

179. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

216. Mitteilung¹⁾

Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese von Ferrioxamin H

von Srinivas Adapa, Peter Huber und Walter Keller-Schierlein

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, CH-8092 Zürich

Herrn Prof. Dr. Oskar Jeger zum 65. Geburtstag gewidmet

(4. VI. 82)

Metabolites of Microorganisms. 216.
Isolation, Structure and Synthesis of Ferrioxamine H

Summary

The structure of ferrioxamine H, a minor component of the sideramine complex of actinomycetes, was determined by spectroscopic investigations, degradation and synthesis. Ferrioxamine H is the Fe (III)-complex of 11,22-dihydroxy-4, 12, 15, 23-tetraoxo-5, 11, 16, 22-tetraazatetracosanoic acid (2).

Im Jahre 1960 wurde die Struktur des Ferrioxamins B, der Hauptkomponente des Sideramingemischs aus Actinomyceten [2] und manchen Bakterien [3] aufgeklärt [4] und bald darauf durch eine Synthese bestätigt [5]. Die Strukturaufklärungen mehrerer Nebenkomponten (Ferrioxamine A₁, A₂, D₁, D₂, E und G) wurden in rascher Folge anfangs der 60er Jahre mitgeteilt (vgl. [6]). Die Strukturen der Ferrioxamine C und F blieben wegen ihrer geringen Menge bis heute unaufgeklärt, und weitere Ferrioxamin-Nebenkomponten liessen sich mit den damaligen Methoden nicht rein gewinnen.

In einer Nebenfraktion, die bei der Gewinnung grösserer Mengen Ferrioxamin B durch *Craig*-Verteilung erhalten wurde und etwa der früher beschriebenen «Sammelfraktion IV» [2] entsprach, fiel bei der Dünnschichtchromatographie ein Fleck durch seine viel ausgeprägtere Rotfärbung auf (die bekannten Ferrioxamine geben gelb-orange Flecke). Der entsprechende Eisenkomplex konnte nun durch Chromatographie an *Sephadex LH-20* rein abgetrennt werden. Das neue Sideramin, das Ferrioxamin H, wurde unmittelbar nach dem Ferrioxamin B eluiert (von dem noch Reste in dieser Fraktion enthalten waren), was auf ein etwas kleineres Molekulargewicht hindeutet. Das als rot-braunes amorphes Pulver erhaltene Produkt zeigt im

¹⁾ 215. Mitt. s. [1].

sichtbaren Spektrum (in Wasser) ein Maximum bei 455 nm, während für die bekannten Ferrioxamine Werte von 425–430 nm gefunden wurden. Die Mikroanalysen des amorphen Ferrioxamins H waren schlecht reproduzierbar und wiesen auf einen wechselnden und nicht stöchiometrischen Gehalt an Wasser hin. Aus einer Eisen-Bestimmung lässt sich ein ungefähres Molekulargewicht von 505 berechnen. (Mol.-Gewicht für Ferrioxamin B-hydrochlorid: 650).

Ferrioxamin H besitzt keine basischen Eigenschaften, sondern wandert bei der Papierelektrophorese in alkalischem Puffer (*Tabelle*) zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist etwas grösser als die des zum Vergleich hergestellten *N*-Succinylferrioxamins B (Eisenkomplex von **1**).

Dass im Ferrioxamin H eine Carboxylgruppe vorhanden ist, ergibt sich aus einer IR.-Absorptionsbande bei 1725 cm^{-1} (Eisenkomplex von **1**: 1725 cm^{-1}), die wesentlich schwächer ist als die für Ferrioxamine typischen Banden bei 1645 und 1570 cm^{-1} (Amid und Hydroxamsäure).

Der eisenfreie Ligand, Desferri-ferrioxamin H, konnte in üblicher Weise durch Behandeln mit 8-Hydroxychinolin hergestellt werden. Die farblose kristalline Verbindung mit IR.-Banden bei 1720 (COOH), 1620 und 1565 cm^{-1} gleicht in ihren spektroskopischen Eigenschaften in mancher Hinsicht dem Desferri-ferrioxamin-B-hydrochlorid. Wie bei diesem liegt ein in einer Hydroxamsäuregruppe gebundener Acetylrest vor, der sich durch ein Singulett (3 H) bei 1,97 ppm im $^1\text{H-NMR}$.-Spektrum (300 MHz. in D_6 -DMSO, s. *Fig. 2*) und ein Signal bei 20,3 ppm im $^{13}\text{C-NMR}$.-Spektrum zu erkennen gibt²⁾. Das $^1\text{H-NMR}$.-Spektrum zeigt im Bereich von 1,1 bis 1,7 ppm 3 Multiplette für die Methylenprotonen an C(2), C(3) und C(4) von 5-Hydroxyaminopentylaminresten. Das Aufspaltungsmuster gleicht weitgehend dem der entsprechenden Signale im Desferri-ferrioxamin B-Hydrochlorid. Das Signal bei 3,0 ppm entspricht CH_2 -Gruppen neben Amid-N-Atomen, dasjenige bei 3,4 ppm CH_2 -Gruppen neben Hydroxamsäure-N-Atomen³⁾. Der Bereich von 2,2–2,7 ppm entspricht den CH_2 -Gruppen von zwei verschiedenartig gebundenen Bernsteinsäureresten, nämlich zwei Methylengruppen in α -Stellung zu Amidcarbonyl-Gruppen (2,3 ppm) und je einer Methylengruppe in α -Stellung zu einer Hydroxamsäuregruppe (2,45 ppm) und einer freien Carboxylgruppe (2,6 ppm). Zu erwähnen sind ferner die Signale von zwei amidischen Protonen bei 7,8 ppm und ein breites flaches Signal von Hydroxamsäure-OH-Protonen bei 8–11 ppm. Die Integralkurven, die an einem in D_2O aufgenommenen Spektrum besser zu beurteilen waren, sprechen für das Vorliegen von zwei Bernsteinsäureresten und zwei 5-Hydroxyaminopentylaminresten in bezug auf eine Acetylgruppe. Für das Vorhandensein von andersartigen Bausteinen ergaben sich weder aus dem $^1\text{H-NMR}$.- noch aus dem $^{13}\text{C-NMR}$.-Spektrum Anhaltspunkte. Das letztere zeigt bei 174,1 ppm das Signal einer freien Carboxylgruppe und bei 170 bis 172 ppm 4 Signale von Amid- und Hydroxamsäure-C-Atomen. Im Bereich

2) Amidartig gebundene Acetylgruppen wie z.B. im Desferri-ferrioxamin D_1 geben dagegen ein Signal bei 22,5 ppm (D_6 -DMSO).

3) Die genaue Zuordnung erfolgte anhand eines Vergleichs mit den Spektren bekannter Ferrioxamine sowie einfacher Modellverbindungen, die z.T. synthetisch, z.T. durch Abbau bekannter Ferrioxamine gewonnen wurden. Einzelheiten s. [7].

Ammoniak behandelt (vgl. z. B. [8]) und das Produkt (2) durch Chromatographie an Cellulosepulver und *Sephadex G-10* und durch Umkristallisieren gereinigt. Es entsprach in seinem chromatographischen Verhalten und in den Spektren dem Desferri-ferrioxamin H und gab mit Eisen (III)-chlorid einen rot-braunen Komplex, der durch DC. und die UV.- und IR.-Spektren nicht von natürlichem Ferrioxamin H zu unterscheiden war.

Aufgrund des Eisengehalts von Ferrioxamin H bildet der Ligand mit Eisen (III)-ionen, wie die bekannten Ferrioxamine, einen Komplex im Verhältnis 1:1, obwohl hier nur zwei Hydroxamsäuregruppen vorhanden sind. Die fünfte und sechste Ligandstelle wird möglicherweise durch die Carboxylgruppe und Wasser oder durch 2 Molekeln Wasser besetzt. Durch die gegenüber Ferrioxamin B und andern Eisen-trihydroxamaten veränderten Komplexierungsverhältnisse ist wohl auch die veränderte Lage der Absorptionsbande im Sichtbaren zu erklären.

Das reine synthetische Ferrioxamin H zeigte im Kreuztest mit gram-positiven Bakterien [9] einen deutlichen Antagonismus zu Ferrimycin A₁ und Albomycin δ₂, der allerdings um das ca. 500-fache geringer war als der von Ferrioxamin-B-Hydrochlorid. Das natürliche Ferrioxamin-H-Präparat war dagegen nur ca. 70-mal weniger aktiv als Ferrioxamin-B-Hydrochlorid, was durch eine geringe Kontamination mit Ferrioxamin B erklärbar ist, die im DC. bei genügender Konzentration, gerade noch erkannt werden kann. Das synthetische *N*-Succinylferrioxamin B (Fe-Komplex von 1) zeigt dagegen etwa 10% der Wirkung von Ferrioxamin-B-Hydrochlorid⁴).

Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [10]. Ergänzend: Die ¹H-NMR.-Spektren bei 300 MHz wurden auf einem Bruker WM-300-Spektrographen, die ¹³C-NMR.-Spektren auf einem Varian XL-100-Gerät bei 25,2 MHz aufgenommen. Als interner Standard diente Dioxan (¹³C-NMR.) oder Natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (¹H-NMR. in D₂O).

Isolierung von Ferrioxamin H. Als Ausgangsmaterial diente eine vor ca. 20 Jahren bei der Isolierung grösserer Mengen Ferrioxamin B durch Gegenstromverteilung angefallene Nebenfraktion, die etwa der früher beschriebenen «Sammelfraktion IV» entsprach [2]. Gemäss DC. enthielt sie noch Reste von Ferrioxamin B, wenig Ferrioxamin C und zur Hauptsache einen früher nicht näher untersuchten Eisenkomplex, Ferrioxamin H, der auf den DC.-Platten durch einen im Vergleich zu den übrigen Ferrioxaminen stärkeren Rotschich auffiel. Eine Probe von 2 g dieser Fraktion wurde mit Methanol an *Sephadex LH-20* (3 × 57 cm) chromatographiert. Die nach DC. einheitlichen Fraktionen gaben durch Eindampfen i.V. und Trocknen bei 0,01 Torr 571 mg eines roten amorphen Pulvers. Papierelektrophorese s. Tabelle. – UV./VIS. (Wasser): 455 (ε 2206). – IR. (KBr): s. Figur 1.

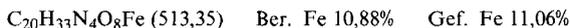


Tabelle. Papierelektrophorese. Rel. Wanderungsgeschwindigkeiten im Vergleich zu bekannten sauren Sidochromen.

	pH 3,6	pH 8	pH 10
Ferrioxamin H	1	1	1
<i>N</i> -Succinyl-ferrioxamin B	1	0,57	0,53
Ferrichrom A	1	1,15	1,27

⁴) Den Herren Prof. Dr. H. Zähler und P. Walz, Universität Tübingen, danken wir für die Ausführung der biologischen Teste.

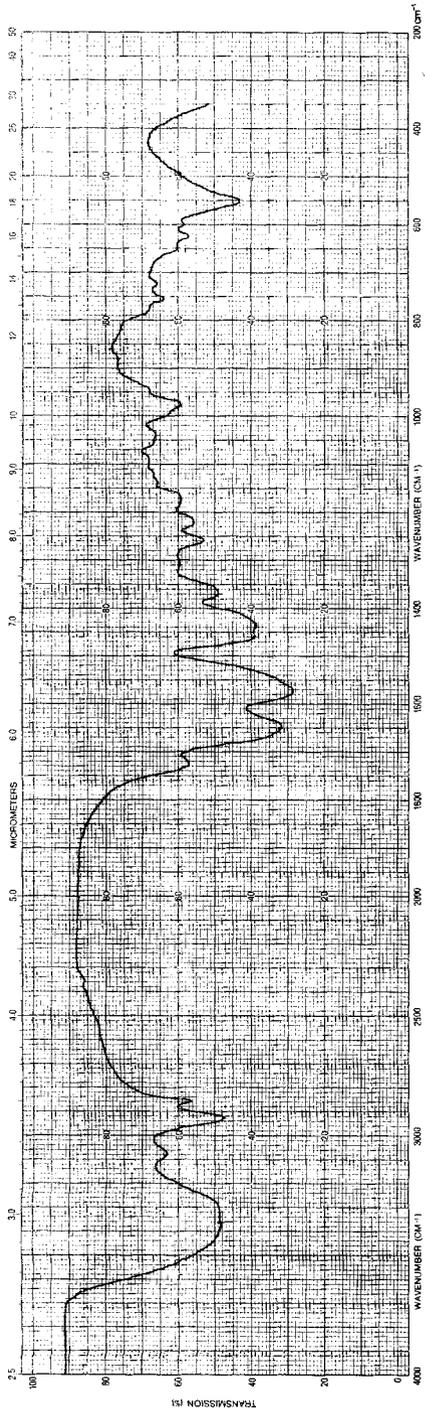


Fig. 1. IR.-Spektrum von Ferrioxamin H in KBr

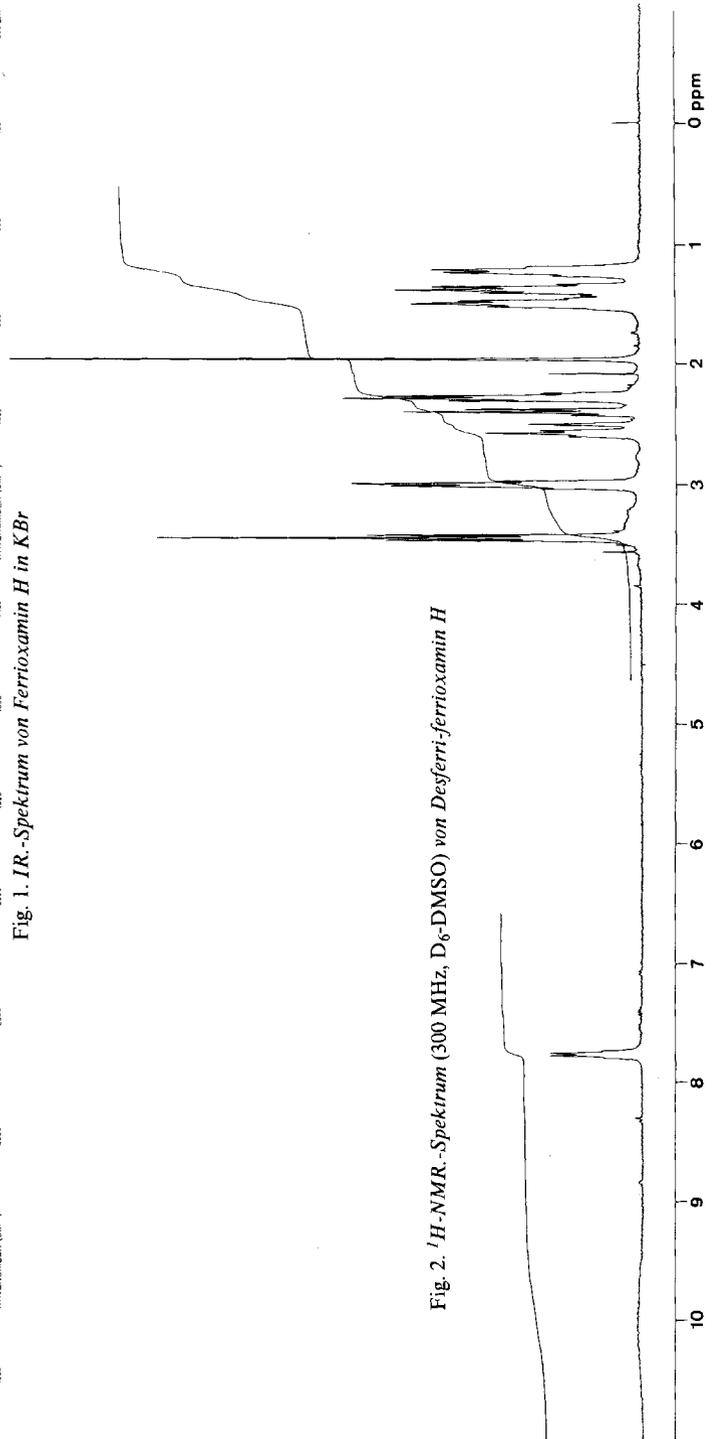


Fig. 2. ^1H -NMR.-Spektrum (300 MHz, D_6 -DMSO) von Desferri-ferrioxamin H

Desferri-ferrioxamin H. Aus 570 mg Ferrioxamin H wurden in der üblichen Weise [11] mit 8-Hydroxychinolin das Eisen abgetrennt. Durch Umkristallisation aus Methanol/Äther wurden 204 mg Desferri-ferrioxamin H als farbloses Pulver erhalten, Smp. 128–130°. – IR. (KBr): 3300, 1720, 1620, 1565. – ¹H-NMR. (300 MHz, D₆-DMSO): s. *Figur 2*. – ¹³C-NMR. (D₆-DMSO): 20,4 (*qa*, C(24)); 23,6 (*t*, C(8) und C(19)); 26,1 (*t*, C(7) und C(18)); 27,7 (*t*, C(13)); 28,9 (*t*, C(9) und C(20)); 29,4 (*t*, C(2)); 30,0 (*t*, C(3) oder C(14)); 30,2 (*t*, C(14) oder C(3)); 38,5 (*t*, C(10) und C(21)); 46,9 (*t*, C(6) oder C(17)); 47,2 (*t*, C(17) oder C(6)); 170,4 (*s*); 171,0 (*s*); 171,6 (*s*); 172,1 (*s*, 2 CO–NH und 2 CO–NOH); 174,1 (*s*, C(1)).

C₂₀H₃₆N₄O₈ · $\frac{2}{3}$ H₂O (472,49) Ber. C 50,83 H 7,96 N 11,86% Gef. C 50,77 H 7,73 N 11,89%

Quantitative Bestimmung von Bernsteinsäure. Die Hydrolyse von 200 mg (0,423 mmol) Desferri-ferrioxamin H mit 5 ml 10proz. NaOH-Lösung bei 100° über Nacht gab nach dem Ansäuern auf pH 2 (Salzsäure) und Verdünnen auf 50 ml durch kontinuierliche Extraktion mit Äther 101,5 mg (0,860 mmol) rohe Bernsteinsäure, woraus durch Umkristallisieren aus Methanol/Essigester 65,1 mg (0,55 mmol) reines Produkt von Smp. 182° erhalten und durch IR. identifiziert wurde. Das Rohprodukt (2 mg) wurde mit Diazomethan verestert; durch Kapillar-GC. konnten ausser Bernsteinsäure-dimethylester keine weiteren flüchtigen Produkte aufgefunden werden.

Partialhydrolyse von Desferri-ferrioxamin H. Die Hydrolyse von 100 mg (0,212 mmol) Desferri-ferrioxamin H erfolgte durch Zusatz von 10 ml 1N H₂SO₄ und 1stdg. Erwärmen auf 82°. (In Modellversuchen mit Desferri-ferrioxamin B war festgestellt worden, dass unter diesen Bedingungen die Hydroxamsäurebindungen vollständig, die Amidbindungen jedoch nur zu einem geringen Teil hydrolysiert werden). Nach dem Abkühlen wurde mit festem Bariumcarbonat neutralisiert, zentrifugiert und die festen Anteile mit wenig Wasser ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit 0,5 ml Essigsäure angesäuert und in Gegenwart von 8 mg PtO₂ über Nacht hydriert. Nach dem Eindampfen wurde das Rohprodukt, das gemäss DC. neben viel **4** und einer Spur Cadaverin keine weiteren ninhydrin-positiven Komponenten enthielt, an *Dowex 50 W* (H-Form) gereinigt. Mit 3proz. wässrg. NH₃-Lösung wurde eine einheitliche Fraktion eluiert und nach dem Eindampfen i.V. aus Methanol umkristallisiert; 14,5 mg (0,069 mmol) farblose Kristalle, Smp. 205° (Zers.); nach IR., ¹H-NMR. und ¹³C-NMR. identisch mit einer synthetischen Probe von 10-Amino-4-oxo-5-azadecansäure (**4**).

C₉H₁₈N₂O₃ · $\frac{1}{2}$ H₂O (211,24) Ber. C 51,16 H 9,07 N 13,26% Gef. C 51,34 H 8,65 N 13,11%

Herstellung von 10-Amino-4-oxo-5-azadecansäure (4). Eine Lösung von 1 g Bernsteinsäureanhydrid in 100 ml abs. CH₃OH wurde unter Rühren zu einer Lösung von 500 mg Cadaverin in 50 ml abs. CH₃OH gegeben. Nach 2 Std. wurde bei vermindertem Druck eingedampft und an *Dowex 50 W* (H-Form) chromatographiert. Nach dem Waschen der Säule mit Wasser wurde mit 3proz. wässrg. NH₃-Lösung eluiert. Eindampfen und Umkristallisieren aus CH₃OH ergaben 267 mg (27%) farblose Kristalle, Smp. 204–205°, Rf 0,34 (DC. mit Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1, Ninhydrin) wie das Abbauprodukt. – IR. (KBr): Übereinstimmung mit dem Abbauprodukt, u.a. 1635 br., 1545. – ¹H-NMR. (D₂O): 1,60–2,30 (*m*, 6 H); 2,84 (*s*, 4 H); 3,40 (*t*, *J* = 7, 2 H); 3,60 (*t*, *J* = 7, 2 H). – ¹³C-NMR. (D₂O): 23,5 (*t*); 27,0 (*t*); 28,4 (*t*); 33,0 (*t*); 33,8 (*t*); 39,5 (*t*); 39,9 (*t*); 176,1 (*s*); 181,2 (*s*). – MS.: 202 (0,7, M⁺), 173 (7), 127 (5), 113 (5), 101 (6), 100 (34), 84 (11), 72 (10), 59 (7), 56 (11), 55 (10), 45 (10), 44 (14), 43 (5), 41 (7), 30 (100), 29 (7), 28 (11), 27 (7), 18 (12).

C₉H₁₈N₂O₃ · $\frac{1}{4}$ H₂O Ber. C 52,28 H 9,02 N 13,55% Gef. C 52,36 H 8,79 N 13,35%

Synthese von Ferrioxamin H. Eine Lösung von 100 mg *N*(1)-Benzyloxycarbonyl-6,17-dihydroxy-7,10,18-trioxo-6,11,17-triazanonadecylamin (**5**) [5] in 50 ml abs. CH₃OH und 0,4 ml 0,5N HCl in CH₃OH wurde 30 Min. lang in Gegenwart von 20 mg 10proz. Pd/C mit H₂ behandelt. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wurde mit einigen Tropfen Triäthylamin basisch gemacht und unter Rühren 70 mg Bernsteinsäureanhydrid zugegeben. Nach 3 Std. wurden 10 ml konz. NH₃-Lösung zugegeben und weitere 16 Std. bei RT. gerührt. Nach dem Eindampfen wurde das Rohprodukt zunächst mit CHCl₃/CH₃OH/H₂O 65:25:4 an Cellulosepulver (1,5 × 35 cm) und dann mit Wasser durch *Sephadex G-10* chromatographiert. Die gemäss DC. (Butanol/Methanol/Wasser 4:1:2, Anfärbung mit FeCl₃, Rf 0,83) einheitlichen Fraktionen gaben durch Eindampfen und Umkristallisieren aus Methanol/Äther 36 mg (39%) farbloses Pulver, das nach DC., IR., ¹H-NMR. und ¹³C-NMR. von natürlichem Desferri-ferrioxamin H nicht unterscheidbar war.

Aus 10 mg synthetischem Desferri-ferrioxamin H in 2 ml CH₃OH wurde durch Zugabe eines Überschusses von FeCl₃ in CH₃OH und Pufferung mit AcONa eine tief braune Lösung erhalten. Nach dem Eindampfen und Chromatographieren an *Sephadex LH-20* (CH₃OH) wurden 8 mg (70%) Ferrioxamin H als rot-oranges amorphes Pulver erhalten. Nach DC. (Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1; auf Cellulose (Rf 0,82) und IR. Übereinstimmung mit natürlichem Ferrioxamin H. – UV./VIS. (Wasser): 455 (ε 1800).

Synthese von N-Succinyl-desferri-ferrioxamin B (1). Zu einer Lösung von 1 g Ferrioxamin-B-Hydrochlorid und 155 mg Triäthylamin in 50 ml CH₃OH/CHCl₃ 3:2 wurde die Lösung von 500 mg Bernsteinsäureanhydrid in 20 ml CHCl₃ gegeben und 15 Min. bei RT. gerührt. Nach dem Eindampfen i.V. wurde der Rückstand mit CH₃OH an *Sephadex LH-20* (Säule 3 × 54 cm) chromatographiert. Die gemäss DC. einheitlichen orangebraunen Fraktionen wurden zu 1,01 g (92%) braunem Pulver, N-Succinylferrioxamin B, eingedampft und i.HV. getrocknet. DC. (Cellulose, Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1): Rf 0,90 gegenüber 0,82 für Ferrioxamin H. – IR. (KBr): u.a. 1720, 1645.

In üblicher Weise [11] wurden 400 mg N-Succinylferrioxamin B in 20 ml CH₃OH/H₂O 1:3 mit 2 g 8-Hydroxychinolin umgesetzt. Nach dem Abfiltrieren des Eisen-oxinats durch *Celite* wurde das Filtrat i.V. zu einem wässrigen Rückstand konzentriert, dieser 4mal mit Äther gewaschen und die wässrige Schicht i.V. eingedampft. Nach dem Aufschlänmen des Rückstands mit wenig kaltem Wasser und Abfiltrieren wurde die Verbindung 1 als farbloser Pulver erhalten, Ausbeute 215 mg (58%); Smp. 166–168° (Zers.). – IR. (KBr): 1720, 1650, 1520, 1565. – ¹H-NMR. (100 MHz, D₆-DMSO): 1,00–1,70 (m, 18 H); 1,96 (s, 3 H); 2,1–2,70 (m, 12 H); 2,80–3,20 (m, 6 H); 3,44 (t, J = 7, 6 H); 7,73 (br., 3 H). – ¹³C-NMR. (D₆-DMSO): 20,1 (qa, C(35)); 23,6 (t, C(8), C(19) und C(30)); 26,1 (t, C(7), C(18) und C(29)); 27,7 (t, C(13) und C(24)); 28,8 (t, C(9), C(20) und C(31)); 30,0 (t, C(2) oder C(3)); 30,3 (t, C(14) und C(25)); 30,7 (t, C(3) oder C(2)); 38,5 (t, C(10), C(21) und C(32)); 47,5 (t, C(6), C(17) und C(28)); 170,1 (s, C(34)); 171,1 (s); 171,4 (s); 171,9 (s); 174,1 (s, C(1)).

C₂₉H₅₂N₆O₁₁ (660,70) Ber. C 52,71 H 7,93 N 12,72% Gef. C 52,66 H 7,95 N 12,58%

Die Mikroanalysen verdanken wir unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Herr D. Manser), die NMR.-Spektren unserem Laboratorium für Instrumentalanalyse (Fr. B. Brandenburg, Herren K. Hiltbrunner und F. Bangarter, Leitung Prof. Dr. J. F. Oth) und die IR.-Spektren Herrn H. Hediger.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. Neupert-Laves & M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* 82, 1426 (1982).
- [2] H. Bickel, R. Bosshardt, E. Gäumann, P. Reusser, E. Vischer, W. Voser, A. Wettstein & H. Zähler, *Helv. Chim. Acta* 43, 2118 (1960).
- [3] A. Müller & H. Zähler, *Arch. Mikrobiologie* 62, 257 (1968).
- [4] H. Bickel, G. E. Hall, W. Keller-Schierlein, V. Prelog, E. Vischer & A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta* 43, 2129 (1960).
- [5] V. Prelog & A. Walser, *Helv. Chim. Acta* 45, 631 (1962).
- [6] W. Keller-Schierlein, V. Prelog & H. Zähler, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* (Ed. L. Zechmeister) 22, 279 (1964).
- [7] P. Huber, Dissertation ETHZ, Nr. 7077, 1982.
- [8] H. U. Naegeli & W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* 61, 2088 (1978).
- [9] H. Zähler, R. Hütter & E. Bachmann, *Arch. Mikrobiologie* 36, 325 (1960); vgl. auch [6].
- [10] W. Keller-Schierlein & E. Kupfer, *Helv. Chim. Acta* 62, 1501 (1979).
- [11] H. Bickel, H. Keberle & E. Vischer, *Helv. Chim. Acta* 46, 1385 (1963).