

weitere Verdünnung mit Dioxan möglich, doch werden zu verdünnte Lösungen bereits vom Papier weitgehend zersetzt.

Wenn die vorauswandernde Front des Dioxans den oberen Rand des Papiers erreicht (nach ca. 30 min), wird das Papier aufgerollt und die obere Grenze des tiefroten Rhodanid-Bereiches eingezeichnet. Zur genauen Analyse muß der tiefste Punkt der Lücken mindestens 2 cm vom unteren Rand des Papiers entfernt sein. Die entstandenen Lücken werden umgezeichnet und planimetriert oder ausgeschnitten und gewogen.

Prof. Dr. E. Waldmann, Vorstand des Institutes für Organische Chemie der T. H. Wien, bin ich für die Erlaubnis zur Ausführung dieser Arbeit in seinem Institut zu besonderem Dank verpflichtet. Ferner danke ich Dr. H. Berbalk für wertvolle Hinweise und anregende Diskussionen.

Eingegangen am 3. Oktober 1955 [A 700]

Zuschriften

Hydrazin-Spaltung von Actinomycinen

Von Prof. Dr. H. BROCKMANN, Dr. G. BOHNSACK
und Dr. C. H. SÜLING

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

Beim Abbau von Actinomycin C₂ und C₃¹⁾ mit Hydrazinhydrat²⁾ (3 h, 140 °C) erhielten wir ein Gemisch von Abbauprodukten, aus dem durch chromatographische Adsorption eine kristallisierte Verbindung C₉H₁₆O₂N₂, [α]_D²⁰; -94 ° (Chloroform) vom Fp 118 °C (Kofler-Block, korrig.) abgetrennt werden konnte. Sie gab beim energischen Abbau mit konz. Salzsäure ein Hydrolysat, das im Papierchromatogramm zwei Flecken mit den R_F-Werten des Sarkosins und N-Methyl-valins zeigte. Da die kristallisierte Verbindung Ninhydrin-negativ ist, leicht sublimiert und sich in organischen Lösungsmitteln, z. B. Benzol gut löst, und da ferner ihr IR-Spektrum bis auf geringfügige Differenzen im Gebiet 6,75–7,50 μ mit dem des D,L-N-Methyl-valyl-sarkosinanhydrides übereinstimmt, halten wir es für sicher, daß ein Anhydrid aus (+)-N-Methyl-valin und Sarkosin vorliegt.

Eine eingehende Untersuchung der Hydrazin-Spaltung ergab, daß bereits unter Bedingungen, wie sie bei normalen Peptiden zur Endgruppenbestimmung angewandt werden³⁾ (12 % äthanolische Hydrazinhydrat-Lösung, 3 h, 100 °C) farblose, kristallisierte Spaltprodukte entstehen. Durch Abbau von Actinomycin I₁¹⁾ kamen wir so u. a. zu einer kristallisierten Verbindung, die mit dem aus Actinomycin C₂ und C₃ gewonnenen optisch aktiven N-Methyl-valyl-sarkosinanhydrid identisch ist. Daneben faßten wir ein zweites, kristallisiertes Spaltstück C₁₀H₁₆O₂N₂ vom Fp 138 °C, [α]_D¹⁹; -167 ° (Chloroform), das bei energetischer Säurehydrolyse zwei Aminosäuren mit den R_F-Werten des Proline und Valins lieferte. Da dieses zweite Abbauprodukt ebenfalls optisch aktiv, Ninhydrin-negativ, leicht sublimierbar und in organischen Solventien gut löslich ist, muß es ein Anhydrid aus den beiden Actinomycin-Aminosäuren L-Prolin und D-Valin sein.

N-Methyl-valyl-sarkosinanhydrid, das wir aus Actinomycin C₂, C₃ und I₁ in Ausbeuten von mindestens 1,2 Mol kristallisiert gewonnen haben, kommt als solches zweifellos nicht in den Actinomycinen vor, denn es enthält keine Gruppen, mit denen es in der Actinomycin-Moleköl verankert sein könnte. Am nahelegensten erscheint die Annahme, daß sich das Anhydrid aus zunächst entstandemem Sarkosyl-N-methyl-valin bzw. N-Methyl-valyl-sarkosin bildet, denn manche Methyl-aminoäure-dipeptide gehen ungewöhnlich leicht in Anhydride über⁴⁾. Wenn diese Vermutung richtig ist, beweist die Isolierung von mehr als 1 Mol N-Methyl-valyl-sarkosinanhydrid, daß in den 2 Mol Sarkosin und 2 Mol N-Methyl-valin enthaltenden⁵⁾ Actinomycinen C₂, C₃ und I₁, jede der beiden Sarkosin-Moleküle mit einer Moleköl N-Methyl-valin verknüpft ist.

Da Prolin-dipeptide ebenfalls leicht zu Anhydriden cyclisieren, ist zweifellos auch das aus Actinomycin I₁ gewonnene Prolyl-valinanhydrid ein Sekundärprodukt, das während der Hydrazinolyse aus einem Dipeptid entsteht. Seine Ausbeute (0,7 Mol) zeigt, daß auf jeden Fall 1 Mol des im Actinomycin I₁ vorhandenen L-Proline mit 1 Mol D-Valin verbunden ist.

Die Ergebnisse beim Hydrazin-Abbau haben uns veranlaßt, das Verfahren in größerem Maßstab auf die in unserem Institut isolierten Actinomycine anzuwenden. Dabei sind eine Reihe weiterer kristallisierte Abbauprodukte gefaßt worden.

Eingegangen am 17. August 1955 [Z 278]

¹⁾ H. Brockmann u. H. Gröne, Chem. Ber. 87, 1036 [1954].

²⁾ Vgl. A. Stoll, Th. Petzeltka u. B. Becker, Helv. chim. Acta 33, 57 [1950].

³⁾ K. Schlägl, F. Wessely u. E. Wawersich, Monatsh. Chem. 85, 957 [1954].

⁴⁾ P. A. Levene, H. S. Simmons u. M. H. Pfaltz, J. biol. Chem. 70, 42 [1926].

⁵⁾ H. Brockmann, G. Bohnsack u. H. Gröne, Naturwissenschaften 40, 223 [1953].

Neue farbige Abbauprodukte der Actinomycine

Von Prof. Dr. H. BROCKMANN und Dr. H. GRÖNE

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

Durch energische Säurehydrolyse erhielten wir aus Actinomycin C (Gemisch aus Actinomycin C₁, C₂ und C₃¹⁾) eine in karmoisinroten Plättchen oder Nadeln kristallisierende, Aminosäure-freie Verbindung C₁₅H₁₁O₄N (Zers. oberhalb 260 °C), die wir Actinocinin genannt haben. Sie ist isomer mit dem beim Baryt-Abbau der Actinomycine entstehenden Despeptido-actinomycin²⁾, unterscheidet sich von diesem aber spektroskopisch und chemisch in charakteristischer Weise.

Actinocinin enthält zwei C-Methyl- und zwei durch potentiometrische Titration in 50 proz. Dimethyl-formamid erfaßbare saure Gruppen. Eine davon ist ihrem pK-Wert nach eine Carboxy-Gruppe. Das N-Atom unseres Abbauproduktes ist so schwach basisch, daß eine potentiometrische Titration in Eisessig mit Perchlorsäure nicht möglich war.

Mit Methyljodid-Silberoxyd ließ sich Actinocinin in ein gelbes, kristallisiertes Dimethoxy-Derivat (Fp 210–211 °C) überführen, das in wäßrigem Alkali unlöslich ist, von konz. Mineralsäuren aber unter Farbvertiefung aufgenommen wird. Mit Benzoylchlorid-Pyridin gab Actinocinin ein kristallisiertes, rotes Dibenzoyl-Derivat (Fp 137–138 °C). Seinem IR-Spektrum nach enthält dieses Derivat eine Säureanhydrid-Gruppierung, die dem Actinocinin fehlt. Offenbar bildet die Carboxy-Gruppe des Actinocinins mit Benzoylchlorid ein gemisches Anhydrid. Der zweite Benzoyl-Rest ist zweifellos an eine Oxy-Gruppe gebunden.

Von den beiden restlichen Sauerstoffatomen des Actinocinins gehört mindestens eins einer chinoiden Carbonyl Gruppe an, die sich durch eine Bande bei 6,16 μ zu erkennen gibt. Über die Funktion des fünften Sauerstoffatoms lassen sich noch keine Aussagen machen.

Actinocinin bildet mit o-Phenyldiamin ein rotbraunes Kondensationsprodukt, eine Reaktion, die wir auf das Vorliegen einer zum chinoiden Carbonyl benachbarten Oxy-Gruppe zurückführen. Da solche Oxy-Gruppen ausgeprägte Acidität zeigen, ist somit auch die Natur der zweiten sauren Gruppe geklärt.

Neben Actinocinin erhielten wir ein zweites, kristallisiertes, Aminosäure-freies, rotes Säureabbauprodukt, das dem Actinocinin spektroskopisch sehr ähnlich ist, wie dieses zwei C-Methyl- und zwei saure Gruppen enthält und mit Zinn(II)-chlorid ein blaugrünes Reduktionsprodukt liefert. Im Gegensatz zum Actinocinin ist es Chlor-haltig und gibt beim Erwärmen mit wäßrigem Alkali eine grüne Lösung.

Bei der Säurehydrolyse gehen die Actinomycine zunächst in Desamino-actinomycine³⁾ über. Dabei tauscht der Farbstoffteil der Actinomycin-Moleköl, ohne daß Aminosäuren abgespalten werden, eine Amino-Gruppe gegen eine Oxy-Gruppe aus und erlangt damit die Fähigkeit, mit Zinn(II)-chlorid ein tiefgrünes, semichinoides Reduktionsprodukt⁴⁾ zu bilden. Geht die Säurehydrolyse über die Stufe des Desamino-actinomycins hinaus, so entstehen unter Freisetzung von Aminosäuren, Chromopeptide mit unterschiedlichem Peptid-Rest (Desamino-actinocyl-peptide), eine Reaktionsfolge, die schließlich, wenn alle Aminosäuren abgelöst sind, zum Actinocinin führt. Dabei treten am Farbstoffteil der Desamino-actinomycine bzw. der Desamino-actinocyl-peptide offenbar keine wesentlichen Veränderungen mehr ein, denn Actinocinin ist spektroskopisch den Desamino-actinomycinen sehr ähnlich und gibt ebenso wie diese mit Zinn(II)-chlorid ein tiefgrünes, semichinoides Reduktionsprodukt (Absorptionsspektrum sehr ähnlich wie das des grünen Semiechinons der Desamino-actinomycine⁵⁾.

¹⁾ H. Brockmann u. H. Gröne, Chem. Ber. 87, 1036 [1954].

²⁾ H. Brockmann u. N. Grubhofer, Naturwissenschaften 37, 494 [1950]; Chem. Ber. 86, 1407 [1953]; H. Brockmann u. H. Muxfeldt, Naturwissenschaften 41, 500 [1954]; diese Ztschr. 67, 617 [1955].

³⁾ H. Brockmann u. B. Franck, Chem. Ber. 87, 1767 [1954].

Beim Säureabbau der Actinomycine wird also ihr Chromophor im Gegensatz zum Baryt-Abbau nur wenig verändert.

Bemerkenswert ist, daß Actinocinin ebenso wie die Desaminoactinomycine nach Alkylierung oder Acylierung der im chinoiden Ring stehenden Oxy-Gruppe beim Umsatz mit Zinn(II)-chlorid nicht mehr die grüne, semichinoiden Zwischenstufe bildet, sondern sofort in die gelbe Dihydro-Verbindung übergeht.

Ein interessantes Zwischenprodukt der Reaktionsfolge Desamino-actinomycin → Actinocinin fanden wir in Form eines roten, kristallisierten Dimethylesters $C_{22}H_{22}O_9N_2$ (F_p 238–240 °C), der spektroskopisch dem Actinocinin sehr ähnlich ist und ebenso wie dieses mit Zinn(II)-chlorid ein grünes Reduktionsprodukt liefert (Absorptionsspektrum qualitativ dem des grünen Desamino-actinomycin-Reduktionsproduktes gleich). Das Hydrolysat dieses Abbauproduktes zeigt im Papierchromatogramm als einzige Aminosäure Threonin. Die dem Dimethylester zugrundeliegende Säure $C_{20}H_{18}O_8N_2$ bezeichnen wir als Desamino-actinoyl-threonin.

Desamino-actinoyl-threonin-dimethylester ist sehr schwach basisch und bildet mit Acetanhydrid-Pyridin ein kristallisiertes Monoacetat, das mit Zinn(II)-chlorid noch ein grünes Reduktionsprodukt gibt. Die schwache Basizität zeigt, daß die Amino-Gruppe des im Desamino-actinoyl-threonin enthaltenen Threonins nicht frei sein kann; aus der Bildung eines Monoacetates mit positiver grüner Zinn(II)-chlorid-Reaktion geht hervor, daß die Oxy-Gruppe des Threonins und nicht das dem Chinoncarbonyl benachbarte Hydroxyl acyliert worden ist.

Soweit wir sehen, spricht nichts gegen die Annahme, daß Desamino-actinoyl-threonin aus einer Actinocinin-Moleköl mit einer zusätzlichen Carboxy-Gruppe besteht, die Säureamid-artig mit der Amino-Gruppe einer Threonin-Moleköl verknüpft ist.

Eingegangen am 17. August 1955 [Z 277]

Abbau des Actinomycins C zu 2,5-Dioxy-toluchinon und 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxyazon-(2)

Von Prof. Dr. H. BROCKMANN und Dr. H. MUXFELDT
Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

Aus einem durch längeres Erwärmen mit 20proz. Salzsäure gewonnenen Hydrolysat von Actinomycin C wurden neben Actinocinin¹⁾ zwei neue farbige, Aminosäure-freie Abbauprodukte isoliert. Das eine, in nur sehr geringer Menge entstehende, löst sich violett in wäßrigem Natriumhydrogencarbonat, ist Stickstoff-frei, kristallisiert in orangefarbenen, bei 157–163 °C schmelzenden Blättchen und sublimiert bereits bei 100 °C. Seine reduzierende Acetylierung lieferte farblose Nadeln vom F_p 194–196 °C, die im Gemisch mit 2,3,5,6-Tetraacetoxy-toluol keine Schmelzpunkts-Depression zeigten.

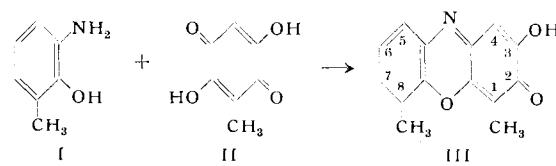
Kondensation dieses Abbauproduktes mit o-Aminophenol-hydrochlorid führte zu einer in rotbraunen Nadeln kristallisierten Verbindung, deren F_p (227–230 °C, Zers.) durch das aus 2,5-Dioxy-toluchinon-(3,6) und o-Amino-phenol erhaltene Kondensationsprodukt nicht verändert wird. Beide Kondensationsprodukte stimmen im Spektrum des sichtbaren sowie des UV- und IR-Gebietes überein. Damit ist das Abbauprodukt als 2,5-Dioxy-toluchinon-(3,6) (II) identifiziert.

Das zweite Abbauprodukt, orangefarbene Prismen vom F_p 242 °C (Zers.), hat die Bruttoformel $C_{14}H_{11}O_3N$ und enthält wie Actinocinin zwei C-Methyl-Gruppen. Seine Acetylierung führte zu einem kristallisierten, gelbroten Monoacetat $C_{16}H_{13}O_4N$ vom F_p 164 bis 166 °C, sein Umsatz mit o-Phenyldiamin gab ein kristallisiertes, braunes Kondensationsprodukt, das sich nicht acetylieren ließ. Die Beobachtung, daß unser Abbauprodukt mit Zinn(II)-chlorid ebenso wie 3-Oxy-phenoxyazon-(2) ein tiefblaues Reduktionsprodukt bildet und auch im Absorptionsspektrum dem 3-Oxy-phenoxyazon-(2) gleicht, ließ vermuten, daß es ein 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxyazon-(2) ist. In Einklang damit steht, daß der Abbau von Actinomycin C 2,5-Dioxy-toluchinon liefert, denn 3-Oxy-phenoxyazone können hydrolytisch zu 2,5-Dioxy-chinonen aufgespalten werden.

Da für eine systematische Konstitutionsaufklärung nicht genügend Material zur Verfügung stand, haben wir synthetisch zu klären versucht, ob unser Abbauprodukt ein 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxyazon-(2) ist und 2,5-Dioxy-toluchinon (II) mit verschiedenen Methyl-o-aminophenolen kondensiert. Dabei entstand aus II und 3-Amino-2-oxy-1-methyl-benzol (I) eine gelbrote, kristallisierte Verbindung, die im Spektrum des sichtbaren, UV- und IR-Gebietes vollkommen mit unserem Abbauprodukt übereinstimmt. Ihr kristallisiertes Acetat gab mit dem Acetat unseres Abbauproduktes keine F_p -Depression. An der Identität der beiden Verbindungen kann demnach kein Zweifel sein.

¹⁾ H. Brockmann u. H. Gröne, diese Ztschr. 68, 66 [1956].

Bei der Kondensation von I mit II kann theoretisch sowohl 3-Oxy-4,8-dimethyl-phenoxyazon-(2) als auch 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxyazon-(2) (III) entstehen. Um zu entscheiden, welche Möglichkeit für unser synthetisches Produkt zutrifft, haben wir I in



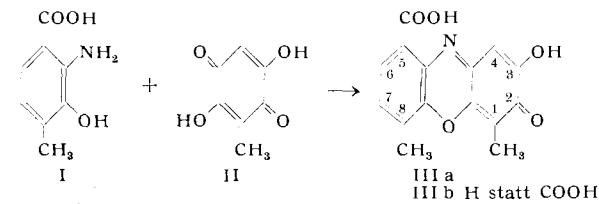
Benzol-Methanol mit Quecksilberoxyd oxydiert und die Lösung des Reaktionsproduktes mit 2n NaOH ausgeschüttelt. Im Benzol verblieb 3-Amino-1,8-dimethyl-phenoxyazon-(2)²⁾, das mit 50 proz. Essigsäure zum 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxyazon-(2) (III) verseift wurde. Da III in allen Eigenschaften mit unserem Abbauprodukt übereinstimmt und die Acetate der beiden Verbindungen keine F_p -Depression zeigen, ist für unser Abbauprodukt und damit auch für das aus I und II erhaltene 3-Oxy-dimethyl-phenoxyazon-(2) die Konstitution III bewiesen.

Eingegangen am 24. August 1955 [Z 279]

Konstitution und Synthese des Actinocinins

Von Prof. Dr. H. BROCKMANN und Dr. H. MUXFELDT
Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

Bei energetischer Säurehydrolyse von Actinomycin C entsteht neben Actinocinin³⁾ 2,5-Dioxy-toluchinon (II)⁴⁾ und 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxyazon-(2) (IIIb)⁴⁾. Actinocinin enthält seinem pK -Wert nach eine Carboxy-Gruppe³⁾, was durch das IR-Spektrum bestätigt wird, denn dieses hat eine Bande bei 5,80 μ , die beim Übergang in das Natriumsalz verschwindet. Da Actinocinin nur ein Kohlenstoff- und zwei Sauerstoff-Atome mehr enthält als 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxyazon-(2) (IIIb) und diesem spektroskopisch und in seinen Farbreaktionen sehr ähnlich ist, lag die Vermutung nahe, daß es sich von IIIb nur durch eine Carboxy-Gruppe unterscheidet.



Actinocinin liefert bei reduzierender Methylierung einen kristallisierten, gelben Dihydro-trimethyläther vom F_p 105–107 °C, der sich in konz. Mineralsäuren blaugrün löst. Sein IR-Spektrum zeigt eine Bande bei 2,90 μ , die einer NH-Gruppe zugeordnet werden muß. Während beim Dimethyläther des Actinocinins³⁾ die CO-Bande der Carbomethoxy-Gruppe bei 5,80 μ liegt, ist sie beim Dihydro-actinocinin-trimethyläther nach 5,89 μ verschoben, ein Effekt, den wir darauf zurückgeführt haben, daß die Carbomethoxy-Gruppe des Reduktionsproduktes an C_4 oder C_5 des Phenoxyazon-Gerüstes steht und sich deshalb eine Wasserstoff-Brücke zwischen Estercarbonyl und NH-Gruppe ausbilden kann. Als wir daraufhin die aus 2-Nitro-3-methoxy-4-methyl-benzoësäure hergestellte 2-Amino-3-oxy-4-methyl-benzoësäure (I) mit 2,5-Dioxy-toluchinon (II) kondensierten, erhielten wir eine kristallisierte, rote Verbindung, die in ihren Farbreaktionen, sowie im Spektrum des sichtbaren sowie des UV- und IR-Gebietes vollkommen mit Actinocinin übereinstimmt. Da in der vorhergehenden Mitteilung gezeigt ist, daß bei der Kondensation von 2-Amino-3-oxy-4-methyl-benzol mit II das 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxyazon-(2) (IIIb) entsteht, kann unserem aus I und II erhaltenen Kondensationsprodukt und damit auch dem Actinocinin die Formel IIIa zugeschrieben werden.

Eingegangen am 24. August 1955 [Z 280]

²⁾ Wie wir fanden, ist das von F. Kehrmann (Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 136 [1906]) durch Oxydation von 3-Amino-2-oxy-1-methylbenzol in wäßrig-alkalischer Lösung erhaltenen Oxydationsprodukt nicht einheitlich. Es besteht aus einem Gemisch von 3-Amino-1,8-dimethyl-phenoxyazon und 3-Oxy-4,8-dimethyl-phenoxyazon.

³⁾ H. Brockmann u. H. Gröne, diese Ztschr. 68, 66 [1956].
⁴⁾ H. Brockmann u. H. Muxfeldt, diese Ztschr. 68, 67 [1956].