

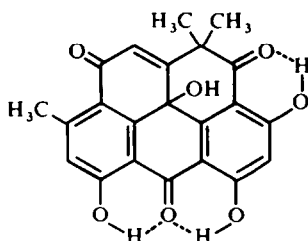
ZUR KONSTITUTION DES ANTIBIOTIKUMS RESISTOFLAVIN

K. ECKARDT, H. FRITZSCHE und D. TRESSELT

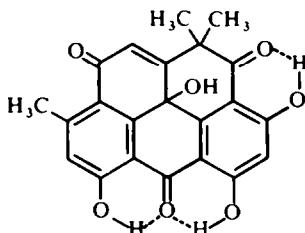
Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Deutschen Akademie der
Wissenschaften zu Berlin, Jena, Beutenbergstrasse 11
Abteilung Antibiotika-Chemie und Biophysikochemie

(Received in Germany 22 July 1970. Received in the UK for publication 17 August 1970)

Zusammenfassung—Für das neue Antibiotikum Resistoflavin wird auf Grund einiger chemischer Umsetzungen, IR- und NMR-Untersuchungen im Vergleich zu dem verwandten Antibiotikum Resistomycin die folgende Strukturformel vorgeschlagen:



Abstract—By means of chemical reactions, IR and NMR studies in comparison with the related antibiotic resistomycin the following structure has been proposed for the new antibiotic resistoflavin:



KÜRZLICH wurde über die Isolierung des neuen Antibiotikums Resistoflavin aus Kulturansätzen einer Selektante des Streptomycesstammes JA 3733 berichtet.¹ Das Antibiotikum wurde gemeinsam mit dem erstmals von Brockmann *et al.*² beschriebenen Resistomycin durch Mycelextraktion in Form von grüngelben, lichtempfindlichen Nadeln vom Schmelzpunkt 238–240° Zers. erhalten. Im Folgenden wird eine Konstitutionsformel für das Antibiotikum vorgeschlagen.

Für Resistoflavin wurde die Summenformel $C_{22}H_{16}O_7$ aus den Analysendaten und Massenspektren ermittelt. Das Antibiotikum ist optisch aktiv und hat ungesättigten Charakter. $KMnO_4$ wird durch Lösungen des Antibiotikums oder seiner Acetate in Eisessig im Gegensatz zu dem strukturverwandten Resistomycin und Resistomycintetraacetat rapide entfärbt.

Durch kurze Einwirkung von Essigsäureanhydrid in Pyridin entsteht aus Resistoflavin ein Triacetat, das im IR-Spektrum nur eine Acetyl-Carbonylvalenzschwingungsbande bei 1782 cm^{-1} aufweist. Demnach gehören drei Sauerstoffatome zu phenolischen bzw. enolischen Hydroxylgruppen. Weiterhin zeigt das IR-Spektrum des Triacetates in CHCl_3 eine konzentrationsunabhängige OH-Valenzschwingungsbande bei 3560 cm^{-1} ; bei höheren Konzentrationen zusätzlich eine Bande bei 3390 cm^{-1} der intermolekularen Assoziation. Bei längerer Acetylierungsdauer wird ein Tetraacetat erhalten, das im IR-Spektrum (CHCl_3) keine OH-Valenzschwingungsbande mehr aufweist, jedoch eine zweite Acetyl-Carbonylbande als Schulter bei 1755 cm^{-1} . Diese IR-spektroskopischen Befunde und die erschwerte Acetylierbarkeit sprechen für eine vierte Hydroxylgruppe mit tertiärem Charakter. Die besondere Stellung dieser vierten Hydroxylgruppe zeigt sich auch bei der Verseifung der Acetate. Während das Triacetat mit methylalkoholischem Alkali glatt zum Ausgangsantibiotikum zurückverseift wird, findet beim Tetraacetat unter gleichen Bedingungen eine Abspaltung der tertiären Acetoxygruppe statt.

TABELLE 1. LAGE DER INFRAROTABSORPTIONSMAXIMA (IN cm^{-1}), RELATIVE BANDENINTENSITÄTEN (NORMIERT AUF DIE INTENSITÄTEN DER CARBONYLVALENZSCHWINGUNGSBANDEN DER ACETATGRUPPEN) UND ZUORDNUNGEN IM CARBONYLVALENZSCHWINGUNGSBEREICH

| | | Zuordnung | Intensität (normiert) |
|---------------------------|------|--|-----------------------|
| Resistomycin* | 1603 | $\text{C}_6=\text{O}$ | |
| | 1633 | $\text{C}_2=\text{O}$ | |
| Resistoflavin | 1604 | $\text{C}_6=\text{O}$ | |
| | 1648 | $\text{C}_2=\text{O}$ | |
| Resistomycin-tetraacetat | 1667 | $\text{C}_{10}=\text{O}$ | |
| | 1658 | $\text{C}_6=\text{O}$ | 0.9 |
| | 1697 | $\text{C}_6=\text{O}$ | 0.4 |
| | 1782 | Acetat | 4.0 |
| Resistoflavin-triacetat | 1672 | $\text{C}_6=\text{O}$ | 1.0 |
| | 1695 | $\left\{ \begin{array}{l} \text{C}_2=\text{O} \\ \text{C}_{10}=\text{O} \end{array} \right.$ | } 0.8 |
| | | 1782 | |
| Resistoflavin-tetraacetat | 1670 | $\text{C}_6=\text{O}$ | 0.7 |
| | 1692 | $\left\{ \begin{array}{l} \text{C}_2=\text{O} \\ \text{C}_{10}=\text{O} \end{array} \right.$ | } 0.9 |
| | | 1755sh | |
| 1776 | | | |
| Anthron | 1667 | | |

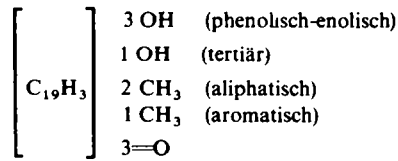
* Siehe auch Brockmann *et al.*³
Alle Spektren in CHCl_3 -Lösung.

Der Nachweis der dritten Carbonylgruppe war anfangs zweifelhaft. Während nämlich im IR-Spektrum des Resistoflavins einwandfrei drei Carbonylvalenzschwingungsbanden identifiziert werden können, sind sowohl im Tri- als auch im Tetraacetat ausser den zusätzlich auftretenden Acetatbanden nur noch zwei Absorptionsbanden in diesem Bereich zu beobachten. Diese Diskrepanz konnte jedoch später geklärt werden. Eine quantitative Auswertung der Bandenintensitäten im Vergleich zu dem strukturanalogen Resistomycintetraacetat ergab nämlich, dass der Bande bei 1695 bzw. 1692 cm^{-1} zwei bei gleicher Wellenzahl absorbierende Carbonylgruppen zuzuordnen sind. Die relative Bandenintensität ist mit 0.8 bzw. 0.9 doppelt so hoch wie die entsprechende Bande des Resistomycintetraacetates (0.4).

Die Analyse der IR-Spektren des Resistoflavins im Carbonylvalenzschwingungsbereich ergab drei konjugierte Carbonylgruppen, von denen mindestens zwei cheliert sind, da die entsprechenden Banden nach Acetylierung zu grösseren Wellenzahlen verschoben sind. (Tab. 1).

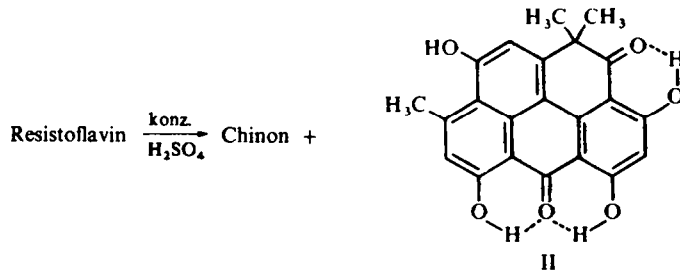
Die NMR-Spektren zeigen Signale für eine aromatische und zwei aliphatische Methylgruppen sowie drei Aromat/Olefin-Protonen (Abb. 1 und 2). Damit sind alle 16 H-Atome des Moleküls erfasst.

Zusammenfassend ergibt sich I als Partialformel für Resistoflavin, wobei 16–19 C-Atome auf das Grundgerüst entfallen.



I

Einige chemische Reaktionen geben über den Grundkörper der Substanz und die Stellungen der funktionellen Gruppen Auskunft. So zeigt das Antibiotikum in konzentrierter Schwefelsäure eine intensiv grüngelbe Fluoreszenz, wie sie auch bei dem Antibiotikum Resistomycin gefunden wurde.² Auch die Elektronenspektren sind in konzentrierter H_2SO_4 nahezu identisch, während die Spektren in organischen Lösungsmitteln starke Unterschiede aufweisen. Die präparative Umsetzung ergab, dass Resistoflavin durch Einwirkung von konzentrierter H_2SO_4 bei Zimmertemperatur in ein rotes Chinon sowie eine gelbe Verbindung umgesetzt wird, die sich als identisch mit Resistomycin (II) erwies:

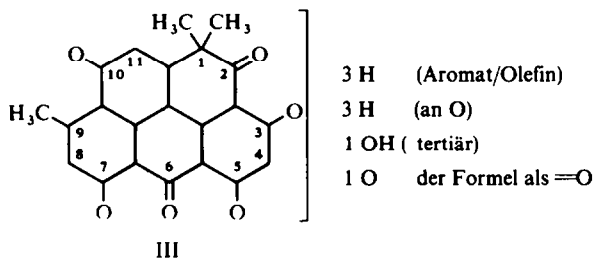


Die chemische Konstitution des Resistomycins wurde kürzlich von Brockmann *et al.*³ sowie Bailey *et al.*⁴ aufgeklärt. Da wir dieses Antibiotikum gleichzeitig mit Resistoflavin aus Kulturansätzen unseres Stammes isoliert hatten,¹ konnten direkte Vergleichsuntersuchungen durchgeführt werden, die die Ableitung eines Konstitutionsvorschlages für das neue Resistoflavin erlauben. Die beschriebene Umsetzung des Resistoflavins in das um ein O-Atom ärmere Resistomycin erfolgt auch durch kurzes Erhitzen über den Schmelzpunkt. Schliesslich wurde nach einer unter milderen Bedingungen verlaufenden Umsetzung gesucht. Eine solche Reaktion findet mit KJ in Eisessig bei 70° statt und führt schon nach 10 Minuten zu einer fast vollständigen Reaktion, wobei als Hauptprodukt wiederum II entsteht.

Bei allen drei Reaktionen erfolgt also der Übergang zu dem stabilen Resistomycin

unter 1. Verlust einer Carbonylgruppe, 2. Verlust einer tertiären Hydroxylgruppe und 3. Entstehung eines weiteren, phenolisch-enolischen Hydroxyls.

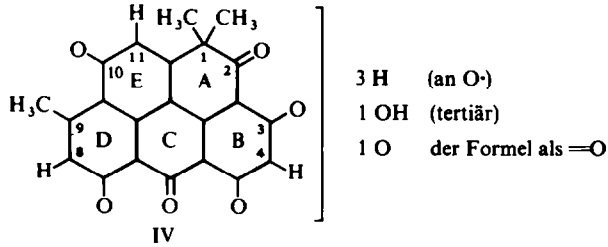
Da weiterhin unser Antibiotikum wie auch Resistomycin nur drei Aromat/Olefin-Protonen und keine aliphatischen H enthält, ist Resistoflavin als ein sauerstoffreicheres Derivat des Resistomycins aufzufassen, das auch das gleiche Kohlenstoffgerüst mit den drei Methylgruppen an C₁ und C₉ enthalten muss. Allerdings erscheinen die beiden geminalen Methylgruppen im NMR-Spektrum des Resistoflavins als zwei getrennte Signale, während für die Protonen der gleichen Methylgruppen im NMR-Spektrum des Resistomycins nur ein Signal zu finden ist (vergl. auch Brockmann *et al.*³ sowie Bailey *et al.*⁴). Dies ist ein Hinweis, dass wesentliche Unterschiede der beiden Formeln in der Nähe des C₁ liegen. Nach Vergleichen der IR-Spektren (Tab. 1) bleiben beim Übergang zum Resistomycin zwei der drei Carbonylgruppen unbeeinflusst, und zwar die C=O-Gruppen an C₂ und C₆. Berücksichtigt man schliesslich, dass durch die drei genannten Reaktionen keine Einführung von OH-Gruppen durch Neuknüpfung von C—O-Bindungen möglich ist und demnach die Positionen 3, 5, 7 und 10 auch im Resistoflavin mit O-Atomen besetzt sind, so ergibt sich als neue Teilformel III:



Welche von den phenolischen Hydroxylen des Resistomycins im Resistoflavin fehlt, lässt sich aus diesen Ergebnissen noch nicht ableiten.

Die dem Resistomycin analoge Anordnung III wird durch die Lokalisierung der drei Aromat/Olefin-Protonen gestützt, die aufgrund ihres Bindungscharakters nur am äussersten Ringgerüst stehen können. Das Signal bei 6.92 ppm ist gegenüber den beiden anderen Protonensignalen verbreitert, bei stark gespreizter Registrierung erkennt man vier Hyperfeinstrukturlinien, was durch eine Kopplung mit der aromatischen CH₃-Gruppe an C₉ erklärt werden kann. Es gehört demnach zu einem Proton an C₈. Diese Zuordnung konnte auch durch Anwendung der INDOR-Technik bestätigt werden, denn durch Einstrahlung auf das Signal der C₉-Methylgruppe bei 2.58 ppm* wird die Intensität des C₈-Protonensignals erhöht. Entsprechend wird das Protonensignal bei 6.40 ppm intensiver, wenn auf das Signal bei 1.49 ppm eingestrahlt wird. Da dieses zu einer der beiden geminalen Methylgruppen gehört, muss das Proton mit dem Signal bei 6.40 ppm an C₁₁ gebunden sein. Offensichtlich steht nur diese der beiden geminalen Methylgruppen in räumlicher Nachbarschaft zum H an C₁₁, denn bei Einstrahlung auf 1.70 ppm tritt kein INDOR-Effekt auf. Die direkte Zuordnung des dritten Protons gelingt nicht. Da es aber aromatisch-olefinisch ist, bleibt in Formel III nur C₄ dafür übrig, und für die weiteren Ableitungen kann die Partialformel IV geschrieben werden.

* Diese Versuche wurden aus Gründen der besseren Löslichkeit mit dem Resistoflavin-triacetat durchgeführt.



Die Partialformeln sagen bisher nichts über die Anordnung der Doppelbindungen aus. Eine Reihe von Aussagen sind jedoch bekannt:

Einerseits gehören drei der vier O-Atome an C_3 , C_5 , C_7 und C_{10} zu phenolisch-olefinischen OH-Gruppen, wie auch die Protonen an C_4 , C_8 und C_{11} aromatisch-olefinisch sind. Weiterhin hat die Methylgruppe an C_9 eindeutig aromatischen Charakter. Andererseits geht aus der optischen Aktivität, der Anwesenheit einer dritten Carbonylgruppe sowie einer tertiären OH-Gruppe hervor, dass neben Ring A ein weiterer Teil des Moleküls gesättigt oder teilgesättigt sein muss. Welcher Ring dafür in Frage kommt, kann aus den IR- und NMR-Spektren abgeleitet werden.

Von den drei $C=O$ -Valenzschwingungsbanden des Resistoflavins (Tab. 1) stimmen zwei (bei 1604 cm^{-1} und 1648 cm^{-1} in CHCl_3) in ihrer Lage nahezu mit den $C=O$ -Valenzschwingungsbanden des Resistomycins überein. Nach Acetylierung erscheinen beide Banden um bestimmte Beträge infolge Aufhebung der Chelation verschoben, stimmen jedoch auch hier in der Lage mit den entsprechenden Banden des Resistomycin-tetraacetates relative gut überein. Dies ist nur möglich, wenn die beiden

TABELLE 2. CHEMISCHE VERSCHIEBUNG δ DER NMR-SIGNALE VON RESISTOMYCIN UND RESISTOFLAVIN BZW. VOM JEWEILIGEN ACETAT

| | C_{11} | C_9 | C_8 | C_7 | C_5 | C_4 | C_3 | C_1 |
|--------------------------|----------|-------|-------|---------------|---------------|-------|---------------|--------------|
| Resistomycin | 7.39 | 3.11 | 7.12 | | | 6.66 | | 1.63 |
| Resistoflavin | 6.71 | 2.73 | 6.92 | | | 6.66 | | 1.69 1.90 |
| $\Delta\delta$ | 0.68 | 0.38 | 0.20 | | | 0.00 | | |
| Resistomycin-tetraacetat | 7.41 | 2.83 | 7.17 | 2.40– 2.47 | 2.40– 2.47 | 6.94 | 2.40– 2.47 | 1.62 |
| Resistoflavin-triacetat | 6.40 | 2.58 | 6.99 | 2.35 | 2.35 | 6.94 | 2.35 | 1.49 1.70 |
| $\Delta\delta$ | 1.01 | 0.25 | 0.18 | | | 0.00 | | |

Die Zahlenangaben erfolgten in ppm, bezogen auf Tetramethylsilan. Die Differenz zwischen den ppm-Werten sich entsprechender Signale ist in der Spalte $\Delta\delta$ angegeben. Die Spalten $C_{11} \dots C_1$ kennzeichnen die Substitutionsstelle der jeweiligen NMR-aktiven Gruppe (aromatische oder olefinische Protonen, CH_3 -bzw. Acetylgruppe) am Molekülgrundgerüst. Die Antibiotika wurden mit einem 100-MHz-Gerät in Pyridin- D_5 gemessen, die Acetate in CDCl_3 .

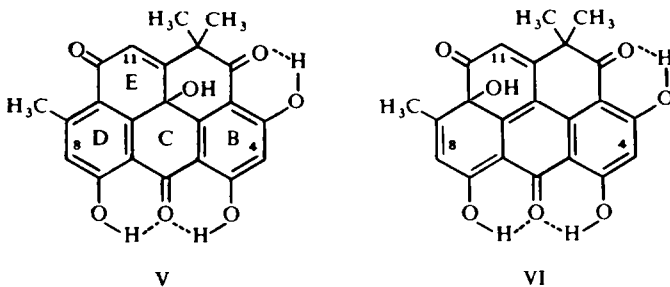
Im Spektrum des Resistoflavin-triacetates tritt weiterhin wie auch beim Resistoflavin selbst ein Signal einer nichtchelierten OH-Gruppe auf. Wegen der konzentrationsabhängigen Lage sind diese Signale in der Tabelle nicht angegeben.

betrachteten C=O-Valenzschwingungsbanden von Carbonylgruppen an C₂ und C₆ herrühren und die Anordnung an den Ringen B, C und D gleich oder nahezu gleich ist. D. h. die Ringe B und D sollten auch in Resistoflavin aromatisch und an den Positionen 3, 5 und 7 mit chelierten Hydroxylen besetzt sein. Dementsprechend sind im Triacetat des Resistoflavins drei phenolische Acetylgruppen nachweisbar. Für den von Resistomycin unterschiedlichen Molekülteil käme damit nur Ring E in Frage.

Zum gleichen Schluss kann man durch die Vergleiche der NMR-Spektren kommen. In der Tabelle 2 werden die chemischen Verschiebungen der beiden Antibiotika sowie ihrer Acetate miteinander verglichen.

Die Tabelle 2 zeigt, dass (abgesehen von den geminalen Methylgruppen an C₁, die im Resistoflavin als zwei getrennte Signale erscheinen) alle Signale des Resistoflavins bei kleineren ppm-Werten liegen als die entsprechenden Signale des Resistomycins. Diese Differenz ist bei C₁₁ besonders stark, sie wird schwächer bei C₉ und C₈ und ist bei Ring B schliesslich gleich Null (Proton am C₄). Die gleichen Verhältnisse finden sich bei den Acetaten. Es liegt deshalb die Annahme nahe, dass der Ring B genau wie beim Resistomycin aromatischen Charakter besitzt, der Ring E dagegen nicht mehr voll aromatisch ist. Der fehlende Ringstromeffekt verschiebt das Signal des Protons an C₁₁ zu höheren Feldstärken und wirkt sich auch noch etwas auf die Substituenten des Nachbarringes D aus. Damit kommt für die Unterbringung der dritten Carbonylgruppe, wie auch die IR-spektroskopischen Überlegungen erwarten lassen, Ring E in Frage.

Da C₁₁ nach den NMR-Spektren mit einem Olefin-Proton besetzt ist und weiterhin noch eine tertiäre OH-Gruppe lokalisiert werden muss, gibt es nur zwei Anordnungsmöglichkeiten (V und VI) für die Konstitution des Resistoflavins.



Formel VI kann aufgrund der Lage des NMR-Signals für die CH₃-Gruppe an C₉ ausgeschieden werden, so dass wir V als Konstitutionsformel für Resistoflavin vorschlagen.

Die Anwesenheit der Ketogruppe an C₁₀ erklärt auch die gemessene Verschiebung des H₁₁-Signals von nur 0.68 ppm gegenüber Resistomycin. Durch den fehlenden Ringstrom wandert dieses Signal zu höherer Feldstärke, die Carbonylgruppe in Nachbarstellung bewirkt aber einen gegenteiligen Effekt. Die resultierende Verschiebung ist abschätzbar und stimmt gut mit dem gemessenen Wert überein.

Das Auftreten von zwei NMR-Signalen für die Protonen der geminalen Methylgruppen weist auf eine magnetische Nichtäquivalenz der beiden Methylgruppen hin.

Tatsächlich kann am Molekülmodell demonstriert werden, dass gegenüber dem Resistomycin im Resistoflavinmolekül eine Verformung auftritt, wodurch die eine Methylgruppe wesentlich weiter vom Proton am C_{11} entfernt ist als die andere. Das konnte auch durch die INDOR-Versuche bestätigt werden.

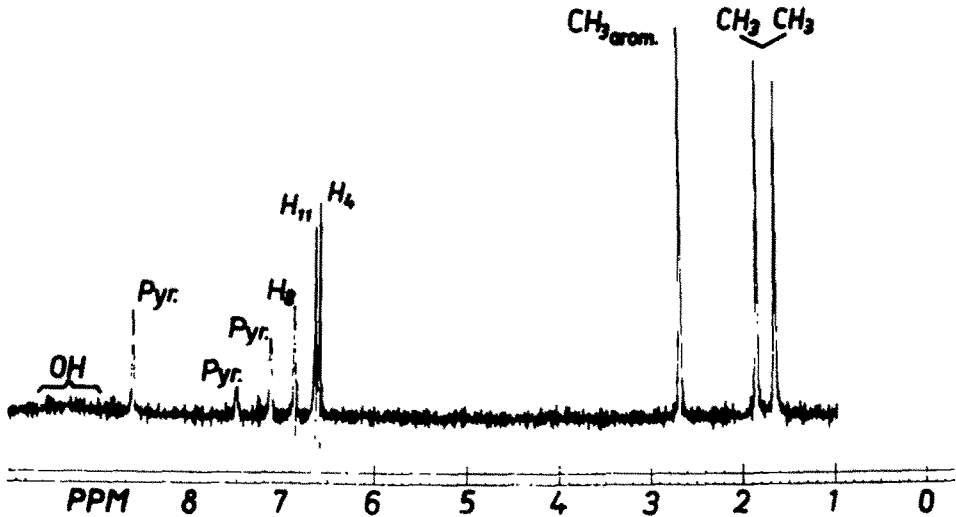


ABB 1. NMR-Spektrum vom Resistoflavin (100-MHz-Gerät) Lösungsmittel: Pyridin-D₅

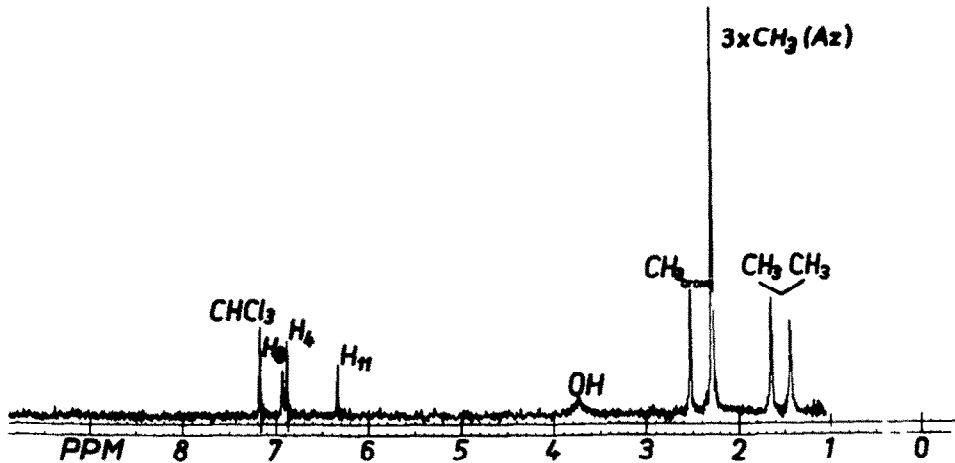


ABB 2. NMR-Spektrum vom Resistoflavin-triacetat Lösungsmittel: $CDCl_3$

Weiterhin wird die leichte Eliminierung der tertiären Hydroxylgruppe verständlich, wobei die Reaktion zum stabileren Resistomycin mit einem Übergang der C_{10} -Carbonylgruppe zum phenolischen Hydroxyl begleitet ist.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die IR-Spektren wurden mit einem IR-Spektralphotometer UR 10 (Carl Zeiss Jena) registriert. Die Bandenintensitäten wurden planimetrisch ermittelt. Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian-100-MHz-Gerät aufgenommen. Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Heitzischmikroskop. Die Molekulargewichte wurden aus den Massenspektren ermittelt.

Resistoflavin. Das Antibiotikum wurde aus Fermentationsansätzen einer Selektante des Streptomycetenstammes JA 3733 und anschließender Mycelextraktion gewonnen.⁵ Resistoflavin fiel beim Einengen der Essigesterextrakte in Form von grüngelben bis grünlichen, rhombenförmigen Kristallen aus, die nach mehrfacher Umkristallisation aus Äthylacetat chromatographisch einheitlich waren.⁵ Schmp.: Braunfärbung bei 215°, Schmelzen bei 238–240°C Zers. unter Neubildung spießförmiger Kristalle. $[\alpha]_D^{23}$ –96 ($c = 0.5$ in Pyridin). Die Substanz dunkelte am Licht nach. ($C_{22}H_{16}O_7$ (392.4). Ber: C, 67.34; H, 4.07. Gef: MG 392; C, 67.23; H, 4.26%).

Resistomycin. Aus den weiter eingengten Mutterlaugen der Essigesterextrakte. Nach Chromatographie an HCl-behandeltem Kieselgel und Umkristallisation aus Essigester oder Dioxan: Hellgelbe bis orangefarbene Nadeln. Schmp. 342–345°C Zers. ($C_{22}H_{16}O_6$ (376.4). Ber: C, 70.21; H, 4.29. Gef: C, 70.27; H, 4.18%).

Resistoflavin-triacetat. 200 mg Resistoflavin wurden in Pyridin (4.5 ml) gelöst und mit Essigsäureanhydrid (1.5 ml) drei Stdn. bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Danach wurde $CHCl_3$ (5 ml) zugesetzt und mit Petroläther gefällt. Die Lösung wurde vom weissgelblichen, zähen Niederschlag abgegossen und im Kühlschrank belassen, wobei sich weitere Mengen Triacetate kristallin abschieden. Der ausgefallene Niederschlag wurde in Äthanol (10 ml) aufgenommen. Das Triacetat schied sich beim Kühlen daraus als blassgelbe Nadeln ab. Umkristallisation aus Äthanol. Ausb. 98 mg. Die Substanz dunkelt am Licht nach. Schmp.: Braunfärbung bei 215°, Schmelzen bei 242–243°C Zers. $[\alpha]_D^{23}$ 32 ($c = 0.5$ in $CHCl_3$). ($C_{28}H_{22}O_{10}$ (518.5) Ber: C, 64.84; H, 4.26; CH_3CO , 24.9. Gef: C, 65.00; H, 4.17; CH_3CO , 24.3%).

Resistoflavin-tetraacetat. 570 mg Resistoflavin wurden in Pyridin (5 ml) gelöst und Essigsäureanhydrid (2.5 ml) zugefügt. Im Dunkeln wurde 24 Stdn. bei Raumtemperatur belassen, anschließend $CHCl_3$ (3 ml) zugefügt und das Acetat mit Petroläther ausgefällt, das sich als gelbes Öl abschied. Nach Abgiessen wurde der ölige Rest erneut mit wenig $CHCl_3$ aufgenommen und mit Petroläther gefällt, wobei das Acetat als weisslicher Niederschlag ausfiel, der abgesaugt und mit Petroläther gewaschen wurde. Umkristallisation aus C_2H_5OH ergab 430 mg blassgelbe, lichtempfindliche Nadeln. $[\alpha]_D^{22}$ 9 ($c = 0.5$ in $CHCl_3$) Schmp.: Bei 150° Braunfärbung, bei 171–172° (Zers.) geschmolzen. ($C_{30}H_{24}O_{11}$ (560.5). Ber: C, 64.28; H, 4.32; CH_3CO , 30.7. Gef: MG, 560; C, 64.22; H, 4.27; CH_3CO , 30.3%).

Umsetzungen des Resistoflavins in Resistomycin

(a) *Mit H_2SO_4 konz.* 400 mg Resistoflavin wurden in H_2SO_4 konz. gelöst und 20 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde die Lösung unter Kühlen in Wasser eingegeben, der ausgefallene Niederschlag abgesaugt, mit H_2O gewaschen und getrocknet. Zur Reinigung wurde das braune Rohprodukt, das im DC⁵ mehrere Zonen zeigte, an einer Kieselgelsäule (Kieselgel Merck 0.2–0.05, HCl-behandelt, in $CHCl_3$ eingeschlämmt) aufgetrennt. Die Substanz wurde dazu in $CHCl_3$ aufgegeben und mit $CHCl_3$ eluiert. Dabei konnten der Reihe nach eine rote Zone (A), eine gelbe Zone (B), eine braune Zone (C) und zwei weitere gelbe Restzonen aufgefangen werden.

Rotes Chinon aus Zone A: Aus der eingengten $CHCl_3$ -Lösung der Zone A fiel im Kühlschrank ein ziegelroter Niederschlag aus (50 mg). Umkristallisation aus Essigester ergab 17 mg rote Nadelchen. Schmp.: >350°. Die Substanz löst sich in verd. NaOH braun und wird mit Natriumdithionitlösung reversibel zu einer intensiv orangen Lösung reduziert. IR: 1590, 1650, 1672 cm^{-1} (KBr). (Gef: C, 67.67; H, 3.92%).

Resistomycin aus Zone B: Die etwas eingengte $CHCl_3$ -Lösung der gelben Zone B wurde erneut auf eine Kieselgelsäule (Kieselgel Merck 0.2–0.05, vorbehandelt mit $NaHCO_3$, eingeschlämmt mit $CHCl_3$) aufgegeben und mit $CHCl_3$ eluiert. Dabei wanderte der Hauptteil als orangefarbene Zone durch die Säule, während eine violettrote Zone am Start blieb. Die aufgefangene orange Zone wurde mit verd. HCl und H_2O gewaschen, die nunmehr gelbe Lösung eingengt und gekühlt. Die ausgefallenen gelben Nadeln (30 mg) waren nach Umkristallisation in Analyse. Schmp., IR- und UV-Spektren sowie DC-Chromatographie⁵ mit Resistomycin identisch.

(b) *Mit KJ in Eisessig.* 400 mg Resistoflavin wurden heiss in Eisessig (200 ml) gelöst und mit KJ (ca. 500 mg) 30 Min. bei 70° gerührt, wobei die Lösung durch freigesetztes Jod braun gefärbt wurde. Ausfällen mit H_2O , Absaugen und Waschen mit H_2O ergab nach Trocknen 360 mg Rohprodukt. Durch Umkristallisation aus Dioxan oder Reinigung durch Säulenchromatographie an unbehandeltem Kieselgel (Merck,

0.2-0.05, eluiert mit CHCl_3), wobei die gesuchte Substanz aus der gelbbraunen Hauptzone 1 gewonnen wurde, erhielt man gelbe Nadeln, die in allen geprüften Eigenschaften mit Resistomycin identisch waren.

(c) *Durch Erhitzen.* 50 mg Resistoflavin wurden gepulvert und im Metallbad zwei Min. auf 250° erhitzt. Die erstarrte schwarze Schmelze wurde heiss mit Äthylacetat extrahiert und die Lösung konzentriert. Die daraus erhaltenen gelben Nadeln gaben im DC nur einen einheitlichen Ring mit dem R_f -Wert des Resistomycins und waren nach Analyse und IR-Spektrum mit dieser Substanz identisch.

Danksagung-- Herrn Dr. R. Tümmler im Forschungsinstitut Manfred von Ardenne, Dresden, danken wir für die molekulmassenspektrographische Bestimmung der Molekulargewichte. Herrn Dr. Frischleder, Sektion Physik der Karl-Marx-Universität Leipzig, für die Anfertigung von NMR-Spektren und die Durchführung der INDOR-Experimente. Für anregende Diskussionen sind wir Herrn Prof. Dr. G. Heublein, Sektion Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, zu Dank verpflichtet.

LITERATUR

- ¹ K. Eckardt. *Z. allg. Mikrobiol.* im Druck
- ² H. Brockmann und G. Schmidt-Kastner, *Chem. Ber.* **87**, 1460 (1954)
- ³ H. Brockmann, E. Meyer, K. Schrempp, F. Reiners und T. Reschke, *Ibid.* **102**, 1224 (1969)
- ⁴ N. A. Bailey, C. P. Falshaw, W. D. Ollis, M. Watanabe, M. M. Dhar, A. W. Khan and V. C. Vora, *Chem. Commun.*, 374 (1968)
- ⁵ G. Bradler. *Z. allg. Mikrobiol.* im Druck