

## 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

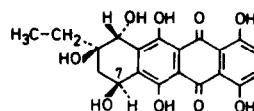
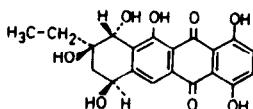
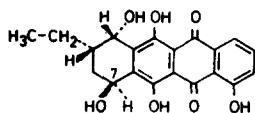
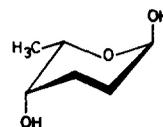
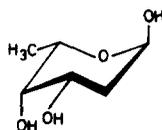
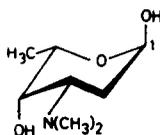
(Received in Germany 29 July 1973; received in UK for publication 6 August 1973)

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 <sup>1,2</sup>). Die Auftrennung in die einzelnen Rhodomycine – durch Gegenstromverteilung oder Verteilungschromatographie bisher nur unvollkommen zu erreichen – gelang durch Schichtchromatographie an Phosphat- und NaHCO<sub>3</sub>-Kieselgel <sup>3</sup>). Ausgangsmaterial war ein aus Mycel und Kulturlosung eines Streptomyces purpurascens-Stammes mit Aceton bzw. Butanol extrahiertes, durch Austauschchromatographie (Chloroform/Carboxymethylcellulose, Elution mit 10 proz. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung <sup>4</sup>) von allen nichtbasischen Begleitstoffen befreites, durch Verteilungschromatographie (Cellulose, Butanol/0.08 M Phosphatpuffer pH 5.8) angereichertes "Rhodomycingemisch".

Hydrolyse (1 proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 h, 80°C) gab als Aglykone:  $\beta$ -Rhodomycinon (1a) <sup>5</sup>) (Hauptkomponente),  $\alpha_2$ -Rhodomycinon (2) <sup>5</sup>),  $\beta$ -Iso-rhodomycinon (3a) <sup>5</sup>),  $\alpha$ -Iso-rhodomycinon (3b) <sup>5</sup>),  $\gamma$ -Rhodomycinon (1b) <sup>5</sup>); und als Zucker: L-Rhodosamin (4a) <sup>6</sup>), 2-Desoxy-L-fucose (5) und L-Rhodosinose (6) <sup>7</sup>). 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) <sup>6</sup>). Isolierung <sup>6,7</sup>), 4a als 4b, Schmp. 69 - 72°C,  $[\alpha]_D^{20}$ : - 18  $\pm$  1° (Aceton); NMR (CDCl<sub>3</sub>). 5 kristallisiert, Schmp. 94 - 97°C;  $[\alpha]_D^{20}$ : - 130  $\pm$  2° (Aceton). 6, NMR (CDCl<sub>3</sub>), 2.4-Dinitrophenylhydrazon, Schmp. 116 - 118°C,  $[\alpha]_D^{20}$ : 15  $\pm$  1° (Pyridin), 1-Methyl-rhodosinid <sup>9</sup>), NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20}$ : - 82  $\pm$  1° (Aceton).

Vortrennung von "Rhodomycingemisch" (500 mg) aus Chloroform/Aceton/Methanol (4 : 1 : 1) auf 0.8 mm  $\times$  20  $\times$  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 NaHCO<sub>3</sub>-Kieselgelschicht (0.2  $\times$  20  $\times$  20 cm, Kieselgel mit 5 proz.

NaHCO<sub>3</sub>-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 : CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> statt 1-OH ;  
epimer an C-156

Isoliert wurden drei chromatographisch einheitliche, aus Athylacetat und dann aus Benzol mit Cyclohexan umgefällte, amorphe Rhodomycine. Das eine (MHK : 0.3  $\mu$ /ml bei *St. aureus* und *B. subtilis*) gab mit 1 proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 h, 80°C) chromatographisch reines  $\beta$ -Rhodomycinon (1a) sowie 4a und 6.

100 MHz-NMR (CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.0 - 8.0 ppm, Signale von 3 Aromat-H ;  $s$  2.18 (12) 2 N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> entsprechend zwei 4a-Resten (Roa).

UV (BPES-Puffer, pH 7.0, Ionenstärke  $\mu = 0.2$ ) : Hauptmaximum  $\lambda_{\max}$  497 ( $\alpha = 13.0$ ) nm ; Chloroform : 537 (10.2), 523 (11.0), 502 (14.9) nm. Die Absorptionskurve gleicht der von  $\beta$ -Rhodomycin II (1c)<sup>1</sup>. 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  $\epsilon$ -Werte hat wie 1c (Mol. Gew. 700.7), so errechnet sich aus seinen  $\alpha$ -Werten (Puffer 13.0, Chloroform 14.9) und dem  $\epsilon_{\max}$  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  $1030 \pm 30$ . 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  $\beta$ -Rhodomycin [Ro $\underline{a}_2$ , Rod $\underline{3}$ ] bezeichnen.

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

UV (Chloroform) : Hauptmaximum  $\lambda_{max}$  499 ( $\alpha = 19.4$ ) nm. Nimmt man an, daß dessen molare Extinktion praktisch ebenso groß ist wie beim Hauptmaximum von  $\gamma$ -Rhodomycin I (1d)<sup>1)</sup> (Mol. Gew. 527.5,  $\lambda_{max}$  : 497 ( $\epsilon = 14\ 900$ ), so ergibt sich aus  $\alpha = 19.4$  das Mol. Gew.  $770 \pm 30$  ; in befriedigender Übereinstimmung mit dem osmometrisch (Chloroform) gefundenen Wert  $807 \pm 16$ . Dementsprechend wäre unser Antibioticum ein  $\gamma$ -Rhodomycin [Ro $\underline{a}_2$ , Rod]  $C_{42}H_{58}N_2O_{13}$  (798.9).

Das dritte Rhodomycin (MHK : St.aureus 1.3  $\gamma$ /ml, B.subtilis 2.5  $\gamma$ /ml) gab mit 1 proz.  $H_2SO_4$  chromatographisch reines  $\gamma$ -Rhodomycinon (1b) sowie 4a, 5 und 6. NMR ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  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  $\lambda_{max}$  499 ( $\alpha = 19.5$ ) nm. Unter der Voraussetzung, daß  $\epsilon_{499}$  praktisch den gleichen Wert hat wie  $\epsilon_{497}$  (14 900) von 1d, errechnet sich aus  $\alpha = 19.5$  das Mol. Gew.  $760 \pm 25$ . Dementsprechend läge ein  $\gamma$ -Rhodomycin[deoFuc, Ro $\underline{a}$ , 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. :  $\beta$ -Rhodomycin-II  $\equiv$   $\beta$ -Rhodomycin[(7)Ro $\underline{a}$ ] [(10)Ro $\underline{a}$ ],  $\beta$ -Rhodomycin-IV<sup>1)</sup>  $\equiv$   $\beta$ -Rhodomycin [(7)Ro $\underline{a}$ -deoFuc-Rod] [(10)Ro $\underline{a}$ ] (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  $\gamma$ /ml, B.subtilis 0.15  $\gamma$ /ml) bei Hydrolyse 4a, 5 und 6 sowie 1a und in geringer Ausbeute 2 und 3a lieferte. Die bei präparativer Trennung<sup>6, 8)</sup> 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  $\gamma$ /ml) <sup>10)</sup>.

Aus dieser Fraktion wurden, wie in der folgenden Mitteilung beschrieben, vier neue  $\beta$ -Rhodomycine und ein  $\beta$ -Iso-rhodomycin isoliert <sup>11)</sup>, deren MHK-Werte (B. subtilis) bei 0.08 - 0.18  $\gamma$ /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  $\gamma$ -Rhodomycine <sup>2)</sup> 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.