $[\alpha]_D = -39^\circ$ ($c = 0,46\%$ in Chloroform).

L-Rhodosamin-hydrochlorid. Anschliessend wurde die Ionenaustauschersäure mit 50 ml 2N Salzsäure eluiert, das Eluat mit Dowex 3 auf pH 6 gebracht und im Vakuum eingedampft. Aus abs. Alkohol und Aceton kristallisierten über Nacht 250 mg farblose Prismen mit Smp. 152–153°, $[\alpha]_D = -44,5^\circ$ ($c = 1\%$ in Wasser) aus, die durch das IR.-Spektrum mit Rhodosamin-hydrochlorid identifiziert wurden [2].

Partialabbau von Cinerubin B. – a) *Hydrolyse*. 1,8 g Cinerubin B wurden mit 300 ml Aceton und 0,6 ml konz. Salzsäure bei Zimmertemperatur stehengelassen. Gemäss Dünnschichtchromatographie war nach einer Std. kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden. Die Reaktionslösung wurde mit Silbercarbonat neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde über 34 Stufen im System Äthylacetat/Wasser im Gegenstromverfahren nach *Craig* verteilt.

Pyrromycin (IV). Die oberen Phasen der Stufen 26–34 wurden mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Nach mehrmaligem Ausziehen mit Benzol wurde der Rückstand aus Aceton umgelöst. Gemäss Rf-Wert und NMR.-Spektrum handelte es sich um Pyrromycin [2].

Anhydrodisaccharid (IX). Die Fraktionen 10–25 der *Craig*-Verteilung gaben nach dem Eindampfen und Umkristallisieren aus Aceton 250 mg farblose Kristalle, Smp. 175–178°. Gemäss NMR.-Spektrum ist in der CDCl_3 -Lösung die α -Form XI stark vorherrschend.

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6$ Ber. C 55,80 H 7,04% M.-G. 258 Gef. C 55,37 H 6,98% $M + 258$

Acetylderivate. Das mit Essigsäureanhydrid und Pyridin bei Zimmertemperatur bereitete Gemisch der Acetate X und XII wurde mit Benzol/Aceton 9:1 an Kieselgel chromatographiert. Neben 67 mg Mischfraktion wurden 69 mg reines β -Acetat X und 73 mg α -Acetat XII erhalten.

α -Anomeres: Nach Umkristallisation aus Aceton-Äther farblose Kristalle, Smp. 120–125°. NMR.-Spektrum in CDCl_3 (60 MHz): δ 1,31 ppm (d , $J = 6,5$); 1,35 ppm (d , $J = 6,5$), zusammen 6 H; 1,5–2,5 ppm (k , 2 H); 2,07 ppm (s , 6 H); 2,60 ppm (d , $J = 3,5$, 2 H); 3,9–4,5 ppm (k , ca. 4 H); 4,70 ppm (q , $J = 6,5$, 1 H); 5,20 ppm (d , $J = 3$, 1 H); 6,3 ppm (dd , $J = 3,5$ und ca. 1, 1 H).

β -Anomeres: Smp. 188–190°, $[\alpha]_D = -128^\circ$ ($c = 0,6\%$ in Chlf.). NMR.-Spektrum in CDCl_3 (100 MHz): Fig. 1.

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_7$ Ber. C 55,99 H 6,71% Gef. C 56,34 H 6,61%

b) *Methanolyse*. 660 mg Cinerubin B in 90 ml Aceton wurden mit 2 ml 2N methanolischer Salzsäure bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 90 Min. war gemäss Dünnschichtchromatographie kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden. Es wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert, der Filtrückstand mit Methanol gewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum eingedampft. Nach mehrmaligem Ausziehen mit Äther blieb ein roter amorpher Rückstand, der gemäss Dünnschichtchromatographie vorwiegend aus Pyrromycin bestand.

Der Ätherextrakt (245 mg) wurde an Kieselgel chromatographiert (Cyclohexan/Aceton 85:15) und gab neben 90 mg reiner Fraktion 125 mg farblose Kristalle des Methylglykosids XIII, Smp. 129–130°. $[\alpha]_D = -196^\circ$ ($c = 0,46\%$ in Chlf.). IR.-Spektrum in CCl_4 : ν_{max} 1730 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in CDCl_3 : Fig. 2.

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_6$ Ber. C 57,34 H 7,40% Gef. C 57,30 H 7,46%

Reduziertes Disaccharid-methylglykosid (XY). 200 mg des Disaccharid-methylglykosids XIII in 20 ml abs. Äther und 200 mg Lithiumaluminiumhydrid in 20 ml Äther wurden 2,5 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Nach der Zugabe von wasserhaltigem Äther und einigen Tropfen Wasser wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Die mit Cyclohexan/Aceton 4:1 aus Kieselgel eluierten einheitlichen Fraktionen gaben aus Aceton/Cyclohexan 120 mg farblose

Kristalle, Smp. 133–135°. IR.-Spektrum in CCl_4 : $\nu_{(\text{OH})}$ 3500 cm^{-1} , keine Absorption in der Gegend von 1700 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in C_6D_6 : δ 0,80 ppm (*d*, $J = 7$, 3 H); 1,28 ppm (*d*, $J = 6$, 3 H); 1,4–1,9 ppm (*k*, 3 H); 2,30 ppm (*dt*, $J_t = 11,5$; $J_d = 4$; 1 H); 3,02 ppm (*s*, 3 H); 3,2 ppm (*b*, 1 H); 3,47 ppm (*b*, 1 H); 3,60 ppm (*q*, $J = 7$, 1 H); 3,8–4,2 ppm (*k*, 3 H); 4,34 ppm (*q*, $J = 6$, 1 H); 4,70 ppm (*b*, 2 H).

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_6$ Ber. C 56,92 H 8,08% M.-G. 274 Gcf. C 56,93 H 8,06% $M^+ 274$

Das mit Essigsäureanhydrid und Pyridin bei Zimmertemperatur bereitete Acetylderivat destillierte bei 85° (0,01 Torr) als farbloses Öl. NMR.-Spektrum in CDCl_3 : δ 1,34 ppm (*d*, $J = 6,5$, 6 H); 1,6–2,7 ppm (*k*, 4 H); 2,12 ppm (*s*, 3 H); 3,38 ppm (*s*, 3 H); 3,8–4,7 ppm (*k*, 6 H); 4,8–5,1 ppm (*k*, 2 H).

Hydrogenolyse von Cinerubin B. – 130 mg Cinerubin B wurden in 20 ml abs. Benzol und 10 ml abs. Alkohol mit 180 mg Palladium auf Bariumsulfat (10-proz.) während einer Std. hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingedampft. Der in 20 ml Benzol gelöste Rückstand wurde zehnmal mit Wasser ausgeschüttelt. Die rote Benzollösung hinterliess beim Eindampfen ein rotes Pulver, das nach chromatographischer Reinigung aus Aceton 50 mg rote Kristalle, Smp. 213–215°, gab. Sie waren nach Dünnschichtchromatographie und IR.-Spektrum identisch mit ζ -*Pyrrromycinon* [2].

Die wässrige Lösung wurde mehrmals mit Chloroform ausgezogen und der Extrakt mit Natriumsulfat getrocknet. Der bräunliche Rückstand war gemäss Dünnschichtchromatographie nahezu einheitlich. Er wurde in üblicher Weise acetyliert. Nach der Reinigung an Kieselgel wurden 30 mg Hauptfraktion erhalten, die gemäss Dünnschichtchromatogramm einheitlich schien. Das farblose zähe Öl erwies sich aber gemäss NMR.-Spektrum als Gemisch der beiden Anomeren Acetate XIX und XX: δ 1,0–1,3 ppm (*k*, 9 H); 1,98 und 2,02 ppm (2 *s*, je ca. 1,5 H), 2,22 ppm (*s*, 6 H; 2 N— CH_3), 2,40 ppm (*d*, $J = 3$, 2 H in α zu C=O), 5,42 ppm (*dd*, J ca. 9 und 3; ca. 0,5 H; H—C(1) des β -Anomeren); 6,05 ppm (*bs*, ca. 0,5 H; H—C—1 des α -Anomeren). Dazu komplexe Signalgruppen zwischen 1,5 und 2,5 ppm (ca. 4 H) und 3,3 und 5,0 ppm (ca. 10 H).

Die Mikroanalysen wurden in unserem analytischen Laboratorium (Leitung *W. Manser*) ausgeführt. Die NMR.- und Massenspektren verdanken wir unserer Abteilung für Instrumentalanalyse (Leitung Prof. Dr. *W. Simon* und Dr. *J. Seibl*).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 103. Mitteilung: *R. Muntwyler & W. Keller-Schierlein*, *Helv.* 55, 460 (1972).
- [2] *W. Keller-Schierlein & W. Rickle*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1970, 68.
- [3] *L. Ettliger, E. Gäumann, R. Hütter, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer, L. Neipp, V. Prelog, P. Reusser & H. Zähler*, *Chem. Ber.* 92, 1867 (1959).
- [4] *R. Corbaz, L. Ettliger, W. Keller-Schierlein & H. Zähler*, *Arch. Mikrobiologie* 25, 325 (1957).
- [5] *H. Brockmann*, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* (Ed. L. Zechmeister) 21, 121 (1963); *H. Brockmann, H. Brockmann, Jr. & J. Niemeyer*, *Tetrahedron Letters* 1968, 4719; *H. Brockmann, Jr., H. Budzikiewicz, C. Djerassi, H. Brockmann & J. Niemeyer*, *Chem. Ber.* 98, 1260 (1965); *H. Brockmann, Jr. & M. Legrand*, *Tetrahedron* 19, 395 (1963).
- [6] *Z. Horii, T. Momose & Y. Tamura*, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 13, 797 (1965).
- [7] *E. L. Albano & D. Horton*, *Carbohydrate Research* 11, 485 (1969).
- [8] *G. Roncari & W. Keller-Schierlein*, *Helv.* 49, 705 (1966).
- [9] *J. Karle & I. L. Karle*, *Acta crystallogr.* 21, 849 (1966).
- [10] *C. K. Johnson*, ORTEP, A Fortran Thermal-Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations. Oak Ridge National Laboratory (1965).
- [11] *T. Suzuki*, *Bull. chem. Soc. Japan* 43, 292 (1970).