

3. Salmycin A–D, Antibiotika aus *Streptomyces violaceus*, DSM 8286, mit Siderophor-Aminoglycosid-Struktur

von László Vértesy*, Werner Aretz, Hans-Wolfram Fehlhaber und Herbert Kogler

Allgemeine Pharma Forschung, Hoechst Aktiengesellschaft, D-65926 Frankfurt am Main

(4. VIII. 94)

Salmycin A–D, Antibiotics from *Streptomyces violaceus*, DSM 8286, Having a Siderophor-Aminoglycoside Structure

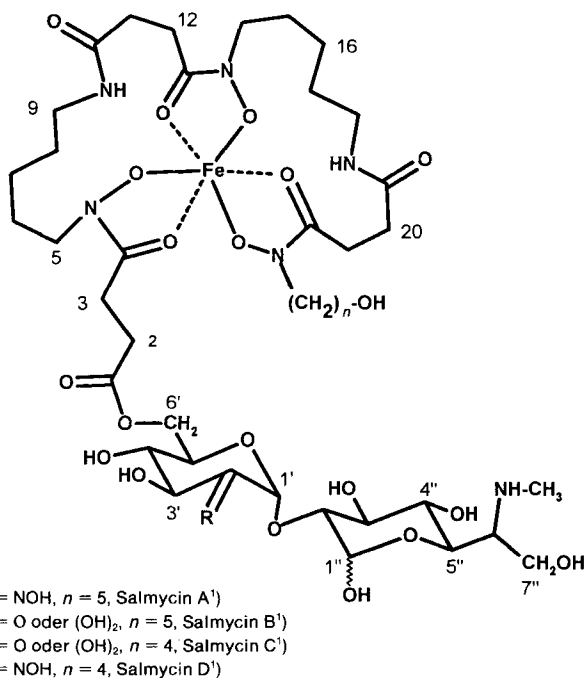
Salmycin B (**2**) and C (**3**) were isolated under acid conditions, under which they are stable, from the culture broth of *Streptomyces violaceus*, DSM 8286. The acid- and alkaline-labile, native main component salmycin A (**1**), as well as salmycin D (**4**), were obtained under strictly neutral pH conditions. The compounds **1** (C₄₁H₇₀FeN₇O₂₁), **2** (C₄₁H₆₉FeN₆O₂₁), **3** (C₄₀H₆₇FeN₆O₂₁), and **4** (C₄₀H₆₈FeN₇O₂₁) are classified as sideromycins and are stable when dry. Mild alkaline hydrolysis of **1** and **2** yielded the known siderophor danoxamin (**5**; C₂₇H₄₆FeN₅O₁₁), and amino-disaccharides. The amino-glycoside **6** (C₁₄H₂₅NO₁₁) of salmycin B was stabilized by hydrogenation and the structure of the corresponding peracetate **10** determined by ¹H-, ¹H-, and ¹H,¹³C-correlation NMR spectroscopy (Table 1). Compound **6** consists of a glucos-2-ulose unit which is linked to the 2-position of a 6-deoxy-6-(methylamino)heptopyranose. The danoxamin is bonded via the carboxy group by ester linkage to the primary alcohol of the glucos-2-ulose. Salmycin A (**1**) is a natural oxime of **2**, it was synthesized from **2** with hydroxylamine. The salmycins and those derivatives which contain hexapyranos-2-ulose form stable ketone hydrates which can be identified by mass spectrometry. Although several recently identified features of the danomycins do not correspond with those of the salmycins, ¹³C-NMR spectra show that both groups of antibiotics are closely related. All salmycins, especially component **1**, are highly active against *Staphylococci* and *Streptococci*, even against resistant strains of these pathogens.

Einleitung. – Eisenhaltige Antibiotika, die sogenannten Sideromycine, sind in Kulturen von Mikroorganismen schon des öfteren gefunden worden. Näher charakterisiert werden konnten die Ferrimycine [1], die Albomycine [2] und vor kurzem die Ferrocine [3], die auch gegen *Gram*-negative Bakterien wirksam sind. Die Danomycine wurden aufgrund ihrer hohen *In-vitro*- und *In-vivo*-Aktivitäten gegen *Gram*-positive Keime ebenfalls umfassend untersucht, die Ermittlung ihrer Konstitution allerdings gelang bis jetzt noch nicht [4].

Wegen der Zunahme der Resistenzen in Krankheitserregern gegen die in der antibakteriellen Chemotherapie verwendeten Antibiotika sind neue Therapieprinzipien von wachsender Bedeutung. Im folgenden wird über die Auffindung und Strukturaufklärung von Sideromycin-Antibiotika, die wir Salmycine [5] nannten, berichtet, die gegen einige *Gram*-positive Bakterien wirksam sind und auch Resistenzen in *Staphylococccen* und *Streptococccen* zu durchbrechen vermögen.

Isolierung. – Es wurde beobachtet, dass Kulturfiltrate des Stammes *Streptomyces violaceus* 37290, DSM 8286, im Agardiffusionstest zur Ermittlung der antibakteriellen Wirksamkeit ein aussergewöhnliches Verhalten zeigten, nämlich die Bildung von konischen Hemmzonen. Zur Klärung des Phänomens wurde der Streptomyceten-Stamm

auf einer komplexen, mannit-haltigen Nährlösung submers kultiviert, da er unter diesen Bedingungen zuverlässig das antibiotische Prinzip bildete. Als Leitstamm zur Kontrolle der Gewinnung und Isolierung der Salmycine verwendete man den Teststamm *Staphylococcus aureus* 209P, weil dieser Organismus gegen die gebildeten Antibiotika besonders empfindlich ist. Die Isolierung der Salmycine stiess zunächst wegen ihrer Labilität und unscharfer Trenneffekte auf Schwierigkeiten. Jedoch stellte sich heraus, dass zwei Komponenten, Salmycin B und C, in mässig saurer Lösung stabil sind. Ein im sauren Milieu durchgeführter Aufarbeitungsgang mit den Schritten Adsorption und Desorption an polymeren Umkehrphasenträger, Ultrafiltration und Molekularsiebchromatographie in essigsaurer Lösung sowie präparative HPLC im System 0,1% CF₃COOH/MeCN/H₂O führte zum reinen Antibiotikum Salmycin B (2) und geringen Mengen Salmycin C (3). Massenspektrometrische Untersuchungen, das UV/VIS-Spektrum, Elementaranalyse und NMR-Studien mit und ohne EDTA-Zusatz ergaben, dass Sideromycin-Antibiotika vorlagen. Hochauflösende 'fast-atom bombardment'(FAB)-MS ergab für Salmycin B (2) die Summenformel C₄₁H₆₉FeN₆O₂₁ ([M + H]⁺ bei m/z 1038,394). Neben dem



¹⁾ Willkürliche Numerierung; die systematischen Namen lauten: {{2-Deoxy-1-[6-deoxy-6-(methylamino)-D-heptopyranos-2-yloxy]-2-(hydroxyimino)-D-glucopyranos-6-yl}-5,16,27,32-tetrahydroxy-4,12,15,23,26-pentaoxo-5,11,16,22,27-pentaazadotriacontanoato(3-)-O⁴,O⁵,O¹⁵,O¹⁶,O²⁶,O²⁷}eisen(III) (1), {{1-[6-Deoxy-6-(methylamino)-D-heptopyranos-2-yloxy]-D-glucopyranos-2-ulos-6-yl}-5,16,27,32-tetrahydroxy-4,12,15,23,26-pentaoxo-5,11,22,27-pentaazadotriacontanoato(3-)-O⁴,O⁵,O¹⁵,O¹⁶,O²⁶,O²⁷}eisen(III) (2), {{1-[6-Deoxy-6-(methylamino)-D-heptopyranos-2-yloxy]-D-glucopyranos-2-ulos-6-yl}-5,16,27,31-tetrahydroxy-4,12,15,23,26-pentaoxo-5,11,16,22,27-pentaazahentriacontanoato(3-)-O⁴,O⁵,O¹⁵,O¹⁶,O²⁶,O²⁷}eisen (3) und entsprechend für 4.

$[M + H]^+$ -Ion trat in den MS ein $[M + H_2O + H]^+$ -Peak auf, der unter 'electron-spray ionization'(ESI)-Bedingungen (MeCN/H₂O) die gleiche Intensität wie $[M + H]^+$ erreichte. Eine Verbindung dieser Bruttoformel ist bislang in der Literatur nicht beschrieben. Für das Salmycin C (**3**), dessen Konzentration weniger als 5% von **2** beträgt, wurden die Massenzahlen 1024,4 ($[M + H]^+$) und 1042,1 ($[M + H_2O + H]^+$) ermittelt, die der Bruttoformel C₄₀H₆₇FeN₆O₂₁(+ H₂O) entsprechen.

Während das ungereinigte Kulturfiltrat stets zu klaren Hemmhöfen in den Agardiffusionstests führte, bewirkten die isolierten Salmycine B (**2**) und C (**3**) nur trübe Hemmzonen. Solche auf spontane Mutantenbildung zurückzuführende Resistenzen sind zwar gerade bei Sideromycinen wiederholt beobachtet worden, im Falle des *Streptomyces violaceus* 37290, DMS 8286, lag aber offensichtlich eine weitere Wirkkomponente vor. Stabilitätsuntersuchungen ergaben, dass dieser Faktor, das Salmycin A (**1**), nur im neutralen Milieu unzersetzt blieb. Der Neigung der Verbindung **1**, bei der Chromatographie über weite Bereiche zu schmieren, konnte für die Reinigung dadurch begegnet werden, dass man phosphat-gepufferte Lösungen anstelle von reinen Lösungsmitteln verwendete. Das Isolierungsschema umfasst deshalb die Adsorption aus dem Kulturfiltrat an einen Polymer-Träger und Desorption mit H₂O/MeOH, Ultrafiltration zur Konzentrierung und Entsalzung, die sehr effektive Negativreinigung mittels Filtration über einen bei pH 7 äquilibrierten Anionenaustauscher sowie in Phosphatpuffer (pH 7) durchgeführte Molekularsieb- und Umkehrphasenchromatographien. Das reine Salmycin A (**1**) hemmt den *Staphylococcus aureus* im Diffusionstest in klaren Hemmzonen. Die durch hochauflösende MS bestimmte Bruttoformel ist C₄₁H₇₀FeN₇O₂₁ ($[M + H]^+$ bei m/z 1053,405). Die gleiche Summenformel gaben Huber *et al.* für das Danomycin A an [4].

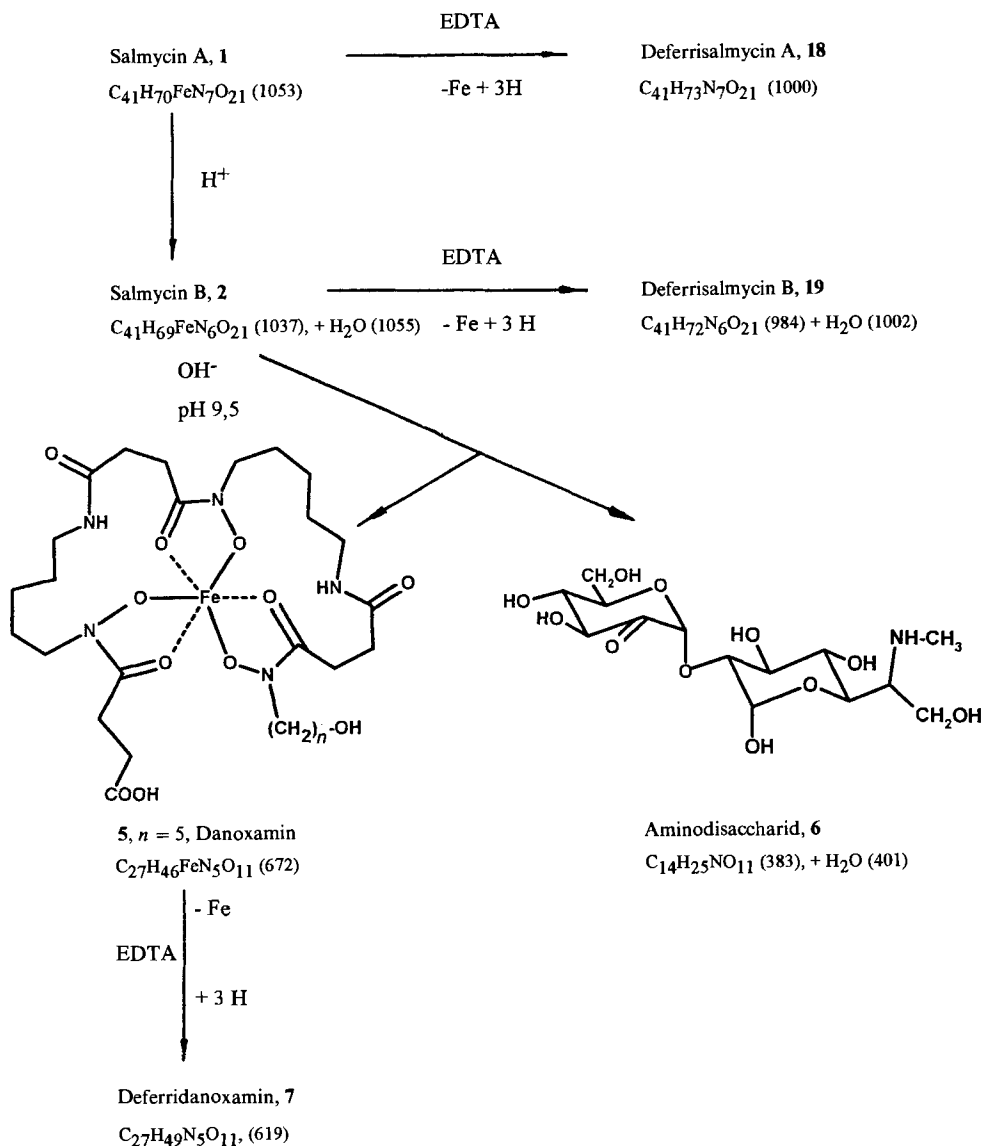
Dem nur in Spuren vorkommenden Salmycin D (**4**) wurde die Summenformel C₄₀H₆₈FeN₇O₂₁ zugeordnet, da es aus Salmycin C (**2**) und Hydroxylamin synthetisiert werden konnte.

Die Salmycine lösen sich in H₂O und MeOH leicht, sie sind schwach basisch. Ihre Lösungen sind lachsfarben, ebenso wie die gefriergetrockneten Formen: λ_{\max} 427–430 nm, $\log \epsilon$ 3,3.

Strukturaufklärung. – Da die Salmycine bis jetzt nicht kristallisiert werden konnten und die nativen Moleküle für eine spektroskopische Strukturermittlung wenig geeignet sind, wurden gezielte Abbaureaktionen durchgeführt. Bereits sehr mild ammoniakalische Hydrolysebedingungen (0,05N NH₄OH, 1 h) führten zur Spaltung von **2** zum Siderophor **5** und zu einem polaren Saccharid **6** (Schema 1). Das rötlichgelbe **5** ergab massenspektrometrisch das Molekulargewicht 672 entsprechend einer Summenformel C₂₇H₄₆FeN₅O₁₁. Diese Bruttoformel wurde von Keller-Schierlein und Mitarbeitern [4] für das Danoxamin angegeben. Zur Identifizierung wurde mit EDTA das Fe-Atom aus der Verbindung **5** entfernt. Die resultierende farblose Substanz **7** (s. Schema 2) zeigte im ESI-MS, bedingt durch die Hydroxamsäure, ein typisches Fragmentierungsmuster. Während Verbindung **7** in fester Form stabil ist, wandelte sie sich in wässriger Lösung allmählich zum Produkt **8** um (Schema 2), das ebenfalls chromatographisch fassbar war. Die Fragmentierung der beiden Präparate in Verbindung mit der Fähigkeit zur Bindung des Fe^{III}-Ions weist auf die Identität von **5** mit dem Danoxamin [4] hin.

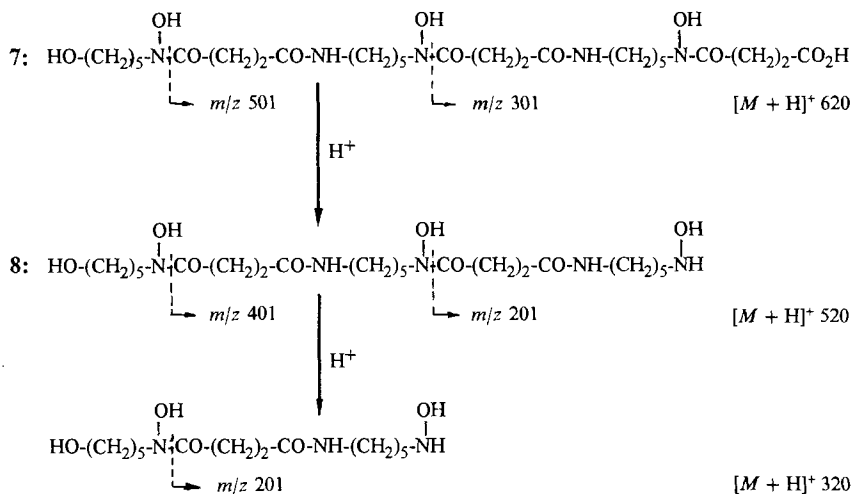
Das Saccharid **6**, isoliert und gereinigt durch Umkehrphasenchromatographie, ergab massenspektrometrisch die Bruttoformel C₁₄H₂₅NO₁₁ ($[M + H]^+$ bei m/z 383,

Schema 1. Abbauschema des Salmycin A (1) und Salmycin B (2)



[$M + H + H_2O$]⁺ bei m/z 401). Es ist damit komplementär zur Summenformel des Siderophores 5. Wegen der stark überlappenden NMR-Signale von 6 wurde für die Strukturermittlung eine Acetylierung notwendig. Diese scheiterte jedoch an der Zersetzlichkeit des Saccharids. Die Struktur von 6 wurde deshalb durch Reduktion von 2, gefolgt von Hydrolyse und Acetylierung, ermittelt (s. unten).

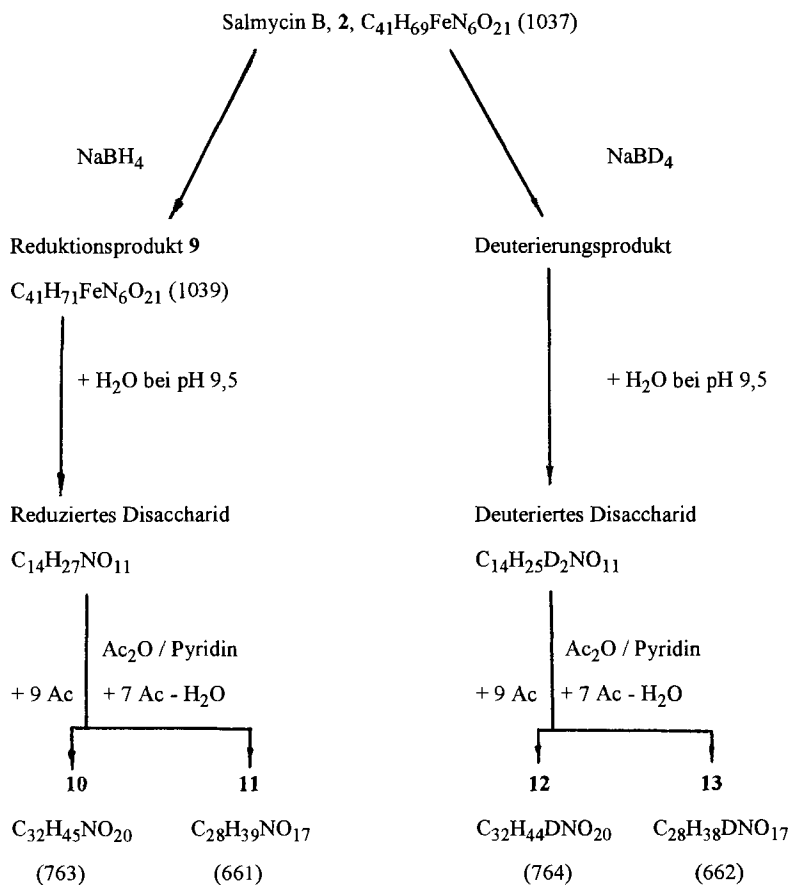
Das im MS von 6 beobachtete Fragment [$MH - 160$]⁺ deutete auf die Anwesenheit einer Didehydrohexose-Einheit hin. Eine daraufhin schonend durchgeführte Reduktion

Schema 2. Zuordnung der ESI-MS-Signale der Abbauprodukte **7** und **8**

von **2** mit NaBH_4 ergab zwei Produkte **9** (Schema 3) und ein Isomer, die jeweils die Molekulargewichte 1039 aufwiesen. Die mild ammoniakalische Hydrolyse von **9** erbrachte ein hydriertes Disaccharid, dessen Acetylierung in Pyridin/ Ac_2O mit nachfolgender präp. HPLC-Reinigung die Verbindungen **10** und **11** ergab. In analoger Arbeitsweise wurden aus **2** mit NaBD_4 zwei Reduktionsprodukte gewonnen, um durch die Deuterierung den Ort der Reduktion zu kennzeichnen. Die Acetylierung des deuterierten Disaccharids zeitigte erneut zwei Peracetate: **12** und **13**. Aus den durch ESI-MS ermittelten Molmassen der vier Disaccharid-Derivate **10–13** liessen sich die in Schema 3 angegebenen Bruttoformeln und chemischen Zusammenhänge ableiten. Die Verbindungen **10** und **12** entsprechen den erwarteten Peracetylierungsprodukten, während **11** und **13** bereits Folgeprodukte sind, da bei der Acetylierung ein Dehydratisierungsprozess eintrat, der, wie sich zeigte, zu einer tiefgreifenden Strukturveränderung führte. Die MS von **10**, **11**, **12**, **13** weisen ein strukturell bedeutsames Fragment-Ion m/z 331 (**10**, **11**) bzw. m/z 332 (**12**, **13**) auf. Es entspricht einer Tetra-*O*-acetylhexopyranose und belegt durch die H–D-Verschiebung, dass die vorgeschaltete NaBH_4 - bzw. NaBD_4 -Reduktion in eben diesem Molekülteil stattfand. Eine detaillierte Strukturanalyse gelang durch Anwendung zweidimensionaler NMR-Methoden, wozu nur die in mg-Mengen vorhandenen Proben **10** und **13** geeignet waren.

Von **10** wurden, um Fehlinterpretationen durch zufällige Signalüberlagerungen auszuschliessen, Messungen in zwei Lösungsmitteln (CDCl_3 , C_6D_6) vorgenommen. Die aus ^1H , ^1H - und ^1H , ^{13}C -Korrelationsspektren extrahierten Daten sind in Tab. 1 zusammengefasst. Daraus folgten, unter Berücksichtigung der chemischen Verschiebungen und ^1H , ^1H -Kopplungskonstanten, die Teilstrukturen **A** und **B**. Das Peracetat **10** besteht also aus einer Glucose-Einheit, die α -glycosidisch mit der 2-Position einer 6-Deoxy-6-(methylamino)heptopyranose verknüpft ist. Das Deuterium-Analoge **12** ergab wegen der geringen Probenmenge nur ein sehr schwaches NMR-Spektrum, aus dem man aber einen ersten Hinweis auf die Position des D-Atoms erhielt: Während alle anderen Signale

Schema 3. Umwandlungen des Salmycin B (2)



Tab. 1. Zuordnung der ¹H- und ¹³C-NMR-Signale von 10. Multiplizitäten und Kopplungskonstanten J [Hz] in Klammern.

	δ [ppm] in CDCl ₃		δ [ppm] in C ₆ D ₆	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
H-C(1) ^a)	6,21 (<i>d</i> , J(1,2) = 3,5)	89,0	6,09 (<i>d</i> , J(1,2) = 3,5)	89,0
H-C(3)	5,41 (<i>dd</i> , J(3,2) = 10, J(3,4) = 9,5)	71,2	5,70 (<i>dd</i> , J(3,2) = 8, J(3,4) = 8,5)	71,1
H-C(3')	5,32 (<i>t</i> , J(3',4') = 9, J(3',2') = 9)	69,9	5,65 (<i>dd</i> , J(3',4') = 9, J(3',2') = 9,5)	70,0
H-C(1')	5,09 (<i>d</i> , J(1',2') = 3,5)	96,4	4,86 (<i>d</i> , J(1',2') = 4)	97,5
H-C(4')	5,08 (<i>dd</i> , J(4',3') = 9, J(4',5') = 9,5)	68,4	5,32 (<i>t</i> , J(4',3') = 9, J(4',5') = 9)	68,2
H-C(6)	5,06 (<i>m</i> , J(6,7a) = 9, J(6,7b) (oder J(6,5)?) = 4,5)	49,9	5,47 (<i>ddd</i> , J(6,7a) = 8,5, J(6,7b) = 4, J(6,5) = 1,5)	49,5
H-C(4)	5,01 (<i>dd</i> , J(4,3) = 9,5, J(4,5) = 9)	69,5	5,22 (<i>dd</i> , J(4,3) = 8,5, J(4,5) = 10)	69,1

Tab. 1 (Forts.)

	δ [ppm] in CDCl_3		δ [ppm] in C_6D_6	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
H–C(2')	4,92 (dd, $J(2',1') = 3,5$, $J(2',3') = 9$)	70,5	5,06 (dd, $J(2',1') = 4$, $J(2',3') = 9,5$)	70,5
H _a –C(7)	4,31 (dd, $J(7a,b) = 9$, $J(7a,7b) = 11$)	59,3	4,48 (dd, $J(7a,b) = 8,5$, $J(7a,7b) = 11$)	59,0
H _b –C(7)	4,29 (dd, $J(7b,b) = 4,5$, $J(7b,7a) = 11$)		4,50 (dd, $J(7b,b) = 4$, $J(7b,7a) = 11$)	
H _a –C(6')	4,19 (dd, $J(6'a,5') = 4$, $J(6'a,6'b) = 11$)	61,7	4,24 (m, $J(6'a,5')$ und $J(6'a,6'b) = ?$)	61,3
H _b –C(6')	4,18 (dd, $J(6'b,5') = 2$, $J(6'b,6'a) = 11$)		4,33 (dd, $J(6'b,5') = 2$, $J(6'b,6'a) = 10$)	
H–C(5) ^{a)}	4,05 (dd, $J(5,4)$ (oder $J(5,6) = 9$))	68,9	4,07 (dd, $J(5,4) = 10$, $J(5,6) = 1,5$)	74,2
H–C(5')	4,05 (ddd, $J(5',4') = 9,5$, $J(5',6'a) = 4$, $J(5',6'b) = 2$)	74,1	4,25 (m, $J(5',4') = 9$, $J(5',6'a)$ und $J(5',6'b) = ?$)	69,2
H–C(2) ^{a)}	3,87 (dd, $J(2,1) = 3,5$, $J(2,3) = 10$)	74,7	3,38 (dd, $J(2,1) = 3,5$, $J(2,3) = 8$)	76,2
MeN ^{a)}	2,93 (s)	32,4	2,53 (s)	31,1
Ac (4 und 5)	2,0–2,2 (s)	21	1,6–2,0 (s)	

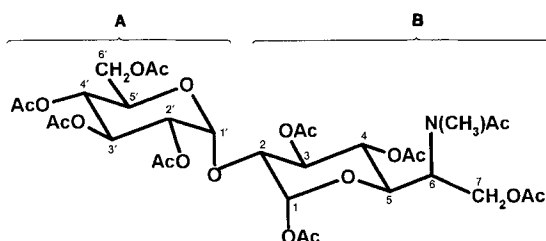
^{a)} Die Signale von H–C(1), H–C(5), H–C(2) und MeN weisen jeweils ein kleineres Zweitsignal auf, verursacht durch ein Lösungsmittel-abhängiges Konformerengleichgewicht des AcN: ca. 30% in CDCl_3 und ca. 20% in C_6D_6 .

ähnlich wie bei **10** erscheinen, ist das Signal von H–C(2) (vgl. Tab. 1) verschwunden, d. h. die Deuterierung erfolgte am C(2) der Glucose-Einheit, womit diese Position für die ursprüngliche Ketofunktion festgelegt ist.

Für das 'Artefakt' **13** wurden aus ^1H , ^1H - und ^1H , ^{13}C -Korrelationspektren die in Tab. 2 zusammengefassten Daten gewonnen. Sie führten zwar noch zu eindeutigen Spin-

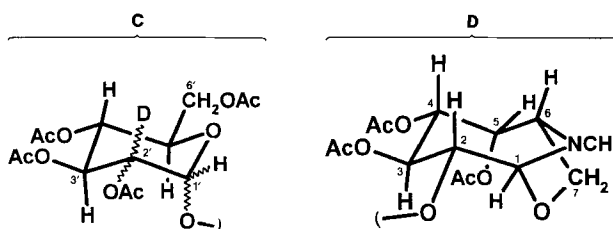
Tab. 2. Zuordnung der ^1H -NMR (CDCl_3)-Signale von **13**. Multiplizitäten und Kopplungskonstanten J [Hz] in Klammern.

	$\delta(\text{H})$ in ppm
H–C(3)	5,66 (dd, $J(3,2) = 7,5$, $J(3,4) = 10,5$)
H–C(3')	5,47 (d, $J(3',4') = 9,5$)
H–C(1')	5,15 (s)
H–C(4')	5,10 (dd, $J(4',3') = 9,5$, $J(4',5') = 8,5$)
H–C(5)	5,10 (dd, $J(5,4) = 2,5$, $J(5,6) = 3,5$)
H–C(4)	5,02 (dd, $J(4,5) = 2,5$, $J(4,3) = 10,5$)
H–C(1)	4,60 (d, $J(1,2) = 1,3$)
H _a –C(6')	4,23 (dd, $J(6'a,5') = 3,5$, $J(6'a,6'b) = 12,5$)
H–C(5')	4,10 (ddd, $J(5',6'a) = 3,5$, $J(5',6'b) = 2,5$, $J(5',4') = 8,5$)
H _b –C(6')	4,08 (dd, $J(6'b,5') = 2,5$, $J(6'b,6'a) = 12,5$)
H _a –C(7)	3,77 (m, $J(7a,7b)$ und $J(7a,6') = ?$)
H _b –C(7)	3,76 (d(m), $J(7b,6') = 1,8$, $J(7b,7a) = ?$)
H–C(2)	3,67 (dd, $J(2,1) = 1,3$, $J(2,3) = 7,5$)
H–C(6)	3,35 (ddd, $J(6,7b) = 1,8$, $J(6,5) = 3,5$, $J(6,7a) = 3,5$)
MeN	2,59 (s)
Ac (4 und 3)	1,96–2,24 (s)



10 : Peracetat des reduzierten Aminodisaccharids

systemen, deren Übersetzung in Teilstrukturen war jedoch nur bei der Glucose-Einheit C eindeutig. Bei der C₇-Einheit D sind neben der angegebenen, an 10 angelehnten Struktur, solche mit anderer Verbrückung des Bicyclus nicht auszuschliessen. Das erscheint aber unerheblich angesichts der Tatsache, dass 13 den eindeutigen Beweis für die Deuterierung in 2-Position der Glucose-Einheit erbrachte!



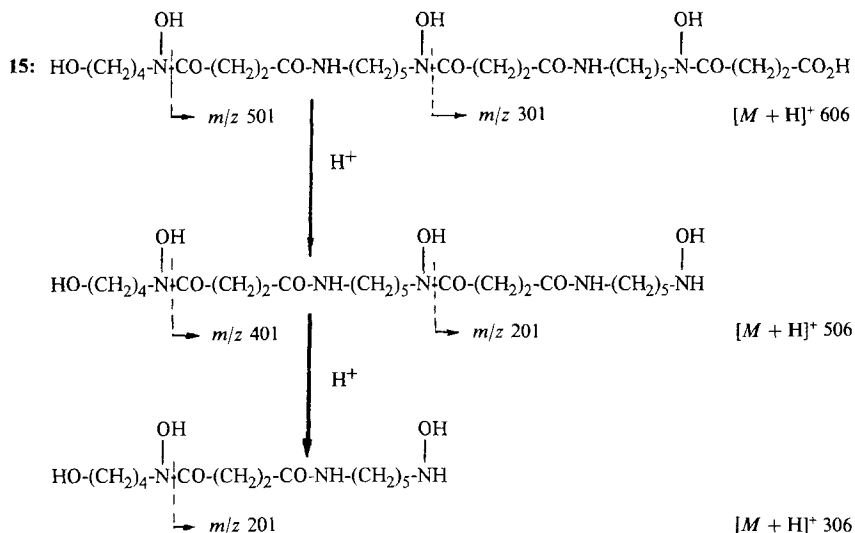
13 : Peracetat des deuterierten Aminodisaccharids

Die vorgeschlagene Ketozucker-Struktur erklärt das Auftreten der Hydrat-Peaks in den Massenspektren von 2, 3 und 6. Es ist bereits für die 3-Amino-3-deoxyaldo-4-ketopyranose 4-O-Didehydrovancosamin beschrieben worden [6], dass dieser Ketozucker zum überwiegenden Teil nicht in der Oxo-, sondern in der NMR- und massenspektrometrisch fassbaren Hydratform (gem. Diol) vorkommt. Da in den Salmycinen und ihren Derivaten mit dem Glucosylase-Baustein ebenfalls eine Aldoketose vorliegt, scheint dies eine allgemeine Eigenschaft von Ketozuckern zu sein. Die Bildung von je zwei Reduktionsprodukten bei der Hydrierung bzw. Deuterierung erklärt sich durch die nicht stereospezifische Reduktion der Carbonylgruppe.

Die hochauflösende Molmassenbestimmung von Salmycin A (1) ergab die Summenformel C₄₁H₇₀FeN₇O₂₁, welche gegenüber Salmycin B (2) zusätzlich NH aufweist. Da im MS das für das Keton charakteristische Hydrat nicht mehr beobachtet wurde, war die Annahme eines Oxims naheliegend. In der Tat erscheint in der HPLC des reinen, natürlichen 1 stets ein Doppelpeak, welcher auf ein *cis/trans*-Oxim-Gemisch hindeutet. Die Bestätigung für das Vorliegen eines Oxims erbrachte die leicht verlaufende Umsetzung von Salmycin B (2) mit Hydroxylamin bei pH 4,5, welche nahezu quantitativ zu Salmycin A (1) führte.

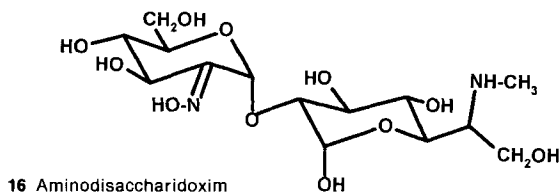
Das Salmycin C (3) mit der Bruttoformel C₄₀H₆₇FeN₆O₂₁ entspricht einem um eine CH₂-Gruppe niedrigeren Analogen des Salmycin B. Milde ammoniakalische Hydrolyse von 3 ergab den Siderophor 14, dessen Molekulargewicht 658 der Summenzusammenset-

Schema 4. Zuordnung der ESI-MS-Signale von Deferrinordanoxamin (15)



zung $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{FeN}_5\text{O}_{11}$, einem Nordanoxamin (nor-5; s. 5 in *Schema 1*), entspricht. Das mit EDTA gewonnene Deferrinordanoxamin (15; $\text{C}_{26}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_{11}$, MG. 605) zeigte im ESI-MS die gleichen Fragmente wie 7 und 8, aber um 14 Da niedrigere Molmassen (vgl. *Schema 2*). Daraus folgt, dass im N-terminalen Teil eine CH_2 -Gruppe weniger vorhanden ist.

In Analogie zur Umsetzung von 2 zu 1 liess sich Salmycin C (3) mit Hydroxylamin zum Oxim Salmycin D (4) umwandeln. Das so gewonnene 4 ergab bei pH 9 in wässriger Lösung ebenso Nordanoxamin (14 = nor-5; s. 5 in *Schema 1*) und ein (Methylamino)-disaccharid-oxim 16 wie das natürliche Salmycin D. Das durch HPLC-Technik gut handhabbare 16 ist identisch mit dem aus Salmycin A erhältlichen (Methylamino)-disaccharid-oxim.



Der letzte offene Punkt der Strukturaufklärung betraf die Verknüpfung zwischen dem Disaccharid-Teil und dem Siderophor. Die leichte Hydrolysierbarkeit der Salmycine im mild-alkalischen Milieu legt die Annahme einer Esterbindung zwischen dem Danoxamin und dem Aminodisaccharid nahe. Zur Überprüfung wurde 1 in H_2O -freiem MeOH mit trockenem NH_3 begast. Es entstanden der Danoxamin-methylester (17; s. 5 in *Schema 1*, mit COOMe statt COOH) und das (Methylamino)disaccharid-oxim 16. Da freies Dan-

oxamin (**5**) unter den gleichen Bedingungen keinen Methylester ergab, muss die Carboxylgruppe an der Verknüpfung beteiligt sein.

In den ESI-MS von Salmycin A (**1**) und B (**2**) treten die Fragmente 830,6 bzw. 815,5 auf, die belegen, dass beide Verbindungen zuerst ein C₈H₁₇NO₆-Molekül (–223), entsprechend der 6-Deoxy-6-(methylamino)heptose, abspalten und anschliessend die Hexose-Fragmente C₆H₇NO₄ (–157) bzw. C₆H₆O₄ (–142) verlieren. Damit ist bewiesen, dass das Danoxamin an der Hexose haften muss.

Im ¹H-NMR-Spektrum von Deferrisalmycin A (**18**) und Deferrisalmycin B (**19**; s. *Schema 1*) sind neben den α-glycosidischen Protonen (*d* bei ca. 5 ppm, *J* = 3 Hz) auch der tieffeldverschobene Teil eines *ABX*-Systems zu erkennen (Signale bei 4,35 ppm). Da die Zuordnung dieser Signale keineswegs gesichert war, wurde das ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von Deferrisalmycin B (**19**) in H₂O mittels Korrelationsspektren vollständig zugeordnet. Die kompletten NMR-spektroskopischen Daten sind in *Tab. 3* aufgelistet (zur Numerierung, s. **2**). Die so getroffenen Zuordnungen wurden durch eine ¹H,¹³C-Korrelation über Weitbereichskopplungen [7] überprüft und zusätzlich die Signale aller quartären C-Atome erfasst. Dieses Experiment bestätigte durch Weitbereichskorrelationen

Tab. 3. ¹³C- und ¹H-NMR-spektroskopische Daten von Deferrisalmycin B (**19**^a) in Wasser.
c = 15,0 mg/ml, T = 300 K; Multiplizität und Intensität in Klammern.

	δ(¹³ C)	δ(¹ H)		δ(¹³ C)	δ(¹ H)
C(1), α-D	176,0 (s, 1/2 C)	–	H–C(1'), α-D	99,6 (d, 1/2 C)	4,74 (s, 1/2 H)
C(1), β-D	176,1 (s, 1/2 C)	–	C(2'), α-D	94,0 (s, 1/2 C)	–
CH ₂ (2)	29,6 (t, 1 C)	2,68 (t, 2 H)	H–C(3'), α-D	74,4 (d, 1/2 C)	3,77 (d, 1/2 H)
CH ₂ (3)	27,9 (t, 1 C)	2,83 (t, 2 H)	H–C(4'), α-D	69,2 (d, 1/2 C)	3,60 (dd, 1/2 H)
C(4)	174,7 (s, 1 C)	–	H–C(5'), α-D	71,1 (d, 1/2 C)	4,15 (ddd, 1/2 H)
CH ₂ (5)	48,8 (t, 1 C)	3,60 (t, 2 H)	CH ₂ (6'), α-D	64,3 (t, 1/2 C)	4,31, 4,37 (2dd, je 1/2 H)
CH ₂ (6)	26,4 (t, 1 C)	1,60 (m, 2 H)	H–C(1''), α-D	90,3 (d, 1/2 C)	5,45 (d, 1/2 H)
CH ₂ (7)	23,9 (t, 1 C)	1,28 (m, 2 H)	H–C(2''), α-D	76,7 (d, 1/2 C)	3,62 (dd, 1/2 H)
CH ₂ (8)	28,8 (t, 1 C)	1,48 (m, 2 H)	H–C(3''), α-D	72,2 (d, 1/2 C)	3,78 (dd, 1/2 H)
CH ₂ (9)	40,2 (t, 1 C)	3,15 (t, 2 H)	H–C(4''), α-D	70,8 (d, 1/2 C)	3,50 (dd, 1/2 H)
C(10)	175,7 (s, 1 C)	–	H–C(5''), α-D	67,2 (d, 1/2 C)	4,21 (dd, 1/2 H)
CH ₂ (11)	31,4 (t, 1 C)	2,46 (t, 2 H)	H–C(6''), α-D	59,9 (d, 1/2 C)	3,58 (ddd, 1/2 H)
CH ₂ (12)	28,6 (t, 1 C)	2,77 (t, 2 H)	CH ₂ (7''), α-D	56,8 (t, 1/2 C)	3,86, 4,02 (2dd, je 1/2 H)
C(13)	174,7 (s, 1 C)	–	MeNH–C(6''), α-D	31,2 (q, 1/2 C)	2,77 (s, 3/2 H)
CH ₂ (14)	48,8 (t, 1 C)	3,60 (t, 2 H)	H–C(1'), β-D	100,8 (d, 1/2 C)	5,08 (s, 1/2 H)
CH ₂ (15)	26,4 (t, 1 C)	1,60 (m, 2 H)	C(2'), β-D	94,1 (s, 1/2 C)	–
CH ₂ (16)	23,9 (t, 1 C)	1,28 (m, 2 H)	H–C(3'), β-D	74,4 (d, 1/2 C)	3,73 (d, 1/2 H)
CH ₂ (17)	28,8 (t, 1 C)	1,48 (m, 2 H)	H–C(4'), β-D	69,2 (d, 1/2 C)	3,60 (dd, 1/2 H)
CH ₂ (18)	40,1 (t, 1 C)	3,15 (t, 2 H)	H–C(5'), β-D	71,0 (d, 1/2 C)	4,26 (ddd, 1/2 H)
C(19)	175,7 (s, 1 C)	–	CH ₂ (6''), β-D	64,3 (t, 1/2 C)	4,33, 4,37 (2dd, je 1/2 H)
CH ₂ (20)	31,4 (t, 1 C)	2,46 (t, 2 H)	H–C(1''), β-D	97,4 (d, 1/2 C)	4,81 (d, 1/2 H)
CH ₂ (21)	28,6 (t, 1 C)	2,77 (t, 2 H)	H–C(2''), β-D	79,0 (d, 1/2 C)	3,38 (dd, 1/2 H)
C(22)	174,7 (s, 1 C)	–	H–C(3''), β-D	75,1 (d, 1/2 C)	3,56 (dd, 1/2 H)
CH ₂ (23)	48,8 (t, 1 C)	3,61 (t, 2 H)	H–C(4''), β-D	70,8 (d, 1/2 C)	3,49 (dd, 1/2 H)
CH ₂ (24)	26,5 (t, 1 C)	1,62 (m, 2 H)	H–C(5''), β-D	71,8 (d, 1/2 C)	3,81 (dd, 1/2 H)
CH ₂ (25)	23,0 (t, 1 C)	1,29 (m, 2 H)	H–C(6''), β-D	60,4 (d, 1/2 C)	3,59 (ddd, 1/2 H)
CH ₂ (26)	31,8 (t, 1 C)	1,53 (m, 2 H)	CH ₂ (7''), β-D	56,7 (t, 1/2 C)	3,90, 4,02 (2dd, je 1/2 H)
CH ₂ (27)	62,5 (t, 1 C)	3,56 (t, 2 H)	MeNH–C(6''), β-D	31,7 (q, 1/2 C)	2,79 (s, 3/2 H)

^a) Numerierung willkürlich, s. 1–4.

zwischen den $CH_2(6)$ -Signalen der Glucose und dem Carbonyl-C-Atom des Succinats zugleich die Esterbindung zwischen dem Siderophor und der Glucose. Den Salmycinen A und B kommen demnach die Strukturformeln **1** und **2** zu.

Für die Formulierung der Struktur wurde die Konfiguration der D-Glucose gewählt. Zur Bestätigung wurde das Hydrierungsprodukt **9** in 4N CF_3COOH bei 100° hydrolysiert, und die entstandenen Zucker wurden durch Umkehrphasenchromatographie angereichert. Das dünnschichtchromatographisch als Glucose eingestufte Saccharid konnte mit D-Glucose-Oxydase, EC 1.1.3.4, umgesetzt werden, so dass in der Tat im nativen Antibiotikum Zucker der D-Konfiguration vorliegen müssen.

Diskussion. – Die aufgefundenen Salmycine sind aufgrund ihres Fe-Gehaltes und ihrer Hydroxamsäure-Struktur als Sideromycine einzuordnen. Von den bislang bekanntgewordenen Verbindungen dieser Reihe sind die Albomycine und Ferrocine Peptid-Antibiotika; die Ferrimycine besitzen Aromatenstrukturen. Das Danomycin und das damit identische A-22765 [8] wurde bisher nicht in reiner Form gewonnen, entsprechend unscharf konnte auch die chemische Charakterisierung ausfallen. Die veröffentlichten Daten, wie z. B. das Vorliegen einer Carbamoyl-Gruppe oder einer *O*-Methyl-Gruppe, weisen auf das Vorliegen unabhängiger Antibiotika hin, hingegen zeigen die ^{13}C -NMR-Spektren der eisenfreien Komponenten – soweit angegeben – die Übereinstimmung mit den publizierten Signalen [4]. Für die nahe Beziehung der Antibiotikafamilien sprechen darüber hinaus die gleiche Summenformel der A-Komponente, der gemeinsame Siderophor: Danoxamin sowie mehrere chemische Merkmale, wie z. B. die leichte Umwandlung des Salmycins A in Salmycin B.

Überraschende Aspekte eröffnet die gefundene Disaccharid-Einheit der Salmycine. Sie besteht aus einer Didehydrohexose, die glycosidisch mit einer basischen Heptose verknüpft ist. Die *arabino*-Hexopyranos-2-ulose ist als Glucoson das Zwischenprodukt zahlreicher synthetischer Arbeiten, in der Natur ist sie allerdings nur vereinzelt beschrieben worden. Bekannt geworden ist zuletzt ein pflanzliches Triterpensaponin: die Gymnem-Säure, die dieses Hexulopyranosid glycosidisch gebunden enthält [9]. Bemerkenswert ist das beobachtete regelmässige Auftreten der Hydratform der gewöhnlich als Keton formulierten Hexopyranos-2-ulose. Da die Wasseranlagerung zum festen geminalen Diol bereits beim 4,4-*O*-Didehydrovancosamin eindeutig belegt ist [6], kann für die Verbindungsklasse der 2-, 3- oder 4-Pyranosulosen allgemein mit einer Hydratbildung gerechnet werden, welche sich z. B. durch Fehlen eines ^{13}C -NMR-Carbonylsignals [10] oder durch charakteristische $[M + H_2O + H]^+$ -Peaks im MS bemerkbar macht.

Das an der Hexopyranos-2-ulose auftretende Oxim des Salmycin A (**1**) ist ein vergleichsweise seltenes Strukturmerkmal in der Naturstoffchemie. Von den mikrobiellen Antibiotika wurden lediglich die Nocardicine [11], Caerulomycine [12] und das LL-BO 1208 b [13] als Oxime beschrieben, daneben sind Inhaltsstoffe aus Schwämmen bekanntgeworden. Auffallend ist die unter sauren Bedingungen leicht ablaufende Hydrolyse von **1** in das Keton und Hydroxylamin, was ebenfalls mit der Neigung zur Hydratbildung in Zusammenhang gebracht werden kann.

Die 6-Deoxy-6-(methylamino)heptopyranose ist ein bisher nicht beschriebener Aminozucker. Das freie Aminodisaccharid zersetzt sich, auch in neutraler Lösung, rasch. Zur Erklärung wird z. B. eine Reaktion des intermediär auftretenden C(1)-Aldehydes mit der Methylamino-Gruppe angenommen.

Die gefundenen chemischen Merkmale werden in Zusammenhang mit der Wirkungsweise der Salmycine gesehen. Während der Siderophor, insbesondere in Fe-armen Medien, zur konzentrierenden Aufnahme der Antibiotika in die Gram-positive Zelle dient, ist das reaktionsfähige Aminoglycosid das wirksame Agens, das für die antibakterielle Aktivität verantwortlich ist. Die Hexopyranos-2-ulose kann chemisch verändert werden, ohne die antibakterielle Wirkung zu verlieren; so sind u. a. die Reduktionsprodukte antimikrobiell aktiv. Die Glucos-2-ulose scheint als Bindeelement zu dienen, welches den nötigen Abstand zwischen dem Siderophor und dem wirksamen Agens hält [14], daneben garantiert es die rasche Abtrennung des Gefechtskopfes vom Träger. Einmal in die Zelle aufgenommen kann das Antibiotikum an der leicht hydrolysierbaren Ester-Bindung gespalten und das sehr reaktionsfreudige Aminodisaccharid freigesetzt werden. Die gezielten Resorptions- und Freisetzungsmechanismen würden die aussergewöhnlich niedrigen Hemmkonzentrationen des Salmycins A von bis unter 0,01 mg/l erklären.

Für die Bereitstellung des Fermentationsmaterials im 200-l-Massstab sind wir den Herren Prof. Dr. D. Sukatsch und Dr. E. Ehlers zu Dank verpflichtet. Unsere besondere Anerkennung gilt Herrn M. Schiell, der nicht nur viele der schwierigen Experimente durchführte, sondern auch durch zahlreiche Anregungen zu den vorgestellten Ergebnissen beitrug. Herrn D. I. M. Weber danken wir für die Durchführung der NMR-Experimente und den Herren D. I. M. Girt und Kl. Schmalz für die Aufnahme der Massenspektren.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Anal. HPLC: Umkehrphasenträger ET 250/8/4 *Nucleosil 5 C₁₈-AB von Macherey-Nagel; Fluss 1,0 ml/min bei RT.; Detektion mittels Knauer-Monitoren durch Lichtabsorption bei 425 nm, bei reinem Material bei 210 nm; mobile Phase 20 mm Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5/MeCN bzw. 0,1% CF₃COOH/MeCN mit 5–15% Lösungsmittelanteilen. Präp. HPLC: in analoger Arbeitsweise mit der Pumpe Pharmacia LKB 2248. UV/VIS: λ_{max} (log ε) in nm. IR: in cm⁻¹. NMR: Bruker AM-400 und ARX-500. FAB-MS: ZAB 2-SEQ (VG Analytical). ESI-MS: BIO-Q (VG Biotech); in m/z (rel. Intensität).

Fermentation des Streptomyces violaceus 37290. DSM 8286 wurde als Vorkultur (500 ml/2-l-Erlenmeyer-Kolben) in folgendem Medium für 2 Tage bei 28° und 240 Rpm inkubiert: 1,5% Glucose, 1,5% Sojamehl, 5 ml 'Cornsteep' (flüssig), 0,2% CaCO₃ und 0,5% NaCl; pH 7,2. Die komplette Vorkultur diente als Inokulum für einen 12-l-Braun-Biostat-V-Fermenter mit 9 l Medium folgender Zusammensetzung: 2% Mannitol und Sojamehl; pH 7,5. Die Anzucht erfolgte für 2–3 Tage bei 28°, 200 Rpm und einer Belüftungsrate von 0,5 Volumen Luft pro Fermentervolumen und min.

Isolierung des Salmycin B (2) und C (3)¹. Das Kulturfiltrat des *Streptomyces violaceus*, DSM 8286 (180 l), wurde auf pH 2 gestellt, auf eine 17 l fassende *Diaion-HP-20-Säule (Mitsubishi Chem. Ind.) aufgetragen und nach dem Waschen mit 5% i-PrOH eluiert. Den antibakteriell wirksamen Säulenausfluss konzentrierte man mittels Ultrafiltration in einer DDS-20-Anlage (DK-4900 Nakskov) mit *Nadir-UF-CA-1-Membranen (Hoechst AG). Die Rechromatographie des Konzentrates auf 1 l *MCI Gel CHP 20 P (75–150 μ, Mitsubishi Chem. Ind.) mit 0,1% CF₃COOH/12% MeCN im Gradientenverfahren ergab nach Gefriertrocknung 6 g Rohprodukt, welches, auf 1 l *Fractogel TSK HW-40 (E. Merck) in 1% AcOH/MeOH 1:1 aufgetrennt, 480 mg 2/3 erbrachte. Die Trennung von 2/3 geschah auf 200 ml (32 mm × 250 mm) reverse Phase mit Phosphatpuffer/6% MeCN, die Entsalzung der komponentenreinen Fraktionen in der gleichen Versuchsanordnung phosphatfrei: 190 mg Salmycin B (2) und 1,5 mg Salmycin C (3).

2: t_R (anal. mit 7% MeCN in Phosphatpuffer): 11,7 min. UV/VIS: Endabsorption; 427 (3,3). IR: 3340, 2940, 1740, 1680, 1645, 1575, 1460, 1360, 1205, 1140, 1055, 840, 800, 725. HR-FAB-MS (Matrix NBA (3-Nitrobenzylalkohol), int. Referenz PEG): 1038,3941 ± 0,002 (C₄₁H₆₉FeN₆O₂₁⁺, ber. für [M + H]⁺ 1038,3943), 1056,406 ± 0,007 ([C₄₁H₆₉FeN₆O₂₁ + H₂O]⁺, ber. für [M + H + H₂O]⁺ 1056,4053). ESI-MS: 1056,6 (90, [M + H₂O + H]⁺), 1038,6 (100, [M + H]⁺), 815,5 (5, [M + H - C₈H₁₇NO₆]⁺), 673,6 (2).

3: t_R 8,42 min. ESI-MS: 1024,4 ([M + H]⁺), 1042,4 ([M + H + H₂O]⁺), 801,3, 659.

*Gewinnung des Salmycin A (1)*¹⁾. Das Antibiotikum wurde aus 180 l Kulturfiltrat bei neutralem pH an 17 l HP-20-Harz adsorbiert, mit 10% i-PrOH/H₂O eluiert und durch Ultrafiltration konzentriert. Trockenmasse: 150 g. Die Durchfiltration durch 4 l DEAE Sepharose 'fast flow' (Pharmacia) bei pH 7,0 ergab eine Mengenreduktion auf 22 g. Chromatographie an 1 l MCI-Gel in 20 mM Kaliumphosphat/MeCN (0–20%) zeitig nach Gefriertrocknung 6 g salzhaltiges Antibiotikum, welches an 4 l Fractogel TSK HW-40 mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer chromatographisch nachgereinigt wurde. Die gefriergetrockneten I-haltigen Fraktionen wurden zur Entsalzung mit MeOH extrahiert und ergaben nach erneuter Gefriertrocknung 290 mg I. HPLC (7,5% MeCN in Phosphatpuffer): *t_R* 7,9 und 8,75 min; cf. Salmycin B (2) 5,2 min. UV/VIS: Endabsorption; 430 (3,3). HR-FAB-MS (Matrix NBA, int. Referenz PEG): 1053,4052 ± 0,0006 (C₄₁H₇₀FeN₇O₂₁, ber. für [M + H]⁺ 1053,4052). ESI-MS: 1053,8 (100, [M + H]⁺), 830,6 (4, [M + H – C₈H₁₇NO₆]⁺), 673,2 (2).

Umwandlung des Salmycin A (1) in Salmycin B (2) und von 2 in 1. Eine wässr. Lsg. von 1 mg 1 wurde mit CF₃COOH auf pH 1,8 gestellt. Nach 16 h hatte sich 1 zu über 98% zu 2 umgewandelt, welches in keinem chromatographischen System, einschliesslich Überspritzung, vom natürlichen 2 unterschieden werden konnte.

Natürlich gewonnenes 2 wurde in einer Lsg. von 1 mg/ml bei pH 4,5 mit 1 mg/ml NH₂OH·HCl versetzt. Bereits nach 1 h war die Reaktion zu über 97% abgelaufen. Das entstandene 1 war chromatographisch identisch mit dem nativen Material, einschliesslich des Oxim-Isomerenmischens im Verhältnis von 2 zu 3.

Hydrolyse von 2 zum [Hydrogen-5,16,27,32-tetrahydroxy-4,12,15,23,26-pentaoxo-5,11,16,22,27-pentaazadotriacantanoato(3-)-O⁴,O⁵,O¹⁵,O¹⁶,O²⁶,O²⁷]eisen(III) (= Danoxamin; 5) und zum 6-Deoxy-2-O-(D-glucopyranos-2-ulosyl)-6-(methylamino)-D-heptopyranose (6). Der pH-Wert einer Lsg. von 120 mg 2 in 60 ml H₂O wurde mit NH₄OH-Lsg. auf 9,5 eingestellt (Hydrolysekontrolle mittels HPLC). Nachdem bei RT. 90% 2 abgebaut war, wurde das NH₃ im Vakuum abdestilliert und die neutrale konz. Lsg. auf einer 200 ml fassenden Nucleosil-12-C₁₈-AB-Säule aufgetrennt. Die Elution mit H₂O erbrachte nach Gefriertrocknung 15 mg 6, 10% MeCN im Gradientenverfahren 59 mg 5. 5: HPLC (Nucleosil 7 C₁₈ AB, Phosphatpuffer, pH 7,5/6% MeCN): *t_R* 8,20 min. [α]_D²¹ = –50 (c = 0,5, H₂O). ESI-MS: 673,4 ([M + H]⁺); d. h. MG. 672,5 der Summenformel C₂₇H₄₆FeN₅O₁₁.

In analoger Weise hydrolysierte man 8 mg 3: 5,5 mg Siderophor 14 (= nor-5). ESI-MS: 659,3 ([M + H]⁺).

Deferri-Produkte: 5,16,27,32-Tetrahydroxy-4,12,15,23,26-pentaoxo-5,11,16,22,27-pentaazadotriacantansäure (= Deferridanoxamin; 7) und 1,6,17-Trihydroxy-27-(hydroxyamino)-6,11,17,22-tetrazaheptacosan-7,10,18,21-tetron (8). Eine Lsg. von 30 mg 5 in 30 ml H₂O wurde mit 300 mg Na₂EDTA versetzt und bei RT. stehen gelassen, bis die Eigenfarbe von 5 verschwunden war (3 h). Danach wurden die Produkte durch präp. HPLC (200 ml Nucleosil 7 C₁₈ AB, 0,1% CF₃COOH/0–15% MeCN; Detektion bei 210 nm) gereinigt. Es resultierten nach Gefriertrocknung 12 mg 7 und 5,6 mg 8. ESI-MS (7): 620 (75, [M + H]⁺), 520 (24), 501 (20), 401 (15), 320 (48), 301 (100), 283 (17), 201 (67). ESI-MS (8): 520 (38, [M + H]⁺), 401 (14), 320 (20), 201 (100).

Disaccharid-Spaltprodukt 6. Die Rechromatographie des rohen 6 aus dem 2-Hydrolysat auf Nucleosil 100-7 C₁₈ AB (8 mm × 250 mm) mit 0,1% CF₃COOH in H₂O und Gefriertrocknung ergaben 6 mg reines 6. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 2,8 (d, J = 9, MeN); 3,4–4,3 (m); 4,6–5,5 (m). ESI-MS: 402 (100, [M + H + H₂O]⁺), 384 (96, [M + H]⁺), 366 (20, [M + H – H₂O]⁺), 224 (90, [M + H – C₆H₈O₅]⁺), 206 (32), 188 (42).

Reduktion von 2 mit NaBH₄: Gewinnung von 2',2'-O-Dihydrosalmycin B (9) und dessen Isomer. Zu einer Lsg. von 400 mg 2 in 50 ml 20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, fügte man vorsichtig körnchenweise NaBH₄ hinzu, so dass der pH nicht über 7,5 stieg. Der pH wurde durch Zugabe von verd. Phosphorsäure bzw. NaBH₄ auf 6,5–7,5 gehalten (Reaktionskontrolle mittels HPLC (0,1% CF₃COOH/7,5% MeCN)). Entsprechend der Konzentrationsabnahme von 2 (*t_R* 8,2 min) erschien im HPLC ein Doppelpack der Reduktionsprodukte (*t_R* 9,5 min). Gegen Reaktionsende trat eine zusätzliche Tetrahydro-Verbindung (*t_R* 11,6 min) auf. Die Umsetzung wurde durch Sauerstellen auf pH 2 abgebrochen und das Gemisch durch Hochdruckchromatographie (200 ml Nucleosil 12 C₁₈ AB, 0,1% CF₃COOH in 5% MeCN) isokratisch aufgetrennt. Die Produkte wurden gefriergetrocknet.

9: 102 mg. IR (KBr): 3310, 2940, 1785, 1675, 1620, 1575, 1460, 1360, 1200, 1145, 1060, 800, 740. FAB-MS: 1040 ([M + H]⁺). Tetrahydro-salmycin B: 6 mg. IR (KBr): 3320, 2940, 2870, 1785, 1680, 1620, 1575, 1460, 1440, 1200, 1140, 1050, 950, 840, 800, 740. FAB-MS: 1042 ([M + H]⁺).

Während die isomeren Reduktionsprodukte 9 antimikrobiell wirksam sind, ist die zweifach hydrierte Verbindung antibiotisch inaktiv.

Hydrolytische Spaltung von 9 und Acetylierung zu 1,3,4,7-Tetra-O-acetyl-6-[acetyl(methyl)amino]-6-deoxy-2-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosyl)-D-heptopyranose (10) und 3,4,5-Tri-O-acetyl-1,7:1,N-6-dianhydro-6-deoxy-6-(methylamino)-2-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosyl)-D-heptopyranose²⁾ (11). Der pH-Wert ei-

²⁾ Struktur nicht sicher belegt.

ner Lsg. von 100 mg **9** in 10 ml H₂O wurde mit 2N NH₄OH-Lsg. auf 9,5 eingestellt (Hydrolyse-Kontrolle mittels HPLC). Nach 2 h waren bereits 95% **9** zersetzt. Nach Stoppen der Reaktion durch Sauerstellen auf pH 2 wurden die Produkte durch Umkehrphasenchromatographie (Nucleosil 7 C₁₈ AB, Säule 20 mm × 250 mm, 0,1% CF₃COOH/7,5% MeCN) gereinigt (DC-Kontrolle (Butan-2-ol/AcOH/H₂O 4:1:1, Sprühreagenz α -Naphthol/H₂SO₄)). Die zuckerhaltigen und salzfreien Fraktionen wurden zusammengefasst und gefriergetrocknet. Acetylierung in Pyridin/Ac₂O 3:1, HPLC (Gradientenverfahren mit Puffer A (20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 4,6) und Puffer B (40% MeCN in 20 mM Kaliumphosphat, pH 4,6)), Konzentrieren der entsprechenden Fraktionen im Vakuum und CH₂Cl₂-Extraktion ergaben 4,9 mg **10** und 1,5 mg **11**.

10: ¹H-NMR: Tab. 1. ESI-MS: 764,5 ([M + H]⁺), 704,4 ([M – AcOH + H]⁺), 331,2.

11: ESI-MS: 662,5 ([M + H]⁺), 331,4.

Deuterierungsprodukte, Hydrolyse und Acetylierung zu den Zuckerderivaten 12 und 13. Wie für die NaBH₄-Reduktion von **2** beschrieben, wurden 120 mg **1** mit NaBD₄ (E. Merck, Darmstadt) zum einfachen Reduktionsprodukt umgesetzt und gereinigt. Die analog zu den oben beschriebenen durchgeführte ammoniakalische Hydrolyse (vgl. Hydrolyse von **9**), Zuckeranreicherung, Acetylierung und Reinigung der Acetylterivate erbrachten 0,1 mg **12** und 1,3 mg **13**). ¹H-NMR: Tab. 2.

Methanolyse von 1 zur 6-Deoxy-2-O-[2-deoxy-2-(hydroximino)-D-glucopyranosyl]-6-(methylamino)-D-heptopyranose (16) und zum Danoxamin-methylester (17). Durch eine dunkle Lsg. von 90 mg **1** in 25 ml H₂O-freiem MeOH wurde trockenes NH₃ geleitet (Reaktionskontrolle mittels HPLC (Phosphatpuffer/12,5% MeCN)). Während die Konzentration an **1** bereits in wenigen min stark abnahm (*t*_R 3,1 min), nahm die Menge eines neuen Stoffes **17** in gleichem Mass zu (*t*_R 4,3 min; cf. **5** *t*_R 6,5 min). Die Umsetzung wurde nach 30 min durch Anlegen von Vakuum zur Entfernung des NH₃ abgebrochen. Das zurückbleibende neutrale Konzentrat wurde in H₂O aufgenommen und auf eine 200-ml-Nucleosil-12-C₁₈-AB-Säule aufgetragen. Die Elution mit reinem H₂O erbrachte 9 mg **16**, die isokratische Elution mit 10,5% MeCN in 20 mM Phosphatpuffer, Entsalzung im CF₃COOH-System und Gefrier Trocknung 30 mg **17**. HPLC von **16** (0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, Nucleosil 5 C₁₈ AB, Detektion bei 205 nm): *t*_R 4,20 min.

16: ESI-MS: 399 ([M + H]⁺, C₁₄H₂₇N₂O₁₁⁺), 381 ([M – H₂O + H]⁺), 224 ([M – Hexopyranos-2-ulose-oxim (175)]⁺), 206 ([M – (175 + 18)]⁺).

17: ESI-MS: 687 ([M + H]⁺, C₂₈H₄₉FeN₅O₁₁⁺).

Deferrisalmycin A (18) und Deferrisalmycin B (19). Eine Lsg. von 100 mg **1** in 10 ml H₂O bei pH 7 wurde mit 50 mg EDTA versetzt. Nach 3 h verschwand die Farbe von **1**, und das Gemisch wurde auf einer 3,2 cm × 25 cm-Nucleosil-Säule (0,1% AcOH und 20% MeCN in 0,1% AcOH im Gradienten-Verfahren) gereinigt und anschliessend gefriergetrocknet: 51 mg **18**. Anal. HPLC (12,5% MeCN in 0,02M Kaliumphosphat, pH 7): *t*_R 8,1 min.

Analog wurden 35 mg **2** mit EDTA umgesetzt: 18 mg **19**, *t*_R 6,3 min.

18: ESI-MS: 1000,7 ([M + H]⁺, C₄₁H₇₄N₇O₂₁⁺), 982,9 ([M – H₂O + H]⁺).

19: ¹H-NMR: Tab. 3; Zuordnung mittels ¹H,¹H-Korrelation COSY [15] und ¹H,¹³C-Korrelation ('relayed' Spektrum [16]) mit 'low pass' *j*-Filter [17] sowie inverser Detektion [18]. ESI-MS: 1003,7 ([M + H + H₂O]⁺), 985,9 ([M + H]⁺, C₄₁H₇₃N₆O₂₁⁺).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. Bickel, E. Gäumann, G. Nussberger, P. Reusser, E. Vischer, W. Voser, A. Wettstein, H. Zähler, *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 2105.
- [2] G. Benz, T. Schröder, J. Kurz, C. Wünsche, W. Karl, G. Steffens, J. Pfitzner, D. Schmidt, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 552.
- [3] N. Katayama, Y. Nozaki, K. Okonogi, S. Harada, H. Ono, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 65.
- [4] P. Huber, H. Leuenberger, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 236.
- [5] L. Vértesy, W. Aretz, H.-W. Fehlhäber, *Hoechst Aktiengesellschaft*, EP 93 710014.7.
- [6] S. Chatterjee, E. K. S. Vijayakumar, S. R. Nadkarni, M. V. Patel, J. Blumbach, B. N. Ganguli, H.-W. Fehlhäber, H. Kogler, L. Vértesy, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3480.
- [7] A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093.
- [8] F. Knüsel, W. Zimmermann, 'Antibiotics, Mechanisms of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents', Eds. J. W. Corcoran und F. E. Hahn, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1975, Vol. III, S. 653; vgl. H. Bickel, E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, V. Prelog, E. Vischer, A. Wettstein, H. Zähler, *Experientia* **1960**, *16*, 129.

- [9] F. Kiuchi, H. M. Liu, Y. Tsuda, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 2326.
- [10] St. J. Angyal, D. Range, J. Defaye, A. Gadelle, *Carbohydr. Res.* **1979**, *76*, 121.
- [11] H. Aoki, H. Sakai, M. Kohsaka, T. Konomi, J. Hosoda, Y. Kubochi, E. Iguchi, H. Imanaka, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 492.
- [12] A. G. McInnes, D. G. Smith, J. A. Walter, J. L. C. Writh, L. C. Vining, G. P. Arsenaault, *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 1836.
- [13] J. H. E. J. Martin, J. P. Korby, D. B. Bordes, A. A. Fantini, R. T. Testa, *American Cyanamid Co.*, EP 58 838 1 1. Sept. 1982.
- [14] H. Zähler, H. Diddens, W. Keller-Schierlein, H.-U. Nägeli, *J. Antibiot.* **1977**, *30*, Suppl., 201.
- [15] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229.
- [16] H. Kessler, M. Bernd, H. Kogler, J. Zarbock, O. W. Sorensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6944.
- [17] H. Kogler, O. W. Sorensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 157.
- [18] L. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4481.