

ISOLIERUNG NEUER RHODOMYCINE

Hans Brockmann, Bernhard Scheffer und Carl Stein

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität
Göttingen und dem Institut der Gesellschaft für Molekular-
biologische Forschung mbH, Stockheim über Braunschweig

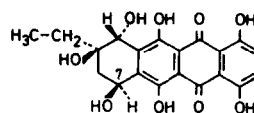
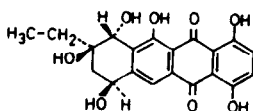
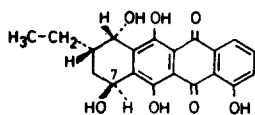
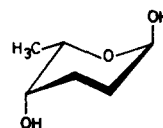
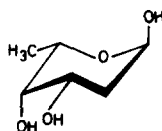
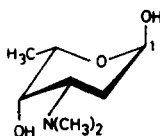
(Received in Germany 29 July 1973; received in UK for publication 6 August 1973)

Streptomyces-Arten mit der Fähigkeit Rhodomycinon-glykoside (Rhodomycine) zu synthetisieren, bilden in der Regel Rhodomycingemische, deren Komponenten sich sowohl in der Konstitution und Konfiguration des Aglykons wie in Zahl, Stellung und Struktur der Zuckerreste unterscheiden können ^{1,2}). Die Auftrennung in die einzelnen Rhodomycine – durch Gegenstromverteilung oder Verteilungschromatographie bisher nur unvollkommen zu erreichen – gelang durch Schichtchromatographie an Phosphat- und NaHCO₃-Kieselgel ³). Ausgangsmaterial war ein aus Mycel und Kulturlosung eines Streptomyces purpurascens-Stammes mit Aceton bzw. Butanol extrahiertes, durch Austauschchromatographie (Chloroform/Carboxymethylcellulose, Elution mit 10 proz. KH₂PO₄-Lösung ⁴) von allen nichtbasischen Begleitstoffen befreites, durch Verteilungschromatographie (Cellulose, Butanol/0.08 M Phosphatpuffer pH 5.8) angereichertes "Rhodomycingemisch".

Hydrolyse (1 proz. H₂SO₄, 4 h, 80°C) gab als Aglykone: β-Rhodomycinon (1a) ⁵) (Hauptkomponente), α₂-Rhodomycinon (2) ⁵), β-Iso-rhodomycinon (3a) ⁵), α-Iso-rhodomycinon (3b) ⁵), γ-Rhodomycinon (1b) ⁵); und als Zucker: L-Rhodosamin (4a) ⁶), 2-Desoxy-L-fucose (5) und L-Rhodinose (6) ⁷). Identifizierung: 1. Aglykone, Ring-Papierchromatogramm (Tetralin/Dekalin/Eisessig/Wasser, 5 : 5 : 1 : 10); DC, Oxalsäure-Kieselgel G (Chloroform/Aceton, 2 : 5); 2. Zucker, DC, neutrales Kieselgel G (Chloroform/Aceton, 1 : 1) ⁶). Isolierung ^{6,7}), 4a als 4b, Schmp. 69 - 72°C, $[\alpha]_D^{20}$: - 18 ± 1° (Aceton); NMR (CDCl₃). 5 kristallisiert, Schmp. 94 - 97°C; $[\alpha]_D^{20}$: - 130 ± 2° (Aceton). 6, NMR (CDCl₃), 2.4-Dinitrophenylhydrazon, Schmp. 116 - 118°C, $[\alpha]_D^{20}$: 15 ± 1° (Pyridin), 1-Methyl-rhodinosid ⁹), NMR (CDCl₃), $[\alpha]_D^{20}$: - 82 ± 1° (Aceton).

Vortrennung von "Rhodomycingemisch" (500 mg) aus Chloroform/Aceton/Methanol (4 : 1 : 1) auf 0.8 mm × 20 × 100 cm Phosphat-Kieselgel-Schicht (DC Pulver, Schleicher & Schull, mit 0.5 M Phosphatpuffer pH 6.4 angerührt und lufttrockene Schicht 4 h auf 120°C erhitzt) gab etwa 15 Zonen. Die Inhaltsstoffe der Hauptzonen chromatographierte man aus Chloroform/Aceton/Methanol (80 : 20 : 6) auf NaHCO₃-Kieselgelschicht (0.2 × 20 × 20 cm, Kieselgel mit 5 proz.

NaHCO₃-Lösung angerührt, lufttrockene Schicht 4 h auf 120°C erhitzt); und die Inhaltsstoffe der Hauptzonen eventuell nochmals auf gleicher Schicht aus Chloroform/Aceton/Methanol (80 : 20 : 3) oder an Cellulosesäulen aus Butanol/Dibutyläther/0.1 M Phosphatpuffer pH 6.4, enthaltend 3% Natrium-1.4-anthrachinon-2.7-disulfonat (9 : 1 : 10).

1ab : H statt OH an C-7c : 7-OH, 10-OH veräthert mit 1-OH von 4ad : H statt OH an C-7 ; 10-OH veräthert mit 1-OH von 4a23ab : epimer an C-74ab : CH₃CO₂ statt 1-OH ;
epimer an C-156

Isoliert wurden drei chromatographisch einheitliche, aus Äthylacetat und dann aus Benzol mit Cyclohexan umgefällte, amorphe Rhodomycine. Das eine (MHK : 0.3 μ /ml bei *St. aureus* und *B. subtilis*) gab mit 1 proz. H₂SO₄ (4 h, 80°C) chromatographisch reines β -Rhodomycinon (1a) sowie 4a und 6.

100 MHz-NMR (CDCl₃) : δ 7.0 - 8.0 ppm, Signale von 3 Aromat-H ; s 2.18 (12) 2 N(CH₃)₂ entsprechend zwei 4a-Resten (Roa).

UV (BPES-Puffer, pH 7.0, Ionenstärke $\mu = 0.2$) : Hauptmaximum λ_{\max} 497 ($\alpha = 13.0$) nm ; Chloroform : 537 (10.2), 523 (11.0), 502 (14.9) nm. Die Absorptionskurve gleicht der von β -Rhodomycin II (1c)¹. Hauptmaximum von 1c (BPES-Puffer, pH 7.0) : 497 ($\epsilon = 13\ 900$) nm ; Chloroform : 500 ($\epsilon = 15\ 600$) nm. Nimmt man an, daß das neue Rhodomycin in BPES-Puffer und Chloroform die gleichen ϵ -Werte hat wie 1c (Mol. Gew. 700.7), so errechnet sich aus seinen α -Werten (Puffer 13.0, Chloroform 14.9) und dem ϵ_{\max} 13 900 bzw. 15 600 von 1c ein Mol. Gew. von 1070 \pm 40 bzw. 1050 \pm 40 ; in guter Übereinstimmung mit dem osmometrisch

in Chloroform ermittelten Wert 1030 ± 30 . Danach sind drei $\underline{6}$ -Reste (Rod) vorhanden und das neue Rhodomycin ist ein Glykosid $C_{54}H_{78}N_2O_{18}$ (1043.3), das wir als β -Rhodomycin [Ro α_2 , Rod $\underline{3}$] bezeichnen.

Das zweite neue Rhodomycin (MHK : St.aureus 1.3 γ /ml, B.subtilis 2.5 γ /ml) gab mit 1 proz. H_2SO_4 chromatographisch einheitliches γ -Rhodomycinon (1b) sowie 4a und 6. NMR(CCl_4): δ 7.0 - 7.9 ppm, Signale von 3 Aromat-H ; s 2.23 (12), 2 N(CH $_3$) $_2$ entsprechend zwei 4a-Resten (Ro α).

UV (Chloroform) : Hauptmaximum λ_{max} 499 ($\alpha = 19.4$) nm. Nimmt man an, daß dessen molare Extinktion praktisch ebenso groß ist wie beim Hauptmaximum von γ -Rhodomycin I (1d)¹⁾ (Mol. Gew. 527.5, λ_{max} : 497 ($\epsilon = 14\ 900$), so ergibt sich aus $\alpha = 19.4$ das Mol. Gew. 770 ± 30 ; in befriedigender Übereinstimmung mit dem osmometrisch (Chloroform) gefundenen Wert 807 ± 16 . Dementsprechend wäre unser Antibioticum ein γ -Rhodomycin [Ro α_2 , Rod] $C_{42}H_{58}N_2O_{13}$ (798.9).

Das dritte Rhodomycin (MHK : St.aureus 1.3 γ /ml, B.subtilis 2.5 γ /ml) gab mit 1 proz. H_2SO_4 chromatographisch reines γ -Rhodomycinon (1b) sowie 4a, 5 und 6. NMR ($CDCl_3$) : δ 7.1 - 7.9 ppm, Signale von 3 Aromat-H ; s 2.29 (6), 1 N(CH $_3$) $_2$ entsprechend einem 4a-Rest (Rod).

UV (Chloroform) : Hauptmaximum λ_{max} 499 ($\alpha = 19.5$) nm. Unter der Voraussetzung, daß ϵ_{499} praktisch den gleichen Wert hat wie ϵ_{497} (14 900) von 1d, errechnet sich aus $\alpha = 19.5$ das Mol. Gew. 760 ± 25 . Dementsprechend läge ein γ -Rhodomycin[deoFuc, Ro α , Rod] $C_{40}H_{53}NO_{14}$ (771.9) vor.

Die hier verwendete Nomenklatur der Rhodomycine - Name nach dem als Aglykon vorliegenden Anthracyclinon und in [] alphabetisch die Symbole der Zuckerreste - kann, wenn Stellung und Sequenz der Reste bekannt, leicht erweitert werden ; z. B. : β -Rhodomycin-II \equiv β -Rhodomycin[(7)Ro α] [(10)Ro α], β -Rhodomycin-IV¹⁾ \equiv β -Rhodomycin [(7)Ro α -deoFuc-Rod] [(10)Ro α] (Zuckerreste hier im Sinne der Sequenz durch Striche verbunden, beginnend mit dem am Aglykon stehenden Rest.

Gegenstromverteilung [400-stufige Apparatur Modell "Ronor", Tetrachlorkohlenstoff/Li-groin/Methanol/Wasser (11 : 1 : 10 : 2)] trennte das "Rhodomycingemisch" in zwei Fraktionen von denen die lipophilere, antibiotisch wirksamere (MHK : St.aureus 0.08 γ /ml, B.subtilis 0.15 γ /ml) bei Hydrolyse 4a, 5 und 6 sowie 1a und in geringer Ausbeute 2 und 3a lieferte. Die bei präparativer Trennung^{6, 8)} erhaltenen Ausbeuten an 1a + 2 + 3a, 4a, 5 und 6 standen im molaren Verhältnis 1 : 2 : 0.9 : 1.8. Bemerkenswert ist die hohe antibiotische Wirksamkeit

bei Mycoplasmen (MHK : 0.001 - 0.008 γ /ml) ¹⁰⁾.

Aus dieser Fraktion wurden, wie in der folgenden Mitteilung beschrieben, vier neue β -Rhodomycine und ein β -Iso-rhodomycin isoliert ¹¹⁾, deren MHK-Werte (B. subtilis) bei 0.08 - 0.18 γ /ml lagen.

REFERENCES

1. H. Brockmann, Th. Waehnelde und J. Niemeyer, Tetrahedron Lett. **1969**, 1415.
2. H. Brockmann und Th. Waehnelde, Naturwissenschaften **48**, 717 (1961).
3. C. Stein, Dissertat. Univ. Göttingen 1972 .
4. Zuerst bei Isolierung der γ -Rhodomycine ²⁾ angewandt ; Th. Waehnelde, Diplomarb. Univ. Göttingen 1960.
5. H. Brockmann, H. Brockmann jr. und J. Niemeyer, Tetrahedron Lett. **1968**, 4719.
6. H. Brockmann, E. Spohler und Th. Waehnelde, Chem. Ber. **96**, 2925 (1963).
7. H. Brockmann und Th. Waehnelde, Naturwissenschaften **50**, 43 (1963).
8. B. Scheffer, Dissertat. Univ. Göttingen 1970.
9. S. Barcza, M. Brufani, W. Keller-Schierlein und H. Zähler, Helv. Chim. Acta **49**, 1736 (1966).
10. Die Werte verdanken wir Herrn Prof. Dr. K. Bartmann, Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld.
11. H. Brockmann und H. Greve, Tetrahedron Lett., in Vorbereitung.