

Literaturhinweise

Zusammenfassende Darstellung der biochemischen Genetik: G. W. Beadle, Chem. Reviews 37, 15-96 [1945]. — Genabhängigkeit biochemischer Reaktionen bei *Neurospora* (dtsh. Referat): H. Friedrich-Freska, Z. Naturforsch. 3b, 63 [1948] mit Zitaten der Originalabhandlungen. — Zum Problem der Heterosis bei Mais: H. Kuckuck, Pflanzenzüchtung, Sammlung Götschen Bd. 1134, dort weitere Literatur. — Resistenzfaktoren bei Kartoffeln und Tomaten: R. Kahn u. I. Löw, Chem. Ber. 80, 406 [1947]; 81, 552 [1948]; R. Kahn u. A. Gauhe, Z. Naturforsch. 2b, 407 [1947]; diese Ztschr. 60, 83 [1948]. — Bestimmung pflanzlicher Wuchs- und

Hemmstoffe nebeneinander: F. Moewus, Naturwiss. 35, 124 [1948]; diese Ztschr. 60, 336 [1948]. — Gene und Carcinom: G. W. Beadle, Chem. Reviews 37, 53 [1945]. — Pigmentbildung im Insektenauge: A. Butenandt, W. Weidle u. W. Derjugin, Naturwiss. 30, 51 [1942]; C. B. Bridges u. K. S. Brehme, Carnegie Inst. Wash. Publ. No. 552 [1944]. — Genetik von *Chlamydomonas*: F. Moewus, Z. Vererbungslehre 78, 418 [1940]; Ergebn. der Biologie 18, 287 [1941]. Bericht Mosbacher Tagung, herausg. von B. Rajewsky, Frankfurt/M. [1948]. — Isolierung von Wirkstoffen aus *Chlamydomonas*: R. Kahn u. I. Löw, Chem. Ber. 81, 363 [1948]; diese Ztschr. 60, 243 [1948]. — Eingeg. am 5. 1. 1949. [A 176]

Zur Chemie des Streptomycins

Von Dipl.-Chem. H. B. KÖNIG

Aus der Biochemischen Abteilung des Chem. Staatsinstitutes der Universität Hamburg

Durch systematisches Suchen nach einem gegen gramnegativen Bakterien wirksamen Antibiotikum wurde 1944 das Streptomycin aus dem Pilz *Streptomyces griseus* durch Waksman, Bugie und Schatz in den USA gefunden und isoliert¹⁾.

Unter Antibiotika verstehen wir allgemein chemische Substanzen, welche von einem oder mehreren lebenden Organismen gebildet werden und schon in relativ geringen Konzentrationen — mehr oder weniger selektive — antimikrobielle Eigenschaften besitzen, die entweder hemmender oder toxischer Art sind. Wenn auch einige Antibiotikalytische Eigenschaften zeigen, so wird doch in der Regel Lysis von ihnen nicht hervorgerufen. Man kann Antibiotika chemotherapeutisch benutzen, wenn sie genügend atoxisch und stabil sind. Sie zeichnen sich, soweit sie als Heilmittel in Frage kommen, im Gegensatz zu den klassischen Chemotherapeutika vor allem durch ihre meist große Wirkungsbreite, Wirkungstiefe und mitunter enorme Ungiftigkeit aus.

Das Streptomycin hat eine starke bakteriostatische Wirkung gegenüber zahlreichen pathogenen gramnegativen aber auch grampositiven Bakterien. Seine Toxizität ist gering, weshalb klinische Versuche in großem Stil durchgeführt werden konnten. Die Hoffnung, ein umfassendes Mittel gegen die verschiedenen Erscheinungsformen und Entwicklungsstadien der Tuberkulose gefunden zu haben, hat sich leider nicht bestätigt. Immerhin stellt das Streptomycin bei der tuberkulösen Meningitis, bei gewissen tuberkulösen Geschwüren und zum Teil auch bei der ganz frischen Lungentuberkulose ein wirksames Heilmittel dar. Die gewöhnliche cavernöse, fibröse Phthise (Schwindsucht) bleibt durch Streptomycin unbeeinflußt. Diese Aussagen sind aber noch nicht als endgültig anzusehen, da die klinischen Versuche noch nicht abgeschlossen sind. Zur Resistenzentwicklung bei der Streptomycin-Therapie ist zu sagen, daß auch hier die Dinge, wie bei den klinischen Versuchen, ungünstiger liegen als beim Penicillin. Da oft sehr langwierige mehrmonatige Behandlungen mit dazu noch relativ sehr hohen Dosen erforderlich sind, ist verständlich, daß die ureigenste Eigenschaft der Mikroorganismen, die der Anpassungsfähigkeit, hier weit eher in Erscheinung treten kann.

Die technische Gewinnung des Streptomycins aus der Kulturflüssigkeit des Pilzes *Streptomyces griseus* wird hauptsächlich in den USA ausgeführt und hat inzwischen eine Monatsproduktion von 1300 kg überschritten²⁾.

Die Aufgaben des Chemikers bestehen darin, von möglichst vielen Antibiotika die Struktur sicherzustellen, um so später einmal Deutungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen chemischer Konstitution und physiologischer Wirkung möglich zu machen, und die Grundlagen für Synthesen zu schaffen. Nachdem bereits zusammengefaßte Beiträge über die technische, chemotherapeutische und biologische Seite des Streptomycins vorliegen^{2), 3)}, soll hier speziell die Konstitutionsermittlung dargestellt werden⁴⁾.

Die erfolgreiche Konstitutionsaufklärung des Streptomycins fußt hauptsächlich auf den zahlreichen Arbeiten von Folkers, Kuehl, Wintersteiner, Wolfrom, Fried, Moore, Rebsch und Mitarbeitern, die 1945/47 erschienen sind. Auf Grund dieser Arbeiten kann die Struktur des Streptomycins mit Ausnahme einiger noch ungeklärter sterischer Fragen heute im Sinne folgender Formel als gesichert angesehen werden⁵⁾.

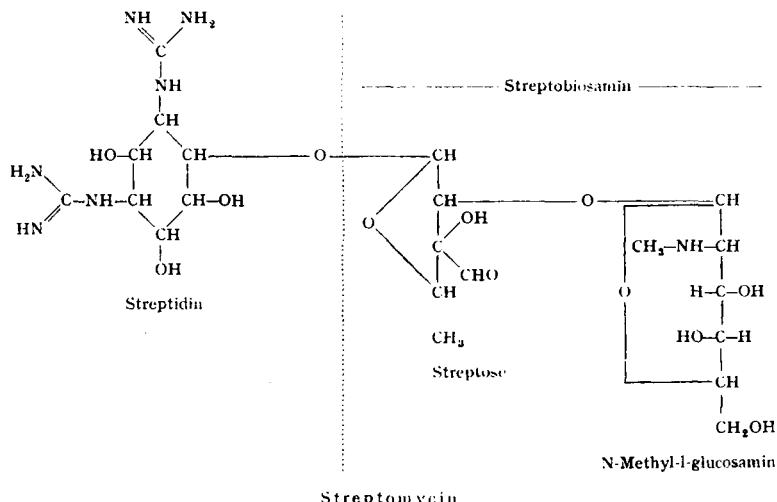
¹⁾ Waksman, Bugie, Schatz, Proc. Mayo Clin. 19, 537 [1944].

²⁾ Saenger, Pharmazie 2, 193 [1947]; vgl. auch diese Ztschr. B 20, 87 [1947].

³⁾ Wagner-Jauregg, Pharmazie 2, 481 [1947].

⁴⁾ Von der ausreichend, wenn auch nicht ganz lückenlos zur Verfügung stehenden amerikanischen Literatur wurde dasjenige, welches für eine übersichtliche Darstellung der Konstitutionsaufklärung von Belang ist, nach sachlichen Gesichtspunkten unter Hintanstellung der zeitlichen Reihenfolge zusammengestellt.

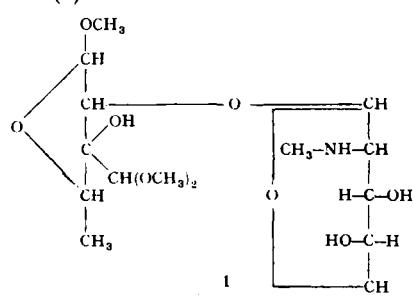
⁵⁾ Kuehl, Peck, Hoffhine, Peel, Folkers, J. Amer. Chem. Soc. 69, 1234 [1947].



Das Streptomycin stellt also einen ungewöhnlichen Typ eines Trisaccharides, bestehend aus den drei Monosacchariden: Streptidine, Streptose (bzw. Streptonose) und N-Methyl-L-glucosamin dar, welche glykosidisch miteinander verbunden sind. Es gelang K. Folkers und Mitarbeitern zuerst den Glucosamin-Teil wie folgt zu identifizieren⁶⁾.

N-Methyl-L-glucosamin

Bei Einwirkung methanolischer Salzsäure auf Streptomycin^{7, 8, 9)}, das man auch als Streptidyl-streptobiosaminid formulieren kann, entsteht unter Absprengung des Streptidins (Methanolysen) Methyl-streptobiosaminid-dimethyl-acetal (I):



Durch Behandlung mit starker Säure (Kochen mit konz. HCl) wird dieses unter Hydrolyse der glykosidischen Bindung zwischen den beiden Zuckern weiter abgebaut und liefert nach Acetylierung der amorphen Reaktionsprodukte als krystallines Spaltprodukt ein Pentaacetyl-hexosamin (II): C₁₇H₂₅NO₁₀/Fp. = 160,5-161,5°/α_D²⁵ = -100° (in HCl₃)¹⁰⁾

hexosamin (II): C₁₇H₂₅NO₁₀/Fp. = 160,5-161,5°/α_D²⁵ = -100° (in HCl₃)¹⁰⁾

Dieses Hexosamin-pentaacetat geht bei Einwirkung von Salzsäure unter Verlust seiner Acetyl-Gruppen in das entsprechende Hexosamin-hydrochlorid (III): C₇H₁₅O₅N · HCl / Fp. = 160-163°/α_D²⁵ = -103° bis -88° (Wasser) über. Mittels Silberoxyd läßt sich daraus die freie Base (IV) gewinnen, eine farblose zähe Masse: α_D²⁵ = -65° (Methanol), welche durch Quecksilberoxyd zu der entsprechenden Hexosaminsäure (V): Fp. = 230 bis 232°, oxydiert wird. Im Schmelzpunkt und dem Betrag der optischen Drehung ist diese Säure identisch mit der N-Methyl-d-

⁶⁾ Kuehl, Flynn, Holly, Mozingo, Folkers, ebenda 68, 536 [1946].

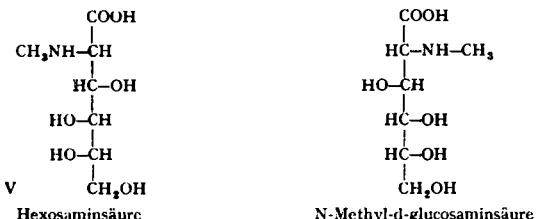
⁷⁾ Fried, Wintersteiner, J. biol. Chemistry 162, 393 [1946].

⁸⁾ Carter, Clark, Dickman, Loo, Skell, Strong, Science [New York] 103, 540 [1946].

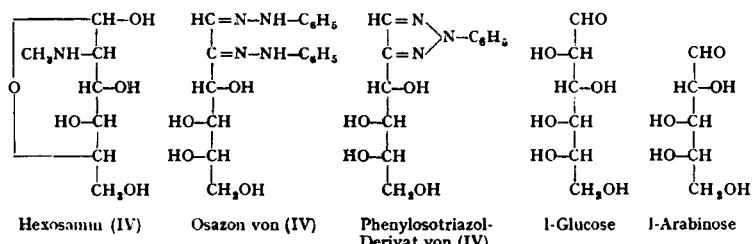
⁹⁾ Peck, Hoffhine, Peel, Gruber, Holly, Mozingo, Folkers, J. Amer. Chem. Soc. 68, 776 [1946].

¹⁰⁾ Auf Grund welcher Ergebnisse die amerikanischen Autoren hier auf das Vorliegen eines Hexosamins schlossen kann wegen Fehlens der entsprechenden Literatur nicht wiedergegeben werden.

glucosaminsäure¹¹⁾), jedoch ist das Vorzeichen der Drehung umgekehrt. (Für V sei die richtige Formel vorweggenommen):

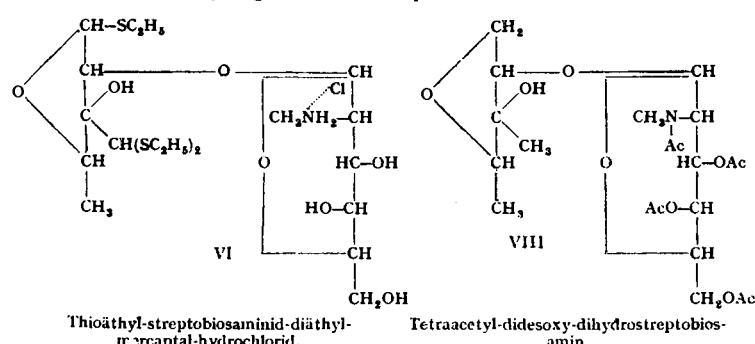


Ähnlich verhält es sich mit dem Hexosamin (IV), der freie Base, welche zwei Derivate, ein Phenylsazone ($F_p = 205^\circ$) und (aus diesem) ein Phenylsotriazol-Derivat gibt ($F_p = 196\text{--}197^\circ$), die ebenfalls beide im Schmelzpunkt und dem Betrag der Drehung, nicht aber mit dem Vorzeichen der Drehung, mit den entsprechenden Derivaten der d-Glucose übereinstimmen. Es war daher anzunehmen, daß das Hexosamin (IV) mindestens den C₅-C₆-Teil der L-Glucose in seiner Moleköl enthält.



Diese Annahme wurde dann dadurch bestätigt, daß die Hydrolyse des Reaktionsproduktes aus L-Arabinose, Methylamin und Blausäure eine mit der natürlichen Hexosaminsäure (V) identische Hexosaminsäure ergab. Diese ließ sich überdies durch Laktonisierung, Reduktion und Acetylierung in das Hexosamin-pentaacetat (II) überführen. Außerdem gelang es, ausgehend von d-Glucosamin durch Methylierung am Stickstoff (N-Methyl-d-glucosamin) und nachfolgende Acetylierung den Antipoden des natürlichen Hexosamin-pentaacetats (II), das Pentaacetyl-N-methyl-d-glucosamin ($F_p = 160,5\text{--}161,5^\circ \alpha_D^{25} = +101^\circ$) synthetisch zu gewinnen. Da die sterische Konfiguration an C₂ des d-Glucosamins bekannt ist¹²⁾, ist damit der Hexosamin-Teil des Streptomycins als N-Methyl-l-glucosamin identifiziert, und es bleibt nur noch die Frage nach der Verknüpfungsart und Verbindungsstelle dieses Teils mit dem übrigen Teil des Streptomycins zu klären.

Es gelang dies Follers¹³⁾ und Wolfrom^{14, 15)} auf folgendem Wege: Streptomycin-hydrochlorid wird durch Einwirkung von HCl/C₂H₅SH (Mercaptolyse) unter Abspaltung des Streptidins zu Äthyl-thiostreptobiosaminid-diäthylmercaptal-hydrochlorid (VI) ($F_p = 110\text{--}112^\circ/\alpha_D^{25} = -262^\circ$ i. Methanol) abgebaut. Nach Überführung ins Tetraacetat (VII) und Behandlung mit Raney-Nickel erhält man daraus Tetraacetyl-didesoxy-dihydrostreptobiosamin (VIII) ($F_p = 159\text{--}160^\circ/\alpha_D^{25} = -85^\circ$ in HCCl₃), welches Fehlingsche Lösung nicht reduziert und beim Kochen mit konz. HCl N-Methyl-l-glucosamin abspaltet.



Unter der Einwirkung von methanolischem Ammoniak spaltet (VIII) seine O-Acetyl-Reste ab und geht in das ebenfalls

¹¹⁾ Votocek, Lukes, Chem. Listy 29, 308 [1935].

¹²⁾ Haworth, Lake, Peat, J. Chem. Soc. [London] 141, 217 [1939].

¹³⁾ Kuehl, Flynn, Brink, Follers, J. Amer. Chem. Soc. 68, 2096 [1946].

¹⁴⁾ Hooper, Klemm, Polglase, Wolfrom, ebenda 68, 2120 [1946].

¹⁵⁾ Dieselben, ebenda 69, 1052 [1947].

Fehling nicht reduzierende N-Acetyl-didesoxy-dihydrostreptobiosamin über. Schließlich erhält man nach „Acetylose“ von (VIII) N-Methyl-l-glucosamin-pentaacetat (II), und zwar je nach den Versuchsbedingungen vorwiegend die α - oder β -Form (an C₁).

Diese Ergebnisse zeigen, daß das N-Methyl-l-glucosamin im Streptomycin über das an C₁ sitzende Hydroxyl der cyclischen Halbacetalform glykosidisch mit dem übrigen Teil der Streptomycin-Moleköl verbunden ist.

Streptidin

In der Folgezeit gelang es Folkers und Mitarbeitern⁹⁾, die Struktur des Streptidins zu ermitteln.

Die saure Hydrolyse des Streptomycins¹⁶⁾ ergibt u. a. eine optisch inaktive Base, das Streptidin, welches als krystallisiertes Salz (Dipikrat, Sulfat, Carbonat, Dihydrochlorid, Dihelianthat, Chloroplatinat usw.) isoliert werden kann. Ihre Summenformel ist C₈H₁₁O₄N₆. Das Streptidin besitzt zwei stark basische Gruppen von etwa der Basizität des Guanidins (potentiometr. gemessen). Da es ein Oktaacetat gibt und andererseits bei oxydativem Abbau mittels Permanganat zwei (1,3 Mole) Mole Guanidin pro Moleköl Streptidin abspaltet, war anzunehmen, daß es neben zwei Guanidin-Resten vier freie Hydroxyl-Gruppen enthält. Andere funktionelle Gruppen wie: Carboxyl-, Carbonyl-, typisch prim. Amino-Gruppen, CH₃-O-, CH₃-NH- und C-CH₃ Gruppen sind nicht nachweisbar. Da eine Doppelbindung sich weder spektroskopisch noch durch Brom-Addition nachweisen läßt und nach der Summenformel – wenn man zwei Guanidin-Reste und vier Hydroxyl-Gruppen annimmt – für ein offenkettiges C-Gerüst zwei H-Atome zu wenig vorhanden sind, muß man auf das Vorliegen eines carbomonocyclischen Gebildes schließen. So kann die Summenformel etwa in folgender Weise aufgelöst werden:

Damit übereinstimmend können die beiden Guanidin-Reste im Streptidin durch Kochen mit Barytlauge schrittweise, und zwar zunächst zu Harnstoff-Gruppen („strepturea“) und schließlich zu prim. Amino-Gruppen abgebaut werden. Die zuletzt entstehende, wieder stark basische Substanz erhielt die Bezeichnung Streptamin:

Sie gibt mit Benzaldehyd eine zweifache Schiffsche Base, verliert bei der Einwirkung von salpetriger Säure (van Slyke) sämtlichen Stickstoff in Form von N₂ und ist ebenfalls optisch inaktiv. Das Streptamin wurde sowohl als freie Base wie auch in Form verschiedener Salze (z. B. Dipikrat, Dihydrojodid) krystallisiert erhalten. Es gibt ein Hexaacetat, welches man durch vorsichtige Verseifung (mit abs.-methanol. Ammoniak bei Raumtemperatur) in N,N'-Diacylstreptamin überführen kann.

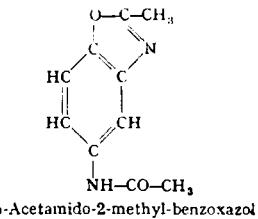
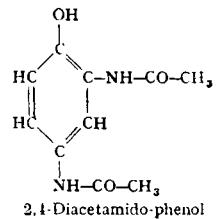
Streptamin verbraucht bei der Einwirkung von Perjodsäure sechs Atome Sauerstoff und spaltet dabei keinen Formaldehyd (Prüfung mit Dimedon) ab. Eine Gruppierung wie: -C(OH)-CH₂OH ist also mit Sicherheit auszuschließen. Da sich Inosit gegenüber Perjodat genau so verhält, dagegen Mannit aber nur fünf Atome Sauerstoff verbraucht und zwei Mol Formaldehyd entwickelt, erhält die Annahme, daß das Streptamin ein Cyclohexan- bzw. Inosit-Derivat ist, eine weitere Stütze.

Es erhebt sich die Frage, welche von den drei möglichen Stellungen der Guanidin-Gruppen im Cyclohexan-Ring des Streptidins (1,2-, 1,3-, 1,4-Stellung) vorliegt. Da aus Streptamin und Phosgen kein cyclisches Ureid erhalten wird und N,N'-Diacylstreptamin nicht drei, sondern zwei Mol Perjodsäure (gleich zwei Atome Sauerstoff) verbraucht, läßt sich mit Sicherheit die 1,2-Stellung (welche drei Atome Sauerstoff verbrauchen würde) ausschließen.

Zwischen den beiden restlichen Möglichkeiten ließ sich zu Gunsten der 1,3-Stellung entscheiden. Erhitzt man Hexaacetylstreptamin eine Stunde im Rohr auf 350°, so werden 3,5 Mol Essigsäure (Bestimmung durch Titration) abgespalten. Aus dem Reaktionsgemisch lassen sich durch Chromatographie in Äthylacetat an Aluminiumoxyd 2,4-Diacetamido-phenol und

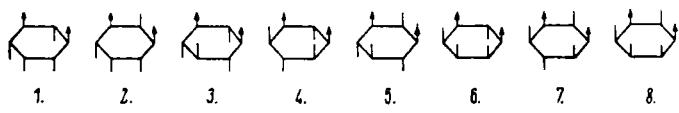
¹⁶⁾ Graber, Peck, Walti, Peel, Hoffhine, Folkers, ebenda 68, 29 [1946].

5-Acetamido-2-methyl-benzoxazol isolieren und als solche durch Vergleich mit synthetischen Produkten (Misch-Fp. und UV-Spektren) identifizieren.



Diese Brenzreaktion geht mit guten Ausbeuten (es werden 95% der Th. an krystallinen Produkten erhalten), während Versuche, durch Dehydratation des Streptamins (durch Brenzen in Gegenwart anorganischer Salze) zu Benzol-Derivaten zu kommen, sehr unbefriedigend verliefen.

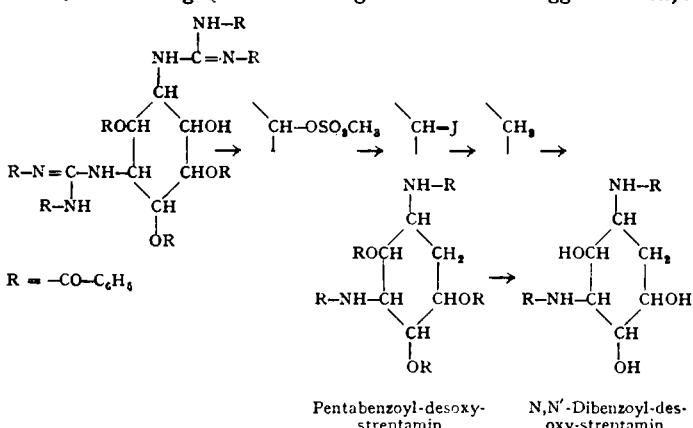
Diese Ergebnisse zeigen nun, daß die Guanidin-Reste im Streptidin in 1,3-Stellung zueinander sitzen und daß das Streptidin einen Kohlenstoff-Sechsring enthält. Das Streptidin ist also ein 1,3-Diguanidino-2,4,5,6-tetraoxy-cyclohexan. Da es optisch inaktiv ist, muß man annehmen, daß ihm eine der acht möglichen Mesoinositos vorliegt¹⁷⁾:



(Die Pfeile zeigen die Guanidin-Reste an)

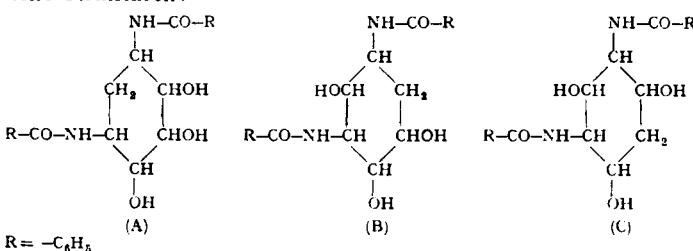
Die Frage nach der Angriffsstelle der Bindung zwischen dem Streptidin und dem Streptobiosamin am Streptidin wurde durch Folkers und Mitarbeiter⁵⁾ geklärt. Die Art dieser Bindung wird im Abschnitt über den Streptose-Teil beantwortet.

Ausgehend von vollständig durchbenzoyliertem Streptomycin erhält man durch Hydrolyse Heptabenzyol-streptidin, welches an der Stelle, wo es mit dem Streptobiosamin verbunden war, eine freie Hydroxyl-Gruppe trägt. Diese Verbindung wurde schrittweise in Mesyl-heptabenzyol-streptidin (Methansulfonester), Jod-heptabenzyol-streptidin, Heptabenzyol-desoxy-streptidin, Pentabenzyol-desoxy-streptamin und schließlich in N,N'-Dibenzoyl-desoxy-streptamin übergeführt (zur Erläuterung des Reaktionsweges ist die richtige Struktur vorweggenommen):



Sämtliche Stufen wurden in Form krystallisierter Produkte erhalten und konnten so auch an Hand der Analysen kontrolliert werden.

Unter Zugrundelegung der bekannten Form des Streptidins ergeben sich für das N,N'-Dibenzoyl-desoxy-streptamin drei mögliche Strukturen:



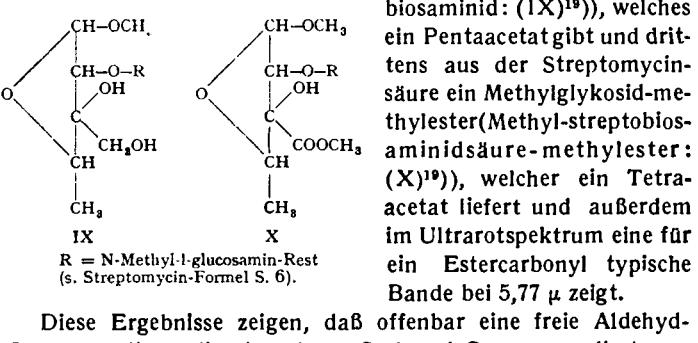
¹⁷⁾ Ob die Form des natürlichen Mesoinosits vorliegt (Nr. 5 oder Nr. 1) ist meines Wissens nicht bekannt.

Da jede dieser drei Strukturen einen anderen Sauerstoff-Verbrauch bei der Einwirkung von Perjodat zeigen muß ($A = 2$ Atome O / B = 1 Atom O / C = kein O-Verbrauch), konnte auf diesem Wege zu Gunsten der Formel B entschieden werden. Es ist damit bewiesen, daß das Hydroxyl an C₄ des Streptidins die Verbindung mit dem übrigen Teil des Streptomycins vermittelt. Durch die Tatsache, daß diese Bindung durch Säuren gelöst wird, ist bereits ein Hinweis für ihre glykosidische Natur gegeben¹⁸⁾.

Der Streptose-Teil: $C_6H_8O_5$ des Streptomycins

Weil man – infolge der genauen Kenntnis der Struktur des Streptidin- und des Glucosamin-Teils – jeweils unterscheiden konnte, ob eine Reaktion auf Funktionen im Streptose-Teil oder auf solche im übrigen Teil der Streptomycinmoleköl zurückging, gestatteten eine Reihe von Reaktionen, die am Streptomycin und Streptobiosamin bzw. deren Derivaten studiert worden waren, Aussagen über Funktionen im Streptose-Teil. So gelang es, die meisten Sauerstoff-Funktionen und gewisse Teilstrukturen der Streptose an Hand derartiger Umsetzungen aufzuklären. Die Festlegung des Kohlenstoff-Gerüstes sowie die Verteilung der einzelnen O-Funktionen an ihm geschah dagegen durch Untersuchungen an definierten Abbauprodukten des isolierten Streptose-Teils.

Das Vorliegen einer freien Aldehyd-Gruppe im Streptose-Teil ging aus folgenden hauptsächlich von Fried und Wintersteiner¹⁹⁾ ausgeführten Arbeiten hervor: Streptomycin wird durch Bromwasser zu einer Säure (Streptomycinsäure) oxydiert und durch katalytisch erregten Wasserstoff in ein Dihydro-Derivat (Dihydro-streptomycin) übergeführt. Die Streptomycinsäure ist eine ziemlich starke Säure ($pK_1' = 2,35$) und zeigt im Ultrarotspektrum ein Absorptionsmaximum bei $6,06 \mu$, welches sich nach $5,81 \mu$ verschiebt, wenn man das Spektrum in Gegenwart von D_2O und DCI mißt. Bei der Methanolysen (Einwirkung von wasserfreier methanolischer Salzsäure) bildet sich erstens aus Streptomycin eine Methylglykosid-dimethylacetal-Verbindung (Methyl-streptobiosaminid-dimethylacetal: (I)^{7, 8)}), welche ein krystallisiertes Tetraacetat liefert⁹), zweitens aus Dihydro-streptomycin ein Methylglykosid (Methyldihydro-streptobiosaminid: (IX)¹⁹), welches ein Pentaacetat gibt und drittens aus der Streptomycinsäure ein Methylglykosid-methylester (Methyl-streptobiosaminidsäure-methylester: (X)¹⁹), welcher ein Tetraacetat liefert und außerdem im Ultrarotspektrum eine für ein Estercarbonyl typische Bande bei $5,77 \mu$ zeigt.



Diese Ergebnisse zeigen, daß offenbar eine freie Aldehyd-Gruppe vorliegt, die einmal zur Carboxyl-Gruppe oxydiert, zur Hydroxyl-Stufe reduziert und schließlich in eine Dimethylacetal-Gruppierung übergeführt worden ist. Damit im Einklang stehen die folgenden Beobachtungen:

Während Streptomycin unter Verbrauch von etwa einem Atom Sauerstoff (pro Mol Streptomycin) durch Hypojodit oxydiert wird, nimmt Dihydrostreptomycin unter gleichen Bedingungen keinen Sauerstoff auf²⁰⁾. Ferner liefert Streptomycin ein (amorphes) Oxim und ein krystallisiertes Thiosemicarbazone und Phenylhydrazone (die beiden letzteren Derivate lassen auch auf Grund ihres UV-Spektrums nur wenig Zweifel am Vorhandensein einer freien Carbonyl-Gruppe), während Dihydro-streptomycin und Streptomycinsäure keine Reaktivität gegenüber Carbonyl-Reagenzien zeigen.

Damit ist mit Sicherheit eine freie Carbonyl-Gruppe nachgewiesen. Auf Grund der Kenntnis des Glucosamin-Teils und des Streptidins sowie ihrer Verknüpfungsstellen mit dem Streptose-Teil (siehe oben), wissen wir ferner, daß diese Carbonyl-Gruppe sich im Streptose-Teil befinden muß. Damit

¹⁸⁾ Andere Autoren: Cater, Loo u. Shell, J. biol. Chemistry 168, 402, vertreten zwar die Ansicht, daß das Streptobiosamin an C₅ des Streptidins sitzt, können aber die Möglichkeit einer Bindung an C₄ nicht ganz ausschließen.

¹⁹⁾ Fried, Wintersteiner, J. Amer. Chem. Soc. 69, 79 [1947].

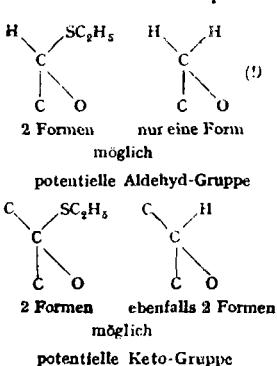
²⁰⁾ Lemieux, Polglase, DeWall, Wolfson, ebenda 68, 2747 [1946].

stimmt zum Beispiel auch überein, daß Methyl-dihydro-streptobiosaminid nach Hydrolyse mit starker Säure N-Methyl-l-glucosamin und nicht N-Methyl-l-glucosamin „*o*“ abspaltet, was der Fall sein müßte, wenn für die obigen Carbonyl-Reaktionen etwa die Aldehyd-Gruppe des Glucosamins verantwortlich wäre¹⁹). Der exakte Beweis, daß es sich um eine freie Aldehyd-Gruppe handelt, konnte schließlich durch Reduktion zur Methyl-Gruppe über das Diäthylmercaptal mittels Raney-Nickel erbracht werden. Dazu läßt man auf Streptomycin C_6H_8SH/HCl einwirken (Mercaptolyse) und kann dann das entstehende Äthyl-thio-streptobiosaminid-diäthylmercaptal (VI) durch Hydrerung in Gegenwart von Raney-Nickel in Didesoxy-dihydro-streptobiosamin (vgl. VIII) überführen, welches an Stelle der freien Aldehyd-Gruppe eine Methyl-Gruppe besitzt. Diese Methyl-Gruppe läßt sich im übrigen nach *Kuhn-Roth* mittels CrO_3 zusammen mit der bereits vorhanden gewesenen C-Methyl-Gruppe^{14, 20} (an C_6 der Streptose) nachweisen. Damit ist gleichzeitig festgestellt, daß die freie Aldehyd-Gruppe und die C-Methyl-Gruppe in der Streptose durch mehr als ein C-Atom voneinander getrennt sein müssen.

Die an C_1 der Streptose sitzende potentielle Aldehyd-Gruppe wurde auf folgendem Wege identifiziert:

Durch quantitativ ausgeführte Hypojodit-Oxydationen²⁰ von Streptomycin und Dihydro-streptomycin einerseits sowie von hydrolysiertem Streptomycin (Gemisch von Streptidin und Streptobiosamin) und hydrolysiertem Dihydro-streptomycin (Gemisch von Streptidin und Dihydro-streptobiosamin) andererseits ließ sich zeigen, daß jeweils nach der Hydrolyse ein O-Atom mehr verbraucht wird als vor der Hydrolyse. Damit war ein deutlicher Hinweis für eine potentielle Carbonyl-Gruppe, wie sie z. B. in Glucosiden vorliegt, gegeben.

Das Äthyl-thio-streptobiosaminid-diäthylmercaptal-tetraacetat (vgl. VI und VIII) läßt sich in zwei Diastereomere, welche sich durch die Stellung der $-SC_2H_5$ -Gruppe am asymmetrischen C-Atom 1 des Streptose-Teils unterscheiden (α - bzw. β -Form), trennen^{14, 15, 20}. Da beide in guter Ausbeute bei der Hydrerung mit Raney-Nickel in ein und dasselbe Didesoxy-dihydro-streptobiosamin-tetraacetat (VIII) übergehen, steht fest, daß es sich bei der potentiellen Carbonyl-Gruppe nicht um eine Keto-, sondern um eine Aldehyd-Gruppe handeln muß, denn nur im zweiten Fall verschwindet beim Austausch des $-SC_2H_5$ -Restes durch Wasserstoff die Asymmetrie des Carbonyl-C-Atoms.



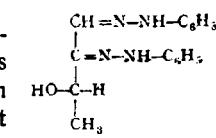
trennen^{14, 15, 20}. Da beide in guter Ausbeute bei der Hydrerung mit Raney-Nickel in ein und dasselbe Didesoxy-dihydro-streptobiosamin-tetraacetat (VIII) übergehen, steht fest, daß es sich bei der potentiellen Carbonyl-Gruppe nicht um eine Keto-, sondern um eine Aldehyd-Gruppe handeln muß, denn nur im zweiten Fall verschwindet beim Austausch des $-SC_2H_5$ -Restes durch Wasserstoff die Asymmetrie des Carbonyl-C-Atoms.

Da das – keine weiteren Acetyl-Gruppen aufnehmende – Methylstreptobiosaminid-dimethylacetal-tetraacetat (I mit einem N-Acetyl- und drei O-Acetyl-Resten im Glucosamin-Teil) noch ein aktives Wasserstoffatom (Zerewitinoff) enthält²¹, muß angenommen werden, daß die Streptose ein tertiäres, schwer acetylierbares Hydroxyl enthält²²). Eine weitere Hydroxyl-Gruppe in der Streptose ergibt sich aus der glykosidischen Bindung mit dem Glucosamin-Teil. Damit sind die fünf Sauerstoff-Funktionen der Streptose ($C_6H_8O_6$) zum größten Teil mit Sicherheit ermittelt.

Da die Streptose eine Methyl-Gruppe und zwei Aldehyd-Gruppen enthält, steht fest, daß sie ein verzweigtes C-Gerüst hat. Damit steht scheinbar im Widerspruch die Tatsache, daß der Streptose-Teil bei Einwirkung von kaltem wäßrigem Alkali auf Streptomycin z. T. in Maltol (α -Methyl- β -oxy- γ -pyron)^{19, 23}) übergeht, welches ein unverzweigtes C-Skelett besitzt. Jedoch kommt diesem Befund keine Beweiskraft zu, da unter den Bedingungen der Maltol-Bildung Umlagerungen nicht ausgeschlossen sind (vgl. dazu^{24, 25, 26}).

²¹) Brink, Kuehl, Flynn, Folkers, ebenda 68, 2557 [1946].
²²) Das Ultrarotspektrum des Methyl-streptobiosaminid-dimethylacetal-tetraacetats zeigt außerdem Absorption bei $2,75 \mu$ (-OH, -NH-Gebiet)²¹.
²³) Schenk, Spielman, ebenda 67, 2276 [1945].
²⁴⁾ Nef, Liebigs Ann. Chem., 376, 1 [1910].
²⁵⁾ Hoff, J. Amer. Chem. Soc., 48, 2665 [1926].
²⁶⁾ Maltol-Bildung tritt ein bei: Streptomycin, Methyl-streptobiosaminid-dimethylacetal (17% Ausbeute) und Methyl-N-acetyl-streptobiosaminid, nicht aber bei: Dihydro-streptomycin, Tetraacetyl-streptobiosamin, N-Acetyl-streptobiosamin und der Streptomycinsäure. Da

Wintersteiner und Mitarbeiter konnten zeigen²⁷), daß es sich bei der Streptose offenbar um einen I-Zucker handelt. Er isolierte aus einem Reaktionsgemisch von Phenylhydrazin und Streptomycin (72stündige Einwirkung in der Kälte) 4-Desoxy-I-erythrose(bzw. -threose-)phenylosazon:



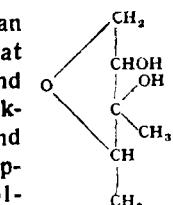
Er identifizierte dieses Osazon durch Synthese (aus Acetyl-l-lactylchlorid über das Diazoketon). Damit ist das Vorhandensein einer C-Methyl-Gruppe in Verbindung mit der Gruppierung: HO-CH-CH₃ festgestellt²⁸.

Eine olefinische Doppelbindung enthält die Streptose nicht¹⁴), da Didesoxy-dihydrostreptobiosamin-tetraacetat (VIII) bei 150° und 100 atm. Wasserstoffdruck in Gegenwart von Raney-Nickel keinen Wasserstoff aufnimmt.

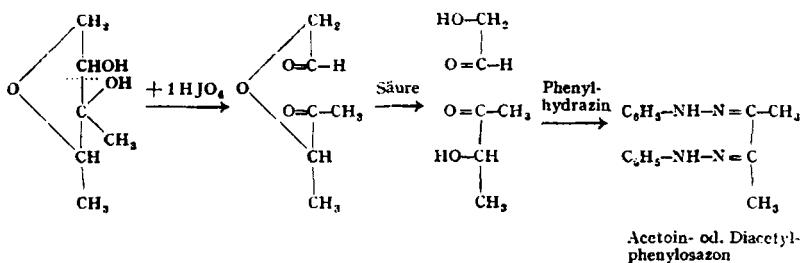
Es waren diese die wesentlichsten Reaktionen des Streptomycins und Streptobiosamins, welche Rückschlüsse auf Funktionen im Streptose-Teil zulassen. Die folgenden Umsetzungen an Derivaten des isolierten Streptose-Teils ermöglichen schließlich zusammen mit den bisherigen Ergebnissen die Aufstellung einer Konstitutionsformel für die Streptose und damit auch für das Streptomycin.

Didesoxy-streptose

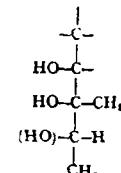
Dieses Abbauprodukt der Streptose erhält man aus Didesoxydihydro-streptobiosamin-tetraacetat (VIII) durch saure Hydrolyse. Wie Folkers und Mitarbeiter zeigen konnten²⁹), ist sie optisch aktiv, gibt mit Borsäure einen sauren Komplex und mit p-Nitro-benzoylchlorid in Pyridin ein Di-p-nitrobenzoat, woraus das Vorliegen einer Glykol-Gruppierung mit wahrscheinlich cis-ständigen Didesoxy-streptose-Hydroxylen hervorgeht. Ferner lassen sich nach *Kuhn-Roth* zwei C-Methyl-Gruppen nachweisen.



Bei der Einwirkung von Perjodat nimmt Didesoxystreptose ein Atom Sauerstoff auf. Wird das Reaktionsgemisch dann einer sauren Hydrolyse unterworfen, so kann man aus ihm, nach Einwirkung von Phenylhydrazin, Acetoinphenylosazon isolieren.



In dem Reaktionsgemisch muß also, wenn man die bereits bekannte Teilkonfiguration HO-CH-CH₃ der Streptose berücksichtigt, Acetoin vorhanden gewesen sein. Die Didesoxystreptose muß also bei der Glykolspaltung durch das Perjodat, da nur 1 O-Atom verbraucht wurde, in ein C-2 und ein C-4 Spaltstück zerfallen sein. Die beiden C-Atome der Glykol-Gruppierung gehen dabei in Carbonyl-C-Atome über. Der abgesprengte C-2-Teil muß mithin am Carbonyl-C-atom des Acetins gesessen haben. Wir kommen damit zu der nebenstehenden Teilstruktur für die Didesoxystreptose:



Eine der beiden Methyl-Gruppen hat in der Streptose als Aldehyd-Gruppe vorgelegen. Unter Berücksichtigung der bekannten Teilstruktur: HO-CH-CH₃ ist anzunehmen, daß es die an C_3 sitzende Methyl-Gruppe ist, was unten auch bestätigt wird. Die potentielle Aldehyd-Gruppe der Streptose ist deshalb nur noch an C_1 unterzubringen. Sie verliert bei der Darstellung der

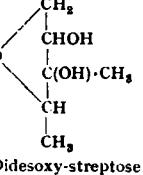
die Ausbeute beim Methyl-streptobiosaminid-dimethylacetal sehr gering ist, scheint es, daß Voraussetzung für die Maltol-Bildung eine glykosidische Gruppierung an C_1 und eine freie Aldehyd-Gruppe an C_6 der Streptose-Hälfte ist^{19, 21}.

²⁷⁾ Fried, Walz, Wintersteiner, ebenda 68, 2746 [1946].
²⁸⁾ Ungewöhnlich ist die Sprengung der C_3-C_4 -Bindung in der Streptose durch das Phenylhydrazin. Sie wird zusammenhängen mit der Dicarbonyl-Natur der Streptose; denn Dihydro-streptomycin erfährt keine derartige Umsetzung.
²⁹⁾ Brink, Kuehl, Flynn, Folkers, ebenda 68, 2403 [1946].

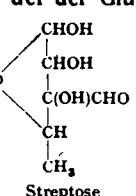
Didesoxystreptose ihr Halbacetalhydroxyl, welches durch Wasserstoff ersetzt wird, während der Sauerstoff-Ring der cyclischen Halbacetalform bestehen bleibt. Da nur ein Sauerstoffatom bei der Einwirkung von Perjodsäure auf die Didesoxy-streptose verbraucht wird, mit p-Nitrobenzoylchlorid nur zwei Hydroxyle festgestellt werden und die Streptose sicher ein γ -Laktol und kein β -Laktol ist, ergibt sich, daß das Hydroxyl an C_4 in der Didesoxystreptose nicht in dieser Form, sondern als Ätherbrücke zwischen C_4 und C_1 vorliegt:

Prüft man diese Formel an Hand der oben beschriebenen Ergebnisse der Reaktionen des Streptomycins und Streptobiosamins, so findet man sie in allen Punkten bestätigt und kommt außerdem schon zu einer sehr wahrscheinlichen Konstitutionsformel für die Streptose selbst.

Die Gruppierung $\text{HO}-\text{CH}-\text{CH}_3$ findet man im C_4 - C_5 -Teil der Didesoxystreptose wieder. Die freie Aldehyd-Gruppe der Streptose muß in der Didesoxy-streptose als Methyl-Gruppe vorliegen, wofür das Methyl an C_3 zur Verfügung steht. Die potentielle Aldehyd-Gruppe, welche die glykosidische Verbindung mit dem Streptidin vermittelt, kann nur an C_1 gesessen haben. Die Annahme, daß die Streptose ein verzweigtes C-Gerüst besitzt, sieht man bestätigt. Die vermutete tertiäre Hydroxyl-Gruppe, welche sich durch den positiven Zerewitinoff des Methyl-streptobiosaminid-dimethylacetal-tetraacetats zu erkennen gab, ist ebenfalls vorhanden und die Hydroxyl-Gruppe, an der der Glucosamin-Teil sitzt, befindet sich an C_2 . Damit ist für die Streptose die Konstitutionsformel abgeleitet³⁰⁾. Sie wird durch die folgenden Umsetzungen und Reaktionen, welche einer Arbeit von Folkers entnommen sind³¹⁾, noch weiter gesichert.



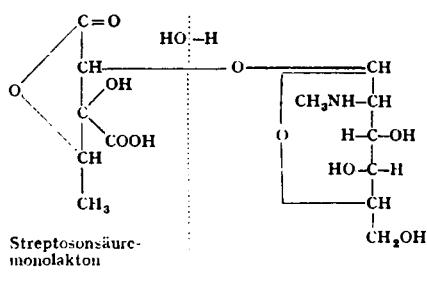
Didesoxy-streptose



Streptose

Streptosonsäure-monolakton und Streptosonsäure-diamid

Ausgehend vom Äthyl-thiostreptobiosaminid-diäthylmercaptal-tetraacetat (vgl. mit VI) bekommt man durch Umsetzung mit HgCl_2 in mit SrCO_3 gepufferter Lösung Streptobiosamin-tetraacetat, welches sich durch Brom zum Streptobiosaminsäure-monolakton



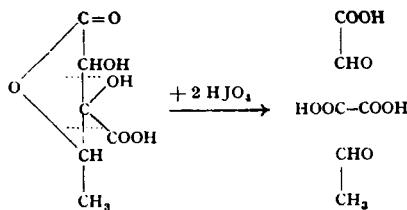
Streptobiosaminsäure-monolakton

oxydieren läßt. Durch saure Hydrolyse gewinnt man daraus Streptosonsäure-monolakton.

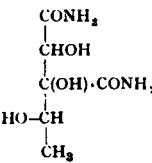
Es zeigt sich, daß alle Eigenschaften der Säure mit dieser Konstitution im Einklang stehen. So wird die Formulierung als Monolakton einer Dicarbonsäure bestätigt durch potentiometrische Messungen und das UR-Spektrum, welches ein Absorptionsmaximum bei $5,80 \mu$ (Carboxyl-Gruppe) und $5,62 \mu$ (Lakton-Gruppe) zeigt. Ferner gibt das Streptosonsäure-monolakton mit Essigsäureanhydrid in Pyridin ein Diacetat, eine positive Jodform-Reaktion und enthält nach Kuhn-Roth eine C-Methyl-Gruppe. Bei der Oxydation mit Perjodat werden zwei Atome Sauerstoff verbraucht, und im Reaktionsgemisch ein Mol Glyoxylsäure, ein Mol Oxalsäure und das Fehlen einer flüchtigen Säure nachgewiesen³²⁾.

³⁰⁾ Stavely, Wintersteiner, Fried, White, Moore, ebenda 69, 2742 [1947].
³¹⁾ Kuehl, Flynn, Brink, Folkers, ebenda 68, 2679 [1946].

³²⁾ Gewisse Unklarheit besteht noch bezüglich des Lakton-Ringes. Es ist zwar anzunehmen, daß ein γ -Lakton vorliegt, da diese Form bevorzugt ist. Nun gibt aber Streptobiosaminsäure-monolakton ein Pentaacetat. Man muß deshalb annehmen, daß die sonst übliche Resistenz der OH-Gruppe an C_3 des Streptose-Teils hier acylierend überwunden worden ist, oder daß hier ein β -Lakton-Ring vorliegt. Im letzten Fall könnte dann noch eine Acetyl-Gruppe an das sekundäre Hydroxyl an C_1 treten. Diese Unklarheiten betreffen jedoch nur das Streptosonsäure-monolakton bzw. die Streptosonsäure und lassen die Streptoseformel unberührt. — Der Perjodat-Verbrauch wurde bestimmt nach der Arsenit-Methode von Jackson, „Organic Reactions“, Vol. II S. 361.



Das Streptosonsäure-monolakton läßt sich in das Diamid der zu Grunde liegenden Dicarbonsäure überführen. Dieses Diamid verbraucht in Übereinstimmung mit der nebenstehend angegebenen Konstitution zwei Mol Perjodsäure. Im Reaktionsgemisch wurde ein Mol Acetaldehyd und keine flüchtige Säure aufgefunden.



Die Streptose-Formel und auch die vorweggenommene Streptomycin-Formel ist damit in allen Punkten bestätigt.

Unklarheit besteht nur noch bezüglich der sterischen Verhältnisse im Streptidin an allen sechs Ring-C-Atomen, im N-Methyl-L-glucosamin an C_1 und in der Streptose an C_1 , C_2 und C_3 .

Abschließend sei noch auf eine von Wintersteiner³³⁾ untersuchte Umwandlung des Dihydrostreptobiosamin-hydrochlorids und einige Fragen im Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus des Streptomycins eingegangen.

Wintersteiner fand, daß die erwähnte Verbindung bei der katalytischen Hydrierung ein Mol Wasserstoff aufnimmt und gleichzeitig unter Abspaltung von einem Mol Wasser eine innermolekulare Kondensation erfährt. Er konnte wahrscheinlich machen, daß die Hydrierung eine reduktive Kondensation der Aldehyd-Gruppe an C_1 der Streptose-Hälfte mit dem Wasserstoff am N der Methylimino-Gruppe im Glucosamin-Teil verursacht hat, so daß nach Acetylierung Pentaacetyl-tetrahydro-anhydro-streptobiosamin-hydrochlorid entstanden ist.

Bemerkenswert ist die geringe Basizität und außerdem die Resistenz der glykosidischen Bindung in dieser Substanz gegenüber starken Säuren (über Analogien siehe Schlubach³⁴⁾ und Haworth³⁵⁾).

Wie Wintersteiner³⁶⁾, Folkers³⁵⁾ und andere^{36, 37, 38)} zeigen konnten, hat das Dihydrostreptomycin annähernd dieselbe antibiotische Wirksamkeit, wie das Streptomycin, während die Streptomycinsäure und die Umsetzungsprodukte des Streptomycins mit Carbonylreagenzien und Cystein³⁹⁾ inaktiv sind. Rein formal findet man ähnliche Verhältnisse bei gewissen Herzgiften. So erfährt das Cymarin durch Reduktion seiner im Aglykon an C_{10} sitzenden Aldehyd-Gruppe zur primären Alkohol-Gruppe (Cymarol) keine Wirksamkeiteinbuße, wohl aber durch Oxydation zur Carboxyl-Gruppe³⁹⁾. Möglicherweise ist die Aldehyd-Gruppe in beiden Fällen verantwortlich für die Haftung am Wirkungsort (durch Reaktion mit $-\text{NH}_2$ und / oder $-\text{SH}$ -Gruppen³⁶⁾).

Weiterhin kann man annehmen, daß das Inosit-Derivat Streptidin im Streptomycin für die antibiotische Wirksamkeit von Bedeutung ist; denn Inosit ist als Wachstumsfaktor für Mikroorganismen bekannt. Eine Abwandlung desselben (unter Wahrung der sterischen Konfiguration!) hat schon in einem anderen Fall, dem des γ -Hexachlor-cyclohexans (Gammexan), welches ein starkes Insekticid und außerdem ein Antivitamin zum Inosit ist⁴⁰⁾, eine Umkehr der physiologischen Eigenschaften sichtbar werden lassen.

Ob Streptidin, Streptobiosamin oder Dihydrostreptobiosamin für sich antibiotisch wirksam sind, ist meines Wissens bisher noch nicht festgestellt worden. Schließlich muß auf die unnatürliche L-Konfiguration des Glucosamin-Teils im Streptomycin hingewiesen werden. Es sind bereits in mehreren Antibiotika biologisch

³³⁾ H. H. Schlubach, Behre, Liebigs Ann. Chem. 508, 16 [1934].

³⁴⁾ Haworth, Streight, Helv. Chim. Acta 15, 693 [1932].

³⁵⁾ Peck, Hoffrine, Folkers, J. Amer. Chem. Soc. 68, 1390 [1946].

³⁶⁾ Denkelwater, Cook, Tishler, Science [New York] 102, 12 [1945].

³⁷⁾ Geiger, Green, Waksman, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81, 187 [1946].

³⁸⁾ Bartz, Contourlis, Crooks, Rebstock, J. Amer. Chem. Soc. 68, 2163 [1946].

³⁹⁾ Chen, Anderson, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 90, 271 [1947].

⁴⁰⁾ Kirkwood, Phillips, J. biol. Chemistry 163, 251 [1946].

