

ANTIBIOTIKA AUS ACTINOMYCETEN. ISOLIERUNG UND KONSTITUTION VON AKLAVINON—I UND AKLAVINON—II, ZWEI NEUEN ANTHRACYCLINONEN AUS FERMENTATIONSANSÄTZEN VON STREPTOMYCES GALILAEUS

K. ECKARDT,¹ D. TRESSELT² und J. TAX³

Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena,¹ Abteilung Antibiotika-Chemie und Abteilung Biophysikochemie.² Institut für Mikrobiologie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag³

(Received in Germany 19 February 1974; Received in the UK for publication 10 June 1974)

Zusammenfassung—Es wird über die Isolierung und Untersuchung der chemischen Konstitution von zwei Stereoisomeren des Aklavinons berichtet.

Abstract—The isolation and structure elucidation of two stereoisomers of aklavinone are reported.

Vor einiger Zeit wurde über die Isolierung der antibiotisch wirksamen Galirubine A und B aus Fermentationsansätzen von *Streptomyces galilaeus*, Stamm JA 3043, berichtet. Galirubin A erwies sich als Glykosidgemisch des ϵ -Pyrromycinons, während als Aglykon des Galirubins B Aklavinon identifiziert wurde.¹ Weiterhin enthielten die Myclextrakte ζ -Pyrromycinon, η -Pyrromycinon, 7-Desoxy-aklavinon und Bis-anhydro-aklavinon. Später konnte aus Rohsubstanzen von Galirubinen ein neues Aglykon isoliert werden, das als ϵ_1 -Pyrromycinon bezeichnet wurde und anstelle der Äthylgruppe des ϵ -Pyrromycinons eine Methylgruppe enthält.² Über die Isolierung und Konstitution von zwei weiteren, neuen Aglykonen der Galirubine soll jetzt berichtet werden.

Aus einem Rohgemisch, das neben den eingangs genannten Anthracyclinonen und Galirubin A vorwiegend Galirubin B enthielt, wurde der antibiotisch wirksame Galirubinanteil zunächst durch Chromatographie an Sephadex LH₂₀ mit Methanol abgetrennt und dieser anschließend mit verdünnter Salzsäure hydrolysiert. Das ausgefallene Aglykongemisch liess sich dünnschichtchromatographisch an NaHCO₃-behandeltem Kieselgel (Lösungsmittel: Chloroform - Methanol/95:5) in mehrere rote und violette Zonen auftrennen. Die beiden neuen Anthracyclinone waren als sehr schwache, rote Zonen sichtbar und wurden als Alkavinon—I und Aklavinon—II bezeichnet. Die Isolierung gelang durch Vortrennung des Aglykongemisches an Sephadex LH₂₀ und anschließender präparativer Dünnschichtchromatographie.

Im Dünnschichtchromatogramm wandern η -Pyrromycinon, Bis-anhydro-aklavinon, ζ -Pyrromycinon und 7-Desoxy-aklavinon weit voraus, während dahinter mit kleineren R_F-Werten Aklavinon, ϵ -Pyrromycinon, ϵ_1 -Pyrromycinon, Aklavinon—I und Aklavinon—II in der

angegebenen Reihenfolge zurückbleiben. Dabei unterscheiden sich die R_F-Werte von ϵ -Pyrromycinon, ϵ_1 -Pyrromycinon und Aklavinon—I nur wenig. Dagegen werden ϵ -Pyrromycinon und ϵ_1 -Pyrromycinon an Sephadex LH₂₀ mit Methanol langsamer eluiert als Aklavinon, Aklavinon—I und Aklavinon—II, so dass die Abtrennung durch Kombination beider Methoden gelang.

Das aus unserem Stamm gewonnene Aklavinon (Aglykon aus Galirubin B)¹ wurde durch Vergleich seiner charakteristischen Daten mit entsprechenden Literaturangaben und durch Überführung in Bis-anhydro-aklavinon als identisch mit dem von GORDON und Mitarbeitern beschriebenen Aglykon des Aklavins befunden.⁶ Dass es sich auch stereochemisch um die gleiche Verbindung handelt, konnte erst kürzlich nachgewiesen werden.⁷ Wegen der grossen Ähnlichkeit ihrer Eigenschaften mit denen des Aklavinons wurden für die neuen Verbindungen die Bezeichnungen Aklavinon—I und Aklavinon—II gewählt.

Aus 40 g Rohprodukt resultierten nach Reinigungsoperationen und Umkristallisation aus Äthanol 9 mg hellrotes, kristallines Aklavinon—I, das bei 169–170°C schmilzt, sowie 3,5 mg hellrotes, kristallines Aklavinon—II mit einem Schmelzpunkt von 186–188°C. Beide Verbindungen lösen sich schwach mit gelber Farbe in Alkoholen, Aceton, Chloroform und Essigester. Sie sind unlöslich in Wasser und Petroläther. In konz. Schwefelsäure und in Alkalien lösen sie sich mit rotvioletter Farbe.

Aklavinon—I und Aklavinon—II haben nach den Massenspektren übereinstimmend die Summenformel C₂₇H₂₀O₈. Auch die NMR-Spektren bestätigen, dass beide Verbindungen jeweils 20 Protonen enthalten. Die Massenspektren von Aklavinon, Aklavinon—I und Aklavinon—II weisen nur Unterschiede in der Intensität der Fragmentpeaks auf (Abb. 1). Dies ist ein Hinweis, dass es sich um

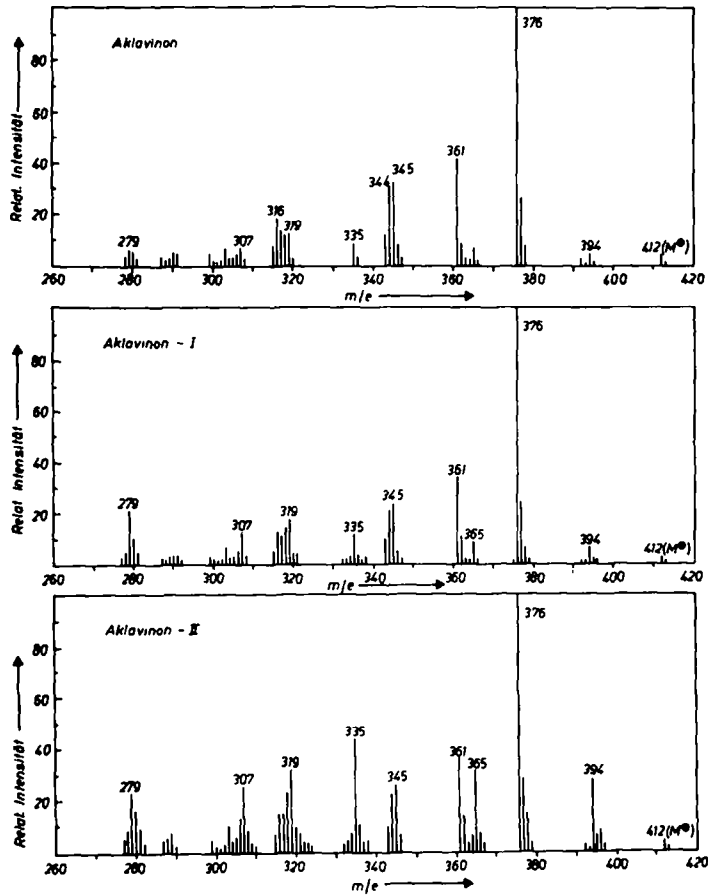


Abb 1. Massenspektren von Aklavinon, Aklavinon—I und Aklavinon—II.

isomere Substanzen handelt. Nachfolgend werden die Befunde der Konstitutionsuntersuchung erläutert.

Die Elektronenspektren von Aklavinon—I und Aklavinon—II in Methanol und Cyclohexan sind untereinander sowie mit Aklavinon nahezu deckungsgleich und haben den charakteristischen Verlauf des Chrysazins. Die beiden neuen Verbindungen leiten sich demnach vom 1,8-Dihydroxy-anthrachinon ab. Entsprechend sind sie beide mit Natriumdithionit reversibel reduzierbar (Chinon). Das IR-Spektrum von Aklavinon—I in KBr enthält die Banden der Chinonkarbonyle bei 1612 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} . Ein IR-Spektrum von Aklavinon—II konnte wegen der beschränkt vorhandenen Substanzmengen nicht aufgenommen werden.

Weitere wesentliche Aufschlüsse über die chemische Konstitution ergab die Reaktion mit

HBr/Eisessig. Durch kurzes Erhitzen entstanden aus beiden neuen Verbindungen und aus dem zum Vergleich mitgeprüften Aklavinon einheitliche Reaktionsprodukte, die im Dünnschichtchromatogramm mit NaHCO_3 -vorbehandeltem Kieselgel mit gleichen R_F -Werten wanderten, wie Bisanhidro-aklavinon (1a). (Die Bildung von Bisanhidro - aklavinon aus Aklavinon durch Einwirkung von HBr/Eisessig wurde schon früher zur Identifizierung des Aglykons aus Galirubin B beschrieben¹). Die Elektronenspektren aller drei Reaktionsprodukte waren identisch und zeigten den charakteristischen Verlauf von 9-Äthyl - 4,6 - dihydroxy - tetracenchinon - (5, 12) (1b),³ wie in Abb. 2 gezeigt ist.* Die Identität aller drei Reaktionsprodukte mit Bisanhidro - aklavinon wurde durch die Massenspektren bestätigt. Sie stimmen mit den von Brockmann jr. *et al.* gegebenen Daten überein.⁴ Daraus lässt sich ableiten:

1. Beide neuen Verbindungen haben als Grundgerüst 9 - Äthyl - 7,8,9,10 - tetrahydro - 4,6 - dihydroxy - tetracenchinon - (5,12) (2a). Die Äthylgruppe wird auch durch die NMR - Spektren der Ausgangsverbindungen bestätigt.

*Wir danken Herrn Dr. J. Niemeyer für die freundliche Genehmigung zur Veröffentlichung des Absorptionsspektrums von 9 - Äthyl - 4,6 - dihydroxy - tetracenchinon - (5,12).

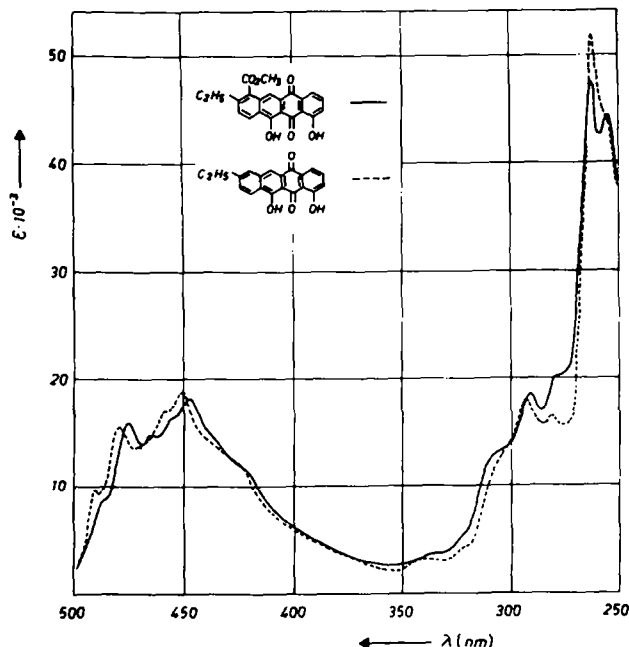
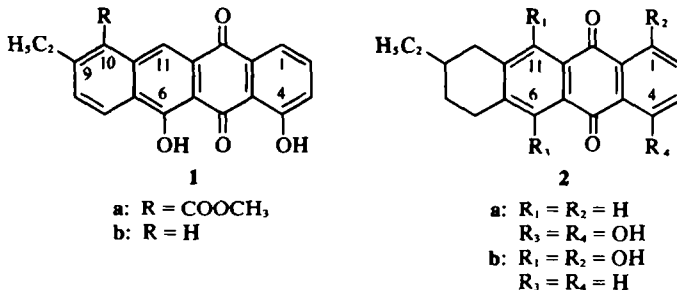


Abb 2. Absorptionskurven in Cyclohexan von 9-Äthyl-4,6-dihydroxy-tetracenchinon-(5,12)--- (nach J. Niemeyer) und Bisanhydroaklavinon— (gewonnen durch Umsetzung von Aklavinon, Aklavinon—I und Aklavinon—II mit HBr/Eisessig).



Das aus Aklavinon durch Umsetzung mit HBr/Eisessig gewonnene Bisanhydro-aklavinon wurde früher von uns auch aus 7 - Desoxyaklavinon durch Umsetzung mit Pd hergestellt.¹ Brockmann und Niemeyer konnten dann unser 7 - Desoxy - aklavinon zu 4,6 - Dihydroxy - 9 - äthyl - tetracenchinon - (5,12) (1b) abbauen und die Identität mit dem synthetischen Produkt sichern.³ Sie bewiesen damit, dass sich 7 - Desoxy - aklavinon und somit auch Aklavinon von 2a ableiten und nicht von 1,11 - Dihydroxy - 9 - äthyl - 7,8,9,10 - tetrahydro - tetracenchinon - (5,12) (2b). 2a und 2b unterscheiden sich u.a. durch die Absorptionsspektren.^{3,5} Da in unserem Falle die HBr/Eisessig - Reaktionsprodukte der neuen Verbindungen und des Aklavinons identisch sind, müssen sich auch Aklavinon—I und Aklavinon—II von 2a ableiten und nicht von 2b.

2. Die auch durch NMR- und IR-Messungen (IR-Bande des Aklavinon—I bei 1720 cm⁻¹) nachgewiesene Carbomethoxygruppe muss in beiden Verbindungen

die gleiche Stellung haben wie in Aklavinon, nämlich an C₁₀.

3. Ring A enthält zwei leicht in Form von Wasser abspaltbare Hydroxylgruppen, was auch die Massenspektren durch die Fragmente M-18 und M-36 sowie die Analyse der NMR-Spektren bestätigen. Damit sind alle funktionellen Gruppen der beiden neuen Verbindungen erfasst.

Die 100 MHz - Kernresonanzspektren wurden in Pyridin - d₅ mit Hexamethyldisiloxan als innerem Standard gemessen. Nachfolgend werden die auf Tetramethylsilan umgerechneten chemischen Verschiebungen von Aklavinon—I mit δ_I und von Aklavinon—II mit δ_{II} bezeichnet.

Die Carbomethoxygruppe beider Substanzen verursacht ein Singulett mit der Intensität 3 bei $\delta_I = 3.61$ und $\delta_{II} = 3.59$ ppm. Ein weiteres Singulett mit der Intensität 1 kann auf Grund seiner che-

mischen Verschiebung ($\delta_I = 4.24$, $\delta_{II} = 4.31$ ppm) nur von einem aliphatischen Proton stammen, das einerseits dem aromatischen Ring benachbart ist und andererseits am gleichen Kohlenstoffatom wie die Carbomethoxygruppe sitzt. Dieses Signal wird also durch ein geminal zur Carbomethoxygruppe stehendes Proton hervorgerufen. Da es in beiden Spektren als Singulett erscheint, kann geschlussfolgert werden, dass bei den neuen Verbindungen in Analogie zum Aklavinon am Kohlenstoff-9 kein Proton, sondern ausser der Äthylgruppe jeweils eine der beiden noch zu lokalisierenden Hydroxylgruppen sitzt. (Die Signale der beiden aromatischen und der beiden alkoholischen OH-Gruppen lassen sich in beiden Spektren nachweisen, fallen aber infolge raschen Protonenaustausches, an dem auch die Protonen der im Lösungsmittel vorhandenen Wasserspuren beteiligt sind, zusammen und erscheinen als relativ breites NMR-Signal im Bereich von 5-6 ppm.)

Die in beiden Verbindungen vorhandene Äthylgruppe an C_5 verursacht im NMR-Spektrum ein Triplett mit der Intensität 3 (CH_3) bei $\delta_I = 1.04$ bzw. $\delta_{II} = 1.19$ ppm und ein Multiplett bei $\delta_I = 1.84$ bzw. $\delta_{II} = 1.86$ ppm, das durch die Methylenprotonen der Äthylgruppe hervorgerufen wird. Die chemische Verschiebung dieser beiden Protonen ist infolge der unmittelbaren Nachbarschaft zu dem asymmetrischen Kohlenstoffatom C_9 nicht völlig identisch.

In beiden Verbindungen steht damit nur noch die Lokalisierung einer Hydroxylgruppe im Ring A aus, die C_7 - oder C_8 -ständig sein kann. Auch hierüber lassen sich auf Grund der NMR-Spektren exakte Aussagen machen.

Sowohl das Spektrum von Aklavinon—I als auch das von Aklavinon—II weist ein Triplett mit der Intensität 1 bei $\delta_I = 5.52$ bzw. $\delta_{II} = 5.76$ ppm auf. Die chemischen Verschiebungen dieser Signale lassen sich nur erklären, wenn sie von jeweils einem Proton an C_7 stammen (unmittelbare Nachbarschaft zum aromatischen Ring) und die zweite Hydroxylgruppe in beiden Verbindungen an eben diesem Kohlenstoffatom sitzt. Die magnetische Abschirmung der beiden Protonen an C_8 ist in Aklavinon—II praktisch gleich (Signal mit der Intensität 2 bei 2.79 ppm), sie bilden mit dem Proton an C_7 ein AA'X-Spinsystem. In Aklavinon—I liegen die Signale der beiden C_8 -Protonen dagegen so weit auseinander ($\delta = 2.17$ bzw. 2.80 ppm), das die Auswertung des ABX-Spinsystems praktisch nach ester Ordnung durchgeführt werden kann. Diese Unterschiede geben in Verbindung mit anderen

Untersuchungen auch Aufschluss über die sterischen Verhältnisse am Ring A. Darüber soll in einer nachfolgenden Publikation berichtet werden.

Aus den beschriebenen Untersuchungen ergibt sich somit, dass sowohl Aklavinon—I als auch Aklavinon—II die Konstitutionsformel 3 haben, die von Gordon *et al.* für Aklavinon gefunden wurde. Die beiden neuen Aglykone der Galirubine sind demnach Stereoisomere des Aklavinons.

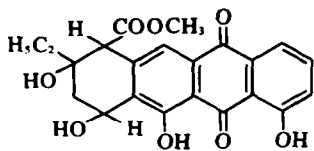
EXPERIMENTELLER TEIL

Gewinnung von Aklavinon—I und Aklavinon—II

40 g Rohprodukt aus sauren Mycelextrakten eines Fermentationsansatzes von *Streptomyces galilaeus* JA 3043 mit überwiegendem Gehalt von Galirubin B wurden an Sephadex gereinigt. Dazu wurden jeweils Anteile von 250 mg in 8 ml CH_3OH gelöst und nach Filtration auf eine Sephadex-Säule (LH₂₀, Säule 3 × 50 cm, eingeschlämmt mit CH_3OH) aufgegeben. Bei Elution mit CH_3OH wanderte die orangerote Zone der antibiotisch wirksamen Galirubine nach einer graubraunen Zone von Verunreinigungen. Später folgten weitere gelbe und rote Zonen von Anthracyclinen der Aklavinon- und Pyromycinreihe. Das Eluat der antibiotisch wirksamen Zone, die die Glykoside enthält (Testung gegen *Bac. subtilis* ATCC 6633), wurde zur Trockene eingedunstet und mit Petroläther gewaschen. Gesamtausbeute: 2 g rotbraunes Galirubingemisch.

Hydrolyse: Das Galirubingemisch wurde in zwei Anteilen mit je 100 ml 0.1 N HCl versetzt, wobei ein Teil der Substanz in Lösung ging. Die Mischung wurde zwei Stunden bei einer Wasserbadtemperatur von 90°C erhitzt, anschliessend abgekühlt und der Niederschlag abgesaugt. Nach Waschen mit H_2O und Trocknen im Exsiccator betrug die Gesamtausbeute 1.2 g rotbraunes Aglykongemisch. Qualitative DC: 33 g Kieselgel H nach Stahl (Typ 60, Merck) und 4 g $NaHCO_3$ p.a. wurden mit 74 ml H_2O geschüttelt und auf Platten aufgegeben (Schichtdicke 0.25 mm, luftgetrocknet). Lösungsmittel - gemisch $CHCl_3-CH_3OH/95:5$, 2-4 mal entwickelt. Das Aglykongemisch enthält η -Pyromycinon (violett), Bisanhydro-aklavinon (rot), beides nahe der Front. Mit kleineren R_F -Werten folgten Aklavinon (rot), ϵ -Pyromycinon, ϵ_1 -Pyromycinon (beide violett), Aklavinon—I, Aklavinon—II (beide schwach rot) sowie zwei weitere Spurenkomponenten (violett).

Präparative Trennung der Aklavinone—I und —II: Je 200 mg Aglykongemisch wurden in 5 ml CH_3OH gelöst und nach Filtration, wie oben beschrieben, an Sephadex LH₂₀ mit CH_3OH chromatographiert. Nach einer breiten Zone von Verunreinigungen und zwei schwach violetten Vorzonen folgte eine breite Zone, deren gelber Vorlauf aus Aklavinon—I und Aklavinon—II sowie einigen Spurenkomponenten bestand. Daran schloss sich die gelbe Hauptzone (Aklavinon) an, gefolgt von einer roten Zone, bestehend aus ϵ -Pyromycinon und ϵ_1 -Pyromycinon. Später folgten Bisanhydro-aklavinon als gelbe und η -Pyromycinon als rote Zone. (Im Falle von frisch verwendetem Sephadex LH₂₀ waren bei weniger scharfer Trennung die Farben der Zonen rot bzw. violett. Das CH_3OH wurde zum Teil über wenig Oxalsäure destilliert.) Die gelben Vorlaufzonen mit den neuen Substanzen wurden im Vakuum konzentriert und der DC unterworfen (Bedingungen wie bei der qualitativen DC, Schichtdicke 1 mm). Die gut abgetrennten Zonen der



Aklavinone—I und —II wurden ausgekratzt, mit CH_3OH (enthaltend 1% Eisessig) eluiert und nach Filtration jeweils mit der 10-fachen Menge Äthylacetat versetzt. Nach mehrfachem Waschen mit H_2O wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und die Extrakte zur Trockene eingengt. Umkristallisation aus $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Aklavinon—I: 9·0 mg hellrote Nadelchen, Schmp. 169–170°C. $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_8$ (berechnet aus Massenspektrum, MG 412,1158; gef. 412,1152) λ_{max} : 229, 258, 290, 432 nm (Cyclohexan, CH_3OH). Aklavinon—II: 3·5 mg hellrote Nadelchen, Schmp. 186–188°C. $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_8$ (berechnet aus Massenspektrum, MG 412,1158; gef. 412,1161); λ_{max} : 229, 258, 290, 432 nm (Cyclohexan, CH_3OH).

Umsetzung mit HBr/Eisessig

0·5 mg Aklavinon—I bzw. Aklavinon—II wurden jeweils in 2 ml einer Mischung von HBr und Eisessig (30 ml Eisessig + 5 ml Bromwasserstoffsäure d: 1·43) gelöst und 2 Min. zum Sieden erhitzt. Anschliessend verdünnte man mit H_2O und extrahierte jeweils mit 20 ml Äthylacetat. Nach mehrfachem Waschen mit H_2O und Trocknen mit Na_2SO_4 engte man zur Trockene ein und erhielt die Reaktionsprodukte als gelbe Rückstände, die zur Reinigung in wenig CH_3OH gelöst und jeweils an einer kleinen Sephadex LH_{20} -Säule mit CH_3OH chromatographiert wurden. Die aus den Hauptzonen nach Einengen gewonnenen Rückstände löste man nochmals in

Äthylacetat (enthaltend 1% Eisessig) und dampfte nach Waschen und Trocknen das Lösungsmittel ab. Die so erhaltenen Reaktionsprodukte aus Aklavinon—I und Aklavinon—II waren im DC, nach den Absorptionsspektren in Cyclohexan (λ_{max} : 263, (280), 290, (306), 447, (455), (463), 475 nm) und ihren Massenspektren identisch mit dem nach gleichen Verfahren aus Aklavinon gewonnenen Bisanhydro-aklavinon.

Wir danken Herrn Dr. H. Jancke (Berlin) für seine Unterstützung, den Herren Dipl.-Chem. W. Ihn (Jena), Ing. P. Sedmera und Dr. J. Vokoun (Prag) für die Anfertigung der Massenspektren sowie Frau Karen Mundt für sorgfältige technische Mitarbeit.

LITERATUR

- ¹K. Eckardt, *Chem. Ber.* **100**, 2561 (1967)
- ²J. Tax, P. Sedmera, J. Vokoun, K. Eckardt, J. Komeršová and Z. Vaněk, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **38**, 2661 (1973)
- ³H. Brockmann und J. Niemeyer, *Chem. Ber.* **101**, 2409 (1968)
- ⁴H. Brockmann jr., H. Budzikiewicz, C. Djerassi, H. Brockmann und J. Niemeyer, *Chem. Ber.* **98**, 1260 (1965)
- ⁵J. Niemeyer, persönliche Mitteilung
- ⁶J. J. Gordon, L. M. Jackman, W. D. Ollis and J. O. Sutherland, *Tetrahedron letters* (London), **28** (1960)
- ⁷D. Tresselt, K. Eckardt und J. Tax, in Vorbereitung